

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 10월 19일 (19.10.2023) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2023/200261 A1

(51) 국제특허분류:

B01J 19/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

B01J 19/12 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/004979

(22) 국제출원일:

2023년 4월 13일 (13.04.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0045903 2022년 4월 13일 (13.04.2022) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]: 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 천홍구 (CHUN, Hong Gu); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 206동 2101호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울특별시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

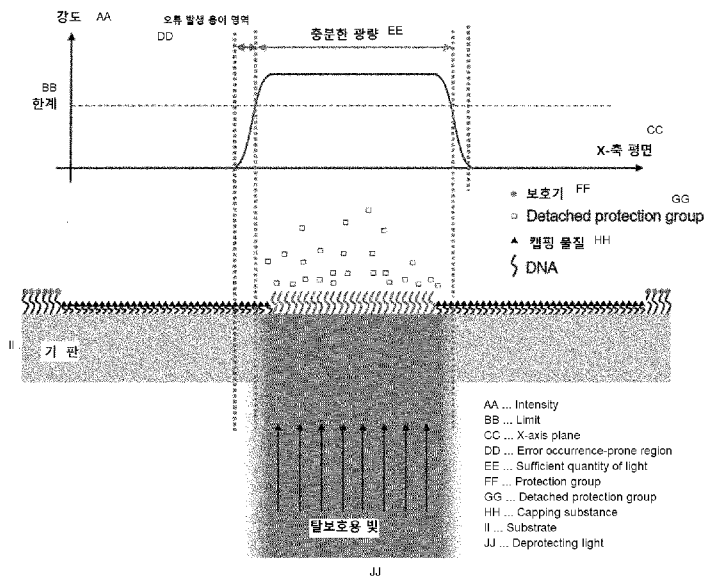
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: SELF-ALIGNMENT-BASED PRECISE DNA OPTICAL SYNTHESIS THROUGH IMAGE INVERSION

(54) 발명의 명칭: 이미지반전에 의한 자가 정렬 기반 정밀 DNA 광학 합성



(57) Abstract: The present invention is a technology that can reduce errors occurring due to insufficient light in the DNA synthesis process, wherein, DNA is deprotected and capped first in areas other than the desired DNA synthesis area and then deprotected and coupled in the desired DNA synthesis area, whereby unwanted DNA deprotection can be prevented and, as a result, DNA synthesis errors can be reduced.

(57) 요약서: 본 발명은 DNA 합성 과정에서 불충분한 빛에 의해 발생하는 오류를 감소시킬 수 있는 기술로 원하는 DNA 합성 영역을 제외한 나머지 영역에서 먼저 DNA를 탈보호 및 캡핑시키고, 이후 원하는 DNA 합성 영역에서 DNA를 탈보호 및 커플링시키면 원치 않는 DNA의 탈보호를 막을 수 있고, 결과적으로 DNA 합성 오류를 줄일 수 있다.



WO 2023/200261 A1

명세서

발명의 명칭: 이미지반전에 의한 자 가 정렬 기반 정밀 DNA 광학 합성

기술분야

- [1] 본 발명은 정밀 DNA 광학 합성을 위한 방법에 관한 것으로 구체적으로 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 빛이 원치 않는 부위의 DNA까지 탈보호시키는 것을 막아 DNA 합성 오류를 줄일 수 있는 기술이다.

배경기술

- [2] 이미지와 동영상을 주로 하는 개인 소셜 네트워크 서비스 (social network service, SNS) 매체의 증가로 데이터 생성량이 매우 빠르게 증가하고 있다. 향후 AR (augmented reality), VR (virtual reality), MR (mixed reality) 기기, 그리고 홀로그램 등 3D 미디어가 보편화되면 데이터 양은 더욱 급증할 것으로 예상된다. 구체적으로 2040년 전 세계적으로 저장된 데이터 양은 10^{24} 비트에서 10^{29} 비트에 달할 것으로 예상된다 (Summary report, Technology Working Group Meeting on future DNA synthesis technologies; September 14, 2017, Arlington, VA).
- [3] 현재 컴퓨터, 스마트폰 등 주요 기기의 데이터 저장 매체는 플래시 메모리 (flash memory)로 플래시 메모리는 1 pg 당 1 비트 (bit) 정도의 데이터 밀도 (data density)를 갖는다. 상기 2040년에 필요한 데이터 양에 해당하는 플래시 메모리를 공급하기 위해서는 10^{14} kg의 실리콘 웨이퍼가 필요하나, 2040년의 실리콘 웨이퍼 공급량은 10^8 kg 정도로 예상되어 수요에 크게 못 미친다. 또한 기존의 데이터 저장 매체는 데이터 보존 기간이 10년 내외라는 한계가 있다.
- [4] 이에 새로운 데이터 저장 매체를 개발하기 위한 시도가 계속해서 이루어지고 있으며 이중 하나가 DNA 저장 장치이다. DNA를 저장 매체로 이용하면 기존의 저장매체의 단점인 데이터 저장 밀도를 뛰어 넘을 수 있고, 물리적인 충격에도 안정적으로 정보를 저장할 수 있다. 또한, DNA는 1 kg의 합성으로 플래시 메모리 10^9 kg에 해당하는 2×10^{24} 비트를 저장할 수 있어 대용량 데이터 저장에 적합하며, 특히 저장된 데이터의 보관기간이 매우 긴 장점이 있다. 그러나 DNA 합성 시 발생하는 오류는 데이터의 저장 밀도 저하 및 정보 손실을 일으켜 DNA 저장 장치의 상용화에 걸림돌로 작용하고 있다.
- [5] 특히, 광화학 DNA 합성 방법은 빛을 비추어 DNA 말단의 보호기를 탈보호 시키므로 빛의 회절 (diffraction), 산란 (scattering), 반사에 의해 원치 않는 영역에 빛이 도달하게 된다. 또한, DNA를 합성하고자 하는 부위에는 빛이 불충분하게 도달하는 영역이 존재하는 문제점이 있다. 이러한 문제점으로 인해 목적하지 않았던 DNA에서 탈보호가 일어나고, 목적하는 부위에서는 DNA의 탈보호가 일어나지 않게 되며, 결과적으로 DNA 합성에 오류가 발생한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 광화학 DNA 합성 과정에서 DNA를 합성하고자 하는 부위에 빛을 고르게 조사할 수 있는 방법을 연구하였고, 원하는 DNA 합성 영역을 제외한 나머지 영역에서 먼저 DNA를 탈보호 및 캡핑시키고, 이후 원하는 DNA 합성 영역에서 DNA를 탈보호 및 커플링시키는 방법을 고안하였다.
- [7] 상기 방법을 사용하면, 빛을 비추어 DNA 말단의 보호기를 탈보호 시키는 단계에서 빛이 DNA 합성 영역의 테두리 부분에는 충분한 광량을 제공하지 못함으로써 보호기가 탈보호 되는 것을 보증하지 못하는 현상을 개선할 수 있다.
- [8] 따라서, 본 발명의 목적은 상기 원리를 이용한 DNA 합성 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 하기 단계를 포함하는 DNA 합성 방법을 제공한다:
- [10] (a) DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계;
- [11] (b) DNA 합성 기관에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA의 말단을 캡핑시키는 단계;
- [12] (c) DNA 합성 기관의 조사 영역에 빛을 조사하여 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계; 및
- [13] (d) 합성하고자 하는 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계;를 포함하고,
- [14] 상기 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩된다.
- [15] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 DNA 합성 방법을 제공한다:
- [16] (a) DNA 합성 기관에 DNA 합성 위치 선택 물질을 공급하는 단계;
- [17] (b) DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계;
- [18] (c) DNA 합성 기관에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA의 말단을 캡핑시키는 단계;
- [19] (d) DNA 합성 기관에 DNA 합성 위치 선택 물질을 재공급하는 단계;
- [20] (e) DNA 합성 기관의 조사 영역에 빛을 조사하여 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계; 및
- [21] (f) 합성하고자 하는 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계;를 포함하고,
- [22] 상기 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩된다.

발명의 효과

- [23] 본 발명의 일 예에 따른 DNA 합성 방법을 사용하면 합성 과정에서 빛의 불충분한 도달에 의해 발생하는 오류를 현저히 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 합성 오류가 나타나는 원인을 개략적으로 보여준다.
- [25] 도 2는 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 DNA 합성 기관의 합성 영역에 조사된 광량을 측정한 결과이다.
- [26] 도 3은 광화학 기반 DNA 합성 방법에서 DNA 말단이 탈보호되고 새로운 뉴클레오티드가 첨가되는 과정의 일 예를 보여준다.
- [27] 도 4는 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 탈보호 분자 제공 물질에 의해 DNA 말단이 탈보호되고 새로운 뉴클레오티드가 첨가되는 과정의 일 예를 보여준다.
- [28] 도 5a는 DNA 합성 기관에서 DNA 합성 영역 (조사 영역)을 제외한 나머지 영역 (반전 조사 영역)에 먼저 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 존재하는 DNA를 탈보호시키는 과정을 보여준다.
- [29] 도 5b는 DNA 합성 기관에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 존재하는 탈보호된 DNA의 말단을 캡핑시키는 과정을 보여준다.
- [30] 도 5c는 DNA 합성 영역 (조사 영역)에 빛을 조사하여 조사 영역에 존재하는 DNA를 탈보호시키는 과정을 보여준다.
- [31] 도 6a는 DNA 합성 기관의 일 형태를 보여준다.
- [32] 도 6b 및 6c는 DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사할 때 수평 방향으로 이동시켜 빛을 조사하는 모습의 일 예를 보여준다.
- [33] 도 6d는 유효한 DNA 합성 영역 (조사 영역)을 보여 준다.
- [34] 도 6e는 DNA 합성 영역 (조사 영역)에 빛을 조사한 모습의 일 예이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 다만, 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명함에 있어, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다. 또한, 유사한 기능 및 작용을 하는 부분에 대해서는 도면 전체에 걸쳐 동일한 부호를 사용한다. 한편, 어떤 구성요소를 '포함'한다는 것은, 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [36]
- [37] 광화학 (photochemistry) 기반 DNA 합성법은 새롭게 첨가된 뉴클레오티드의 말단에 붙어 있는 보호기를 빛을 가하여 선택적으로 탈보호 (deprotection)하는 방법을 사용한다.
- [38] 도 1은 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 합성 오류가 나타나는 원인을 개략적으로 보여준다.

- [39] 포토마스크 (pohotomask) 또는 DMD (digital micromirror device)를 이용하는 DNA 합성 기판 (substrate)의 합성 영역에 선택적으로 탈보호를 위한 빛 (UV 또는 100 내지 500 nm 파장)를 조사할 때 해당 빛이 DNA 합성 기판에서 반사, 분산되거나, 또는 회절에 의해 퍼져 빛이 불필요한 영역에 도달할 수 있다. 불필요한 영역에 도달한 빛은 해당 부위의 DNA 말단에서 보호기 (protection group)를 탈보호 시키게 되고, 결국 이는 DNA 합성 오류를 초래한다.
- [40] 더 중요한 문제는 DNA 합성 기판의 목적 위치에 빛이 불충분하게 도달하는 영역이 존재하여 이들 영역에서는 보호기의 확률적 탈보호 (stochastic deprotection)가 일어나게 된다는 것이다.
- [41] 해당 영역은 도 1에서 오류 발생 용이 영역 (error prone zone)으로 표시되어 있다. 오류 발생 용이 영역에 도달하는 빛은 보호기의 탈보호에 필요한 수준 (threshold)에 미치지 못하기 때문에 일부 보호기는 탈보호가 되나, 일부 보호기는 제거되지 않고 그대로 남아 있게 된다.
- [42] DNA 합성 기판의 목적 위치에 빛이 불충분하게 도달하는 영역이 존재하는 것은 도 2를 통해서도 확인할 수 있다.
- [43]
- [44] 도 2는 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 DNA 합성 기판의 목적 위치에 조사된 광량을 측정한 결과이다.
- [45] 도 2에서 왼쪽 그림은 DNA 합성 부위에 빛이 조사되는 것을 탑 뷰 (top view)로 본 것으로 각 지점에서의 빛의 강도 (intensity)를 색으로 표현하였다. 오른쪽 그림은 빛의 강도를 x-축 (파란색), y-축 (초록색)에서 그린 것으로 DNA 합성 부위에 빛을 비출 때 가운데 영역은 일정한 광량이 유지되지만, 테두리 부분에 도달하는 광량은 구배 (gradient)를 갖고 감소하는 것을 알 수 있다. 즉, 기판에 비춰지는 빛 패턴의 명암비가 완벽하지 않다.
- [46] 도 1에 대한 설명에 기재하였듯이 테두리 부분 (도 1에서 오류 발생 용이 영역에 해당함)은 빛의 강도가 점차 감소하므로 탈보호를 위한 충분한 광량을 제공할 수 없고, 이로 인하여 특정 위치에서는 탈보호가 일어나나, 다른 위치에서는 일어나지 않을 수도 있다. 이러한 확률적 탈보호는 매우 무작위적이기 때문에 매 사이클의 DNA 합성에 있어, (n-1)번째 DNA 합성에서는 탈보호가 안된 DNA 가닥 (strand)이더라도 n번째 DNA 합성에서는 탈보호가 발생하고, 새로운 뉴클레오티드가 첨가되면 (커플링, coupling) (n-1) 번째 서열에 대해 결실 오류 (deletion error)가 발생할 수 있다.
- [47] 즉, n번째 DNA 합성에서 탈보호되는지 여부는 이전 (n-1)번째 DNA 합성에서의 탈보호 여부와 독립적이다. 이와 같은 테두리 (오류 발생 용이 영역)에서의 결실 오류 (deletion error) 때문에 매 합성 사이클에서 추가 합성이 일어나지 않도록 합성 중인 DNA 또는 핵산의 말단을 차단하는 캡핑 (capping)이 필요하며, 합성이 종료된 이후에는 목표했던 DNA 길이보다 짧은 것들은 제거하는 공정이 필요하다. 이러한 테두리에서의 에러는 길이 대 표면 비율 (length to surface ratio)이 높아

질수록, 즉, 빛이 조사되는 영역의 크기가 작아질수록, 그 영향이 커지는데, 이는 마이크로어레이 (microarray DNA) 합성의 동시합성 가능 가지수를 높이기 위하여 한 스폿 (spot)의 크기를 줄이는 것을 어렵게 만든다.

[48]

[49] 도 1 및 도 2에서 설명한 문제점을 해결하기 위해 본 발명자들은 원하는 DNA 합성 영역을 제외한 나머지 영역에서 먼저 DNA를 탈보호 및 캡핑시키고, 이후 원하는 DNA 합성 영역에서 DNA를 탈보호 및 커플링시키는 방법을 고안하였다.

[50] 먼저, 도 3은 광화학 기반 DNA 합성 방법에서 DNA 말단이 탈보호되고 새로운 뉴클레오티드가 첨가되는 과정의 일 예를 보여준다.

[51] 빛에 의해 DNA 말단의 탈보호기가 떨어져 나가면서 DNA의 5' 말단에 -OH기가 노출되므로 새로운 뉴클레오티드가 합성 중인 DNA 가닥의 말단에 결합할 수 있다. 합성에 공급되는 뉴클레오티드는 일 말단에 보호기가 결합되어 있으므로 별도의 탈보호 과정이 없으면 DNA 추가 합성이 발생하지 않는다.

[52] 빛과 직접 반응하여 떨어져 나가는 보호기에는 BzNPPOC, NPPOC, SPh-NOOPC 등이 있다.

[53] 도 4는 광화학 기반 DNA 합성 과정에서 탈보호 분자 제공 물질 (deprotecting molecule supplier)에 의해 DNA 말단이 탈보호되고 새로운 뉴클레오티드가 첨가되는 과정의 일 예를 보여준다.

[54] 빛이 조사되면 탈보호 분자 제공 물질이 빛을 받아 활성 탈보호 분자 (active deprotecting molecule)를 내놓고, 이 활성 탈보호 분자가 보호기를 공격하여 떼어낸다. 결과적으로 DNA의 5' 말단에 -OH기가 노출되므로 새로운 뉴클레오티드가 합성 중인 DNA 가닥의 말단에 결합할 수 있다.

[55] 상기 탈보호 분자 제공 물질로는 하이드로퀴논, 활성 탈보호 분자로는 수소 이온 (H^+)이 사용될 수 있으며, 보호기로는 DMT가 사용될 수 있다.

[56]

[57] 도 5는 본 발명의 일 예에 따른 DNA 합성 방법을 단계적으로 보여 주며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[58] (a) DNA 합성부의 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계;

[59] (b) DNA 합성부에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA의 말단을 캡핑시키는 단계;

[60] (c) DNA 합성부의 조사 영역에 빛을 조사하여 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계; 및

[61] (d) 합성하고자 하는 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계;를 포함하고,

[62] 상기 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩된다.

[63] 본 발명에서 사용된 용어, '반전 조사 영역'은 DNA 합성 기관에서 DNA를 합성하고자 하는 영역 이외의 나머지 영역을 말하며, '조사 영역'은 DNA 합성 기관에서 DNA를 합성하고자 하는 영역을 말한다.

- [64] 도 5a는 상기 방법의 (a) 단계에 해당하며, DNA 합성 기관에서 DNA 합성 영역 (조사 영역)을 제외한 나머지 영역 (반전 조사 영역)에 먼저 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 존재하는 DNA를 탈보호시키는 과정을 보여준다. 도 5a에서 탈보호 빛 (deprotecting light)이 조사되는 영역이 반전 조사 영역으로, 빛에 의해 반전 조사 영역에 위치한 DNA에서 탈보호가 일어난다.
- [65] 도 1 및 2에서 설명하였던 빛의 불충분한 도달 현상이 반전 조사 영역에 빛을 조사할 때도 발생하며, 반전 조사 영역의 테두리에도 빛이 불충분하게 도달하는 광량 감소 영역 (gradient zone)이 존재하게 된다.
- [66] 도 5a에는 이미 DNA 올리고가 DNA 합성 기관의 전체 영역에 있는 것처럼 도시하였으나 이에 한정하지 않는다. 예를 들어, DNA 합성의 가장 첫 단계인 보호기로 보호된 1-mer의 DNA가 DNA 합성 기관에 결합된 상태에서 본 단계를 수행할 수도 있고, 또는 DNA가 커플링될 수 있는 기능기 (functional group)가 DNA 합성 기관에 결합되어 있고, 상기 기능기에 보호기로 보호된 1-mer의 DNA가 연결된 상태에서 본 단계를 수행할 수도 있다.
- [67] 도 5b는 상기 방법의 (b) 단계에 해당하며, DNA 합성 기관에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 존재하는 탈보호된 DNA의 말단을 캡핑시키는 과정을 보여준다.
- [68] 사용될 수 있는 캡핑 물질에는 무수 아세트산 (acetic anhydride) 또는 N-메틸이미다졸 (N-methylimidazole)이 있으며, 캡핑 물질은 빛에 의해 DNA로부터 떨어지지 않는 특성을 가진다.
- [69] 도 5a에서 설명하였듯이 반전 조사 영역에도 빛이 불충분하게 도달하는 광량 감소 영역이 존재하며, 해당 영역에서 일부 DNA는 캡핑이 될 수 있으나 일부 DNA는 탈보호기가 그대로 남아 있을 수 있다.
- [70] 도 5a 및 5b의 단계를 거치면 DNA 합성이 일어날 수 있는 유효면적이 감소하게 된다.
- [71] 도 5c는 반전 조사 영역을 캡핑한 후 DNA 합성 영역 (조사 영역)에 빛을 조사하여 조사 영역에 존재하는 DNA를 탈보호시키는 과정을 보여준다.
- [72] 조사 영역에 빛을 조사할 때는 조사 영역 전체에 광량이 고르게 도달할 수 있도록 조사 영역보다 넓게 빛을 조사하는 것이 바람직하다. 즉, 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩되며, 이 간격은 1 nm ~ 100 um일 수 있다.
- [73] 조사 영역보다 넓게 빛을 조사하면 도 1에서 설명한 오류 발생 용이 영역이 도 5a에서 설명한 광량 감소 영역과 중첩되며, 이 중첩된 부분은 캡핑 물질에 의해 DNA 말단이 막혀 있으므로 빛의 영향을 받지 않는다. 따라서, 빛이 고르게 도달한 영역에서만 DNA 탈보호 및 커플링이 일어난다.
- [74] 반전 조사 영역 및 조사 영역에의 빛의 조사는 0.1 나노초 내지 10분 동안 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [75]

- [76] 한편, 도 5에서는 DNA 5' 말단이 빛에 의해 직접 떨어져 광 민감 보호기(photo-labile protection group)으로 보호된 경우를 예로 들었으나 본 발명은 이에 한정하지 않는다. 예를 들어, 도 2에 도시된 바와 같이, 빛이 탈보호 분자 제공 물질과 반응하여 활성 탈보호 분자를 방출하고, 이 활성 탈보호 분자가 DNA 5' 말단에 붙은 DMT와 같은 보호기를 제거하는 경우에도 본 발명을 적용할 수 있다.
- [77] 이러한 탈보호 분자 제공 물질을 사용할 경우 상기 DNA 합성 방법은 다음일 수 있다:
- [78] (a) DNA 합성부에 DNA 합성 위치 선택 물질을 공급하는 단계;
- [79] (b) DNA 합성부의 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계;
- [80] (c) DNA 합성부에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA의 말단을 캡핑시키는 단계;
- [81] (d) DNA 합성부의 조사 영역에 빛을 조사하여 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계; 및
- [82] (e) 합성하고자 하는 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계;를 포함하고,
- [83] 상기 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩된다.
- [84] 본 발명에서, 용어 'DNA 합성 위치 선택 물질'이란 DNA 합성 과정에서 원하는 위치에서만 DNA를 합성하는데 필요한 물질을 말하며, 수소 이온 발생 물질, 수산화 이온 발생 물질 또는 2가 양이온 제공 물질과 같은 탈보호 분자 제공 물질일 수 있다.
- [85]
- [86] 도 6a는 DNA 합성 기관의 일 형태를 보여준다.
- [87] 도 6b 및 6c는 DNA 합성 유효면적을 충분히 감소시키기 위하여 DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사할 때 수평 방향으로 이동시켜 빛을 조사하는 모습의 일 예를 보여준다. 중앙의 사각형이 DNA를 합성하고자 하는 조사 영역이고, 나머지 사각형이 반전 조사 영역이다.
- [88] 도 6b는 반전 조사 영역을 DNA 합성 기관에 대해 +x 방향으로 이동시켜 빛을 조사한 것이고, 도 6c는 반전 조사 영역을 DNA 합성 기관에 대해 -x 방향으로 이동시켜 빛을 조사한 것이다. 동일한 방식을 +y, -y 방향에 대해서도 반복할 수 있다.
- [89] 도 6d는 반전 조사 영역을 DNA 합성 기관에 대해 +x, -x, +y 및 -y에 대해 이동시킨 후 빛을 조사했을 때 유효한 DNA 합성 영역(조사 영역)을 보여 준다. 원래의 사각형 크기보다 유효 면적이 감소한 것을 볼 수 있다.
- [90] 도 6e는 DNA 합성 영역(조사 영역)에 빛을 조사한 모습의 일 예로 도 6d의 유효한 DNA 합성 영역보다 빛의 조사 범위가 넓으나 실제 DNA 합성은 유효 범위에서만 일어나게 된다.
- [91]

- [92] 상기 설명한 본 발명의 DNA 합성법은 DMT, BzNPPOC 등의 보호기를 고해상으로 선택적으로 탈보호시켜 마이크로어레이 (microarray) 형태로 원하는 부분에 원하는 모노머를 도입하는 데에 쓰일 수 있으나, 본 발명은 이에 한정하지 않는다.
- [93] 도 1 내지 5에서 설명한 DNA 합성은 모두 유기용매를 사용하는 포스포라미다이트 (phosphoramidite)에 의한 DNA 합성이나 본 발명은 DNA 합성 효소 (DNA polymerase) 기반 방법에도 적용될 수 있다.
- [94] DNA 합성 효소 중에서 TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase)는 예외적으로 주형 DNA가 없이도 임의 서열의 단일 가닥 DNA를 합성할 수 있다. TdT를 이용한 DNA 합성에 있어 가장 중요한 이슈는 A, G, T, C 중 원하는 모노머를 어떻게 도입할 것인가로 본 발명을 사용하면 상기 이슈를 해결할 수 있다.
- [95] 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 DNA 합성 위치 선택 물질로부터 2가 양이온을 방출시키고, 캡핑되어 있는 DNA 모노머를 도입하여 2가 양이온에 의해 활성화된 TdT에 의하여 커플링되게 함으로써, 해당 영역에는 더이상 DNA 합성이 일어나지 않게 방지할 수 있다.
- [96] 또는 DNA 합성 기관이 보호기로 코팅되어 있을 때는 반전 조사 영역에 빛을 조사하여, 용액 중의 탈보호 분자 제공 물질이 활성 탈보호 분자 (수소 이온)를 방출하고, 이 활성 탈보호 분자가 보호기를 떼어내도록 할 수 있다. 보호기가 제거되면 캡핑되어 있는 DNA 모노머를 도입하여 활성화된 TdT에 의하여 커플링되게 함으로써, 해당 영역에는 더이상 DNA 합성이 일어나지 않게 방지할 수 있다.

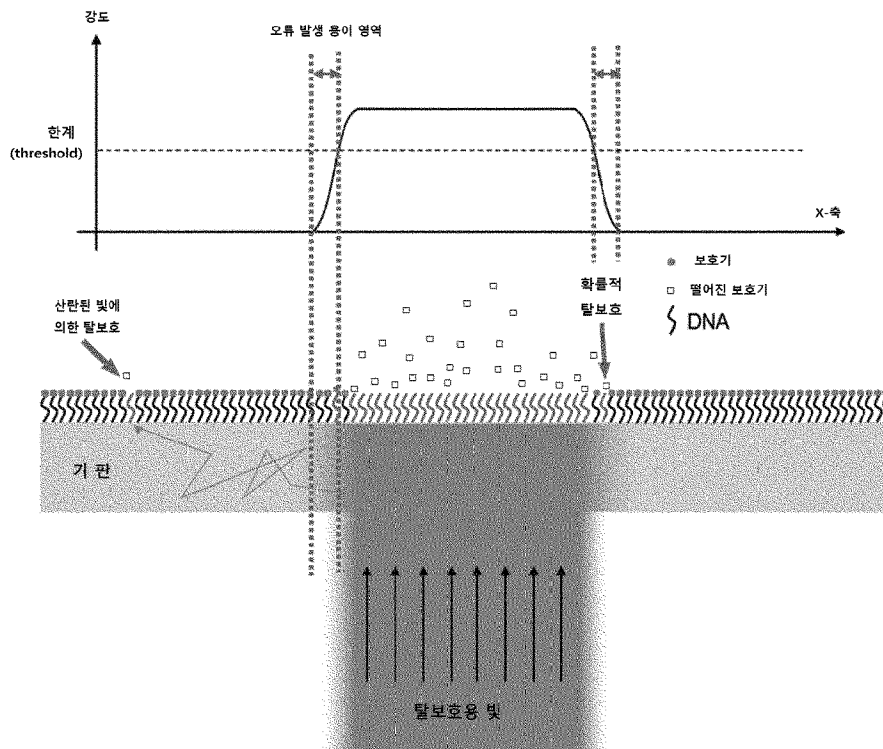
청구범위

- [청구항 1] (a) DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계;
 (b) DNA 합성 기관에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA의 말단을 캡핑시키는 단계;
 (c) DNA 합성 기관의 조사 영역에 빛을 조사하여 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계; 및
 (d) 합성하고자 하는 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계;를 포함하고, 상기 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩되는, DNA 합성 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 및 (c)에서 빛의 조사는 0.1 나노초 내지 10분 동안 수행되는, DNA 합성 방법.
- [청구항 3] (a) DNA 합성 기관에 DNA 합성 위치 선택 물질을 공급하는 단계;
 (b) DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계;
 (c) DNA 합성 기관에 캡핑 물질을 공급하여 반전 조사 영역에 위치한 DNA의 말단을 캡핑시키는 단계;
 (d) DNA 합성 기관에 DNA 합성 위치 선택 물질을 재공급하는 단계;
 (e) DNA 합성 기관의 조사 영역에 빛을 조사하여 조사 영역에 위치한 DNA를 탈보호 시키는 단계; 및
 (f) 합성하고자 하는 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계;를 포함하고, 상기 반전 조사 영역과 조사 영역은 테두리가 중첩되는, DNA 합성 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 (b) 및 (e)에서 빛의 조사는 0.1 나노초 내지 10분 동안 수행되는, DNA 합성 방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 (a) 및 (d)에서 DNA 합성 위치 선택 물질은 수소 이온 발생 물질, 수산화 이온 발생 물질 또는 2가 양이온 제공 물질인, DNA 합성 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 수소 이온 발생 물질은 하이드로퀴논인, DNA 합성 방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 수산화 이온 발생 물질은 퀴논인, DNA 합성 방법.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 2가 양이온 제공 물질은 DMNP-EDTA인, DNA 합성 방법.
- [청구항 9] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 방법은 뉴클레오티드 용액을 공급하는 단계 이후 DNA 합성 기관을 세척하는 단계를 추가로 포함하는, DNA 합성 방법.
- [청구항 10] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 DNA 합성 기관의 반전 조사 영역에 빛을 조사하는 것은 i) 반전 조사 영역과 일치되게 빛을 조사하거나, 또는 ii)

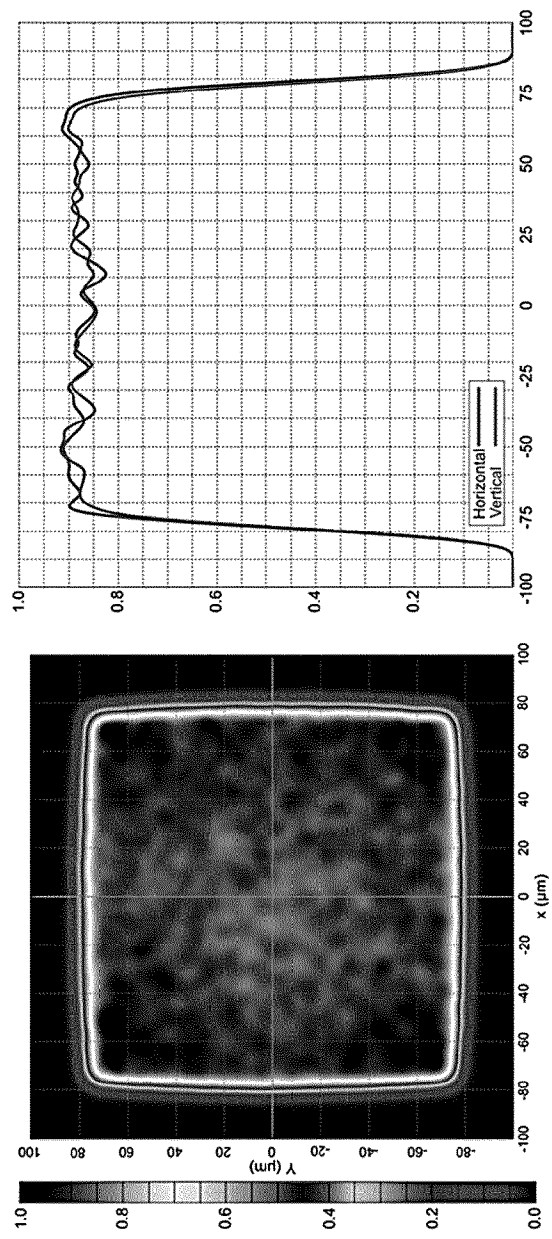
반전 조사 영역에서 수평 또는 수직으로 이동한 영역에 빛을 조사하는 것
인, DNA 합성 방법.

- [청구항 11] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 캡핑 물질은 무수 아세트산 (acetic anhydride) 또는 N-메틸이미다졸 (N-methylimidazole)인, DNA 합성 방법.

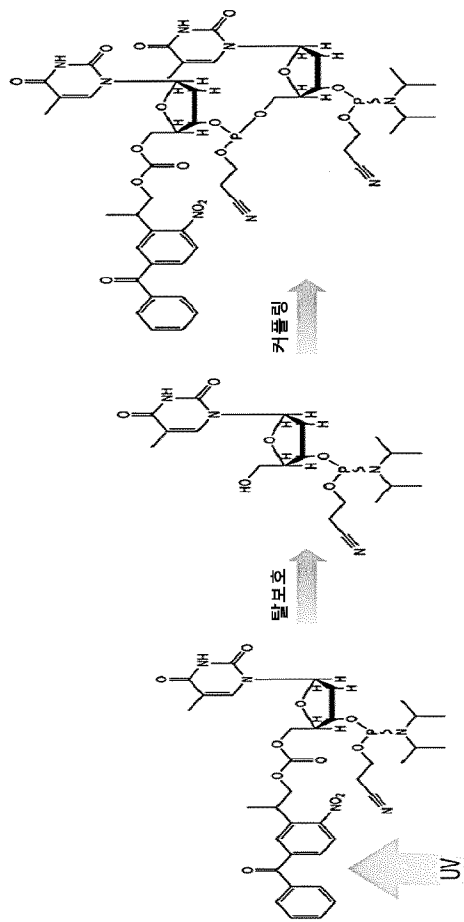
[도 1]



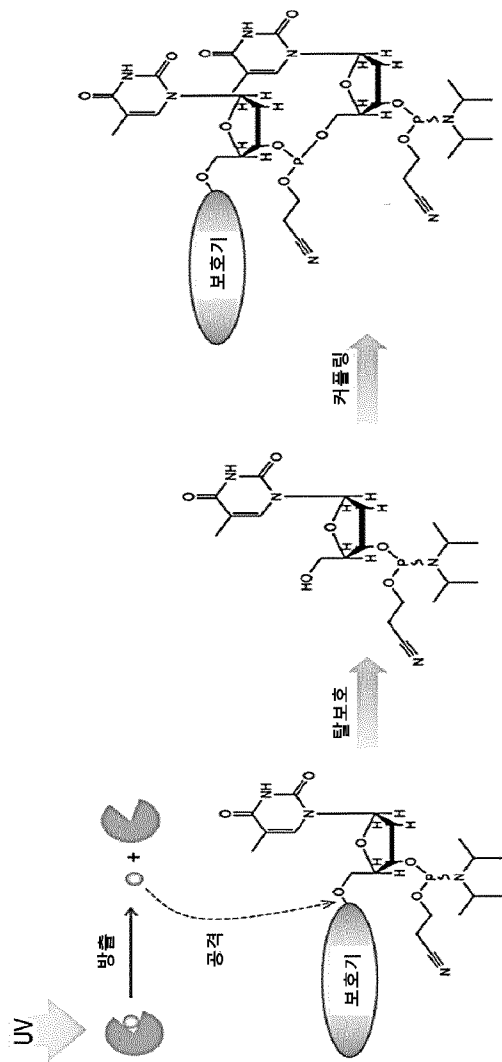
[도2]



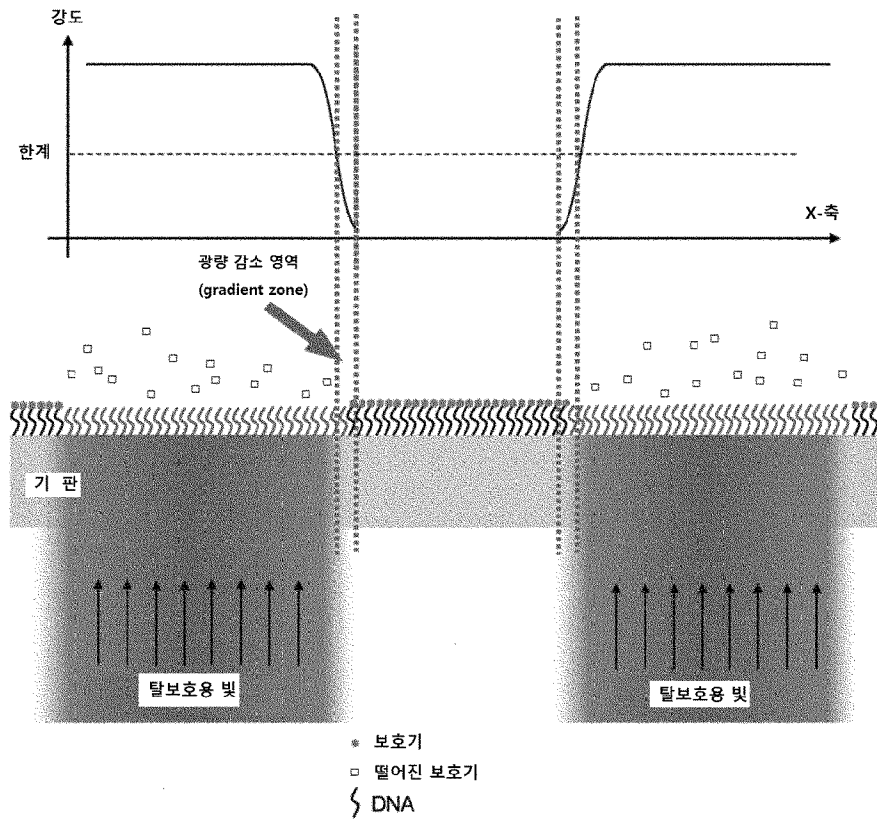
[도3]



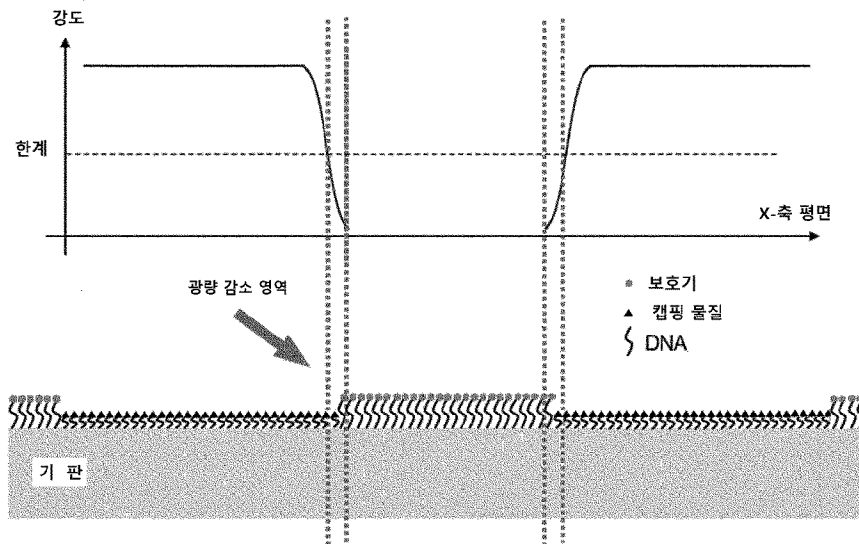
[도4]



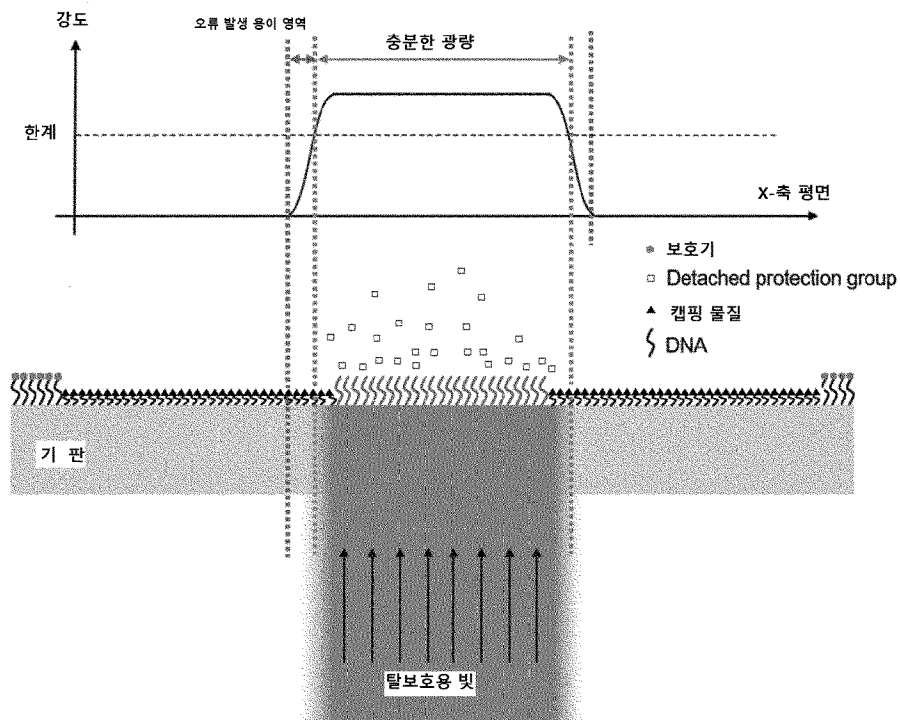
[도5a]



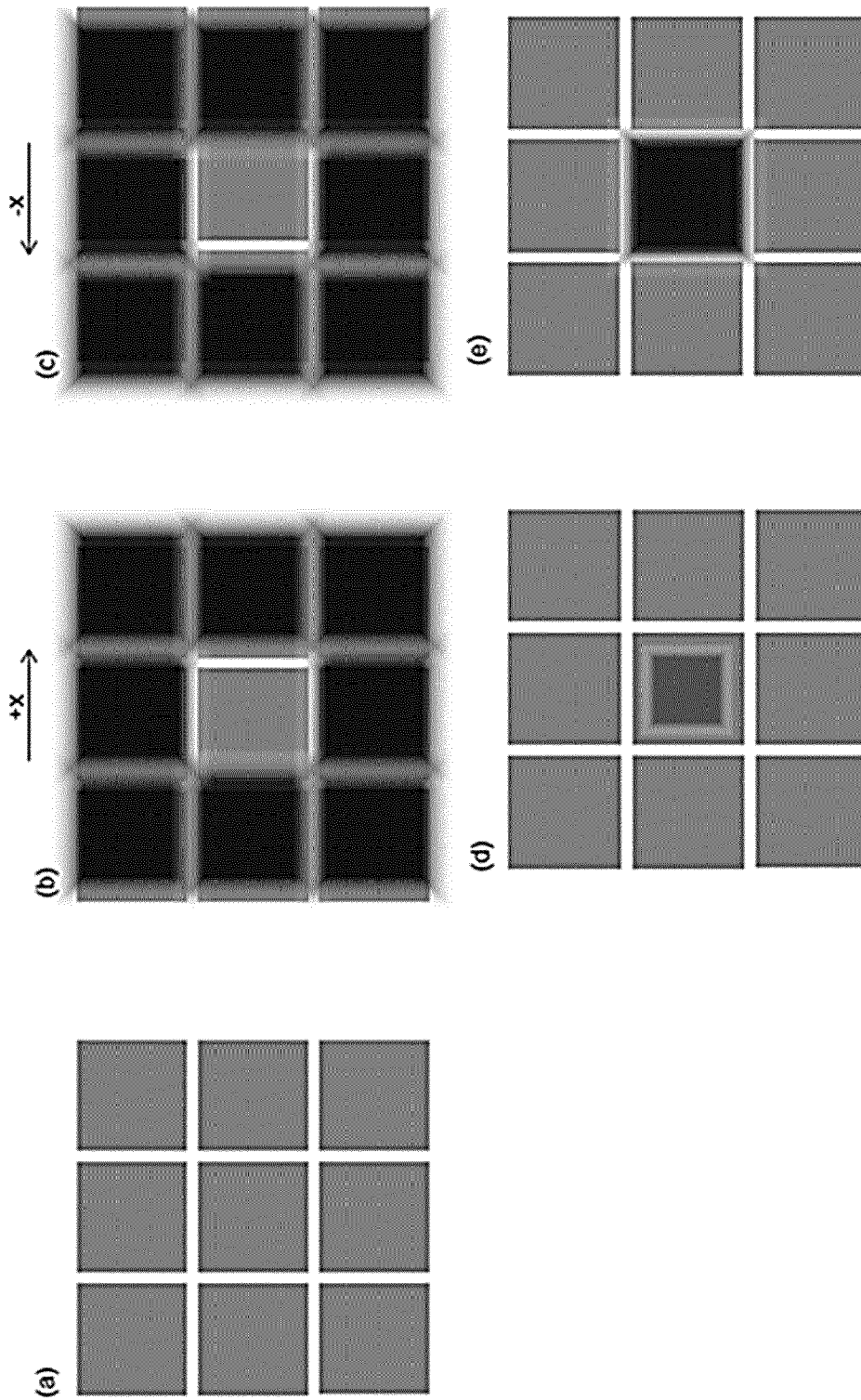
[도5b]



[도5c]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/004979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**B01J 19/00**(2006.01)i; **B01J 19/12**(2006.01)i; **C12N 15/10**(2006.01)i; **C07H 21/04**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01J 19/00(2006.01); C07H 21/02(2006.01); C40B 40/08(2006.01); C40B 50/18(2006.01); G03F 7/20(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 반전 조사(adverse radiation), 빛 조사(light radiation), DNA, 합성(synthesis), 기판 (substrate), 광화학(photochemical), 탈보호(deprotection), 캡핑(capping), 핵산(nucleic acid), 뉴클레오티드(nucleotide)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007-0134677 A1 (KIM, C. et al.) 14 June 2007 (2007-06-14) See abstract, claims 1-2, 11 and 13, and paragraphs [0039]-[0041].	1-11
A	RICHMOND, K. E. et al. Amplification and assembly of chip-eluted DNA(AACED) : a method for high-throughput gene synthesis. Nucleic acid Research. 2004, vol. 32, no. 17, pp. 5011-5018. See entire document.	1-11
A	US 2010-0227780 A1 (CERRINA, F. et al.) 09 September 2010 (2010-09-09) See entire document.	1-11
A	US 2003-0143724 A1 (CERRINA, F. et al.) 31 July 2003 (2003-07-31) See entire document.	1-11
A	US 2005-0249396 A1 (CERRINA, F. et al.) 10 November 2005 (2005-11-10) See entire document.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2023

Date of mailing of the international search report

18 July 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/004979

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2007-0134677	A1	14 June 2007	US	7994098	B2	09 August 2011
				WO	2007-070270	A2	21 June 2007
				WO	2007-070270	A3	23 August 2007
US	2010-0227780	A1	09 September 2010	EP	1066506	A1	10 January 2001
				EP	1066506	B1	21 April 2010
				EP	2180309	A2	28 April 2010
				EP	2180309	A3	07 December 2011
				EP	2180309	B1	01 November 2017
				EP	2259046	A2	08 December 2010
				EP	2259046	A3	30 November 2011
				JP	2002-504679	A	12 February 2002
				JP	4698023	B2	08 June 2011
				US	6375903	B1	23 April 2002
				US	8030477	B2	04 October 2011
				WO	99-42813	A1	26 August 1999
US	2003-0143724	A1	31 July 2003	EP	1469942	A1	27 October 2004
				JP	2006-501807	A	19 January 2006
				JP	4471660	B2	02 June 2010
				US	7157229	B2	02 January 2007
				WO	03-064026	A1	07 August 2003
US	2005-0249396	A1	10 November 2005	EP	1747524	A2	31 January 2007
				JP	2007-536512	A	13 December 2007
				US	2008-0266562	A1	30 October 2008
				US	7072500	B2	04 July 2006
				WO	2005-114551	A2	01 December 2005
				WO	2005-114551	A3	27 July 2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) B01J 19/00(2006.01)i; B01J 19/12(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) B01J 19/00(2006.01); C07H 21/02(2006.01); C40B 40/08(2006.01); C40B 50/18(2006.01); G03F 7/20(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 반전 조사(adverse radiation), 빛 조사(light radiation), DNA, 합성(synthesis), 기판(substrate), 광화학(photochemical), 탈보호(deprotection), 캡핑(capping), 핵산(nucleic acid), 뉴클레오티드(nucleotide)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2007-0134677 A1 (KIM, C. 등) 2007.06.14 요약, 청구항 1-2, 11, 13, 단락 [0039]-[0041] 참조	1-11
A	RICHMOND, K. E. 등, "Amplification and assembly of chip-eluted DNA(AACED): a method for high-throughput gene synthesis", Nucleic acid Research, 2004, 제32권, 제17호, 페이지 5011-5018 전체 문헌	1-11
A	US 2010-0227780 A1 (CERRINA, F. 등) 2010.09.09 전체 문헌	1-11
A	US 2003-0143724 A1 (CERRINA, F. 등) 2003.07.31 전체 문헌	1-11
A	US 2005-0249396 A1 (CERRINA, F. 등) 2005.11.10 전체 문헌	1-11
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년07월17일(17.07.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년07월18일(18.07.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2007-0134677 A1	2007/06/14	US 7994098 B2	2011/08/09
		WO 2007-070270 A2	2007/06/21
		WO 2007-070270 A3	2007/08/23
US 2010-0227780 A1	2010/09/09	EP 1066506 A1	2001/01/10
		EP 1066506 B1	2010/04/21
		EP 2180309 A2	2010/04/28
		EP 2180309 A3	2011/12/07
		EP 2180309 B1	2017/11/01
		EP 2259046 A2	2010/12/08
		EP 2259046 A3	2011/11/30
		JP 2002-504679 A	2002/02/12
		JP 4698023 B2	2011/06/08
		US 6375903 B1	2002/04/23
		US 8030477 B2	2011/10/04
		WO 99-42813 A1	1999/08/26
US 2003-0143724 A1	2003/07/31	EP 1469942 A1	2004/10/27
		JP 2006-501807 A	2006/01/19
		JP 4471660 B2	2010/06/02
		US 7157229 B2	2007/01/02
		WO 03-064026 A1	2003/08/07
US 2005-0249396 A1	2005/11/10	EP 1747524 A2	2007/01/31
		JP 2007-536512 A	2007/12/13
		US 2008-0266562 A1	2008/10/30
		US 7072500 B2	2006/07/04
		WO 2005-114551 A2	2005/12/01
		WO 2005-114551 A3	2006/07/27