

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 993**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2013** **PCT/EP2013/057150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013** **WO13150122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013** **E 13716756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2859008**

54 Título: **Oligonucleótidos modificados que comprenden funciones tiol y su uso para la detección de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

04.04.2012 FR 1253122

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2017

73 Titular/es:

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (EFS)
(25.0%)
20 avenue du Stade de France
93218 La Plaine Saint Denis, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%);
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER 1 (25.0%) y
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (25.0%)

72 Inventor/es:

FOURNIER-WIRTH, CHANTAL;
LEREAU, MYRIAM;
CANTALOUBE, JEAN-FRANÇOIS;
VASSEUR, JEAN-JACQUES;
MORVAN, FRANÇOIS;
MEYER, ALBERT;
MAYEN, JULIE;
CHAIX, CAROLE y
 FARRE, CAROLE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 624 993 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos modificados que comprenden funciones tiol y su uso para la detección de ácidos nucleicos

Campo técnico

La presente invención se refiere a un oligonucleótido modificado que posee dos o más funciones tiol, tal como se define en la reivindicación 1, que puede ser inmovilizado en una superficie de oro o una superficie injertada, especialmente una superficie que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida. La invención se refiere también a un procedimiento de detección de un ácido nucleico en una muestra biológica que comprende una etapa de detección de hibridación entre un oligonucleótido modificado y un ácido nucleico diana amplificado a partir de la muestra biológica. La invención se refiere más particularmente a un procedimiento de detección, genotipificación o secuenciación de un patógeno, preferentemente un virus.

Estado de la técnica

Debido a su estabilidad fisicoquímica y la especificidad conferida por la disposición sucesiva de los diferentes nucleótidos que los componen, los ácidos nucleicos constituyen moléculas extremadamente bien adaptadas para su uso en procedimientos de detección e identificación específicos de organismos humanos, animales, vegetales, bacterianos o virales.

Estas propiedades han dado lugar al desarrollo de biosensores (en inglés "*biosensors*") fiables y sensibles, que se componen clásicamente de un elemento de reconocimiento molecular y de un transductor. El elemento de reconocimiento molecular, llamado "sonda", se inmoviliza generalmente en la superficie del transductor y presenta una especificidad y una sensibilidad elevadas para una molécula de ácido nucleico "diana". El transductor desempeña un papel para convertir el evento de reconocimiento molecular, es decir, la hibridación entre las secuencias nucleotídicas de la sonda y la diana, en una señal fácilmente medible. Los biosensores explotan de este modo las capacidades de apareamiento de dos secuencias nucleotídicas complementarias contenidas en la sonda y la diana, y generan una señal cuando se produce la hibridación de dos secuencias.

Los biosensores se caracterizan por el modo de transducción utilizado para revelar la hibridación de secuencias sonda y diana.

Los biosensores con transducción directa permiten detectar la hibridación de secuencias sin recurrir a un marcado particular. Comprenden por ejemplo los sistemas electroquímicos, en los que la transducción se efectúa por reacciones de transferencia de electrones, tales como amperometría, basada en la detección de cambios de corriente para un potencial constante, conductimetría, que se basa en la detección de cambios de conductividad entre dos electrodos, o potenciometría, basada en la detección de cambios de potencial, para una corriente constante. Los biosensores con transducción directa comprenden también sistemas gravimétricos, basados en tecnologías piezoeléctricas, y utilizan por ejemplo las propiedades de un cristal de cuarzo, cuya frecuencia cambia en respuesta a modificaciones que se producen en su superficie. Generalmente rápidos y específicos, los biosensores con transducción directa presentan sin embargo una sensibilidad limitada (10^{-9} a 10^{-12} M). Los biosensores con transducción directa son muy adecuados para la realización de sistemas de diagnóstico de bajo costo, de uso único y portátiles.

Los biosensores con transducción indirecta necesitan, por su parte, el marcado de las secuencias de ácidos nucleicos diana, y requieren la aplicación de etapas de lavado antes de la detección. Los biosensores con transducción indirecta se presentan generalmente en forma de sistemas ópticos, en los que la detección se efectúa en un lector acoplado a un microscopio confocal, sobre la base de una emisión luminosa por uno o más marcadores fluorescentes en respuesta a una excitación inducida por un láser. Los biosensores con transducción indirecta requieren por tanto generalmente pesados instrumentos, complicados de manipular y necesitan personal cualificado, pero presentan una sensibilidad de detección elevada (10^{-12} a 10^{-15} M). Los biosensores con transducción indirecta constituyen la tecnología más utilizada en el campo del diagnóstico a base de ácidos nucleicos.

Los biosensores, con transducción directa o indirecta, permiten detectar miles o decenas de miles de hibridaciones de secuencias de ácidos nucleicos simultáneamente y se disponen generalmente en forma de una disposición ordenada de sondas inmovilizadas en forma de puntos en un soporte sólido. Cada punto contiene aproximadamente 10^6 sondas idénticas que poseen la misma secuencia nucleotídica, y la secuencia nucleotídica de las sondas difiere de un punto a otro.

Las "micromatrices" (en inglés "*microarrays*") son biosensores de alta complejidad, que comprenden 1.000 a 10^6 puntos de un tamaño de aproximadamente 20 a 50 μm . Son muy sofisticadas y costosas y se destinan principalmente a la secuenciación del ADN, al estudio de enfermedades genéticas y a análisis de polimorfismo. Este tipo de biosensor es desarrollado principalmente por las compañías Affymetrix, Illumina y Agilent. Las "macromatrices" (en inglés "*macroarrays*") son, por su parte, biosensores de baja complejidad que comprenden 1.000 a 10.000 puntos de un tamaño superior o igual a 200 μm .

La inmovilización de las sondas en los biosensores puede efectuarse por acoplamiento covalente o de manera no covalentemente. El acoplamiento covalente de la sonda con el transductor puede obtenerse por ejemplo por fotolitografía o por reacción de un oligonucleótido aminado con una superficie recubierta con silano funcionalizado. La sonda puede inmovilizarse asimismo en una superficie metálica, y especialmente en una superficie de oro, por ejemplo mediante un enlace entre un átomo de oro y un átomo de azufre. No obstante, el enlace Au-S es moderadamente alto, y un solo enlace oro-azufre no es suficiente para inmovilizar una sonda en la superficie de oro de forma muy estable. En efecto, los procedimientos de detección comprenden etapas, principalmente de lavado, que causan fuertes tensiones mecánicas que pueden desestabilizar el enlace Au-S.

La sonda puede acoplarse también con el transductor de manera no covalente, por ejemplo por adsorción electrostática. El acoplamiento no covalente puede por ejemplo resultar de la interacción entre los fosfatos cargados negativamente del ADN de la sonda y la superficie del transductor recubierta con γ -amino propilsilano o una capa de poli-L-lisina. Las interacciones no covalentes entre la sonda y el transductor resisten mal a las etapas de lavado aplicadas durante los procedimientos de detección, en particular cuando la detección se efectúa por transducción indirecta ya que la detección de la hibridación necesita, después de la etapa de hibridación, eliminar las secuencias de nucleótidos diana marcadas que no están unidas a la secuencia nucleotídica de la sonda. El acoplamiento no covalente tampoco permite modificar significativamente las condiciones operatorias para aumentar la rigurosidad de las etapas de hibridación o de lavado y hacerlas así más específicas.

El documento EP 0 523 978 desvela compuestos fosforamidita o fosfonato útiles para la producción de oligonucleótidos modificados por tioles. Estos compuestos pueden, sin embargo, introducirse solo una vez y únicamente en el extremo 5' de un oligonucleótido.

El documento US 7.601.848 desvela un compuesto polifuncional que comprende dos átomos de azufre que tiene por objeto incorporarse en los oligómeros con el fin de crear al menos dos enlaces oro-azufre y de este modo estabilizar el oligonucleótido en la superficie de oro. Algunos de estos compuestos comprenden una función fosforamidita. No obstante, los compuestos utilizados en la presente memoria se fabrican a partir de compuestos muy costosos y el acoplamiento del compuesto polifuncional en los oligonucleótidos no tiene un resultado satisfactorio debido al impedimento estérico de este compuesto. En la presente memoria, un agente de enlace es necesario con el fin de unir los compuestos tiol entre sí y de este modo efectuar una introducción múltiple de compuestos tiol en un oligonucleótido.

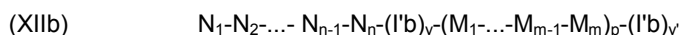
Los documentos JP 6 041 183 y US 7.601.848 describen un oligonucleótido modificado por funciones tiol. El documento EP 0 523 978 describe un oligonucleótido injertado con una función fosforamidita. El documento WO 2005/065405 describe un ionóforo activado por tiosulfonato que comprende un ionóforo, un grupo espaciador y un grupo funcional alquiltiosulfonato.

El objeto de la invención es por tanto desarrollar una sonda formada por un oligonucleótido que posee al menos dos funciones tiol, que puede injertarse de manera simple y eficaz en una variedad de soportes que comprenden tanto las superficies recubiertas con metal (por ejemplo, oro) como las superficies injertadas que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida. La sonda de la invención supera al menos parcialmente los inconvenientes mencionados anteriormente y permite aumentar la especificidad y la sensibilidad de detección de secuencias nucleotídicas diana, independientemente del tipo de transducción (directa o indirecta) aplicado durante la detección.

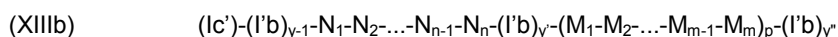
La invención también tiene por objeto proporcionar un procedimiento de detección, secuenciación y/o genotipificación de ácidos nucleicos de organismos patógenos o infecciosos o de genes responsables o implicados en enfermedades, que sea económico, rápido, sensible, más flexible y más fácil de automatizar que los procedimientos actuales.

Sumario de la invención

La presente invención describe un oligonucleótido modificado que corresponde a la fórmula (XIIb):

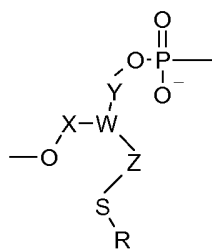


o a la fórmula (XIIIb):

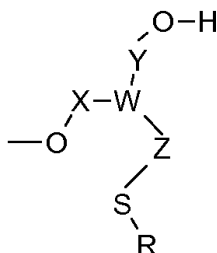


en las que,

$N_1, \dots, N_n$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,
 $M_1, \dots, M_m$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,
 $(I'b)$ representa un compuesto de fórmula:



(Ic') representa un compuesto de fórmula:



n es un número entero que varía de 4 a 100,

m es un número entero que varía de 4 a 100,

y es un número entero que varía de 2 a 12,

p representa 0 o 1,

y' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 e y' es igual a 0 si p vale 0,

y'' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 y si p vale 0 entonces y'' vale 0,

la suma de números enteros (y + y') o (y + y' + y'') se comprende entre 2 y 12,

X se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C1-C12, aminoalquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, cicloalquilo C3-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12,

Y se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C1-C12, aminoalquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, cicloalquilo C3-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12,

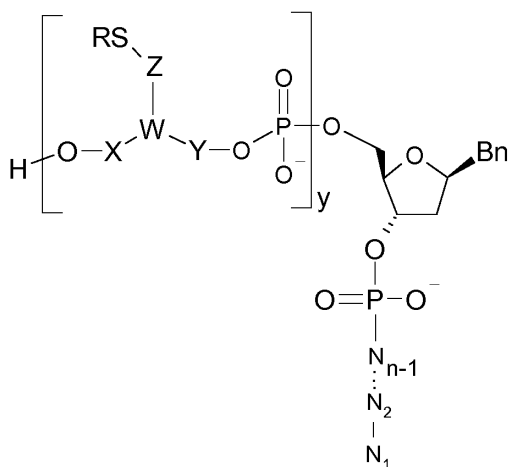
Z se selecciona entre los grupos alcoxi C1-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12, NCO-alquilo C1-C12, CON-alquilo C1-C12,

W se selecciona entre los grupos alcano tri-ilo C1-C12, los grupos arilo tri-ilo C6-C18 y los grupos aralcano tri-ilo C6-C18, preferentemente un grupo seleccionado entre CH, CCH₃, CCH₂CH₃, ciclohexano tri-ilo y benceno tri-ilo,

R es H o se selecciona entre los grupos acilo C1-C12, S-alquilo C1-C12, S-arilo C6-C12, S-2-piridina, S-heteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C1-C12, S-cicloalquilo C3-C12, S-cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12, y

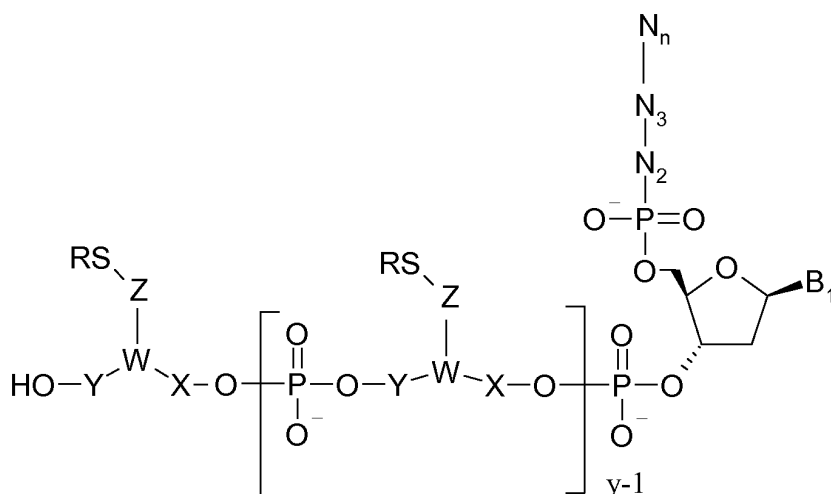
R₁ se selecciona entre los grupos 2-cianoetilo o R'₁R'₂R'₃SiCH₂CH₂, en el que R'₁, R'₂ y R'₃ son idénticos o diferentes y representan un grupo seleccionado entre alquilo lineal o ramificado que comprende 1 a 12 átomos de carbono y arilo C6-C12.

El oligonucleótido modificado de la invención corresponde a la fórmula:



en la que n, y, N₁, ..., N_{n-1}, X, Y, Z, W y R tienen la misma definición que anteriormente, y B_n representa la base del enésimo nucleótido.

Según otro modo de realización de la invención, el oligonucleótido modificado corresponde a la fórmula:



en la que n , y , N_2 , ..., N_n , X , Y , Z , W y R tienen la misma definición que anteriormente, y B_1 representa la base del 1^{er} nucleótido.

Según un modo de realización de la invención, el oligonucleótido modificado, como el que se ha descrito anteriormente, comprende una secuencia de nucleótidos ($N_1-N_2-...-N_{n-1}-N_n$) y, opcionalmente, una secuencia de nucleótidos ($M_1-M_2-...-M_{m-1}-M_m$) que son específicas de un virus, una bacteria o un gen responsable o implicado en una enfermedad.

Según un modo de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) y, opcionalmente, la secuencia de nucleótidos (M₁-M₂-...-M_{n-1}-M_n) se selecciona entre:

- 10 - las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36, específicas del virus de la hepatitis C (VHC),
- las secuencias SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 40, específicas de flavivirus,
- la secuencia SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 41, específica del virus del dengue, o
- la secuencia SEQ ID NO: 19, específica del virus del Nilo Occidental (VNO).

15 Según un modo de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos ($N_1-N_2-...-N_{n-1}-N_n$) y, opcionalmente, la secuencia de nucleótidos ($M_1-M_2-...-M_{n-1}-M_n$) tienen una estructura de tipo anómero alfa, anómero beta, lineal, o tallo-bucle ("caracol").

20 Otro objeto de la invención se refiere a un sustrato injertado con al menos un oligonucleótido modificado como se ha descrito anteriormente, dicho sustrato comprende al menos una zona de recepción recubierta con una sustancia tolerante al injerto de dicho oligonucleótido modificado.

Según un modo de realización de la invención, dicha zona de recepción de dicho sustrato injertado se recubre con una película de oro o platino, y dicho sustrato es de metal, preferentemente de cobre, o dicha zona de recepción comprende en su superficie al menos un doble enlace carbono-carbono (función alqueno) o un triple enlace carbono-carbono (función alquino) o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida, y dicho sustrato es de plástico, preferentemente de poliestireno. Según un modo de realización de la invención, los sustratos utilizados son polímeros no conductores. Según otro modo de realización de la invención, los sustratos utilizados para aplicar la invención son conductores.

Según un modo de realización de la invención, el sustrato injertado plano (en parte o en su totalidad) o curvado, puede adoptar preferentemente una forma esférica. Según un modo de realización, el sustrato es no plano, por ejemplo, se encuentra en forma de micropartículas o nanopartículas, y son preferentemente magnéticas.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de detección de al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica, que comprende una etapa de detección de dicho ácido nucleico diana con al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado, tal como se ha descrito anteriormente.

35 Según un modo de realización de la invención, el procedimiento de detección de la invención comprende las etapas de:

- obtención de al menos un ácido nucleico fuente a partir de una muestra biológica,
- producción de un amplicón por amplificación de dicho ácido nucleico diana a partir del ácido nucleico fuente, y
- detección de la hibridación de dicho amplicón con al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado, como se ha descrito anteriormente.

Según un modo de realización de la invención, el procedimiento de detección de la invención permite determinar el genotipo y/o subtipo de un virus presente en una muestra biológica, y comprende:

- la generación de un amplicón por amplificación de una secuencia nucleotídica diana, que corresponde a una región genómica del virus que porta la información relativa al genotipo y/o subtipo viral, y
- 5 - la detección de la hibridación de dicho amplicón con al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado como se ha descrito anteriormente con una sonda específica de un genotipo y/o subtipo viral.

Según un modo de realización de la invención, la etapa de producción del amplicón del procedimiento de detección de la invención se realiza con una mezcla de cebadores nucleotídicos, preferentemente seleccionados entre los pares de cebadores:

- SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, cuando se genera el amplicón a partir del VHC, independientemente del genotipo viral en cuestión. Este par de cebadores es genérico y permite amplificar un amplicón "largo" de 401 nt a partir de cualquier genotipo de VHC;
- SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9, el par que permite la generación de amplicones "cortos" de 191 nt específicos del genotipo 1a/1b;
- 15 - SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 9, el par que permite la generación de amplicones "cortos" de 108 nt específicos del genotipo 2;
- SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11, el par que permite la generación de amplicones "cortos" de 143 nt específicos del genotipo 3a;
- 20 - SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 30, el par que permite la generación de amplicones "cortos" de 175 nt específicos del genotipo 4a/4d; y
- SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, y/o SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 21 cuando se genera el amplicón a partir de un flavivirus.

Otro objeto de la invención se refiere a un kit de detección de al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica, que comprende:

- al menos un oligonucleótido modificado como se ha descrito anteriormente y al menos un sustrato que comprende al menos una zona de recepción recubierta con una sustancia tolerante al injerto de dicho oligonucleótido modificado, dicha zona de recepción está preferentemente recubierta con oro, platino o comprende al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida,
- 30 - al menos un sustrato injertado como se ha descrito anteriormente.

La presente invención describe un oligonucleótido que posee una secuencia nucleotídica seleccionada entre las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41.

- 35 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un oligonucleótido o de un oligonucleótido modificado como los que se han descrito anteriormente o de un sustrato injertado como se ha descrito anteriormente para detectar al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica.

Según un modo de realización de la invención, dicho uso permite el diagnóstico o el genotipo de cepas virales, preferentemente del VHC, virus del dengue o del Nilo Occidental.

- 40 Las ventajas de la presente invención son las siguientes:

- el oligonucleótido modificado de la invención que porta las funciones tiol es barato de producir,
- el oligonucleótido modificado de la invención puede inmovilizarse de manera estable en una superficie de oro, o en una superficie que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida,
- 45 - el uso del oligonucleótido modificado de la invención en procedimientos de detección, secuenciación y/o genotipificación de ácidos nucleicos permite detectar específicamente las secuencias nucleotídicas diana de varios cientos de nucleótidos,
- la secuencia nucleotídica del oligonucleótido modificado de la invención es ventajosamente más corta que la de las sondas utilizadas en los procedimientos de detección y/o genotipificación conocidos, presentando además una mejor sensibilidad y especificidad de detección.
- 50

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes para la lectura de la siguiente descripción de un modo de realización preferente de la invención, dada a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos anexos.

Breve descripción de las figuras

- 55 La figura 1 muestra un esquema que describe un procedimiento de síntesis de compuestos (I). Las figuras 2A y 2B representan respectivamente un esquema que describe un procedimiento de síntesis de un

oligómero de los compuestos de la invención a partir de compuestos (Ia) y a partir de compuestos (Ib).

La figura 3 representa un esquema que describe un procedimiento de síntesis de un compuesto (XIIc) oligonucleotídico injertado con un oligómero de (I) en su extremo 5'.

La figura 4 representa un esquema que expone un procedimiento de síntesis de un compuesto (XIIc) oligonucleotídico injertado con un oligómero de (I) en su extremo 3'.

La figura 5 representa un histograma de la tasa de injerto de oligonucleótidos modificados en una superficie de oro.

La figura 6 representa un esquema que expone la estabilidad del injerto de oligonucleótidos modificados en una superficie de oro en función del tiempo a 60 °C.

La figura 7 representa un esquema que expone la estabilidad del injerto de oligonucleótidos modificados en una superficie de oro en función del tiempo a 80 °C.

Las figuras 8 y 9 representan diagramas que esquematizan los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda tetratiol de tipo 3a.

La figura 10 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda tetratiol de tipo 1a/1b.

La figura 11 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con sondas de tipo 1a/1b que portan 1, 2, 4, 6 u 8 grupos tiol.

La figura 12 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda de tipo 1a/1b monotiol con diferentes densidades de injerto.

La figura 13 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda de tipo 1a/1b ditiol con diferentes densidades de injerto.

La figura 14 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda de tipo 1a/1b tetratiol con diferentes densidades de injerto.

La figura 15 representa los resultados de un ensayo de hibridación sonda/diana con una sonda tetratiol injertada en una superficie de oro.

La figura 16a representa las reacciones entre el oligonucleótido modificado según la invención y la superficie injertada con grupos alquenoil o alquinilo activados.

La figura 16b representa las reacciones entre el oligonucleótido modificado según la invención y la superficie injertada con grupos alquenoil o alquinilo con activación luminosa ($\lambda = 265 \text{ nm}$).

La figura 17 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda VHC tetratiol de tipo 1a/1b.

La figura 18 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una mezcla de dos sondas VHC tetratiol de tipos 2a/2c y /2b.

La figura 19 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda VHC tetratiol de tipo 3a.

La figura 20 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda VHC tetratiol de tipo 4a/4d.

La figura 21 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda tetratiol genérica para los flavivirus.

La figura 22 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda tetratiol específica del serotipo 4 del dengue.

La figura 23 representa un diagrama que esquematiza los resultados de los ensayos ELOSA con detección por fluorescencia, realizados con una sonda tetratiol genérica para el virus del Nilo Occidental.

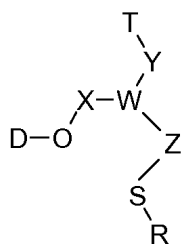
Exposición de los modos de realización de la invención

La presente solicitud describe la preparación de compuestos con estructura fosforamidita, H-fosfonato o compuestos unidos a un soporte sólido que presenta una función tiol protegida. Estos compuestos tiol tienen por objeto introducirse en los oligonucleótidos para formar los oligonucleótidos modificados según la invención. Los oligonucleótidos modificados así obtenidos pueden presentar varias funciones tiol.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a oligonucleótidos modificados que pueden obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente y que comprenden 2 a 12 funciones tiol. Otro objeto de la invención se refiere al uso de tales oligonucleótidos modificados para detectar al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica.

Compuesto tiol

Los compuestos tiol que tienen por objeto introducirse en los oligonucleótidos modificados de la presente invención corresponden a la siguiente fórmula (I):



(I)

en la que:

T es un grupo seleccionado entre -O-P(OR₁)N(R₂)₂, -O-PH(O)O⁻, -OC(O)J
C(O)NH-,

- 5 o R₁ se selecciona entre los grupos 2-cianoetilo, R'₁R'₂R'₃SiCH₂CH₂, y R'₁ R'₂, R'₃, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado entre alquilo lineal o ramificado que comprende 1 a 12 átomos de carbono y arilo C₆-C₁₂,
 o R₂ se selecciona en los grupos alquilo lineal o ramificado que comprenden 1 a 12 átomos de carbono, pirrolidina,
 10 o J se selecciona entre un enlace sencillo, un grupo -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂-, -CH₂OPhOCH₂- en el que Ph es un bencilo,
 o representa un soporte sólido,

D es un grupo protector de alcoholes,

- 15 W se selecciona entre el grupo alcano tri-ilo C₁-C₁₂, el grupo arilo tri-ilo C₆-C₁₈ y el grupo aralcano tri-ilo C₆-C₁₈,

Z se selecciona entre los grupos alcoxi C₁-C₁₂, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C₃-C₁₂, NCO-alquilo C₁-C₁₂, CON-alquilo C₁-C₁₂,

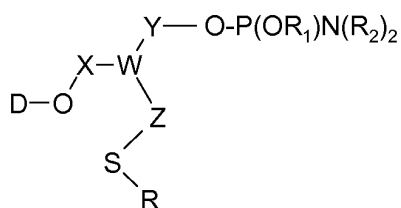
- 20 Y se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C₃-C₁₂,

- X se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C₃-C₁₂,

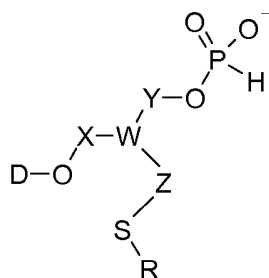
R se selecciona entre los grupos acilo C₁-C₁₂, S-alquilo C₁-C₁₂, S-arilo C₆-C₁₂, S-2-piridina, S-heteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C₁-C₁₂, S-cicloalquilo C₃-C₁₂, S-cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C₃-C₁₂.

- 25 En el sentido de la presente invención, por "alcano tri-ilo", se entiende los alcanos tri-ilo lineales, ramificados o cíclicos, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo. Entre los grupos arilo tri-ilo que pueden estar presentes en el compuesto según la invención, pueden mencionarse el benceno tri-ilo y el naftaleno tri-ilo. Entre los grupos aralcano, pueden mencionarse el 1,3,5-trimetilbenceno tri-ilo y el trimetilnaftaleno tri-ilo.

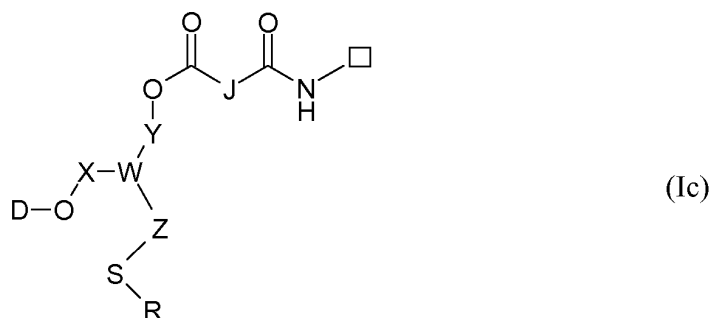
- 30 El compuesto (I) puede distinguirse en tres subcompuestos (Ia), (Ib) y (Ic) que corresponden a las fórmulas (Ia), (Ib) y (Ic) anteriores en las que los parámetros X, Y, Z, R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que la expuesta anteriormente para la fórmula (I):



(Ia)



(Ib)



Preferentemente, R_1 se selecciona entre los grupos 2-cianoetilo y $R'_1R'_2R'_3SiCH_2CH_2$, y R'_1 , R'_2 , R'_3 idénticos o diferentes que representan un grupo seleccionado entre los grupos alquilo lineal o ramificado que comprenden 1 a 6 átomos de carbono, fenilo; preferentemente R_1 se selecciona entre los grupos 2-cianoetilo y $R'_1R'_2R'_3SiCH_2CH_2$, y R'_1 , R'_2 , R'_3 idénticos o diferentes que representan un grupo seleccionado entre los grupos alquilo lineal o ramificado que comprenden 1 a 3 átomos de carbono, fenilo; incluso más preferentemente R_1 se selecciona entre los grupos 2-cianoetilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trifenilsilil)etilo, 2-(difenilmetilsilil)etilo.

Preferentemente, R_2 se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado que comprenden 1 a 6 átomos de carbono. Preferentemente, R_2 es un grupo isopropilo (iPr).

Preferentemente, el soporte sólido $\square$ se selecciona entre resinas, en particular entre las resinas a base de poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, perlas de vidrio, geles de sílice.

Preferentemente, W se selecciona entre los grupos alcano tri-ilo C1-C6, un grupo arilo tri-ilo C6-C12, un grupo aralcano tri-ilo C6-C12, más particularmente entre los grupos CH, CCH_3 , CCH_2CH_3 , ciclohexanos tri-ilo y bencenos tri-ilo.

Preferentemente, D se selecciona entre los grupos protectores de alcoholes que permiten una desprotección ortogonal con respecto a otros grupos del compuesto (I). Más particularmente, D se selecciona entre 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr), 9-fenilxanten-9-ilo (pixilo) o fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). El grupo protector pixilo se describe específicamente en el documento de Chattopadhyaya y Reese, *Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1978, 639-640. Otro grupo protector de alcoholes puede ser un grupo terc-butil-dimetilsililo, en este caso, será particularmente preferente un soporte de poliestireno.

Preferentemente, Z se selecciona entre los grupos aminoalquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C6, NCO-alquilo C1-C6, CON-alquilo C1-C6.

Preferentemente, Y se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C1-C6, aminoalquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, cicloalquilo C3-C6, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C6.

Preferentemente, X se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C1-C6, aminoalquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, cicloalquilo C3-C6, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C6.

Preferentemente, R se selecciona entre los grupos acilo C1-C12, S-alquilo C1-C6, S-arilo C6, S-heteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C6, S-cicloalquilo C6, S-cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C6.

Según un modo de realización, los alquilos lineales o ramificados se seleccionan entre grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, isopropilo, isobutilo, *terc*-butilo.

Según un modo de realización, los aminoalquilos se seleccionan entre los grupos aminometilo, aminoetilo, aminopropilo, aminobutilo, aminopentilo, aminohexilo, aminoheptilo, aminooctilo, aminononilo, aminodecilo, aminoundecilo, aminododecilo, aminoisopropilo, aminoisobutilo, amino-*terc*-butilo que comprende uno o más átomos de nitrógeno.

Según un modo de realización, los alcoxi se seleccionan entre los grupos metoxi, etoxi, propiloxi, oxibutiloxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, isopropiloxi, isobutiloxi, *terc*-butiloxi que comprenden uno o más átomos de oxígeno.

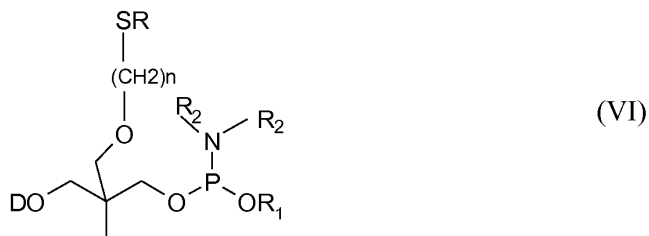
Según un modo de realización, los cicloalquilos se seleccionan entre los anillos, que comprenden opcionalmente una o más insaturaciones, que comprenden 3 a 12 átomos de carbono, preferentemente 6 átomos de carbono.

Según un modo de realización, los cicloheteroalquilos se seleccionan entre anillos sustituidos con uno o más átomos de nitrógeno y/u oxígeno, que comprenden opcionalmente una o más insaturaciones y que comprenden 3 a 12 átomos de carbono, preferentemente 5 átomos de carbono y un átomo de nitrógeno u oxígeno.

Según un modo de realización, los NCO-alquilos y CON-alquilos son grupos en los que los alquilos pueden ser alquilos lineales o ramificados seleccionados entre los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, isopropilo, isobutilo, *terc*-butilo.

Según un modo de realización, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y/o R₁ es un grupo cianoetilo.

- 5 Según un modo de realización preferente, el compuesto tiol (Ia) es el compuesto (VI) que corresponde a la siguiente fórmula:



en la que,

- 10 n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente comprendido entre 1 y 6,
R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr), y R₁ es un grupo cianoetilo.

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

Según otro modo de realización, el compuesto tiol (Ia) es el compuesto (VII) que corresponde la siguiente fórmula:



15

en la que,

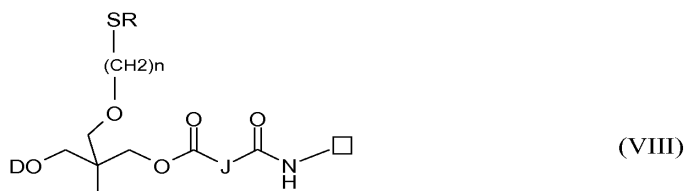
n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente comprendido entre 1 y 6,
R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr), y R₁ es un grupo cianoetilo.

- 20 Preferentemente, R es un grupo acetilo.

Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

Según un modo de realización, el compuesto tiol (Ic) es el compuesto (VIII) que corresponde a la siguiente fórmula:

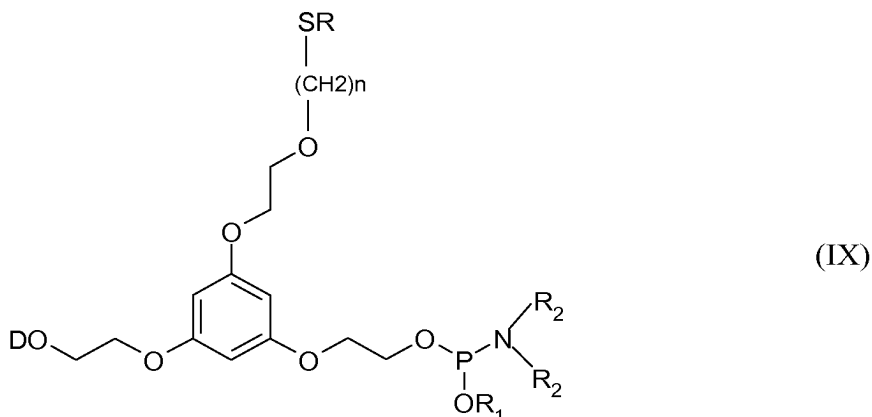


en la que,

- 25 n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente entre 1 y 6,
R y □ tienen la misma definición que anteriormente para (Ic).

Preferentemente, R es un grupo acetilo. Preferentemente, J es un grupo etilo. Preferentemente D es 4,4'-dimetoxitritilo.

Según un modo de realización, el compuesto tior (Ia) es el compuesto (IX) de la fórmula:



en la que,

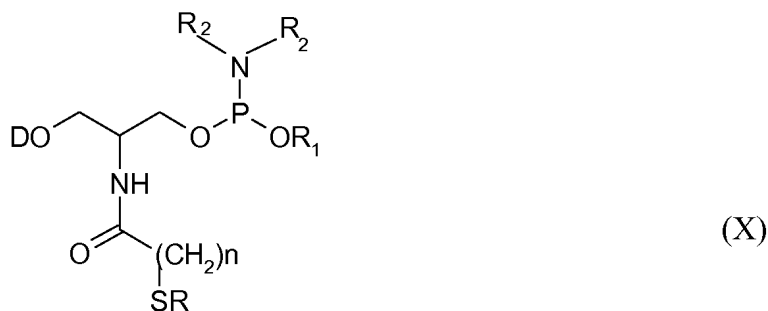
- 5 n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente entre 1 y 6,
 R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y R₁ es un grupo cianoetilo.

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

Según un modo de realización, el compuesto tior (Ia) es el compuesto (X) de fórmula:



10

en la que,

- n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente entre 1 y 6,
 R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y R₁ es un grupo cianoetilo.

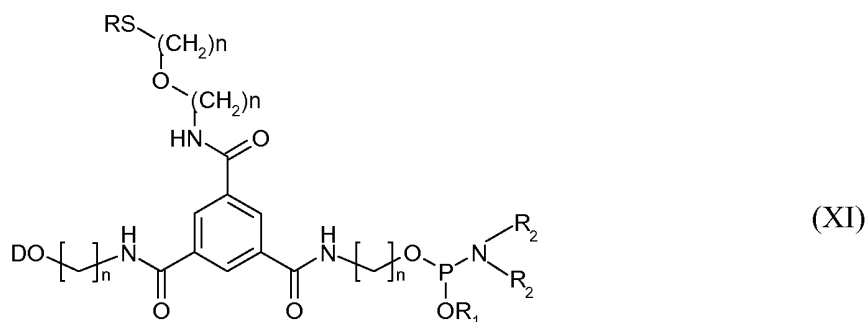
15

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y R₁ es un grupo cianoetilo.

Según un modo de realización, el compuesto tior (Ia) es el compuesto (XI) de fórmula:



en la que,

n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente comprendido entre 1 y 6,
R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

- 5 Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y R₁ es un grupo cianoetilo.

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

Procedimiento de fabricación

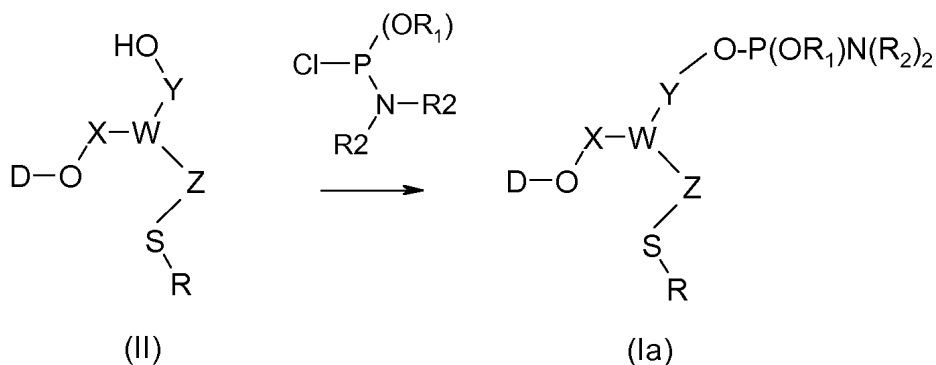
El procedimiento de fabricación de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) se representa en el esquema de la figura 1.

- 10 Los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) se obtienen a partir del mismo compuesto (II) que presenta la siguiente fórmula:

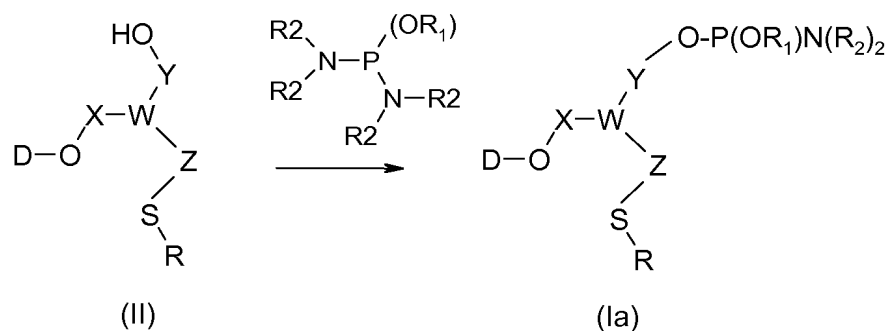


en la que D, X, W, Y, Z y R tienen la misma definición que en el compuesto tiol (I).

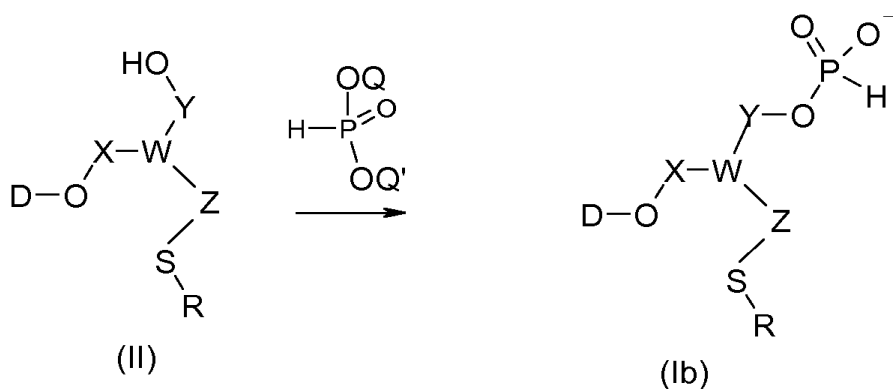
El compuesto de fórmula (Ia) puede obtenerse según la reacción representada en el siguiente esquema:



- 15 o según la reacción representada en el siguiente esquema, preferentemente en presencia de sal de tetrazolida de diisopropilamina:



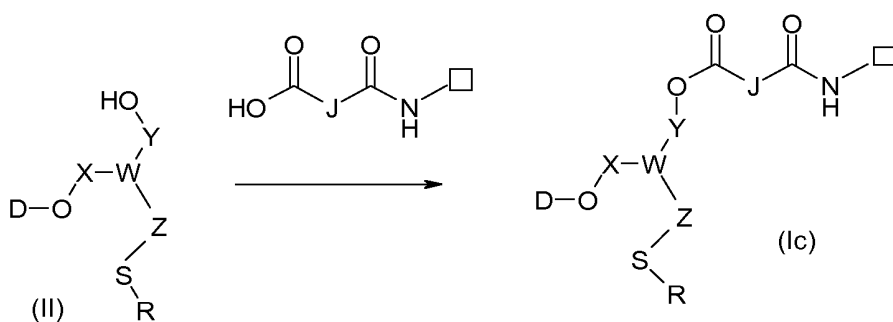
El compuesto de fórmula (Ib) puede obtenerse según la reacción representada en el siguiente esquema:



en la que Q y Q' representan, independientemente uno del otro, un grupo benceno sustituido o no.

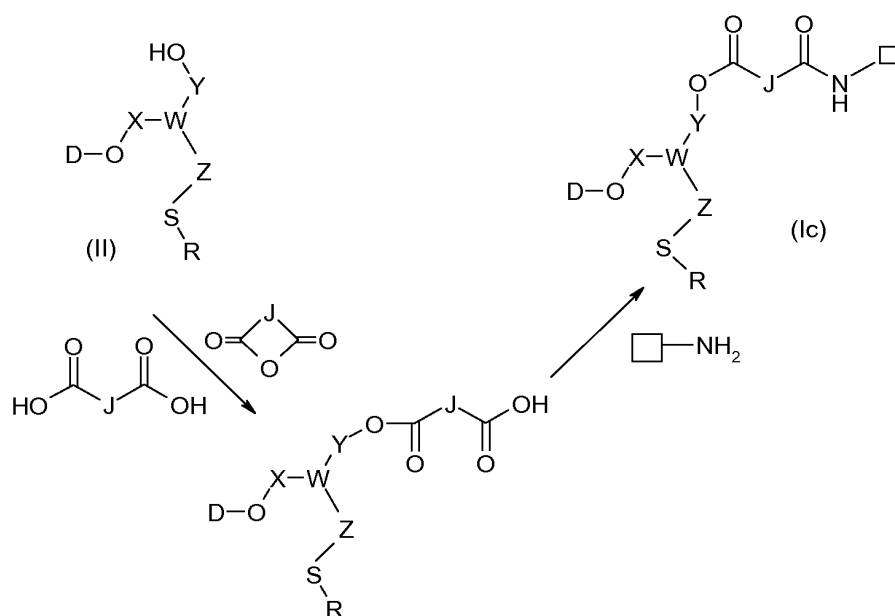
- 5 La reacción precedente de obtención del compuesto (Ia) o (Ib) se efectúa a partir del compuesto (II), preferentemente en presencia de una base, por ejemplo diisopropiletilamina (DIEA), en un disolvente anhidro, tal como diclorometano anhidro.

El compuesto de fórmula (Ic) se obtiene asimismo a partir del compuesto (II) pero preferentemente según la etapa de reacción representada en el siguiente esquema:



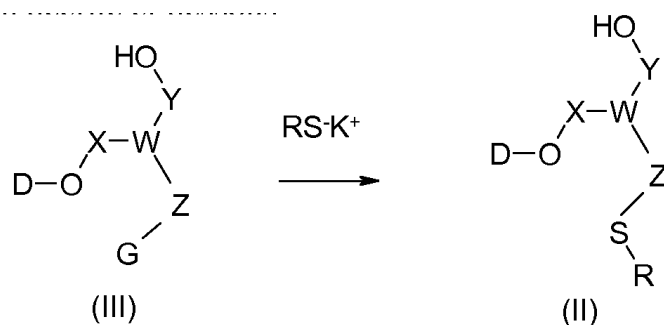
La reacción precedente de obtención del compuesto (Ic) se efectúa preferentemente en un disolvente anhidro, tal como piridina, en presencia de una base, tal como trietilamina.

Asimismo puede obtenerse el compuesto (Ic) según el siguiente esquema de reacción:



El compuesto (II) de fórmula anterior, en la que los grupos X, W, Z, Y y R tienen la misma definición que en el compuesto (I), corresponde a un modo de realización.

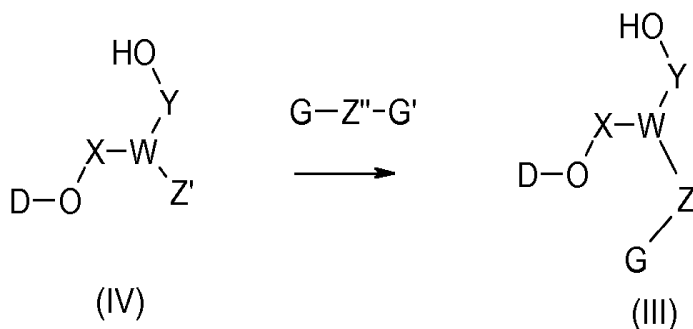
- 5 El compuesto de fórmula (II) puede obtenerse a partir del compuesto (III) según la etapa de reacción descrita a continuación:



en la que G es un halógeno, preferentemente bromo o yodo.

La reacción que se ha descrito anteriormente se efectúa preferentemente en un disolvente anhidro, tal como tolueno anhidro y en presencia de un éter de corona.

- 10 El compuesto (III) puede obtenerse a partir del compuesto (IV) según la etapa de reacción descrita a continuación:



en la que,

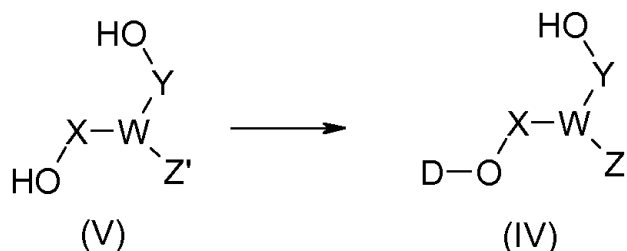
G y G' son átomos de halógeno idénticos o diferentes, preferentemente G y G' son átomos de bromo o yodo,

Z' es un grupo aminoalquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12, NCO-alquilo C1-C12, CON-alquilo C1-C12,
 Z" es un grupo alquilo lineal o ramificado C1-C12, aminoalquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, cicloalquilo C3-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12, NCO-alquilo C1-C12, CON-alquilo C1-C12,

el compuesto dihalogenado G-Z"-G' tiene por objeto reaccionar con el grupo Z' del compuesto (IV) para dar lugar a la formación del grupo Z-G del compuesto (III).

La etapa de obtención del compuesto (III) se efectúa preferentemente en presencia de un hidruro alcalino, tal como NaH.

El compuesto (IV) puede obtenerse a partir del compuesto comercial (V) por protección de la función alcohol, según la siguiente etapa de reacción:



Esta etapa de protección de la función alcohol se efectúa en condiciones bien conocidas por el experto en la materia, en función de la elección de D.

Según un modo de realización, el compuesto (IV) se obtiene a partir del compuesto (V) por reacción con 4,4'-cloruro de dimetoxitritilo (DMTr-Cl) preferentemente en un disolvente, tal como piridina con el fin de proteger la función alcohol.

Según otro modo de realización, el compuesto (IV) se obtiene a partir del compuesto (V) a partir del cloruro de 9-fenilxanten-9-ilo (pixil-Cl) en las condiciones descritas en el documento de Chattopadhyaya y Reese, *Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1978, 639-640.

Según otro modo de realización, el compuesto (IV) se obtiene a partir del compuesto (V) por reacción con el cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc-Cl) en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

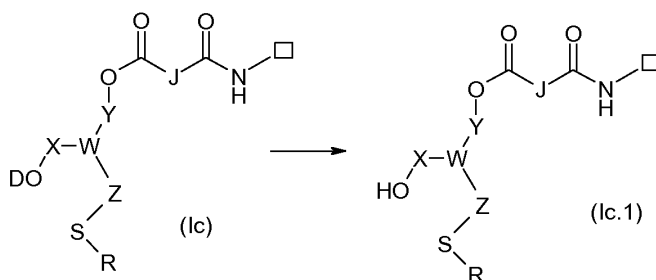
En las fórmulas precedentes (II) a (V), X, Y, W, Z, D, R, R₁, R₂ tienen las mismas definiciones que en la definición del compuesto (I) indicada anteriormente.

Preferentemente, el compuesto (V) de inicio es 1,1,1-tris(hidroximetil)etano o ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico o 1,3,5-tris(hidroxietoxi)benceno o 1,3,5-tris(hidroximetil)ciclohexano o 2-amino-1,3-propanodiol.

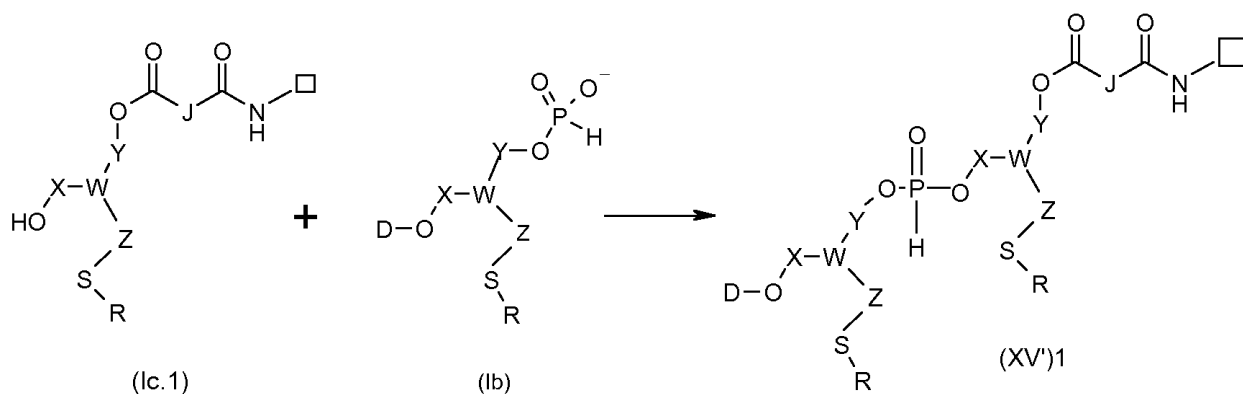
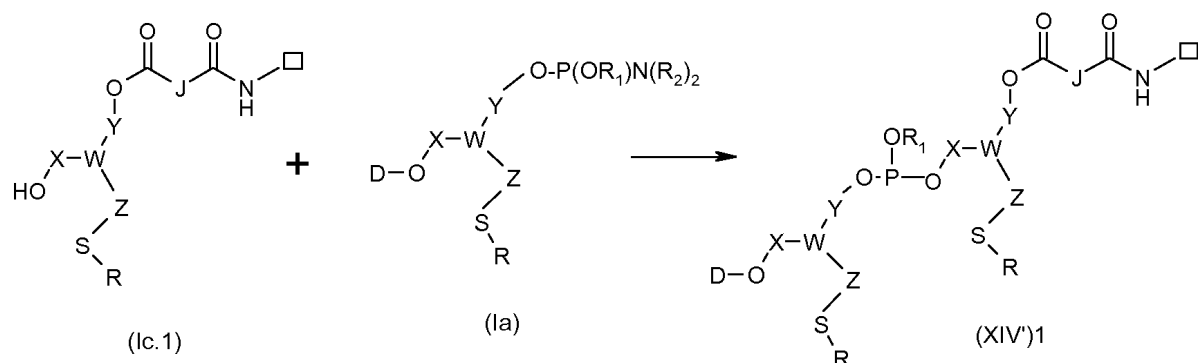
Oligómero del compuesto tiol

Un oligómero puede formarse a partir de compuestos tiol de fórmula (I) descritos previamente. El procedimiento de síntesis de tales oligómeros se describe en el esquema de la figura 2A para la oligomerización de compuestos de fórmula (Ia) y en el esquema de la figura 2B para la oligomerización de compuestos de fórmula (Ib).

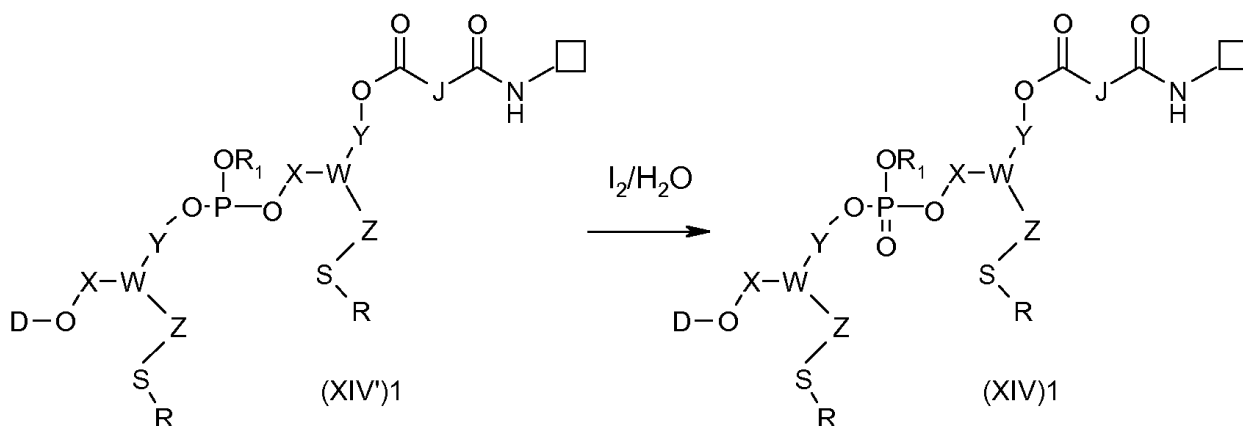
En una primera etapa, la función alcohol del compuesto (Ic) se desprotege para dar lugar al compuesto (Ic.1). Esta etapa de desprotección se efectúa por medios bien conocidos por el experto en la materia, preferentemente en presencia de ácido di o tricloroacético para los grupos DMTr y pixilo y piperidina para el grupo Fmoc.



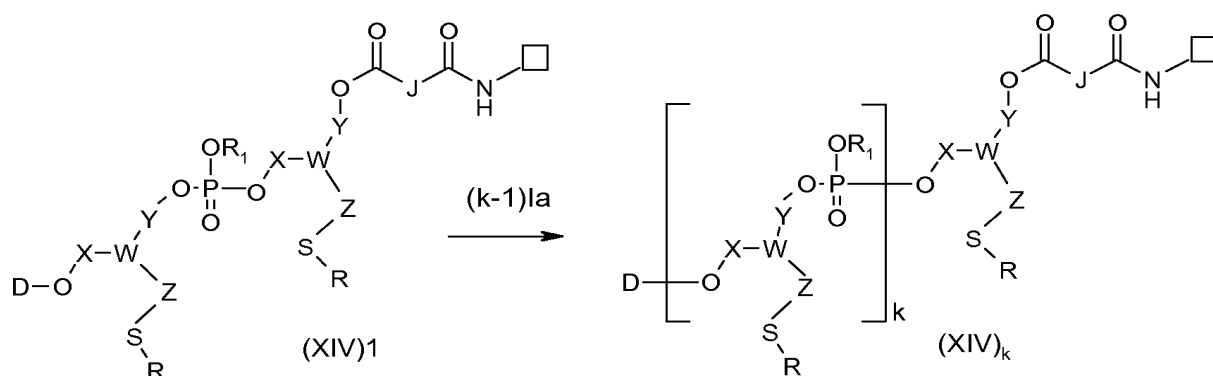
Después, el compuesto (Ic.1) reacciona con el compuesto (Ia) o (Ib) para dar lugar respectivamente al compuesto fosfitetriéster (XIV')₁ o diéster de H-fosfonato (XV')₁.



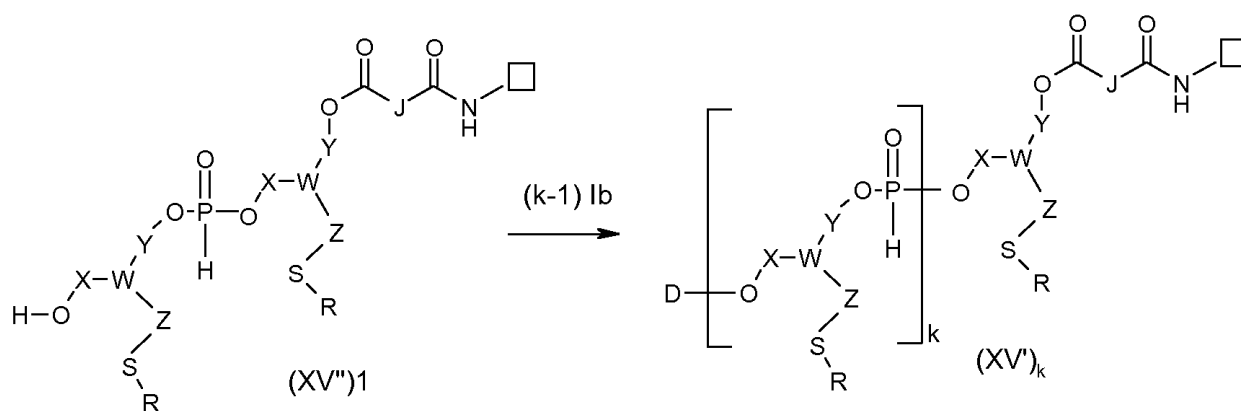
- 5 Después, el compuesto (XIV')₁ se oxida preferentemente en presencia de diyodo, el diyodo se desplaza a continuación por agua que suministra el átomo de oxígeno del enlace fosfato triéster para dar lugar al compuesto fosfotriéster (XIV)₁. Esta etapa de oxidación se efectúa después de cada etapa de acoplamiento entre un compuesto (XIV)_i y un compuesto (Ia).



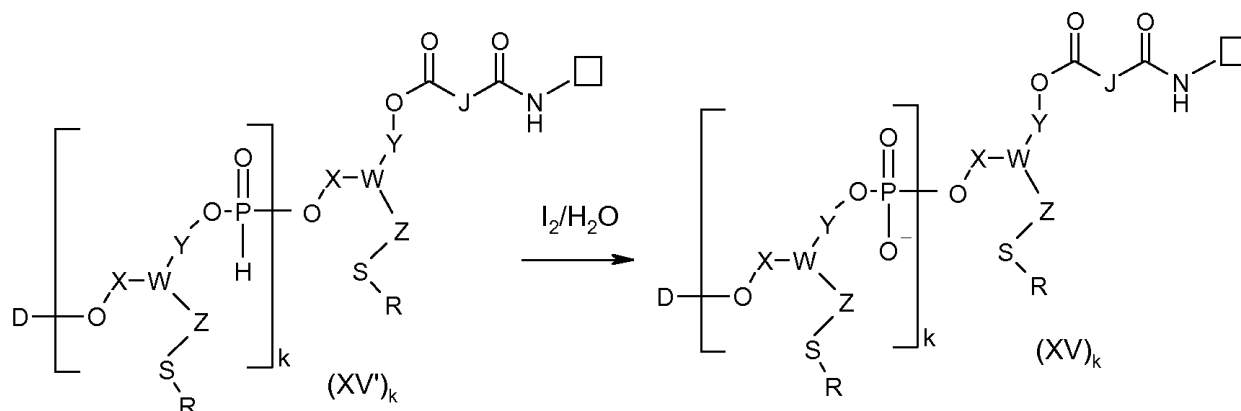
- 10 Después, de la misma manera, el compuesto (XIV)₁ reacciona con compuestos (k-1) (Ia) para dar lugar, después de oxidaciones (k-1), al compuesto (XIV)_k.



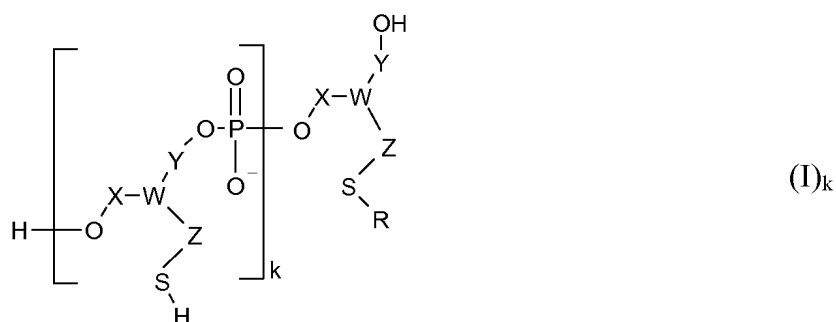
y el compuesto (XV')₁ se desprotege en su función alcohol para dar (XV'')₁ que reacciona con compuestos (k-1) (Ib) para dar lugar al compuesto (XV')_k:



- 5 Después, el compuesto (XV')_k se oxida, preferentemente en presencia de diyodo y agua para dar lugar al compuesto fosfodiéster (XV)_k.



Finalmente, una última etapa opcional consiste en la desprotección de los compuestos (XIV)_k o (XV)_k para dar lugar al mismo compuesto (I)_k.



Preferentemente, el oligómero resultante de la oligomerización de 2 a 12 compuestos (I), en particular entre 2 y 8 compuestos (I), es decir el oligómero puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 compuestos (I). Preferentemente, el oligómero tiol que tiene por objeto injertarse en una superficie de oro comprende entre 3 y 8, ventajosamente entre 4 y 8 compuestos (I) y el oligómero tiol que tiene por objeto la conjugación con una superficie que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida comprende ventajosamente entre 2 y 6 compuestos (I).

Según un modo de realización, el oligómero está fabricado únicamente a partir de compuestos de fórmula (Ia) o de compuestos de fórmula (Ib). La oligomerización se efectúa por reacción entre la función alcohol desprotegida de un primer compuesto (I) y la función fosforamidita o H-fosfonato de un segundo compuesto (I).

Asimismo es posible prever la fabricación de un oligómero a partir de una mezcla de compuestos (Ia) y compuestos (Ib), este modo de realización presenta menos interés.

Preferentemente, el oligómero se fabrica utilizando la química de fosforamiditas, es decir por oligomerización de compuestos de tipo (Ia).

La oligomerización puede efectuarse en un soporte sólido o en solución. Preferentemente, la oligomerización se efectúa en un soporte sólido. En efecto, la oligomerización en solución implica etapas de purificación por cromatografía, etapas no económicamente viables, en particular para las pequeñas cantidades requeridas en aplicaciones de diagnóstico.

El soporte sólido injertado con un oligómero de un compuesto (Ia) o un compuesto (Ib) corresponde a la fórmula (XVI)_k a continuación:

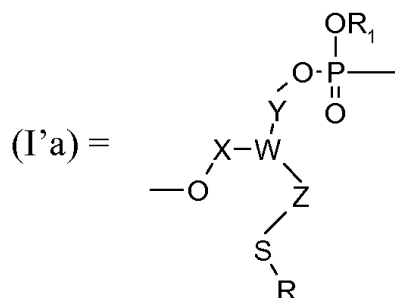


en la que:

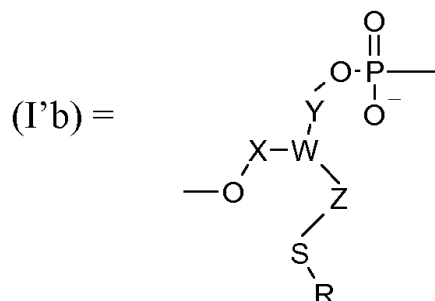
k representa un número entero comprendido entre 1 y 11,

(Ic) tiene el mismo significado que anteriormente,

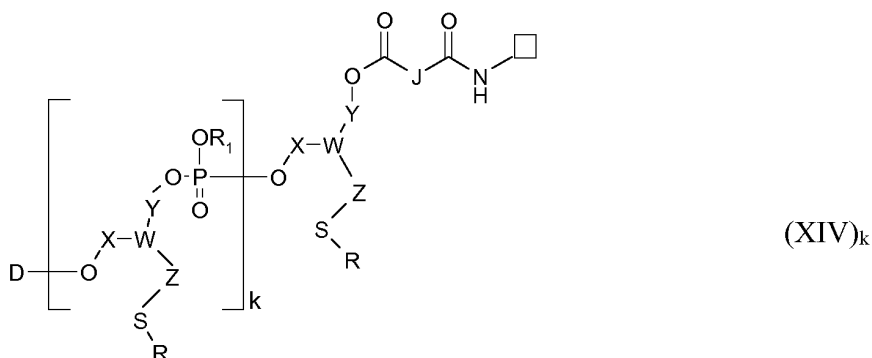
(I') representa (I'a) o (I'b) con:



y

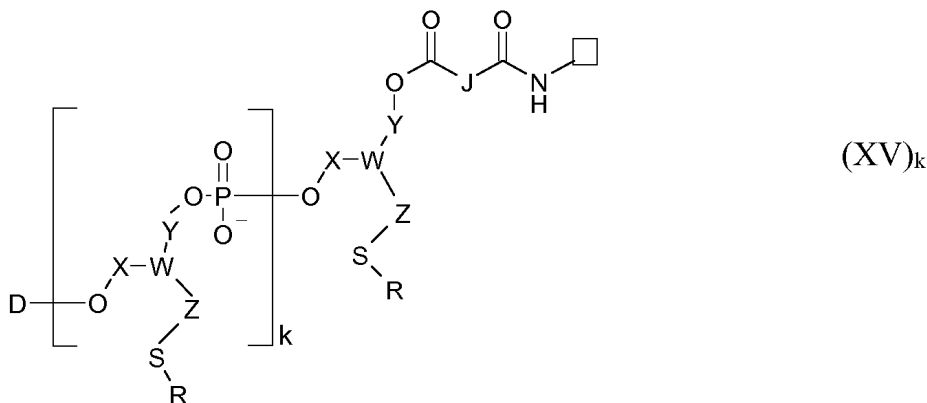


El oligómero en un soporte sólido formado a partir de un compuesto (Ic) y de compuestos de fórmula (Ia) corresponde a la siguiente fórmula (XIV)_k:



en la que D, X, Y, W, Z, J, R y R₁ tienen la misma definición que anteriormente y R también puede representar además H, k es un número entero comprendido entre 1 y 11.

- 5 El oligómero en un soporte sólido formado a partir de un compuesto (Ic) y de compuestos de fórmula (Ib) corresponde a la siguiente fórmula (XV)_k:



en la que D, X, Y, W, Z, J y R tienen la misma definición que anteriormente y R puede representar además H, k es un número entero comprendido entre 1 y 11.

- 10 En el caso en el que se forma el oligómero en un soporte sólido a partir de un compuesto (Ic) y de compuestos (Ib), el compuesto obtenido (XV)_k corresponde a la misma fórmula que el compuesto (XIV)_k pero en la que R₁ es un átomo de hidrógeno después de la oxidación de los enlaces de diésteres de H-fosfonato.

Tras la reacción de oligomerización, puede preverse desproteger las funciones tiol por procedimientos clásicos y entonces R representa H.

Oligonucleótidos modificados

- 15 La presente invención describe un oligonucleótido modificado, que comprende al menos diez nucleótidos y al menos dos compuestos tiol (I), tales como los que se han descrito previamente.

En la presente solicitud, el término oligonucleótido indica una cadena que comprende 4 a 100 nucleótidos.

El injerto del compuesto tiol según la invención se efectúa en la posición 3', en la cadena, o en la posición 5' de un oligonucleótido.

- 20 El procedimiento de preparación de dicho oligonucleótido modificado comprende al menos:

- una etapa de injerto de un compuesto (I) en un oligonucleótido para dar un 5'-tiol oligonucleótido, o
- una etapa de injerto de un nucleótido en un oligómero de un compuesto (I) para dar un 3'-tiol oligonucleótido.

Según un modo de realización, el oligonucleótido injertado corresponde a la siguiente fórmula (XIIa):

□

- 25 $-N_1-N_2-\dots-N_{n-1}-N_n-(I')_y-(M_1-\dots-M_{m-1}-M_m)_p-(I')_y$ (XIIa)

en la que,

N₁, ...N_n representan independientemente entre sí, un nucleótido,

$M_1, \dots, M_m$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,
 (I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b),
 n es un número entero que varía de 4 a 100,
 m es un número entero comprendido entre 4 a 100,
 y es un número entero que varía de 2 a 12,
 p representa 0 o 1,
 y' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0,
 la suma de números enteros (y + y') no es superior a 12,

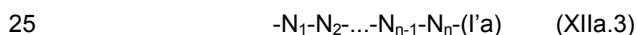
□ representa un soporte sólido.

- 10 El oligonucleótido modificado (XIIa) presenta dos o más compuestos tiol en la posición 5' de un oligonucleótido N o bien en la cadena nucleotídica. Se obtiene por un injerto de un compuesto (I) seguido por una elongación del oligómero resultante de (I) en la posición 5' de un oligonucleótido. Después, en el caso en el que $p = 1$, la elongación de la cadena nucleotídica continúa. Entonces, de la misma manera, puede considerarse el injerto de uno o más compuestos (I) suplementarios en la posición 5' del oligonucleótido M.
- 15 Un esquema de obtención del compuesto (XIIa) se describe en la figura 3 en la que los compuestos tiol son de tipo (Ia) y p es igual a 0. Las primeras tres etapas de fabricación del compuesto (XIIa) permiten la síntesis de un oligonucleótido. La síntesis del oligonucleótido se efectúa en un soporte sólido por un procedimiento clásico bien conocido por el experto en la materia. Durante la primera etapa, un primer nucleótido se injerta en un soporte sólido, y los otros nucleótidos se injertan siguiendo procedimientos sintéticos bien conocidos por un experto en la materia.
- 20 Se obtiene el siguiente compuesto:



Después, otro nucleótido se injerta con un procedimiento idéntico para dar lugar al compuesto de fórmula (XIIa.2).

Durante la siguiente etapa, un compuesto tiol, tal como se ha descrito anteriormente, de tipo (Ia), se injerta en la posición 5' del oligonucleótido (XIIa.2) para dar lugar al compuesto (XIIa.3):



Durante esta etapa, el injerto se realiza de manera clásica por reacción de la función fosforamídita del compuesto (Ia) con la función alcohol en la posición 5' del nucleótido terminal del compuesto (XIIa.2).

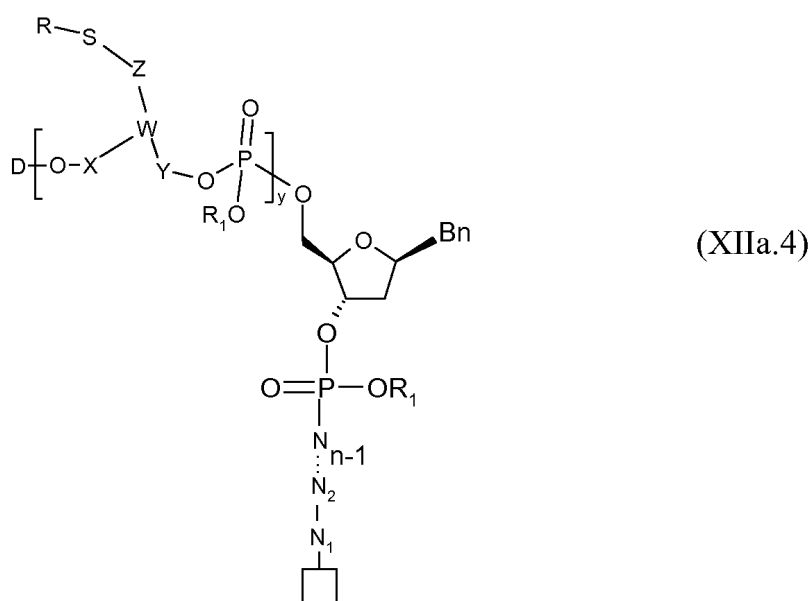
- 30 En el esquema de la figura 3, un ejemplo de síntesis se describe con la oligomerización del compuesto tiol de tipo (Ia); un procedimiento de síntesis similar se utiliza para la síntesis de oligonucleótidos modificados con compuestos tiol de tipo (Ib).

Después, la oligomerización como se ha descrito previamente, en particular en las figuras 2A y 2B, continúa a partir del compuesto (XIIa.3) anterior, por reacción con uno o más compuestos (Ia) o (Ib) para dar lugar al compuesto (XIIa.4) de fórmula:

□



o en la fórmula desarrollada (en caso en que $p = 0$):



en la que,

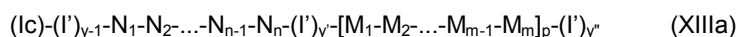
D, R, X, Y, W, Z, R₁ tienen la misma definición que para el compuesto (I) y R₁ puede representar además H, n, y y N₁, N₂, ...N_{n-1} tienen la misma definición que para el compuesto (XIIa), Bn representa una base clásicamente utilizada en una cadena nucleotídica.

En el caso en el que la elongación del oligómero se efectúe con compuestos de tipo (Ib), el oligonucleótido modificado presenta una estructura similar a la del oligonucleótido modificado (XIIa.4) pero en la que R₁ representa H.

Un injerto posterior de compuestos nucleotídicos M₁, M₂, ... M_m está entonces disponible para proporcionar el producto (XIIa) con p = 1. En estos casos, la elongación se efectúa igualmente en un soporte sólido.

Esta etapa de injerto se efectúa de manera clásica por procedimientos conocidos por el experto en la materia.

Según otro modo de realización, el oligonucleótido injertado corresponde a la siguiente fórmula (XIIIa):



en la que,

N₁, ...N_n representan independientemente entre sí, un nucleótido,
M₁, ...M_m representan independientemente entre sí, un nucleótido,
(I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b),
n es un número entero que varía de 4 a 100,
m es un número entero que varía de 4 a 100,
y es un número entero que varía de 2 a 12,
y' es un número entero que varía de 0 a 12,
p vale 0 o 1 si y' es diferente de 0 y, si y' vale 0 entonces p vale 0,
y'' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0,
la suma de números enteros (y + y' + y'') no es superior a 12.

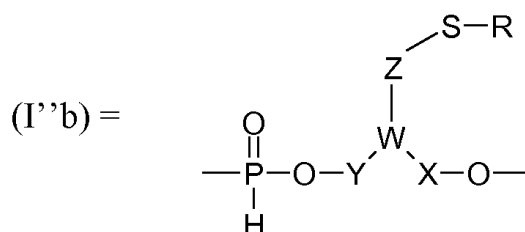
Un esquema que representa un modo de síntesis del compuesto (XIIIc) se describe en la figura 4 utilizando un oligómero formado a partir de un compuesto tipo (Ic) en el que J es un grupo etilo, y compuestos de tipo (Ib).

La síntesis del compuesto de fórmula (XIIIc) comprende una primera etapa que consiste en la oligomerización del compuesto tiol según la invención de fórmula (I), cuyo procedimiento se ha descrito previamente para dar lugar al compuesto de fórmula (XIIIa.1):

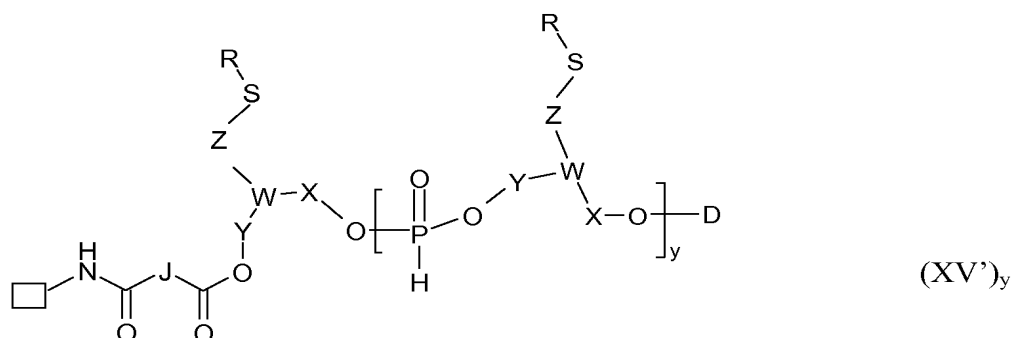


en la que,

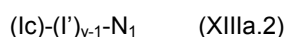
(Ic) tiene la misma definición que anteriormente,
(I') representa un grupo de tipo (I'a) o (I'b), en el que



o en la fórmula desarrollada en el caso en el que (I') representa (I'b):



5 En una segunda etapa, un primer nucleótido N₁ se injerta en el oligómero de fórmula (XIIIa.1) para dar lugar al compuesto de fórmula (XIIIa.2) a continuación:

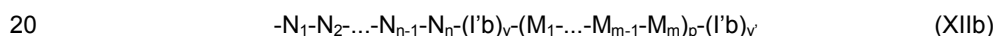


Esta etapa de injerto se efectúa por reacción entre la función alcohol desprotegida en el extremo de la cadena de oligómero del compuesto (XIIIa.1) y la función fosforamidita o H-fosfonato del primer nucleótido N₁.

10 El oligonucleótido modificado se sintetiza después mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, principalmente un procedimiento clásico bien conocido por el experto en la materia por reacción entre la función alcohol en 5' del primer nucleótido presente en el oligómero del compuesto tiol y la función fosforamidita o H-fosfonato en posición 3' de un segundo nucleótido. La síntesis continúa con etapas sucesivas similares de elongación de la cadena de nucleotídica bien conocidas por el experto en la materia para dar lugar al compuesto de fórmula (XIIIa).

15 Un objeto de la presente invención se refiere de este modo a los compuestos obtenidos a partir de los compuestos de fórmula (XIIa) y (XIIIa) anterior después de la escisión del enlace que une el oligonucleótido modificado al soporte sólido. La escisión del enlace se efectúa en la función éster.

De este modo, según un modo de realización descrito en la invención, un oligonucleótido modificado no soportado presenta la siguiente estructura (XIIb):

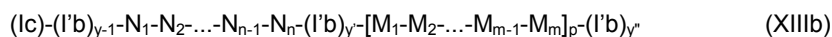


en la que,

25 N₁, ...N_n representan independientemente entre sí, un nucleótido,
M₁, ...M_m representan independientemente entre sí, un nucleótido,
(I'b) representa un compuesto de fórmula como se ha definido anteriormente,
n es un número entero que varía de 4 a 100,
m es un número entero que varía de 4 a 100,
y es un número entero que varía de 2 a 12,
p representa 0 o 1,
y' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0,
30 la suma de números enteros (y + y') no es superior a 12.

La extracción del soporte se efectúa en dos etapas con primero una base fuerte no nucleófila (piperidina o DBU) para eliminar los grupos cianoetilo si están presentes (caso de la fosforamidita) y en segundo lugar por un procedimiento clásico conocido por el experto en la materia, preferentemente por un tratamiento del compuesto (XIIa) con hidróxido de amonio (NH₄OH). Es necesario eliminar los grupos cianoetilo antes de la desprotección de los grupos tiol ya que forman acrilonitrilo durante su eliminación que reacciona fuertemente con las funciones tiol.

Según otro modo de realización descrito en la invención, un oligonucleótido modificado no soportado presenta la siguiente estructura (XIIIb):

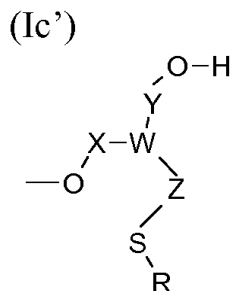


en la que,

$N_1, \dots, N_n$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,

$M_1, \dots, M_m$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,

(I'c) representa el compuesto obtenido a partir de (Ic) por escisión del enlace éster con el soporte sólido, y tiene preferentemente la estructura



(I'b) representa un compuesto de fórmula como se ha definido anteriormente,

n es un número entero que varía de 4 a 100,

m es un número entero que varía de 4 a 100,

y es un número entero que varía de 2 a 12,

y' es un número entero que varía de 0 a 12,

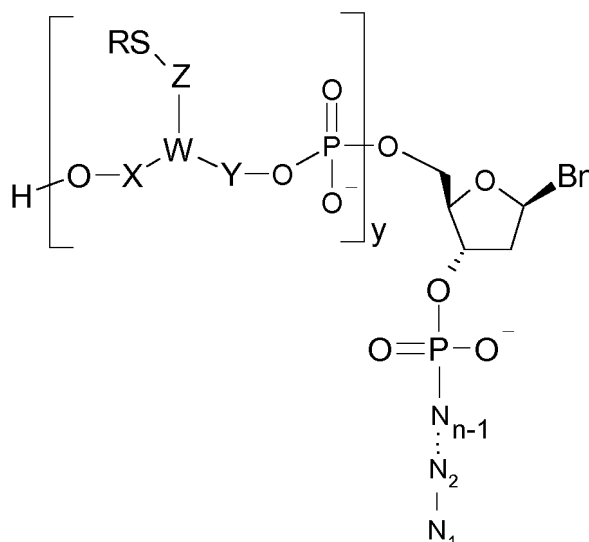
p vale 0 o 1 si y' es diferente a 0 y, si y' vale 0 entonces p vale 0,

y'' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0,

la suma de números enteros ($y + y' + y''$) no es superior a 12.

La extracción del soporte se efectúa por un procedimiento clásico conocido por el experto en la materia, preferentemente por un tratamiento del compuesto (XIIIa) con hidróxido de amonio (NH_4OH).

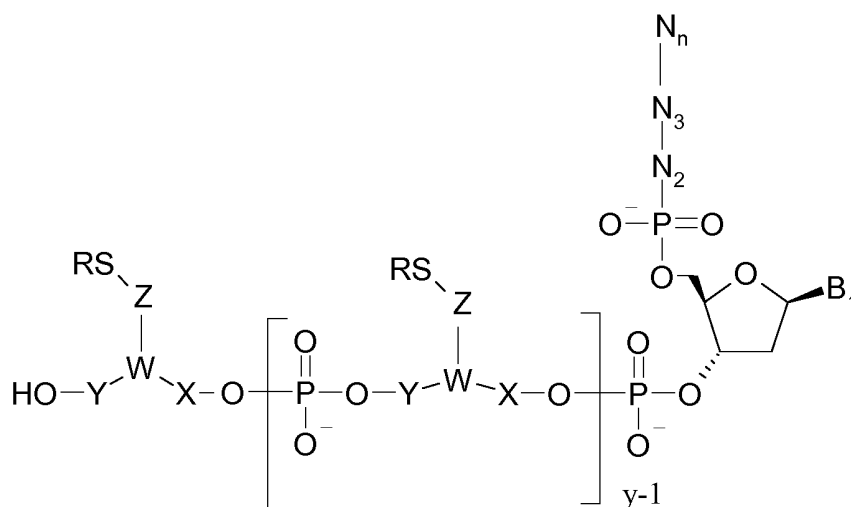
Según la presente invención, en el caso en que $p = 0$, el oligonucleótido modificado corresponde a la fórmula desarrollada (XIIb):



en la que $n, y, N_1, \dots, N_{n-1}, X, Y, Z, W$ y R tienen la misma definición que anteriormente, y B_n representa la base del enésimo nucleótido.

Según la presente invención, en el caso en que $p = 0$, el oligonucleótido modificado corresponde a la fórmula desarrollada (XIIIb):

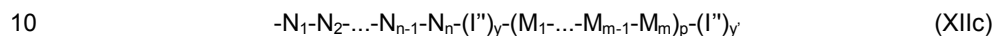
(XIII b)



en la que n , y , N_2 , ..., N_n , X , Y , Z , W y R tienen la misma definición que anteriormente, y B_1 representa la base del 1^{er} nucleótido.

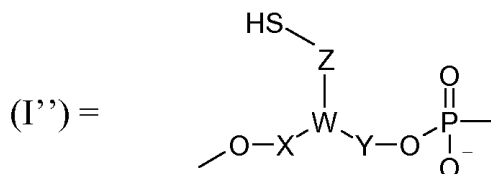
La presente invención describe los oligonucleótidos modificados (XIId) y (XIIIc) obtenidos respectivamente a partir de los compuestos (XIId) y (XIIIa) por desprotección de la función tiol y escisión del enlace que une el compuesto al soporte sólido (Figuras 3 y 4, respectivamente).

En el caso en el que el oligonucleótido se modifica con uno o varios compuestos tiol de tipo (Ia), después de la desprotección de la función tiol y de la función fosforamidita (XIId) del compuesto por un tratamiento conocido por el experto en la materia, se obtiene el compuesto de fórmula (XIId):



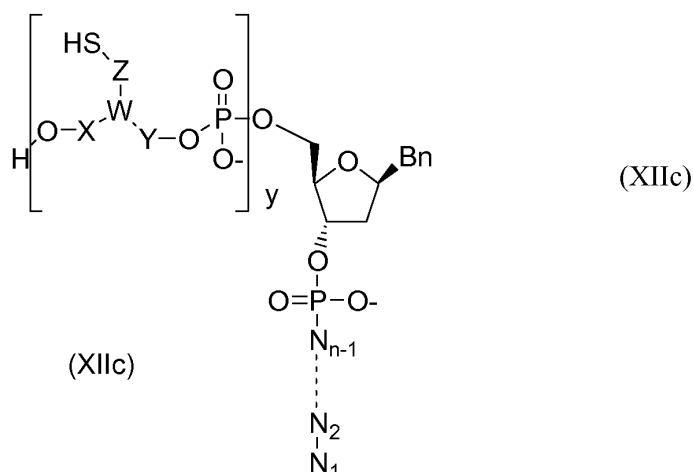
en la que,

$N_1, ...N_n$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,
 $M_1, ...M_m$ representan independientemente entre sí, un nucleótido,



15 n es un número entero que varía de 4 a 100,
 m es un número entero que oscila 4 a 100,
 y es un número entero comprendido entre 2 a 12,
 p representa 0 o 1,
 y' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0,
 20 la suma de números enteros ($y + y'$) no es superior a 12.

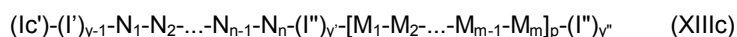
o en la fórmula desarrollada en el caso en que $p = 0$:



en la que,

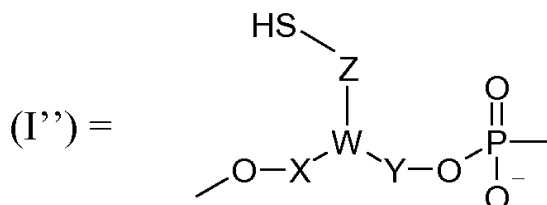
X, Y, W, Z, R₁ tienen la misma definición que para el compuesto (I),
 N₁, ...N_n, n, tienen la misma definición que para el compuesto (XIIa),
 Bn representa una base utilizada clásicamente en una cadena nucleotídica.

En el caso en el que el oligonucleótido se modifica con uno o varios compuestos tiol de tipo (Ib), después de la desprotección de la función tiol del compuesto (XIIIa) por un tratamiento conocido por el experto en la materia, se obtiene el compuesto de fórmula (XIIIc):



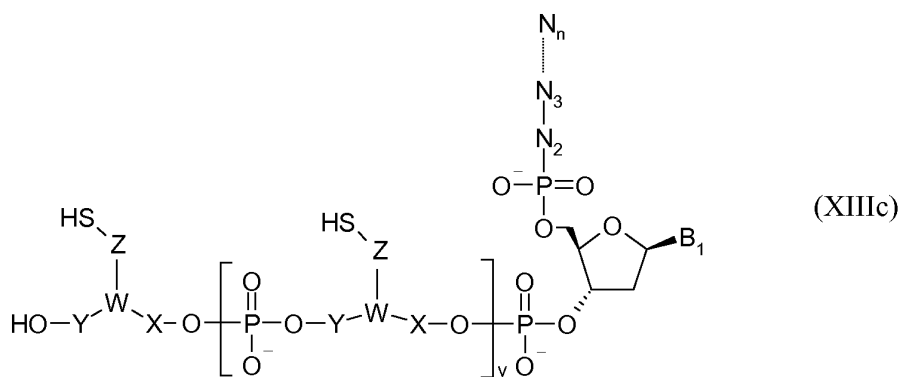
en la que,

N₁, ...N_n representan independientemente entre sí, un nucleótido,
 M₁, ...M_m representan independientemente entre sí, un nucleótido,
 (Ic') representa el compuesto obtenido a partir de (Ic) por escisión del enlace éster con el soporte sólido,



n es un número entero que varía de 4 a 100,
 m es un número entero que varía de 4 a 100,
 y es un número entero que varía de 2 a 12,
 y' es un número entero que varía de 0 a 12,
 p vale 0 o 1 si y' es diferente a 0 y, si y' vale 0 entonces p vale 0,
 y'' es un número entero que varía de 0 a 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0,
 la suma de números enteros (y + y' + y'') no es superior a 12.

o en la fórmula desarrollada en el caso en que p = 0:



en la que,

X, Y, W, Z, R₁ tienen la misma definición que para el compuesto (I),
N₂, ...N_n, n, tienen la misma definición que para el compuesto (XIIa),
Bn corresponde a una base utilizada clásicamente en una cadena nucleotídica.

- 5 Durante la síntesis del oligonucleótido, la función tiol está preferentemente protegida. En efecto, la función tiol puede reaccionar con la función fosforamidita entrante.

La etapa de desprotección de las funciones tiol y la eliminación del soporte sólido puede efectuarse en una sola etapa de tratamiento del oligonucleótido modificado (XIIa) o (XIIIa).

- 10 La eliminación del soporte sólido también puede efectuarse en una primera etapa, después la desprotección de las funciones tiol se efectúa entonces en una segunda etapa.

El oligonucleótido final (XIIc) (respectivamente el oligonucleótido final (XIIIc)) se obtiene independientemente del compuesto tiol de partida, ya sea a partir del compuesto (Ia) o del compuesto (Ib). En efecto, cualquiera que sea el monómero (Ia) o (Ib) utilizado, la unidad monómera tiol resultante de la reacción de oligomerización corresponde al compuesto (I'') descrito previamente.

- 15 Los sustratos injertados de fórmulas (XVI)_k descritos anteriormente permiten cebar la síntesis de oligonucleótidos. Se puede prever, en particular, preparar de manera industrial o semi-industrial soportes sólidos injertados con secuencias de oligómeros que se van a utilizar como secuencia politiol en la posición 3' de un oligonucleótido.

- 20 Según un modo de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) y, opcionalmente, la secuencia de nucleótidos (M₁-M₂-...-M_{m-1}-M_m) del oligonucleótido modificado de la invención, como se describe anteriormente, son específicas de un virus, una bacteria o un gen responsable o implicado en una enfermedad.

- En el sentido de la presente solicitud, por "específico", se entiende que la secuencia (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) y, opcionalmente, la secuencia (M₁-M₂-...-M_{m-1}-M_m) son complementarias a todo o parte de al menos una secuencia de ácido nucleico diana comprendida en un gen o en el genoma de un virus o una bacteria, y característica de estos mismos. Por tanto, se entiende que la hibridación de la secuencia (N₁-N₂-...-N_{n-1}-N_n) y, opcionalmente, de la secuencia (M₁-M₂-...-M_{m-1}-M_m) con parte o la totalidad de la secuencia diana corresponde a la formación de un híbrido de ácidos nucleicos que posee como máximo dos malapareamientos. En un modo de realización de la invención, el término "específico" significa que el híbrido formado solo comprende uno o dos malapareamientos. Ventajosamente, el híbrido formado no contiene ningún malapareamiento. Por "secuencia característica de un gen o de un genoma de un virus o una bacteria" se entiende una región genómica, cromosómica o plásmida de un organismo, un virus o una bacteria, que presenta una disposición de nucleótidos que no se encuentra en los otros organismos, debido a variaciones genéticas únicas.

- En el contexto de la invención, las expresiones "oligonucleótido modificado" y "sonda" se utilizan indistintamente y se refieren a un oligonucleótido de 4 a 100 nucleótidos y que posee al menos dos funciones tiol, como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, cuando se utiliza para la genotipificación, el oligonucleótido modificado de la invención comprende 13 a 20 nucleótidos, ventajosamente 14 o 15 nucleótidos. Por consiguiente, la sonda posee la capacidad de injertarse en una superficie adecuada, tal como una superficie recubierta con oro con grupos maleimida, y también posee la capacidad de hibridarse a través de su parte nucleotídica con una secuencia nucleotídica diana.

- El oligonucleótido modificado de la invención comprende 2 a 12 funciones tiol, en particular entre 2 y 8 funciones, es decir, el oligonucleótido modificado puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 funciones. Preferentemente, el oligonucleótido modificado que tiene por objeto injertarse en una superficie de oro comprende entre 3 y 8, ventajosamente entre 4 y 8 funciones tiol. El oligonucleótido que tiene por objeto la conjugación con una superficie que comprende al menos un enlace doble carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida comprende ventajosamente entre 2 y 8 funciones tiol, y preferentemente 4 funciones tiol.

El término "secuencia diana", como se utiliza en el contexto de la invención, se refiere a una secuencia complementaria o parcialmente complementaria a la sonda de la invención, y que se amplifica a partir de un gen o genoma de un virus o bacteria y, preferentemente a partir de una región característica de estos últimos.

- El término "virus" indica una entidad biológica que necesita una célula huésped para replicarse, y que consiste como mínimo en un ácido nucleico y proteínas, el ácido nucleico puede ser ADN y/o ARN monocatenario o bicatenario. Los virus comprenden aquellos que son capaces de parasitar las procariotas (por ejemplo *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae* e *Inoviridae*), aquellos capaces de parasitar plantas (fitovirus, tales como tobamovirus), insectos (por ejemplo, baculovirus), hongos y seres humanos. En el contexto de la invención, el virus también comprende arbovirus. Los arbovirus reúnen virus morfológicamente heterogéneos pertenecientes a varios géneros distintos que comprenden más particularmente los géneros *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), *Alfavirus* (familia *Togaviridae*) *Coltivirus* (familia *Reoviridae*), flebovirus (familia *Bunyaviridae*). Más ampliamente, la familia

- Flaviviridae* comprende principalmente los géneros *flavivirus* (virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental (*Nilo Occidental virus*), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (VETG), virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus usutu y virus del dengue), *Hepacivirus* (virus de la hepatitis C) y *Pestivirus* (virus de la diarrea viral bovina (VDVB), virus de la peste porcina). La familia *Togaviridae* comprende principalmente los géneros *alfavirus* (virus de Sindbis, virus del río Ross, virus O'nyong'nyong, virus de Chikungunya) y *Rubivirus* (virus Rubella, virus de la rubéola). La familia *Reoviridae* comprende principalmente los virus que afectan al sistema digestivo (por ejemplo, *Rotavirus*) o al sistema respiratorio. La familia *Bunyaviridae* comprende principalmente los géneros *Hantavirus* (síndrome pulmonar por hantavirus, fiebre hemorrágica coreana), *Nairovirus* (virus de Dugbe) *Orthobunyavirus* (virus Bunyamwera) *lebovirus* (fiebre del valle del Rift) y *Tospovirus*.
- En el contexto de la invención, los virus capaces de infectar a los seres humanos comprenden los *Vesiculovirus* (virus de la estomatitis vesicular, etc.), los *Lisavirus* (virus de la rabia, virus australiano del murciélago), los Picornavirus (rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, etc.), virus del herpes (virus varicela-zóster, citomegalovirus CMV, virus de Epstein Barr VEB, etc.), los *Orthomyxovirus* (virus de la gripe, etc.), los *Paramixovirus* (virus del sarampión, virus de las paperas, etc.), los *Poxvirus* (virus de la viruela, etc.), *Coronavirus* (SRAG, etc.), los Filovirus (Ébola etc.), los hepadnavirus (VHB) y los retrovirus (VIH, HLCTH, etc.).
- El término "bacteria" se refiere a cualquier organismo vivo procariota caracterizado por la ausencia de núcleo y orgánulos, y provisto de una pared celular. Este término comprende principalmente las bacterias capaces de ser patógenas y causar enfermedades y/o infecciones en los seres humanos, tales como *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Treponema pallidum* (sífilis), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Mycobacterium leprae* (lepra), *Neisseria gonorrhoeae* (gonorrea), *Rickettsia* (tifus), *Clostridium tetani* (tétanos), *Vibrio cholerae* (cólera), *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus* (patógenos oportunistas). Este término también comprende las bacterias implicadas en los riesgos de la transfusión y las infecciones nosocomiales, tales como, por ejemplo, las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, y *Pseudomonas aeruginosa* o bacterias Gram-positivas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* y *Clostridium perfringens*.
- Según un modo de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos ($N_1-N_2-...-N_{n-1}-N_n$) y opcionalmente la secuencia de ($M_1-M_2-...-M_{m-1}-M_m$) se seleccionan entre:
- las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36, específicas del virus de la hepatitis C (VHC),
 - las secuencias SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 40, específicas de flavivirus,
 - la secuencia SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 41, específica del virus del dengue, o
 - la secuencia SEQ ID NO: 19, específica del virus del Nilo Occidental (VNO).
- Según un modo de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos ($N_1-N_2-...-N_{n-1}-N_n$) y opcionalmente la secuencia de nucleótidos ($M_1-M_2-...-M_{m-1}-M_m$) tienen una estructura de tipo anómero alfa, anómero beta, lineal, o "caracol". Cuando la secuencia de nucleótidos tiene una estructura de tipo anómero beta, el oligómero modificado de la invención (cuyos tioles se sitúan en 5') se hibrida de manera antiparalela con la secuencia diana. Cuando la secuencia de nucleótidos tiene una estructura de tipo anómero, el oligómero modificado de la invención (cuyos tioles se sitúan en 3') se hibrida de manera paralela con la secuencia diana.
- Funcionalización de la superficie**
- Los oligonucleótidos modificados según la invención pueden depositarse en un sustrato con el fin de funcionalizar la superficie de este sustrato. El sustrato puede ser metálico o polimérico, conductor o no conductor. Puede ser plano (en parte o en su totalidad) o curvado, y puede adoptar ventajosamente una forma esférica.
- Según un modo de realización, el sustrato es no plano, por ejemplo, en forma de micropartículas o nanopartículas. Los oligonucleótidos modificados según la invención pueden entonces injertarse en estas micropartículas o nanopartículas. Preferentemente, estas partículas son magnéticas. En efecto, estas partículas magnéticas pueden introducirse con facilidad en la superficie de un electrodo o en la parte inferior de los pocillos de una microplaca, con el fin de un ensayo de detección, genotipificación o secuenciación, por aplicación de un imán. La aplicación de un soporte no plano de tipo micropartícula o nanopartícula en el contexto del procedimiento de detección de la invención permite ventajosamente aumentar el área de la superficie sobre la que pueden injertarse los oligonucleótidos modificados de la invención, y de este modo permiten aumentar la proporción de hibridaciones entre las sondas y las secuencias diana.
- Según un modo de realización, el sustrato es metálico, por ejemplo de cobre o titanio, y está recubierto parcialmente en toda su superficie con una película de oro o platino, preferentemente oro.
- Según un modo de realización, el sustrato es un polímero, preferentemente un polímero conductor.
- Según un modo de realización, el sustrato puede comprender zonas de recepción recubiertas con una película de oro o de platino o recubiertas con funciones alquenilo, alquinilo o halogenoacetamida, tales como funciones

maleimida o acrilamida, en las que se deposita el oligonucleótido modificado.

Según un modo de realización de la invención, los grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono se seleccionan entre los alquenos activados por una función carbonilo alfa, preferentemente los alquenos se seleccionan entre los grupos maleimida y acrilamida.

- 5 Según un modo de realización de la invención, los grupos halogenoacetamida se seleccionan entre los grupos bromoacetamido y yodoacetamido.

Según un modo de realización de la invención, los grupos que comprenden al menos un triple enlace carbono-carbono se seleccionan entre los alquinos activados por una función carbonilo alfa, preferentemente los alquinos se seleccionan entre los grupos 2-propinamida.

- 10 Como se ilustra en la figura 16a, en la que el compuesto gpt-SH representa el oligonucleótido modificado según la invención, la función tiol reacciona con el doble enlace carbono-carbono o el triple enlace carbono-carbono activado por una función carbonilo alfa. De arriba hacia abajo de la figura 13a, la primera reacción de funcionalización corresponde con una superficie injertada maleimida, la segunda reacción corresponde con una superficie injertada acrilamida, la tercera reacción corresponde con una superficie injertada yodoacetamido o bromoacetamido y la
- 15 cuarta reacción corresponde con una superficie injertada 2-propinamida efectuada en el caso de un oligonucleótido modificado según la invención que comprende dos compuestos tiol.

- En el caso de la figura 16b, la superficie se injerta con grupos alquénilo (1ª reacción) y alquínulos (2ª reacción) no activados. La reacción entre la función tiol del oligonucleótido modificado y los grupos de superficie se efectúa utilizando una activación luminosa ($\lambda = 265 \text{ nm}$). La primera reacción de funcionalización se efectúa utilizando un
- 20 oligonucleótido modificado monotiol esquemáticamente representado por gpt-SH y la segunda reacción se efectúa utilizando un oligonucleótido modificado ditiol.

- En el caso en el que el soporte sea injertado con funciones alquínulas, la funcionalización de la superficie por un oligonucleótido modificado politiol es muy interesante ya que da lugar a una estructura cíclica gracias a dos reacciones sucesivas entre una primera función tiol y la función -ino en una primera etapa entre una segunda función
- 25 tiol y la función -eno resultante en una segunda etapa (figuras 16a y 16b).

Según un modo de realización preferente, el sustrato se injerta con grupos maleimida o acrilamida.

Así, la invención permite, por ejemplo funcionalizar una superficie de oro por creación de un enlace o enlaces oro-azufre entre la superficie del sustrato y el oligonucleótido modificado o funcionalizar una superficie injertada con funciones maleimida o acrilamida por creación de un enlace o enlaces tioéteres.

- 30 La fijación de los oligonucleótidos modificados a la superficie del sustrato se efectúa sumergiendo la superficie a tratar en una solución que comprende el oligonucleótido modificado según la invención, como se ha descrito anteriormente. Se prevé en general posteriormente una o más etapas de lavado y secado. En general, la solución de oligonucleótidos modificados está en una concentración comprendida entre $0,10 \text{ } \mu\text{M}$ y $500 \text{ } \mu\text{M}$, preferentemente entre $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ y $100 \text{ } \mu\text{M}$ cuando la superficie del sustrato es de oro y comprendida entre 50 nM y 200 nM ,
- 35 preferentemente entre 75 nM y 150 nM cuando la superficie del sustrato está formada con maleimida. La inmersión es seguida por lavado para eliminar aquello sin reaccionar.

La presencia de varios átomos de azufre en el oligonucleótido permite crear varios enlaces oro-azufre, o varios enlaces tioéter, estabilizando de este modo el oligonucleótido en la superficie.

- 40 Un objeto de la invención comprende por consiguiente un sustrato injertado con al menos un oligonucleótido modificado, tal como se ha descrito anteriormente, dicho sustrato contiene al menos una zona de recepción recubierta con una sustancia tolerante al injerto de dicho oligonucleótido modificado. Según un modo de realización de la invención, el sustrato tiene la forma de un electrodo. Según otro modo de realización de la invención, el sustrato tiene la forma de una microplaca que tiene 96 pocillos o más.

- Según un modo de realización de la invención, el sustrato injertado según la invención es de metal, preferentemente de cobre o titanio, y comprende al menos una zona de recepción recubierta con una película de oro o platino. Según otro modo de realización de la invención, el sustrato injertado es de plástico, preferentemente de poliestireno, y la zona de recepción está recubierta con grupos maleimida y/o comprende en su superficie al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida.
- 45

- Según un modo de realización de la invención, la densidad del injerto del oligonucleótido modificado según la invención obtenida en la zona de recepción resulta de la utilización de soluciones de injerto de 10 nM por pocillo a 500 nM por pocillo, cuando una placa de 96 pocillos se utiliza como sustrato. Ventajosamente, la densidad de injerto del oligonucleótido modificado según la invención en la zona de recepción del sustrato se obtiene utilizando una solución de injerto de 100 nM por pocillo cuando una placa de 96 pocillos se utiliza como sustrato.
- 50

Fijación a los marcadores o ligandos

Los oligómeros modificados de la presente invención también pueden unirse con uno o más puntos de unión a los marcadores o ligandos que pueden ser por ejemplo marcadores enzimáticos, cromógenos, fluorógenos, radiactivos, o quimioluminiscentes, metales, iones metálicos, hormonas, proteínas, péptidos, sacáridos, oligosacáridos, agentes nucleolíticos o proteolíticos, agentes de unión, tales como biotina, un antígeno, un hapteno, un anticuerpo o un receptor. Ventajosamente, este marcador o ligando permite detectar el evento de hibridación entre el oligonucleótido modificado de la invención y una secuencia diana representativa de un gen, un virus o una bacteria.

Según otro modo de realización de la invención, el marcador o ligando se une a la secuencia nucleotídica diana representativa de un gen, un virus o una bacteria, y permite detectar el evento de hibridación entre el oligonucleótido modificado de la invención y la secuencia diana.

Procedimiento de detección

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica, que comprende una etapa de detección de dicho ácido nucleico diana con al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado, tal como se ha descrito anteriormente.

Según un modo de realización de la invención, el procedimiento de detección comprende las etapas de:

- obtención de al menos un ácido nucleico "fuente" a partir de una muestra biológica,
- producción de un amplicón por amplificación de un ácido nucleico diana a partir del ácido nucleico fuente, y
- detección de la hibridación entre el amplicón y al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado, tal como se ha descrito anteriormente.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier sustancia que contiene o se sospecha que contiene un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y se obtiene a partir de un ser humano, un animal, una planta o cualquier composición líquida o sólida. La muestra biológica incluye, por ejemplo muestras de tejidos o de fluidos aislados de un individuo o individuos, incluyendo, entre otros, piel, sangre, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, fluido sinovial, orina, lágrimas, células de la sangre, médula ósea, órganos, tumores, así como muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*. La muestra biológica puede tratarse ventajosamente para destruir la estructura de los tejidos o células con el fin de colocar los componentes intracelulares en solución.

Por "amplicón" se entiende una molécula de ácido nucleico generada durante un procedimiento de amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana característica del gen, virus o bacteria contenidos en la muestra biológica. Según un modo de realización de la invención, el amplicón se genera por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (en inglés "*polymerase chain reaction*", o PCR). El amplicón utilizado en el procedimiento de detección de la invención posee ventajosamente un tamaño que varía de 75 pb a aproximadamente 500 pb. Parece que una de las ventajas particulares del procedimiento de la invención reside en la posibilidad de utilizar amplicones que tienen una longitud de uno o de varios cientos de nucleótidos, lo que suele ser imposible en los procedimientos de detección conocidos en el estado de la técnica. El procedimiento de detección de la invención hace que sea posible seleccionar y amplificar las secuencias dianas más grandes en los genes, virus o bacterias.

Según un modo de realización de la invención, el procedimiento de detección permite determinar el genotipo y/o subtipo de un virus presente en una muestra biológica. El amplicón se genera específicamente por amplificación de una secuencia nucleotídica diana correspondiente a una región genómica del virus que porta la información relativa al genotipo y/o subtipo viral, y la detección se efectúa con una sonda específica para un genotipo y/o subtipo viral específica. El procedimiento de la invención hace que sea posible por lo tanto efectuar la detección sobre la base de las secuencias diana que contienen más información sobre el tipo o subtipo viral o bacteriano. Esta ventaja resulta directamente del oligonucleótido modificado según la invención, de su modo y de su capacidad de fijación a la zona de fijación al sustrato. Ventajosamente, ya no es por consiguiente indispensable definir los cebadores que permiten amplificar una secuencia diana más corta posible a partir del genoma viral o bacteriano. El procedimiento de la presente invención permite, al contrario, seleccionar cebadores localizados en regiones conservadas en las familias de virus o bacterias previstas, y amplificar secuencias diana más largas. Esto se traduce en ahorros significativos y mayor facilidad de uso en la medida en que los mismos cebadores pueden utilizarse para amplificar una zona genómica que se encuentra en varios tipos y/o subtipos virales o bacterianos, sin temor a los resultados de hibridación distorsionados por el tamaño de amplificación utilizado.

Según un modo de realización de la invención, la etapa de producción del amplicón del procedimiento de detección de la invención se realiza con una mezcla de cebadores nucleotídicos, preferentemente seleccionados entre los pares de cebadores:

- SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, cuando se genera el amplicón a partir del VHC, independientemente del genotipo viral en cuestión. Este par de cebadores es genérico y permite amplificar un amplicón "largo" de 401 nt a partir de cualquier genotipo de VHC;
- SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9, un par que permite la generación de amplicones "cortos" de 191 nt específicos del genotipo 1a/1b;

- SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 9, un par que permite la generación de amplicones "cortos" de 108 nt específicos del genotipo 2;
- SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11, un par que permite la generación de amplicones "cortos" de 143 nt específicos del genotipo 3a;
- 5 - SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 30, un par que permite la generación de amplicones "cortos" de 175 nt específicos del genotipo 4a/4d; y
- SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, y/o SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 21 cuando se genera el amplicón a partir de un flavivirus.

10 Según un modo de realización, el oligonucleótido modificado según la invención se utiliza en el procedimiento de detección con una densidad resultante de la puesta en contacto de una solución de injerto que varía de 10 nM a 500 nM con un pocillo, cuando una placa de 96 pocillos se utiliza como sustrato. Ventajosamente, la solución de injerto del oligonucleótido modificado según la invención es de 100 nM, cuando una placa de 96 pocillos se utiliza como sustrato. Cuando el oligonucleótido modificado de la invención comprende dos funciones tiol, la solución de injerto utilizada posee una concentración de oligonucleótidos modificados de al menos 10nM (cuando una placa de 96 pocillos se utiliza como sustrato) y la concentración del amplicón utilizado en el procedimiento de detección es de al menos 100 pM. Cuando el oligonucleótido modificado según la invención comprende cuatro funciones tiol, la solución de injerto utilizada posee una concentración de oligonucleótidos modificados de al menos 10 nM por pocillo y la concentración del amplicón utilizado en el procedimiento de detección es de al menos 10 pM por pocillo, cuando una placa de 96 pocillos se utiliza como sustrato.

20 El procedimiento de detección según la invención presenta una ventaja particular para la genotipificación de VHC, en que permite, en particular, distinguir los diferentes genotipos y subtipos conocidos del VHC, aplicando un ensayo de detección molecular simple.

25 Las infecciones relacionadas con la hepatitis C, son de hecho un problema de salud extremadamente importante ya que los individuos infectados corren el riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas, cirrosis y carcinomas hepáticos primarios, y constituyen también un reservorio infeccioso. Los estudios epidemiológicos predicen una triplicación del número de muertes anuales resultantes del VHC en los próximos 10 años si no se desarrollan nuevos sistemas de diagnóstico y terapéuticos.

30 Caracterizado por una alta variabilidad genética, el VHC se clasifica en 6 genotipos principales, que comprenden más de 80 subtipos. La determinación exacta del genotipo y/o subtipo infecciosos tienen consecuencias cruciales para las estrategias terapéuticas, y permiten predecir la eficacia de la respuesta antiviral y definir la duración de la terapia, así como el tipo y la dosificación de tratamiento. La identificación de la clasificación precisa de VHC encontrados en los individuos infectados es también importante para el seguimiento epidemiológico, a fin de supervisar la distribución de cepas virales e identificar los factores de transmisión.

35 Numerosos ensayos de detección y/o cuantificación de ARN del VHC disponibles comercialmente se basan en secuencias que se encuentran en la región 5' no codificante (o 5'NCR, para "*noncoding region*") que constituye una de las regiones más conservadas y mejor caracterizadas de VHC. La región 5'NCR se selecciona de este modo como diana en los diferentes procedimientos de genotipificación conocidos y distribuidos comercialmente, tales como el ensayo INNO LiPA HCV II, de Bayer, el kit Trugene HCV 5'NCR de Bayer/Siemens Healthcare (documento WO2007/076493), basándose en el análisis de la secuencia y el ensayo de movilidad del híbrido ("*duplex mobility test*"), o un sistema de detección de hibridación que comprende una pluralidad de tipificación de HCV indicada en la región 5'NCR o en la región NS5 desarrollado por Molecular Systems Roche (documento US 2007/014160).

No obstante, la presencia de mutaciones en la región 5'NCR conduce a una clasificación errónea de los genotipos del VHC en el 5 al 8 % de los casos, con graves consecuencias sobre los resultados del tratamiento. La región 5'NCR no parece presentar un grado de fiabilidad suficiente para identificar los genotipos 2 y 4 del virus.

45 El procedimiento de referencia para efectuar la genotipificación del VHC reside adicionalmente en la secuenciación de regiones específicas del VHC, y en particular de la región NS5b del virus que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN. No obstante, la secuenciación es costosa y larga, y requiere un equipo especializado y operadores cualificados. Por lo tanto, no es apropiado llevar a cabo estudios clínicos a gran escala.

50 Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos de detección y/o genotipificación mejorados del VHC que permitan distinguir los diferentes genotipos y subtipos conocidos del VHC, aplicando un ensayo molecular simple, tal como el de la invención.

55 La presente invención describe un oligonucleótido que posee una secuencia nucleotídica seleccionada entre las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEQ ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los VHC de tipo 1a/1b y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 27 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los VHC de tipo 2 y permite detectar

específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 35 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los VHC de tipo 2a/2c y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 36 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los VHC de tipo 2b y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 4 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los VHC de tipo 3a y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 28 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los VHC de tipo 4a/4d y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 40 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en flavivirus y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 18 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los virus del dengue y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 41 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los virus del dengue de serotipo 4 y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 19 corresponde a una secuencia nucleotídica encontrada específicamente en los virus del Nilo Occidental y permite detectar específicamente estos últimos en el contexto de un procedimiento de detección como se ha descrito anteriormente.

Kits de detección

Otro objeto de la invención consiste en un kit de detección y/o diagnóstico que comprende al menos un soporte que comprende al menos una zona de recepción, en la que se coloca al menos un oligonucleótido modificado según la invención.

De este modo, el kit de detección puede utilizarse para la identificación sistemática de moléculas biológicamente activas, o para ensayos de diagnóstico o de secuenciación. Se puede prever que el kit de diagnóstico comprende una pluralidad de zonas de recepción distintas, en las que se deposita un soporte sólido injertado con oligonucleótidos idénticos o distintos. Por ejemplo, soportes sólidos injertados con oligonucleótidos modificados idénticos o diferentes pueden colocarse en zonas de recepción distintas de un sustrato recubierto con una película de oro o un sustrato injertado con las funciones que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida con el fin de formar un soporte de ensayo y/o diagnóstico.

El soporte puede ser especialmente un electrodo de oro. El kit de ensayo puede comprender ventajosamente una celda electroquímica que contiene un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. El electrodo de trabajo puede ser oro, el contraelectrodo de platino, y el electrodo de referencia de plata. El estudio de la interacción de un oligonucleótido modificado con una molécula que se va a ensayar puede comprender una etapa voltamperometría cíclica.

El injerto con una superficie que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono (función alquénilo) o un triple enlace carbono-carbono (función alquínilo) o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida puede por ejemplo utilizarse para aplicaciones en el campo de diagnóstico en un formato de microplacas y/o para la aplicación de ensayos de tipo ELOSA ("*Enzyme-Linked Oligo Sorbent Assay*" en inglés o "ensayo de oligoabsorbente ligado a enzimas" en español). Durante este tipo de ensayo, la superficie de los pocillos se injerta con funciones alquénilo, alquínilo o halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida. A continuación, la superficie se pone en contacto con los oligonucleótidos modificados según la invención. Por lo tanto, uno o más enlaces tioéter se forman debido a la presencia de una o más funciones tiol en los oligonucleótidos según la invención. Entonces, el ensayo consiste en poner en contacto una muestra a ensayar que comprende una secuencia nucleotídica diana con los pocillos funcionalizados de este modo para medir en particular la hibridación de los oligonucleótidos. La medición puede llevarse a cabo por ejemplo por un fluorescente gracias a un marcador de cadenas de oligonucleótidos.

La invención también se refiere al uso de un oligonucleótido modificado como se ha descrito anteriormente y que comprende al menos dos funciones tiol para el injerto en la superficie que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida. Según un modo de realización, el compuesto puede comprender tres o cuatro funciones tiol. El oligonucleótido modificado inmovilizado en la superficie comprende al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida mediante al menos dos funciones tiol que presentan una muy buena estabilidad para su uso en un ensayo de diagnóstico, tal como un ensayo de tipo ELOSA, así como una mayor disponibilidad frente a las dianas. Cuando el número de funciones tiol en el compuesto aumenta, el número de hibridaciones en el conjunto del soporte

inertado durante el ensayo de detección aumenta. Así, un oligonucleótido modificado que presenta cuatro funciones tiol permite obtener una hibridación de diana más eficaz.

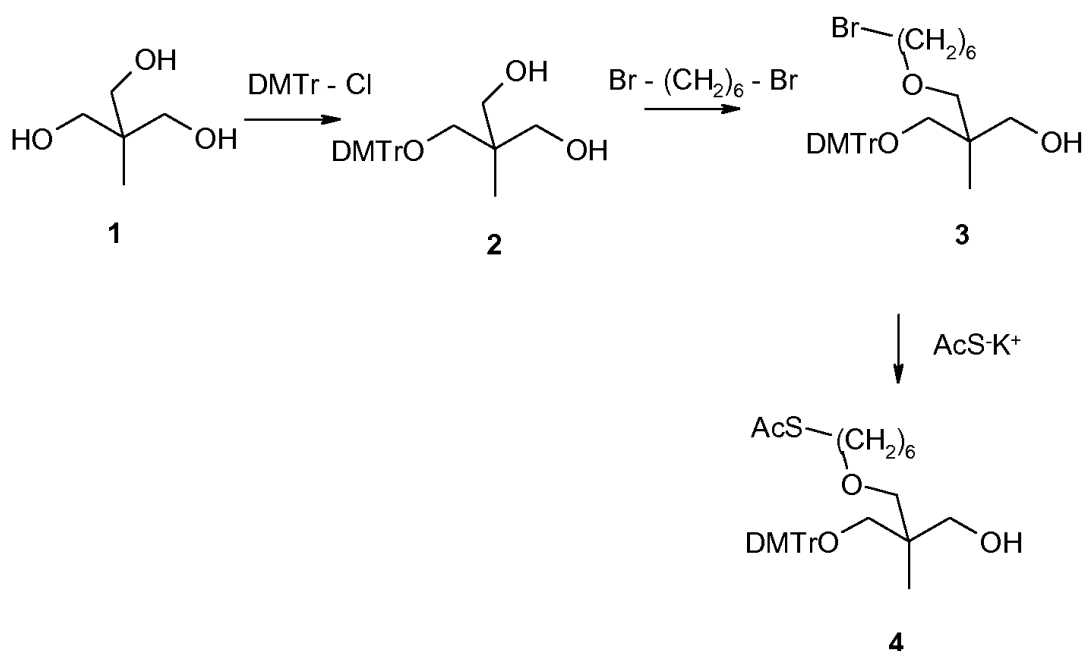
Ejemplos

5 En los ejemplos, se entiende por "sonda" una cadena de oligonucleótido que comprende al menos un compuesto tiol según la invención que tiene por objeto inmovilizarse en una superficie.

Se entiende por "diana" una cadena de oligonucleótidos que tiene por objeto hibridarse con la sonda, por ejemplo, durante un ensayo de diagnóstico.

Ejemplo 1: Síntesis de un oligómero

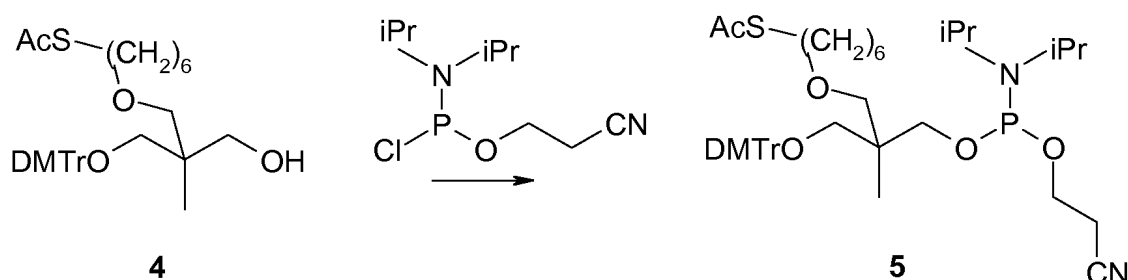
Síntesis del compuesto 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetiltiohexiloximetil)-2-metilpropano-1,3-diol 4



El compuesto **3** se obtiene a partir del compuesto **1** siguiendo el protocolo descrito en Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J. J., y Morvan, F., *Journal of Organic Chemistry* 74, 2009, 1218-1222.

15 A una solución de 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-bromohexiloximetil)-2-metil-1,3-propanodiol **3**, (556 mg, 0,95 mmol) y de tioacetato de potasio (162 mg, 1,42 mmol) en tolueno anhidro (10 ml) se añadió éter de corona 18-6 (70 mg, 0,26 mmol). La mezcla se agita magnéticamente durante 2 horas a 50 °C. Después de la dilución con diclorometano (150 ml), la mezcla se filtra y la fase orgánica se lava con agua (2 x 50 ml) y después se seca en Na₂SO₄. Después de la evaporación, el producto bruto de reacción se purifica por cromatografía en sílice (acetato de etilo de 0 al 30 % en ciclohexano) para dar lugar al producto deseado como un aceite incoloro (413 mg, 75 %).

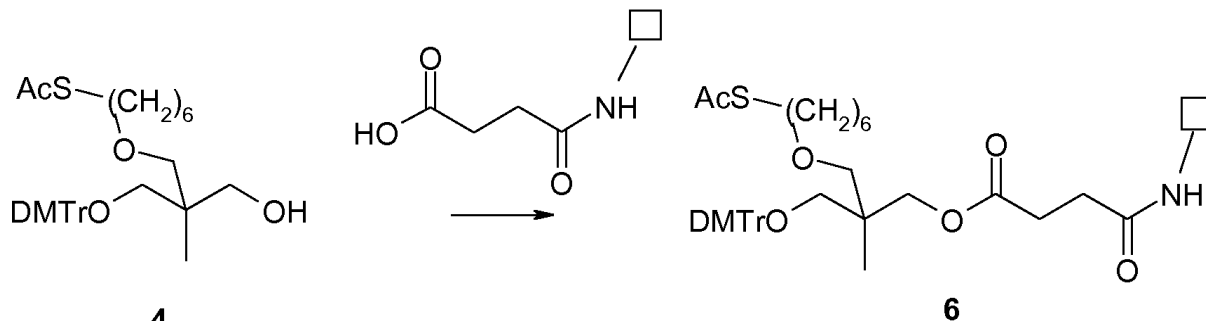
Síntesis de 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetiltiohexiloximetil)-2-metil-3-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidita)-propano-1,3-diol 5



25 A una solución de 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetiltiohexiloximetil)-2-metilpropano-1,3-diol **4** (413 mg, 0,71 mmol) y de diisopropilclorofosforamidita (186 µl, 1,06 mmol) en diclorometano anhidro (10 ml) se añade 2-cianoetil-N,N'-diisopropilclorofosforamidita (190 µl, 0,85 mmol). La mezcla se agita magnéticamente durante una hora a temperatura ambiente. El exceso de reactivo se neutraliza mediante la adición de 500 µl de agua y después la mezcla se diluye con diclorometano (150 ml). La fase orgánica se lava con una solución acuosa saturada de

NaHCO₃ (100 ml), después se seca sobre Na₂SO₄. Después de la evaporación, el producto bruto se purifica por cromatografía en sílice (acetato de etilo de 0 a 30 % en ciclohexano que contiene trietilamina al 4 %) que da lugar al compuesto **5** deseado como un aceite incoloro (400 mg, 72 %).

Síntesis del soporte sólido tiol **6**



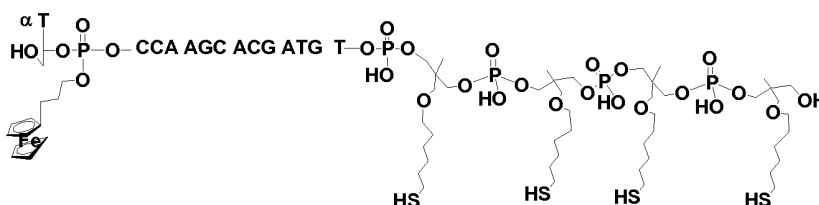
En un tubo esmerilado, 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetilthiohexiloximetil)-2-metil-1,3-propanodiol **4** (178 mg, 0,3 mmol) y dimetilaminopiridina (DMAP 36 mg, 0,3 mmol) se coevaporan con 3 ml de piridina anhidra. Después se añade succinil-alkuilamina de cadena larga-VPC (vidrio de poro controlado) (1 g), piridina anhidra (5 ml), trietilamina anhidra (160 ml, 1,2 mmol) y etildimetilaminopropil carbodiimido (EDC, 280 mg, 2,0 mmol). Después se enjuaga con 1 ml de piridina anhidra. La mezcla se agita durante una noche.

La mezcla se filtra y lava con CH_2Cl_2 (10 ml), después se seca en un desecador. El compuesto tiol en un soporte sólido se trata con una solución de anhídrido acético, N-metilimidazol, 2,6-lutidina en THF durante 3 h con agitación. La mezcla se filtra y lava con CH_2Cl_2 (10 ml), después se seca en un desecador para dar el soporte sólido tiol **6** (940 mg) con una funcionalización de 29 $\mu\text{mol/g}$.

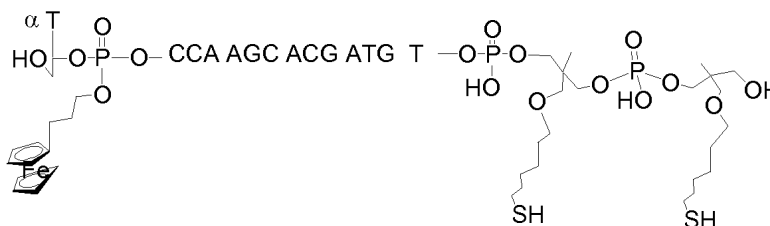
Ejemplo 2: Preparación de oligonucleótidos modificados

Tres oligonucleótidos que comprenden un grupo ferroceno en la posición 5' y un número creciente de compuestos tiol de tipo (1a) según la invención (1, 2 y 4 compuestos tiol) se sintetizaron en un sintetizador de ADN. El grupo ferroceno se ha utilizado para visualizar la inmovilización del oligonucleótido en la superficie de oro mediante voltamperometría cíclica. Uno, dos o cuatro grupos tiol se introdujeron en un soporte sólido de tipo propanodiol y se ha injertado la secuencia de ADN SEQ ID NO: 7. Finalmente, una fosoramidita alfa-timidina que lleva un grupo ferroceno se introdujo en la posición 5' del oligonucleótido modificado. La desprotección que sigue se efectúa en dos etapas. En primer lugar, el medio se trata con piperidina al 10 % en acetonitrilo durante 10 minutos para eliminar el grupo cianoetilo por una beta-eliminación y el acrilonitrilo resultante se elimina del medio por lavado con acetonitrilo. Después, un tratamiento con hidróxido de amonio concentrado permite eliminar los grupos protectores acilos en las nucleobases y en las funciones tiol y permite hidrolizar el brazo de unión de succinilo (soporte sólido). Este protocolo permite evitar la adición de Michael entre las funciones tiol desprotegidas y acrilonitrilo. Después de la evaporación, el oligonucleótido modificado no soportado se purifica por cromatografía HPLC en fase inversa en columna C18.

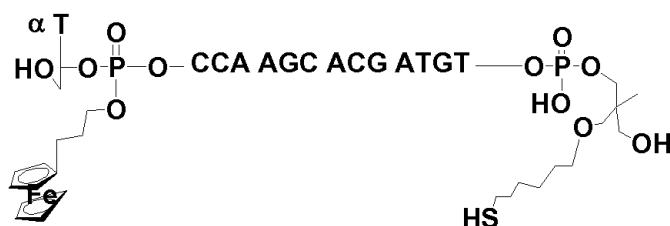
Tetratiol (oligonucleótido modificado por 4 compuestos tiol)



Ditiol (oligonucleótido modificado por 2 compuestos tiol)



Monotiol (oligonucleótido modificado por 1 compuesto tiol)



Injerto y estudio de estabilidad de oligonucleótidos modificados (tetraol, ditiol y monotioli)

Para este estudio, se utilizó un potenciostato multicanal VMP3 Biologic (Biologic Science Instruments, Pont de Claix). Los resultados se registraron utilizando un software EC-Lab Biologic Science Instruments.

- 5 La celda electroquímica se compone de un electrodo de oro de 0,28cm² de superficie, de un contraelectrodo de platino y de un electrodo de referencia Ag/AgCl.

Etapas 1: Reducción de los grupos tiol

- 10 4 nmol de ODN-tiol (oligonucleótidos modificados con uno o más compuestos tiol) se reducen en una solución de Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP, HCL, Sigma-Aldrich) (160 mm) en una concentración en la solución de 20 mM en TCEP, HCl, a 20 °C durante 2 h en atmósfera de argón.

El ODN se purifica mediante dos diluciones/centrifugaciones sucesivas con una solución de TCEP, HCl, 20 mM desgasificada en filtros amicon YM3000 (Millipore) 15min a 14.000 fcr (fcr = fuerza centrífuga relativa). Después de la dilución en 450 µl de tampón fosfato de 100 mM desgasificado, el medio se centrifuga de nuevo en filtros amicon YM3000, 30 min a 14.000 fcr.

- 15 Se obtiene una solución de injerto que contiene 4 nmol de ODN, 90 mM de fosfato de sodio, 2 mM de TCEP, HCl.

Etapas 2: Activación del electrodo de oro

El electrodo de trabajo de oro se limpia por un primer lavado en acetona durante 10 minutos con ultrasonidos. Una vez seca la superficie se sumerge en una solución "piraña" (0,7 ml de H₂SO₄, 0,3 ml de H₂O₂) durante 1 minuto para eliminar cualquier residuo orgánico de la superficie.

- 20 Finalmente, la activación básica del electrodo consiste en limpiar el oro de la superficie por producción de hidrógeno en el electrodo por hidrólisis del agua en hidróxido sódico 0,5 M en los potenciales negativos (-1,4 V frente a Ag/AgCl) durante varios ciclos.

Etapas 3: Injerto de la sonda

- 25 Después del enjuague, la solución de injerto que contiene el oligonucleótido tiol se pone en contacto con el electrodo de oro activado, durante tres días bajo atmósfera inerte.

Después del enjuague, la celda electroquímica se llena con electrolitos de análisis (10 mM de fosfato de sodio dibásico, 10 mM de fosfato de potasio monobásico, 250 mM de perclorato de sodio, pH 6,5).

La superficie se pasiva con una solución de 1mM de mercaptopropanol durante 30 minutos, después del enjuague, la célula se coloca en el electrolito de análisis durante 2 h para estabilizar la capa injertada.

- 30 *Etapas 4: Análisis de la estabilidad de los compuestos injertados en superficie*

Los análisis se realizan mediante voltamperometría cíclica (VC) a 50 mV/s; entre -0,1 V y 0,45V. Los estudios de estabilidad de la capa injertada se realizan después de una estabilización de la señal electroquímica durante 2h ciclando cada 30 minutos.

- 35 La celda se llena con agua destilada desgasificada a 60 °C u 80 °C durante 1 o 5 minutos, después del enjuague, la celda se llena con 1,5 ml de electrolito de análisis fosfato (20 mM), perclorato (250 mM). Después de 30 minutos de estabilización, se realiza VC.

La operación se repite según sea necesario.

Resultados

- 40 Se realizó una comparación de la tasa de injerto de los 3 oligonucleótidos modificados con compuestos tiol (tetraol, ditiol y monotioli). La tasa de injerto se determinó por integración del pico de oxidación del ferroceno. En efecto, la carga del electrón transferida está directamente relacionada con el número de ferrocenos presentes en la superficie del electrodo, y por lo tanto el número de sondas injertadas en el oro.

Los resultados siguientes corresponden a la media de tasas de injerto de 3 injertos diferentes para cada sonda.

	moléculas/cm ²
monotiol	5,21E+12
ditiol	5,81E+12
tetradiol	1,40E+12

Un histograma de los resultados se representa en la figura 5.

- 5 Las tasas de injertos para monotiol y ditioi son bastante comparables, se puede observar un injerto menor de tetradiol debido probablemente al impedimento mayor de acuerdo con el número de brazos tiol. A pesar de esta diferencia, la tasa de injerto de tetradiol sigue siendo importante y es muy reproducible.

- 10 Un estudio de estabilidad de 3 oligonucleótidos modificados por compuestos tiol frente a la temperatura se llevó a cabo en agua destilada desgasificada. La evolución de la respuesta electroquímica fue seguida por voltamperometría cíclica. El porcentaje de disminución de intensidad de oxidación del ferroceno se calcula en relación a la señal obtenida después de la estabilización.

Estas disminuciones en función del tiempo se notifican en las figuras 6 y 7.

La molécula tetradiol es muy estable frente a tratamientos sucesivos en agua a 60 °C (figura 6). En efecto, después de 5 veces por minuto de este tratamiento, hay un 97 % de señal de inicio, en oposición a monotiol (70 % de la señal de inicio) y ditioi (62 % de señal de inicio).

- 15 A 80 °C, la pérdida de señal es mayor (figura 7). Después de cinco tratamientos sucesivos de un minuto, el 83 % de la señal de inicio es aún cuantificable para tetradiol. Por lo tanto, la estabilidad de tetradiol es mucho mayor que la de monotiol (45 % de señal residual) y la de ditioi (18 % de señal residual).

- 20 Este estudio muestra el aumento significativo de la estabilidad del injerto tiol en oro por el empleo de un oligonucleótido modificado por 4 compuestos tiol (tetradiol) comparando el injerto de un monotiol o un ditioi. La falta de estabilidad de este último ditioi puede explicarse por una posible competencia entre el injerto en oro y el cierre del anillo para reformar el puente disulfuro intramolecular. Por consiguiente, parece preferible mantener un número de cuatro tioles en el brazo de injerto para asegurar una buena estabilidad frente a la temperatura.

Ejemplo 3: Aplicación para la detección del virus de la hepatitis C

Muestras diana a ensayar

- 25 1) Dianas naturales: amplicones "VHC (+)"

Se analizan muestras de plasmas de donantes de sangre que dieron positivo a la presencia de VHC a nivel nacional, por secuenciación. Se determinan el genotipo viral y el subtipo viral del VHC que infecta cada donante.

- 30 Los amplicones "VHC (+)" de 401 pb se producen a partir de la región viral NS5b del VHC por RT-PCR a partir de cada una de las muestras de plasma previamente descritas. Se extrajo ARN a partir de 200 µl de plasma humano utilizando el kit de ácido nucleico viral de alta pureza (Roche) según las recomendaciones del fabricante. El ARN se eluye en 50 µl de agua estéril (DNase/RNase libre). Con el fin de efectuar la etapa de retrotranscripción (RT), 11 µl de ARN se desnaturalizan a 72 °C durante 10 minutos y se retrotranscriben en presencia de 4 µl de 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µl de 10X de mezcla de hexanucleótidos (Roche), 2 µl de 10 mM de mezcla de dNTP (Invitrogen) y 200 U de Transcriptasa Inversa Superscript® II (Invitrogen). Las condiciones de retrotranscripción son las siguientes: 10 min a 23 °C, 45 min a 37 °C y 10 min a 95 °C.

Cinco microlitros de ADNc se amplifican por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los cebadores:

- 40 - "VHC directo biotinilado" (secuencia: [Btñ]-TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A (o [Btñ]-SEQ ID NO: 8)) y
 - "VHC inverso" (secuencia GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA (SEQ ID NO: 9)) (véase Tamalet C. y col. 2003, *Journal of Medical Virology* 71:391-398).

- 45 La reacción de amplificación se efectúa en 50 µl de mezcla de reacción que comprende: 1X PCR tampón sin MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), mezcla de dNTP de 0,2 mM (Invitrogen) y 1,3 U de polimerasa Taq (Invitrogen). Las condiciones de PCR son las siguientes: 5 min a 95 °C, 40 ciclos (desnaturalización: 40 s, 95 °C; hibridación: 40 s, 56 °C; elongación: 50 s, 72 °C), y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los amplicones de VHC obtenidos se analizan por electroforesis en gel de agarosa, se alicuotan y almacenan a -20 °C antes de su uso.

Estos amplicones cuyos genotipos virales de origen son conocidos, se conservan en forma de una biblioteca.

5 Un ejemplo de amplicón largo de 401 pb obtenido a partir de una cepa viral 1a/1b, de referencia n.º PTR6719 tiene por secuencia:

5'-

TGGGGATCCCGTATGATAACCGCTGCTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACAT
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACCTAGCCCCGAAGCCAGACAG
GCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAA
AAGGGCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCGCGGAGCGGTGTGCTGACGACCA
GCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCGGCCTGTCGAGCTGC
AAAGCTCCAGGACTGCACAATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTTGTCTGTTATCTGT
GAAAGCGCGGGAACCCARGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCT
ATGACCAGGAATTCCGCC - 3' (SEQ ID NO : 12).

Un ejemplo de amplicón largo de 401 pb obtenido a partir de una cepa viral 2, de referencia n.º PTR7761 tiene por secuencia:

5'-

10 TGGGGATCCCGTATGATAACCGCTGCTTTGACTCAACTGTCACTGAGAGAGACAT
CAGAACCGAGGAGTCCATATACCAGGCCTGCTCCCTAACCGAGGAGGCTCGCACC
GCCATACACTCGCTGACTGAGAGGCTATACGTGGGAGGGGCCATGCTCAATAGCA
AAGGCCAGACCTGCGGGTACAGGCGTTGCCGCGCCAGCGGGGTGCTCACCCTA
GCATGGGAAACACCATTACGTGCTATGTGAAAGCTCTAGCGGCATGCAAGGCCGC
AGGGATAGTAGCGCCACGATGCTGGTATGCGGCGACGACCTGGTCGTCATCTCA
GAAAGCCAGGGGACTGAGGAGGACGAGCGGAACCTGAGAGTCTTCACGGAGGCT
ATGACCAGGAATTCCGCC-3' (SEQ ID NO : 31).

Un ejemplo de amplicón largo de 401 pb obtenido a partir de una cepa viral 3a, de referencia n.º PTR9058 tiene por secuencia:

5'-

TGGGGATCCCGTATGATAACCGCTGCTTTGACTCGACTGTCACTGAACAGGATAT
CAGGGTGAAGAGGAGATATACCAATGCTGTAATCTTGAACCGGAGGCCAGGAA
GGTGATCTCCTCCCTCACGGAGCGGCTTTACTGCGGGGGTCTATGTTCAACAGC
AAAGGGGGCCAGTGTGGTTATCGCCGTTGCCGTGCTAGTGGAGTTCTACCTACCA
GCTTCGGCAATACAATCACTTGCTACATCAAGGCCACAGCGGCTGCAAGGGCCGC
AGGCCTCCGGAACCCGGACTTTCTTGTCTGCGGAGACGATCTAGTCGTGGTGGCT
GAGAGTGACGGCGTCGACGAGGATGGGGCGGCCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCT
ATGACCAGGAATTCCGCC-3' (SEQ ID NO : 14).

Un ejemplo de amplicón largo de 401 pb obtenido a partir de una cepa viral 4a/4d, de referencia n.º PTR4162 tiene

por secuencia:

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACTGTAACCGAAAGAGACAT
CAGGGTTCGAGGAGGAGGTCTATCAGTGTGTGACCTAGAGCCCCGAAGCCCGCAA
GGTAATATCCGCCCTCACAGAGAGACTCTACGTGGGCGGTCCCATGTACAACAGC
AGGGGAGACCTTTGCGGAACCTCGACGGTGCCGTGCAAGCGGCGTATTCACCACCA
GCTTTGGGAACACACTGACGTGCTATCTTAAGGCCAGCGCGGCCATCAGGGGCTGC
AGGCCTAAAGGACTGCACCATGCTGGTCTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCGCT
GAAAGCGATGGCGTGGAGGAGGACAACCGTGCGCTCAGAGCCTTCACGGAGGCT
ATGACCAGGAATTCCGCC-3' (SEQ ID NO : 32).

- 5 Como complemento de estos largos amplicones, otros cebadores se diseñaron para generar amplicones más cortos a partir de cada una de las muestras de plasmas descritas previamente. Se sigue el mismo protocolo global para generar amplicones "cortos", y solo se cambian los cebadores utilizados. Los cebadores utilizados se seleccionan según el genotipo y/o subtipo de VHC que ha infectado a los pacientes.

Amplicones específicos de VHC de subtipo 1a/1b, con un tamaño de 191 nucleótidos se amplifican con los siguientes cebadores:

- 10 - Cebador directo biotinilado "1a/1b directo", de secuencia 5'-[BtN]-TGA-CRA-CYA-GCT-GYG-GTA-AYA-CCC-T-3' (o [BtN]-SEQ ID NO: 10), y
- Cebador inverso "VHC inverso" de SEQ ID NO: 9 (véase anteriormente).

Un ejemplo de amplicón corto de 191 nucleótidos obtenido a partir de una cepa viral 1a/1b, de referencia n.º PTR6719 tiene por secuencia:

5'-

TGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCGGCCTG
TCGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACAATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTTGTC
GTTATCTGTGAAAGCGCGGGAACCCARGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCA
CGGAGGCTATGACCAGGAATTCCGCC -3' (SEQ ID NO : 13).

- 15 Amplicones específicos de VHC de subtipo 2, con un tamaño de 108 nucleótidos se amplifican con los siguientes cebadores:

- Cebador directo biotinilado "VHC 2 directo biotinilado", de secuencia 5'-[BtN]-ATG-YTG-GTR-TGC-GGC-GAC-GAC-3' (o [BtN]-SEQ ID NO: 29), y
- Cebador inverso "VHC inverso" de SEQ ID NO: 9 (véase anteriormente).

- 20 Un ejemplo de amplicón corto de 108 nucleótidos obtenido a partir de una cepa viral 2, de referencia n.º PTR7761 tiene por secuencia:

5'-

ATGCTGGTATGCGGCGACGACCTGGTCGTCATCTCAGAAAGCCAGGGGACTGAG
GAGGACGAGCGGAACCTGAGAGTCTTCACGGAGGCTATGACCAGGAATTCCGCC
-3' (SEQ ID NO : 33).

Amplicones específicos de VHC de subtipo 3a, con un tamaño de 143 nucleótidos se amplifican con los siguientes cebadores:

- 25 - Cebador directo biotinilado "VHC directo", de secuencia SEQ ID NO: 8 (véase anteriormente), y
- Cebador inverso "3a rev" de secuencia: 5'-GCA-GTA-AAG-CCG-YTC-CGT-GAG-3' (SEQ ID NO: 11).

Un ejemplo de amplicón corto de 143 nucleótidos obtenido a partir de una cepa viral 3 a, de referencia n.º PTR9058 tiene por secuencia:

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCGACTGTCACTGAACAGGATAT
CAGGGTGAAGAGGAGATATACCAATGCTGTAATCTTGAACCGGAGGCCAGGAA
GGTGATCTCCTCCCTCACGGAGCGGCTTTACTGC-3' (SEQ ID NO :15).

5 Amplicones específicos de VHC de subtipo 4a/4d, con un tamaño de 175 nucleótidos se amplifican con los siguientes cebadores:

- Cebador directo biotinilado "VHC directo", de secuencia SEQ ID NO: 8 (véase anteriormente), y
- Cebador inverso "VHC inverso 4 rev" de secuencia: 5'-AGG-TCT-CCC-YTG-CTG-TTG-TRC-AT-3' (SEQ ID NO: 30).

10 Un ejemplo de amplicón corto de 175 nucleótidos obtenido a partir de una cepa viral 4a/4d, de referencia n.º PTR4162 tiene por secuencia:

5'-

TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACTGTAACCGAAAGAGACAT
CAGGGTCGAGGAGGAGGTCTATCAGTGTGTTGTGACCTAGAGCCCGAAGCCCGCAA
GGTAATATCCGCCCTCACAGAGAGACTCTACGTGGGCGGTCCCATGTACAACAGC
AGGGGAGACCT -3' (SEQ ID NO : 34).

Como previamente, los amplicones VHC "cortos" obtenidos de 191, 108, 175 y 143 nucleótidos se analizan por electroforesis en gel de agarosa, se alicuotan y almacenan a -20 °C antes de su uso.

Estos amplicones cuyos genotipos virales de origen son conocidos, se almacenan en forma de una biblioteca.

15 2) Dianas sintéticas: oligonucleótidos biotinilados de 15 meros o 105 meros

Se sintetizaron oligonucleótidos sintéticos de 15 meros o 105 meros biotinilados en el extremo 5'.

Los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros son estrictamente complementarios a las sondas de VHC seleccionadas (véase anteriormente), y poseen las siguientes secuencias:

- 20 - los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros específicos del subtipo 1a/1b tienen la secuencia: 5' [Btn]-GCT CCR GGA ACT GCA C -3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 2);
- los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros específicos del subtipo 3a tienen la secuencia: [Btn]-CTT GAA CCG GAG GCC-3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 5) y
- los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros específicos del subtipo 4a/4d tienen la secuencia: 5' [Btn]-CTA YGT GGG CGG YCC -3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 39).

25 Oligonucleótidos más largos que comprenden la secuencia complementaria de las sondas de VHC presentadas a continuación, enmarcadas a ambos lados por secuencias de 45 nucleótidos, o 105 nucleótidos en total, y biotinilados en el extremo 5' también se sintetizaron para el desarrollo de ensayos de hibridación de sondas/dianas.

Los oligonucleótidos sintéticos de 105 meros utilizados poseen las siguientes secuencias:

- 30 - los oligonucleótidos sintéticos de 105 meros específicos del subtipo 1a/1b tienen la secuencia: 5' [Btn]-CCT CAC TTG CTA CAT CAA GGC CCA GGC AGC CTG TCG AGC CGC AGG - GCT CCR GGA ACT GCA C - CAT GCT CGT GTG TGG CGA CGA CTT AGT CGT TAT CTG TGA AAG TGC-3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 3); y
- los oligonucleótidos sintéticos de 105 meros específicos del subtipo 3a tienen la secuencia: 5' [Btn]-GAA CAG GAC ATC AGG GTG GAA GAG GAG ATA TAC CAA TGC TGT AAC - CTT GAA CCG GAG GCC - AGG AAA GTG ATC TCC TCC CTC ACG GAG CGG CTT TAC TGC GGG GGC -3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 6).

35 *Diseño de sondas oligonucleotídicas para el reconocimiento de secuencias de VHC.*

La región NS5b que codifica la ARN polimerasa del VHC se orientó selectivamente para el diseño de sondas oligonucleotídicas de la invención.

Las secuencias de genomas de VHC amplificadas en la región NS5b (banco representativo de 800 muestras) se

- determinaron y analizaron utilizando software de alineamiento clustalW2 y filogenia Mega5 para identificar las zonas más conservadas para cada genotipo y/o subtipo de VHC. Se seleccionaron regiones distintas que permiten el reconocimiento genérico de secuencias virales de un genotipo y, opcionalmente, de un subtipo dado. Una región altamente conservada que permite la detección específica de todos los VHC de genotipo viral 1a/1b también se ha identificado y seleccionado. Del mismo modo, se ha identificado y seleccionado una región que permite la detección específica de VHC de genotipo viral 2, 2a/2c, 2b, 3a y 4a/4d. Se han diseñado oligonucleótidos de 15 meros complementarios de cada una de las regiones seleccionadas y los oligonucleótidos multi-tiol se sintetizaron basándose en las secuencias seleccionadas para el reconocimiento específico de los subtipos 1a/1b, 2, 2a/2c, 2b, 3a y 4a/4d.
- 5 La secuencia oligonucleotídica retenida para generar la sonda 1a/1b es: 5'-GTG-CAG-TCC-YGG-AGC (SEQ ID NO: 1). Esta sonda es específica de cepas de subtipo 1a y 1b.
- La secuencia oligonucleotídica retenida para generar la sonda 2 es: 5'-TGG-CTY-TCT-GAG-ATG (SEQ ID NO: 27). Esta sonda es específica de cepas de subtipo 2.
- 10 La secuencia oligonucleotídica retenida para generar la sonda 2a/2c es: 5'-GGA-CTC-CTC-RGT-TCT (SEQ ID NO: 35). Esta sonda es específica para las cepas del subtipo 2a y 2c.
- La secuencia oligonucleotídica retenida para generar la sonda 2b es: 5'-TAT-GGA-TTC-TTC-TGT (SEQ ID NO: 36). Esta sonda es específica para las cepas de subtipo 2b.
- La secuencia oligonucleotídica retenida para generar la sonda 3a es: 5'-GGC-CTC-CGG-TTC-AAG (SEQ ID NO: 4). Esta sonda es específica para las cepas de subtipo 3a.
- 20 La secuencia oligonucleotídica retenida para generar la sonda 4a/4d es: 5'-GGR-CCG-CCC-ACR-TAG (SEQ ID NO: 28). Esta sonda es específica para las cepas de subtipos 4a y 4d.

Evaluación de las hibridaciones de sondas/dianas por ELOSA (ensayo de oligoabsorbente ligado a enzimas)

- El injerto de cualquier tipo de sondas tiol (oligonucleótidos de anomería alfa o beta, sondas lineales o tallo-bucle ("caracoles") etc.) puede realizarse según el siguiente protocolo optimizado. Los pocillos de microplacas activadas maleimida (Pierce) se lavan con tampón WB1 (Na₂HPO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05 % (p/v), pH 7,2). La funcionalización de los pocillos se realiza con 100 nM de sondas multi-tiol (como se han descrito anteriormente) en tampón BB (Na₂HPO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, 100 mM de EDTA, pH 7,2) durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Los pocillos se lavan a continuación tres veces con WB1, se saturan con 10 µg.ml⁻¹ de solución de cisteína-HCl en BB (Pierce) durante 1 hora a TA, y se lavan de nuevo tres veces con WB1.
- 25 Los ensayos de hibridación se realizan con las dianas sintéticas cortas de 15 o 105 meros o con amplicones reales de VHC largos (401 nt) o más cortos (191 nt o 143 nt). Las dianas sintéticas y los amplicones se diluyen en 150 µl de tampón de hibridación (TH: NaCl 0,9 M, 60 mM de NaH₂PO₄, 6 mM de EDTA, pH 7,4, Denhardt 5X) antes de depositarse en los pocillos. Una etapa suplementaria de desnaturalización de 10 min a 95 °C se efectúa en los amplicones antes de su transferencia en los micropocillos. La hibridación se realiza durante la noche a 37 °C. Los pocillos se lavan con tampón WB2 (NaCl 0,75 M, 50 mM de NaH₂PO₄, 5 mM de EDTA, pH 7,4, SDS al 0,1 %) tres veces 2 min a TA y una vez 30 min a 50 °C.
- 30 La etapa de detección se realiza después de la incubación durante 30 min a TA de los pocillos en presencia de 100 µl/pocillos de estreptavidina-europio (Perkin Elmer) diluido en 100 µl de tampón de ensayo ("Assay Buffer", Perkin Elmer). Los pocillos se lavan finalmente seis veces con tampón WB3 (WB1X, Perkin Elmer) y 200 µl de tampón de revelación de señal ("tampón de potenciación", Perkin Elmer) se añaden a cada pocillo durante 5 min a TA. La fluorescencia en tiempo resuelto se mide en un detector multimarcado Victor™ 1420 ("contador multimarcado", Perkin Elmer) según el protocolo del fabricante (excitación a 340 nm y emisión a 615 nm).

Resultados 1: Ensayos de hibridación en sondas lineales de anomería beta que poseen 4 funciones tiol

- Se injertan sondas 3a lineales de anomería beta que poseen 4 funciones tiol con una densidad de 100 nM en un soporte recubierto de grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente. Los resultados obtenidos con las sondas 3a se describen en las figuras 8 y 9.
- Se realizan ensayos de ELOSA variando la naturaleza y la concentración de la diana utilizada (dianas sintéticas cortas de 15 meros y 105 meros, amplicones cortos de 143 nt o 191 nt, amplicones largos de 401 nt) para verificar la especificidad de las sondas retenidas.
- 50 Los resultados presentados en la figura 8 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con amplicones largos específicos del genotipo VHC 3a en diluciones 1/10, 1/100 y 1/1.000 y con amplicones largos no específicos (que corresponden al genotipo VHC 1a/1b) en diluciones 1/10, 1/100 y 1/1.000. El control positivo de hibridación se efectúa con una diana sintética (15 meros) específica para el genotipo 3a en concentraciones de 1.000 pM y 5 pM. Los controles negativos de hibridación se efectúan con una diana sintética (15 meros) no específica

(correspondiente a la secuencia diana 1a/1b) a una concentración de 1.000 pM o con TH (tampón de hibridación) solo, que no comprende diana alguna.

Para que la sonda 3 haya podido considerarse "específica" del subtipo 3a, resulta necesario que los resultados obtenidos con dianas "3a" superen el ruido de fondo obtenido con los controles negativos, de modo que la hibridación sonda/diana pueda cuantificarse.

Los resultados presentados en la figura 9 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con las siguientes dianas:

- diana sintética de 15 meros o 105 meros específica 3a en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- diana sintética de 15 meros o 105 meros no específica 1a/1b (control negativo) en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- amplicón largo específico 3a en dilución 1/100,
- amplicón largo no específico 1a/1b en dilución 1/100,
- amplicón corto específico 3a (143 nt) en diluciones 1/100 y 1/1.000,
- amplicón corto no específico 1a/1b (191 nt) en diluciones 1/100 y 1/1.000,
- TH solo, no comprende diana alguna.

Los resultados obtenidos en las figuras 8 y 9 muestran que la sonda "3a" según la presente invención no solo es capaz de hibridarse con dianas sintéticas específicas 3a de 15 meros (la diana tiene una concentración de 5 pM) o 105 meros (la diana tiene una concentración de 10 pM), sino también con amplicones largos de 401 nt o cortos de 143 nt obtenidos a partir de plasmas genotipados 3a, y por tanto específicos del genotipo 3a (en una dilución al 1/1.000^a). Estos resultados muestran también que las dianas 1a/1b, no específicas de la sonda 3a, no se hibridan de forma detectable con esta última, independientemente de su forma (diana sintética de 15 meros o 105 meros, amplicón corto 191 nt o largo 401 nt), o su concentración (1.000 pM para las dianas sintéticas o dilución al 1/10^a para los amplicones).

Los resultados presentados en la figura 10 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con sondas 1a/1b lineales (véase anteriormente), de anomería beta que poseen 4 funciones tiol, que se injertan en una densidad 100 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de la figura 10 se obtienen a partir de las siguientes dianas:

- diana sintética de 15 meros o 105 meros específica 1a/1b en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- diana sintética de 15 meros o 105 meros no específica 3a (control negativo) en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- amplicón largo del genotipo VHC 1a/1b en dilución 1/100,
- amplicón largo no específico 3a en dilución 1/100,
- amplicón corto (191 nt) específico 1a/1b en diluciones 1/100 y 1/1.000,
- amplicón corto (143 nt) no específico 3a en diluciones 1/100 y 1/1.000,
- TH solo, no comprende diana alguna.

Los resultados obtenidos en la figura 10 muestran que la sonda 1a/1b según la presente invención no solo es capaz de hibridarse con dianas sintéticas específicas de 15 meros o 105 meros específicas 1a/1b (la diana tiene una concentración de 10 pM), sino también con amplicones cortos de 191 nt obtenidos a partir de plasmas genotipados 1a/1b, y por tanto específicos del genotipo 1a/1b (en una dilución al 1/1.000^a) y con amplicones largos de 401 nt específicos del genotipo 1a/1b (en una dilución al 1/1.000^a). Estos resultados muestran también que las dianas 3a, no específicas de la sonda 1a/1b, no se hibridan de forma detectable con esta última, independientemente de su forma (diana sintética de 15 meros o 105 meros, amplicón corto 143 nt o largo 401 nt), o su concentración (1.000 pM para las dianas sintéticas o dilución al 1/10^a para los amplicones).

Los resultados presentados en la figura 17 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con una sonda 1a/1b lineal de anomería beta que posee 4 funciones tiol, que se injerta en una densidad 100 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de la figura 17 se obtienen a partir de las siguientes dianas:

- diana sintética de 15 meros específica 1a/1b en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- diana sintética 15 meros no específica 2a/2c, 2b, 3a o 4a/4d (control negativo) en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- amplicón largo específico del genotipo VHC 1a/1b en dilución 1/100,
- amplicón largo no específico 2a/2b/2c, 3a o 4a/4d en dilución 1/100,
- TH solo, no comprende diana alguna.

Los resultados presentados en la figura 18 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con una mezcla de dos sondas (2a/2c de SEQ ID NO: 35 y 2b de SEQ ID NO: 36) lineales de anomería beta que poseen 4 funciones tiol, que se injertan en una densidad 50 nM cada una en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de la figura 18 se obtienen a partir de las siguientes dianas:

- dianas sintéticas de 15 meros específicas 2a/2c y 2b en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- diana sintética de 15 meros no específica 1a/2b, 3a o 4a/4d (control negativo) en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- 5 - amplicón largo específico del genotipo VHC 2a/2b/2c en dilución 1/100,
- amplicón largo no específico 1a/2b, 3a o 4a/4d en dilución 1/100,
- TH solo, no comprende diana alguna.

Los resultados presentados en la figura 19 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con una sonda 3a lineal de anomería beta que posee 4 funciones tiol, que se injerta en una densidad 100 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de la figura 19 se obtienen a partir de las siguientes dianas:

- diana sintética de 15 meros específica 3a en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- diana sintética de 15 meros no específica 1a/1b, 2a/2b/2c o 4a/4d (control negativo) en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- 15 - amplicón largo específico del genotipo VHC 3a en dilución 1/100,
- amplicón largo no específico 1a/1b, 2a/2b/2c o 4a/4d en dilución 1/100,
- TH solo, no comprende diana alguna.

Los resultados presentados en la figura 20 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con una sonda 4a/4d lineal de anomería beta que posee 4 funciones tiol, que se injerta en una densidad 100 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de la figura 20 se obtienen a partir de las siguientes dianas:

- diana sintética de 15 meros específica 4a/4d en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- diana sintética de 15 meros no específica 1a/1b, 2a/2b/2c o 3a (control negativo) en una concentración de 10 pM o 1.000 pM,
- 25 - amplicón largo específico del genotipo VHC 4a/4d en dilución 1/100,
- amplicón largo no específico 1a/1b, 2a/2b/2c o 3a en dilución 1/100,
- TH (tampón de hibridación) solo, no comprende diana alguna.

Para los ensayos efectuados utilizando amplicones, los resultados de 3 ensayos independientes realizados a partir de las cepas virales de diferentes orígenes, pero del mismo subtipo, se presentan en las figuras 17 a 20.

- 30 Los resultados obtenidos en las figuras 17 a 20 muestran que cada una de las sondas 1a/1b, 2a//2c, 2b, 3a o 4a/4d según la presente invención no solo es capaz de hibridarse con dianas sintéticas de 15 meros que le son específicas (la diana tiene una concentración de 10 pM), sino también con amplicones específicos del mismo genotipo (en una dilución de 1/100^a). Estos resultados también muestran que las dianas no específicas no se hibridan de forma detectable.

35 Resultados 2: Estudio del efecto del número de funciones tiol

Se realizan también ensayos de ELOSA variando el número de funciones tiol en la sonda utilizada y ensayando diferentes naturalezas y concentraciones de dianas (diana sintética corta de 15 meros o 105 meros, amplicones cortos de 143 nt o 191 nt, amplicones largos de 401 nt).

- 40 Los resultados presentados en la figura 11 corresponden a un ensayo de ELOSA realizado con sondas 1a/1b lineales (véase anteriormente) de anomería beta que poseen 1, 2, 4, 6 u 8 funciones tiol, que se injertan en una densidad 100 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente. Los resultados de la figura 11 se obtienen a partir de las siguientes dianas:

- diana sintética de 15 meros o 105 meros específica 1a/1b en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- diana sintética de 15 meros o 105 meros no específica 3a (control negativo) en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- 45 - TH solo, no comprende diana alguna.

Cada condición de hibridación sonda/diana se ensaya por triplicado en una placa de microtitulación. Los ensayos se reproducen tres veces en su totalidad para la etapa de injerto de las sondas para la detección de la hibridación (en 3 microplacas diferentes). Los resultados expuestos en la solicitud corresponden por consiguiente a una media de 9 mediciones.

Los resultados en la figura 11 muestran que la hibridación de una diana sintética de 15 meros específica 1a/1b con la sonda 1a/1b es detectable a partir de 10 pM, en cuanto a la presencia de un tiol. La detección de la diana sintética específica de 105 meros 1a/1b necesita, por su parte, una concentración diana de 100 pM cuando la sonda comprende 2 funciones tiol o de 10 pM cuando la sonda comprende 4, 6 u 8 funciones tiol. No se observó

hibridación detectable alguna en presencia de dianas 3a, no específicas de la sonda 1a/1b, independientemente de su tamaño (15 meros o 105 meros) o de su concentración (concentración máxima ensayada: 1.000 pM). Los resultados muestran así que la adición de funciones tiol en la sonda oligonucleotídica injertada mejora los rendimientos de detección de las dianas mencionadas. La presencia de 4 funciones tiol en la sonda utilizada permite

5

Resultados 3: Estudio del efecto de la densidad de injerto

Los resultados presentados en las figuras 12, 13 y 14 corresponden a ensayos de ELOSA realizados con sondas 1a/1b lineales (véase anteriormente), de anomería beta que poseen 1, 2 o 4 funciones tiol, que se injertan en densidades de 1, 10, 25, 50 o 100 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente. La figura 12 ilustra los resultados obtenidos para la sonda monotiol, es decir, que comprende un

10

único compuesto tiol según la invención. La figura 13 ilustra los resultados obtenidos para la sonda ditiol, es decir, que comprende dos compuestos tiol según la invención, y la figura 14 ilustra los resultados obtenidos para la sonda tetratiol, es decir, que comprende cuatro compuestos tiol según la invención.

En cada caso, los ensayos de hibridación se realizan con las siguientes dianas:

15

- diana sintética 15 meros o 105 meros específica 1a/1b en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- diana sintética 15 meros o 105 meros no específica 3a (control negativo) en una concentración de 10 pM, 100 pM o 1.000 pM,
- TH solo, no comprende diana alguna.

Los resultados presentados en las figuras 12, 13 y 14 confirman la especificidad de hibridación de las sondas 1a/1b con las dianas 1a/1b, en la medida en que no se observa hibridación detectable en presencia de dianas 3a, independientemente de la concentración de estas últimas.

20

Estos resultados confirman (1) que la presencia de un solo tiol en la sonda utilizada no permite detectar dianas que tienen un tamaño de 105 nt, (2) a partir de 2 funciones tiol, es posible detectar la hibridación entre la sonda y la diana de 105 nt (en particular a partir de 100 pM de diana), (3) que los mejores resultados se obtienen con la sonda tetratiol.

25

Por otra parte, parece que la densidad de injerto de la sonda monotiol no influye en gran medida en las señales de hibridación, independientemente de las dianas (15 meros y 105 meros), mientras que la hibridación es dependiente de la dosis de la densidad de injerto en el caso de sondas ditiol y tetratiol. Las mejores señales de hibridación sondas/dianas (15 meros y 105 meros) se obtienen con la sonda tetratiol injertada en 100 nM.

30

Evaluación de las hibridaciones sondas/dianas en un electrodo de superficie de oro

Un ensayo de hibridación se realizó mediante el injerto de una secuencia de sonda específica 1a/1b en un electrodo de superficie de oro.

Una sonda tetratiol que lleva un oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 1 se ha injertado en el electrodo de trabajo de superficie de oro de una celda. La hibridación de las dianas de 105 meros específicas 1a/1b (SEQ ID NO: 3) se evaluó para 3 concentraciones diferentes de dianas: 1 pM, 10 pM y 100 pM. Un control negativo se efectúa con una diana de 105 meros específica 3a de SEQ ID NO: 6 (control negativo).

35

La reacción de hibridación es seguida por voltametría de pulsos diferenciales. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 15.

Los valores en ordenada corresponden a los valores normalizados de variación de corriente.

40

Los resultados obtenidos muestran que el ensayo de hibridación por electroquímica es sensible y específico a una concentración de dianas de 1 pM. La variación de señal también parece ser más fuerte en 1 pM cuando el ensayo se lleva a cabo a 100 pM. Una mayor concentración de diana, un efecto de la adsorción no específico de las dianas en la superficie del electrodo reduce la eficacia de la reacción de reconocimiento. El procedimiento electroquímico no permite un seguimiento cuantitativo de la reacción de hibridación. Sin embargo, proporciona una respuesta sí/no

45

Ejemplo 4: Aplicación para la detección de flavivirus, tales como los virus del dengue y del Nilo Occidental

Se extrajeron y se analizaron secuencias conocidas del virus del dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4) y del Nilo Occidental de la base de datos GenBank. La tabla 1 enumera los números de acceso GenBank de las secuencias del virus del dengue y del Nilo Occidental que sirven para realizar los alineamientos:

50

Tabla 1

Virus	Número de acceso GenBank de las secuencias
Dengue 1 (8 cepas)	FJ882517, FJ882552, EU482480, FJ639683, HM181967, AY726549, GU131762, GU131982
Dengue 2 (17 cepas)	GQ398257, HM582109, HM582110, HM582116, HM582117, AY744150, AY744149, AY744148, AY744147, EU056812, AF169686, AF169683, AF169687, AF169682, GU131896, DQ181803, EU073981
Dengue 3 (34 cepas)	GQ252678, GU131951, EU482566, GQ868574, GQ868617, FJ882577, GU131868, FJ024465, HM181974, HM181973, GQ199870, AY770511, GU370053, GQ199888, GU131939, GU131937, GU131934, HM631854, GU131905, GU189648, EU660409, DQ109373, DQ109368, DQ109310, AY676351, AY676350, FJ744740, FJ744730, DQ109400, DQ109348, GQ868593, AB214880, AY744677, EF629370
Dengue 4 (20 cepas)	AY618992, AY618990, AY858049, AY618993, GQ398256, AF289029, EU854301, EU073983, GU289913, AF326573, FJ882597, GQ199885, GQ199884, GQ199882, GQ868582, GQ868584, AY762085, AY618989, AY618988, EF457906
Nilo Occidental (15 cepas)	GQ851607, GQ851606, AY369441, AY490240, AY274504, GQ851602, GQ851603, DQ256376, DQ318019, EF429199, EF429200, JN858070, AY277251, FJ159131, FJ159129

Diseño de sondas oligonucleotídicas para el reconocimiento de secuencias del dengue y del Nilo occidental.

Los alineamientos y las comparaciones de secuencias efectuadas con software clustalW2 y Mega5 han permitido definir 4 regiones, entre las cuales:

- 2 se conservan entre todas las cepas de los virus del dengue y del Nilo Occidental, así como entre otros flavivirus, tales como el virus de la encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla y el virus usutu (listado no exhaustivo)
- 1 se conserva entre los virus del dengue,
- 1 se conserva entre el virus del Nilo Occidental.

Estas regiones se utilizaron para diseñar sondas según la presente invención, con el fin de permitir la detección genérica de flavivirus, o la detección específica del virus del dengue, de subtipo 4 del dengue o del virus del Nilo Occidental, en una muestra biológica.

Las sondas 1-3 presentadas en la tabla 2 a continuación permiten así detectar flavivirus de manera general (incluyendo los flavivirus del dengue y del Nilo Occidental). La sonda 4 es específica para el virus del dengue, independientemente del serotipo. La sonda 5 es específica del serotipo 4 del virus del dengue. La sonda 6 es específica para virus del Nilo Occidental.

Tabla 2

Sonda	Secuencia	Especificidad	Tamaño	SEQ ID
Sonda 1	5'-GCT CCC ARC CAC AT-3'	Genérica	14 meros	SEQ ID NO: 16
Sonda 2	5'-AAC CAT CTR TCT TC-3'	Genérica	14 meros	SEQ ID NO: 17
Sonda 3	5'-AGC CAC ATG WAC CA -3'	Genérica	14 meros	SEQ ID NO: 40
Sonda 4	5'-CTT CYC CTT CYA CTC-3'	Dengue	15 meros	SEQ ID NO: 18
Sonda 5	5'-CAC TCC ACT CCA TGA-3'	Dengue 4	15 meros	SEQ ID NO: 41
Sonda 6	5'-CKC CTC CTG ART TCT-3'	Virus del Nilo Occidental	15 meros	SEQ ID NO: 19

Diseño de dianas para ensayar la especificidad de reconocimiento de las sondas 1 a 6

Los amplicones que abarcan cada una de las 6 regiones identificadas se preparan efectuando una PCR simple, a partir de las secuencias mencionadas en la tabla 1, utilizando los cebadores y el protocolo descritos previamente por Scaramozzino y col. (Scaramozzino N. y col. *Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences*. 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1922-1927).

La amplificación primaria por PCR se realiza de este modo con:

- el cebador directo MAMD: [Btn]- 5'-AAC-ATG-ATG-GGR-AAR-AGR-GAR-AA-3' (o [Btn]- SEQ ID NO: 20), y
- el cebador inverso cFD2 (SEQ ID NO: 21): 5'-GTG-TCC-CAG-CCG-GCG-GTG-TCA-TCA-GC -3'.

Esta amplificación conduce a la obtención de un amplicón primario de 263 pb.

- 5 Cuando la carga viral es muy baja, se efectúa una PCR secundaria utilizando como molde los productos de amplificación resultantes de la primera PCR. Esta PCR "semi-anidada" permite ventajosamente una ganancia significativa en la sensibilidad.

Un ejemplo de amplicón de 263 pb obtenido después de la amplificación de la cepa del virus del dengue referenciada con el número FJ882517 tiene por secuencia: 5'-

AACATGATGGGGAAGAGAGAGAGAAAACTAGGAGAGTTTCGGAAAGGCAA
AAGGAAGTCGTGCAATATGGTACATGTGGCTGGGAGCACGCTTTCTAGAG
TTCGAAGCTCTTGGTTTCATGAACGAAGATCACTGGTTCAGCAGAGAGAA
TTCCTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAACTTGGATATATAC
TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAACATGTATGCAGATGACACA
GCCGGATGGGACAC-3' (SEQ ID NO :23).

10

Un ejemplo de amplicón de 263 pb obtenido después de la amplificación de la cepa del virus del Nilo Occidental referenciada con el número EF429200/H442 tiene por secuencia: 5'-

AACATGATGGGAAAGAGAGAGAAGAAGCCTGGAGAGTTTCGGCAAGGCTA
AAGGCAGCAGAGCCATCTGGTTCATGTGGCTGGGGGCTCGTTTCCTGGAG
TTTGAAGCTCTCGGATTCCTCAATGAAGACCACTGGCTGGGTAGGAAGAA
CTCAGGAGGAGGAGTTGAAGGCTTAGGACTGCAGAAGCTTGGGTACATCT
TGAAGGAAGTTGGGACAAAGCCTGGAGGAAAGATTTACGCCGATGATACC
GCAGGCTGGGACAC-3' (SEQ ID NO :25).

- 15 Una amplificación secundaria por PCR puede opcionalmente realizarse de acuerdo con el protocolo publicado por Scaramozzino y col., utilizando amplicones primarios anteriores como molde con:

- el cebador directo FS778: [Btn] 5'- AAR-GGH-AGY-MCD-GCH-ATH-TGG-T- 3' (o [Btn]- SEQ ID NO: 22), y
- el cebador inverso cFD2 (SEQ ID NO: 21): 5'-GTG-TCC-CAG-CCG-GCG-GTG-TCA-TCA-GC -3'.

Esta amplificación conduce a la obtención de un amplicón secundario de 215 pb.

- 20 Un ejemplo de amplicón de 215 pb obtenido después de la amplificación de la cepa del virus del dengue referenciada con el número FJ882517 tiene por secuencia: 5'-

AAAGGAAGTCGTGCAATATGGTACATGTGGCTGGGAGCACGCTTTCTAGA
GTTTGAAGCTCTTGGTTTCATGAACGAAGATCACTGGTTCAGCAGAGAGA
ATTCACTCAGCGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCCACAACTTGGATATATA
CTCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAACATGTATGCAGATGACAC
AGCCGGATGGGACAC-3' (SEQ ID NO : 24).

Un ejemplo de amplicón de 215 pb obtenido después de la amplificación de la cepa del virus del Nilo Occidental referenciada con el número EF429200/H442 tiene por secuencia: 5'-

AAAGGCAGCAGAGCCATCTGGTTCATGTGGCTGGGGGCTCGTTTCCTGGA
 GTTTGAAGCTCTCGGATTCCTCAATGAAGACCACTGGCTGGGTAGGAAGA
 ACTCAGGAGGAGGAGTTGAAGGCTTAGGACTGCAGAAGCTTGGGTACATC
 TTGAAGGAAGTTGGGACAAAGCCTGGAGGAAAGATTTACGCCGATGATAC
 CGCAGGCTGGGACAC-3' (SEQ ID NO :26).

En otro modo de realización, los amplicones se preparan a partir de ARN virales de flavivirus, dengue o Nilo Occidental por RT-PCR asimétrica. Los ARN virales se extraen a partir de virus del dengue (1-4) y del Nilo Occidental (origen americano NY o africano Af) producidos *in vitro*. Los amplicones de 263 pb se producen a partir de la región viral NS5 de flavivirus por RT-PCR a partir de cada una de las muestras de ARN que se han descrito previamente. Con el fin de efectuar la etapa de retrotranscripción (RT), 5 µl de ARN se desnaturalizan a 72 °C durante 10 minutos y se retrotranscriben en presencia de 4 µl de 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µl de 10X de mezcla de hexanucleótidos (Roche), 2 µl de 10 mM de mezcla de dNTP (Invitrogen) y 200 U de Transcriptasa Inversa Superscript® II (Invitrogen) en un volumen total de 20 µl. Las condiciones de retrotranscripción son las siguientes: 10 min a 25 °C, 60 min a 42 °C y 10 min a 95 °C. Cinco microlitros de ADNc se amplifican por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los cebadores:

- directo flavivirus "MAMD" biotinilado (de secuencia: [Btn]-AAC ATG ATG GGR AAR AGR GAR AA (o [Btn]-SEQ ID NO: 20)) y
- inverso flavivirus "cFD2" (de secuencia GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC (SEQ ID NO: 21)) (véase Scaramozzino N. y col. 2001, *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1922-1927).

La reacción de amplificación asimétrica se efectúa en 50 µl de mezcla de reacción que comprende: 1X PCR tampón sin MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µM de MAMD, 0,02 µM de cFD2, 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), mezcla de dNTP de 0,2 mM (Invitrogen) y 1,5 U de polimerasa Taq (Invitrogen). Las condiciones de PCR son las siguientes: 5 min a 95 °C, 40 ciclos (desnaturalización: 40 s, 94 °C; hibridación: 40 s, 53 °C; elongación: 50 s, 72 °C), y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los amplicones obtenidos se analizan por electroforesis en gel de agarosa, se alicuotan y se almacenan a -20 °C antes de su uso. Estos amplicones cuyos genotipos virales de origen son conocidos, se almacenan en forma de una biblioteca.

Los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros biotinilados en el extremo 5' se sintetizaron. Estos oligonucleótidos son estrictamente complementarios a las sondas seleccionadas anteriormente, es decir la sonda 3 genérica para detectar los flavivirus, la sonda genérica para detectar el virus del Nilo Occidental y la sonda específica del serotipo 4 del virus del dengue. Estos oligonucleótidos sintéticos poseen las siguientes secuencias:

- los oligonucleótidos sintéticos de 14 meros específicos de flavivirus tienen la secuencia: 5' [Btn]-TGG TWC ATG TGG CT-3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 43);
- los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros específicos para el virus del Nilo Occidental tienen la secuencia: 5' [Btn]-AGA AYT CAG GAG GMG -3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 42) y
- los oligonucleótidos sintéticos de 15 meros específicos del serotipo 4 del virus del dengue tienen la secuencia: 5' [Btn]-TCA TGG AGT GGA GTG -3' (o [Btn]-SEQ ID NO: 44).

Se efectúan ensayos de hibridaciones con la sonda 3 que reconoce genéricamente los flavivirus (véase la figura 21), la sonda 5 reconoce específicamente el serotipo 4 del dengue (véase la figura 22) y la sonda 6 reconoce el virus del Nilo Occidental (véase la figura 23). Las sondas que poseen 4 funciones tiol se injertan en una densidad de 200 nM en un soporte recubierto con grupos maleimida según el protocolo descrito anteriormente. Se realizan a continuación ensayos de ELOSA utilizando amplicones preparados a partir de los serotipos 1, 2, 3 o 4 del dengue, del virus del Nilo Occidental de origen americano (NY) y africano (Af), o del virus de la hepatitis C (amplicón largo 3a), en una dilución de 1/10 para la sonda 3 y de 1/50 para las sondas 5 y 6 con el fin de verificar la especificidad de las sondas retenidas. En los gráficos de las figuras 21, 22 y 23, el valor "muestras/ruido de fondo" se obtiene calculando la relación entre el número de recuentos medido para cada muestra y el número de recuentos medido para el control (TH), correspondiente al tampón de hibridación solo, que no comprende diana alguna. Los amplicones del dengue y del virus del Nilo Occidental utilizados en estos ensayos se obtuvieron por el procedimiento de RT-PCR asimétrica que se ha descrito anteriormente.

Los resultados presentados en las figuras 21, 22 y 23 muestran que la sonda genérica de flavivirus, la sonda específica dengue 4 y la sonda genérica virus del Nilo Occidental no se hibridaron de manera significativa con los amplicones correspondientes a los virus en cuestión.

Listado secuencial

<110> Establecimiento Francés de Sangre (EFS)
 Centro Nacional para la Investigación Científica (CNIC)
 Universidad de Montpellier 1

Universidad Claude Bernard Lyon 1

<120> Oligonucleótidos modificados que comprenden funciones tiol y su uso para la detección de ácidos nucleicos

<130> 33740 EFN

5 <160> 44

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

10 <213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

<223> /mol_tipo="ADN"

15 /nota="Sonda VHC 1a/lb"

/organismo="secuencias artificiales"

<400> 1

gtgcagtcgc ggagc 15

<210> 2

20 <211> 15

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

<223> /mol_tipo="ADN"

25 /nota="Diana VHC 1a/1b de 15 meros"

/organismo="secuencias artificiales"

<400> 2

30 gctccrggac tgcac 15

<210> 3

<211> 105

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuentes

<222> 1..105

<223> /mol_tipo="ADN"

35 /nota="Diana VHC 1a/1b de 105 meros"

/organismo="secuencias artificiales"

<400> 3

cctcacttgc tacatcaagg cccaggcagc ctgtcgagcc gcagggctcc gggactgcac 60

catgctcgtg tgtggcgacg acttagtcgt tatctgtgaa agtgc 105

<210> 4

45 <211> 15

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

<223> /mol_tipo="ADN"

50 /nota="Sonda VHC 3a"

```

/organismo="secuencias artificiales"

<400> 4
ggcctccggt tcaag 15

5   <210> 5
    <211> 15
    <212> ADN
    <213> secuencias artificiales

    <220>
    <221> fuente
10   <222> 1..15
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Diana VHC 3a de 15 meros"
    /organismo="secuencias artificiales"

    <400> 5
15   cttgaaccgg aggcc 15

    <210> 6
    <211> 105
    <212> ADN
    <213> secuencias artificiales

20   <220>
    <221> fuente
    <222> 1..105
    <223> /mol_tipo="ADN"
25   /nota="Diana VHC 3a de 105 meros"
    /organismo="secuencias artificiales"

    <400> 6

        gaacaggaca tcagggtgga agaggagata taccaatgct gtaaccttga accggaggcc      60

        aggaaagtga tctcctccct cacggagcgg ctttactgcg ggggc                      105

    <210> 7
    <211> 13
30   <212> ADN
    <213> secuencias artificiales

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..13
35   <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Ácido nucleico del ensayo de injerto"
    /organismo="secuencias artificiales"

    <400> 7
    ccaagcacga tgt 13

40   <210> 8
    <211> 31
    <212> ADN
    <213> secuencias artificiales

    <220>
45   <221> fuente
    <222> 1..31
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Cebador VHC directo biotinilado"
    /organismo="secuencias artificiales"

50   <400> 8
    tggggatccc gtatgatacc cgctgcttg a 31

    <210> 9

```

<211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador VHC inverso"
 /organismo="secuencias artificiales"

 10 <400> 9
 ggcggaattc ctggcatag cctccgtgaa 30

 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> secuencias artificiales

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN"
 20 /nota="Cebador VHC 1a/1b directo biotinilado"
 /organismo="secuencias artificiales"

 <400> 10
 tgacracyag ctgyggtgaa accct 25

 <210> 11
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador VHC inverso 3a rev"
 /organismo="secuencias artificiales"

 <400> 11
 35 gcagtaaagc cgytccgtga g 21

 <210> 12
 <211> 401
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C

 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..401
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Amplicón VHC largo 401nt 1a/1b n.º PTR6719"
 45 /organismo=" Virus de la hepatitis C"

 <400> 12

ES 2 624 993 T3

	tggggatccc gtatgatacc cgctgctttg actcaacggt cactgagaat gacatccgtg	60
	ttgaggagtc aatttaccaa tgttgtgacc tagccccga agccagacag gccataaggt	120
	cgctcacaga gcggctttac atcgggggtc ccctgactaa ttcaaaaggg cagaactgcg	180
	gctatcgccg gtgccgcgcg agcgggtgtg tgacgaccag ctgcggtaat accctcacat	240
	gttacttgaa ggcctctgcg gcctgtcgag ctgcaaagct ccaggactgc acaatgctcg	300
	tgtgcggaga cgaccttgtc gttatctgtg aaagcgcggg aaccargag gatgcggcga	360
	gcctacgagt cttcacggag gctatgacca ggaattccgc c	401
5	<210> 13 <211> 191 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
10	<220> <221> fuente <222> 1..191 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="Amplicón VHC corto 191nt 1a/1b n.º PTR6719" /organismo="Virus de la hepatitis C"	
	<400> 13	
	tgacgaccag ctgcggtaat accctcacat gttacttgaa ggcctctgcg gcctgtcgag	60
	ctgcaaagct ccaggactgc acaatgctcg tgtgcggaga cgaccttgtc gttatctgtg	120
	aaagcgcggg aaccargag gatgcggcga gcctacgagt cttcacggag gctatgacca	180
	ggaattccgc c	191
15	<210> 14 <211> 401 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
20	<220> <221> fuente <222> 1..401 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="Amplicón VHC largo 401nt 3a n.º PTR9058" /organismo="Virus de la hepatitis C"	
	<400> 14	
	tggggatccc gtatgatacc cgctgctttg actcgactgt cactgaacag gatatcaggg	60
	tggaagagga gatataccaa tgctgtaatc ttgaaccgga ggccaggaag gtgatctcct	120
	ccctcacgga gcggctttac tgcgggggtc ctatgttcaa cagcaaaggg gccagtggtg	180
	gttatcgccg ttgccgtgct agtggagttc tacctaccag cttcggcaat acaatcactt	240
	gctacatcaa ggccacagcg gctgcaaggg ccgcaggcct ccggaaccgg gactttcttg	300
	tctgcggaga cgatctagtc gtggtggctg agagtgcgag cgtcgacgag gatggggcgg	360
25	ccctgagagc cttcacggag gctatgacca ggaattccgc c	401
	<210> 15 <211> 143 <212> ADN	

	<213> Virus de la hepatitis C	
	<220>	
	<221> fuente	
	<222> 1..143	
5	<223> /mol_tipo="ADN"	
	/nota="Amplicón VHC corto 143nt 3a n.º PTR9058"	
	/organismo=" Virus de la hepatitis C"	
	<400> 15	
	tggggatccc gtatgatacc cgctgctttg actcgactgt cactgaacag gatatcaggg	60
	tggaagagga gatataccaa tgctgtaatc ttgaaccgga ggccaggaag gtgatctcct	120
	ccctcacgga ggggctttac tgc	143
10	<210> 16	
	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> secuencias artificiales	
15	<220>	
	<221> fuente	
	<222> 1..14	
	<223> /mol_tipo="ADN"	
	/nota="Sonda genérica 1 flavivirus"	
	/organismo="secuencias artificiales"	
20	<400> 16	
	gctcccarcc acat 14	
	<210> 17	
	<211> 14	
	<212> ADN	
25	<213> secuencias artificiales	
	<220>	
	<221> fuente	
	<222> 1..14	
	<223> /mol_tipo="ADN"	
30	/nota="Sonda genérica 2 flavivirus"	
	/organismo="secuencias artificiales"	
	<400> 17	
	aaccatctrt cttc 14	
	<210> 18	
35	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> secuencias artificiales	
	<220>	
	<221> fuente	
40	<222> 1..15	
	<223> /mol_tipo="ADN"	
	/nota="Sonda específica 3 Dengue"	
	/organismo="secuencias artificiales"	
	<400> 18	
45	cttcyccttc yactc 15	
	<210> 19	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> secuencias artificiales	
50	<220>	

5 <221> fuente
 <222> 1..15
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Sonda específica 4 Nilo Occidental"
 /organismo="secuencias artificiales"

<400> 19
 ckcctcctga rtct 15

10 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador directo flavivirus MAMD"
 /organismo="secuencias artificiales"

15 <400> 20
 aacatgatgg graaragrga raa 23

20 <210> 21
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador inverso flavivirus cFD2"
 /organismo="secuencias artificiales"

25 <400> 21
 gtgtcccagc cggcgggtgc atcagc 26

30 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador directo flavivirus FS778"
 /organismo="secuencias artificiales"

40 <400> 22
 aargghagym cdgchathtg gt 22

45 <210> 23
 <211> 263
 <212> ADN
 <213> Virus dengue 1

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..263
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Amplicón dengue 1 263nt FJ882517"
 /organismo="Virus dengue 1"

50 <400> 23

ES 2 624 993 T3

	aacatgatgg ggaagagaga gaaaaaacta ggagagtctg gaaaggcaaa aggaagtcgt	60
	gcaatatggg acatgtggct gggagcacgc tttctagagt tcgaagctct tggtttcatg	120
	aacgaagatc actggttcag cagagagaat tcactcagcg gagtgggaagg agaaggactc	180
	cacaaacttg gatataact cagagacata tcaaagattc cagggggaaa catgtatgca	240
	gatgacacag ccggatggga cac	263
5	<210> 24 <211> 215 <212> ADN <213> Virus dengue 1	
10	<220> <221> fuente <222> 1..215 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="Amplicón dengue 1 215nt FJ882517" /organismo="Virus dengue 1"	
	<400> 24	
	aaaggaagtc gtgcaatatg gtacatgtgg ctgggagcac gctttctaga gttcgaagct	60
	cttggtttca tgaacgaaga tcactggttc agcagagaga attcactcag cggagtggaa	120
	ggagaaggac tccacaaact tggatatata ctcagagaca tatcaaagat tccaggggga	180
	aacatgtatg cagatgacac agccggatgg gacac	215
15	<210> 25 <211> 263 <212> ADN <213> virus del Nilo Occidental	
20	<220> <221> fuente <222> 1..263 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="Amplicón VNO 263nt EF429200H442" /organismo="virus del Nilo Occidental"	
	<400> 25	
	aacatgatgg gaaagagaga gaagaagcct ggagagtctg gcaaggctaa aggcagcaga	60
	gccatctggg tcatgtggct gggggctcgt ttcctggagt ttgaagctct cggattcctc	120
	aatgaagacc actggctggg taggaagaac tcaggaggag gaggttgaagg cttaggactg	180
	cagaagcttg ggtacatctt gaaggaagtt gggacaaagc ctggaggaaa gatttacgcc	240
25	gatgataccg caggctggga cac	263
30	<210> 26 <211> 215 <212> ADN <213> virus del Nilo Occidental	
35	<220> <221> fuente <222> 1..215 <223> /mol_tipo="ADN" /nota="Amplicón VNO 215nt EF429200H442" /organismo="virus del Nilo Occidental"	

<400> 26

aaaggcagca gagccatctg gttcatgtgg ctgggggctc gtttcctgga gtttgaagct 60

ctcggattcc tcaatgaaga ccactggctg ggtaggaaga actcaggagg aggagttgaa 120

ggcttaggac tgcagaagct tgggtacatc ttgaaggaag ttgggacaaa gcctggagga 180

aagatttacg ccgatgatac cgcaggctgg gacac 215

<210> 27
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Sonda VHC 2"
 /organismo="secuencias artificiales"

<400> 27
 tggctytctg agatg 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Sonda VHC 4a/4d"
 /organismo="Virus de la hepatitis C"

<400> 28
 ggrccgccca crtag 15

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador VHC2 directo biotinilado"
 /organismo="secuencias artificiales"

<400> 29
 atgytggrt gcggcgacga c 21

<210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Cebador VHC inverso 4 rev"
 /organismo="secuencias artificiales"

<400> 30

```

aggtctcccy tgctgtgtr cat 23

<210> 31
<211> 401
<212> ADN
5 <213> Virus de la hepatitis C

<220>
<221> fuente
<222> 1..401
10 <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Amplicón VHC largo 2 401nt n.º PTR7761"
    /organismo="Virus de la hepatitis C"

<400> 31
    tgggggatccc gtatgatacc cgctgctttg actcaactgt cactgagaga gacatcagaa      60
    ccgaggagtc catataccag gcctgctccc taaccgagga ggctcgcacc gccatacact      120
    cgctgactga gaggctatac gtgggagggc ccatgctcaa tagcaaaggc cagacctgcg      180
    ggtacaggcg ttgccgcgcc agcgggggtgc tcaccactag catgggaaac accattacgt      240
    gctatgtgaa agctctagcg gcatgcaagg ccgcagggat agtagcgccc acgatgctgg      300
    tatgcggcga cgacctggtc gtcattctcag aaagccaggg gactgaggag gacgagcgga      360
    acctgagagt cttcacggag gctatgacca ggaattccgc c                          401

<210> 32
15 <211> 401
    <212> ADN
    <213> Virus de la hepatitis C

<220>
20 <221> fuente
    <222> 1..401
    <223> /mol_tipo="ADN"
    /nota="Amplicón VHC largo 4a/4d 401nt n.º PTR4162"
    /organismo="Virus de la hepatitis C"

<400> 32
    tgggggatccc gtatgatacc cgctgctttg actccactgt aaccgaaaga gacatcaggg      60
    tcgaggagga ggtctatcag tgttgtgacc tagagcccga agcccgcaag gtaatatccg      120
    ccctcacaga gagactctac gtgggcggtc ccatgtacaa cagcagggga gacctttgcg      180
    gaactcgacg gtgccgtgca agcggcggtat tcaccaccag ctttggggaac aactgacgt      240
    gctatcttaa ggccagcgcg gccatcaggg ctgcaggcct aaaggactgc accatgctgg      300
    tctgtggcga cgacttagtc gttatcgctg aaagcgatgg cgtggaggag gacaaccgtg      360
25    cgctcagagc cttcacggag gctatgacca ggaattccgc c                          401

<210> 33
30 <211> 108
    <212> ADN
    <213> Virus de la hepatitis C

<220>
<221> fuente
<222> 1..108
<223> /mol_tipo="ADN"

```

ES 2 624 993 T3

/nota="Amplicón VHC corto 108nt 2 n.º PTR7761"

/organismo=" Virus de la hepatitis C"

<400> 33

atgctggtat gcggcgacga cctggtcgtc atctcagaaa gccaggggac tgaggaggac 60

gagcgggaacc tgagagtctt cacggaggct atgaccagga attccgcc 108

5

<210> 34

<211> 175

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis C

10

<220>

<221> fuente

<222> 1..175

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="Amplicón VHC corto 4a/4d 175nt n.º PTR4162" /organismo="Virus de la hepatitis C"

<400> 34

tgggggatccc gtatgatacc cgctgctttg actccactgt aaccgaaaga gacatcaggg 60

tgcaggagga ggtctatcag tgttgtagacc tagagccga agcccgcaag gtaatatccg 120

15

ccctcacaga gagactctac gtgggcggtc ccatgtacaa cagcagggga gacct 175

<210> 35

<211> 15

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

20

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

<223> /mol_tipo="ADN"

/nota="Sonda VHC 2a/2c"

25

/organismo="secuencias artificiales"

<400> 35

ggactcctcr gttct 15

<210> 36

<211> 15

30

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

35

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="Sonda VHC 2b"/organismo="secuencias artificiales"

<400> 36

tatggattct tctgt 15

<210> 37

<211> 15

40

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

45

<223> /mol_tipo="ADN"

/nota="Diana VHC 2a/2c de 15 meros biotinilado"

/organismo="secuencias artificiales"

<400> 37
 agaacygagg agtcc 15

 <210> 38
 <211> 15
 5 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 10 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Diana VHC 2b de 15 meros biotinilado"
 /organismo="secuencias artificiales"

 <400> 38
 acagaagaat ccata 15

 15 <210> 39
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 20 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Diana VHC 4a/4d de 15 meros biotinilado"
 /organismo="secuencias artificiales"

 25 <400> 39
 ctaygtgggc ggycc 15

 <210> 40
 <211> 14
 <212> ADN
 30 <213> secuencias artificiales

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..14
 <223> /mol_tipo="ADN"
 35 /nota="Sonda genérica 3 flavivirus"
 /organismo="secuencias artificiales"

 <400> 40
 agccacatgw acca 14

 <210> 41
 40 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 45 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Sonda específica dengue 4"
 /organismo="secuencias artificiales"

 <400> 41
 50 cactccactc catga 15

 <210> 42
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Diana VNO de 15 meros biotinilado"
 /organismo="secuencias artificiales"

 <400> 42
 agaaytcagg aggmng 15

 10 <210> 43
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..13
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Diana genérica 3 flavivirus de 15 meros biotinilado"
 /organismo="secuencias artificiales"

 20 <400> 43
 tggwcatgtg gct 13

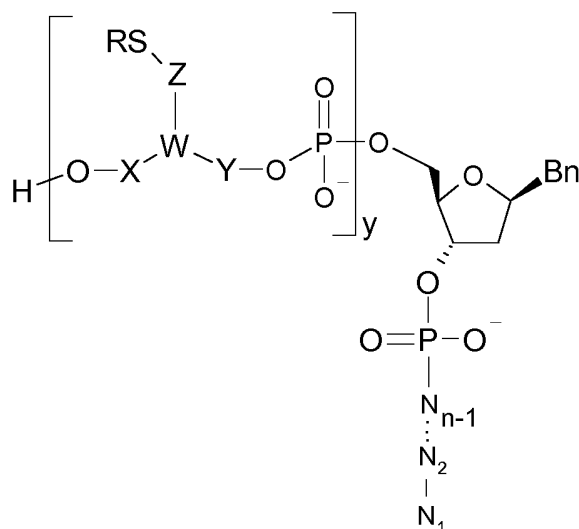
 <210> 44
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

 25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="Diana específica dengue 4 de 15 meros biotinilado"
 30 /organismo="secuencias artificiales"

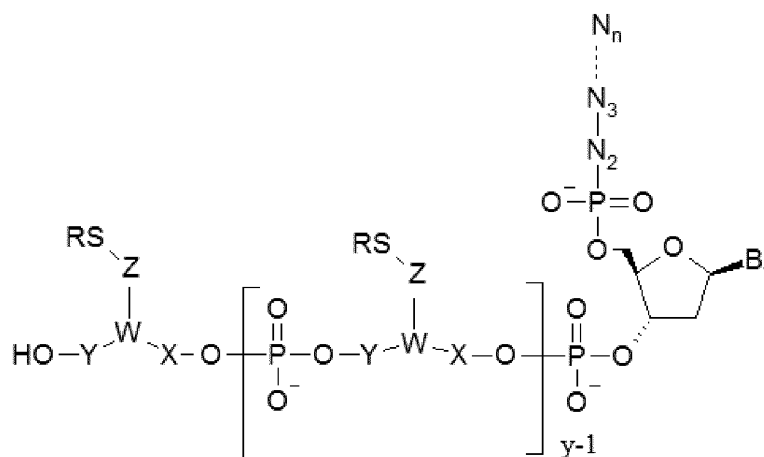
 <400> 44

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido modificado que corresponde a una de las fórmulas:



5 o



en las que:

N1, ..., Nn representan independientemente entre sí, un nucleótido,

n es un número entero que varía de 4 a 100,

y es un número entero que varía de 2 a 12,

X se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C1-C12, aminoalquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, cicloalquilo C3-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12,

Y se selecciona entre los grupos alquilo lineal o ramificado C1-C12, aminoalquilo C1-C12, alcoxi C1-C12, cicloalquilo C3-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12,

Z se selecciona entre los grupos alcoxi C1-C12, cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12, NCO-alquilo C1-C12, CON-alquilo C1-C12,

W se selecciona entre los grupos alcano tri-ilo C1-C12, los grupos arilo tri-ilo C6-C18 y los grupos aralcano tri-ilo C6-C18, y

R es H o se selecciona entre los grupos acilo C1-C12, S-alquilo C1-C12, S-arilo C6-C12, S-2-piridina, S-heteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C1-C12, S-cicloalquilo C3-C12, S-cicloheteroalquilo que contiene óxido o que contiene nitrógeno C3-C12.

Bn representa la base del enésimo nucleótido,

B1 representa la base del 1^{er} nucleótido.

2. Oligonucleótido modificado según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos (N1-N2-...-Nn-1-Nn) es específica de un virus, una bacteria o un gen responsable o implicado en una enfermedad.

3. Oligonucleótido modificado según la reivindicación 2, en el que la secuencia de nucleótidos (N1-N2-...-Nn-1-Nn) se

selecciona entre:

- las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36 específicas del virus de la hepatitis C (VHC),
 - las secuencias SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 40, específicas de flavivirus,
 - la secuencia SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 41, específica de virus del dengue, o
 - la secuencia SEQ ID NO: 19, específica de virus del Nilo Occidental (VNO).
- 5
4. Oligonucleótido modificado según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótidos (N_1 - N_2 -...- N_{n-1} - N_n) tiene una estructura de tipo anómero alfa, anómero beta, lineal, o "caracol".
- 10
5. Sustrato injertado por al menos un oligonucleótido modificado según las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho sustrato al menos una zona de recepción recubierta con una sustancia que tolera el injerto de dicho oligonucleótido modificado.
6. Sustrato injertado según la reivindicación 5, en el que:
- dicha zona de recepción está recubierta con una película de oro o platino, y dicho sustrato es de metal, preferentemente de cobre o titanio, o
 - dicha zona de recepción comprende en su superficie al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida, y dicho sustrato es de plástico, preferentemente de poliestireno.
- 15
7. Sustrato injertado según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho sustrato es no plano, y es preferentemente una micropartícula o una nanopartícula.
- 20
8. Procedimiento de detección de al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica, que comprende una etapa de:
- detección de dicho ácido nucleico diana con al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado según una de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Procedimiento de detección según la reivindicación 8, que comprende las etapas de:
- obtención de al menos un ácido nucleico fuente a partir de dicha muestra biológica,
 - producción de un amplicón por amplificación de dicho ácido nucleico diana a partir del ácido nucleico fuente, y
 - detección de la hibridación de dicho amplicón con al menos una sonda de detección formada por un oligonucleótido modificado según una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25
10. Procedimiento según la reivindicación 9, para determinar el genotipo y/o subtipo de un virus presente en una muestra biológica, en la que
- el amplicón se genera por amplificación de una secuencia nucleotídica diana, que corresponde a una región genómica del virus que porta la información relativa al genotipo y/o subtipo viral, y
 - la detección se efectúa con una sonda específica de un genotipo y/o subtipo viral.
- 30
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa de producción del amplicón se realiza amplificando una secuencia nucleotídica diana que corresponde a una región genómica del virus que porta la información relativa al genotipo y/o subtipo viral, con una mezcla de cebadores nucleotídicos, preferentemente seleccionados entre los pares de cebadores:
- SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, cuando el amplicón se genera a partir de cualquier genotipo del VHC;
 - SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9, cuando el amplicón se genera a partir de un VHC de genotipo 1a/1b;
 - SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 9, cuando el amplicón se genera a partir de un VHC de genotipo 2;
 - SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11 cuando el amplicón se genera a partir de un VHC de genotipo 3a;
 - SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 30, cuando el amplicón se genera a partir de un VHC de genotipo 4a/4b;
 - SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, o SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 21 cuando el amplicón se genera a partir de un flavivirus.
- 40
12. Kit de detección de al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica que comprende:
- al menos un oligonucleótido modificado según una de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un sustrato que comprende al menos una zona de recepción recubierta con una sustancia que tolera el injerto de dicho oligonucleótido modificado, estando dicha zona de recepción preferentemente recubierta con oro, platino o comprende en su superficie al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o funciones halogenoacetamida, preferentemente funciones maleimida o acrilamida, o
 - al menos un sustrato injertado según una de las reivindicaciones 5 a 7.
- 45
- 50

13. Uso de un oligonucleótido modificado según una de las reivindicaciones 1 a 4, o de un sustrato injertado según una de las reivindicaciones 5 a 7 para detectar al menos un ácido nucleico diana en una muestra biológica.

5 14. Uso según la reivindicación 13, para el diagnóstico, genotipificación o secuenciación de cepas virales, preferentemente de los virus de la hepatitis, o de arbovirus, preferentemente *Flaviviridae*, *Togaviridae* o *Bunyaviridae*.

15. Uso según la reivindicación 14, para el diagnóstico, genotipificación o secuenciación del VHC, VHB, virus del dengue o virus del Nilo Occidental.

Figura 1

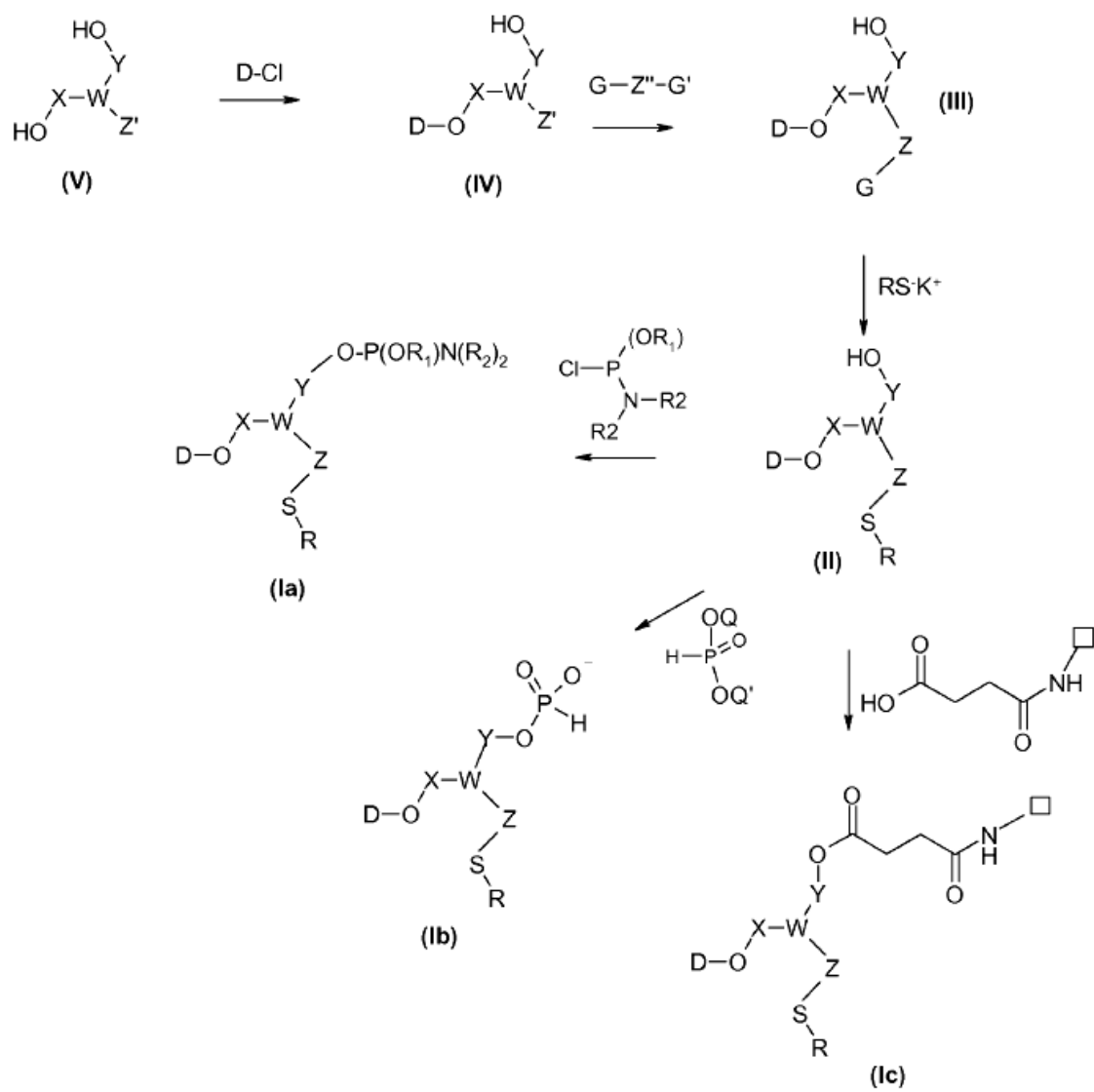


Figura 2A

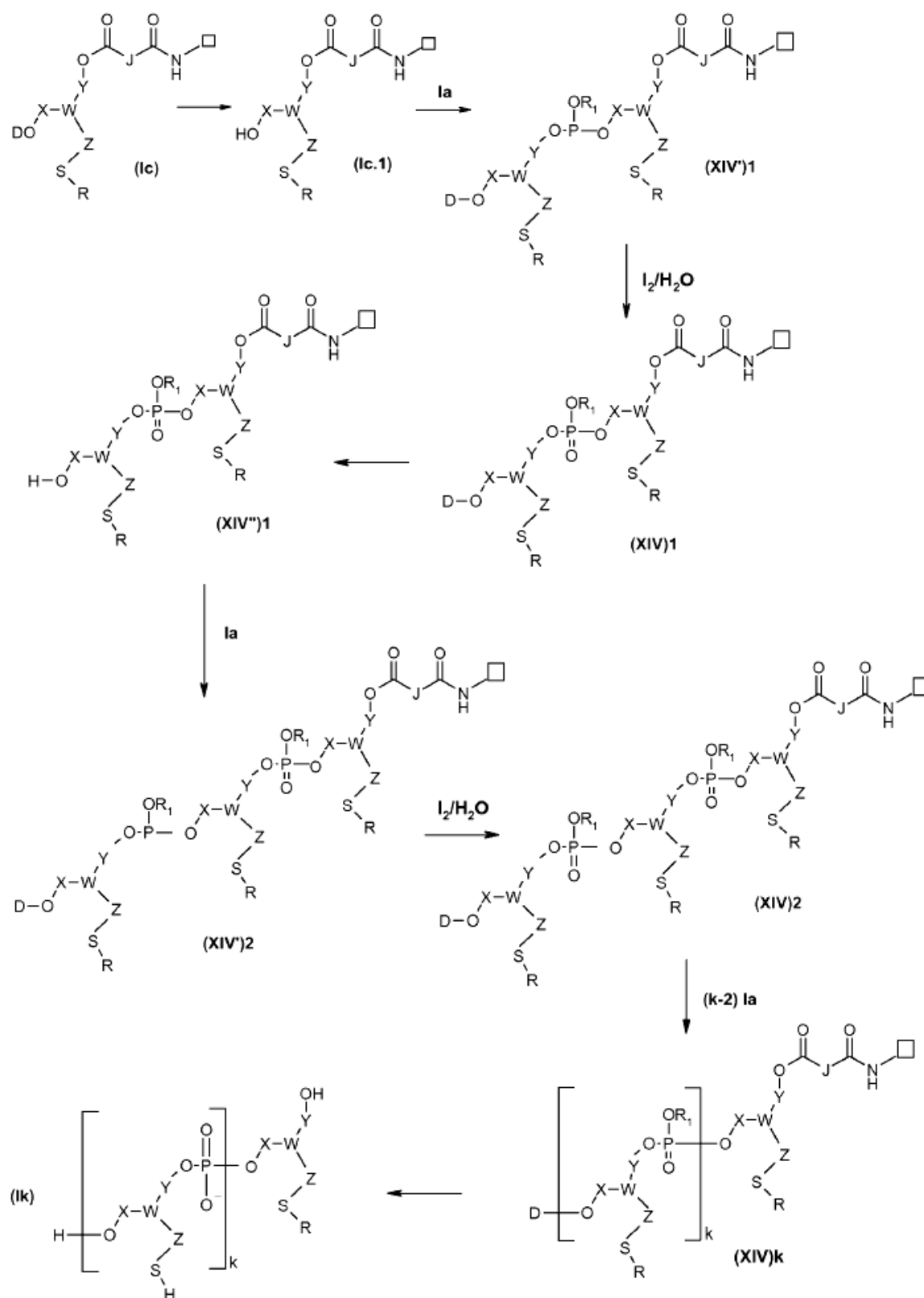


Figure 2B

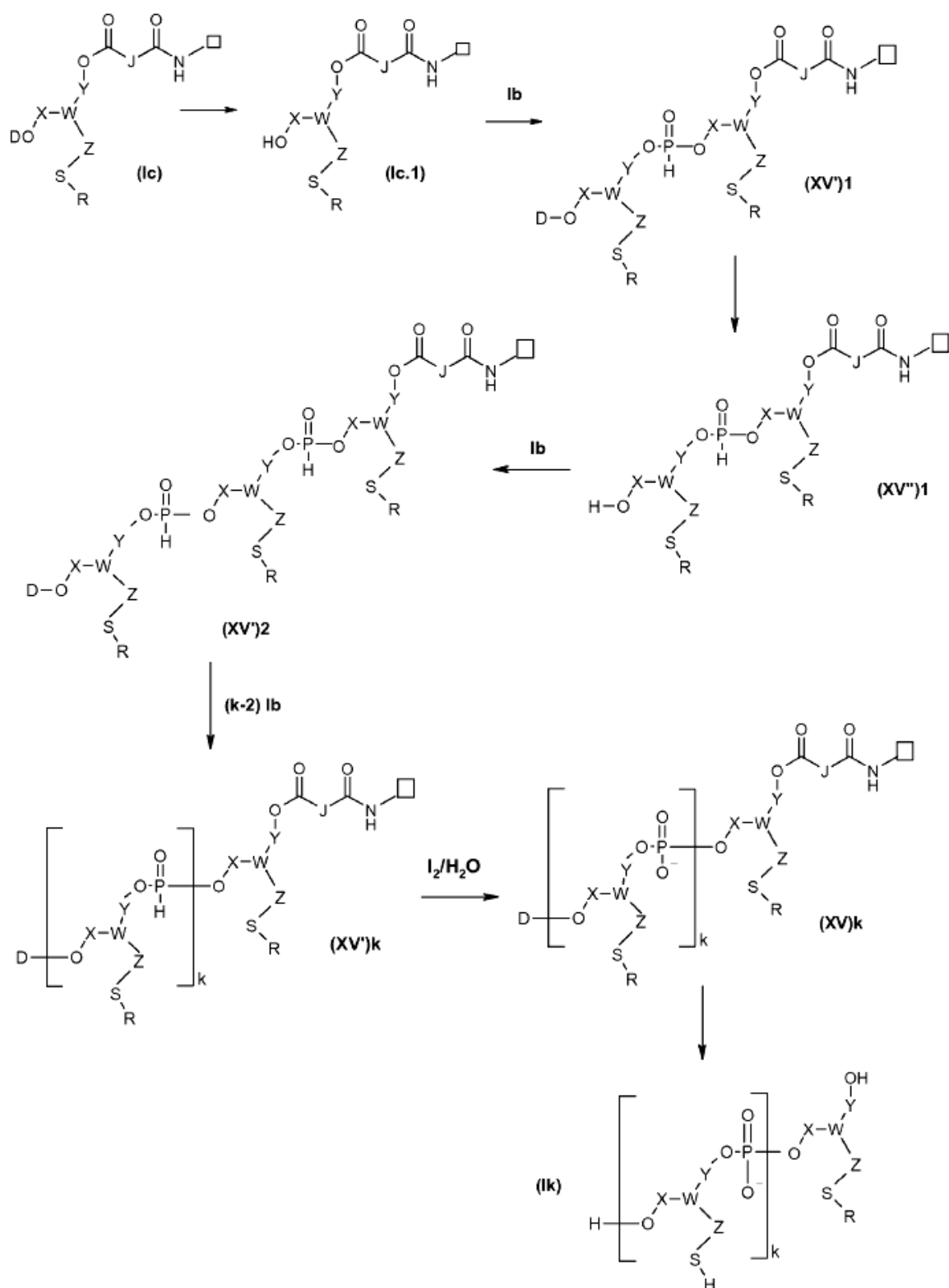


Figura 3

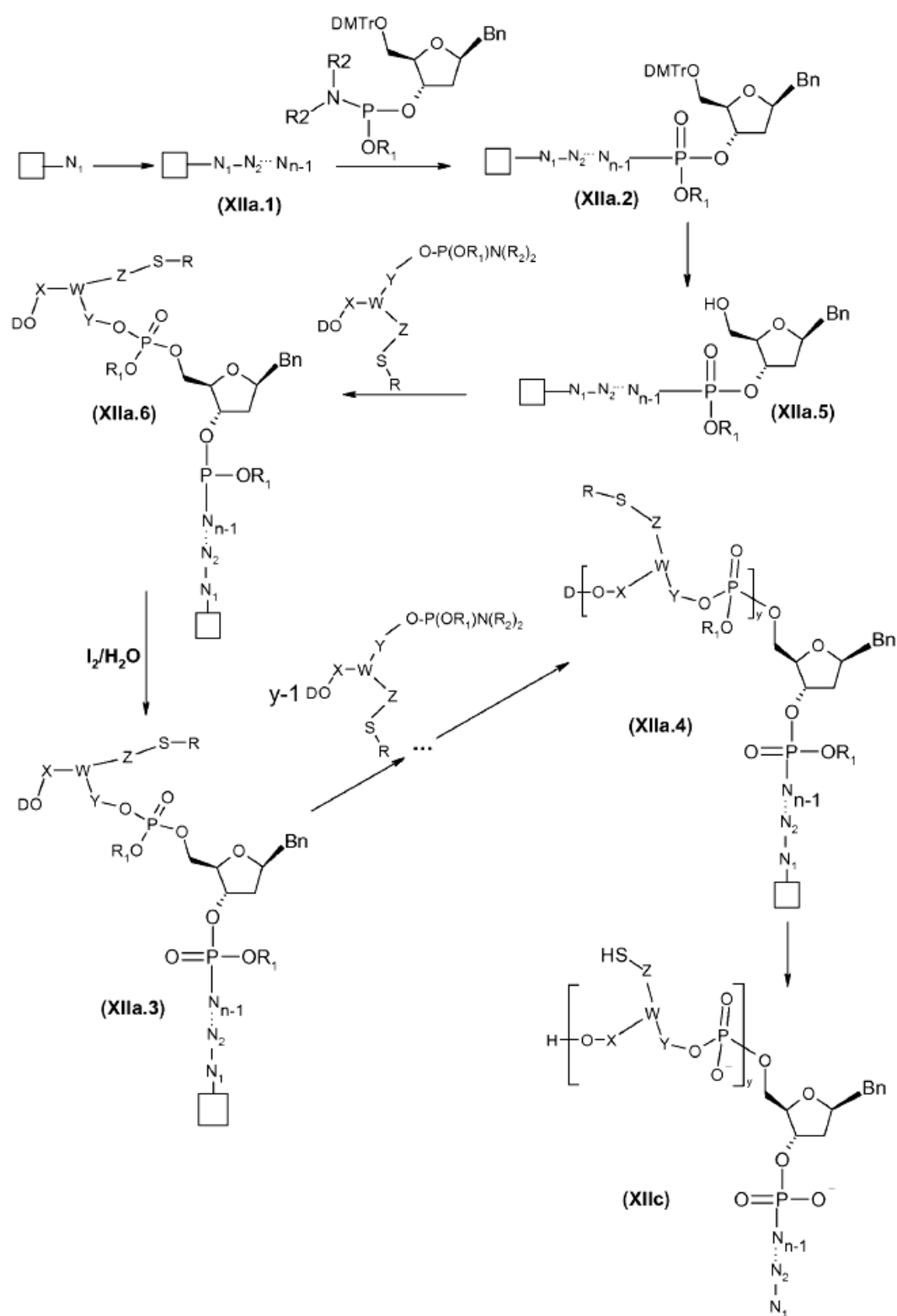


Figura 4

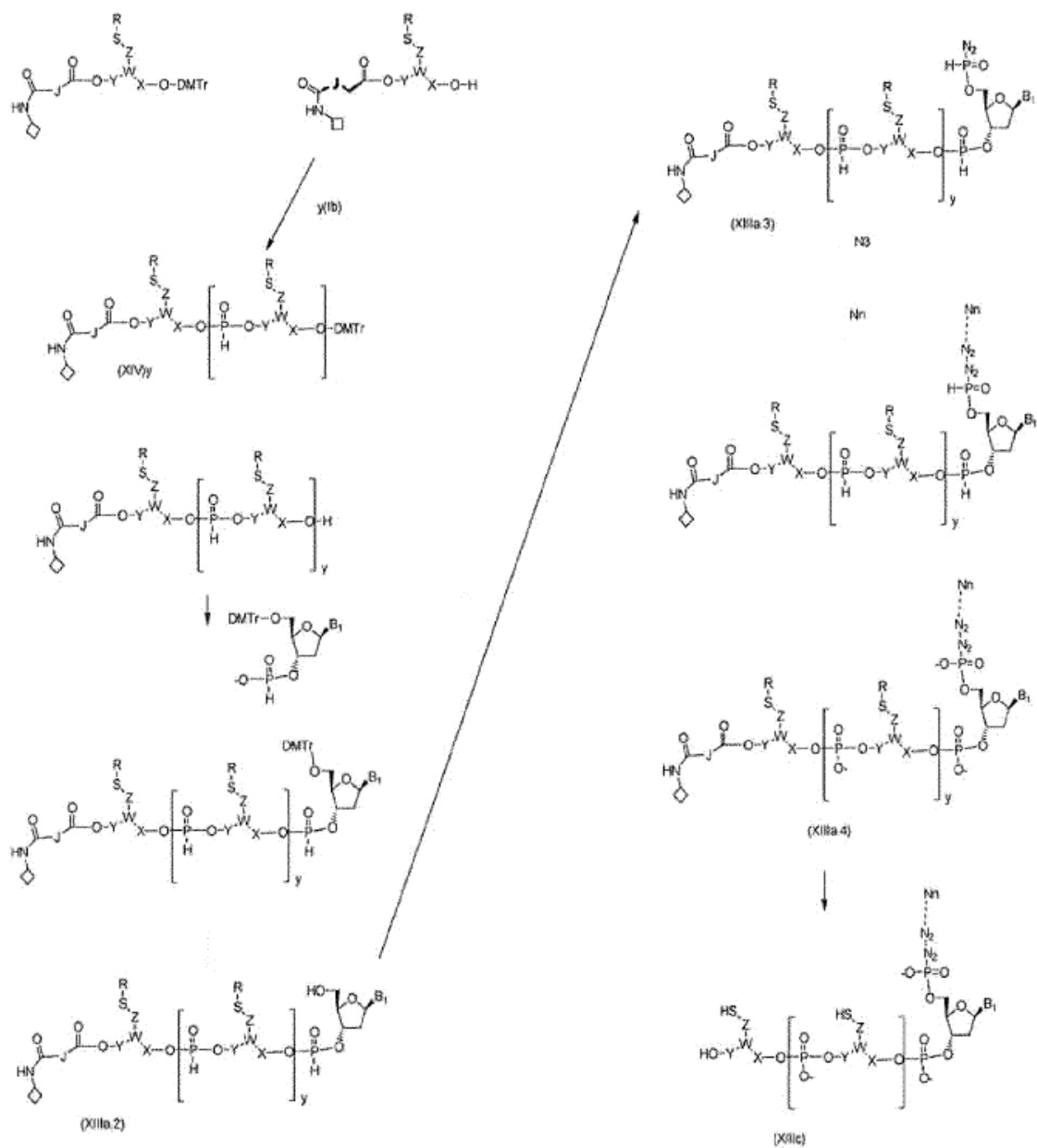


Figura 5

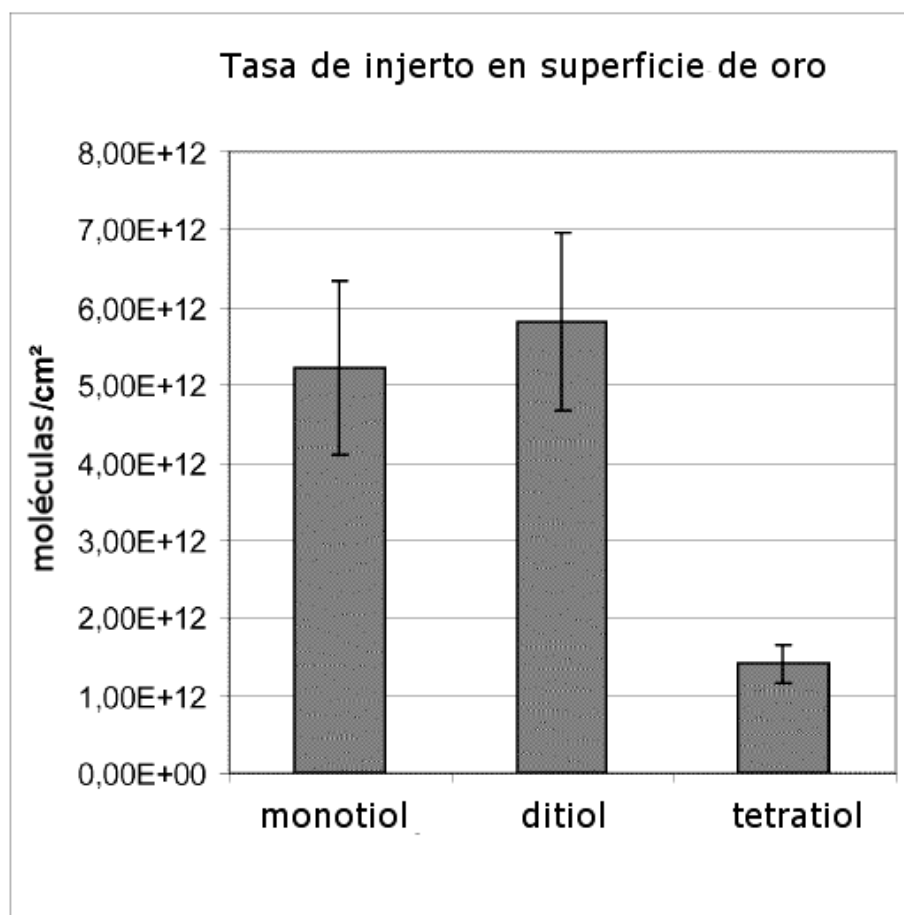


Figura 6

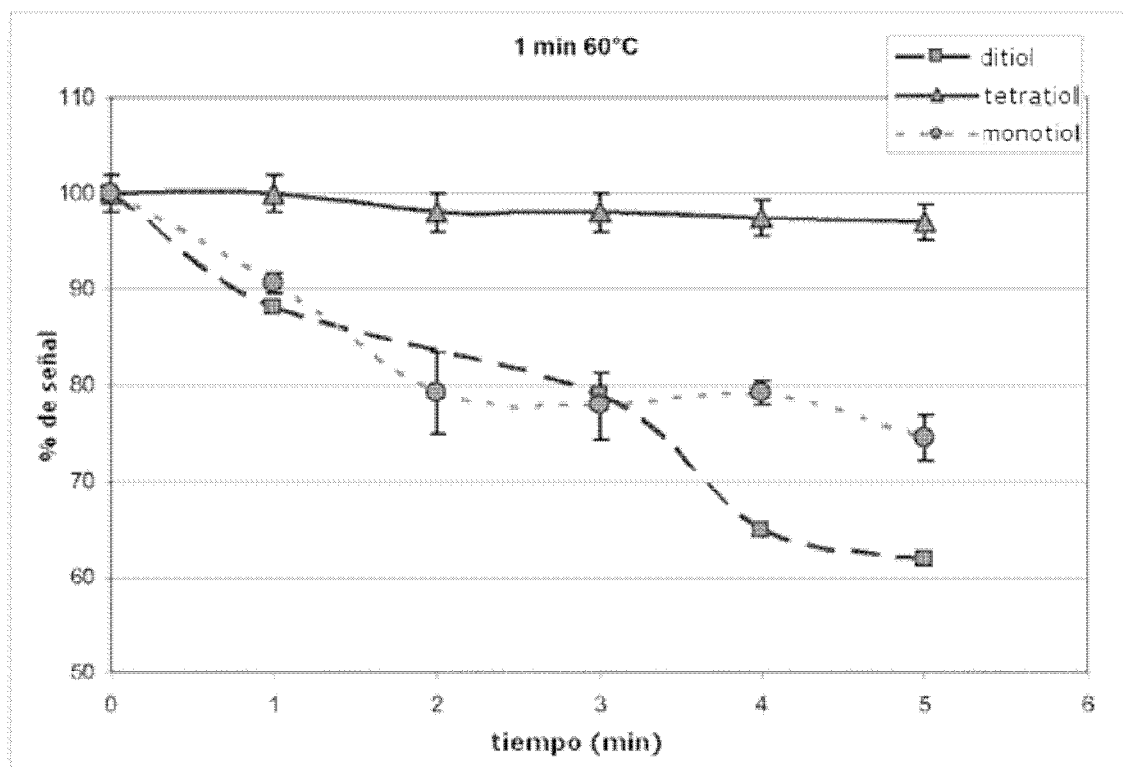


Figura 7

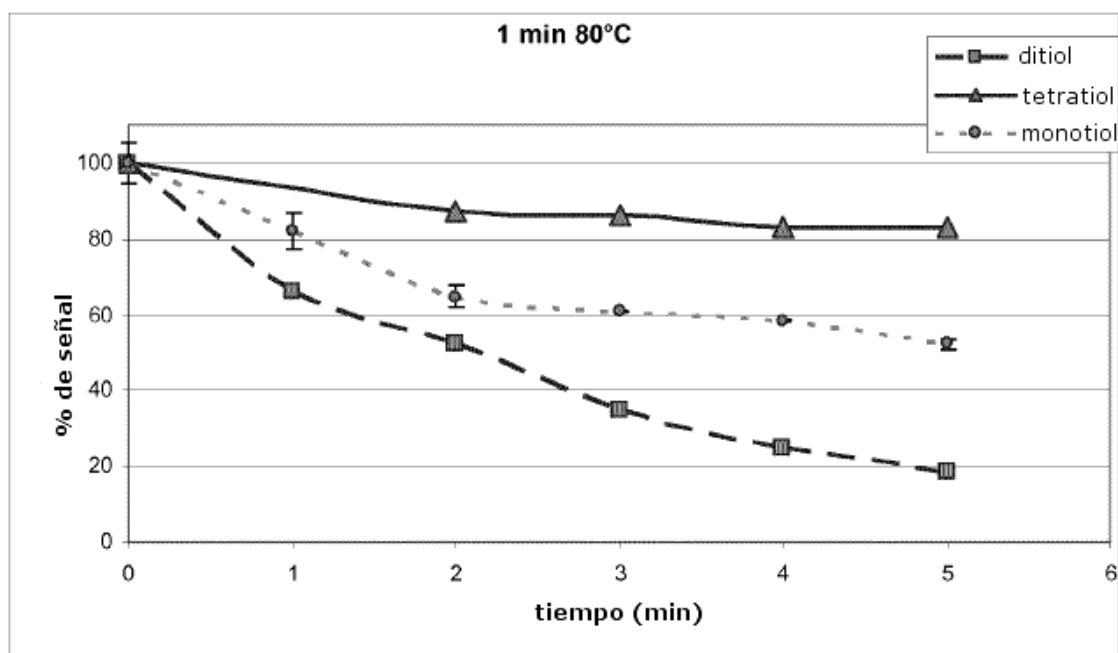


Figura 8

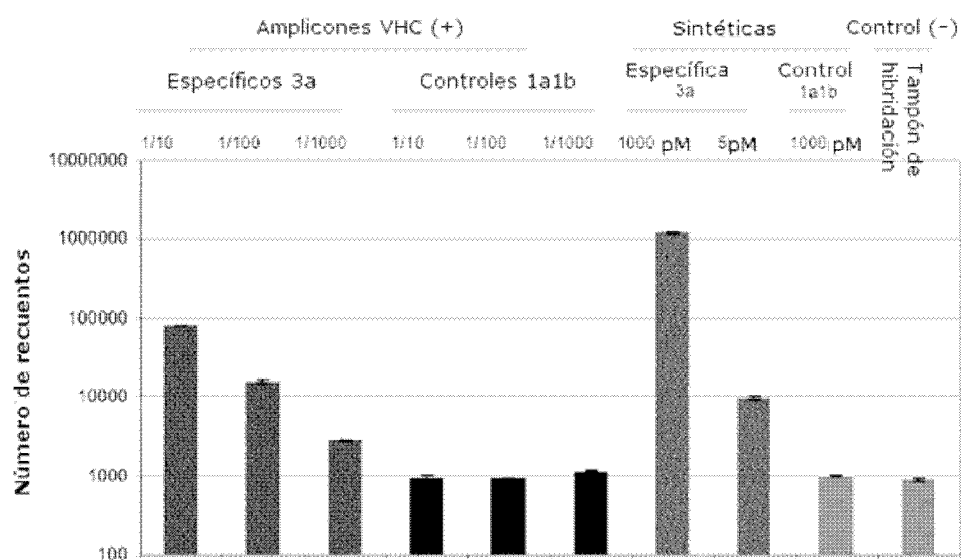


Figura 9

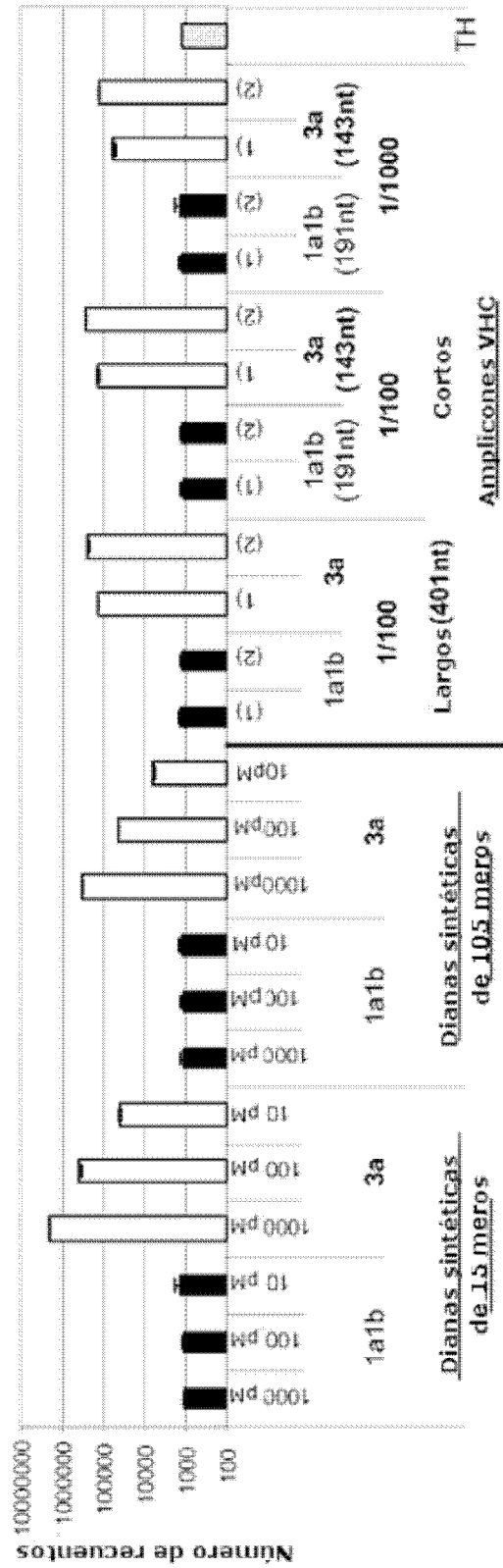


Figura 10

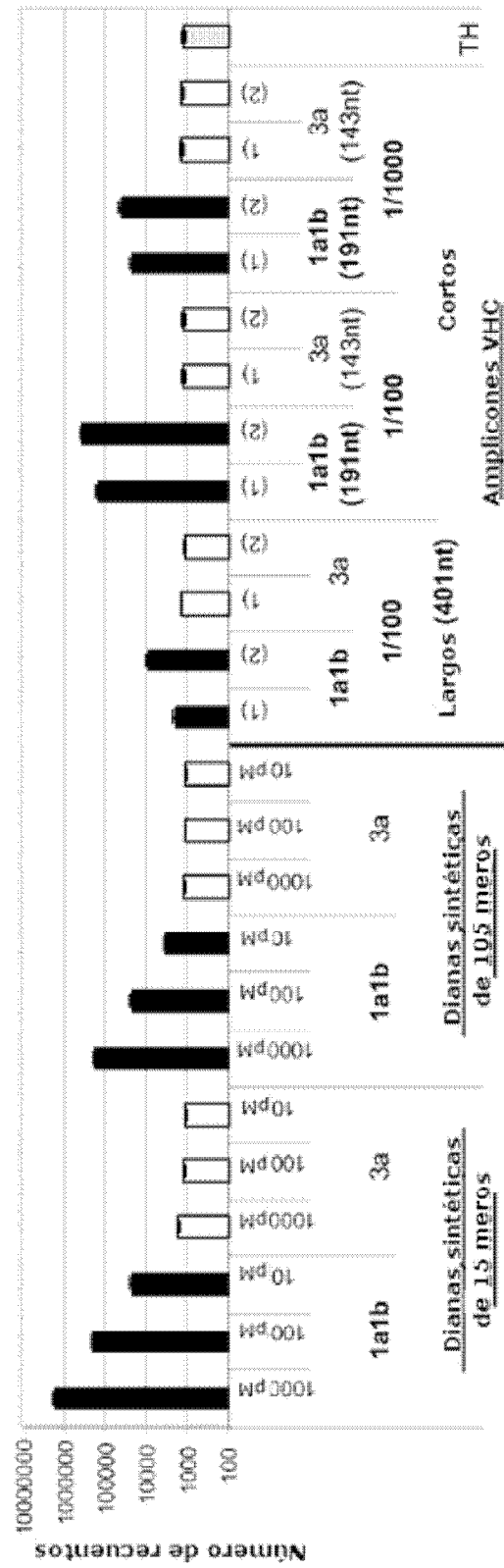


Figura 11

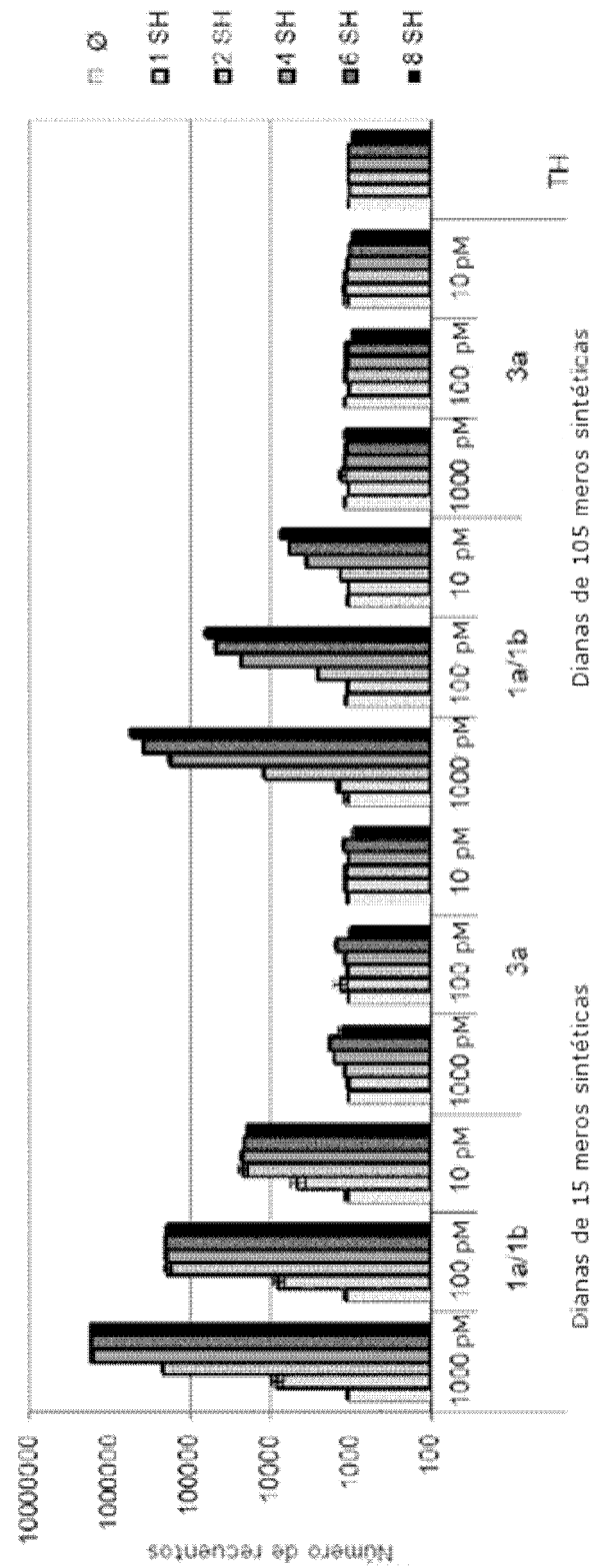


Figura 12

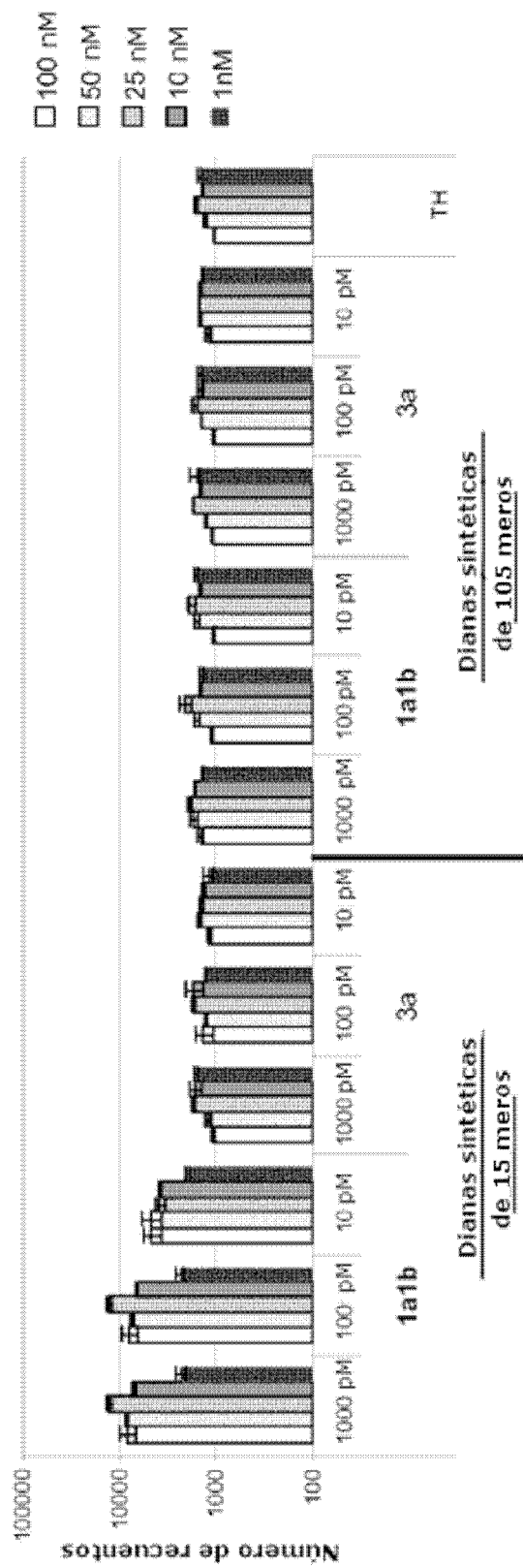


Figura 13

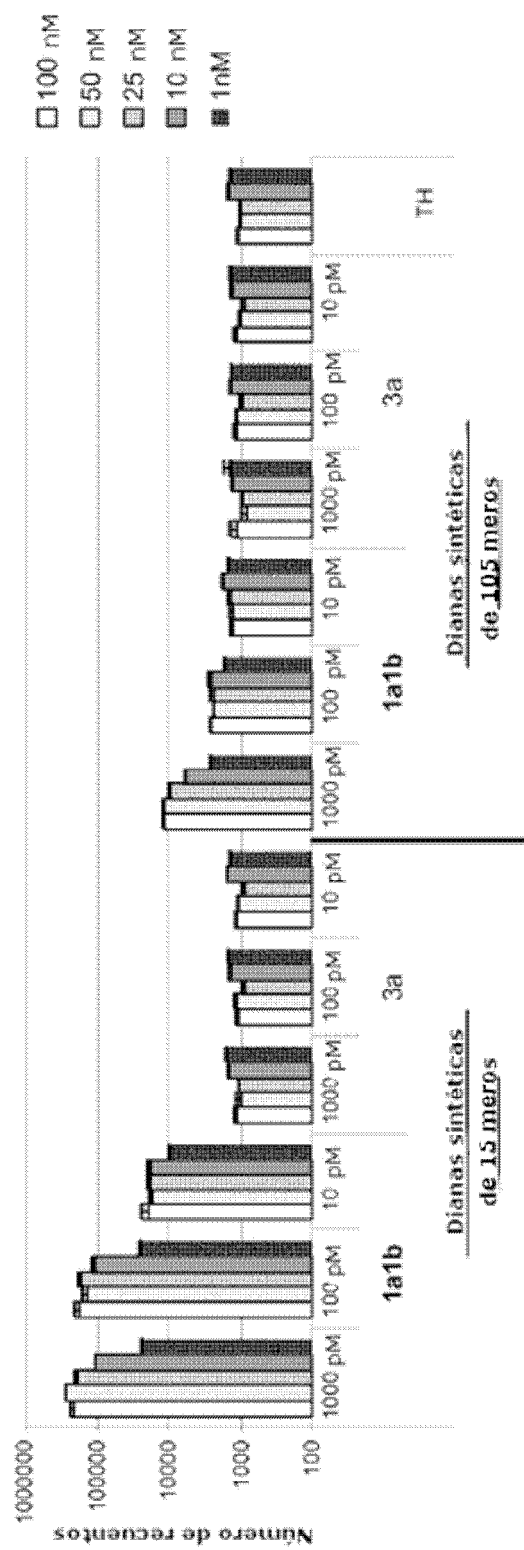


Figura 14

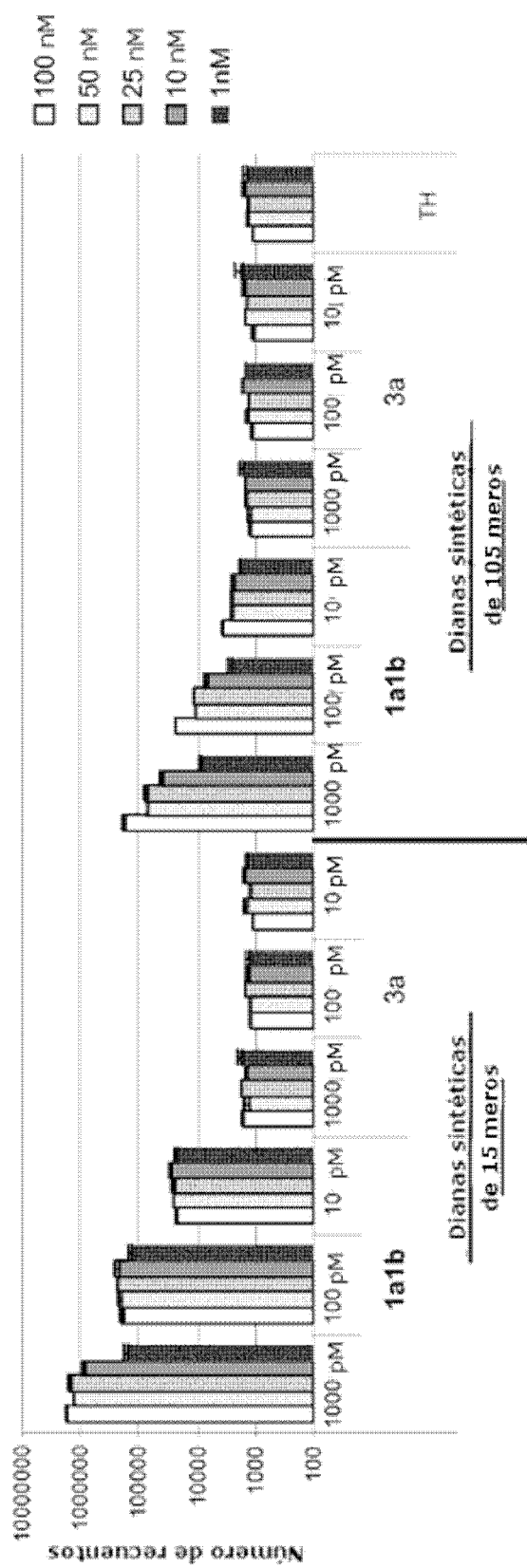


Figura 15

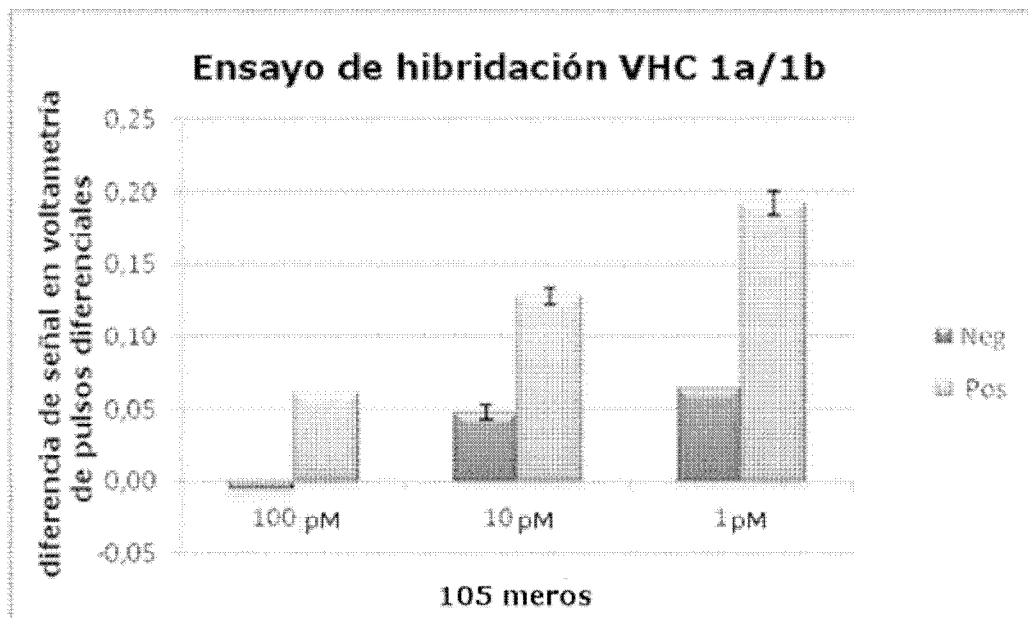


Figura 16a

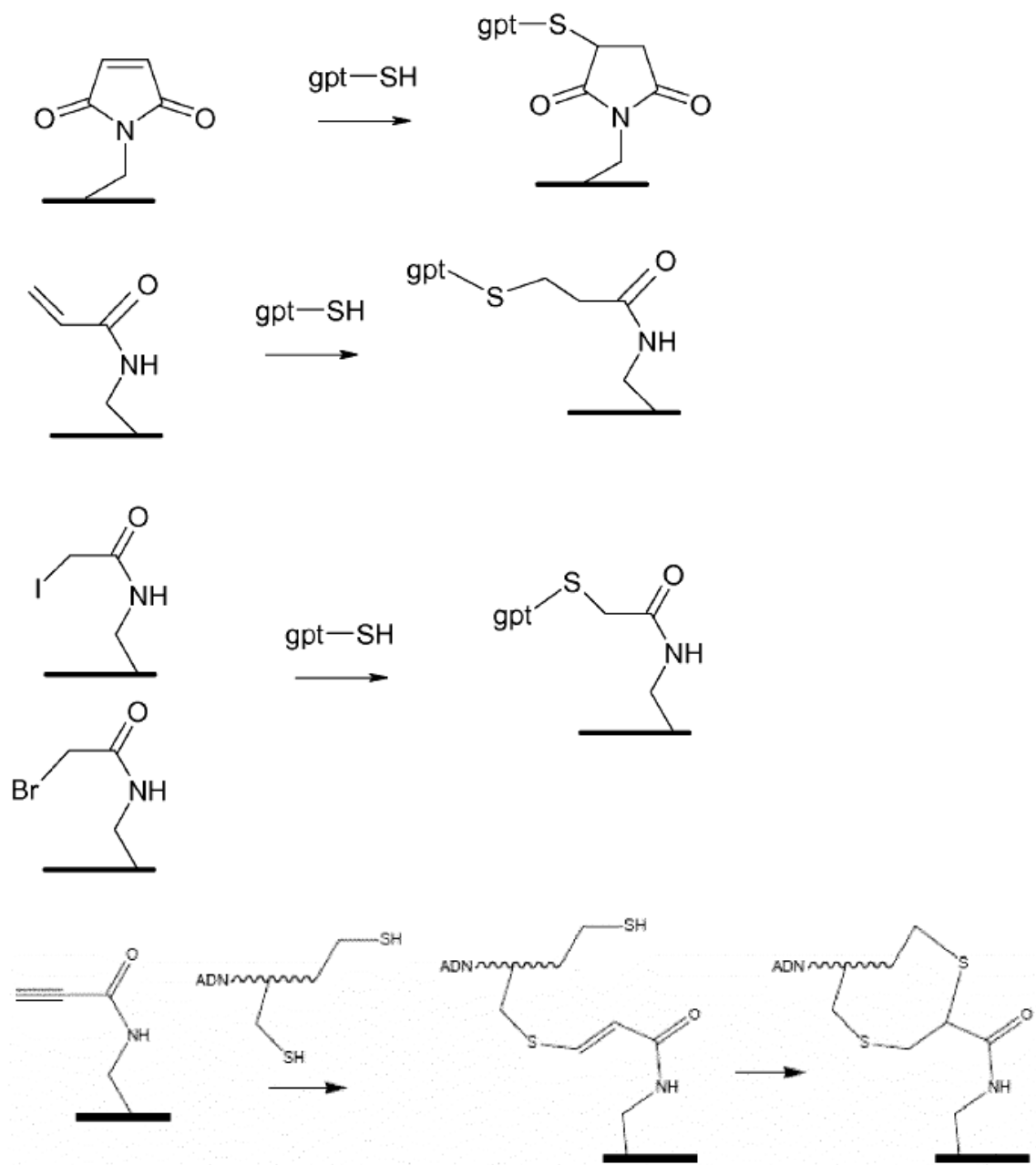


Figura 16b

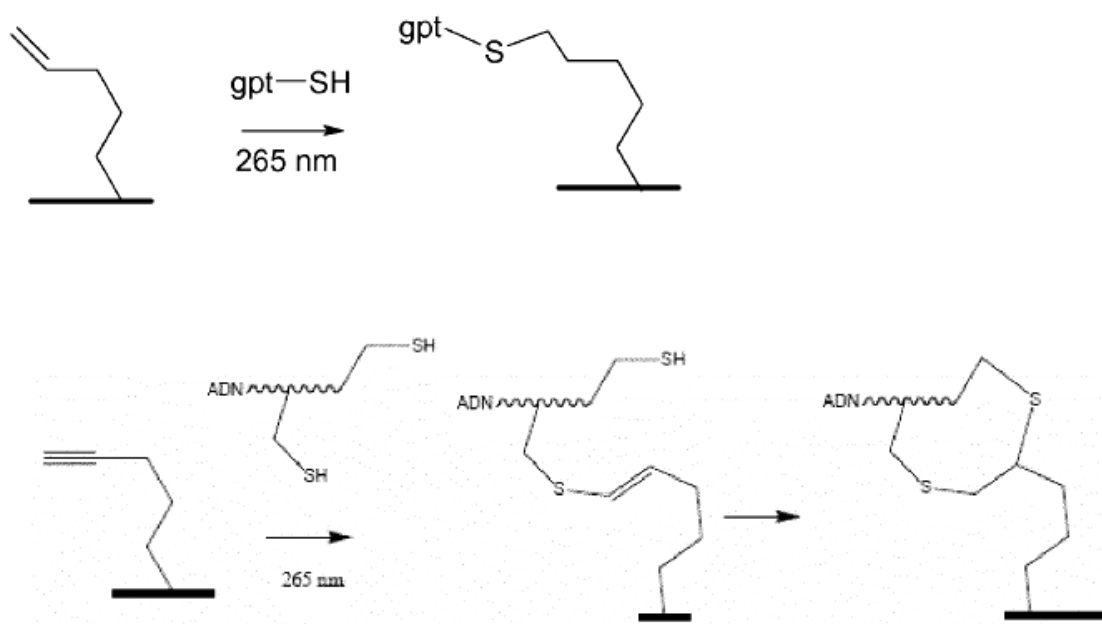


Figura 17

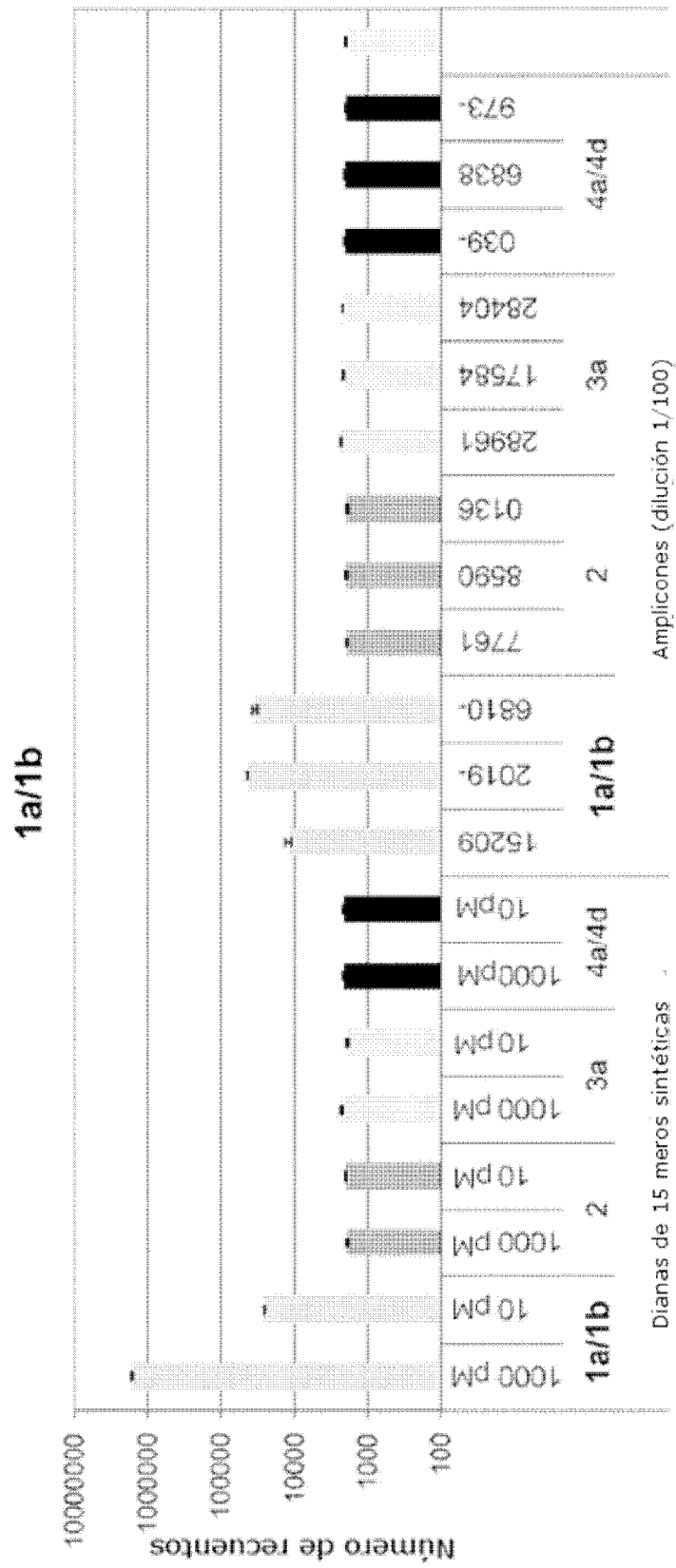


Figura 18

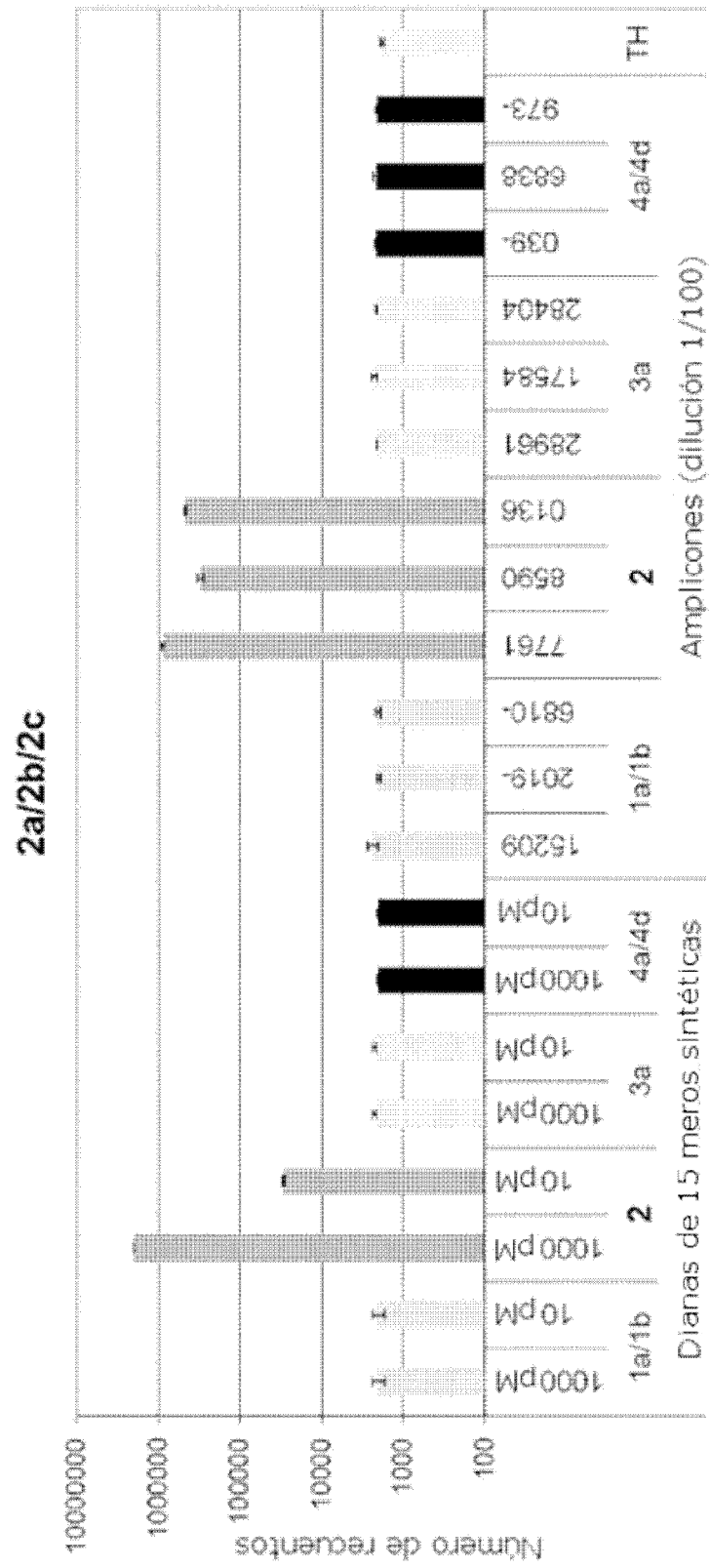


Figura 19

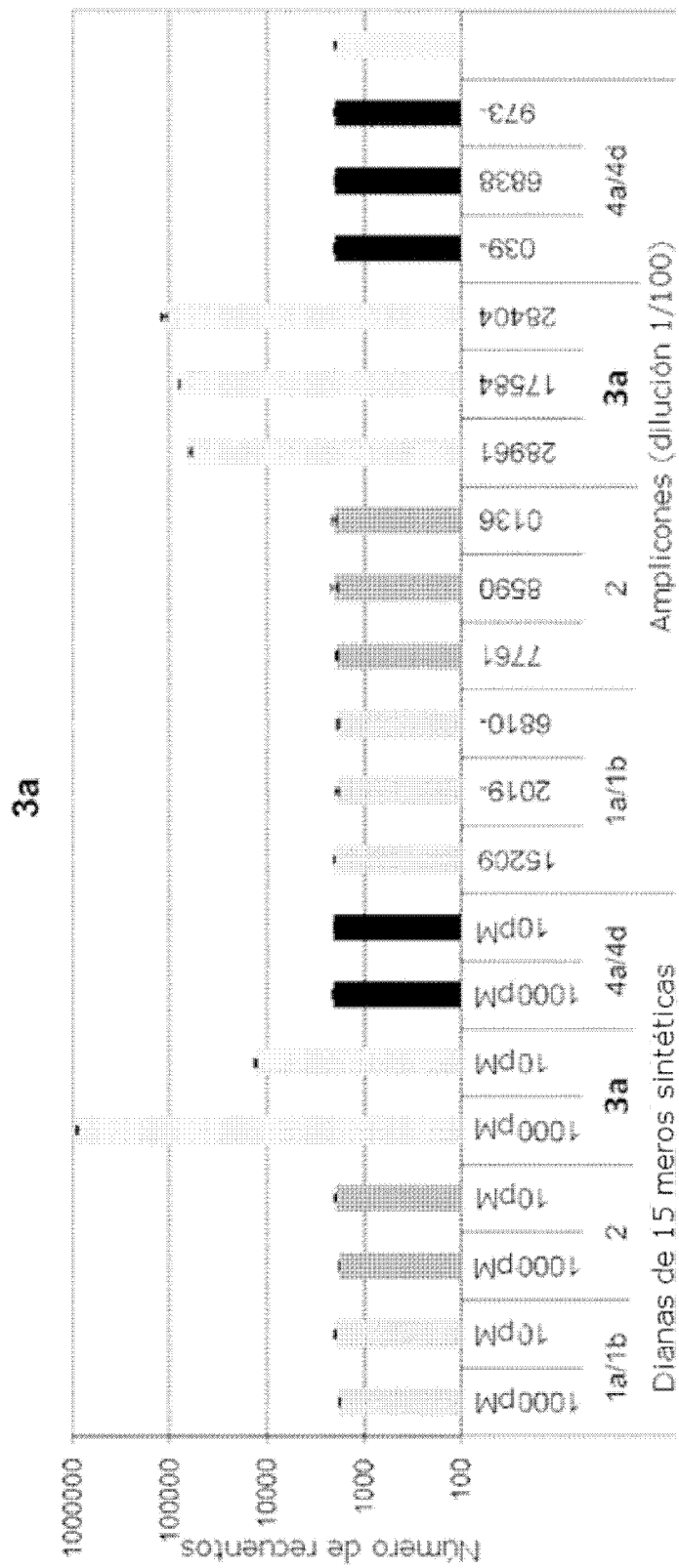


Figura 20

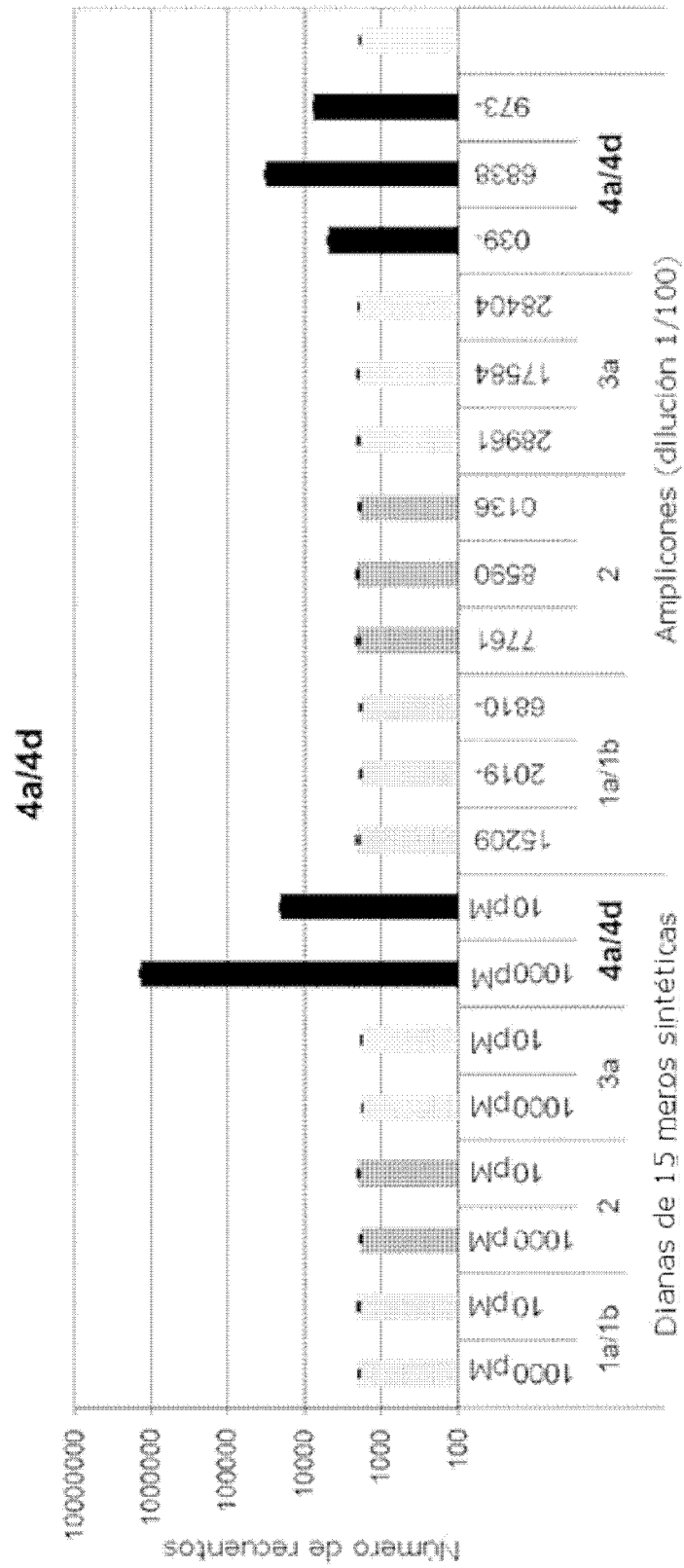


Figura 21

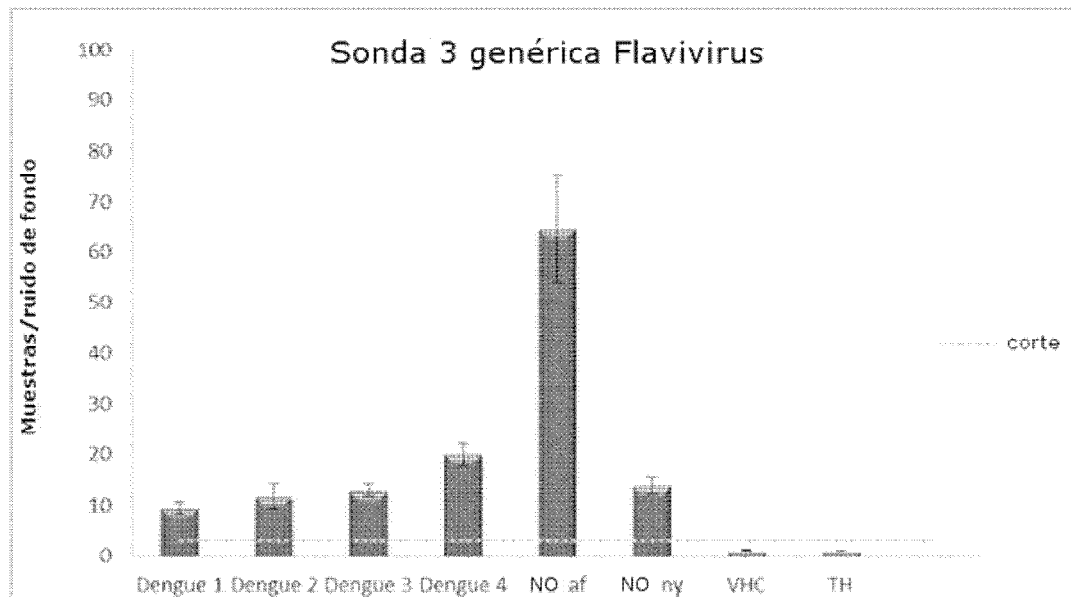


Figura 22

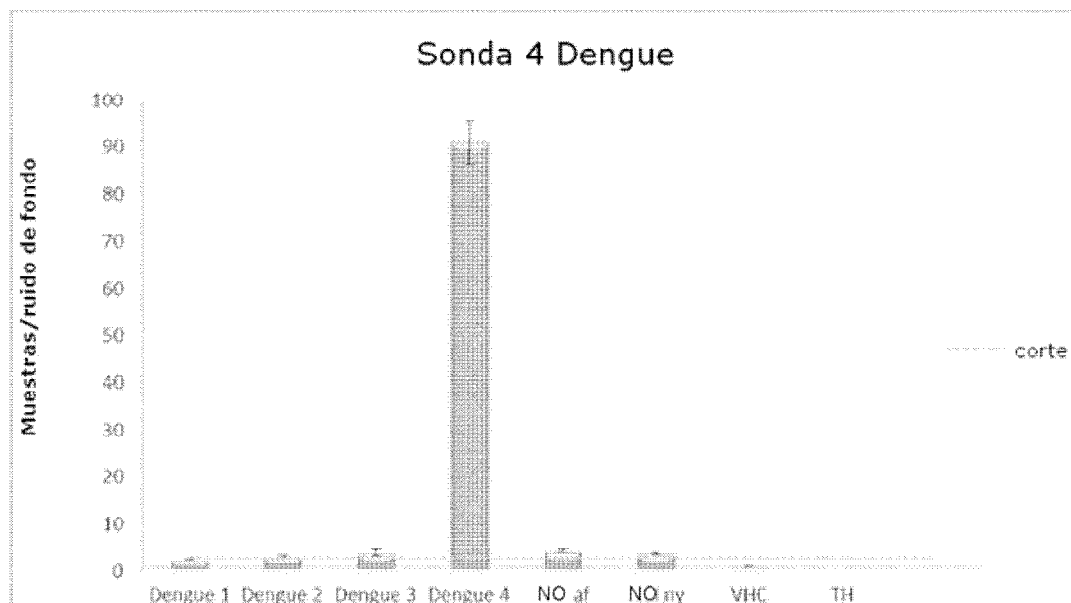


Figura 23

