

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 824**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 19/073 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2016** **PCT/PL2016/050038**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017** **WO17048147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2016** **E 16846944 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021** **EP 3350195**

54 Título: **Procedimiento de síntesis y purificación de un nucleósido y/o un nucleótido, un nucleósido y/o nucleótido modificados, una molécula de ADN y una biblioteca de oligonucleótidos que comprende dicho nucleósido y/o nucleótido modificados y la utilización de dicha biblioteca de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

17.09.2015 PL 41394115

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2021

73 Titular/es:

PURE BIOLOGICS SPÓLKA AKCYJNA (100.0%)
Dunska, 11
54-427 Wrocław, PL

72 Inventor/es:

JUREK, PRZEMYSŁAW;
JELEN, FILIP;
MAZUREK, MACIEJ y
JAKIMOWICZ, PIOTR

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 885 824 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de síntesis y purificación de un nucleósido y/o un nucleótido, un nucleósido y/o nucleótido modificados, una molécula de ADN y una biblioteca de oligonucleótidos que comprende dicho nucleósido y/o nucleótido modificados y la utilización de dicha biblioteca de oligonucleótidos

Los objetos de la presente invención son un procedimiento de síntesis y purificación de un nucleótido, un nucleótido modificado, una molécula de ADN y una biblioteca de oligonucleótidos que comprende dicho nucleótido modificado y la utilización de dicha biblioteca de oligonucleótidos. Los objetivos de la presente invención pueden aplicarse en una selección *in vitro* de aptámeros utilizados como moléculas terapéuticas y también como componentes básicos de herramientas de diagnóstico molecular.

Los aptámeros son oligonucleótidos, fragmentos de una sola cadena de ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico (ARN o ADN), habitualmente de más de diez a varias decenas de nucleótidos de longitud, cuya secuencia definida les permite conformar una estructura tridimensional que se ajusta a la estructura molecular del ligando y unirse a dicho ligando con una sensibilidad y selectividad elevadas. Los aptámeros presentan aplicaciones muy numerosas en biotecnología y medicina, como moléculas terapéuticas y como componentes básicos de herramientas de diagnóstico molecular. Esto lleva a que los aptámeros se comparen a menudo con anticuerpos ampliamente utilizados. Sin embargo, el alcance de los potenciales ligandos, para los cuales ya se han seleccionado aptámeros de trabajo, es mucho más amplio que las parejas de anticuerpos principalmente basados en proteínas. Los ligandos de aptámeros también incluyen compuestos de bajo peso molecular de casi cualquier estructura, tales como, por ejemplo, iones metálicos, alcaloides, colorantes orgánicos, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, porfirinas o azúcares [1-3]. Entre otras ventajas de los aptámeros, que los colocan por encima de los anticuerpos en muchas aplicaciones, se incluyen: tamaño pequeño (el aptámero de trabajo seleccionado más pequeño tiene 15 nucleótidos de longitud [4], lo que corresponde a una masa de aproximadamente 4.600 g/mol); inmunogenicidad baja o nula; síntesis química económica y eficiente, que además proporciona una preparación 100 % homogénea; la posibilidad de introducir diversas modificaciones químicas; fuerte resistencia a condiciones no fisiológicas y la capacidad de renaturalización espontánea, y proceso relativamente rápido de selección de aptámeros hacia la diana molecular elegida.

Los aptámeros se obtienen en un proceso de "evolución *in vitro*" denominado procedimiento SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Se basa en la unión repetitiva de un conjunto de moléculas de oligonucleótidos con diferentes secuencias (habitualmente 10^{12} - 10^{14} moléculas en la primera ronda de selección) con una diana molecular elegida y la posterior separación física de las moléculas que se han unido a la diana de las moléculas no unidas. Después de la separación, los oligonucleótidos que se unen a la diana se amplifican de manera enzimática y el proceso se repite, habitualmente con condiciones más rigurosas a efectos de seleccionar moléculas de los parámetros de unión a la diana deseados [5, 6]. Los aptámeros obtenidos de esta manera se someten a secuenciación, el conocimiento de la secuencia de nucleótidos permite sintetizar químicamente un aptámero puro para una utilización posterior o para una optimización adicional, que comprende, por ejemplo, introducir modificaciones o recortar el oligonucleótido.

Las bibliotecas son conjuntos de moléculas de ácido nucleico de una sola cadena que comprenden en sus secuencias una región de secuencia aleatoria de nucleótidos. Durante el proceso SELEX, las secuencias (clones) seleccionadas de la biblioteca son aquellas secuencias que ejercen la capacidad de unirse a una diana molecular elegida, hacia la que se está realizando la selección. Cada molécula de ácido nucleico en la biblioteca tiene la misma estructura, dos regiones de cebador en ambos extremos que permiten la amplificación de la biblioteca con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una región con secuencia aleatoria en el medio.

Tanto el ADN como el ARN son susceptibles de ser digeridos por enzimas nucleolíticas. La utilización de aptámeros *in vivo* o incluso *in vitro* en muestras que comprenden nucleasas (por ejemplo, lisados celulares) se ve obstaculizada debido a la degradación de los ácidos nucleicos por esas enzimas. Para superar este problema, se han propuesto muchas modificaciones en la cadena principal de azúcar-fosfato de los aptámeros, por ejemplo, sustituyendo el grupo hidróxido en el carbono 2' por un grupo amina, o una sustitución de uno de los átomos de oxígeno en el enlace fosfodiéster por un átomo de azufre (tioaptámeros). Otros ejemplos de procedimientos que reducen la susceptibilidad de los ácidos nucleicos a la digestión enzimática pueden ser la introducción de "spiegelmers", oligonucleótidos cuya estructura de azúcar está compuesta de isómero L-ribosa en lugar del isómero D natural; o la utilización de LNA (ácido nucleico bloqueado, *Locked Nucleic Acid*), un análogo en el que las moléculas de ribosa tienen un enlace adicional que conecta el carbono 4' con el oxígeno 2' (cerrando de este modo la ribosa en la conformación 3'-endo, lo cual también influye en las propiedades de hibridación del oligonucleótido).

Un problema separado es el escaso repertorio de monómeros (nucleótidos) de los cuales están formados las cadenas de ácidos nucleicos en la naturaleza. La composición de ácidos nucleicos naturales incluye solo cuatro moléculas de nucleobase diferentes: adenina, guanina, citosina y timina (o uracilo en el caso del ARN), que tienen solo unos pocos grupos químicos que pueden participar en la posible unión de la diana molecular. Ha generado la necesidad de enriquecer las bibliotecas de oligonucleótidos utilizadas para el proceso SELEX con nuevos nucleótidos y grupos químicos no naturales, análogos de nucleótidos naturales, que pueden ayudar a seleccionar

aptámeros con mejores propiedades de unión a la diana. Para hacer frente a este desafío, muchos grupos de investigación han trabajado en la incorporación enzimática de nucleótidos modificados en las bibliotecas y su utilización para la selección [7-9].

En el estado de la técnica, se obtienen nucleótidos modificados mediante procedimientos de síntesis orgánica avanzada, a menudo procesos largos y de múltiples etapas con un pobre rendimiento, no accesible para laboratorios sin equipo especial para síntesis orgánica [8-11]. Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento de síntesis de nucleótidos modificados más fácil, más eficiente y más rápido que se puedan incorporar posteriormente a los ácidos nucleicos utilizando procedimientos enzimáticos, y dicho procedimiento será útil en la selección de nuevos aptámeros modificados con mejores parámetros que los aptámeros que comprenden solo nucleótidos naturales.

La cicloadición de Huisgen de azida-alquino catalizada por cobre (I) (CuACC) permite una conjugación de una etapa, muy selectiva, eficiente (a menudo produce más del 90 %), rápida (el tiempo de conjugación puede ser de menos de una hora), se realiza en condiciones suaves (temperatura ambiente, presión normal, amplia selección de posibles disolventes que incluyen agua, pH alrededor de 4 a 12) de dos compuestos, uno de los cuales comprende un grupo azida libre ($-N_3$) y el otro un alquino terminal ($-C\equiv CH$). La reacción se realiza en presencia de iones de cobre (I) (un catalizador) y el enlace triazol covalente estable resultante tiene siempre la misma regioisometría [12,13]. Por estas razones, esta reacción se clasifica como un ejemplo de la denominada "Química click": una química de conjugación sencilla y eficiente de tipo "click" con un amplio espectro de aplicación [14, 15].

Los autores de la Patente US 6,175,001 (Barbas y Kandasamy, 2001) [10] describen la preparación y la utilización para la síntesis de ADN de nucleósidos trifosfatos que contienen una modificación en la posición 5 del anillo de desoxiuracil pirimidina; comprende un enlazador en forma de alilamina (prop-2-en-1-amina) y un grupo funcional unido al enlazador a través de un enlace amida. Entre los grupos funcionales utilizados se incluían ácido benzoico, imidazol, piridina, bencilamina o fenol. Una serie de reacciones de síntesis orgánica, en las que a partir del compuesto inicial 5-yododesoxiuridina los autores obtuvieron un precursor para otras modificaciones, el 5-(3-aminopropen)-desoxiuridina trifosfato, alcanzaron un rendimiento del 24 %. A continuación, los autores utilizaron este compuesto precursor para preparar nucleósidos trifosfatos modificados con reacciones, cuyo rendimiento fue del 58-73 %.

La publicación "Expanding the chemistry of DNA for in vitro selection", Vaught et al., JACS 2010, 132, 4141-4151 [9] describe estructuras y un procedimiento de preparación de nucleósidos trifosfatos modificados. Los autores utilizaron 5-yododesoxiuridina en una reacción de carboxiamidación catalizada por paladio para preparar derivados, cuyos grupos funcionales (que comprenden bencilo, isobutano, metilnaftaleno, imidazol-4-etano o (1H-indol-3-)etano) están unidos al carbono número 5 del anillo de pirimidina con un enlace amida. La reacción de conjugación en sí requiere una etapa, pero tiene una duración de 48 a 72 horas. Además, requiere la manipulación previa del sustrato mediante la introducción de grupos protectores para los grupos hidroxilo en varias reacciones. Los autores han presentado el rendimiento del proceso como de medio a bueno, del 30 al 60 %. A continuación, los autores han realizado pruebas, en las que han demostrado que los nucleótidos modificados se incorporan al ADN en una reacción de extensión con cebadores (PER, *primer extension reaction*) mediante ADN polimerasas dependientes de ADN (KOD XL, Pfu (exo-), D. Vent (exo-), Tth, Taq, KF (exo-)) y que los oligonucleótidos que comprenden dichos nucleótidos modificados en su secuencia también pueden utilizarse como molde para PER. Sin embargo, los nucleótidos modificados no se pudieron utilizar con éxito en una PCR.

En otra publicación "Synthesis of Deoxynucleoside Triphosphates that Include Proline, Urea, or Sulfonamide Groups and Their Polymerase Incorporation into DNA", Marcel Hollenstein, Chem. EUR. J. 2012, 18, 13.320-13.330 [16], el autor presenta la síntesis y posterior incorporación en moléculas de ADN de nucleótidos enriquecidos con grupos funcionales complejos (que comprenden residuos de prolina, un grupo urea, un grupo sulfamida) unidos al carbono número 5 del anillo de pirimidina con un enlazador en forma de alilamina (prop-2-en-1-amina) y un enlace amida. La preparación del precursor intermedio a partir de 5-yodouridina se realizó con un rendimiento del 31 %. A continuación, se utilizó el precursor para sintetizar cinco nucleósidos trifosfatos diferentes; la serie de reacciones de síntesis con el mayor rendimiento proporcionó aproximadamente una conversión del 23 % del precursor en el producto.

En la Patente WO2009012363A2 se describieron aptámeros de oligonucleótidos que se unen de manera selectiva a un polipéptido o proteína glicosilados diana, y que tienen una afinidad sesgada por el glicano a través de un ácido borónico unido a una base nucleosídica de un nucleótido o nucleótidos. La divulgación comprende procedimientos para aislar un aptámero o aptámeros que se unen de manera selectiva a un polipéptido glicosilado diana, donde, entre una población de oligonucleótidos aleatorizados que tienen, como mínimo, un nucleótido que tiene un marcador de ácido borónico unido a una base, se selecciona una primera subpoblación de aptámeros que se unen al polipéptido o proteína glicosilados diana. A continuación, esta subpoblación se amplifica sin utilizar TTP modificado con ácido borónico y se seleccionan los productos de amplificación que no se unen a un polipéptido o proteína glicosilados diana. A continuación, la segunda subpoblación de aptámeros se amplifica utilizando TTP modificado con ácido borónico para proporcionar una población de aptámeros modificados con ácido borónico capaces de unirse de manera selectiva a un sitio de glicosilación de un polipéptido o proteína diana. Otros aspectos de la divulgación comprenden procedimientos para la utilización de los aptámeros modificados para detectar

especies glicosiladas de un polipéptido o proteína.

La publicación "Design, Synthesis, and Polymerase-Catalyzed Incorporation of Click-Modified Boronic Acid-TTP Analogues", CHEMISTRY-AN ASIAN JOURNAL, volumen 6, 2011, páginas 2.747-2.752, XPO55160640 describe la síntesis de cuatro análogos de timidina trifosfato (TTP) modificados con ácido borónico. La síntesis de ciertos análogos se realizó mediante la utilización de una única ligadura de dialquino para el acoplamiento de Sonogashira con timidina y la posterior cicloadición [3 + 2] mediada por Cu para unirse al resto de ácido borónico. Todos los análogos mostraron muy buena estabilidad en las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fueron reconocidos como sustrato por la ADN polimerasa y, por lo tanto, se incorporaron en el ADN.

En la publicación "A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers", ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, volumen 54, número 37, 23 de julio de 2015, páginas 10.971-10.974, XPO55589969 se presentó un procedimiento novedoso y versátil para la expansión modular del espacio químico de las bibliotecas de ácidos nucleicos, lo que permite la generación de aptámeros modificados con nucleobase con propiedades de reconocimiento sin precedentes. La reintroducción de la modificación después de la replicación enzimática proporciona un amplio acceso a muchas modificaciones químicas.

Otra publicación "Site-Specifically Arraying Small Molecules or Proteins on DNA Using An Expanded Genetic Alphabet", CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, volumen 19, número 42, 11 de octubre de 2013 (11-10-2013), páginas 14.205-14.209, XP055590293 y "Supporting Information", XPO55590282, describió una clase de pares de bases de ADN no naturales replicables formados entre d5SICS y dMMO2, dDMO o dNaM, el que fuera. Se describe la síntesis de una variedad de derivados que contienen grupos propinilo, un análisis de su replicación mediada por polimerasa y la posterior modificación específica del sitio del ADN amplificado mediante química Click. Con el armazón d5SICS, un enlazador de propinil éter se acomoda mejor que su análogo alifático, pero no tan bien como el enlazador de propargilamina protegida explorada previamente. También se encontró que con los análogos de dMMO2 y dDMO, la posición *para* de dMMO2 para el enlace glicosídico es más adecuada para la unión del enlazador y que aunque los enlazadores alifáticos y basados en éter se acomodan de manera similar, la unión directa de un grupo etinilo al núcleo de la nucleobase se tolera mejor. Para demostrar la utilidad de estos análogos, se utilizaron varios de ellos para unir de manera selectiva de sitio una etiqueta de biotina al ADN amplificado. Finalmente, la utilización de d5SICS^{CO}-dNaM para acoplar una o dos proteínas al ADN amplificado, con el producto doble marcado, se visualizó mediante microscopía de fuerza atómica. La capacidad de codificar las relaciones espaciales de moléculas en matriz en ADN amplificable por PCR debería tener aplicaciones importantes, que van desde SELEX con funcionalidades que no están presentes de forma natural en el ADN hasta la producción y, quizás, la "evolución" de nanomateriales.

A continuación, la publicación "C5-Modified nucleosides exhibiting anticanceractivity", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, volumen 19, número 16, 15 de agosto de 2009 (15-08-2009), páginas 4.688-4.691, XP026419057 describe un procedimiento sencillo para la síntesis de nucleósidos modificados en C5 a partir de 5-yodo-2'-desoxiuridina y (ii) su actividad contra seis tipos de líneas celulares de cáncer humano (HCT15, MM231, NCI-H23, NUGC-3, PC-3, ACHN). Muestra óxidos de nitrilo *in situ* a partir de oximas utilizando un agente blanqueador comercial; sus cicloadiciones con 5-etinil-2'-desoxiuridina produjeron derivados de isoxazol que poseían actividad contra las líneas celulares cancerosas. Se sintetizaron varias azidas a partir de bromuros bencílicos y sus reacciones click con 5-etinil-2'-desoxiuridina proporcionaron derivados de triazol.

En otra publicación, "A 2'-deoxycytidine long-linker click adduct forming two conformers in the asymmetric unit", ACTA CRYSTALLOGRAPHICA, SECTION C: CRYSTAL STRUCTURE COMMUNICATIONS, volumen 68, número 4, 2012, páginas 1-17, XPO55519073, se describió un compuesto, cuyo nombre sistemático es: 4-amino-1-(2'-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-5-[6-(1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)hex-1-il]pirimidin-2(1*H*)-ona, C₂₄H₂₈N₆O₄, muestra dos conformaciones en estado cristalino, a saber (I-1) y (I-2). Los grupos pirimidina y las cadenas laterales de los dos conformeros son casi superponibles, mientras que las mayores diferencias entre ellos se observan para los grupos de azúcares. Los enlaces N-glicosídicos de ambos conformeros adoptan conformaciones *anti* similares, con $\chi = -168,02$ (12)° para el conformero (I-1) y $\chi = -159,08$ (12)° para el conformero (I-2). El residuo de azúcar de (I-1) muestra una conformación de tipo N (C3'-*endo*), con $P = 33,1$ (2)° y $\tau_m = 29,5$ (1)°, mientras que la conformación del grupo 2'-desoxirribofuranosilo de (I-2) es de tipo S (C3'-*exo*), con $P = 204,5$ (2)° y $\tau_m = 33,8$ (1)°. Ambos conformeros participan en la formación de enlaces de hidrógeno y muestran patrones idénticos que dan lugar a redes tridimensionales. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares se forman con moléculas vecinas de conformaciones diferentes e idénticas (N-H...N, N-H...O, O-H...N y O-H...O).

En la publicación "AZIDOPROPYL VINYL SULFONAMIDE AS A NEW BIFUNCTIONAL CLICK REAGENT FOR BIOORTHOGONAL CONJUGATIONS: APPLICATION FOR DNA-PROTEIN CROSS-LINKING", CHEMISTRY-A EUROPEAN JOURNAL, volumen 21, número 45, 2 de noviembre de 2015 (02-11-2015), páginas 16.091-16.102, XP055519078, se presentó la *N*-(3-azidopropil)vinilsulfonamida como un nuevo reactivo de bioconjugación bifuncional adecuado para la reticulación de biomoléculas a través de reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (I) y de adición de Michael del tiol en condiciones biortogonales. El reactivo se conecta ("click") fácilmente a un ADN o proteína que contiene acetileno y, a continuación, reacciona con péptidos o proteínas que contienen cisteína para formar reticulaciones covalentes. Se proporcionan varios ejemplos de bioconjugaciones de

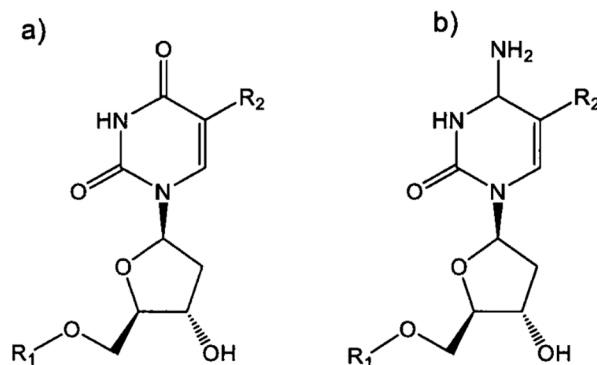
ADN modificado con etinilo u octadiinilo con péptidos, proteína p53 o anhidrasa carbónica humana modificada con alquino con péptidos.

La publicación "Cross-Linked DNA: Site-Selective "Click" Ligation in Duplexes with Bis-Azides and Stability Changes Caused by Internal Cross-Links", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, volumen 23, número 6, 1 de enero de 2012 (01-01-2012), páginas 1.230-1.243, XP055519081, mostró un ADN reticulado entre cadenas heterodimérico construido mediante la reacción "bis-click" llevada a cabo sobre dobles cadenas de oligonucleótidos preformadas con la bis-azida 1. Para esto, se sintetizaron 8-aza-7-desazapurina alquilada o nucleósidos de pirimidina 5-sustituidos correspondientes. La reticulación dio lugar a la formación quimioselectiva de dobles cadenas heterodiméricas, mientras que se suprimieron los homodímeros. Para la identificación del producto, se preparó ADN heterodimérico mediante la reacción de "click por pasos", mientras que se pudo acceder de forma inequívoca a los homodímeros no complementarios mediante química "bis-click". Los estudios sobre la fusión en dobles cadenas de dobles cadenas reticuladas complementarias (heterodímeros) revelaron valores de T_f significativamente mayores en comparación con los congéneres no reticulados. La estabilidad de este ADN reticulado depende de la longitud del enlazador y del sitio de modificación. Los homodímeros reticulados hibridados con oligonucleótidos complementarios de una cadena muestran una estabilidad mucho menor.

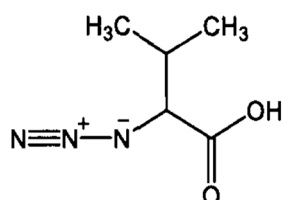
Los procedimientos presentados de preparación de nucleótidos modificados requieren múltiples reactivos, equipos especializados para síntesis orgánica, también se caracterizan por un bajo rendimiento y múltiples etapas, lo que alarga el tiempo de preparación del compuesto final deseado.

El problema técnico para ser resuelto por la presente invención es proponer un procedimiento de síntesis de nucleótidos modificados que proporcionaría nucleótidos modificados que se pueden incorporar en ácidos nucleicos mediante procedimientos enzimáticos, y por tanto, serían útiles para la selección de nuevos aptámeros modificados con mejores parámetros que los aptámeros que comprenden solo nucleótidos naturales, en el que dicho procedimiento no requeriría la utilización de un equipo de laboratorio especializado complicado y caro y sería un proceso de alto rendimiento que no requeriría una manipulación previa del sustrato, y en el que dicho procedimiento sería relativamente sencillo y rápido, y el producto obtenido se caracterizaría por un nivel de pureza elevado. De manera sorprendente, los problemas y objetivos técnicos mencionados anteriormente fueron resueltos por la presente invención.

El primer objetivo de la presente invención es un procedimiento de síntesis y purificación de un nucleótido, del que el sustrato de la estructura 1 es un monofosfato, difosfato o trifosfato, caracterizado por que se realiza una reacción de cicloadición de Huisgen de azida-alquino catalizada por cobre utilizando un compuesto de estructura 1:

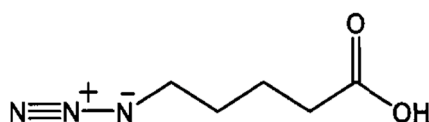


con un compuesto de estructura 2



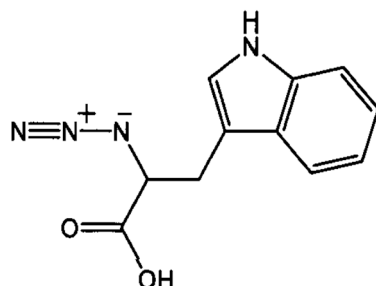
Estructura 2

o con un compuesto de estructura 3



Estructura 3

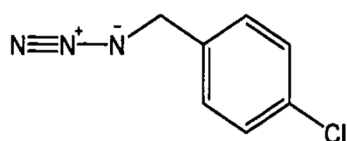
o con un compuesto de estructura 4



Estructura 4

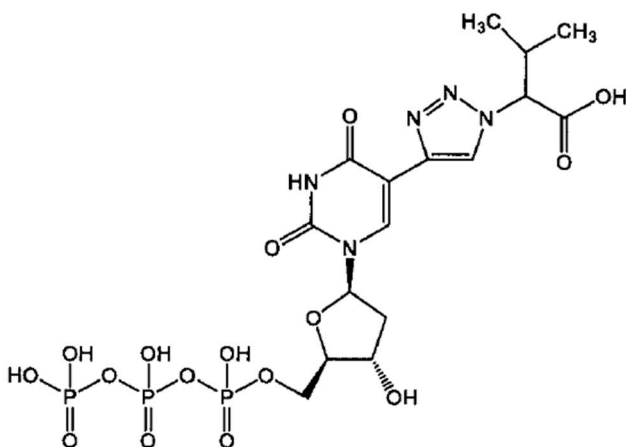
5

o con un compuesto de estructura 5



Estructura 5

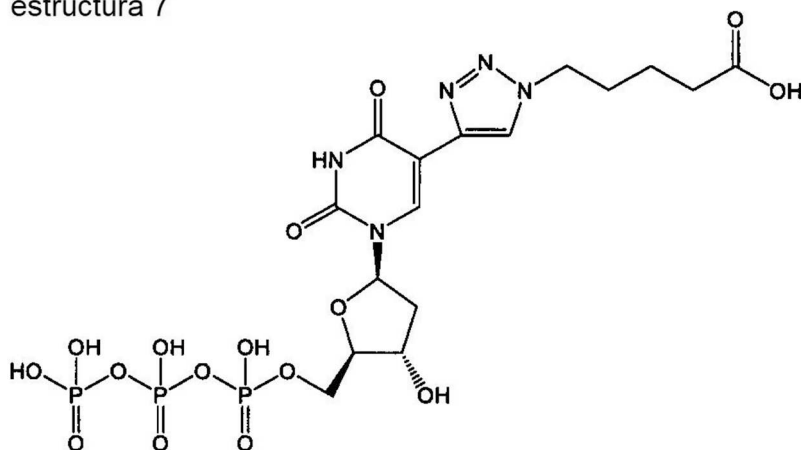
10 en el que los disolventes de la mezcla de reacción comprenden tampón TEAA, es decir, ácido trietilamina-acético, ascorbato de sodio y DMSO, en el que que la síntesis se realice a una temperatura de 40 °C durante 2 horas es esencial para la obtención de un compuesto con estructura 6:



15

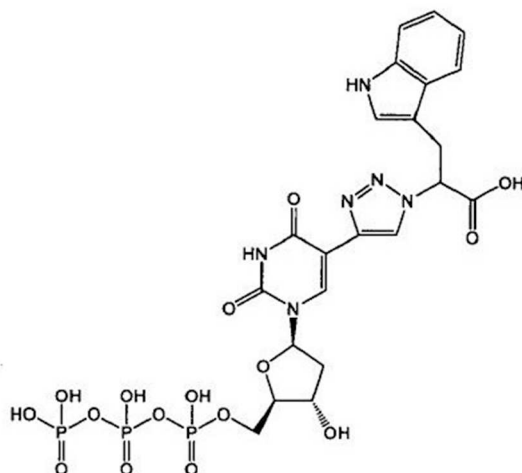
a partir de la estructura 2 y a la temperatura de 40-55 °C durante 1-6 horas es esencial para obtener el compuesto con

estructura 7

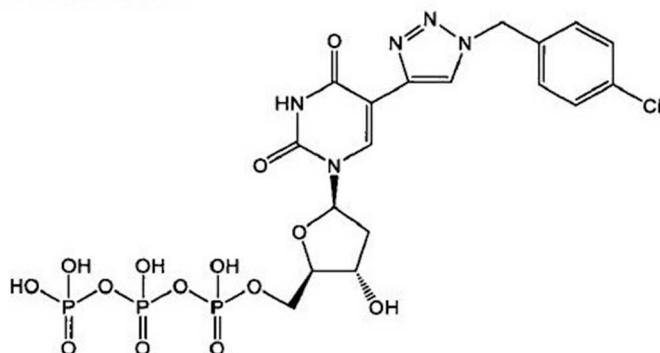


20

estructura 8

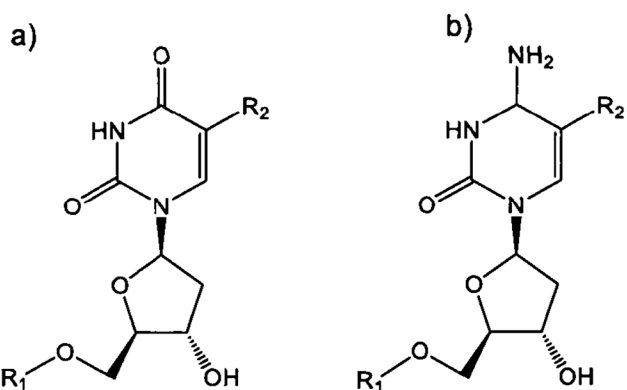


o estructura 9



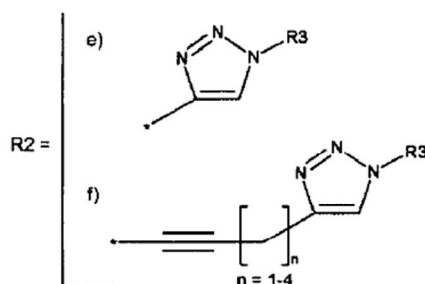
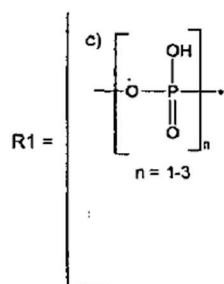
5 a partir de las azidas correspondientes de las estructuras 3-5, y en el que la purificación directa en una etapa del producto de síntesis se realiza utilizando cromatografía de fase inversa.

10 El segundo objetivo de la presente invención es un nucleótido modificado que es un monofosfato, difosfato o trifosfato, que comprende citosina o uracilo como su nucleobase, que en la posición 5 del anillo heterocíclico tiene un grupo 1,2,3-triazol o una cadena de alcano o alquino que tiene un grupo 1,2,3-triazol terminal, y tiene un sustituyente en la posición 1 de dicho grupo 1,2,3-triazol que es un derivado de uno de los compuestos del grupo de estructuras 2 a 5, y siendo dicho nucleótido modificado de estructura 10:

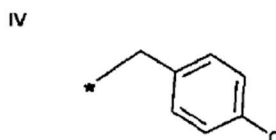
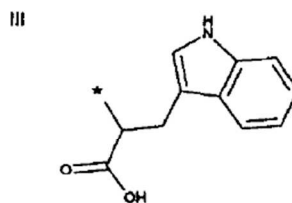
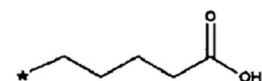
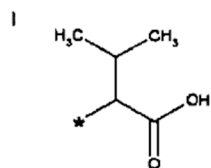


Estructura 10

15 en las que:



R3 =



El tercer objetivo de la presente invención es una molécula de ADN que comprende una cadena de ADN de una cadena o de doble cadena, caracterizada por que comprende en una o más posiciones de la secuencia de cualquiera o de ambas cadenas uno o más nucleótidos modificados, tal como se describe en el segundo objetivo de la presente invención. En una realización preferente de la presente invención, la posición de uno o más nucleótidos modificados en la secuencia no está restringida. En otra realización preferente, la molécula de ADN se ha preparado mediante una reacción enzimática (PCR, PER) o mediante síntesis química de oligonucleótidos.

El cuarto objetivo de la presente invención es una biblioteca de oligonucleótidos que tiene en su secuencia una región de secuencia aleatoria, como mínimo, de 10 nucleótidos de longitud, y dos regiones flanqueantes de secuencias constantes, como mínimo, de 10 nucleótidos de longitud, o carentes de regiones flanqueantes, caracterizada por que comprende en una o más posiciones de la secuencia uno o más nucleótidos modificados, tal como se describe en el segundo objetivo de la presente invención. En una realización preferente de la presente invención, la posición de uno o más nucleótidos modificados en la secuencia no está restringida. En otra realización de la presente invención, la biblioteca de oligonucleótidos se ha preparado mediante una reacción enzimática (PCR, PER) o mediante síntesis química de oligonucleótidos.

El quinto objetivo de la presente invención es la utilización de la biblioteca de oligonucleótidos, tal como se describe en el cuarto objetivo de la presente invención, para obtener aptámeros mediante la técnica SELEX y sus derivados.

El procedimiento de síntesis y purificación de nucleótidos modificados, según la presente invención, permite preparar nucleótidos modificados, que pueden incorporarse a ácidos nucleicos mediante procedimientos enzimáticos, gracias a lo cual es posible utilizarlos en la selección de nuevos aptámeros modificados con mejores parámetros que los aptámeros que comprenden solo nucleótidos naturales. El procedimiento presentado permitió limitar el número de etapas de síntesis y purificación a efectos de preparar nucleótidos modificados, en el que no se requirió la utilización de un equipo de laboratorio complejo. La síntesis y purificación se caracterizan por una alta eficiencia del proceso, no requieren manipulación previa del sustrato, son rápidas y los productos obtenidos se caracterizan por un nivel de pureza elevado. La incorporación enzimática de los nucleótidos modificados en oligonucleótidos se caracteriza por una alta eficiencia, similar a la incorporación de nucleótidos naturales. Los oligonucleótidos descritos en el tercer objetivo de la presente invención que comprenden nucleótidos modificados en su secuencia también se caracterizan por que pueden actuar como molde para PER o PCR, durante los cuales mediante la utilización de nucleótidos naturales se produce una síntesis de oligonucleótidos no modificados con secuencias complementarias a la de los oligonucleótidos modificados con el molde; este requisito es necesario para poder utilizar la biblioteca modificada para la selección de aptámeros mediante la técnica SELEX y sus derivados, tal como se describe en el quinto

objetivo de la presente invención.

Las realizaciones de ejemplo de la presente invención se presentan mediante ejemplos y en las figuras, en las que la figura 1 presenta un esquema general de la reacción de cicloadición de Huisgen de azida-alquino catalizada por cobre, la figura 2 presenta esquemas de reacciones según la presente invención, la figura 3 presenta un cromatograma del nucleótido de estructura 6 preparado mediante cromatografía de fase inversa, la figura 4 presenta un espectro de masas representativo del nucleótido de estructura 6 obtenido mediante análisis de masas con MS-TOF (espectrometría de masas – tiempo de vuelo), la figura 5 presenta el resultado del análisis electroforético (un electroferograma) del producto de la síntesis enzimática de un oligonucleótido que comprende nucleótidos modificados de estructura 9 en su secuencia y la figura 6 presenta el resultado del análisis electroforético del producto de la síntesis enzimática de un oligonucleótido no modificado, para el cual el molde durante la reacción de síntesis fue un oligonucleótido que comprendía nucleótidos modificados de estructura 6 en su secuencia.

Ejemplo 1: Síntesis y purificación de un nucleótido modificado de estructura 6

La reacción de síntesis del nucleótido de estructura 6 se preparó en 200 μ l. A 4,0 μ l de EdUTP 100 mM (2'-desoxiuridina 5'-trifosfato de 5-etinilo, estructura 1.a).c).e); 400 nmol), se añadieron 20 μ l de 10x tampón TEAA (trietilamina-ácido acético 500 mM pH 7,0) y 30 μ l de ácido (S)-2-azido-3-metilbutírico (estructura 2) disuelto en DMSO a una concentración de 200 mM (6,0 μ mol, 15 equivalentes molares de EdUTP). A continuación, se añadieron 10 μ l de la mezcla Cu-TBTA preparada previamente (CuSO₄ 10 mM, TBTA (tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina) 25 mM, DMSO al 50 %, terc-butanol al 16,6 %) hasta una concentración final de cobre en la reacción de 0,5 mM (0,25 equivalentes molares de EdUTP). La mezcla se llenó hasta 180 μ l utilizando DMSO, se mezcló y se añadieron 20 μ l de ascorbato de sodio a una concentración de 200 mM (hasta una concentración final de 20 mM, 10 equivalentes molares de EdUTP), iniciando de este modo la reacción mediante la reducción del cobre al estado de oxidación I y el tapón del tubo se cerró de forma hermética. Se preparó un control negativo paralelo en un volumen de 20 μ l, manteniendo las concentraciones como en la muestra positiva, pero sustituyendo el ascorbato de sodio por agua desionizada. La reacción se realizó en un tubo cerrado durante 2 horas a 40 °C con agitación vigorosa.

A continuación, el producto se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando tampón TEAA 100 mM y metanol como fase móvil (sistema de cromatografía NGC de Bio-Rad, la columna AccQ-Tag de Water, 60 Å, 4 μ m, 3,9 mm x 150 mm). El cromatograma del análisis tanto del control negativo como de la muestra positiva se presenta en la figura 3. Las fracciones recogidas que contienen el nucleótido purificado de estructura 6 se combinaron, se secaron en un concentrador de vacío (concentrador de vacío centrífugo de sobremesa CentriVap de Labconco) y se disolvieron en un volumen conocido de DMSO al 25 %. A continuación, la muestra se analizó mediante MS-TOF (espectrómetro Xevo G2-XS QToF de Water) en ionización por electropulverización en modo negativo: masa detectada 634,04 Da, masa calculada 634,30 Da. En la figura 4 se presenta un espectro de masas representativo.

Ejemplo 2: Síntesis y purificación de nucleótidos modificados de estructura 7-9

La reacción de síntesis de nucleótidos de estructuras 7-9 se realizó de forma análoga a la síntesis del compuesto de estructura 6 (ejemplo 1) utilizando las azidas correspondientes de las estructuras 3-5 en lugar del compuesto de estructura 2. Temperatura de reacción 40-55 °C, tiempo de reacción 1-6 horas.

Análisis de masas de los productos de las estructuras 7-9: nucleótido de estructura 7: masa detectada 634,04 Da, masa calculada 634,30 Da; nucleótido de estructura 8: masa detectada 721,0 Da, masa calculada 721,38 Da; nucleótido de estructura 9: masa detectada 658,50 Da, masa calculada 658,75 Da.

Ejemplo 3: Síntesis enzimática de ADN de una cadena utilizando nucleótidos modificados

La síntesis enzimática de un oligonucleótido que comprende nucleótidos modificados de estructura 9 en su secuencia se realizó en un volumen de 10 μ l utilizando el molde de una cadena D56 (SEQ ID NO: 1) y el cebador LHAb (SEQ ID NO: 2; una cadena poliA unida al extremo 5' del cebador permite discriminar del molde del producto por la masa) en un proceso PER. Se preparó la mezcla de reacción, que contenía D56 a una concentración de 2 μ M, LHAb a una concentración de 4 μ M, 0,5 U de polimerasa Pwo, 1x tampón concentrado con magnesio suministrado por el proveedor de polimerasa, agua desionizada y nucleótidos trifosfatos: dATP, dCTP y dGTP a una concentración final de 200 μ M cada uno. El control negativo (muestra N) no contenía ningún otro nucleótido, el control positivo (muestra P) contenía adicionalmente TTP a una concentración de 100 μ M y la muestra de prueba (muestra T) contenía adicionalmente el nucleótido de estructura 9 (preparado como en el ejemplo 2) en una dilución de 10 veces. Las mezclas de reacción se incubaron durante un minuto a 95 °C, dos minutos a 50 °C y 30 minutos a 70 °C. Después de la reacción, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poli(acrilamida) al 10 % desnaturante (urea 7 M) (acrilamida 19:1 bis-acrilamida) calentado a 55 °C con voltaje constante de 300 V. El gel se visualizó utilizando colorante verde de Midori (Nippon Genetics), figura 5.

Se llevaron a cabo experimentos análogos para los nucleótidos de las estructuras 6-8 confirmando su incorporación

apropiada en el ADN mediante reacción PER. La obtención del producto también se confirmó con otra polimerasa, DeepVent(exo-), así como con moldes diferentes al oligonucleótido D56.

También se confirmó la capacidad de síntesis de ADN por la polimerasa Pwo en un molde biotinilado inmovilizado sobre microperlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, en concordancia con informes anteriores [9].

Ejemplo 4: Síntesis enzimática de una biblioteca de ADN de una cadena que comprende nucleótidos modificados en su región aleatoria

La síntesis de biblioteca de ADN de una cadena se realizó con reacción PER de forma análoga al ejemplo 3, con cambios explícitos: se utilizó la biblioteca no modificada (SEQ ID NO: 3) como molde, se utilizó el cebador L4 como cebador (SEQ ID NO: 4).

La biblioteca de una cadena que comprende el nucleótido o los nucleótidos modificados de las estructuras 6, 7, 8 o 9 se preparó mediante la separación de las cadenas del producto de doble cadena utilizando microperlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, en concordancia con informes anteriores [9], y su la pureza se evaluó mediante electroforesis (como en el ejemplo 3).

Otro procedimiento para obtener la biblioteca de una cadena que comprende el nucleótido o los nucleótidos modificados de las estructuras 6, 7, 8 o 9 es separar las cadenas del producto de doble cadena en un gel de poli(acrilamida al 10 % desnaturizante (urea 7 M) (acrilamida 19:1 bis-acrilamida) calentado a 55 °C con voltaje constante de 300 V. El gel se visualizó utilizando colorante verde de Midori, a continuación, se cortaron las bandas correspondientes a la cadena modificada y se sometieron a un procedimiento de purificación según protocolos estándar.

Ejemplo 5: Síntesis enzimática de ADN de una cadena no modificado utilizando un molde que comprende nucleótidos modificados en su secuencia

Utilizando un oligonucleótido de una cadena purificado complementario de la SEQ ID NO: 1 como molde que comprendía nucleótidos modificados de estructura 6 en su secuencia (preparado como en el ejemplo 3 y purificado a partir de un gel de poli(acrilamida según los protocolos estándar), se realizó la síntesis enzimática de ADN de una cadena sin modificar (el producto de la reacción es un oligonucleótido D56 reconstruido de SEQ ID NO: 1). La reacción se realizó en 20 µl utilizando un molde descrito anteriormente y un cebador L4 (SEQ ID NO: 4) en un proceso PER. Se preparó la mezcla de reacción, que contenía el molde a una concentración de 0,1 a 2,0 µM, L4 a una concentración de 2 a 5 µM, 1 U de polimerasa DeepVent o 1 U de polimerasa Pwo, tampón concentrado 1x suministrado por el proveedor de polimerasa (adecuado a la polimerasa utilizada), sulfato de magnesio a 2,0 mM, nucleótidos trifosfatos TTP, dATP, dCTP y dGTP a una concentración final de 400 µM cada uno, y agua desionizada. El control negativo (muestra N) no se sometió a incubación (se incubó a 4 °C). La muestra de prueba 1 (muestra T1) se incubó durante un minuto a 95 °C, un minuto a 50 °C y 60 minutos a 70 °C. La muestra de prueba 2 (muestra T2) se sometió a 10 ciclos de incubación: durante un minuto a 95 °C, un minuto a 50 °C y 20 minutos a 70 °C.

Después de la reacción, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poli(acrilamida al 10 % desnaturizante (urea 7 M) (acrilamida 19:1 bis-acrilamida) calentado a 55 °C con un voltaje constante de 300 V. El gel se visualizó utilizando colorante verde de Midori, figura 6.

Se realizaron experimentos análogos con moldes de oligonucleótidos que comprendían nucleótidos modificados de la estructura 7, 8, o 9 en sus secuencias.

Referencias:

1. Famulok, M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9, 324-329.
2. Mayer, G. The Chemical Biology of Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 2.672-2.689.
3. Radom, F.; Jurek, P. M.; Mazurek, M. P.; Otlewski, J.; Jelen, F. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnol. Adv.* 2013.
4. Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992, 355, 564-566.
5. Klug, S. J.; Famulok, M. All you wanted to know about SELEX. *Mol. Biol. Rep.* 1994, 20, 97-107.
6. Gold, L.; Tuerk, C. *Nucleic Acid Ligands* 1995.
7. Capek, P.; Cahová, H.; Pohl, R.; Hocek, M.; Gloeckner, C.; Marx, A. An efficient method for the construction of functionalized DNA bearing amino acid groups through cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by primer extension or PCR. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 2007, 13, 6.196-6.203.
8. Schoetzau, T.; Langner, J.; Moyroud, E.; Roehl, I.; Vonhoff, S.; Klusmann, S. Aminomodified Nucleobases: Functionalized Nucleoside Triphosphates Applicable for SELEX. *Bioconj. Chem.* 2003, 14, 919-926.
9. Vaught, J. D.; Bock, C.; Carter, J.; Fitzwater, T.; Otis, M.; Schneider, D.; Rolando, J.; Waugh, S.; Wilcox, S. K.; Eaton, B. E. Expanding the chemistry of DNA for in vitro selection. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 4.141-4.151.
10. Barbas, C. F.; Kandasamy, S. Functionalized pyrimidine nucleosides and nucleotides and DNA's incorporating

same 2001.

11. Goullain, T.; Sidorov, A.; Mignet, N.; Thorpe, S. J.; Lee, S. E.; Grasby, J. A.; Williams, D. M. Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids. II. Simultaneous incorporation of amino and imidazolyl functionalities by two modified triphosphates during PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 1.898-1.905.

12. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed

Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 210-216.

13. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2002, 41, 2.596-2.599.

14. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* 2003, 8, 1.128-1.137.

15. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.

Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2001, 40, 2.004-2.021.

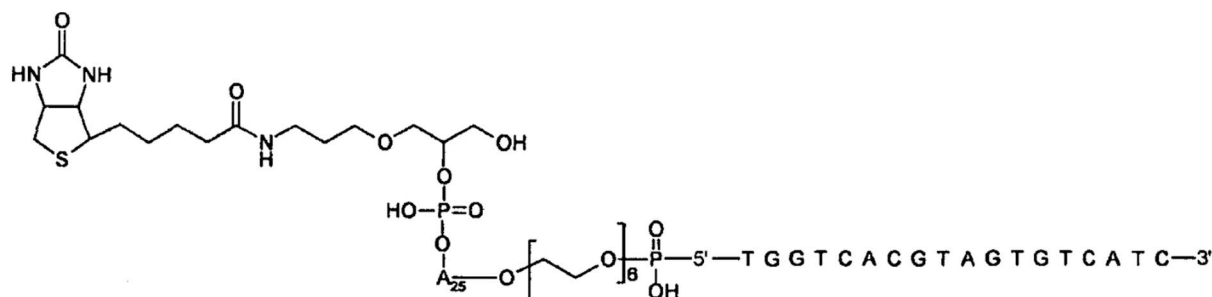
16. Hollenstein, M. Synthesis of deoxynucleoside triphosphates that include proline, urea, or sulfonamide groups and their polymerase incorporation into DNA. *Chem. Wein. Bergstr. Ger.* 2012, 18, 13.320-13.330.

Lista de secuencias:

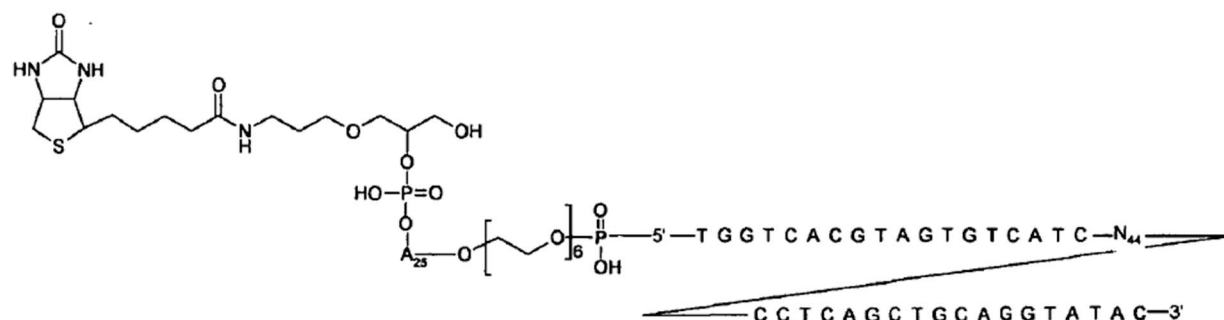
SEQ ID NO: 1 - D56



SEQ ID NO: 2 - Cebador LHAb



SEQ ID NO: 3 - Biblioteca

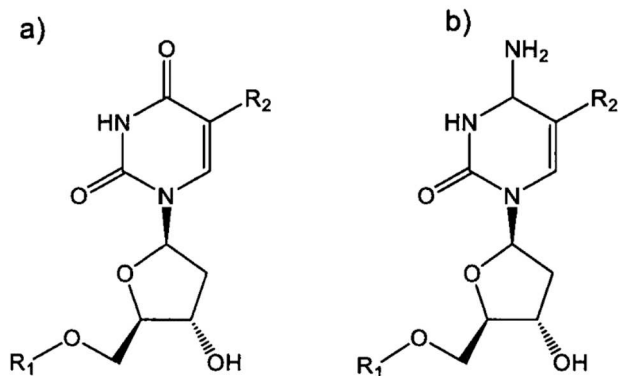


SEQ ID NO: 4 - Cebador L4

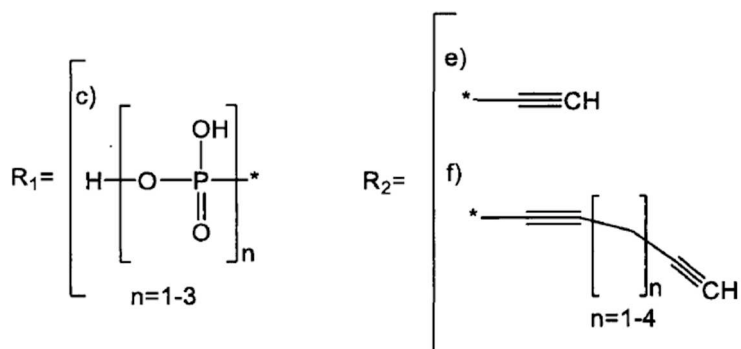
5'-GTATACCTGCAGCTGAGG-3'

REIVINDICACIONES

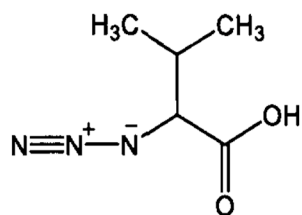
1. Procedimiento de síntesis y purificación de un nucleótido que es un monofosfato, difosfato o trifosfato, **caracterizado por que** se realiza una reacción de cicloadición de Huisgen de azida-alquino catalizada por cobre que comprende la utilización de un compuesto de estructura 1:



en las que:

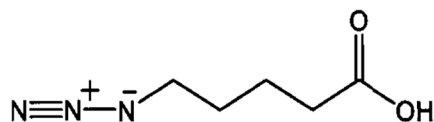


con un compuesto de estructura 2



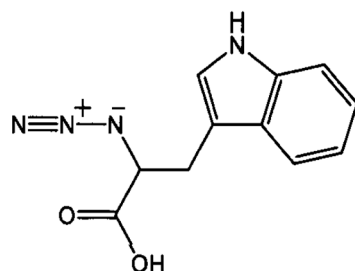
Estructura 2

o con un compuesto de estructura 3



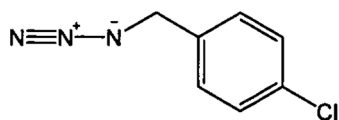
Estructura 3

o con un compuesto de estructura 4



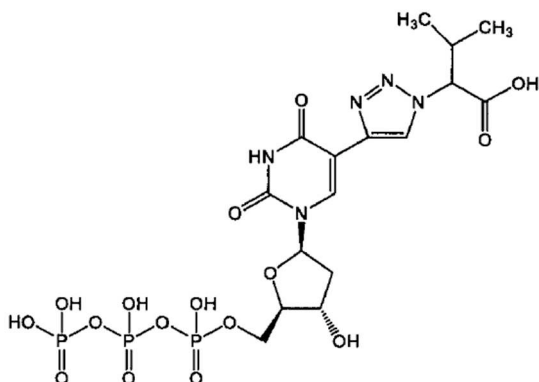
Estructura 4

o con un compuesto de estructura 5



Estructura 5

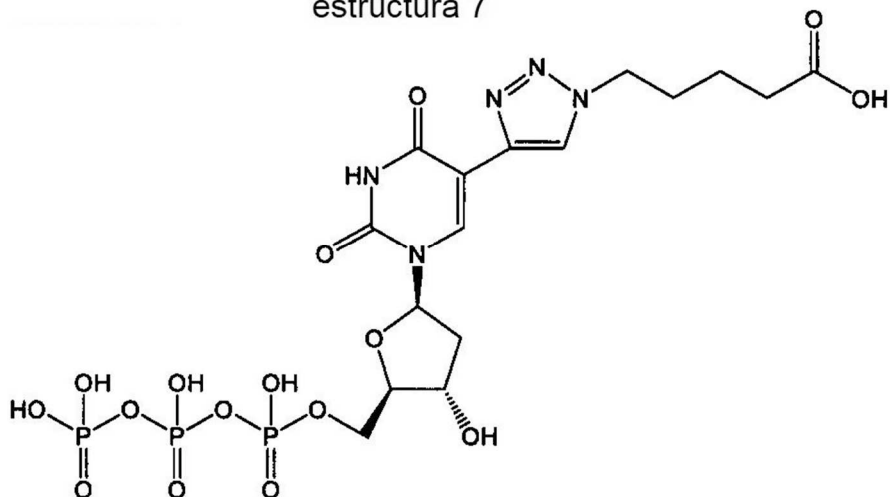
5 en el que los disolventes de la mezcla de reacción comprenden tampón TEAA, es decir, ácido trietilamina-acético, ascorbato de sodio y DMSO, en el que la síntesis se realice a una temperatura de 40 °C durante 2 horas es esencial para la obtención de un compuesto con estructura 6:



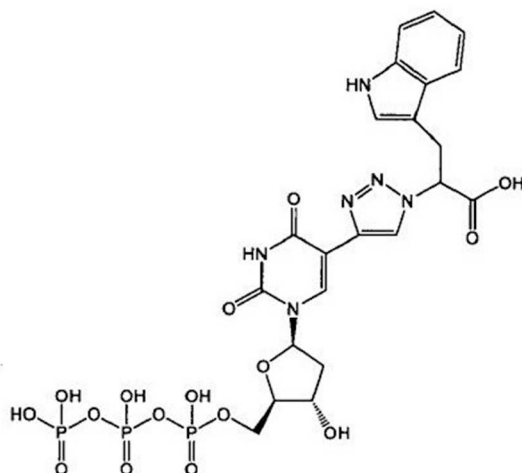
10 a partir de la estructura 2 y a la temperatura de 40-55 °C durante 1-6 horas es esencial para obtener el compuesto con

15

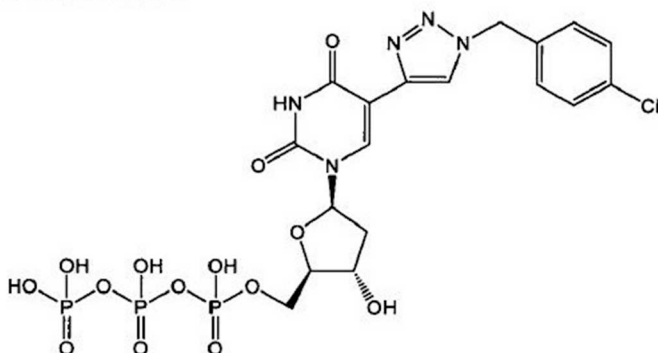
estructura 7



o estructura 8

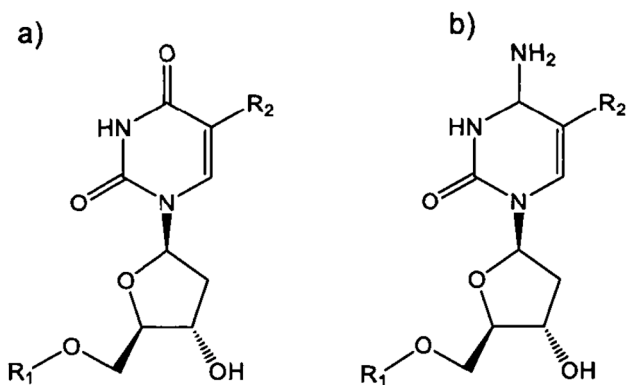


o estructura 9



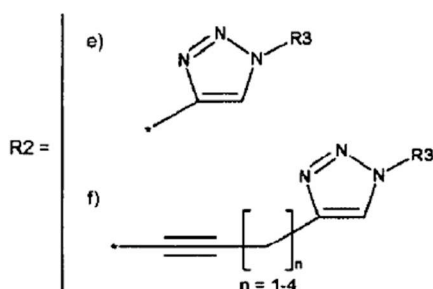
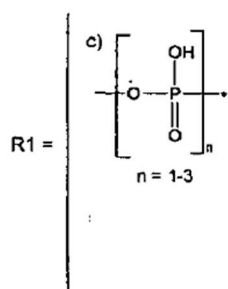
5 a partir de las azidas correspondientes de las estructuras 3-5,
y en el que la purificación directa en una etapa del producto de síntesis se realiza utilizando cromatografía de fase
inversa.

10 2. Nucleótido modificado que es un monofosfato, difosfato o trifosfato, que comprende citosina o uracilo como su
nucleobase, que en la posición 5 del anillo heterocíclico tiene un grupo 1,2,3-triazol o una cadena de alcano o
alquino que tiene un grupo 1,2,3-triazol terminal, y tiene un sustituyente R3 en la posición 1 de dicho grupo
1,2,3-triazol que es un derivado de uno de los compuestos del grupo de estructuras 2 a 5, tal como se define en la
reivindicación 1, y dicho nucleótido modificado es de estructura 10:

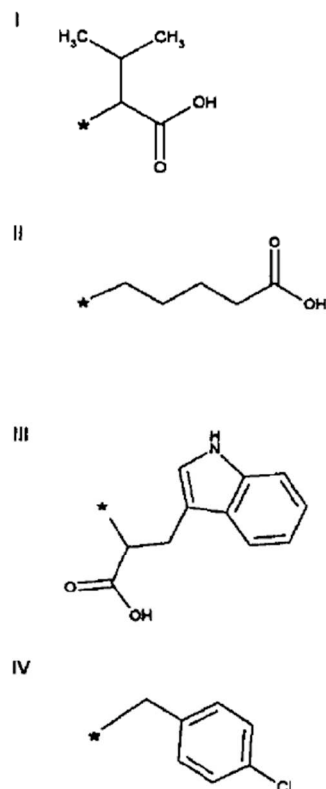


Estructura 10

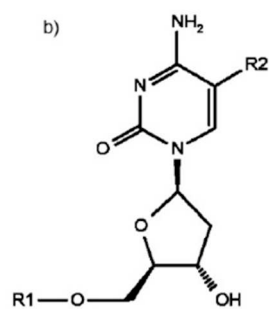
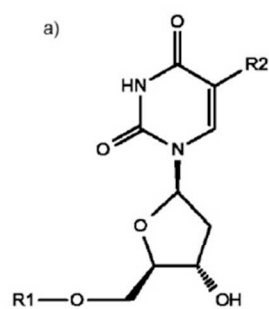
en la que:



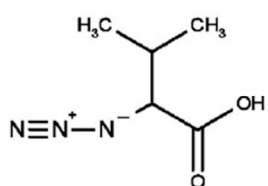
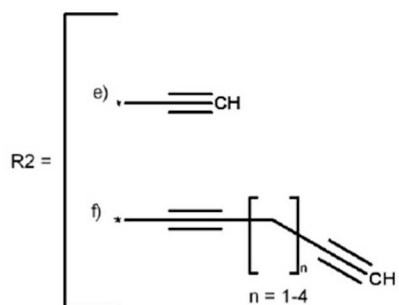
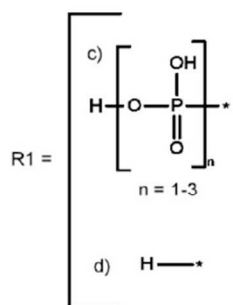
R3 =



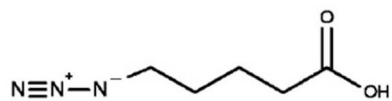
3. Molécula de ADN compuesta por una cadena de ADN de una cadena o doble cadena, **caracterizada por que** comprende en una o más posiciones de la secuencia de cualquiera o ambas cadenas uno o más nucleótidos modificados, según la reivindicación 2.
- 5
4. Molécula de ADN, según la reivindicación 3, **caracterizada por que** la posición de uno o más nucleótidos modificados no está restringida.
- 10
5. Molécula de ADN, según la reivindicación 3 o 4, **caracterizada por que** ha sido preparada mediante una reacción enzimática PCR, PER, o mediante síntesis química de oligonucleótidos.
- 15
6. Biblioteca de oligonucleótidos que comprende en su secuencia una región con una secuencia aleatoria, como mínimo, de 10 nucleótidos de longitud, y dos regiones flanqueantes con secuencias constantes, como mínimo, de 10 nucleótidos de longitud, o carente de las regiones flanqueantes, **caracterizada por que** comprende en una o más posiciones de la secuencia uno o más nucleótidos modificados, según la reivindicación 2.
- 20
7. Biblioteca, según la reivindicación 6, **caracterizada por que** la posición de uno o más nucleótidos modificados en la secuencia no está restringida.
8. Biblioteca, según la reivindicación 6 o 7, **caracterizada por que** ha sido preparada mediante una reacción enzimática PCR, PER, o mediante síntesis química de oligonucleótidos.
- 25
9. Utilización de la biblioteca de oligonucleótidos, según la reivindicación 6 o 7, para producir aptámeros mediante la técnica SELEX o sus derivados.



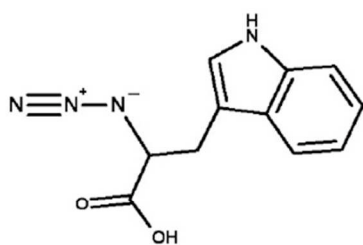
Estructura 1



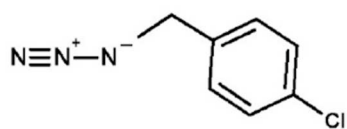
Estructura 2



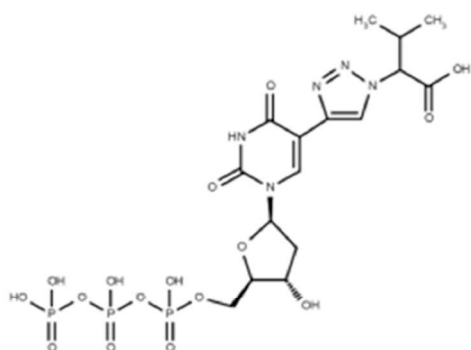
Estructura 3



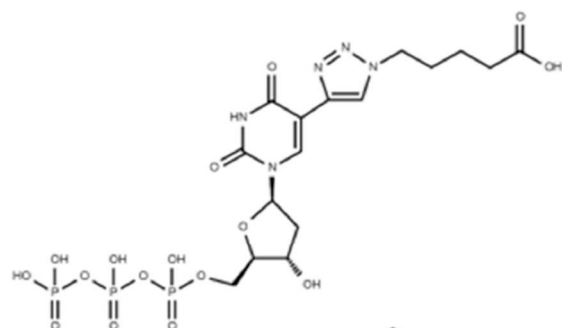
Estructura 4



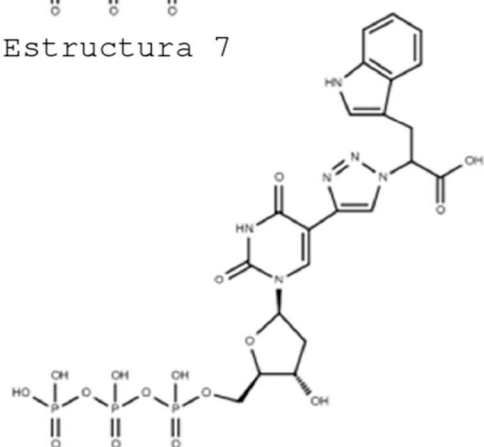
Estructura 5



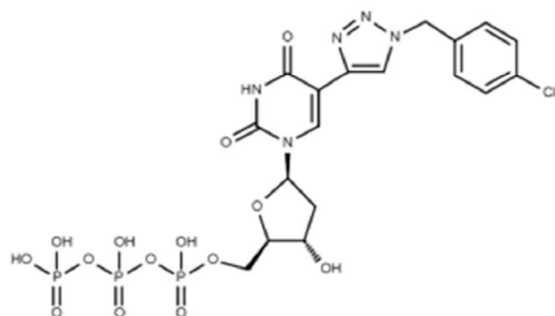
Estrutura 6



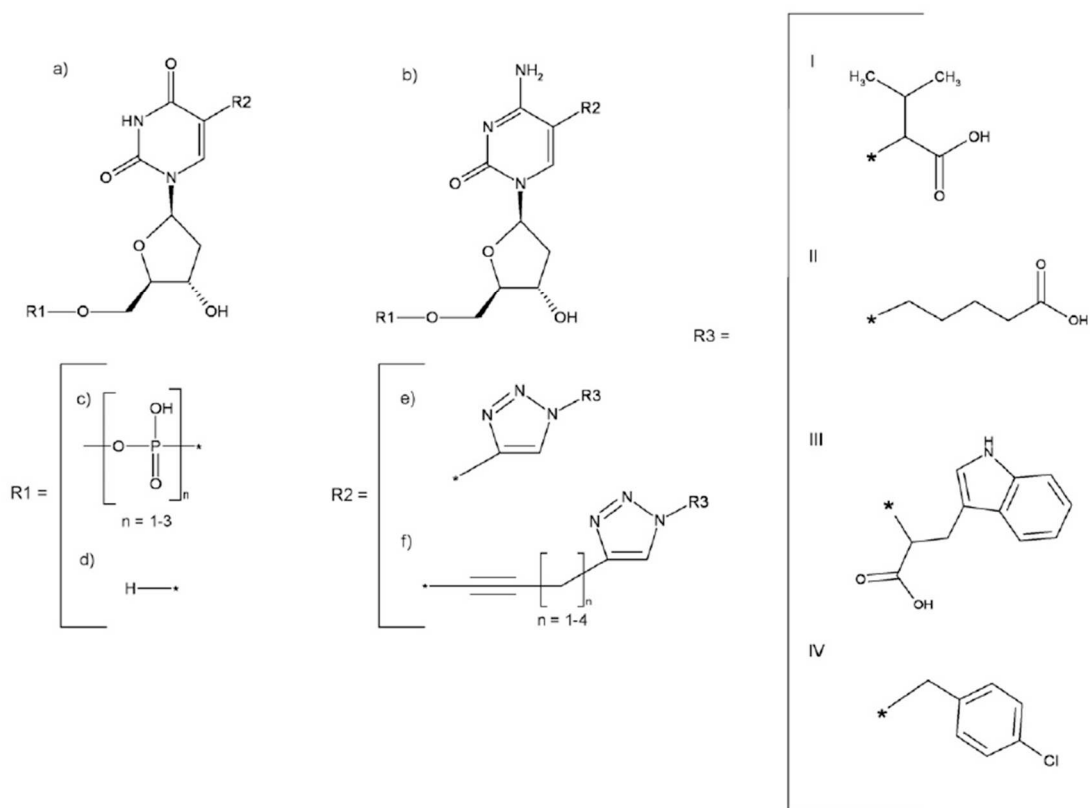
Estrutura 7



Estrutura 8



Estrutura 9



Estructura 10

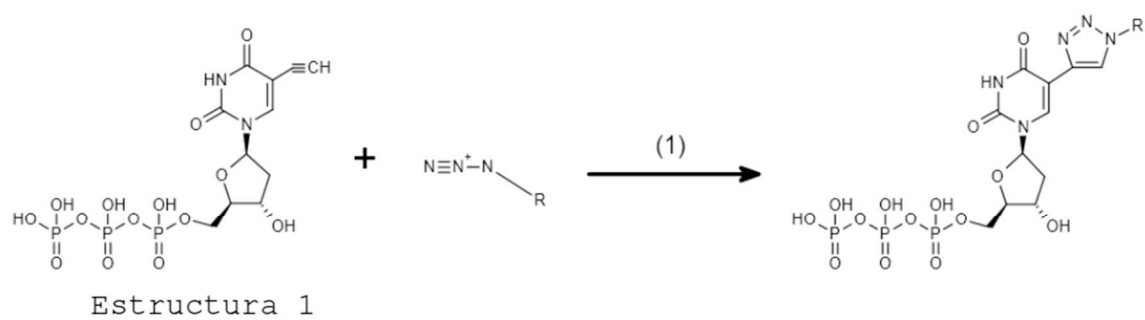


Fig. 1

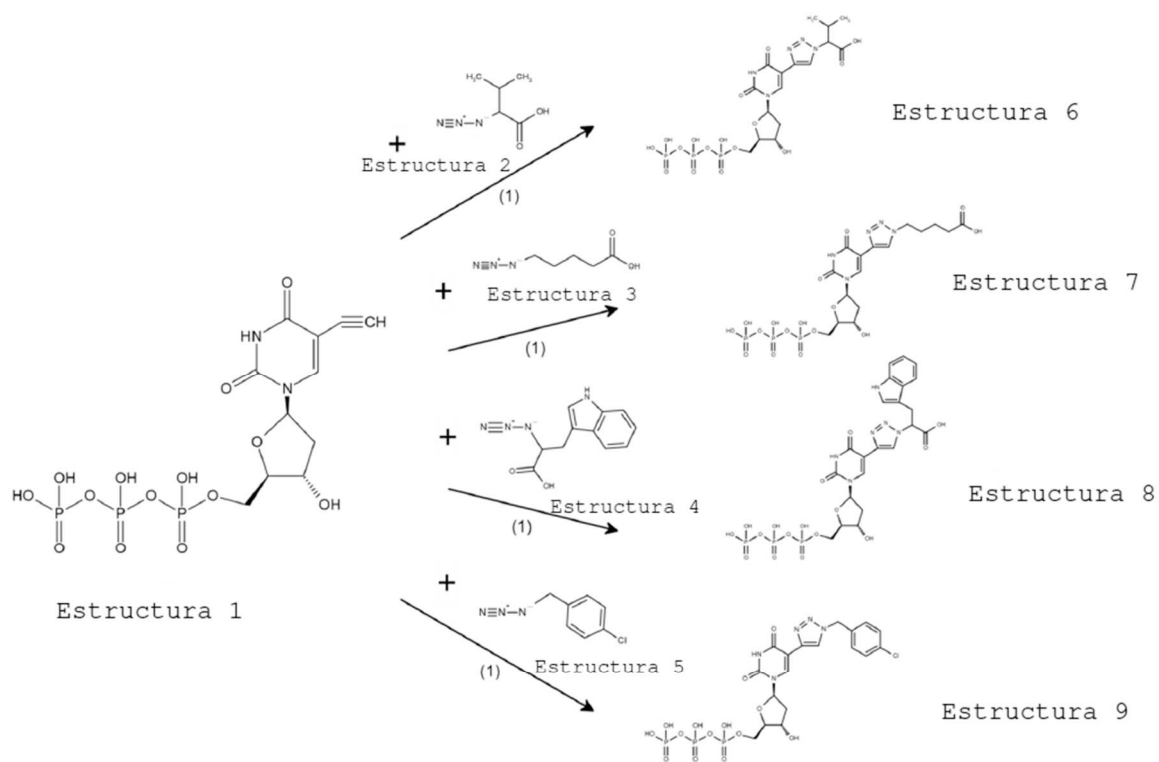


Fig. 2

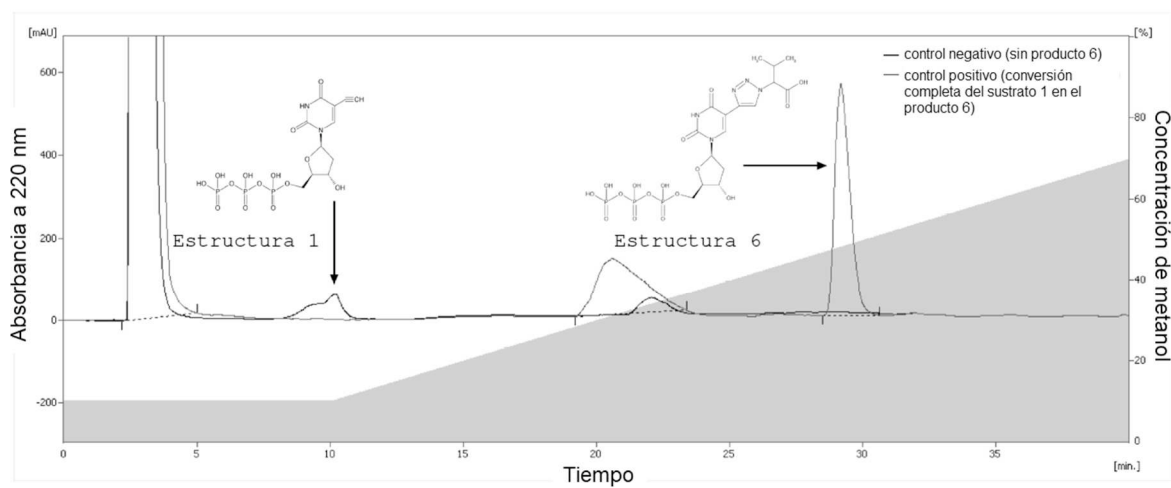


Fig. 3

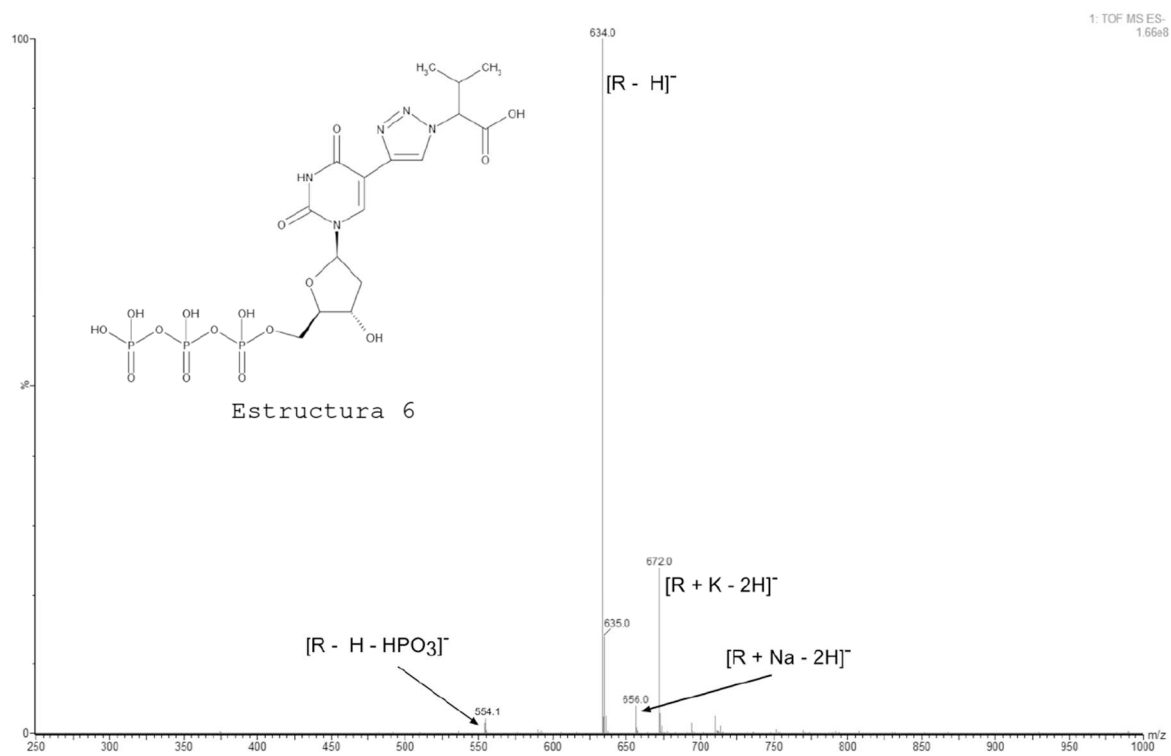


Fig. 4

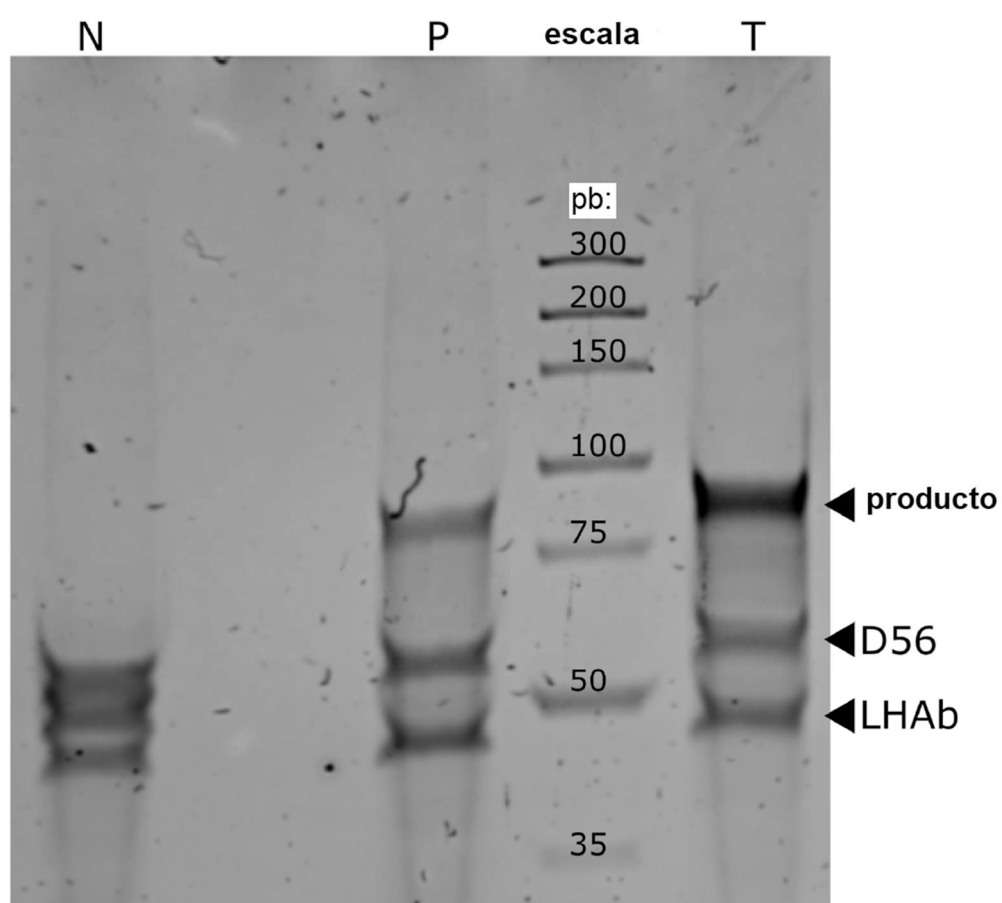


Fig. 5

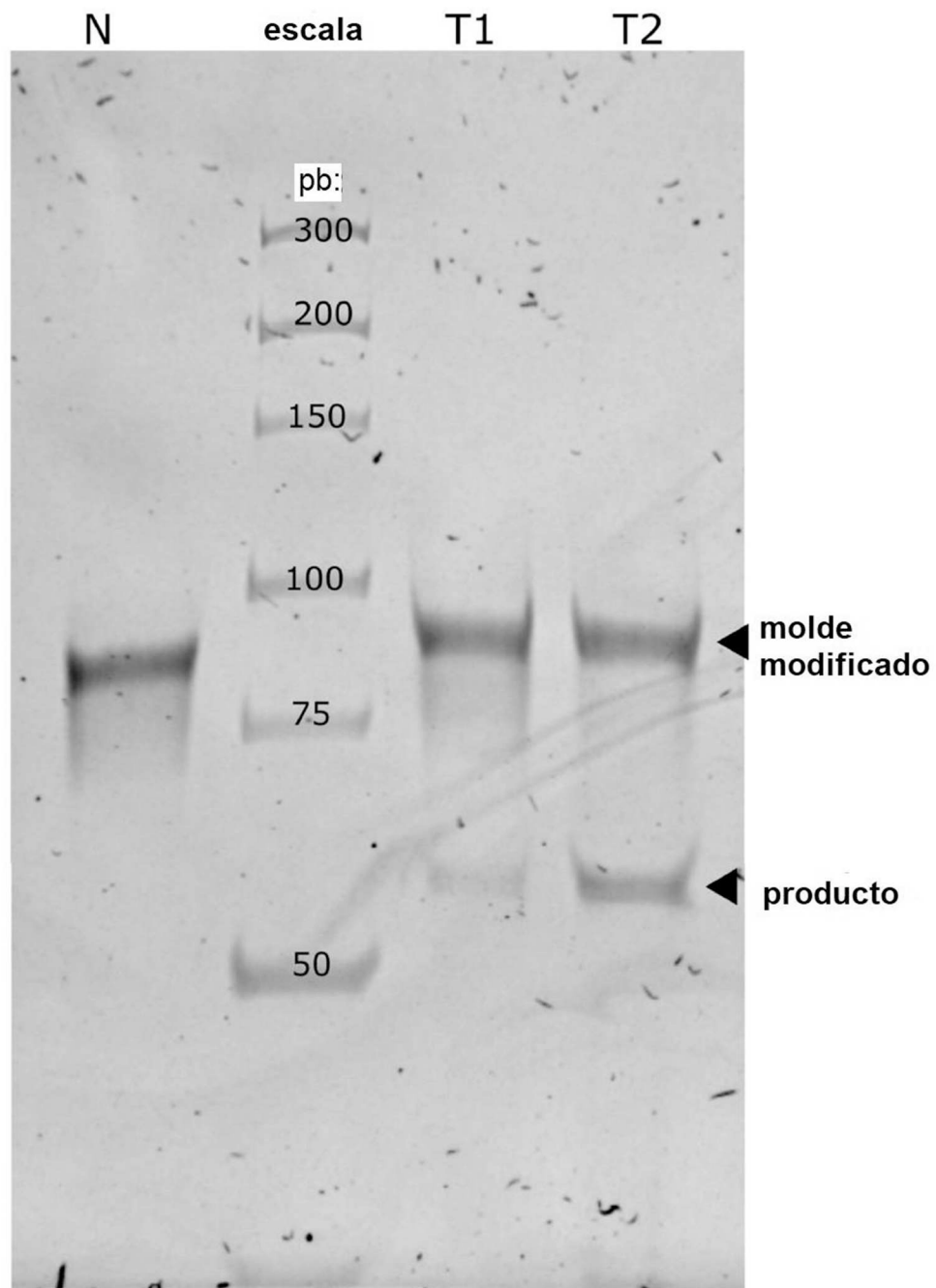


Fig. 6

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

• US 6175001 B

• WO 2009012363 A2

Literatura no patente citada en la descripción

- **VAUGHT et al.** Expanding the chemistry of DNA for in vitro selection. *JACS*, 2010, vol. 132, 4141-4151
- **MARCEL HOLLENSTEIN.** Synthesis of Deoxynucleoside Triphosphates that Include Proline, Urea, or Sulfonamide Groups and Their Polymerase Incorporation into DNA. *Chem. Eur. J.*, 2012, vol. 18, 13320-13330
- Design, Synthesis, and Polymerase-Catalyzed Incorporation of Click-Modified Boronic Acid- TTP Analogues. *CHEMISTRY -AN ASIAN JOURNAL*, 2011, vol. 6, 2747-2752
- A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers. *ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION*, 23 July 2015, vol. 54 (37), 10971-10974 |
- Site-Specifically Arraying Small Molecules or Proteins on DNA Using An Expanded Genetic Alphabet. *CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL*, 11 October 2013, vol. 19 (42), 14205-14209
- C5-Modified nucleosides exhibiting anticancer activity. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, 15 August 2009, vol. 19 (16), 4688-4691
- A 2'-deoxycytidine long-linker click adduct forming two conformers in the asymmetric unit. *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA, SECTION C: CRYSTAL STRUCTURE COMMUNICATIONS*, 2012, vol. 68 (4), 1-17
- AZIDOPROPYL VINYL SULFONAMIDE AS A NEW BIFUNCTIONAL CLICK REAGENT FOR BIOORTHOGONAL CONJUGATIONS: APPLICATION FOR DNA-PROTEIN CROSS-LINKING. *CHEMISTRY-A EUROPEAN JOJRNAL*, 02 November 2015, vol. 21 (45), 16091-16102
- Cross-Linked DNA: Site-Selective "Click" Ligation in Duplexes with Bis-Azides and Stability Changes Caused by Internal Cross-Links. *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, 01 January 2012, vol. 23 (6), 1230-1243
- **FAMULOK, M.** Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, vol. 9, 324-329
- **MAYER, G.** The Chemical Biology of Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, vol. 48, 2672-2689
- **RADOM, F. ; JUREK, P. M. ; MAZUREK, M. P. ; OTLEWSKI, J. ; JELEN ; F. APTAMERS.** Molecules of great potential. *Biotechnol. Adv.*, 2013
- **BOCK, L. C. ; GRIFFIN, L. C. ; LATHAM, J. A. ; VERMAAS, E. H. ; TOOLE, J. J.** Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 1992, vol. 355, 564-566
- **KLUG, S. J. ; FAMULOK, M.** All you wanted to know about SELEX. *Mol. Biol. Rep.*, 1994, vol. 20, 97-107
- **GOLD, L. ; TUERK, C.** *Nucleic Acid Ligands*, 1995
- **CAPEK, P. ; CAHOVÁ, H. ; POHL, R. ; HOCEK, M. ; GLOECKNER, C. ; MARX, A.** An efficient method for the construction of functionalized DNA bearing amino acid groups through cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by primer extension or PCR. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, 2007, vol. 13, 6196-6203
- **SCHOETZAU, T. ; LANGNER, J. ; MOYROUD, E. ; ROEHL, I. ; VONHOFF, S. ; KLUSSMANN, S.** Aminomodified Nucleobases: Functionalized Nucleoside Triphosphates Applicable for SELEX. *Bioconjug. Chem.*, 2003, vol. 14, 919-926
- **VAUGHT, J. D. ; BOCK, C. ; CARTER, J. ; FITZWATER, T. ; OTIS, M. ; SCHNEIDER, D. ; ROLANDO, J. ; WAUGH, S. ; WILCOX, S. K. ; EATON, B. E.** Expanding the chemistry of DNA for in vitro selection. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, vol. 132, 4141-4151 [0042]
- **BARBAS, C. F. ; KANDASAMY, S.** *Functionalized pyrimidine nucleosides and nucleotides and DNA's incorporating same*, 2001
- **GOURLAIN, T. ; SIDOROV, A. ; MIGNET, N. ; THORPE, S. J. ; LEE, S. E. ; GRASBY, J. A. ; WILLIAMS, D. M.** Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids. II. Simultaneous incorporation of amino and imidazolyl functionalities by two modified triphosphates during PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, 1898-1905

- **HIMO, F. ; LOVELL, T. ; HILGRAF, R. ; ROSTOVTSEV, V. V. ; NOODLEMAN, L. ; SHARPLESS, K. B. ; FOKIN, V. V.** Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, 210-216
- **ROSTOVTSEV, V. V. ; GREEN, L. G. ; FOKIN, V. V. ; SHARPLESS, K. B.** A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2002, vol. 41, 2596-2599
- **KOLB, H. C. ; SHARPLESS, K. B.** The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today*, 2003, vol. 8, 1128-1137
- **KOLB, H. C. ; FINN, M. G. ; SHARPLESS, K. B.** Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2001, vol. 40, 2004-2021
- **HOLLENSTEIN, M.** Synthesis of deoxynucleoside triphosphates that include proline, urea, or sulfonamide groups and their polymerase incorporation into DNA. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, 2012, vol. 18, 13320-13330