(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 635 T2** 2005.02.17

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 025 902 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 635.1**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 103 594.8**
(96) Europäischer Anmeldetag: **19.10.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.08.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.03.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.02.2005**

(51) Int Cl.[7]: **B01J 19/00**

(30) Unionspriorität:
142593 **22.10.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University, Palo Alto, Calif., US

(72) Erfinder:
Brennan, Thomas M., Menlo Park, US

(74) Vertreter:
Meissner, Bolte & Partner GbR, 80538 München

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Verfahren zur Synthese von Polymeren mit Anwendung von Arrays**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Polymersynthesevorrichtung im allgemeinen und betrifft insbesondere eine Polymersynthesevorrichtung, die Felder bzw. Arrays verwendet.

Allgemeiner Stand der Technik

[0002] Seit kurzem spielen Oligonucleotide in der diagnostischen Medizin, der forensischen Medizin und der Forschung auf dem Gebiet der Molekularbiologie eine immer stärkere und zentrale Rolle. Eine primäre Funktion dieser Polymere ist insbesondere deren Verwendung bei Gensondenassays für den Nachweis bestimmter Nucleinsäuresequenzen.

[0003] Gensondenassays werden für viele Zwecke verwendet, dazu gehören: die genetische Beratung, die Typisierung von Gewebe und die Forschung auf dem Gebiet der Molekularbiologie. Ein Individuum kann z. B. getestet werden, um festzustellen, ob er oder sie das Gen für die Huntington-Krankheit oder zystische Fibrose trägt. Eine weitere Anwendung von Gensondenassays schließt die Bestimmung der Kompatibilität vor einer Gewebetransplantation und für die Anpassung von Gewebe- oder Blutproben für die forensische Medizin ein.

[0004] Schließlich werden diese Assays in der Forschung auf dem Gebiet der Molekularbiologie extensiv verwendet, um Homologien zwischen Genen von unterschiedlichen Spezies zu erforschen und Gene zu klonen, bei denen nur eine partielle Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz bekannt ist, wie bei der Polymerase-Kettenraktion (PCR).

[0005] Diese Arten von Assays testen typischerweise das Vorhandensein einer bestimmten Nucleinsäuresequenz, gewöhnlich einer DNA-Sequenz, obwohl auch RNA-Sequenzen verwendet werden können. Wie es auf diesem Fachgebiet allgemein bekannt ist, wird dies durch die Verwendung von Oligonucleotiden erreicht, die so synthetisiert worden sind, daß sie bestimmte, vorher festgelegte Sequenzen haben. Die Sequenz einer Oligonucleotid-Sonde kann auf bekannten Aminosäuresequenzen, bekannten DNA-Sequenzen, basieren oder kann eine "Vermutungs"-Sonde sein, die auf der Homologie mit bekannten oder mutmaßlichen DNA- oder Aminosäuresequenzen basiert.

[0006] Da die DNA ein "degenerierter" Code ist und einige DNA-Sequenzen zu einer einzigen Aminosäuresequenz führen, verwenden auf einer Aminosäuresequenz basierende Gensondenassays häufig Pools verwandter Oligonucleotide, die jeweils eine andere spezifische Sequenz der Nucleotide aufweisen. Somit ist es oft erforderlich, eine große Anzahl von verwandten, jedoch verschiedenen Oligonucleotiden zu erzeugen, um ein einziges Gen zu klonen.

[0007] Zusätzlich zur tatsächlichen Sequenz gibt es eine Anzahl von Parametern, die bei der Synthese der Oligonucleotide geändert werden können. Es ist auch häufig erforderlich, diese Polymere mit unterschiedlichen Längen zu synthetisieren, da der Gensondenassay im allgemeinen um so spezifischer ist, je länger die Oligonucleotid-Sonde ist; die Spezifität kann bei irgendeiner bestimmten Anwendung erwünscht sein oder auch nicht.

[0008] Oligonucleotide können aus Desoxyribonucleotiden oder Ribonucleotiden oder Gemischen erzeugt werden. Alternativ können Oligonucleotide mit eingeführten modifizierten oder nicht standardgemäßen Basen oder nicht-radioaktiven Markern erwünscht sein. In ähnlicher Weise können für einige Anwendungszwecke Oligonucleotide mit geänderten Ribosephosphat-Hauptketten erzeugt werden.

[0009] Neben der Verwendung beim Gensondenassay gibt es einige andere Anwendungszwecke für Oligonucleotide. Die Erzeugung eines einzelsträngigen Oligonucleotids mit einer bestimmten Sequenz kann z. B. bei der Bildung von äußerst stabilen DNA-Triplexstrukturen verwendet werden. Zu anderen Verwendungszwecken gehören die direkte Konstruktion von synthetischen Genen und Plasmidvektoren, indem die Oligonucleotid-Komponenten über 5'-Phosphat miteinander verknüpft oder verbunden werden.

[0010] Da die Verwendung von synthetischen Oligonucleotiden zugenommen hat, ist folglich auch der Bedarf danach gestiegen. Das hat wiederum zur Entwicklung einer neuen Synthesevorrichtung und neuer Methodologien für grundsätzliche Verfahren für Oligonucleotide mit einer definierten maßgeschneiderten Sequenz geführt. Die Verwendung dieser Vorrichtung und Verfahren ist jedoch im allgemeinen sehr teuer und steht nicht

einfach für die Massenproduktion zur Verfügung.

[0011] Bei der heutigen Generation von automatisierten DNA-Sequenz-Synthesizern wird typischerweise ein derivatisierter fester Träger, wie Glas mit geregelten Poren (CPG) in eine einzige Reaktionskammer einer Säule gegeben, so daß eine stabile Verankerung bereitgestellt wird, auf der die Festphasensynthese eingeleitet wird.

[0012] Mit Reihen von komplexen Ventilführungen und mittels mit der Säule verbundenen Pumpen werden die geeignet ausgewählten Reagenzien in einer vorher festgelegten Weise nacheinander durch die Kammer filtriert. Der Kontakt des Reagens mit den Polymereinheiten, die vorher am CPG fixiert worden sind, das durch poröse Fritten zum Tragen der Probe in der Kammer gehalten und getragen wird, führt zu einer Reaktion, die darauf zu einem sequenziertem Wachstum führt.

[0013] Obwohl jede Säule dieser Anordnung für eine schnelle Massenproduktion einer homogenen Population von Oligonucleotiden mit einer definierten Sequenz wirksam ist, bieten die gegenwärtigen Anordnungen nur die Möglichkeiten von vier (4) Säulen. Eine größere Kapazität der Säule ist durch die physischen Einschränkungen der Gestaltung der Ventilführung begrenzt.

[0014] Folglich können nur vier unabhängige Synthesezyklen gleichzeitig durchgeführt werden. Da die Synthesevorrichtung außerdem im allgemeinen nicht für eine integrierte Automatisierung mit einem anderen Laborapparatur-Roboter geeignet ist, muß der Betreiber dazwischen eingreifen, um die einzelnen Synthesesäulen manuell zu füllen und zu entnehmen. Mit dieser Handhabung nehmen die Fehler durch den Menschen zu.

[0015] Eine wichtigere Einschränkung besteht darin, daß alle Reagenzien trichterförmig durch einen gemeinsamen Verteilerdurchtritt geleitet werden. Folglich kann nur ein Reagens oder eine Kombination davon gleichzeitig in ausgewählte Säulen eingebracht werden. Das Reagens "Tetrazol" kann z. B. nicht in die Säule 1 eingebracht werden, während ein bestimmtes Amidit-Reagens gleichzeitig in die Säule 4 eingebracht wird.

[0016] Außerdem muß für jede unabhängige Synthese oder Reaktion der gemeinsame Verteilerdurchtritt und die damit verbundene Ventilführung mit einem reinigenden Reagens gespült werden, so daß die restlichen Amidit- oder deblockierenden Reagenzien nicht unerwünscht in eine Säule eingebracht werden. Dieser Versuch ist zeitaufwendig und erhöht auch die Kosten für den Betreiber.

[0017] Die Synthese von Gruppen von gebundenen Oligonucleotiden oder Peptiden ist auf diesem Fachgebiet ebenfalls bekannt. Bei einem Versuch zur parallelen Synthese, der als "Teebeutel"-Verfahren oder Scheibengestaltung bekannt ist, wird für die Behandlung mit dem ausgewählten Amidit eine Anordnung von einzelnen Packen oder Scheiben fester Trägerkügelchen physisch in vier (4) Amidit-Teilsätze sortiert.

[0018] Nachdem jeder Packen der Kügelchen mit dem gemeinsamen Reagens behandelt worden ist, müssen die Packen für den anschließenden Synthesezyklus wieder manuell in vier Teilsätze sortiert werden. Dieses Sortieren und erneute Sortieren wird für die Herstellung großer Gruppen von Oligonucleotiden zu belastend und zu arbeits-aufwendig.

[0019] Ein weiterer Versuch unter Verwendung von Gruppen ist das Stifteintauchverfahren für die parallele Oligonucleotidsynthese. Geysen, J. Org. Chem. 56, 6659 (1991). Bei diesem Verfahren werden geringe Mengen eines festen Trägers mit Gruppen von mit einem Selenoid gesteuerten Polypropylenstiften vereinigt, die anschließend in Schalen des geeigneten Reagens getaucht werden. Die Dichte der Gruppen ist jedoch begrenzt, und das verwendete Eintauchverfahren ist in der Praxis problematisch.

[0020] In Southern, Genome Mapping Sequence Conference, Mai 1991, Cold Spring Harbour, N. Y. wird ein anderes Schema für die Synthese von Oligonucleotidgruppen offenbart, bei dem ausgewählte Bereiche auf einer Glasplatte physikalisch abgedeckt werden und gewünschte chemische Reaktion auf dem nicht abgedeckten Teil der Platte durchgeführt wird. Das Problem besteht bei diesem Verfahren darin, daß nach jeder Wechselwirkung die alte Maske entfernt und eine neue aufgebracht werden muß.

[0021] Fodor et al., Science 251, 767 (1991) beschreibt ein anderes Verfahren zum Synthetisieren von sehr dichten 50 µm Gruppen von Petiden (und möglicherweise Oligonucleotiden) unter Anwendung eines maskenspezifischen photochemischen Entfernen des Schutzes und synthetischer Zwischenprodukte. Dieses Verfahren ist durch die geringe Rate beim photochemischen Entfernen des Schutzes und durch die Empfindlichkeit für Nebenreaktionen (z. B. die Bildung eines Thymidindimers) bei der Oligonucleotidsynthese begrenzt.

[0022] Khrapko et al., FEBS Letters 256, 118 (1989) schlägt eine vereinfachte Synthese und Immobilisierung von mehreren Oligonucleotiden durch direkte Synthese auf einem zweidimensionalen Träger vor, wobei eine druckerähnliche Vorrichtung verwendet wird, die jedes der vier Nucleotide an vorgegebenen Punkten auf der Matrix aufteilen kann. Es gibt jedoch keine bestimmten Angaben, wie eine solche Vorrichtung hergestellt oder verwendet werden soll.

[0023] Zusammenfassend enthält das zugehörige Fachgebiet im allgemeinen zahlreiche Ideen und eine Information in bezug auf die Synthese von Gruppen von Oligonucleotiden oder Peptiden für die Bestimmung von Nucleotidsequenzen oder Aminosäuresequenzen bestimmter bindender Peptide. Die vorhandenen oder vorgeschlagenen Verfahren sind jedoch beschränkt und liefern keine bequeme und zuverlässige Massenproduktion von sehr großen Gruppen, die für eine wirksame Sequenzierung im großen Umfang erforderlich sind.

Offenbarung der Erfindung

[0024] Es ist folglich eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Polymersynthesevorrichtung und ein -verfahren zum Aufbauen von Polymerketten mit einer definierten Sequenz anzugeben.

[0025] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Angabe einer Polymersynthesevorrichtung und eines -verfahrens, um eine große Menge von Gruppen von Oligonucleotiden oder Peptiden auf reproduzierbare und schnelle Art und Weise herzustellen.

[0026] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Angabe einer Polymersynthesevorrichtung und eines -verfahrens, das den Abfall des Reagens während der Herstellung einer großen Menge von Oligonucleotidgruppen verringert.

[0027] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Angabe einer Polymersynthesevorrichtung und eines -verfahrens, um mit geringeren Kosten große Mengen von Oligonucleotidgruppen herzustellen.

[0028] Es ist weiterhin Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren für die Synthese von Polymergruppen anzugeben, die bzw. das dauerhaft und kompakt ist, leicht zu warten ist, eine minimale Anzahl von Komponenten aufweist, sich von unerfahrenem Personal leicht handhaben läßt und ökonomisch hergestellt werden kann.

[0029] Gemäß den vorstehend aufgeführten Aufgaben gibt ein Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung eine Polymersynthesevorrichtung zum Aufbauen einer Polymerkette durch sequentielle Zugabe von Polymereinheiten in eine Reagenslösung an. Diese Synthesevorrichtung weist folgendes auf:
eine Kopfanordnung (**21**), an der eine Vielzahl von Düsen (**22**) in einer im allgemeinen beabstandeten Relation angebracht ist, wobei jede Düse (**22**) mit einem Vorrat (**23**) von flüssigem Reagens (**24**) zur gesteuerten Abgabe durch sie hindurch verbunden ist;
eine Basisanordnung (**25**), die mindestens eine Reaktionsvertiefung (**26**) und mindestens eine Öffnung (**74**) hat, die sich in die Vertiefung (**26**) erstreckt, wobei die Öffnung (**74**) einen Eingang in die Vertiefung (**26**) und einen Ausgang hat und eine solche Größe und Dimension besitzt, daß sie eine Kapillar-Flüssigkeitsdichtung bildet, um das eingebrachte flüssige Reagens (**24**) in der Vertiefung (**26**) zurückzuhalten, um ein Polymerkettenwachstum darin zu ermöglichen, wenn eine Druckdifferenz zwischen einem ersten Gasdruck in der Kammer (**31**) und einem zweiten Gasdruck, der auf den Ausgang der Öffnung (**74**) aufgebracht wird, kleiner als ein vorbestimmter Wert ist;
eine Transporteinrichtung (**27**), die mit mindestens einer von der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) verbunden ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu erzeugen, um die Reaktionsvertiefung (**26**) und eine ausgewählte Düse (**22**) für das Einbringen eines flüssigen Reagens (**24**) in die Reaktionsvertiefung (**26**) für die Synthese einer Polymerkette in Ausfluchtung zu positionieren;
eine zwischen der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) positionierte Gleitdichtung (**30**), die eine gemeinsame Kammer (**31**) bildet, die sowohl die Reaktionsvertiefung (**26**) als auch die Düsen (**22**) darin einschließt; und
eine Druckregulierereinrichtung (**82**), um die Druckdifferenz derart zu steuern, daß im Gebrauch, wenn die Druckdifferenz den vorbestimmten Wert überschreitet, die Reagenslösung (**24**) durch die Öffnung (**74**) aus der Vertiefung (**26**) ausgestoßen wird.

[0030] Die Synthesevorrichtung kann ferner einen Einlaß in die gemeinsame Kammer, der stromaufwärts der Düsen positioniert ist, und einen Auslaß aus der gemeinsamen Kammer aufweisen, der stromabwärts der Dü-

sen positioniert ist. Eine Druckgasversorgung ist mit dem Einlaß verbunden, um ein Gas von stromaufwärts der Kammer in Richtung stromabwärts der Kammer kontinuierlich durch die gemeinsame Kammer und aus dem Auslaß strömen zu lassen, um toxische Schwaden, die von Reagenzien abgegeben werden aus der gemeinsamen Kammer auszuspülen und auch das Einspülen von Luft und Feuchtigkeit zu vermeiden.

[0031] Die vorliegende Erfindung umfaßt auch ein Verfahren zur Synthese einer Polymerkette in einer Synthesevorrichtung (**20**) durch sequentielle Zugabe von Polymereinheiten, wobei die Synthesevorrichtung (**20**) folgendes aufweist:
eine Kopfanordnung (**21**), an der eine Vielzahl von Düsen (**22**) in einer im allgemeinen beabstandeten Relation angebracht ist, wobei jede Düse (**22**) mit einem Vorrat (**23**) von flüssigem Reagens (**24**) zur gesteuerten Abgabe durch sie hindurch verbunden ist; eine Basisanordnung (**25**), die mindestens eine Reaktionsvertiefung (**26**) hat; und eine Gleitdichtung (**30**), die zwischen der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) positioniert ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu ermöglichen, und sowohl die Reaktionsvertiefung (**26**) als auch die Düsen (**22**) darin einschließt, um eine gemeinsame Kammer (**31**) zu bilden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:

(A) Ausfluchten der Reaktionsvertiefung (**26**) und einer ausgewählten Düse (**22**) durch eine Transporteinrichtung (**27**), die mit mindestens einer von der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) verbunden ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu erzeugen;
(B) Einbringen eines flüssigen Reagens (**24**) in die Vertiefung (**26**) aus dem Reagensvorrat (**23**) durch diese eine Düse (**22**), um die Synthese einer Polymerkette zu ermöglichen;
(C) Ausspülen von toxischen Schwaden, die von den Reagenzien (**24**) abgegeben werden, aus der gemeinsamen Kammer (**31**) durch Hindurchleiten eines Gases aus einer Druckgasversorgung, die mit einem Einlaß (**70**) in die gemeinsame Kammer (**31**) verbunden und stromaufwärts der Düsen (**22**) positioniert ist, und aus der Kammer (**31**) durch einen Auslaß (**71**) aus der gemeinsamen Kammer (**31**), der stromabwärts der Düsen (**22**) positioniert ist.

Kurze Beschreibung der Zeichnungsfiguren

[0032] Die erfindungsgemäße Anordnung weist weitere Aufgaben und Vorteile auf, die anhand der folgenden Beschreibung der besten Art und Weise der Durchführung der Erfindung und der zugehörigen Ansprüche in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungsfiguren besser verständlich werden, welche zeigen:

[0033] **Fig.** 1 eine auseinandergezogene perspektivische Draufsicht der Vorrichtung zur Synthese von Polymergruppen, die gemäß der vorliegenden Erfindung aufgebaut ist;

[0034] **Fig.** 2 eine Perspektivansicht der Kopfanordnung der Vorrichtung für die Synthese von Polymergruppen von **Fig.** 1 von unten, die die zurückgesetzten bzw. ausgesparten Düsenenden zeigt;

[0035] **Fig.** 3 einen Querschnitt der Vorrichtung zur Synthese von Polymergruppen von **Fig.** 1 von der Seite, der die ausspülende Wirkung des Inertgasstroms durch die gemeinsame Kammer zeigt;

[0036] **Fig.** 4 einen Querschnitt der Vorrichtung zur Synthese von Polymergruppen von **Fig.** 1 von vorn, der die Kopfanordnung zeigt, die schwenkbar an der Rahmenanordnung befestigt ist;

[0037] **Fig.** 5 einen vergrößerten Querschnitt der Vorrichtung zur Synthese von Polymergruppen von der Seite, im wesentlichen entlang der Linie 5-5 in **Fig.** 3, der die Kapillar-Flüssigkeitsdichtung zeigt, die zwischen der flüssigen Reagenslösung und der entsprechenden Fritte und Öffnung ausgebildet ist;

[0038] **Fig.** 6 einen vergrößerten Querschnitt der Vorrichtung zur Synthese von Polymergruppen von der Seite, im wesentlichen entlang der Linie 6-6 der **Fig.** 3, der die Ballondichtung zeigt.

[0039] **Fig.** 7 eine vergrößerte schematische Perspektivansicht der Zuführungsanordnung von oben, die an der Kopfanordnung der Vorrichtung zur Synthese von Polymergruppen angebracht ist;

[0040] **Fig.** 8A und B die Ergebnisse von Kapillarelektrophoreseversuchen der Oligonucleotide Nr. 14 bzw. 15 von Beispiel 1.

Beste Art und Weise der Durchführung der Erfindung

[0041] Obwohl die vorliegende Erfindung unter Bezugnahme auf wenige bestimmte Ausführungsbeispiele be-

schrieben wird, stellt diese Beschreibung nur eine Erläuterung der Erfindung dar und soll die Erfindung nicht einschränken. Der Fachmann kann verschiedene Abänderungen der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung vornehmen, ohne daß vom wirklichen Gedanken und Umfang der Erfindung abgewichen wird, die durch die zugehörigen Ansprüche definiert sind. Es wird hier darauf hingewiesen, daß gleiche Komponenten in den verschiedenen Zeichnungsfiguren zum besseren Verständnis mit den gleichen Bezugsziffern bezeichnet sind.

[0042] Es wird nunmehr auf die **Fig.** 1 und 2 bezug genommen, in denen eine Polymersynthesevorrichtung, die allgemein mit **20** bezeichnet ist, zum Aufbauen einer Polymerkette durch sequentielle Zugabe von Polymereinheiten zu einem festen Träger in einem flüssigen Reagens gezeigt ist. Obwohl die Vorrichtung **20** für den Aufbau von Oligonucleotiden mit definierter Sequenz besonders geeignet ist, kann die vorliegende Erfindung übrigens auch für die Synthese irgendeiner Polymerkette verwendet werden. Der Begriff "Polymerenheit" wird folglich hier als eine Einheit definiert, die an andere Einheiten der gleichen oder einer anderen Art gebunden ist, so daß eine Polymerkette, wie Oligonucleotide und Peptidketten, erzeugt werden.

[0043] In einem Ausführungsbeispiel weist die Synthesevorrichtung **20** kurz zusammengefaßt eine Kopfanordnung, die allgemein mit **21** bezeichnet ist, mit einer Vielzahl von Düsen **22** auf (**Fig.** 2), die in einer im allgemeinen beabstandeten Relation daran angebracht sind. Jede Düse **22** ist mit einem Vorrat **23** (**Fig.** 7) des flüssigen Reagens **24** zur gesteuerten Abgabe durch sie hindurch verbunden.

[0044] Außerdem sind eine Basisanordnung, die allgemein mit **25** bezeichnet ist, mit mindestens einer Reaktionsvertiefung **26** und eine Transporteinrichtung, die allgemein mit **27** bezeichnet ist (**Fig.** 3), enthalten, die mit der Kopfanordnung **21** und/oder der Basisanordnung **25** verbunden ist, um eine Relativbewegung zwischen diesen zu erzeugen.

[0045] Dadurch werden eine ausgewählte Reaktionsvertiefung **26** und eine ausgewählte Düse **26** für das Einbringen des ausgewählten flüssigen Reagens **24** in die Reaktionsvertiefung für die Synthese einer Polymerkette in einer Ausfluchtung positioniert. Eine Gleitdichtung, die allgemein mit **30** bezeichnet ist, ist zwischen der Kopfanordnung und der Basisanordnung positioniert, so daß eine gemeinsame Kammer **31** (**Fig.** 3) gebildet wird, die sowohl die Reaktionsvertiefung als auch die Düsen darin einschließt.

[0046] Im bevorzugten Ausführungsbeispiel ist ein Feld von Vertiefungen **26** (**Fig.** 1) vorgesehen, die in einer Mikrotiterplatte **32** ausgebildet sind, die von einer Gleitplatte **33** der Basisanordnung **25** getragen wird. Die Synthesevorrichtung ist vorzugsweise so gestaltet, daß eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen verwendet wird (zur Vereinfachung der Darstellung sind nicht alle Vertiefungen gezeigt), die in **12** gleichmäßig beabstandeten Reihen **34**, die sich jeweils quer zur Längsachse **35** der länglichen Basisanordnung **25** erstrecken, in einer Breite von 8 gleichmäßig beabstandeten Spalten **36** ausgerichtet sind.

[0047] Die Mikrotiterplatte **32** ist vorzugsweise aus einem chemisch inerten Material, wie Polypropylen, hergestellt. Es ist natürlich selbstverständlich, daß irgendeine Anzahl von Vertiefungen oder Anordnung von Reihen und Spalten verwendet werden kann, ohne vom tatsächlichen Gedanken und der Art der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

[0048] Die **Fig.** 1 und 2 zeigen ferner, daß die Düsen **22**, die an Befestigungsblöcken **37** der Kopfanordnung **21** angebracht sind, außerdem in einem Feld aus Düsenreihen **40** und Düsenspalten **41** ausgefluchtet sind, das dem Feld der Vertiefungen **26** ähnlich ist. In der bevorzugten Form ist die Anzahl der Düsenspalten **41**, die jeweils parallel zur Längsachse **42** der Kopfanordnung **21** verlaufen, gleich der Anzahl der Vertiefungsspalten **36**. Folglich entspricht jede Düse **22** in einer bestimmten Reihenanordnung oder Reihe **40** der Düsen einer entsprechenden Spalte **36** der Vertiefungen **26** oder ist zu dieser ausgefluchtet.

[0049] Die Düsen in irgendeiner Reihe **40** und Spalte **41** sind ebenfalls im gleichen Abstand wie der Abstand zwischen den Vertiefungsreihen **34** und -spalten **36** gleichmäßig beabstandet, so daß während eines einziges Zyklus eine gleichzeitige Ausfluchtung zwischen einer oder mehreren Vertiefungsreihen **34** und ausgewählten Düsenreihen **40** möglich ist. Das heißt, daß das Feld der Vertiefungen zum gleichzeitigen Einbringen entlang einer Vielzahl von Positionen mit dem Feld der Düsen ausgefluchtet werden kann.

[0050] Diese Gruppentechnik für die Synthese von Oligonucleotiden mit definierter Sequenz wurde zum ersten Mal aus einer Chipanordnung mit einer hohen Dichte von Oligonucleotidgruppen für die Hybridisierungs-Sequenzierung entwickelt, die in der US-A-5,474,796 (US-Patentanmeldung, Seriennr. 07/754,614, am 4. September 1991 eingereicht) offenbart ist. Somit wird diese Gruppentechnik allein nicht als neues Merkmal

der vorliegenden Erfindung beansprucht. Diese Anordnung ist jedoch für die Massenproduktionsmöglichkeiten gemäß der vorliegenden Erfindung, wie sie hier nachstehend beschrieben sind, weder geeignet noch angemessen.

[0051] Um die Organisation und Herstellung von Polymerketten zu vereinfachen, verbindet eine Zuführungsanordnung **43** (**Fig.** 7) der Synthesevorrichtung alle Düsen **22** in einer bestimmten Reihenanordnung oder Reihe **40** kommunizierbar mit einem gemeinsamen unabhängigen Vorrat **23** des flüssigen Reagens, um die Zufuhr der flüssigen Reagenzien durch das Feld der Düsen zu steuern, wohingegen jede Reihenanordnung oder Reihe **40** der Düsen mit einem anderen flüssigen Reagens verbunden ist, das bei einer bestimmten Polymersynthese verwendet wird.

[0052] Die erste Reihe **40** der Düsen **22** kann z. B. nur den Aktivator Tetrazol abgeben, wohingegen die zweite Reihe der Düsen das Amidit Thymidin abgibt. Bei der Oligonucleotidsynthese kann sich diese Reihenfolge der Verteilung der flüssigen Reagenzien über die ganze Reihe der Amidite Adenosin, Cytosin und Guanin, die Hilfsbase AnyN, das Waschlösungsmittel/Reaktionslösungsmittel Acetonitril, das Cap Essigsäureanhydrid, das Cap N-Methylimidazol, Iod und die Deblocker Dichloressigsäure oder Trichloressigsäure fortsetzen, die jeweils Reagenzien darstellen, die für die Synthese von Oligonucleotiden mit einer definierten Sequenz verwendet werden.

[0053] Zur Vereinfachung der Darstellung sind übrigens nur fünf Reihen von Düsen gezeigt. Außerdem ist es selbstverständlich, daß irgendeine in diesem Feld enthaltene Düse kommunizierbar mit irgendeinem Reagensvorrat verbunden sein kann.

[0054] Die Zuführungsanordnung **43** der vorliegenden Erfindung verbindet jede Reihenanordnung der Düsen über unabhängige Abgaberöhrchen **44** mit einem gemeinsamen Reagensvorrat **23**. Jedes Röhrchen weist einen Durchgang **45** (**Fig.** 6) auf und hat ein Ende, das mit der entsprechenden Düse verbunden ist, und ein entgegengesetztes Ende, das im flüssigen Reagens **24** endet, das im Vorrat enthalten ist. Diese Röhrchen werden im Paßsitz in die Öffnungen **46** eingesetzt, die durch die Befestigungsblöcke **37** und eine Kopfplatte **47** der Kopfanordnung **21** verlaufen.

[0055] Die flexible und halbelastische Natur jedes Röhrchens **44**, vorzugsweise TEFLON®, durch die es gegenüber einer Beeinträchtigung beim Kontakt mit den Reagenzien widerstandsfähiger ist, liefert eine angemessene Abdichtung zwischen der Außenseite des Röhrchens und der entsprechenden Öffnung.

[0056] Das distale Ende jedes Röhrchen **44** bildet eine Düse **22**, wie es in den **Fig.** 2 und 6 gezeigt ist, die sich in quer positionierte Schlitze **50**, die in der Unterseite **51** der Kopfplatte **47** ausgebildet sind, jedoch nicht über diese hinaus erstreckt. Somit ist jede unabhängige Düse **22** ausgespart, so daß sie die Oberseite **52** der Grundgleit-platte **33** während der relativen Gleitbewegung zwischen diesen nicht behindert.

[0057] Die unabhängige Verlängerung jeder Düse in die Schlitze **50** fördert außerdem, daß das restliche flüssige Reagens, das sich nach der Zufuhr des Reagens aus der Düse an deren Ende angesammelt hat, von dieser entfernt oder abgegossen werden kann.

[0058] Zwei Dinge sind bei der Zuführung von flüssigen Reagenzien durch die Düsen **22** wichtig: 1) wie kann ein Tropfen sauber ausgestoßen werden, so daß der Tropfen nicht am Ende der Düse hängenbleibt, und 2) wie kann das Spritzen des Inhalts der Reaktionskammer verhindert werden, wenn der Strom des Reagens in die Vertiefung eingeführt wird. Außerdem muß die Ausstoßgeschwindigkeit des Reagens aus der Düse ausreichend sein, so daß das Vermischen des ersten und des zweiten zugeführten Reagens in der Reaktionskammer beginnt.

[0059] Sehr kleine Tropfen können mit hohen Ausstoßgeschwindigkeiten sauber ausgestoßen werden, sie haben jedoch keine ausreichende kinetische Energie, um die Oberflächenspannung der bereits in der Vertiefung vorliegenden Flüssigkeit zu überwinden, so daß es zu einer Vermischung kommt. Demgegenüber werden größere Tropfen bei hohen Ausstoßgeschwindigkeiten ebenfalls sauber ausgestoßen, neigen jedoch dazu, den Inhalt in benachbarte Vertiefungen zu spritzen.

[0060] Bei geringeren Ausstoßgeschwindigkeiten neigen die Reagenzien dazu, daß der letzte Tropfen an der Düsenspitze hängenbleibt, was auch eine Funktion der Querschnittsfläche der Spitze ist. Außerdem ändert sich die Strömungsrate von Flüssigkeiten durch ein kleines Kapillarröhrchen direkt mit dem Zuführungsdruck und umgekehrt mit der Länge des Röhrchens und umgekehrt mit dem Durchmesser.

[0061] All diese Variablen müssen in Betracht gezogen werden, wenn der Zuführungsdruck und die Gestaltung der Düsen sowie auch die Konstruktionsmaterialien entwickelt werden, so daß die Reagenzien sauber ausgestoßen werden können, ohne daß ein Resttropfen des flüssigen Reagens an der Düsenspitze hängenbleibt. In Abhängigkeit vom flüssigen Reagens kann es folglich vorteilhafter sein, wenn die Abgabe in einem kontinuierlichen Strom, einer Reihe von Impulsen oder in Tropfenform erfolgt.

[0062] Jeder Reagensvorrat **23** weist, wie in **Fig.** 7 gezeigt, ein Druckröhrchen **53** auf, das mit einer Kompressoreinrichtung (nicht gezeigt) verbunden ist, die den Luftraum **54** im Vorrat unter Druck setzt, damit das gespeicherte flüssige Reagens aus dem Vorrat und durch die entsprechenden Abgaberöhrchen **44** gedrückt wird. Die Zuführung der Reagenzien durch die Abgaberöhrchen **44** wird durch eine Gruppe von unabhängigen Ventilanordnungen **55** gesteuert, die jeweils in-line damit verbunden sind.

[0063] Diese Ventilanordnungen sind vorzugsweise mit von einem Solenoid gesteuerten Mikrosperrventilen versehen, die jeweils in weniger als 5 Millisekunden öffnen und schließen können, um die exakten Volumina des flüssigen Reagens zuzuführen.

[0064] Um einen konstanten Zuführungsdruck entlang jedes Abgaberöhrchens **44** und folglich eine konstante Zuführungsrate des flüssigen Reagens durch irgendeine Düse in einer Reihenanordnung oder Reihe **40** der Düsen **22** zu sichern, endet jedes Abgaberöhrchen unabhängig in dem im Reagensvorrat enthaltenen flüssigen Reagens. Unabhängig von der festgelegten Anzahl der Düsen für die Zuführung hat diese Konfiguration folglich nicht den Nachteil einer uneinheitlichen Zuführungsrate, die durch einen veränderlichen Leitungsdruck hervorgerufen wird.

[0065] Gemäß der vorliegenden Erfindung wirken die Basisanordnung **25** und die Kopfanordnung **21** mit der Transporteinrichtung **27** für die Relativbewegung zwischen der Basisanordnung und der Kopfanordnung zusammen, so daß das Feld der Vertiefungen an einer Vielzahl von Positionen mit dem Feld der Düsen ausgefluchtet wird. Die Transporteinrichtung bewegt die Basisanordnung vorzugsweise entlang ihrer Längsachse **35** (Phantomlinien in **Fig.** 3), so daß die Vertiefungen jeder Reihe **34** mit den Düsenspalten **41** ausgefluchtet bleiben. Die Basisanordnung **25** wird somit für eine Hin- und Herbewegung in Richtung der Pfeile **60** von der Rahmenanordnung **57** gleitend gehalten (**Fig.** 3 und 4).

[0066] Die Gleitplatte **33**, die die Mikrotiterplatte **32** trägt, wird für eine ausgefluchtete Bewegung gleitend in einem Laufbahnmechanismus **61** der Rahmenanordnung **57** aufgenommen. Durch die Steuerung der Zuführung des Reagens durch ausgewählte Düsen (über die Ventilanordnungen **55**) und durch die Bedienung der Transporteinrichtung kann somit in ausgewählten Vertiefungen gleichzeitig schnell und reproduzierbar eine Vielzahl von homogenen Populationen von Polymeren mit definierter Sequenz synthetisiert werden.

[0067] Die Transporteinrichtung **27** weist eine Schrittmotoranordnung **62** auf, die in **Fig.** 3 schematisch dargestellt ist, die betriebsmäßig mit der Gleitplatte **33** verbunden ist. Folglich wirken die Basisanordnung **25** und der Laufbahnmechanismus **61** und der Schrittmotor für eine linear zunehmende Bewegung zusammen, so daß das Feld der Vertiefungen an einer Vielzahl von Positionen mit dem Feld der Düsen ausgefluchtet ist. Es ist jedoch selbstverständlich, daß die Transporteinrichtung mit irgendeiner Motor/Laufbahn-Konfiguration versehen sein kann, die die Basisanordnung im Verhältnis zur Kopfanordnung bewegt.

[0068] Bevor die Polymersynthese beginnt oder nachdem Syntheseprozeß beendet ist, kann das Feld der Vertiefungen außerhalb der gemeinsamen Kammer **31** positioniert werden und für den Zugriff von außen zugänglich sein, indem die Vertiefungen **26** (durch die Bewegung der Basisanordnung **25**) ganz nach rechts oder links der Gleitdichtung **30** bewegt werden. Das Feld der Vertiefungen kann folglich gereinigt oder mit einem festen Trägermaterial gefüllt werden, was noch erläutert wird.

[0069] Außerdem ist der Zugriff zu den Vertiefungen und Düsen, wenn sie sich einmal innerhalb der gemeinsamen Kammer befinden, durch eine Klappanordnung **63** möglich, wie es in **Fig.** 4 gezeigt ist, die die Kopfanordnung **21** schwenkbar an der Rahmenanordnung **57** befestigt.

[0070] Die Gleitdichtung gemäß der vorliegenden Erfindung wird nunmehr anhand der **Fig.** 1, 3 und 5 beschrieben. Bei der Oligonucleotidsynthese durch Phosphoramidit-Kopplung gibt es zwei wesentliche chemisch-technische Vorschriften, da die Kopplungsreaktionen schnell und irreversibel sind: während der Synthese sind vorzugsweise sowohl Wasser als auch Sauerstoff aus der gemeinsamen Reaktionskammer auszuschließen. Phosphoramidite sind gegenüber der Hydrolyse durch Spuren von Wasser und gegenüber der Oxidation durch Kontakt mit Luft empfindlich.

[0071] Die Gleitdichtung **30** wird folglich zwischen der Unterseite **51** der Kopfanordnung **21** und der Oberseite **52** der Basisanordnung **25** angeordnet, so daß sowohl die Reaktionsvertiefungen als auch die Düsen in einer gemeinsamen Kammer **31** gegenüber der Umgebung abgeschlossen sind. Wie es nachstehend ausführlicher beschrieben ist, können außerdem die Hydrolyse und die Oxidation minimiert, wenn nicht sogar ausgeschlossen werden, wenn Spuren von Luft und Wasser mittels eines Inertgasstroms durch die gemeinsame Kammer ausgespült werden.

[0072] Die Gleitdichtung **30** muß gebildet werden, damit ein Verschluß gegenüber der Umgebung aufrechterhalten bleibt, während die Basisanordnung im Verhältnis zur Kopfanordnung gleiten kann. In der bevorzugten Form wird die Gleitdichtung **30** von einer elastischen, rechtwinklig geformten wasserbeständigen Foliendichtung oder Ballondichtung gebildet, deren oberes Ende an der Unterseite **51** des Kopfes angebracht ist und deren entgegengesetztes oder unteres Ende **64** im Gleitkontakt mit der Oberseite **52** der Basis steht.

[0073] Diese besondere Dichtung, die vorzugsweise aus Gummi oder dgl. besteht, verbessert die Integrität der Dichtung zwischen dem unteren Ende **64** der Dichtung und der Oberseite **52** der Basis, wenn in der Druck in der gemeinsamen Kammer zunimmt. **Fig.** 5 zeigt, daß sich das untere Ende **64** der Dichtung am Umfang einwärts in Richtung der Innenseite der gemeinsamen Kammer **31** verjüngt.

[0074] Wenn der Druck in der Kammer zunimmt, dehnen sich die Wände der Dichtung **30** nach außen, so daß der Flächenkontakt zwischen dem unteren Ende der Dichtung und der Oberseite der Basis für eine besser abdichtende Verbindung zwischen beiden zunimmt.

[0075] Damit der Gleitkontakt erleichtert wird, wobei der Verschluß gegenüber der Umwelt erhalten bleibt, weist die Dichtung **30** eine klebefreie Beschichtung oder Schicht **65** (**Fig.** 5), vorzugsweise aus TEFLON®, zwischen dem unteren Ende der Dichtung und der Oberseite der Basis auf. Diese Schicht dient ferner dem Zweck, die Dichtung vor der Absorption von restlichen flüssigen Reagenzien an der Oberfläche zu schützen, die beim Kontakt, teilweise wegen ihrer elastischen Natur, zu einer Beeinträchtigung der Dichtung neigen. Wie in **Fig.** 5 gezeigt, kann die Oberseite **52** der Basisanordnung auch eine Beschichtung oder Schicht **66** aus TEFLON® aufweisen, damit der Gleitkontakt gefördert und die Oberseite vor einem Reagensrest gestützt wird.

[0076] Es ist selbstverständlich, daß die Abdichtung zwischen dem unteren Ende **64** der Dichtung und der Oberseite **52** der Basis nicht hermetisch sein muß. Die grundsätzliche Funktion der Dichtung besteht darin, Sauerstoff aus der Reaktionskammer auszuschließen. Somit ist es wichtig, daß zu jedem Zeitpunkt während der Synthese im Inneren der gemeinsamen Kammer **31** normalerweise der Mindestüberdruck aufrechterhalten wird, der etwas höher als der Atmosphärendruck ist, so daß der Gasstrom, sollte eine Undichtigkeit auftreten, nach außen gehen würde. Diese Mindestüberdruckdifferenz beträgt im allgemeinen etwa 69 Pa (1/100 psi) bis etwa 689 Pa (1/10 psi).

[0077] Wie bereits angegeben und in den **Fig.** 3, 5 und 6 im Überblick gezeigt, ist es erwünscht, Spuren von Luft und Wasser mit einem Inertgas, vorzugsweise Argon, aus dem Reaktionskopfraum der Kammer auszuspülen, damit die Hydrolyse und die Oxidation der Amidite während der Synthese minimiert werden. Es ist ferner erwünscht, daß das Inertgas kontinuierlich durch den Kopfraum strömt, um die empfindlichen Amidite vor den schützenden und deblockierenden Reagenzien, wie wäßrigem Ioddampf oder Trichloressigsäure, zu schützen, die mit den Amiditen reagieren.

[0078] Das wird erreicht, indem ein Inertgasstrom (wie es mit den Pfeilen **67** gezeigt ist) von einem Gaseinlaß **70**, der sich stromaufwärts des Feldes der Düsen **22** befindet, durch die gemeinsame Kammer **31** strömt, der die Kammer durch einen Gasauslaß **71** verläßt, der sich stromabwärts der Düsen befindet.

[0079] Der Gaseinlaß **70** ist durch ein Einlaßröhrchen **72** (**Fig.** 1) mit einer Gasversorgung (nicht gezeigt) verbunden, das ferner den Überdruck im Inneren der gemeinsamen Kammer **31** bereitstellt, der erforderlich ist, um Sauerstoff aus der Umgebung auszuschließen. Da der Kopfraum der gemeinsamen Kammer relativ klein ist (in den Figuren zur Erläuterung vergrößert dargestellt), kann nach den Düsen ein ausreichender Gasstrom erzeugt werden, um die Kammer zu spülen oder auszuspülen, ohne daß große Gasvolumina verbraucht werden.

[0080] Der Gaseinlaß ist vorzugsweise mit einem länglichen Einlaßschlitz **70** (**Fig.** 2) versehen, der sich in die Kopfplatte **47** erstreckt und quer zur Längsachse **42** der Kopfplatte **47** ausgefluchtet ist. Diese Form und Orientierung leitet eine im wesentlichen laminare Strömung der Inertgase vom stromaufwärtigen Einlaß **70** zum stromabwärtigen Auslaß **71** ein, so daß ein Querstrom des Gases entlang der Düsen minimiert wird und die

Ruhezonen von stagnierenden Dämpfen der Reagenzien aus der Kammer gespült werden.

[0081] Es ist selbstverständlich, daß der Gaseinlaß auch mit einer Reihe von Öffnungen versehen sein kann, die sich quer entlang der Kopfplatte **47** erstrecken, und daß der Gasauslaß **71** außerdem mit einem länglichen Schlitz oder eine Reihe von Öffnungen versehen sein kann.

[0082] Aufgrund des Gastroms durch die Kammer werden die säure- und feuchtigkeitsempfindlichen Phosphoramide stromaufwärts der deblockierenden und schützenden Reagenzien positioniert, so daß eine Gasdiffusionssperre erzeugt wird, die den Spüleffekt maximiert. Folglich werden in **Fig.** 3 die Phosphoramide aus den Düsen **22**, die näher am Gaseinlaß **70** sind, abgegeben, wohingegen die schützenden, waschenden und deblockierenden Mittel aus den Düsen abgegeben werden, die sich näher am Gasauslaß **71**, stromabwärts der Phosphoxamid abgebenden Düsen, befinden.

[0083] Wie in den **Fig.** 5 und 6 am besten gezeigt, ist die Polymersynthesevorrichtung **20** nach einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung mit Reaktionsvertiefungen **26** ausgestattet, die mindestens eine Öffnung, die allgemein mit **74** bezeichnet ist, aufweisen, die sich in die Vertiefung erstreckt. In der Vertiefung befindet sich mindestens ein fester Träger **75**, um darauf eine Polymerkette zu züchten und zu immobilisieren. Die Reagenzlösung **76** in der Vertiefung **26** steht mit dem festen Träger **75** in Kontakt, und mindestens eine Polymereinheit der Polymerkette ist am festen Träger fixiert.

[0084] Die Öffnung **74** weist einen Eingang **77** in die Vertiefung **26** von Seite der gemeinsamen Kammer her und einen Ausgang **80** aus der Vertiefung in einen darunterliegenden unteren Auffangbehälter **81** auf. Es ist wichtig, daß die Öffnung eine solche Größe und Abmessung aufweist, daß eine Kapillar-Flüssigkeitsdichtung mit der darin enthaltenen Reagenslösung **76** gebildet wird, so daß die Reagenslösung in der Vertiefung zurückgehalten wird, damit darin eine Polymerkette wachsen kann.

[0085] Um die Lösung **76** besser in den Vertiefungen **26** zurückzuhalten, muß die Druckdifferenz zwischen dem Gasdruck in der gemeinsamen Kammer, der auf die Reagenslösung in den Reaktionsvertiefungen **2G** ausgeübt wird, und einem zweiten Gasdruck, der auf die Ausgänge **80** der Öffnungen ausgeübt wird (in **Fig.** 6 mit den Pfeilen **79** gezeigt) geringer als ein vorbestimmter Wert sein. Schließlich ist eine Druckreguliereinrichtung **82** zur Steuerung der Druckdifferenz vorgesehen, so daß die Reagenslösung **76**, wenn die Druckdifferenz den vorbestimmten Wert übersteigt, durch die Öffnung **74** aus der Vertiefung **26** ausgestoßen wird (**Fig.** 5).

[0086] Kurz zusammengefaßt können nach einer geeigneten Ausfluchtung der ausgewählten Vertiefungen **26'** und der ausgewählten Düsen **22'** (**Fig.** 6) unter Verwendung dieser Gruppentechnik und der vorstehend genannten neuen Vorrichtung die flüssigen Reagenzien in ausgewählte Vertiefungen **76'** eingebracht werden. Die eingebrachten Reagenslösungen sammeln sich entlang der exakt bemessenen Öffnung **74**, in Kombination mit einer relativ geringen Druckdifferenz (nicht höher als vorbestimmte Wert), so daß entlang der Öffnung **74** ein Meniskus gebildet wird und eine Kapillar-Flüssigkeitsdichtung geschaffen wird, damit die Lösung in der Vertiefung zurück-gehalten wird, ohne daß sie durch die Öffnung abläuft.

[0087] Diese Abdichtung trennt die gemeinsame Reaktionskammer wirksam von der Umgebung des darunter liegenden unteren Auffangbehälters **81**. Nachdem ausreichend Zeit vergangen ist, um die Synthesereaktion zu beenden (im allgemeinen etwa 1 Minute), wird die Reagenslösung aus der Vertriefung **26** durch die Öffnung **74** und in den unteren Auffangbehälter **81** gespült, indem die Gasdruckdifferenz über den vorbestimmten Wert erhöht wird, so daß die Kapillarkräfte in der Öffnung überwunden werden (**Fig.** 5).

[0088] Danach können die ausgespülten Reagenslösungen durch einen Ablauf **83** aus dem Auffangbehälter abgezogen werden. Dieses Verfahren wird für jeden Synthesezyklus (d. h. die Schritte des Deblockierens, Waschens, Koppelns, Schützens und Oxidierens) wiederholt, bis das gewünschte definierte Synthesepolymer hergestellt ist.

[0089] Es ist eine zurückhaltende Einrichtung vorgesehen, die allgemein mit **84** bezeichnet ist, die sich im Boden der Vertiefung **26** zwischen der Öffnung **74** und festen Träger **75** befindet, die so ausgebildet und bemessen ist, daß der feste Träger im wesentlichen nicht durch die Öffnung gelangen kann. Die zurückhaltende Einrichtung **84** wird vorzugsweise von einer Fritte aus Polyethylen oder Glasfasern gebildet, die als Filtermembran wirkt, wobei die Reagenslösung hindurchströmen kann, während der feste Träger und die darauf wachsende Polymerkette in der Vertiefung zurück-gehalten weiden. Somit stellt bei der Erzeugung der Kapillar-Flüssigkeitsdichtung und der Bestimmung der erforderlichen Druckdifferenz, um die Reaktionsvertiefung zu spülen, auch die Porosität der Fritte einen Faktor dar.

[0090] Um wie vorstehend erwähnt die Druckdifferenz zwischen der gemeinsamen Kammer **31** und dem unteren Auffangbehälter **81** zu regeln und zu steuern, ist eine Druckregulierungseinrichtung **82** vorgesehen, die betriebsmäßig dazwischen gesetzt ist. Im bevorzugten Ausführungsbeispiel ist die Druckregulierungseinrichtung **82** in die Gasströmungsanordnung integriert, die verwendet wird, um den Kopfraum in der gemeinsamen Kammer **31** von Reagenstoxinen zu spülen.

[0091] Wenn das Inertgas die Kammer vom Gaseinlaß **70** zum Gasauslaß **71** ungehindert spült, wird die Mindestdruckdifferenz im allgemeinen zwischen etwa 1/100 psi bis etwa 1/10 psi gehalten. Diese Druckdifferenz ist ausreichend positiv, um das Eindringen von Umgebungsluft in die gemeinsame Kammer zu verhindern, wohingegen sie nicht ausreicht, um die Kapillarkräfte der Kapillar-Flüssigkeitsdichtung in jeder Vertiefung zu überwinden.

[0092] Wenn das Ausströmen von Inertgas durch den Gasauslaß **71** verhindert oder eingeschränkt wird, kann der Druck im Inneren der Kammer **31** erhöht werden, so daß die Druckdifferenz zum Spülen der Vertiefungen zunimmt (**Fig.** 5), wenn der Druck des Auffangbehälters nicht auf den gleichen oder einen höheren Wert erhöht wird.

[0093] Die Druckregulierungseinrichtung **82** weist folglich ein Kammerventil **85** (**Fig.** 1) auf, das mit dem Gauslaß **71** verbunden ist, um das Ausströmen des die gemeinsame Kammer **31** spülenden Inertgases zu steuern. Durch eine ausreichende Verhinderung oder Einschränkung der Strömung durch das Kammerventil **85** kann folglich die Druckdifferenz über den vorbestimmten Wert erhöht werden, so daß gleichzeitig die Reagenslösung aus den Vertiefungen gespült werden kann. Wenn das Kammerventil **85** ausreichend geöffnet wird, kann in ähnlicher Weise die Druckdifferenz unter den vorbestimmten Wert verringert werden, falls es erwünscht ist, die eingebrachte flüssige Lösung in den ausgewählten Vertiefungen zurückzuhalten.

[0094] Die flüssige Reaktionslösung tritt nicht aus der Öffnung **74** der Vertiefung aus oder wird nicht daraus ausgespült, bis nicht eine ausreichende Druckhöhe der Flüssigkeit in der Vertiefung oder eine ausreichende Gasdruckdifferenz zwischen der gemeinsamen Kammer und dem unteren Auffangbehälter entstanden ist, um die Kapillarkräfte in der Öffnung zu überwinden. Die Rate des von der Schwerkraft und vom Druck gesteuerten Austritts aus der Öffnung wird primär von der Viskosität des Lösungsmittels, der Porosität der Fritte, der Größe der Öffnung und der Gasdruckdifferenz bestimmt.

[0095] Eine 10 µm Fritte aus Polyethylen mit UHMW und eine 0,04 cm^2 (0,015 in^2) Öffnung tragen eine Flüssigkeitsdruckhöhe von Acetonitril (mit einer Viskosität von etwa 0,345 cP ($7{,}2 \times 10^{-5}$ $(lbf \cdot s)/ft^2$ bei einer Betriebstemperatur von etwa 20°C (68°F)) von mindestens 2,0 cm (0,79 in), bevor die Überwindung der Kapillarkräfte in der Öffnung beginnt. Durch eine Erhöhung der Druckdifferenz über den vorbestimmten Wert (im allgemeinen etwa 6895 Pa (1 psi) auf etwa 34474 Pa (5 psi) geht andererseits das Spülen der Vertiefung schnell vonstatten. In der Praxis ist es erforderlich, eine Druckdifferenz zwischen etwa 17237 Pa (2,5 psi) und etwa 34474 Pa (5 psi) zu halten, um die Reagenslösung gleichzeitig ausreichend aus den Reaktionsvertiefungen zu spülen.

[0096] Wenn sich die einzelnen Vertiefungen beginnen zu leeren, nimmt die Strömungsrate des Inertgases durch die leeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wesentlich zu, was den Druck in der gemeinsamen Kammer **31** verringert. Folglich verringert diese Abnahme des Innendrucks die Spül- oder Ablaufrate der Reagenslösung durch die Öffnungen weiter, ein Effekt, der durch die zurückhaltende Filtermembran **84** verstärkt wird.

[0097] Es ist selbstverständlich, daß auch eine Druckdifferenz entstehen kann, wenn im unteren Auffangbehälter **81** ein Vakuum erzeugt wird, um die Reaktionsvertiefungen zu spülen. **Fig.** 1 zeigt, daß eine Zugangsöffnung **86** in den unteren Auffangbehälter **81** durch eine Abdeckung **87** verschlossen werden kann, und ein Ablauf **83** mit einer Vakuumpumpe verbunden werden kann, die im Behälter ein Vakuum erzeugt. Die Druckdifferenz kann auch durch eine Kombination aus Überdruck in der gemeinsamen Kammer **31** und einem Vakuum im Auffangbehälter **81** entstehen.

[0098] Da sich die Reagenslösung für deren Reaktion zudem in der Reaktionsvertiefung sammeln kann, statt daß sie kontinuierlich durch die Kammer strömt, wie es bei einigen anderen herkömmlichen Anordnungen erfolgt, wird der Verbrauch der Reagenzien wesentlich minimiert, so daß Kosten gespart werden. Die Arbeitskosten werden auch verringert, wenn jede Zykluszeit minimiert wird.

[0099] Um all diese gleichzeitigen Funktionen zu koordinieren, ist eine Steuereinrichtung **90** (vgl. **Fig.** 7) betriebsmäßig zwischen der Transporteinrichtung **27**, den Ventilanordnungen **55** und der Druckregulierungseinrichtung **82** eingebunden. Es kann ein Sequenzbefehl eingegeben werden, der eine bestimmte Aufstellung der

Position der Vertiefung, eine Stufenfolge, die Instruktion für das abschließende Deblockieren und die Sequenz von ATGC und N (unpaarige Base) für jedes Oligonucleotid enthält.

[0100] Dieser Befehl wirkt mit einem Steuerbefehl zusammen, der dazu dient, die tatsächliche Anzahl und Reihenfolge der Schritte aus Deblockieren/Waschen/Koppeln/Schützen/Oxidieren und die Zeitdauer für die Schritte aus Warten und Druck und/oder Entspannen zu kennzeichnen, die den kompletten Kopplungszyklus definieren.

[0101] Oligonucleotide werden typischerweise auf festen Trägern aus Glas mit geregelten Poren (CPG) synthetisiert, wobei das erste Oligonucleotid über eine 3'-Succinatbindung bereits an das CPG gebunden ist. Bei der Vorbereitung für die Polymersynthese wird folglich jede Vertiefung einzeln mit dem exakten CPG-Derivat gefüllt. Obwohl man mit einer ganzen Syntheseplatte beginnen kann, wobei nur ein CPG-Derivat, z. B. T (d. h. dT-Icaa-CPG) verwendet wird, ist es stärker erwünscht, eine Gruppensynthese durchzuführen, bei der sich irgendeine Base in der ersten Position befinden kann. Das einzelne Abwiegen und Übertragen von 0,5 mg Mengen des geeigneten trockenen CPG-Derivats in jede Vertiefung kann jedoch ermüdend und zeitaufwendig sein.

[0102] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren mit einer Aufschlämmung mit ausgeglichener Dichte angewendet, um die exakte Menge von CPG in eine Reaktionsvertiefung einzubringen. Wenn das CPG in einer Suspensionslösung suspendiert wird, kann die gewünschte CPG-Menge exakt in eine Vertiefung eingebracht werden, in dem das entsprechende Volumen der Suspensionslösung entweder automatisch oder manuell in diese pipettiert wird.

[0103] Eine sich nicht absetzende Suspension von CPG mit 10% → 1% Gewicht/Volumen kann z. B. in einer Dibromethan-Dichlormethan-Lösung mit 2,5 : 1 Volumen/Volumen hergestellt werden. Vor der Synthese unter Anwendung des vorstehend genannten Verfahrens kann das CPG anschließend gewaschen werden und die Suspensionslösung kann abgespült werden.

[0104] Nach einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Synthetisieren einer Polymerkette angegeben, das die folgenden Schritte aufweist:
(A) Ausfluchten der Reaktionsvertiefung **26** und einer ausgewählten Düse **22** der Synthesevorrichtung **20** durch eine Transporteinrichtung **27**, die mit der Kopfanordnung **21** und/oder der Basisanordnung **25** verbunden ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu erzeugen; und (B) Einbringen eines flüssigen Reagens **24** aus dem Reagensvorrat **23** durch diese eine Düse **22** in die Vertiefung **26**, um die Synthese einer Polymerkette zu ermöglichen.

[0105] Abschließend (C) das Ausspülen von toxischen Schwaden, die von den Reagenzien abgegeben werden, aus der gemeinsamen Kammer **31** durch Hindurchleiten eines Gases aus der Druckgasversorgung, die mit einem Einlaß **70** in die gemeinsame Kammer **31** verbunden und stromaufwärts der Düsen positioniert ist, und aus der Kammer durch einen Auslaß **71** aus der gemeinsamen Kammer, der stromabwärts der Düsen positioniert ist.

[0106] Es wird ein weiteres Verfahren zur Polymersynthese angegeben, um eine Polymerkette durch sequentielle Zugabe von Polymereinheiten zu zumindest einem festen Träger aufzubauen, damit darauf in einem flüssigen Reagens eine Polymerkette wächst und immobilisiert wird. Dieses Verfahren umfaßt die folgenden Schritte: A) Einbringen eines flüssigen Reagens **24** in die Reaktionsvertiefung **26**, die eine geeignet bemessene Öffnung **74** aufweist, in Kontakt mit mindestens einem festen Träger **75** und mindestens einer Polymereinheit der Polymerkette, die am festen Träger **75** fixiert ist, und Erzeugen einer Kapillar-Flüssigkeitsdichtung, um die Reagenslösung in der Vertiefung **26** zurückzuhalten, damit die Polymerkette auf dem festen Träger **75** wachsen kann. Der nächste Schritt weist folgendes auf: B) Aufbringen eines ersten Gasdrucks auf die Reaktionskammer **31**, so daß die Druckdifferenz zwischen dem ersten Gasdruck und einem zweiten Gasdruck, der auf einen Ausgang **80** der Öffnung **74** ausgeübt wird, einen bestimmten Wert übersteigt, der erforderlich ist, um die Kapillar-Flüssigkeitsdichtung zu überwinden und die Reagenslösung durch die Öffnung **74** aus der Vertiefung **26** auszustoßen.

[0107] Durch Wiederholen dieser Schritte der beiden vorstehend genannten Verfahren kann eine kontinuierliche Kette von Polymereinheiten erzeugt werden.

[0108] Das folgende Beispiel dient dazu, die Axt und Weise der Anwendung der vorstehend beschriebenen Erfindung ausführlicher zu beschreiben sowie auch die beste Art und Weise aufzuführen, die für die Durchführung der verschiedenen Gesichtspunkte der Erfindung in Betracht gezogen wird. Es ist selbstverständlich, daß

dieses Beispiel keineswegs dazu dient, den tatsächlichen Umfang der Erfindung einzuschränken, sondern nur als Erläuterung aufgeführt ist. Es ist selbstverständlich, daß in der vorliegenden Erfindung irgendein Verfahren zum Synthetisieren von Oligonucleotiden angewendet werden kann.

Beispiel 1

Synthese einer Gruppe aus 15 Oligonucleotiden

[0109] Das allgemeine Syntheseverfahren folgt veröffentlichten Verfahren für Phosphoramidit- und Hydrogenphosphonat-Verfahren der Oligonucleotidsynthese, z. B. den Verfahren, die in Oligonucleotides and Analogues: A. Practical Approach, F. Eckstein, Herausg. IRL Press, Oxford University; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Gait, Herausg. IRL Press, Washington D. C.; und in US-Patenten Nr. 4,458,066, 4,500,707 und 5,047,524 aufgeführt sind. Es ist selbst-verständlich, daß in der vorliegenden Erfindung andere Verfahren zum Synthetisieren von Oligonucleotiden angewendet werden können.

[0110] Die grundsätzlichen Schritte der Synthesereaktion sind im allgemeinen wie folgt, mit geeigneten Waschschritten mit Acetonitril:

a) das erste Nucleosid, das in der 5'-Position geschützt worden ist, wird auf einen festen Träger, gewöhnlich Glas mit geregelten Poren (CPG), derivatisiert oder wird bereits derivatisiert erhalten;

b) die Schutzgruppe des Zuckerrestes des ersten Nucleosids wird entfernt oder dieser Zuckerrest wird detrityliert, wobei Trichloressigsäure-Methylenchlorid verwendet wird, was zu einem gefärbten Produkt führt, das für den Ablauf der Reaktion überwacht werden kann;

c) das zweite Nucleotid, bei dem die Phosphor-, Zucker- und Basenreste geschützt sind, wird der wachsenden Kette, gewöhnlich in Gegenwart eines Tetrazol-Katalysators, zugesetzt;

d) das unreagierte erste Nucleosid wird geschützt, um sich fortsetzende Fehler zu vermeiden, wobei Essigsäureanhydrid und N-Methylimidazol verwendet werden;

e) der Phosphittriester wird oxidiert, so daß der stabilere Phosphattriester erzeugt wird, wobei gewöhnlich Iod-Reagenzien verwendet werden;

f) das Verfahren wird wie erforderlich wiederholt, wobei dies von der gewünschten Länge des Oligonucleotids abhängt; und

g) es erfolgt die Abspaltung vom festen Träger, wobei gewöhnlich für einen Zeitraum von Stunden wäßriger Ammoniak bei erhöhten Temperaturen verwendet wird.

[0111] Somit wurde ein Sequenzbefehl erzeugt, der folgendes angibt: die 3'-5'-Sequenz und die Nummer der Vertiefung für jedes zu synthetisierende Oligonucleotid, den Umfang der Reaktion für jedes Oligonucleotid und ob am Ende der Reaktion eine abschließende Detritylierung des Produktes erfolgen soll. Die Software wurde so gestaltet, daß sie die gleichzeitige unabhängige Synthese von Oligonucleotiden mit unterschiedlichen Längen und unterschiedlichem Umfang unterstützt. Die Sequenz der 15 verschiedenen Oligonucleotide ist in der nachstehenden Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Nummer	Sequenz
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

[0112] Es wurde ein Steuerbefehl erzeugt, der die Sequenz der Reaktionsschritte, die während eines Kopplungszyklus durchgeführt werden, enthielt. Die grundsätzlichen Befehle sind Waschen (Volumen), Deblockieren (Volumen), Koppeln, Schützen, Oxidieren, Warten (Sekunden) und Ablassen (Druck/Vakuum Sekunden), wie es in der nachstehenden Tabelle 2 gezeigt ist:

Tabelle 2

Schritt Nummer	Schritt	Volumen (λ)	Zeit (s)
1	Deblockieren	125	
2	Warten		5
3	Ablassen		15
4	Waschen	200	
5	Ablassen		15
6	Waschen	300	
7	Ablassen		20
8	Waschen	200	
9	Ablassen		20
10	Koppeln		
11	Koppeln		
12	Warten		150
13	Ablassen		10
14	Waschen	200	
15	Ablassen		15
16	Schützen		
17	Warten		40
18	Ablassen		10
19	Waschen	200	
20	Ablassen		15
21	Oxidieren		40
22	Warten		10
23	Ablassen	300	
24	Waschen		20
25	Ablassen	200	
26	Waschen		20
27	Ablassen		

[0113] Es wurde ein Konfigurationsbefehl erzeugt, der die Betriebsmerkmale der Vorrichtung, die Strömungsraten der Flüssigkeit, die Konzentration und die molaren Äquivalente, die für jedes der Reagenzien verwendet wurden, angibt, wie es in der nachstehenden Tabelle 3 gezeigt ist.

Tabelle 3

Reagens	Konzentration	Strömungsrate	molarer Überschuß
Acetonitril		220 λ/s	
Trichloressigsäure-Methylenchlorid		125 λ/s	
Tetrazol	0,45 m	210 λ/s	250
Essigsäureanhydrid		210 λ/s	500
N-Methylimidazol		210 λ/s	500
Iod		210 λ/s	150
Phosphoramidit	0,1 m	210 λ/s	

[0114] Es wurden Platten mit 96 Vertiefungen verwendet, die einen sich verjüngenden unteren Abschnitt aufweist, der zurückversetzt ist, so daß eine 0,50 cm (0,196 inch) Filterscheibe im Paßsitz aufgenommen werden kann. Unter dem Filter befand sich die Strömungsdrosselung und die Öffnung für die Kapillar-Flüssigkeitsdichtung, 0,05 cm (0,020 inch) Durchmesser × 0,89 cm (0,350 inch) Länge. Der Außendurchmesser der Kapillardichtung betrug an der Ausgangsspitze 0,09 cm (0,035 inch).

[0115] Beim Verbinden mit Filtern Whatman FG/A betrug der Gasdurchsatz über eine vollständig trockene Platte bei einem Druck der oberen Kammer von 6895 Pa (1 psi) 10 l/Minute. Bei einem Druck der oberen Kammer von 138 Pa (0,02 psi) hielt die Kapillardichtung am Boden der Synthesevertiefung eine Flüssigkeitsdruckhöhe von Acetonitril von etwa 1 cm über dem Filter aus, bevor das langsame Auslaufen begann. Die Platten waren aus geformtem Polypropylen hergestellt.

[0116] In jede Vertiefung wurde die exakte Menge von CPG mit der derivatisierten ersten Base, entweder A, T, C oder G, gegeben. Bei einer Reaktion mit einem Umfang von 20 nMol wurde z. B. 0,5 mg CPG verwendet. Die CPG-Kügelchen wurden als Aufschlämmung in Dibromethan-Chloroform zugesetzt, die in jede Vertiefung pipettiert wurde. Dieser Schritt wurde in der üblichen Laboratmosphäre durchgeführt, bevor die Platte in die Vorrichtung gegeben wurde. Nachdem die Platte in die Vorrichtung gegeben worden war, erfolgte ein Waschzyklus mit Acetonitril, um die Aufschlämmung zu spülen und zu bestätigen, daß alle Vertiefungen angemessen abgelassen worden waren.

[0117] Die Düsenventilbehälter wurden mit Argon gespült und dann durch Übertragung mittels Druck mit frischen Reagenzien aus Beschickungsflaschen gefüllt, um eine Verunreinigung mit Luft und Wasser zu vermeiden. Die Ventilbehälter wurden dann auf den Konfigurationsdruck von 27579 Pa (4 psi) gebracht. Das Düsenröhrchen wurde dann vorgefüllt, indem in der Spülposition der Gleitplatte für jedes Reagens eine kleine Flüssigkeitsmenge abgegeben wurde.

[0118] Während der Zeiträume für die Zugabe des Reagens und des Abwartens der Reaktion wurde die laminare Strömung der Gasspülung durch die Reaktionskammer bei einem Innendruck von etwa 138 Pa (0,02 psi) bei 0,4 l/min geregelt. Während der Zyklen zum Entfernen des verbrauchten Reagens und zum Waschen wurde der Druck der Kammer auf einen Höchstwert von 34474 Pa (5 psi) erhöht. Bei 17237 Pa (2,5 psi) liefen die Synthesevertiefungen mit einer Rate von etwa 150 λ/s aus.

[0119] Dann wurde die Vorrichtung in den automatischen Modus umgeschaltet, um die tatsächliche Synthese einzuleiten. Die Maschine machte während des ersten, zweiten und letzten Zyklus eine Pause, damit sich die Tritylprodukte vom Deblockieren für die Kolorimetrieanalyse sammeln konnten. Das wurde erreicht, indem man eine zweite Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen in die untere Vakuum/Ablaß-Kammer, direkt unter den kapillarförmigen Ausgangsspitzen der Syntheseplatte gleiten ließ.

[0120] Die optische Dichte der Detritylierungslösung wurde bei 490 nm mit einem Plattenlesegerät abgelesen. Der Wert für den ersten Zyklus bestätigte die in die Vertiefung eingebrachte CPG-Menge, und ein Vergleich des zweiten Zyklus mit dem letzten Zyklus erlaubte eine Berechnung des Wirkungsgrads dieser Synthese beim Koppeln. Der Wert des letzten Zyklus gibt auch die Menge des Oligonucleotids an, die nach dem Ent-

fernen des Schutzgruppe der Seitenkette durch Ammoniakspaltung erhalten wurde.

[0121] Nachdem die Vorrichtung die Synthese in allen Vertiefungen beendet hatte, wurde die Syntheseplatte aus der Vorrichtung genommen. Die Syntheseplatte wurde auf eine zweite Platte mit 96 Vertiefungen zum Entfernen der Schutzgruppe (Beckman-Titerplatte mit tiefen Vertiefungen 267001) gestapelt. Die Oligonucleotide wurden vom Träger abgespalten, indem in jede Vertiefung 200 µl konzentriertes NH_4OH pipettiert wurden, worauf 15 Minuten bei 25°C inkubiert wurde.

[0122] Die Lösungen für die Ammoniumspaltung eluierten durch den Filter und dem kapillarförmigen Ausgang in die Vertiefungen der Platte zum Entfernen der Schutzgruppe aufgrund von Druck, Vakuum oder vorzugsweise kurzes Zentrifugieren des Stapels. Der Spaltungsschritt wurde zweimal mit frischen aliquoten Ammoniakmengen wiederholt.

[0123] Wenn die für die Synthese verwendeten Phosphoramidite Benzoyl- und Isobutyryl-Schutzgruppen aufwiesen, wurde das abschließende Entfernen der Schutzgruppen komplettiert, indem das unbehandelte Produkt der Ammoniakspaltung erwärmt wurde. Die Vertiefungen der Titerplatte zum Entfernen der Schutzgruppe wurden mit einer Abdeckung aus gekräuseltem Silicongummi (Beckman 267002) verschlossen, und die Abdeckungen wurden mit einer gefederten Plattenpresse in ihrer Position gehalten.

[0124] Die verschlossene Vorrichtung wurde 8 bis 15 Stunden in einem Luftofen oder einem Wasserbad bei 55°C erwärmt und danach in einem Eisbad abgekühlt. Die Platte zum Entfernen der Schutzgruppe wurde aus der Presse genommen und vor dem Entfernen der Abdeckung kurz zentrifugiert.

[0125] Dann wurde die Ammoniaklösung bis zur Trockne verdampft, wobei ein Savant 210 Speed Vac verwendet wurde, das mit einem Mikroplattenrotor ausgestattet war. Die so erhaltenen Oligonucleotid-Pellets waren im allgemeinen ausreichend rein, so daß sie bei den meisten Anwendungen als Sequenzierungs-Primer und bei der PCR direkt verwendet werden konnten. Die Oligonucleotidmenge, die durch den letzten Trityl-Assay vorhergesagt worden war, wurde durch die optische Dichte bei 260 nm bestätigt, und die Homogenität des Produktes wurde durch HPLC oder Kapiallar-Gelelektrophorese bestätigt.

[0126] Die Kapiallar-Gelelektrophorese wurde mit dem Gerät Applied Biosystems 270A laut Protokoll des Herstellers durchgeführt, für die Oligonucleotide 14 und 15 vom vorstehenden Versuch sind sie in den **Fig.** 8A bzw. 8B gezeigt. Die typischen Ausbeuten für eine Synthese mit einem Umfang von 20 nMol eines 20-Mers betrugen 2,5 OD (85 µg).

Patentansprüche

1. Polymersynthesevorrichtung (**20**) zum Aufbauen einer Polymerkette durch sequentielle Zugabe von Polymereinheiten in eine Reagenslösung, wobei die Vorrichtung (**20**) folgendes aufweist:
– eine Kopfanordnung (**21**), an der eine Vielzahl von Düsen (**22**) in einer im allgemeinen beabstandeten Relation angebracht ist, wobei jede Düse (**22**) mit einem Vorrat (**23**) von flüssigem Reagens (**24**) zur gesteuerten Abgabe durch sie hindurch verbunden ist;
– eine Basisanordnung (**25**), die mindestens eine Reaktionsvertiefung (**26**) und mindestens eine Öffnung (**74**) hat, die sich in die Vertiefung (**26**) erstreckt, wobei die Öffnung (**74**) einen Eingang in die Vertiefung (**26**) und einen Ausgang hat und eine solche Größe und Dimension besitzt, daß sie eine Kapillar-Flüssigkeitsdichtung bildet, um das eingebrachte flüssige Reagens (**24**) in der Vertiefung (**26**) zurückzuhalten, um ein Polymerkettenwachstum darin zu ermöglichen, wenn eine Druckdifferenz zwischen einem ersten Gasdruck in der Kammer (**31**) und einem zweiten Gasdruck, der auf den Ausgang der Öffnung (**74**) aufgebracht wird, kleiner als ein vorbestimmter Wert ist;
– eine Transporteinrichtung (**27**), die mit mindestens einer von der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) verbunden ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu erzeugen, um die Reaktionsvertiefung (**26**) und eine ausgewählte Düse (**22**) in Ausfluchtung zu positionieren für das Einbringen eines flüssigen Reagens (**24**) in die Reaktionsvertiefung (**26**) für die Synthese einer Polymerkette;
– eine zwischen der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) positionierte Gleitdichtung (**30**), die eine gemeinsame Kammer (**31**) bildet, die sowohl die Reaktionsvertiefung (**26**) als auch die Düsen (**22**) darin einschließt; und
– eine Druckreguliereinrichtung (**82**) zum Steuern der Druckdifferenz derart, daß im Gebrauch, wenn die Druckdifferenz den vorbestimmten Wert überschreitet, die Reagenslösung (**24**) durch die Öffnung (**74**) aus der Vertiefung (**26**) ausgestoßen wird.

2. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 1,
wobei jede Düse (**22**) nahe einer im wesentlichen planen unteren Oberfläche der Kopfanordnung (**21**) endet, und
wobei die Basisanordnung (**25**) eine im wesentlichen plane obere Oberfläche in gegenüberliegender Relation zu der unteren Oberfläche der Kopfanordnung (**21**) aufweist.

3. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 2, wobei die Gleitdichtung (**30**) von einer Ballondichtung gebildet ist, von der das eine Ende an einer von der unteren Oberfläche der Kopfanordnung (**21**) und der oberen Oberfläche der Basisanordnung (**25**) befestigt ist und ein gegenüberliegendes Ende mit der anderen von der oberen Oberfläche der Basisanordnung (**25**) und der unteren Oberfläche der Kopfanordnung (**21**) in Gleitkontakt ist.

4. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 3, wobei das gegenüberliegende Ende sich radial nach innen in Richtung zu einem Innenbereich der Kammer (**31**) derart verjüngt, daß bei Druckzunahme in der Kammer (**31**) die Dichtungsintegrität zwischen dem gegenüberliegenden Ende und der anderen von der oberen Oberfläche der Basisanordnung (**25**) und der unteren Oberfläche der Kopfanordnung (**21**) zunimmt.

5. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 1,
wobei die Druckreguliereinrichtung (**82**) folgendes aufweist:
einen Einlaß (**70**) in die gemeinsame Kammer (**31**), der stromaufwärts von den Düsen (**22**) positioniert ist, einen Auslaß (**71**) aus der gemeinsamen Kammer (**31**), der stromabwärts von den Düsen (**22**) positioniert ist, und eine Druckgasversorgung, die mit dem Einlaß verbunden ist, um ein Gas aus der Gasversorgung durch die gemeinsame Kammer (**31**) aus der Kammer stromaufwärts zu der Kammer stromabwärts und aus dem Auslaß kontinuierlich strömen zu lassen, um toxische Schwaden, die von den Reagenzien abgegeben werden, aus der Kammer auszuspülen.

6. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 5, wobei die Reguliereinrichtung (**82**) ferner ein mit dem Auslaß (**71**) verbundenes Kammerventil (**85**) aufweist, das das Ausströmen des Gases aus der Kammer (**31**) steuert, um entweder die Druckdifferenz über den vorbestimmten Wert zu erhöhen oder die Druckdifferenz unter den vorbestimmten Wert zu senken.

7. Polymersynthesevorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Basisanordnung (**25**) folgendes aufweist:
eine obere Oberfläche, die die Vertiefung (**26**) bildet, und eine gegenüberliegende zugewandte untere Oberfläche, wobei die Öffnung (**74**) sich von der unteren Oberfläche zu der oberen Oberfläche und in die Vertiefung (**26**) erstreckt, und wobei die Synthesevorrichtung ferner folgendes aufweist:
eine untere Kammereinrichtung, die mit der unteren Oberfläche der Basis zusammenwirkt, um eine untere Kammer zu bilden, die die Öffnung (**74**) darin einschließt, wobei die Reguliereinrichtung (**82**) mit der unteren Kammer kommuniziert, um ein Vakuum zum Regulieren der Druckdifferenz zu bilden.

8. Polymersynthesevorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei der Einlaß (**70**) stromaufwärts der Düsen (**22**) mit einem Abstand positioniert ist, der ausreicht, damit der kontinuierliche Strom, während er daran vorbei strömt, im wesentlichen laminar ist.

9. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 1,
wobei die Basisanordnung (**25**) eine Vielzahl von Vertiefungen (**26**) aufweist, die in einem Feld ausgefluchtet sind, und
wobei die Transporteinrichtung (**27**) so ausgebildet ist, daß jeweils eine Düse (**22**) mit jeweils einer Vertiefung (**26**) ausgerichtet ist.

10. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 9,
wobei das Feld von einer Vielzahl von beabstandeten Vertiefungsreihen (**34**) und Vertiefungsspalten (**36**) gebildet ist, und
wobei die Düsen (**22**) in einem Feld ausgefluchtet sind, das Düsenreihen (**40**) und Düsenspalten (**41**) besitzt, die mit einem Abstand beabstandet sind, der dem Abstand zwischen den beabstandeten Vertiefungsreihen (**34**) und Vertiefungsspalten (**36**) im wesentlichen ähnlich ist, für die Ausfluchtung zwischen diesen derart, daß in ausgewählte Vertiefungen (**26**) gleichzeitig ein ausgewähltes Reagens (**24**) eingebracht werden kann.

11. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 9 oder Anspruch 10, wobei die Basisanordnung (**25**) ein Feld von Reaktionsvertiefungen (**26**) und mindestens eine entsprechende Öffnung (**74**) aufweist, die sich in

eine entsprechende Vertiefung (**26**) erstreckt, wobei jede Öffnung (**74**) einen Eingang in die Vertiefung (**26**) und einen Ausgang hat und eine solche Größe und Dimension besitzt, daß sie eine Kapillar-Flüssigkeitsdichtung bildet, um das eingebrachte flüssige Reagens (**24**) in der ausgewählten Vertiefung (**26**) zurückzuhalten, um darin ein Polymerkettenwachstum zu ermöglichen, wenn eine Druckdifferenz zwischen einem ersten Gasdruck in der Kammer (**31**) und einem zweiten Gasdruck, der auf den Ausgang jeder Öffnung (**74**) aufgebracht wird, kleiner als ein vorbestimmter Wert ist.

12. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 11,
die ferner folgendes aufweist:
eine Druckregulierereinrichtung (**82**), um die Druckdifferenz derart zu steuern, daß dann, wenn die Druckdifferenz den vorbestimmten Wert überschreitet, die Reagenslösung (**24**) durch die Öffnung (**74**) aus der Vertiefung (**26**) ausgestoßen wird.

13. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 12,
wobei die Druckregulierereinrichtung (**82**) folgendes aufweist:
einen Einlaß (**70**) in die gemeinsame Kammer (**31**), der stromaufwärts des Felds von Düsen (**22**) positioniert ist, einen Auslaß (**71**) aus der gemeinsamen Kammer (**31**), der stromabwärts des Felds von Düsen (**22**) positioniert ist, und eine Druckgasversorgung, die mit dem Einlaß (**70**) verbunden ist, um ein Gas aus der Gasversorgung durch die gemeinsame Kammer (**31**) aus der Kammer stromaufwärts zu der Kammer stromabwärts und aus dem Auslaß (**71**) kontinuierlich strömen zu lassen, um toxische Schwaden, die von den Reagenzien abgegeben werden, aus der Kammer (**31**) auszuspülen.

14. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 1,
die ferner folgendes aufweist:
eine Rahmenanordnung (**57**), an der die Kopfanordnung (**21**) zwischen einer geschlossenen Position, in der die gemeinsame Kammer (**31**) dicht verschlossen ist, und einer offenen Position schwenkbar angebracht ist, die einen Zugang zu den Düsen (**22**) und den Vertiefungen (**26**) ermöglicht.

15. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 14,
wobei die Basisanordnung (**25**) an der Rahmenanordnung (**57**) bewegbar angebracht ist, und
wobei die Transporteinrichtung (**27**) einen Schrittmotor aufweist, der mit der Basisanordnung (**25**) betriebsmäßig verbunden ist zur schrittweisen Bewegung und Ausfluchtung der Vertiefung (**26**) mit der entsprechenden Düse (**22**) zum Einbringen des ausgewählten Reagens (**24**).

16. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 1,
wobei die Vorrichtung ferner eine Rahmenanordnung (**57**) aufweist;
wobei die Basisanordnung (**25**) an der Rahmenanordnung (**57**) bewegbar angebracht ist und ein Feld von Reaktionsvertiefungen (**26**) aufweist, die in einer Vielzahl von beabstandeten Vertiefungsreihen (**34**) und Vertiefungsspalten (**36**) ausgefluchtet sind, wobei jede Vertiefung (**26**) mindestens eine entsprechende Öffnung (**74**) hat, die sich in die Vertiefung (**26**) erstreckt;
wobei die Kopfanordnung (**21**) an der Rahmenanordnung (**57**) angebracht ist und ein Feld von Düsen (**22**) hat, die in einer Vielzahl von Düsenreihen (**40**) und Düsenspalten (**41**) ausgefluchtet sind, die mit einem Abstand beabstandet sind, der dem Abstand zwischen den Vertiefungsreihen (**34**) und Vertiefungsspalten (**36**) im wesentlichen ähnlich ist, für die Ausfluchtung zwischen diesen, wobei jede Düse (**22**) mit einem Vorrat (**23**) von flüssigem Reagens (**24**) zur gesteuerten Abgabe durch sie hindurch verbunden ist;
wobei die Transporteinrichtung (**27**) mit der Basisanordnung (**25**) zur Bewegungsabstützung relativ zu der Kopfanordnung (**21**) entlang einer Bahn verbunden ist, die zu den Düsenspalten (**41**) im wesentlichen parallel ist, um mindestens eine Reihe (**34**) der Reaktionsvertiefungen (**26**) in Einbringausfluchtung mit einer ausgewählten Reihe (**40**) von Düsen (**22**) zu positionieren, um ein flüssiges Reagens (**24**) gleichzeitig in ausgewählte Reaktionsvertiefungen (**26**) für die Synthese von Polymerketten einzubringen; und
wobei die Gleitdichtung (**30**) sämtliche Reaktionsvertiefungen (**26**) und sämtliche Düsen (**22**) darin einschließt, um eine gemeinsame Kammer zu bilden.

17. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 16, wobei die Gleitdichtung (**30**) von einer Ballondichtung gebildet ist, von der das eine Ende an einer unteren Oberfläche der Kopfanordnung (**21**) befestigt ist und ein gegenüberliegendes Ende mit einer oberen Oberfläche der Basisanordnung (**25**) in Gleitkontakt ist.

18. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, wobei entsprechende Düsen (**22**) jeder Düsenreihe (**40**) mit einem Reagensvorrat (**23**) der Vielzahl von unabhängigen Reagensvorräten verbunden sind.

19. Polymersynthesevorrichtung nach Anspruch 18,
wobei jede Düse (**22**) mit dem entsprechenden Reagensvorrat (**23**) durch ein Rohr (**44**) kommuniziert, das einen Durchgang (**45**) bildet und ein Ende, das mit der Düse (**22**) verbunden ist, und ein gegenüberliegendes Ende hat, das in dem Reagensvorrat (**23**) endet, und
wobei jedes Rohr (**44**) eine Ventilanordnung aufweist, die in-line mit dem entsprechenden Durchgang (**45**) vorgesehen ist, um den Durchtritt der Reagenslösung (**24**) durch diesen zu steuern.

20. Polymersynthesevorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19,
wobei die Druckregulierereinrichtung (**82**) folgendes aufweist:
einen Einlaß (**70**) in die gemeinsame Kammer (**31**), der stromaufwärts des Felds von Düsen (**22**) positioniert ist, einen Auslaß (**71**) aus der gemeinsamen Kammer (**31**), der stromabwärts des Felds von Düsen (**22**) positioniert ist, und eine Druckgasversorgung, die mit dem Einlaß (**70**) verbunden ist, um einen Gasvorrat durch die gemeinsame Kammer (**31**) aus der Kammer stromaufwärts zu der Kammer stromabwärts und aus dem Auslaß kontinuierlich strömen zu lassen, um toxische Schwaden, die von den Reagenzien abgegeben werden, aus der Kammer auszuspülen.

21. Verfahren zur Synthese einer Polymerkette in einer Synthesevorrichtung (**20**) durch sequentielle Zugabe von Polymereinheiten, wobei die Synthesevorrichtung (**20**) folgendes aufweist:
eine Kopfanordnung (**21**), an der eine Vielzahl von Düsen (**22**) in einer im allgemeinen beabstandeten Relation angebracht ist, wobei jede Düse (**22**) mit einem Vorrat (**23**) von flüssigem Reagens (**24**) zur gesteuerten Abgabe durch sie hindurch verbunden ist, ein Basisanordnung (**25**), die mindestens eine Reaktionsvertiefung (**26**) hat, und eine Gleitdichtung (**30**), die zwischen der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) positioniert ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu ermöglichen, und sowohl die Reaktionsvertiefung (**26**) als auch die Düsen (**22**) darin einschließt, um eine gemeinsame Kammer (**31**) zu bilden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:
(A) Ausfluchten der Reaktionsvertiefung (**26**) und einer ausgewählten Düse (**22**) durch eine Transporteinrichtung (**27**), die mit mindestens einer von der Kopfanordnung (**21**) und der Basisanordnung (**25**) verbunden ist, um zwischen diesen eine Relativbewegung zu erzeugen;
(B) Einbringen eines flüssigen Reagens (**24**) in die Vertiefung (**26**) aus dem Reagensvorrat (**23**) durch die genannte eine Düse (**22**), um die Synthese einer Polymerkette zu ermöglichen;
(C) Ausspülen von toxischen Schwaden, die von den Reagenzien (**24**) abgegeben werden, aus der gemeinsamen Kammer (**31**) durch Hindurchleiten eines Gases aus einer Druckgasversorgung, die mit einem Einlaß (**70**) in die gemeinsame Kammer (**31**) verbunden und stromaufwärts der Düsen (**22**) positioniert ist, und aus der Kammer (**31**) durch einen Auslaß (**71**) aus der gemeinsamen Kammer (**31**), der stromabwärts der Düsen (**22**) positioniert ist.

22. Verfahren zur Synthese einer Polymerkette nach Anspruch 21,
das ferner den folgenden Schritt aufweist:
(D) Ausstoßen des eingebrachten flüssigen Reagens (**24**) aus der Vertiefung (**26**) durch eine Öffnung (**74**), die sich in die Vertiefung (**26**) erstreckt, durch Aufbringen eines ersten Gasdrucks auf die gemeinsame Kammer (**31**) derart, daß eine Druckdifferenz zwischen dem ersten Gasdruck und einem zweiten Gasdruck, der auf einen Ausgang der Öffnung (**74**) aufgebracht wird, einen vorbestimmten Wert überschreitet, der erforderlich ist, um eine Kapillar-Flüssigkeitsdichtung zu überwinden, die zwischen dem flüssigen Reagens (**24**) und der Öffnung (**74**) gebildet ist, um das flüssige Reagens (**24**) in der Vertiefung (**26**) zurückzuhalten.

23. Verfahren zur Synthese einer Polymerkette nach Anspruch 22,
das ferner den folgenden Schritt aufweist:
Wiederholen der Schritte (A) bis (D), um mindestens eine kontinuierliche Kette von Polymereinheiten zu bilden.

24. Verfahren zur Synthese einer Polymerkette nach Anspruch 22 oder 23, wobei der Schritt des Ausstoßens ausgeführt wird, indem das Ausströmen des Gases durch den Auslaß (**71**) der Kammer (**31**) gesteuert wird, um die Druckdifferenz durch Erhöhen des ersten Gasdrucks auf einen Wert zu erhöhen, der den vorbestimmten Wert überschreitet.

25. Verfahren zur Synthese einer Polymerkette nach Anspruch 24, wobei der Schritt des Steuerns von einem Kammerventil (**85**) ausgeführt wird, das mit dem Kammerauslaß (**71**) zur Steuerung des Hindurchleitens des Gases durch diesen verbunden ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

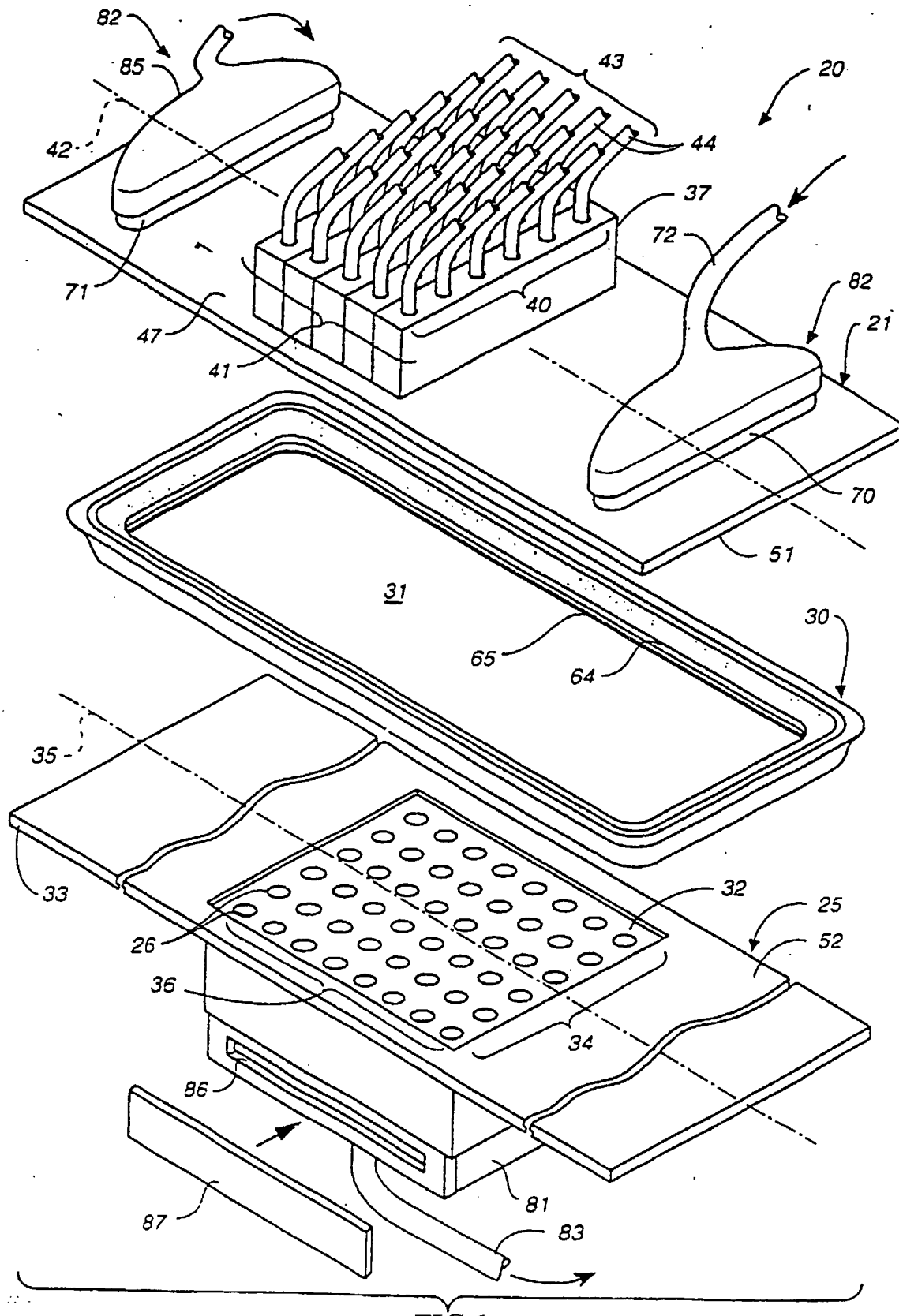


FIG 1

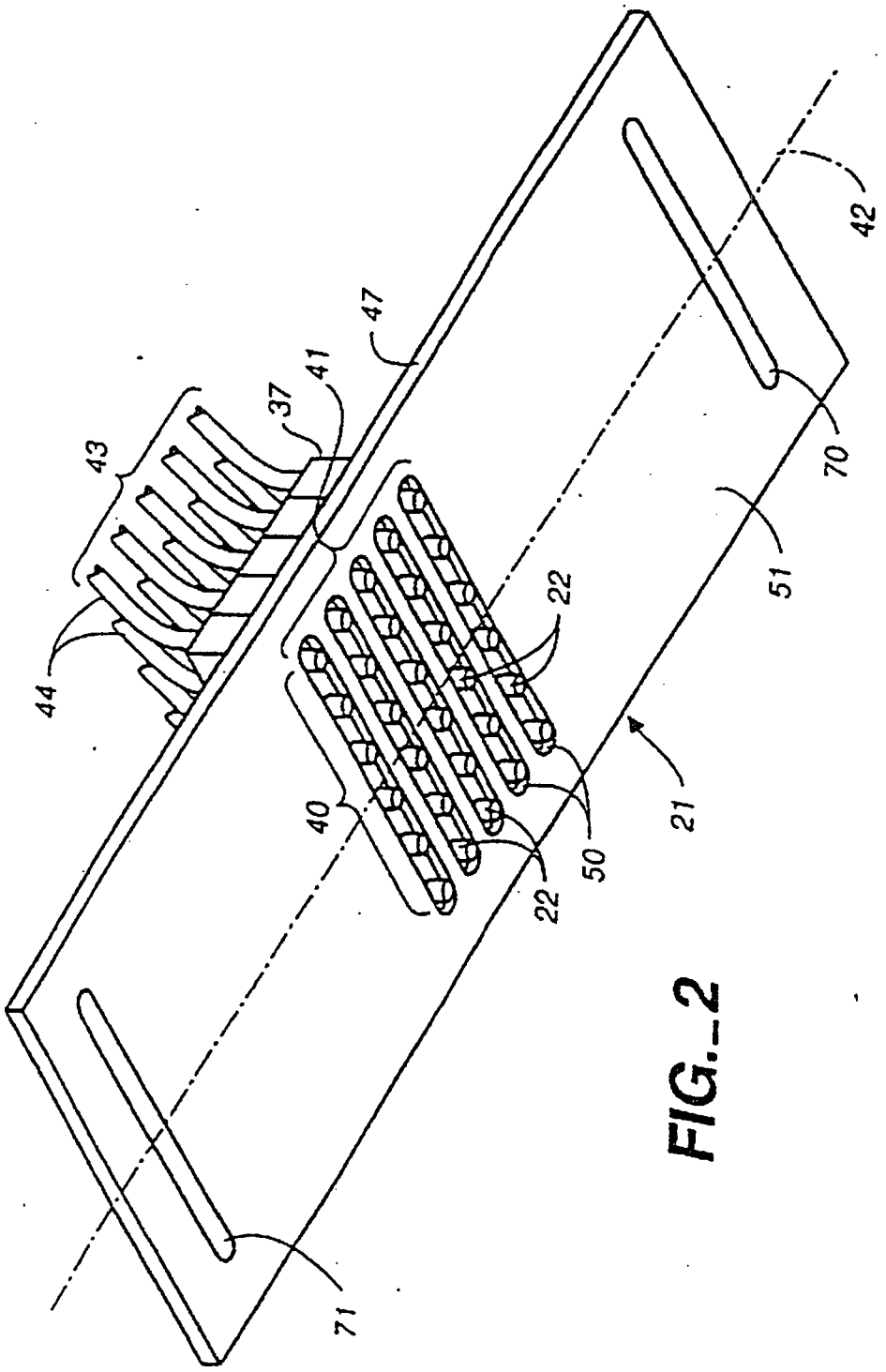


FIG._2

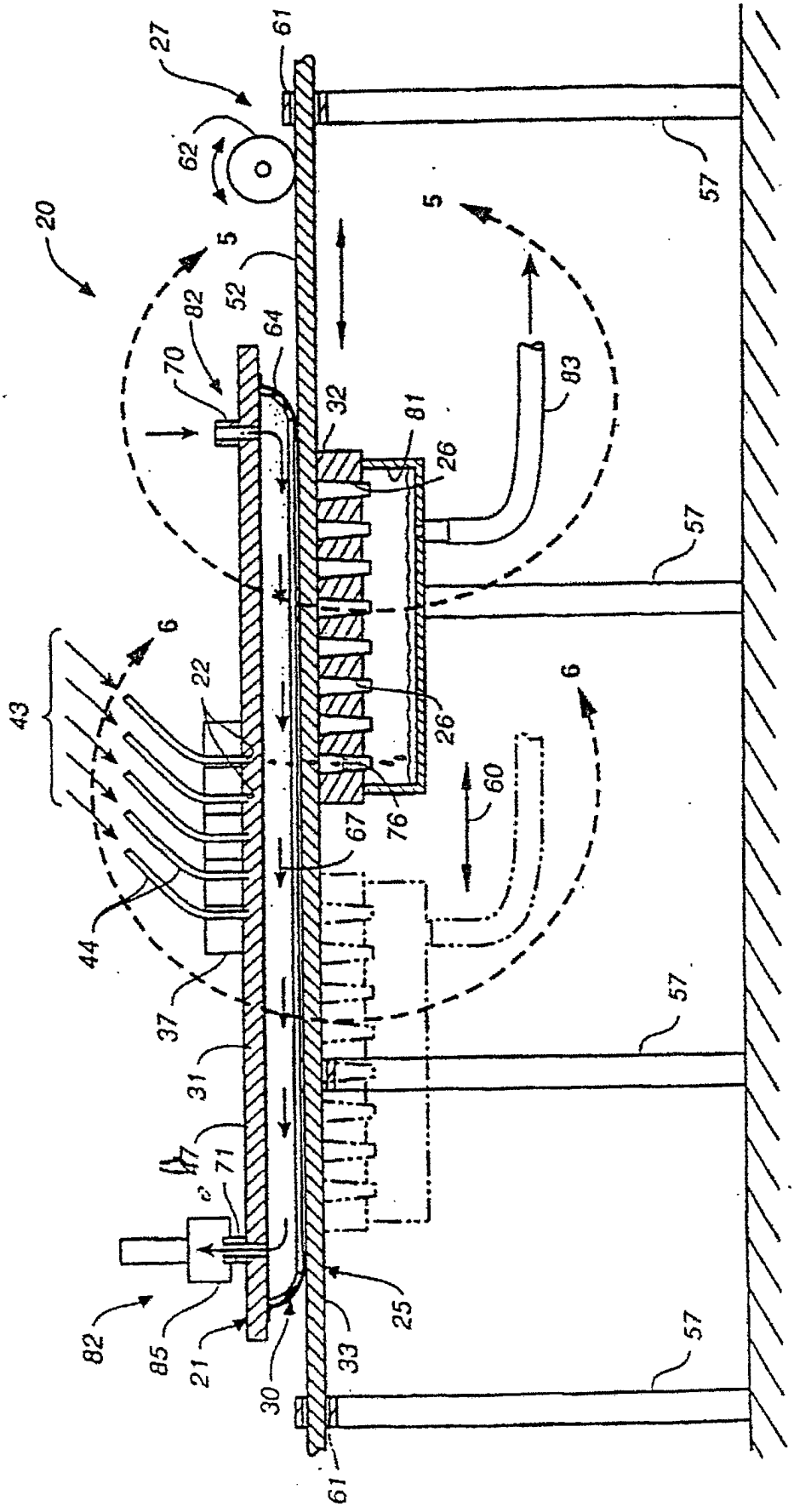

20
27
61
62
5
52
82
70
64
32
81
26
83
57
6
43
22
26
76
60
67
44
37
31
47
71
82
85
21
30
33
25
61

FIG._3

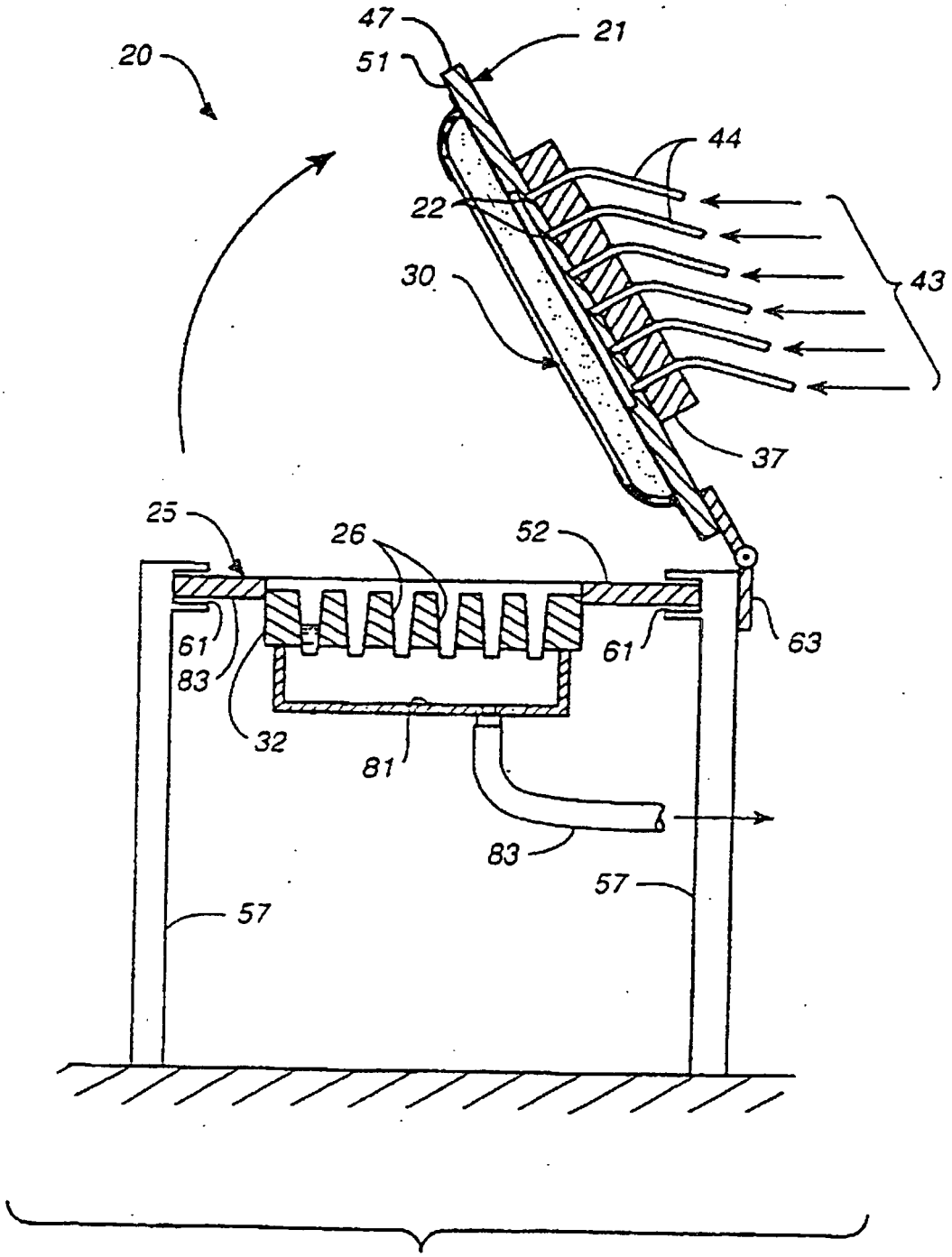


FIG._4

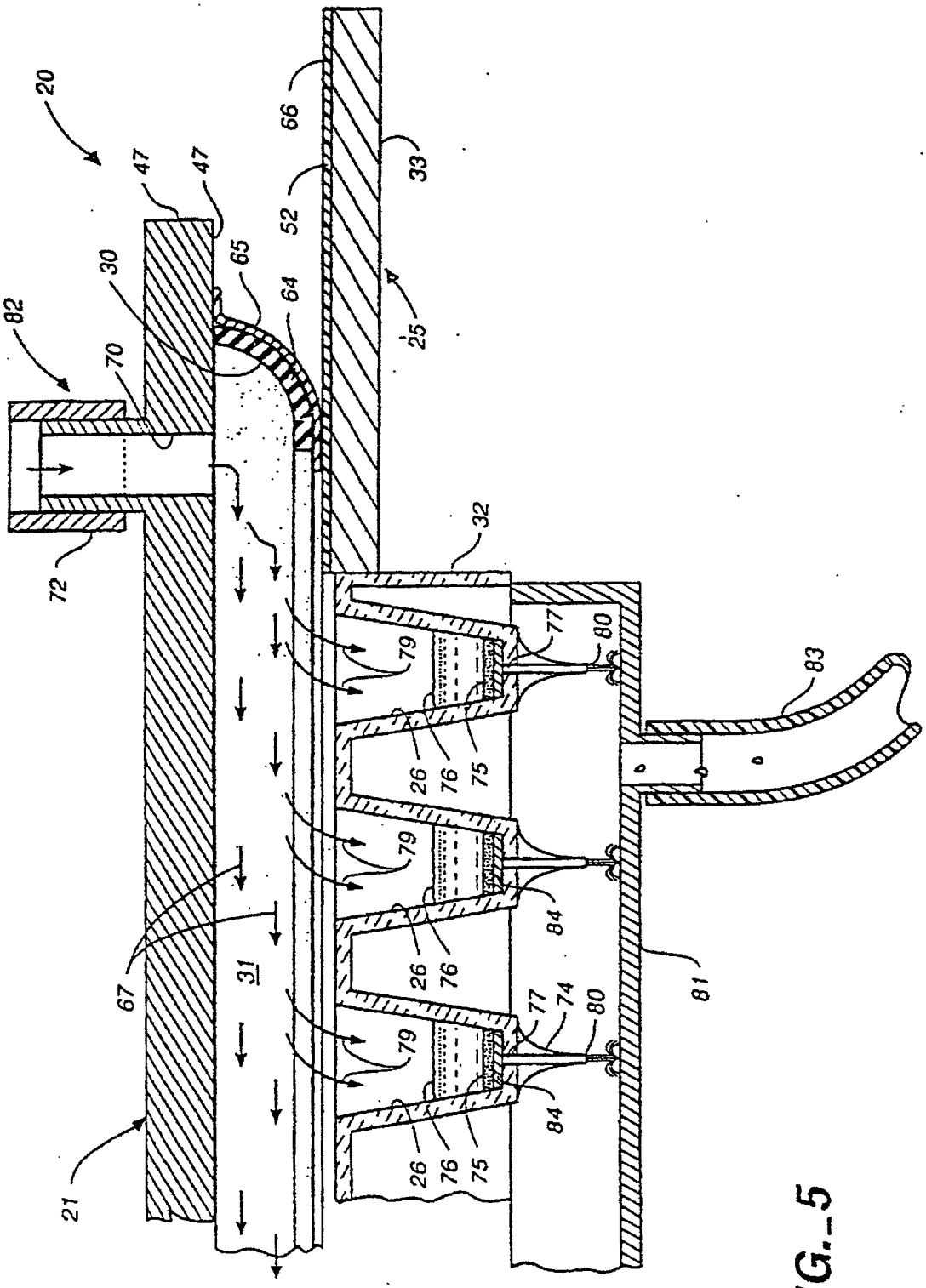

20
47
47
66
33
52
65
64
30
25
82
70
72
32
77
80
79
83
26
76
75
79
84
67
31
26
76
81
77
74
80
79
84
21
26
76
75

FIG._5

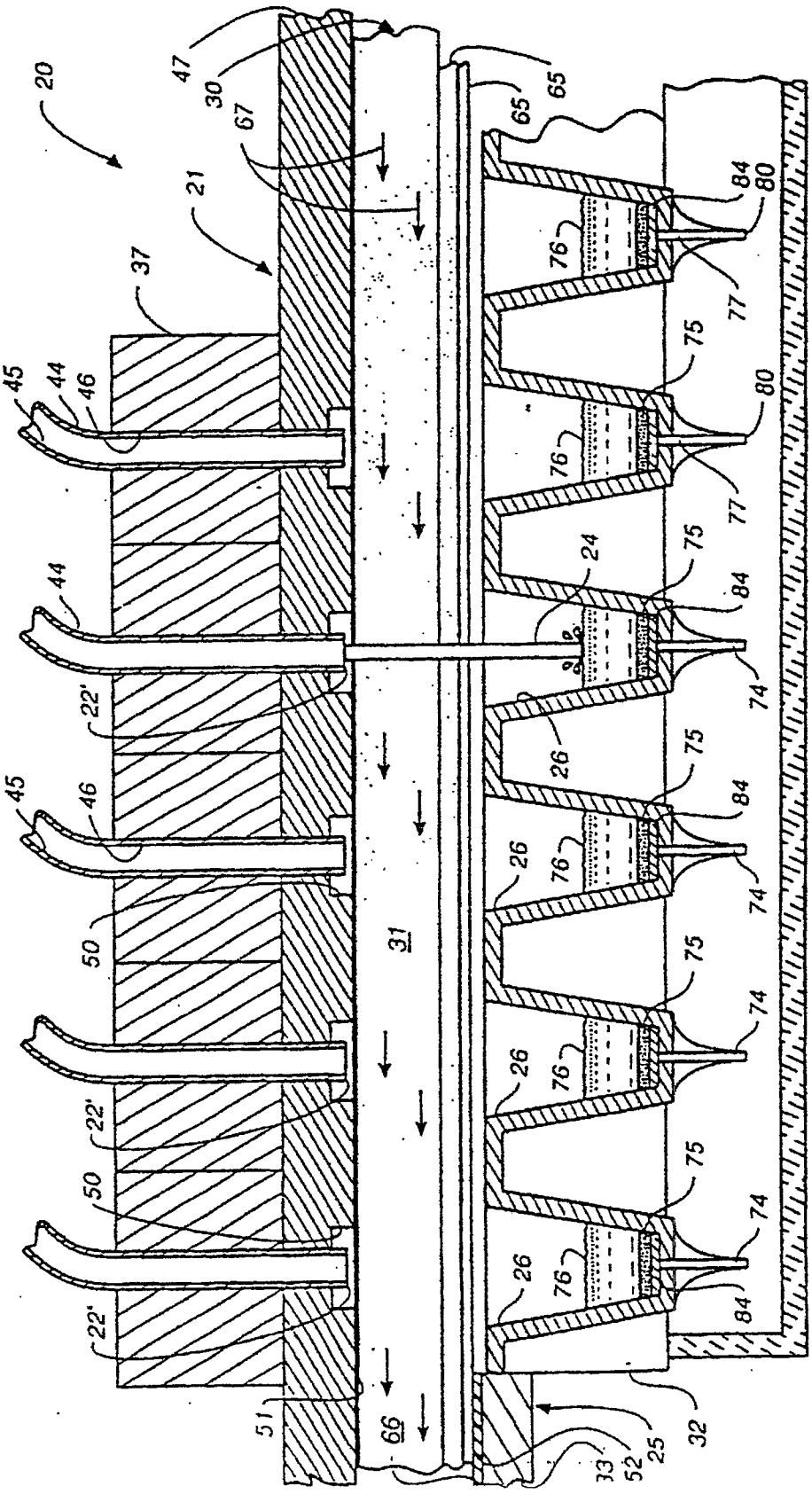

20
47
30
67
21
37
45
44
46
22'
50
51
66
31
65
65
84
80
76
77
75
80
76
77
24
75
84
74
26
75
84
26
76
74
75
74
26
76
75
74
26
76
84
32
25
52
33

FIG._6

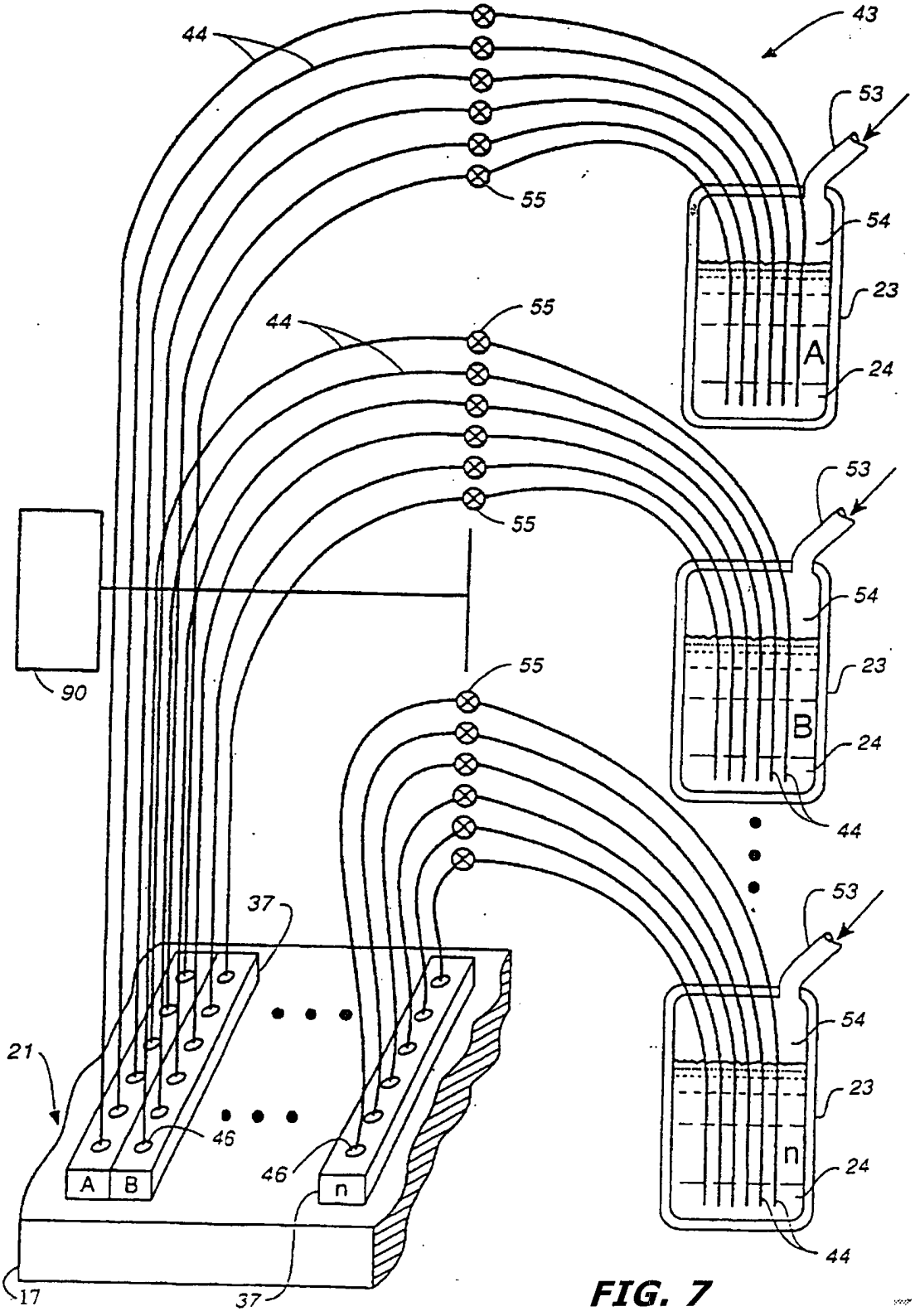
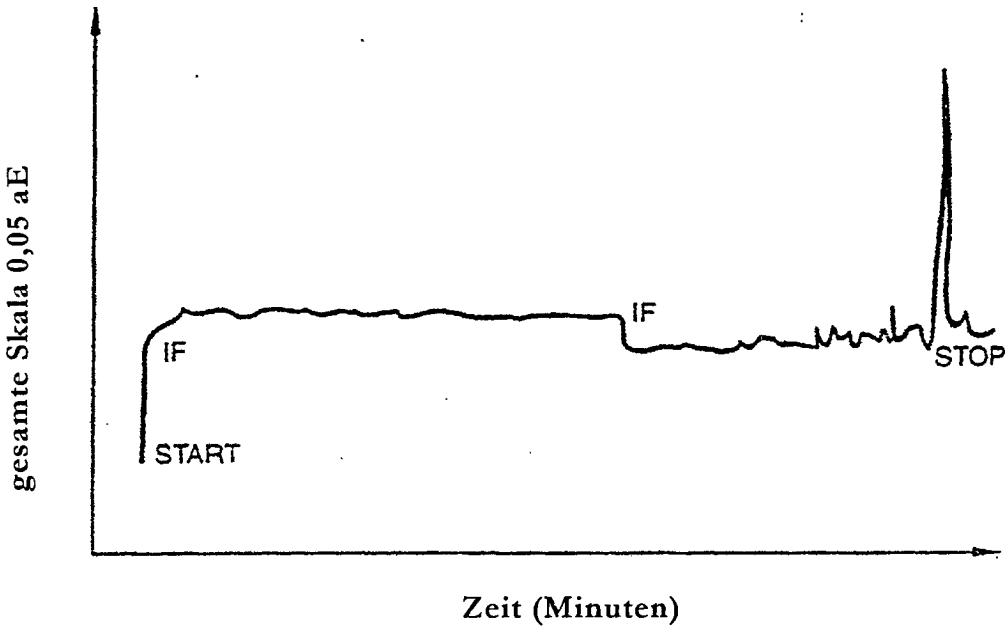

43
44
53
55
54
23
A
24
44
55
53
55
54
23
B
24
90
55
44
53
54
23
n
24
37
21
46
46
A
B
n
17
37

FIG. 7

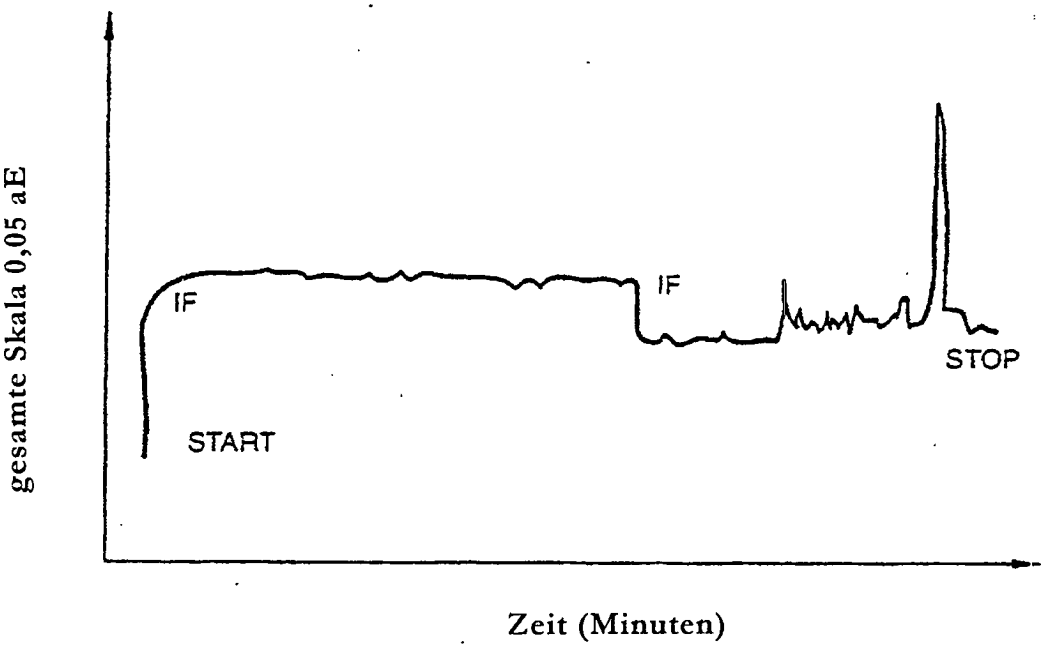


Versuch Nr. 116
Arbeitsbefehl ID: C
Arbeitsbefehl Name:

gesamter Bereich = 757390
MUL-Faktor = 1,0000E + 00

Flächen-% RT	Fläche			
8,56	15630	VB	0,054	2,064
9,81	10112	BB	0,037	1,335
10,36	10365	PB	0,050	1,369
10,48	16847	BB	0,057	2,224
10,61	31631	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



Versuch Nr. 115
ARBEITSBEFEHL ID: C
Arbeitsbefehl Name:

gesamter Bereich = 563000
MUL-Faktor = 1,0000E + 00

RT	Fläche	Flächen-%		
10,40	54453	BB	0,057	2,657
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