

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3677041号  
(P3677041)

(45) 発行日 平成17年7月27日(2005.7.27)

(24) 登録日 平成17年5月13日(2005.5.13)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I		
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00		A
C 0 7 H 21/00	C 0 7 H 21/00		
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00		A
// C 0 7 K 1/02	C 0 7 K 1/02		

請求項の数 3 (全 19 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-512191</p> <p>(86) (22) 出願日 平成6年10月19日(1994.10.19)</p> <p>(65) 公表番号 特表平9-507505</p> <p>(43) 公表日 平成9年7月29日(1997.7.29)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US1994/011936</p> <p>(87) 国際公開番号 W01995/011262</p> <p>(87) 国際公開日 平成7年4月27日(1995.4.27)</p> <p>審査請求日 平成13年10月16日(2001.10.16)</p> <p>(31) 優先権主張番号 08/142,593</p> <p>(32) 優先日 平成5年10月22日(1993.10.22)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者</p> <p>ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ リーランド スタンフォード ジュ ニア ユニバーシティ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 304 パロ アルト ウェルチ ロード 900 스위트 350</p> <p>(74) 代理人 弁理士 中村 稔</p> <p>(74) 代理人 弁理士 大塚 文昭</p> <p>(74) 代理人 弁理士 穴戸 嘉一</p> <p>(74) 代理人 弁理士 竹内 英人</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレイを使用したポリマー合成装置並びに方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

液体試薬中の固体担体に、オリゴヌクレオチド構成単位を連続的に添加することによりオリゴヌクレオチド鎖を形成するために、オリゴヌクレオチド合成装置であって、  
反応ウエルを含み、かつ該ウエル内に延びた少なくとも一つのオリフィスを有するベース  
アSEMBリー、

該ウエル内に配置された少なくとも一つの固体担体、ここで該固体担体上でオリゴヌクレ  
オチド鎖を成長させかつこれに固定する、

該ウエル中で、該固体担体および該固体担体に固定された該オリゴヌクレオチド鎖の少な  
くとも1種のオリゴヌクレオチド構成単位と接触状態にある液体試薬、

該ウエル内に配置され、かつ該固体担体の該オリフィス内の通過を実質的に防止するよう  
に形成され、かつそのような寸法とされた保持手段、

該オリフィスが該ウエルへの入口とそこからの出口とを有し、かつ該ウエル中に該液体試  
薬を維持するための毛管液体封止を形成するサイズと寸法とをもつものであって、該反応  
ウエル上にかかる第一のガス圧と、該オリフィス出口にかかる第二のガス圧との間の差圧  
が予め定められた値未満である場合に、該ウエル内でのオリゴヌクレオチド鎖の成長を可  
能とし、および

該差圧が該予め定められた値を越えた場合に、該液体試薬が該オリフィスを通して該ウ  
エルから追い出されるように、該差圧を制御するための圧力調節デバイス、

を含むことを特徴とする上記オリゴヌクレオチド合成装置。

10

20

## 【請求項2】

液体試薬中に連続的にオリゴヌクレオチド構成単位を添加することにより、オリゴヌクレオチド鎖を形成するためのオリゴヌクレオチド合成装置であって、

フレームアセンブリー、

該フレームアセンブリーに移動可能に搭載され、複数の隔置されたウエルの行および列として配列された反応ウエルのアレイを含むベースアセンブリー、ここで該各ウエルは、その中に延びた少なくとも一つの各オリフィスを有する、

該フレームアセンブリーに搭載され、かつ整合のために、該ウエルの行と列との間隔に実質的に等しい距離だけ隔置された、複数のノズルの行および列として配列されたノズルのアレイを有するヘッドアセンブリー、ここで各ノズルは、制御された放出のための、液体試薬のタンクと結合されている、

該ベースアセンブリーに結合されて、該ノズル列に実質的に平行な通路に沿って、該ヘッドアセンブリーに相対的に支持体を移動させ、反応ウエルの少なくとも一つの行を、投入するためのノズルの選択された行との整合位置に配置させて、オリゴヌクレオチド鎖の合成のために、液体試薬を選択された反応ウエルに同時に投入する輸送機構、

該ヘッドアセンブリーと該ベースアセンブリーとの間に配置され、かつ内部に該反応ウエル全ておよび該ノズル全てを収容して、共通のチャンバーを形成する滑動封止、

該ウエルオリフィス各々は、該選択されたウエル中に該選択された液体試薬を維持するための毛管液体封止を形成するサイズと寸法とをもつものであって、該チャンバー内の第一のガス圧と、各オリフィス出口にかかる第二のガス圧との間の差圧が予め定められた値未満である場合に、該ウエル内でのオリゴヌクレオチド鎖の成長を可能とし、および該差圧が該予め定められた値を越えた場合に、該液体試薬が各オリフィスを通して各ウエルから追い出されるように、該差圧を制御するための圧力調節デバイス、

を含むことを特徴とする上記オリゴヌクレオチド合成装置。

## 【請求項3】

少なくとも一つの固体担体に、該担体上でオリゴヌクレオチド鎖を成長させかつこれを固定化するために、連続的にオリゴヌクレオチド構成単位を添加することによりオリゴヌクレオチド鎖を形成するための合成法であって、

A) 少なくとも一つの固体担体および該固体担体に固定された該オリゴヌクレオチド鎖の少なくとも1種のオリゴヌクレオチド構成単位と接触状態で、反応ウエル中に液体試薬を投入する工程、ここで該ウエルは該ウエル内に延びた少なくとも一つのオリフィスを有し、かつ該ウエル中に該液体試薬を維持するための毛管液体封止を形成するサイズおよび寸法を有して、該固体担体上でのオリゴヌクレオチド鎖の成長を可能とする、

B) 該反応ウエルに第一のガス圧を印加する工程、ここで該第一のガス圧と該オリフィスの出口に及ぼされる第二のガス圧との間の差圧は、該毛管液体封止を凌駕し、かつ該オリフィスを通して該ウエルから該液体試薬を追い出すのに必要とされる予め定められた値を越える、

を含むことを特徴とする、上記合成方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 技術分野

本発明は、一般的にはポリマー合成装置に関連し、より詳しくはアレイを使用したポリマー合成装置に関する。

## 背景技術

ここ最近において、オリゴヌクレオチドは、診断医学、法医学および分子生物学的研究において、次第に増大する、かつより重要となる役割を演じつつある。これらポリマーの一つの主な機能は、特に特定の核酸配列を検出するための、遺伝子プローブアッセイにおけるその用途である。

遺伝子プローブアッセイは、遺伝相談、組織適合性検査および分子生物学的研究を包含する様々な目的のために利用されている。例えば、ある個体をテストして、該個体がハンチントン病または嚢胞性線維症に関連する遺伝子を保持しているか否かを知ることができる

10

20

30

40

50

。遺伝子プローブアッセイのもう一つの用途は、組織移植の前に適合性を判定すること、および法医学的目的で組織または血液サンプルを一致させることを含む。最後に、分子生物学的研究において、これらのアッセイは様々な種由来の遺伝子の相同性を探究するために、また例えばポリメラーゼ連鎖反応(pcr)におけるように、核酸またはアミノ酸配列の一部のみが公知である遺伝子のクローニングのために、広範に利用されている。

典型的に、これらの型のアッセイは、特定の核酸配列、通常はDNA配列の存在につきテストするが、RNA配列も同様に利用できる。当分野で周知のように、これは特異的な予め決定された配列をもつように合成されたオリゴヌクレオチドを使用して達成される。あるオリゴヌクレオチドプローブの配列は、既知のアミノ酸配列、既知のDNA配列に基づくか、あるいは公知のまたは推定上のDNAまたはアミノ酸配列との相同性に基づく、「推定上」のプローブであり得る。DNAは「縮重」コードであり、かつ幾つかのDNA配列が単一のアミノ酸配列をもたらすので、アミノ酸配列に基づく遺伝子プローブアッセイは、しばしば関連オリゴヌクレオチドのプールを利用し、その各々はオリゴヌクレオチドの異なる特定の配列を有する。従って、多数の関連はするが、別々のオリゴヌクレオチドを生成して、単一の遺伝子をクローニングすることがしばしば必要となる。

実際の配列に加えて、オリゴヌクレオチドの合成において変えることのできる多くのパラメータがある。また、これらポリマーを種々の長さで合成することがしばしば必要となるが、その理由は、一般的に該オリゴヌクレオチドプローブが長い程、該遺伝子プローブアッセイがより一層特異的となるからであり、特異性は任意の特定の用途において、望ましいことも、望ましくないこともある。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドもしくはその混合物から作成できる。また、変性されたまたは標準的でない塩基をもつ、あるいは組み込まれた非-放射性ラベルをもつオリゴヌクレオチドが望ましいこともある。同様に、幾つかの用途に対しては、変更されたりボース-ホスフェートバックボーンをもつオリゴヌクレオチドを製造することも可能である。

該遺伝子プローブアッセイ以外にも、オリゴヌクレオチドの幾つかの他の用途がある。例えば、特定の配列をもつ一本鎖オリゴヌクレオチドの形成を、極めて安定なトリプレックスDNA構造を形成する際に利用できる。他の用途は、成分5'-ホスフェートオリゴヌクレオチドと連結または接合することによる、合成遺伝子およびプラスミドベクターの直接的構築を包含する。

従って、合成オリゴヌクレオチドの利用度が増すにつれて、その需要も増大している。それに応じて、これは所定の規定された配列をもつオリゴヌクレオチドの新規な合成装置およびその合成の基本的手順のための方法論の開発をもたらした。しかしながら、これらの装置および方法の利用は、一般的に高い経費を要し、また大量生産のために利用することは容易でない。典型的には、現世代の自動化DNA配列合成装置は、誘導された(derivatized)固体担体、例えば調節された孔径のガラス(controlled pore glass: CPG)を、カラムの個々の反応チャンバーに配置して、安定な係留部を設け、その上で固相合成を開始している。一連の複雑なバルブ系および該カラムに結合されたポンプを使用して、適当に選択した試薬を、前もって定められた様式で、該チャンバーを介して順次濾過する。該試薬と、サンプル支持用の多孔性フリットによって該チャンバー内に保持されかつ支持されている、該CPGに予め固定した該ポリマーユニットとの接触が、反応を生じ、そこでの連続的な成長をもたらす。

このアセンブリーの各カラムは、一群の均一な配列の規定されたオリゴヌクレオチドを迅速に大量生産するのに有効であるが、この通常のアセンブリーは、4個のカラムの利用可能性をもたらすに過ぎない。カラム容量の増加は、該バルブ系の構成の物理的限界により制限されている。結果として、僅かに4つの独立した合成サイクルを同時に実施できるに過ぎない。更に、この合成装置は、一般的に他の実験用のロボット設備と組み合わせた自動化には向かないので、各別々の合成カラムを装着し、またこれを取り外すために、作業者が手動で介入する必要がある。このような取扱いは人為的誤差を増すものである。

より重要な限界は、全ての試薬が共通のマニホールド通路を介して送り込まれることにある。従って、ただ1種の試薬またはその組み合わせを、同時に選択されたカラムに投入する

10

20

30

40

50

ことができるに過ぎない。例えば、試薬「テトラゾール」をカラム1に投入し、一方で特定のアミダイト(amidite)試薬を同時にカラム4に投入することはできない。更に、各独立の合成または反応のために、該共通のマニホールド通路およびこれに結合されたバルブ系を洗浄剤でフラッシングして、残留しているアミダイトまたは脱保護試薬が、不当にあるカラム内に投入されないようにする必要がある。この方法は、時間を浪費し、しかも作業コストを増大させる。

結合したオリゴヌクレオチドまたはペプチドのアレイの合成も、当分野において一般的に知られている。ティーバッグ??法またはディスクデザイン(disk design)としても知られている、平行合成法の一つの方法では、固体担体ビーズの個々のポケットまたはディスクのアレイを、選択されたアミダイトによる処理のために、物理的に4つのアミダイトサブセットに分割する。ビーズの各ポケットを該共通の試薬で処理した後、該ポケットを、後の合成サイクルのために、再度手動で4つのサブセットに分割する必要がある。このような分割および再分割は極めて厄介であり、またオリゴヌクレオチドの大きなアレイを調製するには労力の増大を招く。

アレイを使用したもう一つの方法は、平行オリゴヌクレオチド合成法に対するピン浸漬法である。ゲイセン(Geysen), J. Org. Chem., 1991, 56, p. 6659。この方法においては、少量の固体担体を融合して、ソレノイド型の調節されたポリプロピレンピンのアレイとし、該ピンを、後に適当な試薬を含むトレー中に浸漬する。しかしながら、アレイの密度が制限され、また使用される浸漬手順は、実施することが厄介である。

オリゴヌクレオチドアレイ合成の更に別の方法が、サザーン(Southern), ゲノムマッピンググシーケンスコンフェレンス(Genome Mapping Sequence Conference), 1991年5月, コールドスプリングハーバー(Cold Spring Harbour), N.Y.に開示されており、この方法では、硝子板の選択された領域を物理的に隠蔽し、所定の化学反応を該硝子板の隠蔽されていない部分上で実施している。この方法に関連する問題点は、各相互作用後に、前のマスクを除去して、新たなマスクを適用する必要があることにある。フォード(Fodor)等は、Science, 1991, 251, p. 767において、マスク - 誘導光化学的脱保護および合成中間体を利用した、ペプチド(および可能性としてオリゴヌクレオチド)の極めて高密度の50 $\mu$ のアレイを合成するためのもう一つの方法を記載している。この方法は、光化学的脱保護の低速およびオリゴヌクレオチド合成における副反応(例えば、チミジンダイマー形成)の生じ易さにより制限される。クラクポ(Khrapko)等, FEBS Letters, 1989, 256, p. 118は、二次元支持体上での直接合成による、多数のオリゴヌクレオチドの簡略化された合成並びに固定化を示唆しており、ここでは4種のヌクレオチド各々を、マトリックス上の所定のドット中に採取することを可能とするプリンター - 様のデバイスを使用している。しかしながら、このようなデバイスを如何に製造し、使用するかに関する詳細が与えられていない。

概して、関連技術は、一般的にヌクレオチド配列または特異的結合ペプチドのアミノ酸配列を決定するための、オリゴヌクレオチドまたはペプチドのアレイの合成に関する多数の工夫および情報を含んでいる。しかしながら、既存のまたは示唆された方法は限界があり、効果的な大規模の配列決定に必要とされる、極めて大きなアレイを有利にかつ高信頼度で大量生産するものではない。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的の一つは、配列の規定されたポリマー鎖を構築するための、ポリマー合成装置および方法を提供することにある。

本発明のもう一つの目的は、再現性よくかつ迅速に、オリゴヌクレオチドまたはペプチドのアレイを大量に調製するための、ポリマー合成装置および方法を提供することにある。更に別の本発明の目的は、オリゴヌクレオチドのアレイを大量に調製するに際して、試薬の浪費を減ずる、ポリマーの合成装置および方法を提供することにある。

本発明の更に別の目的は、節減されたコストにて、オリゴヌクレオチドのアレイを大量に調製するための、ポリマーの合成装置および方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、耐久性があり、緻密で、維持が容易であり、かつ最小数の成分を含

10

20

30

40

50

み、未熟練者による利用が容易であり、しかも経済的に製造できる、ポリマーアレイの合成装置および方法を提供することにある。

上記目的に従えば、本発明の一態様は、試薬溶液中にポリマー構成単位を連続的に添加することによる、ポリマー鎖を製造するためのポリマー合成装置を提供する。この合成装置は、一般的に隔置された関係で搭載された複数のノズルをもつヘッドアセンブリーを含む。各ノズルはこれを介して制御された様式で放出するための液状試薬のタンクに結合されている。更に、ベースアセンブリーを含み、該ベースアセンブリーは少なくとも1つの反応ウエル、および該ヘッドアセンブリーおよび該ベースアセンブリーの少なくとも一方に連結されて、それらの間に相対的運動を生ずる輸送機構をもつ。これによって、該反応ウエルと、選択された一つのノズルとが、ポリマー鎖の合成のために、液状試薬を該反応ウエルに投入する整合状態に配置される。滑動封止が該ヘッドアセンブリーと該ベースアセンブリーとの間に設けられて、該反応ウエルおよび該ノズル両者を内部に収容する共通のチャンバーを形成する。

10

この合成装置は、更に該ノズルの上流側に配置された該共通のチャンパーに通ずる入口と、該ノズルの下流側に配置された該共通のチャンパーからの出口を含むことができる。加圧ガス源が、該入口に接続されていて、該共通チャンパーを通して、その上流側から下流側に、該出口までガスを連続的に流し、該試薬から放出される有害な煙霧を該共通チャンパーから掃気し、かつ空気および湿気の拡散状態を維持する。

本発明のもう一つの局面においては、ポリマー合成装置が提供され、該装置は反応ウエルと該ウエル内に延びた少なくとも一つのオリフィスをもつベースアセンブリーを含む。少なくとも一つの固体担体を、その上でポリマー鎖を成長させかつこれを固定化するために、該ウエル中に配置する。該ウエル中の試薬溶液は、該固体担体および該固体担体に固定された該ポリマー鎖の少なくとも1種のポリマー構成単位と接触状態にある。更に、該ウエル内に配置された保持デバイスを含み、これは該固体担体が該オリフィスを通ずるのを実質的に阻止するように形成され、かつそのような寸法が与えられている。該オリフィスは該ウエルへの入口および該ウエルからの出口をもち、しかも毛管液体封止を形成して、該試薬溶液を該ウエル内に維持し、その中でポリマー鎖が成長できるようなサイズおよび寸法をもつものである。該溶液を該ウエル内に維持するために、該反応ウエルに及ぼされた第一のガス圧と、該オリフィス出口に及ぼされた第二のガス圧との間の差圧は、予め決められた値未満でなければならない。最後に、該差圧を、これが該所定の値を越えた場合に、該試薬溶液が該オリフィスを介して該ウエルから追い出されるように制御するために、圧力調節デバイスが設けられている。

20

30

本発明は、また合成装置内でポリマー鎖を合成する方法をも包含し、該方法は以下の諸工程：A)該反応ウエルと選択された一つのノズルとを、該ヘッドアセンブリーおよび該ベースアセンブリーの少なくとも一方に連結された輸送機構を通して整合させて、これらの間に相対的な運動を発生させる工程、およびB)液状試薬を、該一つのノズルを介して、該試薬タンクから該ウエルに投入して、ポリマー鎖の合成を可能とする工程を含む。最後に、C)該試薬から放出される有害な煙霧を、該チャンパーの入口に連結され、かつ該ノズルの上流側に位置する加圧ガス源からのガス流路を介して、該共通のチャンパーから、該ノズルの下流側に位置する該共通のチャンパーの出口に掃気する。

40

ポリマー合成のもう一つの方法が、ポリマー構成単位を、液状試薬中の、ポリマー鎖を成長させかつ固定するための少なくとも一つの固体担体に連続的に添加することにより、ポリマー鎖を製造するために提供される。この方法は、A)液状試薬を、適当なサイズのオリフィスをもつ該反応ウエルに、少なくとも一つの固体担体および該固体担体に固定された該ポリマー鎖の少なくとも1種のポリマー構成単位と接触状態で投入する工程と、該ウエル内の試薬溶液を保持するための毛管液体封止を形成して、該固体担体上でのポリマー鎖の成長を可能とする工程を含む。この方法の次の工程は、B)該反応ウエルに第一のガス圧を、該第一のガス圧と該オリフィスの出口に及ぼされる第二のガス圧との間の差圧が、該毛管液体封止を凌駕し、かつ該オリフィスを通して該ウエルからの該試薬溶液を追い出すのに必要な所定の値を越えるように印加することを含む。

50

**【図面の簡単な説明】**

本発明のアセンブリーは、以下の本発明を実施するための最良の態様の記載および添付の請求の範囲を、添付図面との組み合わせで考慮した場合に、より一層容易に理解されるであろう、他の目的並びに利点の特徴をもつ。ここで、

第1図は、本発明に従って組み立てられた、ポリマー合成用のアレイ装置の分解斜視平面図である。

第2図は、嵌込まれたノズル端部を示す、第1図のポリマー合成用のアレイ装置のヘッドアセンブリーを示す斜視底面図である。

第3図は、第1図のポリマー合成用アレイ装置の、断面図で示された斜視側面図であり、該共通のチャンバーを介する、不活性ガス流の掃気作用を説明する図である。

10

第4図は、第1図のポリマー合成用アレイ装置の、断面図で示された正面図であり、フレームアセンブリーに回転可能に搭載されたヘッドアセンブリーを説明する図である。

第5図は、実質的に第3図のライン5-5に沿ってとった、本発明のポリマー合成用アレイ装置の、断面図で示された拡大側面図であって、該液状試薬溶液と対応するフリットと、オリフィスとの間に形成される該毛管液体封止を示す図である。

第6図は、実質的に第3図のライン6-6に沿ってとった、本発明のポリマー合成用アレイ装置の断面図で示された、拡大側面図であり、気球封止ガスケットを示している。

第7図は、本発明のポリマー合成用アレイ装置の該ヘッドアセンブリーに搭載された放出アセンブリーの、拡大された模式的斜視平面図である。

第8Aおよび8B図は、それぞれ実施例1で作成したオリゴヌクレオチドNo. 14および15の毛管電気泳動実験の結果を示す図である。

20

**発明を実施するための最良の態様**

以下本発明を幾つかの特定の態様に関連して説明するが、該説明は本発明を例示するものであり、本発明を何等限定するものではない。添付の請求の範囲に規定される本発明の真の精神並びに範囲を逸脱することなしに、当業者は、これらの好ましい態様に対して、本発明に関する種々の改良を施すことができる。より良く理解するために、種々の図面において、類似の部材は類似の参照番号で示されていることに注意すべきである。

まず、第1図および第2図を参照すると、そこには一般的に参照番号20で示されたポリマー合成装置が示され、これは液状試薬中で固体担体に連続的にポリマー構成単位を添加することにより、ポリマーを製造するための装置である。ところで、この装置20は配列の規定されたオリゴヌクレオチドを製造するのに特に適しているが、本発明は任意のポリマー鎖の合成のために利用できる。従って、用語「ポリマー構成単位」は、同一または種類を異にする他の部分と結合して、ポリマー鎖、例えばオリゴヌクレオチドおよびペプチド鎖を形成する、ある部分として定義されるであろう。

30

一態様において、該合成装置20は、簡単に言えば、一般的に21で示されるヘッドアセンブリーを含み、該アセンブリーは一般的に隔置された関係でこれに搭載された複数のノズル22(第2図)をもつ。各ノズル22は、これを通して制御放出を行うために、液状試薬24のタンク23(第7図)に接続されている。更に、一般的に25で示されたベースアセンブリーが含まれ、これは少なくとも一つの反応ウエル26および一般的に27で示された輸送機構(第3図)を有し、該機構はヘッドアセンブリー21およびベースアセンブリー25の少なくとも一方と連結されて、その間に相対的な運動を発生する。これによって、選択された一つの反応ウエル26および選択された一つのノズル22が、ポリマー鎖を合成するために、選択された1種の液状試薬24を該反応ウエルに投入するための整合状態に置かれる。一般的に30で示された滑動封止が、該ヘッドアセンブリーと該ベースアセンブリーとの間に配置されて、共通のチャンバー31(第3図)を形成し、該共通のチャンバーは該反応ウエルおよび該ノズル両者をその内部に収容する。

40

好ましい態様において、ウエル26のアレイ(第1図)はマイクロタイタープレート32中に形成されるように設けられ、該プレートはベースアセンブリー25の滑動プレート33によって担持される。この合成装置は、12本の等距離で隔置された行34として配列された96-ウエルのマイクロタイタープレート(表示の簡略化のために、全ウエルを図示してはいない

50

)を使用するように、特別に設計されており、該列の各々は8本の等距離で隔置された列36の幅で、長いベースアセンブリー25の長手方向の軸35を横切って伸びている。マイクロタイタープレート32は、好ましくは化学的に不活性な材料、例えばポリプロピレンから作られる。勿論、任意の数のウエルまたは行列の配列が、本発明の真の精神および特徴を逸脱することなしに使用可能であると理解すべきである。

第1および2図は、更にヘッドアセンブリー21の搭載ブロック37に搭載されたノズル22が、更に該ウエルのアレイ26と同様に、ノズル行40列41のアレイとして配列されていることをも示している。好ましい態様においては、各々ヘッドアセンブリー21の長手方向の軸42と平行に伸びたノズル列41の数は、ウエル列36の数と等しい。従って、ノズルの特定のバンク即ち行40における各ノズルは、ウエル26のそれぞれの列36に対応しかつこれと整合されている。任意の1行40および列41における該ノズルも、該ウエルの行34と列36との間の間隔と同一の距離だけ等距離で隔置されており、これにより単一のサイクル中に、1以上のウエル行34と選択されたノズル行40との間の同時の整合が可能となる。即ち、ウエルのアレイを、同時の投入のために、複数の位置に沿ったノズルのアレイと整合させることができる。

10

この配列の規定されたオリゴヌクレオチド合成のためのアレイ技術は、最初にハイブリダイゼーション配列決定のための高密度オリゴヌクレオチドアレイチップアセンブリーから発展したものであり、該技術は1991年9月4日付けで出願され現在継続中の米国特許出願第07/754,617号に記載されている。従って、このアレイ技術は、単独で、本発明の新規な特徴として特許請求されていない。しかしながら、該アセンブリーは、以下に説明されるであらうように、本発明の大規模生産性に対しては適しているとはいえない。

20

ポリマー鎖の構成並びに製造を単純化するために、ノズルアレイを介して該液状試薬を制御された様式で放出するための、該合成装置の放出アセンブリー43(第7図)は、特定のバンク即ち行40中の全ノズル22を、連絡可能に共通の独立した液状試薬タンク23に連結し、一方でノズルの各バンク即ち行40各々を、特定のポリマー合成に適用される異なる液状試薬と連結する。例えば、ノズル22の第一の行40は活性化剤テトラゾールのみを分配し、一方で該第二のノズル行はアミダイトチミジンを分配することができる。オリゴヌクレオチド合成において、液状試薬分配のこの順序は、アミダイトアデノシン、シトシン、およびグアニン、補助的塩基AnyN、洗浄/反応溶媒アセトニトリル、キャップ無水酢酸、キャップN-メチルイミダゾール、ヨウ素および脱保護剤ジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸の順で継続でき、これらの試薬全ては、規定された配列のオリゴヌクレオチドの合成に使用される試薬である。ところで、説明の簡略化のために、ノズルの僅かに5行のみが図示されている。更に、該アレイ中に含まれる任意のノズルを、任意の試薬タンクと連絡可能に結合できることが理解されよう。

30

本発明の放出アセンブリー43は、各ノズルバンクを、独立の分配チューブ44を介して共通の試薬タンク23に、連絡可能に結合する。各チューブは通路45(第6図)を含み、それぞれのノズルと結合された一端と、該タンク中に含まれる該液状試薬24中で終端している他端部を有する。これらのチューブは、搭載ブロック37およびヘッドアセンブリー21のヘッドプレート47を貫いて伸びた開口46に圧嵌めされている。好ましくは該試薬と接触した際の劣化に対してより高い抵抗性のテフロン(TEFLON<sup>®</sup>)製の各チューブ44の可撓性かつ半-弾性特性は、該チューブ外部とそれぞれの開口部との間の十分な封止を与える。

40

第2および6図に示したように、各チューブ44の遠方の端部はノズル22を形成し、該ノズルは、以前はそうでなかったが、横方向に配置されたスロット50内に延び、該スロットはヘッドプレート47の底部表面51内に形成される。従って、各独立したノズル22は、相対的滑動運動中に、ベース滑動プレート33の上部面52を妨害しないように嵌込まれている。更に、各ノズルのスロット50内への独立した延びは、該ノズルから試薬を放出した後に、該ノズル端部に蓄積された残留液状試薬の除去または棄却を促進する。

ノズル22を介する液状試薬の放出に関する重要な関心事が2つある。即ち、1)該ノズルの端部に液滴が懸垂状態で残留しないように、如何にしてすっかり液滴を排出するか、および2)該試薬の流れを該ウエルに放出する場合に、如何にして該反応チャンバーの内容物の

50

はねを防止するかである。更に、該ノズルからの該試薬の射出速度は、該反応チャンバー中に放出された該第一および第二の試薬間の混合を誘発するのに十分である必要がある。非常に小さな液滴は、高い射出速度にて完全に射出できるが、該ウエル中に既に存在する液体の表面張力を凌駕して、混合を生ずるのに十分な運動エネルギーではない。これとは対照的に、大きな液滴も、高い射出速度の下で完全に放出されるが、隣接するウエルに対して該内容物を撥ね飛ばす傾向がある。低射出速度の下では、該試薬は該ノズル先端部から懸垂した最後の滴を残す傾向がある。これも該先端部断面積の関数である。その上、小さな毛管チューブを介する液体の流量は放出圧に正比例し、かつ該チューブの長さおよびその径に逆比例して変動する。放出圧およびノズルの形状並びに構成材料を開発する場合には、これら全ての変数を考慮すれば、該ノズル先端部から懸垂した液状試薬の残留滴を残すことなしに、完全に該試薬を追い出すことができる。従って、該液状試薬に依存して、これを連続流として、一連のパルスとしてあるいは液滴として分配することがより有利である可能性がある。

10

第7図に示したように、各試薬タンク23は、圧縮デバイス(図示せず)と接続された加圧チューブ53を含み、これはタンクの空気空間54を加圧して、貯蔵された該液状試薬を、該タンクから各分配チューブ44を通して流動させる。分配チューブ44を通しての試薬の放出は、該チューブに直列状に搭載された独立のバルブアセンブリー55のレイによって調節される。これらのバルブアセンブリーは、ソレノイド駆動型の微小遮断バルブを備えることが好ましく、その各々は5  $\mu$  sec以内に開放および閉鎖の動作を行い、液状試薬の正確な容量を放出することができる。

20

各分配チューブ44を横切る一定の放出圧およびその結果としてのノズル22のバンクまたは行40内の任意のノズルを介する、液状試薬の一定の放出速度を確保するために、各分配チューブは独立に該試薬タンク中に含まれる該試薬中で終端するであろう。かくして、放出のために設定されたノズルの数とは独立に、この構成は、変動するライン圧力に起因する不均一な速度での放出をもたらさない。

本発明によれば、ベースアセンブリー25およびヘッドアセンブリー21は、該ベースアセンブリーとヘッドアセンブリーとの間の相対的運動を生じさせるための輸送機構27と協働して、該ウエルのレイと複数位置におけるノズルのレイとを整合させる。好ましくは、この輸送機構は、各行34のウエルが該ノズル列41との整合状態を維持するように、長手方向の軸35に沿って(第3図の仮想線)該ベースアセンブリーを移動させる。ベースアセンブリー25は、従って矢印60の方向に往復動させるためのフレームアセンブリー57(第3および4図)によって滑動可能に支持されている。マイクロタイタープレート32を担持する、滑動プレート33は、整合された運動を行うために、フレームアセンブリー57のトラック機構61内に滑動可能に受け取られる。従って、選択されたノズル(バルブアセンブリー55を介して)によっておよび該輸送機構の操作によって該試薬の放出を調節することにより、複数の均一な群の配列の規定されたポリマーを、迅速かつ再現性のある様式で、選択されたウエル中で同時に合成できる。

30

輸送機構27は、第3図に模式的に示したステップモーターアセンブリー62を含み、これは滑動プレート33と機能可能に連結されている。従って、ベースアセンブリー25はトラック機構61および直線状に増加する運動を行わせるための該ステップモーターと協働して、ウエルのレイと、複数の位置におけるノズルのレイとを整合させる。しかしながら、該輸送機構は、該ヘッドアセンブリーと相対的に該ベースアセンブリーを運動させる、任意のモーター/トラック構成により与えることができる。

40

ポリマーの合成を開始する前に、あるいは該合成工程が終了した後に、該ウエルのレイを共通のチャンバー31の外側に配置し、該ウエル26を(ベースアセンブリー25の運動を通して)滑動封止30の右端または左端部まで移動させることによって、アクセスのために、外部環境に暴露することができる。従って、該ウエルレイを、以下に論ずるように、清浄化し、もしくは固体担体材料を搭載することができる。更に、一旦該共通のチャンバーに収容された、該ウエルおよびノズルは、第4図に示したように、ヒンジアセンブリー63を通してアクセスでき、該ヒンジアセンブリーはヘッドアセンブリー21をフレームアセン

50

ブリー57に旋回可能に搭載する。

第1、3および5図を参照すると、本発明の該滑動封止が記載されている。ホスホルアミダイトカップリングによるオリゴヌクレオチド合成においては、2つの主な化学操作上の要求がある。というのは、該カップリング反応が迅速かつ不可逆的であるからであり、水および酸素は、両者共に合成中該共通の反応チャンパーから排除することが好ましい。ホスホルアミダイトは痕跡の水の存在によって加水分解に敏感となり、かつ空気との接触によって酸化に対して敏感となる。従って、滑動封止30は、ヘッドアセンブリー21の底部表面51と、ベースアセンブリー25の上部表面52との間に配置され、その周囲に、共通のチャンパー31中の該反応ウエルおよび該ノズル両者を含む。更に、以下に一層詳細に記載されるように、不活性ガスを共通のチャンパー31を通して流して、該チャンパーから痕跡の空気および水を排除することにより、加水分解および酸化を、排除されないとしても、最小化することができる。

10

滑動封止30は、周囲からの封止状態を維持し、一方で該ベースアセンブリーが該ヘッドアセンブリーに相対的に移動することを可能とするように形成される必要がある。好ましい態様においては、滑動封止30は、ヘッド底部表面51に搭載された上端とベース上面52と滑動可能に接触した他端または下端部64とを有する、弾性かつ矩形-形状のハイドロfoil (hydrofoil) または気球封止ガスケットによって与えられる。好ましくはゴム等により構成される、この特別なガスケットは、共通チャンパー内の圧力が増大した際に、ガスケット下端部64とベース上面52との間の封止の一体性を増大する。第5図は、ガスケット下端部64が共通チャンパー31の内部に内方向に、周辺部がテーパーをもつように示されている。チャンパー内の圧が増大した場合に、ガスケット封止30の壁は外側に向かって膨張し、その結果該ガスケットの下端部と該ベース上面との間の接触表面積は増大して、これらの間を良好に封止、嵌合する。

20

滑動接触を容易にし、一方で周囲からの封止状態を維持するために、ガスケット封止30は、該ガスケットの下端部と該ベース上面との間に、好ましくはテフロン製の、粘着性の無い皮膜または層65(第5図)を含む。この層は、更に該封止ガスケットを残留液状試薬による表面吸着から保護する目的をも果たし、該残留液状試薬は、部分的にはその弾性特性のために、接触した場合に該ガスケットを劣化する傾向を示す。第5図に示したように、該ベースアセンブリーの上部面52も、テフロンの皮膜または層66を含んでいて、滑動接触を促進し、かつ該上部面を残留試薬から保護することができる。

30

ガスケットの下端部64とベース上面52との間の封止は気密封止である必要がないことを理解するであろう。この封止ガスケットの主な機能は、該反応チャンパーから酸素を排除することにある。従って、通常合成中の全期間を通じて、共通チャンパー31内を、大気圧よりも僅かに大きくて、漏洩を生ずるはずの該ガス流が外方向に向かうような、最小の正の圧力を維持することが重要である。この最小の正の圧力差は、一般的に約1/100psi ~ 約1/10psiである。

前に示した如く、また第3、5および6図に見られるように、該チャンパーの反応上部空間から、痕跡の空気および水を、不活性ガス、好ましくはアルゴンによってフラッシングして、合成中の該アミダイトの加水分解および酸化を最小化することが望ましい。更に、該上部空間を介して、該不活性ガスを連続的に流して、反応性のアミダイトを、キャッピングおよび脱保護試薬、例えば水性ヨウ素蒸気またはトリクロロ酢酸から保護することも望ましい。該試薬は該アミダイトと反応するであろう。この保護は、ガス入口70から共通チャンパー31を通して不活性ガスの流れ(矢印67で示されている)を導入することにより達成され、該入口70はノズル22のアレイの上流側に位置し、また該不活性ガスは、該ノズルの下流側に位置するガス出口71を通して、該チャンパーを出ていく。ガス入口70は、入口管72(第1図)を通してガス源(図示せず)に接続され、該ガスは更に外部からの酸素の流入を阻止するために必要な正の圧力を、共通のチャンパー31に与える。該共通チャンパーの上部空間は比較的小さい(図では例示のために誇張されている)ので、該ノズルを通過した十分なガス流が、大容量のガスを消費することなく、該チャンパーを掃気しもしくはフラッシングするように工夫することができる。

40

50

該ガス入口は、ヘッドプレート47内に延びかつ該ヘッドプレート47の長手方向の軸42を横断して配列された、長い入口スロット70(第2図)によって与えられることが好ましい。この形状および配向は、上流部入口70から下流部入口71まで実質的に不活性ガスの層流を誘導し、これは該ノズルを横切る交叉流れを最小化し、かつ緩慢な試薬蒸気の不動領域を、該チャンバーから排除する。該ガス入口は、またヘッドプレート47を横切って延びた一群の開口によって与えられてもよく、しかもガス入口71は更に長いスロットまたは一群の開口によって与えられてもよいことに気づくであろう。

該チャンバーを介する該ガス流のために、酸および水分に敏感なホスホラミドは、該脱保護剤およびキャッピング剤の上流側に配置され、拡散ガスバリアーを形成し、これは掃気効果を最大とする。従って、第3図に示すように、該ホスホラミドは、ガス入口70に近接したノズル22から分配され、一方キャッピング剤、洗浄剤および脱保護剤は、該ホスホラミド分配ノズルの下流側の、ガス入口71近傍に位置するノズルから分配される。

本発明のもう一つの局面においては、第5および6図に最もよく示されているように、ポリマー合成装置20は、反応ウエル26を備え、該ウエルは一般的に74で示され、該ウエル内に延びている少なくとも1個のオリフィスを有する。少なくとも一つの固体担体75が該ウエル内に配置され、その上でポリマー鎖を成長させかつこれを固定化している。ウエル26中の試薬溶液76は固体担体75および該固体担体に固定された少なくとも1種のポリマー構成単位と接触状態にある。オリフィス74は該共通チャンバー側からウエル26への入口77と、該ウエルから下部溜めます81への出口80を有する。重要なことは、該オリフィスが、そこに含まれる試薬溶液76に関して毛管液体封止を形成して、該試薬溶液を該ウエル内に保持し、その中でのポリマー鎖の成長を可能とするようなサイズおよび寸法をもつことである。更に溶液76をウエル26に維持するために、反応ウエル26中の該試薬溶液に及ぼされる共通チャンバースガス圧と、オリフィス出口80に及ぼされる第二のガス圧(第6図では、矢印79で示されている)との間の圧力差を、所定の値未満にする必要がある。最後に、圧力制御デバイス82が、該圧力差を、これが該所定の値を越えた場合に、該試薬溶液76をオリフィス74(第5図)を介して該ウエル26から排除するように調節するために設けられている。

簡単に言えば、選択されたウエル26'と選択されたノズル22'との間の適当な整合後に、該アレイ技術および上記の新規な装置を使用して、該液状試薬を選択されたウエル26'に投入できる。この投入された試薬溶液は、正確な寸法とされたオリフィス74を横切って集まり、比較的小さな圧力差(所定の値を越えない)との組み合わせで、オリフィス74を横切るメニスカスを形成して、該オリフィスを通して排出されることなく、該ウエル中に該溶液を保持するための毛管液体封止を生成する。この封止は、効果的に該共通反応チャンバーを、下部溜めます81の周囲から分離する。該合成反応を完了するのに十分な時間(一般的には、約1分)の経過後、該試薬溶液をオリフィス74を介してウエル26から下部溜めます81にパージする。これは、該ガス圧差を、該オリフィス内の毛管力を凌駕する、該所定の値を越えて増大させることによって達成される(第5図)。引き続き、このパージした試薬溶液を、排液出口83を介して、該溜めますから抜き出すことができる。この工程を各合成サイクル(即ち、脱保護、洗浄、カップリング、キャッピングおよび酸化段階)につき、所定の配列の規定されたポリマーが製造されるまで繰り返す。

一般的に84で示された保持デバイスが含まれ、これはウエル26の底部の、オリフィス74と該固体担体75との間に配置されており、該固体担体が該オリフィスを通り抜けるのを実質的に阻止するように形成され、かつそのような寸法が与えられている。保持デバイス84は、好ましくはポリエチレンまたはガラス繊維フリットで与えられ、該試薬溶液の通過を可能とし、一方で該固体担体および該ウエル内の該担体上で成長するポリマー鎖を保持する、フィルタ膜として機能する。従って、該フリットの多孔度も、該毛管液体封止の形成および該反応ウエルをパージするのに必要な該圧力差を決定する際のファクタとなる。

共通チャンバー31と下部溜めます81との間の圧力差を調節し、かつ制御するために、上記の如く、これら間に圧力調節デバイス82が機能可能に接続されている。好ましい態様において、圧力調節デバイス82は、共通チャンバー31のヘッドスペースから試薬毒物をフラ

10

20

30

40

50

ッシングするのに使用される、ガス流動アセンブリーと一体化されている。該不活性ガスが、ガス入口70からガス出口71まで、該チャンパーを自由に掃気する際に、最小の圧力差は、一般に約1/100psi ~ 約1/10psiの範囲に維持される。この圧力差は、周囲空気の該共通のチャンパー内への漏洩を防止するのに十分に正の値であり、かつ各ウエル内の該毛管液体封止の毛管力を凌駕するには不十分である。不活性ガスのガス出口71を介する流出を阻止または制限することにより、チャンパー31内部の圧力を高め、これにより該溜めますの圧が同一のまたはより高い速度で増大しない場合には、該ウエルをパージ（第5図）するための該圧力差を高めることができる。

従って、該圧力調節デバイス82は、ガス出口71と接続したチャンパーバルブ85（第1図）を含み、これは共通チャンパー31を掃気する不活性ガスの流出を制御する。従って、チャンパーバルブ85を介する流れを十分に遮りもしくは制限することにより、該差圧を該所定の値以上に上げて、同時に該ウエルの試薬溶液をパージすることができる。同様に、チャンパーバルブ85を十分に開放することにより、該投入された溶液を該選択されたウエル中に維持したい場合には、該差圧を該所定の値以下に下げることができる。

該ウエル中に十分な液体ヘッドが存在するか、あるいは該共通チャンパーと該下部の溜めますとの間が、該オリフィス中の該毛管力を越えるのに十分なガス圧差となるまで、該液状反応溶液はウエルオリフィス74から漏洩またはパージされないであろう。該オリフィスからの重力によりおよび圧力により誘発される漏れの割合は、主として溶媒の粘性、該フリットの多孔度、該オリフィスのサイズ、および該ガス圧力差によって支配される。例えば、10 $\mu$ UHMWポリエチレンフリットおよび0.015in<sup>2</sup>オリフィスは、該オリフィス中の該毛管力を越える前に、少なくとも0.79inのアセトニトリル（粘度約0.345cps（操作温度約約68°Fにおいて $7.2 \times 10^{-5}$  (1bf·s)/ft<sup>2</sup>）を有する）ヘッドを維持するであろう。他方、該圧力差を該所定の値（一般に約1psi）を越えて、約5psiまで増大することにより、該ウエルのパージは迅速に起こるであろう。実際に、約2.5psi ~ 約5psiの範囲内の圧力差を維持して、試薬溶液と同時に該反応ウエルを十分にパージすることが必要である。個々のウエルが空になるにつれて、該マイクロタイタープレートの空となったウエルを介する不活性ガスの流量は実質的に増大し、共通チャンパー31内の圧を低下する。従って、この内圧の低下は、更に該オリフィスを通る該試薬溶液のパージまたは排液速度を減ずる。これはフィルタ膜84を保持することにより大きくなる。

この圧力差は、また該反応ウエルをパージするために、下部溜めます81内を真空にすることによっても発生することが理解されよう。第1図は、下部溜めます81へのアクセス開口86がカバー87によって封止でき、かつ排液出口83が、該溜めます内に真空を発生する真空ポンプと接続可能であることを示している。該圧力差は、共通チャンパー31内の正の圧力と溜めます81内の真空との組み合わせによっても生成される可能性がある。更に、該試薬溶液は該チャンパーを連続的に流動するというよりも、その反応のために該反応ウエル中に集められるので、幾つかの他の公知技術のアセンブリーで使用されているように、試薬の消費は実質的に最小化され、従って経費の節減が図られる。労働コストも各サイクル時間を最小化することにより下げられる。

全ての同時に行われる機能を調和させるために、制御機構90（第7図）が、輸送機構27、バルブアセンブリー55および圧力調節デバイス82の間に動作可能に接続されている。配列ファイルを入力でき、該配列ファイルはウエル位置、規模、最終的な脱保護指令および各オリゴヌクレオチドに対するATGCおよびN（異常塩基）配列に関する順序立ったリストを含む。この配列ファイルはコマンドファイルと協働し、該コマンドファイルは、脱保護/洗浄/カップリング/キャッピング/酸化工程の実際の数および順序、並びに完全なカップリングサイクルを規定する、待機および加圧および/または真空排気段階の期間の長さを示すのに使用される。

オリゴヌクレオチドは、典型的には3'-サクシネート結合により調節された多孔度をもつガラス(CPG)に前もって結合された第一のヌクレオチドを有する該CPG製の固体担体上で合成される。従って、ポリマー合成の準備の際に、各ウエルには正確なCPG誘導体が独立に担持される。プレート全体の合成を、ただ一つのCPG誘導体、例えばT（即ち、dT-Icaa-C

10

20

30

40

50

PG) を使用して開始することができるが、あらゆる塩基が該第一の位置に存在し得るアレイ合成を実施することがより望ましい。しかしながら、各ウエルに適当に乾燥したCPG誘導体0.5mgを計り取ることは面倒かつ時間浪費である可能性がある。

本発明では、平衡化密度スラリー法(balanced density slurry technique)を利用して、正確な量のCPGを反応ウエルに投入する。懸濁溶液中に該CPGを懸濁することにより、自動的にまたは手で、ピペットで対応する体積の懸濁溶液を計り取ることによって、所定量のCPGをウエル内に正確に投入できる。例えば、CPGの沈殿していない10%-1%w/v懸濁液を、2.5/1 v/vのジプロモメタン - ジクロロメタン溶液中で調製できる。引き続き、上記の方法を利用した合成の前に、該CPGを洗浄し、懸濁溶液のパーズを行うことができる。

本発明のもう一つの局面においては、ポリマー鎖の合成法が提供され、該方法は以下の諸工程：A)反応ウエル26と、合成装置20の選択された一つのノズル22とを、ヘッドアセンブリ-21およびベースアセンブリ-25の少なくとも一方に連結された輸送機構27を通して整合させて、これらの間に相対的な運動を発生させる工程、およびB)液状試薬24を、該一つのノズルを介して、試薬タンク23からウエル26を投入して、ポリマー鎖の合成を可能とする工程を含む。最後に、C)該試薬から放出される有害な煙霧を、共通チャンバー-31の入口70に連結され、かつ該ノズルの上流側に位置する加圧ガス源からのガス流路を介して、共通のチャンバー-31から、該ノズルの下流側に位置する該共通のチャンバーの出口71を介して、該チャンバーから掃気する。

ポリマー合成のもう一つの方法が、ポリマー構成単位を、液状試薬中で、ポリマー鎖を成長させかつ固定するための少なくとも一つの固体担体に連続的に添加することにより、ポリマー鎖を製造するために提供される。この方法は、A)液状試薬24を、適当なサイズのオリフィス74をもつ反応ウエル26に、少なくとも一つの固体担体75および該固体担体75に固定された該ポリマー鎖の少なくとも1種のポリマー構成単位と接触状態で投入する工程と、ウエル26内の該試薬溶液を保持するための毛管液体封止を形成して、固体担体75上でのポリマー鎖の成長を可能とする工程を含む。この方法の次の工程は、B)反応ウエルチャンバー-31に第一のガス圧を、該第一のガス圧とオリフィス74の出口80に及ぼされる第二のガス圧との間の差圧が、該毛管液体封止を凌駕し、かつオリフィス74を通してウエル26からの該試薬溶液を追い出すのに必要な所定の値を越えるように印加することを含む。

上記2つの方法の諸工程を繰り返すことにより、一本のポリマー構成単位の連続した連鎖を形成することができる。

以下の実施例は上記本発明の利用法をより十分に説明するのに役立つ、また本発明の様々な局面を実施するための最良の態様を示すためのものである。この実施例は本発明の真の範囲を何限定するものではなく、寧ろ本発明を例示する目的で与えられるものである。オリゴヌクレオチド合成のあらゆる方法が本発明において利用可能であるものと理解すべきである。

#### 実施例 1：15個のオリゴヌクレオチドのアレイの合成

一般的合成手順はオリゴヌクレオチド合成のホスホラミダイトおよびハイドロジェンホスホネート法に従う。例えば、オリゴヌクレオチドおよびアナログズ(Oligonucleotides and Analogues): アプラクティカルアプローチ(A Practical Approach), F. エクシュタイン(Eckstein)編, IRLプレス, オックスフォードユニバーシティー; オリゴヌクレオチドシンセシス(Oligonucleotide Synthesis): アプラクティカルアプローチ(A Practical Approach), ゲイト(Gait)編, IRLプレス, ワシントンD.C.; および米国特許第4,458,066号、同第4,500,707号および同第5,047,524号に概説された方法に従う。これら全てを本発明の参考とする。本発明においては、他のオリゴヌクレオチド合成法も利用できるものと理解すべきである。

一般的に、該合成反応の基本的工程は以下の通りであり、これらを適当なアセトニトリル洗浄工程と組み合わせる。

a) 5'位置において保護されている第一のヌクレオチドを、固体担体(通常は調節された多孔度をもつガラス(CPG)との誘導体とするか、あるいは予備誘導体化によって得る。

b) 該第一のヌクレオチドの糖残基を、トリクロロアセティック - メチレンクロリド酸を

10

20

30

40

50

使用して、脱保護または脱トリチル化する。これは着色生成物を与え、該生成物により反応進行を追跡できる。

c) 保護された燐、糖および塩基の残基をもつ第二のヌクレオチドを、通常テトラゾール触媒の存在下で、該成長中の鎖に添加する。

d) 未反応の第一のヌクレオチドを、無水酢酸およびN-メチルイミダゾールを使用してキャッピングして、永続的誤差を回避する。

e) 該ホスファイトトリエステルを、ヨウ素試薬を使用して酸化して、より安定なホスフェートトリエステルを形成する。

f) 該オリゴヌクレオチドの所定の長さに応じて必要とされるだけ、この方法を繰り返す。

g) 通常は高温にてアンモニア水を使用して、該固体担体の開裂を時間単位の期間に渡り実施する。

かくして、配列ファイルが作成された。これは合成すべき各オリゴヌクレオチドの3'-5'配列およびウエル数、各ヌクレオチドに対する反応の規模、および該反応の終了時点において、該生成物につき最終的な脱トリチル化を実施すべきか否かを示している。このソフトウェアは、独立した、異なる長さのオリゴヌクレオチドおよび異なる規模のその合成を同時に実施するように設計されていた。この15個の異なるオリゴヌクレオチドの配列を以下の第1表に示した。

第1表

番号	配列
1	AAG TCT TGG ACT TAG AAG CC
2	GGG TCA CTT CTT TGT TTT CG
3	CCT TTA CTT TTC GGT CAA GG
4	TGA CTG GTA GGT CCA CTG CA
5	ACC TCA CTT CGG TAA CTT AAA
6	CCA AAT TTT GAG GTA ACC ACT T
7	GTG CTA TCC GGG ACA CCA
8	GGA AGA TCC ACG AGT CGT TT
9	CGT CCA CCT CTT CTT TGA AGA
10	TGG TAG TAA TCC TAC CGT CT
11	GCG AAG GTC TAC TCT CGT C
12	GTT CAG AGT AAG GAG TCG TGG
13	GTG GAA CCA TAG ACA ACC ACA TAT
14	TTG TTC ATC TTT GTG TAG GGT AC
15	AGA AAA GTC ACG GTC ACA CT

コマンドファイルを作成した。これはカップリングサイクル中に実施される反応段階の順序を含む。基本コマンドは、以下の第2表に示したように、WASH(洗浄)(体積)、DEBLOCK(脱保護)(体積)、COUPLE(カップリング)、CAP(キャッピング)、OXIDIZE(酸化)、WAIT(待機)(秒)およびDRAIN(排液)(圧力/真空,秒)であった。

第2表

段階数	段階	体積 (λ)	時間 (秒)
1	Deblock (脱保護)	125	
2	Wait (待機)		5
3	Drain (排液)		15
4	Wash (洗浄)	200	
5	Drain (排液)		15
6	Wash (洗浄)	300	
7	Drain (排液)		20
8	Wash (洗浄)	200	
9	Drain (排液)		20
1 0	Couple (カップリング)		
1 1	Couple (カップリング)		20
1 2	Wait (待機)		150
1 3	Drain (排液)		10
1 4	Wash (洗浄)	200	
1 5	Drain (排液)		15
1 6	Cap (キャッピング)		
1 7	Wait (待機)		40
1 8	Drain (排液)		10
1 9	Wash (洗浄)	200	
2 0	Drain (排液)		15
2 1	Oxidize (酸化)		40
2 2	Wait (待機)		10
2 3	Drain (排液)	300	
2 4	Wash (洗浄)		20
2 5	Drain (排液)	200	
2 6	Wash (洗浄)		20
2 7	Drain (排液)		

コンフィギュレーションファイルを作成した。これは、以下の第3表に示すような、該装置の動作特性、液体の流量、各試薬各々について使用した濃度およびモル当量を含む。

## 第3表

試薬	濃度	流量	モル過剰量
アセトニトリル		220 $\lambda$ /sec	
トリクロロアセティック		125 $\lambda$ /sec	
メチレンクロリド酸			
テトラゾール	0.45M	210 $\lambda$ /sec	250
無水酢酸		210 $\lambda$ /sec	500
N-メチルイミダゾール		210 $\lambda$ /sec	500
ヨウ素		210 $\lambda$ /sec	150
ホスホラミダイト	0.1M	210 $\lambda$ /sec	

96ウエルのプレートを使用した。これは円錐形の下部断面を有し、該断面は圧嵌め式の0.196インチのフィルタディスクを受け取るための窪みを有していた。該フィルタ下部には、径0.020インチ×長さ0.350インチの流動制限かつ毛管液体封止オリフィスを配置した。出口先端における該毛管封止の外径は0.350インチであった。ファットマン(Whatman)GF/A

20  
30  
96  
フィルタを取り付けた場合、チャンバー上部圧1psiにおける、完全に乾燥したプレートを介するガス流量は10 l / 分であった。0.02psiのチャンバー上部圧の下では、該合成ウエルの底部における該毛管封止が、緩慢な漏洩が開始する前に、該フィルタ上方約1 cmにアセトニトリル液体ヘッドを維持していた。これらのプレートは、成形したポリプロピレン製のものであった。

各ウエルに、誘導されたA、T、CまたはGの何れかの第一塩基を有する、正確な量のCPGを添加した。例えば、0.5mgのCPGを20ナノモル規模の反応で使用した。該CPGビーズを、ジプロモメタン-クロロホルム中に分散されたスラリーとして、ピペットにより各ウエルに添加した。この段階は、該プレートを該装置に取り付ける前に、通常の実験室の雰囲気下で実施した。該プレートを該装置に取り付けた後に、WASHアセトニトリルサイクルを実施して、該スラリーを洗浄しかつ全てのウエルが適当に排液されていることを確認した。該ノズルバルブタンクを、アルゴンでフラッシングし、次いで空気および水の混入を防止すべく加圧輸送により、供給ボトルからの新鮮な試薬で満たした。このバルブタンクを、次に該コンフィギュレーション圧(4 psi)まで加圧した。次いで、各試薬に対してパージ位置にある該滑動プレートにより、少量の液体を分配することにより、ノズルチューブを充填した。

40  
試薬添加および反応の待機期間中は、該反応チャンバーを横切る層状の掃気ガス流を、0.4 l / 分に調節したが、この際の内部圧力は約0.02psiであった。使用済試薬の除去および洗浄サイクル中に、該チャンバー内の圧力は最大5psiまで増大した。2.5psiにおいて、該合成ウエルを約150 / 秒の速度で排液した。

次いで、この装置をオートマチック(AUTOMATIC)モードに切り換えて、実際の合成を開始した。該装置を該第一、第二および最終サイクル中に停止して、比色分析のために、該DEBLOCKトリチル生成物の採取を可能とした。これは、下部真空/排液チャンバー内の第二の96-ウエルのマイクロタイタープレートを、該合成プレートの毛管出口先端部直下にずらすことにより実施した。490nmにおける脱トリチル化溶液の光学密度を、プレートリーダーを使用して読み取った。この第一のサイクルに対する値はウエル中に入れられたCPGの量を裏付け、また該第二のサイクルと該最終のサイクルとの比較は、該合成カップリング効率の算出を可能とした。該最終サイクルの値は、またアンモニア開裂により側鎖の脱保護後に得られるであろうオリゴヌクレオチドの量をも示した。

50  
該装置が全てのウエルにおいて該合成を完了した後、該合成プレートを該装置から取り出

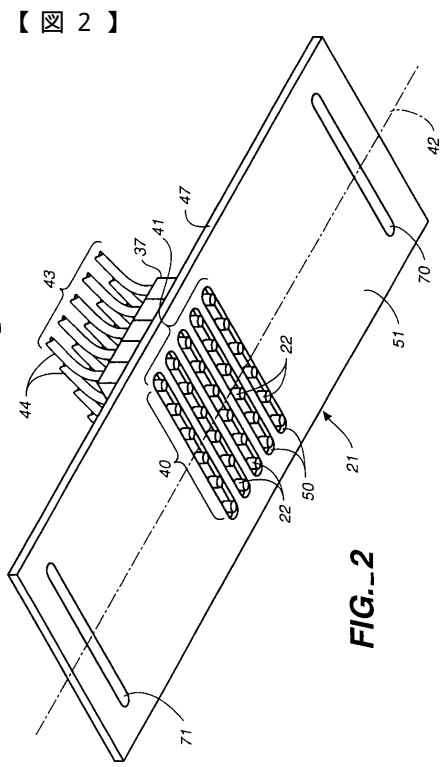
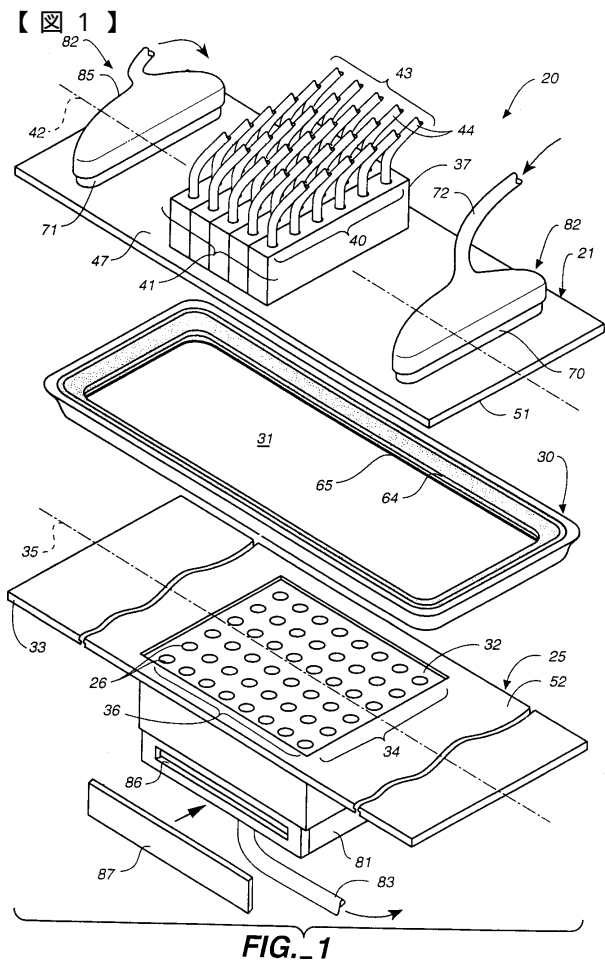
した。該合成プレートを第二の96ウエル脱保護プレート（ベックマンディープウエルタイタープレート(Beckman deep-well titer plate)267001)の上に重ねた。各ウエルに200 $\mu$ lの濃厚NH<sub>4</sub>OHをピペットで分配することによって、これらのオリゴヌクレオチドを該担体から開裂し、次いで25℃にて15分間インキュベートした。これらのアンモニア開裂溶液を該フィルタおよび毛管出口を通して、該脱保護プレートの該ウエルに溶出したが、この際に該積層体を加圧し、真空を印加し、あるいは簡単な遠心処理にかけた。この開裂段階を、新たなアンモニアのアリコートを用いて2度繰り返した。

合成に使用した該ホスホラミダイトがベンジルおよびイソブチリル保護基を有する場合には、この最終の脱保護段階は、該粗製アンモニア開裂生成物を加熱することにより完了させた。該脱保護タイタープレートのウエルを、窪みをもつシリコンゴムキャップ（ベックマン(Beckman)267002)で封止し、該キャップをパネ式プレートプレスを使用して所定位置に維持した。この封止した装置をエアオープンまたは水浴中で、55℃にて8-15時間加熱し、次いで氷浴中で冷却した。該脱保護プレートを該プレスから取り出し、手短に遠心処理した後、該キャップを取り外した。

次に、該アンモニア溶液を、マイクロプレートローターを備えたサバント210スピードバク(Savant 210 Speed Vac)を使用して、蒸発乾固した。かくして得られたオリゴヌクレオチドペレットは、多くの配列決定用プライマーとしておよびPCR用途において直接使用するのに十分に純粋であった。最後のトリチルアッセイにより予想されたオリゴヌクレオチドの量は、260nmにおける光学密度により立証され、また該生成物の均一性はHPLCまたは毛管ゲル電気泳動法によってアッセイした。毛管電気泳動分析は、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)270A装置を製造業者のプロトコールに従って実施した。上記実験で得たオリゴヌクレオチド14および15に対する結果をそれぞれ第8Aおよび8B図に示した。20-マーの20ナノモル規模での合成についての典型的な収量は2.50D(85 $\mu$ g)であった。

10

20



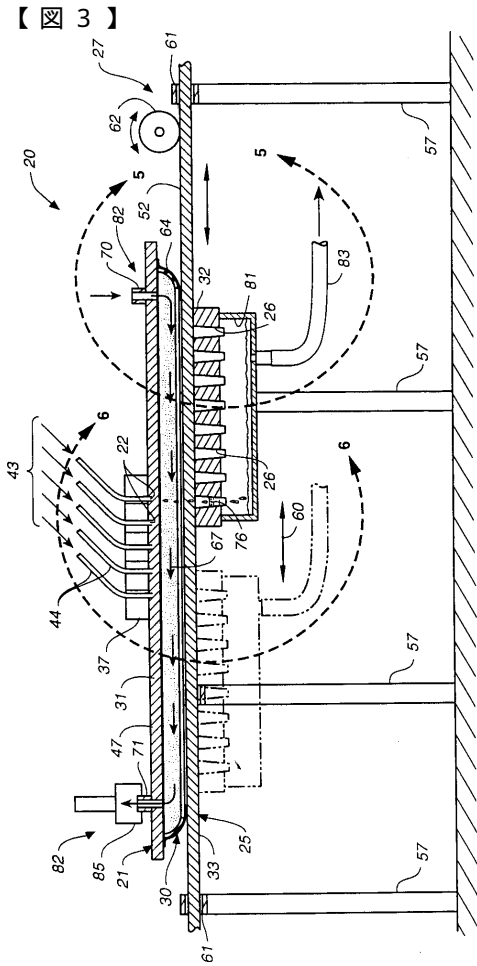


FIG.\_3

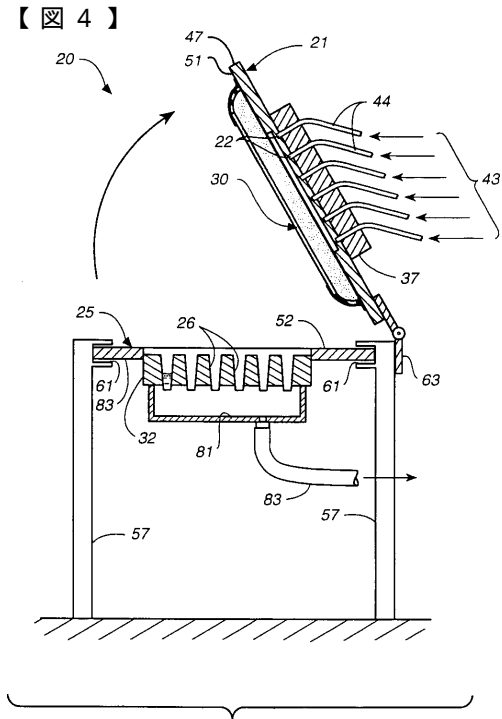


FIG.\_4

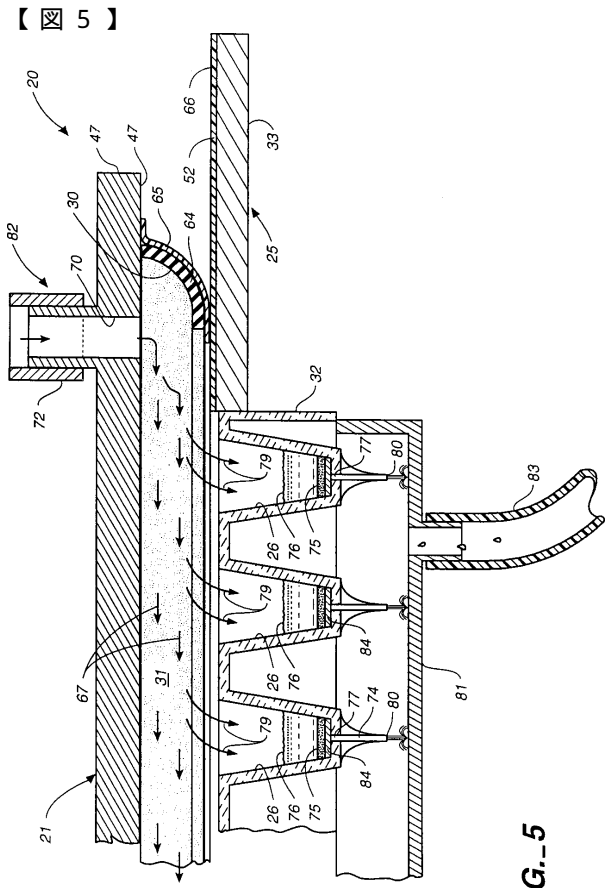


FIG.\_5

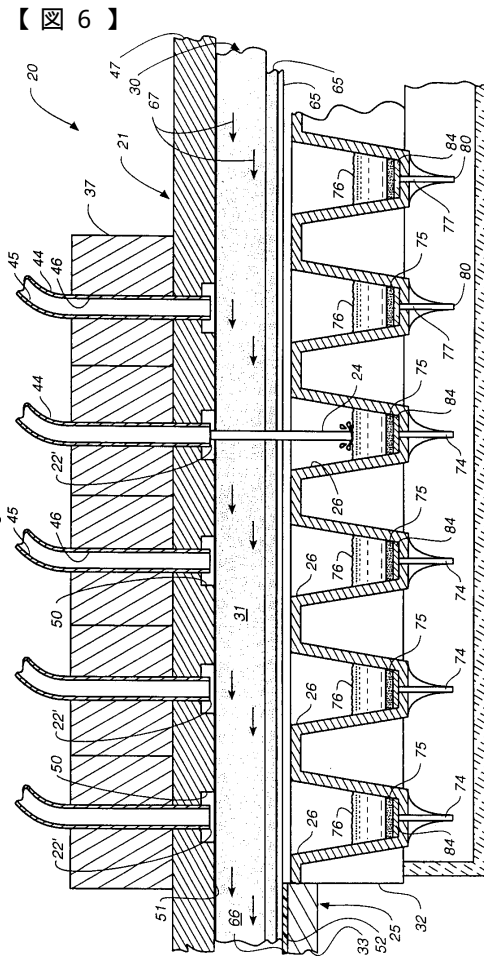


FIG.\_6

【 図 7 】

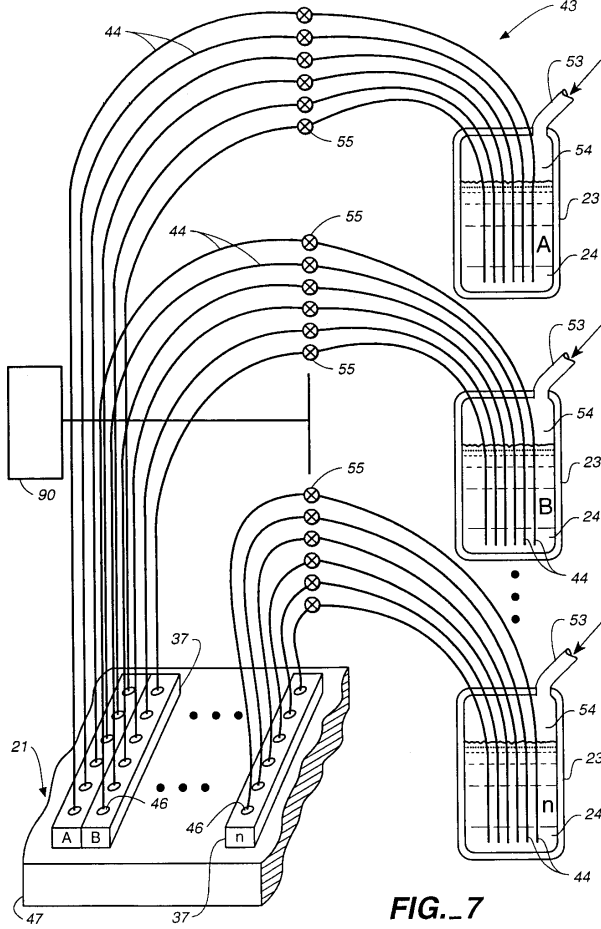
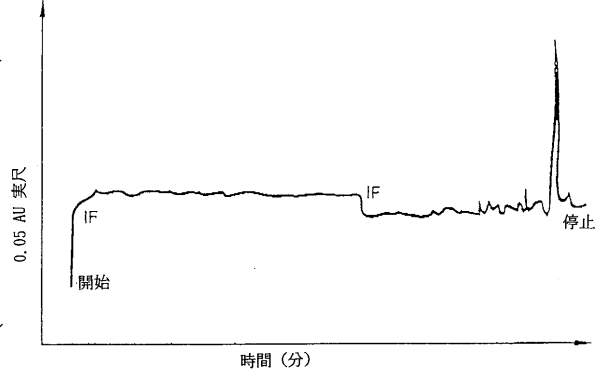


FIG.\_7

【 図 8 A 】

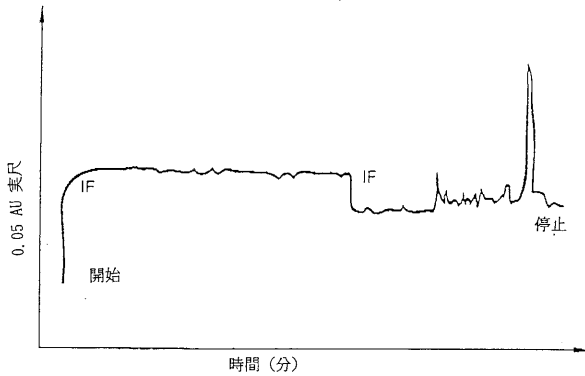


実験#116  
ワークファイル ID: C  
ワークファイル 名称: 全領域 = 757390  
乗数ファクタ = 1.0000E + 00

領域%	RT	領域	タイプ	AR/HT	領域%
	8.56	15630	VB	0.054	2.064
	9.81	10112	BB	0.037	1.835
	10.36	10365	PB	0.050	1.369
	10.48	16847	BB	0.057	2.224
	10.61	31831	BB	0.084	4.176
	10.78	11126	PB	0.034	1.469
	11.01	10483	PB	0.047	1.384
	11.26	26949	BB	0.045	3.558
	11.64	31930	BB	0.058	4.216
	11.82	16944	VB	0.047	2.237
	12.06	20256	VB	0.075	3.731
	12.42	26993	PB	0.052	6.564
	12.64	40742	BB	0.045	5.379
	12.79	10509	VB	0.034	1.388
	13.04	13205	BB	0.029	1.744
	13.31	17940	PB	0.033	2.369
	13.38	412520	BB	0.089	54.467
	13.77	25202	PB	0.069	3.328

FIG.\_8A

【 図 8 B 】



実験#115  
ワークファイル ID: C  
ワークファイル 名称: 全領域 = 563000  
乗数ファクタ = 1.0000E + 00

領域%	RT	領域	タイプ	AR/HT	領域%
	10.40	54453	BB	0.057	9.657
	10.47	23838	BB	0.048	4.228
	10.66	35480	BB	0.072	6.292
	10.93	11016	BB	0.039	1.954
	11.16	41408	VB	0.073	7.343
	11.54	14864	PB	0.059	2.636
	11.79	14056	BB	0.037	2.493
	11.95	16643	PB	0.041	2.952
	12.12	11510	PB	0.040	2.041
	12.21	23744	BB	0.045	4.211
	12.34	27969	BB	0.055	4.960
	12.79	272420	VB	0.071	48.311
	13.01	16486	BB	0.063	2.924

FIG.\_8B

---

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(72)発明者 プレナン トーマス エム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94115 サンフランシスコ ブロードウェイ 705  
200

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平05-504147(JP,A)

特開平04-308600(JP,A)

国際公開第90/02605(WO,A1)

国際公開第93/17785(WO,A1)

米国特許第5106583(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>,DB名)

C12N 15/09

C07H 21/00

C12M 1/00

C07K 1/02

BIOSIS/WPI(DIALOG)