



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2558577 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/10 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.05.20
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.12.12
(86)	European Application Nr.	11720372.9
(86)	European Filing Date	2011.04.16
(87)	The European Application's Publication Date	2013.02.20
(30)	Priority	2010.04.16, DK, 201070149 2010.04.16, US, 325160 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
	Designated Extension States:	BA; ME
(73)	Proprietor	Nuevolution A/S, Rønnegade 8, 5., 2100 Copenhagen Ø, Danmark
(72)	Inventor	GOULIAEV, Alex, Haahr, Brøndsted 223, 3670 Veksø Sjælland, Danmark FRANCH, Thomas, Tjørnevej 26, 3070 Snekkersten, Danmark GODSKESEN, Michael, Anders, Plantagekrogen 8, 2950 Vedbæk, Danmark JENSEN, Kim, Birkebæk, Voldumvej 30C, 2610 Rødovre, Danmark
(74)	Agent or Attorney	Jesper Levin A/S, Postboks 40, 2900 HELLERUP, Danmark

(54)	Title	BIFUNKSJONELLE KOMPLEKSER OG FRAMGANGSMÅTER FOR Å FRAMSTILLE OG BRUKE SLIKE KOMPLEKSER
(56)	References Cited:	US-A1- 2009 264 300 EP-B1- 1 828 381

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Framgangsmåte for syntese av et bifunksjonelt kompleks som omfatter en molekylidel og en identifikator-oligonukleotid-del som identifiserer molekyliden, der framgangsmåten omfatter trinnene

5

- i) å tilveiebringe en fast bærer,
- ii) å tilveiebringe et opsjonelt beskyttet første identifikator-oligonukleotid-merke (tag) som omfatter et sted for kjemisk reaksjon som er i stand til å reagere med en første reaktiv forbindelsesbyggestein, og i stand til å
- 10 reagere med en ytterligere reaktiv forbindelsesbyggestein,
- iii) å tilveiebringe en første reaktiv forbindelsesbyggestein, der det første identifikator-oligonukleotid-merket identifiserer den første reaktive forbindelsesbyggesteinen,

15

- iv) å kovalent binde det første identifikator-oligonukleotid-merket til den faste bæreren,

- v) å reagere den første reaktive forbindelsesbyggesteinen i et organisk løsemiddel med stedet for kjemisk reaksjon hos det første identifikator-oligonukleotid-merket som identifiserer den første reaktive forbindelsesbyggesteinen,

20

- der det første identifikator-oligonukleotid-merket er kovalent bundet til den faste bæreren når den første reaktive forbindelsesbyggesteinen reagerer med stedet for kjemisk reaksjon hos det første identifikator-oligonukleotid-merket,

- der reaksjonen mellom den første reaktive forbindelsesbyggesteinen og det første identifikator-oligonukleotid-merket genererer et første mellomliggende bifunksjonelt kompleks som omfatter en første molekylidel og et opsjonelt beskyttet første identifikator-oligonukleotid-merke som er kovalent bundet til den faste bæreren,

25

- v) å reagere det første mellomliggende bifunksjonelle komplekset

30

- oppnådd i trinn v) i et organisk løsemiddel med en andre reaktive forbindelsesbyggestein i fravær av et andre identifikator-oligonukleotid-merke som identifiserer den andre reaktive forbindelsesbyggesteinen,

der det første mellomliggende bifunksjonelle komplekset er kovalent bundet til den faste bæreren når den andre reaktive forbindelsesbyggesteinen reagerer med stedet for kjemisk reaksjon og/eller reagerer med den første molekyldelen hos det første mellomliggende bifunksjonelle komplekset,

der reaksjonen mellom den andre reaktive forbindelsesbyggesteinen og det første mellomliggende bifunksjonelle komplekset genererer et andre mellomliggende bifunksjonelt kompleks som er kovalent bundet til den faste bæreren,

vii) å spalte det andre mellomliggende bifunksjonelle komplekset oppnådd i trinn vi) fra den faste bæreren, og

viii) å enzymatisk ligere det første identifikator-oligonukleotid-merket hos det andre mellomliggende bifunksjonelle komplekset som er spaltet fra den faste bæreren, i løsning til et andre identifikator-oligonukleotid-merke som identifiserer den andre reaktive forbindelsesbyggesteinen,

der den enzymatiske ligasjonen av det første og det andre identifikator-oligonukleotid-merket genererer et tredje mellomliggende bifunksjonelt kompleks som omfatter en molekyldel og en identifikator-oligonukleotid-del som identifiserer molekyldelen.

20

2. Framgangsmåte ifølge krav 1, der en flerhet faste bærere er tilveiebrakt i trinn i), og en flerhet første identifikator-oligonukleotid-merker er tilveiebrakt i trinn ii), og en flerhet første reaktive forbindelsesbyggesteiner er tilveiebrakt i trinn iii), og reageres i trinn iv) i samme eller ulike reaksjonskammer, slik at det i hvert reaksjonskammer genereres en flerhet samme eller ulike første mellomliggende bifunksjonelle komplekser.

3. Framgangsmåte ifølge krav 2, der ulike, opsjonelt beskyttede første identifikator-oligonukleotid-merker og/eller ulike første reaktive forbindelsesbyggesteiner er tilveiebrakt i ulike reaksjonskammer.

30

- 4.** Framgangsmåte ifølge et av kravene 2 til 3, der ulike første mellomliggende bifunksjonelle komplekser oppnås i ulike reaksjonskammer.
- 5.** Framgangsmåte ifølge krav 4, der de ulike første mellomliggende bifunksjonelle kompleksene deretter blandes i det samme reaksjonskammeret.
- 6.** Framgangsmåte ifølge krav 1, der faste bærere er kovalent bundet til første reaktive forbindelsesbyggesteiner og/eller kovalent bundet til første identifikator-oligonukleotid-merker ved hjelp av en selektivt spaltbar første forbindermoietet som er i stand til å kovalent binde første identifikator-oligonukleotid-merker og/eller de første reaktive forbindelsesbyggesteinene til en fast bærer, og der første reaktive forbindelsesbyggesteiner er kovalent bundet til første identifikator-oligonukleotid-merker ved hjelp av en andre forbindermoietet som er i stand til å kovalent binde første reaktive forbindelsesbyggesteiner og første identifikator-oligonukleotid-merker.
- 7.** Framgangsmåte ifølge krav 6, der den selektivt spaltbare forbinderen som er dannet mellom den faste bæreren og det første identifikator-oligonukleotid-merket eller den første reaktive forbindelsesbyggesteinen, er dannet ved å reagere én eller flere reaktive grupper hos den første forbindermoieteten med én eller flere reaktive grupper hos et første identifikator-oligonukleotid-merke og/eller én eller flere reaktive grupper hos en første reaktiv forbindelsesbyggestein.
- 8.** Framgangsmåte ifølge krav 6, der den kovalente forbinderen som er dannet mellom det første identifikator-oligonukleotid-merket og den første reaktive forbindelsesbyggesteinen, er dannet ved å reagere én eller flere reaktive grupper hos det første identifikator-oligonukleotid-merket og én eller flere reaktive grupper hos den første reaktive forbindelsesbyggesteinen, der reaksjonene danner én eller flere andre forbindermoieteter som forbinder det første identifikator-oligonukleotid-merket med den første reaktive forbindelsesbyggesteinen.

- 9.** Framgangsmåte ifølge krav 1, som omfatter de ytterligere trinnene å reagere, samtidig eller i rekkefølge, de tredje mellomliggende bifunksjonelle
- 5 kompleksene med ytterligere reaktive forbindelsesbyggesteiner og ytterligere oligonukleotid-merker som identifiserer de ytterligere reaktive forbindelsesbyggesteinene.
- 10.** Framgangsmåte ifølge krav 1, der framgangsmåten omfatter det ytterligere
- 10 trinnet å tilveiebringe en flerhet første og/eller andre beskyttelsesgrupper for å beskytte reaktive grupper hos reaktive forbindelser eller oligonukleotid-merker i en første eller etterfølgende reaksjonssyklus.
- 11.** Framgangsmåte ifølge krav 1, som omfatter de ytterligere trinnene å utføre
- 15 én eller flere ytterligere reaksjonssykluser, der, i hver reaksjonssyklus, tredje eller ytterligere mellomliggende bifunksjonelle komplekser reageres, samtidig eller i rekkefølge, med en flerhet ytterligere reaktive forbindelsesbyggesteiner og en flerhet ytterligere oligonukleotid-merker som identifiserer de ytterligere reaktive forbindelsesbyggesteinene, der, etter hver ytterligere reaksjonssyklus,
- 20 en flerhet mellomliggende eller endelige bifunksjonelle komplekser genereres, der hvert bifunksjonelle kompleks omfatter et molekyl og en oligonukleotid-identifikator som identifiserer molekylet.
- 12.** Framgangsmåte ifølge krav 1, der steder for kjemisk reaksjon hos det tredje
- 25 bifunksjonelle komplekset reagerer én eller flere ganger med én eller flere ytterligere reaktive forbindelsesbyggesteiner, og der stedet for oligonukleotid-merke-addisjon reagerer ved hjelp av en enzymkatalysert reaksjon med de respektive oligonukleotid-merkene som identifiserer byggesteinene, der rekkefølgen av oligonukleotid-merkene hos identifikator-oligonukleotidet hos et
- 30 endelig bifunksjonelt kompleks brukes til å bestemme de reaktive forbindelsesbyggesteinene som har deltatt i dannelsen av molekylet.

13. Framgangsmåte ifølge krav 1, der flerheten tredje mellomliggende bifunksjonelle komplekser omfatter

5

a) et molekyl og en oligonukleotid-identifikator som omfatter en flerhet oligonukleotid-merker som identifiserer reaktive forbindelsesbygggesteiner som har deltatt i syntesen av molekylet,

10

b) ett eller flere steder for kjemisk reaksjon omfatter én eller flere reaktive grupper, og

c) ett eller flere merkeaddisjonssteder for enzymatisk addisjon av et oligonukleotid-merke,

der framgangsmåten omfatter de ytterligere trinnene

15

i) å tilveiebringe en flerhet tredje reaktive forbindelsesbygggesteiner som hver omfatter én eller flere reaktive forbindelsesbygggesteiner og én eller flere reaktive grupper, der hver tredje reaktive forbindelsesbygggestein er i stand til å reagere med

20

ett eller flere steder for kjemisk reaksjon hos et tredje mellomliggende bifunksjonelt kompleks, og/eller én eller flere reaktive grupper hos en ytterligere tredje reaktiv forbindelsesbygggestein som omfatter én eller flere reaktive forbindelsesbygggesteiner,

25

der den ytterligere tredje reaktive forbindelsesbygggesteinen tilveiebringes samtidig eller i en hvilken som helst rekkefølge med den tredje reaktive forbindelsesbygggesteinen, der den tredje og de ytterligere tredje reaktive forbindelsesbygggesteinene er identiske eller ulike reaktive forbindelsesbygggesteiner,

30

- ii) å tilveiebringe en flerhet tredje identifikator-oligonukleotid-merker som hvert er i stand til å hybridisere med en del av et tredje komplementært identifikator-oligonukleotid-merke, der hvert tredje identifikator-oligonukleotid-merke identifiserer en tredje reaktiv forbindelsesbyggestein og opsjonelt en ytterligere tredje reaktiv forbindelsesbyggestein,
- iii) å tilveiebringe en flerhet tredje komplementære identifikator-oligonukleotid-merker som hvert er i stand til å hybridisere med minst en del av et tredje identifikator-oligonukleotid-merke som er tilveiebrakt i trinn ii), og med minst en del av oligonukleotid-identifikatoren hos et tredje mellomliggende bifunksjonelt kompleks,
- iv) å reagere hver av de tredje reaktive forbindelsesbyggesteinene som er tilveiebrakt i trinn i), med det ene eller flere stedene for kjemisk reaksjon hos de tredje mellomliggende bifunksjonelle kompleksene og/eller med den ene eller flere reaktive gruppene hos en ytterligere tredje reaktiv forbindelsesbyggestein som omfatter én eller flere reaktive forbindelsesbyggesteiner,
- der reaksjonen mellom komplementære reaktive grupper fører til at det dannes en kovalent binding, og
- der én eller flere reaksjoner mellom reaktive grupper i trinn iv) fører til at det dannes én eller flere kovalente bindinger mellom det ene eller flere stedene for kjemisk reaksjon hos de tredje mellomliggende bifunksjonelle kompleksene og minst én reaktiv forbindelsesbyggestein av minst én reaktiv forbindelsesbyggestein valgt fra gruppen som består av en tredje reaktiv forbindelsesbyggestein og en ytterligere tredje reaktiv forbindelsesbyggestein,
- v) å hybridisere komplementære identifikator-oligonukleotid-merker med tredje mellomliggende bifunksjonelle komplekser og med tredje identifikator-oligonukleotid-merker,
- der framgangsmåtens trinn iv) og v) er samtidige eller i en hvilken som helst rekkefølge,

- vi) å enzymatisk ligere tredje mellomliggende bifunksjonelle komplekser og tredje identifikator-oligonukleotid-merker, slik at det genereres et
- 5 ytterligere mellomliggende bifunksjonelt kompleks,
- vii) å dele flerheten ytterligere mellomliggende bifunksjonelle komplekser oppnådd i trinn vi) i en flerhet ulike kammer,
- viii) å tilveiebringe i hvert ulike kammer en flerhet ulike fjerde reaktive forbindelsesbygggesteiner som hver omfatter én eller flere reaktive
- 10 forbindelsesbygggesteiner og én eller flere reaktive grupper som er i stand til å reagere med
- det ene eller flere stedene for kjemisk reaksjon hos et ytterligere mellomliggende bifunksjonelt kompleks oppnådd i trinn vi), og/eller én eller flere reaktive grupper hos én eller flere reaktive
- 15 forbindelsesbygggesteiner som har reagert i en tidligere synteserunde, og/eller
- én eller flere reaktive grupper hos en ytterligere fjerde reaktiv forbindelsesbygggestein som omfatter én eller flere reaktive forbindelsesbygggesteiner,
- 20 der de ytterligere fjerde reaktive forbindelsesbygggesteinene tilveiebringes samtidig eller i en hvilken som helst rekkefølge med de fjerde reaktive forbindelsesbygggesteinene,
- der den fjerde og de ytterligere fjerde reaktive forbindelsesbygggesteinene er identiske eller ulike reaktive forbindelsesbygggesteiner,
- 25 ix) å tilveiebringe i hvert ulike kammer en flerhet fjerde identifikator-oligonukleotid-merker som hvert er i stand til å hybridisere med en del av et fjerde komplementært identifikator-oligonukleotid-merke, der ulike fjerde identifikator-oligonukleotid-merker er tilveiebrakt i hvert ulike kammer, og der hvert ulike fjerde identifikator-oligonukleotid-merke
- 30 identifiserer en ulike fjerde reaktiv forbindelsesbygggestein og opsjonelt en ytterligere fjerde reaktiv forbindelsesbygggestein,

5 x) å tilveiebringe i hvert ulike kammer en flerhet fjerde komplementære
 identifikator-oligonukleotid-merker som er i stand til å hybridisere med en
 del av et tredje identifikator-oligonukleotid-merke som er tilveiebrakt i
 trinn ii), og med en del av et fjerde identifikator-oligonukleotid-merke som
 er tilveiebrakt i trinn ix),
 10 xi) å reagere, i hvert ulike kammer, hver av de ulike fjerde reaktive
 forbindelsesbygggesteinene som er tilveiebrakt i trinn viii), med det ene
 eller flere stedene for kjemisk reaksjon hos et ytterligere tredje
 mellomliggende bifunksjonelt kompleks og/eller én eller flere reaktive
 grupper hos én eller flere reaktive forbindelsesbygggesteiner som har
 reagert i en tidligere synteserunde og/eller én eller flere reaktive grupper
 15 hos en ytterligere fjerde reaktiv forbindelsesbygggestein som omfatter én
 eller flere reaktive forbindelsesbygggesteiner,
 der den ene eller flere reaksjonene fører til at det dannes ulike
 bifunksjonelle komplekser i hvert ulike kammer,
 der reaksjonen mellom komplementære reaktive grupper fører til at det
 20 dannes én eller flere kovalente bindinger, og
 der reaksjoner mellom én eller flere reaktive grupper i trinn xi) fører til
 at det dannes én eller flere kovalente bindinger mellom det ene eller flere
 stedene for kjemisk reaksjon og minst én reaktiv forbindelsesbygggestein
 av minst én reaktiv forbindelsesbygggestein valgt fra gruppen som består
 25 av fjerde reaktive forbindelsesbygggesteiner og ytterligere fjerde reaktive
 forbindelsesbygggesteiner, og/eller
 at det dannes én eller flere kovalente bindinger mellom en reaktiv
 forbindelsesbygggestein som har reagert i en tidligere synteserunde, og
 minst én reaktiv forbindelsesbygggestein av minst én reaktiv
 30 forbindelsesbygggestein valgt fra gruppen som består av fjerde reaktive
 forbindelsesbygggesteiner og ytterligere fjerde reaktive
 forbindelsesbygggesteiner,

xii) å hybridisere komplementære oligonukleotid-identifikator-merker med tredje identifikator-oligonukleotid-merker og fjerde identifikator-oligonukleotid-merker i hvert ulike kammer, der framgangsmåten trinn xi) og xii) er samtidige eller i en hvilken som helst rekkefølge, xiii) å enzymatisk ligere, i hvert ulike kammer, tredje og fjerde identifikator-oligonukleotid-merker i fraværet av tredje og fjerde komplementære oligonukleotid-merker for ligasjon, og xiv) å opsjonelt forskyve, i hvert kammer, uligerte komplementære oligonukleotid-merker fra bifunksjonelle komplekser som omfatter et molekyl og en enkelttrådet oligonukleotid-identifikator som omfatter oligonukleotid-merker som identifiserer reaktive forbindelsesbygggesteiner som har deltatt i syntesen av molekylet.

15

14. Framgangsmåte ifølge krav 13, der trinnene vii) til xiii) gjentas én eller flere ganger med bruk av ulike reaktive forbindelsesbygggesteiner og oligonukleotid-merker som identifiserer de ulike reaktive forbindelsesbygggesteinene.

20

15. Framgangsmåte ifølge krav 13, der ulike reaksjonssykluser utføres i parallell i ulike reaksjonskammer, der de samme eller ulike tredje mellomliggende bifunksjonelle kompleksene er tilveiebrakt i hvert av en flerhet separate reaksjonskammer, og der, deretter, i hvert av reaksjonskamrene, den tredje reaktive forbindelsesbygggesteinen og opsjonelt også den ytterligere tredje reaktive forbindelsesbygggesteinen reagerer med det ene eller flere stedene for kjemisk reaksjon, og der, i hvert av kamrene, et tredje identifikator-oligonukleotid-merke som identifiserer den ene eller flere reaktive forbindelsesbygggesteinene, adderes enzymatisk til det ene eller flere merkeaddisjonsstedene, der reaksjonen(e) mellom de reaktive forbindelsesbygggesteinene og addisjonen(e) av oligonukleotid-merket fører til at det dannes, i hvert av reaksjonskamrene, ulike bifunksjonelle komplekser.

30

5 **16.** Framgangsmåte ifølge krav 15, der de ulike bifunksjonelle kompleksene blandes, og der blandingen av ulike mellomliggende bifunksjonelle komplekser deretter deles i en flerhet ulike reaksjonskammer.

10 **17.** Framgangsmåte ifølge krav 16, der et ulikt mellomliggende bifunksjonelt kompleks er tilveiebrakt i hvert av flerheten separate reaksjonskammer, og deretter, i hvert av reaksjonskamrene, den fjerde reaktive
forbindelsesbygggesteinen og opsjonelt også den ytterligere fjerde reaktive
forbindelsesbygggesteinen reagerer med ett eller flere av et sted for kjemisk
reaksjon og én eller flere reaktive grupper hos en tredje reaktive
forbindelsesbygggestein og/eller ytterligere tredje reaktive
forbindelsesbygggestein, og der, i hvert av kamrene, et fjerde identifikator-
15 oligonukleotid-merke som identifiserer den ene eller flere reaktive
forbindelsesbygggesteinene, adderes enzymatisk til det tredje identifikator-
oligonukleotid-merket, der reaksjonen(e) mellom de reaktive
forbindelsesbygggesteinene og addisjonen(e) av oligonukleotid-merket fører til at
det dannes, i hvert av kamrene, ytterligere ulike bifunksjonelle komplekser.

20 **18.** Framgangsmåte ifølge krav 17, der, i hver etterfølgende runde med parallell syntese, reaksjonsproduktet av den reaktive forbindelsesbygggesteinen fra en tidligere synteserunde reagerer med den reaktive forbindelsesbygggesteinen i en etterfølgende synteserunde, og der et oligonukleotid-merke som er addert i en
25 tidligere synteserunde, fungerer som et substrat for enzymet som adderer et oligonukleotid-merke i en etterfølgende synteserunde.