



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20200250 T1



HR P20200250 T1

(12) **PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTEJEVA
EUROPSKOG PATENTA**

(51) MKP:

C07H 19/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 29.05.2020.

(21) Broj predmeta: P20200250T

(22) Datum podnošenja zahtjeva u HR: 14.02.2020.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US2014050423
Datum podnošenja međunarodne prijave: 08.08.2014.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 14834827.9
Datum podnošenja europske prijave patenta: 08.08.2014.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2015021432
Datum međunarodne objave: 12.02.2015.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 3041854 A1
Datum objave europske prijave patenta: 13.07.2016.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 3041854 B1
Datum objave europskog patenta: 04.12.2019.

(31) Broj prve prijave: 201361863649 P (32) Datum podnošenja prve prijave: 08.08.2013. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(73) Nositelj patenta: **The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, 92037 La Jolla, CA 92037, US**

(72) Izumitelji: **Floyd E. Romesberg, c/o 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US**
Denis A. Malyshev, c/o 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US
Lingjun Li, c/o 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US
Thomas Laverigne, c/o 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US
Zhengtao Li, c/o 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US

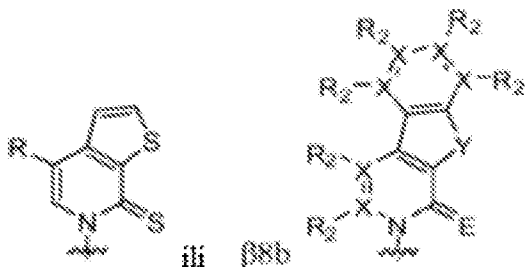
(74) Zastupnik: **Odvjetnica Danija Budimir, 10000 Zagreb, HR**

(54) Naziv izuma: **METODA SITE-SPECIFIČNO ENZIMSKO OBILJEŽAVANJE NUKLEINSKIH KISELINA IN VITRO UGRADNJOM NEPRIRODNIH NUKLEOTIDA**

HR P20200250 T1

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Spoj koje sadrži analog nukleobaze bilo koje od sljedećih formula:



5 naznačeno time, da je R vodik ili reaktivni veznik koji sadrži reaktivni centar prilagođen za vezanje na transportni reagens koji sadrži isporuku i skupinu reaktivnosti komplementarnih reaktivnom centru, ili je R spojen veznik za kojeg je vezana isporuka;

gdje je svaki X ugljik,

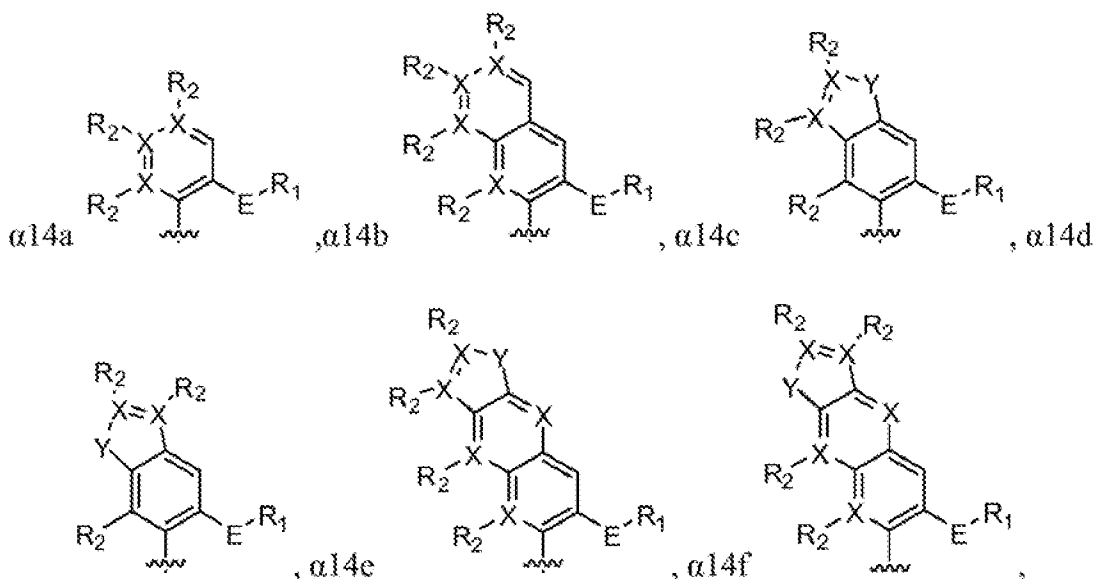
gdje je svaki R₂ nezavisno vodik, alkil, alkenil, alkinil, metoksi, metantioil, metanseleno, halogen, cijano, azidna skupina, reaktivni veznik koji sadrži reaktivni centar prilagođen za vezivanje za transportni reagens koji sadrži isporuku i skupinu reaktivnosti komplementarnu reaktivnom centru, ili spojeni veznik za kojeg je vezana isporuka,

gdje je svaki Y nezavisno sumpor, selen ili sekundarni amin,

gdje je svako E sumpor,

15 i valovita linija označava točku vezanja za ribozilni, deoksiribozilni ili dideoksiribozilni ostatak ili njegov analog, pri čemu je ribozilni, deoksiribozilni ili dideoksiribozilni ostatak ili njegov analog u slobodnom obliku, vezan za monofosfatnu, difosfatnu ili trifosfatnu skupinu, koja opcijски sadrži α-tiotrifosfatnu, β-tiotrifosfatnu ili γ-tiotrifosfatnu skupinu ili je uključen u RNA ili DNA ili u analog RNA ili analog DNA.

2. Spoj koje sadrži analog nukleobaze bilo koje od sljedećih formula:



gdje je svaki X nezavisno ugljik ili dušik,

gdje je svaki R₁ nezavisno vodik, alkil skupina, reaktivni linker koji sadrži reaktivni centar prilagođen za vezanje za transportni reagens koji sadrži isporuku i skupinu reaktivnosti komplementarnu reaktivnom centru, ili spojen veznik za koga je vezana isporuka,

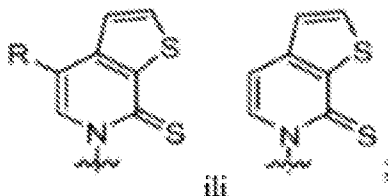
gdje je svaki R₂ prisutan, kada je X ugljik i nezavisno je vodik, alkil, alkenil, alkinil, metoksi, metantioil, metanseleno, halogen, cijano, azidna skupina, reaktivni veznik koji sadrži reaktivni centar prilagođen za vezanje za transportni reagens koji sadrži isporuku i skupinu reaktivnostu komplementarnu reaktivnom centru, ili spojen veznik za kojeg je vezana isporuka,

gdje je svaki Y nezavisno sumpor, kisik, selen ili sekundarni amin,

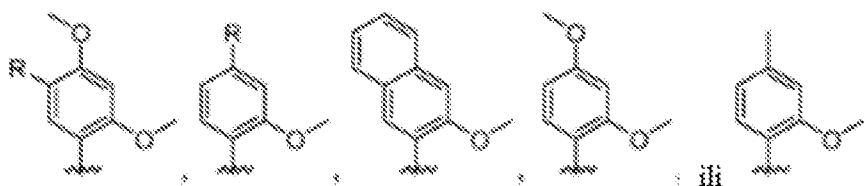
gdje je svako E sumpor,

i valovita linija označava točku vezivanja za ribozilnu, deoksiribozilnu ili dideoksiribozilnu skupinu ili njen analog, pri čemu je ribozilni, deoksiribozilni ili dideoksiribozilni ostatak ili njegov analog u slobodnom obliku, vezan za monofosfatnu, difosfatnu ili trifosfatnu skupinu, koja opcijски sadrži α-tiotrifosfatnu, β-tiotrifosfatnu ili γ-tiotrifosfatnu skupina ili je uključen u RNA ili DNA ili u analog RNA ili analog DNA.

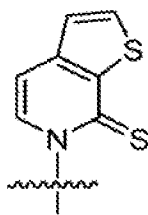
3. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 1, naznačeno time, da reaktivni centar sadrži amino skupinu, acetilensku skupinu, tiol skupinu, aldehidnu skupinu ili azidnu skupinu.
4. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 2, naznačeno time, da reaktivni centar sadrži amino skupinu, acetilensku skupinu, tiol skupinu, aldehidnu skupinu ili azidnu skupinu.
5. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 1, naznačeno time, da ribozilni ili deoksiribozilni ostatak nosi trifosfatnu ili α -tiotrifosfatnu skupinu vezanu za njegov 5'-hidroksil.
6. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 2, naznačeno time, da ribozilni ili deoksiribosilni ostatak nosi trifosfatnu ili α -tiotrifosfatnu skupinu vezanu za njegov 5'-hidroksil.
7. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 1, naznačeno time, da je ribozilni ili deoksiribosilni ostatak inkorporiran u RNA ili DNA oligonukleotidni lanac, respektivno, ili je ribozilni ili deoksiribozilni ostatak ili njegov analog ugrađen u analog RNA ili DNA.
8. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 2, naznačeno time, da je ribozilna ili deoksiribozilna grupa ugrađena u RNA ili DNA oligonukleotidni lanac, respektivno, ili je ribozilni ili deoksiribozilni ostatak ili njegov analog ugrađen u analog RNA ili DNA.
9. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 1, naznačeno time, da najmanje jedan R_2 nezavisno sadrži: skupinu odabranu iz skupine sastavljene od $-C\equiv C-CH_2NHR_3$ skupine, gdje je R_3 vodonik ili je amino-zaštitna skupinu; acetilensku skupinu pogodnu za uporabu u reakciji brave s transportnim reagensom koji sadrži punjenje i acetilen-reaktivnu skupinu; tiol skupinu pogodnu za uporabu u reakciji s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i tiol-reaktivnu skupinu; aldehidnu skupinu pogodnu za uporabu u reakciji s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i aldehidnu reaktivnu skupinu; azidnu skupinu pogodnu za uporabu u reakciji s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i azidnu reaktivnu skupinu; i $-C\equiv C-(CH_2)_n-C\equiv CH$, gdje n je 1, 2, 3, 4, 5 ili 6; i $-C\equiv C-(CH_2)_{n1}-O-(CH_2)_{n2}-C\equiv CH$, gdje su $n1$ i $n2$ svaki nezavisno 1, 2 ili 3.
10. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 2, naznačeno time, da najmanje jedan R_2 nezavisno sadrži: skupinu odabranu od skupinu koja se sastoji od $-C\equiv C-CH_2NHR_3$ grupe, gdje je R_3 vodonik ili je amino-zaštitna skupinu; acetilensku skupinu pogodnu za upotrebu u reakciji brave sa transportnim reagensom koji sadrži isporuku i acetilensku reaktivnu skupinu; tiol skupinu pogodnu za upotrebu u reakciji s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i tiol-reaktivnu skupinu; aldehidnu skupinu pogodnu za uporabu u reakciji s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i aldehidnu reaktivnu skupinu; azidnu skupinu pogodnu za uporabu u reakciji s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i azidnu reaktivnu skupinu; i $-C\equiv C-(CH_2)_n-C\equiv CH$, gdje n je 1, 2, 3, 4, 5 ili 6; i $-C\equiv C-(CH_2)_{n1}-O-(CH_2)_{n2}-C\equiv CH$, gdje su $n1$ i $n2$ svaki nezavisno 1, 2 ili 3.
11. Nukleobazni par koji sadrži prvi analog nukleobaze koji sadrži formulu



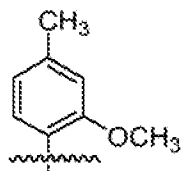
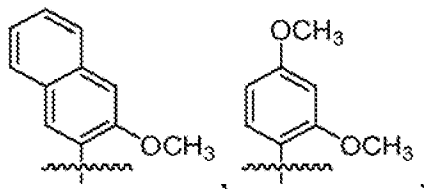
i drugi analog nukleobaze koji ima bilo koju od formula



- gdje je R nezavisno vodik, ili spojen veznik koji sadrži reaktivni centar prilagođen za vezanje za transportni reagens koji sadrži isporuku i skupinu reaktivnosti komplementarnu reaktivnom centru, ili je R spojen veznik za kojeg je vezana isporuka;
- i valovita linija označava točku vezanja za ribozilnu, deoksiribozilnu ili dideoksiribozilnu skupinu ili njen analog, pri čemu je ribozilni, deoksiribozilni ili dideoksiribozilni ostatak ili njegov analog u slobodnom obliku, vezan za monofosfatnu, difosfatnu ili trifosfatnu skupinu, koja opcijski sadrži α -tiotrifosfatnu, β -tiotrifosfatnu ili γ -tiotrifosfatnu skupinu ili je uključen u RNA ili DNA ili u analog RNA ili analog DNA.
12. Dvolančani oligonukleotidni dupleks, naznačen time, da prvi oligonukleotidni lanac sadrži spoj sukladno patentnom zahtjevu 1, a drugi komplementarni oligonukleotidni lanac sadrži komplementarnu nukleobazu za uparivanje baze na njegovom komplementarnom položaju uparivanja baze.
13. Dvolančani oligonukleotidni dupleks, naznačen time, da prvi oligonukleotidni lanac sadrži spoj sukladno patentnom zahtjevu 2, a drugi komplementarni oligonukleotidni lanac sadrži komplementarnu nukleobazu za uparivanje baze na njegovom komplementarnom položaju za uparivanje baze.
14. Dvolančani oligonukleotidni dupleks sukladno patentnom zahtjevu 12, naznačen time, da prvi lanac sadrži nukleobazu koja ima formulu

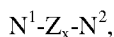


a drugi lanac sadrži komplementarnu nukleobazu za uparivanje baze odabranu iz



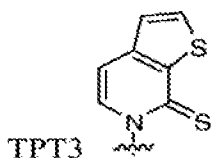
na komplementarnom mjestu spajanja baze.

15. Postupak izvođenja funkcionalizacije specifične za položaj dvostruko lančanog oligonukleotidnog duplekta, koji obuhvaća: ugradnju neprirodne nukleobaze koja sadrži reaktivni veznik koji sadrži reaktivni centar, nukleobaze koja je odabrana iz spoja sukladno patentnom zahtjevu 1, u prvi oligonukleotidni lanac; zatim, sintetiziranje drugog oligonukleotidnog lanca komplementarno prvom oligonukleotidnom lancu, drugi oligonukleotidni lanac koji sadrži nukleobazu komplementarnu neprirodnoj nukleobazi na mjestu specifičnom komplementarnom položaju u njemu, pod uvjetom da prvi oligonukleotidni lanac i drugi oligonukleotidni lanac oblikuju dvolančani oligonukleotidni dupleks; zatim, dovodenje u kontakt dvolančanog oligonukleotidnog duplekta koji inkorporira neprirodnu nukleobazu koja sadrži reaktivnu skupinu veznika s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i skupinu komplementarne reaktivnosti, pod uvjetima podobnim za reakciju reaktivnog veznika i skupine komplementarne reaktivnosti da bi se došlo do spojenog veznika; da bi se osigurao funkcionalni dvolančani oligonukleotidni dupleks s isporukom vezanom za njega putem spojenog veznika
16. Postupak provođenja funkcionalizacije dvostrukog lanca oligonukleotidnog duplekta specifične za položaj, koji uključuje: ugrađivanje neprirodne nukleobaze koja sadrži reaktivni linker koji sadrži reaktivni centar, nukleobaze koja je odabrana iz spoja sukladno patentnom zahtjevu 2, u prvi oligonukleotidni lanac; zatim, sintetiziranje drugog oligonukleotidnog lanca komplementarno prvom oligonukleotidnom lancu, drugi oligonukleotidni lanac koji sadrži nukleobazu komplementarnu s neprirodnom nukleobazom na mjesto-specifičnom komplementarnom položaju u njemu, pod uvjetima da prvi oligonukleotidni lanac i drugi oligonukleotidni lanac oblikuju dvolančani oligonukleotidni dupleks; zatim, kontaktiranje dvolančanog oligonukleotidnog duplekta koji uključuje neprirodnu nukleobazu koja sadrži reaktivni dio veznika s transportnim reagensom koji sadrži isporuku i skupinu komplementarne reaktivnosti, pod uvjetom pogodnim za reakciju reaktivnog veznika i skupine komplementarne reaktivnosti kako bi se dobio spojeni veznik; da bi se osigurao funkcionalizirani dvolančani oligonukleotidni dupleks s teretom povezanom za njega spojenim veznikom.
17. Struktura koja sadrži formulu:

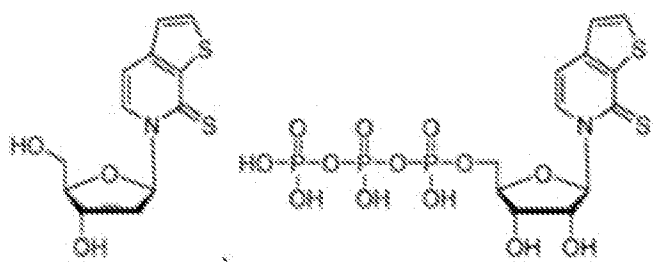
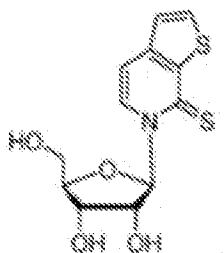


gdje je N^1 nukleotid ili njegov analog, ili terminalna fosfatna skupina; gdje je N^2 nukleotid ili njegov analog, ili terminalna hidroksilna skupina; gdje je Z spoj sukladno patentnom zahtjevu 1 ili patentnom zahtjevu 2 i gdje je x cijeli broj od 1 do 20.

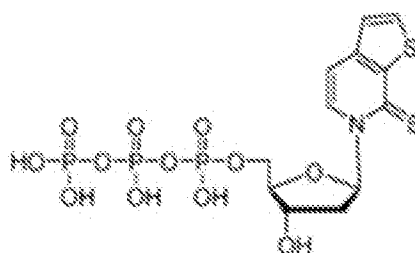
18. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 1, koje ima formulu odabranu od:



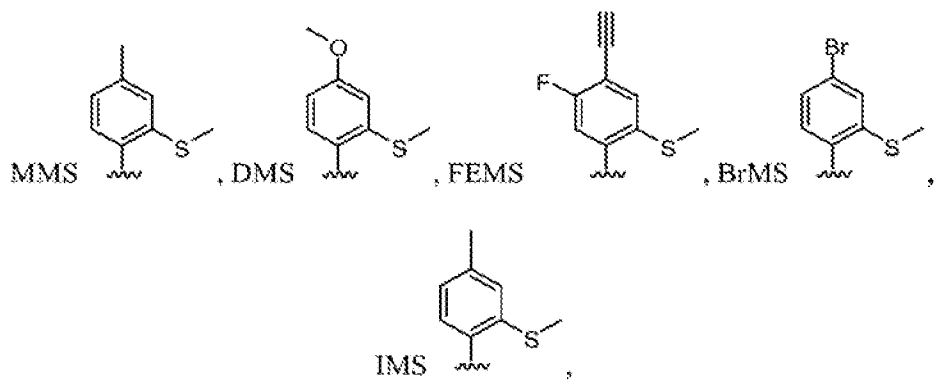
ili njegovih derivata ili analoga,



ili



19. Spoj sukladno patentnom zahtjevu 2, odabrano iz skupine sastavljene od:



5 i njihovih derivata ili analoga.