



(12) PATENTANSØGNING

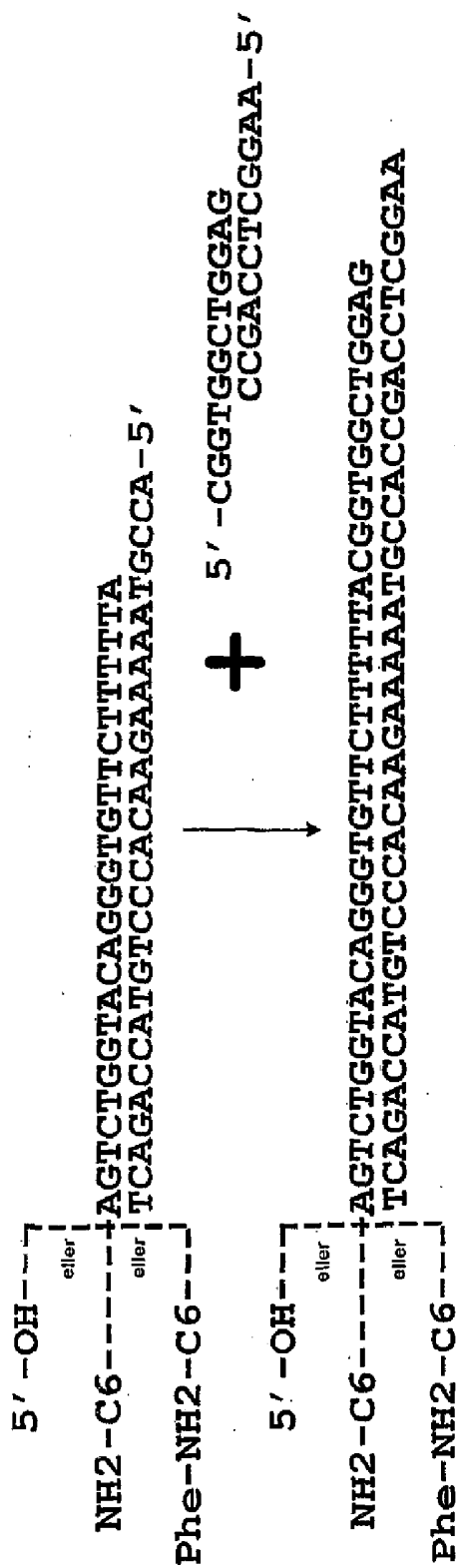
Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl.®: **C 12 N 15/10 (2006.01)** **C 07 H 21/00 (2006.01)**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 2008 00005**
- (22) Indleveringsdag: **2008-01-03**
- (24) Løbedag: **2006-06-09**
- (41) Alm. tilgængelig: **2008-03-04**
- (86) International ansøgning nr: **PCT/US2006/022555**
- (86) International indleveringsdag: **2006-06-09**
- (85) Videreførelsesdag: **2008-01-03**
- (30) Prioritet: **2005-06-09 US 60/689,466** **2005-10-28 US 60/731,041**
- (71) Ansøger: **Praecis Pharmaceuticals Inc., 830 Winter Street, Waltham, MA 02451-1420, USA**
- (72) Opfinder: **Raksha A. Acharya, 2 Glen Ora Drive, Bedford, MA 01730, USA**
Nils Jacob Vest Hansen, 1073 14 Street, San Francisco, CA 94114, USA
Dennis Benjamin, 9929 157 th Place, N.E., Apartment V-929, Redmond, WA 98052, USA
Malcolm L. Gefter, 46 Baker Bridge Road, Lincoln, MA 1773, USA
David I. Israel, 117 Anson Road, Concord, MA 01742, USA
Paolo A. Centrella, 612 Old Stonebrook Road, Acton, MA 1720, USA
George J. Franklin, 18 Murray Avenue, Auburn, MA 1501, USA
Steffan hillip Creaser, 47 Cottage Street 3, Cambridge, MA 2139, USA
Malcolm J. kavarana, 516 Farms Drive, Burlington, MA 01803, USA
Richard Wagner, 24 Coolidge Avenue, Cambridge, MA 02138, USA
Matthew Clark, 4 Glenn terrace, Cambridge MA 02139, USA
Christopher C. Arico-Muendel, 21 Shaw Street, West Roxbury, MA 02132, USA
Stephen Hale, 133 Brookside Avenue, Belmont, MA 02478, USA
Barry Morgan, 237 Prospect Street, Franklin, MA 02038, USA
- (74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**
-

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåder til syntese af kodede biblioteker**

(57) Sammendrag:
Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til syntetisering af et bibliotek af forbindelser, som er mærket med et kodede oligonukleotid.

Figur 1



Patentkrav:

1. Fremgangsmåde til syntetisering af et molekyle omfattende en funktionel
enhed, der er operativt bundet til et kodende oligonukleotid, *k e n d e -*
5 *t e g n e t* ved, at fremgangsmåden omfatter trinnene med:

(a) tilvejebringelse af en initiatorforbindelse bestående af en initial
funktionel enhed, der omfatter n byggesten, hvor n er et helt tal på 1
eller større, hvor den initiale funktionelle enhed omfatter mindst én
10 reaktiv gruppe og er operativt bundet til et initialt oligonukleotid;

(b) omsætning af initiatorforbindelsen med en byggesten omfattende
mindst én komplementær reaktiv gruppe, hvor den mindst ene
komplementære reaktive gruppe er komplementær til den reaktive
15 gruppe i trin (a), under betingelser, der er egnede til omsætning af den
komplementære reaktive gruppe til dannelse af en kovalent binding;

(c) omsætning af det initiale oligonukleotid med et indkommende
oligonukleotid, som identificerer byggestenen i trin (b), i nærvær af et
20 enzym, der katalyserer ligering af det initiale oligonukleotid og det
indkommende oligonukleotid, under betingelser, der er egnede til
ligering af det indkommende oligonukleotid og det initiale oligo-
nukleotid til dannelse af et kodende oligonukleotid;

25 hvorved der produceres et molekyle, der omfatter en funktionel enhed
omfattende $n+1$ byggesten, som er operativt bundet til et kodende
oligonukleotid.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at den
30 funktionelle enhed i trin (c) omfatter en reaktiv gruppe, og trin (a) til (c)
gentages én eller flere gange, hvorved der dannes cykluser 1 til i , hvor i er et
helt tal på 2 eller større, hvor produktet fra trin (c) i en cyklus s , hvor s er et
helt tal på $i-1$ eller mindre, er initiatorforbindelsen i cyklus $s+1$.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at trin (c) går forud for trin (b), eller trin (b) går forud for trin (c).
- 5 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at mindst én af byggestenene er en aminosyre eller en aktiveret aminosyre.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe er valgt fra gruppen
- 10 bestående af (i) en aminogruppe; en carboxylgruppe; en sulfonylgruppe; en phosphonylgruppe; en epoxidgruppe; en aziridingruppe; og en isocyanatgruppe; eller (ii) en hydroxylgruppe; en carboxylgruppe; en sulfonylgruppe; en phosphonylgruppe; en epoxidgruppe; en aziridingruppe; og en isocyanatgruppe; eller (iii) en aminogruppe og en aldehyd- eller ketongruppe; fakultativt
- 15 hvor omsætningen mellem den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe udføres under reducerende betingelser; eller (iv) en phosphorylidgruppe og en aldehyd- eller ketongruppe.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe reagerer via cycloaddition til
- 20 dannelse af en cyklisk struktur; fakultativt hvor den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe er valgt fra gruppen bestående af (i) en alkyne og et azid; eller (ii) en halogeneret heteroaromatisk gruppe og en nukleofil; fakultativt hvor (a) den halogenerede heteroaromatiske gruppe er valgt fra
- 25 gruppen bestående af chlorerede pyrimidiner, chlorerede triaziner og chlorerede puriner; eller (b) at nukleofilen er en aminogruppe.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at enzymet er valgt fra gruppen bestående af en DNA-ligase, en RNA-ligase, en DNA-polymerase,
- 30 en RNA polymerase og en topoisomerase.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at det initiale oligonukleotid er dobbeltstrenget eller enkeltstrenget; fakultativt hvor det initiale

oligonukleotid (i) omfatter en PCR-primærsekvens, eller (ii) er enkeltstrengt, og det indkommende oligonukleotid er enkeltstrengt; eller det initiale oligonukleotid er dobbeltstrengt, og det indkommende oligonukleotid er dobbeltstrengt; fakultativt hvor den initiale funktionelle enhed og det initiale oligonukleotid bindes af en bindingsenhed; fakultativt hvor det initiale oligonukleotid er dobbeltstrengt, og bindingsenheden er kovalent koblet til den initiale funktionelle enhed og til begge strenge i det initiale oligonukleotid.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at det indkommende oligonukleotid har en længde på fra 3 til 10 nukleotider.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 2, *k e n d e t e g n e t* ved, at det indkommende oligonukleotid i cyklus i omfatter en PCR-lukker-primer.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 2, *k e n d e t e g n e t* ved, at den yderligere i cyklus i omfatter trinnet med

(d) ligering af et oligonukleotid omfattende en PCR-lukker-primærsekvens til det kodende oligonukleotid; fakultativt hvor oligonukleotidet omfattende en PCR-lukker-primærsekvens liggeres til det kodende oligonukleotid i nærvær af et enzym, der katalyserer ligeringen.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 2, *k e n d e t e g n e t* ved, at den yderligere efter cyklus i omfatter trinnet med

(e) cyklisering af den funktionelle enhed; fakultativt hvor den funktionelle enhed omfatter en alkynylgruppe og en azidogruppe og, at forbindelsen underkastes betingelser, der er egnede til cycloaddition af alkynylgruppen og azidogruppen til dannelse af en triazolgruppe, hvorved den funktionelle enhed cykliseres.

13. Fremgangsmåde til syntetisering af et bibliotek af forbindelser, kendt ved, at forbindelserne omfatter en funktionel enhed omfattende to eller flere byggesten, der er operativt bundet til et initialt oligonukleotid, som identificerer den funktionelle enheds struktur, hvilken fremgangsmåde omfatter trinnene med:

(a) tilvejebringelse af en opløsning omfattende m initiatorforbindelser, hvor m er et helt tal på 1 eller større, hvor initiatorforbindelserne består af en funktionel enhed omfattende n byggesten, hvor n er et helt tal på 1 eller større, der er operativt bundet til et initialt oligonukleotid, som identificerer den byggesten;

(b) deling af opløsningen fra trin (a) i r reaktionsbeholdere, hvor r er et helt tal på 2 eller større, hvorved der produceres r alikvoter af opløsningen;

(c) omsætning af initiatorforbindelserne i hver reaktionsbeholder med én af r byggesten, hvorved der produceres r alikvoter omfattende forbindelser bestående af en funktionel enhed omfattende $n+1$ byggesten, der er operativt bundet til det initiale oligonukleotid; og

(d) omsætning af det initiale oligonukleotid i hver alikvot med én af et sæt på r distinkte indkommende oligonukleotider i nærvær af et enzym, der katalyserer ligering af det indkommende oligonukleotid og det initiale oligonukleotid under betingelser, der er egnede til enzymatisk ligering af det indkommende oligonukleotid og det initiale oligonukleotid;

hvorved der produceres r alikvoter, der omfatter molekyler bestående af en funktionel enhed omfattende $n+1$ byggesten operativt bundet til et forlænget oligonukleotid, som koder for de $n+1$ byggesten; fakultativt yderligere omfattende trinnet med

(e) kombinerings af to eller flere af de r alikvoter, hvorved der produceres en opløsning, der omfatter molekyler bestående af en funktionel enhed

omfattende $n+1$ byggesten, der er operativt bundet til et forlænget oligonukleotid, som koder for de $n+1$ byggesten; fakultativt hvor (i) r alikvotter kombineres; eller (ii) hvor trin (a) til (e) udføres én eller flere gange til tilvejebringelse af cykluser 1 til i , hvor i er et helt tal på 2 eller større, hvor i

5 cyklus $s+1$, hvor s er et helt tal på $i-1$ eller mindre, opløsningen omfattende m initiatorforbindelser fra trin (a) er opløsningen i trin (e) i cyklus s .

14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at mindst én af cykluserne 1 til i i trin (d) går forud for trin (c).

10

15. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at mindst én af byggestenene er en aminosyre.

16. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er

15 DNA-ligase, RNA-ligase, DNA-polymerase, RNA-polymerase eller topoisomerase.

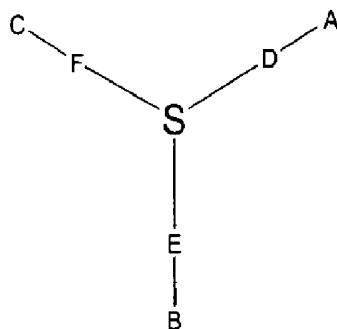
17. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at det initiale oligonukleotid er et dobbeltstrenget oligonukleotid; fakultativt hvor det

20 indkommende oligonukleotid er et dobbeltstrenget oligonukleotid.

18. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at initiatorforbindelserne omfatter en linkerenhed omfattende en første funktionel gruppe, der er tilpasset til binding med en byggesten, en anden funktionel

25 gruppe, der er tilpasset til binding til et oligonukleotids 5'-ende, og en tredje funktionel gruppe, der er tilpasset til binding til et oligonukleotids 3'-ende; fakultativt hvor linkerenheden har strukturen

6



hvor

A er en funktionel gruppe, der er tilpasset til binding til en byggesten;

5 B er en funktionel gruppe, der er tilpasset til binding til et oligonukleotids 5'-ende;

C er en funktionel gruppe, der er tilpasset til binding til et oligonukleotids 3'-ende

S er et atom eller et stillads;

10 D er en kemisk struktur, der forbinder A med S;

E er en kemisk struktur, der forbinder B med S; og

F er en kemisk struktur, der forbinder C med S; fakultativt hvor (i):

A er en aminogruppe;

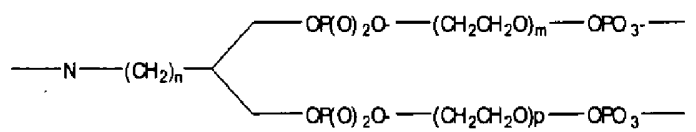
15 B er en phosphatgruppe; og

C er en phosphatgruppe; eller (ii)

hvor D, E og F hver især uafhængigt er en alkylengruppe eller en

oligo(ethylenglycol)gruppe; eller (iii) hvor S er et kulstofatom, et nitrogen-

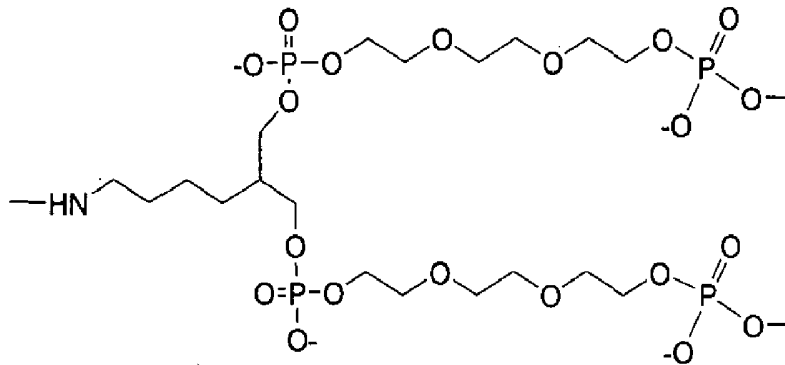
20 atom, et phosphoratom, et boratom, en phosphatgruppe, en cyklisk gruppe eller en polycyklisk gruppe; fakultativt hvor linkerenheden har strukturen



hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 1 til ca. 20; fakultativt

25 hvor (a) n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 2 til otte; fakultativt

hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 3 til 6; eller (b) hvor linkerenheden har strukturen:



5

19. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at hver af initiatorforbindelserne omfatter en reaktiv gruppe, og hvor hver af de byggesten omfatter en komplementær reaktiv gruppe, som er komplementær til den reaktive gruppe; fakultativt hvor den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe er valgt fra gruppen bestående af (i) en aminogruppe; en carboxylgruppe; en sulfonylgruppe; en phosphonylgruppe; en epoxidgruppe; en aziridingruppe; og en isocyanatgruppe; eller (ii) en hydroxylgruppe; en carboxylgruppe; en sulfonylgruppe; en phosphonylgruppe; en epoxidgruppe; en aziridingruppe; og en isocyanatgruppe; eller (iii) en aminogruppe og en aldehyd- eller ketongruppe; fakultativt hvor omsætningen mellem den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe udføres under reducerende betingelser; eller (iv) en phosphorylidgruppe og en aldehyd- eller ketongruppe.
20. Fremgangsmåde ifølge krav 19, k e n d e t e g n e t ved, at den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe reagerer via cycloaddition til dannelse af en cyklisk struktur; fakultativt hvor den reaktive gruppe og den komplementære reaktive gruppe er valgt fra gruppen bestående af (i) en alkyln og et azid; eller (ii) en halogeneret heteroaromatisk gruppe og en nukleofil;
- 25 fakultativt hvor (a) den halogenerede heteroaromatiske gruppe er valgt fra

gruppen bestående af chlorerede pyrimidiner, chlorerede triaziner og chlorerede puriner; eller (b) nukleofilen er en aminogruppe.

21. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at den efter
5 cyklus i yderligere omfatter trinnet med:

(f) cyklisering af én eller flere af de funktionelle enheder; fakultativt hvor en funktionel enhed i trin (f) omfatter en azidogruppe og en alkynylgruppe; fakultativt hvor den funktionelle enhed holdes under betingelser, der
10 er egnede til cycloaddition af azidogruppen og alkynylgruppen til dannelse af en triazolgruppe, hvorved der dannes en cyklisk funktionel enhed; fakultativt hvor cycloadditionsreaktionen udføres i nærvær af en kobberkatalysator; fakultativt hvor mindst én af den ene eller flere funktionelle enheder i trin (f)
15 omfatter mindst to sulfhydrylgrupper, og den funktionelle enhed holdes under betingelser, der er egnede til omsætning af de to sulfhydrylgrupper til dannelse af en disulfidgruppe, hvorved den funktionelle enhed cykliseres.

22. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at det initiale
20 oligonukleotid omfatter en PCR-primersekvens.

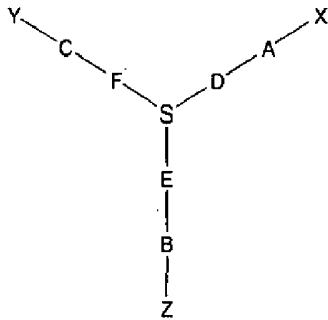
23. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at det indkomende oligonukleotid i cyklus i omfatter en PCR-lukker-primer.

24. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at den efter
25 cyklus i yderligere omfatter trinnet med

(d) ligering af et oligonukleotid omfattende en PCR-lukker-primersekvens til det kodende oligonukleotid; fakultativt

30 hvor oligonukleotidet omfattende en PCR-lukker-primersekvens liggeres til det kodende oligonukleotid i nærvær af et enzym, der katalyserer ligeringen.

25. Forbindelse med formlen



5

hvor:

X er en funktionel enhed omfattende én eller flere byggesten;

Z er et oligonukleotid, der ved dets 3'-terminus er fastknyttet til B;

Y er et oligonukleotid, der ved dets 5'-terminus er fastknyttet til C;

10 A er en funktionel gruppe, der danner en kovalent binding med X;

B er en funktionel gruppe, der danner en binding med 3'-enden af Z;

C er en funktionel gruppe, der danner en binding med 5'-enden af Y;

D, F og E hver især uafhængigt er en bifunktionel bindingsgruppe; og

S er et atom eller et molekylært stillads, hvor Y og Z er kovalent

15 sammenføjede.

26. Forbindelse ifølge krav 25, kendetegnet ved, at D, E og F hver især uafhængigt er en alkylenkæde eller en oligo(ethylenglycol)kæde.

20 27. Forbindelse ifølge krav 25, kendetegnet ved, at Y og Z er i hovedsagen komplementære og orienteret således i forbindelsen, at Watson-Crick baseparring og duplexdannelse muliggøres under egnede betingelser.

25 28. Forbindelse ifølge krav 25, kendetegnet ved, at Y og Z har samme længde eller forskellig længde; fakultativt hvor Y og Z har samme længde.

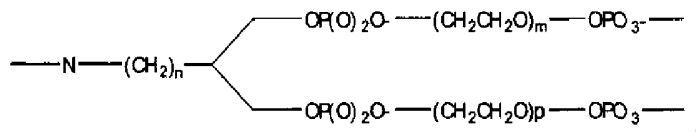
29. Forbindelse ifølge krav 25, k e n d e t e g n e t ved, at Y og Z hver især har en længde på 10 eller flere baser og har komplementære områder på ti eller flere basepar.

- 5 30. Forbindelse ifølge krav 25, k e n d e t e g n e t ved, at S (i) er et kulstofatom, et boratom, et nitrogenatom, et phosphoratom, eller et polyatomstillads; eller (ii) er en phosphatgruppe eller en cyklisk gruppe; eller (iii) er en cycloalkyl-, cycloalkenyl-, heterocycloalkyl-, hererocycloalkenyl-, aryl- eller heteroaryl-gruppe.

10

31. Forbindelse ifølge krav 25, k e n d e t e g n e t ved, at linkerenheden har strukturen

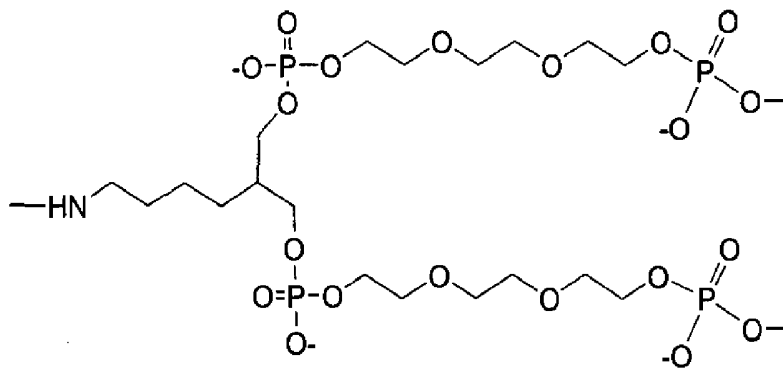
15



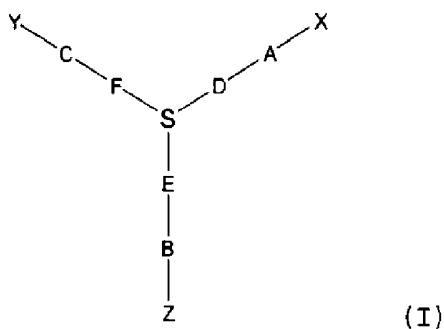
hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 1 til ca. 20; fakultativt hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 2 til otte; fakultativt hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 3 til 6.

20

32. Forbindelse ifølge krav 25, k e n d e t e g n e t ved, at linkerenheden har strukturen



33. Forbindelse ifølge krav 25, k e n d e t e g n e t ved, at X og Y omfatter en PCR-primersekvens.
- 5 34. Forbindelsesbibliotek omfattende mindst ca. 10^2 distinkte forbindelser, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelserne omfatter en funktionel enhed omfattende to eller flere byggesten, der er operativt bundet til et oligonukleotid, som identificerer den funktionelle enheds struktur.
- 10 35. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 34, k e n d e t e g n e t ved, at biblioteket omfatter mindst ca. 10^5 kopier af hver af de distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^6 kopier af hver af de distinkte forbindelser.
- 15 36. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 34, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter mindst ca. 10^4 distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^6 distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^8 distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^{10} distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^{12} distinkte forbindelser.
- 20 37. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 34, k e n d e t e g n e t ved, at biblioteket omfatter en flerhed af forbindelser, der hver især har Formel I:



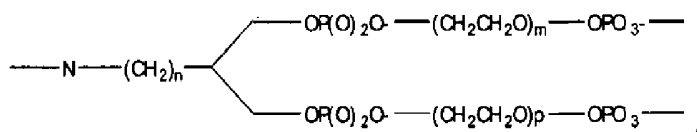
25 hvor:

X er en funktionel enhed omfattende én eller flere byggesten;
Z er et oligonukleotid, der ved dets 3'-terminus er fastknyttet til B;

- Y er et oligonukleotid, der ved dets 5'-terminus er fastknyttet til C;
A er en funktionel gruppe, der danner en kovalent binding med X;
B er en funktionel gruppe, der danner en binding med 3'-enden af Z;
C er en funktionel gruppe, der danner en binding med 5'-enden af Y;
- 5 D, F og E hver især uafhængigt er en bifunktionel bindingsgruppe; og
S er et atom eller et molekylært stillads, hvor Y og Z er kovalent
sammenføjede.
38. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at A, B, C, D,
10 E, F og S hver især har samme identitet for hver forbindelse med Formel I.
39. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at biblioteket i
hovedsagen består af en flerhed af forbindelser med Formel I.
- 15 40. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at D, E og F
hver især uafhængigt er en alkylenkæde eller en oligo(ethylenglycol)kæde.
41. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at Y og Z er i
hovedsagen komplementære og orienteret således i forbindelsen, at Watson-
20 Crick baseparring og duplexdannelse muliggøres under egnede betingelser.
42. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at Y og Z har
samme længde eller forskellig længde; fakultativt hvor Y og Z har samme
længde.
- 25 43. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at Y og Z
hver især har en længde på 10 eller flere baser og har komplementære
områder på ti eller flere basepar.
- 30 44. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, k e n d e t e g n e t ved, at S (i) er et
kulstofatom, et boratom, et nitrogenatom, et phosphoratom eller et
polyatomstillads; eller (ii) er en fosfatgruppe eller en cyklisk gruppe; eller (iii)

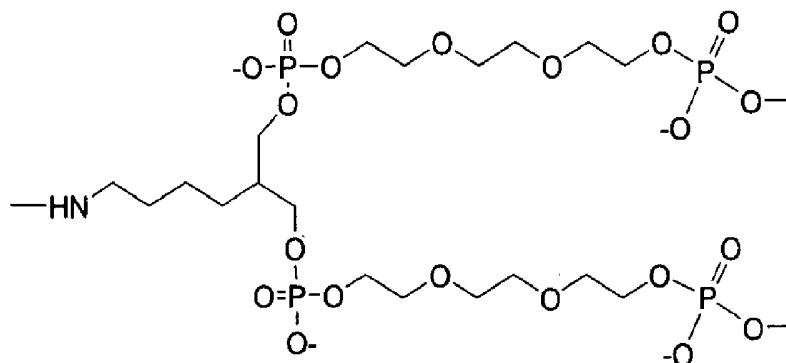
er en cycloalkyl-, cycloalkenyl-, heterocycloalkyl-, heterocycloalkenyl-, aryl- eller heteroarylgruppe.

45. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, kendt og gnet ved, at linker-
5 enheden har strukturen



- 10 hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 1 til ca. 20; fakultativt hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 2 til otte; fakultativt hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 3 til 6.

46. Forbindelse ifølge krav 37, kendt og gnet ved, at linkerenheden har strukturen



- 15 47. Forbindelsesbibliotek ifølge krav 37, kendt og gnet ved, at X og Z omfatter en PCR-primærsekvens.

- 20 48. Forbindelse, kendt og gnet ved, at den er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge krav 1.

49. Forbindelsesbibliotek, kendt og gnet ved, at det er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge krav 13.

50. Fremgangsmåde til at identificere én eller flere forbindelser, der binder til et biologisk target, *k e n d e t e g n e t* ved, at fremgangsmåden omfatter trinnene med:

- 5 (a) at bringe det biologiske target i forbindelse med et forbindelsesbibliotek fremstillet ved fremgangsmåden ifølge krav 13 under betingelser, der er egnede til, at mindst ét medlem af forbindelsesbiblioteket binder til targetet;
- (b) at fjerne biblioteksmedlemmer, som ikke binder til targetet;
- 10 (c) at amplificere de kodende nukleotider i det mindst ene medlem af forbindelsesbiblioteket, som binder til targetet;
- (d) at sekventere de kodende oligonukleotider i trin (c); og
- (e) at anvende de i trin (d) bestemte sekvenser til at bestemme strukturen af de funktionelle enheder i de medlemmer af
- 15 forbindelsesbiblioteket, som binder til det biologiske target; hvorved der identificeres én eller flere forbindelser, som binder til det biologiske target.

51. Fremgangsmåde til at identificere en forbindelse, der binder til et biologisk target, *k e n d e t e g n e t* ved, at fremgangsmåden omfatter trinnene med:

- (a) at bringe det biologiske target i forbindelse med et forbindelsesbibliotek omfattende mindst ca. 10^2 distinkte forbindelser, hvilke forbindelser omfatter en funktionel enhed, der omfatter to eller flere byggesten, der er operativt bundet til et oligonukleotid, som
- 25 identificerer den funktionelle enheds struktur under betingelser, der er egnede til, at mindst ét medlem af forbindelsesbiblioteket binder til targetet;
- (b) at fjerne biblioteksmedlemmer, som ikke binder til targetet;
- 30 (c) at amplificere de kodende nukleotider i det mindst ene medlem af forbindelsesbiblioteket, som binder til targetet;
- (d) at sekventere de kodende oligonukleotider i trin (c); og

(e) at anvende de i trin (d) bestemte sekvenser til at bestemme strukturen af de funktionelle enheder i de medlemmer af forbindelsesbiblioteket, som binder til det biologiske target; hvorved der identificeres én eller flere forbindelser, som binder til det biologiske target.

5

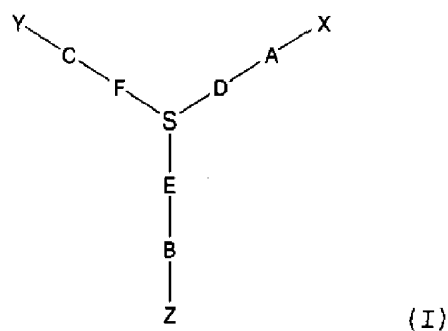
52. Fremgangsmåde ifølge krav 51, k e n d e t e g n e t ved, at biblioteket omfatter mindst ca. 10^5 kopier af hver af de distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^6 kopier af hver af de distinkte forbindelser.

10

53. Fremgangsmåde ifølge krav 51, k e n d e t e g n e t ved, at biblioteket omfatter mindst ca. 10^4 distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^6 distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^8 distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^{10} distinkte forbindelser eller mindst ca. 10^{12} distinkte forbindelser.

15

54. Fremgangsmåde ifølge krav 51, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelsesbiblioteket omfatter en flerhed af forbindelser, der hver især uafhængigt har Formel I:



20

hvor:

X er en funktionel enhed omfattende én eller flere byggesten;

Z er et oligonukleotid, der ved dets 3'-terminus er fastknyttet til B;

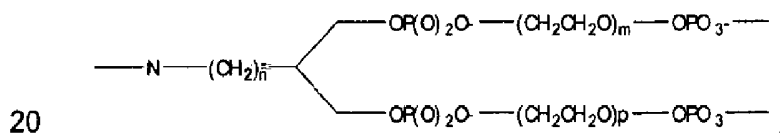
25 Y er et oligonukleotid, der ved dets 5'-terminus er fastknyttet til C;

A er en funktionel gruppe, der danner en kovalent binding med X;

B er en funktionel gruppe, der danner en binding med 3'-enden af Z;

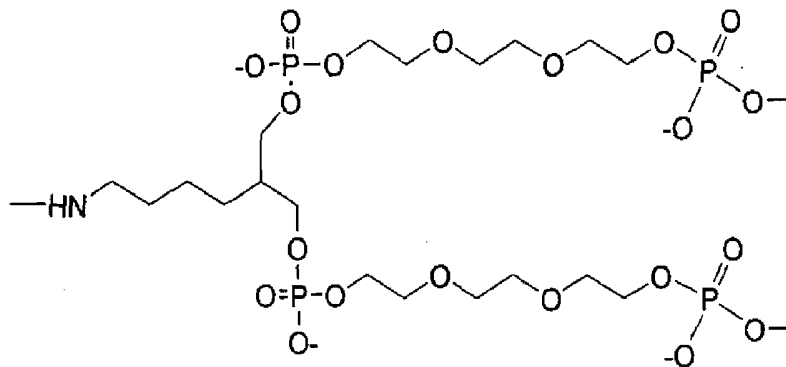
C er en funktionel gruppe, der danner en binding med 5'-enden af Y;
 D, F og E hver især uafhængigt er en bifunktionel bindingsgruppe; og
 S er et atom eller et molekylært stillads; fakultativt

- 5 hvor (i) A, B, C, D, E, F og S hver især har samme identitet for hver forbindelse med Formel I; eller (ii) forbindelsesbiblioteket i hovedsagen består af en flerhed af forbindelser med Formel I; eller (iii) D, E og F hver især uafhængigt er en alkylenkæde eller en oligo(ethylenglycol)kæde; eller (iv) Y og Z er i hovedsagen komplementære og orienteret således i forbindelsen, at Watson-Crick
- 10 baseparring og duplexdannelse muliggøres under egnede betingelser; eller (v) Y og Z har samme længde eller forskellig længde; fakultativt hvor Y og Z har samme længde; eller (vi) Y og Z hver især har en længde på 10 eller flere baser og har komplementære områder på ti eller flere basepar; eller (vii) hvor S er (a) et kulstofatom, et boratom, et nitrogenatom, et phosphoratom eller et
- 15 polyatomstillads; eller (b) er en fosfatgruppe eller en cyklisk gruppe; eller (c) er en cycloalkyl-, cycloalkenyl-, heterocycloalkyl-, heterocycloalkenyl-, aryl- eller heteroarylgruppe; eller (viii) linkerenheden har strukturen



- hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 1 til ca. 20; fakultativt hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 2 til otte; fakultativt hvor n, m og p hver især uafhængigt er et helt tal fra 3 til 6, hvor linkerenheden har
- 25 strukturen

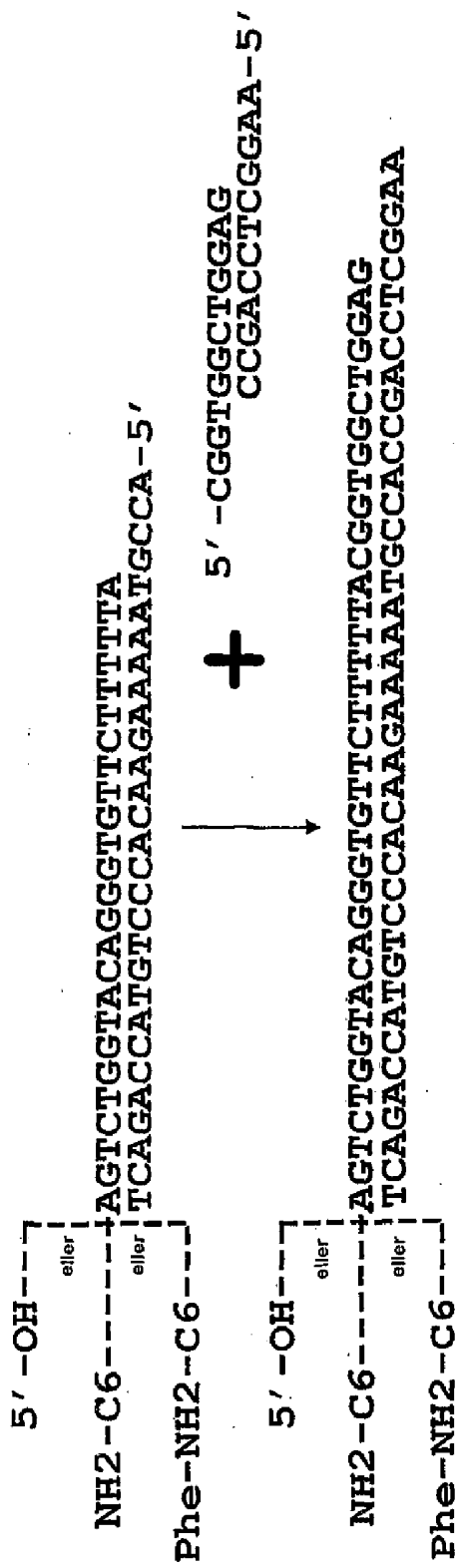
17



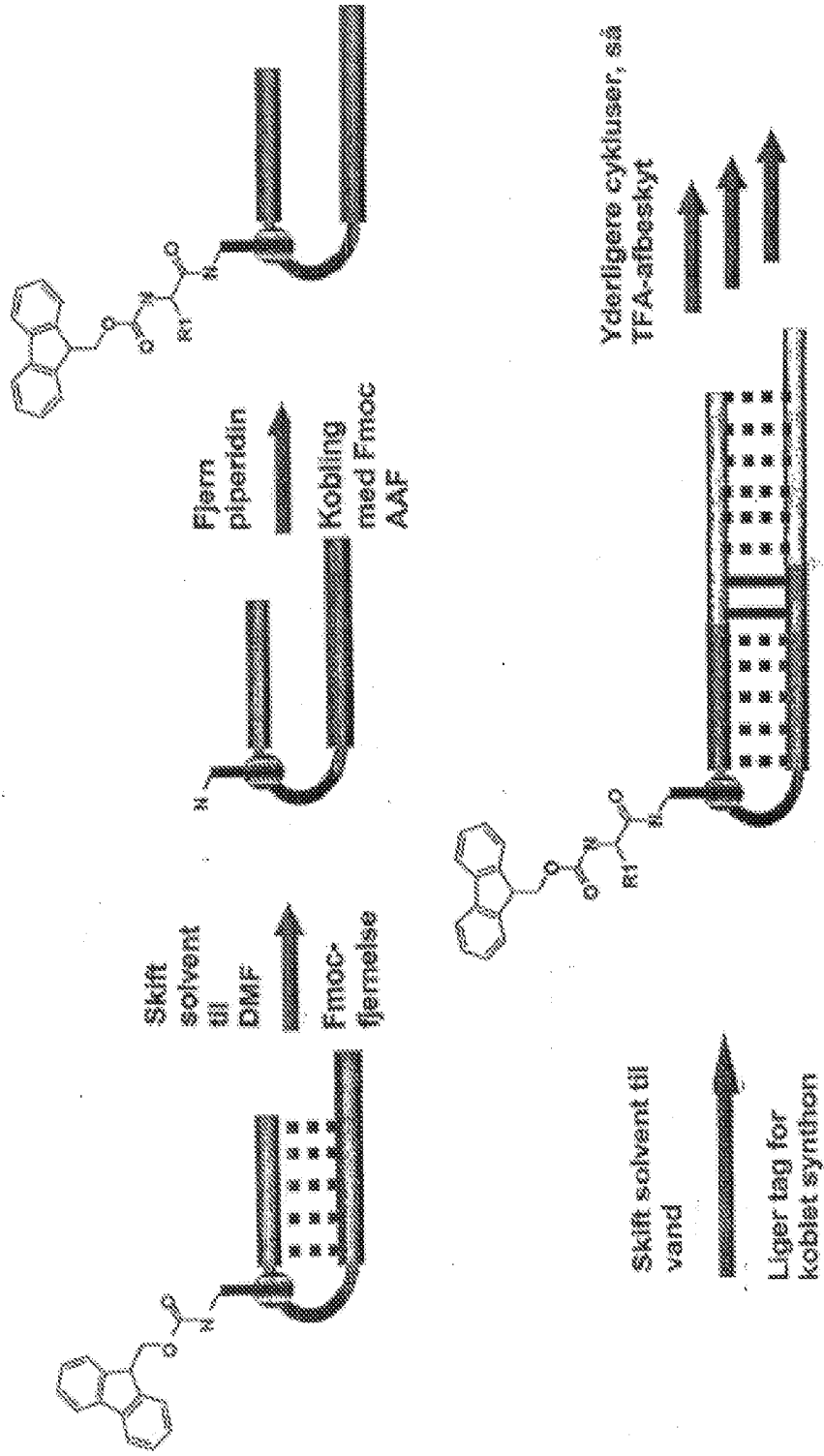
eller (ix) X og Z omfatter en PCR-primersekvens.

5

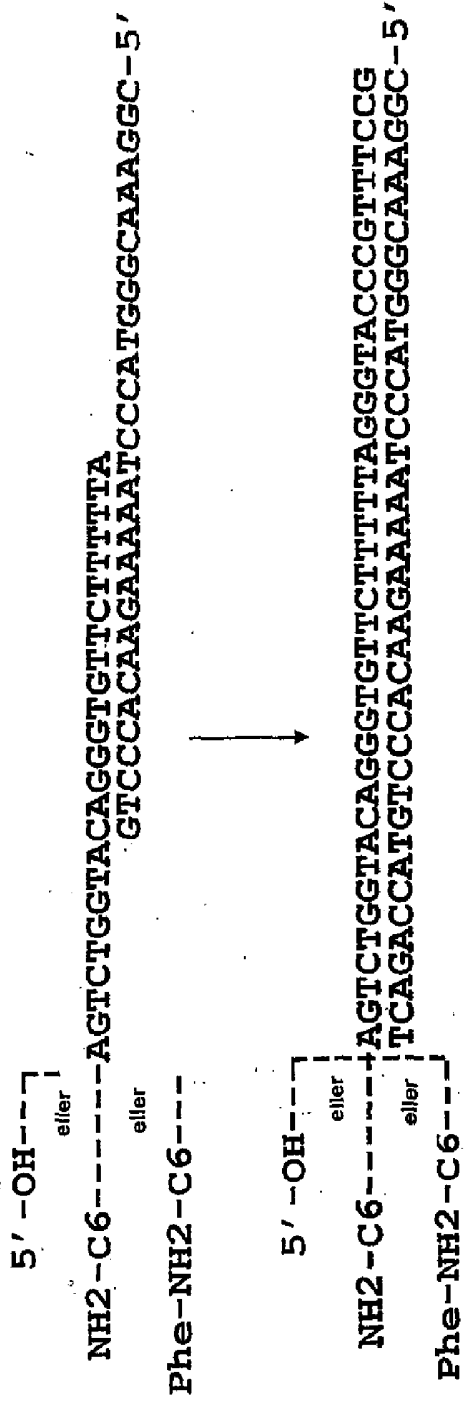
Figur 1

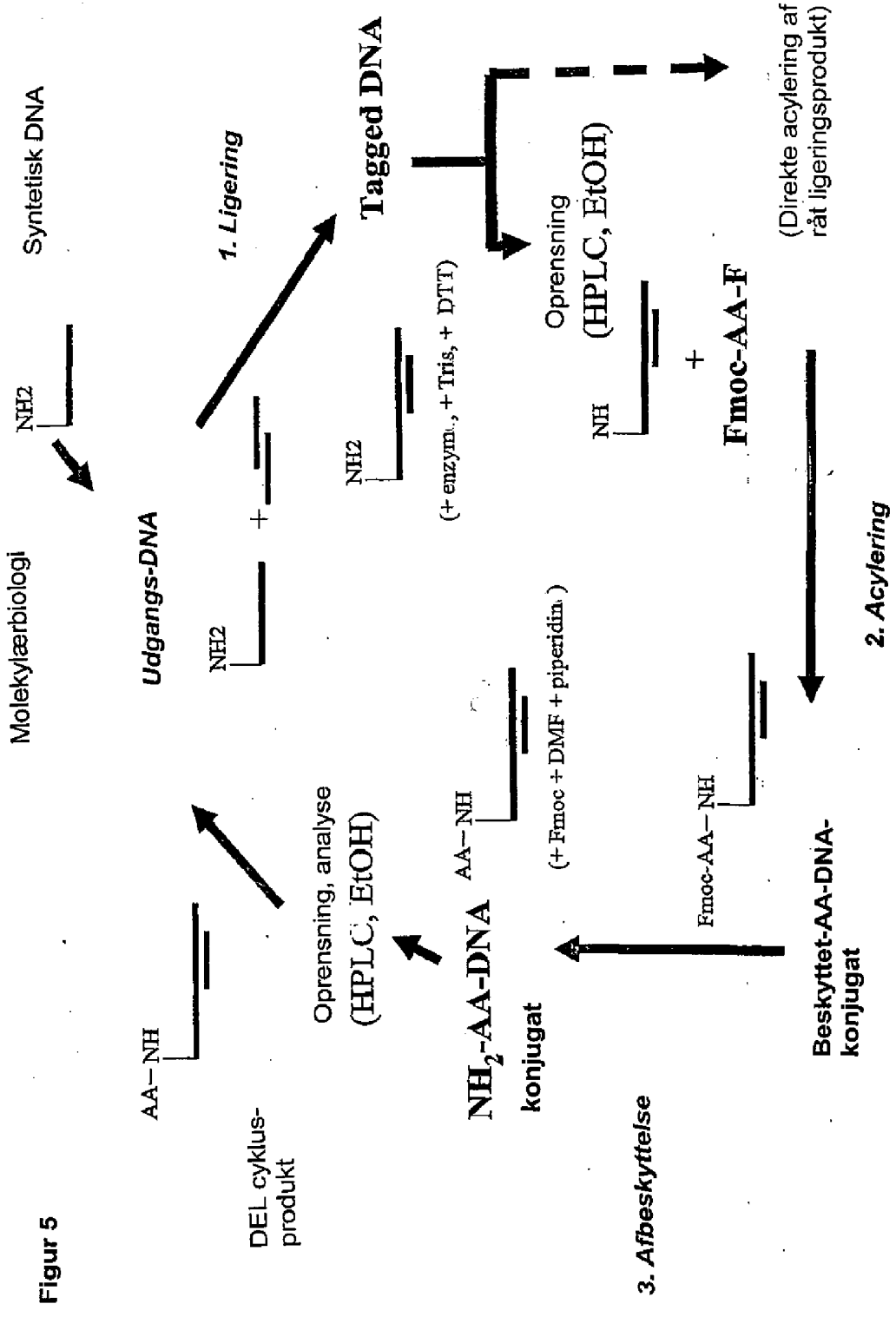


Figur 3



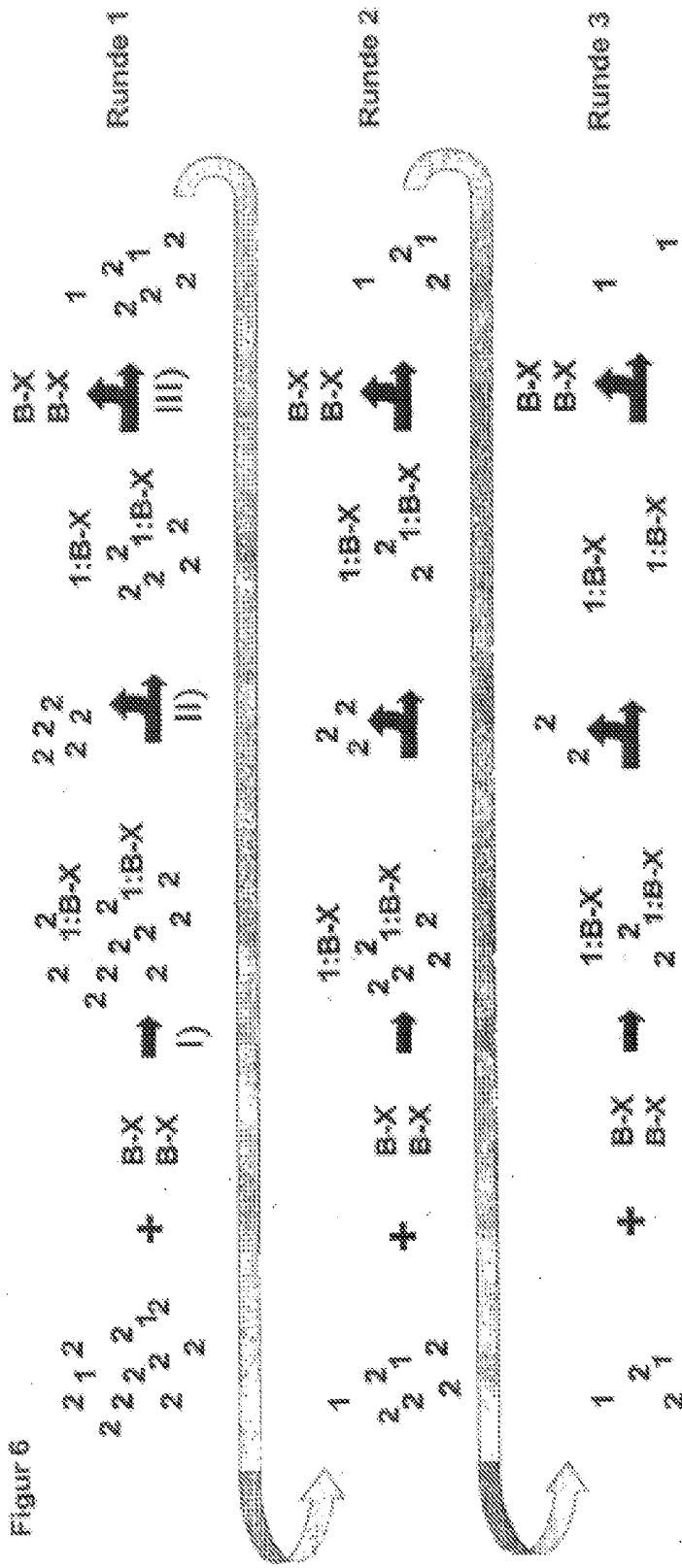
Figur 4





Figur 5

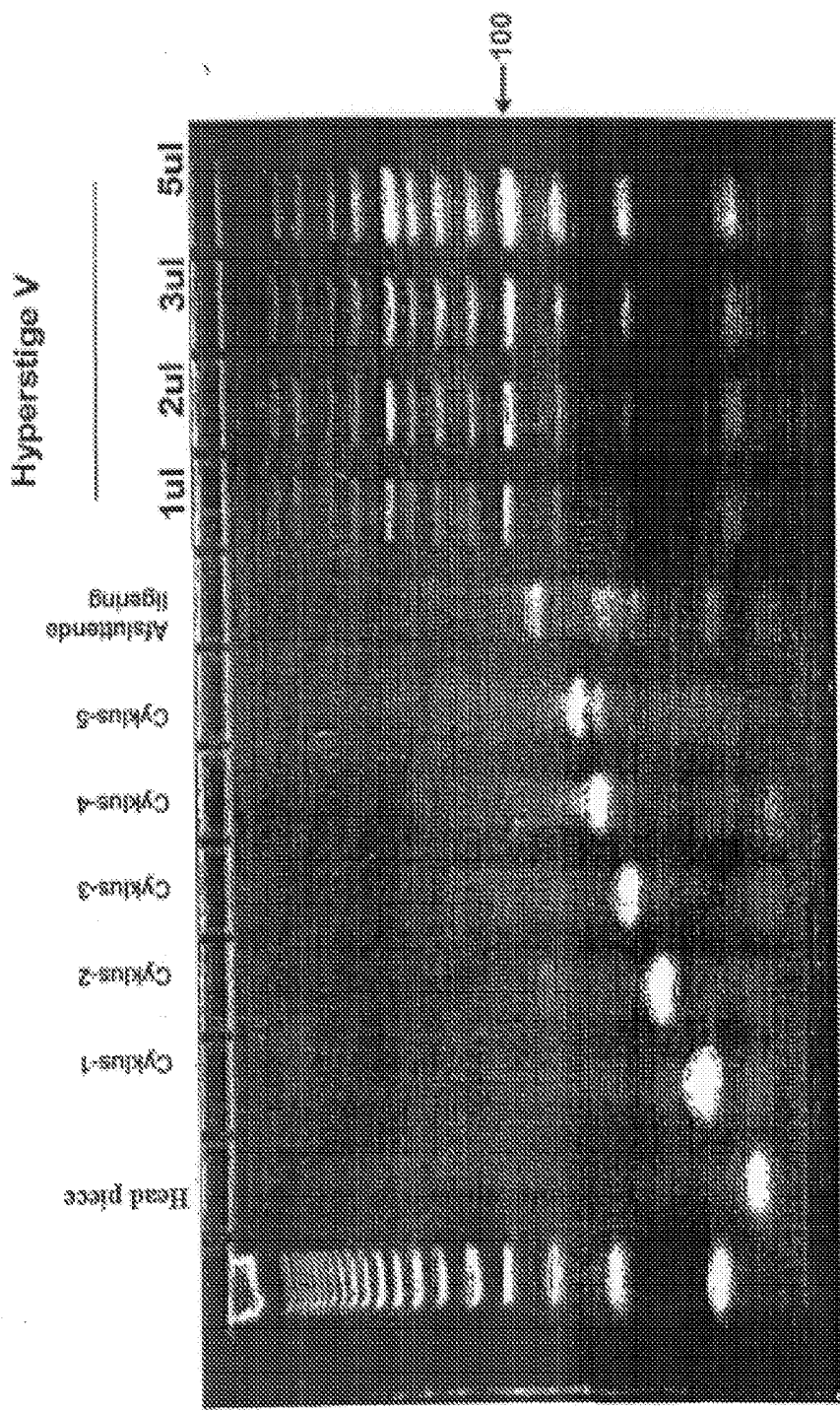
Figur 6

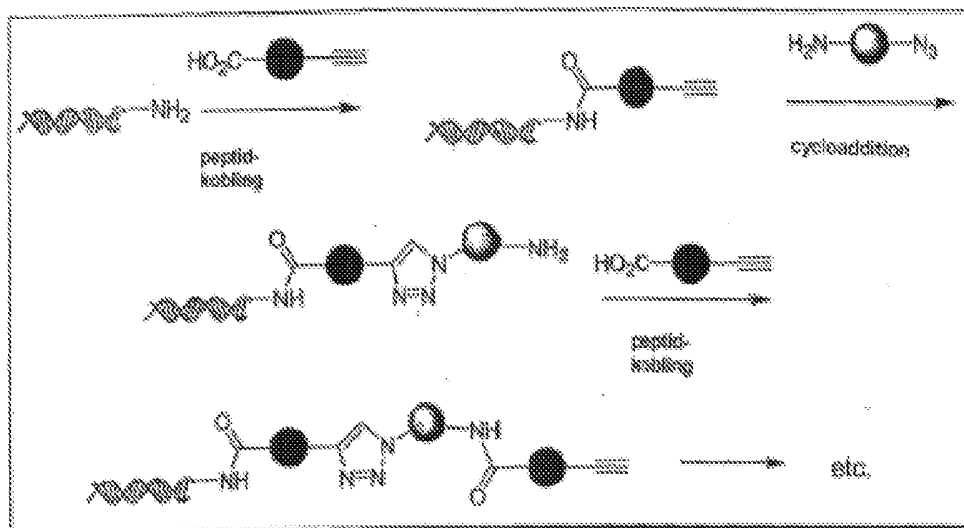


Kortlægning

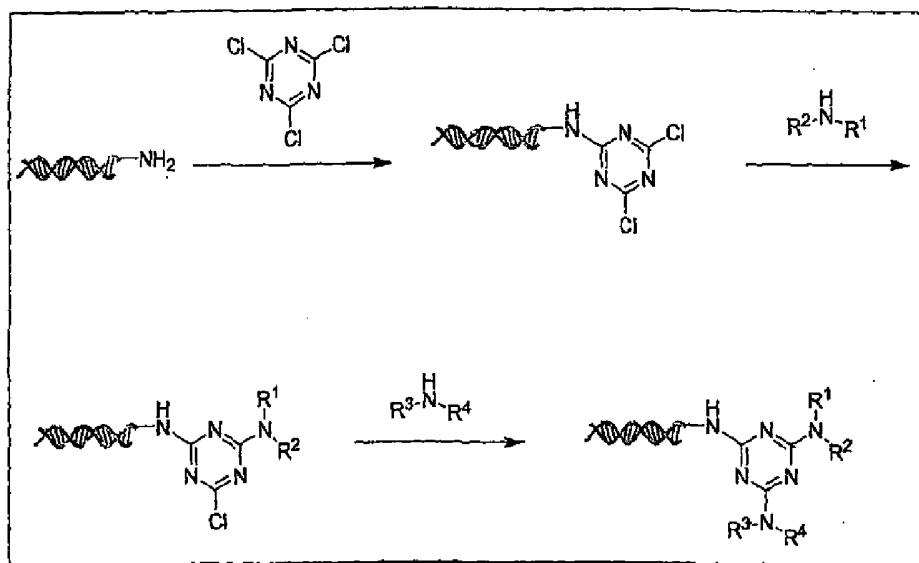
- 1 definerer et B-bindende biblioteksmedlem
- 2 definerer et ikke-B-bindende biblioteksmedlem
- B definerer et target, for hvilket der ønskes et bindende biblioteksmedlem
- X definerer en komponent, som kan separeres fysisk fra 1 og 2
- I) Definerer en begivenhed, der tillader binding af 1 til B [binding]
- II) Definerer en fysisk separation af X fra komponenterne I II [capture/vask]
- III) Definerer en frigivelse af 1 fra B [eluering]

Figur 7

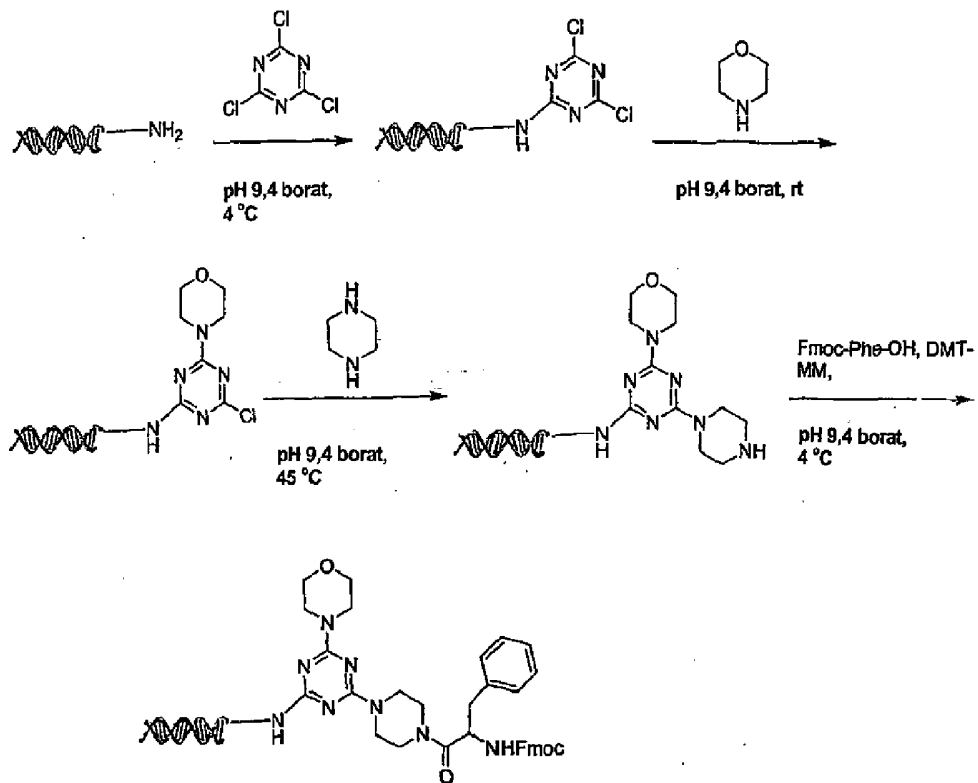




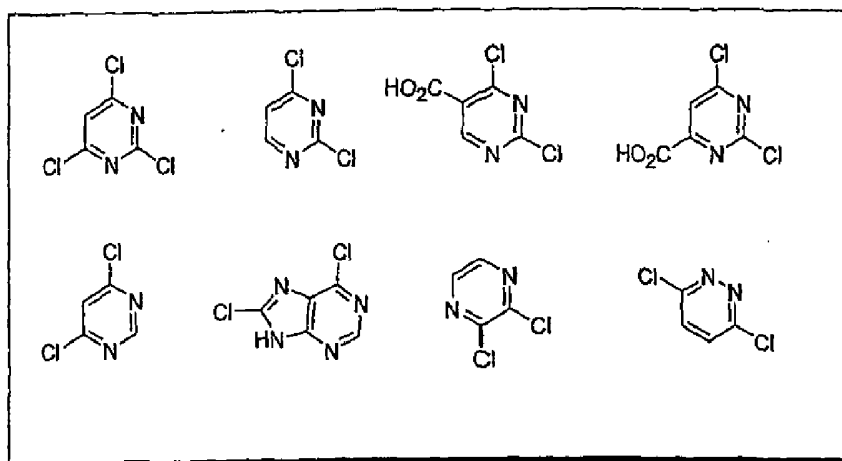
Figur 8



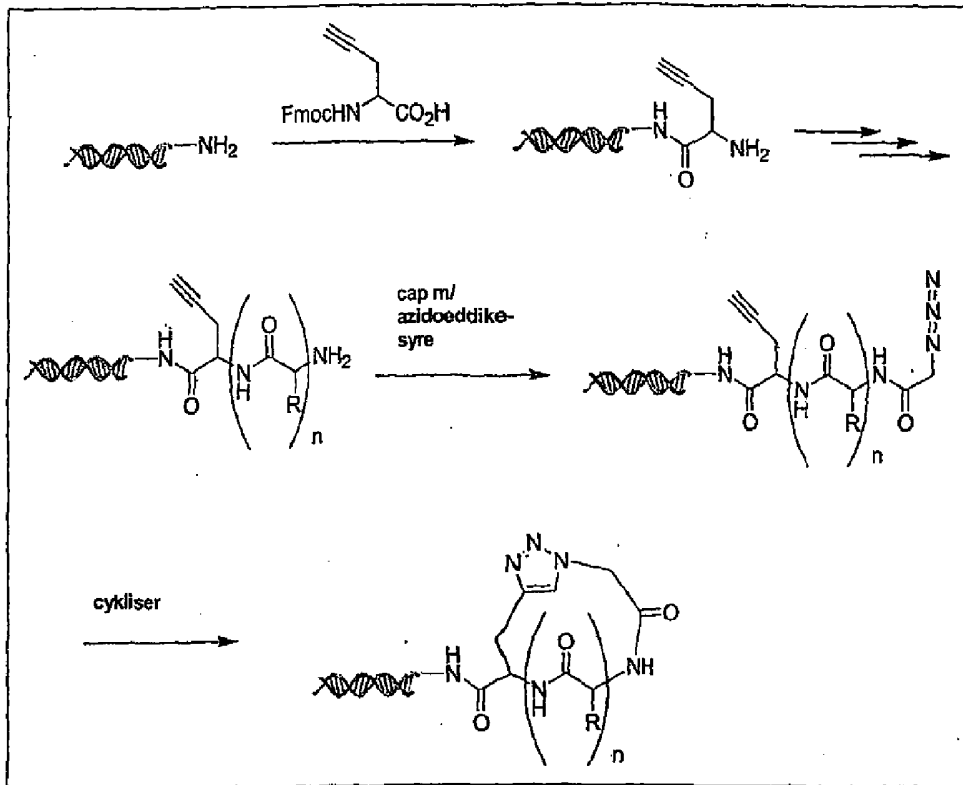
Figur 9



Figur 10

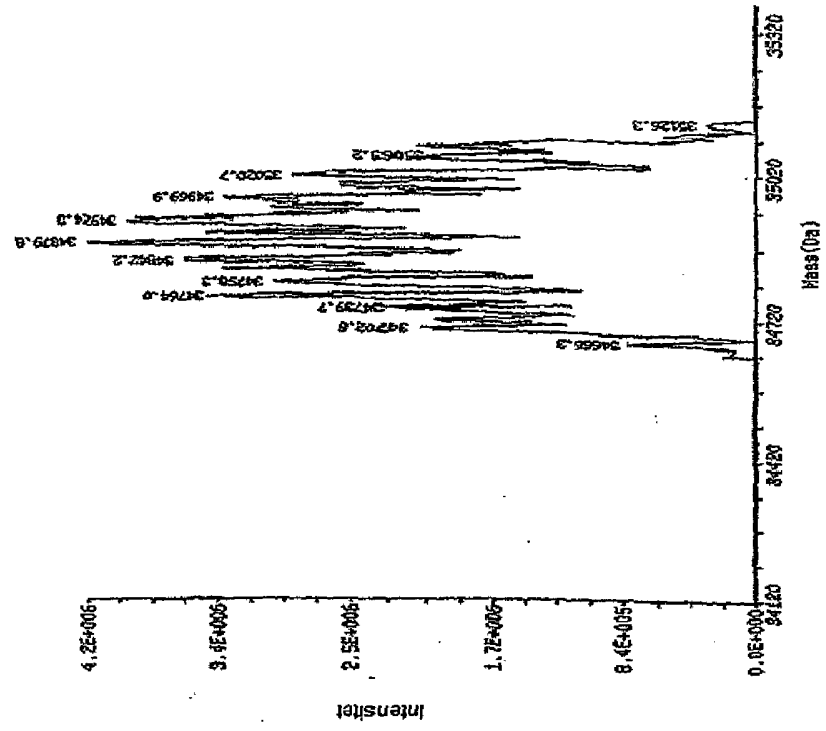


Figur 11

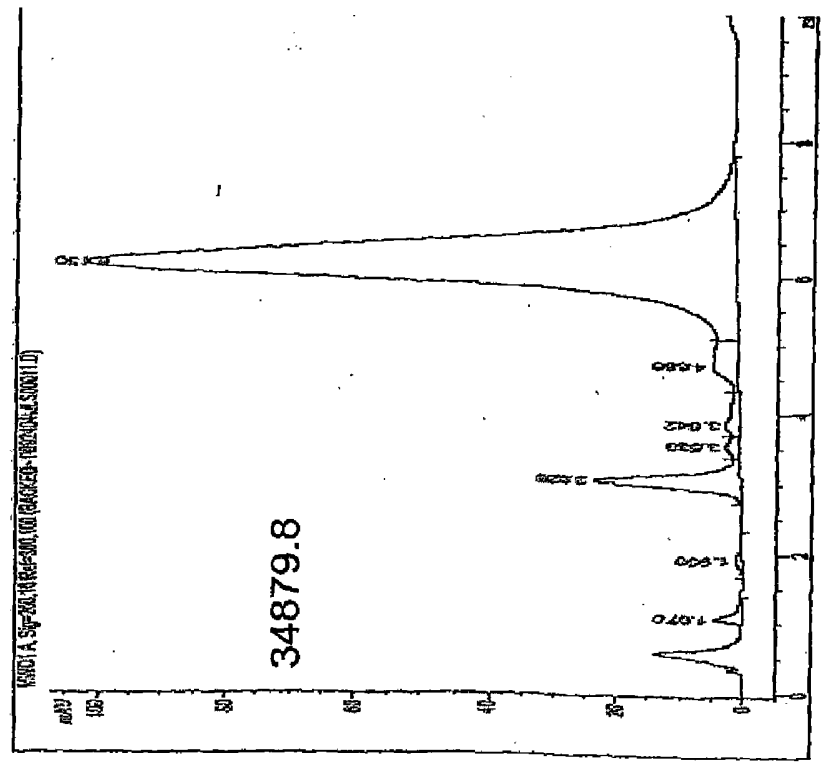


Figur 12

B



A



Figur 13