

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale
9 mars 2006 (09.03.2006)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/024722 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C07F 9/24,
C07D 207/46, C07C 271/08, C07F 7/18

(74) Mandataires : GOULARD, Sophie etc.; CABINET
ORES, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001786

(22) Date de dépôt international : 11 juillet 2005 (11.07.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0408318 28 juillet 2004 (28.07.2004) FR

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 PARIS (FR). UNI-
VERSITE JOSEPH FOURIER [FR/FR]; 621 Avenue
Centrale, Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères,
F-38041 GRENOBLE (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : HOANG,
Antoine [FR/FR]; 26, rue Félix Esclangon, F-38000
GRENOBLE (FR). VINET, Françoise [FR/FR]; 22
boulevard Edouard REY, F-38000 GRENOBLE (FR).
DEFRANCQ, Eric [FR/FR]; Le Sauget, F-38830
SAINT-PIERRE-D'ALLEVARD (FR). DUMY, Pascal
[FR/FR]; Chemin du Chaboud, F-38580 ALLEVARD
(FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COUPLING AGENTS COMPRISING A PHOTOLABILE PROTECTING GROUP AND USES THEREOF, SUCH AS FOR THE FUNCTIONALISATION OF SOLID SUPPORTS

(54) Titre : AGENTS DE COUPLAGE A GROUPEMENT PROTECTEUR PHOTOLABILE ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA FONCTIONNALISATION DE SUPPORTS SOLIDES

(57) Abstract: The invention relates to compounds comprising a photolabile protecting group and to the use thereof as coupling agents for the functionalisation of solid supports. The invention also relates to the solid supports functionalised by said compounds and to the use of same for the immobilisation of biological molecules of interest, such as nucleic acid molecules.

(57) Abrégé : La présente Invention est relative à des composés comportant un groupement protecteur photolabile, à leur utilisation à titre d'agent de couplage pour la fonctionnalisation de supports solides. La présente Invention est également relative aux supports solides fonctionnalisés par ces composés, ainsi qu'à leur utilisation pour l'immobilisation de molécules biologiques d'intérêt, notamment de molécules d'acide nucléique.

WO 2006/024722 A1

**AGENTS DE COUPLAGE A GROUPEMENT PROTECTEUR
PHOTOLABILE ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA
FONCTIONNALISATION DE SUPPORTS SOLIDES**

La présente Invention est relative à des agents de couplage comportant un groupement protecteur photolabile et à leur utilisation pour la fonctionnalisation de supports solides. La présente Invention est également relative aux supports solides fonctionnalisés par ces agents de couplage, ainsi qu'à leur utilisation pour l'immobilisation de molécules biologiques d'intérêt, notamment de molécules d'acide nucléique.

Différentes méthodes permettant le greffage covalent de molécules biologiques d'intérêt, et notamment d'acide nucléique tel que les oligonucléotides (ON), sur un support solide ont été déjà été proposées. Dans le cadre particulier de la fixation d'ON, ces méthodes peuvent être divisées en deux grandes catégories :

1) La synthèse *in situ* qui consiste à construire pas à pas la molécule d'ON sur un support solide en utilisant le principe de la synthèse par la voie des phosphoramidites. Cette méthode, décrite notamment dans la demande internationale WO 97/39151 permet la préparation de surfaces à hautes densités en ON. En outre, par un jeu de caches et l'utilisation de groupes protecteurs photolabiles, elle permet l'adressage des différents ON sur le support. Néanmoins, cette méthode présente un certain nombre de désavantages majeurs. En particulier, les ON fixés sur le support ne peuvent pas être caractérisés et il est très difficile d'incorporer des ON porteurs de modifications.

2) La synthèse par déposition, ou *ex situ*, qui consiste, dans un premier temps, à préparer l'ON de manière conventionnelle, puis dans un second temps, à le fixer sur un support solide en utilisant une réaction chimique adaptée. Cette deuxième méthode présente notamment l'avantage de mettre en œuvre des molécules d'ON qui peuvent être caractérisées avant leur fixation sur le support solide.

L'Invention qui va être décrite ci-après, s'inscrit plus spécialement dans le cadre des méthodes de synthèse par déposition.

Plusieurs types de méthodes de synthèse par déposition ont déjà été décrites dans l'art antérieur, notamment en ce qui concerne les différentes techniques permettant de localiser le greffage de l'ON.

On peut, en premier, lieu mentionner les méthodes utilisant la voie électrochimique qui consistent à ancrer l'ON, préalablement fonctionnalisé par un groupement électroconducteur tel que par exemple par un groupement pyrrole, *via* l'électropolymérisation du résidu pyrrolique. Ce type de méthode de déposition d'ON par voie électrochimique a notamment été décrit dans le brevet FR 2 703 359. Il présente néanmoins l'inconvénient de nécessiter l'emploi d'un support conducteur de l'électricité, ce qui complexifie le composant final. D'autre part, dans un composant de type "laboratoire sur puce" ("Lab On a Chip"), les différentes étapes de fabrication peuvent altérer la qualité des électrodes et donc leur fonctionnalité.

On peut, en deuxième lieu, mentionner la voie photochimique qui semble être plus prometteuse car la gestion des surfaces et des solutions chimiques à mettre en œuvre est externalisée. Deux approches ont été développées :

i) le photogreffage direct entre la surface et la molécule cible. Dans ce cas, le photogreffage présente le désavantage de faire intervenir des réactions radicalaires peu sélectives ;

ii) la libération d'une fonction protégée par un groupement protecteur photolabile sur le support, pour permettre la réaction ultérieure avec l'ON cible pour conduire à sa fixation. Dans ce cas, les supports mis en œuvre sont généralement fonctionnalisés par des agents de couplage qui sont des composés bifonctionnels comportant à une de leurs extrémités une fonction d'accrochage sur la surface du support et à l'autre extrémité une fonction réactive vis-à-vis d'une molécule cible comportant une fonction chimique complémentaire, ladite fonction réactive de l'agent de couplage étant protégée par un groupement photolabile. Cependant, pour être compétitive, cette dernière approche doit répondre à un certain nombre de critères. Ces critères sont les suivants :

- la réaction entre le support activé et la molécule cible doit être rapide ; cette réaction ne peut intervenir que lorsque que les fonctions réactives de l'agent de couplage ont été libérées de leur groupement protecteur (réaction d'activation) ;

- le rendement de cette réaction doit être élevé ;

- le procédé de synthèse permettant de préparer les agents de couplage doit être simple à mettre en œuvre et comporter le moins d'étapes possible ;

- l'utilisation de conditions de réactions douces (eau par exemple) ;
- la liaison formée entre l'agent de couplage et la molécule cible doit être stable dans différentes conditions de température et de pH de façon à permettre une utilisation très souple du support ainsi fonctionnalisé.

5 Or, il apparaît que les différentes méthodes proposées jusqu'à ce jour ne remplissent pas l'ensemble de ces critères de façon totalement satisfaisante, notamment en raison de la nature des différents agents de couplages utilisés.

10 C'est pourquoi les Inventeurs se donnés pour but de pourvoir à de nouveaux agents de couplages bifonctionnels comportant une fonction réactive protégée par un groupement photolabile, qui soient faciles à synthétiser, selon un procédé comportant peu d'étapes et réalisable en conditions douces, ces agents de couplage pouvant avantageusement être utilisés pour fonctionnaliser des supports solides dans le but d'y fixer ensuite des molécules biologiques cibles.

15 La présente Invention a donc pour premier objet un agent de couplage de formule (I) suivante :

A-X-B-Proc (I)

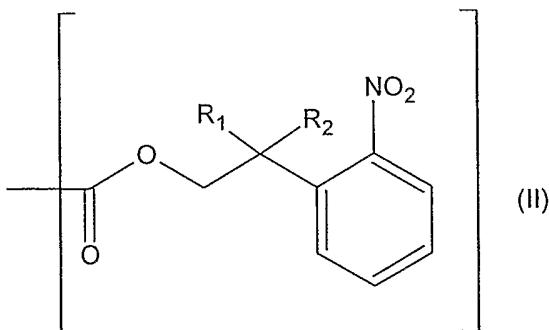
dans laquelle :

20 - A représente une fonction d'accrochage sur un support solide, ladite fonction étant choisie parmi les fonctions de type amine, phosphoramidite, silane et ester activé ;

- X représente un bras espaceur ;

25 - B est une fonction réactive choisie parmi les groupements conduisant, après photo-déprotection, à une fonction de type oxyamine (-ONH₂) et dérivés ou hydrazide (-NH-NH₂) et dérivés, ladite fonction B étant protégée par un groupement Proc ;

- Proc est un groupement protecteur photolabile de formule (II) suivante :



dans laquelle :

- R_1 et R_2 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle en C_1-C_4 .

5 Selon l'Invention, la fonction A sera choisie en fonction de la nature du support sur lequel les agents de couplage de formule (I) seront destinés à être fixés. Les fonctions de type ester activé sont de préférence des fonctions acides carboxyliques estérifiées par du *N*-hydroxysuccinimide, ou encore par tout autre réactif d'activation convenable et connu de l'Homme du métier tel que par exemple le
10 pentafluorobenzène.

Le bras espaceur X peut être de longueur et de polarité variables selon les propriétés finales souhaitées. Il peut par exemple être une chaîne hydrophobe non chargée (telle qu'une chaîne hydrocarbonée saturée) ou bien une chaîne hydrophile non chargée tel qu'un éther de glycol.

15 Selon une forme de réalisation particulièrement préférée de l'Invention, le bras espaceur X est choisi parmi les chaînes hydrocarbonées saturées comportant de 1 à 13 atomes de carbone et les éthers de glycol dans lesquels la chaîne carbonée comporte de 4 à 12 atomes de carbone tels que le triéthylèneglycol (TEG) et l'hexaéthylèneglycol (HEG).

20 La fonction réactive B est une fonction qui permet, après photodéprotection, la fixation covalente de molécules cibles porteuses d'au moins une fonction chimique complémentaire. Ces fonctions réactives B seront aptes à interagir avec une fonction complémentaire portée par lesdites molécules cibles telle que les fonctions amines, les alcools, les thiols, les carboxyles, les carbonyles. On pourra trouver facilement, dans toute monographie de chimie organique, une liste plus exhaustive des paires de groupements fonctionnels complémentaires.
25

Au sein des groupements protecteurs de formule (II) ci-dessus, et lorsqu'ils représentent un radical alkyle, R₁ et R₂, indépendamment l'un de l'autre, sont de préférence choisis parmi les radicaux méthyle et éthyle ; le radical méthyle étant tout particulièrement préféré.

5 Parmi les agents de couplage de formule (I) ci-dessus, on préfère particulièrement ceux dans lesquels :

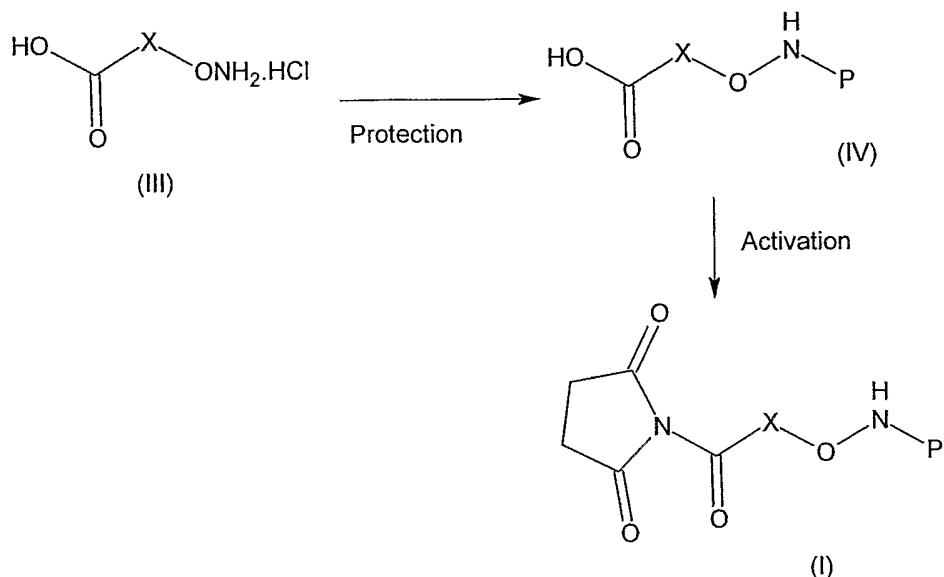
- i) - A représente une fonction phosphoramidite,
 - X représente une chaîne hydrocarbonée saturée ayant 6 atomes de carbone,
 - B représente une fonction oxyamine (-ONH-), et
 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène ou un radical méthyle ;
- ii) - A représente une fonction trialcoxy(C₁-C₄)silane,
 - X représente une chaîne hydrocarbonée saturée ayant de 2 à 12 atomes de carbone,
 - B représente une fonction oxyamine (-ONH-), et
 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène ou un radical méthyle ;
- iii)- A représente une fonction carboxylique estérifiée par du N-hydroxysuccinimide ou du pentafluorobenzène,
 - X représente -CH₂-,
 - B représente une fonction oxyamine (-ONH-), et
 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène ou un radical méthyle ;

10 20 25 30 Parmi les composés définis au point iii) ci-dessus, on préfère tout particulièrement les composés dans lesquels la fonction A est du triéthoxysilane et X une chaîne hydrocarbonée saturée ayant 3 ou 11 atomes de carbone. Les agents de couplages de formule (I) ci-dessus peuvent être facilement préparés selon les principes de synthèse organique bien connus de l'homme du métier et suivant la nature des fonctions A et B.

Selon une première forme de réalisation de l'Invention, et lorsque l'agent de couplage est un composé de formule (I) dans lequel la fonction d'accrochage

A est de type acide carboxylique activé sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide par exemple, et la fonction B est une fonction oxyamine, on utilise de préférence un procédé de préparation répondant au Schéma 1 suivant :

SCHEMA 1

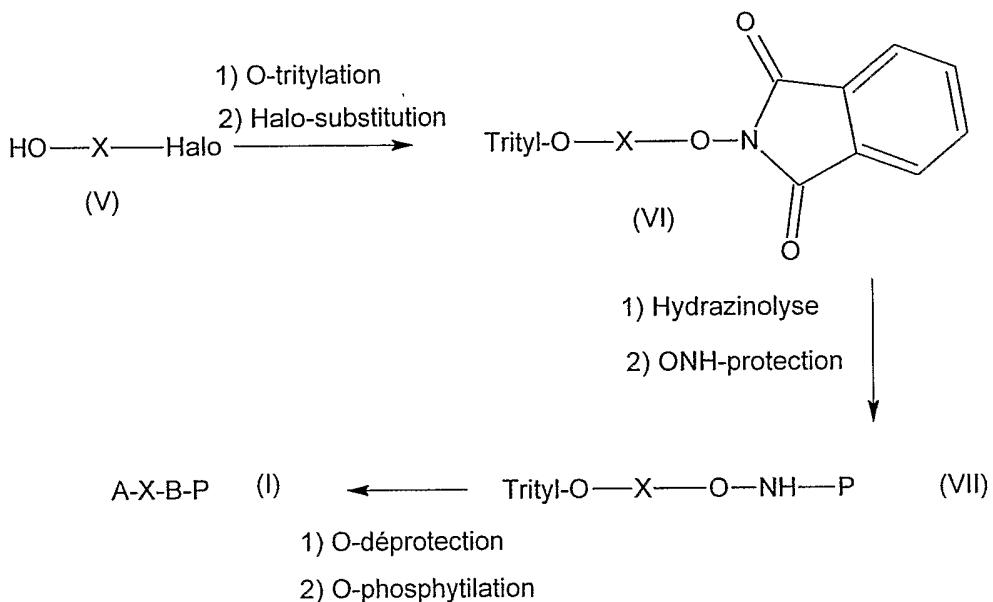


5

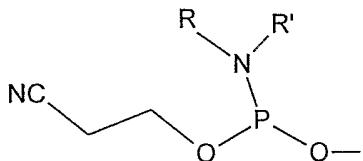
Dans ce schéma, Proc est un groupement protecteur photolabile de formule (II) telle que définie précédemment et X est un bras espaceur pouvant prendre les mêmes significations que celles indiquées précédemment.

Selon ce schéma, un composé de formule (III) comportant une fonction carboxylique et une fonction oxyamine est, dans une première étape, protégé par un groupement protecteur photolabile Proc de formule (II) choisie, pour conduire à un composé de formule (IV), puis dans une deuxième étape, la fonction acide carboxylique du composé de formule (IV) est activée par du *N*-hydroxysuccinimide, pour conduire au composé de formule (I) attendu.

15 Selon une deuxième forme de réalisation de l'Invention, et lorsque l'agent de couplage est un composé de formule (I) dans lequel la fonction d'accrochage A est une fonction phosphoramidite, et la fonction B est une fonction oxyamine, on utilise de préférence un procédé de préparation répondant au Schéma 2 suivant :

SCHEMA 2

Sur ce schéma, X et Proc ont les mêmes significations que celles indiquées précédemment, B représente une fonction oxyamine et A désigne le 5 groupement suivant :



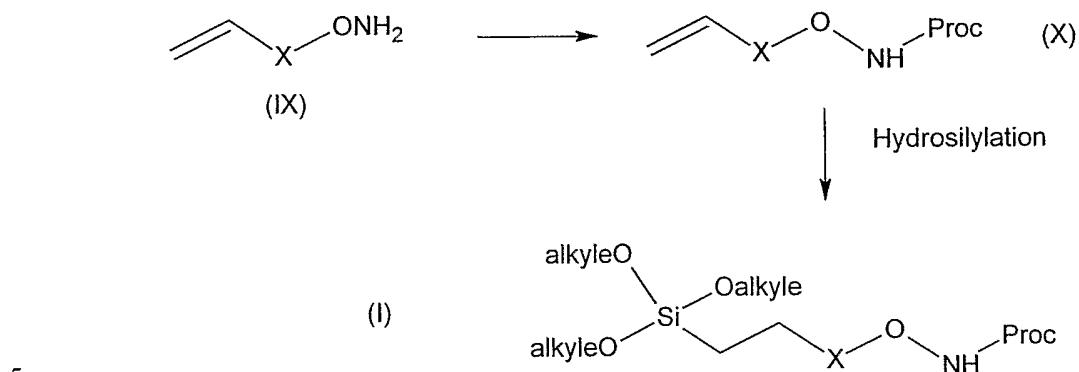
dans lequel R et R', identiques ou différents, représentent un radical alkyle ayant de 1 à 13 atomes de carbone.

Selon ce schéma, on fait réagir, dans une première étape, un alcool halogéné de formule (V) dans lequel Halo représente un atome d'halogène tel que le brome, le chlore, l'iode ou le fluor, avec du *N*-hydroxyphtalimide (substitution nucléophile de l'atome d'halogène) pour obtenir un composé de formule (VI) qui, dans une deuxième étape, subit une hydrazinolysé afin de libérer la fonction oxyamine qui est ensuite protégée par un groupement protecteur Proc photolabile de formule (II) 10 choisie pour conduire à un composé de formule (VII) qui, dans une troisième étape, subit une phosphitylation pour conduire au composé de formule (I) attendu. 15

Selon une troisième forme de réalisation de l'Invention, et lorsque l'agent de couplage est un composé de formule (I) dans lequel la fonction d'accrochage

A est de type silane et la fonction B est une fonction oxyamine, on utilise de préférence un procédé de préparation répondant au Schéma 3 suivant :

SCHEMA 3



5

5 Selon ce procédé, on protège la fonction oxyamine d'un composé alcène de formule (IX) dans lequel X représente un bras espacer pouvant prendre les mêmes significations que celles indiquées précédemment pour les agents de couplage de formule (I), pour obtenir un composé de formule (X) qui subit ensuite une 10 hydro-silylation pour conduire à un composé de formule (I) dans lequel la fonction d'accrochage A est une fonction trialcoxy(C₁-C₄)silane.

10 Les agents de couplage de formule (I) conformes à l'Invention peuvent être utilisés pour la fonctionnalisation de supports solides. La présente Invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins un agent de couplage de formule 15 (I) tel que défini précédemment, pour la fonctionnalisation de supports solides.

L'utilisation des agents de couplage de formule (I) permet avantageusement de modifier rapidement la surface de supports solides par une couche stable porteuse de fonctions réactives facilement accessibles par photodéprotection.

20 Ainsi, la présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un support solide fonctionnalisé, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins une étape de mise en contact d'au moins une surface d'un support solide avec une solution d'au moins un agent de couplage de formule (I) dans un solvant organique.

Le solvant organique est de préférence choisi parmi les solvants non polaires tels que par exemple le trichloroéthylène, le diméthylformamide (DMF) et le cyclohexane.

La mise en contact du support solide avec la solution de l'agent de 5 couplage de formule (I) est de préférence réalisée à une température comprise entre 4 et 80°C environ, pendant 1 à 48 heures environ.

Le substrat est ensuite rincé avec un ou plusieurs solvants, de préférence et successivement avec le solvant de réaction, de l'éthanol absolu et/ou du chloroforme, puis séché, de préférence à l'azote.

10 Ce procédé présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et permet l'obtention d'une couche de bonne densité. Il permet notamment d'obtenir des supports solides comportant au moins une surface fonctionnalisée par une monocouche auto-assemblée de composés de formule (I) ("Self-Assembled-Monolayer" : SAM). Les SAMs sont définies comme un assemblage de molécules 15 dans lequel les molécules sont organisées, organisation due à des interactions entre les chaînes des molécules, donnant lieu à un film anisotrope stable, monomoléculaire et ordonné (A. ULMAN, Chem. Rev., 1996, **96**, 1533-1554). Il est en particulier possible d'obtenir de telles SAMs lorsque l'on fonctionnalise la surface d'un support solide avec 20 un agent de couplage de formule (I) conforme à l'Invention dans lequel la fonction d'accrochage A est une fonction de type silane, de préférence en solution à 10 mM environ dans un solvant tel que le trichloroéthylène et lorsque la mise en contact est réalisée à une température d'environ 4°C pendant environ 24 heures.

Par ailleurs, les surfaces obtenues en mettant en œuvre le procédé conforme à l'Invention présentent directement un grand nombre de fonctions réactives 25 protégées par un groupement protecteur photolabile facile à enlever de façon sélective dans le temps et l'espace afin d'immobiliser, de façon covalente, des molécules biologiques d'intérêt comportant une fonction chimique complémentaire vis-à-vis de la fonction réactive B des agents de couplages présents à la surface du support solide.

Les supports solides pouvant être fonctionnalisés par les agents de 30 couplage de formule (I) conformes à l'Invention sont de préférence choisis parmi les supports de verre, de céramiques (de type oxyde), de silicium ou de plastique, lesdits supports comportant au moins une surface hydratée, hydroxylée, silanisée, aminée ou

bien encore de type ester activé. De telles surfaces peuvent être aisément préparées selon les techniques bien connues de l'art antérieur de la technique. Il est par exemple possible de préparer un support solide comportant une surface hydroxylée par silanisation au moyen d'un silane époxyde qui subit ensuite une hydrolyse acide de 5 façon à libérer les fonctions hydroxyle de la surface.

Ces supports solides possèdent au moins une surface plane ou non, lisse ou structurée, et peuvent se présenter par exemple sous la forme de lame de verre, de plaque plastique plane ou à puits, de capillaire ou encore de bille poreuse ou non.

10 Ainsi que décrit ci-dessus, la fonction d'accrochage A des agents de couplage de formule (I) est choisie en fonction de la nature de la surface du support sur laquelle ceux-ci sont destinés à être fixés.

15 Ainsi lorsqu'il s'agit de supports comportant au moins une surface de type ester activé, alors la fonction A est de préférence une fonction amine ; lorsqu'il s'agit de supports comportant au moins une surface de type hydroxyle, alors la fonction A est de préférence une fonction phosphoramidite ou silane ; lorsqu'il s'agit de supports comportant au moins une surface de type hydrure, alors la fonction A est de préférence une fonction silane et lorsqu'il s'agit de supports comportant une surface aminé, alors la fonction A est de préférence une fonction ester activée.

20 La présente Invention a donc également pour objet les supports solides comportant au moins une surface fonctionnalisée par un ou plusieurs agents de couplage de formule (I) tels que définis ci-dessus.

25 De tels supports peuvent avantageusement être utilisés pour l'immobilisation de molécules biologique d'intérêt comportant une fonction chimique complémentaire vis-à-vis de la fonction réactive B des agents de couplage de formule (I) présents à la surface dudit support solide après leur déprotection, et en particulier pour l'immobilisation covalente de molécules d'acide nucléique telles que l'ADN et les oligonucléotides.

30 Ainsi, la présente Invention a également pour objet l'utilisation d'un support solide tel que décrit ci-avant pour l'immobilisation covalente de molécules biologiques d'intérêt comportant une fonction chimique complémentaire vis-à-vis de la fonction réactive B des agents de couplage de formule (I) présents à la surface dudit

support solide, et en particulier d'acides nucléiques (ADN, oligonucléotides) par formation d'une liaison amide (peptidique).

La présente Invention a, en outre, pour objet un procédé d'immobilisation de molécules biologiques d'intérêt, et en particulier de molécules d'acide nucléique, sur un support solide tel que décrit ci-avant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une première étape de photo-déprotection des fonctions réactives B composés de formule (I) par insolation d'au moins une partie de la surface du support solide, puis la mise en contact du support solide ainsi activé avec une solution de molécules biologique d'intérêt, et en particulier de molécules d'acide nucléique, pour conduire à l'immobilisation desdites molécules par formation d'une liaison covalente entre au moins une fonction chimique portée par lesdites molécules et réactive vis-à-vis des fonctions réactives B desdits composés de formule (I) conforme à l'Invention, sur ledit support solide et la répétition éventuelle de ces deux étapes.

En particulier, l'étape de photo-déprotection peut-être localisée sur seulement une partie de la surface fonctionnalisée du support solide et par exemple réalisée au travers d'un masque.

Après insolation, la fonction réactive B des agents de couplage de formule (I) se trouve déprotégée (active), ce qui crée ainsi des zones portant la fonction réactive libre qui pourra capturer toute molécule en solution comportant une fonction chimique réactive vis-à-vis de ladite fonction réactive B activée présente à la surface du support solide.

En particulier, l'étape d'immobilisation est réalisée par la formation de liaisons oxime entre les fonctions B oxyamine des composés de formule (I) et les fonctions carbonylées des molécules biologique d'intérêt, en particulier des molécules d'acide nucléique. Cette réaction présente l'avantage de pouvoir être réalisée dans des conditions douces, en particulier à un pH compris entre 4 et 7. La liaison formée (oxime) présente par ailleurs une grande stabilité et il n'est pas nécessaire de la stabiliser par une étape de réduction supplémentaire.

La longueur d'onde d'insolation est de préférence comprise entre 300 et 400 nm.

Les solutions de molécules biologiques d'intérêt peuvent être de simples solutions aqueuses ou bien des solutions de ces molécules dans des solutions aqueuses tamponnées.

La durée de la mise en contact est de préférence comprise entre 5 et 5 60 minutes environ et réalisée à une température de préférence comprise entre 4 et 60°C environ.

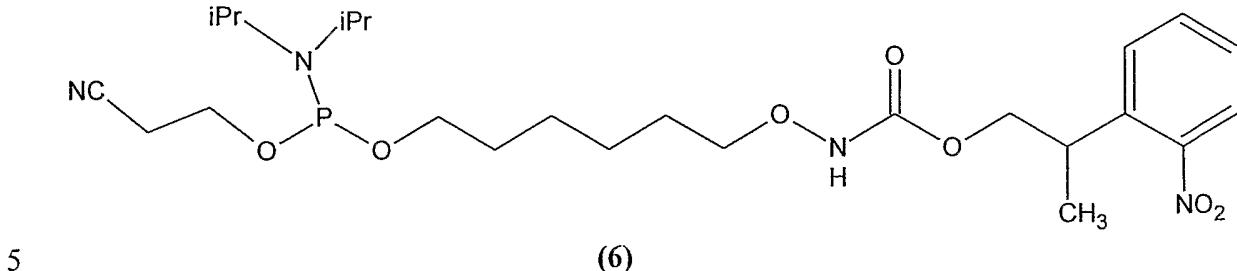
Enfin, l'Invention a également pour objet les supports solides (puces à acides nucléiques notamment) tels que décrits précédemment et obtenus en mettant en œuvre le procédé d'immobilisation conforme à l'Invention, c'est-à-dire comportant 10 au moins une surface sur laquelle lesdites molécules biologiques d'intérêt, et en particulier des molécules d'acide nucléique, sont immobilisées par l'intermédiaire d'une liaison covalente formée avec la fonction réactive B des agents de couplage de formule (I) conformes à l'Invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore 15 d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation d'agents de couplage de formule (I), à des exemples de fonctionnalisation de supports solides en verre de type capillaire ou support solide plan avec des agents de couplages de formule (I) conforme à l'Invention, à l'utilisation de ces supports fonctionnalisés pour l'immobilisation d'oligonucléotides, ainsi qu'aux 20 figures 1 et 2 annexées dans lesquelles :

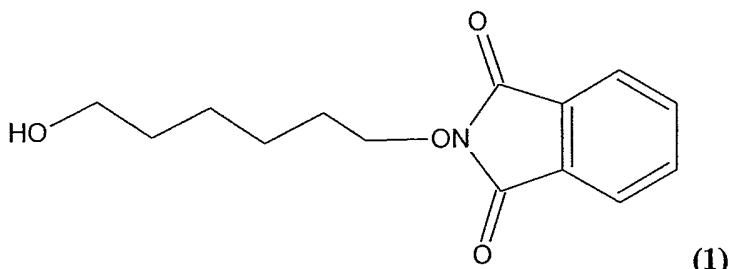
- la figure 1 représente la photographie de la fluorescence émise par des oligonucléotides fixés sur un support solide de type capillaire selon le procédé conforme à l'Invention, après hybridation avec des oligonucléotides complémentaires marqués à l'aide d'un fluorophore (capillaire de type a/), comparativement à un 25 capillaire non fonctionnalisé (capillaire de type b/);

- la figure 2 représente la photographie de la fluorescence émise par des oligonucléotides fixés sur un support solide plan selon le procédé conforme à l'Invention, après hybridation avec des oligonucléotides complémentaires marqués à l'aide d'un fluorophore (support de type a/), comparativement à un support non 30 fonctionnalisé (support de type b/).

EXEMPLE 1 : PREPARATION D'UN DERIVE PHOSPHORAMIDITE CONFORME A LA FORMULE (I)



1) Première étape : Préparation du composé (1) : introduction de l'oxyamine

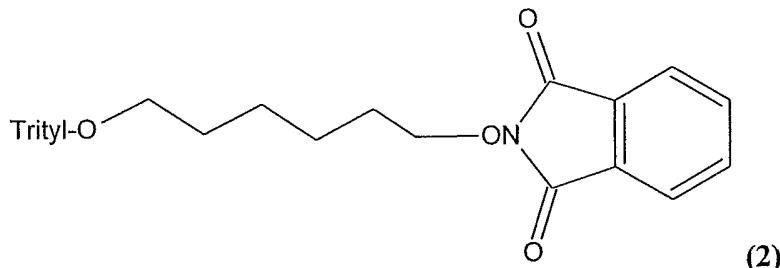


Une solution de *N*-hydroxyphthalimide (2,70 g ; 16,6 mmoles) et de 10 carbonate de potassium (4,6 g ; 23,6 mmoles) dans 150 ml de diméthylformamide (DMF) a été chauffée à une température de 50°C sous argon pendant une heure sous agitation. On a ensuite ajouté du 6-bromohexanol (3 g ; 16,6 mmoles), puis le mélange réactionnel a de nouveau été mis sous agitation pendant une nuit à une température de 50°C. Après filtration, le solvant a été évaporé sous pression réduite. On a ensuite 15 ajouté au résidu ainsi obtenu 50 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique a été lavée avec de la soude 0,1 N, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a ensuite été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit (1) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (3,28 g ; 12,5 mmoles ; rendement 75 %) présentant un point de fusion compris entre 85 et 20 88°C.

L'analyse en résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), effectuée à une longueur d'onde de 200 MHz dans du CDCL3 était la suivante : δ ppm = 1,30-1,90 (8H, m, 4 CH_2), 3,60 (2H, t, J = 13 Hz, CH_2O), 4,20 (2H, t, J = 13 Hz, CH_2ON), 7,70-7,90 (4H, m, Ar-H).

SM (DCI, mode positif) : $M_{\text{calc}} = 263$ ($C_{14}H_{17}NO_4$), $m/z = 281$ $[M+NH_4]^+$.

2) Deuxième étape : Tritylation du composé (1) pour conduire au composé (2)

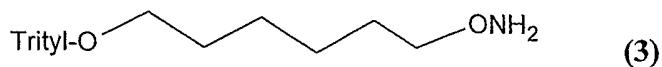


A une solution du composé (1) obtenu ci-dessus à l'étape précédente (3,2 g ; 12,5 mmoles) dans 75 ml de pyridine anhydre, on a ajouté du chlorure de trityle (4,2 g ; 15 mmoles). La solution a été agitée sous argon pendant 1 nuit à température ambiante. 5 ml de méthanol ont ensuite été ajoutés lentement, puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu a alors été solubilisé dans 100 ml l'acétate d'éthyle, puis la phase organique a été lavée avec de l'eau puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a alors été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane/cyclohexane : 75/25, v/v). Le produit (2) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (6,27 g, 12,4 mmoles ; rendement 99 %) fondant à 106-107°C.

L'analyse RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) était la suivante : δ ppm = 1,30-1,90 (8H, m, 4 CH₂), 3,20 (2H, t, $J = 13$ Hz, CH₂O), 4,20 (2H, t, $J = 13$ Hz, CH₂ON), 7,70-7,90 (4H_{Ar}, m, Ar-H-phtalimide), 7,20-7,40 (15H, m, Ar-H-trityle).

20 SM (ESI, mode positif) : $M_{\text{Calc}} = 505$ ($C_{33}H_{31}NO_4$), $m/z = 528$ $[M+Na]^+$, $m/z = 544$ $[M+K]^+$.

3) Troisième étape : Hydrazinolysé du composé (2) pour l'obtention du composé (3)



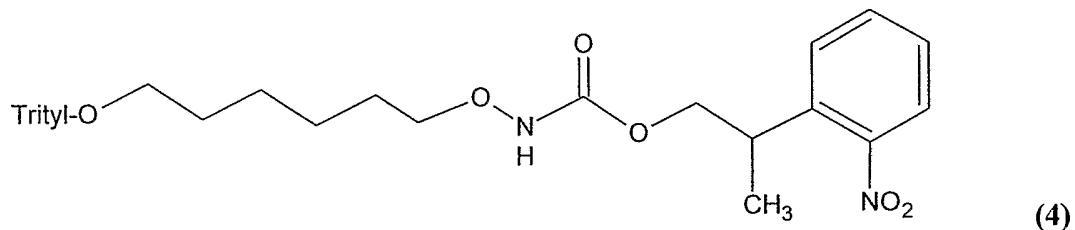
25 Le composé (2) obtenu ci-dessus à la deuxième étape (6,27 g ; 12,4 mmoles) a été solubilisé dans 50 ml de dichlorométhane et l'on a ajouté 780 mg d'hydrazine (24,8 mmoles). La solution obtenue a été portée au reflux pendant 1 heure

et demie, puis filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice, avec comme éluant du dichlorométhane puis un mélange 95/5 (v/v) de dichlorométhane et de méthanol. On a obtenu le composé (3) sous la forme d'une huile (4,20 g ; 11,2 mmoles) avec un rendement de 90 %.

5 **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,30-1,80 (8H, m, 4 CH₂), 3,10 (2H, t, J = 13 Hz, CH₂O-Tri), 3,60 (2H, t, J = 13 Hz, CH₂ON), 7,70-7,90 (15H, m, Ar-H-trityle).

10 **SM** (ESI, mode positif) : M_{calc} = 375 (C₂₅H₂₉NO₂), m/z = 376 [M+H]⁺, m/z = 398 [M+Na]⁺, m/z = 414 [M+K]⁺.

10 4) Quatrième étape : Protection de l'oxyamine du composé (3) pour obtenir le composé (4)



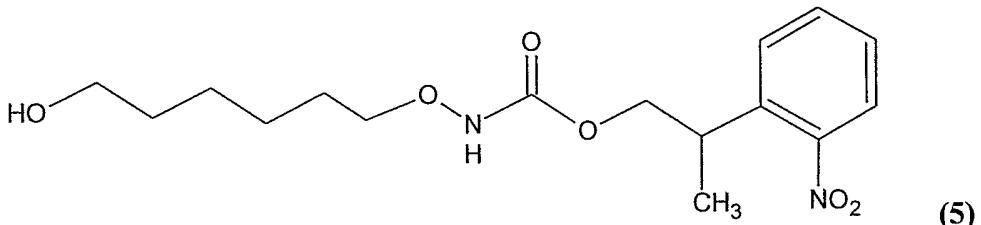
15 Le composé (3) préparé ci-dessus à la troisième étape (4,20 g ; 11,2 mmoles) a été dissous dans 100 ml de pyridine. On a ensuite ajouté, goutte à goutte, 50 ml d'une solution de dichlorométhane contenant 5,40 g (22,4 mmoles) de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC). Le mélange réactionnel a été agité pendant une heure à l'obscurité puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu a ensuite été solubilisé dans du dichlorométhane puis la phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant le dichlorométhane comme éluant. Le produit (4) a été obtenu sous la forme d'une huile orange (5,80 g ; 9,9 mmoles) avec un rendement de 89 %.

20 **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,30 (3H, d, J = 16 Hz, CH₃), 1,50-1,80 (8H, m, 4 CH₂), 3,0 (2H, t, J = 13 Hz, CH₂O-Tri), 3,70 (2H, m, CH₂ON, 1H, m, CH), 4,20 (2H, t, J = 13 Hz, CH₂OCO), 7,10-7,50 (15H, m, Ar-H-trityle), 7,50-7,80 (4H, m, Ar-H NPPOC).

SM (ESI, mode positif) : $M_{\text{calc}} = 582$ ($C_{35}H_{38}N_2O_6$), $m/z = 605$ $[M+Na]^+$, $m/z = 621$ $[M+K]^+$.

SM (ESI, mode négatif) : $m/z = 581$ $[M-H]^-$.

5) Détritylation du composé (4) pour obtenir le composé (5)

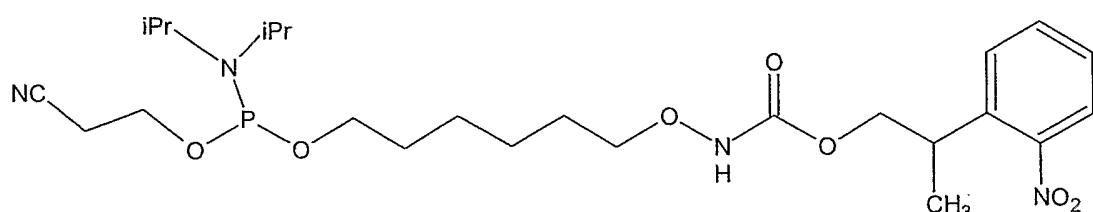


5,80 g (9,90 mmoles) du composé (4) obtenu ci-dessus à l'étape précédente ont été dissous dans 50 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique à 20 % dans le dichlorométhane. Le mélange a été agité pendant 3 à 4 heures à température ambiante, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu a été solubilisé dans 10 100 ml de dichlorométhane, puis la phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique a alors été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant du dichlorométhane puis un mélange dichlorométhane/méthanol 95/5 (v/v). Le composé (5) a été obtenu sous la forme 15 d'une huile orange (3,0 g ; 8,9 mmoles) avec un rendement de 90 %.

RMN-¹H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm = 1,30 (3H, d, $J = 16$ Hz, CH_3), 1,50-1,80 (8H, m, 4 CH_2), 3,70 (2H, m, CH_2ON , 1H, m, CH), 4,30 (2H, t, CH_2OCO , 2H, t, CH_2OH), 7,50-7,80 (4H, m, Ar- H NPPOC).

20 **SM** (DVI, mode positif) : $M_{\text{calc}} = 340$ ($C_{16}H_{24}N_2O_6$), $m/z = 454$ $[M+TFA]^+$.

6) Sixième étape : Phosphitylation du composé (5) pour conduire au composé (6)

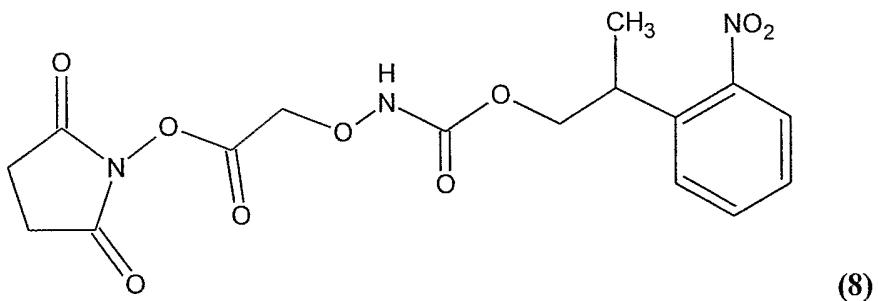


Le composé (5) obtenu ci-dessus à l'étape précédente (0,90 g ; 2,7 mmoles) a été solubilisé sous courant d'argon dans 15 ml de dichlorométhane, puis on a ajouté de la diisopropyléthylamine (DIEA) (0,56 ml, 3,2 mmoles), puis 0,72 ml de 2-cyanoéthyldiisopropylchlorophosphoramidite (3,2 mmoles). Le mélange réactionnel 5 a été agité à température ambiante pendant 4 heures, jusqu'à disparition du produit de départ. On a alors ajouté 40 ml de dichlorométhane, puis lavé la phase organique avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée, puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en 10 utilisant comme éluant du dichlorométhane puis un mélange dichlorométhane/méthanol 97/3 (v/v). Le composé (6) a été obtenu sous la forme d'une huile jaune (0,50 g ; 1,0 mmoles) avec un rendement de 38 %.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,20-1,50 (15H, m, 4 CH₃), 1,50-1,85 (8H, m, 4 CH₂), 2,65 (2H, t, CH₂CN) 3,80 (2H, m, CH₂OH, 1H, m, CH, 4 H, m, 2 CH₂OP), 4,30 (2H, m, CH₂OCO, 2H, m, 2 CHN), 7,10-7,70 (4H Ar-H NPPOC).

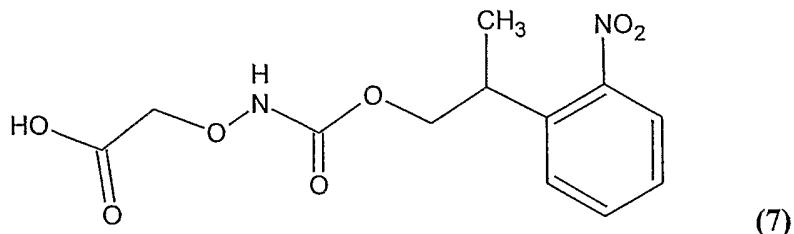
RMN-³¹P (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 120 (2 diastéréo-isomères).

EXEMPLE 2 : PREPARATION D'UN DERIVE ESTER ACTIVE CONFORME A LA FORMULE (I) (composé (8))



20

1) Première étape : Préparation de l'acide précurseur (7)



Du chlorhydrate de carboxyméthoxylamine (1 g ; 4,57 mmoles) a été dissous dans 25 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 %. La solution

a été refroidie à une température de 0°C et l'on a ajouté, goutte à goutte et sous agitation, 20 ml d'une solution de dioxane renfermant 2,20 g (9,1 mmoles) de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC). L'agitation a été maintenue pendant 2 à 3 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel a été évaporé à sec. Au résidu ainsi obtenu, on a ajouté 250 ml d'eau, puis on a lavé la phase aqueuse avec 200 ml d'éther diéthylique. La phase aqueuse a alors été acidifiée avec une solution d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 3 et l'on a extrait avec trois fois 250 ml de dichlorométhane. Les phases organiques ont été réunies et séchées sur sulfate de sodium anhydre. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant du dichlorométhane puis un mélange dichlorométhane/méthanol 97/3 (v/v). Le composé (7) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche fondant entre 88 et 92°C (1,20 g ; 4,0 mmoles), avec un rendement de 90 %.

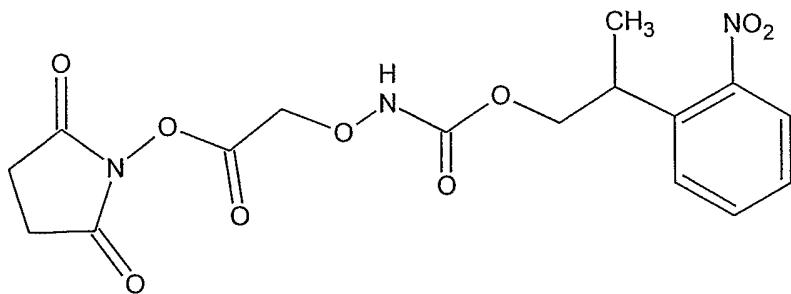
15 **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,40 (3H, d, J = 16 Hz, CH₃), 3,70 (1H, m, CH), 4,30 (2H, m, CH₂O) 4,40 (s, 2H, COCH₂O), 7,30-7,60 (4H, m, Ar-H NPPOC).

20 **RMN-¹³C** (300 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 18 (CH₂), 33 (CH₂), 67 (CH₃), 70 (CH₃), 75 (CH₃), 123 (quat), 137 (quat), 138 (quat), 133 (quat), 136 (CH), 151 (CH), 159 (CH), 172 (CH), 173 (CH).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 298 (C₁₂H₁₄N₂O₇), m/z = 321 [M+Na]⁺, m/z = 337 [M+K]⁺.

SM (ESI, mode négatif) : m/z = 297 [M-H]⁻, m/z = 595 [2M-H]⁻.

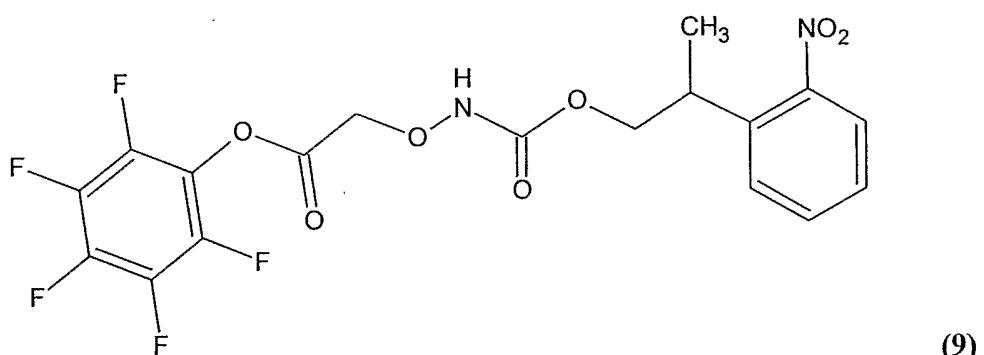
2) Deuxième étape : préparation de l'ester activé N-hydroxysuccinimide (8)



L'acide (7) obtenu ci-dessus à l'étape précédente (1,20 g ; 4,0 mmoles) a été dissous dans 15 ml de dichlorométhane anhydre, puis l'on a ajouté du

5 dicyclocarbodiimide (DCC) (0,82 g ; 4,4 mmoles) puis du *N*-hydroxysuccinimide (0,457 g ; 4,4 mmoles). Le milieu réactionnel a été agité pendant une nuit. Après filtration, le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie rapide sur gel de silice en utilisant de l'acétate d'éthyle comme éluant. Le composé (8) a été obtenu sous la forme d'une poudre jaune (1,0 g ; 2,68 mmoles) avec un rendement de 67 %.

EXEMPLE 3 : PREPARATION D'UN DERIVE ESTER DE FORMULE (I), ACTIVE AVEC DU PENTAFLUOROPHENOL (9)

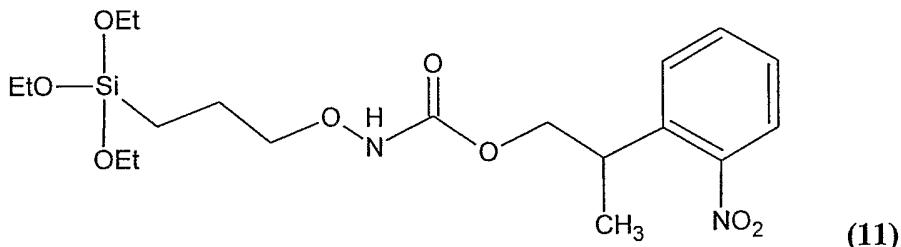


10 500 mg (1,6 mmoles) de composé (7) obtenu à la première étape de l'exemple 2 ci-dessus ont été dissous dans 5 ml de dichlorométhane, puis l'on a ajouté 372 mg (1,9 mmoles) de pentafluorophénol, puis goutte à goutte, 1 ml d'une solution de DCC (360 mg, 1,9 mmoles) dans le dichlorométhane. On a agité pendant 4 heures, puis le précipité de dicyclourée (DCU) formé a été filtré. Après évaporation du solvant, on a obtenu le composé (9) sous la forme d'une huile (740 mg, 1,9 mmoles), avec un rendement de 100 %.

15 **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,30 (3H, d, J = 16 Hz, CH₃), 3,70 (1H, m, CH), 4,30 (2 H, m, CH₂O) 4,70 (s, 2H, COCH₂O), 7,30-7,70 (4H, m, Ar-H NPPOC).

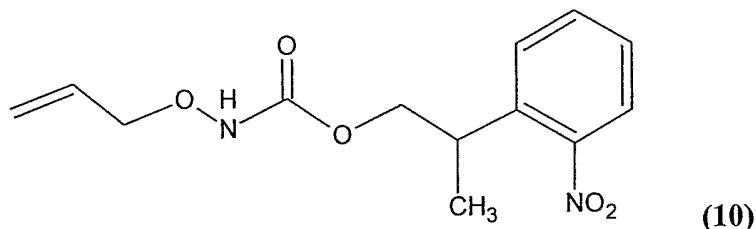
20 **RMN-¹⁹F** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = -166,0 (1F, t), -164,0 (1F, d), -162,0 (1F, t), -157,0 (1F, t), -152,50 (1F, d).

EXEMPLE 4 : PREPARATION D'UN DERIVE TRIETHOXYSILANE DE FORMULE (I)



1) Première étape : Préparation de la *N*-nitro-phényl-

5 propyloxycarbonyl-allyloxyamine (10)



A une solution de 3,250 g (29,6 mmoles ; 1,1 équivalent) d'allyloxyamine commerciale dans 25 ml de pyridine anhydre refroidie à une température de 0°C, on a ajouté, goutte à goutte, 15 ml d'une solution de dichlorométhane renfermant 6 g (27 mmoles) de chloroformate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC). Après 30 minutes d'agitation, le solvant a été évaporé puis co-évaporé avec du toluène. Le produit brut réactionnel a été dissous dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à pression réduite. Le composé (10) a été obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/hexane : 1/4 (v/v) (5,76 g), avec un rendement de 72 %.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,40 (d, 6H, Si-CH₂-CH₃), 3,70 (q, 1H, Ar-CH-CH₃), 4,30 (m, 4H, CH₂O, OCH₂) 5,30 (dd, 2H, CH₂), 5,90 (m, 1H, CH), 7,20 (s, 1H, NH), 7,30-7,80 (m, 4H, H-Ar).

20 2) Deuxième étape : Hydrosilylation pour conduire au composé (11)

A une solution de 1,67 g (5,6 mmoles) du composé (10) obtenu ci-dessus à l'étape précédente dans 8 ml de triéthoxysilane, on a ajouté goutte à goutte 20 µl de catalyseur de Karsted. Après une nuit d'agitation à une température de 60°C, le solvant a été évaporé par distillation sous vide. Le produit brut réactionnel a été

purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle/hexane 1/4 (v/v) pour conduire au composé attendu (11) avec un rendement de 60 % (1,33 g).

5 RMN^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm = 0,65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Si}$), 1,20 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 1,40 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$) 1,70 (m, 3H, CH_2 , CH-CH_3), 3,80 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4,30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-CO}$), 7,30-7,80 (m, 5H, NH , H-Ar).

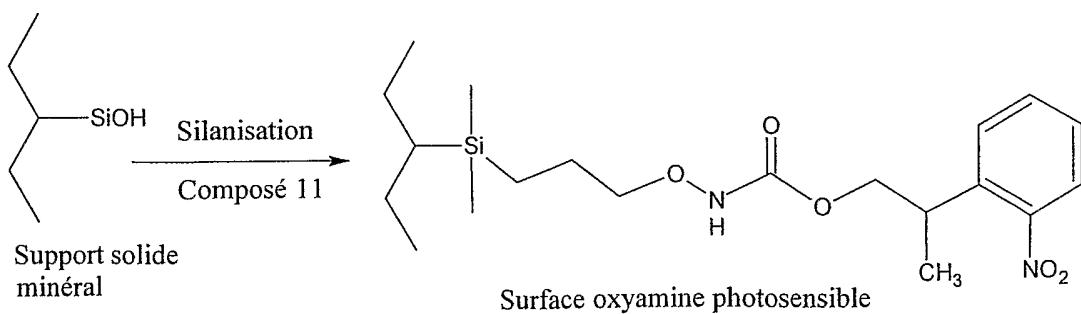
SM (électrospray, mode positif) : $M_{\text{calc}} = 444$, m/e = 444,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10 Les exemples de préparation de supports solides qui suivent ont été réalisés avec les agents de couplage de formule (I) conformes à l'Invention, en format capillaire (capillaires de verre d'une longueur de 3 cm et d'un diamètre de 100 μm). Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont transposables en format plan sur d'autres types de support.

EXEMPLE 5 : PREPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE FONCTIONNALISE AVEC UN AGENT DE COUPLAGE DE FORMULE (I) COMPORTANT UNE FONCTION D'ACCROCHAGE A DE TYPE SILANE

15 Dans cet exemple le composé (11) tel que préparé ci-dessus à l'exemple 4 a été utilisé à titre d'agent de couplage de formule (I).

20 L'obtention d'un support solide fonctionnalisé par le composé (11) se fait en une seule étape, en l'occurrence par l'étape dite de silanisation de la surface du support solide minéral (capillaire de verre) selon le schéma réactionnel ci-dessous :



25 Pour ce faire, un capillaire a été rempli avec une solution de soude à 6M dans un mélange 1/1 eau/éthanol et la solution a été laissée dans le capillaire durant 2 heures à température ambiante.

On a ensuite rincé abondamment le capillaire avec de l'eau puis on l'a séché à l'azote.

Le capillaire a ensuite été rempli avec une solution du composé (11) à 10 mM dans du trichloroéthylène et on a laissé agir durant une nuit à température ambiante.

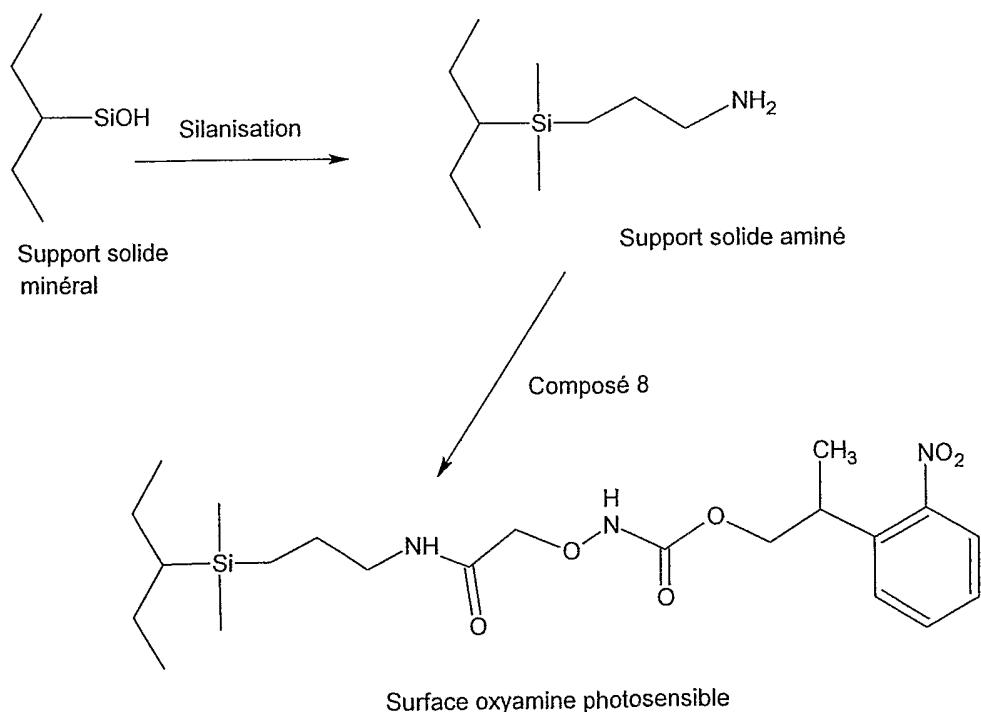
Le capillaire a ensuite été rincé abondamment avec du trichloroéthylène, de l'éthanol absolu puis du chloroforme et enfin séché à l'azote.

On a ainsi obtenu un capillaire de verre dont la surface interne était fonctionnalisée par une couche de composé (11), c'est-à-dire une surface oxyamine photosensible.

EXEMPLE 6 : PREPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE
10 FONCTIONNALISE PAR UN AGENT DE COUPLAGE DE FORMULE (I)
COMPORTANT UNE FONCTION D'ACCROCHAGE A DE TYPE ESTER
ACTIVE

Dans cet exemple le composé (8) tel que préparé ci-dessus à l'exemple 2, comportant une fonction d'accrochage A de type ester activé par NHS a été utilisé à titre d'agent de couplage de formule (I).

L'obtention d'un support solide fonctionnalisé par cet agent de couplage ester activé NHS se fait en deux étapes, selon le schéma réactionnel ci-dessous :



selon lequel, dans une première étape, on transforme la surface minérale du support solide en une surface comportant des fonctions amine, et dans une deuxième étape on fait réagir lesdites fonctions amine de surface avec le composé (8).

5 1) Première étape : réalisation d'une surface comportant des fonctions amine

Un capillaire de verre a été rempli avec une solution de soude à 6M dans un mélange 1/1 eau/éthanol et on a laissé la solution dans le capillaire durant 2 heures à température ambiante.

On a rincé abondamment le capillaire avec de l'eau puis on l'a séché

10 à l'azote.

Le capillaire a ensuite été rempli avec une solution de triéthoxy-aminopropyl-silane à 10 % dans l'éthanol à 95° et on a laissé la solution dans le capillaire durant une nuit à température ambiante. Le capillaire a ensuite été rincé avec de l'éthanol puis séché à l'azote.

15 On a obtenu un capillaire dont la surface interne était recouverte de fonctions amine.

2) Deuxième étape : fonctionnalisation du support avec le composé (8)

20 Le capillaire obtenu ci-dessus à la première étape a été rempli d'une solution du composé (8) à 10 mM dans le diméthylformamide (DMF) et on a laissé la solution dans le capillaire durant 1 nuit à température ambiante.

Le capillaire a ensuite été rincé avec du DMF puis de l'éthanol et enfin séché à l'azote.

25 On a ainsi obtenu un capillaire de verre dont la surface interne était fonctionnalisée par une couche de composé (8), c'est-à-dire une surface oxyamine photosensible.

EXEMPLE 7 : UTILISATION D'UN SUPPORT FONCTIONNALISE POUR L'IMMOBILISATION DE MOLECULES BIOLOGIQUES D'INTERET

30 Dans cet exemple, le support solide obtenu ci-dessus à l'exemple 5 a été utilisé pour l'immobilisation d'oligonucléotides (ON). Il doit être bien entendu toutefois que l'utilisation de ces supports pour l'immobilisation d'autres molécules biologiques d'intérêt est également valable.

Dans le cas des oligonucléotides, le greffage de ces molécules et la mise en évidence de leur présence sur la surface du support solide sont composés de quatre étapes :

5 (i) l'insolation : c'est l'étape qui permet de libérer localement la fonction réactive B sur la surface du support solide sous l'action de la lumière. Cette fonction B va permettre le greffage de la biomolécule.

(ii) l'immobilisation : c'est l'étape de greffage proprement dite de l'ON par l'intermédiaire de la réaction entre la fonction aldéhyde portée par l'ON et la fonction B photo-déprotégée à la surface du support solide après l'étape d'insolation.

10 (iii) l'hybridation : c'est l'étape de mise en évidence du greffage ou non de l'ON désiré par l'intermédiaire de la reconnaissance de l'ON greffé sur la surface du support solide par son complémentaire portant un fluorophore.

(iv) la détection de la fluorescence au scanner : c'est l'étape du traitement de tout signal émis par le fluorophore.

15 **I) Mode opératoire :**

1) Etape d'insolation

Le capillaire fonctionnalisé par le composé (11) et tel que préparé ci-dessus à l'exemple 5 a été rempli d'un mélange 1/1 de pyridine/eau.

20 On a ensuite procédé à une insolation du capillaire à différents endroits choisis de celui-ci durant 5 secondes, à l'aide d'un insolateur à rayonnements ultraviolet A (UVA) à une longueur d'onde de 365 nm, en ajustant la taille de la fente à 160 µm, avec une intensité de 4 mW/mm² ledit insolateur étant équipé d'une lampe de 100 W.

Le capillaire a ensuite été rincé à l'eau puis séché à l'azote.

25 2) Etape d'immobilisation des ON

Le capillaire ainsi traité selon la première étape a été incubé avec une solution d'ON portant une fonction aldéhyde à 10 µM dans de l'eau et on a laissé agir pendant 30 minutes.

30 Le capillaire a ensuite été rincé à l'eau, puis avec une solution de laurylsulfate de sodium à 0,2 %, puis de nouveau à l'eau et enfin séché à l'azote.

3) Etape d'hybridation

Le capillaire sur lequel ont été immobilisés les ON conformément à l'étape 2) ci-dessus a été rempli avec une solution d'ON complémentaires portant le fluorophore CY3 et on laissé agir pendant 1 heure à une température de 40°C.

5 Le capillaire a ensuite été rincé avec une solution de citrate de sodium à 0,2 %.

4) Etape de lecture

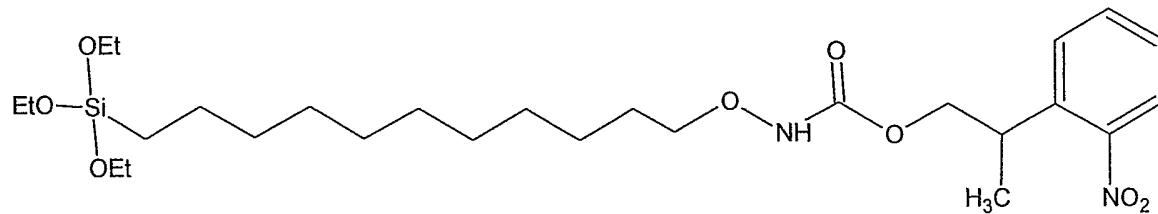
10 Le capillaire sur lequel les ON marqués au fluorophore se sont hybridés conformément à l'étape 3) ci-dessus a été placé sur une lame de verre puis introduit dans un lecteur de fluorescence vendu par la société Genomic's Solution.

La même mesure a également été réalisée sur un capillaire témoin (type b/) ayant subi les mêmes traitements que ceux décrits ci-dessus pour le capillaire test (type a/) sauf l'étape de fonctionnalisation par les agents de couplage de formule (I).

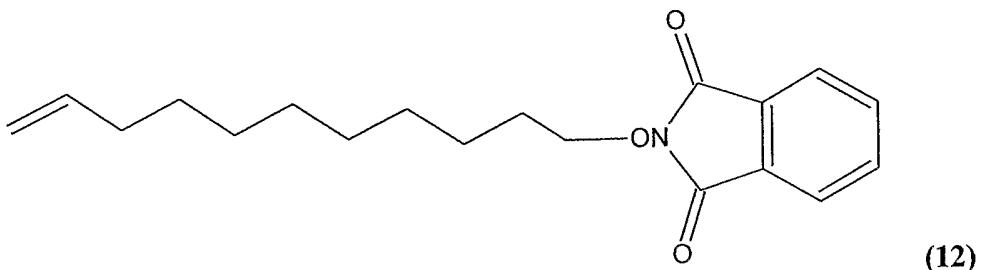
II/ RESULTATS

15 L'image de la fluorescence obtenue est représentée sur la figure 1 annexée sur laquelle on peut constater que seuls les endroits ayant été insolés sont fluorescents. On voit par ailleurs que seul le capillaire fonctionnalisé par les agents de couplage de formule (I) conforme à l'Invention (type a/) comporte des segments fluorescents correspondant à l'immobilisation photo-localisée des ON désirés, le capillaire non fonctionnalisé (type b/) étant totalement non fluorescent.

Cet exemple démontre que les supports solides conformes à l'Invention peuvent être avantageusement utilisés pour l'immobilisation de molécules d'intérêt de façon spécifique et localisée.

EXEMPLE 8 : PREPARATION D'UN DERIVE TRIETHOXYSILANE DE FORMULE (I) (15)

5 1) Première étape : Préparation d'un composé (12) : Introduction de l'oxyamine



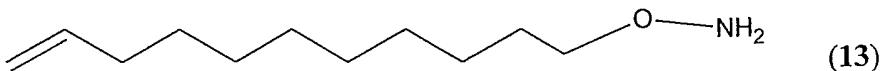
Une solution de *N*-hydroxyphthalimide (3,50 g ; 21 mmoles) et de carbonate de potassium (8 g ; 41 mmoles) dans 250 ml de diméthylformamide (DMF) 10 a été chauffée à une température de 50°C sous argon pendant une heure sous agitation. On a ensuite ajouté du 11-bromo-undécène (5,0 g ; 21 mmoles), puis le mélange réactionnel a de nouveau été agité pendant 3 heures à une température de 50°C. Après filtration, le solvant a été évaporé sous pression réduite. On a ensuite ajouté au résidu ainsi obtenu 100 ml de dichlorométhane puis la phase organique a été lavée avec de la soude 0,1 N, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a ensuite été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit (12) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (6,45 g ; 20,4 mmoles ; rendement 97 %) présentant un point de fusion compris entre 38 et 40°C.

20 L'analyse en résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), effectuée à une longueur d'onde de 200 MHz dans du CDCl₃ était la suivante :

δ ppm = 1,20-1,50 (12 H, m, 6 CH₂) ; 1,78 (2 H, m, J = 7 Hz, C₂H₃CH₂CH₂CH₂) ; 2,02 (2 H, m, C₂H₃CH₂CH₂) ; 4,18 (2 H, t, J = 6 Hz, CH₂ON) ; 4,95 (2 H, m, CH₂CHCH₂) ; 5,79 (1 H, m, CH₂CHCH₂) ; 7,70-7,85 (4 H, m, Ar-H).

25 SM (ESI, mode positif) : M_{calc} – 315 (C₁₉H₂₅NO₃), m/z = 338 [M+Na]⁺.

2) Deuxième étape : Hydrazinolysé du composé (12) pour conduire au composé (13)



Le composé (12) (3,0 g ; 9,64 mmoles) obtenu ci-dessus à la première étape a été solubilisé dans 30 ml de dichlorométhane et l'on a ajouté 966 mg d'hydrazine (19,3 mmoles). La solution obtenue a été portée au reflux pendant 3 heures, puis filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice, avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (v/v : 1/2). On a obtenu le composé (13) sous la forme d'une huile translucide (1,65 g ; 8,94 mmoles) avec un rendement de 93 %.

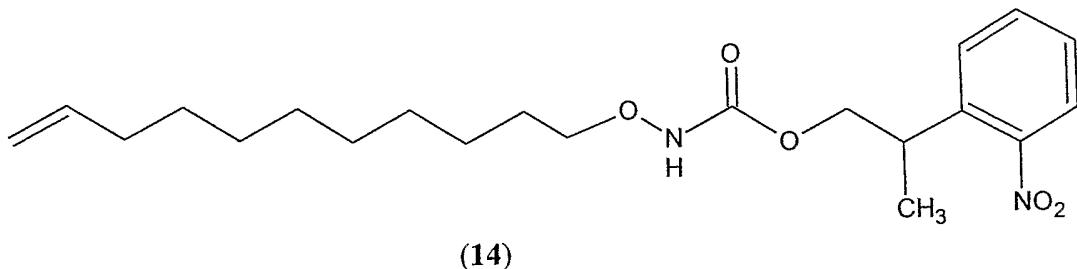
10 RMN^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm = 1,20-1,50 (12 H, m, 4 CH_2),
 1,56 (2 H, m, $\text{C}_2\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,03 (2 H, q, $\text{C}_2\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,65 (2 H, t, J = 6 Hz,
 CH_2ON), 4,96 (2 H, m, CH_2CHCH_2), 5,80 (1 H, m, CH_2CHCH_2).

SM (ESI, mode positif) : $M_{\text{calc}} = 185$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}$), $m/z = 186$

$[\text{M}+\text{H}]^+$

3) Troisième étape : Protection de l'oxyamine du composé (13)

15 pour obtenir le composé (14)



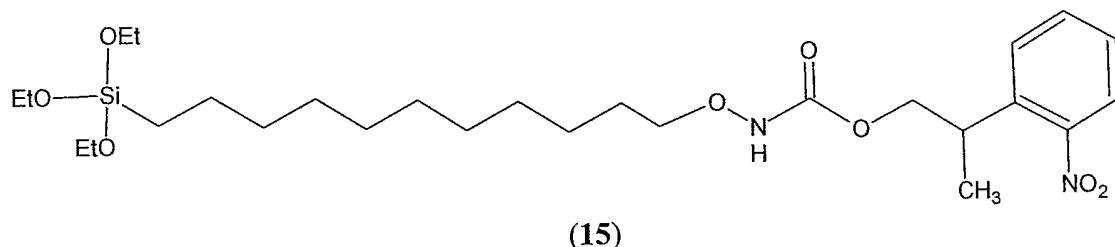
Le composé (13) préparé ci-dessus à la deuxième étape (470 mg ; 2,54 mmoles) a été dissous dans 2 ml de pyridine. On a ensuite ajouté, goutte à goutte, 20 3 ml d'une solution de dichlorométhane contenant 620 mg (5,08 mmoles) de chloroformate de 2-(2-nitrophénol)-propyle (Cl-NPPOC). Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 heures à l'obscurité puis filtré et évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu a ensuite été solubilisé dans du dichlorométhane puis la phase organique a été lavée avec une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 % (p/v), puis avec 25 une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1N), et enfin avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (v/v : 1/4) comme

éluant. Le produit (14) a été obtenu sous la forme d'une huile orange (873 mg ; 2,22 mmoles) avec un rendement de 88 %.

5 **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1,20-1,40 (12 H, m, 6 CH₂), 1,35 (3 H, d, J = 7 Hz, CH₃), 1,56 (2 H, m C₃H₃CH₂CH₂CH₂), 2,03 (2 H, m, C₂H₃CH₂CH₂), 3,65 (2 H, m, CH₂ON, 1H, m, CH), 4,28 (2H, m, CH₂OCO), 4,96 (2 H, m, CH₂CHCH₂), 5,80 (1 H, m, CH₂CHCH₂), 7,20-7,80 (4 H, m, Ar-H NPPOC).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 392 (C₂₁H₃₂N₂O₅), m/z = 415 [M+Na]⁺, m/z = 410 [M+NH₄]⁺.

10 4) Quatrième étape : Hydrosilylation du composé (14) pour obtenir le composé (15)



15 1,28 g (3,2 mmoles) de composé (14) obtenu selon le procédé décrit ci-dessus à la troisième étape ont été ajoutés à une solution constituée de 5 ml de triéthoxysilane et de 14 µl (0,25 équivalent) de catalyseur de Karsted. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 heures à une température de 60°C puis le solvant a été évaporé et co-évaporé avec du DMF (5 à 6 fois) sous vide. On a obtenu le produit (15) attendu sous la forme d'une huile (1,49 g ; 2,68 mmoles) avec un rendement de 83 %.

20 **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 0,6 (2 H, m, CH₂Si), 1,20-1,40 (16 H, m, 6 CH₂, 9H 3 CH₃CH₂OSi), 1,35 (3 H, d, J = 7 Hz, CH₃), 3,65 (2 H, m, CH₂ON, 1H, m, CH), 4,28 (2 H, m, CH₂OCO), 7,20-7,80 (4 H, m, Ar-H NPPOC).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 556 (C₂₇H₄₈N₂O₈Si), m/z = 579 [M+Na]⁺.

25 **EXEMPLE 9 : PREPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE PLAN FONCTIONNALIS AVEC UN AGENT DE COUPLAGE DE FORMULE (I) COMPORTANT UNE FONCTION D'ACCROCHAGE A DE TYPE SILANE**

Dans cet exemple le composé (15) tel que préparé ci-dessus à l'exemple 8 a été utilisé à titre d'agent de couplage de formule (I).

1) Première étape : Réhydratation de la surface (activation)

Un support plan solide en silicium comportant des fonctions inactives SiO_2 a été plongé dans une solution constituée de 4 ml d'eau et de 3 ml d'éthanol et renfermant de la soude (1 g NaOH) pendant 1 heure. Le support a ensuite 5 été rincé à l'eau ultra pure, puis avec une solution d'acide chlorhydrique 0,2 N et enfin à l'eau ce qui a conduit à une surface comportant des fonctions activées SiOH . Le support a ensuite été séché à l'argon.

2) Deuxième étape : silanisation de support avec le composé (15)

Le support ainsi activé a été trempé dans une solution du composé 10 (15) (7 ml) à 5mM dans un mélange toluène/triéthylamine (v/v : 97/3) pendant une nuit à 80°C. Le support a ensuite été lavé au toluène puis à l'éthanol et enfin séché à l'argon. Le support ainsi fonctionnalisé par le composé (15) a ensuite été mis à l'étuve à 110°C pendant 3 heures.

EXEMPLE 10 : UTILISATION D'UN SUPPORT PLAN SOLIDE 15 FONCTIONNALISE PAR UN COMPOSE DE FORMULE (I) POUR L'IMMOBILISATION DE MOLECULES BIOLOGIQUES D'INTERET

Tout comme décrit ci-dessus à l'exemple 7, le greffage d'ON et la mise en évidence de leur présence à la surface du support solide sont composés de 20 quatre étapes : l'insolation, l'immobilisation, l'hybridation et enfin la détection de la fluorescence au scanner.

I) Mode opératoire :

1) Première étape : insolation du support

Le support plan solide, fonctionnalisé par le composé (15) selon le 25 procédé décrit ci-dessus à l'exemple 9, sur lequel a été plaqué un masque en plastique qui comporte des points transparents de taille 100 μm sur 100 μm qui laissent passer la lumière, a été recouvert d'une goutte d'un mélange 1/1 (v/v) de pyridine/eau. On a ensuite procédé à une insolation sur toute la surface du support et donc à travers le masque durant 15 secondes, à l'aide d'un insolateur à rayonnement ultraviolet A (UVA) à une longueur d'onde de 365 nm, avec une intensité de 4 mW/mm², ledit 30 insolateur étant équipé d'une lampe de 100 W.

Le support plan solide a ensuite été rincé à l'eau puis séché à l'azote.

2) Deuxième étape : Immobilisation des ON

Le support plan ainsi traité selon la première étape a été incubé avec une solution d'ON portant une fonction aldéhyde à 10 µM dans de l'eau et on a laissé agir pendant 30 minutes.

5 Le support a ensuite été rincé à l'eau, puis avec une solution de laurylsulfate de sodium à 0,2 %, puis de nouveau à l'eau et enfin séché à l'azote.

3) Troisième étape : Hybridation

10 Le support solide sur lequel ont été immobilisés les ON conformément à l'étape 2) ci-dessus a été rempli avec une solution d'ON complémentaires portant le fluorophore CY3 et on laissé agir pendant 1 heure à une température de 40°C. Le support a ensuite été rincé avec une solution de citrate de sodium à 0,2 %.

15 4) Quatrième étape : Lecture

Le support sur lequel les ON marqués au fluorophore se sont hybridés conformément à l'étape 3) ci-dessus a été placé sur une lame de verre puis introduit dans un lecteur de fluorescence vendu par la société Genomic's Solution.

20 La même mesure a également été réalisée sur un support plan solide témoin (type b/) ayant subi les mêmes traitements que ceux décrits ci-dessus pour le capillaire test (type b/) sauf l'étape de fonctionnalisation par le composé (15).

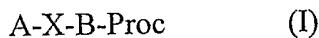
25 **II) Résultats :**

L'image de la fluorescence obtenue est représentée sur la figure 2 annexée sur laquelle on peut constater que seuls les endroits ayant été insolés sont fluorescents. On voit par ailleurs que seul le support plan solide fonctionnalisé par les agents de couplage (15) conformes à l'Invention (support de type a/) comporte des points fluorescents correspondant à l'immobilisation photo-localisée des ON désirés, le support non fonctionnalisé (support de type b/) étant totalement non fluorescent.

30 Cet exemple démontre que les supports solides conformes à l'Invention peuvent être avantageusement utilisés pour l'immobilisation de molécules d'intérêt de façon spécifique et localisée.

REVENDICATIONS

1. Agent de couplage de formule (I) suivante :



5 dans laquelle :

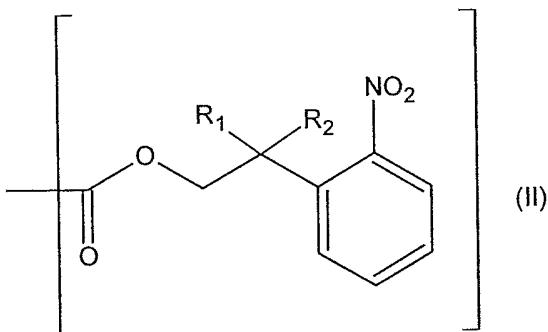
- A représente une fonction d'accrochage sur un support solide, ladite fonction étant choisie parmi les fonctions de type amine, phosphoramidite, silane et ester activé ;

- X représente un bras espaceur ;

10 - B est une fonction réactive choisie parmi les groupements conduisant, après photo-déprotection, à une fonction de type oxyamine ($-\text{ONH}_2$) et dérivés ou hydrazide ($-\text{NH-NH}_2$) et dérivés, ladite fonction B étant protégée par un groupement Proc ;

- Proc est un groupement protecteur photolabile de formule (II)

15 suivante :



dans laquelle :

- R_1 et R_2 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle en C_1-C_4 .

20 2. Agent de couplage selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le bras espaceur X est une chaîne hydrophobe non chargée ou une chaîne hydrophile non chargée.

25 3. Agent de couplage selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le bras espaceur X est choisi parmi les chaînes hydrocarbonées saturées comportant de 1 à 13 atomes de carbone et les éthers de glycol dans lesquels la chaîne carbonée comporte de 4 à 12 atomes de carbone.

4. Agent de couplage selon l'une quelconque des revendications

précédentes, caractérisé par le fait que R₁ et R₂, indépendamment l'un de l'autre, représentent un radical alkyle choisi parmi les radicaux méthyle et éthyle.

5. Agent de couplage selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi ceux dans lesquels :

- 5 i) - A représente une fonction phosphoramidite,
 - X représente une chaîne hydrocarbonée saturée ayant 6 atomes
 de carbone,
 - B représente une fonction oxyamine (-ONH-), et
 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène ou un radical
10 méthyle ;
 ii) - A représente une fonction trialcoxy(C₁-C₄)silane,
 - X représente une chaîne hydrocarbonée saturée ayant de 2 à 12
 atomes de carbone,
 - B représente une fonction oxyamine (-ONH-), et
 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène ou un radical
15 méthyle ;
 iii)- A représente une fonction carboxylique estérifiée par du
 N-hydroxysuccinimide ou du pentafluorobenzène,
 - X représente -CH₂-,
 - B représente une fonction oxyamine (-ONH-), et
 - R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène ou un radical
20 méthyle.

6. Agent de couplage selon la revendication 5, caractérisés par le fait que les composés iii) sont choisis parmi les composés dans lesquels la fonction A est du triéthoxysilane et X est une chaîne hydrocarbonée saturée ayant 3 ou 11 atomes de carbone.

25 7. Utilisation d'au moins un agent de couplage de formule (I) tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la fonctionnalisation de supports solides.

30 8. Procédé de préparation d'un support solide fonctionnalisé caractérisé par le fait qu'il comporte au moins une étape de mise en contact d'au moins une surface d'un support solide avec une solution, dans un solvant organique, d'au

moins un agent de couplage de formule (I) tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 6.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que la mise en contact du support solide avec la solution d'agent de couplage de formule (I) est réalisée à une température comprise entre 4 et 80°C pendant 1 à 48 heures.

10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé par le fait que le support solide est choisi parmi les supports de verre, de céramiques, de silicium ou de plastique, lesdits supports comportant au moins une surface hydratée, hydroxylée, silanisée, aminée ou de type ester activé.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé par le fait que le support possède au moins une surface plane ou non, lisse ou structurée, et se présente sous la forme de lame de verre, de plaque plastique plane ou à puits, de capillaire ou de bille poreuse ou non.

12. Support solide caractérisé par le fait qu'il comporte au moins une surface fonctionnalisée par un ou plusieurs agents de couplage de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6.

13. Utilisation d'au moins un support solide tel que défini à la revendication 12 pour l'immobilisation covalente de molécules biologiques d'intérêt comportant une fonction chimique complémentaire vis-à-vis de la fonction réactive B des agents de couplage de formule (I) présents à la surface dudit support solide.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée par le fait que les molécules biologiques d'intérêt sont des molécules d'acide nucléique.

15. Procédé d'immobilisation de molécules biologiques d'intérêt sur un support solide tel que défini à la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une première étape de photo-déprotection des fonctions réactives B composés de formule (I) par insolation d'au moins une partie de la surface du support solide, puis la mise en contact du support solide ainsi activé avec une solution de molécules biologiques d'intérêt, pour conduire à l'immobilisation desdites molécules par formation d'une liaison covalente entre au moins une fonction chimique portée par lesdites molécules et réactive vis-à-vis des fonctions réactives B desdits composés de formule (I), sur ledit support solide et la répétition éventuelle de ces deux étapes.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé par le fait que l'étape de photo-déprotection est localisée sur seulement une partie de la surface fonctionnalisée du support solide.

5 17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé par le fait que l'étape d'immobilisation est réalisée par la formation de liaisons oxime entre les fonctions B oxyamine des composés de formule (I) et les fonctions carbonylées des molécules biologiques d'intérêt.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé par le fait que l'étape d'immobilisation est réalisée à un pH compris entre 4 et 7.

10 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé par le fait que la longueur d'onde d'insolation est comprise entre 300 et 400 nm.

15 20. Support solide caractérisé par le fait qu'il est obtenu selon le précédent tel que défini à l'une quelconque des revendications 15 à 19 et par le fait qu'il comporte au moins une surface sur laquelle des molécules biologique d'intérêt sont immobilisées par l'intermédiaire d'une liaison covalente formée avec la fonction réactive B des agents de couplage de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6.

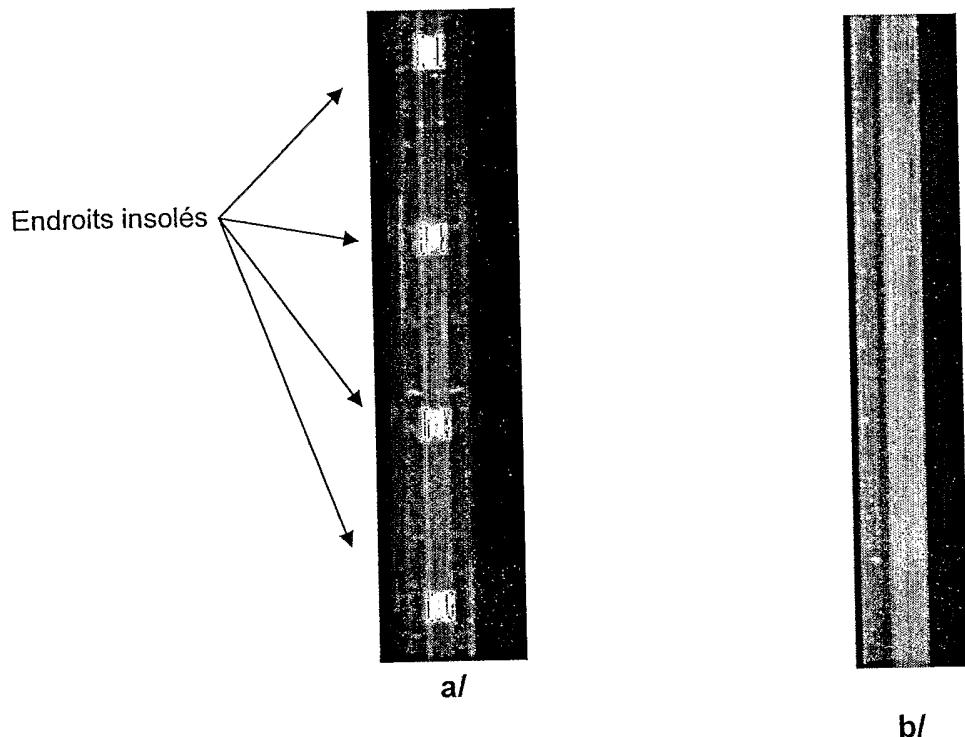


FIGURE 1

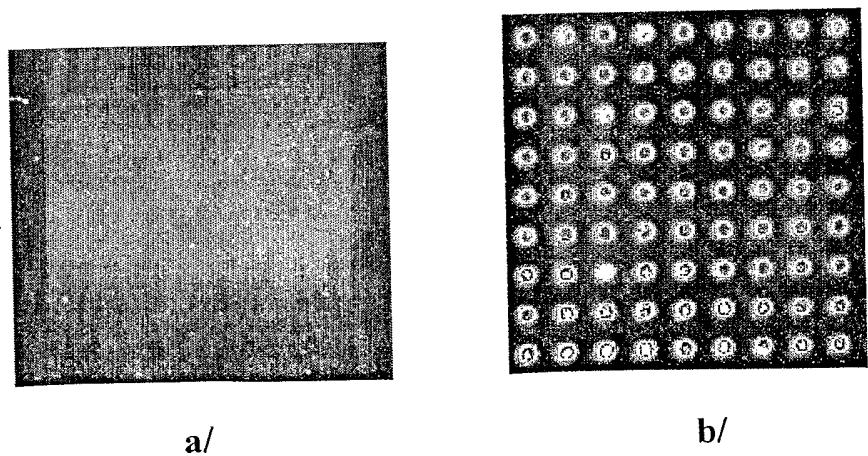


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07F9/24 C07D207/46 C07C271/08 C07F7/18									
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC									
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07F C07D C07C									
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category °</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: left; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px; vertical-align: top;"> WO 97/39151 A (AFFYMETRIX, INC; GOLDBERG, MARTIN; DIGGELMAN, MARTIN; HUBBELL, EARL; M) 23 October 1997 (1997-10-23) cited in the application page17, ligne 26 -page 18, ligne 2; page 22, ligne 6- page 23 to the end page 2, line 17 - page 3, line 3; claims ----- -/-- </td> <td style="text-align: left; padding: 2px; vertical-align: top;">1-20</td> </tr> </tbody> </table>				Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 97/39151 A (AFFYMETRIX, INC; GOLDBERG, MARTIN; DIGGELMAN, MARTIN; HUBBELL, EARL; M) 23 October 1997 (1997-10-23) cited in the application page17, ligne 26 -page 18, ligne 2; page 22, ligne 6- page 23 to the end page 2, line 17 - page 3, line 3; claims ----- -/--	1-20
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.							
A	WO 97/39151 A (AFFYMETRIX, INC; GOLDBERG, MARTIN; DIGGELMAN, MARTIN; HUBBELL, EARL; M) 23 October 1997 (1997-10-23) cited in the application page17, ligne 26 -page 18, ligne 2; page 22, ligne 6- page 23 to the end page 2, line 17 - page 3, line 3; claims ----- -/--	1-20							
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.							
° Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed									
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family									
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report							
15 November 2005		13/12/2005							
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmid, A							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001786

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BHUSHAN K R ET AL: "Synthesis of photolabile 2-(2-nitrophenyl)propyloxycarbonyl protected amino acids" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 47, 17 November 2003 (2003-11-17), pages 8585-8588, XP004464983 ISSN: 0040-4039 composes 4a-1 abstract</p> <p>-----</p> <p>M. ACEDO ET AL: "N-2-(2,4-dinitrophenyl)ethyloxycarbonyl-Amino Acids, New Base Labile Protected Derivatives Suitable for Solid-Phase Peptide Synthesis" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 33, no. 34, 1992, pages 4989-4992, XP002320125 the whole document</p> <p>-----</p>	1-20
A		1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/001786

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9739151	A 23-10-1997	AU	2804797 A	07-11-1997
		CA	2251755 A1	23-10-1997
		EP	0950112 A1	20-10-1999
		JP	2000508542 T	11-07-2000
		US	6307042 B1	23-10-2001
		US	5959098 A	28-09-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/001786

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

C07F9/24 C07D207/46 C07C271/08 C07F7/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07F C07D C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97/39151 A (AFFYMETRIX, INC; GOLDBERG, MARTIN; DIGGELMAN, MARTIN; HUBBELL, EARL; M) 23 octobre 1997 (1997-10-23) cité dans la demande page17, ligne 26 -page 18, ligne 2; page 22, ligne 6- page 23 to the end page 2, ligne 17 - page 3, ligne 3; revendications ----- -/-	1-20

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 novembre 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/12/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schmid, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/001786

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BHUSHAN K R ET AL: "Synthesis of photolabile 2-(2-nitrophenyl)propyloxycarbonyl protected amino acids" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 47, 17 novembre 2003 (2003-11-17), pages 8585-8588, XP004464983 ISSN: 0040-4039 composés 4a-1 abrégé</p> <p>-----</p>	1-20
A	<p>M. ACEDO ET AL: "N-2-(2,4-dinitrophenyl)ethyloxycarbonyl-Amino Acids, New Base Labile Protected Derivatives Suitable for Solid-Phase Peptide Synthesis" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 33, no. 34, 1992, pages 4989-4992, XP002320125 Le document en entier</p> <p>-----</p>	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR2005/001786

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9739151	A 23-10-1997	AU 2804797 A		07-11-1997
		CA 2251755 A1		23-10-1997
		EP 0950112 A1		20-10-1999
		JP 2000508542 T		11-07-2000
		US 6307042 B1		23-10-2001
		US 5959098 A		28-09-1999