

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 322**

51 Int. Cl.:

C07F 9/44

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2013 PCT/EP2013/057122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13150106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013 E 13713922 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2834253**

54 Título: **Compuestos de tiol y su uso para la síntesis de oligonucleótidos modificados**

30 Prioridad:

04.04.2012 FR 1253121

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%)**

3, rue Michel-Ange

75794 Paris Cedex 16, FR;

UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1 (25.0%);

ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG (25.0%) y

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (25.0%)

72 Inventor/es:

MORVAN, FRANÇOIS;

MEYER, ALBERT;

VASSEUR, JEAN-JACQUES;

MAYEN, JULIE;

CHAIX, CAROLE;

FARRE, CAROLE;

FOURNIER-WIRTH, CHANTAL;

CANTALOUBE, JEAN-FRANÇOIS y

LEREAU, MYRIAM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 628 322 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

Compuestos de tiol y su uso para la síntesis de oligonucleótidos modificados

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un compuesto de tiol apto para formar una cadena de oligómeros que se pueden injertar sobre un oligonucleótido. La invención también se refiere a un oligonucleótido injertado con un compuesto de este tipo, que de ese modo posee uno o varios grupos funcionales tiol, aptos para su inmovilización sobre una superficie de oro o sobre una superficie injertada, en particular una superficie injertada con grupos maleimida o acrilamida. La invención también se refiere a un kit de ensayo de detección de interacción entre nucleótidos y otras moléculas usando como superficie la superficie de oro o la superficie injertada, en particular con grupos maleimida o acrilamida sobre la que se inmovilizan los oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

Estado de la técnica

Los oligonucleótidos son moléculas que comprenden una cadena corta de nucleótidos, número de nucleótidos que puede variar de 1 a aproximadamente 100. Se trata de fragmentos de ARN (ácido ribonucleico) o de ADN (ácido desoxirribonucleico). Los oligonucleótidos se sintetizan generalmente en forma de hebras sencillas.

15 Los oligonucleótidos se pueden sintetizar por vía enzimática o mediante procedimientos de síntesis química. Cuando se elige un procedimiento químico, habitualmente, los oligonucleótidos se sintetizan sobre soporte sólido mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, realizando un procedimiento que usa fosforamiditas, H-fosfonatos, fosfodiésteres o fosfotriésteres, siendo los dos últimos compuestos derivados del ácido fosfórico, mientras que las fosforamiditas son derivados del ácido fosforoso.

20 Una propiedad importante de los oligonucleótidos es su capacidad para controlar los genes y la función de las proteínas en una secuencia específica. Esta propiedad hace que los oligonucleótidos y sus derivados sean compuestos muy usados en investigación en biología molecular y en numerosas aplicaciones farmacéuticas y de diagnóstico. El campo de la investigación necesita tener a disposición grandes cantidades de oligonucleótidos. Por lo tanto, es necesario un procedimiento que permita producir grandes cantidades de oligonucleótidos que tengan una pureza muy elevada.

Los ácidos nucleicos que tienen una secuencia dada de nucleótidos se usan en gran medida para la detección de ADN en muestras biológicas. El principio de este ensayo de detección se basa en la complementariedad de la secuencia de nucleótidos con la secuencia diana, formando de ese modo una hebra doble. Esta hebra doble se forma en el transcurso de un procedimiento denominado hibridación.

30 Este fenómeno de hibridación se puede detectar a continuación con diversos procedimientos, en particular mediante etiquetado de la secuencia de nucleótidos destinada a unirse a la secuencia inicialmente presente. Los procedimientos de etiquetado, fluorescente o radiactivo, para la detección del fenómeno de hibridación presentan ciertos inconvenientes. El etiquetado necesita una etapa complementaria durante la síntesis de la secuencia de nucleótidos, en ocasiones siendo esta etapa difícil de realizar. El ensayo basado en este fenómeno de hibridación detectado mediante etiquetado necesita, después de la etapa de hibridación, eliminar las secuencias de nucleótidos etiquetadas que no se han unido a la secuencia diana de la muestra.

40 A continuación se realizaron otros procedimientos de detección, en particular procedimientos en los que las secuencias de nucleótidos se inmovilizan previamente sobre una superficie, siendo a continuación la muestra a someter a ensayo puesta en contacto con esta superficie con el fin de crear el fenómeno de hibridación mediante la formación de hebras dobles.

Entre estos otros procedimientos, cada vez se usan más los procedimientos electroquímicos. Estos procedimientos se basan en la inmovilización de oligonucleótidos sobre un electrodo, por ejemplo un electrodo de oro. Durante el transcurso del ensayo, la hibridación de los oligonucleótidos inmovilizados con hebras sencillas sobre el electrodo de oro se cuantifica gracias a la medición de la corriente eléctrica, que depende del número de hebras dobles formadas entre el oligonucleótido de una sola hebra inmovilizado y el oligonucleótido de la muestra.

50 Con el fin de realizar estos ensayos, el oligonucleótido se inmoviliza sobre la superficie metálica, y en particular sobre una superficie de oro. Esta inmovilización se puede obtener en particular gracias a un enlace entre un átomo de oro y un átomo de azufre. Sin embargo, el enlace Au-S es moderadamente fuerte. Por lo tanto, un solo enlace de oro-azufre no es suficiente para inmovilizar un oligonucleótido sobre la superficie de oro de manera muy estable. De hecho, los procedimientos de ensayo conllevan etapas, en particular de lavado, que ocasionan fuertes limitaciones mecánicas susceptibles de desestabilizar el enlace Au-S.

El documento EP 0 523 978 desvela compuestos de fosforamidita o fosfonato que se pueden usar para la producción de oligonucleótidos modificados con tioles. No se pueden introducir más que una sola vez y únicamente en el extremo la posición 5' de un oligonucleótido.

El documento US 7.601.848 desvela un compuesto polifuncional que comprende dos átomos de azufre destinado a su incorporación en oligómeros con el fin de crear al menos dos enlaces de oro-azufre y de ese modo estabilizar el oligonucleótido sobre la superficie de oro. Algunos de estos compuestos comprenden un grupo funcional fosforamidita. Los compuestos usados en el presente documento se fabrican a partir de compuestos de alto coste y el acoplamiento del compuesto polifuncional sobre los oligonucleótidos no tiene un rendimiento satisfactorio debido al impedimento estérico de este compuesto. En el presente documento, es necesario un agente de enlace con el fin de unir los compuestos de tior entre sí y de ese modo realizar una múltiple introducción de compuestos de tior en un oligonucleótido.

U. K. Shigdel y C. He, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130 (52), 17634-5, describen un nucleótido modificado con un el grupo funcional fosforamidita destinado a su introducción sobre un oligonucleótido mediante este grupo funcional fosforamidita. La síntesis del compuesto descrito se realiza en 12 etapas.

S. Jin y col., J. Org. Chem. 2005, 70, 4284-4299, describen un nucleósido modificado con un grupo funcional fosforamidita y un grupo funcional tior. Los nucleósidos modificados se usan para introducir sondas biofísicas en el seno del ARN. El nucleósido modificado se sintetiza en 9 etapas con un rendimiento global de un 12,5 %.

A. Hatano y col., Tetrahedron, 61, 2005, 1723-1730, describen la síntesis de ADN haciendo intervenir una base de nucleósido que comprende un grupo funcional fosforamidita y un grupo funcional tiofenol. El nucleósido modificado se sintetiza en 7 etapas con un rendimiento insuficiente, inferior a un 5 %.

En las tres publicaciones científicas mencionadas anteriormente, el compuesto de fosforamidita es un nucleósido modificado destinado a su incorporación en un oligonucleótido mediante el compuesto intermedio de este grupo funcional de fosforamidita. Los reactivos de partida son caros, las síntesis son largas y complejas y los rendimientos de la síntesis de estos compuestos de fosforamidita son bajos. Además, el impedimento estérico de estos compuestos osídicos no es adecuado para un injerto satisfactorio sobre una superficie.

A. A. Rowe y col., Anal. Chem. 2011, 83, 9462-9466 describen un compuesto nucleosídico que se puede inmovilizar sobre la superficie de oro para la detección de ADN. El compuesto nucleosídico se incorpora una sola vez, para una inmovilización sobre una superficie de oro mediante el compuesto intermedio de un único grupo funcional tior. El reactivo de partida es caro, y la fabricación del compuesto de tior es compleja.

El objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto de tior que disminuya al menos parcialmente los inconvenientes mencionados anteriormente, es decir, un compuesto de tior, fácil de fabricar, que se pueda oligomerizar de manera sencilla y económica, y destinado a su incorporación en un oligonucleótido e inmovilización sobre una superficie.

De forma más particular, la invención se dirige a proporcionar un procedimiento que permita introducir de manera fácil y eficaz uno o varios grupos funcionales tior en un oligonucleótido.

Sumario de la invención

Un primer objeto de la invención se refiere a un compuesto que responde a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

T es un grupo elegido entre -O-P(OR₁)N(R₂)₂, -O-PH(O)O-, -OC(O)JC(O)NH-□,

◦ R₁ se elige entre los grupos 2-cianoetilo, R'₁R'₂R'₃SiCH₂CH₂, y R'₁, R'₂, R'₃ idénticos o diferentes representan un grupo elegido entre los alquilos lineales o ramificados que comprenden de 1 a 12 átomos de carbono y los arilos en C₆-C₁₂,

◦ R₂ se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados que comprenden de 1 a 12 átomos de carbono, pirrolidina,

◦ J se elige entre un enlace sencillo, un grupo -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂-, -CH₂OPhOCH₂- en el que Ph es un bencilo,

◦ □ representa un soporte sólido,

D es un grupo protector de alcoholes elegido entre 4,4'-dimetoxitritilo, 9-fenilxanten-9-ilo,

fluorenilmetiloxycarbonilo y terc-butil-dimetilsililo,

W se elige entre los grupos CH, CCH₃, CCH₂CH₃, ciclohexanos triilo, y bencenos triilo,

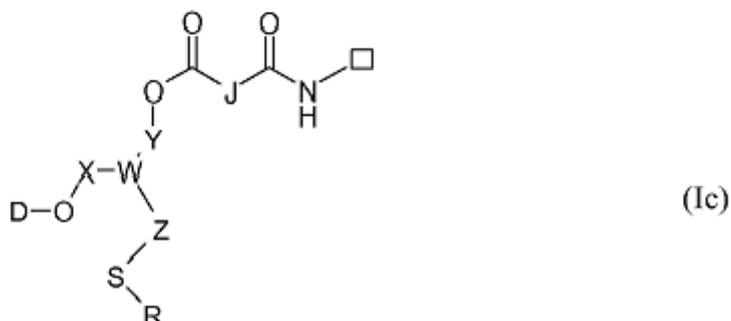
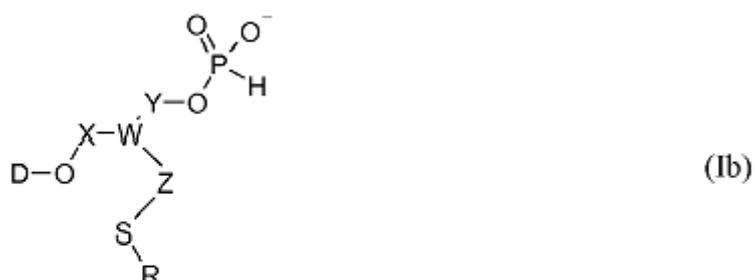
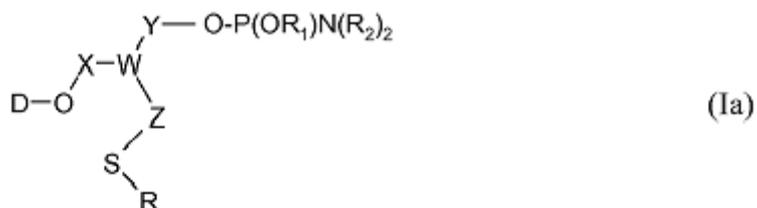
Z se elige entre los grupos alcoxi en C1-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12, NCO-alquilos en C1-C12, CON-alquilos en C1-C12,

5 Y se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C12, aminoalquilos en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilos en C3-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12,

X se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C12, aminoalquilos en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilos en C3-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12,

10 R se elige entre los grupos acilo en C1-C12, S-alquilos en C1-C12, S-arilos en C6-C12, S-2-piridina, S-heteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C1-C12, S-cicloalquilos en C3-C12, S-cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto responde a una de las siguientes fórmulas (Ia), (Ib) e (Ic):



De acuerdo con un modo de realización,

- 15
- D se elige entre 4,4'-dimetoxitritilo, 9-fenilxanten-9-ilo o Fluorenilmetiloxycarbonilo,
 - W se elige entre un grupo CH, CCH₃, CCH₂CH₃, un ciclohexano tri-ilo y benceno tri-ilo; y/o
 - Z se elige entre los grupos alcoxi en C1-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6, NCO-alquilos en C1-C6, CON-alquilos en C1-C6 ; y/o
- 20
- Y se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C6, aminoalquilos en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloalquilos en C3-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6 ; y/o
 - X se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C6, aminoalquilos en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloalquilos en C3-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6 ; y/o
 - R se elige entre los grupos acilo en C1-C6, S-alquilos en C1-C6, S-arilos en C6-C6, S-heteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C1-C6, S-cicloalquilos en C3-C6, S-cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6, preferentemente R es un acilo en C1-C6.
- 25

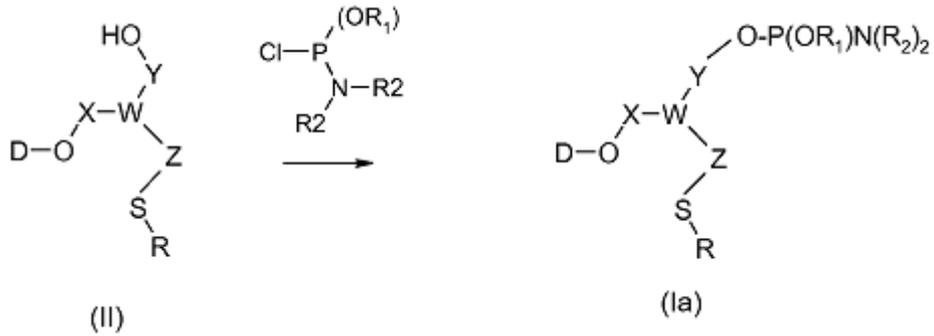
De acuerdo con un modo de realización, el grupo T es un grupo -O-P(OR₁)N(R₂)₂ en el que R₂ es un grupo isopropilo y R₁ se elige entre los grupos 2-cianoetilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trifenilsilil)etilo, 2-(difenilmetilsilil)etilo.

De acuerdo con un modo de realización, el grupo T es el grupo -OC(O)JC(O)NH-□ en el que □ es un soporte sólido elegido entre resinas, en particular entre las resinas a base de poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa,

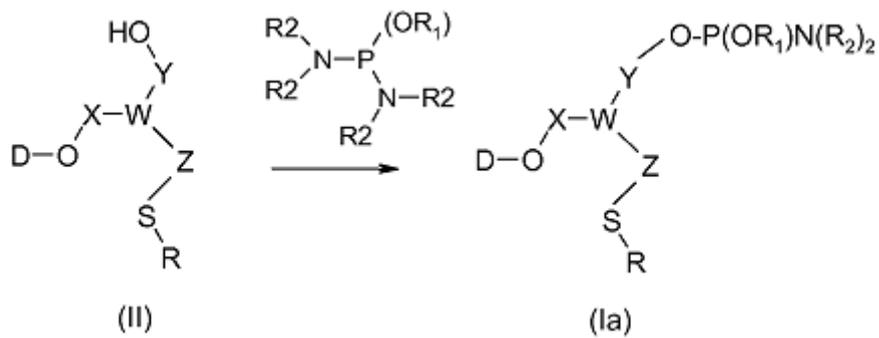
polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, perlas de vidrio, geles de sílice.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención que comprende al menos una etapa elegida entre las etapas siguientes:

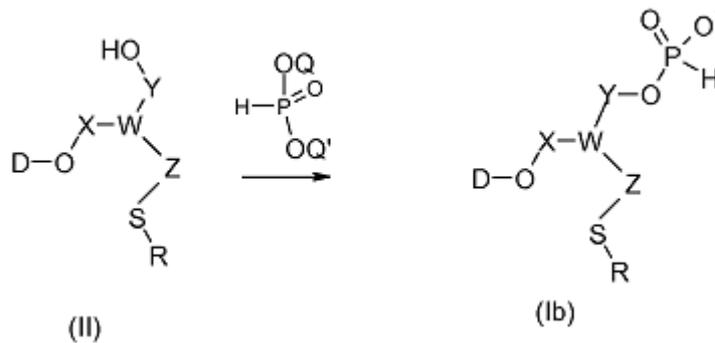
- 5 - preparación del compuesto (Ia) a partir del compuesto (II) de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



o de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



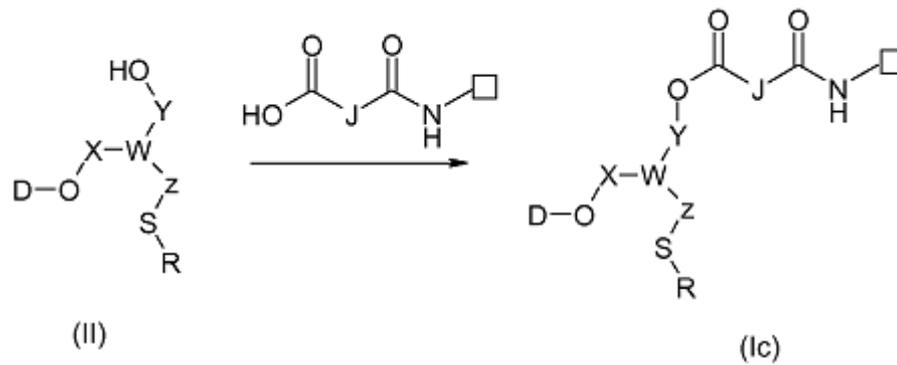
- preparación del compuesto (Ib) a partir del compuesto (II) de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



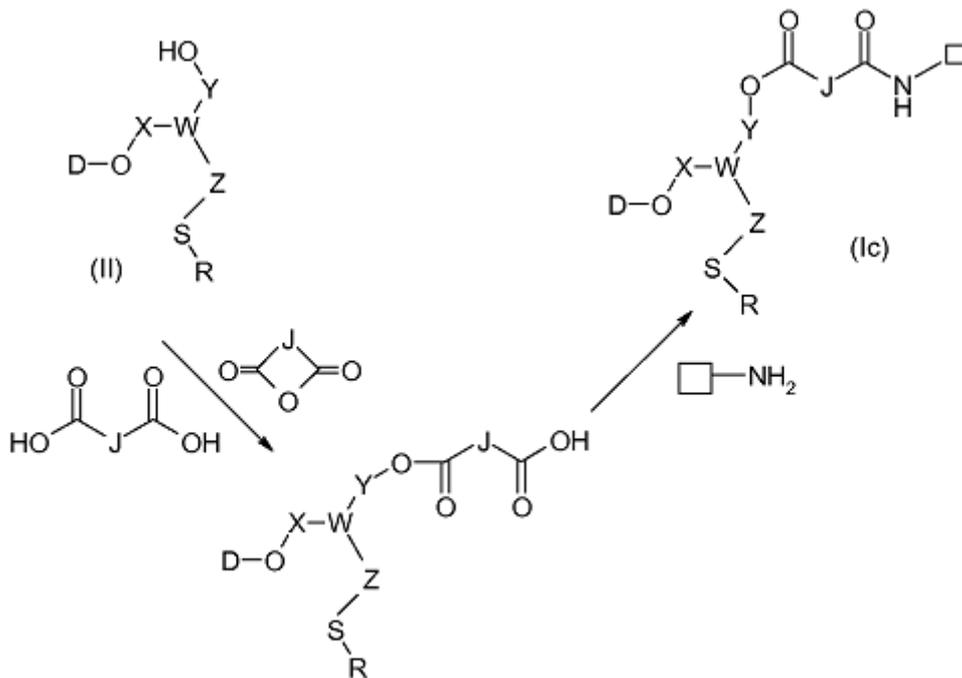
10

en la que Q y Q' representan, independientemente entre sí, un grupo benceno sustituido o no,

- preparación del compuesto (Ic) a partir del compuesto (II) de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



o de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



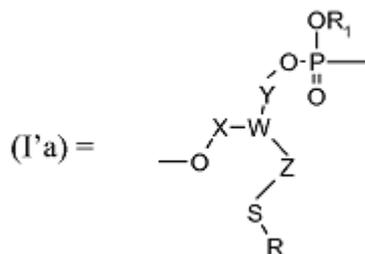
D, X, Y, Z, W, R, □, R₁ y R₂ teniendo la misma definición en cada una de estas etapas que en el compuesto (I).

- 5 Otro objeto de la invención se refiere a un oligómero susceptible de ser obtenido por oligomerización de un compuesto (I) de acuerdo con la invención, que responde a la fórmula

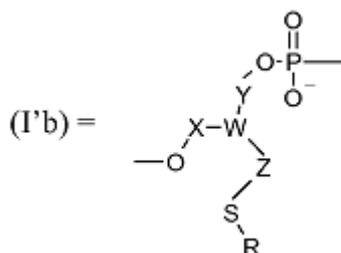


en la que:

- 10 (Ic) tiene el mismo significado que se ha mencionado anteriormente, el grupo R del compuesto (Ic) además puede representar H.
 k representa un número entero comprendido entre 1 y 12,
 Δ representa (I'a) o (I'b) en los que

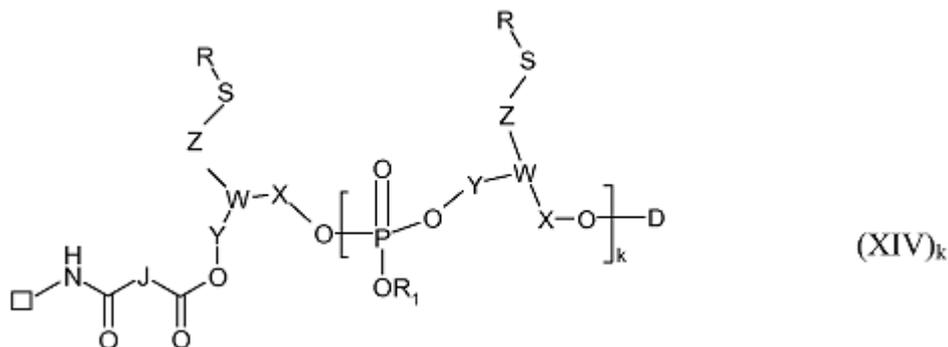


y



5 en las que, X, Y, W, Z, R, R₁ tienen la misma definición que para el compuesto (I), R además puede representar H.

De acuerdo con un modo de realización, el oligómero de acuerdo con la invención responde a la fórmula (XIV)_k:



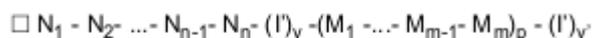
en la que,

10 □, D, X, Y, W, Z, R y R₁ tienen la misma definición que para el compuesto (I), R además puede representar H y D además puede representar H, k es un número entero comprendido entre 1 y 11.

La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un oligonucleótido modificado que comprende al menos:

- 15 - una etapa de injerto de un compuesto (I) de acuerdo con la invención sobre un oligonucleótido, o
- una etapa de injerto de un nucleótido sobre un oligómero de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención se refiere a un oligonucleótido modificado susceptible de ser obtenido con el procedimiento de acuerdo con la invención que responde a la fórmula (XIIa) siguiente:

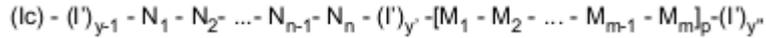


en la que,

20 N₁, ... N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
M₁, ... M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
(I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b) tal como se ha definido anteriormente,
n es un número entero comprendido entre 1 y 100,

m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 p representa 0 o 1,
 y' es un número entero comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0,
 □ representa un soporte sólido.

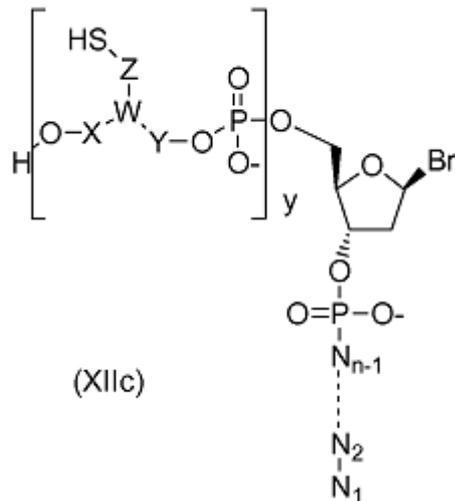
Otro objeto de la invención se refiere a un oligonucleótido modificado susceptible de ser obtenido con el procedimiento de acuerdo con la invención que responde a la fórmula (XIIIa) siguiente:



en la que,

10 N_1, \dots, N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 M_1, \dots, M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 (I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b) tal como se ha definido anteriormente,
 n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 15 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 y' es un número entero comprendido entre 0 y 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 comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0.

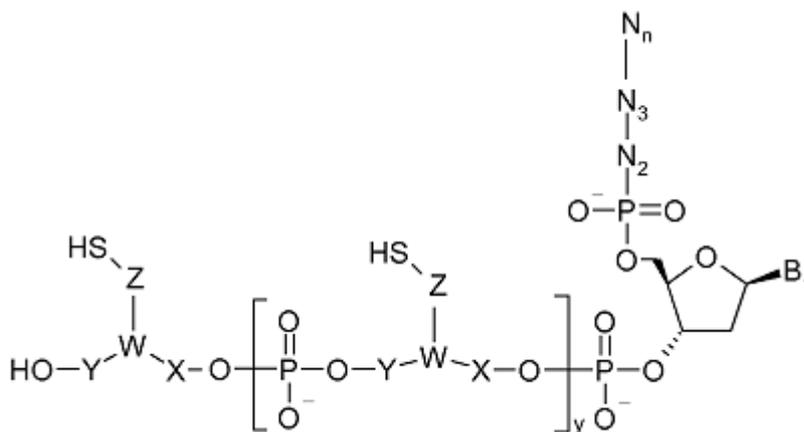
De acuerdo con un modo de realización, el oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención responde a la fórmula (XIIc):



en la que,

25 n, y, N_1, \dots, N_{n-1} tienen la misma definición que anteriormente,
 X, Y, Z, W tienen la misma definición que anteriormente,
 Bn representa la base del n-ésimo nucleótido.

De acuerdo con un modo de realización, el oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención responde a la fórmula (XIIc):



en la que,

- 5 n, y, N tienen la misma definición que anteriormente,
 X, Y, Z, W tienen la misma definición que anteriormente,
 B₁ representa la base del 1^{er} nucleótido.

Otro objeto de la invención se refiere a un dispositivo automatizado para la síntesis de nucleótidos que comprende al menos recipientes distintos que contienen:

- 10 - nucleótidos,
 - activadores de acoplamiento y
 - productos de lavado,

medios mecánicos de extracción y distribución de muestras de productos, así como medios informáticos que permiten la realización controlada de estos medios mecánicos, así como:

- 15 al menos un recipiente en el que se coloca un soporte sólido injertado con un oligómero de acuerdo con la invención, y/o al menos un recipiente que contiene un compuesto (Ia) o un compuesto (Ib) de acuerdo con la invención.

20 Otro objeto de la invención se refiere a un sustrato injertado con al menos un oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho sustrato al menos una zona de recepción revestida con una película de oro o de platino o injertada con grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o grupos halogenoacetamida, preferentemente grupos maleimida y/o acrilamida, siendo dicho sustrato de metal en el caso de la película de oro y de plástico en el caso del injerto con grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o grupos halogenoacetamida, preferentemente grupos maleimida y/o acrilamida.

25 De acuerdo con 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 eligen entre los alquenos activados por un grupo funcional carbonilo en alfa, preferentemente los alquenos se eligen entre los grupos maleimida, acrilamida.

De acuerdo con un modo de realización, los grupos halogenoacetamida se eligen entre los grupos bromoacetamido e yodoacetamido .

30 De acuerdo con un modo de realización de la invención, los grupos que comprenden al menos un triple enlace carbono-carbono se eligen entre los alquinos activados por un grupo funcional carbonilo en alfa, preferentemente los alquinos se eligen entre los grupos 2-propinamida.

De acuerdo con un modo de realización, el sustrato de metal es de cobre o de titanio y/o el sustrato de plástico es de poliestireno.

La invención también propone un kit de ensayo que comprende:

- 35 - al menos un sustrato que comprende al menos una zona de recepción revestida con una película metálica de oro o de platino o de un sustrato injertado con grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o grupos halogenoacetamida, preferentemente grupos maleimida y/o acrilamida,
 - al menos un oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención se refiere a un uso de un sustrato de acuerdo con la invención para realizar ensayos de

afinidad entre un oligonucleótido y otra molécula.

Las ventajas de la presente invención son las siguientes:

- el compuesto de tiol de la invención es de bajo coste,
 - el compuesto de tiol de la invención se obtiene mediante un procedimiento de realización sencillo,
 - 5 - el compuesto de tiol de la invención se puede introducir una o varias veces en un oligonucleótido de manera simple y eficaz,
 - el oligonucleótido injertado de la invención se puede inmovilizar de manera estable sobre una superficie de oro, o sobre una superficie injertada, en particular con grupos maleimida o acrilamida,
 - los oligonucleótidos de la invención se pueden fabricar con un procedimiento totalmente automatizable.
- 10 Otras características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción que sigue a continuación de un modo de realización de la invención, proporcionada a modo de ejemplo y por referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa un esquema que describe un procedimiento de síntesis de los 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).
- 15 La figura 3 representa un esquema que describe un procedimiento de síntesis de un compuesto (XIIc) oligonucleótido injertado con un oligómero de (I) en su extremo en la posición 5'.
- La figura 4 representa un esquema que expone un procedimiento de síntesis de un compuesto (XIIIc) oligonucleótido injertado con un oligómero de (I) en su extremo en la posición 3'.
- 20 La figura 5 representa un histograma de la tasa de injerto de oligonucleótidos modificados sobre una superficie de oro.
- La figura 6 representa un esquema que expone la estabilidad del injerto de oligonucleótidos modificados sobre 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 sobre una superficie de oro en función del tiempo a 80 °C.
- 25 La figura 8 representa un diagrama que esquematiza los resultados de un ensayo de ELOSA con detección mediante fluorescencia.
- La figura 9 representa los resultados de un ensayo de hibridación de sonda/diana con una sonda de monotiol.
- La figura 10 representa los resultados de un ensayo de hibridación de sonda/diana con una sonda de ditioi.
- 30 La figura 11 representa los resultados de un ensayo de hibridación de sonda/diana con una sonda de tetratioi.
- La figura 12 representa los resultados de un ensayo de hibridación de sonda/diana con una sonda de tetratioi injertada sobre superficie de oro.
- La figura 13a representa las reacciones entre el oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención y la superficie injertada con grupos alquénilos o alquínilos activados.
- 35 La figura 13b representa las reacciones entre el oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención y la superficie injertada con grupos alquénilos o alquínilos con activación luminosa ($\lambda = 265 \text{ nm}$).
- La figura 14 representa los resultados de un ensayo de hibridación de sonda/diana con sondas que presentan respectivamente 1, 2, 4, 6 y 8 compuestos de tiol de acuerdo con la invención.

Resumen de los modos de realización de la invención

- 40 La presente invención se refiere a la preparación y el uso de compuestos de estructura de fosoramidita, H-fosfonato o de compuestos unidos a un soporte sólido que presentan un grupo funcional tiol protegido. Estos compuestos de tiol están destinados a su introducción en oligonucleótidos. Los oligonucleótidos obtenidos de este modo pueden presentar varios grupos funcionales tiol.

Compuesto de tiol

- 45 Los compuestos de la presente invención responden a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

T es un grupo elegido entre -O-P(OR₁)N(R₂)₂, -O-PH(O)O-, -OC(O)JC(O)NH-□,

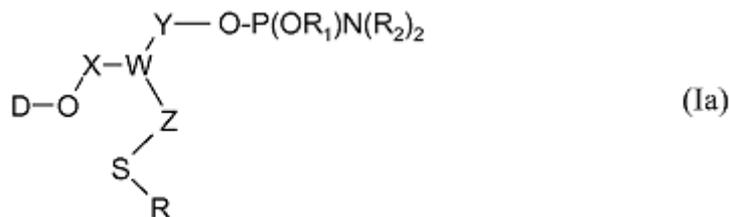
- 5
- R₁ se elige entre los grupos 2-cianoetilo, R₁R₂R₃SiCH₂CH₂, y R₁, R₂, R₃, idénticos o diferentes, representan un grupo elegido entre los alquilos lineales o ramificados que comprenden de 1 a 12 átomos de carbono y los arilos en C6-C12,
 - R₂ se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados que comprenden de 1 a 12 átomos de carbono, pirrolidina
 - J se elige entre un enlace sencillo, un grupo -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂-, -CH₂OPhOCH₂- en el que Ph es un bencilo,
 - □ representa un soporte sólido,
- 10
- D es un grupo protector de alcoholes elegido entre 4,4'-dimetoxitriilo, 9-fenilxanten-9-ilo, fluorenilmetiloxicarbonilo y terc-butil-dimetilsililo,
- W se elige entre los grupos CH, CCH₃, CCH₂CH₃, ciclohexanos triilo, y bencenos triilo,
- Z se elige entre los grupos alcoxi en C1-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12, NCO-alquilos en C1-C12, CON-alquilos en C1-C12,
- 15
- Y se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C12, aminoalquilos en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilos en C3-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12,
- X se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C12, aminoalquilos en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilos en C3-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12,
- 20
- R se elige entre los grupos acilo en C1-C12, S-alquilos en C1-C12, S-arilos en C6-C12, S-2-piridina, S-heteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C1-C12, S-cicloalquilos en C3-C12, S-cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12.

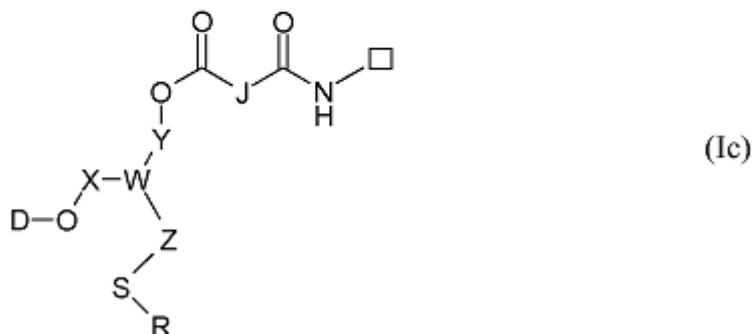
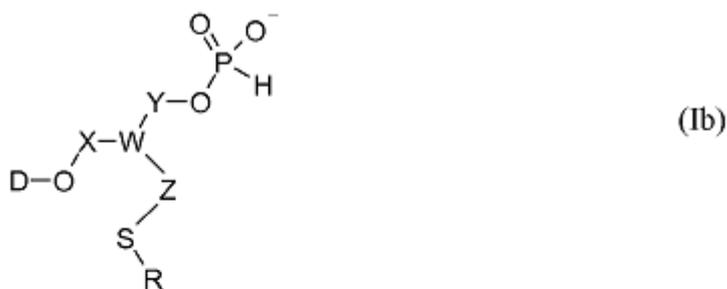
En el sentido de la presente invención, por « alcano tri-ilo » se hace referencia a los alcanos triilo, lineales, ramificados o cíclicos, opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos alquilo.

Entre los grupos arilos tri-ilos que pueden estar presentes en el compuesto de acuerdo con la invención, se pueden mencionar benceno tri-ilo, naftaleno tri-ilo.

- 25
- Entre los grupos aralcanos tri-ilos que pueden estar presentes en el compuesto de acuerdo con la invención, se pueden mencionar 1,3,5-trimetilbenceno tri-ilo, trimetilnaftaleno tri-ilo.

El compuesto (I) se puede separar en tres subcompuestos (Ia), (Ib) e (Ic) que responden a las siguientes fórmulas (Ia), (Ib) y (Ic), en las que los parámetros X, Y, Z, R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que se ha expuesto anteriormente para la fórmula (I):





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

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

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

Preferentemente, W se elige entre los grupos CH, CCH_3 , CCH_2CH_3 , ciclohexanos triilo, y bencenos triilo.

Preferentemente, D se elige entre 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr), 9-fenilxanten-9-ilo (pixilo) o Fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). El grupo protector pixilo se describe en particular en el documento de Chattopadhyaya y Reese, Chem. Soc. Chem. Comm., 1978, 639-640. Otro grupo protector de alcoholes puede ser un grupo *tert*-butil-dimetilsililo, en este caso, será particularmente preferente un soporte de poliestireno.

Preferentemente, Z se elige entre los grupos aminoalquilo en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6, NCO-alquilos en C1-C6, CON-alquilos en C1-C6.

Preferentemente, Y se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C6, aminoalquilos en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloalquilos en C3-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6.

Preferentemente, X se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C6, aminoalquilos en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloalquilos en C3-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6.

Preferentemente, R se elige entre los grupos acilo en C1-C12, S-alquilos en C1-C6, S-arilos en C6, S-heteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C6, S-cicloalquilos en C6, S-cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C6.

De acuerdo con un modo de realización, los alquilos lineales o ramificados se eligen entre los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, isopropilo, isobutilo, *tert*-butilo.

De acuerdo con un modo de realización, los aminoalquilos se eligen entre los grupos aminometilo, aminoetilo, aminopropilo, aminobutilo, aminopentilo, aminohexilo, aminoheptilo, amino octilo, aminononilo, aminododecilo, aminoundecilo, aminododecilo, aminoisopropilo, aminoisobutilo, amino-*tert*-butilo que comprende uno o varios átomos de nitrógeno.

De acuerdo con un modo de realización, los alcoxi se eligen entre los grupos metoxi, etoxi, propiloxi, oxibutiloxi,

pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, isopropiloxi, isobutiloxi, *terc*-butiloxi que comprende uno o varios átomos de oxígeno.

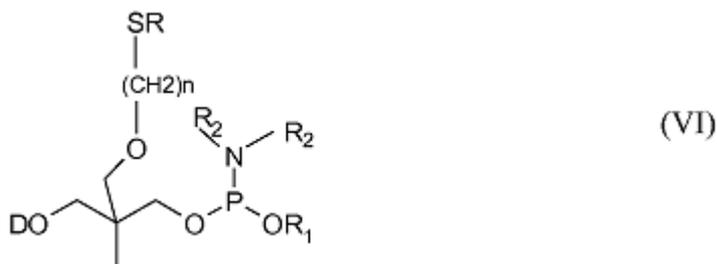
5 De acuerdo con un modo de realización, los cicloalquilos se eligen entre los ciclos, que comprenden opcionalmente una o varias insaturaciones, que comprenden entre 3 y 12 átomos de carbono, preferentemente 6 átomos de carbono.

De acuerdo con un modo de realización, los cicloheteroalquilos se eligen entre los ciclos sustituidos con uno o varios átomos de nitrógeno y/o de oxígeno, que comprenden opcionalmente una o varias insaturaciones y que comprenden entre 3 y 12 átomos de carbono, preferentemente 5 átomos de carbono y un átomo de nitrógeno o de oxígeno.

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

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

De acuerdo con un modo de realización preferente, el compuesto de tiol (Ia) es el compuesto (VI) que responde a la fórmula siguiente:



15 en la que,

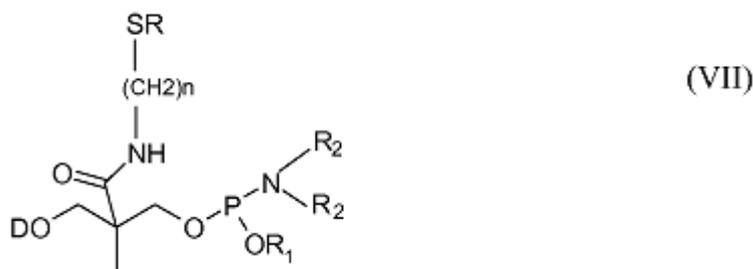
n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente comprendido entre 1 y 6, R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

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.

De acuerdo con otro modo de realización, el compuesto de tiol (Ia) es el compuesto (VII) que responde a la fórmula siguiente:



25 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).

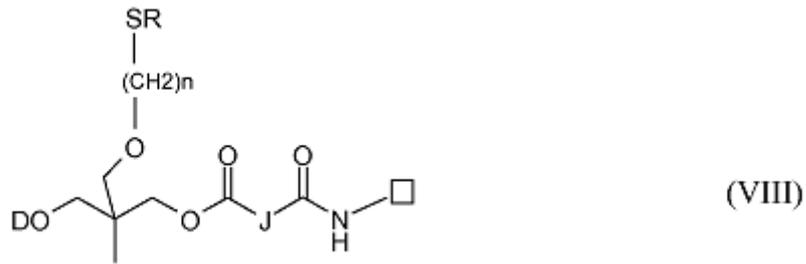
Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y R₁ es un grupo cianoetilo.

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

30 Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto de tiol (Ic) es el compuesto (VIII) que responde a la fórmula

siguiente:

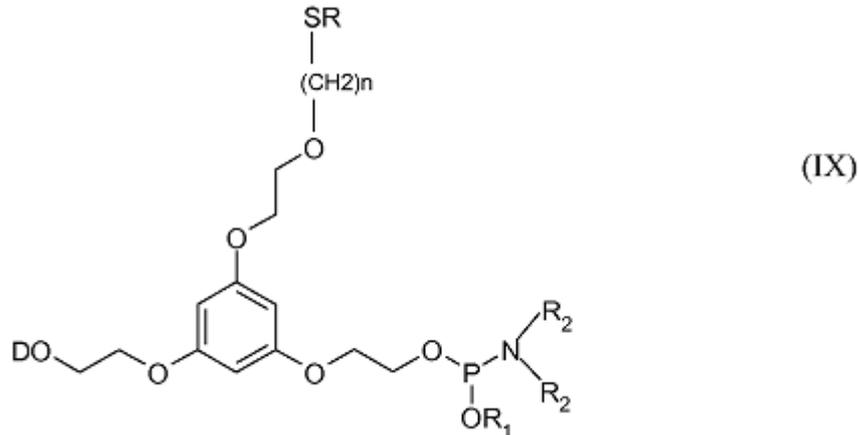


en la que,

- 5 n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente entre 1 y 6.
R, D 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.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto de tior (Ia) es el compuesto (IX) de fórmula:



- 10 en la que,

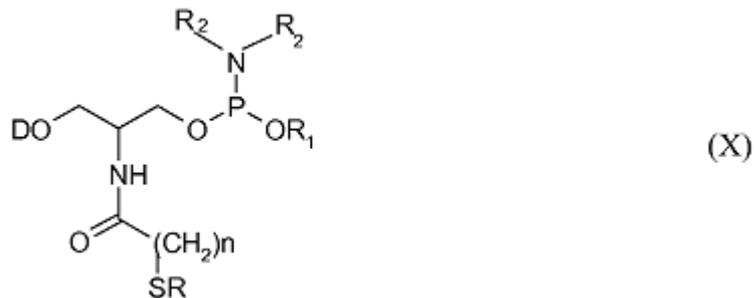
n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferentemente entre 1 y 6.
R, R₁, R₂ y D tienen la misma definición que anteriormente para (Ia).

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

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

- 15 Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto de tior (Ia) es el compuesto (X) de fórmula:



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).

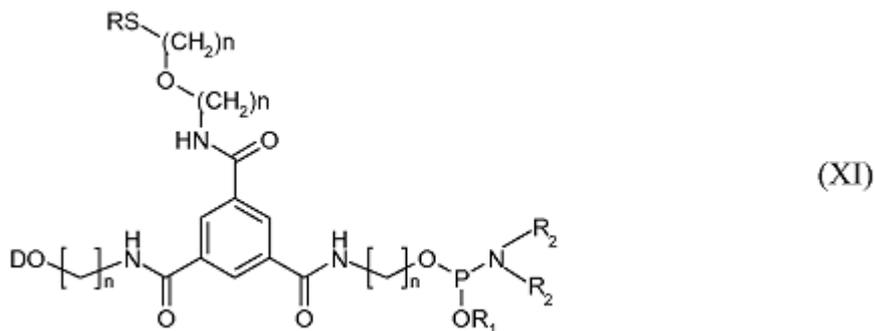
Preferentemente, R₂ es un grupo isopropilo (iPr) y R₁ es un grupo cianoetilo.

Preferentemente, R es un grupo acetilo.

5 Preferentemente, D es 4,4'-dimetoxitritilo.

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

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto de tiol (Ia) es el compuesto (XI) de 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.

15 Procedimiento de fabricación

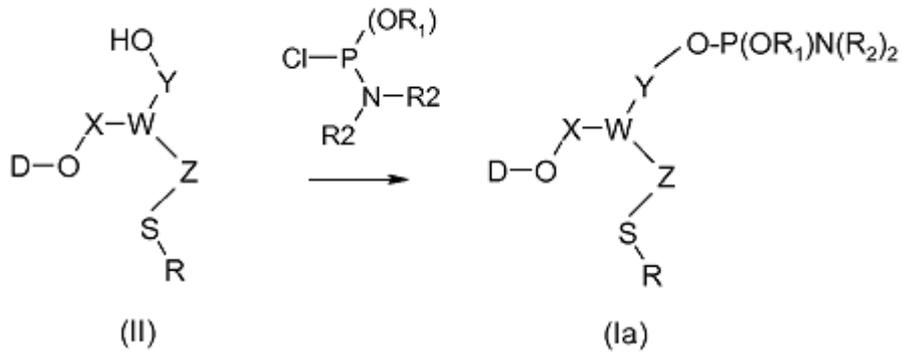
El procedimiento de fabricación de los compuestos (Ia), (Ib) e (Ic) se representa en el esquema de la figura 1.

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

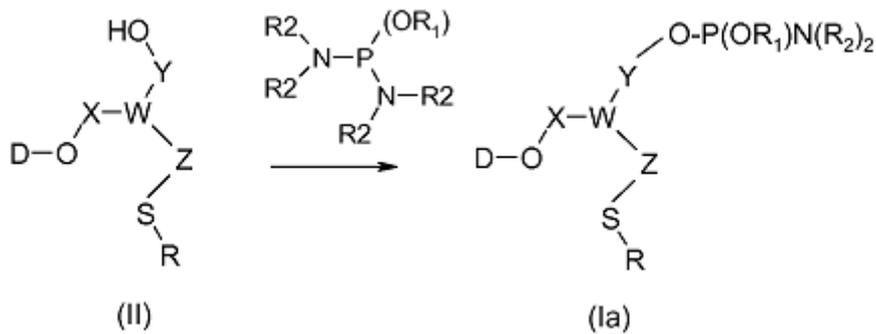


en la que, D, X, W, Y, Z y R tienen la misma definición que en el compuesto de tiol (I).

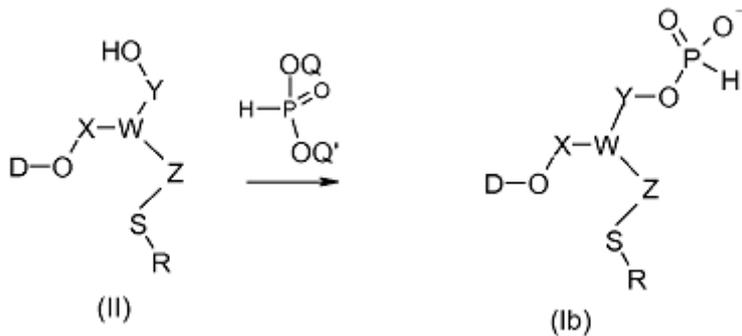
20 El compuesto de fórmula (Ia) se puede obtener de acuerdo con la reacción representada en el esquema siguiente:



o de acuerdo con la reacción representada en el esquema siguiente, preferentemente en presencia de la sal de tetrazolida de diisopropilamina:



5 El compuesto de fórmula (Ib) se puede obtener de acuerdo con la reacción representada en el esquema siguiente:

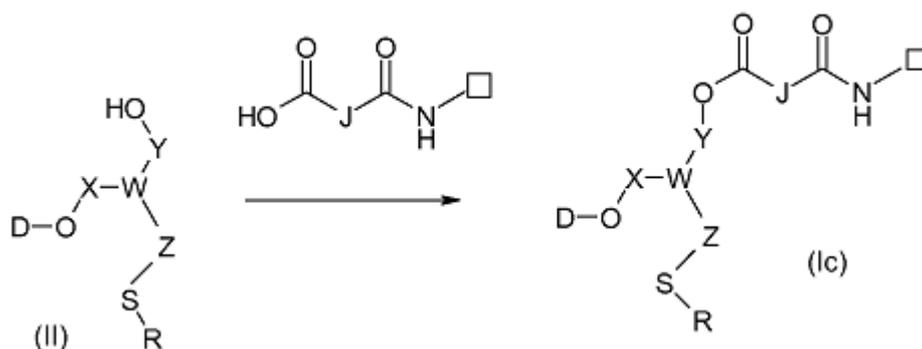


en la que, Q y Q' representan, independientemente entre sí, un grupo benceno sustituido o no.

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

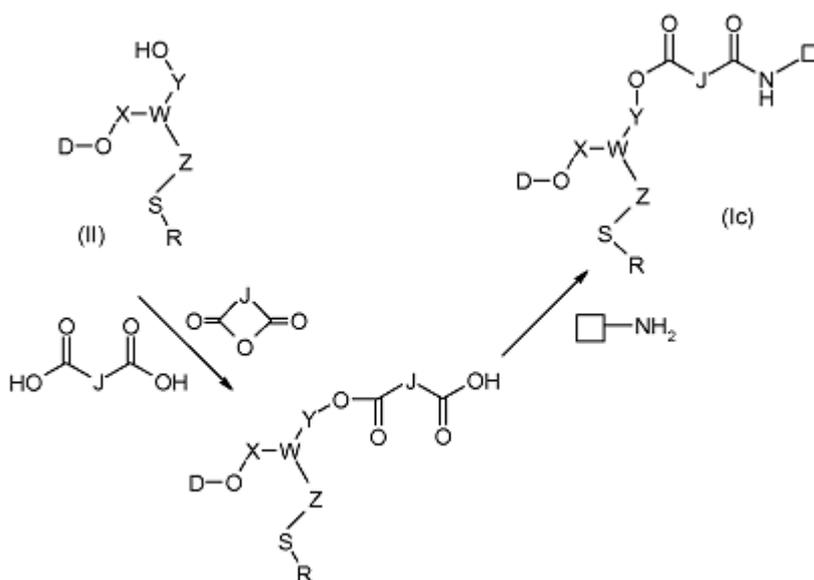
10

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



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

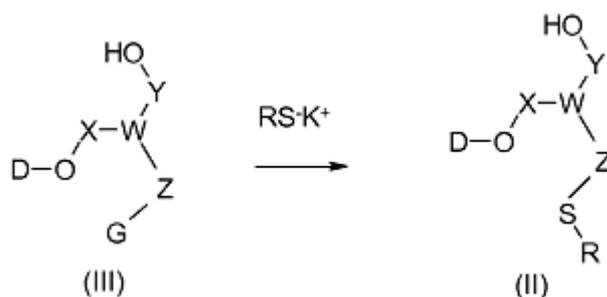
El compuesto (Ic) también se puede obtener de acuerdo con el esquema de reacción siguiente:



5

Un objeto de la presente invención es el compuesto (II) de fórmula mencionada anteriormente en la que los grupos D, X, W, Z, Y y R tienen la misma definición que en el compuesto (I).

El compuesto de fórmula (II) se puede obtener a partir del compuesto (III) de acuerdo con la etapa de reacción que se describe a continuación:



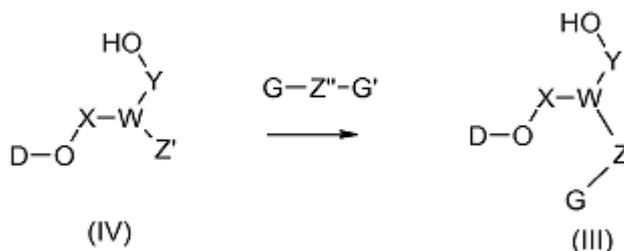
10

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

La creación descrita anteriormente se realiza preferentemente en un disolvente anhidro, tal como tolueno anhidro y en presencia de un éter corona.

El compuesto (III) se puede obtener a partir del compuesto (IV) de acuerdo con la etapa de reacción que se describe a continuación:

15

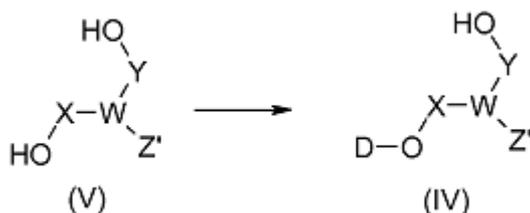


en la que,

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 en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloheteroalquilo oxigenado o nitrogenado en C3-
 C12, NCO-alquilo en C1-C12, CON-alquilo en C1-C12,
 Z'' es un grupo alquilo lineal o ramificado en C1-C12, aminoalquilo en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilo en
 C3-C12, cicloheteroalquilo oxigenado o nitrogenado en C3-C12, NCO-alquilo en C1-C12, CON-alquilo en C1-
 C12,
 estando el compuesto dihalogenado G-Z''-G' destinado a reaccionar con el grupo Z' del compuesto (IV) para
 llevar a la formación del grupo Z-G del compuesto (III).

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

El compuesto (IV) se puede obtener a partir del compuesto comercial (V) mediante protección del grupo funcional alcohol, de acuerdo con la etapa de reacción siguiente:



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

De acuerdo con 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 el grupo funcional alcohol.

De acuerdo con otro modo de realización, el compuesto (IV) se obtiene a partir del compuesto (V) a partir de cloruro de 9-fenilxanten-9-ilo (pixilo-Cl) en las condiciones que se describen en el documento de Chattopadhyaya y Reese, Chem. Soc. Chem. Comm., 1978, 639-640.

De acuerdo con otro modo de realización, el compuesto (IV) se obtiene a partir del compuesto (V) por reacción con cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (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) indicado anteriormente.

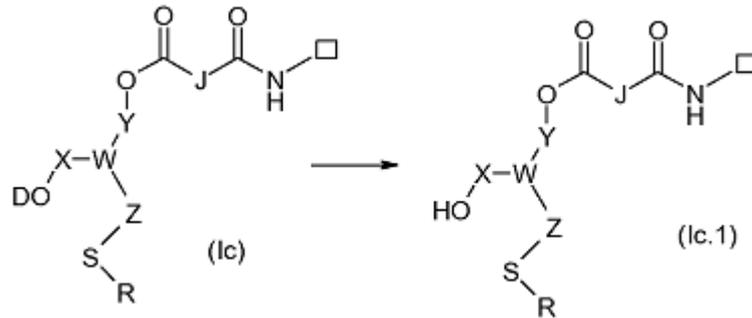
Preferentemente, el compuesto (V) de partida es 1,1,1-tris(hidroximetil)etano o ácido 2,2-bis(hidroximetil) propiónico o 1,3,5-tris(hidroxietoxi) benceno o 1,3,5-tris(hidroximetil)ciclohexano o 2-amino-1,3-propanodiol.

30 Oligómero del compuesto de tiol

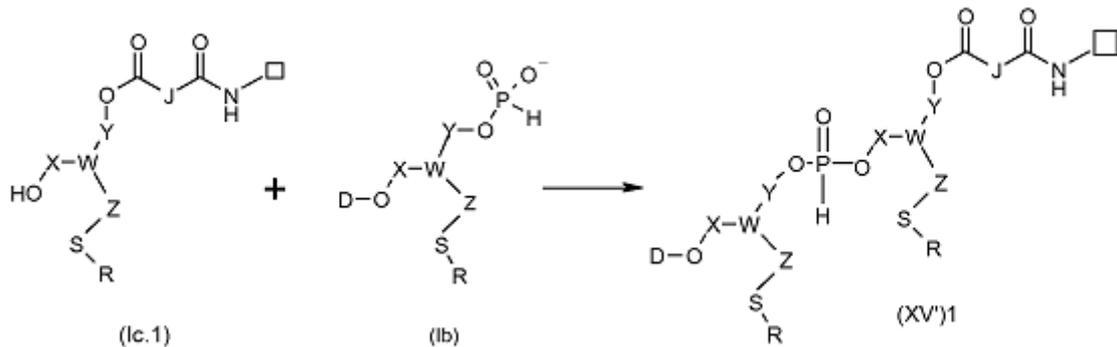
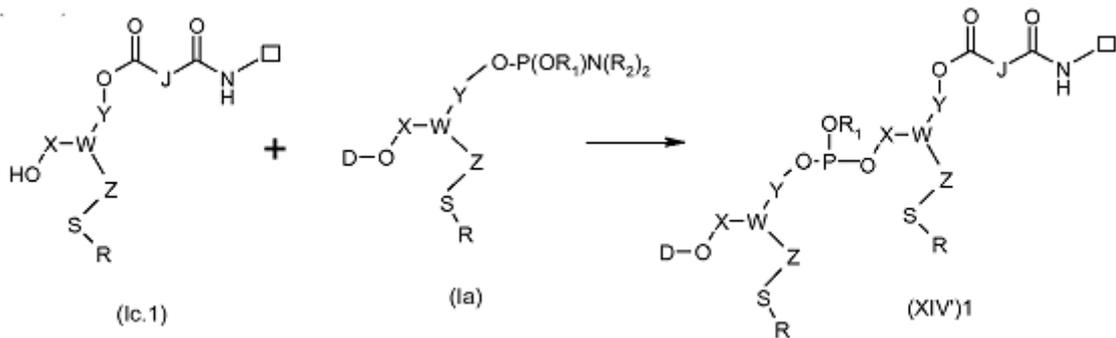
Un objeto de la presente invención se refiere a un oligómero formado a partir de compuestos de tiol de fórmula (I) descritos anteriormente. El procedimiento de síntesis de tales oligómeros se describe en el esquema de la figura 2A para la oligomerización de compuestos de fórmula (Ia) y en el esquema de la figura 2B para la oligomerización de compuestos de fórmula (Ib).

En una primera etapa, el grupo funcional alcohol del compuesto (Ic) está desprotegida para conducir al compuesto (Ic.1). Esta etapa de desprotección se realiza con medios bien conocidos por el experto en la materia,

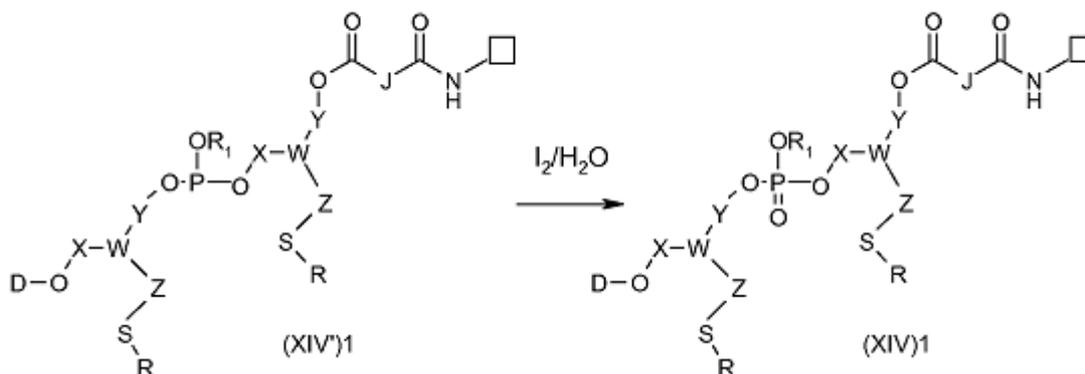
preferentemente en presencia del ácido di o tricloraacético para los grupos DMTr y Pixilo y piperidina para el grupo Fmoc.



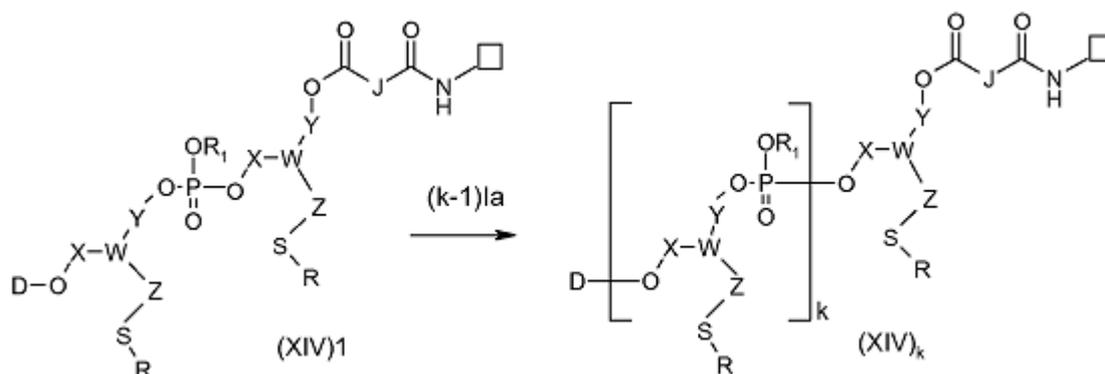
5 A continuación, el compuesto (Ic.1) reacciona con el compuesto (Ia) o (Ib) para conducir respectivamente al compuesto de fosfotriéster (XIV')1 o H-fosfonato diéster (XV') 1



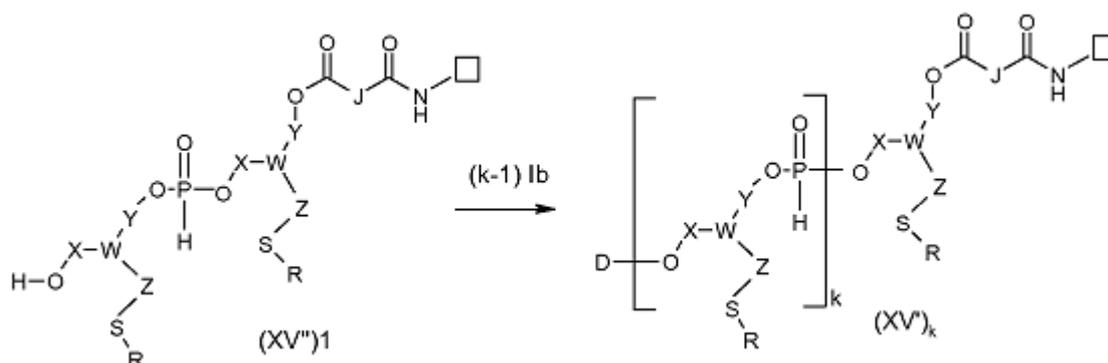
10 A continuación, el compuesto (XIV')1 se oxida preferentemente en presencia de diyodo, siendo a continuación el diyodo desplazado por el agua que aporta el átomo de oxígeno del enlace triéster de fosfato, para conducir al compuesto fosfotriéster (XIV)1. Esta etapa de oxidación se realiza después de cada etapa de acoplamiento entre un compuesto (XIV)*i* y un compuesto (Ia).



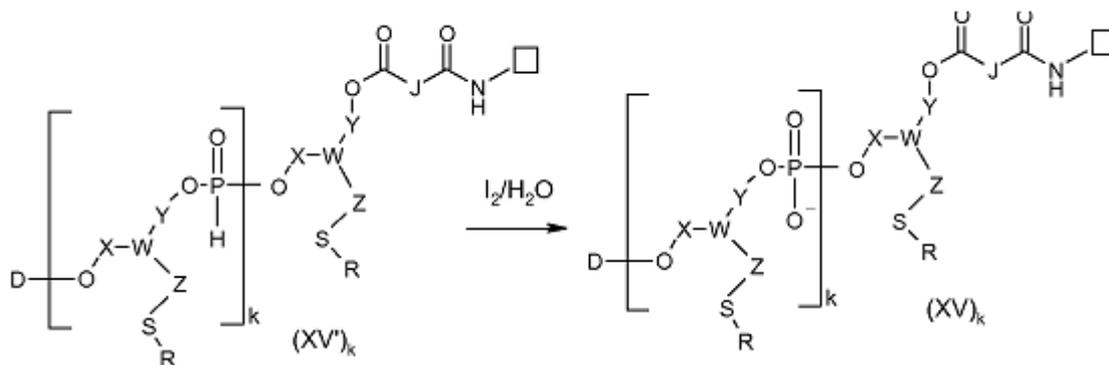
A continuación, de la misma manera, el compuesto (XIV)1 reacciona con (k-1) compuestos (Ia) para conducir, después de (k-1) oxidaciones, al compuesto (XIV)k:



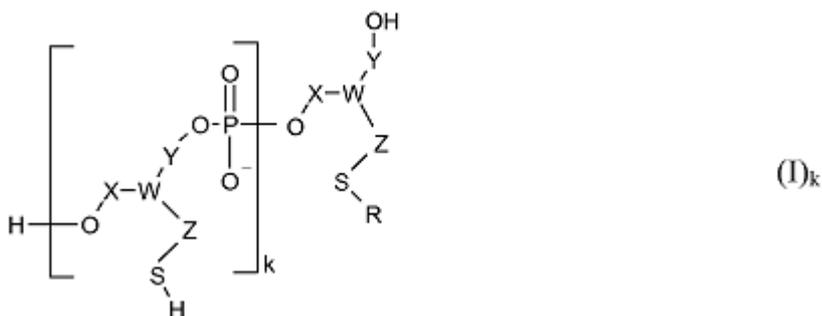
- 5 y el compuesto (XV')1 se desprotege sobre su grupo funcional alcohol para dar (XV'')1 que reacciona con (k-1) compuestos (Ib) para conducir al compuesto (XV')k:



A continuación, el compuesto (XV')k se oxida, preferentemente en presencia de diyodo y de agua para conducir al compuesto fosfodiéster (XV)k.



Por último, una última etapa opcional consiste en desproteger los compuestos (XIV)_k o (XV)_k para conducir al mismo compuesto (I)_k.



- 5 Preferentemente, el oligómero resulta de la oligomerización de 2 a 12 compuestos (I), en particular entre 2 y 8 compuestos (I), es decir que el oligómero puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 compuestos (I). Preferentemente, el oligómero de tiol destinado a ser injertado sobre una superficie de oro comprende entre 3 y 8, de forma ventajosa entre 4 y 8 compuestos (I) y el oligómero de tiol destinado a la conjugación con un sustrato injertado con un grupo que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o un grupo halogenoacetamida, en particular maleimida o acrilamida, comprende entre 2 y 6 compuestos (I).

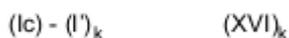
De acuerdo con un modo de realización, el oligómero se fabrica únicamente a partir de compuestos de fórmula (Ia) o de compuestos de fórmula (Ib). La oligomerización se realiza por reacción entre grupo funcional alcohol desprotegido de un primer compuesto (I) y el grupo funcional fosforamidita o H-fosfonato de un segundo compuesto (I).

- 15 También es posible proporcionar la fabricación de un oligómero a partir de una mezcla de compuestos (Ia) y de compuestos (Ib), modo de realización que presenta menos interés.

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

- 20 La oligomerización se puede realizar sobre soporte sólido o en solución. Preferentemente, la oligomerización se realiza sobre soporte sólido. De hecho, la oligomerización en solución implica etapas de purificaciones mediante cromatografía, etapas que no son económicamente viables, en particular para las pequeñas cantidades necesarias en las aplicaciones de diagnóstico.

Otro objeto de la invención descrito anteriormente es un soporte sólido injertado con un oligómero de un compuesto (Ia) o de un compuesto (Ib) y que responde a la fórmula (XVI)_k que sigue a continuación:



- 25 en la que:

k representa un número entero comprendido entre 1 y 11
(Ic) tiene el mismo significado que se ha mencionado anteriormente,
(I') representa (I'a) o (I'b), con:

un número entero comprendido entre 1 y 11.

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

- 5 Al final de la reacción de oligomerización, se puede proporcionar la desprotección de los grupos funcionales tiol mediante procedimientos clásicos y entonces R representa H.

Oligonucleótidos modificados

Otro objeto de la presente invención se refiere a un oligonucleótido modificado, que comprende al menos un nucleótido, preferentemente al menos dos nucleótidos y al menos un compuesto de tiol (I) descrito anteriormente.

- 10 En la presente solicitud, un oligonucleótido designa una cadena que comprende entre 2 y 100 nucleótidos.

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

El procedimiento de preparación de un oligonucleótido modificado de este tipo comprende al menos:

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

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el oligonucleótido injertado responde a la fórmula (XIIa) siguiente:



en la que,

- 20 N₁, ... N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 M₁, ... M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 (I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b),
 n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 25 m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 p representa 0 o 1,
 y' es un número entero comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0,
 □ representa un soporte sólido.

- 30 El oligonucleótido modificado (XIIa) presenta uno o varios compuestos de tiol en la posición 5' de un oligonucleótido N o bien en la cadena de nucleótidos. Este compuesto se obtiene mediante un injerto de un compuesto (I) seguido por una elongación del oligómero obtenido en (I) en la posición 5' de un oligonucleótido. A continuación, en el caso en el que p = 1, la elongación de la cadena de nucleótidos continúa. A continuación, de la misma manera, se puede considerar el injerto de uno o varios compuestos (I) complementarios en la posición 5' del oligonucleótido M.

- 35 Un esquema de obtención del compuesto (XIIa) se describe en la figura 3 en la que los compuestos de tiol son de tipo (Ia) y p es igual a 0. Las tres primeras etapas de fabricación del compuesto (XIIa) permiten la síntesis de un oligonucleótido. La síntesis del oligonucleótido se realiza sobre soporte sólido con un procedimiento clásico bien conocido por el experto en la materia. Durante la primera etapa, un primer nucleótido se injerta sobre un soporte sólido, a continuación los otros nucleótidos se injertan siguiendo procedimientos de síntesis bien conocidos por el experto en la materia. Se obtiene el siguiente compuesto:



A continuación, otros nucleótidos se injertan con un procedimiento idéntico para conducir al compuesto de fórmula (XIIa.2).

Durante la etapa siguiente, un compuesto de tiol de acuerdo con la invención de tipo (Ia) se injerta en la posición 5' del oligonucleótido (XIIa.2) para conducir al compuesto (XIIa.3):



Durante esta etapa, el injerto se realiza de manera clásica por reacción del grupo funcional fosforamídita del

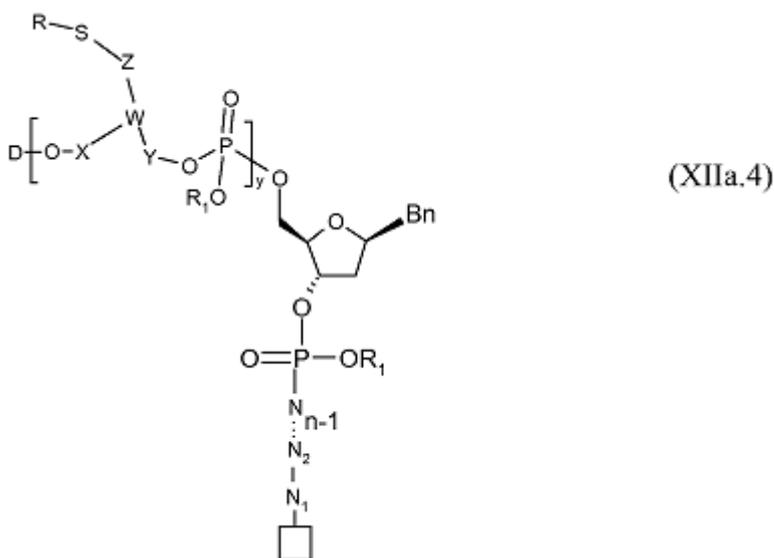
compuesto (Ia) con el grupo funcional alcohol en la posición 5' del nucleótido terminal del compuesto (XIIa.2).

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

- 5 A continuación, la oligomerización tal como se estila anteriormente, en particular en las figuras 2A y 2B, continúa a partir del compuesto (XIIa.3) mencionado anteriormente, por reacción con uno o varios compuestos (Ia) o (Ib) para conducir al compuesto (XIIa.4) de fórmula:



o de fórmula desarrollada (en el caso en el que p = 0):



10

en la que,

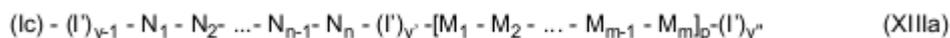
□, D, R, X, Y, W, Z, R₁ tienen la misma definición que para el compuesto (I) y R₁ además puede representar H, n, y, y N₁, N₂, ...N_{n-1} tienen la misma definición que para el compuesto (XIIa), Bn representa una base usada clásicamente en una cadena de nucleótidos.

- 15 En el caso en el que la elongación del oligómero se realiza 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 nucleótidos M₁, M₂, ...M_m es posible a continuación para conducir al producto (XIIa) con p = 1. En este caso, la elongación también se realiza sobre soporte sólido.

- 20 Esta etapa de injerto se realiza de manera clásica con procedimientos conocidos por el experto en la materia.

De acuerdo con otro modo de realización de la invención, el oligonucleótido injertado responde a la fórmula (XIIIa) siguiente:



en la que,

- 25 N₁, ... N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
M₁, ... M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
(I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b),
n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
30 y' es un número entero comprendido entre 0 y 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 comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y" vale 0.

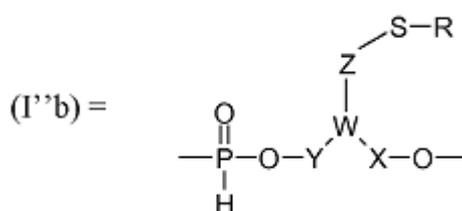
Un esquema que representa un modo de síntesis del compuesto (XIIIc) se describe en la figura 4 usando un oligómero formado a partir de un compuesto de tipo (Ic) en el que J es un grupo etilo, y que compuestos de tipo (Ib).

- 5 La síntesis del compuesto de fórmula (XIIIc) comprende una primera etapa que consiste en la oligomerización del compuesto de tiol de acuerdo con la invención de fórmula (I) cuyo procedimiento se ha descrito anteriormente para conducir al compuesto de fórmula (XIIIa.1):

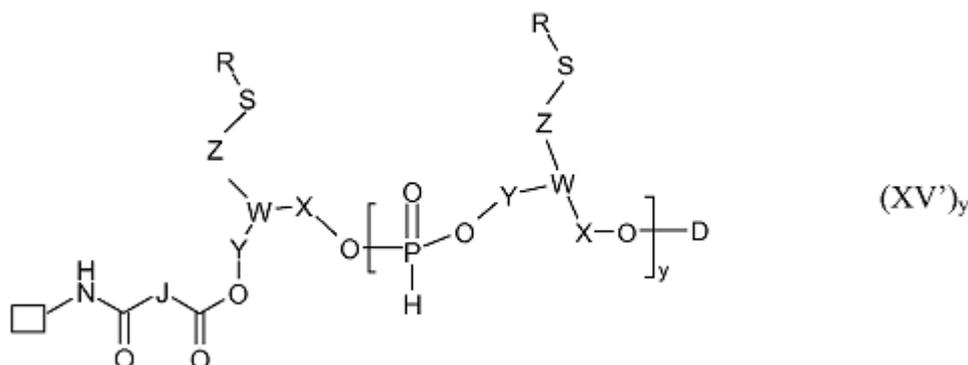


en la que,

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



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



- 15 En una segunda etapa, un primer nucleótido procedimiento se injerta sobre el oligómero de fórmula (XIIIa.1) para conducir al compuesto de fórmula (XIIIa.2) que sigue a continuación:

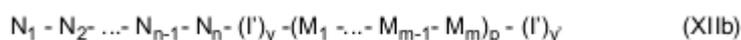


Esta etapa de injerto se realiza por reacción entre el grupo funcional alcohol desprotegido al final de la cadena de oligómero del compuesto (XIIIa.1) y el grupo funcional fosoramidita o H-fosfonato del primer nucleótido.

- 20 El oligonucleótido modificado se sintetiza a continuación sin importar con qué procedimiento conocido por el experto en la materia, en particular un procedimiento clásico bien conocido por el experto en la materia por reacción entre el grupo funcional alcohol en la posición 5' del primer nucleótido presente en el oligómero del compuesto de tiol y el grupo funcional fosoramidita o H-fosfonato en la posición 3' de un segundo nucleótido. La síntesis continúa mediante etapas sucesivas similares de elongación de la cadena de nucleótidos bien conocidas por el experto en la materia para conducir al compuesto de fórmula (XIIIa).

- 25 Otro objeto de la presente invención se refiere a los compuestos obtenidos a partir de los compuestos de fórmula (XIIa) y (XIIIa) mencionadas anteriormente después de romper el enlace que une el oligonucleótido modificado al soporte sólido. La rotura del enlace se realiza a nivel del grupo funcional éster.

Por lo tanto, de acuerdo con un modo de realización de la invención, el oligonucleótido no soportado presenta la estructura (XIIb) siguiente:

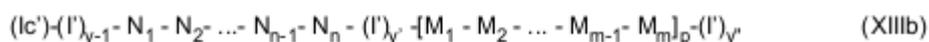


en la que,

N_1, \dots, N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 M_1, \dots, M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 (I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b),
 n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 p representa 0 o 1,
 y' es un número entero comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0.

La retirada del soporte se realiza en dos etapas en primer lugar con una base fuerte no nucleófila (piperidina o DBU) para eliminar los grupos cianoetilo, si estuvieran presentes (caso de las fosoramiditas), y en segundo lugar con un procedimiento clásico conocido por el experto en la materia, preferentemente con un tratamiento del compuesto (XIIa) con hidróxido de amonio (NH_4OH). 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 los grupos funcionales tiol.

De acuerdo con otro modo de realización de la invención, el oligonucleótido no soportado presenta la estructura (XIIIb) siguiente:



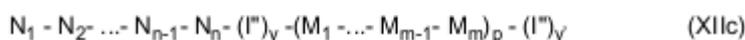
en la que,

N_1, \dots, N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 M_1, \dots, M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 (Ic') representa el compuesto obtenido a partir de (Ic) mediante rotura del enlace éster con el soporte sólido □,
 (I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b),
 n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 y' es un número entero comprendido entre 0 y 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 comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0.

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

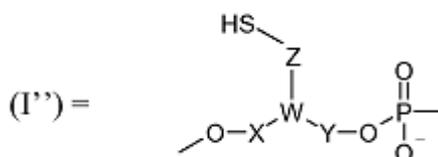
Otro objeto de la presente invención se refiere a los oligonucleótidos modificados (XIIc) y (XIIIc) obtenidos respectivamente a partir de los compuestos (XIIa) y (XIIIa) por desprotección del grupo funcional tiol y rotura del enlace que une el compuesto al soporte sólido (Figuras 3 y 4 respectivamente).

En el caso en el que el oligonucleótido está modificado con uno o varios compuestos de tiol de tipo (Ia), después de la desprotección del grupo funcional tiol y del grupo funcional fosoramidita del compuesto (XIIa) con un tratamiento conocido por el experto en la materia, se obtiene el compuesto de fórmula (XIIc):



en la que,

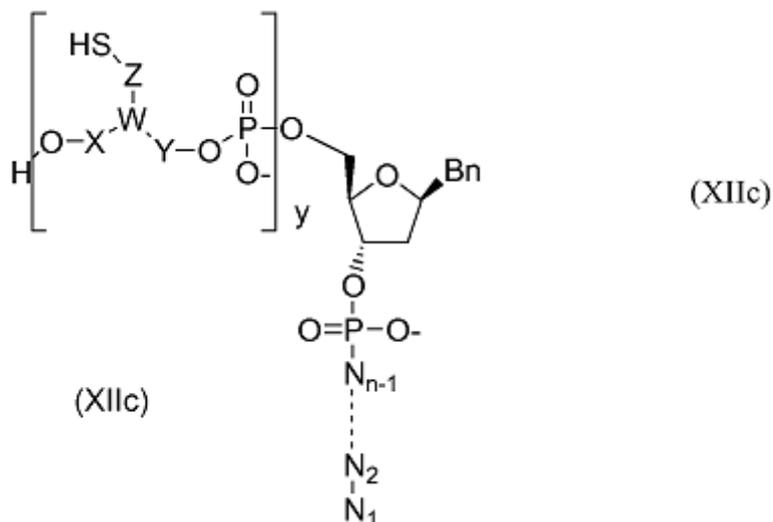
N_1, \dots, N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 M_1, \dots, M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,



n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 p representa 0 o 1,

y' es un número entero comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0.

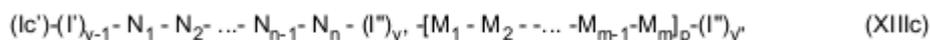
o en la fórmula desarrollada en el caso en el que p = 0:



en la que,

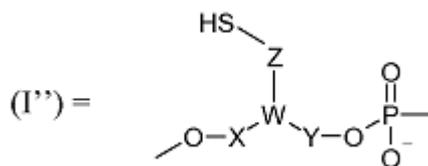
- 5 X, Y, W, Z tienen la misma definición que para el compuesto (I),
 N₁, ... N_n, n, y tienen la misma definición que para el compuesto (XIIa),
 Bn representa una base usada clásicamente en una cadena de nucleótidos.

10 En el caso en el que el oligonucleótido está modificado con uno o varios compuestos de tior de tipo (Ib), después de la desprotección del grupo funcional tior del compuesto (XIIIa) con un tratamiento conocido por el experto en la materia, se obtiene el compuesto de fórmula (XIIIc):



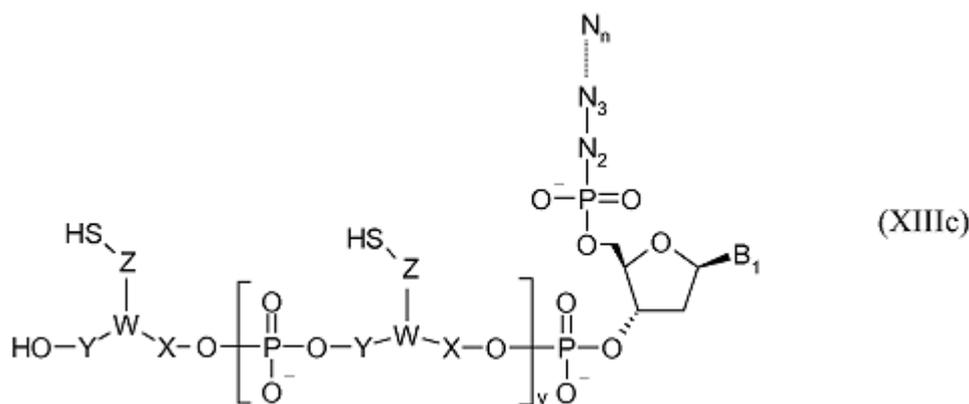
en la que,

- 15 N₁, ... N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 M₁, ... M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
 (lc') representa el compuesto obtenido a partir de (Ic) mediante rotura del enlace éster con el soporte sólido □,



- 20 n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
 y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
 y' es un número entero comprendido entre 0 y 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 comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0.

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



en la que,

- X, Y, W, Z tienen la misma definición que para el compuesto (I),
 N_2, \dots, N_n , n e y tienen la misma definición que para el compuesto (XIIa),
 Bn corresponde a una base usada clásicamente en una cadena de nucleótidos.

Durante la síntesis del oligonucleótido, el grupo funcional tiol está preferentemente protegido. De hecho, el grupo funcional tiol puede reaccionar con el grupo funcional fosoramidita entrante.

De acuerdo con un modo de realización, la etapa de desprotección de los grupos funcionales tiol y de eliminación del soporte sólido se realiza en una sola etapa de tratamiento del oligonucleótido modificado (XIIa) o (XIIIa).

- De acuerdo con un modo de realización, la eliminación del soporte sólido se realiza en una primera etapa y a continuación la desprotección de los grupos funcionales tiol se realiza en una segunda etapa.

El oligonucleótido final (XIIc) (respectivamente el oligonucleótido final (XIIIc)) se obtiene independientemente del compuesto de tiol de partida, ya sea a partir del compuesto (Ia) o del compuesto (Ib). De hecho, independientemente del monómero (Ia) o (Ib) usado, la unidad de monómero de tiol que resulta de la reacción de oligomerización corresponde al compuesto (I'') descrito anteriormente.

Los soportes injertados de fórmulas (XVI)_k de acuerdo con la invención permiten comenzar la síntesis de oligonucleótidos. En particular se puede considerar la preparación de soportes sólidos injertados con secuencias de oligómeros de manera industrial o semiindustrial que se usarán como secuencia de politiol en la posición 3' de un oligonucleótido.

20 Kit de síntesis

Un soporte sólido de este tipo injertado con un primer oligómero (Ic) - (I')_k se puede usar de forma ventajosa en un kit de síntesis de oligonucleótidos modificados. En un kit de este tipo, se puede asociar con un soporte que comprende zonas de recepción tales como los pocillos de una placa de múltiples pocillos en los que las reacciones de síntesis se realizan con procedimientos tales como los que se conocen para la realización de reacciones de oligomerización de nucleótidos.

Dispositivo automatizado

Un kit de este tipo se puede usar en un dispositivo automatizado para la síntesis de oligonucleótidos. En este caso, un dispositivo de este tipo comprende al menos

- recipientes distintos que contienen:

- nucleótidos,
 - activadores de acoplamiento y
 - productos de lavado,
- medios mecánicos de extracción y distribución de muestras de productos, así como medios informáticos que permiten la realización controlada de estos medios mecánicos, así como:
- al menos un recipiente en el que se coloca un soporte sólido injertado con un oligómero (XVI)_k de los compuestos (I) tal como se ha descrito anteriormente, y/o al menos un recipiente que contiene un compuesto (Ia) o un compuesto (Ib).

Un dispositivo automatizado de este tipo también comprende medios mecánicos de toma de muestras en los diferentes recipientes y medios de distribución de estas muestras en el recipiente que comprende el soporte sólido.

Los medios de este tipo pueden consistir en un conjunto de tubos de circulación de fluidos y válvulas, colocados opcionalmente en circuitos microfluidizados, o en brazos articulados equipados con pipetas de extracción. El dispositivo tema de estado tamil comprende medios informáticos (programas) que permiten la realización controlada de estos medios mecánicos, permitiendo la realización de reacciones secuenciadas.

5 Funcionalización de superficie

Los oligonucleótidos modificados de acuerdo con la invención se pueden depositar sobre un sustrato con el fin de funcionalizar la superficie de este sustrato. El sustrato puede ser metálico o bien de polímero.

De acuerdo con un modo de realización, el sustrato es metálico, por ejemplo de cobre o de titanio, y está revestido parcialmente o en toda su superficie con una película de oro o de platino, preferentemente de oro.

10 De acuerdo con otro modo de realización, el sustrato de polímero, por ejemplo de poliestireno, está injertado con grupos funcionales alquenilo o alquinilo o bromoacetamida o yodoacetamida.

De acuerdo con un modo de realización, el sustrato de polímero es un polímero conductor.

De acuerdo con un modo de realización, los grupos funcionales alquenilo o alquinilo se activan con un el grupo funcional carbonilo en alfa, preferentemente los grupos funcionales alquenilo o alquinilo se eligen entre los grupos maleimida, acrilamida, yodoacetamido o bromoacetamido, 2-propinamida o N-alquil-2-propinamida.

15 Por ejemplo, el sustrato puede comprender zonas de recepción revestidas con una película de oro o de platino por revestidas con grupos funcionales alquenilo o alquinilo, tales como grupos funcionales maleimida o acrilamida sobre los que se deposita el oligonucleótido modificado.

Como se ilustra en la figura 13a, en la que el compuesto gpt - SH representa el oligonucleótido modificado (XIIc) o el oligonucleótido modificado (XIIIc) de acuerdo con la invención, el grupo funcional tiol reacciona con el doble enlace carbono-carbono o el triple enlace carbono-carbono activada con un el grupo funcional carbonilo en alfa. Desde la parte alta hacia la parte baja de la figura 13a, la primera reacción de funcionalización corresponde una superficie injertada con maleimida, la segunda reacción corresponde a una superficie injertada con acrilamida, la tercera reacción corresponde a una superficie injertada con yodoacetamido o bromoacetamido y la cuarta reacción

20 corresponde a una superficie injertada con 2-propinamida realizada en el caso de un oligonucleótido (XIIc) o (XIIIc) modificado con dos compuestos de tiol de acuerdo con la invención.

En el caso de la figura 13b, la superficie esta injertada con grupos alquenilo (1ª reacción) y alquinilo (2ª reacción) no activados. La reacción entre el grupo funcional tiol del oligonucleótido modificado (XIIc) o (XIIIc) se realiza con la ayuda de una activación luminosa ($\lambda = 265 \text{ nm}$). La primera reacción de funcionalización se realiza con la ayuda de un oligonucleótido modificado de monotiol que se representa esquemáticamente mediante gpt - SH y la segunda reacción se realiza con la ayuda de un oligonucleótido modificado de ditio.

30 En el caso en el que soportes de injertado con grupos funcionales alquinilo, la funcionalización de la superficie con un oligonucleótido modificado de politiol es muy interesante ya que conduce a una estructura cíclica gracias a los reacciones sucesivas entre un primer el grupo funcional tiol y el grupo funcional -ino en una primera etapa y a continuación entre un segundo grupo funcional tiol y el grupo funcional -eno resultante en una segunda etapa (figuras 13a y 13b).

De acuerdo con un modo de realización preferente, el sustrato está injertado con grupos maleimida o acrilamida.

35 Por lo tanto, la invención permite por ejemplo con qué analizar una superficie de oro mediante la creación de un enlace o enlaces de oro-azufre entre la superficie del sustrato y el oligonucleótido modificado o bien funcionalizado una superficie injertada con grupos funcionales maleimida o acrilamida mediante la creación de un enlace o enlaces tioéter.

La fijación de los oligonucleótidos modificados a la superficie del sustrato se realiza por contacto de la superficie a tratar con una solución que comprende el oligonucleótido modificado, tal como los representados con las fórmulas (XIIc) y (XIIIc). Por lo general también se considera una o varias etapas posteriores de lavado y de secado. En general, la solución de oligonucleótidos modificados se encuentra en una concentración comprendida entre 0,10 μM y 500 μM , preferentemente entre 0,50 μM y 100 μM para la superficie de oro y entre 50 y 200 nM, preferentemente entre 75 nM y 150 nM para la maleimida o la acrilamida seguido de un lavado para eliminar lo que no ha reaccionado.

45 La presencia de varios átomos de azufre en el oligonucleótido permite crear varios enlaces de oro-azufre, o varios enlaces de tioéter, lo que permite estabilizar el oligonucleótido sobre la superficie.

De acuerdo con un modo de realización, el sustrato no es plano, por ejemplo, se encuentra en forma de micropartículas o nanopartículas. Los oligonucleótidos modificados de acuerdo con la invención se pueden insertar a continuación sobre estas micropartículas o nanopartículas. Preferentemente, estas partículas son magnéticas. De hecho, estas partículas magnéticas se pueden llevar a continuación fácilmente a la superficie de un electrodo o al

fondo de los pocillos de una microplaca, con fines de un ensayo de detección, mediante la aplicación de un imán.

Fijación a marcadores o ligandos

5 Los oligómeros de la presente invención también se pueden usar con el fin de unir marcadores o ligandos a moléculas o polímeros mediante uno o varios puntos de unión. Los marcadores o ligandos pueden ser, por ejemplo, marcadores enzimáticos, agentes cromógenos, fluorógenos, radiactivos, o quimioluminiscentes, metales, iones metálicos, hormonas, proteínas, péptidos, sacáridos, oligosacáridos, agentes nucleolíticos o proteolíticos, agentes de enlace, tales como una biotina, un antígeno, un hapteno, un anticuerpo o un receptor. Los marcadores o ligandos pueden ser todos estos compuestos de interés biológico que pueden influir en el transporte de los oligonucleótidos a través de las membranas biológicas y/o que pueden modificar la solubilidad de los oligonucleótidos.

10 Kits de ensayo

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

15 Por lo tanto, el kit de ensayo se puede usar para el cribado de moléculas biológicamente activas o para ensayos de diagnóstico o secuenciación. Se puede considerar que el kit de diagnóstico comprenda varias zonas de recepción distintas, sobre las que se deposita un soporte sólido injertado con oligonucleótidos idénticos o distintos. Por ejemplo, los soportes sólidos injertados con oligonucleótidos idénticos o distintos se pueden colocar en zonas de recepción distintas de un sustrato revestido con una película de oro o de un sustrato injertado con grupos funcionales que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o 20 grupos funcionales halogenoacetamida, preferentemente grupos funcionales maleimida o acrilamida con el fin de formar un soporte de ensayo y/o de diagnóstico.

En particular, el soporte puede ser un electrodo de oro. El kit de ensayo puede comprender una celda electroquímica que comprende un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. El electrodo de trabajo puede ser de oro y el contraelectrodo de platino y el electrodo de referencia de plata. El estudio de la interacción de 25 un oligonucleótido modificado con una molécula a someter a ensayo puede comprender una etapa de voltamperometría cíclica.

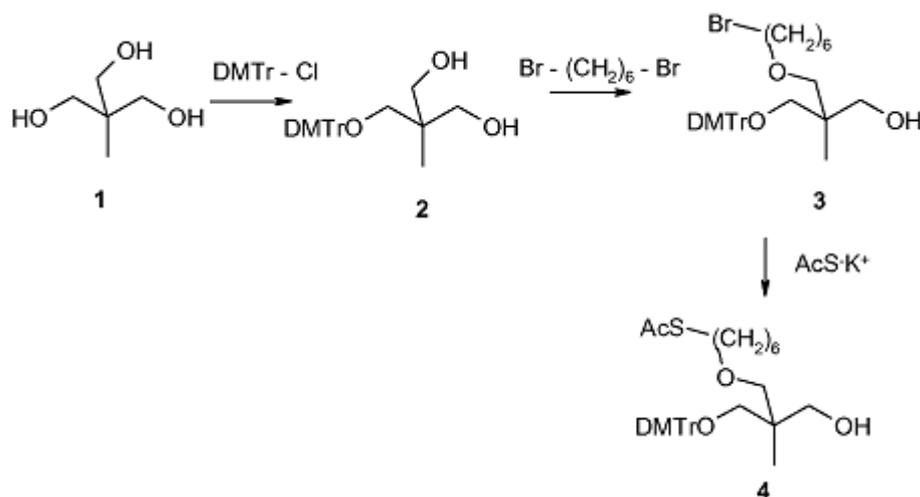
El injerto con grupos funcionales alquénilo, alquinilo o halogenoacetamida, tales como maleimida o acrilamida, se puede usar, por ejemplo, para aplicaciones en el campo del diagnóstico en formato microplaca y/o para la realización de ensayos de tipo ELOSA (« Enzyme-Linked OligoSorbent Assay » en inglés o « dosage d'oligoadsorption par enzyme liée » en francés). En el transcurso de este tipo de ensayo, la superficie de los pocillos se injerta con grupos 30 funcionales alquénilo, alquinilo o halogenoacetamida, tal como grupos funcionales maleimida o acrilamida. A continuación, la superficie se pone en contacto con oligonucleótidos modificados de acuerdo con la invención. Por lo tanto, se forman uno o varios enlaces tioéter gracias a la presencia de uno o varios compuestos de tiol de acuerdo con la invención sobre los oligonucleótidos. A continuación, el ensayo consiste en la puesta en contacto de una muestra a someter a ensayo con los pocillos funcionalizados de ese modo, para medir en particular la hibridación de 35 los oligonucleótidos. La medición se puede realizar por ejemplo mediante fluorescencia gracias a un etiquetado de las cadenas de oligonucleótidos.

Ejemplos

40 En los ejemplos, por « sonda » se hace referencia a una cadena de oligonucleótidos que comprende al menos un compuesto de tiol de acuerdo con la invención destinado a ser inmovilizado sobre una superficie.

Por « diana » se hace referencia a una cadena de oligonucleótidos destinada a su hibridación con una sonda, por ejemplo, durante un ensayo de diagnóstico.

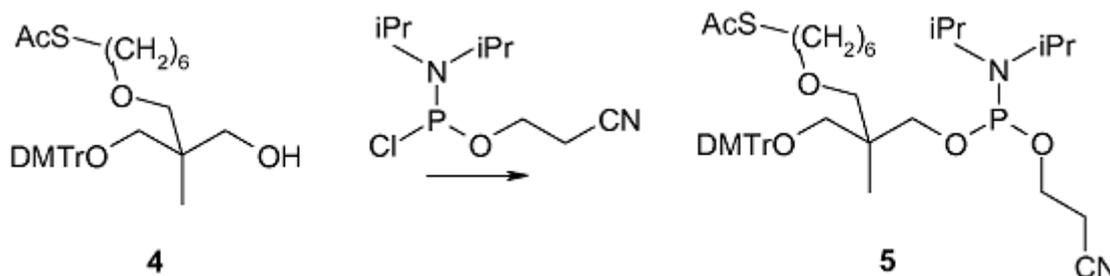
Síntesis del compuesto 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetilthiohexiloximetil)-2-metilpropano-1,3-diol 4



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

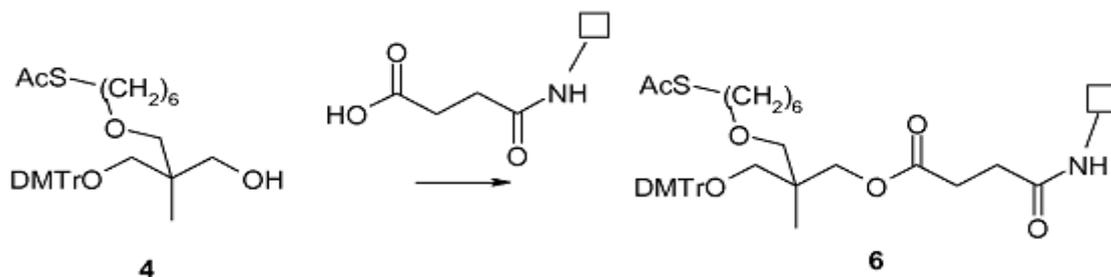
- 5 A una solución de 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-bromohexiloximetil)-2-metil-1,3-propanodiol **3**, (556 mg, 0,95 mmol) y tioacetato de potasio (162 mg, 1,42 mmol) en tolueno anhidro (10 ml) se añade el éter corona 18-6 (70 mg, 0,26 mmol). La mezcla se agita magnéticamente 2 horas a 50 °C. Después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

- 10 Síntesis del 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetilthiohexiloximetil)-2-metil-3-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidita)-propano-1,3-diol **5**



- 15 A una solución de 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetilthiohexiloximetil)-2-metilpropano-1,3-diol **4** (413 mg, 0,71 mmol) y diisopropiletilamina (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 adición de 500 µl de agua y a continuación la mezcla se diluye con diclorometano (150 ml). La fase orgánica se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (100 ml), a continuación se seca sobre Na₂SO₄. Después de evaporación, el producto en bruto se purifica mediante cromatografía sobre sílice (de un 0 a un 30 % de acetato de etilo en ciclohexano) que contiene un 4 % de trietilamina) conduciendo al compuesto **5** deseado en forma de un aceite incoloro (400 mg, 72 %).

Síntesis del soporte sólido de tiol **6**



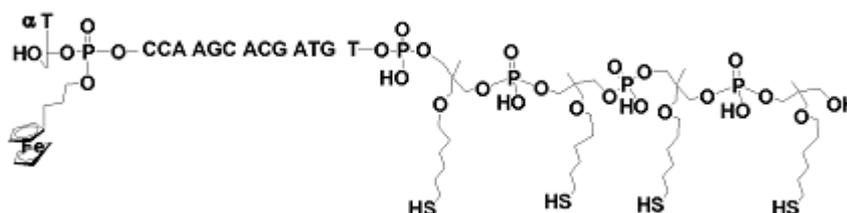
5 En un tubo esmerilado, 1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(6-S-acetilthiohexiloximetil)-2-metil-1,3-propanodiol **4** (178 mg, 0,3 mmol) y dimetilaminopiridina (DMAP 36 mg, 0,3 mmol) se coevaporan con 3 ml de piridina anhidra. A continuación se añade succinil-alquilamina de cadena larga -CPG (Vidrio de Poro Controlado) (1 g), piridina anhidra (5 ml), trietilamina anhidra (160 ml, 1,2 mmol) y etildimetilaminopropil carbodiimida (EDC, 280 mg, 2,0 mmol). A continuación se aclara con 1 ml de piridina anhidra. La mezcla se agita durante una noche.

La mezcla se filtra y se lava con CH_2Cl_2 (10 ml) y a continuación se seca en el desecador. El compuesto de tiol sobre 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 se lava con CH_2Cl_2 (10 ml) y a continuación se seca en el desecador para dar el soporte sólido de tiol **6** (940 mg) con una funcionalización de 29 $\mu\text{mol/g}$.

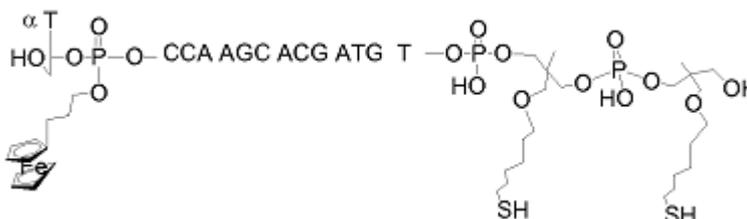
10 Preparación de oligonucleótidos modificados

Tres oligonucleótidos que comprenden un grupo ferroceno en la posición 5' y un número creciente de compuestos de tiol de tipo (Ia) de acuerdo con la invención (1, 2 y 4 compuestos de tiol) se sintetizaron en un sintetizador de ADN. El grupo ferroceno se usó con el fin de visualizar la inmovilización del oligonucleótido sobre la superficie de oro mediante voltamperometría cíclica. Uno, dos o cuatro grupos de tiol se introdujeron sobre un soporte sólido de tipo propanodiol y la secuencia de ADN, SEQ ID NO: 3, se injertó. Por último, una fosforamidita alfa-timidina portadora de un grupo ferroceno se introdujo en la posición 5' del oligonucleótido modificado. La desprotección que sigue a continuación se realiza en dos etapas. En primer lugar, el medio se trata con un 10 % de piperidina en acetonitrilo durante 10 minutos con el fin de eliminar el grupo cianoetilo mediante una beta-eliminación el acetonitrilo resultante se elimina del medio mediante un lavado en acetonitrilo. A continuación, un tratamiento con hidróxido de amonio concentrado permite eliminar los grupos protectores de acilo sobre las nucleobases y sobre los grupos funcionales tiol y permite hidrolizar la rama de enlace succinilo (soporte sólido). Este protocolo permite evitar la adición de Michael entre los grupos funcionales tiol desprotegidos y el acrilonitrilo. Después de la evaporación, el oligonucleótido modificado no soportado se purifica mediante cromatografía de HPLC en fase inversa sobre columna C18.

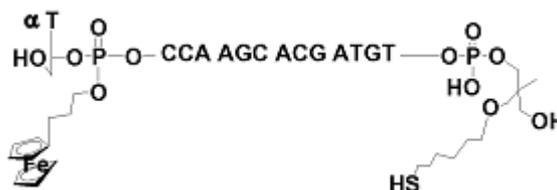
25 Tetratiol (oligonucleótido modificado con 4 compuestos de tiol)



Ditiol (oligonucleótido modificado con 2 compuestos de tiol)



Monotiol (oligonucleótido modificado con 1 compuesto de tiol)



30

Injerto y estudio de estabilidad de los oligonucleótidos modificados (tetratiol, ditiol y monotiol)

Para este estudio se usó un potenciostato de múltiples vías VMP3 Biologic (Biologic Science Instruments, Pont de Claix). Los resultados se registraron con la ayuda del software informático EC-Lab de Biologic Science Instruments.

La celda electroquímica está formada por un electrodo de oro de 0,28 cm^2 de superficie, un contraelectrodo de

platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Etapa 1: Reducción de los grupos tiol

5 4 nmoles de ODN-tiol (oligonucleótidos modificados con uno o varios compuestos de tiol) se reducen en una solución de clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, HCL, Sigma-Aldrich) (160 mM) es decir, una concentración en la solución de 20 mM de TCEP,HCl, a 20 °C, durante 2 h en atmósfera de argón.

El ODN se purifica mediante dos diluciones/centrifugaciones con una solución de TCEP, HCl 20 mM desgasificado sobre filtros amicon YM3000 (Millipore) 15 min a 14000 rcf (rcf = Fuerza Centrífuga Relativa). Después de dilución en 450 µl de tampón fosfato 100 mM desgasificado, el medio se centrifuga de nuevo sobre filtros amicon YM3000, 30 min, 14000 rcf.

10 Se obtiene una solución de injerto que contiene 4 nmoles de ODN, 90 mM en fosfato de sodio, 2 mM en TCEP, HCl.

Etapa 2: Activación del electrodo de oro

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

15 Por último, la activación básica del electrodo consiste en limpiar el oro de la superficie mediante la producción de hidrógeno en el electrodo mediante hidrólisis de agua en sosa 0,5 M en los potenciales negativos (-1,4 V con respecto a Ag/AgCl) durante varios ciclos.

Etapa 3: Injerto de la sonda

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

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

La superficie se pasiva con una solución de mercaptopropanol 1 mM durante 30 minutos, después del aclarado la celda se pone en el electrolito de análisis durante 2 h con el fin de estabilizar la capa injertada.

25 *Etapa 4: Análisis de la estabilidad de los compuestos injertados en la superficie*

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

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

La operación se repite tantas veces como sea necesario.

Resultados

35 Se realizó una comparación de la tasa de injerto de los 3 oligonucleótidos modificados con compuestos de tiol (tetra tiol, ditiol y monotioli). La tasa de injerto se determinó mediante integración del pico de oxidación del ferroceno. De hecho, la carga electrónica transferida está relacionada directamente con el número de ferrocenos presentes en la superficie del electrodo, y por lo tanto con el número de sondas injertadas sobre el oro.

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a la media de las tasas de injerto de 3 injertos diferentes para cada sonda.

	moléculas/cm ²
monotioli	5,21E+12
ditioli	5,81E+12
tetra tioli	1,40E+12

40

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

Las tasas de injerto para monotiol y ditiol son bastante comparables, los inventores pueden observar un injerto menos importante del tetratiol debido probablemente al volumen más importante de acuerdo con el número de ramas de tiol. A pesar de esta diferencia, la tasa de injerto del tetratiol sigue siendo importante y es muy reproducible.

- 5 Un estudio de estabilidad de los 3 oligonucleótidos modificados con compuestos de tiol con respecto a la temperatura se realizó en agua destilada desgasificada. La evolución de la respuesta electroquímica se siguió mediante voltamperometría cíclica. El porcentaje de disminución de la intensidad de oxidación del Ferroceno se calcula con respecto a la señal obtenida después de estabilización.

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

- 10 La molécula de tetratiol es muy estable con respecto a tratamientos sucesivos en agua a 60 °C (figura 6). De hecho, después de 5 veces durante un minuto de este tratamiento, queda un 97 % de la señal de partida, a diferencia del monotiol (70 % de señal de partida) y ditiol (62 % de señal de partida).

- 15 A 80 °C, la pérdida de señal es más importante (figura 7). Después de cinco tratamientos sucesivos de un minuto, todavía se puede cuantificar un 83 % de la señal de partida para el tetratiol. Por lo tanto, la estabilidad del tetratiol es bastante superior a la del monotiol (45 % de señal residual) y la del ditiol (18 % de señal residual).

- 20 Este estudio muestra el aumento notable de estabilidad del injerto de tiol sobre oro mediante el uso de un oligonucleótido modificado con 4 compuestos de tiol (tetratiol), en comparación con el injerto de un monotiol o de un ditiol. La falta de estabilidad de este último ditiol se puede explicar mediante una posible competición entre el injerto sobre oro y el cierre del ciclo para reformar el puente disulfuro intramolecular. Por lo tanto, parece preferente mantener un número de cuatro tioles sobre la rama de injerto para asegurar una buena estabilidad con respecto a la temperatura.

Aplicación: detección de la presencia del Virus de la Hepatitis C

Muestras diana a someter a ensayo

- 1) Dianas naturales: amplicones de VHC (+)

- 25 Toma de muestras: las muestras de plasma obtenidas de donantes de sangre que dieron positivo para la presencia del Virus de la Hepatitis C (VHC) a escala nacional se analizan mediante secuenciación.

- Amplificación del ARN viral: Se producen amplicones de VHC de 401 pb en la región viral NS5b mediante RT-PCR a partir de las muestras de plasma descritas anteriormente. El ARN se extrae a partir de 200 µl de plasma humano usando el kit de Ácido Nucleico Viral de Alta Pureza (Roche) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ARN se eluyó en 50 µl de agua estéril (sin DNasa/RNasa). Con el fin de realizar una etapa de retro-transcripción (RT), se desnaturalizaron 11 µl de ARN a 72 °C durante 10 minutos y se retro-transcribieron en presencia de 4 µl de 5X de Tampón de Primera Hebra (Invitrogen), 2 µl de 10X de Mezcla de Hexanucleótidos (Roche), 2 µl de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen) y 200 U de Transcriptasa Inversa SuperScript® II (Invitrogen). Las condiciones de retro-transcripción son las siguientes: 10 min a 23 °C, 45 min a 37 °C, y 10 min a 95 °C. a continuación se amplificaron cinco microlitros de ADNc por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando los cebadores « VHCsentido biotinilado » (SEQ ID NO: 1 [Btn] Tgg ggA TCC CgT Atg ATA CCC gCT gCT TTg A) y « VHCanti-sentido » (SEQ ID NO: 2 ggC ggA ATT CCT ggT CAT AgC CTC CgT gAA) (véase Catherine Tamalet, Philippe Colson, Hervé Tissot-Dupont, Mireille Henry, Christian Tourres, Natacha Tivoli, Danielle Botta, Isabelle Ravaux, Isabelle Poizot-Martin y Nouara Yahy. 2003, Journal of Medical Virology 71: 391-398) en 50 µl de mezcla de reacción: 1X Tampón para PCR sin MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µM de cada cebador, MgCl₂ 1,5 mM (Invitrogen), mezcla de dNTP 0,2 mM (Invitrogen) y 1,3 U Taq Polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de PCR son las siguientes: 5 min a 95 °C, 40 ciclos (desnaturalización: 40 seg, 95 °C; hibridación: 40 seg, 56 °C; elongación: 50 seg, 72 °C), y una extensión final de 10 min a 72 °C.

- 45 Los amplicones de VHC obtenidos se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa, se toman alícuotas y se conservan a -20 °C antes de su uso.

- 2) Dianas sintéticas: oligonucleótidos biotinilados

Se sintetizaron oligonucleótidos de 15-meros biotinilados en el extremo en la posición 5'. Estos oligonucleótidos son estrictamente complementarios con las sondas de VHC elegidas como sigue a continuación.

Diseño de las sondas de oligonucleótidos para el reconocimiento de secuencias de VHC.

- 50 La región NS5b del VHC se tomó como diana para el diseño de las sondas de oligonucleótidos.

Las secuencias de los genomas de VHC amplificadas en la región NS5b (banco de 800 muestras) se analizaron con la ayuda de los programas informáticos de alineamiento clustalW2 y de filogenia Mega5 con el fin de identificar las zonas más conservadas. Se seleccionó una región muy conservada que permite la amplificación específica de todos

los genomas de genotipo viral 1a1b así como una segunda región que permite la amplificación específica de los genomas de genotipo viral 3a. Se diseñaron dos sondas de 15-meros complementarias de cada una de estas regiones. A continuación, el diseño de las sondas 1a1b y 3a se usa para la síntesis de los oligonucleótidos de multi-tiol.

5 *Evaluación de las hibridaciones de sondas / dianas por ELOSA (Ensayo de OligoAbsorción Ligado a Enzimas)*

El injerto de cualquier tipo de sondas de tiol (oligonucleótidos con anomería alfa o beta, sondas lineales o estructuradas (por ejemplo tallo-lazo) se puede realizar de acuerdo con este protocolo optimizado después del lavado de los pocillos de microplacas activadas con maleimida (Pierce) con el tampón WB1 (Na_2HPO_4 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 en tampón BB (Na_2HPO_4 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, pH 7,2) durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). A continuación, los pocillos se lavan tres veces con WB1, se saturan con una solución de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Cisteína-HCl en BB (Pierce) durante 1 hora a TA, y se lavan de nuevo tres veces con WB1.

Los ensayos de hibridación se pueden realizar con las dianas sintéticas cortas de 15-meros o con amplicones reales de VHC largos (401 nucleótidos) descritos anteriormente. Las dianas sintéticas y los amplicones se diluyen en 150 μl de tampón de hibridación (TH: NaCl 0,9 M, NaH_2PO_4 60 mM, EDTA 6 mM, pH 7,4, Denhardt 5X) antes de su deposición en los pocillos. Una etapa complementaria de desnaturalización de 10 min a 95 °C se realiza 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, NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4, SDS al 0,1 %) tres veces durante 2 min a TA y una vez durante 30 min a 50 °C.

La etapa de detección se realiza después de incubación durante 30 min a TA de los pocillos en presencia de 100 μl /pocillo de Estreptavidina-Europio diluido en 100 μl de tampón de ensayo (« Tampón de Ensayo », Perkin Elmer). Por último, los pocillos se lavan seis veces con tampón WB3 (WB1X, Perkin Elmer) y se añaden 200 μl de tampón de amplificación (« Tampón de Amplificación », Perkin Elmer) en cada pocillo durante 5 min a TA. La fluorescencia en tiempo resuelto se mide en un detector de múltiples etiquetas Victor3™ 1420 (« contador de múltiples etiquetas », Perkin Elmer) de acuerdo con el protocolo del fabricante (excitación a 340 nm y emisión a 615 nm).

El ensayo ELOSA se realizó con amplicones específicos del genotipo VHC 3a (diluciones a 1/10, 1/100 y 1/1000) y amplicones específicos del genotipo VHC 1a1b (y por lo tanto no específicos del genotipo 3a). El control de la hibridación se realiza con dianas sintéticas (15-meros) específicas del genotipo 3a (complementaria de la sonda), sometidas a ensayo a 1000 pM y 5 pM y dianas sintéticas específicas del genotipo 1a1b, sometidas a ensayo a 1000 pM.

El gráfico de la figura 8, que corresponde al ensayo de fluorescencia, ilustra los resultados del ensayo ELOSA y cuantifica la hibridación con la sonda de tetratiol que corresponde al genotipo VHC 3a. Los ensayos « control 1a1b » corresponden al ruido de fondo; por lo tanto los resultados « específicos 3a » deben superar el ruido de fondo para que el ensayo permita cuantificar la hibridación.

Estudio del efecto de la densidad de injerto

El mismo ensayo ELOSA se realizó modificando la concentración de la solución de sondas (monotiol, ditiol y tetratiol) para variarla de 1 nM a 100 nM. El ensayo ELOSA se realiza con las sondas 1a1b y 3a a de cadenas cortas (15-meros) y de cadenas medias (105-meros). Los ensayos realizados con las sondas específicas del genotipo 1a1b muestran una especificidad de hibridación muy buena con las dianas específicas 1a1b y ninguna hibridación con las dianas no complementarias del genotipo 3a.

La detección de la hibridación de sonda/diana se realiza mediante fluorescencia como se ha mencionado anteriormente (figura 8).

Los resultados para cada tipo de sonda (monotiol, ditiol y tetratiol) se representan en los gráficos de las figuras 9, 10 y 11. El control TH corresponde a un ensayo realizado en los pocillos pero sin la presencia de las sondas. También se sometieron a ensayo otras sondas (que comprenden 6 y 8 tioles) y se representan en la figura 14.

La figura 9 ilustra los resultados obtenidos para la sonda de monotiol, es decir, que comprende un solo compuesto de tiol de acuerdo con la invención. La sonda de monotiol no es eficaz para la detección de diana de 105-meros, siendo la señal para las dianas de 105-meros idéntica a la señal de control TH. Además, la figura 9 muestra también que la concentración de sonda usada para el injerto entre 10 nM y 100 nM no tiene ningún efecto sobre la eficacia de la hibridación, de hecho, no hay diferencia significativa entre el ensayo realizado con 10 nM de sondas y con el realizado con 100 nM de sondas. Por el contrario, el uso de una concentración de 1 nM en la sonda conlleva una reducción de la eficacia de la hibridación.

La figura 10 ilustra los resultados obtenidos para la sonda de ditiol, es decir, que comprende dos compuestos de tiol de acuerdo con la invención. Se desvela que la sonda de ditiol es poco eficaz para la detección de dianas de 105-meros, siendo observada una detección de la hibridación para una concentración de dianas 1a1b de 1000 pM.

Además, la figura 10 muestra que la densidad de injerto influye ligeramente en la detección de la hibridación. De hecho, la señal de fluorescencia es más importante cuando la concentración de las sondas pasa de 1 nM a 100 nM con poca diferencia entre 25 nM y 100 nM.

5 La figura 11 ilustra los resultados obtenidos para la sonda de tetratiol, es decir, que comprende cuatro compuestos de tiol de acuerdo con la invención. Se desvela que la sonda de ditiol es muy eficaz para la detección de dianas de 105-meros, la señal de fluorescencia es muy superior a la señal de fluorescencia del control TH, en particular para una concentración de dianas de 100 pM y 1000 pM. Además, la figura 11 muestra que la densidad de injerto influye en la detección de la hibridación para los 105-meros. De hecho, para una misma concentración de dianas, por ejemplo 1000 pM, la señal de fluorescencia es más importante cuando la concentración de las sondas es de 100 nM, con respecto a una concentración de las sondas de 1 nM. Este efecto, también denominado « dependencia de la dosis » es muy notable para la detección de dianas de 105-meros.

La figura 14 muestra que las sondas que comprenden 6 o 8 tioles proporcionan resultados de hibridación satisfactorios. De hecho, la señal de fluorescencia para estas dos sondas es similar a la de la sonda de tetratiol.

15 La figura 12 ilustra los resultados de un ensayo de hibridación realizado con la secuencia que permite la formación de genotipos 1a/1b de VHC. El ensayo se realiza a tres concentraciones de diana, 100 pM, 10 pM y 1 pM, con dianas sintéticas de 105 bases de longitud. El control negativo se realiza con la diana 3a no complementarias. La sonda de tetratiol 1a/1b se injerta en el electrodo de trabajo en superficie o de la celda electroquímica. La reacción de reconocimiento va seguida por voltametría de pulsos diferenciales. Los valores indicados en la ordenada corresponden a los valores normalizados de variación de corriente. Este ensayo mediante electroquímica es sensible y específico a una concentración de diana de 1 pM. La variación de la señal parece ser más fuerte que para el ensayo realizado a 100 pM. A mayor concentración de diana, un efecto de adsorción no específica de las dianas sobre la superficie del electrodo reduce la eficacia de la reacción de reconocimiento. La variación de la señal del ensayo realizado a 100 pM parece más baja que la observada para el ensayo a 1 pM. Este procedimiento electroquímico no permite un seguimiento cuantitativo de la reacción de hibridación. Sin embargo, proporciona una respuesta de sí/no específica de una gran sensibilidad.

Listado de secuencias

<110> Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) Establecimiento Francés de la Sangre (EFS) Universidad de Montpellier 1 Universidad Claude Bernard Lyon 1

<120> Compuestos de tiol y su uso para la síntesis de oligonucleótidos modificados

30 <130> 33336 CNRS

<160> 3

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 31

35 <212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..31

40 <223> /mol_tipo = "ADN" /nota = "Cebo de VHC sentido biotinilado" /organismo = "secuencias artificiales"

<400> 1

tgggatccc gtagatacc cgctgcttg a 31

<210> 2

<211> 30

45 <212> ADN

<213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..30

50 <223> /mol_tipo = "ADN" /nota = "Cebo de VHC anti-sentido" /organismo = "secuencias artificiales"

<400> 2

ggcggaattc ctggtcatag cctccgtgaa 30

<210> 3

ES 2 628 322 T3

<211> 13
<212> ADN
<213> secuencias artificiales

5 <220>
<221> fuente
<222> 1..13
<223> /mol_tipo = "ADN" /nota = "Ácido nucleico ensayo injerto" /organismo = "secuencias artificiales"

10 <400> 3
ccaagcacga tgt 13

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que responde a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

5 T es un grupo elegido entre -O-P(OR₁)N(R₂)₂, -O-PH(O)O-, -OC(O)JC(O)NH-□,

◦ R₁ se elige entre los grupos 2-cianoetilo, R'₁R'₂R'₃SiCH₂CH₂, y R'₁, R'₂, R'₃ idénticos o diferentes representan un grupo elegido entre los alquilos lineales o ramificados que comprenden de 1 a 12 átomos de carbono y los arilos en C6-C12,

10 ◦ R₂ se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados que comprenden de 1 a 12 átomos de carbono, pirrolidina,

◦ J se elige entre un enlace sencillo, un grupo -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂-, -CH₂OPhOCH₂- en el que Ph es un bencilo,

◦ □ representa un soporte sólido,

15 D es un grupo protector de alcoholes elegido entre 4,4'-dimetoxitritilo, 9-fenilxanten-9-ilo, fluorenilmetiloxycarbonilo y terc-butil-dimetilsililo,

W se elige entre los grupos CH, CCH₃, CCH₂CH₃, ciclohexanos tri-ilo, y bencenos triilo,

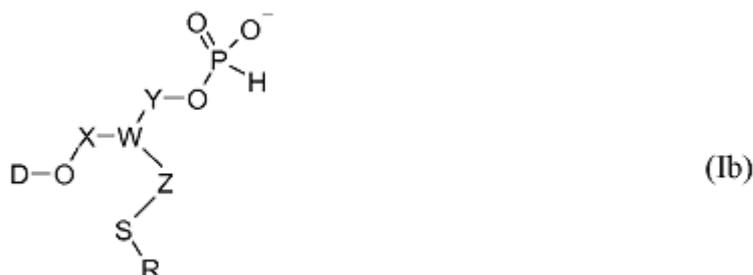
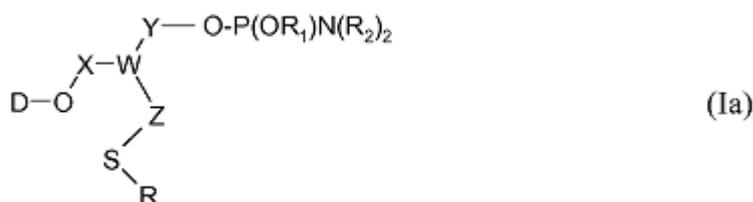
Z se elige entre los grupos alcoxi en C1-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12, NCO-alquilos en C1-C12, CON-alquilos en C1-C12,

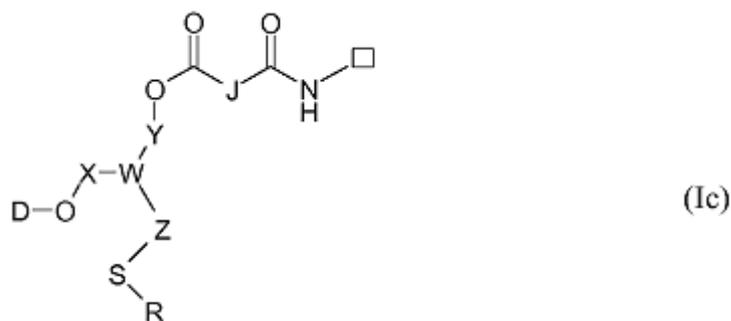
20 Y se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C12, aminoalquilos en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilos en C3-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12,

X se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C12, aminoalquilos en C1-C12, alcoxi en C1-C12, cicloalquilos en C3-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12,

25 R se elige entre los grupos acilo en C1-C12, S-alquilos en C1-C12, S-arilos en C6-C12, S-2-piridina, S-heteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C1-C12, S-cicloalquilos en C3-C12, S-cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12.

2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que responde a una de las siguientes fórmulas (Ia), (Ib) y (Ic):





3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que:

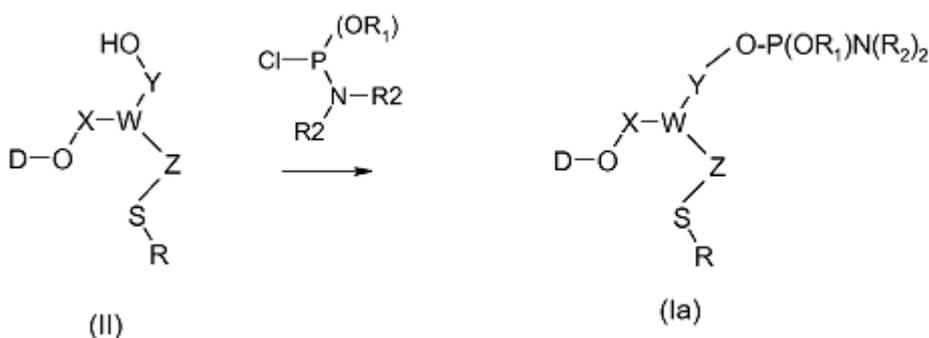
- D se elige entre 4,4'-dimetoxitritilo, 9-fenilxanten-9-ilo o Fluorenilmetiloxicarbonilo,
- W es un grupo elegido entre CH, CCH₃, CCH₂CH₃, ciclohexano tri-ilo y benceno tri-ilo; y/o
- Z se elige entre los grupos alcoxi en C1-C12, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C12, NCO-alquilos en C1-C12, CON-alquilos en C1-C12 ; y/o
- Y se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C6, aminoalquilos en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloalquilos en C3-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6 ; y/o
- X se elige entre los grupos alquilo lineales o ramificados en C1-C6, aminoalquilos en C1-C6, alcoxi en C1-C6, cicloalquilos en C3-C6, cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6 ; y/o
- R se elige entre los grupos acilo en C1-C6, S-alquilos en C1-C6, S-arilos en C6-C6, S-heteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C1-C6, S-cicloalquilos en C3-C6, S-cicloheteroalquilos oxigenados o nitrogenados en C3-C6, preferentemente R es un acilo en C1-C6.

4. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo T es un grupo -O-P(OR₁)N(R₂)₂ en el que R₂ es un grupo isopropilo y R₁ se elige entre los grupos 2-cianoetilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trifenilsilil)etilo, 2-(difenilmetsilil)etilo.

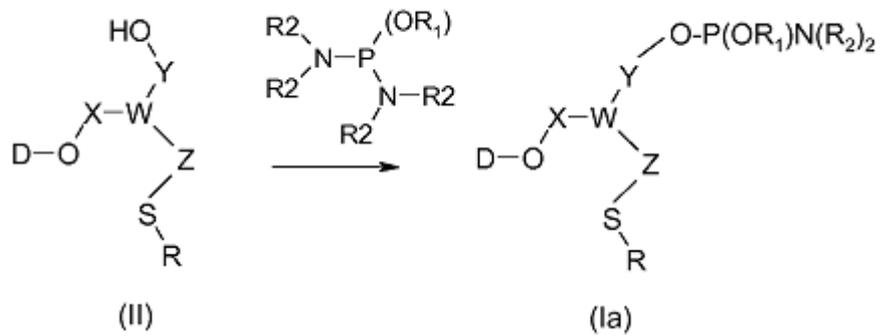
5. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo T es el grupo -OC(O)JC(O)NH-□ en el que □ es un soporte sólido elegido entre resinas, en particular entre las resinas a base de poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, perlas de vidrio, geles de sílice.

6. Procedimiento de fabricación de de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende al menos una etapa elegida entre las etapas siguientes:

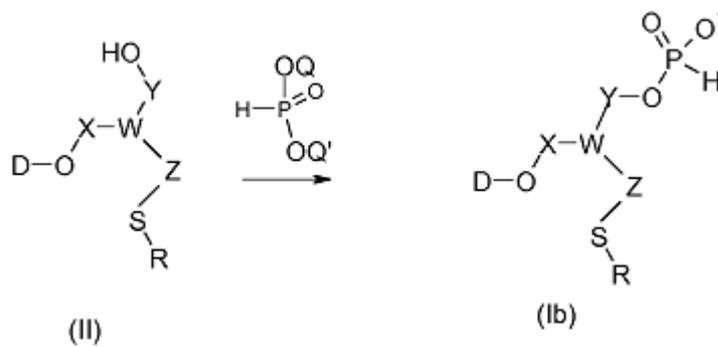
- preparación del compuesto (Ia) a partir del compuesto (II) de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



o de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:

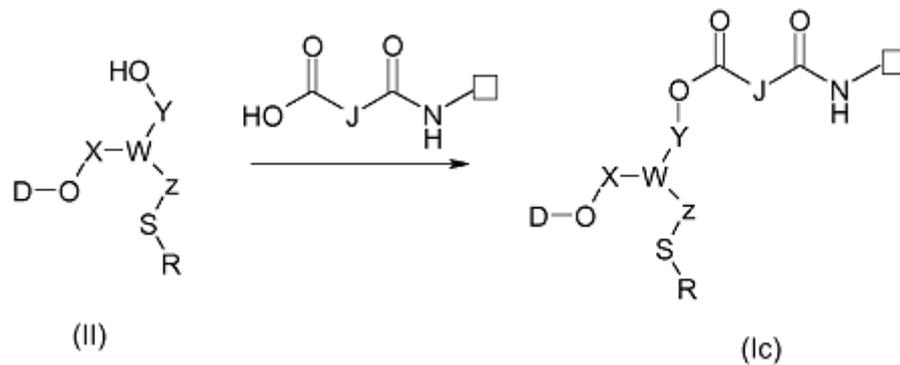


- preparación del compuesto (Ib) a partir del compuesto (II) de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:

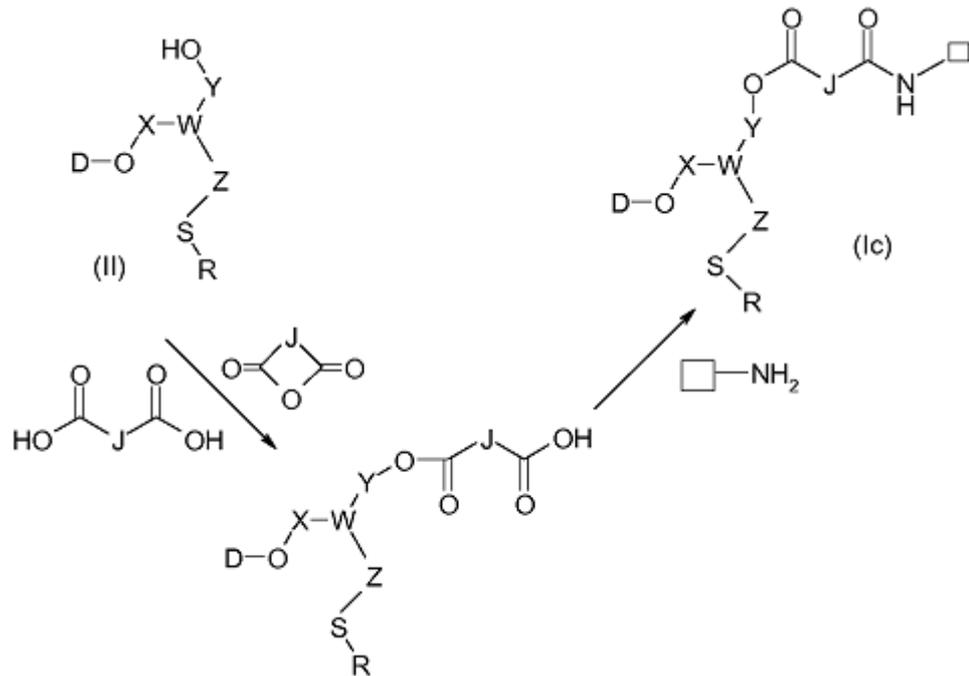


5 en la que Q y Q' representan, independientemente entre sí, un grupo benceno sustituido o no,

- preparación del compuesto (Ic) a partir del compuesto (II) de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



o de acuerdo con el esquema de síntesis siguiente:



D, X, Y, Z, W, R, □, R₁ y R₂ teniendo la misma definición en cada una de estas etapas que en las reivindicaciones 1 a 5.

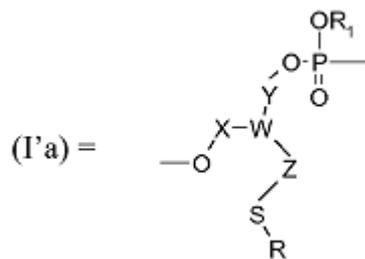
7. Oligómero susceptible de ser obtenido por oligomerización de un compuesto (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, que responde a la fórmula



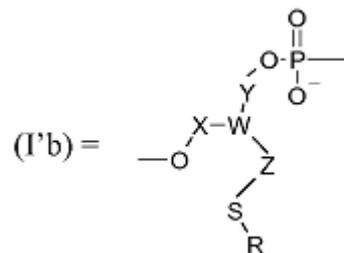
en la que:

(Ic) tiene el mismo significado que en las reivindicaciones 2 a 5, el grupo R del compuesto (Ic) además puede representar H.

k representa un número entero comprendido entre 1 y 12,
 Δ representa (I'a) o (I'b) en los que



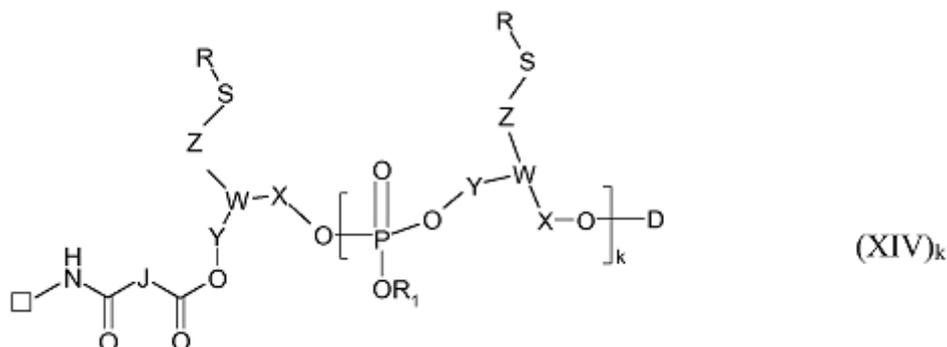
y



15 en las que, X, Y, W, Z, R, R₁ tienen la misma definición que en las reivindicaciones 1 a 5, R además puede

representar H.

8. Oligómero de acuerdo con la reivindicación 7, que responde a la fórmula (XIV)_k:



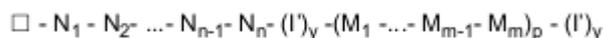
en la que,

- 5 □, D, X, Y, W, Z, R y R₁ tienen la misma definición que en las reivindicaciones 1 a 4, R además puede representar H y D además puede representar H, k es un número entero comprendido entre 1 y 11.

9. Procedimiento de preparación de un oligonucleótido modificado que comprende al menos:

- 10 - una etapa de injerto de un compuesto (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 sobre un oligonucleótido,
o
- una etapa de injerto de un nucleótido sobre un oligómero de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8.

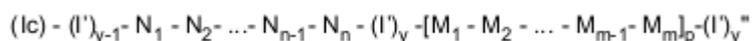
15 10. Oligonucleótido modificado susceptible de ser obtenido con el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 que responde a la fórmula (XIIa) siguiente:



en la que,

- 20 N₁, ... N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
M₁, ... M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
(I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b) tal como se definen en la reivindicación 7,
n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
p representa 0 o 1,
25 y' es un número entero comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 e, y' es igual a 0 si p vale 0,
□ representa un soporte sólido.

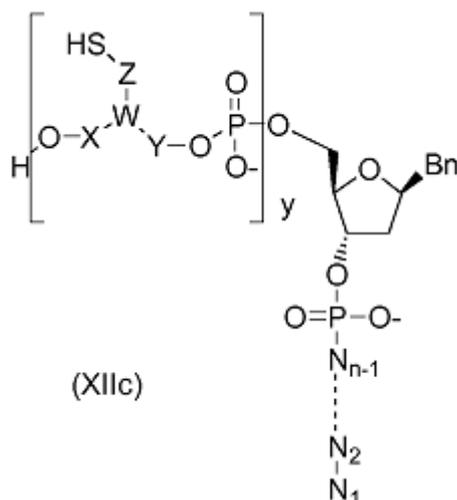
11. Oligonucleótido modificado susceptible de ser obtenido con el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 que responde a la fórmula (XIIIa) siguiente:



30 en la que,

- 35 N₁, ... N_n representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
M₁, ... M_m representan independientemente los unos de los otros un nucleótido,
(I') representa un compuesto de fórmula (I'a) o (I'b) tal como se definen en la reivindicación 7,
n es un número entero comprendido entre 1 y 100,
m es un número entero comprendido entre 1 y 100,
y es un número entero comprendido entre 1 y 12,
y' es un número entero comprendido entre 0 y 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 comprendido entre 0 y 12 si p vale 1 y, si p vale 0 entonces y'' vale 0.

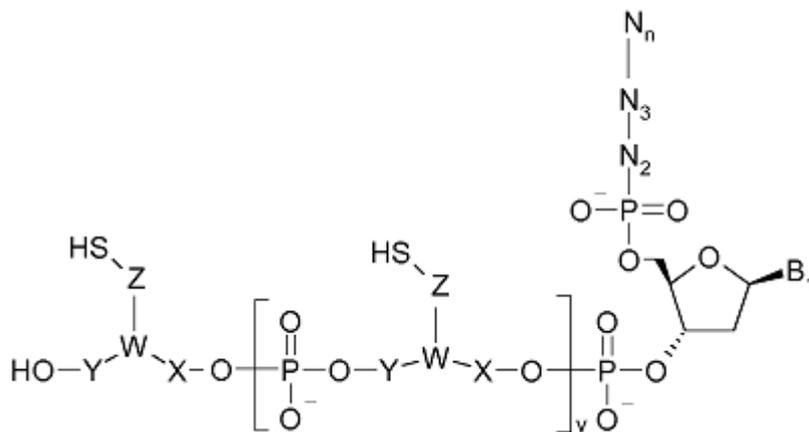
12. Oligonucleótido modificado de acuerdo con la reivindicación 10 que responde a la fórmula (XIIc):



en la que,

- 5 n, y, N₁, ... N_n ... N_{n-1} tienen la misma definición que en la reivindicación 8,
 X, Y, Z, W tienen la misma definición que en las reivindicaciones 1 a 4,
 Bn representa la base del n-ésimo nucleótido.

13. Oligonucleótido modificado de acuerdo con la reivindicación 11 que responde a la fórmula (XIIIc):



en la que,

- 10 n, y, N tienen la misma definición que en la reivindicación 9,
 X, Y, Z, W tienen la misma definición que en las reivindicaciones 1 a 4,
 B₁ representa la base del 1^{er} nucleótido.

14. Dispositivo automatizado para la síntesis de nucleótidos que comprende al menos:

- recipientes distintos que contienen:
 - 15 - nucleótidos,
 - activadores de acoplamiento y
 - productos de lavado,
- medios mecánicos de extracción y distribución de muestras de productos, así como medios informáticos que permiten la realización controlada de estos medios mecánicos, así como:
 - 20 • al menos un recipiente en el que se coloca un soporte sólido injertado con un oligómero de acuerdo con la reivindicación 7 o 8, y/o al menos un recipiente que contiene un compuesto (Ia) o un compuesto (Ib) de acuerdo con la reivindicación 2.

15. Sustrato injertado con al menos un oligonucleótido modificado de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 13, comprendiendo dicho sustrato al menos una zona de recepción revestida con una película de oro o de platino o injertado con grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o grupos halogenoacetamida, preferentemente grupos maleimida y/o acrilamida, siendo dicho sustrato de metal en el caso de la película de oro y de plástico en el caso del injerto con grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o grupos halogenoacetamida, preferentemente grupos maleimida y/o acrilamida.
- 5
16. Sustrato de acuerdo con la reivindicación precedente en el que el sustrato de metal es de cobre o de titanio y/o el sustrato de plástico es de poliestireno.
- 10
17. Kit de ensayo que comprende:
- al menos un sustrato que comprende al menos una zona de recepción revestida con una película metálica de oro o de platino o de un sustrato injertado con grupos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono o grupos halogenoacetamida, preferentemente grupos maleimida y/o acrilamida,
- 15
- al menos un oligonucleótido modificado de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 13.
18. Uso de un sustrato de acuerdo con la reivindicación 15 para realizar ensayos de afinidad entre un oligonucleótido y otra molécula.

Figura 1

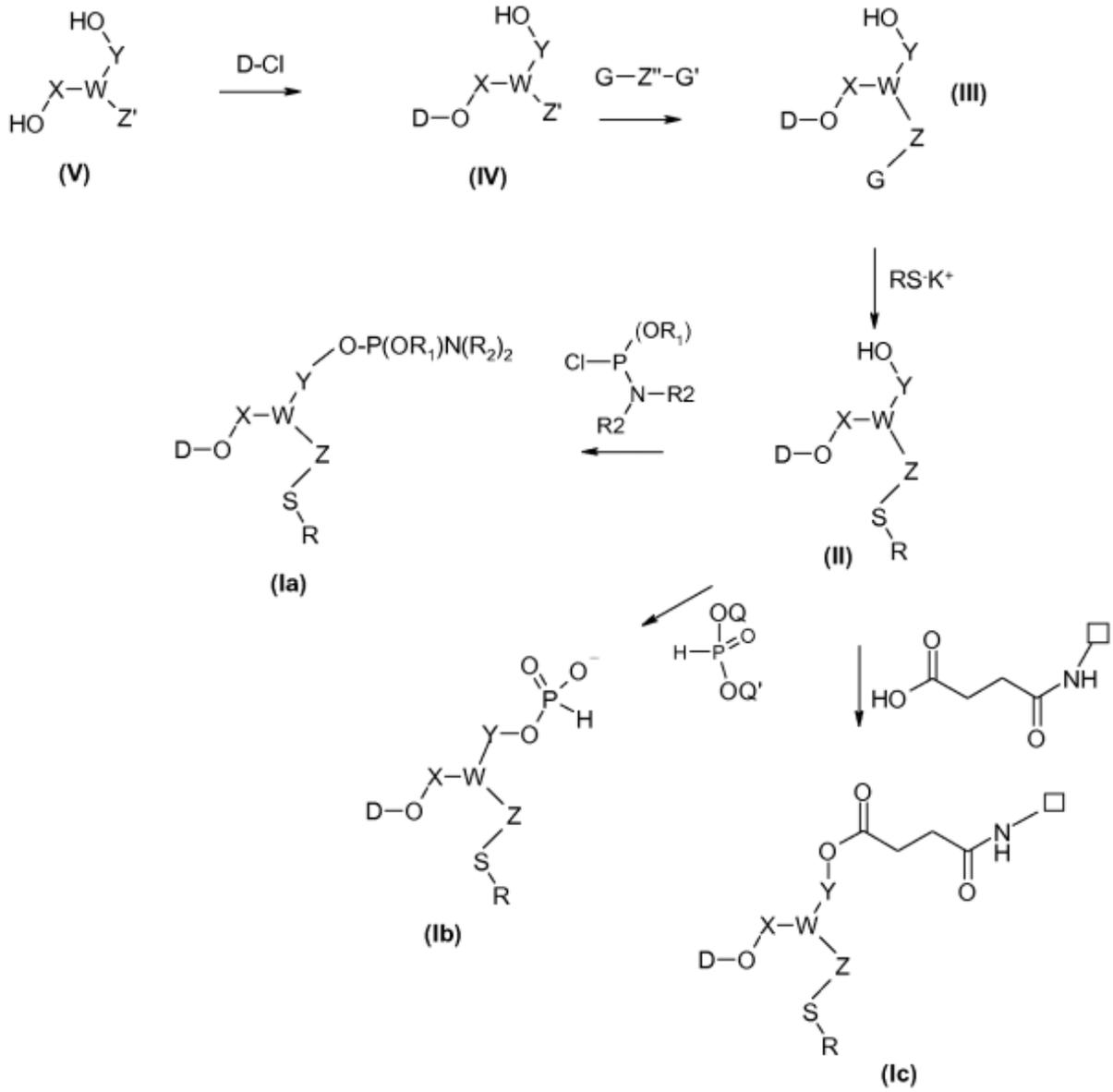


Figura 2A

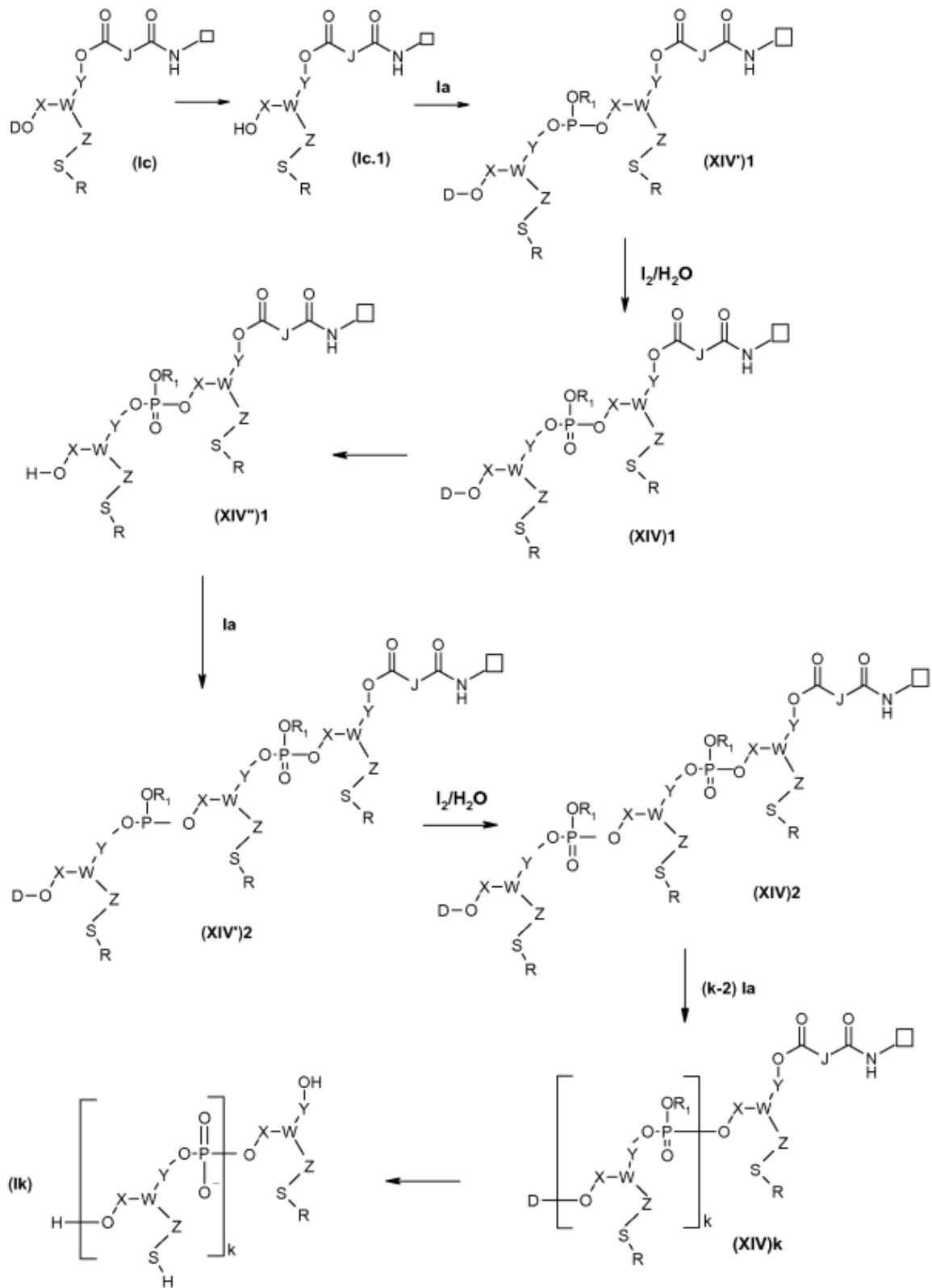


Figura 2B

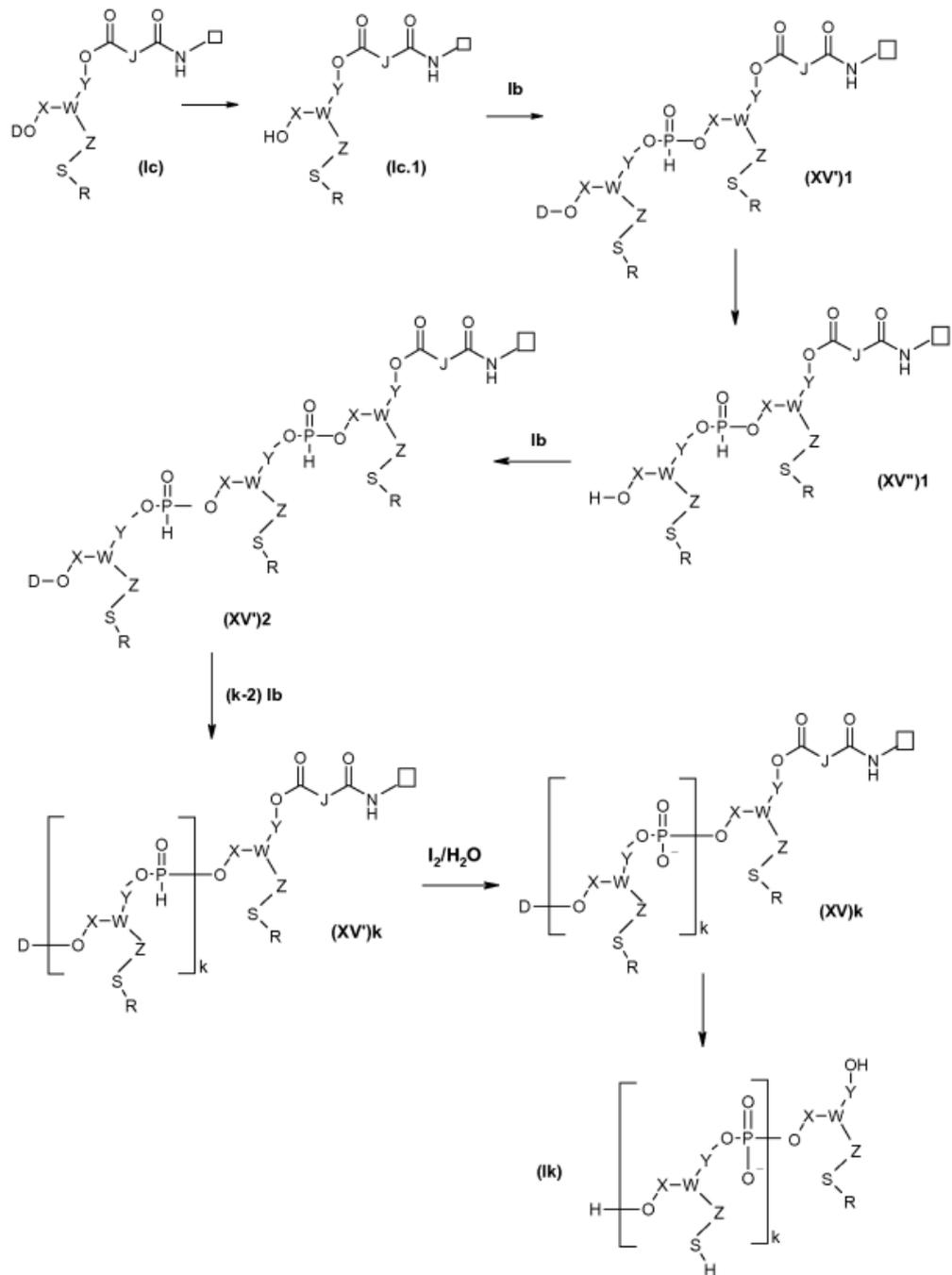


Figura 3

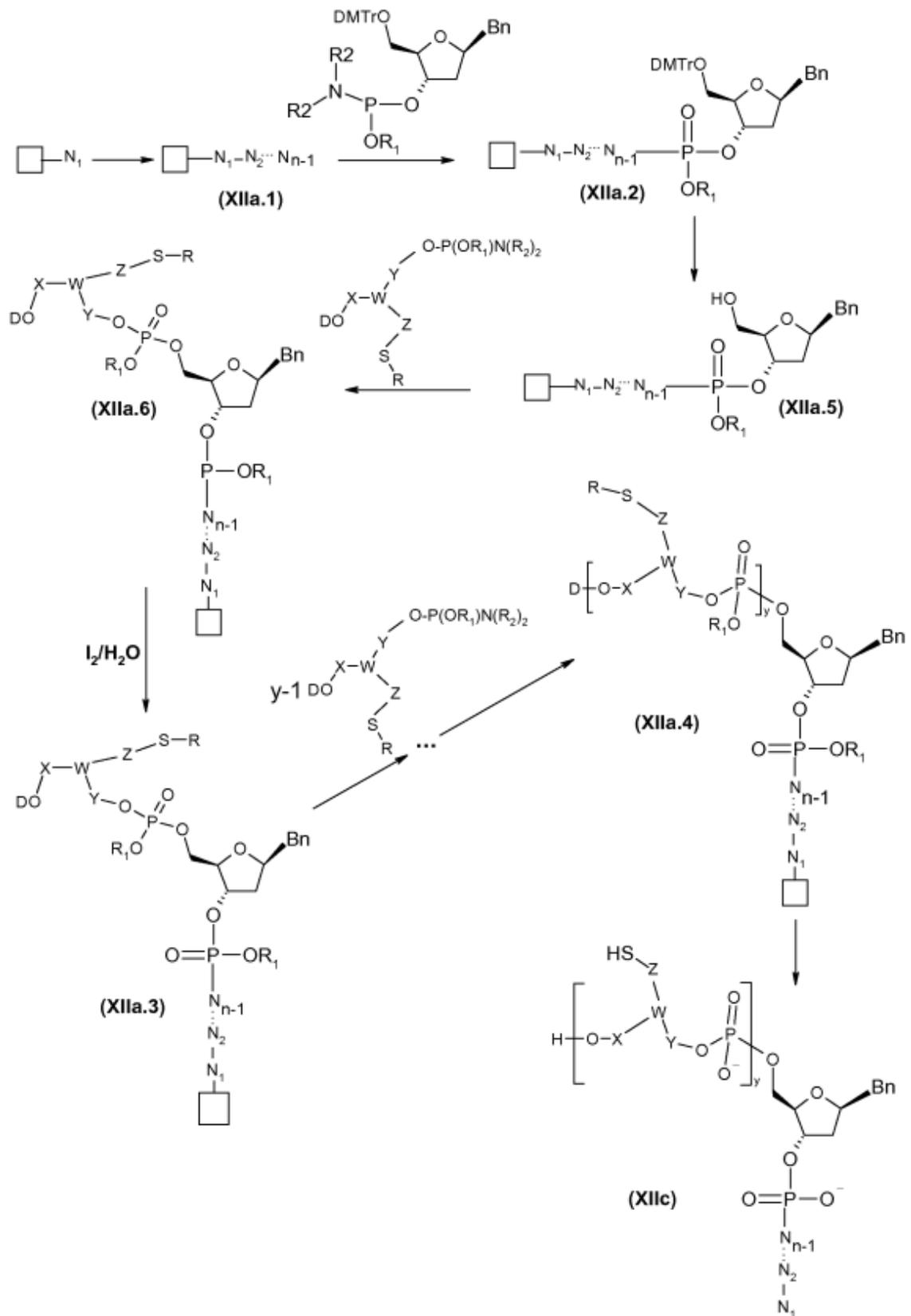


Figura 4

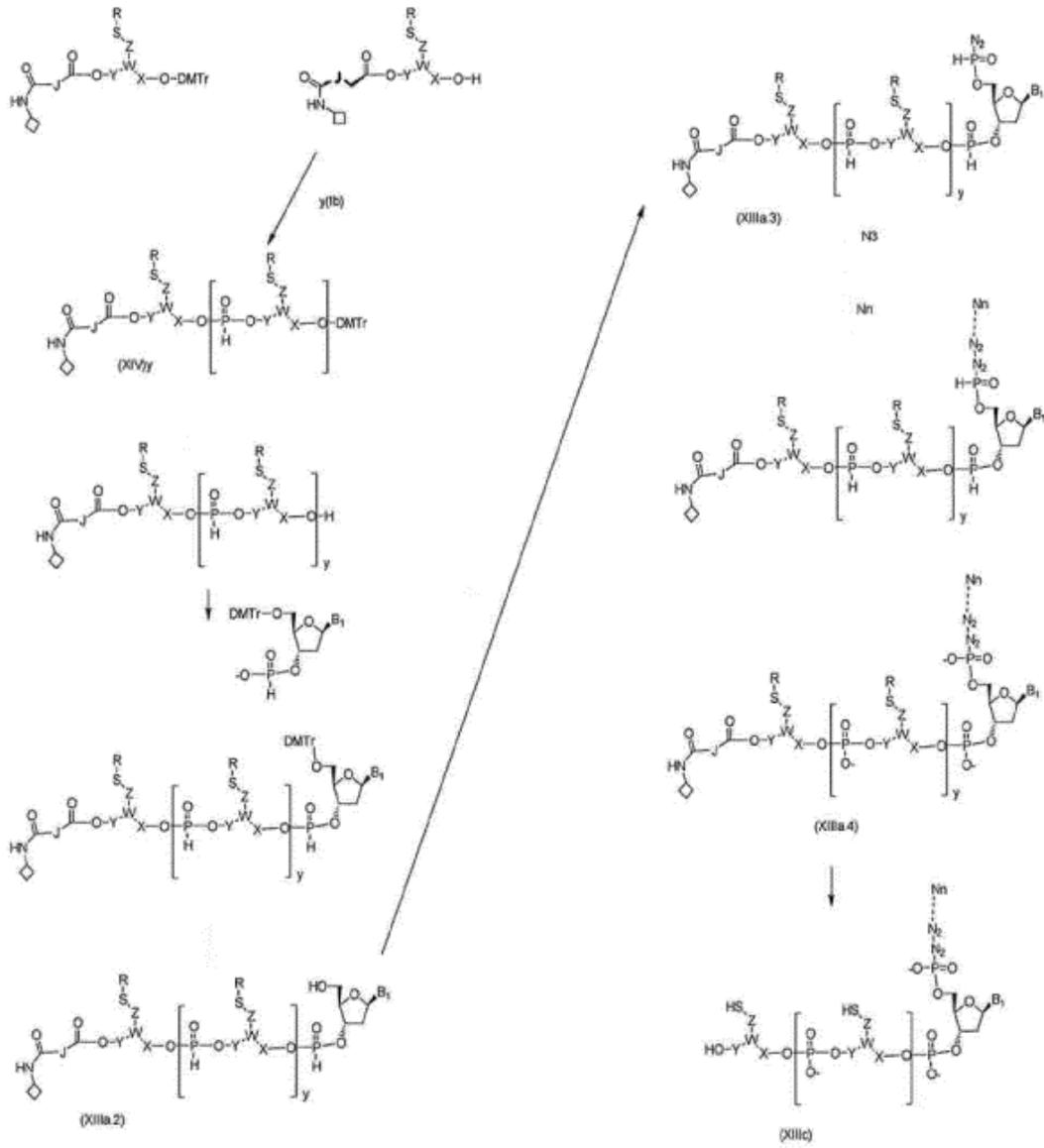


Figura 5

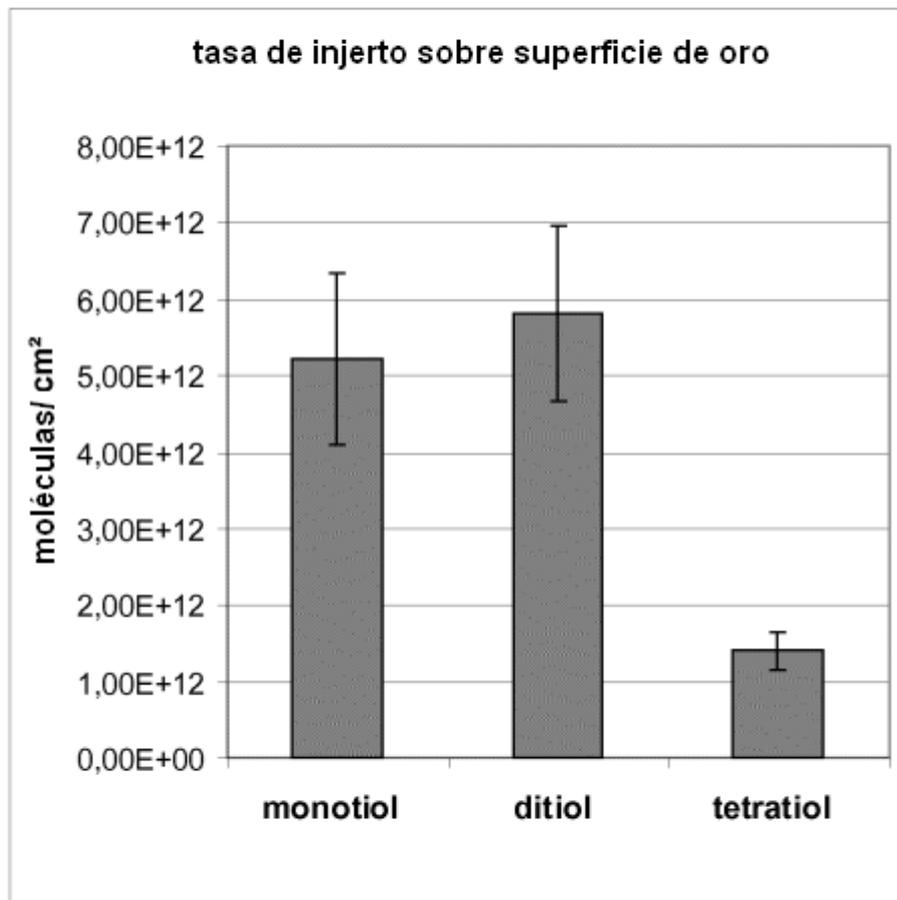


Figura 6

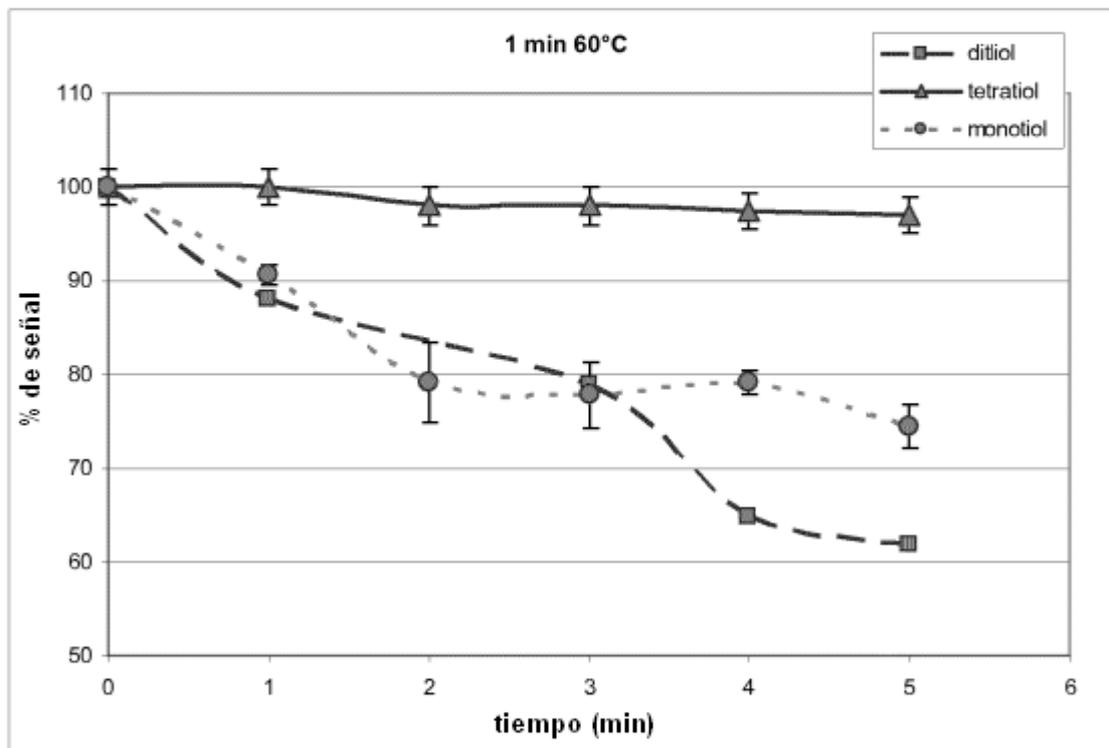


Figura 7

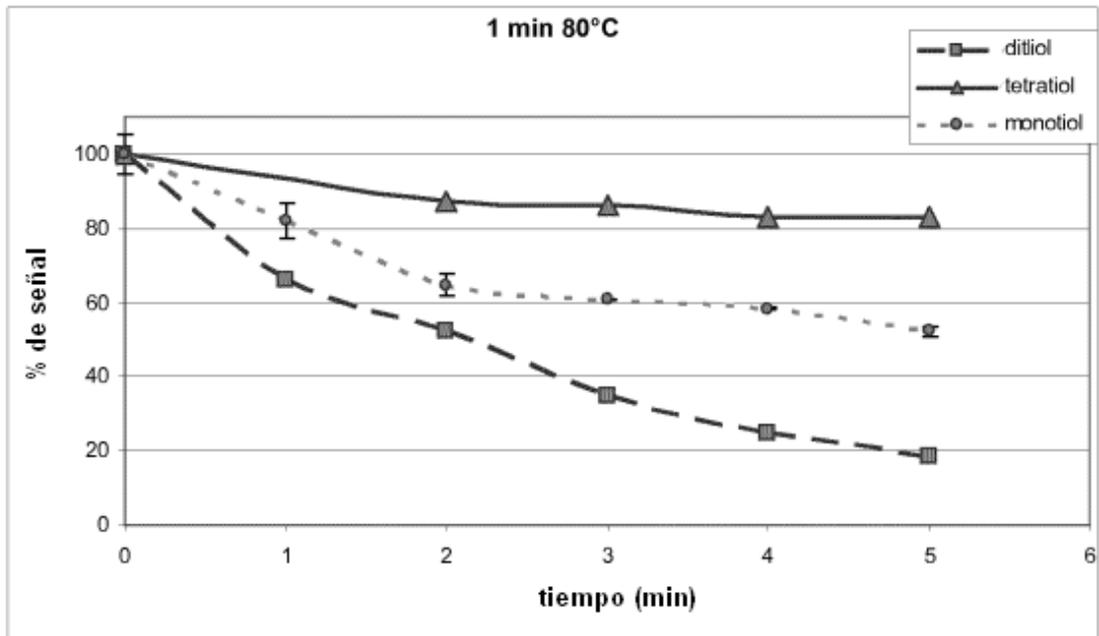


Figura 8

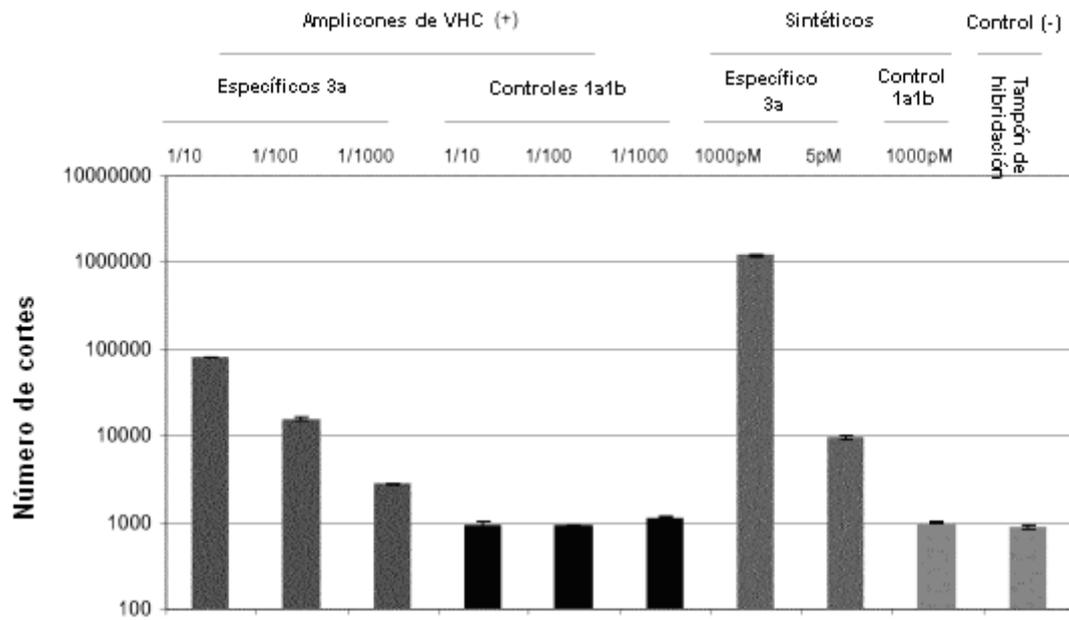


Figura 9

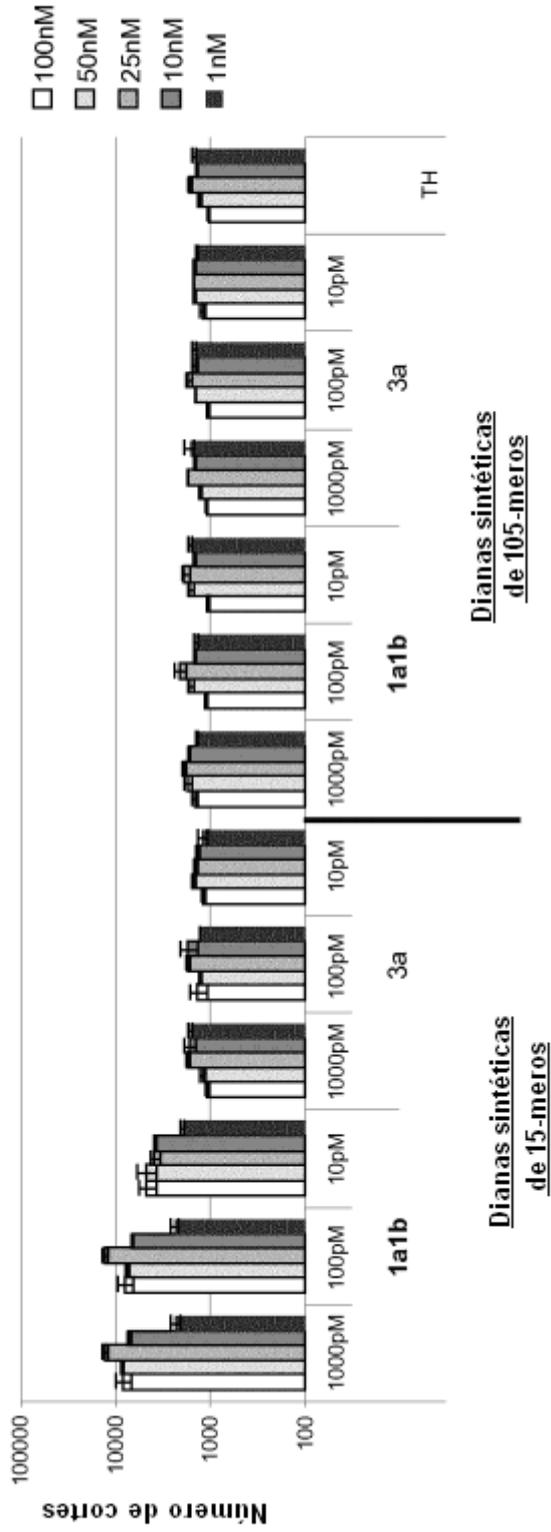


Figura 11

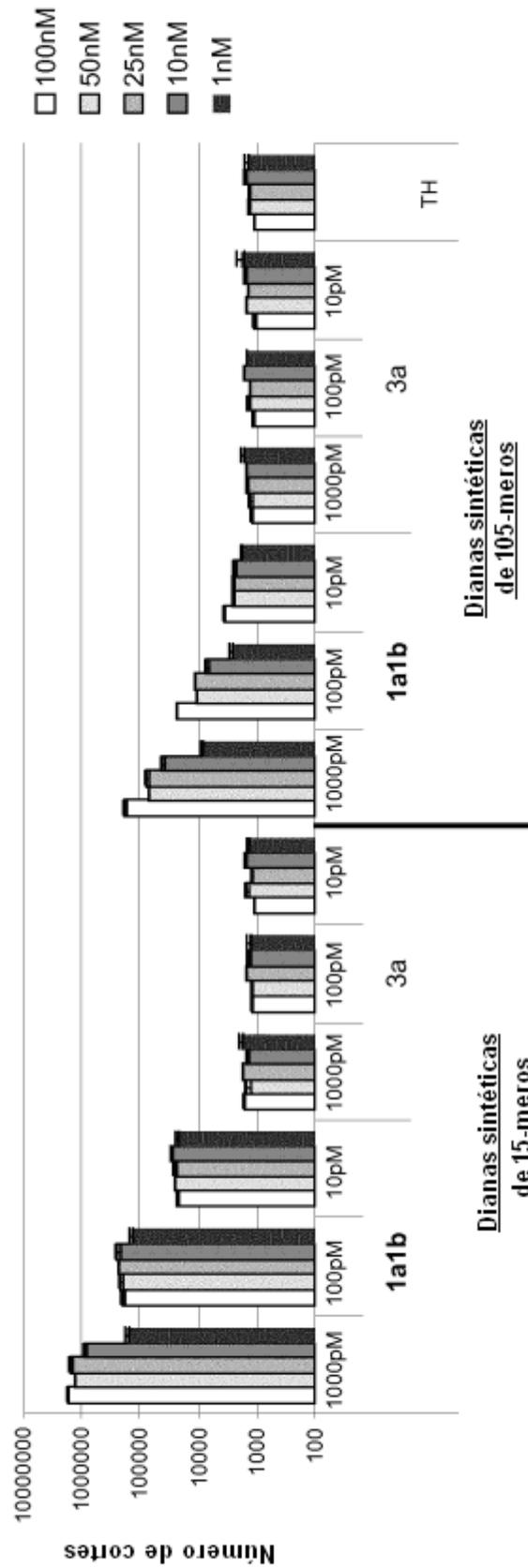


Figura 12

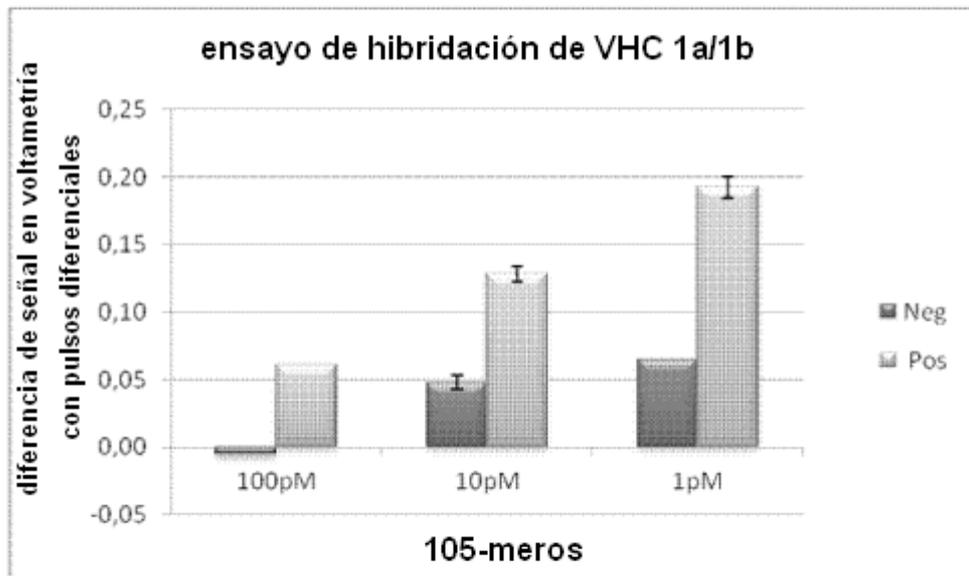


Figura 13a

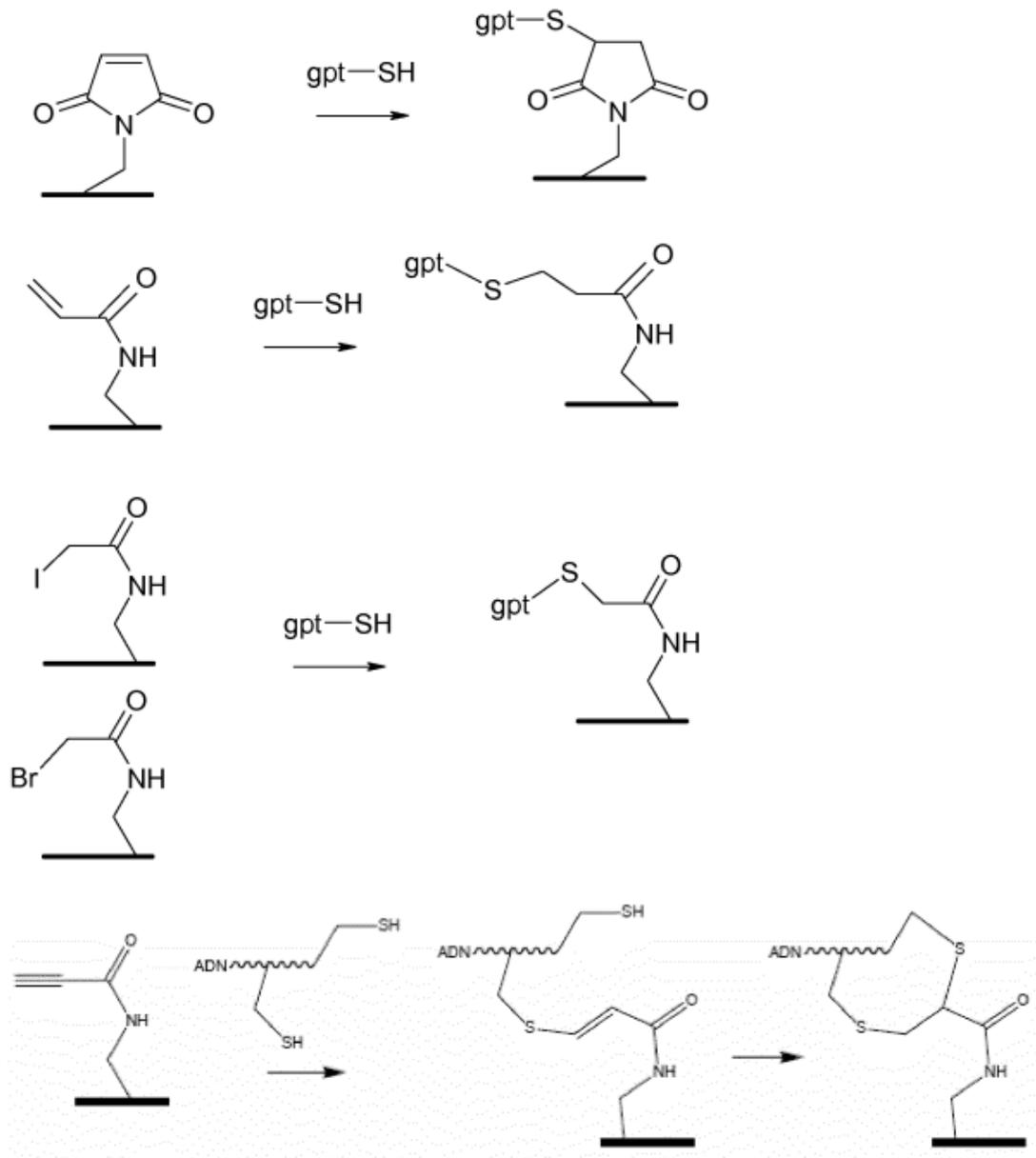


Figura 13b

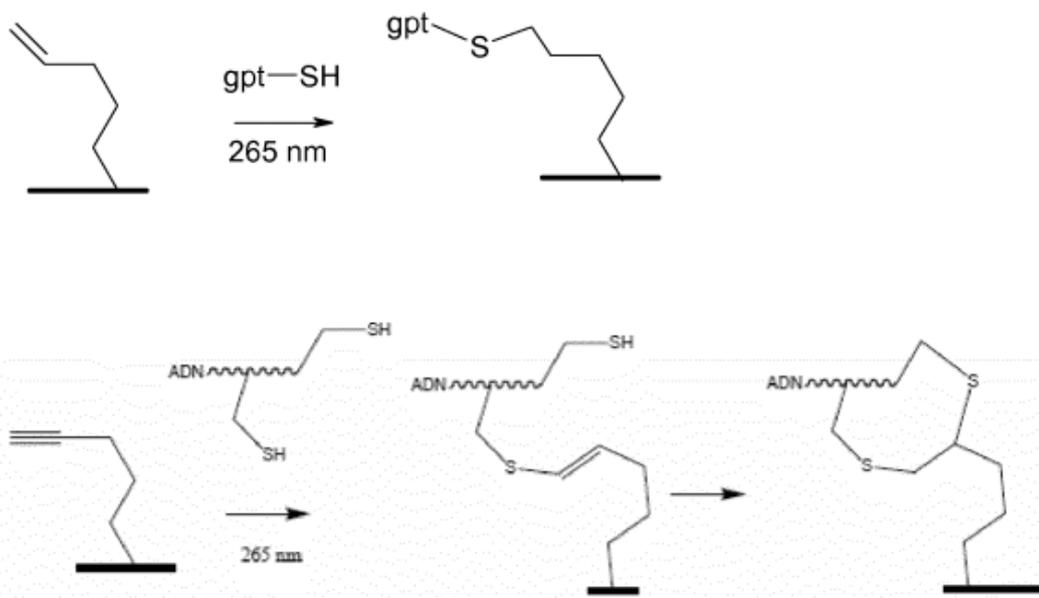


Figura 14

