



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07H 21/00, C12Q 1/68	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/19364 (43) Date de publication internationale: 1er septembre 1994 (01.09.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE94/00013 (22) Date de dépôt international: 18 février 1994 (18.02.94) (30) Données relatives à la priorité: 9300160 19 février 1993 (19.02.93) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LA REGION WALLONNE [BE/BE]; Square du Bastion 1A, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DE VOS, Marie-Joëlle [BE/BE]; Tienne-à-Coulons 6, B-7181 Feluy (BE). BOLLEN, Alex [BE/BE]; Gaasbeekstraat 65, B-1701 Ifterbeek (BE). (74) Mandataire: DE KEMMETER, François; Cabinet Bede, Place de l'Alma 3, B-1200 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: NUCLEIC ACID PROBES CHEMICALLY 5'(OH)- AND/OR 3'(OH)-MODIFIED FOR INSERTING ONE OR MORE NON-RADIOACTIVE LABELING ELEMENTS THEREAT, AND METHOD FOR PREPARING SAME (54) Titre: SONDES D'ACIDES NUCLEIQUES CHIMIQUEMENT MODIFIEES EN 5'(OH) ET/OU EN 3'(OH) EN VUE DE L'INTRODUCTION EN CES POSITIONS D'UN OU PLUSIEURS ELEMENTS DE MARQUAGE NON RADIOACTIF ET PROCEDE DE PREPARATION (57) Abstract Nucleic acid probes for sensing a DNA or RNA molecule. The probe comprises (a) an oligonucleotide or oligodeoxynucleotide portion consisting of a DNA or RNA nucleic acid sequence (S) depending on the kind of molecule to be sensed, and (b) a non-nucleotide portion having chemical properties enabling the direct or indirect attachment of one or more detection units or labelling elements (M) that are non-isotopically detectable by production of colour or light. The probe is characterised in that portion (b) consists of a chain of phosphate units between which are inserted alkyl units, i.e. (b1) a number of alkyl units joining the various phosphate groups and having no particular functionality, and (b2) alkyl units having primary amine functions enabling coupling to various reagents and thus direct or indirect detection, units (b2) being bound to portion (a) or sequence (S) via units (b1). Sequence (S) is linked at its 5' and/or 3' end to one or more labelling elements (M). Such probes are useful for sensing and diagnosing hereditary genetic diseases, oncogenes, and viral, bacterial or parasitic diseases. (57) Abrégé La présente invention concerne des sondes d'acides nucléiques pour détecter une molécule d'ADN ou d'ARN. La sonde comporte: a) une partie oligonucléotidique ou oligodésoxynucléotidique constituée d'une séquence S d'acide nucléique ADN ou ARN en fonction du type de molécule à détecter et b) une partie non nucléotidique possédant des propriétés chimiques qui permettent la fixation directe ou indirecte d'une ou plusieurs unités de détection ou éléments de marquage M détectables de manière non isotopique par production de couleur ou de lumière. La sonde se caractérise par le fait que la partie b) est constituée d'une chaîne d'unités phosphates entrecoupées de motifs alkyle à savoir: b1) certains motifs alkyle unissant les différents groupes phosphates et ne présentant aucune fonctionnalité particulière; b2) des motifs alkyle présentant des fonctions amines primaires qui permettent le couplage avec des réactifs variés pour réaliser la détection de manière directe ou indirecte, les motifs b2 étant liés à la partie a) ou séquence S par l'intermédiaire des motifs b1). La séquence S est liée à son extrémité 5' et/ou 3' à un ou plusieurs éléments de marquage M. Les sondes de ce type sont utilisées pour détecter et diagnostiquer les maladies génétiques héréditaires, les oncogènes, les maladies virales, bactériennes ou parasitaires.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Description

Sondes d'acides nucléiques chimiquement modifiées en 5'(OH) et/ou en 3'(OH) en vue de l'introduction en ces positions d'un ou plusieurs éléments de marquage non radioactif et procédé de préparation.

La présente invention concerne les sondes d'acides nucléiques non radioactives, et les composés chimiques utiles à la synthèse des dites sondes. L'emploi de sondes d'acides nucléiques pour détecter et diagnostiquer les maladies génétiques héréditaires, les oncogènes, les maladies virales, bactériennes ou parasitaires, se généralise de plus en plus et trouve des applications dans les domaines cliniques, vétérinaires et agro-alimentaires. Ces sondes sont généralement des séquences d'ADN ou d'ARN simples brins capables, sous certaines conditions expérimentales, de retrouver leurs séquences complémentaires et de s'hybrider avec elles pour former des duplex stables.

A l'origine, la méthode de détection des hybrides ADN-ADN ou ADN-ARN faisait appel à un marquage radioactif: la sonde est marquée avec un radioisotope, le plus souvent du ^{32}P et la détection après hybridation se fait par comptage ou autoradiographie.

Etant donnés les inconvénients liés à l'utilisation des radioisotopes (temps de demi-vie, coût et sécurité), l'utilisation de sondes "froides" (qui ne contiennent pas d'élément radioactif) se développe de plus en plus. Les sondes froides mettent en jeu des techniques de détection utilisant principalement des systèmes enzymatiques qui, en présence d'un substrat, donnent lieu à la production d'une couleur et, dans les systèmes plus récents, à la production d'une lumière (fluorescence, chimiluminescence, bioluminescence).

En ce qui concerne le marquage de telles sondes, les techniques qui ont été publiées peuvent se ranger en deux grandes catégories:

1. La première consiste à coupler la sonde à un élément directement détectable par exemple par couplage covalent d'une enzyme à la sonde (phosphatase alcaline, peroxydase).

2. La seconde catégorie consiste en la détection indirecte de l'hybride. Pour ce faire, on a recours à des substances intermédiaires qui reconnaissent des motifs fixés sur la sonde. Il s'agit principalement de systèmes basés sur l'interaction très forte entre la biotine et l'avidine ou la streptavidine, l'avidine ou la streptavidine étant
5 conjuguées à une enzyme. Cette approche nécessite l'incorporation d'une ou plusieurs biotines à la sonde nucléique.

Les techniques basées sur l'utilisation de sondes froides, qu'elles relèvent d'une détection directe ou indirecte, nécessitent donc, au niveau de ces sondes, des modifications chimiques de la chaîne oligonucléotidique pour permettre son
10 marquage.

Des oligodésoxyribonucléotides portant des fonctions chimiques telles que des amines primaires ou des thiols permettant le couplage avec des réactifs variés ont été décrits dans la littérature. L'introduction de ces groupes peut se faire, soit sur une ou plusieurs des bases, soit à une des extrémités 5' ou 3' de l'oligodésoxyribonucléotide.
15 Des modifications chimiques au niveau des bases de la chaîne ont le désavantage d'interférer avec les appariements des bases lors de la mise en hybridation de l'oligonucléotide avec des séquences homologues. L'introduction de groupes fonctionnels en 5' ou en 3' est, à cet effet, plus judicieuse à condition que la technique proposée permette d'éloigner suffisamment la partie détectable de la partie
20 oligonucléotidique de la sonde ainsi préparée.

Le but de la présente invention est donc d'obtenir des sondes d'acides nucléiques :

- offrant une bonne hybridation avec les séquences cibles complémentaires;
- permettant une détection directe ou indirecte par des méthodes non radioactives et ce, avec un seuil de détection aussi bas que possible;
- 25 - facilement synthétisables, c'est-à-dire appropriées à une synthèse d'acides nucléiques automatique ou manuelle, notamment sur support solide.

A cet effet, la présente invention concerne des sondes d'acides nucléiques pour détecter une molécule d'ADN ou d'ARN, comportant

- a) une partie oligonucléotidique ou oligodésoxynucléotidique constituée de
30 S : une séquence d'acide nucléique ADN ou ARN en fonction du type de molécule à détecter et
- b) une partie non nucléotidique possédant des propriétés chimiques qui permettent la fixation directe ou indirecte d'une ou plusieurs unités de détection ou éléments de marquage M détectables de manière non isotopique par production de couleur ou de
35 lumière, caractérisée en ce que la partie b) est constituée d'une chaîne d'unités

phosphates entrecoupées de motifs alkyle à savoir

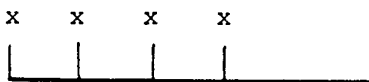
b1) certains motifs alkyle unissant les différents groupes phosphates et ne présentant aucune fonctionnalité particulière

b2) des motifs alkyle présentant des fonctions amines primaires qui permettent le couplage avec des réactifs variés pour réaliser la détection de manière directe ou indirecte, les motifs b2) étant liés à la partie a) ou séquence S par l'intermédiaire des motifs b1).

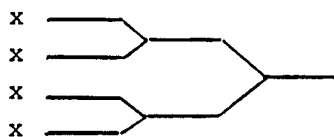
Conformément à l'invention, la séquence S est liée à son extrémité 5' et/ou 3' à un ou plusieurs éléments de marquage M.

L'édifice moléculaire qui possède les fonctions chimiques X, permettant la fixation directe ou indirecte d'une ou plusieurs unités de détection peut présenter entre autres deux types de structure:

- une structure en "PEIGNE" où les fonctions chimiques X sont disposées en chaîne linéaire.



- une structure en "CANDELABRE" où les fonctions chimiques X sont disposées en chaîne ramifiée.



La présente invention concerne les deux types de structure.

I. Sondes d'acides nucléiques chimiquement modifiées en 5'(OH) et (ou) en 3'(OH) par un édifice moléculaire en "PEIGNE".

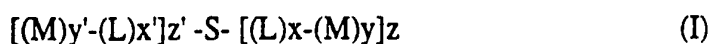
Dans de telles sondes, la partie nucléotidique consiste en une séquence d'acides nucléiques définie et homologue d'un fragment complémentaire cible, elle apporte l'énergie de stabilisation et assure l'hybridation avec la molécule d'ADN ou d'ARN que l'on veut détecter. Elle est constituée d'une chaîne d'unités phosphates entrecoupées de motifs riboses.

La partie non nucléotidique qui fournit la réactivité permettant la détection de l'hybride, directe ou indirecte, susceptible d'être introduite en l'extrémité 5'(OH) et/ou 3'(OH) de la séquence d'acides nucléiques décrite précédemment, est constituée d'une chaîne linéaire d'unités phosphates entrecoupées de motifs alkyle à savoir

L: certains motifs alkyle ne présentent aucune fonctionnalité chimique particulière; la succession de tels motifs, encore appelés "bras chimique" consistent à introduire des espacements entre les unités de détection;

M: certains motifs alkyle présentent des fonctions amine primaire qui permettent le couplage avec des réactifs variés pour conduire à la formation de motifs de détection directe ou indirecte.

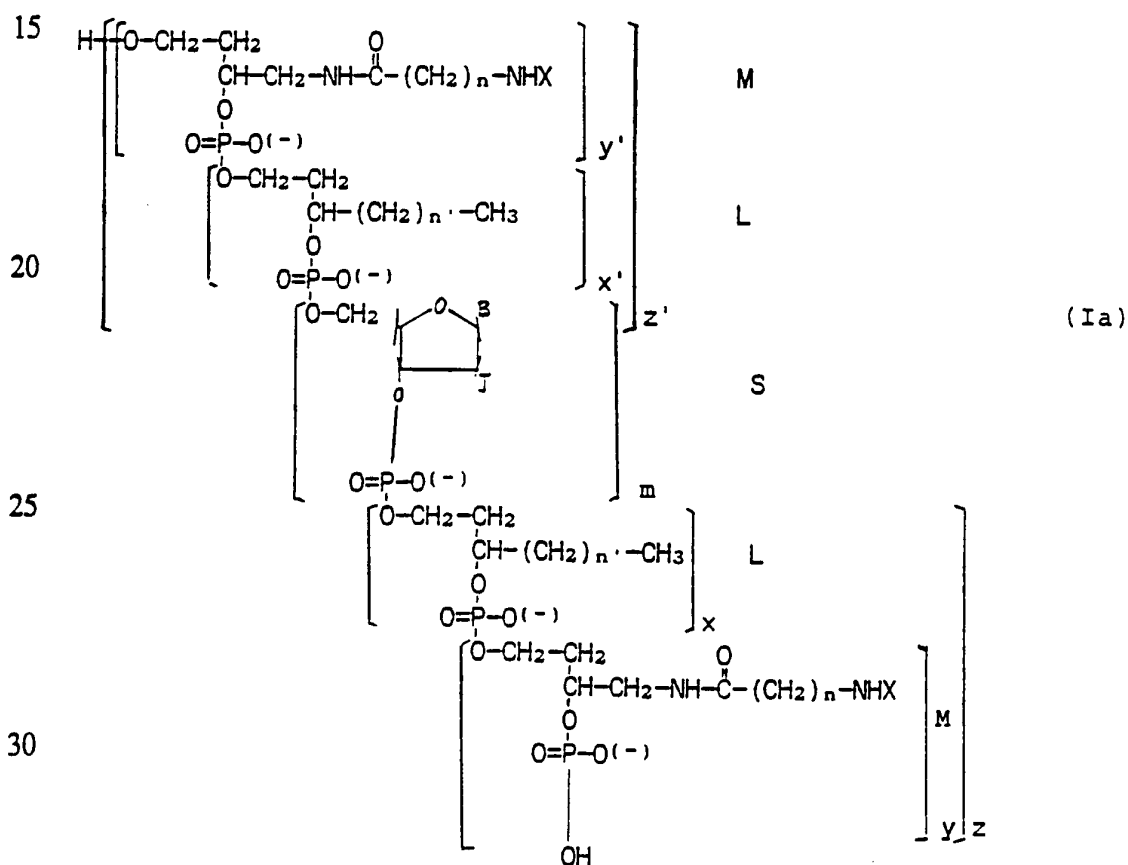
Les motifs M sont séparés les uns des autres par un nombre variable de bras
5 chimiques L, M comporte une molécule, synthétique ou naturelle, directement ou
indirectement détectable de manière non isotopique. Une sonde ainsi constituée
répond à la formule générale



dans laquelle S, L et M ont les significations données ci-dessus

10 x, x', z, z' sont des nombres égaux ou supérieurs à 0, avec la restriction que z et z' ne sont jamais simultanément égaux à 0, y et y' sont des nombres supérieurs à 0.

La modification chimique se fait donc en 5' et/ou en 3' de la séquence d'acides nucléiques de telle sorte que l'on peut détailler la formule I de la manière suivante :



On peut décrire les unités S, L et M de la façon suivante :

S: la séquence d'acides nucléiques

$J = H$ ou OH

m représente le nombre de nucléotides de 1 à 1000

5 B base d'acide nucléique, purique ou pyrimidique, variable selon les nucléotides.

On rappelle que les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides, ribonucléotides dans le cas des ARN, désoxyribonucléotides dans le cas des ADN.

Les monomères, c'est-à-dire les nucléotides, sont constitués dans le cas de l'ARN par de l'acide phosphorique, un ose à cinq atomes de carbone, le ribose ($J=OH$) et l'une
10 des quatre bases fondamentales: adénine, guanine, cytosine, uridine. On rencontre plus rarement des bases ou nucléosides dits mineurs, tels les bases méthylées ou hydroxylées, le dihydrouracile et la pseudo-uridine. Dans le cas de l'ADN, l'ose des désoxyribonucléotides est le D-2désoxyribose ($J=H$) et les quatre bases principales
15 sont l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine; dans de rares cas, la cytosine est remplacée par la méthylcytosine ou l'hydroxyméthylcytosine. Une des caractéristiques essentielles des polynucléotides est la liaison inter-nucléotidique 3'-5' phosphodiester.

L : le bras chimique

$x, x' = 0$ à 100

20 $n' = 0$ à 20

Le bras chimique est un polymère non-nucléotidique. Une des caractéristiques essentielles de ce polymère est, tout comme pour l'ADN et l'ARN, le lien phosphodiester qui unit les monomères.

Le monomère est constitué par de l'acide phosphorique, un diol: le propane 1-3 diol
25 substitué sur le carbone 1 par une chaîne alkyle latérale.

M : l'élément de marquage

$y, y' = 1$ à 100

$n = 0$ à 20

30 X : le marqueur, soit direct: phosphatase alcaline, peroxydase, fluorescéine, toute enzyme capable, en présence d'un substrat, de produire une coloration, ou une lumière;

soit indirect: biotine, digoxigénine, tout haptène capable d'être

reconnu par des anticorps marqués de manière non-isotopique.

L'élément de marquage est un polymère non nucléotidique. Une des caractéristiques
35 essentielles de ce polymère est, tout comme pour l'ADN et l'ARN, le lien

phosphodiester entre les monomères.

Le monomère est constitué par de l'acide phosphorique, un diol: le propane 1,3-diol substitué sur le carbone 1 par un méthylène acétamido-alcane, la chaîne alkyle est fonctionnalisée en position terminale par une amine portant le marqueur.

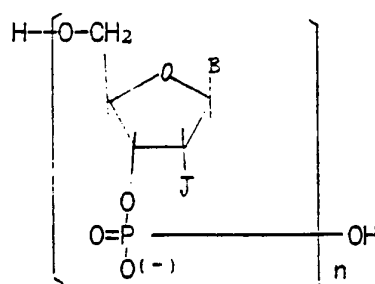
- 5 Enfin, l'élément LM responsable de la détection de la sonde peut être introduit en 5'(OH) pour $z \neq 0$; $z=0$ ou en 3'(OH) pour $z'=0$; $z \neq 0$ ou encore simultanément en 5'(OH) et en 3'(OH) pour $z' \neq 0$; $z \neq 0$ avec de façon générale z et $z' = 0$ à 100.

La synthèse du composé Ia peut donc se réaliser par synthèse internucléotidique classique puisque les différents éléments de I, à savoir S, L et M sont des polymères
10 dont les monomères sont reliés entre eux par des liens phosphodiester.

La présente invention a donc pour objet un procédé de préparation de sondes de formule Ia comportant:

A1) la synthèse d'une séquence d'acides nucléiques S

15



20

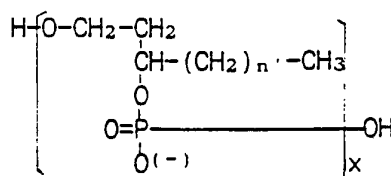
par toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, de préférence sur support solide,

et

- A2) la fixation d'un marqueur, caractérisé en ce que la dite séquence est soumise, de
25 préférence par la même méthode de synthèse, notamment sur support solide, soit, à une extension en son extrémité 5'(OH) par une série d'unités M et L soit, à une extension en son extrémité 3'(OH) par une série d'unités M et L soit, à une extension en ses extrémités 5'(OH) et 3'(OH) par deux séries d'unités M et L

- 30 B) les dites unités L sont obtenues par la synthèse d'un polymère non nucléotidique L

35

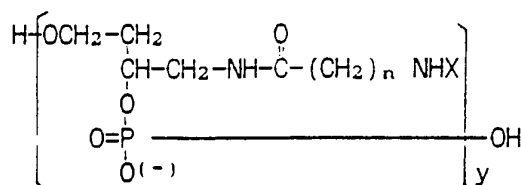


dans laquelle n' et x ont les significations données plus haut,
et

C) les dites unités M sont obtenues par la synthèse d'un polymère non nucléotidique

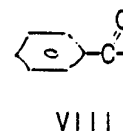
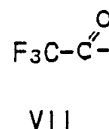
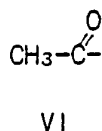
M

5



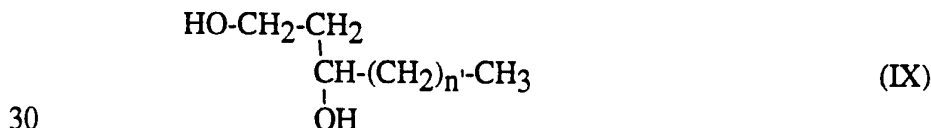
- 10 dans laquelle n et y ont les significations données plus haut, et X représente
soit un marqueur: phosphatase alcaline, peroxydase, fluorescéine, biotine,
digoxigénine, tout haptène capable d'être reconnu par des anticorps marqués de
manière non isotopique,
soit un groupe protecteur transitoire de la fonction amine primaire destiné à être
15 éliminé après synthèse totale de la sonde d'acides nucléiques I. A titre illustratif, dans
cette approche de synthèse, x peut représenter un acétyle VI, un trifluoroacétyle VII,
un benzoyle VIII.

20



et les synthèses B et C ci-dessus se font de préférence aussi par toute méthode de
synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, et en
25 particulier sur support solide.

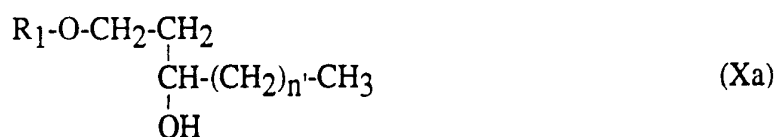
Plus particulièrement, chaque élément de bras chimique L est obtenu au départ d'un
alcanediol 1,3 de formule



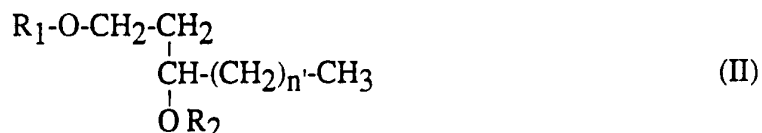
par les étapes suivantes de

a) protection de la fonction alcool primaire au moyen d'un groupe protecteur R₁, pour
obtenir un composé de formule

35



- b) transformation de la fonction alcool secondaire en un groupement OR_2 pour
 5 obtenir un composé de formule



- où R_2 représente un groupe approprié à l'introduction du composé II (synthon) à
 10 l'extrémité d'un nucléotide ou bien à l'extrémité d'un synthon déjà existant.

Selon une autre particularité de l'invention, chaque élément ou unité de détection M est obtenu au départ de butène-3ol-1 de formule

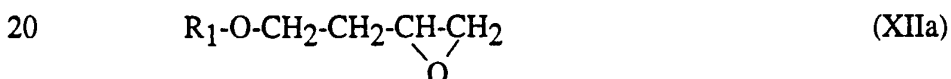


par les étapes de

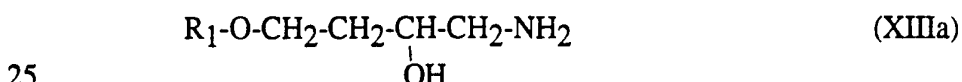
- 15 a) protection de la fonction alcool primaire au moyen d'un groupe protecteur R_1 pour obtenir un composé de formule



- b) époxydation de la double liaison du composé (XXXI) pour former un composé de
 formule



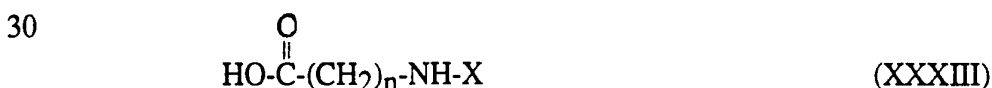
- c) ouverture de l'époxyde au moyen d'ammoniaque pour former un composé de
 formule



- 25 d) protection du groupe amino primaire d'un composé de formule



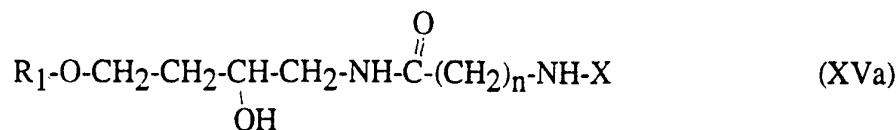
pour former un composé de formule



où X a les significations données plus haut

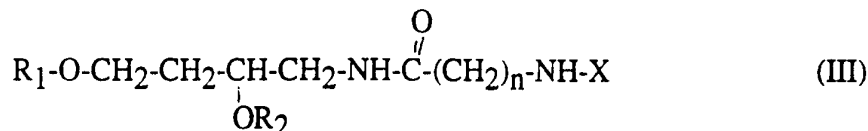
- e) activation du composé (XXXIII)

- f) condensation des composés (XIIIa) et (XXXIII) entre eux pour former un composé
 35 de formule



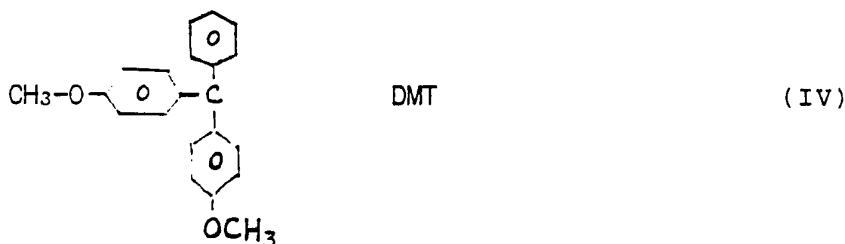
et

- 5 f) phosphorylation du composé (XVa) pour former un composé de formule



dans laquelle R_2 représente un groupe phosphorylé apte à l'introduction du composé
10 IIIa (synthon) à l'extrémité d'un nucléotide ou bien à l'extrémité d'un synthon déjà existant.

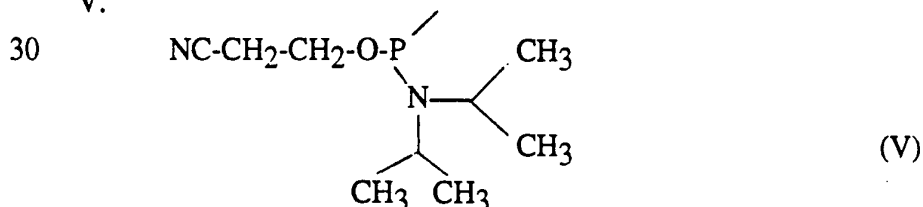
Dans les formules précitées, R_1 est un groupe protecteur de la fonction alcool
primaire; à titre illustratif, en cas de synthèse aux phosphoramidites sur support
solide, R_1 peut représenter le groupe 4,4'-diméthoxytrityle de formule IV (DMT)
15 labile en milieu acide.



et

- R_2 représente H ou tout groupe phosphorylé éventuellement protégé, approprié à
l'introduction du synthon II ou III à l'extrémité 5' d'un nucléotide ou d'un synthon,
25 déjà condensé sur le support solide pour un type donné de synthèse d'assemblage internucléotidique.

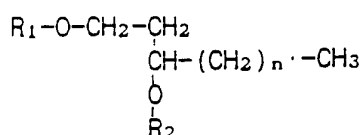
R_2 peut représenter, à titre illustratif en cas de synthèse aux phosphoramidites sur
support solide, le groupe cyanoéthoxydiisopropylaminophosphoramidite de formule
V.



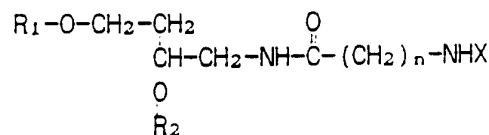
- 35 La présente invention a également pour objet deux composés synthétiques non

nucléotidiques utiles respectivement comme intermédiaires pour la synthèse des fragments M et L du composé Ia par toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, de préférence sur support solide. Les deux composés synthétiques revendiqués sont représentés par les formules II et

5 III.



(II)



(III)

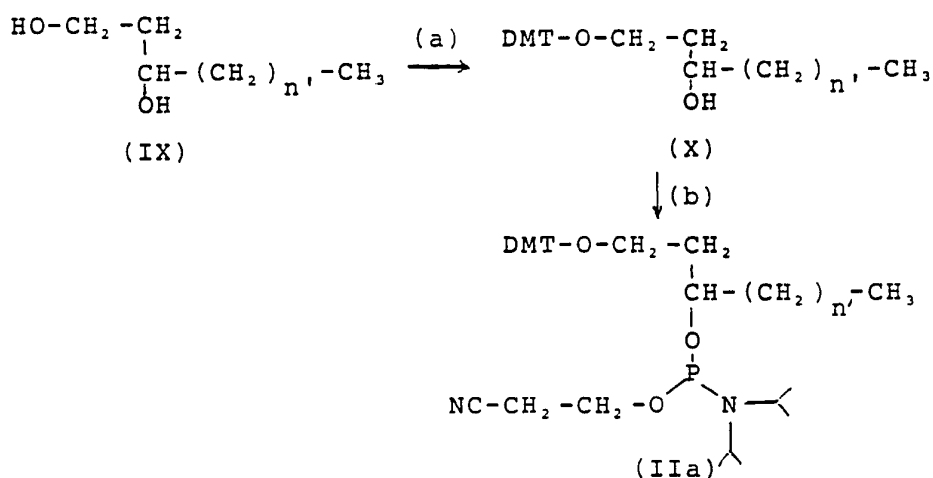
10

dans lesquelles R_1 , R_2 , n , n' et X ont les significations données précédemment.

L'invention concerne également la préparation des composés intermédiaires II et III par les procédés décrits ci-dessus.

En cas de synthèse aux phosphoramidites, la synthèse des composés II peut être

15 représentée par le schéma suivant:

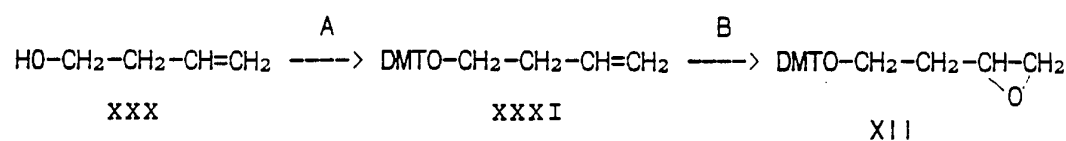


20

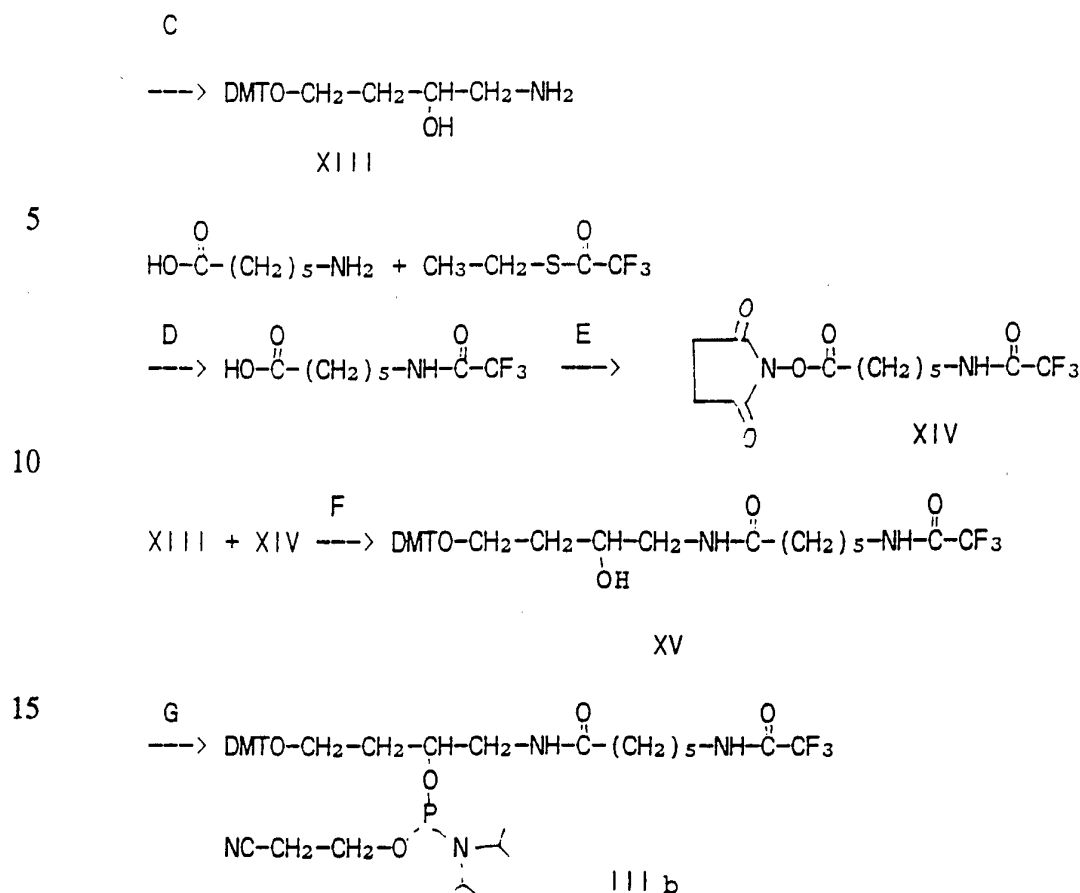
25

Egalement en cas de synthèse aux phosphoramidites, le procédé de préparation des

30 composés de formule III peut être représenté par le schéma ci-dessous:



35



20 étape A) protection de l'alcool primaire du butèn-3 ol par le chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle

étape B) époxydation de la double liaison par l'acide méta-chloroperbenzoïque

étape C) ouverture de l'époxyde par l'ammoniaque pour conduire au composé XIII.

25 étape D) protection par un groupe trifluoroacétyle de l'amine primaire de l'acide 6-aminocaproïque.

étape E) activation de l'acide 6-trifluoroacétylamidocaproïque par la N-hydroxy-succinimide pour conduire au composé XIV.

étape F) préparation du composé XV par condensation entre XIII et XIV.

30 étape G) phosphorylation de l'alcool secondaire XV avec un réactif qui permet le couplage ultérieur en phase solide du dérivé III ainsi obtenu par un type de synthèse d'assemblage internucléotidique. La phosphorylation, en cas de synthèse aux phosphoramidites, peut se faire avec la diisopropylaminocyanoéthoxy-chlorophosphine XI.

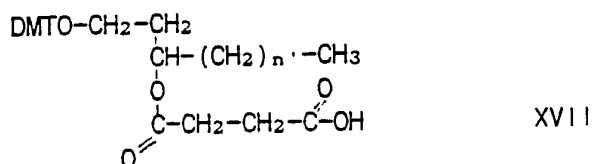
35 Par ailleurs, la présente invention a pour objet un procédé de fonctionnalisation d'un support solide CPG (controlled porous glass) par le composé de formule X. Le

support solide ainsi fonctionnalisé permettra la préparation de sondes d'acides nucléiques de type I dans lesquelles z est non nul, c'est-à-dire dans lesquelles un marquage est introduit en 3' de la sonde. En effet, toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, de préférence sur support solide, opère par une élongation de la chaîne en formation du 3' vers le 5'.

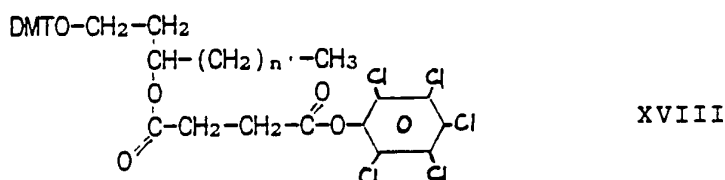
Dans le cas de sondes d'acides nucléiques de type I dans lesquelles z est non nul, il est donc nécessaire de démarrer la synthèse sur un support solide fonctionnalisé par un composé de formule X ou XV. Toutefois, en raison de la facilité d'obtention du dérivé X par rapport au composé XV, nous avons choisi de fonctionnaliser le support avec X.

La méthode revendiquée pour la fonctionnalisation du support solide - le support est initialement recouvert de fonctions amine primaire - comporte les étapes suivantes :

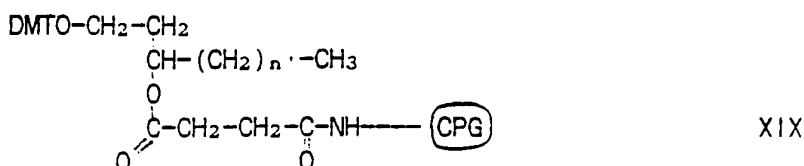
- acylation de l'alcool secondaire de X par l'anhydride succinique pour conduire au composé de formule XVII



- activation de la fonction acide carboxylique du composé XVII par le pentachlorophénol en présence de carbodiimide qui produit l'ester XVIII.



- Fixation du dérivé XVIII sur un support solide aminé. Le support solide fonctionnalisé XIX est ainsi obtenu.



II. Sondes d'acides nucléiques chimiquement modifiées en 5'(OH) par un édifice moléculaire en "CANDELABRE"

Dans de telles sondes, la partie nucléotidique consiste en une séquence d'acides nucléiques définie et homologue d'un fragment complémentaire cible, elle apporte
5 l'énergie de stabilisation et assure l'hybridation avec la molécule d'ADN ou d'ARN que l'on veut détecter. Elle est constituée d'une chaîne d'unités phosphates entrecoupées de motifs riboses.

La partie qui fournit la réactivité permettant la détection de l'hybride, directe ou indirecte, est introduite en l'extrémité 5'(OH) de la séquence d'acides nucléiques
10 décrite précédemment. Elle est constituée d'une chaîne ramifiée d'unités phosphates entrecoupées de motifs alkyle:

les motifs alkyle internes à la ramification, c'est-à-dire unissant les différents groupes phosphates, ne présentent aucune fonctionnalité chimique particulière.

les motifs alkyle externes à la ramification, c'est-à-dire terminant les différents
15 bras de la ramification, possèdent en bout de chaîne une fonction amine primaire.

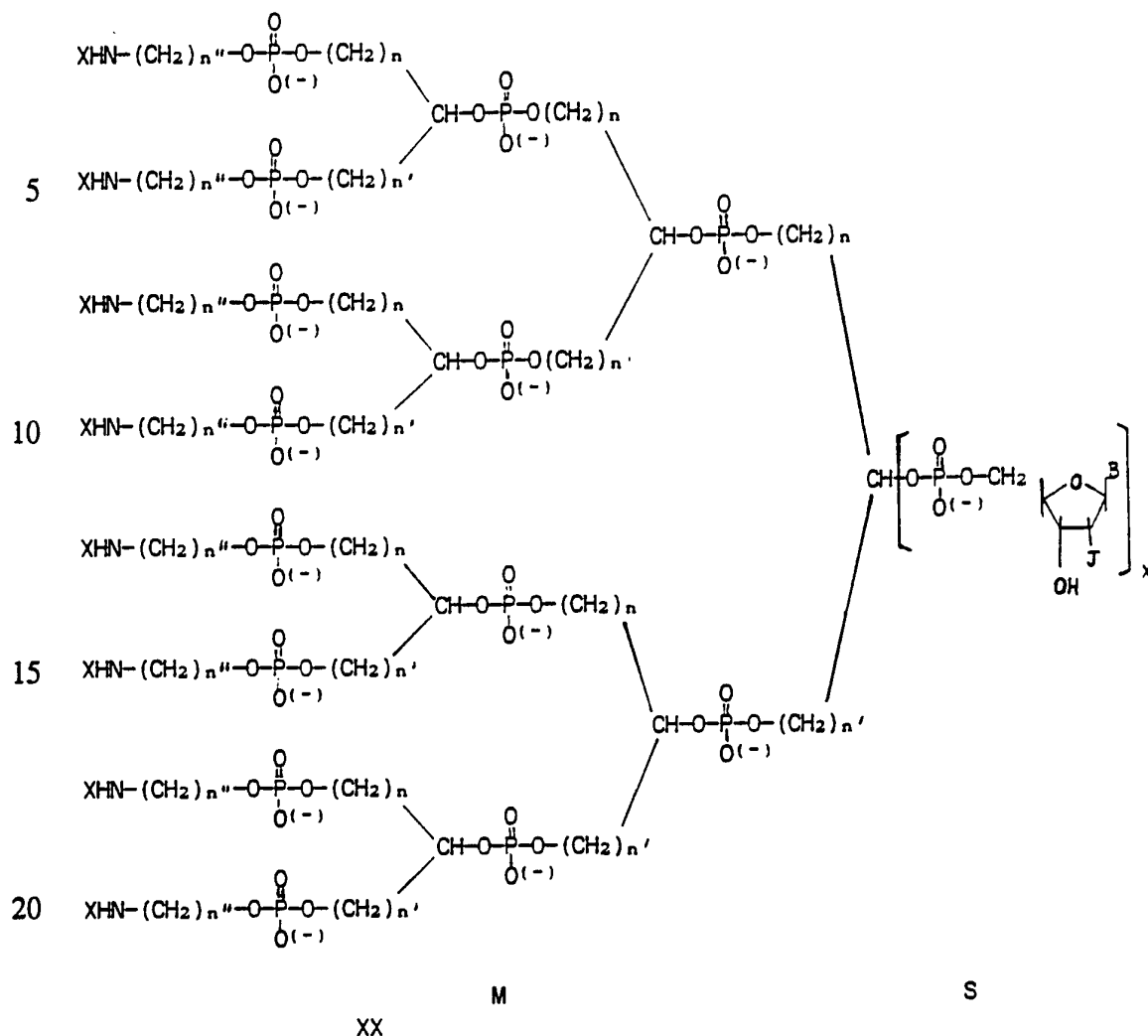
La présente invention a donc pour objet une sonde d'acides nucléiques XX comportant une séquence d'acides nucléiques S, ADN ou ARN, caractérisée en ce que ladite séquence S est liée à son extrémité 5' à un élément de marquage M.

20 La modification chimique se fait donc en 5'(OH) de la séquence d'acides nucléiques de telle sorte que l'on peut détailler la formule XX, par exemple, de la manière suivante :

25

30

35



25 On peut décrire les unités S et M de la façon suivante :

S: la séquence d'acides nucléiques

J - H ou OH

x représente le nombre de nucléotides de 1 à 1000

B base nucléique, purique ou pyrimidique, variable selon les nucléotides

30 On rappelle que les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides, ribonucléotides dans le cas des ARN, désoxyribonucléotides dans le cas des ADN.

Les monomères, c'est-à-dire les nucléotides, sont constitués, dans le cas de l'ARN, par de l'acide phosphorique, un ose à cinq atomes de carbone, le ribose (J=OH) et l'une des quatre bases fondamentales : adénine, guanine, cytosine, uridine. Dans le

35 cas de l'ADN, l'ose des désoxyribonucléotides est le D-2-désoxyribose (J=H) et les

quatre bases principales sont l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine. Une des caractéristiques essentielles des polynucléotides est la liaison internucléotidique 3'-5' phosphodiester.

M: l'élément de marquage, il se termine dans l'exemple décrit cidessus par huit bras aminés. On l'appellera dès lors d'ordre huit. Néanmoins, l'ordre de ramification peut prendre des valeurs de 2 à 128 (l'ordre supérieur étant toujours double de celui qui le précède).

$n, n' \text{ et } n'' = 0 \text{ à } 20$

X : le marqueur, soit direct: phosphatase alcaline, peroxydase, fluorescéine, toute enzyme capable, en présence d'un substrat, de produire une coloration ou une lumière.

soit indirect: biotine, digoxigénine, tout haptène capable d'être reconnu par des anticorps marqués de manière non-isotopique.

L'élément de marquage est un polymère ramifié non nucléotidique. Une des caractéristiques essentielles de ce polymère est, tout comme pour l'ADN et l'ARN, le lien phosphodiester entre les monomères.

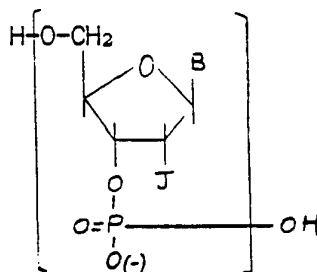
Le polymère ramifié M est constitué à partir de deux types de monomères distincts:

- le monomère responsable de la construction de l'édifice ramifié. Il est constitué par de l'acide phosphorique et un triol: UN 1,n, ω alcane triol.
- le monomère responsable de l'introduction en bout de ramification, des fonctions amine primaire. Il est constitué par de l'acide phosphorique et un amino-alcool, le 1-amino hexan 6-ol.

La synthèse du composé XX peut donc se réaliser par synthèse internucléotidique classique puisque les différents éléments de XX sont des polymères dont les monomères sont reliés entre eux par des liens phosphodiesters.

La présente invention a donc également pour objet un procédé de préparation de sondes de formules XX comportant la synthèse d'une séquence d'acides nucléiques S :

30

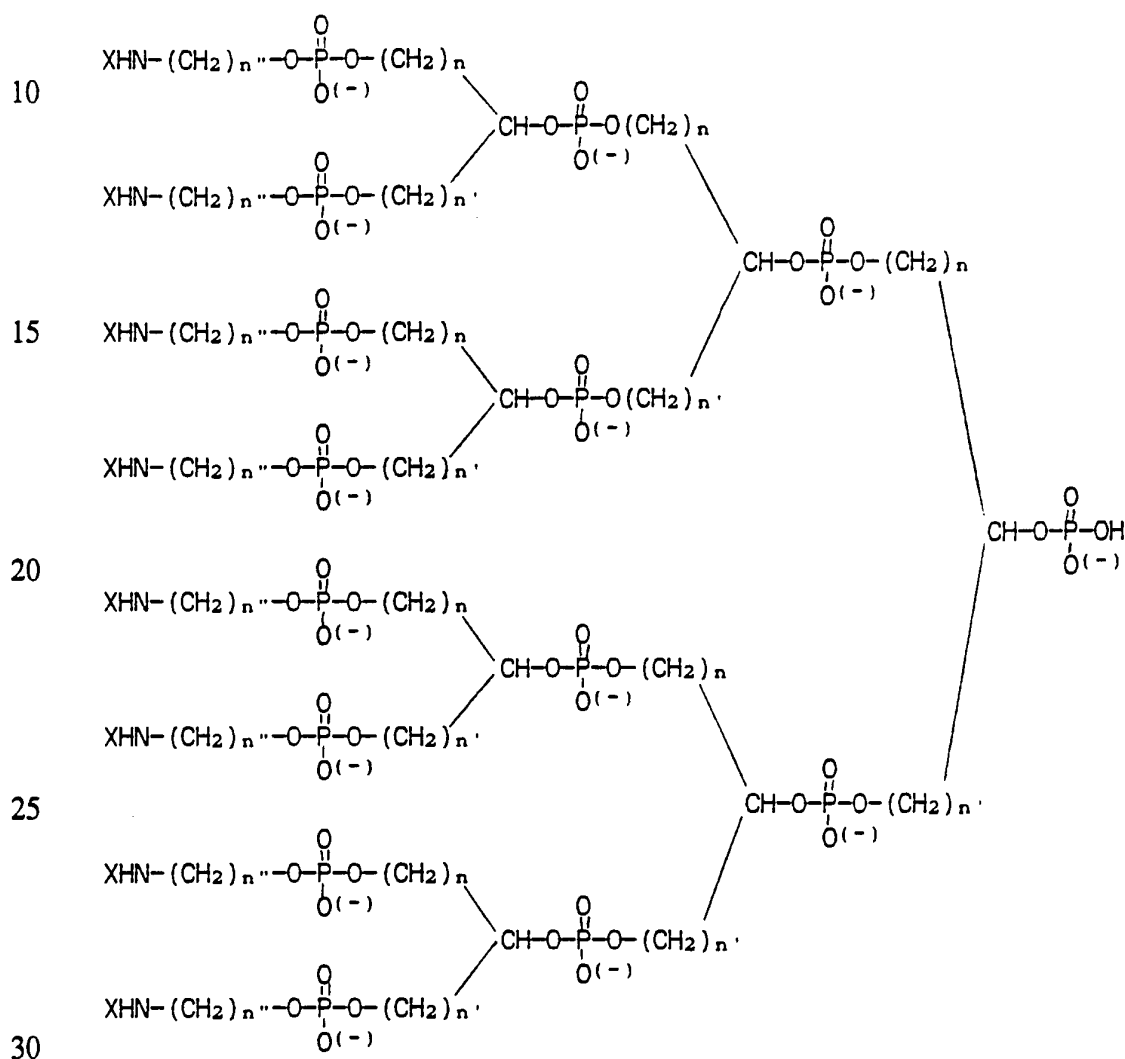


35 dans laquelle B et J ont les significations données précédemment,

par toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, de préférence sur support solide, caractérisée en ce que ladite séquence est soumise, de préférence par la même méthode de synthèse, notamment sur support solide, à une extension en son extrémité 5'(OH) par un édifice

5 moléculaire ramifié M dont les bras terminaux portent chacun une fonction amine primaire.

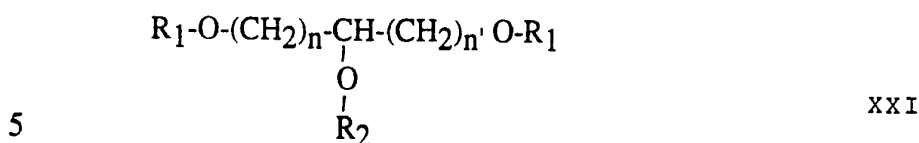
L'édifice moléculaire ramifié peut répondre à la formule suivante :



et peut être synthétisé plus particulièrement par toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, de préférence sur support solide.

35 En particulier, après synthèse de la chaîne oligonucléotidique S dont les fonctions

phosphates et les bases sont protégées, on condense à l'extrémité 5'(OH) de ladite chaîne une série de composés de formule



dans lesquels R_1 et R_2 ont les significations données précédemment.

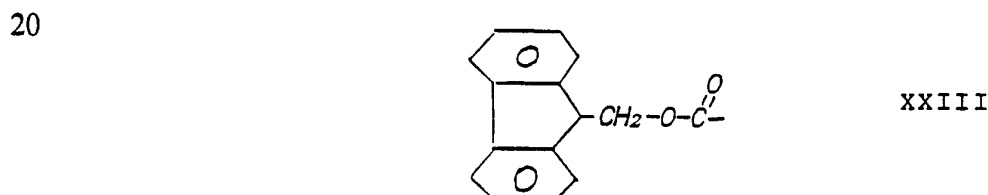
Outre le composé XXI, la synthèse de M nécessite encore l'utilisation du composé XXII pour l'introduction des bras aminés en bout de ramification.



Ce composé est connu dans la littérature.

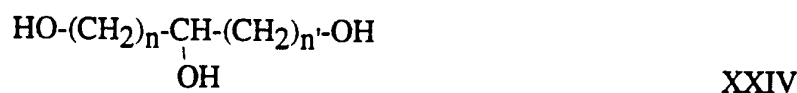
Dans la formule XXII, X représente -soit un marqueur: phosphatase alcaline, peroxydase, fluorescéine, biotine, digoxigénine, tout haptène capable d'être reconnu par des anticorps marqués de manière non isotopique.

- soit un groupe protecteur transitoire de la fonction amine primaire destiné à être éliminé après synthèse totale de la sonde d'acides nucléiques XX. A titre illustratif, dans cette approche de synthèse, X peut représenter un trifluoroacétyle VII, un fluorénylméthoxycarbonyl XXIII.



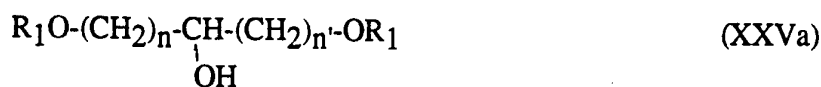
et R_2 a les significations données précédemment.

Conformément à l'invention, le composé de formule XXI est obtenu au départ d'un alcanetriol de formule



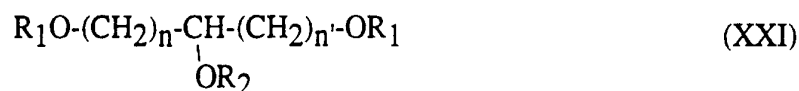
par les étapes suivantes de

a) protection de la fonction alcool primaire au moyen d'un groupe protecteur R_1 pour obtenir un composé de formule



b) transformation de la fonction alcool secondaire en un groupement OR_2 pour

obtenir un composé de formule

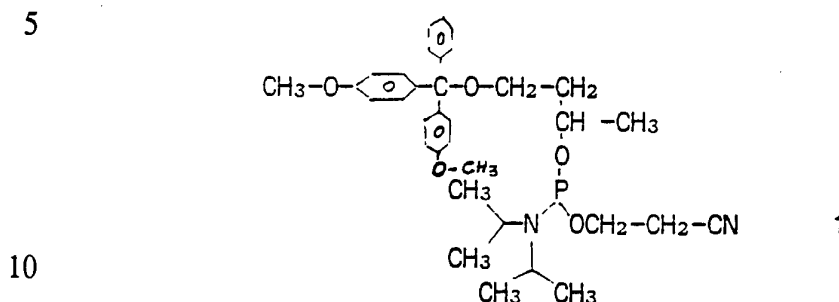


dans laquelle R_2 a les significations données précédemment.

- 5 Plus particulièrement, à l'étape a) la protection se fait au moyen du chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle, et à l'étape b) a lieu une phosphorylation de la fonction alcool secondaire au moyen de la diisopropylaminocyanoéthoxychlorophosphine (XI). L'invention concerne également les composés de formule XXI, à titre d'intermédiaires de synthèse des sondes de formule XX, ainsi qu'un procédé, tel que
- 10 décrit ci-dessus, pour la préparation des composés intermédiaires de formule XXI. D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

EXEMPLE I: Préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 3-O-[N,N'diisopropylamino-2-cyanoéthoxyphosphino] 1,3-butanediol

Le dérivé 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 3-O-[N,N' diisopropylamino,2cyanoéthoxyphosphino] 1,3-butanediol 1 répond à la formule :



L'approche suivie a pour objectif la préparation d'un synthon non nucléotidique portant cependant les groupes chimiques qui permettent son introduction dans une chaîne oligonucléotidique ou dans un polymère non nucléotidique dont les monomères sont unis par un lien phosphodiester dans les conditions de synthèse automatique d'ARN ou d'ADN habituelles. Ce synthon a l'avantage de fournir à l'utilisateur un outil permettant l'introduction de "bras chimiques" en 3'(OH) et (ou) en 5'(OH) d'une séquence d'acides nucléiques sans sortir de la routine de synthèse automatique ou manuelle. Le rôle du bras chimique dans cet assemblage est d'introduire des espacements entre les différents éléments de marquage d'une part, et entre les éléments de marquage et la séquence d'acides nucléiques d'autre part, en vue d'une meilleure efficacité des deux parties respectivement dans leur rôle d'hybridation et de détection.

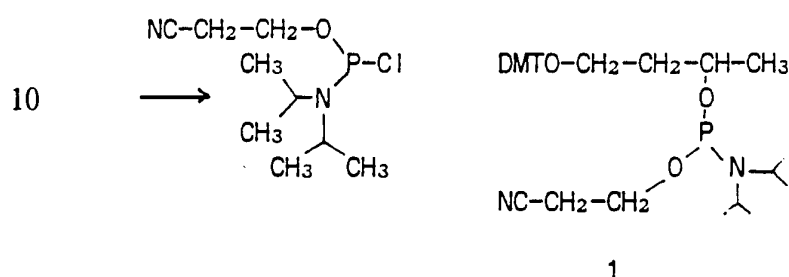
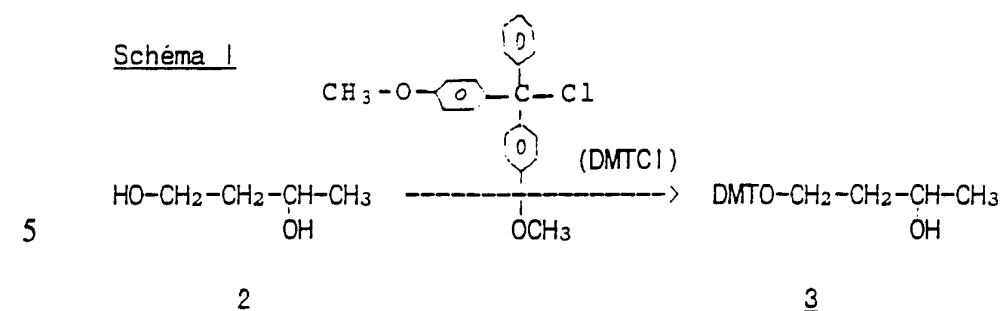
Les groupes 4,4'-diméthoxytrityle et 2-cyanoéthoxydiisopropylamino phosphoramidite sont appropriés à une synthèse aux phosphoramidites, notamment sur support solide.

Le chemin réactionnel pour l'obtention du composé 1 présenté dans le schéma I ci-après comporte les étapes suivantes :

1. Protection sélective de l'alcool primaire du 1,3-butanediol 2 par le groupe 4,4'-diméthoxytrityle (DMT) labile à pH acide.
2. Phosphorylation de l'alcool secondaire 3. L'exemple du phosphoramidite montré dans le schéma n'est pas limitatif; on peut envisager aussi la synthèse d'un phosphate triester ou diester ou d'un phosphonate.

20

Schéma I



15 Procédé de préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-1,3-butanediol 3

Dans un ballon bicol de 100cc, on met 2,25gr (25mmoles) de 1,3butanediol 2 sous atmosphère d'argon. On ajoute 40cc de pyridine anhydre puis on ajoute à la solution, par petites portions 11 gr (32.5mmoles) de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle. On agite magnétiquement à température ambiante et sous argon pendant 1h30. On ajoute

20 alors au mélange réactionnel 10cc de méthanol. Cette opération a pour but de neutraliser l'excès de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle. On hydrolyse alors le mélange réactionnel (100cc de NaHCO₃ 5%), on extrait deux fois au dichlorométhane (CH₂Cl₂-2 fois 75cc). La phase organique obtenue est lavée trois fois avec une solution de bicarbonate de sodium 5% (NaHCO₃ 5%). La phase

25 organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium (MgSO₄), filtrée puis évaporée (évaporateur rotatif p=20mm Hg).

Le résidu est purifié sur colonne de silice Merck 9385- éluant CH₂Cl₂. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension, dans une solution de CH₂Cl₂ contenant 1% de diisopropyléthylamine (DIEA). Après purification, on récupère

30 6.79g du composé 3 (17.32mmoles) Rdt. 69%.

Chromatographie sur couche mince (C.C.M.) plaque Merck 5735 (gel de silice 60F₂₅₄) éluant CH₂Cl₂: RF = 0.3.

35

Procédé de préparation du 1-0-(4,4'-diméthoxytrityl) 3-0-[N,N' diisopropylamino)-2-cyanoéthoxyphosphino]1,3-butanediol 1

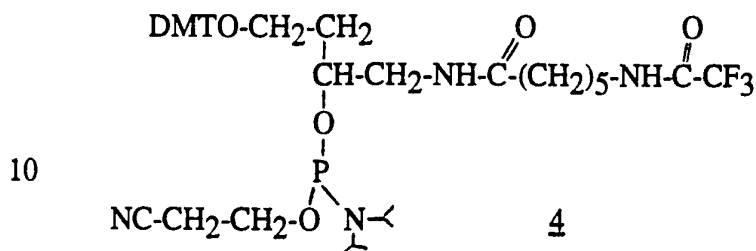
Dans un ballon bicol de 100cc, on introduit 6.7gr de composé 3 (17.3mmoles). On met sous atmosphère d'argon puis on ajoute 52cc de tétrahydrofurane anhydre et 9cc
5 (51.9mmoles) de diisopropyléthylamine. On ajoute ensuite au mélange réactionnel à la seringue et goutte à goutte 5.52g (23.35mmoles, 5cc) de 2-cyanoéthoxydiisopropylamino chlorophosphine.

Après dix minutes de réaction, un important précipité apparaît au sein du mélange réactionnel (chlorhydrate de diisopropyléthylamine). On filtre ce précipité, on ajoute
10 au filtrat 100cc d'acétate d'éthyle, on lave la phase organique ainsi obtenue trois fois avec une solution de NaHCO_3 5%. La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée (évaporateur rotatif, $p=20\text{mm Hg}$). Le résidu est purifié sur colonne de silice Merck 9385 - éluant acétate d'éthyle 4-hexane 6. La silice a préalablement été neutralisée par mise en suspension dans de l'éluant contenant 1%
15 de DIEA. Après purification, on récupère 9.24g du composé 1. Rdt. 90%.

Chromatographie sur couche mince (C.C.M.) plaque Merck 5735 (gel de silice 60F₂₅₄), éluant Acétate d'éthyle 5 - hexane 5. RF : 0.8 (le produit de départ de cette réaction 3 a, dans ces conditions, un RF de 0.5).

EXEMPLE II : Préparation du 1-0-(4,4'-diméthoxytrityl)3-0-(N,N'-diisopropylamino 2-cyanoéthoxyphosphino) 4-amido-(6-trifluoroacétylamido) caproate 4-amino 1,3-butanediol 4

Le dérivé 1-0-(4,4'-diméthoxytrityl)3-0-(N,N'-diisopropylamino 2-cyanoéthoxyphosphino) 4-amido-(6-trifluoroacétylamido) caproate 4-amino 1,3-butanediol 4 répond à la formule :



L'approche suivie a pour objectif la préparation d'un synthon non nucléotidique portant cependant les groupes chimiques qui permettent son introduction dans une chaîne oligonucléotidique ou dans un polymère non-nucléotidique dont les monomères sont unis par un lien phosphodiester dans les conditions habituelles de synthèse automatique ou manuelle d'ARN ou d'ADN.

Ce système a l'avantage de fournir à l'utilisateur un outil permettant l'introduction en 3'(OH) et (ou) en 5'(OH) d'une séquence d'acides nucléiques, un ou plusieurs éléments de marquage non isotopique, sans sortir de la routine de synthèse automatique ou manuelle. Les éléments de marquage sont séparés de la chaîne oligonucléotidique d'une part, et séparés les uns des autres d'autre part, par des "bras chimiques". Le rôle direct de l'élément de marquage tel que décrit dans cet exemple, est d'introduire en 5'(OH) et (ou) en 3'(OH) d'une chaîne oligonucléotidique des bras "amine primaire" séparés les uns des autres par des "bras chimiques". Les bras aminés sont capables, de par leur nucléophilicité, de fixer ultérieurement un élément de détection directe ou indirecte (enzyme, fluorescéine, biotine, digoxigénine,...).

Les groupes 4,4'-diméthoxytrityle et N,N' diisopropylamino 2-cyanoéthoxy phosphoramidite sont appropriés à une synthèse aux phosphoramidites.

Le chemin réactionnel pour l'obtention du composé 4 présenté dans le schéma II ci-après comporte les étapes suivantes :

1. Protection de l'alcool du 3-butène 1-ol 5 par le 4,4'-diméthoxytrityl (DMT) labile à pH acide.
2. Epoxydation de l'oléfine terminale 6 par l'acide metachloroperbenzoïque.
3. Ouverture de l'époxyde 7 par l'ammoniaque
4. Protection de l'amine primaire de l'acide 6-aminocaproïque par le groupe

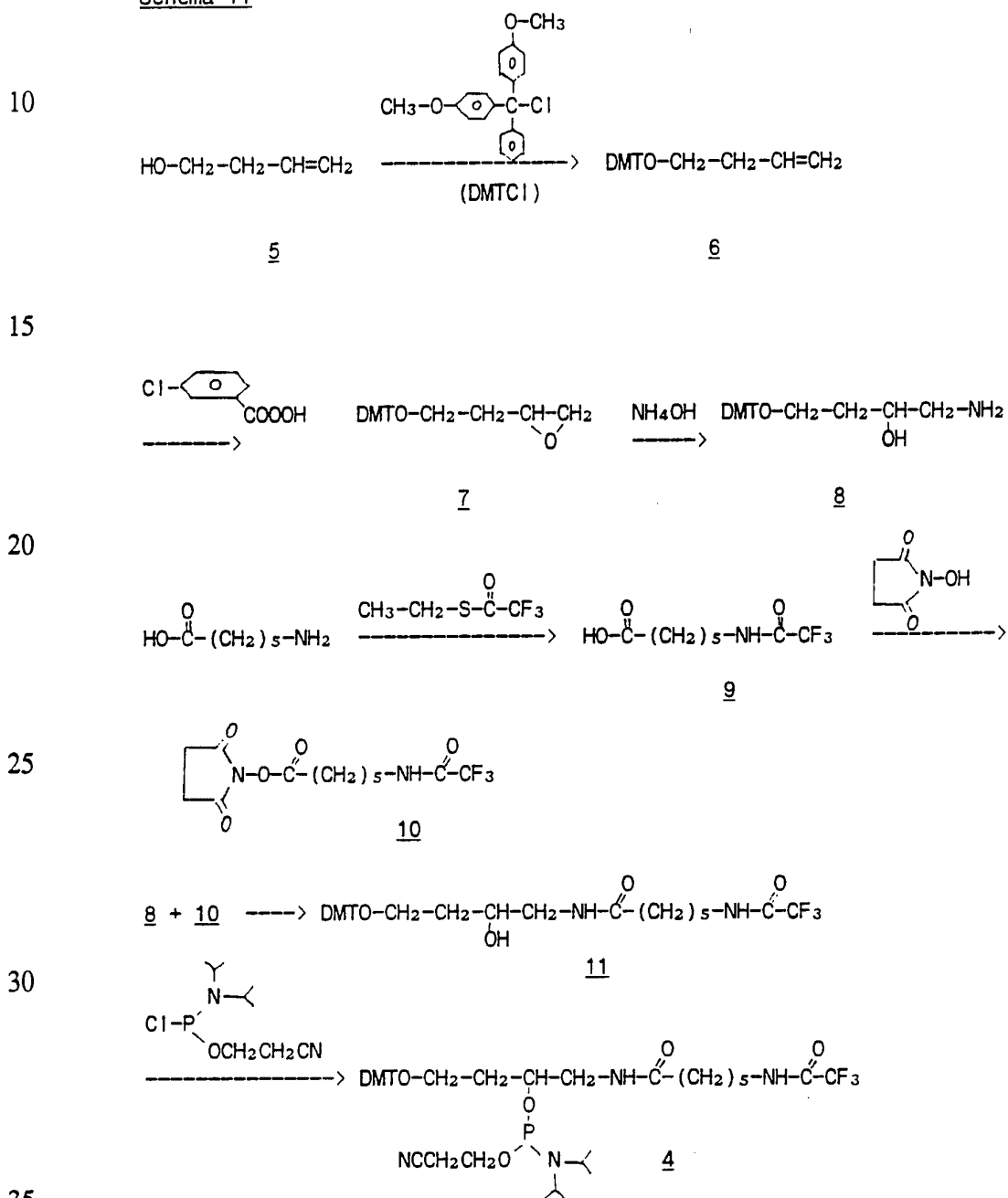
trifluoroacétyl.

5. Activation de l'acide carboxylique du dérivé 9 en ester N-hydroxysuccinimique 10.

6. Condensation entre le composé 8 et le composé 10.

7. Phosphorylation de l'alcool secondaire 11. L'exemple du phosphoramidite montré dans le schéma n'est pas limitatif. On peut aussi envisager la synthèse d'un phosphate triester ou diester ou d'un phosphonate.

Schéma 11



Procédé de préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 3-butène 1-ol 6

Dans un ballon bicol de 250 ml, on met 3,6 gr (50 mmoles) de 3-butène 1-ol sous argon, en solution dans 80cc de pyridine anhydre. On introduit par petites portions 22 g (65 mmoles) de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (la réaction est légèrement

5 exothermique).

On maintient à température ambiante et sous agitation magnétique pendant 4 h. On ajoute alors au mélange réactionnel 10cc de méthanol afin de neutraliser l'excès de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle. On hydrolyse alors le mélange réactionnel avec 100cc de NaHCO₃ 5%. On extrait le mélange deux fois avec 150cc de

10 dichlorométhane. La phase organique obtenue est lavée trois fois avec NaHCO₃ 5%, trois fois à l'eau et une fois avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique obtenue est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée (évaporateur rotatif p: 20 mm Hg).

Le résidu obtenu est ensuite coévaporé avec du toluène afin d'entraîner azéotropiquement la pyridine résiduelle, puis coévaporé avec du dichlorométhane afin d'entraîner azéotropiquement le toluène résiduel. Le résidu est alors purifié sur

15 colonne de silice Merck 9385 éluant: hexane 1 - dichlorométhane - 9. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant contenant 1% de DIEA. Le composé 6 est obtenu avec 90% de rendement.

20 Chromatographie sur couche mince (CCM) plaque Merck 5735 (gel de silice 60F₂₅₄) éluant dichlorométhane RF: 0.85.

Procédé de préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 3,4-butène oxyde 7

L'acide m-chloroperbenzoïque commercial contient 50% d'eau; afin d'éliminer cette

25 eau, on le met en solution dans du dichlorométhane et on élimine l'eau par décantation. Dans un erlen de 100cc, on introduit 8,5 g d'acide m-chloroperbenzoïque à 50% (24.6 mmoles), on le met en solution dans 64cc de dichlorométhane. On décante la phase aqueuse surnageant. Dans un ballon de 250cc, on met 6.35 g de composé 6 (17 mmoles) sous atmosphère d'argon. On le met en solution dans 40cc de

30 dichlorométhane. On ajoute ensuite lentement la solution de peracide préparée (comme décrit ci-dessus). On agite le mélange réactionnel magnétiquement pendant 8 h. On filtre alors le précipité qui s'est formé (acide m-chlorobenzoïque). On ajoute au filtrat 150cc de dichlorométhane et on l'hydrolyse avec 75cc de NaHCO₃ 5%. La phase organique est lavée quatre fois avec 75cc de NaHCO₃ 5%, puis séchée sur

35 MgSO₄, filtrée et évaporée (évaporateur rotatif p=20 mm Hg). Le résidu est purifié

sur colonne de silice Merck 9385 - éluant hexane 2 - dichlorométhane 8. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant contenant 1% de DIEA. Après purification, on obtient 5.32 g d'époxyde 7, Rdt 80%.

5 Procédé de préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 4-amino 1,3-butanediol 8

Dans un ballon en pyrex de 25cc muni d'un bouchon à visser et capable de supporter des pressions importantes, on introduit 3g (7,6 mmoles) d'époxyde 7, 10cc d'acétonitrile et 25cc d'ammoniaque à 32%. On chauffe 8 heures à 60°C puis on évapore l'eau et l'acétonitrile. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice Merck 9385 éluant CH₂Cl₂-CH₃OH, la proportion de méthanol est progressivement portée de 2% à 10%. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant de départ contenant 1% de DIEA. Après purification, on obtient le dérivé 8 avec un rendement de 75%. Chromatographie sur couche mince (CCM) - plaque Merck 5735, gel de silice 60F₂₅₄ - éluant 20% CH₃OH - 80% CH₂Cl₂, RF 0.2.

15

Procédé de préparation de l'acide 6-trifluoroacétamidocaproïque 9

Dans un ballon rotavapor de 50cc, on introduit 2.62g (2×10^{-2} moles) d'acide 6-aminocaproïque. On le met en suspension dans 4cc de diméthylformamide anhydre, puis on ajoute à la suspension 3cc ($2,35 \times 10^{-2}$ moles) de S-éthyl trifluoro thioacétate. On met sous atmosphère d'argon et on agite 4 heures, la solution est alors limpide. On évapore la diméthylformamide sous pression réduite (P = 20mm Hg). Le résidu est cristallisé dans le dichlorométhane. Le composé 9 est obtenu avec un rendement de 84%. Chromatographie sur couche mince (CCM)- plaque Merck 5735, gel de silice 60F₂₅₄ - éluant 20% CH₃OH-80% CH₂Cl₂. RF 0.5.

25

Procédé de préparation du 6-trifluoroacétamido caproate de N-hydroxysuccinimide 10.

Dans un ballon de 100ml, on introduit 2,27 g (10^{-2} mole) de composé 9, 2,04 g (10^{-2} mole) de dicyclohexylcarbodiimide et 1,15 g (10^{-2} mole) de N-hydroxysuccinimide. On ajoute 40cc de CH₂Cl₂ et on agite 5 heures sous atmosphère d'argon. Un précipité blanc s'est formé, il est filtré. Le filtrat est évaporé. Le résidu obtenu ne présente qu'une seule tache en chromatographie sur couche mince, il n'est pas purifié, le rendement est quantitatif. Chromatographie sur couche mince (CCM) - plaque Merck 5735, gel de silice 60F₂₅₄ - éluant 5% CH₃OH-95% CH₂Cl₂. RF 0.7.

35

Procédé de préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 4-amido(6trifluoro-acétylamido) caproate 4-amino 1,3-butanediol 11

Dans un bicol de 50cc, on met sous atmosphère d'argon 2,44 g (6 mmoles) de composé 8 et 3,44 g de composé 10 (9,45 mmoles). On met en solution dans 25cc de diméthylformamide anhydre et on agite 16 heures. On évapore alors la
5 diméthylformamide au rotavapor sous pression réduite (P = 20 mmHg). Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice Merck 9385, éluant 5 hexane - 95 CH₂Cl₂, puis CH₃OH 2⇒10 - CH₂ Cl₂ 98⇒90. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant initial contenant 1% de DIEA. Après purification, le
10 composé 11 est obtenu avec 84% de rendement. Chromatographie sur couche mince (CCM)- plaque Merck 5735, gel de silice 60F₂₅₄ - éluant 10% CH₃OH-90% CH₂Cl₂. RF 0.8.

Procédé de préparation du 1-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 3-O-(N,N' diisopropylamino 2-cyanoéthoxyphosphino) 4-amido-(6-trifluoroacétylamido) caproate 4-amino 1,3-butanediol 4

Dans un ballon bicol de 50cc, on met sous atmosphère d'argon 2 g (3 mmoles) de dérivé 11. On ajoute 17 ml de tetrahydrofuranne anhydre, 1,6cc de diisopropyléthylamine et 0.88cc (4,1 mmoles) de N,N' diisopropylamino 2-
20 cyanoéthoxychlorophosphine. On agite 1 heure à température ambiante, on ajoute alors à la solution 25cc d'acétate d'éthyle et 20cc de NaHCO₃ 5%. La phase organique obtenue est ensuite lavée trois fois avec NaHCO₃ 5%, elle est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous vide (P = 20mm Hg). Le résidu est purifié sur
25 colonne de silice Merck 9385, éluant hexane 15 - acétate d'éthyle 85. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant contenant 1% de DIEA. Après purification, on obtient le dérivé 4 avec 62% de rendement. Chromatographie sur couche mince (CCM) - éluant hexane 10 - acétate d'éthyle 90. RF 0.75.

EXEMPLE III: Etude de la réactivité des dérivés 1 et 4

Les phosphoramidites non nucléotidiques 1 et 4 peuvent être utilisés pour introduire en 5'(OH) et (ou) en 3'(OH) d'un oligonucléotide, respectivement:

- des bras chimiques (dérivé 1)

5 - des bras "amine primaire" (dérivé 4)

Les bras "amine primaire" sont séparés les uns des autres et séparés de la chaîne oligonucléotidique par des bras chimiques.

Dans le but de réaliser de tels édifices biopolymériques, la réactivité des composés 1 et 4 a été testée dans les conditions de synthèse automatique d'ADN ou d'ARN habituelles.

A cet effet, les dérivés 1 et 4 ont été condensés dans l'appareil de synthèse automatique des oligonucléotides, ils ont été condensés en 5'(OH) d'un dimère thymidine-thymidine (T-T) fixé sur un support solide (support CPG - Controlled Porous Glass, classique en synthèse automatique).

15 Si l'on appelle N le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1, les dimères T-T modifiés en 5'(OH) qui ont été synthétisés sont les suivants :

NTT 12

STT 13

20 NSTT 14

SNSTT 15

Les dérivés 1 et 4 se fixent avec succès en 5'(OH) d'un oligonucléotide en élongation (cfr. NTT, STT). Le composé 4 se fixe avec succès à la suite d'un bras chimique (cfr. NSTT) et le composé 1 se fixe bien à la suite d'un bras aminé (cfr. SNSTT).

25 Toutes les conditions (temps de couplage, concentration réactifs et solvants) habituellement utilisées au cours d'un cycle d'élongation oligonucléotidique se sont révélées adéquates en ce qui concerne la condensation de 1.

Néanmoins, pour la condensation de 4, les conditions habituellement utilisées (concentration en phosphoramidite 0.1M et temps de condensation 25 sec) ont dû être optimisées. En fait, le dérivé 4 se condense avec un rendement quasi quantitatif si on utilise une concentration 0.1M en phosphoramidite et un temps de condensation de 10 minutes.

30 On obtient dans chacun des quatre essais de condensation effectués un produit quasiment pur ainsi que le montrent les résultats d'analyse en électrophorèse capillaire (Fig. 1). Ces résultats montrent que les réactions de condensation,

d'oxydation de capping et de clivage du support solide après synthèse sont efficaces et ne dégradent pas les trimères (NTT, STT), tetramères (NSTT) et pentamères (SNSTT) formés. Par ailleurs, en synthèse oligonucléotidique, il est possible de récupérer la solution de déprotection du groupe diméthoxytrityle et de mesurer
5 l'intensité de la coloration orange du cation en vue d'estimer le rendement de chaque condensation. Ces mesures ont été faites pour les condensations de S et N, elles indiquent des rendements quasi quantitatifs.

La labilité du groupe protecteur de l'amine (groupe trifluoroacétyl) a également été étudiée. En fait, les conditions classiques de clivage d'une chaîne oligonucléotidique
10 du support solide (NH_4OH 32%, 1h, RT) et les conditions classiques de déprotection des phosphates et des amines des bases de la chaîne oligonucléotidique (NH_4OH 32%, 8h, 55°C) se sont révélées suffisantes pour déprotéger l'amine primaire introduite dans les polymères 12, 14 et 15 par condensation d'un monomère 4.

15 Couplage en phase solide du dérivé 1 ou du dérivé 4 avec un dimère thymidine-thymidine fixé sur un support solide insoluble.

Le dérivé 1, ou le dérivé 4, solubilisé dans l'acétonitrile anhydre à une concentration de 0.1M est activé par le tétrazole 0.5M dans le même solvant et condensé avec le groupe hydroxylique en position 5' d'un dimère thymidine-thymidine fixé sur un
20 support solide insoluble habituellement utilisé en synthèse oligonucléotidique dans un synthétiseur ABI 394. En ce qui concerne la condensation du composé 1, toutes les conditions sont identiques à celles utilisées dans un cycle d'élongation oligonucléotidique (N.D.Sinha, J.Biernat, J.McManus et H.Köster, Nucleic Acids Research (1984) 12(11), 4539).

25 En ce qui concerne la condensation du composé 4, toutes les conditions sont identiques à celles utilisées dans un cycle d'élongation oligonucléotidique, à l'exception du temps de couplage qui est porté à 10 minutes alors qu'il est de 25 secondes dans les conditions classiques de couplage.

Le clivage du support solide est réalisé dans les conditions habituelles (NH_4OH 32%)
30 et le produit final est obtenu avec un rendement comparable à ceux couramment réalisés en synthèse oligonucléotidique.

Les tri-, tetra- et pentamères synthétisés 12, 13, 14 et 15 ont été analysés en électrophorèse capillaire (cfr. fig. 1) ABI 270A, colonne capillaire MICRO-GEL100, diamètre interne 50µm, longueur 50cm, voltage 15kV, tampon 75mM Tris-phosphate
35 10% méthanol pH 7.6.

EXEMPLE IV : Préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 5'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés utiles dans la détection de séquences d'ADN par des méthodes non radioactives.

- 5 La synthèse et l'utilisation de molécules mixtes composées d'une partie oligodésoxynucléotidique et d'une autre partie possédant des propriétés chimiques caractéristiques permettent la détection facile et rapide de cibles d'acides désoxyribonucléiques par des méthodes non radioactives. La partie oligodésoxyribonucléotidique de séquence définie et homologue d'un fragment
- 10 d'ADN cible apporte l'énergie de stabilisation et assure son hybridation avec la molécule d'ADN que l'on veut détecter. La partie qui fournit la réactivité permettant la détection directe ou indirecte de l'hybride peut être introduite en l'extrémité 5'(OH) et (ou) 3'(OH) de la séquence d'acides nucléiques. Dans cet exemple précis, la partie responsable de la détection sera essentiellement introduite en 5'(OH) de la séquence
- 15 d'acides nucléiques.

- La partie responsable de la détection sera introduite en 5'(OH) de la chaîne oligonucléotidique encore fixée sur le support solide et protégée sur ses bases et ses phosphates en procédant à une série de condensations des dérivés 1 et 4 en utilisant les mêmes cycles de réaction dans le synthétiseur automatique d'ADN que ceux mis
- 20 en oeuvre pour la synthèse de la séquence d'acides nucléiques. Toutefois en ce qui concerne le dérivé 4, le temps de condensation sera porté à 10 minutes au lieu des 25 secondes du cycle classique.

- Après clivage de la chaîne oligonucléotidique 5' modifiée, de son support solide, et déprotection des bases et des phosphates, la partie qui fournit la réactivité responsable
- 25 de la détection sera introduite par un lien chimique covalent. Parmi les différentes molécules possédant les propriétés requises pour la détection, on utilise de préférence la biotine, la digoxigénine, la fluorescéine, la peroxydase et l'alkaline phosphatase. Ces molécules, judicieusement activées, sont fixées sur la chaîne oligonucléotidique au niveau des amines primaires introduites à cet effet en raison de leur
- 30 nucléophilicité.

Si l'on appelle N le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1, les oligomères modifiés en 5'(OH) qui ont été synthétisés sont les suivants :

- | | | |
|----|-------------------------------|----|
| | NSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA | 16 |
| 35 | NSSNSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA | 17 |

NSSNSSNSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 18

NSSNSSNSNSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 19

Après clivage de la chaîne oligonucléotidique ainsi modifiée de son support solide et déprotection des bases et des phosphates, les sondes 16, 17, 18 et 19 sont biotinylées,

5 pour conduire aux sondes biotinylées 20, 21, 22 et 23 qui sont analysées en électrophorèse capillaire (Fig. 2a, 2b).

Si l'on appelle B le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 suivie d'une biotinylation, et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1, les sondes mono- ou polybiotinylées en 5'(OH) qui ont été obtenues sont les

10 suivantes:

BSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 20

BSSBSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 21

BSSBSSBSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 22

BSSBSSBSSBSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 23

15 Fig. 2a, 2b.

Procédé de préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 5'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés 16, 17, 18 et 19

20 Une sonde ADN a été synthétisée avec une séquence oligodésoxynucléotidique complémentaire d'une séquence cible. On prépare, en phase solide, dans un synthétiseur automatique d'ADN ABI 394 simultanément quatre sondes identiques (dans quatre réacteurs) de séquence 5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 3'.

25 Le synthétiseur est programmé pour continuer des cycles de fixation en 5' d'unités 1 et 4 pour conduire respectivement aux biopolymères 16, 17, 18 et 19. Pour ce faire, on a utilisé 6 mg de support CPG fonctionnalisé avec de la diméthoxytrityl isobutyl guanosine à 34 µmoles/g, ce qui correspond à 0.2 µmole. Le dérivé 1 et le dérivé 4 sont solubilisés dans l'acétonitrile anhydre à une concentration 0.1M et introduits dans le synthétiseur aux endroits prévus pour des phosphoramidites non classiques.

30 Après synthèse automatique des biopolymères 16, 17, 18 et 19, les chaînes oligonucléotidiques ainsi modifiées sont clivées des supports CPG par quatre traitements successifs de 15 minutes avec 500 µl de NH₄OH 32%. Les solutions ammoniacales obtenues sont portées 5 h à 55°C. Ce deuxième traitement a pour but de déprotéger les bases et les phosphates des chaînes oligonucléotidiques. Les
35 solutions ammoniacales sont liophylisées, les quatre résidus sont soumis à une

chromatographie par filtration moléculaire (gel sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%.

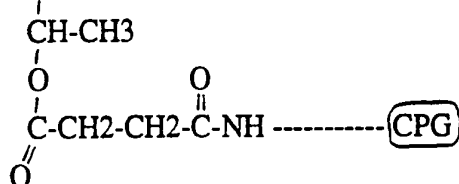
- 5 Procédé de biotinylation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 5'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés.
Préparation des sondes biotinylées 20, 21, 22, 23

- Dans un tube Eppendorf, on dissout 20DO de sonde aminée 16, 17, 18 ou 19 dans 120 µl de tampon phosphate 0.01M pH 7.5. On ajoute une solution de 20 mg de sulfosuccinimidyl 6-biotinamidocaproate dans 240 µl de diméthylformamide. On
- 10 laisse incuber à température ambiante 16h. Chaque solution est soumise à une chromatographie par filtration moléculaire (gel sephadex G50), puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%. Les sondes biotinylées 20, 21, 22 et 23 ont été analysées en électrophorèse capillaire Micro-Gel₁₀₀ diamètre interne 50 µm, longueur 50 cm, voltage 15kV, tampon 75 mM Tris-phosphate - 10% methanol
- 15 pH 7,6.

EXEMPLE V : Préparation d'un support solide CPG (controlled porous glass) fonctionnalisé par le 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 1,3-butanediol

Le support CPG fonctionnalisé par le 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 1,3butanediol 3 a pour formule 24

5 DMTO-CH₂-CH₂

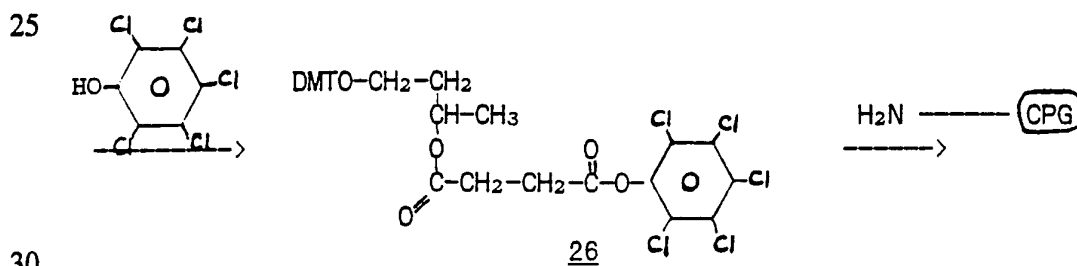
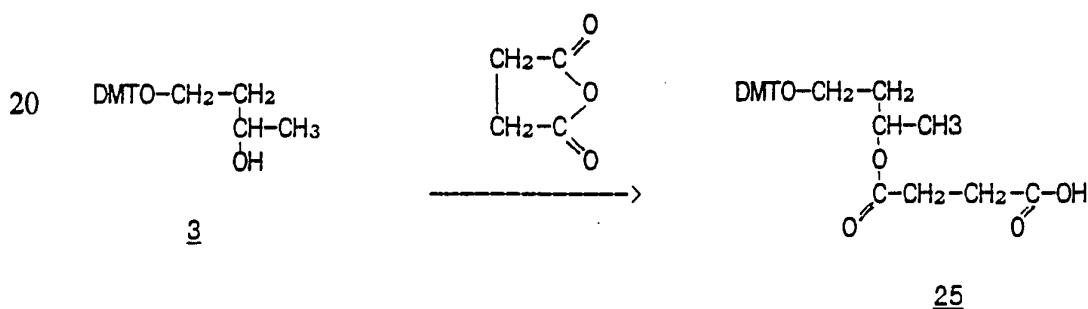


24

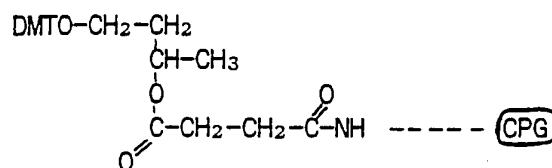
10 L'approche suivie a pour objectif la préparation d'un support solide judicieusement fonctionnalisé en vue de la préparation de sondes d'acides nucléiques dans lesquelles un ou plusieurs éléments de marquage entrecoupés de bras chimiques sont introduits en 3'(OH) de la sonde par toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique sur support solide.

15 La méthode adoptée pour fonctionnaliser le support CPG comporte les étapes suivantes (schéma III).

Schéma III



30



24

35

Le 1-O-(4,4' diméthoxytrityl)1,3-butanediol 3 est acylé sur l'alcool secondaire libre par l'anhydride succinique puis l'acide généré 25 est activé sous forme d'ester pentachlorophénolique 26. Le support CPG porte en surface des fonctions "amine primaire" qui fixeront le dérivé 26 par formation d'un lien amide à partir de l'ester
5 activé.

Procédé de préparation de 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 3-succinate 1,3-butanediol 25

Dans un ballon bicol de 50cc, on met sous argon 2,35 g (6 mmoles) de composé 3, on ajoute 22cc de pyridine anhydre, 0,74g (6.1 mmoles) de 4diméthylaminopyridine et
10 0.64g (6.4 mmoles) d'anhydride succinique. On agite magnétiquement le mélange réactionnel pendant 3 jours à température ambiante. On ajoute alors du toluène au mélange réactionnel et on procède à un entraînement azéotropique de la pyridine par le toluène (évaporateur rotatif p=20mm Hg). Le résidu obtenu est dissous dans 75cc de dichlorométhane. La phase organique ainsi obtenue est lavée deux fois avec une
15 solution d'acide citrique 4×10^{-2} M. La phase organique est alors séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée (évaporateur rotatif p=20mm Hg). Le résidu est purifié sur colonne de silice Merck 9385 - éluant: gradient Hexane 15 - CH_2Cl_2 85 $\Rightarrow$ CH_2Cl_2 100 $\Rightarrow$ MeOH3- CH_2Cl_2 97. La silice a préalablement été neutralisée par mise en suspension dans l'éluant de départ contenant 1% de DIEA. On obtient après purification 1 g de
20 composé 25. Rdt: 34%.

Procédé de préparation du 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 3-(pentachlorophenoxy-succinate) 1,3-butanediol 26

Dans un ballon bicol de 25cc, on introduit 1g de composé 25 (2mmoles), on met sous
25 atmosphère d'argon et on ajoute une solution de 14cc de diméthylformamide anhydre contenant 0.58g de pentachlorophénol (2.2 mmoles) et 0.62g de dicyclohexylcarbodiimide (3 mmoles). On agite le mélange réactionnel magnétiquement pendant 24h à température ambiante. On filtre le précipité de dicyclohexylurée puis le précipité est lavé avec 50cc de benzène. On évapore le benzène.
30 Le résidu est purifié sur colonne de silice Merck 9385 - éluant hexane 15 - dichlorométhane 85. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant contenant 1% de DIEA. Après purification, on obtient 1.7 g de composé 26. Rdt = $\pm$ 100%.

Procédé de préparation d'un support solide CPG (Controlled Porous Glass) fonctionnalisé par des groupements 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 1,3-butanediol 24

- Le support solide utilisé (PIERCE Ref.24875) a une porosité de 500Å, il est fonctionnalisé en surface par des groupes "amine primaire". Dans un ballon de 10cc,
- 5 on introduit 0.5 g de support CPG aminé, 0.2 cc de triéthylamine fraîchement distillée, 0.385 g d'ester pentachlorophénolique 26 (0.26 mmole) et 1.3 cc de diméthylformamide anhydre. On ferme le ballon et on agite à 37°C pendant 24h. A ce moment, on contrôle sur un petit aliquot de support solide qu'il a effectivement été fonctionnalisé par 26. L'aliquot est lavé plusieurs fois à l'éthanol puis à l'éther, puis il
- 10 est traité avec une solution 0.1M d'acide p toluène sulfonique dans l'acétonitrile anhydre. Cette opération a pour but de déprotéger l'alcool primaire et de faire apparaître la coloration orange du cation diméthoxytrityl formé dans ce milieu anhydre. Si donc la coloration orange apparaît, on peut poursuivre le traitement du support ainsi fonctionnalisé.
- 15 On procède alors à la neutralisation des fonctions amine primaire du support n'ayant pas réagi. Pour cela, on ajoute au mélange réactionnel 70µl d'anhydride acétique et on laisse agir 10 minutes à 37°C. On filtre ensuite le support solide. Le support est ensuite successivement lavé avec 20cc de diméthylformamide, 20cc d'alcool éthylique, 20cc de dioxanne et 20cc d'éther éthylique. Il est ensuite séché sous vide
- 20 au dessiccateur (p= 20mm Hg) en présence de pentoxyde de phosphore. On procède alors à une détermination du nombre de molécules 26 fixées sur le support par dosage spectroscopique (visible) du nombre de groupes 4,4'-diméthoxytrityle libérés en milieu acide par gramme de support.

- Dans un flacon jaugé de 10cc, on introduit 8.1 mg de support CPG fonctionnalisé, on
- 25 ajoute 10 ml d'acide p toluène sulfonique 0.1 M dans l'acétonitrile anhydre. La solution se colore en orange, la lecture se fait à 497 nm. $\epsilon = 7.10^4$. On mesure une absorbance de 1.72.

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{1.72}{7.10^4 \times 1} = 0.245 \cdot 10^{-4} \text{ mole/l}$$

- 30 La fonctionnalisation du support est donc de 30.3 µmole/g.

EXEMPLE VI : Etude de la réactivité d'un support CPG fonctionnalisé par des unités 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 1,3-butanediol

Le support CPG 24 fonctionnalisé par des unités 1-O-(4,4' diméthoxytrityl) 1,3-butanediol peut être utilisé pour introduire en 3'(OH) d'un oligonucléotide

- 5 - des bras chimiques (condensation du dérivé 1)
- des bras "amine primaire" (condensation du dérivé 4).

Les bras "amine primaire" sont séparés les uns des autres et séparés de la chaîne oligonucléotidique par des bras chimiques.

Dans le but de réaliser de tels édifices biopolymériques, la réactivité du support CPG
10 24 a été testée dans les conditions de synthèse automatique d'oligonucléotides. A cet effet, le support CPG 24, introduit dans un réacteur de l'appareil de synthèse automatique d'oligonucléotides, a été soumis à une série de condensations respectivement des phosphoramidites 1, 4 et celui de la thymidine (T).

Si l'on appelle N le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 et S le bras
15 chimique provenant de la condensation d'une unité 1, les polymères qui ont été synthétisés sont les suivants :

TTSS 27
TTNS 28
SSTT 29
20 NSTTSNS 30

Le tetramère SSTT a uniquement été synthétisé pour une comparaison en électrophorèse capillaire avec TTSS. Les phosphoramidites 1 et 4 se fixent donc avec succès sur le support CPG 24 dans les conditions classiques (temps de couplage, solvant, réactifs) de condensation dans un synthétiseur automatique
25 d'oligonucléotides. Toutefois, en ce qui concerne la condensation du composé 4, le temps de couplage a dû être porté à 10 minutes au lieu des 25 secondes du cycle classique. De plus, les conditions classiques utilisées pour le clivage des oligonucléotides de leur support solide (NH₄OH 32% - 4x(500 µl-15 minutes) se sont avérées adéquates puisque les composés 27, 28 et 30 ont été obtenus avec de bons
30 rendements.

On obtient dans chacun de ces essais de condensation effectués, un produit relativement pur ainsi que le montrent les résultats d'analyse en électrophorèse capillaire (Fig. 3).

Par ailleurs, en synthèse oligonucléotidique, il est possible de récupérer la solution de
35 déprotection du groupe diméthoxytrityle et de mesurer l'intensité de la coloration

orange du cation en vue d'estimer le rendement de chaque condensation. Ces mesures ont été faites pour chaque condensation sur le support 24, elles indiquent des rendements quasi quantitatifs.

5 Condensation des phosphoramidites 1 et 4 sur le support CPG 24. Synthèse des polymères 27, 28 et 30.

- On réalise simultanément les trois polymères 27, 28 et 30 dans un synthétiseur automatique d'oligonucléotides ABI 394. Pour ce faire, on introduit dans trois réacteurs 6,6 mgr (0.2 μ mole) de support CPG 24 fonctionnalisé à 30,3 μ mole/g. Le
- 10 dérivé 1 et le dérivé 4 sont solubilisés dans l'acétonitrile anhydre à une concentration 0.1M et introduits dans le synthétiseur aux endroits prévus pour des phosphoramidites non classiques. Le synthétiseur est programmé pour effectuer des cycles de condensation de 1, 4 et T selon les séquences de 27, 28 et 30. Après
- 15 synthèse automatique de 27, 28 et 30, les polymères sont clivés des supports CPG par quatre traitements successifs de 15 minutes avec 500 μ l de NH_4OH 32%. Les solutions ammoniacales sont lyophilisées et les résidus sont analysés en électrophorèse capillaire (ABI 270A), colonne Micro-Gel₁₀₀ diamètre interne 50 μ m, longueur 50 cm, voltage 15kV, tampon 75 mM Tris-phosphate - 10% méthanol pH 7.6.

EXEMPLE VII : Préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 3'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés utiles dans la détection de séquence d'ADN par des méthodes non-radioactives.

- 5 Les molécules mixtes composées d'une partie oligodésoxyribonucléotidique et d'une autre partie possédant des propriétés chimiques caractéristiques permettent la détection facile et rapide de cibles d'acides désoxyribonucléiques par des méthodes non radioactives. La partie oligodésoxyribonucléotidique de séquence définie et homologue d'un fragment d'ADN cible apporte l'énergie de stabilisation et assure son
- 10 hybridation avec la molécule d'ADN que l'on veut détecter. La partie qui fournit la réactivité permettant la détection directe ou indirecte de l'hybride peut être introduite en l'extrémité 5'(OH) et (ou) 3'(OH) de la séquence d'acides nucléiques. Dans cet exemple précis, la partie responsable de la détection sera essentiellement introduite en 3'(OH) de la séquence d'acides nucléiques. La partie responsable de la détection sera
- 15 introduite en 3'(OH) de la chaîne oligonucléotidique en procédant d'abord à une série de condensations des dérivés 1 et 4 sur un support solide CPG 24 dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides. Lorsque la séquence souhaitée de bras chimiques et amine primaire a été édifiée dans le synthétiseur automatique, on procède, à la suite de l'édifice bâti, à la construction de la chaîne oligonucléotidique. Les condensations
- 20 des phosphoramidites 1 et 4 dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides sont réalisées en utilisant les mêmes cycles de réactions que ceux mis en oeuvre pour la synthèse de la séquence d'acides nucléiques. Toutefois, en ce qui concerne le dérivé 4, le temps de condensation est porté à 10 minutes au lieu des 25 secondes du cycle classique. Après clivage de la chaîne oligonucléotidique 3' modifiée de son support
- 25 solide et déprotection des phosphates et des bases de la chaîne oligonucléotidique, la partie qui fournit la réactivité responsable de la détection sera introduite par un lien chimique covalent. Parmi les différentes molécules possédant les propriétés requises pour la détection, on utilise de préférence la biotine, la digoxigénine, la fluorescéine, la peroxydase et l'alcaline phosphatase. Ces molécules, judicieusement activées, sont
- 30 fixées sur la chaîne oligonucléotidique au niveau des amines primaires introduites à cet effet en raison de leur nucléophilicité.

Si l'on appelle N le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1, les oligomères modifiés en 3'(OH) qui ont été synthétisés sont les suivants :

35 TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNS

TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNS 32

TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNSSNS 33

TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNSSNSSNS 34

Après clivage de la chaîne oligonucléotidique ainsi modifiée, de son support solide et
5 déprotection des bases et des phosphates, les quatre oligonucléotides sont analysés en
électrophorèse capillaire (Fig. 4).

Après déprotection des amines primaires, les sondes 31, 32, 33 et 34 sont biotinylées.
Les sondes biotinylées obtenues 35, 36, 37 et 38 sont analysées en électrophorèse
10 capillaire (Fig. 4).

Si l'on appelle B le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 suivie
d'une biotinylation et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1,
les sondes mono ou polybiotinylées en 3'(OH) qui ont été obtenues sont les suivantes:

TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBS 35

15 TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBS 36

TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBS 37

TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBSSBS 38

Procédé de préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant
20 en 3'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés.
Synthèse des sondes 31, 32, 33 et 34.

On réalise simultanément les quatre sondes 31, 32, 33 et 34 dans un synthétiseur
automatique d'ADN ABI 394. Pour ce faire, on introduit dans quatre réacteurs 6,6 mg
(0,2 μ mole) de support CPG 24 fonctionnalisé à 30.3 μ mole/gr. Le dérivé 1 et le
25 dérivé 4 sont solubilisés dans l'acétonitrile anhydre à une concentration 0.1 M et
introduits dans le synthétiseur aux endroits prévus pour des phosphoramidites non
classiques. Le synthétiseur est programmé pour débiter par des cycles de fixation des
phosphoramidites 1 et 4 selon les séquences respectives 31, 32, 33 et 34, puis
poursuivre avec les phosphoramidites nucléotidiques, la synthèse d'une séquence
30 d'acides nucléiques complémentaire d'une séquence cible :

5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 3'

Après synthèse automatique des biopolymères 31, 32, 33 et 34, les chaînes
oligonucléotidiques ainsi modifiées sont clivées des supports CPG par quatre
traitements successifs de 15 minutes avec 500 μ l de NH_4OH 32%. Les solutions
35 ammoniacales obtenues sont portées 5 heures à 55°C. Ce deuxième traitement a pour

but de déprotéger les bases et les phosphates des chaînes oligonucléotidiques. Les solutions ammoniacales sont lyophilisées, les quatre résidus sont soumis à une chromatographie par filtration moléculaire (gel Sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%.

5

Procédé de biotinylation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 3'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés. Préparation des sondes biotinylées 35, 36, 37 et 38.

Dans un tube eppendorf, on dissout 20 DO de sonde aminée 31, 32, 33 ou 34 dans
10 120 µl de tampon phosphate 0.01 M pH 7.5. On ajoute une solution de 20 mg de sulfosuccinimidyl 6-biotinamido caproate dans 240 µl de diméthylformamide. On laisse incuber à température ambiante 16 heures. Chaque solution est alors soumise à une chromatographie par filtration moléculaire (gel Sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%. Les sondes biotinylées 35, 36, 37 et
15 38 ainsi que les sondes aminées correspondantes 31, 32, 33 et 34 sont analysées en électrophorèse capillaire colonne Micro-Gel₁₀₀, diamètre interne 50 µm, longueur 50cm, voltage 15kV, tampon 75mM Tris-phosphate - 10% méthanol pH 7.6.

EXEMPLE VIII : Préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 3'(OH) et en 5'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés utiles dans la détection de séquences d'ADN par des méthodes non-radioactives.

5 Les molécules mixtes composées d'une partie oligodésoxyribonucléotidique et d'une autre partie possédant des propriétés chimiques caractéristiques permettent la détection facile et rapide de cibles d'acides désoxyribonucléiques par des méthodes non-radioactives. La partie oligodésoxyribonucléotidique de séquence définie et homologue d'un fragment d'ADN cible apporte l'énergie de stabilisation et assure son
10 hybridation avec la molécule d'ADN que l'on veut détecter. La partie qui fournit la réactivité permettant la détection directe ou indirecte de l'hybride peut être introduite en l'extrémité 5'(OH) et (ou) 3'(OH) de la séquence d'acides nucléiques. Dans cet exemple précis, la partie responsable de la détection sera introduite de part et d'autre de la chaîne oligonucléotidique simultanément en 5'(OH) et en 3'(OH).

15 La partie responsable de la détection sera introduite en 3'(OH) de la chaîne oligonucléotidique en procédant d'abord à une série de condensations des dérivés 1 et 4 sur un support solide CPG 24, dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides. Lorsque la séquence souhaitée de bras chimiques et amine primaire a été édifiée dans le synthétiseur, on procède, à la suite de l'édifice construit, à la construction de la
20 chaîne oligonucléotidique.

A la suite de la chaîne oligonucléotidique, le synthétiseur est programmé pour continuer des cycles de fixation en 5' d'unités 1 et 4. Les condensations des phosphoramidites 1 et 4 dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides sont réalisées en utilisant les mêmes cycles de réactions que ceux mis en oeuvre pour la
25 synthèse de la séquence d'acides nucléiques. Toutefois, en ce qui concerne le composé 4, le temps de condensation est porté à 10 minutes au lieu des 25 secondes du cycle classique.

Après clivage de son support solide de la chaîne oligonucléotidique 3'(OH) et 5'(OH) modifiée et déprotection des phosphates et des bases de la chaîne oligonucléotidique,
30 la partie qui fournit la réactivité responsable de la détection sera introduite par un lien chimique covalent. Parmi les différentes molécules possédant les propriétés requises pour la détection, on utilise de préférence la biotine, la digoxigénine, la fluorescéine, la peroxydase et l'alkaline phosphatase. Ces molécules, judicieusement activées, sont fixées sur la chaîne oligonucléotidique au niveau des amines primaires introduites à
35 cet effet en raison de leur nucléophilicité.

Si l'on appelle N le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1, les oligomères modifiés en 3'(OH) et 5'(OH) qui ont été synthétisés sont les suivants :

NSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNS 39
 5 NSSNSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNS 40
 NSSNSSNSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNSSNS 41
 NSSNSSNSSNSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSNSSNSSNSSNS 42

Après clivage de la chaîne oligonucléotidique ainsi modifiée de son support solide et déprotection des bases et des phosphates, les quatre oligonucléotides sont analysés en
 10 électrophorèse capillaire (Fig. 5).

Les sondes 39, 40, 41 et 42 sont alors biotinylées; les sondes biotinylées obtenues 43, 44, 45 et 46 sont analysées en électrophorèse capillaire (Fig. 5).

Si l'on appelle B le bras aminé provenant de la condensation d'une unité 4 suivie d'une biotinylation et S le bras chimique provenant de la condensation d'une unité 1,
 15 les sondes biotinylées en 3'(OH) et en 5'(OH) qui ont été obtenues sont les suivantes :

BSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBS 43
 BSSBSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBS 44
 BSSBSSBSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBS 45
 BSSBSSBSSBSSTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACASSBSSBSSBSSBS 46

20

Procédé de préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 3'(OH) et en 5'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupés de bras aminés. Synthèse des sondes 39, 40, 41 et 42.

On réalise simultanément les quatre sondes 39, 40, 41 et 42 dans un synthétiseur
 25 automatique d'ADN ABI 394. Pour ce faire, on introduit dans quatre réacteurs 6,6 mg (0.2 µmole) de support CPG 24 fonctionnalisé à 30.3 µmole/g. Le dérivé 1 et le dérivé 4 sont solubilisés dans l'acétonitrile anhydre à une concentration 0.1 M et introduits dans le synthétiseur aux endroits prévus pour des phosphoramidites non classiques.

30 Le synthétiseur est programmé pour débiter par des cycles de fixation des phosphoramidites 1 et 4 selon les séquences respectives 39, 40, 41 et 42, puis poursuivre avec les phosphoramidites nucléotidiques, la synthèse d'une séquence d'acides nucléiques complémentaire d'une séquence cible :

5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAAACA 3'

35 et enfin continuer des cycles de condensation d'unités 1 et 4 en 5' de la chaîne

d'acides nucléiques.

Après synthèse automatique des biopolymères 39, 40, 41 et 42, les chaînes oligonucléotidiques ainsi modifiées sont clivées des supports CPG par quatre traitements successifs de 15 minutes avec 500 µl de NH₄OH 32%. Les solutions
5 ammoniacales obtenues sont portées 5 heures à 55°C. Ce deuxième traitement a pour but de déprotéger les bases et les phosphates des chaînes oligonucléotidiques. Les solutions ammoniacales sont liophylisées; les quatre résidus sont soumis à une chromatographie par filtration moléculaire (gel Sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 20%.

10

Procédé de biotinylation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 3'(OH) et en 5'(OH) un enchevêtrement linéaire de bras chimiques entrecoupé de bras aminés. Préparation des sondes biotinylées 43, 44, 45 et 46

Dans un tube eppendorf, on dissout 20 DO de sonde 39, 40, 41 ou 42 dans 120 µl de
15 tampon phosphate 0.01 M pH 7.5. On ajoute une solution de 30 mg de sulfosuccinimidyl 6-biotinamido caproate dans 360 µl de diméthylformamide. On laisse incuber à température ambiante pendant 16 heures. Chaque solution est alors soumise à une chromatographie par filtration moléculaire (gel Sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%. Les sondes biotinylées 43, 44, 45
20 et 46 ainsi que les sondes aminées correspondantes 39, 40, 41 et 42 sont analysées en électrophorèse capillaire colonne Micro-Gel₁₀₀, diamètre interne 50 µm, longueur 50cm, voltage 15kV, tampon 75 mM Tris-phosphate - 10% méthanol pH 7.6

EXEMPLE IX : Utilisation des sondes biotinylées décrites dans les exemples IV, VII et VIII en hybridation sur support solide - limites de détection.

Afin de mettre en évidence les avantages de la présente invention, les sondes polybiotinylées en 5'(OH) 20, 21, 22 et 23, les sondes polybiotinylées en 3'(OH) 35, 36, 37 et 38, ainsi que les sondes polybiotinylées en 3'(OH) et en 5'(OH) 43, 44, 45 et 46 ont été testées en hybridation en vue d'étudier leur potentiel d'utilisation en diagnostic.

De manière générale, l'hybridation s'est faite entre un oligonucléotide (30 mer) fixé sur un support solide en plastique par son extrémité 5'(OH) et complémentaire des sondes à tester (23 mer) par son extrémité 3' (OH). Chaque support solide (tube) revêt de l'ordre de 10 ng d'oligonucléotide (30 mer) complémentaire aux sondes à tester, ce qui représente environ 1012 copies. Chaque oligonucléotide biotinylé mentionné ci-dessus est soumis à 8 hybridations différentes partant de 1 pg d'oligonucléotide marqué ($\sim 10^8$ copies) et allant jusqu'à 300 atg (3×10^4 copies) en procédant à des dilutions 1/3 d'une cuvette à l'autre. Après hybridation, la révélation se fait par chémiluminescence (CSPD-Tropix); la lecture se fait au luminomètre.

Les résultats repris au schéma IV concernent l'hybridation des sondes polybiotinylées en 5'(OH) 20, 21, 22 et 23 avec le 30 mer complémentaire fixé sur tube en plastique.

Schéma IV

OLIGO	Nombre de Biotines		Limite de détection	
			fg	nombre de copies
20	1	5' (OH)	30	3×10^6
21	2	"	30	3×10^6
22	3	"	30	3×10^6
23	4	"	3	3×10^5

25 Pour les sondes polybiotinylées en 3'(OH) 35, 36, 37 et 38, les résultats d'hybridation sont repris au schéma V.

Schéma V

OLIGO	Nombre de Biotines		Limite de détection	
			fg	nombre de copies
35	1	3' (OH)	30	3×10^6
36	2	"	10	10^6
37	3	"	3	3×10^5
38	4	"	3	3×10^5

En ce qui concerne les sondes polybiotinylées en 5'(OH) et en 3'(OH) 43, 44, 45 et 46, les résultats sont repris au schéma VI.

Schéma VI

5	OLIGO	Nombre de Biotines		Limite de détection	
				fg	nombre de copies
	43	2	3' + 5' (OH)	30	3×10^6
	44	4	"	10	10^6
10	45	6	"	3	3×10^5
	46	8	"	1	10^5

15 Procédé d'hybridation d'une sonde mono ou polybiotinylée (23 mer) avec un oligomère complémentaire (30 mer) fixé sur un tube en plastique.

Les tubes, recouverts de l'oligonucléotide complémentaire (30 mer) sont d'abord saturés une heure à 37°C avec 200 µl d'une solution à 5% de lait écrémé lyophilisé dans le TBS 1x contenant une trace d'azide. Les tubes sont ensuite préhybridés 20 heures à 50°C avec le tampon d'hybridation (100 µl): 5x Denhardt's, 6xSSC, 0.1% SDS, 100 µg/ml de DNA de sperme de saumon.

Pour chaque oligonucléotide à tester, on réalise 8 essais avec les quantités suivantes (dans 100 µl de tampon d'hybridation): 1 pg (10^8 copies), 300 fg, 100 fg (10^7 copies), 30 fg, 10 fg (10^6 copies), 3 fg, 1 fg (10^5 copies), 0.3 fg. On réalise également une 25 série de huit tubes avec un oligomère non complémentaire et non biotinylé et huit tubes sans oligonucléotide.

L'ensemble des tubes est mis en hybridation 2 h à 50°C, puis chaque tube est lavé trois fois pendant dix minutes à 50°C avec une solution SSC 6x, ils sont ensuite lavés une fois pendant cinq minutes avec le tampon I.

30 Tampon I: 0.1 M Tris, 2 mM MgCl₂, 0.05% triton, 1 M NaCl.

On prépare alors une solution de streptavidine-phosphatase alcaline (fournie avec le kit Tropix): 1 µl de la solution du kit dans 5.500 µl de tampon I. On met 100 µl de cette solution dans chaque tube, on laisse incuber trente minutes à température ambiante, on lave ensuite chaque tube six fois avec le tampon I. On prépare la 35 solution d'agent chimiluminescent, le CSPD: (3-(4-méthoxyspiro[1,2-dioxétane-3,2'-

tricyclo[3.3.1.1.]chlorodecane]-4-yl) phenyl phosphate.

La solution est préparée comme suit : 80 µl de CSPD (Tropix), 500 µl d' "emerald" (Tropix) et 4.420 µl de tampon de révélation.

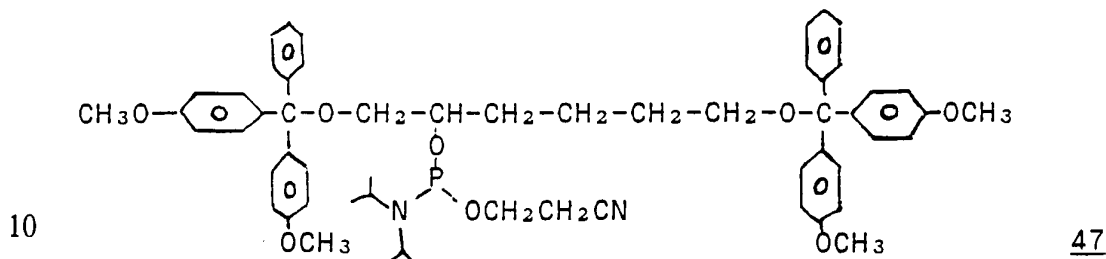
Tampon de révélation: 0.1 M diéthanamine, 1 mM MgCl₂, 0.02% azide de sodium.

- 5 On dépose 100 µl de cette solution dans chaque tube, on laisse incubé 45' puis on lit au luminomètre.

EXEMPLE X : Préparation du 1,6-O-(4,4' diméthoxytrityl) 2-O-(N, N' diisopropyl-amino 2-cyanoéthoxyphosphino) 1, 2, 6- hexane triol.

Le dérivé 1,6-O-(4,4' diméthoxytrityl) 2-O-(N,N' diisopropylamino 2-cyanoéthoxyphosphino) 1,2,6-hexane triol 47 répond à la formule:

5



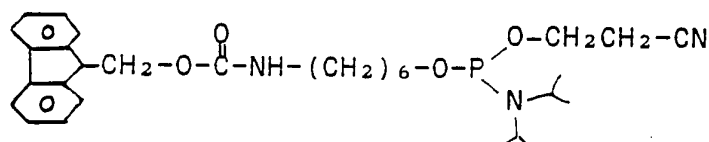
L'approche suivie a pour objectif la préparation d'un synthon non nucléotidique portant cependant les groupes chimiques qui permettent son introduction en 5'(OH) d'une chaîne oligonucléotidique ou dans un polymère non nucléotidique dont les monomères sont unis par un lien phosphodiester, dans les conditions de synthèse automatique d'ARN ou d'ADN habituelles.

Ce synthon a l'avantage de fournir à l'utilisateur un outil permettant l'introduction de chaînes ramifiées, en 5'(OH) d'une séquence d'acides nucléiques, sans sortir de la routine de synthèse automatique ou manuelle.

En effet, il possède deux fonctions alcool primaire protégées par un groupe diméthoxytrityle et donc, à chaque cycle de condensation, il double le nombre de sites pour la condensation suivante.

L'intérêt de multiplier le nombre de sites de condensation réside dans la possibilité de pouvoir introduire sur ces sites en fin de synthèse, des chaînes alkyle portant une amine primaire. Cette introduction est possible par condensation, en fin de synthèse, du dérivé 48 sur les n sites alcool primaire créés.

30



48

35

Le dérivé 48 est connu dans la littérature et n'est donc pas revendiqué ni décrit.

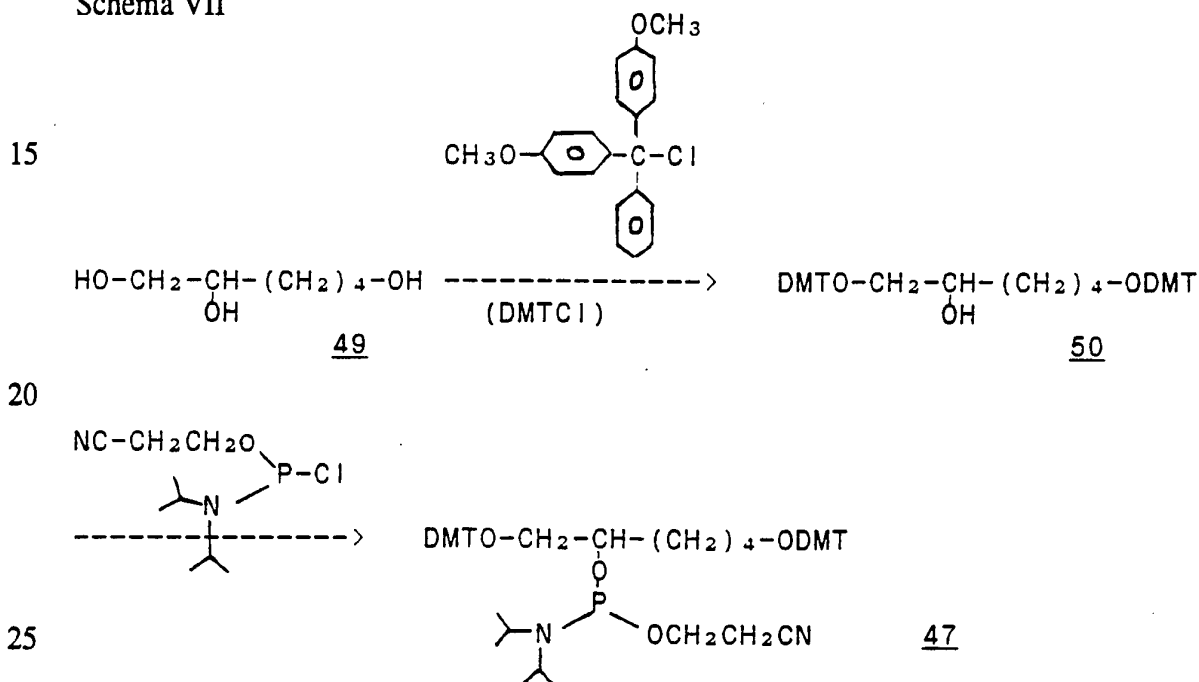
En ce qui concerne le composé 47, les groupes 4,4'-diméthoxytrityle et 2-cyanoéthoxydiisopropylaminophosphoramidite sont appropriés à une synthèse aux phosphoramidites notamment sur support solide.

5 Le chemin réactionnel pour l'obtention du composé 47 présenté dans le schéma VII comporte les étapes suivantes :

1) protection sélective des deux alcools primaires du 1,2,6-hexane triol 49 par le chlorure de diméthoxytrityle (DMT) labile à pH acide.

2) phosphorylation de l'alcool secondaire 50. L'exemple du phosphoramidite montré
10 dans le schéma VII n'est pas limitatif; on peut envisager aussi la synthèse d'un phosphate triester ou diester ou d'un phosphonate.

Schéma VII



Procédé de préparation du 1,6-O-(4,4'-diméthoxytrityl) 1,2,6- hexanetriol 50

Dans un ballon bicol de 50cc, on introduit 1.34 g de 1,2,6-hexane triol 49 (10⁻²
30 mole). On le met sous atmosphère d'argon puis on ajoute 20cc de pyridine anhydre. On ajoute ensuite à la solution 8.45 g (2.5 x 10⁻² moles) de chlorure de diméthoxytrityle. On agite 2 heures à température ambiante. On hydrolyse le mélange réactionnel (25cc NaHCO₃ 5%) et on extrait au dichlorométhane (2 x 50cc). La phase organique obtenue est lavée trois fois à l'eau puis une fois avec une solution
35 aqueuse saturée en chlorure de sodium, elle est séchée sur MgSO₄ puis filtrée et

évaporée sous pression réduite (évaporateur rotatif $p = 20\text{mm Hg}$). La pyridine résiduelle est ensuite éliminée par entraînement azéotropique sous pression réduite avec du toluène. Le toluène résiduel est alors éliminé par entraînement azéotropique sous pression réduite avec du dichlorométhane. Le résidu obtenu est purifié sur
5 colonne de silice Merck 9385 - éluant éther 0 $\Rightarrow$ 40 - hexane 100 $\Rightarrow$ 60. La silice est préalablement neutralisée par mise en suspension dans l'éluant initial contenant 1% DIEA. Après purification, on récupère 4.5 g (6.1×10^{-3} moles) Rdt. 61%. Chromatographie sur couche mince (CCM) - plaque Merck 5735 (gel de silice 60F₂₅₄) éluant éther 4 - hexane 6 RF: 0.3.

10

Procédé de préparation du 1,6-O-(4,4' diméthoxytrityl 2-O- (N,N'- diisopropylamino-2-cyanoéthoxyphosphino) 1,2,6 hexane triol 47

Dans un ballon bicol de 25cc, on introduit 1.1 g de composé 50 (1.5×10^{-3} moles). On met sous atmosphère d'argon puis on ajoute 6cc de tétrahydrofurane anhydre et
15 0.84cc de diisopropyléthylamine. On ajoute alors au mélange réactionnel, à la seringue et goutte à goutte, 0.45cc (2×10^{-3} moles) de 2-cyanoéthoxy diisopropylamino chlorophosphine. Après dix minutes de réaction, un important précipité apparaît au sein du mélange réactionnel (chlorhydrate de diisopropyléthylamine). On hydrolyse le mélange réactionnel (15cc NaHCO₃ 5%),
20 on extrait au dichlorométhane (2 x 30cc). La phase organique obtenue est lavée à l'eau (3 x 20cc), puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (1 x 20cc), elle est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite (évaporateur rotatif $p = 20\text{ mm Hg}$). Le résidu est purifié sur colonne de silice Merck 9385 - éluant acétate d'éthyle 3 - hexane 7. La silice est préalablement neutralisée par
25 mise en suspension dans l'éluant contenant 1% DIEA. Après purification, on obtient 1.2 g de 47. Rdt. 84%.

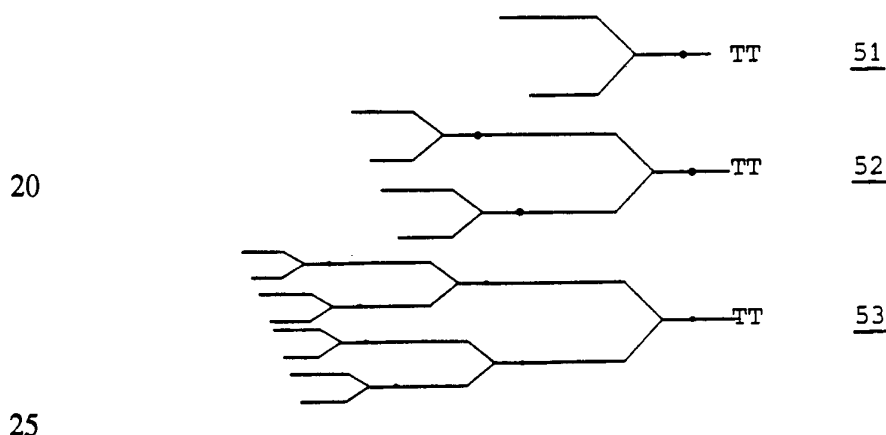
Chromatographie sur couche mince (CCM) plaque Merck 5735 (gel de silice 60F₂₅₄) - éluant acétate d'éthyle 3 - hexane 7. RF : 0.6.

EXEMPLE XI : Etude de la réactivité du composé 47

Le phosphoramidite non nucléotidique 47 peut être utilisé pour introduire en 5'(OH) d'une séquence d'acides nucléiques, une chaîne ramifiée : l'intérêt de 47 est de multiplier par deux à chaque condensation, le nombre de sites de condensation. En fin de synthèse, il est alors possible d'introduire sur les sites de condensation ainsi créés, des chaînes alkyle portant une amine primaire. L'introduction des amines primaires est réalisée par condensation finale du dérivé 48 sur les n sites alcool primaire créés.

Dans un premier temps, le dérivé 47 a été condensé dans l'appareil de synthèse automatique d'oligonucléotides en 5'(OH) d'un dimère thymidine-thymidine T-T fixé sur un support solide (support CPG: Controlled Porous Glass) classique en synthèse automatique.

Si l'on représente par  le motif provenant de la condensation d'une unité 47 dans lequel • représente un phosphate, les dimères TT modifiés en 5'(OH) qui ont été synthétisés peuvent se représenter de la façon suivante :



Comme le montrent les analyses en électrophorèse capillaire (Fig. 6), le dérivé 47 se fixe avec succès en 5'(OH) d'un oligonucléotide en élongation (cfr 51), il se fixe avec succès sur les deux sites de condensation créés après une première condensation de 47 sur TT (cfr 52) et il se fixe bien sur les quatre sites de condensation créés après deux condensations successives de 47 sur TT (cfr 53).

Etant donné que l'on multiplie par deux le nombre de sites de condensation à chaque cycle, la solution de 47 qui a été utilisée pour préparer simultanément les dérivés 51, 52 et 53 dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides est 0.4 M (conditions classiques: 0.1 M); de plus, le temps de couplage est porté à 10 minutes (conditions classiques 25 sec.).

Ces résultats montrent aussi que les réactions de condensation, d'oxydation, de capping et de clivage du support solide après synthèse sont efficaces et ne dégradent pas les polymères 51, 52 et 53.

Par ailleurs, en synthèse oligonucléotidique, il est possible de récupérer la solution de
 5 déprotection du groupe diméthoxytrityle et de mesurer l'intensité de la coloration orange du cation en vue d'estimer le rendement de chaque condensation. Ces mesures ont été réalisées pour la synthèse de 53 à chaque cycle; elles indiquent de bons rendements comme le montrent les résultats ci-dessous (schéma VIII).

Schéma VIII

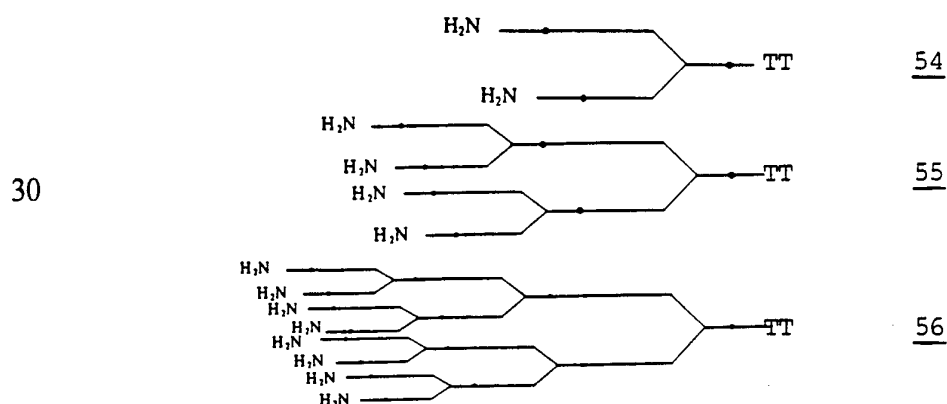
10	1° condensation (T)	1 DMT	A ₄₉₇ : 0.93	Rdt: 100% (imposé)
	2° condensation	2 DMT	A ₄₉₇ : 1.78	Rdt: 95%
	3° condensation	4 DMT	A ₄₉₇ : 3.4	Rdt: 95%
	4° condensation	8 DMT	A ₄₉₇ : 5.3	Rdt: 77%

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un nombre x de condensations de 47 (x
 15 = 1⇒3) sur un dimère thymidine-thymidine TT fixé sur un support solide (support CPG, Controlled Porous Glass) classique en synthèse automatique, puis nous avons terminé par une condensation de 48 sur les n sites de condensation créés en vue d'introduire n sites amine primaire pour la fixation ultérieure de n éléments de marquage.

20 Si l'on représente par  le motif provenant de la condensation d'une unité 47 où
 ● représente un phosphate,
 par H₂N—● le motif résultant de la condensation d'une unité 48 où
 ● représente un phosphate,

les dimères TT modifiés qui ont été synthétisés sont les suivants:

25



35

Comme le montrent les analyses en électrophorèse capillaire pour le composé 55 comme exemple (Fig. 7), le dérivé 48 se fixe efficacement sur les 4 sites de condensation créés dans le polymère 52 puisque l'on ne trouve qu'une trace de 52 dans l'électrophérogramme de 55.

- 5 Etant donné que l'on multiplie par deux le nombre de sites de condensation à chaque cycle, la solution de 47 qui a été utilisée pour préparer simultanément les composés 54, 55 et 56 dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides, est 0.4 M et la solution de 48 est 0.8 M (conditions classiques 0.1 M). De plus, le temps de couplage est porté à 10 minutes pour les condensations de 47 et 48 (conditions classiques 25
10 secondes).

Couplage en phase solide des dérivés 47 et 48 avec un dimère thymidine-thymidine fixé sur un support solide CPG.

- Le phosphoramidite 47 est solubilisé dans l'acétonitrile anhydre à une concentration
15 de 0.4 M et le phosphoramidite 48 est solubilisé dans le même solvant à une concentration de 0.8 M. Ils sont introduits dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides aux endroits prévus pour les phosphoramidites non classiques.

- Pour les condensations de 47 et 48, toutes les conditions de condensation sont les conditions d'un cycle d'élongation d'oligonucléotide, exceptés la concentration en
20 phosphoramidite et le temps de couplage. Le clivage du support solide est réalisé dans les conditions habituelles (NH₄OH 32%) et le produit final est obtenu avec un rendement comparable à ceux couramment réalisés en synthèse oligonucléotidique.

- Les polymères 51, 52, 53, 54, 55 et 56 ont été analysés en électrophorèse capillaire ABI 270A, colonne capillaire Micro-Gel₁₀₀, diamètre interne 50 µm, longueur 50cm,
25 voltage 15 kV, tampon 75 mM tris-phosphate 10% méthanol pH 7.6.

EXEMPLE XII: Préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 5'(OH) un enchevêtrement ramifié de chaînes alkyles se terminant par des chaînes aminées utiles dans la détection de séquences d'ADN par des méthodes non radioactives

- 5 La synthèse et l'utilisation de molécules mixtes composées d'une partie oligodésoxyribonucléotidique et d'une partie possédant des propriétés chimiques caractéristiques permettent la détection facile et rapide de cibles d'acides désoxyribonucléiques par des méthodes non radioactives. La partie oligodésoxyribonucléotidique de séquence définie et homologue d'un fragment
10 d'ADN cible apporte l'énergie de stabilisation et assure son hybridation avec la molécule d'ADN que l'on veut détecter. La partie qui fournit la réactivité permettant la détection directe ou indirecte de l'hybride peut être introduite en l'extrémité 5'(OH) et (ou) 3'(OH) de la séquence d'acides nucléiques. Dans cet exemple précis, la partie responsable de la détection sera essentiellement introduite en 5'(OH) de la séquence
15 d'acides nucléiques.

De par la stratégie utilisée, la partie responsable de la détection ne peut être introduite qu'en 5'(OH). Elle le sera en procédant à une série de condensations du phosphoramidite 47 sur la chaîne oligonucléotidique encore fixée sur le support solide et protégée sur ses bases et ses phosphates. Après la série de condensations de
20 47, une condensation finale du phosphoramidite 48 permettra d'introduire n fonctions amine primaire par condensation de 48 sur les n sites de condensations (sites alcool primaire) créés par les condensations successives de 47.

- Les condensations de 47 et de 48 se feront en utilisant les mêmes cycles de réaction dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides que ceux mis en oeuvre pour la
25 synthèse de la séquence d'acides nucléiques. Toutefois, étant donné que les condensations successives de 47 ont pour effet de doubler à chaque cycle le nombre de sites de condensation, la concentration en 47 utilisée est 0.4 M et celle de 48 est 0.8 M (concentration classique 0.1 M). Pour les deux phosphoramidites 47 et 48, le temps de couplage est porté à 10 minutes au lieu des 25 secondes du cycle classique.
- 30 Après clivage de la chaîne oligonucléotidique 5' modifiée de son support solide et déprotection des bases et des phosphates, la partie qui fournit la réactivité responsable de la détection est introduite par un lien chimique covalent. Parmi les différentes molécules possédant les propriétés requises pour la détection, on utilise de préférence la biotine, la digoxigénine, la fluorescéine, la peroxydase et la phosphatase alcaline.
- 35 Ces molécules, judicieusement activées, sont fixées sur la chaîne oligonucléotidique

au niveau des amines primaires introduites à cet effet en raison de leur nucléophilicité.

Si l'on représente par  le motif provenant de la condensation d'une unité 47 où

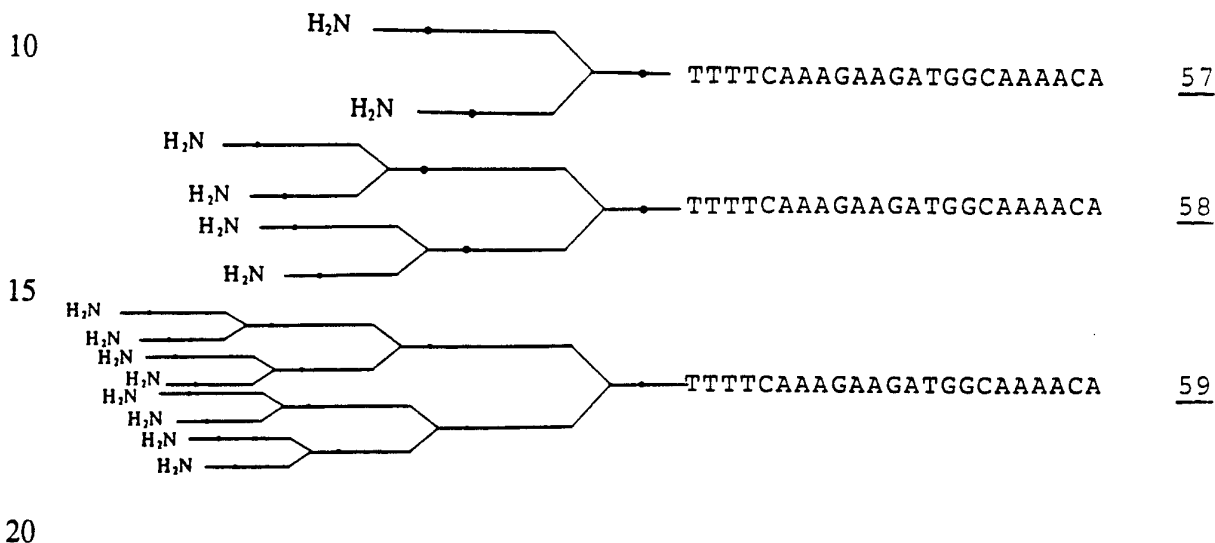
● représente un phosphate,

5

par $H_2N-\bullet$ le motif provenant de la condensation d'une unité 48

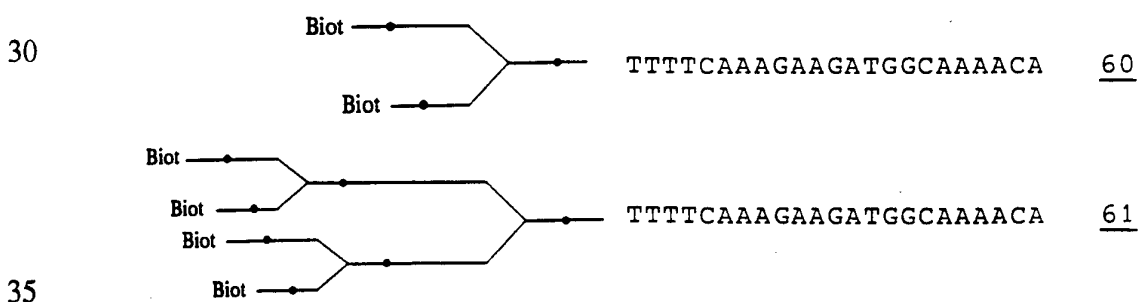
où ● représente un phosphate,

les oligomères 5'(OH) modifiés qui ont été synthétisés sont les suivants:

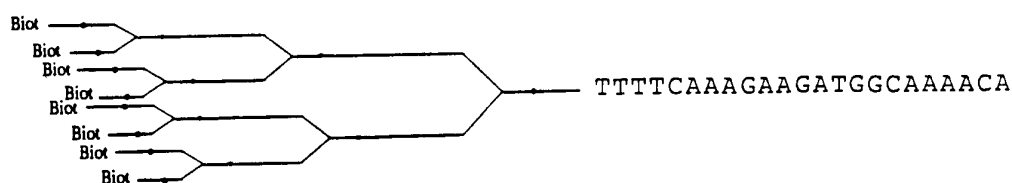


Après clivage de la chaîne oligonucléotidique ainsi modifiée de son support solide et déprotection des bases et des phosphates, les sondes 57, 58 et 59 sont biotinylées pour conduire aux sondes biotinylées correspondantes 60, 61 et 62. (Fig. 8).

25 Si l'on appelle B l'unité biotine provenant de la condensation de la biotine N hydroxysuccinimide sur les fonctions amine primaire, les sondes polybiotinylées en 5'(OH) qui ont été obtenues sont les suivantes :



54



62

5

Procédé de préparation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 5'(OH) un enchevêtrement ramifié de chaînes alkyles se terminant par des chaînes aminées.

Une sonde ADN a été synthétisée avec une séquence oligodésoxynucleotidique complémentaire d'une séquence cible. On prépare en phase solide, dans un synthétiseur automatique d'ADN ABI 394, simultanément trois sondes identiques (dans trois réacteurs) de séquence: 5' TTTTCAAAGAAGATGGCAAACA 3'. Le synthétiseur est programmé pour continuer des cycles de fixation en 5' d'unités 47 puis en fin de synthèse d'une unité 48 pour conduire respectivement aux sondes 57, 58 et 59.

Pour ce faire, on a utilisé 6 mg de support CPG fonctionnalisé avec de la diméthoxytrityl benzoyl adénosine à 34 μ moles/g, ce qui correspond à 0.2 μ mole. Les dérivés 47 et 48 sont solubilisés dans l'acétonitrile anhydre à une concentration 0.4 M pour 47 et 0.8 M pour 48. Ils sont introduits dans le synthétiseur aux endroits prévus pour les phosphoramidites non classiques.

Après synthèse automatique des biopolymères 57, 58 et 59, les chaînes oligonucléotidiques ainsi modifiées sont clivées des supports CPG par quatre traitements successifs de 15 minutes avec 500 μ l de NH_4OH 32%. Les solutions ammoniacales obtenues sont portées 5 h à 55°C. Ce deuxième traitement a pour but de déprotéger les bases et les phosphates des chaînes oligonucléotidiques. Les solutions ammoniacales sont lyophilisées, les quatre résidus sont soumis à une chromatographie par filtration moléculaire (gel sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%.

Procédé de biotinylation de molécules mixtes oligodésoxyribonucléotidiques portant en 5'(OH) un enchevêtrement ramifié de chaînes alkyles se terminant par des chaînes aminées.

Dans un tube Eppendorf, on dissout 20 DO de sonde aminée 57, 58 ou 59 dans 120 μ l de tampon phosphate 0.01 M pH 7.5. On ajoute une solution de 20 mg de sulfosuccinimidyl 6-biotinamidocaproate dans 240 μ l de diméthylformamide. On

laisse incuber à température ambiante 16 h. Chaque solution est soumise à une chromatographie par filtration moléculaire (gel sephadex G50) puis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20%.

Les sondes 57, 58, 59, 60, 61 et 62 ont été analysées en électrophorèse capillaire sur
5 un ABI 270A, colonne Micro-gel₁₀₀ diamètre interne 50 µm, longueur 50 cm, voltage 15 kV, tempon 75 mM tris-phosphate - 10% méthanol pH 7.6.

EXEMPLE XIII: Utilisation des sondes biotinylées décrites dans l'exemple XII en hybridation sur support solide - Limites de détection.

Afin de mettre en évidence les avantages de la présente invention, les sondes polybiotinylées en 5'(OH) 60, 61 et 62 ont été testées en hybridation en vue d'étudier leur potentiel d'utilisation en diagnostic.

De manière générale, l'hybridation s'est faite entre un oligonucléotide (30 mer) fixé sur un support solide en plastique par son extrémité 5'(OH) et complémentaire des sondes à tester (23 mer) par son extrémité 3'(OH). Chaque support solide (tube) revêt de l'ordre de 10 ng d'oligonucléotide (30 mer) complémentaire aux sondes à tester, ce qui représente environ 10^{12} copies.

Chaque oligonucléotide biotinylé mentionné ci-dessus est soumis à 8 hybridations différentes, partant de 1 pg d'oligonucléotide marqué ($\sim 10^8$ copies) et allant jusqu'à 300 atg (3×10^4 copies) en procédant à des dilutions 1/3, d'une cuvette à l'autre. Après hybridation, la révélation se fait par chemiluminescence (CSPD - Tropix); la lecture se fait au luminomètre.

Les résultats des hybridations des sondes 60, 61 et 62 sont repris au schéma IX.

Schéma IX

	OLIGO	Nombre de Biotines	Limite de détection	
			fg	nombre de copies
20	60	2 5' (OH)	10	10^6
25	61	4 "	10	10^6
	62	8 "	3	3×10^5

Procédé d'hybridation d'une sonde mono ou polybiotinylée (23 mer) avec un oligomer complémentaire (30 mer) fixé sur un tube en plastique.

Les tubes, recouverts de l'oligonucléotide complémentaire (30 mer) sont d'abord saturés une heure à 37°C avec 200 µl d'une solution à 5% de lait écrémé liophylisé dans le TBS 1x, contenant une trace d'azide. Les tubes sont ensuite préhybridés 2 h à 50°C avec le tampon d'hybridation (100 µl): 5x Denhardt's, 6xSSC, 0.1% SDS, 100 µg/ml de DNA de sperme de saumon.

Pour chaque oligonucléotide à tester, on réalise 8 essais avec les quantités suivantes (dans 100 µl de tampon d'hybridation) : 1 pg (10^8 copies), 300 fg, 100 fg (10^7 copies), 30 fg, 10 fg (10^6 copies), 3 fg, 1 fg (10^5 copies) 0.3 fg. On réalise également une série de huit tubes avec un oligomère non complémentaire et non biotinylé et huit

5 tubes sans oligonucléotide. L'ensemble des tubes est mis en hybridation 2 h à 50°C puis chaque tube est lavé trois fois dix minutes à 50°C avec une solution SSC 6x, ils sont ensuite lavés une fois cinq minutes avec le tampon I.

Tampon I: 0.1 M tris, 2 mM $MgCl_2$, 0.05% triton, 1 M NaCl.

On prépare alors une solution de streptavidine-phosphatase alcaline (fournie avec le

10 kit Tropix): 1 µl de la solution du kit dans 5500µl de tampon I. On met 100 µl de cette solution dans chaque tube, on laisse incuber trente minutes à température ambiante, on lave ensuite chaque tube six fois avec le tampon I. On prépare la solution d'agent chimiluminescent, le CSPD: (3-(4-méthoxyspiro[1,2 -dioxétane-3,2'-tricyclo[3.3.1.1.1.]chlorodécane]-4-yl)phenylphosphate. La solution est préparée

15 comme suit: 80 µl de CSPD (Tropix), 500 µl d'emerald (Tropix) et 4420 µl de tampon de révélation.

Tampon de révélation: 0.1 M diéthanolamine, 1 mM $MgCl_2$, 0.02% azide de sodium.

On dépose 100 µl de cette solution dans chaque tube, on laisse incuber 45' puis on lit au luminomètre.

58.

REVENDICATIONS

1. Sonde d'acides nucléiques pour détecter une
molécule d'ADN ou d'ARN, comportant

5

a) une partie oligonucléotidique ou oligodé-
soxynucléotidique constituée de

S : une séquence d'acide nucléiques ADN ou
ARN en fonction du type de molécule à
détecter et

10

b) une partie non nucléotidique possédant des
propriétés chimiques qui permettent la
fixation directe ou indirecte d'une ou
plusieurs unités de détection ou éléments
de marquage M détectables de manière non
isotopique par production de couleur ou
de lumière,

15

20 caractérisée en ce que la partie b) est constituée
d'une chaîne d'unités phosphates entrecoupées de
motifs alkyle à savoir

b1) certains motifs alkyle unissant les
différents groupes phosphates et ne présentant aucune
fonctionnalité particulière

25

b2) des motifs alkyle présentant des fonctions
amines primaires qui permettent le couplage avec des
réactifs variés pour réaliser la détection de manière
directe ou indirecte,

30

les motifs b2) étant liés à la partie a) ou séquence S
par l'intermédiaire des motifs b1).

35

2. Sonde d'acides nucléiques suivant la revendication 1,

caractérisée en ce que la partie b) est en forme de chaîne linéaire dans laquelle les motifs b1) forment des "bras chimiques" L servant à introduire des espacements entre les motifs b2) qui constituent les éléments de marquage M proprement dits.

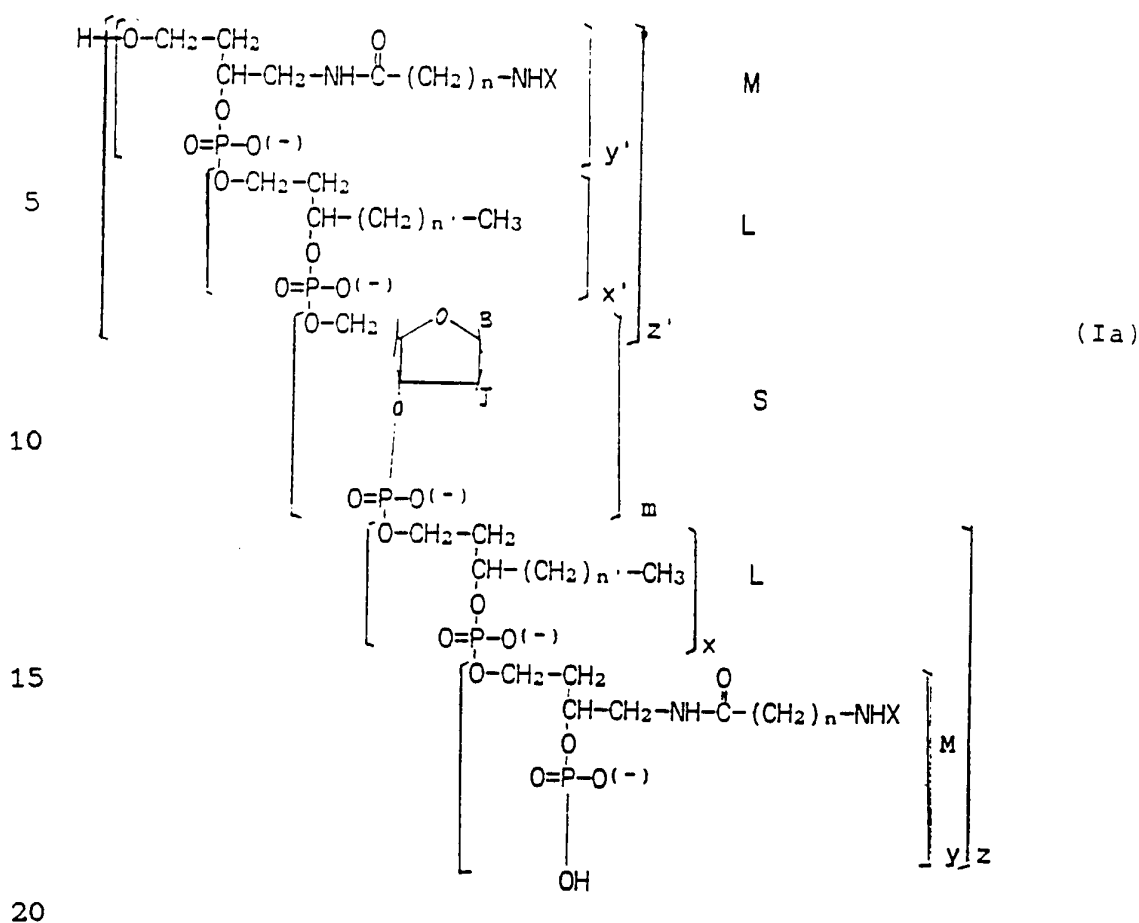
3. Sonde d'acides nucléiques suivant la revendication 2, répondant à la formule

$$[(M)y'-(L)x']z'-S-[(L)x-(M)y]z \quad (I)$$

dans laquelle S, L et M ont les significations données dans les revendications 1 et 2, et

x, x', z, z' sont des nombres égaux ou supérieurs à 0, avec la restriction que z et z' ne sont jamais simultanément égaux à 0
y et y' sont des nombres supérieurs à 0.

4. Sonde d'acides nucléiques suivant la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale Ia



dans laquelle :

S, L et M ont les significations données dans les revendications 1 et 2, et dans la séquence S,

25 J désigne H ou OH

B désigne une base d'acide nucléique, purique ou pyrimidique variable selon les nucléotides et

m = 1 à 1.000.

30 dans la séquence L

x et x' = 0 à 100

n et n' = 0 à 20

dans la séquence M

y et y' = 1 à 100

35 n et n' = 0 à 20

61.

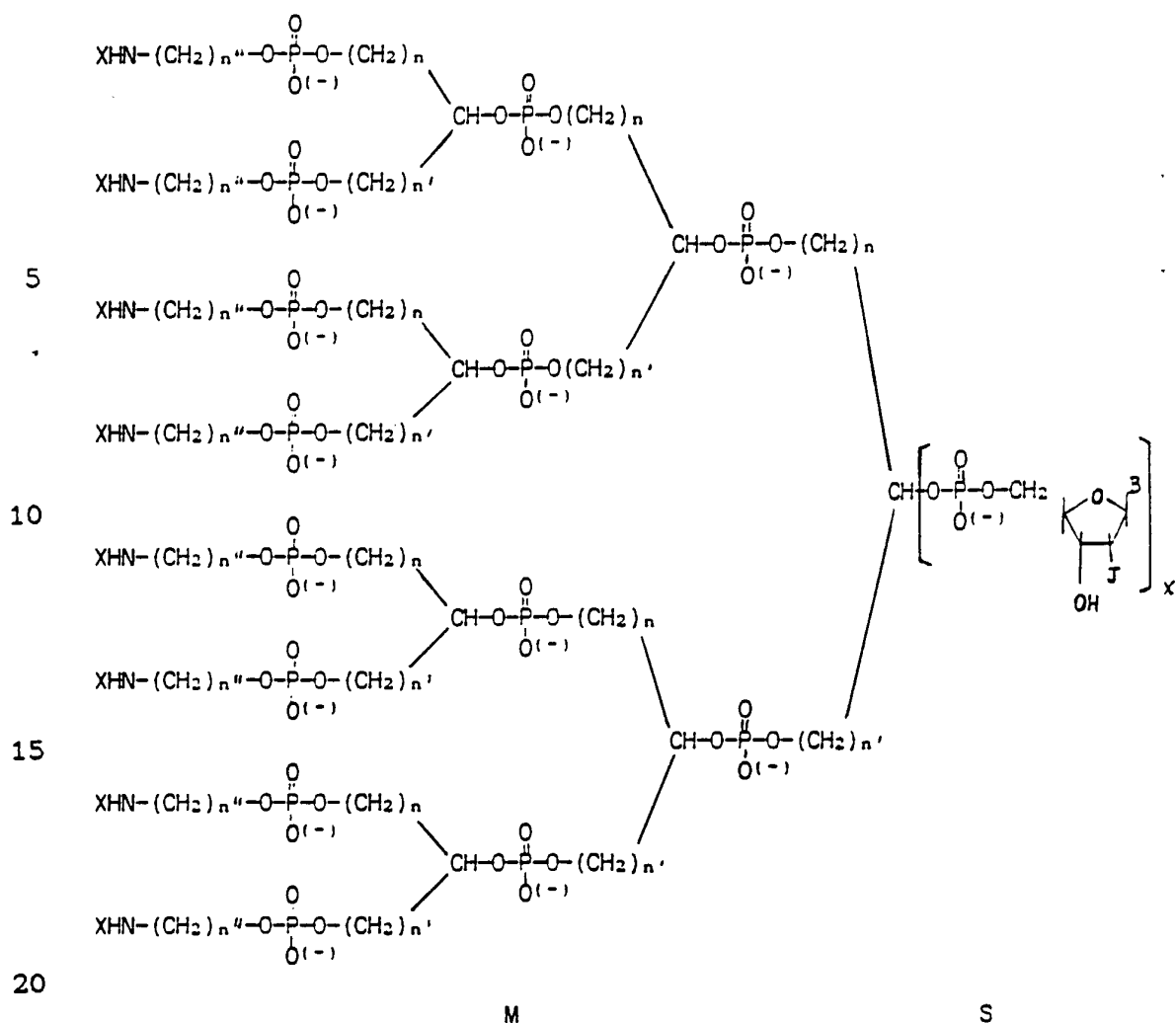
X désigne le marqueur proprement dit, pouvant être :

- 5 soit direct, auquel cas il est choisi parmi les enzymes telles que phosphatase alcaline, peroxydase et fluorescéine, capables de produire une coloration ou une lumière en présence d'un substrat,
- 10 soit indirect, auquel cas il est choisi parmi les haptènes tels que la biotine ou la digoxigénine, capables d'être reconnus par des anticorps marqués de manière non isotopique,
- l'élément LM responsable de la détection de la sonde pouvant être introduit
- 15 en 5'(OH) pour $z \neq 0$ et $z = 0$
 ou en 3'(OH) pour $z' = 0$ et $z \neq 0$
 ou simultanément en 5'(OH) et en 3'(OH)
 pour $z \neq 0$ et $z \neq 0$
 z et z' étant de manière générale = 0 à 100.

- 20 5. Sonde d'acides nucléiques suivant la revendication 1, caractérisée en ce que la partie b) formant l'élément de marquage M est constituée d'une chaîne ramifiée d'unités phosphates entrecoupées de motifs alkyle comprenant les motifs b1), comme motifs
- 25 internes à la ramification et les motifs b2) comme motifs externes à la ramification, c'est-à-dire terminant les différents bras de la ramification.

- 30 6. Sonde d'acides nucléiques suivant la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale XX

62.



XX
dans laquelle

dans la séquence S,

J désigne H ou OH

25 B désigne une base nucléique, purique ou
pyrimidique, variable selon les nucléotides
x représente le nombre de nucléotides de 1 à
1.000

30 n, n' et n'' sont égaux à 0 à 20

M désigne l'élément de marquage dont l'ordre de
ramification peut prendre des valeurs de 2 à 128,
par exemple 8, l'ordre supérieur étant toujours
35 double de celui qui le précède;

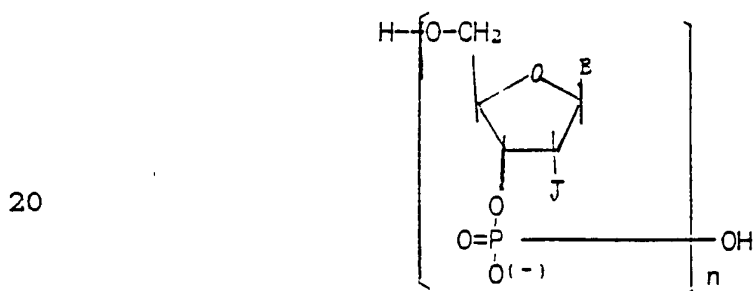
63.

X désigne le marqueur proprement dit, pouvant être soit direct, auquel cas il est choisi parmi les enzymes telles que phosphatase alcaline, peroxydase et fluorescéine, capables de produire une coloration ou une lumière en présence d'un substrat,

5 soit indirect, auquel cas il est choisi parmi les haptènes tels que la biotine ou la digoxigénine, capables d'être reconnus par des anticorps

10 marqués de manière non isotopique.

7. Procédé de préparation de sondes de formule Ia telle que définie à la revendication 4, comportant A1) la synthèse d'une séquence d'acides nucléiques S



25 dans laquelle B et J et n ont les significations
données à la revendication 4
par toute méthode de synthèse d'assemblage inter-
nucléotidique manuelle ou automatique connue, de
préférence sur support solide,

30

et

A2) la fixation d'un marqueur ,
caractérisé en ce que, pour la fixation du marqueur,
ladite séquence est soumise de préférence par la même
méthode de synthèse, notamment sur support solide,

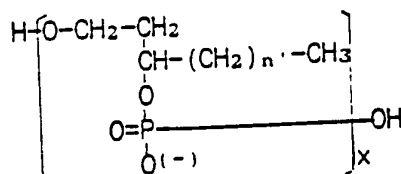
64.

soit à une extension en son extrémité 5' (OH) par
une série d'unités M et L

soit à une extension en son extrémité 3' (OH) par
une série d'unité M et L

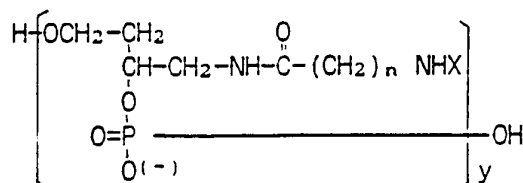
soit à une extension en ses extrémités 5' (OH) et
3' (OH) par deux séries d'unités M et L,
M et L étant tels que définis à la revendication
4,

B) les dites unités L sont obtenues chacune par syn-
thèse d'un polymère non nucléotidique



dans laquelle n' et x ont les significations
données à la revendication 4,

C) lesdites unités M sont obtenues chacune par syn-
thèse d'un polymère non nucléotidique



65.

dans laquelle

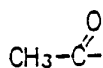
n et y ont les significations données à la revendication 4

et

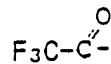
5 X représente soit un marqueur tel que phosphatase alcaline, peroxydase, fluorescéine, biotine, digoxigénine, tout haptène capable d'être reconnu par des anticorps marqués de manière non isotopique, soit un groupe protecteur de la fonction amine primaire destiné à être éliminé après synthèse totale de la sonde d'acides nucléiques, par exemple un groupe acétyle (VI), trifluoracétyle (VII) ou benzoyle (VIII):

15

20



VI



VII



VIII

25

et les synthèses B et C ci-dessus se font plus particulièrement par toute méthode de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle ou automatique connue, de préférence sur support solide.

30

8. Procédé suivant la revendication 7 pour la préparation d'une sonde constituée par une chaîne oligonucléotidique portant en 5'(OH) un enchevêtrement

35

de bras chimiques entrecoupés de bras aminés utiles dans la détection de séquences d'ADN par des méthodes non radioactives, caractérisé par les opérations consistant à

- 5 - synthétiser sur un support solide une chaîne oligonucléotidique dont les fonctions phosphates et les bases sont protégées;
- condenser à l'extrémité 5'(OH) de ladite chaîne une succession de dérivés générateurs de bras
10 chimiques et de bras aminés en mettant en oeuvre les mêmes cycles de condensation que pour la synthèse de la chaîne oligonucléotidique;
- séparer la chaîne oligonucléotidique 5' modifiée de son support solide;
- 15 - déprotéger les bases et phosphates de ladite chaîne;
- introduire au niveau des groupes amino primaire la partie qui fournit la réactivité responsable de la détection.

20

9. Procédé suivant la revendication 7, pour la préparation d'une sonde constituée par une chaîne oligonucléotidique portant en 3'(OH) un enchevêtrement de bras chimiques entrecoupés de bras aminés utiles dans
25 la détection de séquences d'ADN par des méthodes non-radioactives, caractérisé par les opérations suivantes consistant à

- condenser sur un support solide des dérivés générateurs de bras chimiques et de bras aminés selon les
30 mêmes cycles de condensation que pour la synthèse d'acides nucléiques, pour former une séquence souhaitée de bras chimiques et de bras aminés,
- construire à la suite de cette séquence, une chaîne oligonucléotidique, pour obtenir ainsi une chaîne
35 oligonucléotidique 3'(OH) modifiée, dont les fonc-

67.

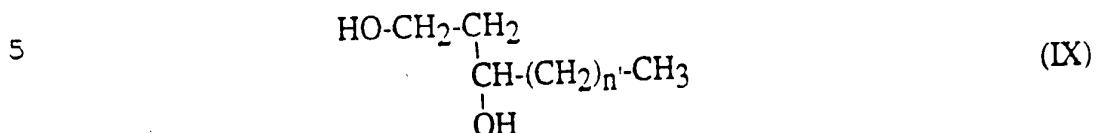
- tions phosphates et bases sont protégées,
- séparer cette chaîne modifiée du support solide,
 - déprotéger les phosphates et bases,
 - introduire au niveau des fonctions amino primaires
- 5 la partie qui fournit la réactivité responsable de la détection.

10. Procédé suivant la revendication 7, pour la préparation de sondes à chaîne oligodésoxyribonucléotidique portant en 3'(OH) et en 5'(OH) un enchevêtrement de bras chimiques entrecoupés de bras aminés utiles dans la détection de séquences d'ADN par des méthodes non-radioactives, caractérisé par les opérations consistant à
- 15 - condenser sur un support solide des dérivés générateurs de bras chimiques et de bras aminés sur un support solide selon les mêmes cycles de condensation que pour la synthèse d'acides nucléiques, pour former une séquence souhaitée de bras chimiques et
 - 20 de bras aminés,
 - construire, à la suite de cette séquence, une chaîne oligonucléotidique fixée à son extrémité 3'(OH) modifiée dont les fonctions phosphates et bases sont protégées,
 - 25 - construire, à l'extrémité 5'(OH) de la chaîne oligonucléotidique, une séquence de bras chimiques et de bras aminés,
 - séparer la chaîne oligonucléotidique modifiée en 3'(OH) et en 5'(OH) de son support solide, déprotéger les phosphates et bases et
 - 30 - introduire au niveau des fonctions amino primaires la partie fournissant la réactivité responsable de la détection.

- 35 11. Procédé suivant l'une quelconque des reven-

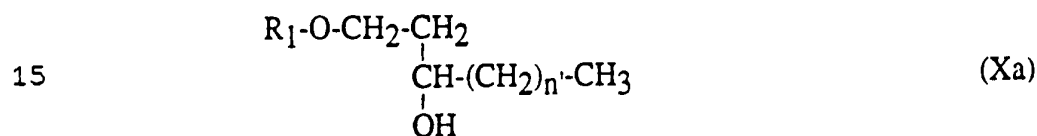
68.

dications 7 à 10, caractérisé en ce que chaque élément de bras chimique L est obtenu au départ d'un alcane diol 1,3 de formule

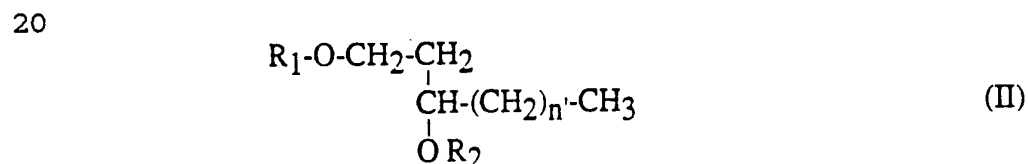


par les étapes suivantes de

- 10 a) protection de la fonction alcool primaire au moyen d'un groupe protecteur R_1 , pour obtenir un composé de formule



- b) transformation de la fonction alcool secondaire en un groupement OR_2 pour obtenir un composé de formule



- 25 où R_2 représente un groupe approprié à l'introduction du composé II (synthon) à l'extrémité d'un nucléotide ou bien à l'extrémité d'un synthon déjà existant.

- 30 12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que à l'étape a) R_1 signifie 4,4'-diméthoxytrityle (en abrégé DMT) de formule

35

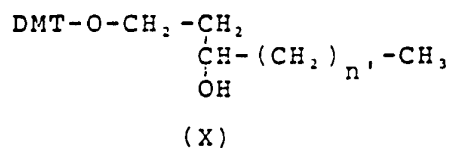
69.



10

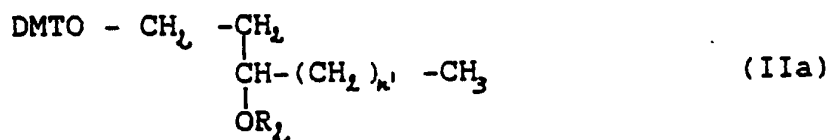
et la protection de la fonction alcool primaire est réalisée au moyen du chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (DMT-Cl) pour obtenir un composé de formule

15



20

et l'étape b) comprend une phosphorylation du composé (X) pour obtenir un composé de formule



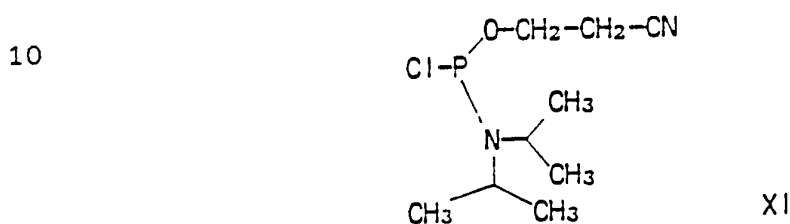
25

dans laquelle R₂ représente un groupe phosphorylé éventuellement protégé approprié à l'introduction du composé X' (synthon) à l'extrémité d'un nucléotide ou bien d'un synthon déjà condensé sur un support solide approprié pour un type donné de synthèse d'assemblage internucléotidique.

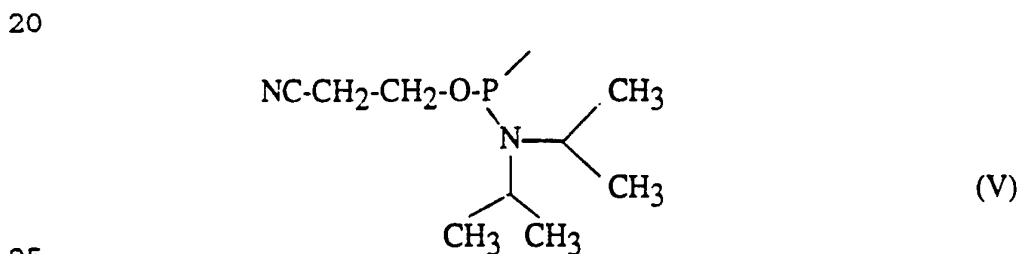
13. Procédé suivant la revendication 12,
lorsqu'il est appliqué à la synthèse aux phosphorami-

35

5 dites, caractérisé en ce que l'agent de phosphorylation utilisé à l'étape b) est la diisopropylaminocyanoéthoxychlorophosphine de formule



15 si bien que, dans le composé de formule IIa obtenu à l'issue de cette étape, R₂ est un groupe diisopropylaminocyanoéthoxyphosphine ou cyanoéthoxy-diisopropylaminophosphoramidite de formule

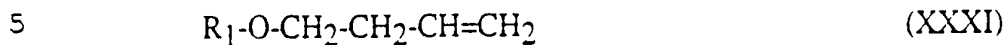


30 14. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce que chaque élément ou unité de détection M est obtenu au départ de butène-3ol-1 de formule

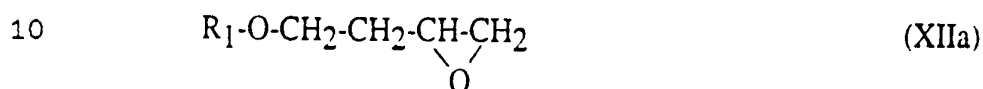


35 par les étapes de

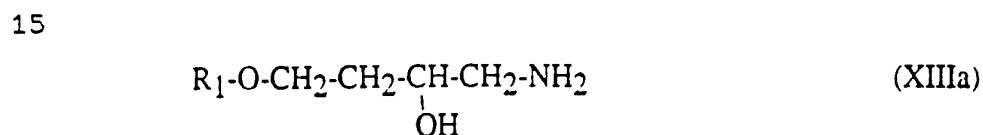
- a) protection de la fonction alcool primaire au moyen d'un groupe protecteur R_1 pour obtenir un composé de formule



- b) époxydation de la double liaison du composé (XXXI) pour former un composé de formule



- c) ouverture de l'époxyde au moyen d'ammoniaque pour former un composé de formule

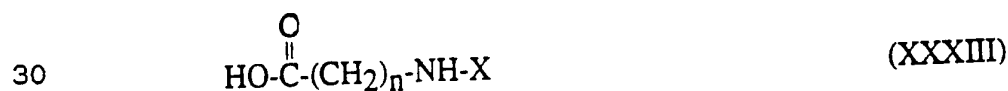


- d) protection du groupe amino primaire d'un composé de formule
- 20



25

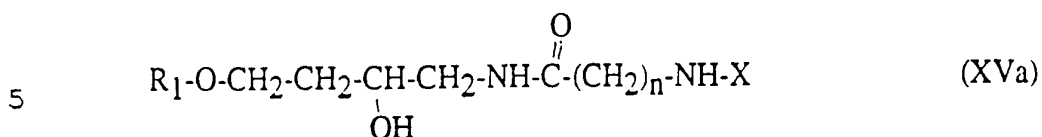
pour former un composé de formule



où X a les significations données à la revendication 7.

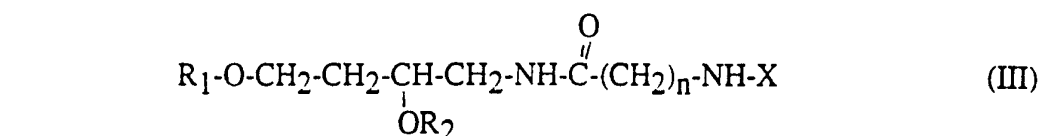
- 35 e) activation du composé (XXXIII),

f) condensation des composés (XIIIa) et (XXXIII) entre eux pour former un composé de formule



et

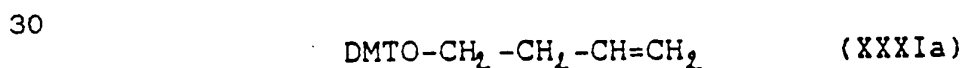
f) phosphorylation de composé (XVa) pour former un composé de formule



dans laquelle R_2 représente un groupe phosphorylé apte à l'introduction du composé IIIa (synthon) à l'extrémité (3' et/ou 5') d'un nucléotide ou bien à l'extrémité d'un synthon déjà existant.

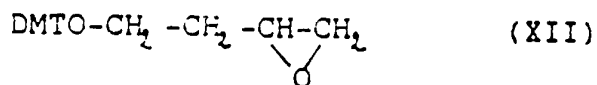
15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que,

à l'étape a) R_1 signifie 4,4'-diméthoxytrityle (en abrégé DMT) et la protection de la fonction alcool primaire est réalisée au moyen de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (DMT-Cl) pour obtenir un composé de formule

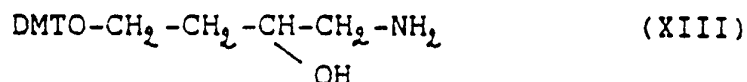


à l'étape b) l'époxydation est réalisée par l'acide métachloroperbenzoïque pour former un composé de formule

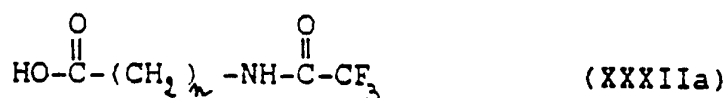
73.



à l'étape c) l'ouverture de l'époxyde est réalisée au
5 moyen d'ammoniaque pour former un composé de formule



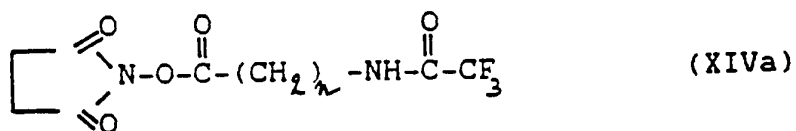
10 à l'étape d) la protection du groupe amino primaire de composé (XXVI) est réalisé par un groupe trifluor-acétyle pour former un composé



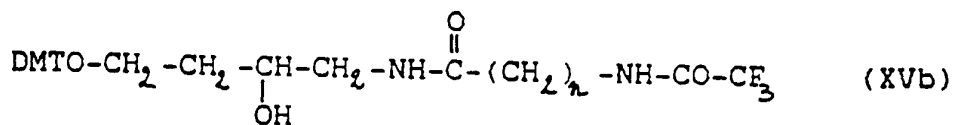
15

à l'étape e) le composé (XXXIIa) est activé par la N-hydroxysuccinimide pour former le composé

20



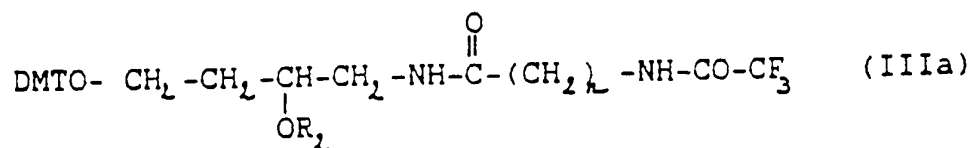
25 à l'étape f) les composés (XIII) et (XIVa) sont condensés pour former un composé de formule



30

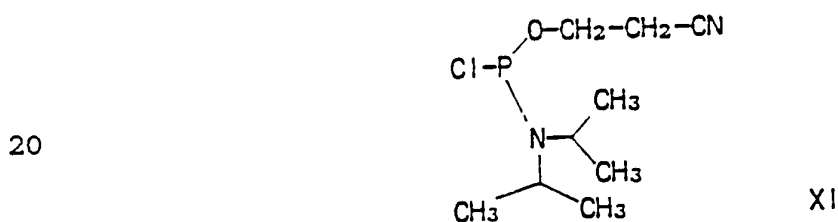
à l'étape g) le composé (XVb) est phosphorylé pour obtenir un composé de formule

35

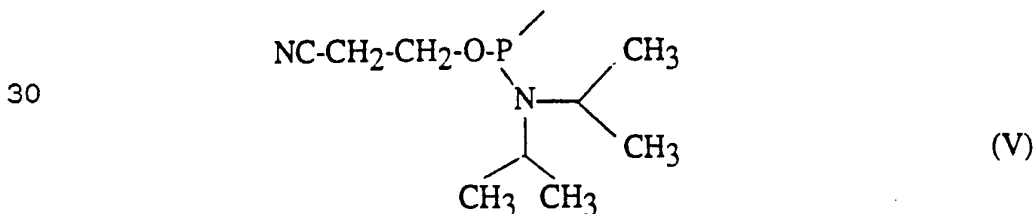


5 dans laquelle R_1 représente un groupe phosphorylé éventuellement protégé, approprié à l'introduction du composé ou synthon (IIIa) à l'extrémité d'un nucléotide ou bien d'un synthon déjà condensé sur un support solide approprié pour un type donné de synthèse
10 d'assemblage internucléotidique.

16. Procédé suivant la revendication 15, lorsqu'il est appliqué à la synthèse aux phosphoramidites, caractérisé en ce que l'agent de phosphorylation utilisé à l'étape g) est la diisopropylaminocya-
15 noéthoxychlorophosphine de formule



si bien que dans le composé de formule III obtenu à l'issue de cette étape, R_1 est un groupe diisopropylaminocyanoéthoxyphosphino ou cyanoéthoxydiisopropylaminophosphoramidite de formule
25



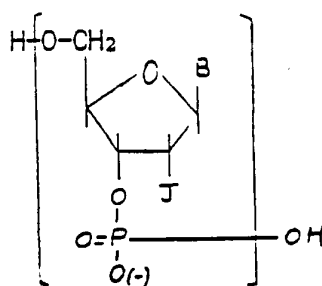
75.

17. Procédé suivant la revendication 16 caractérisé en ce que dans les formules (XXXIIa, XIVa, XVb et IIIa) n est égal à 5.

5 18. Procédé de préparation de sondes de formule XX telle que définie à la revendication 6 comportant la synthèse d'une séquence d'acides nucléiques S

10

15

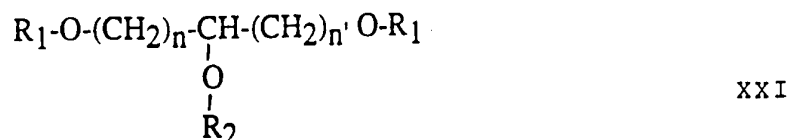


dans laquelle B et J ont les significations données
 20 précédemment à la revendication 4, par toute méthode
 de synthèse d'assemblage internucléotidique manuelle
 ou automatique connu, de préférence sur support
 solide,
 et la fixation d'un marqueur
 25 caractérisé en ce que pour la fixation du moyen de
 marquage, ladite séquence est soumise, de préférence
 par la même méthode de synthèse, notamment sur support
 solide, à une extension en son extrémité 5'(OH) par un
 élément de marquage M tel que défini à la revendica-
 30 tion 6 formant un édifice moléculaire ramifié dont les
 bras terminaux portent chacun une fonction amino pri-
 maire.

19. Procédé selon la revendication 18 pour la
 35 préparation d'une sonde constituée par une chaîne

oligonucléotidique portant en 5'(OH) un enchevêtrement ramifié de chaînes alkyles se terminant par des chaînes aminées utiles dans la détection de séquences d'ADN par des méthodes non radioactives, caractérisé par les opérations consistant à

- synthétiser sur un support solide une chaîne oligonucléotidique dont les fonctions phosphates et les bases sont protégées;
- condenser à l'extrémité 5'(OH) de ladite chaîne une série de composés de formule



15

où R_1 est un groupe protecteur des fonctions alcool primaire et R_2 représente H ou tout autre groupe phosphorylé, éventuellement protégé, approprié à l'introduction du synthon XXI à l'extrémité 5' d'un nucléotide ou d'un synthon déjà existant, ce qui donne lieu à n sites de condensation étant des sites alcool primaire puis

- sur chacun desdits sites alcool primaire, effectuer une condensation finale d'un composé de formule

25



30

dans laquelle

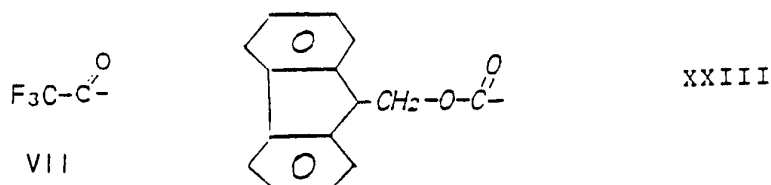
R_2 a les significations données ci-dessus et X représente

35

- soit un marqueur: phosphatase alcaline, peroxydase, fluorescéine, biotine, digoxigénine, tout haptène capable d'être reconnu

par des anticorps marqués de manière non isotopique

- soit un groupe protecteur transitoire de la fonction amine primaire destiné à être éliminé après synthèse totale de la sonde d'acides nucléique XX; à titre illustratif, dans cette approche de synthèse, X peut représenter un trifluoroacétyle VII, un fluorénylméthoxycarbonyle XXIII



les condensations des composés XXI et XXII mettant en oeuvre les mêmes cycles de réaction que pour la synthèse de la séquence oligonucléotidique,

- déprotéger les bases et phosphates de ladite chaîne oligonucléotidique et
- introduire au niveau des groupes amino primaire la partie qui fournit la réactivité responsable de la détection.

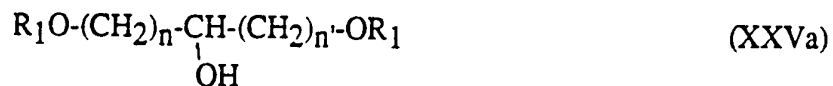
20. Procédé suivant la revendication 19, caractérisé en ce que le composé de formule XXI est obtenu au départ d'un alcanetriol de formule



78.

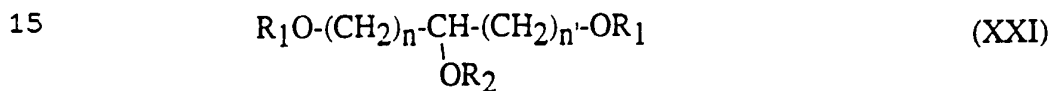
par les étapes suivantes de

- a) protection de la fonction alcool primaire au moyen d'un groupe protecteur R_1 pour obtenir un composé de formule



et

- b) transformation de la fonction alcool secondaire en un groupement OR_2 pour obtenir un composé



dans laquelle R_2 a la signification donnée à la revendication 19.

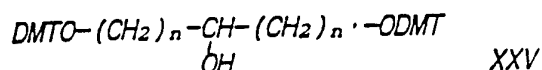
21. Procédé suivant la revendication 20, caractérisé en ce que
à l'étape a) R_1 signifie 4,4'-diméthoxytrityle (en abrégé DMT) de formule



79.

et la protection de la fonction alcool primaire est réalisée au moyen de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (DMT-Cl) pour obtenir un composé de formule

5

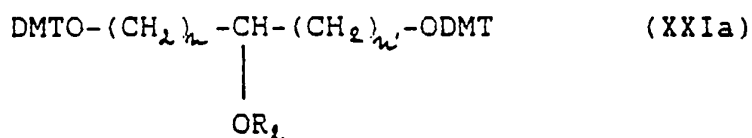


10

15

et l'étape b) comprend une phosphorylation du composé XXV pour obtenir un composé

20



dans laquelle R_1 représente un groupe phosphorylé éventuellement protégé approprié à l'introduction du composé XXIa (synthon) à l'extrémité 5' d'un nucléotide ou à une extrémité d'un synthon déjà condensé sur un support solide approprié pour un type donné de synthèse d'assemblage internucléotidique.

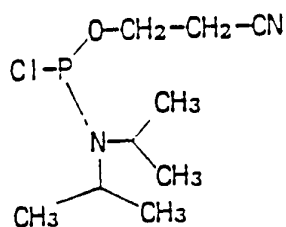
30

22. Procédé suivant la revendication 21, lorsqu'il est appliqué à la synthèse aux phosphoramidites, caractérisé en ce que l'agent de phosphorylation utilisé à l'étape b) est le diisopropylaminocyanoéthoxy-chlorophosphine de formule

35

80.

5



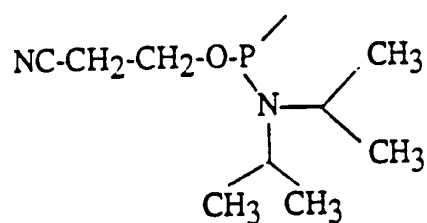
XI

10

si bien que dans le composé XXIa obtenu à l'issue de cette étape, R_1 est un groupe diisopropylaminocya-
noéthoxyphosphine ou cyanoéthoxydiisopropylamino-
phosphoramidite de formule

15

20



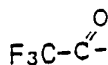
(V)

25

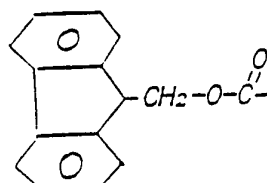
23. Procédé suivant la revendication 19, caracté-
30 risé en ce que, dans le composé XXII, le groupe R_2
a en particulier les significations données aux
revendications 19 et 22 et X représente un groupe pro-
tecteur transitoire de la fonction amino primaire des-
tiné à être éliminé après synthèse totale de la sonde
35 d'acides nucléiques XX.

81.

24. Procédé suivant la revendication 23, caractérisé en ce que dans le composé XXII, le groupe X représente un trifluoracétyl VII ou un fluorénylméthoxycarbonyl XXIII

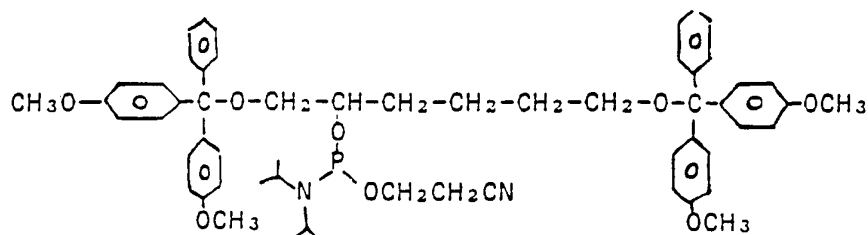


VII



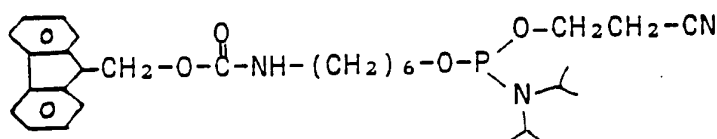
XXIII

25. Procédé suivant la revendication 21 et 22, caractérisé en ce que, dans le composé XXIa n est égal à 1, n' est égal à 4 et R₁ est un groupe cyanoéthoxydiisopropylaminophosphoramidite, en sorte que le composé XXIa mis en oeuvre répond à la formule



47

26. Procédé suivant la revendication 24, caractérisé en ce que dans le composé XXII, le groupe R₂ est un groupe cyanoéthoxydiisopropylaminophosphoramidite et X est un groupe fluorénylméthoxycarbonyl et n'' est égal à 6 en sorte que le composé XXII mis en oeuvre répond à la formule



48

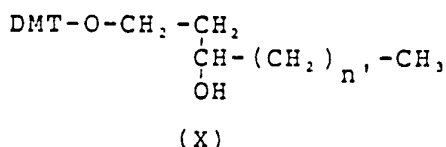
82.

27. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 26, caractérisé en ce que le support solide est un CPG (Controlled Porous Glass) fonctionnalisé.

5

28. Procédé suivant la revendication 27, caractérisé en ce que dans le cas de oligonucléotides marqués en 3'(OH), le CPG est fonctionnalisé par un composé de formule

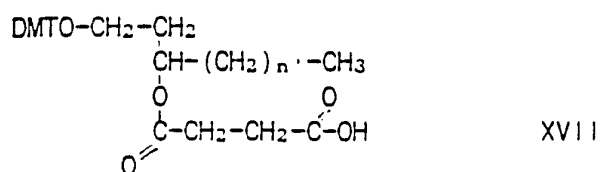
10



15 dans laquelle DMT et n' ont les significations données aux revendications 7 et 12.

29. Procédé suivant la revendication 28, caractérisé en ce que la fonctionnalisation du CPG comprend
les opérations consistant à
- acyler la fonction alcool secondaire d'un composé de formule X pour former un composé de formule

20



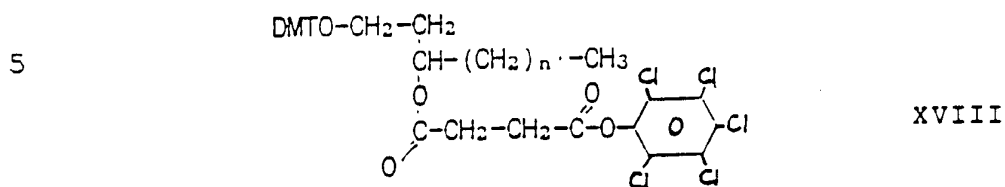
25

30 dans laquelle DMT et n' ont les significations données aux revendications 7 et 12

- activer la fonction acide carboxylique du composé de formule XVII par le pentachlorophénol en présence de carbodiimide pour former un ester de formule

35

83.

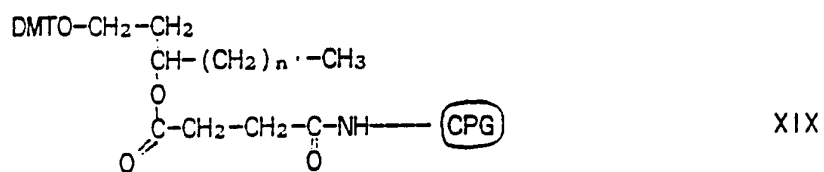


10

et

- fixation du dérivé XVIII sur le support solide aminé pour former un support fonctionnalisé

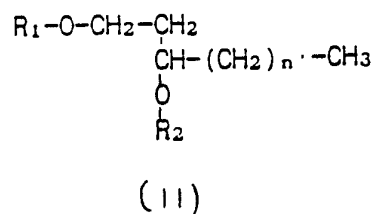
15



20

30. A titre d'intermédiaires utiles pour la préparation des bras chimiques L, les composés de formule

25



30

dans laquelle

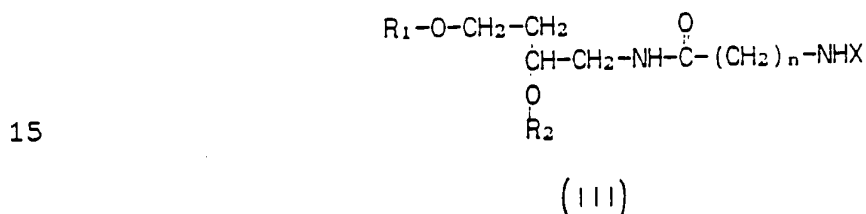
n' représente un nombre entier de 0 à 20

R₁ est un groupe protecteur de la fonction alcool primaire

35 et

R_2 représente H ou tout groupe phosphorylé éventuellement protégé approprié à l'introduction de synthon II à l'extrémité 3' et/ou 5' d'un nucléotide ou d'un synthon déjà condensé sur un support solide pour un type donné de synthèse d'assemblage internucléotidique.

31. A titre d'intermédiaire utiles pour la préparation des unités de marquage M, les composés de formule



20

dans laquelle

n représente un nombre entier de 0 à 20,

R_1 est un groupe protecteur de la fonction alcool primaire et

R_2 représente H ou tout groupe phosphorylé éventuellement protégé approprié à l'introduction du synthon III à l'extrémité d'un nucléotide ou d'un synthon déjà condensé sur un support solide pour un type donné de synthèse d'assemblage internucléotidique

et

X représente tous des marqueurs soit un groupe protecteur transitoire de la fonction amine primaire destiné à être éliminé après synthèse totale de la sonde d'acides nucléiques.

85.

32. Composés selon l'une quelconque des revendications 30 et 31, caractérisé en ce que R_1 représente un groupe 4,4'-diméthoxytrityle (abrégé (DMT) labile en milieu acide

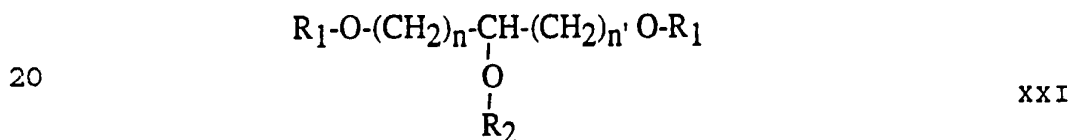
5 et

R_2 représente un groupe cyanoéthoxydiisopropylamino-phosphoramidite.

33. Composés selon les revendications 31 et 32, caractérisés en ce que

X représente un groupe acétyle trifluoracétyle ou benzoyle.

34. A titre d'intermédiaires utiles pour la synthèse d'éléments de marquage M ramifiés dans une sonde d'acides nucléiques en candélabre, les composés de formule



dans laquelle

n et n' représentent des nombres de 0 à 20,

25 R_1 représente un groupe protecteur des fonctions alcool primaire, tel que 4,4-diméthoxytrityle (en abrégé DMT)

et

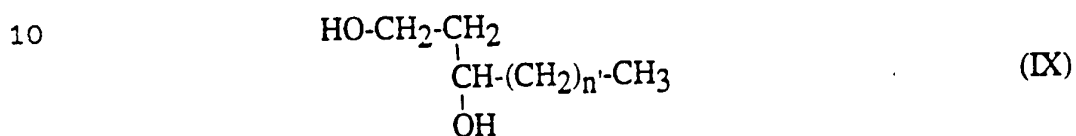
30

R_2 représente H ou tout groupe phosphorylé éventuellement protégé, approprié à l'introduction du synthon (XXI) à l'extrémité 5' d'un nucléotide ou d'un synthon déjà condensé sur un support solide pour un type donné de

35

synthèse d'assemblage internucléotidique, tel
que cyanoéthoxydiisopropylaminophosphorami-
dite.

5 35. Procédé de préparation des intermédiaires de
formules II telle que définie à la revendication 30
caractérisé en ce qu'il part d'un alcanediol 1,3 de
formule



15

et comporte les étapes de protection des fonctions alcool primaire et secondaire telles que décrites à la revendication 11, avec, de préférence, les particularités décrites aux revendications 12 et 13.

36. Procédé de préparation des composés intermédiaires de formule III telle que définie à la revendication 31, caractérisé en ce qu'il part d'un butène-3-ol-1 de formule



30 lequel est soumis successivement à des étapes, de protection de la fonction alcool primaire, d'époxydation de la liaison double, d'ouverture de l'époxyde, de réaction de condensation avec un composé de formule

35

87.



5

et de phosphorylation du produit de condensation,
telles que décrites à la revendication 14 avec, de
préférence, les particularités décrites aux revendi-
cations 15 à 17.

37. Procédé de préparation des composés intermé-
diaires de formule XXI telle que définie à la reven-
dication 34, caractérisé en ce qu'il part d'un alca-
netriol de formule

15



20

et comporte les étapes de protection des fonctions
alcool primaire et secondaire telles que décrites à la
revendication 20 avec, de préférence, les particula-
rités décrites aux revendications 21 et 22.

25

30

35

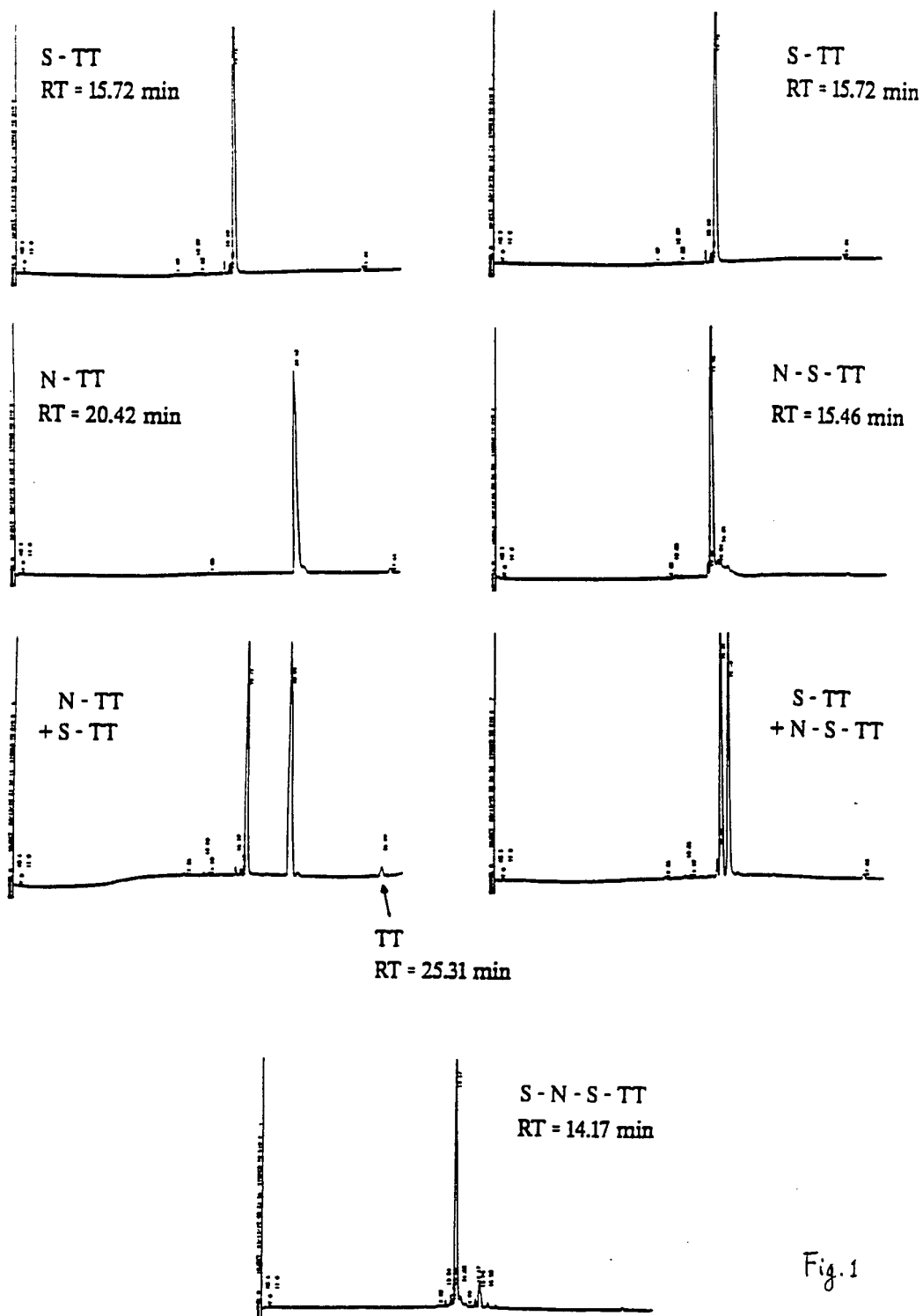
Réactivité du bras aminé :

Fig. 1

2/9

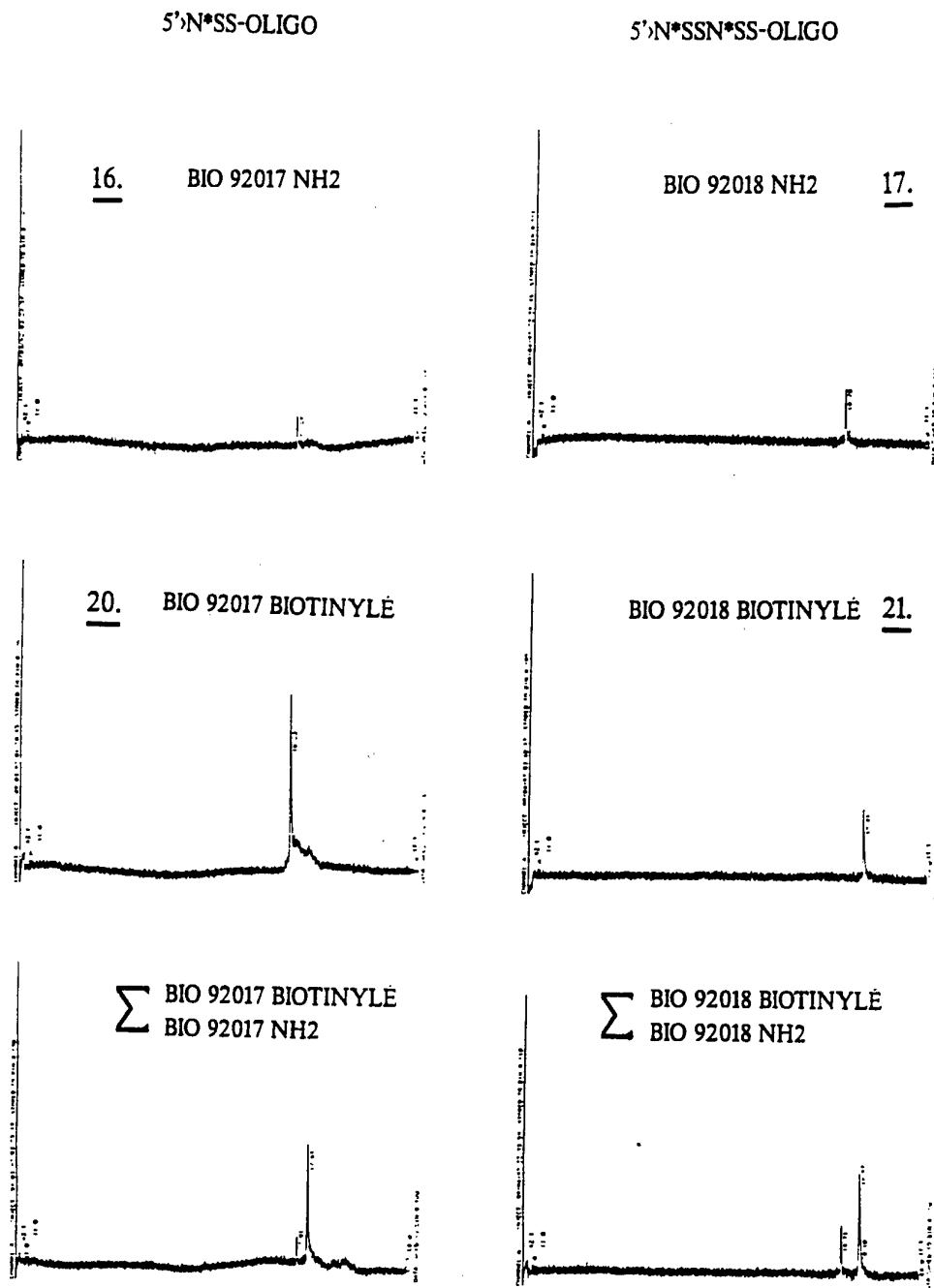
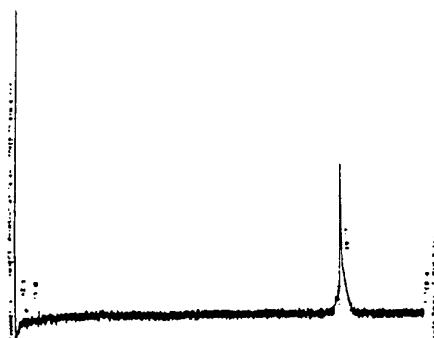
Oligo 23 mer avec bras aminés en 5' OH

Fig. 2a

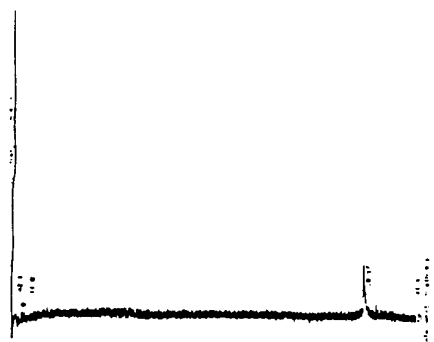
3/9

Oligo 23 mer avec bras aminés en 5' OH

5'-N*SSN*SSN*SS-OLIGO



BIO 92019 NH2

18.

BIO 92019 BIOTINYLE

22. Σ BIO 92019 BIOTINYLE
BIO 92019 NH2

Fig. 2b

4/9

ESSAIS AVEC CPG FONCTIONNALISE AVEC "S",
BRAS "N" A 0,1 M

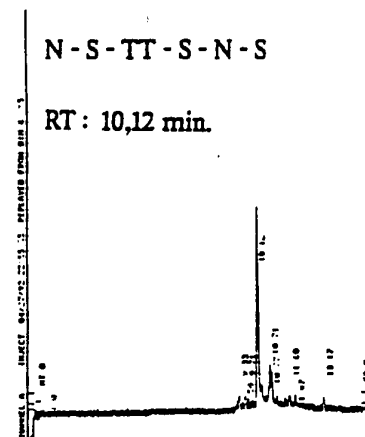
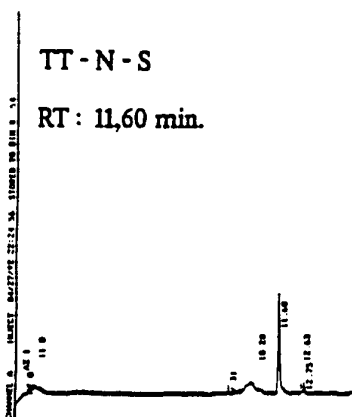
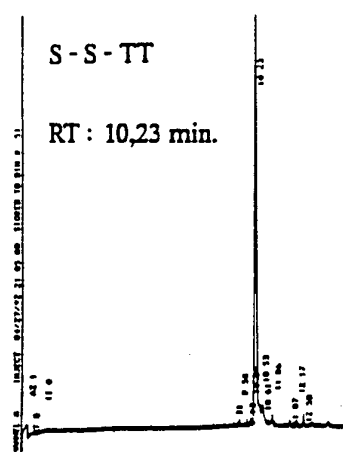
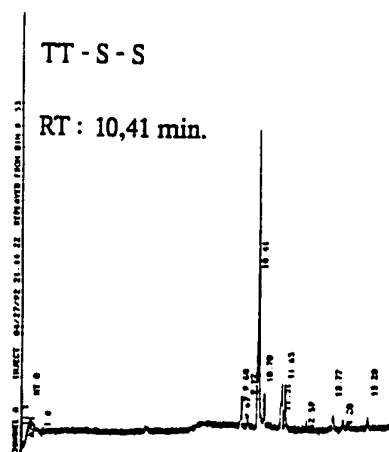


Fig. 3

5/9

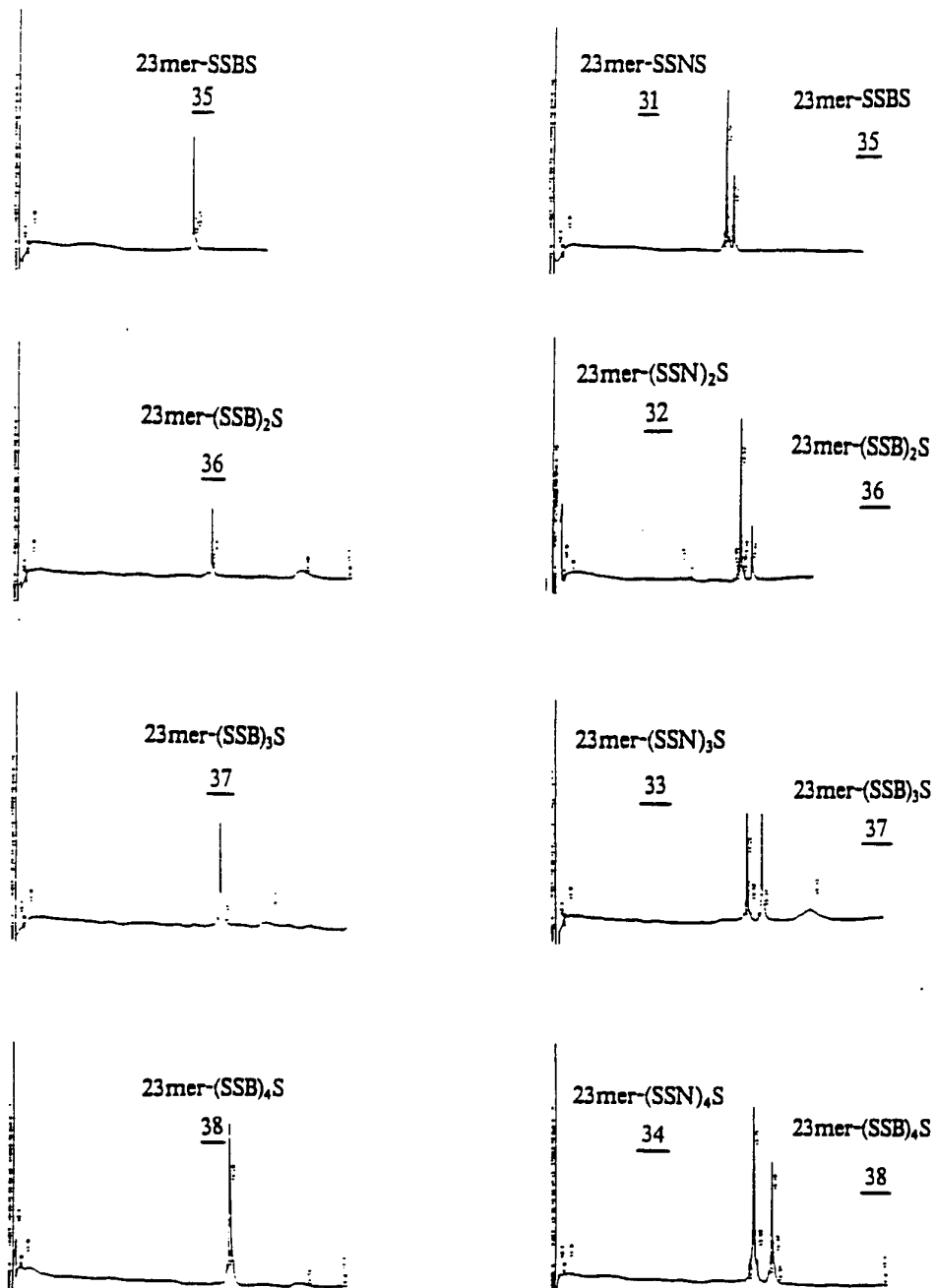
Oligonucléotides biotinylés en 3'OH

Fig. 4

Oligonucléotides biotinylés en 3' et 5' OH

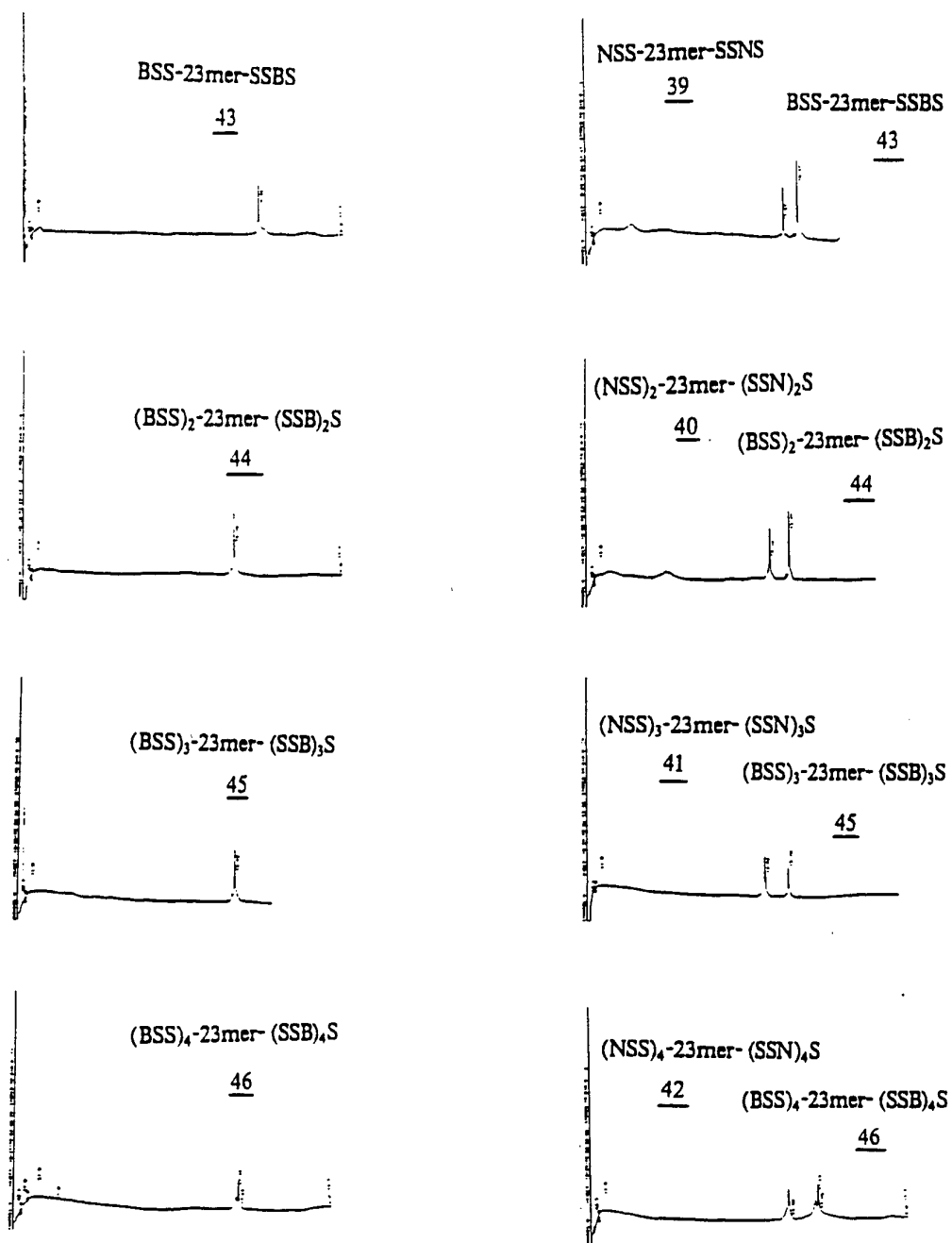


Fig. 5

7/9

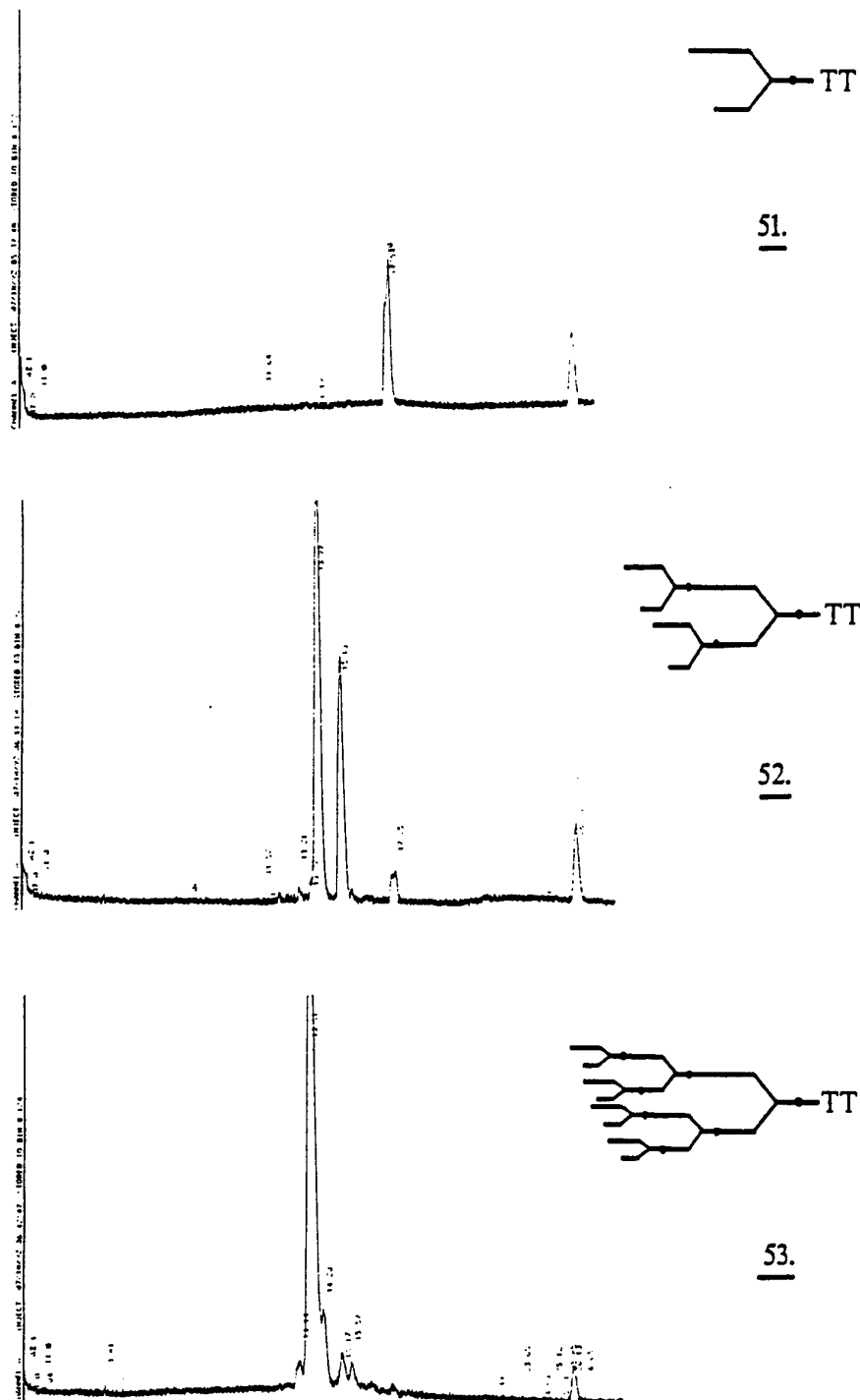


Fig. 6

8/9

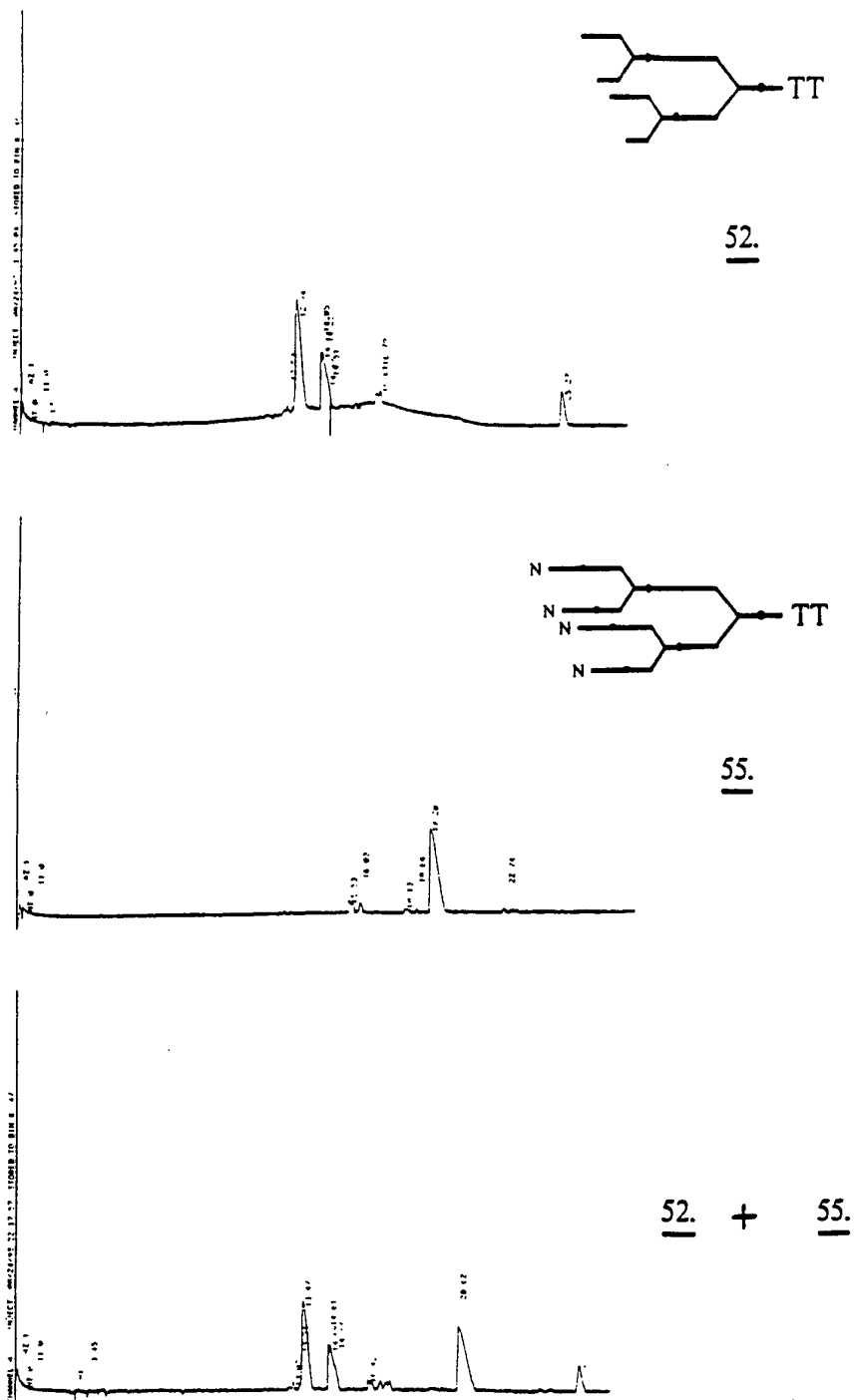


Fig. 7

9/9

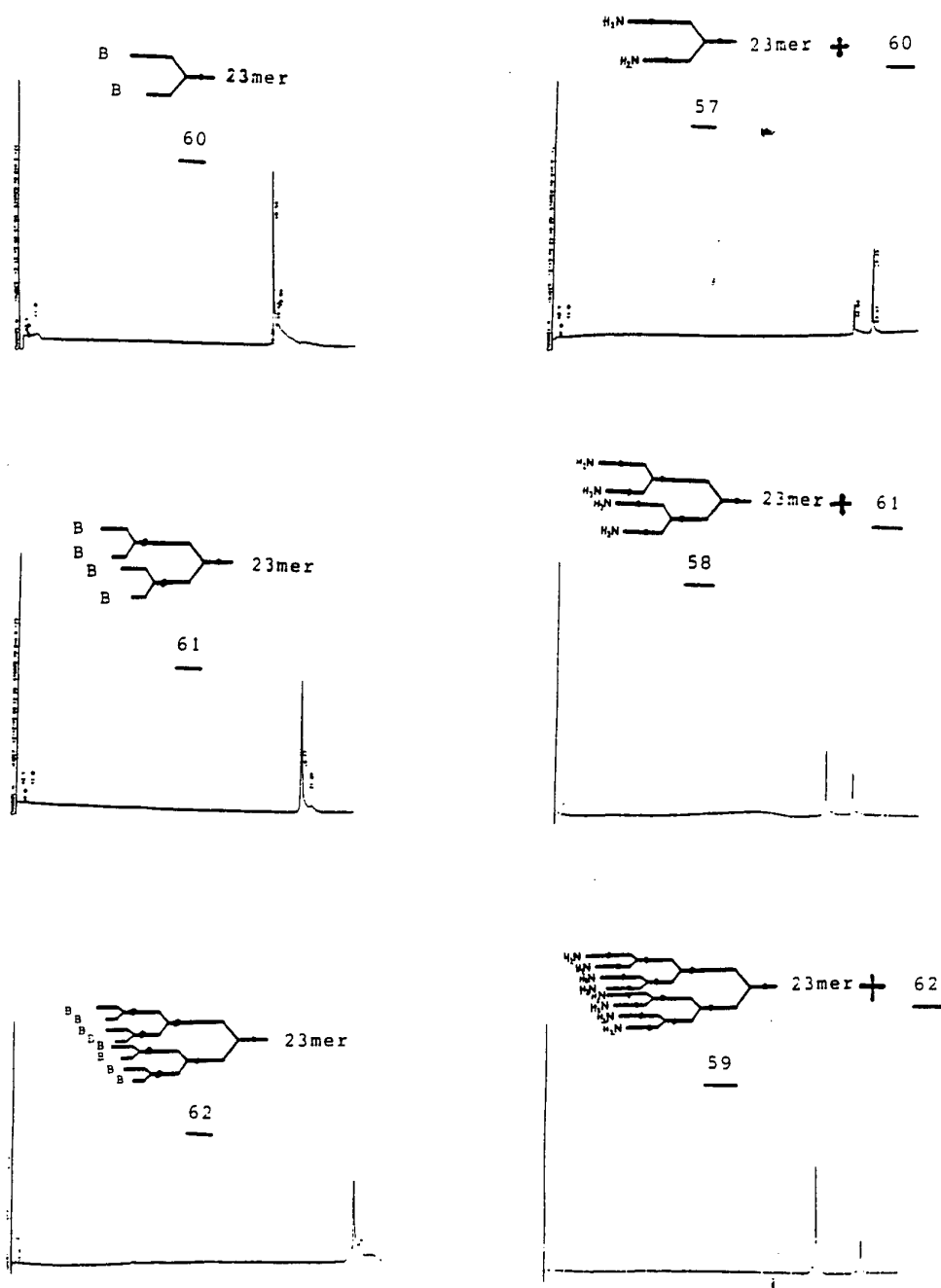
Constructions en candélabre

Fig. 8