

①⑨ **RÉPUBLIQUE FRANÇAISE**
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ **N° de publication :**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 556 726

②① **N° d'enregistrement national :**

84 19462

⑤① **Int Cl⁴ : C 07 H 21/00; C 07 K 17/10; C 12 N 11/10 //**
C 12 N 15/00; C 12 Q 1/00; G 01 N 33/483.

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② **Date de dépôt :** 19 décembre 1984.

③⑦ **Priorité :** US, 20 décembre 1983, n° 565,010.

④③ **Date de la mise à disposition du public de la**
demande : BOPI « Brevets » n° 25 du 21 juin 1985.

⑥⑦ **Références à d'autres documents nationaux appa-**
rentés :

⑦① **Demandeur(s) :** CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNO-
LOGY. — US.

⑦② **Inventeur(s) :** Lloyd M. Smith.

⑦③ **Titulaire(s) :**

⑦④ **Mandataire(s) :** Cabinet Lavoix.

⑤④ **Compositions à base d'oligonucléotides monocaténaires et procédé pour leur préparation.**

⑤⑦ L'invention concerne notamment un procédé pour la syn-
thèse d'oligonucléotides qui contiennent un ou des groupe(s)
amino aliphatique(s) libre(s). Le procédé de synthèse est géné-
ral, permettant de fixer des groupes amino sur des oligonu-
cléotides de toute composition ou longueur obtainable par des
procédés usuels de synthèse d'ADN.

Application à la biologie moléculaire et notamment au sé-
quençage automatisé d'ADN, à la détection de troubles généti-
ques par hybridation d'ADN et à l'utilisation de la fluorescence
pour la détection d'une hybridation.

FR 2 556 726 - A1

D

Un oligonucléotide est un polymère de faible longueur consistant en une séquence linéaire de 4 nucléotides dans un ordre défini. Les sous-unités de nucléotides sont réunies par des liaisons phosphodiester qui joignent la partie 3' hydroxyle d'un nucléotide à la partie 5' hydroxyle du nucléotide suivant. Comme exemple d'oligonucléotide, on peut citer 5' ApCpGp TpApTpGpGpCp 3'. Les lettres A, C, G et T se rapportent à la nature de la base purine ou pyrimidine fixée à la position 1 du désoxyribose : A, adénine ; C, cytosine ; G, guanine ; T, thymidine. P représente la liaison phosphodiester. La structure d'une section d'un oligonucléotide est représentée sur la figure 1 du dessin annexé.

Les oligonucléotides monocaténares de l'invention sont en outre caractérisés par une homogénéité de la séquence de sous-unités de nucléosides et ont une masse moléculaire uniforme.

Les oligonucléotides synthétiques sont de puissants outils dans la biologie moléculaire moderne et dans la technique de l'ADN recombinant. Ces molécules trouvent de nombreuses applications, comprenant a) des modèles pour l'isolement de gènes spécifiques, basé sur la séquence protéinique du produit de gène, b) la commande de la mutagénèse in vitro d'un gène désiré, c) des primaires pour la synthèse de l'ADN sur un modèle monocaténaire, d) la synthèse totale de gènes, et de nombreuses autres, tel que décrit par Wm. R. Bahl et al., Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 21, 101 (1978).

Un effort considérable a donc été orienté vers le développement de procédés chimiques efficaces pour la synthèse de ces oligonucléotides. Une brève revue de ces procédés tels qu'ils sont développés actuellement, est donnée par Crockett G. C., Aldrichimica Acta 16 (3), 47-55 (1983). La meilleure méthodologie actuellement disponible utilise les dérivés de phosphoramidite des nucléosides avec un mode opératoi-

re synthétique en phase solide, Matteucci et al., J. Al. Chem. Soc. 103, 3185 (1981) ; et Beaucage et al., M. H. Tet., 22 (20), 1858-1862 (1981). Ces modes opératoires permettent d'obtenir dans des conditions de routine des oligonucléotides ayant jusqu'à 30 bases de longueur et on a obtenu des molécules atteignant même 50 bases. Des équipements qui utilisent cette technologie sont maintenant commercialisés.

On trouve dans la littérature d'autres publications sur la formation de dérivés d'ADN. On a développé un nucléoside triphosphate modifié dans lequel un groupe biotine est associé à un groupe amino aliphatique en position 5 de l'uracile, Langer et al., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 78, 6633-6637 (1981). Ce dérivé de nucléotide est efficacement incorporé dans un ADN bicaténaire. Une fois dans l'ADN, il peut être relié à un anticorps anti-biotine qui peut alors être utilisé pour des détections par des procédés de fluorescence ou enzymatiques. L'ADN dans lequel ont été incorporés des nucléosides conjugués avec la biotine par le procédé de Langer et al., est fragmenté en plus petites morceaux mono- et bicaténaires dont la séquence de sous-unités de nucléosides est hétérogène et la masse moléculaire variable. Draper et Gold, Biochemistry 19, 1774-1781 (1980), ont rapporté l'introduction de groupes amino aliphatiques par une réaction de transamination catalysée par un bisulfite, et leur réaction ultérieure avec un marqueur fluorescent. Chez Draper et Gold, le groupe amino est directement fixé sur une base de pyrimidine. Le groupe amino en une telle position inhibe les liaisons hydrogène et c'est pourquoi ces matériaux ne sont pas utilisables dans une hybridation et analogues, Chu et al., Nucleic Acid Res. 11 (18) ; 6513-6529 (1983), ont décrit un procédé pour fixer une amine sur le groupe 5'-phosphate terminal d'oligonucléotides ou d'acides nucléiques.

De nombreuses raisons font désirer un procédé

pour fixer de manière covalente d'autres espèces chimiques sur des oligonucléotides synthétiques. Des colorants fluorescents fixés aux oligonucléotides permettent de supprimer les radioisotopes dans la recherche, et dans les procédés diagnostiques et cliniques dans lesquels ils sont utilisés, et améliorent la stabilité et la disponibilité. Tel que décrit dans une autre demande de brevet de la demanderesse pour un équipement de séquençage d'ADN (séquenceur), la synthèse d'oligonucléotides marqués avec une substance fluorescente permet l'automatisation d'un procédé de séquençage d'ADN. Le développement de techniques et d'une instrumentation appropriées pour la détection et l'utilisation d'oligonucléotides marqués avec une substance fluorescente permet l'automatisation d'autres techniques de laboratoire et cliniques généralement compliquées. La fixation de produits chimiques de scission d'ADN tels que ceux décrits par Schults et al., J. Am. Chem. Soc. 104, 6861 (1982) ; et par Hertzberg et al., J. Am. Chem. Soc., 104, 313 (1982) permet la construction d'enzymes de restriction synthétiques dont la spécificité est dirigée par la séquence d'oligonucléotides.

La présente invention fournit un procédé général pour l'introduction d'un ou de groupe(s) amino aliphatique(s) dans des oligonucléotides synthétiques. Ce groupe amino réagit spécifiquement et facilement avec diverses fonctions amino-réactives et permet ainsi la fixation covalente d'une grande variété d'espèces chimiques.

En résumé, l'invention concerne de nouveaux oligonucléotides monocaténares sur lesquels a été fixé un groupe amino aliphatique, conjugués à une partie détectable qui est un chromophore, un agent fluorescent, une protéine, une enzyme ou un autre "marqueur".

L'invention concerne en outre les nouveaux oligonucléotides dans lesquels est inséré au moins un amino-nucléoside au moyen d'un précurseur de phosphor-

amidite.

Selon un autre aspect, l'invention concerne la synthèse d'oligonucléotides sur un support en phase solide, dans laquelle on fait réagir un oligonucléotide avec un phosphoramidite d'amino-nucléoside protégé.

Selon un des aspects spécifiques, l'invention concerne la molécule synthétique de 5'-trifluoroacétamido 5'-désoxy 3'-N,N-diisopropyl-phosphoramido thymidine (figure 2 du dessin annexé) et son addition sur l'extrémité 5', comme dernière addition dans la synthèse de l'oligonucléotide en phase solide. Pendant la scission et la suppression de la protection de l'oligonucléotide, le groupe trifluoroacétyle est hydrolysé, laissant un groupe amino aliphatique libre sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. Cet oligonucléotide sur lequel a été fixé un groupe amino peut alors réagir avec une grande variété de molécules amino-réactives pour donner le dérivé d'oligonucléotide correspondant. Ceci représente un cas particulier de la technique plus générale d'utilisation d'un nucléoside modifié qui comporte un groupe amino aliphatique protégé sur la partie base, plutôt que sur le carbone 5'. Une telle molécule permet d'introduire plusieurs groupes amino libres dans l'oligonucléotide, en n'importe quelle position désirée dans la séquence d'oligonucléotide.

L'invention a pour but de fournir de nouveaux réactifs et techniques applicables au séquençage de l'ADN.

L'invention a également pour but de fournir des perfectionnements dans l'hybridation d'ADN pour la détection de troubles génétiques et pour d'autres buts.

D'autres buts et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre.

La stratégie utilisée pour introduire des groupes amino aliphatiques dans un oligonucléotide consiste à synthétiser un dérivé de 3' phosphoramidite d'un analogue de nucléoside contenant un groupe amino aliphati-

que protégé. On peut alors faire réagir ce phosphoramidite avec l'oligonucléotide synthétisé sur un support solide, d'une manière semblable à la réaction de nucléoside phosphoramidites non-dérivés. Une scission à partir de la phase solide et une suppression de la protection des moitiés base et du groupe amino aliphatique permettent d'obtenir le dérivé amino de l'oligonucléotide.

10 Exemple I
Synthèse de VI.

La figure 3 du dessin annexé représente la synthèse du composé VI à partir du composé I commercial (thymidine). Les synthèses des composés II à IV sont
15 décrites par Horowitz et al., J. Org. Chem. 27, 3045-3048 (1962) ; et Gibbs et Orgel, J. Carbohydrates-Nucleosides and Nucléotides, 3 (5 et 6), 315-334 (1976). Les synthèses des composés V et VI sont décrites ci-après.

20 Exemple II
5' trifluoroacétamido 5'-désoxythymidine (V) :

On dissout 1,25 g (5 μ moles) de 5'-amino 5'-désoxythymidine dans 25 ml de diméthylformamide sec. On y ajoute 1,3 ml (10 μ moles) de S-éthyl-trifluorothioacétate (Aldrich). On agite doucement le mélange
25 réactionnel à la température ambiante. La chromatographie en couche mince du mélange réactionnel sur des plaques de gel de silice F-254 dans MeOH/acétone (1:1) montre une seule tache de produit détectée par un
30 rayonnement UV de courte longueur d'onde. Le produit montre une grande mobilité dans ce système de solvant, contrairement au composé de départ VI qui est virtuellement immobile.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec par
35 rotation sous pression réduite, transféré dans une fiole Erlenmeyer contenant 30 ml d'isopropanol et recristallisé à partir d'isopropanol/MeOH bouillant.

Rendement = 1,315 g (3,9 mmoles, rendement 80 %)
 point de fusion 261 - 262° C (décomposition) : ana-
 lyse, calculé : C 42,7 %, H 4,18 %, N 12,5 % ;
 trouvé : C 42,7 %, H 4,16 %, N 12,4 %.

05 La structure de V est en outre confirmée par RMN de ^1H .

Exemple III

Cet exemple illustre la préparation d'un
 phosphoramidite d'un dérivé amino-protégé de nucléoside.

10

5' trifluoroacétamido 5'-désoxy 3'-N,N-diisopropyl-
 phosphoramido thymidine (VI) :

Tous les instruments en verre, seringues et
 tubes capillaires utilisés dans cette réaction ont été
 15 au préalable maintenus pendant une nuit dans une étuve
 de séchage. Le diméthylformamide (DMF) a été conservé
 sur des tamis moléculaires 4 Å (Linde). La diisopropyl-
 éthylamine (DIPEA) a été distillée à partir d'hydroxyde
 de potassium, puis d'hydru^ore de calcium et conservée
 20 sur des tamis moléculaires 4 Å.

Dans un ballon tricol à fond rond de 50 ml,
 sec, équipé d'une tige d'agitateur, on introduit 63 mg
 (0,19 mmole) de composé V. On bouche les trois cols
 avec des bouchons de caoutchouc pour serum et on intro-
 25 duit des aiguilles dans les bouchons. On pompe l'air
 du ballon pendant plusieurs heures dans un dessiccateur
 sur CaCl_2 sec. On maintient l'intérieur du ballon sous
 un léger courant d'azote gazeux sec et, au moyen d'une
 seringue, on ajoute 2 ml de DMF sec. Dans un tube ca-
 30 pillaire sec de 100 µl, on introduit 60 µl de DIPEA
 (0,34 mmole). On ajoute 40 µl de chloro-N,N-diisopro-
 pylaminométhoxyphosphine (American Bionuclear, Emery-
 ville, CA) (dans un tube capillaire sec de 100 µl).
 On agite doucement le mélange réactionnel jusqu'à dis-
 35 solution totale du composé de départ et on laisse au
 repos à température ambiante (toujours sous N_2). La
 chromatographie en couche mince sur des plaques de gel

de silice F-254 dans HCCl_3 : EtOH : Et_3N (88:10:2) montre une heure plus tard une simple tache de produit d'une mobilité bien supérieure à celle du matériau de départ V. Des essais de purification de ce produit de la même manière que décrit pour les nucléosides phosphoramidites (4) sont restés infructueux par suite de la dégradation du produit. On a donc utilisé directement le mélange réactionnel brut pour le couplage sur l'oligonucléotide synthétique sur le support en phase solide. La structure de VI est déduite de la réactivité de ce produit lors de l'addition de l'oligonucléotide, et du produit de réaction attendu d'après les résultats de la littérature.

15 Exemple IV

Cet exemple illustre la préparation d'un oligonucléotide couplé à l'extrémité 5' avec l'extrémité 3' de la 5'-amino 5'-désoxythymidine au moyen d'une liaison phosphodiester.

20

Addition de VI à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide :

On prépare un oligonucléotide synthétique à base protégée ayant la séquence 5' OH-AGC ACT TTT AGA GT 3', couplé avec la phase solide à l'extrémité 3', selon des procédés décrits en détail dans la brochure intitulée "A procedure for the Manual Synthesis of Deoxyoligonucleotides using dimethoxytrityl nucleoside phosphoramidites on a Solid Support", publiée par Applied Biosystems Inc., Foster City, California. Mais, on effectue la réaction de l'oligonucléotide avec VI avec les différences suivantes : a) au lieu des opérations 4.22 et 4.23, on combine 1 ml du mélange réactionnel fraîchement préparé avec 1 ml de tétrazole 0,5 M dans de l'acétonitrile et on ajoute dans le récipient de réaction ; b) après l'opération 4.33, on effectue deux lavages de 30 secondes avec de l'acétonitrile ; et c) on omet la section 5 finale (de manière à permet-

tre un dosage des groupes hydroxyle n'ayant pas réagi dans une addition ultérieure).

L'efficacité de la réaction de couplage est facilement vérifiée par un couplage ultérieur avec un phosphoramidite "normal" et une scission du groupe diméthoxy trityle pour obtenir une réaction colorée. Si les groupes hydroxyle 5' de l'oligonucléotide ont réagi dans le premier couplage avec VI, ils ne sont plus disponibles pour une réaction dans le couplage ultérieur et ils seront donc libérés sous une forme peu colorée lors d'un traitement au DCA après le second couplage. Dans cet exemple, $OD_{450} = 1,12$ (après dilution) pour le groupe DMT libéré à partir de l'oligonucléotide avant la réaction avec VI. $OD_{450} = 0,026$ (après dilution) ($OD =$ absorbance) pour le DMT libéré à partir d'un reste G ajouté après la réaction avec VI. 98 % des groupes 5' OH sont donc bloqués dans la réaction avec VI. On élimine le groupe protecteur de l'oligonucléotide et on scinde de la phase solide par traitement avec du thiophénol et NH_4OH concentré, d'une manière usuelle, puis on élimine NH_4OH sous pression réduite. On dissout l'oligonucléotide dans 1 ml d'eau distillée. $OD_{260} = 128$ pour cette solution, indiquant que la concentration en ADN est de 4,5 mg/ml. On dilue 50 μ l de cette solution avec de l'eau et on mélange pendant 15 minutes avec quelques centaines de mg de résine échangeuse d'ions AG50W-X4 (forme sodium) pour convertir l'ADN du sel d'ammonium en sel de sodium (les ions ammonium interfèrent avec l'essai ultérieur à la ninhydrine). On élimine la résine par centrifugation et on sèche le produit surnageant dans un évaporateur rotatif Savant. L'essai quantitatif à la ninhydrine (Sarin V.K. et al., Anal. Biochem. 117, 147-157 (1981) donne environ 1 mole de groupe amino par mole d'oligonucléotide (on détermine la concentration molaire en oligonucléotide à partir d'un coefficient d'extinction calculé $E_{260} = 1,55 \times 10^5$, sur la base de la composition du né-

cléotide). L'essai à la ninhydrine sur la même quantité molaire d'un oligonucléotide témoin non-conjugué avec VI ne donne pas de réaction amino-positive.

05 Exemple V

Conjugaison avec un colorant :

A 100 μ l de la solution ci-dessus d' amino oligonucléotide, on ajoute 200 μ l de H_2O , 50 μ l de tampon carbonate/bicarbonate 1 M de pH 9,0 et 25 μ l de fluorescéine isothiocyanate (FITC) à 10 mg/ml (Molecular Probes, Inc., Junction City, Oregon) fraîchement préparé, dans du diméthylsulfoxyde. On laisse le mélange à la température ambiante pendant plusieurs heures, et on purifie par chromatographie sur colonne (1 x 9 cm) de Sephadex G-25 dans H_2O . On élue le produit jaune dans le volume séparé et on effectue proprement la résolution à partir du colorant qui n'a pas réagi. Une réaction témoin avec un oligonucléotide qui n'a pas réagi avec VI, ne donne pas de coloration ou ne donne qu'une faible coloration dans le volume séparé de la colonne, indiquant que le colorant a bien réagi avec le groupe amino ajouté. Le produit de conjugaison colorant-oligonucléotide a pour valeurs OD: $OD_{260} = 2,3$ et $OD_{495} = 0,54$. En partant de $E_{495} = 7 \times 10^4$ pour FITC, on obtient une solution 7,7 μ M de colorant. En partant de $E_{260} = 1,55 \times 10^5$, la concentration en ADN est de 12,8 μ M. 60 % environ des molécules d'ADN sont donc marqués avec le colorant. Ceci est une estimation grossière qui ne tient pas compte des changements d'absorption de la fluorescéine fixée par rapport à la fluorescéine non-fixée, ni de la contamination d'oligonucléotide plus courts et non-réactifs. On soumet une partie aliquote de cet ADN coloré à une électrophorèse sur un gel à 20 % de polyacrylamide et on observe nettement une simple bande colorée (et fluorescente) d'une mobilité semblable à celle d'un oligonucléotide de cette longueur.

On purifie facilement l'oligonucléotide con-

jugué avec le colorant par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sur une colonne en C₁₈ à phase inverse (Waters) en utilisant un gradient d'acétonitrile : acétate de triéthylammonium 0,1 M de pH 7,0 pour l'élution.

Les nouveaux dérivés oligonucléotides sur lesquels ont été fixé un groupe amino décrits ci-dessus trouvent de nombreuses applications. Le groupe amino aliphatique peut réagir facilement et spécifiquement avec un grand nombre de groupes fonctionnels. Ceci signifie que, pratiquement, n'importe quelle molécule désirée peut être fixée sur un oligonucléotide préparé tel que décrit ci-dessus. Ceci concerne des enzymes, d'autres protéines, des marqueurs fluorescents, des marqueurs bioluminescents, des chromophores, et autres. Les oligonucléotides ont été utilisés dans un grand nombre de domaines, souvent conjointement avec des radiomarqueurs. Il devient possible de remplacer les marqueurs radioactifs par des molécules modèles non-radioactives. Ceci permet des modes opératoires utilisant des oligonucléotides meilleur marché, plus faciles à manipuler et compatibles avec un ensemble clinique. Bien que les radiomarqueurs soient moins préférés, les nouveaux dérivés aminés d'oligonucléotides peuvent également être marqués radioactivement par exemple avec ¹²⁵I. Les trois exemples particuliers suivants d'utilisation des nouveaux dérivés aminés d'oligonucléotides ne sont donnés qu'à titre d'illustration :

1. Séquençage automatisé d'ADN,
2. Détection de troubles génétiques par hybridation d'ADN,
3. Utilisation générale de la fluorescence pour la détection d'une hybridation.

Détection d'anomalies génétiques :

On peut utiliser des oligonucléotides pour déterminer le génotype d'individus. Ceci est effectué sur

des échantillons d'ADN obtenus à partir du fœtus par amniocentèse. Ces informations ne sont pas valables pour le conseil génétique de couples présentant des risques de multiples troubles génétiques. On peut également déterminer le génotype d'adultes, permettant un diagnostic et un traitement efficaces à un tout premier stade. Un exemple frappant de cette technologie est la détection d'une anémie due à des cellules malades, Connor et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 278 (1983). On a synthétisé des oligonucléotides ayant une longueur de 90 paires de bases, l'un complémentaire au gène normal de la β -globine humaine (β^A) et l'autre complémentaire au gène (β^S) de la β -globine d'une cellule malade. Ces molécules sont marquées radioactivement et utilisées comme modèles dans une hybridation d'ADN. Dans des conditions d'hybridation appropriées, ces modèles peuvent être distingués pour distinguer le gène β^A de l'allèle β^S . Ceci permet un diagnostic de la maladie de la cellule malsaine. Plus généralement, comme l'on fait remarquer Connor et al., ce "comportement d'hybridation spécifique de l'allèle des oligonucléotides fournit un procédé général pour le diagnostic de toute maladie génétique qui implique un point de mutation dans la séquence d'ADN d'un gène à simple copie". L'invention est directement applicable à cette technique. Les modèles d'oligonucléotides sont préparés avec un groupe amino et marqués avec un marqueur fluorescent. La molécule de modèle fluorescente est indéfiniment stable, contrairement à la courte durée de vie des modèles radioactifs et ne demande aucune précaution spéciale de manipulation. Ceci permet une approche bien préférable dans un ensemble clinique, qui est le principal domaine dans lequel la technologie est utilisée.

Les modèles d'oligonucléotides sont largement utilisés dans la recherche et dans les études cliniques. Ils sont communément utilisés pour détecter un fragment d'ADN et une séquence désirée dans une "bibliothèque",

une collection de fragements d'ADN clonés dans un plasmide ou un vecteur de phage, qui contient des séquences englobant le génome entier (ou ARN exprimé) d'un organisme. Ils sont également utilisés pour une hybridation à un ADN d'une séquence donnée dans une "tache" d'une digestion de restriction d'un fragment particulier d'ADN. Dans tous ces exemples, et dans bien d'autres également, l'oligonucléotide est marqué avec ^{32}P , normalement à l'extrémité 5', et les molécules sont détectées par autoradiographie. La présente invention décrit le marquage d'oligonucléotides avec des colorants fluorescents. La fluorescence peut donc être utilisée pour la détection des molécules dans toute technique dans laquelle la radioactivité est normalement utilisée. Ceci présente de nombreux avantages par rapport à la radioactivité, tels que la stabilité des modèles, le coût et la facilité d'emploi et l'élimination.

La Fig. 4 du dessin annexé illustre un modèle d'ADN recombinant monocaténaire pour didésoxyséquençage.

REVENDECATIONS

1. Composition comprenant des oligonucléotides monocaténares sur lesquels a été fixé un groupe amino conjugués avec une partie détectable.
- 05 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie détectable est fluorescente.
3. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie détectable est absorbante ou colorée.
- 10 4. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie détectable est une protéine.
5. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie détectable est une enzyme.
- 15 6. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie détectable est ^{125}I .
7. Oligonucléotide dans lequel a été inséré au moins un nucléoside sur lequel a été fixé un groupe amino, au moyen de précurseur(s) phosphoramidite.
- 20 8. Procédé de synthèse d'oligonucléotides sur un support en phase solide, caractérisé en ce qu'on fait réagir l'oligonucléotide avec un phosphoramidite protégé d'un nucléoside sur lequel a été fixé un groupe amino.
- 25 9. Oligonucléotide couplé à l'extrémité 5' avec l'extrémité 3' hydroxyle de la 5'-amino 5'-désoxythymidine au moyen d'une liaison phosphodiester.
- 30 10. Procédé de préparation du composé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on fait réagir la 5'-amino 5'-désoxythymidine avec un agent protecteur pour obtenir la 5'-trifluoroacétamido 5'-désoxythymidine qu'on fait ensuite réagir avec une phosphine pour obtenir le phosphoramidite correspondant et on fait ensuite réagir le phosphoramidite avec un oligonucléotide à base protégée, fixé sur un support en phase solide.
- 35

11. Phosphoramidites protégés de nucléosides
sur lesquels a été fixé un groupe amino.

12. Phosphoramidite obtenu par réaction de
la 5'-trifluoroacétamido 5'-désoxythymidine avec une
05 phosphine.

1/2

FIG. 1

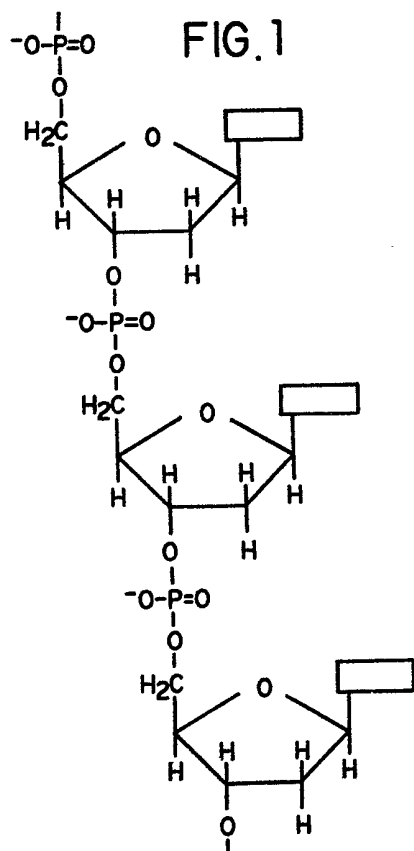


FIG. 2

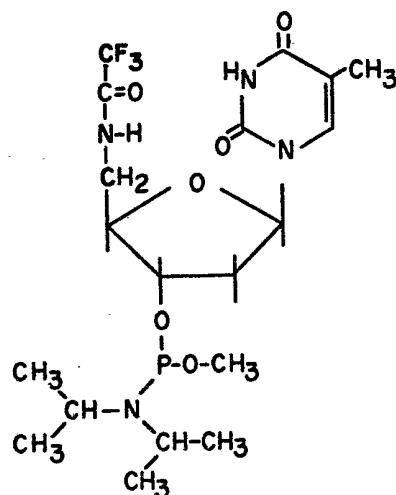


FIG. 4

