

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2022-61994

(P2022-61994A)

(43)公開日 令和4年4月19日(2022.4.19)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 2 0 0

C 1 2 Q 1/6837(2018.01)

C 1 2 Q 1/6837 Z Z N A

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全70頁)

(21)出願番号	特願2022-117(P2022-117)	(71)出願人	514199799
(22)出願日	令和4年1月4日(2022.1.4)		ヴィブラント ホールディングス リミテ
(62)分割の表示	特願2018-553059(P2018-553059)		ッド ライアビリティ カンパニー
	)の分割		アメリカ合衆国 9 4 0 7 0 カリフォル
原出願日	平成28年12月28日(2016.12.28)		ニア州 サン カルロス ハワード アベニ
(31)優先権主張番号	62/272,057		ュー 1 0 2 1
(32)優先日	平成27年12月28日(2015.12.28)	(74)代理人	100102978
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 清水 初志
		(74)代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929

最終頁に続く

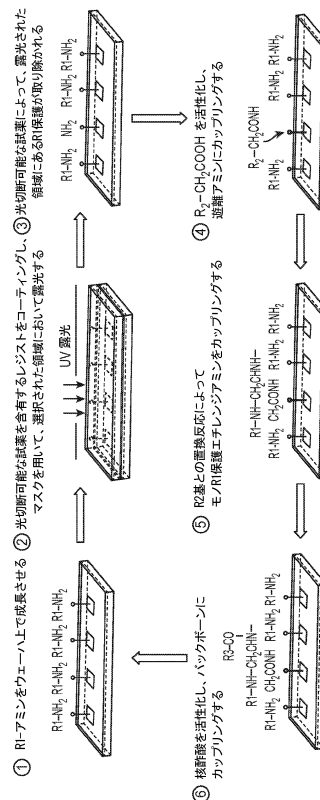
(54)【発明の名称】 核酸アレイ合成のための、支持体、システム、および方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】マイクロアレイ上でPNA鎖およびPNA-DNAキメラを合成するための、製剤、支持体、およびアレイを提供する。

【解決手段】マイクロアレイに既に取り付けられている任意のPNA単量体、PNAポリマー、またはPNA-DNAキメラを、PNA鎖合成中またはPNA-DNA鎖合成中の放射線曝露から守る光防護化合物を含む。一部の態様において、支持体およびアレイは、PNAもしくはDNAの単量体、またはPNAもしくはPNA-DNAのポリマーを、合成および取り付けのための多孔層または平面層を備える。一部の態様において、PNA単量体またはPNAポリマーをマイクロアレイ支持体に高効率でカップリングするための、製剤および方法が本明細書において開示される。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

表面の、位置が定められた場所に取り付けられた特徴のアレイであって、該特徴がそれぞれ、決定可能な配列および意図された長さの複数のPNAポリマーを含み、該複数のPNAポリマーが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%のカップリング効率によって特徴付けられる長さの分布を含む、アレイ。

## 【請求項 2】

意図された長さより短い複数のPNAポリマーの長さの分布が、式：

$$F(N)=10(N+1) \cdot \log(E/100\%)-10(N) \cdot \log(E/100\%)$$

10

によって特徴付けられ、式中、N=PNAポリマーの実際の長さ、E=カップリング効率であり、Eが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%である、請求項1記載のアレイ。

## 【請求項 3】

意図された長さのPNAポリマーの比率が、式：

$$F(N)=10(N) \cdot \log(E/100\%)$$

によって特徴付けられ、式中、N=PNAポリマーの意図された長さ、E=平均カップリング効率であり、Eが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%である、請求項1記載のアレイ。

## 【請求項 4】

20

少なくとも10,000の特徴を含む、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 5】

少なくとも100,000の特徴を含む、請求項4記載のアレイ。

## 【請求項 6】

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも30である、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 7】

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも40である、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 8】

30

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも50である、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 9】

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも75である、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 10】

PNAポリマーがPNA/核酸キメラであり、該PNAポリマーが1つまたは複数の核酸残基をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 11】

核酸がデオキシリボ核酸である、請求項10記載のアレイ。

40

## 【請求項 12】

1平方センチメートルあたり少なくとも10,000の特徴を含む、前記請求項のいずれか一項記載のアレイ。

## 【請求項 13】

1平方センチメートルあたり少なくとも20,000、少なくとも40,000、少なくとも100,000、少なくとも200,000、少なくとも500,000、少なくとも100万、少なくとも200万、少なくとも500万、少なくとも1000万、少なくとも2000万、または少なくとも5000万の特徴を含む、請求項12記載のアレイ。

## 【請求項 14】

アレイがピラーを備え、表面が該ピラーの上部表面である、前記請求項のいずれか一項記

50

載のアレイ。

【請求項 15】

ピラーの上部表面が少なくとも  $1 \mu\text{m}^2$  の面積を有する、請求項 14 記載のアレイ。

【請求項 16】

光マスクを用いてパターンを作製する工程、

該光マスクを通してフォトリジストを紫外線に露光する工程、および

該紫外線への該露光の結果として該アレイ上の該パターンで酸または塩基を発生させる工程

を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項記載のアレイを作る方法。

【請求項 17】

露光によって光塩基発生剤から塩基が発生する、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

光塩基発生剤が、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパン、1,3-Bis[1-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-4-ピペリジル]プロパン、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-フェニルグリオキシラート、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-4-ニトロフェニルグリオキシラート、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-テトラフェニルボラート、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エニル-テトラフェニルボラート、1-フェナシル-(1-アゾニア-4-アザビシクロ[2,2,2]オクタン)-テトラフェニルボラート、および1-ナフトイルメチル-(1-アゾニア-4-アザビシクロ[2,2,2]オクタン)-テトラフェニルボラートまたは類似物からなる群より

10

20

選択される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

光塩基発生剤が、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパンである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

塩基によってアミン基から保護基が切断される、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

PNA 単量体を、脱保護されたアミン基にカップリングする工程をさらに含む、請求項 20 記載の方法。

30

【請求項 22】

露光によって光酸発生剤から酸が発生する、請求項 16 記載の方法。

【請求項 23】

光酸発生剤が、ヨードニウム塩、ポロニウム塩、およびスルホニウム塩からなる群より選択される、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

光酸発生剤が、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホナート、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムp-トルエンスルホナート、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムトリフラート、Boc-メトキシフェニルジフェニルスルホニウムトリフラート、(tert-ブトキシカルボニルメトキシナフチル)-ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-tert-ブチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、ジフェニルヨードニウムヘキサフルオロホスファート、ジフェニルヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホナート、ジフェニルヨードニウムトリフラート、(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メチルチオフェニル)メチルフェニルスルホニウムトリフラート、Tris(4-tert-ブチルフェニル)スルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)フェニルスルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)フェニルヨードニウムトリフラート、4メトキシフェニル)フェニルヨードニウムトリフルオロメタンスルホナート、(4メトキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラート、および(2,4-ジヒドロキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリ

40

50

フラートまたは類似物からなる群より選択される、請求項22記載の方法。

【請求項25】

光酸発生剤が、トリフラート、ホスフェート、およびアンチモナートのヨードニウム塩およびスルホニウム塩からなる群より選択される、請求項22記載の方法。

【請求項26】

光酸発生剤が、(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラートである、請求項22記載の方法。

【請求項27】

酸によってカルボン酸基から保護基が切断される、請求項22～26のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項28】

DNA単量体を、脱保護されたカルボン酸基にカップリングする工程をさらに含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】

PNA単量体をカップリングする工程が、置換された酢酸を活性化剤によって活性化すること、および選択的に露光された部分において、活性化された酢酸を無保護アミン基にカップリングすることを含み、酢酸の置換が脱離基を含む、請求項21記載の方法。

【請求項30】

PNA単量体をカップリングする工程がアレイ上の複数の部位で同時に行われる、請求項29記載の方法。

20

【請求項31】

脱離基がハロゲンである、請求項29記載の方法。

【請求項32】

前記カップリングする工程が、酢酸の脱離基をジアミノ-アルカンで置き換えることをさらに含む、ジアミノ-アルカンの1つのアミンが保護されている、請求項29記載の方法。

【請求項33】

ジアミノ-アルカンがエチレンジアミンである、請求項32記載の方法。

30

【請求項34】

前記カップリングする工程が、PNA単量体酢酸を活性化剤によって活性化すること、および活性化されたPNA単量体酢酸をジアミノ-アルカンの無保護アミンにカップリングすることをさらに含む、請求項29または30記載の方法。

【請求項35】

PNA単量体酢酸が、R-チミン-1-酢酸、R-(シトシン-1-イル)-酢酸、R-アデニン-9-イル-酢酸、R-グアニン-9-酢酸、またはR-ウラシル-1-酢酸であり、式中、RがHまたは保護基である、請求項34記載の方法。

40

【請求項36】

対象から得られた核酸を含む試料を分析する方法であって、以下の工程を含む、方法：  
該試料を請求項1～15のいずれか一項記載のアレイと、該試料と該アレイとの間のハイブリダイゼーションを促進する条件下で接触させる工程；  
該アレイからシグナルを検出する工程であって、該シグナルが、該特徴場所の1つまたは複数における、該アレイとハイブリダイズした試料の存在、非存在、または量を示す、工程；ならびに  
該シグナルを分析し、それによって、該試料を分析する工程。

【請求項37】

50

分析する工程が、シグナルに基づいて、試料に存在する核酸配列を決定することを含む、請求項36記載の方法。

【請求項38】

分析する工程が、シグナルに基づいて、試料に存在するSNPの存在または非存在を決定することを含む、請求項36記載の方法。

【請求項39】

アレイがPNA/DNAキメラを含み、試料と該アレイとの間のハイブリダイゼーション後にプライマー伸長反応を行う工程をさらに含む、請求項38記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2015年12月28日に出願された米国仮特許出願第62/272,057号の恩典を主張し、この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

背景

典型的なマイクロアレイシステムは、概して、ガラス、プラスチック、またはシリコンチップのような固体平面上にフォーマットされた生体分子プローブ、例えば、DNA、またはRNAなどと、試料を扱うために必要とされる機器(自動ロボット工学)、レポーター分子を読み取るために必要とされる機器(スキャナ)、およびデータを解析するために必要とされる機器(生物情報学ツール)からなる。マイクロアレイ技術によって、1平方センチメートルあたり多くのプローブをモニタリングすることが容易になる。複数のプローブを使用する利点には、速度、順応性、包括性、および相対的に安い大量生産コストが含まれるが、これに限定されない。このようなアレイの用途には、病原体の検出および特定を含む診断微生物学、抗菌剤耐性の研究、疫学的菌株分類、癌遺伝子の研究、宿主ゲノム発現を用いた微生物感染の解析、および多型プロファイルが含まれるが、これに限定されない。

20

【0003】

ペプチド核酸(PNA)は、ペプチド様バックボーンをもつDNA類似体であり、それぞれのサブユニットは天然塩基または非天然塩基を含有する。このようなバックボーンの1つは、P. E. Nielsen et al., Science, 254, 1497-1500(1991)(非特許文献1)に記載のように、アミド結合によって連結したN-(2-アミノエチル)グリシン反復単位で構成されている。さらに、米国特許第6,395,474号(特許文献1)は、DNAおよびRNAの両方に結合する新たな種類の化合物(PNA)についてPNA/DNA二重鎖またはPNA/RNA二重鎖の形成物を開示している。PNA/オリゴヌクレオチドハイブリッドは、対応するDNA(またはRNA)ハイブリッドよりも熱安定性が高く、高い生物学的安定性を有する。このDNAおよびRNAに対する結合の特異性は、PCRに基づくアッセイにおける一塩基多型の特定を含む、バイオテクノロジーにおけるPNA応用の道を開いてきた。PNAには、RNAまたはDNAに対する結合を直接検出するための高感度な方法となる潜在能力がある。しかしながら、ロバスト解析の場合、マイクロアレイ形式で並べられた比較的多数の高品質オリゴマーを用いることによって、反応体積を大幅に減らし、検出プロセスを簡素化することができる。

30

40

【0004】

2つのPNAマイクロアレイ合成方法が当業者に周知であり、(1)異なるシングルプローブを、それぞれ、固相合成技術に基づいて合成し、次いで、スポット合成または吸着によって、これらのプローブをマイクロアレイ支持体上の異なる場所に結合させる工程と、(2)光マスクを用いた、インサイチューでの紫外線によって管理されたフォトリソグラフィ合成を使用する工程を含む。

【0005】

第1の方法の例は米国特許出願公開第2006/0147949号(特許文献2)に開示され、効

50

率的な、かつ費用対効果の大きいやり方で、エポキシ基含有ポリマー層によってエポキシ基含有ポリマーでコーティングされたプラスチック支持体上に、望ましいDNA配列を含むプローブPNAが固定化されているPNAチップの生産を含む。しかしながら、この方法は、空間分解能が低くかつPNAアレイを形成するためのシングルプローブの合成費用が高い、時間のかかるプロセスだということを含むが、これに限定されない欠点がある。

【0006】

第2の方法の例は米国特許第6,359,125号(特許文献3)に開示される。米国特許第6,359,125号(特許文献3)は、ポリマー光酸発生剤を用いることによって、固体マトリックス上に固定化されたPNAプローブアレイを調製するためのプロセスを含む。このプロセスの速度は、第1の方法と比較して、マイクロアレイ上にプローブを合成するときと並列処理を用いることで速くなっている。しかしながら、このプロセス制約要因は、並列合成に必要なPNA単量体の合成費用が高いことを伴う。

10

【0007】

従って、先行技術の両方法には、特に、複数のカップリングサイクルを通じてカップリング効率が低いか、または一致しないこと、合成費用、および異なるPNAプローブの合成を空間制御することが難しいことを含む様々な欠陥がある。さらに、フォトリソグラフィ方法は、マイクロアレイ上で高いPNAプローブ密度を得るのに必要とされる短波長放射線(例えば、248nmの紫外線)に核酸が露光されたときに不安定になる(すなわち、破壊される)という影響により損なわれる。

【0008】

PNA-DNAキメラは、別々のPNA部分とヌクレオチド部分を含むオリゴマー分子である。PNA-DNAキメラは、PNA単量体配列をヌクレオチド配列と共に実質的に任意の組み合わせまたは配列で共有結合により連結することによって合成することができる。

20

【0009】

Egholm et al.(米国特許第6,316,230号(特許文献4))は、ポリメラーゼ、ヌクレオチド5'-三リン酸、およびプライマー伸長試薬を用いて、PNA-DNAキメラをテンプレート核酸からプライマー伸長するための方法およびキットを提供する。本発明は、PNA-DNAキメラが広範な実験条件および変数の下でプライマー伸長を行うことができるという発見に基づいている。PNA-DNAキメラの使用からDNA配列決定法が利益を得る可能性があり、この場合、PNA-DNAキメラの中にあるPNA部分によって付与される高い親和性および特異性によって特異性がさらに高くなる。この方法には、空間分解能が低く、PNA-DNAキメラアレイを形成するためのシングルプローブの合成費用が高いということに加えて、時間のかかるプロセスだという点で欠点がある。

30

【0010】

従って、必要とされているものは、マイクロアレイ上でのPNA合成およびPNA-DNAキメラプローブ合成に対する、これらのおよび他の短所に対処するが、依然として、アレイが、例えば、試料からのSNP検出に首尾よく用いられることを可能にする方法および組成物である。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0011】

【特許文献1】米国特許第6,395,474号

【特許文献2】米国特許出願公開第2006/0147949号

【特許文献3】米国特許第6,359,125号

【特許文献4】米国特許第6,316,230号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】P. E. Nielsen et al., Science, 254, 1497-1500(1991)

【発明の概要】

【0013】

50

## 概要

アレイ上でのPNAおよびPNA-DNAキメラの合成を改善する方法および組成物ならびにこれらのアレイの使用方法が本明細書において提供される。本発明は、下記で詳述するように核酸マイクロアレイ合成のための、新規の支持体、システム、および方法を提供する。特に、本発明は、PNAプローブの高いスポット密度があるPNAマイクロアレイを経済的に調製することができる、サブモノマーに由来する、紫外線によって管理されたPNA単量体およびPNAポリマーを、マイクロアレイのアドレス指定可能な場所に合成する新規の方法を含む。

## 【0014】

一部の態様において、PNAおよびPNA-DNAキメラプローブの高いスポット密度がありかつPNAおよびPNA-DNAキメラプローブが経済的に調製されるアレイ、およびアレイを製造する方法が本明細書において開示される。本明細書において、本発明者らは、アドレス指定可能な場所に、サブモノマーに由来する、紫外線によって管理されたPNA単量体およびPNAポリマーを合成し、その後、紫外線によって管理されたDNAオリゴマーおよびDNAポリマーを合成する新規の方法を示す。これは、PNAの利点(高い特異性およびカップリング収率)とDNAオリゴマーの利点(PCR反応を用いてチップ上で検出することができる)を組み合わせしており、それによって、さらに良好な検出精度を可能にする。

10

## 【0015】

本発明の態様は、製剤、支持体、およびアレイを含む。態様はまた、製剤、支持体、およびアレイを製造および使用するための方法も含む。

20

## 【0016】

一部の態様では、表面の、位置が定められた場所に取り付けられた特徴のアレイであって、前記特徴がそれぞれ、決定可能な配列および意図された長さの複数のPNAポリマーを含み、前記複数のPNAポリマーが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%のカップリング効率によって特徴付けられる長さの分布を含むアレイが、本明細書において提供される。一部の態様において、意図された長さより短い前記複数のPNAポリマーの長さの分布は、式：

$$F(N) = 10^{(N+1)} \cdot \log(E/100\%) - 10^N \cdot \log(E/100\%)$$

によって特徴付けられ、式中、N=PNAポリマーの実際の長さ、E=カップリング効率であり、Eは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%である。一部の態様において、意図された長さのPNAポリマーの比率(proportion)は、式：

$$F(N) = 10^N \cdot \log(E/100\%)$$

によって特徴付けられ、式中、N=PNAポリマーの意図された長さ、E=平均カップリング効率であり、Eは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%である。

30

## 【0017】

一部の態様において、アレイは少なくとも10,000の特徴を含む。一部の態様において、アレイは少なくとも100,000の特徴を含む。

## 【0018】

一部の態様において、アレイ上にあるPNAポリマーの意図された長さは少なくとも30である。一部の態様において、アレイ上にあるPNAポリマーの意図された長さは少なくとも40である。一部の態様において、アレイ上にあるPNAポリマーの意図された長さは少なくとも50である。一部の態様において、アレイ上にあるPNAポリマーの意図された長さは少なくとも75である。

40

## 【0019】

一部の態様において、アレイ上にあるPNAポリマーはPNA/核酸キメラであり、PNAポリマーは1つまたは複数の核酸残基をさらに含む。一部の態様において、核酸はデオキシリボ核酸である。

## 【0020】

50

一部の態様において、アレイは1平方センチメートルあたり少なくとも10,000の特徴を含む。一部の態様において、アレイは、1平方センチメートルあたり少なくとも20,000、少なくとも40,000、少なくとも100,000、少なくとも200,000、少なくとも500,000、少なくとも100万、少なくとも200万、少なくとも500万、少なくとも1000万、少なくとも2000万、または少なくとも5000万の特徴を含む。一部の態様において、アレイはピラーを備え、前記表面は前記ピラーの上部表面である。一部の態様において、ピラーの上部表面の面積は少なくとも $1\mu\text{m}^2$ である。

【0021】

PNAまたはPNA-DNAキメラアレイを作る方法であって、光マスクを用いてパターンを作製する工程、前記光マスクを通してフォトレジストを紫外線に露光する工程、および前記紫外線への前記露光の結果として前記アレイの前記パターンで酸または塩基を発生させる工程を含む方法も、本明細書において提供される。

10

【0022】

一部の態様では、UV露光によって光塩基発生剤から塩基が発生する。一部の態様において、光塩基発生剤は、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパン、1,3-Bis[1-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-4-ピペリジル]プロパン、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-フェニルグリオキシラート、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-4-ニトロフェニルグリオキシラート、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-テトラフェニルボラート、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エニル-テトラフェニルボラート、1-フェナシル-(1-アゾニア-4-アザビシクロ[2,2,2]オクタン)-テトラフェニルボラート、および1-ナフトイルメチル-(1-アゾニア-4-アザビシクロ[2,2,2]オクタン)-テトラフェニルボラートまたは類似物からなる群より選択される。一部の態様において、光塩基発生剤は、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパンである。一部の態様において、光塩基発生剤に由来する塩基によってアミン基から保護基が切断される。

20

【0023】

一部の態様において、PNAまたはPNA-DNAキメラアレイを作る方法は、PNA単量体を、脱保護されたアミン基にカップリングする工程を含む。

【0024】

一部の態様において、UV露光によって光酸発生剤から酸が発生する。一部の態様において、光酸発生剤は、ヨードニウム塩、ポロニウム塩、およびスルホニウム塩からなる群より選択される。一部の態様において、光酸発生剤は、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホナート、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムp-トルエンスルホナート、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムトリフラート、Boc-メトキシフェニルジフェニルスルホニウムトリフラート、(tert-ブトキシカルボニルメトキシナフチル)-ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-tert-ブチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、ジフェニルヨードニウムヘキサフルオロホスファート、ジフェニルヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホナート、ジフェニルヨードニウムトリフラート、(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メチルチオフェニル)メチルフェニルスルホニウムトリフラート、Tris(4-tert-ブチルフェニル)スルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)フェニルヨードニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)フェニルヨードニウムトリフルオロメタンスルホナート、(4メトキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラート、(2,4-ジヒドロキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラートまたは類似物である。一部の態様において、光酸発生剤は、トリフラート、ホスフェート、またはアンチモナート(antimonate)のヨードニウム塩またはスルホニウム塩である。一部の態様において、光酸発生剤は、(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラートである。一部の態様において、光酸発生剤によって発生した酸によってカルボン酸基から保護基が切断される。

30

40

50



## 【0025】

一部の態様において、PNA-DNAキメラアレイを作り出す方法は、DNA単量体を、脱保護されたカルボン酸基にカップリングする工程をさらに含む。一部の態様において、PNA単量体をカップリングする工程は、置換された酢酸を活性化剤によって活性化する工程、および前記選択的に露光された部分において、活性化された酢酸を無保護アミン基にカップリングする工程を含み、酢酸の置換は脱離基を含む。一部の態様において、PNA単量体をカップリングする工程は前記アレイ上の複数の部位で同時に行われる。

## 【0026】

一部の態様において、脱離基はハロゲンである。一部の態様において、カップリングは、酢酸の脱離基をジアミノ-アルカンで置換する工程をさらに含み、ジアミノ-アルカンの1つのアミンが保護されている。一部の態様において、ジアミノ-アルカンはエチレンジアミンである。

10

## 【0027】

一部の態様において、カップリングする工程は、PNA単量体酢酸を活性化剤によって活性化する工程、および活性化されたPNA単量体酢酸をジアミノ-アルカンの無保護アミンにカップリングする工程をさらに含む。一部の態様において、PNA単量体酢酸は、R-チミン-1-酢酸、R-(シトシン-1-イル)-酢酸、R-アデニン-9-イル-酢酸、R-グアニン-9-酢酸、またはR-ウラシル-1-酢酸であり、RはHまたは保護基である。

## 【0028】

対象から得られた核酸を含む試料を分析する方法であって、以下の工程を含む方法も、本明細書において提供される：前記試料を本明細書に記載のPNAまたはPNA-DNAアレイと、前記試料と前記アレイとの間のハイブリダイゼーションを促進する条件下で接触させる工程；アレイからシグナルを検出する工程であって、前記シグナルが、前記特徴場所の1つまたは複数における、前記アレイとハイブリダイズした試料の存在、非存在、または量を示す、工程；ならびに前記シグナルを分析し、それによって、前記試料を分析する工程。

20

## 【0029】

一部の態様において、試料を分析する工程は、前記シグナルに基づいて、前記試料に存在する核酸配列を決定する工程を含む。一部の態様において、試料を分析する工程は、前記シグナルに基づいて、前記試料に存在するSNPの存在または非存在を決定する工程を含む。一部の態様において、前記アレイはPNA/DNAキメラを含み、前記方法は、前記試料と前記アレイとの間の前記ハイブリダイゼーション後にプライマー伸長反応を行う工程をさらに含む。

30

## 【0030】

一部の態様において、光活性化化合物は総製剤の約0.5～5重量%である。一部の態様において、光防護化合物は、マイクロアレイに取り付けられた任意の化合物またはカップリング分子を電磁放射線から守る。カップリング分子の例にはペプチド核酸(「PNA」)などが含まれるが、これに限定されない。一部の態様において、カップリング分子は総製剤の1～2重量%である。一部の態様において、カップリング分子は、保護された基を含む。一部の態様において、基はFmocによって保護されている。

40

## 【0031】

一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNA鎖は長さが少なくとも6単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNA鎖は長さが少なくとも6単量体、10単量体、15単量体、20単量体、25単量体、30単量体、35単量体、40単量体、45単量体、50単量体、55単量体、または60単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNA鎖は1つまたは複数のL-キラルPNA単量体を含む。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNA鎖は1つまたは複数のD-キラルPNA単量体を含む。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNA鎖は1つまたは複数の合成のPNAまたはDNA単量体を含む。一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた少なくとも1,000の異なるPNA鎖またはPNA-DNA鎖を含む。一

50

部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた少なくとも10,000の異なるPNA鎖またはPNA-DNA鎖を含む。

【0032】

一部の態様において、位置が定められた場所はそれぞれ、他の、位置が定められた場所のそれぞれと物理的に分離された異なる既知の場所にある。一部の態様において、位置が定められた場所はそれぞれ、複数の同一のPNA配列またはPNA-DNA配列を含む。一部の態様において、それぞれの、位置が定められた場所は、他の、位置が定められた場所と異なる複数の同一のPNA配列を含む。一部の態様において、位置が定められた場所はそれぞれ、位置が区別できる場所である。ある特定の態様において、それぞれの決定可能なPNA配列またはPNA-DNA配列は既知のヌクレオチド配列に対応する。ある特定の態様において、それぞれの決定可能なPNA-DNA配列は別個の配列である。一部の態様において、特徴は表面に共有結合により取り付けられている。一部の態様において、PNA鎖またはPNA-DNA鎖はリンカー分子またはカップリング分子を介して表面に取り付けられている。

10

[本発明1001]

表面の、位置が定められた場所に取り付けられた特徴のアレイであって、該特徴がそれぞれ、決定可能な配列および意図された長さの複数のPNAポリマーを含み、該複数のPNAポリマーが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%のカップリング効率によって特徴付けられる長さの分布を含む、アレイ。

20

[本発明1002]

意図された長さより短い複数のPNAポリマーの長さの分布が、式：

$$F(N) = 10^{(N+1) \cdot \log(E/100\%)} - 10^{(N) \cdot \log(E/100\%)}$$

によって特徴付けられ、式中、N=PNAポリマーの実際の長さ、E=カップリング効率であり、Eが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%である、本発明1001のアレイ。

[本発明1003]

意図された長さのPNAポリマーの比率が、式：

$$F(N) = 10^{(N) \cdot \log(E/100\%)}$$

によって特徴付けられ、式中、N=PNAポリマーの意図された長さ、E=平均カップリング効率であり、Eが、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、または99.5%である、本発明1001のアレイ。

30

[本発明1004]

少なくとも10,000の特徴を含む、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1005]

少なくとも100,000の特徴を含む、本発明1004のアレイ。

[本発明1006]

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも30である、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1007]

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも40である、前記本発明のいずれかのアレイ。

40

[本発明1008]

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも50である、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1009]

PNAポリマーの意図された長さが少なくとも75である、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1010]

PNAポリマーがPNA/核酸キメラであり、該PNAポリマーが1つまたは複数の核酸残基を

50

さらに含む、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1011]

核酸がデオキシリボ核酸である、本発明1010のアレイ。

[本発明1012]

1平方センチメートルあたり少なくとも10,000の特徴を含む、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1013]

1平方センチメートルあたり少なくとも20,000、少なくとも40,000、少なくとも100,000、少なくとも200,000、少なくとも500,000、少なくとも100万、少なくとも200万、少なくとも500万、少なくとも1000万、少なくとも2000万、または少なくとも5000万の特徴を含む、本発明1012のアレイ。

10

[本発明1014]

アレイがピラーを備え、表面が該ピラーの上部表面である、前記本発明のいずれかのアレイ。

[本発明1015]

ピラーの上部表面が少なくとも $1\ \mu\text{m}^2$ の面積を有する、本発明1014のアレイ。

[本発明1016]

光マスクを用いてパターンを作製する工程、

該光マスクを通してフォトリソを紫外線に露光する工程、および

該紫外線への該露光の結果として該アレイ上の該パターンで酸または塩基を発生させる工程

20

を含む、本発明1001~1015のいずれかのアレイを作る方法。

[本発明1017]

露光によって光塩基発生剤から塩基が発生する、本発明1016の方法。

[本発明1018]

光塩基発生剤が、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパン、1,3-Bis[1-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-4-ピペリジル]プロパン、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-フェニルグリオキシラート、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-4-ニトロフェニルグリオキシラート、1,5,7-トリアザビシクロ[4.4.0]dec-5-エニル-テトラフェニルボラート、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エニル-テトラフェニルボラート、1-フェナシル-(1-アゾニア-4-アザビシクロ[2,2,2]オクタン)-テトラフェニルボラート、および1-ナフトイルメチル-(1-アゾニア-4-アザビシクロ[2,2,2]オクタン)-テトラフェニルボラートまたは類似物からなる群より選択される、本発明1017の方法。

30

[本発明1019]

光塩基発生剤が、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパンである、本発明1018の方法。

[本発明1020]

塩基によってアミン基から保護基が切断される、本発明1017~1019のいずれかの方法。

40

[本発明1021]

PNA単量体を、脱保護されたアミン基にカップリングする工程をさらに含む、本発明1020の方法。

[本発明1022]

露光によって光酸発生剤から酸が発生する、本発明1016の方法。

[本発明1023]

光酸発生剤が、ヨードニウム塩、ポロニウム塩、およびスルホニウム塩からなる群より選択される、本発明1022の方法。

[本発明1024]

光酸発生剤が、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホ

50

ナート、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムp-トルエンスルホナート、Bis(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムトリフラート、Boc-メトキシフェニルジフェニルスルホニウムトリフラート、(tert-ブトキシカルボニルメトキシナフチル)-ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-tert-ブチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、ジフェニルヨードニウムヘキサフルオロホスファート、ジフェニルヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホナート、ジフェニルヨードニウムトリフラート、(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラート、(4-メチルチオフェニル)メチルフェニルスルホニウムトリフラート、Tris(4-tert-ブチルフェニル)スルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)フェニルスルホニウムトリフラート、(4-メトキシフェニル)フェニルヨードニウムトリフラート、4メトキシフェニル)フェニルヨードニウムトリフルオロメタンスルホナート、(4メトキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラート、および(2,4-ジヒドロキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラートまたは類似物からなる群より選択される、本発明1022の方法。

10

[本発明1025]

光酸発生剤が、トリフラート、ホスフェート、およびアンチモナートのヨードニウム塩およびスルホニウム塩からなる群より選択される、本発明1022の方法。

[本発明1026]

光酸発生剤が、(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフラートである、本発明1022の方法。

20

[本発明1027]

酸によってカルボン酸基から保護基が切断される、本発明1022～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

DNA単量体を、脱保護されたカルボン酸基にカップリングする工程をさらに含む、本発明1027の方法。

[本発明1029]

PNA単量体をカップリングする工程が、

置換された酢酸を活性化剤によって活性化すること、および

選択的に露光された部分において、活性化された酢酸を無保護アミン基にカップリングすること

30

を含み、酢酸の置換が脱離基を含む、本発明1021の方法。

[本発明1030]

PNA単量体をカップリングする工程がアレイ上の複数の部位で同時に行われる、本発明1029の方法。

[本発明1031]

脱離基がハロゲンである、本発明1029の方法。

[本発明1032]

前記カップリングする工程が、

酢酸の脱離基をジアミノ-アルカンで置き換えること

40

をさらに含む、ジアミノ-アルカンの1つのアミンが保護されている、本発明1029の方法。

[本発明1033]

ジアミノ-アルカンがエチレンジアミンである、本発明1032の方法。

[本発明1034]

前記カップリングする工程が、

PNA単量体酢酸を活性化剤によって活性化すること、および

活性化されたPNA単量体酢酸をジアミノ-アルカンの無保護アミンにカップリングすること

をさらに含む、本発明1029または1030の方法。

50

## [本発明1035]

PNA単量体酢酸が、R-チミン-1-酢酸、R-(シトシン-1-イル)-酢酸、R-アデニン-9-イル-酢酸、R-グアニン-9-酢酸、またはR-ウラシル-1-酢酸であり、式中、RがHまたは保護基である、本発明1034の方法。

## [本発明1036]

対象から得られた核酸を含む試料を分析する方法であって、以下の工程を含む、方法：  
該試料を本発明1001～1015のいずれかのアレイと、該試料と該アレイとの間のハイブリダイゼーションを促進する条件下で接触させる工程；

該アレイからシグナルを検出する工程であって、該シグナルが、該特徴場所の1つまたは複数における、該アレイとハイブリダイズした試料の存在、非存在、または量を示す、工程；ならびに

該シグナルを分析し、それによって、該試料を分析する工程。

## [本発明1037]

分析する工程が、シグナルに基づいて、試料に存在する核酸配列を決定することを含む、本発明1036の方法。

## [本発明1038]

分析する工程が、シグナルに基づいて、試料に存在するSNPの存在または非存在を決定することを含む、本発明1036の方法。

## [本発明1039]

アレイがPNA/DNAキメラを含み、試料と該アレイとの間のハイブリダイゼーション後にプライマー伸長反応を行う工程をさらに含む、本発明1038の方法。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0033】

いくつかの図面の簡単な説明

本発明のこれらのおよび他の特徴、態様、および利点は、以下の説明および添付の図面に関して、さらによく理解されるようになるだろう。

## 【0034】

【図1】一部の態様に従う、PNAアレイを製造する方法を示す。

【図2A】一部の態様に従う、PNA-DNAキメラアレイを製造する方法および選択された工程のための反応スキームを示す。

【図2B】一部の態様に従う、PNA-DNAキメラアレイを製造する方法および選択された工程のための反応スキームを示す。

【図3】逆ホスホロアミダイトアプローチのための例示的な合成スキームを図示する。

【図4】PNAオリゴマーにカスタムオリゴヌクレオチドまたは予め選択されたオリゴヌクレオチドを付加するための一般的な合成スキームを図示する。

【図5】ドナーヌクレオチドの3'位置からアクセプターヌクレオチドの3'位置までの配列にアクセスするためのホスホロアミダイト化学を図示する。

【図6】一部の態様に従う、アレイに結合しているPNA分子に取り付けられた正しい配列およびミスマッチ配列のハイブリダイゼーションを測定するためのフルオレセイン強度を示す。

【図7】配列変種を検出するための例示的な一塩基プライマー伸長反応を図示する。図は、出現順にそれぞれSEQ ID NO:18、19を開示する。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0035】

詳細な説明

特許請求の範囲および明細書において用いられる用語は、他で特定しない限り、以下で示されるように定義される。

## 【0036】

本明細書で使用する「ウェーハ」という用語は、集積回路製作において一般的に用いられる半導体材料、例えば、ケイ素またはゲルマニウム結晶の薄片を指す。ウェーハは、様々

なサイズ、例えば、ある寸法に沿って25.4mm(1インチ)~300mm(11.8インチ)をとってもよく、厚さは、例えば、275µm~775µmでもよい。

【0037】

本明細書で使用する「光マスク」または「レチクル」または「マスク」という用語は、光を通すことができる光透過性のパターンまたは穴を備えた光不透過性の板を指す。典型的な露光プロセスでは、フォトレジスト上に光マスクのパターンが移される。

【0038】

本明細書で使用する「フォトレジスト」または「レジスト」または「光活性材料」という用語は、電磁放射線、特に、紫外線または遠紫外線に露光されたときに化学修飾を受ける、例えば、溶液中での溶解度を変えるか、または光酸を発生する感光性材料を指す。フォトレジストには有機化合物または無機化合物が含まれる。

10

【0039】

本明細書で使用する「フォトレジスト製剤」という用語は、光活性化合物および光防護化合物を含む製剤を指す。

【0040】

本明細書で使用する「光活性化合物」という用語は、電磁放射線に曝露されたときに改変される化合物を指す。これらの化合物には、例えば、カチオン性光開始剤、例えば、電磁放射線に曝露されたときに、対応する光酸を発生する光酸発生剤(PAG)または対応する光塩基を発生する光塩基発生剤(PBG)が含まれる。光活性化合物の例は、その全体が全ての目的のために本明細書に組み入れられる、2013年11月14日に出版された国際特許出願番号PCT/US2013/070207に開示される。光開始剤は、電磁放射線を、開始種、例えば、フリーラジカルまたはカチオンの形で化学エネルギーに変換するために製剤に特別に添加される化合物である。次いで、電磁放射線に曝露された光活性化合物の酸、塩基、または他の生成物は望ましい化学反応を生じるように連鎖反応で別の化合物と反応し得る。従って、これらの化学反応が発生する空間の向きは、光活性化合物を含む溶液または表面が曝露されるときに用いられる電磁放射線パターンに従って規定される。このパターンは、例えば、光マスクまたはレチクルによって規定されてもよい。

20

【0041】

本明細書で使用する「光防護」化合物という用語は、放射線の方向に沿って光防護化合物を越えた放射線のエネルギーが減少するように、放射線を吸収するかまたは散乱させることによって電磁放射線を遮蔽する、有機化合物または無機化合物を指す。無機光防護化合物の例には、二酸化チタン、硫化亜鉛、およびフッ化マグネシウムが含まれるが、これに限定されない。

30

【0042】

本明細書で使用する「カップリング分子」または「単量体分子」という用語は、窒素が、任意で、フルオレニルメチルオキシカルボニル(FmocもしくはF-Moc)基またはt-ブトキシカルボニル(tbocもしくはBoc)基で保護されている、天然の、または人工合成された任意のペプチド核酸(PNA)またはPNA単量体酢酸を含む。または、これらの用語は、置換された酢酸を含み、置換は脱離基である。カップリング分子の例には、R-チミン-1-酢酸、R-(シトシン-1-イル)-酢酸、R-アデニン-9-イル-酢酸、R-グアニン-9-酢酸、およびR-ウラシル-1-酢酸が含まれ、式中、RはHまたは核酸単量体の保護基である。他の例を下記で説明する。

40

【0043】

本明細書で使用する「カップリング」または「カップリングプロセス」または「カップリング工程」という用語は、リンカー分子またはカップリング分子などの2つ以上の分子間で結合を形成するプロセスを指す。結合はペプチド結合などの共有結合でもよい。ペプチド結合は、一方のカップリング分子のカルボキシル基が他方のカップリング分子のアミノ基と反応して水分子(H<sub>2</sub>O)を放出するときに2つの分子間で形成される化学結合である。これは脱水合成反応(縮合反応とも知られる)であり、通常、アミノ酸間で発生する。結果として生じた-C(=O)NH-結合はペプチド結合と呼ばれ、結果として生じた分子はアミド

50

である。本明細書で使用する、PNA単量体をカップリングする工程は、PNAまたはPNA前駆体の一部をカップリングし、次いで、PNAを作り上げる工程を含む。

【0044】

本明細書で使用する「カップリング効率」という用語は、単量体に結合することができる反応部位(例えば、ポリマー末端にある反応部位)に単量体がうまく付加する可能性を指す。例えば、C<sub>N</sub>方向にPNAポリマー(PNA配列とも称される)が成長している間に、遊離カルボキシル基を有するPNAモノマーは、適切な条件下で、遊離アミン基を有する別のPNAモノマーに結合する。カップリング効率は、ある特定の条件下で遊離カルボン酸が遊離アミノ基に付加する可能性を示す。カップリング効率は、例えば、いくつかの個別の反応部位に1種類の単量体が付加されたことを同時にモニタリングすることによって、

10

【0045】

本明細書で使用する「バイオマーカー」という用語は、PNA、DNA、RNA、タンパク質(例えば、キナーゼなどの酵素)、ペプチド、糖、塩、脂肪、脂質、イオンなどを含むが、これに限定されない。

【0046】

本明細書で使用する「リンカー分子」または「スペーサー分子」という用語は、結果として生じたPNAモノマー、またはPNAポリマー、またはPNA-DNAキメラポリマーにいかなる機能も付け加えないが、モノマーまたはポリマーの間隔をあけ、支持体からモノマーまたはポリマーを延ばし、従って、支持体表面と、成長しているPNAまたはPNA-DNA配列との間の距離を広げる任意の分子を含む。これにより、一般的に、PNAまたはPNA-DNAポリマーが関与する反応(単分子フォールディング反応および多分子結合反応を含む)の場合、支持体との立体障害が減り、そのため、PNAまたはPNA-DNA機能の1つまたは複数の態様を測定するアッセイの成績が改善される。

20

【0047】

本明細書で使用する「現像剤」という用語は、露光された、または露光されなかった材料を選択的に溶解することができる溶液を指す。典型的には、現像剤は、微量の塩基が添加された水をベースとする溶液である。例には、水をベースとする現像剤に溶解したテトラメチルアンモニウムヒドロキシドが含まれる。現像剤は、市販のフォトレジストが用いられる初回パターンの画定に用いられる。

30

【0048】

本明細書で使用する「保護基」という用語は、後の化学反応における化学選択性を得るために官能基の化学修飾によって分子に導入された基を含む。「化学選択性」とは、化学反応を所望の経路に向けて、予め選択された産物を別の産物と比較して得ることを指す。例えば、保護基としてt**boc**を使用すると、光マスクおよび光酸発生剤を用いたPNA合成の化学選択性によって保護基は選択的に除去され、光マスクによって規定された場所における予め決められた直接的なPNAカップリング反応の発生が可能になる。

【0049】

本明細書で使用する「マイクロアレイ」、「アレイ」、または「チップ」という用語は、特異的PNA、RNA、またはDNA結合配列の複数のプローブ分子が別々の場所に、順序づけられたやり方で付けられており、従って、微小アレイを形成している支持体を指す。特異的PNA、RNA、またはDNA結合配列は1つまたは複数の異なるタイプのリンカー分子を介してチップの支持体に結合されてもよい。「チップアレイ」とは、複数のチップ、例えば、24個、96個、または384個のチップを有するプレートを指す。

40

【0050】

本明細書で使用する「プローブ分子」という用語は、ペプチド核酸(「PNA」)、DNA結合配列、オリゴヌクレオチド、核酸、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ヌクレオチド模倣体、キレート剤、側鎖修飾ペプチド配列、バイオマーカーなどを指すが、これに限定されない。本明細書で使用する「特徴」という用語は、マイクロアレイに取り付けられている特定のプローブ分子を指す。本明細書で使用する「リガンド」という用語

50

は、1つまたは複数の特徴に結合することができる関心対象の分子、薬剤、分析物、または化合物を指す。

【0051】

本明細書で使用する「マイクロアレイシステム」または「チップアレイシステム」という用語は、通常、ガラス、プラスチック、またはシリコンチップのような固体平面上にフォーマットされた生体分子プローブと、試料を扱うために必要とされる機器(自動ロボット工学)、レポーター分子を読み取るために必要とされる機器(スキャナ)、およびデータを解析するために必要とされる機器(生物情報学ツール)からなるシステムを指す。

【0052】

本明細書で使用する「パターン領域」または「パターン」または「場所」という用語は、様々な特徴が成長する支持体上の領域を指す。これらのパターンはフォトマスクを用いて定めることができる。

10

【0053】

本明細書で使用する「誘導体化」という用語は、表面が生体分子合成に適するように表面を化学修飾するプロセスを指す。典型的には、誘導体化は、以下の工程:支持体を親水性にする工程、アミノシラン基を付加する工程、およびリンカー分子を取り付ける工程を含む。

【0054】

本明細書で使用する「キャッピング」または「キャッピングプロセス」または「キャッピング工程」という用語は、取り付けられた分子のさらなる反応を阻止する分子の付加を指す。例えば、ペプチド結合のさらなる形成を阻止するために、典型的に、無水酢酸分子でアミノ基がキャッピングされる。別の態様では、エタノールアミンが使用される。

20

【0055】

本明細書で使用する「拡散」という用語は、高濃度の領域から低濃度の領域へのランダムな運動を介した、例えば、光酸または光塩基の広がりを指す。

【0056】

本明細書で使用する「色素分子」という用語は、典型的に、支持体に結合することができる有色物質である色素を指す。色素分子は、アレイ上にある特徴と、関心対象の分子との間の結合の検出において有用であり得る。

【0057】

本明細書で使用する「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」という用語は、免疫グロブリン分子と、その免疫グロブリンが特異性を示す抗原との間で発生するタイプの非共有結合相互作用を指す。

30

【0058】

本明細書で使用する「生物学的試料」という用語は、関心対象の分析物についてアッセイすることができる生物学的な組織または液体に由来する試料を指す。このような試料には、痰、羊水、血液、血球(例えば、白血球)、組織もしくは細針生検試料、尿、腹水、および胸膜液、またはこれに由来する細胞が含まれるが、これに限定されない。生物学的試料はまた、組織切片、例えば、組織学的目的で採取された凍結切片を含んでもよい。試料は典型的にヒト患者から採取されるが、アッセイは、任意の生物(例えば、哺乳動物、細菌、ウイルス、藻類、もしくは酵母)または哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、およびブタに由来する試料中の関心対象の分析物を検出するのに使用することができる。試料は、必要に応じて、適切な緩衝溶液で希釈することによって調製されてもよく、所望であれば濃縮されてもよい。

40

【0059】

本明細書で使用する「アッセイ」という用語は、物質の複合混合物を含有し得る溶液中にある関心対象の物質の存在または濃度を測定する生化学的試験の一種を指す。

【0060】

2つ以上の核酸配列またはPNA配列の状況でのパーセント「同一性」という用語は、下記の配列比較アルゴリズムの1つ(例えば、当業者が利用可能なBLASTPおよびBLASTNも

50



しくは他のアルゴリズム)を用いて、または目視検査によって測定されたときに、最大限一致するように比較およびアラインメントされたときに同一である特定のパーセントの核酸塩基を有する2つ以上の配列または部分配列を指す。用途に応じて、パーセント「同一性」は、比較されている配列の領域にわたって、例えば、機能ドメインにわたって存在してもよく、比較しようとする2つの配列の完全長にわたって存在してもよい。

【0061】

配列比較の場合、典型的には、ある配列が参照配列として働き、参照配列と試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列はコンピュータに入力され、必要に応じて、部分配列の座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて参照配列と比較して試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

10

【0062】

比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith & Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性手法のための検索、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または目視検査によって行うことができる(概して、Ausubel et al., 下記を参照されたい)。

20

【0063】

パーセント配列同一性および配列類似性を求めるのに適したアルゴリズムの一例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載のBLASTアルゴリズムである。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトから公的に入手することができる。

【0064】

特に断りのない限り、本明細書で使用する「アルキル」は単独で用いられても置換基の一部として用いられても、親アルカンの1個の炭素原子から1個の水素原子を取り除くことによって得られた飽和、分枝、または直鎖の一価炭化水素基を指す。代表的なアルキル基には、メチル;エチル;プロピル、例えば、プロパン-1-イル、プロパン-2-イル;ブチル、例えば、ブタン-1-イル、ブタン-2-イル、2-メチル-プロパン-1-イル、2-メチル-プロパン-2-イルなどが含まれるが、これに限定されない。好ましい態様において、アルキル基はC<sub>1</sub>-6アルキルであり、C<sub>1</sub>-3アルキルが特に好ましい。「アルコキシル」基は、以前に述べられた直鎖アルキル基または分枝鎖アルキル基から形成された酸素エーテルである。

30

【0065】

本明細書で使用する「ハロ」または「ハロゲン」とは、塩素、臭素、フッ素、およびヨウ素を意味するものとする。「ハロ置換された」とは、少なくとも1個のハロゲン原子で置換された、好ましくは、少なくとも1個のフッ素原子で置換された基を意味するものとする。適切な例には、-CF<sub>3</sub>などが含まれるが、これに限定されない。

40

【0066】

本明細書で使用する「シクロアルキル」という用語は、3~8個の環炭素、好ましくは5~7個の環炭素を含有する、安定した飽和または部分飽和の単環式環構造または二環式環構造を指す。このような環式アルキル環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチルが含まれる。

【0067】

「アルケニル」という用語は、親アルケンの1個の炭素原子から1個の水素原子を取り除くことによって得られた少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和の分枝、直鎖、または環式の一価炭化水素基を指す。この基は、二重結合を中心にしてシスコンホメーションまたはトランスコンホメーションをとってもよい。代表的なアルケニル基には、

50

エテニル;プロペニル、例えば、プロパ-1-エン-1-イル、プロパ-1-エン-2-イル、プロパ-2-エン-1-イル、プロパ-2-エン-2-イル、シクロプロパ-1-エン-1-イル;シクロプロパ-2-エン-1-イル;ブテニル、例えば、ブタ-1-エン-1-イル、ブタ-1-エン-2-イル、2-メチル-プロパ-1-エン-1-イル、ブタ-2-エン-1-イル、ブタ-2-エン-1-イル、ブタ-2-エン-2-イル、ブタ-1,3-ジエン-1-イル、ブタ-1,3-ジエン-2-イル、シクロブタ-1-エン-1-イル、シクロブタ-1-エン-3-イル、シクロブタ-1,3-ジエン-1-イルなどが含まれるが、これに限定されない。

【0068】

「ヘテロアリアル」という用語は、親複素環式芳香族環構造の1個の原子から1個の水素原子を取り除くことによって得られた一価複素環式芳香族基を指す。代表的なヘテロアリアル基には、一方または両方の環が複素環式芳香族である単環式構造および二環式構造が含まれる。複素環式芳香族環は、O、N、およびSより選択される1~4個のヘテロ原子を含有してもよい。例には、カルバゾール、フラン、イミダゾール、インダゾール、インドール、インドリジン、イソインドール、イソキノリン、イソチアゾール、イソキサゾール、ナフチリジン、オキサジアゾール、オキサゾール、プリン、ピラジン、ピラゾール、ピリダジン、ピリジン、ピリミジン、ピロール、ピロリジン、キナゾリン、キノリン、キノリジン、キノキサリン、テトラゾール、チアジアゾール、チアゾール、チオフェン、トリアゾール、キサンテンなどに由来する基が含まれるが、これに限定されない。

10

【0069】

本明細書で使用する「アリアル」という用語は、炭素原子からなる安定した6員環単環式芳香環構造、または10員環二環式芳香環構造、または14員環三環式芳香環構造を含む芳香族基を指す。アリアル基の例にはフェニルまたはナフタレニルが含まれるが、これに限定されない。

20

【0070】

「ヘテロシクリル」という用語は、炭素原子、ならびにN、O、およびSより選択される1~6個のヘテロ原子からなる、3~12員環の飽和または部分飽和した一環式(単環式)環構造、二環式環構造、または縮合環構造である。ヘテロシクリル基は、任意のヘテロ原子または炭素原子に取り付けて安定構造を作り出すことができる。二環式ヘテロシクリル基には、一方または両方の環がヘテロ原子を含む構造が含まれる。ヘテロシクリル基の例には、2-イミダゾリン、イミダゾリジン;モルホリン、オキサゾリン、オキサゾリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、ピロリジン、ピリドン、ピリミドン、ピペラジン、ピペリジン、インドリン、テトラヒドロフラン、2-ピロリン、3-ピロリン、2-イミダゾリン、2-ピラゾリン、インドリノン、チオモルホリン、テトラヒドロピラン、テトラヒドロキノリン、テトラヒドロキナゾリン、[1,2,5]チアジアゾリジン、1,1-ジオキシド、[1,2,3]オキサチアゾリジン、2,2-ジオキシドなどが含まれるが、これに限定されない。

30

【0071】

「シス・トランス異性体」という用語は、基準面に対する原子(または基)の位置が異なる立体異性オレフィンまたはシクロアルカン(またはヘテロアナログ)を指す。シス異性体では、優先順位が最も高い原子は同じ側にある。トランス異性体では、優先順位が最も高い原子は反対側にある。

40

【0072】

「置換された」という用語は、1つまたは複数の水素原子がそれぞれ独立して同じ置換基または異なる置換基で置換されている基を指す。

【0073】

置換基に関して、「独立して」という用語は、複数のこのような置換基があり得るときに、このような置換基が同じでもよく、互いに異なってもよいことを意味する。

【0074】

「オキソ」という用語は単独で用いられても置換基の一部として用いられても、炭素原子または硫黄原子に結合しているO=を指す。例えば、フタルイミドおよびサッカリンは、オキソ置換基を有する化合物の例である。

50

## 【0075】

「PNA-DNAキメラ」という用語は、(i)PNA単量体単位の連続部分と、(ii)酵素により伸長可能な末端を有する、ヌクレオチド単量体単位の連続部分と、で構成されるオリゴマーを指す。

## 【0076】

「プライマー伸長」という用語は、プライマーがテンプレート核酸にハイブリダイズ(アニール)している間に、単量体ヌクレオチド単位がプライマーに酵素により付加されること、すなわち、重合を指す。

## 【0077】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきり規定されていない限り複数の指示物を含むことに留意しなければならない。

## 【0078】

組成物および合成スキームマイクロアレイ上でのPNA合成

本願は、光リソグラフィを用いたハイスループットパラレル合成によってマイクロアレイプラットフォーム上で、PNA単量体およびPNAポリマーを含むペプチド核酸(PNA)化合物を作る方法およびPNA-DNAキメラを作る方法を提供する。一部の態様では、PNAまたはPNA-DNAキメラマイクロアレイを作るために248nmの紫外線が用いられる。

## 【0079】

図1およびスキーム1は、PNAオリゴマー合成のための、一部の態様に従う、示唆された合成経路を図示する。このスキーム、下記のガイドライン、および実施例を用いて、当業者は、本発明の範囲内にある、ある特定のPNA化合物または複数のPNA化合物を有するマイクロアレイを得るための同様または類似の方法を開発することができる。一部の態様において、PNA化合物は、マイクロアレイの、位置が定められた場所にカップリングされる。これらの方法は合成スキームを代表するものであるが、本発明の範囲を限定すると解釈してはならない。

## 【0080】

一部の態様において、図1に図示したように、前記方法は、取り付けられた保護されたアミン基を含む表面を有するマイクロアレイウェーハを準備する工程を含む(図1、パート番号1)。アミンの保護基はR<sub>1</sub>であり、R<sub>1</sub>は、一部の態様では、カルボベンジルオキシ(Cbz)、p-メトキシベンジルカルボニル(Moz)、tert-ブチルオキシカルボニル(Boc)、カルバメート基、メトキシトリチル(Mmt)、ジメトキシトリチル(DMT)、トリチル(Trt)、トシル(Ts)、tert-アミルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、1-メチルシクロブチルオキシカルボニル、2-(p-ピフェニル)プロピル(2)オキシカルボニル、2-(p-フェニルアゾフェニル)プロピル(2)オキシカルボニル、ジメチル-3,5-ジメチルオキシベンジルオキシカルボニル、2-フェニルプロピル(2)オキシカルボニル、4-メチルオキシベンジルオキシカルボニル、フルフリルオキシカルボニル、p-トルエンシルフェニルアミノカルボニル、ジメチルホスフィノチオイル、ジフェニルホスフィノチオイル、2-ベンゾイル-1-メチルピニル、o-ニトロフェイルシルフェニル、および1-ナフチリデンを含み、これらは全て酸不安定性である。一部の態様において、アミンの保護基は、アセチル(Ac)、ベンゾイル(Bz)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、メチルスルホニルエチルオキシカルボニル、および5-ベンズイソアゾリルメチレンオキシカルボニルであり、これらは、一般的に、塩基不安定性である。

## 【0081】

一部の態様において、マイクロアレイのウェーハはフォトレジスト製剤でスピンコーティングされる(図1、パート番号2)。一部の態様において、フォトレジスト製剤は光活性化化合物および光防護化合物を含む。光活性化化合物は、光切断可能な試薬とも呼ばれる。一部の態様において、光活性化化合物は光酸発生剤(PAG)または光塩基発生剤(PBG)である。一部の態様において、ポリマーは、ポリ(ビニルアルコール)、デキストラン、アルギン酸

10

20

30

40

50

ナトリウム、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(酸化エチレン)、ポリ(ピニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)-ナトリウム塩、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、多糖類、およびセルロース誘導体である。一部の態様において、光防護化合物は、二酸化チタン、硫化亜鉛、およびフッ化マグネシウムである。

**【0082】**

一部の態様において、前記方法は、フォトレジスト製剤を適用することによってウェーハ表面上にフォトレジスト層を形成する工程を含む。フォトレジスト層は、マイクロアレイに取り付けられた、PNA化合物を含む基または化合物を放射線から守り、ウェーハは放射線に曝露される。一部の態様において、守られる基または化合物は、ウェーハ表面とフォトレジスト層との間に配置された層に含まれる(図1、パート番号2)。

10

**【0083】**

一部の態様において、フォトレジスト製剤はポリマーおよび溶媒をさらに含む。一部の態様において、溶媒は、水、有機溶媒、またはその組み合わせである。一部の態様において、有機溶媒は、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、酢酸プロピレングリコールメチルエーテル(PGMEA)、乳酸エチル、酢酸エトキシエチル、またはその組み合わせである。

**【0084】**

一部の態様において、ウェーハは、2000rpm~4000rpmの範囲で、好ましくは、2500rpm~3000rpmの範囲で、10~180秒間、好ましくは、60~120秒間にわたってフォトレジスト製剤でスピニングされる。フォトレジスト製剤がスピニングされた後に、ウェーハは、光マスクによって規定されるパターンに従って放射線に曝露され、フォトレジスト製剤に光酸発生剤または光塩基発生剤が存在するので、放射線に曝露された場所には酸または塩基が発生する。一部の態様において、放射線は遠紫外線スキャナーツールでの248nmの紫外線を含む。一部の態様において、放射線は365nmの紫外線を含む。光酸発生剤または光塩基発生剤を活性化する放射線は、ある範囲の波長でもよく、本明細書において開示される波長に限定されない。一部の態様において、露光エネルギーは1mJ/cm<sup>2</sup>~100mJ/cm<sup>2</sup>、好ましくは、30~60mJ/cm<sup>2</sup>の範囲である。

20

30

**【0085】**

一部の態様において、ウェーハの表面はベークモジュールにおいて放射線曝露後にポストベークされる。一部の態様において、ポストベーク温度は約60秒間、典型的には180秒を超えずに75~115℃である。

**【0086】**

一部の態様において、光酸発生剤または光塩基発生剤は放射線に曝露されたら光酸または光塩基を生じ、そして次に、光酸または光塩基によって、マイクロアレイのウェーハ表面にある曝露領域のアミノ基保護が取り除かれ(スキーム1の工程1)、それに続いて、フォトレジスト層が取り去られる(図1、パート番号3)。一部の態様では、生じた光酸または光塩基(反応済みの光切断可能な試薬とも呼ばれる)は、フォトレジスト層から、守られている基または化合物、例えば、マイクロアレイ表面に取り付けられたPNA化合物を含む層に拡散する。

40

**【0087】**

一部の態様において、無保護(遊離)アミノ基は、R<sub>2</sub>-酢酸および活性化剤を含む活性化剤をスピニングすることによって、活性化されたR<sub>2</sub>-酢酸にカップリングされ、ベークモジュールの中で55~115℃の温度で60~240秒間にわたって反応される(スキーム1の工程2; 図、パート番号4)。一部の態様において、R<sub>2</sub>は脱離基である。一部の態様において、脱離基は、プロモ、クロロ、フルオロ、ヨードなどである。一部の態様において、R<sub>2</sub>-酢酸は、プロモ酢酸、クロロ酢酸、フルオロ酢酸、ヨード酢酸などである。

**【0088】**

50

一部の態様において、活性化剤は、1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、1,3-ジイソプロピル-カルボジイミド(DIC)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HATU)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(PyBOP)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、N-ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド(HONB)、6-クロロ-1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(6-Cl-HOBt)、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HODhbt)およびそのアザ誘導体(HODhat)、またはその任意の組み合わせである。

10

## 【0089】

一部の態様において、R<sub>2</sub>-酢酸の濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

20

## 【0090】

一部の態様において、活性化剤の濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

30

## 【0091】

一部の態様において、活性化されたR<sub>2</sub>-酢酸のカップリングの後に、モノアミノ保護エチレンジアミン(モノR<sub>1</sub>保護エチレンジアミンとも呼ばれる)と保護基R<sub>1</sub>との置換反応が続く(スキーム1の工程3; 図1、パート番号5)。一部の態様において、置換反応はモノアミノ保護ジアミノ-アルカンを含む。「モノアミノ保護」とは、2つのアミノ基のうち1つしか保護されていないことを指す。一部の態様において、モノR<sub>1</sub>保護エチレンジアミンを含む置換剤はウェーハ上でスピコーティングされ、バークモジュールの中で55 ~ 115 の温度で30 ~ 300秒間、好ましくは、120秒間にわたって反応される。

## 【0092】

一部の態様において、保護基R<sub>1</sub>は上記の任意のアミノ保護基である。一部の態様において、モノアミノ保護エチレンジアミンの濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

40

## 【0093】

50

一部の態様では、置換反応の後に、PNA単量体酢酸とのカップリング反応が続く(スキーム1の工程4; 図1、パート番号6)。一部の態様において、PNA単量体酢酸は、R-チミン-1-酢酸、R-(シトシン-1-イル)-酢酸、R-アデニン-9-イル-酢酸、R-グアニン-9-酢酸、およびR-ウラシル-1-酢酸を含むが、これに限定されないR<sub>3</sub>-酢酸であり、式中、RはHまたは核酸単量体の保護基であり、一部の態様では、Boc、Bis-Boc、Alloc、ベンゾイル、アセチル、Fmoc、トリチル、任意の上記のアミノ保護基である。一部の態様において、PNA単量体酢酸は活性化剤によって活性化された後に、置換されたアミンにカップリングされる。一部の態様において、ウェーハは、PNA単量体酢酸および活性化剤を含む活性化製剤でスピコーティングされ、90~300秒間にわたって反応される。

【0094】

10

一部の態様において、活性化剤は、1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、1,3-ジイソプロピル-カルボジイミド(DIC)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HATU)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(PyBOP)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、N-ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド(HONB)、6-クロロ-1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(6-Cl-HOBT)、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HODhbt)およびそのアザ誘導体(HODhat)、またはその任意の組み合わせである。

20

【0095】

一部の態様において、ウェーハ表面は、任意で、ウェーハ上にある反応しなかったアミノ基が次のカップリング分子、例えば、活性化されたR<sub>2</sub>-酢酸と反応しないようにするために、キャッピング溶液でスピコーティングされる。一部の態様において、キャッピング溶液は、キャッピング分子、溶媒、ポリマー、およびカップリング分子を含む。一部の態様において、溶媒は、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミドのような有機溶媒、またはその組み合わせである。一部の態様において、キャッピング分子は無水酢酸であり、ポリマーは、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリ-(メチル-イソプロペニル)-ケトン、またはポリ-(2-メチル-ペンテン-1-スルホン)である。一部の態様において、キャッピング溶液は1500~3500rpmで少なくとも30秒間にわたってウェーハ上にスピコーティングされ、ベークモジュールの中で、1サイクルを完了するために55~95の温度で30秒~90秒間、好ましくは60秒間にわたって反応される。

30

【0096】

一部の態様において、望ましい長さの特定のPNA配列を生じるために、合成サイクル全体(図1、パート1~6)が、各サイクルにおいて特定のPNA単量体酢酸を用いて繰り返される。

【0097】

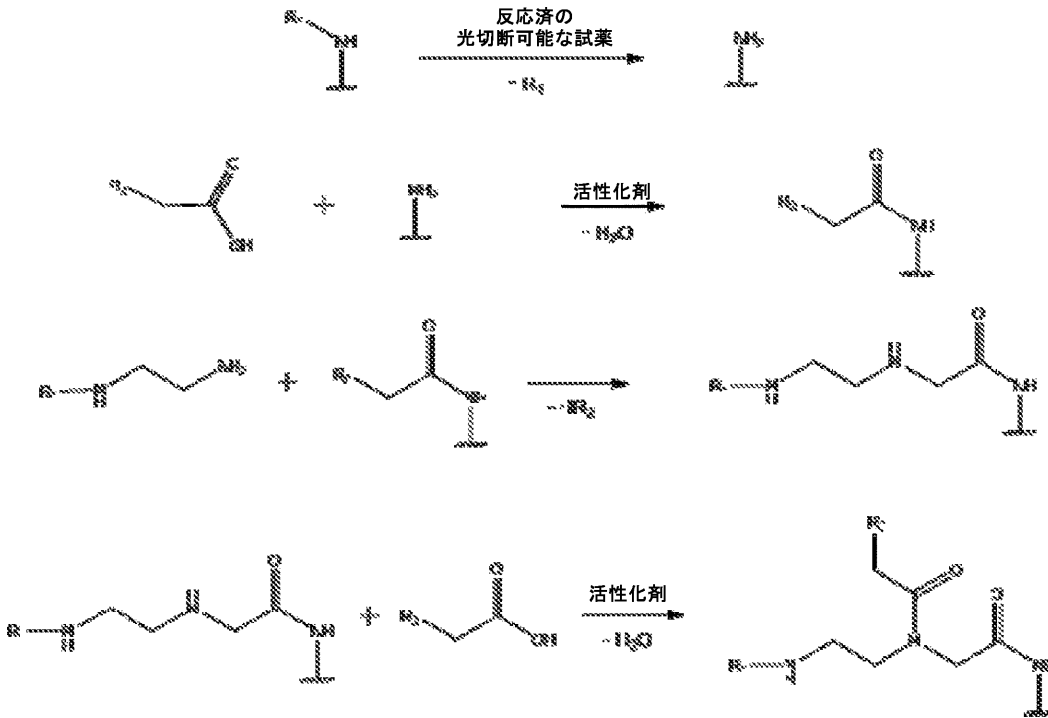
説明された合成サイクルの例をスキーム1および実施例1~8においてさらに説明する。これらの実施例の標的化合物に類似する化合物は同様の合成経路に従って作ることができる。開示された化合物は、本明細書に記載のようにマイクロアレイ製造において有用である。開示されたスキームにある波線

40

(~~~~)

は、特定の化合物とマイクロアレイ表面とのカップリングを示す。

スキーム1



10

20

30

40

50

## 【0098】

本発明に従う化合物が少なくとも1つのキラル中心を有する場合、それに合うように鏡像異性体として存在し得る。前記化合物が2つ以上のキラル中心を有する場合、さらにジアステレオマーとして存在し得る。本発明に従う化合物を調製するためのプロセスによって立体異性体の混合物が生じる場合、これらの異性体は調製用クロマトグラフィーなどの技法によって分離することができる。前記化合物はラセミ型で調製されてもよく、立体特異的合成または分割によって個々の鏡像異性体またはジアステレオマーとして調製されてもよい。前記化合物は、例えば、光学活性塩基との塩形成によって立体異性対を形成し、その後に分別晶出および遊離酸再生を行うなどの技法によって、成分である鏡像異性体またはジアステレオマーに分割することができる。前記化合物はまた、立体異性エステルまたはアミドを形成し、その後クロマトグラフィー分離およびキラル助剤の除去を行うことによって分割することもできる。または、前記化合物はキラルHPLCカラムによって分割することができる。その立体異性体、ラセミ混合物、ジアステレオマー、幾何異性体、および鏡像異性体は全て本発明の範囲内に包含されると理解しなければならない。

## 【0099】

さらに、前記化合物の結晶型の一部は多形として存在する場合があります。従って、本発明に含まれることが意図される。さらに、前記化合物の一部は、水と溶媒和化合物(すなわち、水和物)、または一般的な有機溶媒と溶媒和化合物を形成する場合があります。このような溶媒和化合物も本発明の範囲内に包含されることが意図される。

## 【0100】

DNA単量体と、マイクロアレイ上にあるPNAとのカップリング

図1ならびに図2Aおよび図2Bは、PNA-DNAキメラオリゴマー合成のための、一部の態様に従う、示唆された合成経路を図示する。このスキーム、下記のガイドライン、および実施例を用いて、当業者は、本発明の範囲内にある、ある特定のPNA-DNAキメラまたは複数のPNA-DNAキメラを有するマイクロアレイを得るための同様または類似の方法を開発することができる。一部の態様において、PNA-DNAキメラは、マイクロアレイの、位置が定められた場所にカップリングされる。これらの方法は合成スキームを代表するものであるが、本発明の範囲を限定すると解釈してはならない。

## 【0101】

一部の態様において、PNA-DNAキメラは、3つの別個のタイプの共有結合(すなわち、

共有結合による取り付け)、すなわち、(i)PNA単量体と、アレイの表面に付けられた別のPNA単量体、PNAオリゴマー、または遊離アミンとの共有結合; (ii)DNA単量体と、アレイの表面に付けられたPNAオリゴマーの末端にあるPNA単量体との共有結合;または (iii)DNA単量体と、PNA-DNAキメラオリゴマーの末端にあるDNA単量体との共有結合、を介して合成される。PNA単量体の共有結合は前記で説明した通りである。

#### 【0102】

図2Aおよび図2Bは、DNA単量体をPNAオリゴマーに共有結合により取り付けるための(工程7~10)、およびDNA単量体をPNA-DNAキメラオリゴマーの5'末端に共有結合により取り付けるための(工程11~13)、一部の態様に従う、示唆された合成経路を図示する。

10

#### 【0103】

一部の態様において、図2Aに図示したように、前記方法は、PNAオリゴマーの末端に取り付けられた保護されたアミン基を含む表面を有するマイクロアレイウェーハを準備する工程を含む(図2A、パート番号7)。保護に適した保護基の例が本明細書において示される。一部の態様において、PNAオリゴマーは、本明細書において提供される方法に従ってアレイ上に合成される。

#### 【0104】

一部の態様において、マイクロアレイのウェーハはフォトレジスト製剤でスピニングされる(図2A、パート番号8)。一部の態様において、フォトレジスト製剤は光活性化化合物および光防護化合物を含む。光活性化化合物は、光切断可能な試薬とも呼ばれる。一部の態様において、光活性化化合物は光酸発生剤(PAG)または光塩基発生剤(PBG)である。一部の態様において、ポリマーは、ポリ(ビニルアルコール)、デキストラン、アルギン酸ナトリウム、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(酸化エチレン)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)-ナトリウム塩、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、多糖類、およびセルロース誘導体である。一部の態様において、光防護化合物は、二酸化チタン、硫化亜鉛、およびフッ化マグネシウムである。

20

#### 【0105】

一部の態様において、前記方法は、フォトレジスト製剤を適用することによってウェーハ表面にフォトレジスト層を形成する工程を含む。フォトレジスト層は、マイクロアレイに取り付けられた、PNA化合物を含む基または化合物を放射線から守り、ウェーハは放射線に曝露される。一部の態様において、守られる基または化合物は、ウェーハ表面とフォトレジスト層との間に配置された層に含まれる(図1、パート番号2)。

30

#### 【0106】

一部の態様において、フォトレジスト製剤はポリマーおよび溶媒をさらに含む。一部の態様において、溶媒は、水、有機溶媒、またはその組み合わせである。一部の態様において、有機溶媒は、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、酢酸プロピレングリコールメチルエーテル(PGMEA)、乳酸エチル、酢酸エトキシエチル、またはその組み合わせである。

40

#### 【0107】

一部の態様において、ウェーハは、2000rpm~4000rpmの範囲で、好ましくは、2500rpm~3000rpmの範囲で、10~180秒間、好ましくは、60~120秒間にわたってフォトレジスト製剤でスピニングされる。フォトレジスト製剤がスピニングされた後に、ウェーハは、光マスクによって規定されるパターンに従って放射線に曝露され、フォトレジスト製剤に光酸発生剤または光塩基発生剤が存在するので、放射線に曝露された場所には酸または塩基が発生する。一部の態様において、放射線は遠紫外線スキャナーツールでの248nmの紫外線を含む。一部の態様において、放射線は365nmの紫外線を含む。光酸発生剤または光塩基発生剤を活性化する放射線は、ある範囲の波長でも

50



よく、本明細書において開示される波長に限定されない。一部の態様において、露光エネルギーは $1\text{mJ}/\text{cm}^2 \sim 100\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、好ましくは、 $30 \sim 60\text{mJ}/\text{cm}^2$ の範囲である。

【0108】

一部の態様において、ウェーハの表面はベークモジュールにおいて放射線曝露後にポストベークされる。一部の態様において、ポストベーク温度は約60秒間、典型的には180秒を超えずに75 ~ 115 である。

【0109】

一部の態様において、光酸発生剤または光塩基発生剤は放射線に曝露されたら光酸または光塩基を生じ、そして次に、光酸または光塩基によって、マイクロアレイのウェーハ表面にある曝露領域のアミノ基保護が取り除かれ、それに続いて、フォトレジスト層が取り去られる(図2A、パート番号9)。一部の態様では、生じた光酸または光塩基(反応済みの光切断可能な試薬とも呼ばれる)は、フォトレジスト層から、守られている基または化合物、例えば、マイクロアレイ表面に取り付けられたPNA化合物を含む層に拡散する。

10

【0110】

一部の態様において、無保護(遊離)アミノ基は、逆ホスホロアミダイトおよび活性化剤を含む活性化剤をスピンコーティングすることによって、活性化された逆ホスホロアミダイトにカップリングされ、ベークモジュールの中で75 ~ 115 の温度で60~180秒間にわたって反応される(図2Aおよび図2B、パート番号10)。一部の態様において、逆ホスホロアミダイトは、デオキシヌクレオシドの3'-ヒドロキシルにジメトキシトリチル(「DMT」)または類似の保護基を含む。一部の態様において、逆アミダイトは3'-R4-R5ホスホロアミダイトである。一部の態様において、活性化剤はテトラゾール触媒である。

20

【0111】

図3に示し、下記で説明する例示的な合成スキームは、上述した「逆」(すなわち、成長しているオリゴマーの5'位置とのカップリング)ホスホロアミダイトアプローチを示す。

【0112】

一部の態様において、リンカーまたはペプチド/ヌクレオチドは、ホスホエステル経路(ホスホジエステル、ホスホトリエステル、亜リン酸トリエステル、ホスホロチオエートによって活性化された基の使用を含む)を介してヌクレオチドに共有結合により取り付けることができる。これらの例ではジメトキシトリチル(DMT)が用いられるが、他の保護基が当業者に周知である。例えば、任意のヌクレオチドの5'位置または3'位置に、前記のホスホロアミダイト化学および5'-O-(メチル-6-ニトロピペロニルオキシカルボニル)(MeNPOC)保護基を使用することができるだろう。一般的な保護基または「ブロッキング」基を用いた、このような変化および変更は、当業者が用いる能力の範囲内である。

30

【0113】

一部の態様において、逆アミダイトの濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

40

【0114】

一部の態様において、活性化剤の濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量

50

%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

【0115】

一部の態様において、ウェーハ表面は、任意で、支持体上にある反応しなかったアミノ基が次のカップリング分子と反応しないようにするために、キャッピング溶液でスピニングされる。キャッピング溶液は、以下:溶媒、ポリマー、およびカップリング分子のように調製することができる。キャッピング溶液は1500~3500rpmで少なくとも30秒間にわたってウェーハ上にスピニングされ、ベークモジュールの中で、1サイクルを完了するために55~95の温度で30秒~90秒間、好ましくは60秒間にわたって反応される。次いで、カップリング工程で形成された亜リン酸トリエステルは、水およびピリジンの存在下でヨウ素酸化によって成し遂げられる安定型に変換される。

10

【0116】

一部の態様では、配列にカスタムオリゴヌクレオチドまたは予め選択されたオリゴヌクレオチドを付加するための一般的な(そうでなければ、オリゴヌクレオチド合成として当技術分野において公知の)合成スキームは、図4に示したような例示的な合成において説明される。当業者が理解するように、この合成により、ドナーヌクレオチドの5'位置を介してアクセプターヌクレオチドの3'位置へヌクレオチドが付加される。一部の態様では、図5に示したように、ドナーヌクレオチドの3'位置を介してアクセプターヌクレオチドの3'位置へ配列にアクセスするために、同じホスホロアミダイト化学を使用することができる。

20

【0117】

従って、一部の態様では、当業者は、所望のようにドナーおよびアクセプターと一緒にカップリングするために、すなわち、5'位置を介して任意の組み合わせもまた生じさせるために、アクセプターヌクレオチドおよびドナーヌクレオチドの5'位置および3'位置にあるDMT、そうでなければ既知の保護基およびホスホルアミダイト活性化基を、混合しかつマッチさせることができる。従って、本明細書において開示されたPNAのアミノ酸は、本明細書に記載の方法のいくつかの態様に従って核酸にカップリングすることができる。

【0118】

DNA単量体と、マイクロアレイ上にあるPNA-DNAキメラオリゴとのカップリング  
一部の態様において、図2Aおよび図2Bに図示したように、前記方法は、PNA-DNAキメラオリゴマー上にあるDNA単量体の5'末端に取り付けられた保護されたカルボン酸基を含む表面を有するマイクロアレイウェーハを準備する工程を含む(図2Aおよび図2B、パート番号10または13)。保護に適した保護基の例が本明細書において示される。一部の態様において、PNA-DNAキメラオリゴマーは、本明細書において提供される方法に従ってアレイ上に合成される。

30

【0119】

一部の態様において、マイクロアレイのウェーハはフォトレジスト製剤でスピニングされる(図2A、パート番号11)。一部の態様において、フォトレジスト製剤は光活性化化合物および光防護化合物を含む。光活性化化合物は、光切断可能な試薬とも呼ばれる。一部の態様において、光活性化化合物は光酸発生剤(PAG)または光塩基発生剤(PBG)である。一部の態様において、ポリマーは、ポリ(ビニルアルコール)、デキストラン、アルギン酸ナトリウム、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(酸化エチレン)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)-ナトリウム塩、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、多糖類、およびセルロース誘導体である。一部の態様において、光防護化合物は、二酸化チタン、硫化亜鉛、およびフッ化マグネシウムである。

40

50

## 【0120】

一部の態様において、前記方法は、フォトレジスト製剤を適用することによってウェーハ表面にフォトレジスト層を形成する工程を含む。フォトレジスト層は、マイクロアレイに取り付けられた、PNA化合物を含む基または化合物を放射線から守り、ウェーハは放射線に曝露される。一部の態様において、守られる基または化合物は、ウェーハ表面とフォトレジスト層との間に配置された層に含まれる(図1、パート番号11)。

## 【0121】

一部の態様において、フォトレジスト製剤はポリマーおよび溶媒をさらに含む。一部の態様において、溶媒は、水、有機溶媒、またはその組み合わせである。一部の態様において、有機溶媒は、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、酢酸プロピレングリコールメチルエーテル(PGMEA)、乳酸エチル、酢酸エトキシエチル、またはその組み合わせである。

10

## 【0122】

一部の態様において、ウェーハは、2000rpm~4000rpmの範囲で、好ましくは、2500rpm~3000rpmの範囲で、10~180秒間、好ましくは、60~120秒間にわたってフォトレジスト製剤でスピンコーティングされる。フォトレジスト製剤がスピンコーティングされた後に、ウェーハは、光マスクによって規定されるパターンに従って放射線に曝露され、フォトレジスト製剤に光酸発生剤または光塩基発生剤が存在するので、放射線に曝露された場所には酸または塩基が発生する。一部の態様において、放射線は遠紫外線スキャナーツールでの248nmの紫外線を含む。一部の態様において、放射線は365nmの紫外線を含む。光酸発生剤または光塩基発生剤を活性化する放射線は、ある範囲の波長でもよく、本明細書において開示される波長に限定されない。一部の態様において、露光エネルギーは1mJ/cm<sup>2</sup>~100mJ/cm<sup>2</sup>、好ましくは、30~60mJ/cm<sup>2</sup>の範囲である。

20

## 【0123】

一部の態様において、ウェーハの表面はベークモジュールにおいて放射線曝露後にポストベークされる。一部の態様において、ポストベーク温度は約60秒間、典型的には180秒を超えずに75~115℃である。

## 【0124】

一部の態様において、光酸発生剤または光塩基発生剤は放射線に曝露されたら光酸または光塩基を生じ、そして次に、光酸または光塩基によって、マイクロアレイのウェーハ表面にある曝露領域のアミノ基保護が取り除かれ、それに続いて、フォトレジスト層が取り去られる(図2A、パート番号12)。一部の態様では、生じた光酸または光塩基(反応済みの光切断可能な試薬とも呼ばれる)は、フォトレジスト層から、守られている基または化合物、例えば、マイクロアレイ表面に取り付けられたPNA-DNAキメラオリゴ化合物を含む層に拡散する。

30

## 【0125】

一部の態様において、逆ホスホロアミダイトおよび活性化剤を含む活性化製剤をスピンコーティングすることによって、無保護(遊離)カルボン酸基は、活性化された逆ホスホロアミダイトにカップリングされ、ベークモジュールの中で75~115℃の温度で60~180秒間にわたって反応される(図2Aおよび図2B、パート番号13)。一部の態様において、逆アミダイトは3'-R4-R6ホスホロアミダイトである。一部の態様において、活性化剤はテトラゾール触媒である。

40

## 【0126】

一部の態様において、3'-R4-R6ホスホロアミダイトの濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、

50

4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

【0127】

一部の態様において、活性化剤の濃度は、製剤総濃度の0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%より少ないか、または5.0重量%より多い。

10

【0128】

一部の態様において、ウェーハ表面は、任意で、支持体上にある反応しなかったアミノ基が次のカップリング分子と反応しないようにするために、キャッピング溶液でスピニングされる。キャッピング溶液は、以下:溶媒、ポリマー、およびカップリング分子のように調製することができる。キャッピング溶液は1500~3500rpmで少なくとも30秒間にわたってウェーハ上にスピニングされ、ベークモジュールの中で、1サイクルを完了するために55~95の温度で30秒~90秒間、好ましくは60秒間にわたって反応される。次いで、カップリング工程で形成された亜リン酸トリエステルは、水およびピリジンの存在下でヨウ素酸化によって成し遂げられる安定型に変換される。

20

【0129】

一部の態様において、望ましい長さの特定のDNA配列をPNA-DNAキメラオリゴマー末端に生じるために、DNA合成サイクル全体(図2Aおよび図2B、パート11~13)が、各サイクルにおいて特定の3'-R4-R6ホスホロアミダイト(phosphoramidite)を用いて繰り返される。

【0130】

製剤

フォトレジスト製剤、置換製剤、活性化製剤、およびリンカー製剤などの製剤が本明細書において開示される。これらの製剤は、製造および/または使用において、例えば、本明細書において開示されるPNAマイクロアレイの製造および/または使用において有用な場合がある。一般的に、本明細書において開示されるそれぞれの製剤の成分は室温(約25)で水に溶ける。

30

【0131】

フォトレジスト製剤

フォトレジスト製剤が本明細書において開示される。一部の態様において、フォトレジスト製剤は、光活性化化合物(光切断可能な試薬とも呼ばれる)および光防護化合物などの成分を含む。一部の態様において、光活性化化合物は光酸発生剤または光塩基発生剤である。一部の態様において、フォトレジスト製剤はポリマーおよび溶媒をさらに含む。

【0132】

一部の態様において、ポリマーは、ポリ(ビニルアルコール)、デキストラン、アルギン酸ナトリウム、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(酸化エチレン)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)-ナトリウム塩、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、多糖類、およびセルロース誘導体である。一部の態様において、光防護化合物は、二酸化チタン、硫化亜鉛、フッ化マグネシウムなどである。

40

【0133】

一つの局面において、フォトレジスト製剤は光活性化化合物を含む。光活性化化合物は光塩基

50

発生剤または光酸発生剤を含んでもよい。電磁放射線への光活性化合物の曝露は、拡散が限定された範囲内で材料変換二次反応を誘導し続ける化合物を生成する一次光化学的事象である。フォトレジスト製剤は、放射線感受性触媒前駆体、例えば、光酸発生剤(PAG)を含む光活性化合物;触媒の存在下で脱離、付加、または転位によって反応することができる複数の化学基;および成績または加工性を改善する任意の添加物、例えば、界面活性剤、光増感剤、およびエッチングレジスタを含んでもよい。

【0134】

一部の態様において、フォトレジスト製剤は、溶媒中に分散されたポリマーマトリックスの中に光塩基発生剤および光増感剤を含む。一部の態様において、フォトレジスト組成物中のポリマーは一般的に不活性かつ非架橋性であるが、光活性化合物は、電磁放射線に曝露されると望ましい反応を引き起こして、許容される収率で生成物を生じるのに十分な量の光塩基を容易に発生する。

10

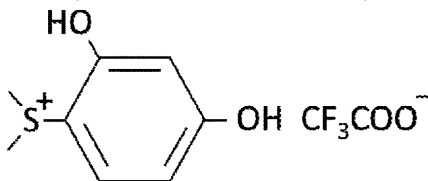
【0135】

一部の態様において、フォトレジスト製剤は、光増感剤、光活性化合物、ポリマー、および溶媒などの様々な成分を含んでもよい。

【0136】

一部の態様において、光活性化合物は光酸発生剤(PAG)でもよく、光塩基発生剤(PBG)でもよい。光酸発生剤(またはPAG)はカチオン性光開始剤である。光開始剤は、吸収した光エネルギー、UV、または可視光線を、開始種、例えば、フリーラジカルまたはカチオンの形で化学エネルギーに変換するために製剤に特別に添加される化合物である。カチオン性光開始剤は光リソグラフィにおいて広範に用いられている。一般的に、いくつかのタイプのカチオン性光開始剤が、非常に強いプロトン酸またはルイス酸の隠れた光化学的供給源として働く能力はフォトイメージング分野において用いられるための基盤である。一部の態様において、光酸発生剤は、ヨードニウム塩、ポロニウム塩、またはスルホニウム塩である。一部の態様において、光酸発生剤は、(4-メトキシフェニル)フェニルヨードニウムまたはトリフルオロメタンスルホネートである。一部の態様において、光酸発生剤は、以下に示した(2,4-ジヒドロキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラートまたは(4メトキシフェニル)ジメチルスルホニウムトリフラートである。

20



30

【0137】

一部の態様において、光酸発生剤は、トリフラート、ホスフェート、および/またはアンチモネートのヨードニウム塩およびスルホニウム塩である。一部の態様において、光酸発生剤は製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、光酸発生剤は、製剤総濃度の約0.1重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%、5.1重量%、5.2重量%、5.3重量%、5.4重量%、5.5重量%、5.6重量%、5.7重量%、5.8重量%、5.9重量%、6.0重量%、6.1重量%、6.2重量%、6.3重量%、6.4重量%、6.5重量%、6.6重量%、6.7重量%、6.8重量%、6.9重量%、7.0重量%より少ないか、または7.0重量%より多い。

40

【0138】

50

一部の態様において、光塩基発生剤は、1,3-Bis[(2-ニトロベンジル)オキシカルボニル-4-ピペリジル]プロパンまたは1,3-Bis[(1-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-4-ピペリジル]プロパンである。光塩基発生剤は、単量体が支持体に結合できるように、単量体を脱保護するのに十分な量で本発明の組成物中に存在しなくてはならない。一部の態様において、光塩基発生剤は製剤総濃度の約0.5～5重量%である。一部の態様において、光塩基発生剤は、製剤総濃度の約0.1重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%、5.1重量%、5.2重量%、5.3重量%、5.4重量%、5.5重量%、5.6重量%、5.7重量%、5.8重量%、5.9重量%、6.0重量%、6.1重量%、6.2重量%、6.3重量%、6.4重量%、6.5重量%、6.6重量%、6.7重量%、6.8重量%、6.9重量%、7.0重量%より少ないか、または7.0重量%より多い。

10

## 【0139】

一部の態様において、フォトレジスト製剤はマイクロアレイの表面にフォトレジスト層を形成し、フォトレジスト層の濃度は、製剤総濃度の0.1重量%より少ないか、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%であるか、または5.0重量%より多い。

20

## 【0140】

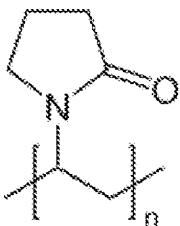
一部の態様において、溶媒は製剤総濃度の約80～90重量%である。一部の態様において、溶媒は、製剤総濃度の約70重量%、70重量%、71重量%、72重量%、73重量%、74重量%、75重量%、76重量%、77重量%、78重量%、79重量%、80重量%、81重量%、82重量%、83重量%、84重量%、85重量%、86重量%、87重量%、88重量%、89重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%より少ないか、または99重量%より多い。

30

## 【0141】

一部の態様において、ポリマーは非架橋性不活性ポリマーである。一部の態様において、ポリマーはポリビニルピロリドンである。ポリビニルピロリドンの一般構造は以下の通りであり、 $n$ は、1より大きな任意の正の整数である。

40



## 【0142】

一部の態様において、ポリマーはビニルピロリドンのポリマーである。一部の態様において、ポリマーはポリビニルピロリドンである。ポリビニルピロリドンは水および他の極性溶媒に溶ける。乾燥しているときにポリビニルピロリドンは軽いフレーク状の粉末であり

50

、一般的に、大気水蒸気中で重量の40%までを容易に吸収する。溶解状態では、ポリビニルピロリドンは優れた湿潤性を有し、薄膜を容易に形成する。一部の態様において、ポリマーはビニルピロリドンまたはビニルアルコールである。一部の態様において、ポリマーはポリメチルメタクリレートである。

【0143】

一部の態様において、ポリマーは製剤総濃度の2.5~5重量%である。一部の態様において、ポリマーは製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、ポリマーは、製剤総濃度の約0.1重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%より少ないか、または5.0重量%より多い。

10

【0144】

一部の態様において、溶媒は、水、乳酸エチル、nメチルピロリドン、またはその組み合わせである。一部の態様において、乳酸エチルは50%超まで水に溶解して溶媒を形成することができる。一部の態様において、溶媒は、約10%の酢酸プロピレングリコールメチルエーテル(PGMEA)および約90%のDI水でもよい。一部の態様において、溶媒は約20%までのPGMEAを含んでもよい。一部の態様において、溶媒は50%の乳酸エチルおよび50%のnメチルピロリドンを含んでもよい。一部の態様において、溶媒はnメチルピロリドンである。一部の態様において、溶媒は、水、有機溶媒、またはその組み合わせである。一部の態様において、有機溶媒は、Nメチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、またはその組み合わせである。

20

【0145】

一部の態様において、溶媒は製剤総濃度の約80~90重量%である。一部の態様において、溶媒は、製剤総濃度の約70重量%、70重量%、71重量%、72重量%、73重量%、74重量%、75重量%、76重量%、77重量%、78重量%、79重量%、80重量%、81重量%、82重量%、83重量%、84重量%、85重量%、86重量%、87重量%、88重量%、89重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%より少ないか、または99重量%より多い。

30

【0146】

置換製剤

一部の態様において、置換製剤は、製剤総濃度の1~2重量%のモノR<sub>1</sub>保護エチレンジアミンを含む。一部の態様において、モノR<sub>1</sub>保護エチレンジアミンは製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、モノR<sub>1</sub>保護エチレンジアミンは、製剤総濃度の約0.1重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%より少ないか、または5.0重量%より多い。一部の態様において、R<sub>1</sub>は、モノ保護アミノ基、例えば、t-Boc化学またはF-Moc化学を介して保護された基を含む。ほとんどの場合では、モノR<sub>1</sub>保護エチレンジアミンの濃度を上げると最高の成績が得られる。

40

【0147】

50

## 活性化製剤

遊離アミノ基とカルボン酸が反応するように、カルボン酸を活性化するための活性化製剤が本明細書において開示される。一部の態様において、活性化製剤は活性化剤(カップリング試薬とも呼ばれる)を含む。一部の態様において、カップリング試薬はカルボジイミドまたはトリアゾールである。一部の態様において、カルボジイミドは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである。一部の態様において、カルボン酸基活性化化合物はN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)である。一部の態様において、活性化製剤は任意で溶媒および/またはポリマーを含む。

### 【0148】

一部の態様において、活性化製剤は、R<sub>2</sub>-酢酸、例えば、プロモ酢酸、クロロ酢酸、フルオロ酢酸、ヨード酢酸をさらに含む。一部の態様において、活性化製剤は、カップリング分子、例えば、PNA単量体酢酸をさらに含む。一部の態様において、PNA単量体酢酸は、R-チミン-1-酢酸、R-(シトシン-1-イル)-酢酸、R-アデニン-9-イル-酢酸、R-グアニン-9-酢酸、およびR-ウラシル-1-酢酸であり、RはHまたは核酸単量体の保護基であり、一部の態様では、Boc、Bis-Boc、Alloc、ベンゾイル、アセチル、Fmoc、トリチル、任意の上記のアミノ保護基である。

### 【0149】

一部の態様において、カップリング試薬は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド[EDC]、N-ヒドロキシスクシンイミド[NHS]、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド[DIC]、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート)[HATU]、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート[PyBOP]、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン[DIEA]より選択される。一部の態様において、溶媒は水である。一部の態様において、溶媒はN-メチルピロリドン(NMP)である。一部の態様において、カップリング試薬はカルボン酸をカルボニル基に変換する(すなわち、カルボン酸基の活性化)。一部の態様において、カルボン酸基は、置換反応製剤への曝露後、5分間、10分間、15分間、20分間、30分間、45分間、または60分間にわたって活性化される。

### 【0150】

一部の態様において、カップリング試薬は製剤総濃度の2~4重量%である。一部の態様において、カップリング試薬は製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、カップリング試薬は、製剤総濃度の約0.1重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%より少ないか、または5.0重量%より多い。

### 【0151】

前記の組み合わせのいずれにおいても、製剤を水で完全にはがすことができる。従って、一部の態様では、曝露後に、水を用いて製剤を洗い流すことができる。

### 【0152】

一部の態様において、活性化製剤は、脱イオン水に溶解した4重量%の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよび2重量%のN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含む。一部の態様において、活性化製剤は、NMPに溶解した4重量%の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)および2重量%のヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)を含む。一部の態様において、活性化製剤は、NMPに溶解した4重量%の(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファ



ート)(HATU)および2重量%のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)を含む。一部の態様において、活性化剤は、NMPに溶解した4重量%のベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(PyBOP)および2重量%のDIEAを含む。

【0153】

一部の態様において、溶媒は水である。一部の態様において、溶媒は製剤総濃度の約80~90重量%である。一部の態様において、溶媒は、製剤総濃度のおよそ、70重量%未満、70重量%、71重量%、72重量%、73重量%、74重量%、75重量%、76重量%、77重量%、78重量%、79重量%、80重量%、81重量%、82重量%、83重量%、84重量%、85重量%、86重量%、87重量%、88重量%、89重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%、または99重量%より多い。

10

【0154】

一部の態様において、ポリマーはポリビニルピロリドンおよび/またはポリビニルアルコールである。一部の態様において、ポリマーは製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、ポリマーは、製剤総濃度のおよそ、0.1重量%未満、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%、または5.0重量%より多い。

20

【0155】

一部の態様において、カップリング試薬はカルボジイミドである。一部の態様において、カップリング試薬はトリアゾールである。一部の態様において、カップリング試薬は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである。一部の態様において、カップリング試薬は製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、カップリング試薬は、製剤総濃度のおよそ、0.1重量%未満、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%、または5.0重量%より多い。

30

【0156】

リンカー製剤

リンカー製剤も本明細書において開示される。リンカー製剤は、溶媒、ポリマー、リンカー分子、およびカップリング試薬などの成分を含んでもよい。一部の態様において、ポリマーは1重量%のポリビニルアルコールおよび2.5重量%のポリビニルピロリドンであり、リンカー分子は1.25重量%のポリエチレンオキシドであり、カップリング試薬は1重量%の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドであり、溶媒は水を含む。一部の態様において、ポリマーは0.5~5重量%のポリビニルアルコールおよび0.5~5重量%のポリビニルピロリドンであり、リンカー分子は0.5~5重量%のポリエチレンオキシドであり、カップリング試薬は0.5~5重量%の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドであり、溶媒は水を含む。

40

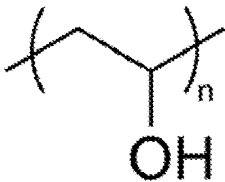
【0157】

50

一部の態様において、溶媒は水、有機溶媒、またはその組み合わせである。一部の態様において、有機溶媒は、Nメチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、またはその組み合わせである。一部の態様において、溶媒は製剤総濃度の約80~90重量%である。一部の態様において、溶媒は、製剤総濃度のおよそ、70重量%未満、70重量%、71重量%、72重量%、73重量%、74重量%、75重量%、76重量%、77重量%、78重量%、79重量%、80重量%、81重量%、82重量%、83重量%、84重量%、85重量%、86重量%、87重量%、88重量%、89重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%、または99重量%より多い。

【0158】

一部の態様において、ポリマーはポリビニルピロリドンおよび/またはポリビニルアルコールである。ポリビニルアルコールの一般構造は以下の通りであり、nは、1より大きな任意の正の整数である。



【0159】

一部の態様において、ポリマーは製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、ポリマーは、製剤全体のおよそ、0.1重量%未満、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%、または5.0重量%より多い。

【0160】

リンカー分子は、本明細書において開示された表面と、カップリング分子を介して合成されているPNA鎖との間に挿入される分子でもよい。リンカー分子は、必ずしも、結果として生じたPNA鎖に分子認識機能などの機能をもたらすとは限らず、その代わりに、表面にあるPNA鎖の機能領域の露出を高めるために、表面とPNA鎖との間の距離を延ばすことができる。一部の態様において、リンカーは、露出させるために約4~約40原子の長さでもよい。リンカー分子は、例えば、アリアルアセチレン、2~10個の単量体単位を含有するエチレングリコールオリゴマー(PEG)、ジアミン、二酸、アミノ酸、およびその組み合わせでもよい。ジアミンの例にはエチレンジアミンおよびジアミノプロパンが含まれる。または、リンカーは、合成されている分子(例えば、新生ポリマーまたは様々なカップリング分子)と同じ分子タイプ、例えば、ポリペプチドおよびアミノ酸誘導体のポリマー、例えば、アミノヘキサ酸、またはPNAポリマーでもよい。一部の態様において、リンカー分子は、分子の第1の末端にカルボキシル基を有し、分子の第2の末端に保護基を有する分子である。一部の態様において、保護基はt-Boc保護基またはFmoc保護基である。一部の態様において、リンカー分子は、アリアル-アセチレン、ポリエチレングリコール、新生ポリペプチド、ジアミン、二酸、ペプチド、PNAモノマーもしくはポリマー、またはその組み合わせであるか、これを含む。一部の態様において、リンカー分子は製剤総濃度の約0.5~5重量%である。一部の態様において、リンカー分子は、製剤総濃度のおよそ、0.1重量%未満、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1

10

20

30

40

50

.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2.0重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3.0重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4.0重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5.0重量%、または5.0重量%より多い。

【0161】

リンカー分子の結合されていない部分(または遊離末端)は、除去可能な保護基によって、ブロックされている、保護されている、または他の方法で反応に利用できないようにされている反応性官能基を有してもよい。保護基は、リンカー分子にある反応性官能基を保護するためにリンカー分子に結合されてもよい。使用することができる保護基は、全ての、酸に不安定な保護基および塩基に不安定な保護基を含む。例えば、リンカーアミン基は、両方とも酸に不安定であるt-ブトキシカルボニル(t-BOCもしくはBOC)またはベンジロキシカルボニル(CBZ)によって保護されてもよく、塩基に不安定である9-フルオレニルメトキシカルボニル(FMOC)によって保護されてもよい。

10

【0162】

使用することができる、さらなる保護基には、アミノ部分を保護するための、酸に不安定な基:tert-アミルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、1-メチルシクロブチルオキシカルボニル、2-(p-ピフェニル)プロピル(2)オキシカルボニル、2-(p-フェニルアゾフェニル)プロピル(2)オキシカルボニル、1,1-ジメチル-3,5-ジメチルオキシベンジルオキシカルボニル、2-フェニルプロピル(2)オキシカルボニル、4-メチルオキシベンジルオキシカルボニル、フルフリルオキシカルボニル、トリフェニルメチル(トリチル)、p-トルエンスルフェニルアミノカルボニル、ジメチルホスフィノチオイル、ジフェニルホスフィノチオイル、2-ベンゾイル-1-メチルピニル、o-ニトロフェニルスルフェニル、および1-ナフチリデン;アミノ部分を保護するための、塩基に不安定な基:9フルオレニルメチルオキシカルボニル、メチルスルホニルエチルオキシカルボニル、および5-ベンズイソアゾイルメチレンオキシカルボニル;還元されたときに不安定になるアミノ部分を保護するための基:ジチアスクシノイル、p-トルエンスルホニル、およびピペリジノ-オキシカルボニル;酸化されたときに不安定になるアミノ部分を保護するための基:(エチルチオ)カルボニル;多種多様な試薬に対して不安定な、アミノ部分を保護するための基、適切な薬剤を基の後にある括弧の中に示した:フタロイル(ヒドラジン)、トリフルオロアセチル(ピペリジン)、およびクロロアセチル(2-アミノチオフェノール);カルボン酸を保護するための、酸に不安定な基:tert-ブチルエステル;ヒドロキシル基を保護するための、酸に不安定な基:ジメチルトリチルが含まれる。Greene, T. W., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, NY, (1981)も参照されたい。

20

30

【0163】

上記の組み合わせのうち任意のものについて、製剤は完全に水剥離性であり得る。

【0164】

支持体

支持体も本明細書において開示される。一部の態様において、支持体表面は平面(すなわち、2次元)である。一部の態様において、支持体表面は遊離アミン基によって官能化される。一部の態様において、支持体表面は遊離カルボン酸基によって官能化される。遊離アミン基によって官能化された表面は、少なくとも2つの遊離カルボン酸基を含む分子のカルボン酸基を活性化し(例えば、カルボジイミドを用いてカルボン酸基をカルボニル基に変換し)、前記分子を、支持体の表面に取り付けられた遊離アミン基と反応させることによって遊離カルボン酸基に変換されてもよい。一部の態様において、複数のカルボン酸基を含む前記分子は、無水コハク酸、ポリエチレングリコール二酸、ベンゼン-1,3,5-トリカルボン酸、ベンゼンヘキサカルボン酸、またはカルボキシメチルデキストランである。

40

【0165】

50

一部の局面において、表面は、剛性または半剛性を有する材料または材料群である。一部の態様において、表面は実質的に平らでもよいが、一部の態様では、例えば、ウェル、一段高い領域、ピン、ピラー、エッチングされた溝などで、異なる分子または特徴のための合成領域を物理的に分離することが望ましい場合がある。ある特定の局面では、表面は多孔性でもよい。表面材料は、例えば、ケイ素、生体適合性ポリマー、例えば、ポリ(メチル-メタクリレート)(PMMA)およびポリジメチルシロキサン(PDMS)、ガラス、 $\text{SiO}_2$ (例えば、熱酸化ケイ素シリコンウェーハ、例えば、半導体産業において用いられるもの)、石英、窒化ケイ素、官能化ガラス、金、白金、ならびにアルミニウムを含んでもよい。官能化表面は、例えば、アミノ官能化ガラス、カルボキシ官能化ガラス、およびヒドロキシ官能化ガラスを含む。さらに、表面は、任意で、分子の取り付けもしくは官能基化、反応性の増加もしくは減少、結合検出、または他の特殊用途のために第2の表面を設けるために1つまたは複数の層でコーティングされてもよい。表面の材料および/または層は多孔性でも非多孔性でもよい。例えば、表面は多孔性ケイ素で構成されてもよい。さらに、表面はシリコンウェーハまたはチップ、例えば、半導体装置製造産業において用いられるものでもよい。ウェーハまたはチップの場合、複数のアレイをウェーハ上で合成することができる。

10

#### 【0166】

一部の態様において、支持体は、第1の単量体基本要素を結合するための官能基を含む多孔層(すなわち、3次元層)を含んでもよい。一部の態様において、支持体表面は、PNAを取り付けるためまたは合成するためのピラーを含む。一部の態様において、多孔層はピラーの上部に付加される。

20

#### 【0167】

##### 多孔層支持体

使用することができる多孔層は、第1のPNA基本要素を取り付けるために(構成要素ポリマーに固有の、または多孔層に導入された)アミン基を有する多孔構造からなる平らな透過性ポリマー材料である。例えば、多孔層は多孔性ケイ素からなってもよく、多孔性ケイ素の表面にはポリマー基本要素を取り付けるための官能基が取り付けられている。別の例において、多孔層は架橋ポリマー材料からなってもよい。一部の態様において、多孔層は、ポリスチレン、サッカロース、デキストラン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリアクリレート、ポリメチルアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリアクリロイルピロリドン、ポリ酢酸ビニル、ポリエチレングリコール、アガロース、セファロース、他の従来クロマトグラフィー型材料、ならびにその誘導体および混合物を使用することができる。一部の態様において、多孔層構成材料は、ポリ(ビニルアルコール)、デキストラン、アルギン酸ナトリウム、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)-ナトリウム塩、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、多糖類、およびセルロース誘導体より選択される。好ましくは、多孔層の多孔度は10~80%である。一つの態様において、多孔層の厚さは $0.01\ \mu\text{m}$ ~約 $1,000\ \mu\text{m}$ である。多孔層に含まれる孔径は $2\ \text{nm}$ ~約 $100\ \mu\text{m}$ でもよい。

30

40

#### 【0168】

本発明の別の態様によれば、多孔度が10~80%の多孔性ポリマー材料を含む支持体であって、反応基が孔表面に化学結合されており、例えば、反応種、例えば、脱保護された単量体基本要素またはポリマー鎖と化学結合することによって、相互作用する用途に適合されている支持体が提供される。いくつかの態様において、反応基は遊離アミン基である。遊離アミン基は結合するように遊離しており、例えば、カップリング分子または置換されたアミノ酸分子の活性化されたカルボキシル基に結合するように遊離している。

#### 【0169】

ある態様において、多孔層は支持層と接触している。支持層は、例えば、金属、プラスチック

50

ック、ケイ素、酸化ケイ素、または窒化ケイ素を含む。別の態様において、多孔層は、パターン表面、例えば、下記のピラー支持体の上部にあるパターン表面と接触してもよい。

【0170】

ピラー支持体

一部の態様において、支持体は、上面および下面を有する平面層と;該層の、位置が定められた場所に機能的に連結された複数のピラーとを備えてもよく、それぞれのピラーは、該層から延びた平らな表面を有し、それぞれのピラーの表面と該層の上面との間の距離は約1,000~5,000オングストロームであり、複数のピラーは約10,000/cm<sup>2</sup>を超える密度で存在する。

【0171】

一部の態様において、平面層は、金属、プラスチック、ケイ素、酸化ケイ素、または窒化ケイ素を含む。一部の態様において、金属はクロムである。一部の態様において、金属は、クロム、チタン、アルミニウム、タングステン、金、銀、スズ、鉛、タリウム、インジウム、またはその組み合わせである。一部の態様において、平面層は少なくとも98.5~99(重量)%の金属、プラスチック、ケイ素、酸化ケイ素、または窒化ケイ素である。一部の態様において、平面層は、100%の金属、ケイ素、酸化ケイ素、または窒化ケイ素である。一部の態様において、平面層は、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、または99%を超える金属、ケイ素、酸化ケイ素、または窒化ケイ素である。一部の態様において、平面層は、金属、ケイ素、酸化ケイ素、または窒化ケイ素の均一な層である。

【0172】

一部の態様において、それぞれのピラーの表面と平面層の上面との間の距離はおよそ、1,000オングストローム、2,000オングストローム、3,000オングストローム、3,500オングストローム、4,500オングストローム、5,000オングストローム未満、または5,000オングストローム超の間(またはその間の任意の整数)であってもよい。

【0173】

一部の態様において、それぞれのピラーの表面は層の上面と平行である。一部の態様において、それぞれのピラーの表面は層の上面と実質的に平行である。

【0174】

一部の態様において、複数のピラーは、500/cm<sup>2</sup>、1,000/cm<sup>2</sup>、2,000/cm<sup>2</sup>、3,000/cm<sup>2</sup>、4,000/cm<sup>2</sup>、5,000/cm<sup>2</sup>、6,000/cm<sup>2</sup>、7,000/cm<sup>2</sup>、8,000/cm<sup>2</sup>、9,000/cm<sup>2</sup>、10,000/cm<sup>2</sup>、11,000/cm<sup>2</sup>、もしくは12,000/cm<sup>2</sup>を超える密度(またはその間の任意の整数)で存在する。一部の態様において、複数のピラーは10,000/cm<sup>2</sup>を超える密度で存在する。一部の態様において、複数のピラーは約10,000/cm<sup>2</sup>~約250万/cm<sup>2</sup>の密度(またはその間の任意の整数)で存在する。一部の態様において、複数のピラーは250万/cm<sup>2</sup>を超える密度で存在する。

【0175】

一部の態様において、それぞれのピラー表面の表面積は少なくとも1μm<sup>2</sup>である。一部の態様において、それぞれのピラー表面の表面積は、少なくとも0.1μm<sup>2</sup>、0.5μm<sup>2</sup>、12μm<sup>2</sup>、3μm<sup>2</sup>、4μm<sup>2</sup>、5μm<sup>2</sup>、6μm<sup>2</sup>、7μm<sup>2</sup>、8μm<sup>2</sup>、9μm<sup>2</sup>、10μm<sup>2</sup>、15μm<sup>2</sup>、20μm<sup>2</sup>、25μm<sup>2</sup>、30μm<sup>2</sup>、35μm<sup>2</sup>、40μm<sup>2</sup>、45μm<sup>2</sup>、もしくは50μm<sup>2</sup>(またはその間の任意の整数)でもよい。一部の態様において、それぞれのピラー表面の表面積は10,000μm<sup>2</sup>未満の総面積を有する。一部の態様において、それぞれのピラー表面の表面積は、500μm<sup>2</sup>、1,000μm<sup>2</sup>、2,000μm<sup>2</sup>、3,000μm<sup>2</sup>、4,000μm<sup>2</sup>、5,000μm<sup>2</sup>、6,000μm<sup>2</sup>、7,000μm<sup>2</sup>、8,000μm<sup>2</sup>、9,000μm<sup>2</sup>、10,000μm<sup>2</sup>、11,000μm<sup>2</sup>、もしくは12,000μm<sup>2</sup>より小さい(またはその間の任意の整数の)総面積を有する。

【0176】

一部の態様において、それぞれのピラーの表面と層の下面との間の距離は2,000~7,000オングストロームである。一部の態様において、それぞれのピラーの表面と層の下面と

10

20

30

40

50

の間の距離はおよそ、500オングストローム、1,000オングストローム、2,000オングストローム、3,000オングストローム、4,000オングストローム、5,000オングストローム、6,000オングストローム、7,000オングストローム、8,000オングストローム、9,000オングストローム、10,000オングストローム、11,000オングストローム、12,000オングストロームより短いか、または12,000オングストロームより長い(またはその間の任意の整数)。一部の態様において、それぞれのピラーの表面と層の下面との間の距離は、7,000オングストローム、3,000オングストローム、4,000オングストローム、5,000オングストローム、6,000オングストローム、または7,000オングストローム(またはその間の任意の整数)である。

【0177】

一部の態様において、層は厚さ1,000~2,000オングストロームである。一部の態様において、層はおよそ、500オングストローム厚、1,000オングストローム厚、2,000オングストローム厚、3,000オングストローム厚、4,000オングストローム厚、5,000オングストローム厚、6,000オングストローム厚、7,000オングストローム厚、8,000オングストローム厚、9,000オングストローム厚、10,000オングストローム厚、11,000オングストローム厚、12,000オングストローム厚より薄いか、または12,000オングストローム厚より厚い(またはその間の任意の整数)。

【0178】

一部の態様において、それぞれのピラーの中心は他の任意のピラーの中心から少なくとも2,000オングストローム離れている。一部の態様において、それぞれのピラーの中心は他の任意のピラーの中心から少なくとも約500オングストローム、1,000オングストローム、2,000オングストローム、3,000オングストローム、もしくは4,000オングストローム(またはその間の任意の整数)離れている。一部の態様では、それぞれのピラーの中心は他の任意のピラーの中心から少なくとも約2 $\mu$ m~200 $\mu$ m離れている。

【0179】

一部の態様において、少なくとも1つのピラーまたはそれぞれのピラーはケイ素を含む。一部の態様において、少なくとも1つのピラーまたはそれぞれのピラーは二酸化ケイ素または窒化ケイ素を含む。一部において、少なくとも1つのピラーまたはそれぞれのピラーは少なくとも90(重量)％、91(重量)％、92(重量)％、93(重量)％、94(重量)％、95(重量)％、96(重量)％、97(重量)％、98(重量)％、98.5(重量)％、または99(重量)％の二酸化ケイ素である。

【0180】

一部の態様において、支持体は、それぞれのピラーの表面に取り付けられた、遊離アミノ末端を有するリンカー分子を含んでもよい。一部の態様において、支持体は、少なくとも1つのピラーの表面に取り付けられた、遊離アミノ末端を有するリンカー分子を含んでもよい。一部の態様において、支持体は、それぞれのピラーの表面に取り付けられた保護基を有するリンカー分子を含んでもよい。一部の態様において、支持体は、少なくとも1つのピラーの表面に取り付けられた保護基を有するリンカー分子を含んでもよい。一部の態様において、支持体は、それぞれのピラーの表面に取り付けられたカップリング分子を含んでもよい。一部の態様において、支持体は、それぞれのピラーの表面に取り付けられたカップリング分子を含んでもよい。一部の態様において、支持体は、ピラーの少なくとも1つの表面と接触しているポリマーを含んでもよい。一部の態様において、支持体は、それぞれのピラーの表面と接触しているポリマーを含んでもよい。一部の態様において、支持体は、ピラーの少なくとも1つの表面と接触しているゼラチン状のポリマーを含んでもよい。一部の態様において、支持体は、ピラーの少なくとも1つの表面と接触している固体状のポリマーを含んでもよい。

【0181】

一部の態様において、支持体のピラーの少なくとも1つの表面は誘導体化される。一部の態様において、支持体は、ピラーの少なくとも1つの表面に取り付けられたポリマー鎖を含んでもよい。一部の態様において、ポリマー鎖はPNAを含む。一部の態様において、

10

20

30

40

50

少なくとも1つのピラーの表面への取り付けは共有結合を介したものである。

【0182】

一部の態様において、それぞれのピラーの表面は形が正方形または長方形である。一部の態様において、支持体は二酸化ケイ素層に連結されてもよい。二酸化ケイ素層は約 $0.5\mu\text{m}$ ~ $3\mu\text{m}$ 厚でもよい。一部の態様において、支持体は、ウェーハ、例えば、シリコンウェーハに連結されてもよい。二酸化ケイ素層は約 $700\mu\text{m}$ ~ $750\mu\text{m}$ 厚でもよい。

【0183】

アレイ

アレイも本明細書において開示される。一部の態様において、アレイは二次元アレイでもよい。一部の態様において、アレイは、支持体を備える表面を備え、支持体は、上面および下面を有する平面層を備える。

10

【0184】

一部の態様において、二次元アレイは、表面の、位置が定められた場所に取り付けられた特徴を含んでもよく、前記特徴はそれぞれ、決定可能な配列および意図された長さのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖のコレクションを含み、個々の特徴の中で、意図された長さを有する前記コレクションの中にあるPNAまたはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドの比(fraction)は、約98%の、各カップリング工程の平均カップリング効率によって特徴付けられる。一部の態様において、アレイは、前記層の、位置が定められた場所に機能的にカップリングされた複数のピラーを備え、それぞれのピラーは、前記層から伸ばされた平らな表面を有し、それぞれのピラーの表面と前記層の上面との間の距離は $1,000$ ~ $5,000$ オングストロームであり、複数のピラーは $10,000/\text{cm}^2$ を超える密度で存在する。

20

【0185】

一部の態様において、アレイの表面は遊離アミン基で官能化されている。一部の態様において、アレイ上にある遊離アミン基の表面密度は、 $10/\text{cm}^2$ 、 $100/\text{cm}^2$ 、 $1,000/\text{cm}^2$ 、 $10,000/\text{cm}^2$ 、 $100,000/\text{cm}^2$ 、 $1,000,000/\text{cm}^2$ 、または $10,000,000/\text{cm}^2$ より大きい。一部の態様において、アレイ上にある特徴の表面密度は、 $10/\text{cm}^2$ 、 $100/\text{cm}^2$ 、 $1,000/\text{cm}^2$ 、 $10,000/\text{cm}^2$ 、 $100,000/\text{cm}^2$ 、 $1,000,000/\text{cm}^2$ 、または $10,000,000/\text{cm}^2$ より大きい。

【0186】

一部の態様において、アレイは、三次元アレイ、例えば、多孔性アレイの表面に特徴が取り付けられている多孔性アレイでもよい。一部の態様において、多孔性アレイの表面は、外面および多孔性アレイ内の孔容積を規定する表面を含む。一部の態様において、三次元アレイは、表面の、位置が定められた場所に取り付けられた特徴を含んでもよく、前記特徴はそれぞれ、決定可能な配列および意図された長さのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖のコレクションを含む。一つの態様において、個々の特徴の中で、意図された長さを有する前記コレクションの中にあるPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の比は、98%を超える各カップリング工程の平均カップリング効率によって特徴付けられる。

30

【0187】

一部の態様において、PNA-PNA結合のための各カップリング工程の平均カップリング効率は少なくとも98.5%である。一部の態様において、PNA-PNA結合のための各カップリング工程の平均カップリング効率は少なくとも99%である。一部の態様において、PNA-PNA結合のための各カップリング工程の平均カップリング効率は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%である。

40

【0188】

一部の態様において、PNA-DNA結合のための各カップリング工程の平均カップリング効率は少なくとも97%である。一部の態様において、PNA-DNA結合のための各カップリ

50

ング工程の平均カップリング効率は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%である。

【0189】

一部の態様において、DNA-DNA結合のための各カップリング工程の平均カップリング効率は少なくとも98.5%である。一部の態様において、DNA-DNA結合のための各カップリング工程の平均カップリング効率は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%である。

10

【0190】

一部の態様において、完全長PNAまたはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド合成のための各カップリング工程の平均カップリング効率は少なくとも98.5%である。一部の態様において、各カップリング工程の平均カップリング効率は少なくとも99%である。一部の態様において、各カップリング工程の平均カップリング効率は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%である。

【0191】

一部の態様において、完全長の予め決められたPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の比に関する、それぞれの特徴の純度は、予め決められた配列および予め決められた完全長配列の長さNを有する、それぞれの特徴の完全長の予め決められたPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の比Fであり、

20

$$F=10(N+1) \cdot \log(E/100\%)$$

によって特徴付けられる。一部の態様において、Fは、予め決められた配列のそれぞれの単量体をカップリングする場合、少なくとも98.5%の平均カップリング効率Eによって特徴付けられる。一部の態様において、Fは、予め決められた配列のそれぞれの単量体をカップリングする場合、少なくとも98.5%の平均カップリング効率Eによって特徴付けられる。一部の態様において、各カップリング工程の平均カップリング効率Eは、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%である。

30

【0192】

一部の態様において、規定された長さ(例えば、64mer)のPNAまたはPNA-DNAキメラ配列の合成に基づいた、アレイ上にある配列の長さの分布。各カップリング工程において、望ましいカップリングが起こらない配列の長さは、キャッピング溶液が用いられたときの長さとして定められる。完全配列より短い、それぞれの配列の長さの工程収率に従う長さの分布は、以下の式：

$$F(N)=10(N+1) \cdot \log(E/100\%)-10(N) \cdot \log(E/100\%)$$

40

によって示される。式中、F(N)は、完全長配列より短い長さNでの、アレイ上にある配列の比率であり、Eは、平均カップリング効率のパーセントである。それぞれの長さNでのEの正確な値はまた、それぞれの長さでの、オリゴマーの正確な数を得るのにも使用することができる。

【0193】

完全長配列の比率は、以下の式：

$$F(N)=10(N) \cdot \log(E/100\%)$$

によって表され、式中、F(N)は、完全長配列(これ以上、カップリング工程が無い)のアレイ上にある配列の比率であり、Eは平均カップリング効率である。

【0194】

50



一部の態様において、配列の長さNは長さが少なくとも64単量体であり、完全長より短い予め決められたPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の比(fraction)は(1-F)に等しい。一部の態様において、配列の長さNは長さが少なくとも65単量体である。

【0195】

一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが5~100単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも64単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも65単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも100単量体であるか、または100単量体より長い。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも5単量体、10単量体、15単量体、20単量体、25単量体、30単量体、35単量体、40単量体、45単量体、50単量体、55単量体、60単量体、65単量体、70単量体、75単量体、80単量体、85単量体、90単量体、95単量体、または100単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが5単量体より短いか、少なくとも5単量体、6単量体、7単量体、8単量体、9単量体、10単量体、11単量体、12単量体、13単量体、14単量体、15単量体、16単量体、17単量体、18単量体、19単量体、20単量体、21単量体、22単量体、23単量体、24単量体、25単量体、26単量体、27単量体、28単量体、29単量体、30単量体、31単量体、32単量体、33単量体、34単量体、35単量体、36単量体、37単量体、38単量体、39単量体、40単量体、41単量体、42単量体、43単量体、44単量体、45単量体、46単量体、47単量体、48単量体、49単量体、50単量体、51単量体、52単量体、53単量体、54単量体、55単量体、56単量体、57単量体、58単量体、59単量体、60単量体、61単量体、62単量体、63単量体、64単量体、65単量体、66単量体、67単量体、68単量体、69単量体、70単量体、71単量体、72単量体、73単量体、74単量体、75単量体、76単量体、77単量体、78単量体、79単量体、80単量体、81単量体、82単量体、83単量体、84単量体、85単量体、86単量体、87単量体、88単量体、89単量体、90単量体、91単量体、92単量体、93単量体、94単量体、95単量体、96単量体、97単量体、98単量体、99単量体、100単量体であるか、または100単量体より長い。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は1つまたは複数のL-キラルPNA単量体を含む。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は1つまたは複数のD-キラルPNA単量体を含む。一部の態様において、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む。

10

20

30

【0196】

一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は長さが5~100単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は長さが少なくとも64単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は長さが少なくとも65単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は長さが少なくとも100単量体であるか、100単量体より長い。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は長さが少なくとも5単量体、10単量体、15単量体、20単量体、25単量体、30単量体、35単量体、40単量体、45単量体、50単量体、55単量体、60単量体、65単量体、70単量体、75単量体、80単量体、85単量体、90単量体、95単量体、または100単量体である。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は長さが5単量体より短いか、少なくとも5単量体、6単量体、7単量体、8単量体、9単量体、10単量体、11単量体、12単量体、13単量体、14単量体、15単量体、16単量体、17単量体、18単量体、19単量体、20単量体、21単量体、22単量体、23単量体、24単量体、25単量体、26単量体、27単量体、28単量体、29単量体、30単量体、

40

50

31単量体、32単量体、33単量体、34単量体、35単量体、36単量体、37単量体、38単量体、39単量体、40単量体、41単量体、42単量体、43単量体、44単量体、45単量体、46単量体、47単量体、48単量体、49単量体、50単量体、51単量体、52単量体、53単量体、54単量体、55単量体、56単量体、57単量体、58単量体、59単量体、60単量体、61単量体、62単量体、63単量体、64単量体、65単量体、66単量体、67単量体、68単量体、69単量体、70単量体、71単量体、72単量体、73単量体、74単量体、75単量体、76単量体、77単量体、78単量体、79単量体、80単量体、81単量体、82単量体、83単量体、84単量体、85単量体、86単量体、87単量体、88単量体、89単量体、90単量体、91単量体、92単量体、93単量体、94単量体、95単量体、96単量体、97単量体、98単量体、99単量体、100単量体であるか、または100単量体より長い。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は1つまたは複数のL-キラルPNA単量体を含む。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は1つまたは複数のD-キラルPNA単量体を含む。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖は1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む。一部の態様において、それぞれのPNA-DNAオリゴヌクレオチドキメラ鎖はDNA位置に1つまたは複数のリボヌクレオチドを含む。

10

## 【0197】

一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた少なくとも1,000の異なる特徴を含んでもよい。一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた少なくとも10,000の異なる特徴を含んでもよい。一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた少なくとも100、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000の、もしくは10,000を超える(またはその間の任意の整数の)異なる特徴を含んでもよい。

20

## 【0198】

一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた、少なくとも1,000の異なるPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含んでもよい。一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた、少なくとも10,000の異なるPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含んでもよい。一部の態様において、アレイは、表面に取り付けられた、少なくとも100、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000の、もしくは10,000を超える(またはその間の任意の整数の)異なるPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含んでもよい。

30

## 【0199】

一部の態様において、それぞれの特徴は、少なくとも500の同一の完全長PNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含み、それぞれの同一の完全長PNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は、長さが少なくとも64単量体、65単量体、66単量体、67単量体、68単量体、69単量体、70単量体、71単量体、72単量体、73単量体、74単量体、75単量体、76単量体、77単量体、78単量体、79単量体、80単量体、81単量体、82単量体、83単量体、84単量体、85単量体、86単量体、87単量体、88単量体、89単量体、90単量体、91単量体、92単量体、93単量体、94単量体、95単量体、96単量体、97単量体、98単量体、99単量体、100単量体の、または100単量体を超える、予め決められた完全長を有する。一部の態様において、それぞれの特徴は、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、または2000の同一の完全長PNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含み、それぞれの同一の完全長PNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は、長さが少なくとも64単量体、65単量体、66単量体、67単量体、68単量体、69単量体、70単量体、71単量体、72単量体、73単量体、74単量体、75単量体、76単量体、77単量体、78単量体、79単量体、80単量体、81単量体、82単量体、83単量体、84単量体、85単量体、86単量体、87単量体、88単量体、89単量体、90単量体、91単量体、92単量体、93単量体、94単量体、

40

50

95単量体、96単量体、97単量体、98単量体、99単量体、100単量体の、または100単量体を超える、予め決められた完全長を有する。

【0200】

一部の態様において、位置が定められた場所はそれぞれ、他の、位置が定められた場所のそれぞれと物理的に分離された異なる既知の場所にある。一部の態様において、位置が定められた場所はそれぞれ、位置が区別できる場所である。一部の態様において、それぞれの決定可能な配列は既知配列である。一部の態様において、それぞれの決定可能な配列は別個の配列である。

【0201】

一部の態様において、それぞれの特徴は、アレイの表面の、位置が定められた異なる場所に取り付けられ、それぞれの特徴の、位置が定められた場所は、ピラーの、位置が定められた場所に対応し、それぞれのピラーの上部表面はサイズが少なくとも $1\mu\text{m}^2$ である。

10

【0202】

一部の態様において、前記特徴は表面に共有結合により取り付けられる。一部の態様において、前記PNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖はリンカー分子またはカップリング分子を介して表面に取り付けられる。

【0203】

ある特定の態様において、前記特徴は、既知配列を有する供給源DNA配列またはRNA配列に由来する部分配列を含む、複数の別個の入れ子状の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含む。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の長さは実質的に同じである。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の長さは同じである。

20

【0204】

一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも5単量体である。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも5単量体、10単量体、15単量体、20単量体、25単量体、30単量体、35単量体、40単量体、45単量体、50単量体、55単量体、または60単量体である。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが5単量体より短いか、少なくとも5単量体、6単量体、7単量体、8単量体、9単量体、10単量体、11単量体、12単量体、13単量体、14単量体、15単量体、16単量体、17単量体、18単量体、19単量体、20単量体、21単量体、22単量体、23単量体、24単量体、25単量体、26単量体、27単量体、28単量体、29単量体、30単量体、31単量体、32単量体、33単量体、34単量体、35単量体、36単量体、37単量体、38単量体、39単量体、40単量体、41単量体、42単量体、43単量体、44単量体、45単量体、46単量体、47単量体、48単量体、49単量体、50単量体、51単量体、52単量体、53単量体、54単量体、55単量体、56単量体、57単量体、58単量体、59単量体、60単量体、61単量体、62単量体、63単量体、64単量体、65単量体、66単量体、67単量体、68単量体、69単量体、70単量体、71単量体、72単量体、73単量体、74単量体、75単量体、76単量体、77単量体、78単量体、79単量体、80単量体、81単量体、82単量体、83単量体、84単量体、85単量体、86単量体、87単量体、88単量体、89単量体、90単量体、91単量体、92単量体、93単量体、94単量体、95単量体、96単量体、97単量体、98単量体、99単量体、100単量体であるか、または100単量体より長い。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが5単量体より短いか、少なくとも100単量体、105単量体、110単量体、

30

40

50

115単量体、120単量体、125単量体、130単量体、135単量体、140単量体、145単量体、150単量体、155単量体、160単量体、165単量体、170単量体、175単量体、180単量体、185単量体、190単量体、195単量体、200単量体であるか、または200単量体より長い。

【0205】

一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、少なくとも1つのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも5単量体である。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、少なくとも1つのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが少なくとも5単量体、10単量体、15単量体、20単量体、25単量体、30単量体、35単量体、40単量体、45単量体、50単量体、55単量体、または60単量体である。一部の態様において、複数の重複するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の中にある、少なくとも1つのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖は長さが5単量体より短いか、少なくとも5単量体、6単量体、7単量体、8単量体、9単量体、10単量体、11単量体、12単量体、13単量体、14単量体、15単量体、16単量体、17単量体、18単量体、19単量体、20単量体、21単量体、22単量体、23単量体、24単量体、25単量体、26単量体、27単量体、28単量体、29単量体、30単量体、31単量体、32単量体、33単量体、34単量体、35単量体、36単量体、37単量体、38単量体、39単量体、40単量体、41単量体、42単量体、43単量体、44単量体、45単量体、46単量体、47単量体、48単量体、49単量体、50単量体、51単量体、52単量体、53単量体、54単量体、55単量体、56単量体、57単量体、58単量体、59単量体、60単量体、61単量体、62単量体、63単量体、64単量体、65単量体、66単量体、67単量体、68単量体、69単量体、70単量体、71単量体、72単量体、73単量体、74単量体、75単量体、76単量体、77単量体、78単量体、79単量体、80単量体、81単量体、82単量体、83単量体、84単量体、85単量体、86単量体、87単量体、88単量体、89単量体、90単量体、91単量体、92単量体、93単量体、94単量体、95単量体、96単量体、97単量体、98単量体、99単量体、100単量体であるか、または100単量体より長い。

【0206】

一部の態様において、特徴の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の長さは実質的に同じである。一部の態様において、特徴の中にある、それぞれのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の長さは同じである。一部の態様において、特徴は複数のPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を含み、それぞれの鎖はランダムで決定可能な単量体配列を有する。

【0207】

方法

支持体を製造する方法

支持体を作るための方法も本明細書において開示される。一部の態様において、支持体を生成する方法は多孔層を支持層にカップリングする工程を含んでもよい。支持層は、任意の金属またはプラスチックまたはシリコンまたは酸化ケイ素または窒化ケイ素を含んでもよい。一つの態様において、支持体は、PNAもしくはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド合成およびPNAモノマーカップリングの間にPNAモノマーを結合するために支持体に取り付けられた複数のアミノ基支持体を含む。一部の態様において、支持体を生成する方法は、多孔層を複数のピラーにカップリングする工程を含んでもよく、多孔層は化合物を支持体に取り付けるための官能基を含み、ここで、平面層の、位置が定められた場所に複数のピラーが取り付けられ、それぞれのピラーは、平面層から延びた平らな表面を有し、それぞれのピラーの表面と平面層の上面との間の距離は約1,000~5,000オングストロームであり、複数のピラーは約10,000/cm<sup>2</sup>を超える密度で存在する。

【0208】

一部の態様において、それぞれのピラーの表面は平面層の上面と平行である。一部の態様

において、それぞれのピラーの表面は平面層の上面と実質的に平行である。

#### 【0209】

##### 表面誘導体化

その全体が全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる、(2006年9月29日に出願された)米国特許出願公開第2010/0240555号において説明されたように、支持体は半導体モジュールにおいて表面誘導体化することができる。本発明の代表的な支持体には、表面誘導体化される準備ができた酸化物のピラーがある。表面誘導体化とは、遊離アミノ基が生体分子カップリングに利用できるように、アミノシラン基が支持体に付加される方法である。一部の局面において、表面誘導体化された支持体に取り付けられる第1の分子はtboc保護グリシンである。このカップリング手順は、当業者に一般的に公知の標準的なメリフィールド固相ペプチド合成手順に似ている。

10

#### 【0210】

一部の態様において、支持体の表面を調製する方法は、二酸化ケイ素を含む表面を得る工程、ならびに表面を、光活性化化合物および光防護化合物を含み、任意で、ポリマーおよび溶媒を含むフォトレジスト製剤と接触させる工程;ならびに紫外線を、表面の上部に位置し、かつフォトレジスト製剤と接触している位置が定められた場所に当てる工程を含んでもよい。一部の局面において、前記方法は、位置が定められた場所の外側にあるフォトレジスト製剤を除去する工程を含んでもよい。

#### 【0211】

##### アレイを製造する方法

アレイを製造するための方法も本明細書において開示される。一部の態様において、本明細書において開示されたアレイは、表面、例えば、本明細書において開示された支持体上で、インサイチューで合成することができる。場合によっては、アレイは光リソグラフィを用いて作られる。例えば、支持体はフォトレジスト製剤と接触される。マスクを用いて、保護基を有する遊離リンカー分子または遊離カップリング分子が設けられた表面上の特定の場所への放射線または光の曝露を制御することができる。曝露された場所では保護基は除去されて、カップリング分子上またはリンカー分子上に1つまたは複数の新たに露出した反応性部分が生じる。次いで、望ましいリンカーまたはカップリング分子が、保護されていない取り付けられた分子に、例えば、遊離アミノ基に連結される。表面上の特定の場所または位置が定められた場所において多数の特徴を合成するために、このプロセスは繰り返されてもよい(例えば、Pirrungらへの米国特許第5,143,854号、米国特許出願公開第2007/0154946号(2005年12月29日に出願された)、同第2007/0122841号(2005年11月30日に出願された)、同第2007/0122842号(2006年3月30日に出願された)、同第2008/0108149号(2006年10月23日に出願された)、および同第2010/0093554号(2008年6月2日に出願された)を参照されたい。これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる)。

20

30

#### 【0212】

一部の態様において、特徴の三次元(例えば、多孔性)アレイを生成する方法は、表面に取り付けられた多孔層を得る工程;および特徴を多孔層に取り付ける工程を含んでもよく、前記特徴はそれぞれ、決定可能な配列および意図された長さのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖のコレクションを含み、個々の特徴の中で、意図された長さを有する前記コレクションの中にあるPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の比は、少なくとも約98%の各カップリング工程の平均カップリング効率によって特徴付けられる。一部の態様において、前記特徴は、光活性化化合物、光防護化合物、任意で、ポリマーおよび溶媒を含むフォトレジスト製剤を用いて表面に取り付けられる。一部の態様において、前記特徴は、本明細書において開示されたフォトレジスト製剤を用いて表面に取り付けられる。一部の態様において、フォトレジスト製剤は水を用いて取り除かれる。

40

#### 【0213】

一部の態様において、アレイを製造するプロセスが本明細書に記載される。取り付けられ

50

た遊離アミン基を含む表面が提供される。表面は、光活性化化合物、光防護化合物、任意で、ポリマーおよび溶媒を含むフォトレジスト製剤と接触される。表面は、遠紫外線スキャナーツールの中で、光マスクによって規定されるパターンに従って電磁放射線、例えば、紫外線(UV)に露光され、フォトレジスト製剤に光酸発生剤が存在するので、放射線に曝露された場所に光酸が発生する。十分な光塩基を生成するためには、露光エネルギーは $1\text{ mJ/cm}^2 \sim 100\text{ mJ/cm}^2$ でよい。一部の態様において、放射線は $248\text{ nm}$ の紫外線を含む。一部の態様において、放射線は $365\text{ nm}$ の紫外線を含む。光酸発生剤または光塩基発生剤を活性化する放射線は、ある範囲の波長でもよく、本明細書において開示される波長に限定されない。

#### 【0214】

光防護化合物は、マイクロアレイに取り付けられた任意の分子を電磁放射線から守り、取り付けられている分子の、起こり得る放射線誘導性破壊を妨げる。光防護化合物には、二酸化チタン、硫化亜鉛、フッ化マグネシウムなどが含まれるが、これに限定されない。

#### 【0215】

表面は、ポスト露光バークモジュールにおいて露光の際にポストバークされる。ポスト露光バークは化学的増幅工程として働く。バーク工程は、最初に発生した光酸を増幅し、支持体への拡散速度も速める。ポストバーク温度は多孔性表面または支持体の平面層の厚さに応じて、少なくとも60秒間、通常120秒は超えず、 $75 \sim 115$ でもよい。遊離アミン基は遊離化合物分子の活性化カルボン酸基にカップリングされて、表面に取り付けられたアミン基に遊離化合物分子がカップリングされる。この表面は多孔性表面または支持体の平面層でもよい。表面に取り付けられたアミン基にカップリングされたPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖の合成はC-N合成方向で行われる。または、合成をC-N方向に向けるためにジアミンリンカーが遊離カルボン酸基に取り付けられてもよく、遊離化合物分子の活性化カルボン酸基は、支持体表面に結合しているアミン基に付着する。

#### 【0216】

次に、フォトレジスト製剤を取り除くことができる。一部の態様において、脱イオン(DI)水を用いてフォトレジストを完全に取り除く方法が本明細書において提供される。このプロセスは現像モジュールにおいて達成される。ウェーハを真空チャックにおいて例えば60秒~90秒間回転させ、ノズルを通して脱イオン水が約30秒間分注される。

#### 【0217】

フォトレジスト製剤はカップリングスピンモジュールにおいて表面に塗布されてもよい。カップリングスピンモジュールは、典型的には、光活性カップリング製剤を供給するために20個以上のノズルを有してもよい。これらのノズルは、これらの溶液を保持するシリンドラを加圧することによって、または必要量を分注するポンプによって光活性カップリング製剤を分注するように作られてもよい。一部の態様において、ポンプは、支持体上に5~8ccの光活性カップリング製剤を分注するように用いられる。支持体を真空チャックにおいて15~30秒間回転させ、光活性カップリング製剤が分注される。回転速度は $2000 \sim 2500\text{ rpm}$ になるように設定することができる。

#### 【0218】

「組成物」の箇所で記載したように、上記方法の後続のステップが、図1、スキーム1、ならびに図2Aおよび2Bに示されている。

#### 【0219】

任意で、支持体上にある未反応アミノ基が次のカップリング分子と反応しないようにするためにキャップフィルム溶液コートが表面上に塗布される。キャップフィルムコート溶液は、以下:溶媒、ポリマー、およびカップリング分子、のように調製することができる。使用することができる溶媒は、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、またはその組み合わせのような有機溶媒でもよい。キャッピング分子は典型的には無水酢酸であり、ポリマーはポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリ-(メチル-イソプロペニル)-ケトン、またはポリ-(2-メチル-ペンテン-1-スルホン)

10

20

30

40

50

でもよい。一部の態様において、カップリング分子はエタノールアミンである。

【0220】

このプロセスはカップリングスピンモジュールにおいて行われる。カップリングスピンモジュールは、カップフィルムコート溶液を支持体上に分注するように作ることができる1本のノズルを備えてもよい。この溶液は、カップフィルムコート溶液を貯蔵するシリンダを加圧することによって、または必要量を正確に分注するポンプを通して分注されてもよい。一部の態様において、約5~8ccのカップコート溶液を支持体上に分注するためにポンプが用いられる。支持体を真空チャックにおいて15~30秒間回転させ、カップリング製剤が分注される。回転速度は2000~2500rpmになるように設定される。

【0221】

カップリング溶液を含む支持体はカップベークモジュールにおいてベークされる。カップリングベークモジュールは、カップリングフィルムコートが適用された直後に、特にウェーハを受け取るように設けられたホットプレートである。一部の態様において、ホットプレートにおいて、スピンコーティングされたカップリングコート溶液をベークしてカップリング反応を著しく加速する方法が本明細書において提供される。一般的に、ホットプレートベークはカップリング時間を2分未満に短縮する。

【0222】

カップリング反応の副産物はストリッパモジュールにおいて取り除かれる。ストリッパモジュールは、有機溶媒、例えば、アセトン、イソプロピルアルコール、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、DI水などを分注するために設けられた、いくつかのノズル、典型的には10個までのノズルを備えてもよい。一部の態様において、ノズルは、アセトンの後にイソプロピルアルコールが回転ウェーハ上に分注されるように指定されてもよい。回転速度は約20秒間に2000~2500rpmになるように設定される。

【0223】

決定可能な配列および意図された長さのPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を得るために、毎回、異なるカップリング分子を用いて、このサイクル全体を所望のように繰り返すことができる。

【0224】

PNAまたはPNA-DNAマイクロアレイの使用法

支持体、製剤、および/またはアレイを使用する方法も本明細書において開示される。本明細書において開示されるアレイの使用は、研究用途、治療目的、医学診断、および/または1人もしくは複数人の患者の層別化を含んでもよい。

【0225】

本明細書に記載のアレイはいずれも研究ツールとして、または研究用途において使用することができる。一つの局面において、アレイはハイスループットスクリーニングアッセイに使用することができる。例えば、PNA基質は、アレイをDNA分子またはRNA分子に供し、相補的なDNA、RNA、またはPNA分子の存在または非存在を特定することによって、例えば、アレイの特徴の中の少なくとも1つの変化を検出することによって試験することができる。PNA-DNAキメラ基質は、アレイを相補的DNA分子に供し、一塩基伸長反応を行って基質が生物学的に活性であるかどうか確かめることによって、および試料中のSNPを特定することによって試験することができる。

【0226】

一部の態様において、アレイは、試料中の配列変種、例えば、一塩基多型(SNP)を検出するのに使用することができる。配列変種は、標識された分子と、アレイ上にあるプローブとの配列特異的ハイブリダイゼーションを観察することによって検出することができる。配列変種はまた、配列変種を有すると疑われる配列と、アレイ上にあるプローブを結合させ、その後に、標識ヌクレオチドを用いてポリメラーゼ伸長反応を行うことによって検出することもできる。好ましい態様では、PNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドプローブがアレイに結合され、配列変種を含むと疑われる試料に由来するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。PNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドは酵素的に活性である、すなわ

10

20

30

40

50

ち、重合に好ましい条件下でポリメラーゼを用いて、成長中の鎖に相補的ヌクレオチドが組み込まれるための基質として働くことができる。図7は、アレイに共有結合により取り付けられたPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドにハイブリダイズした試料オリゴヌクレオチドの身元(identity)を、ポリメラーゼに基づく一塩基伸長反応と標識ヌクレオチドを用いて検出するための例示的なスキームを示す。PNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドに基づくSNP検出法の例は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,316,230号に示される。

【0227】

アレイはまた、基質特異性を確かめるためのリガンド結合のスクリーニングアッセイ、またはインビボまたはインビトロである細胞で発現される相補的なDNA、RNA、PNA分子を特定するためのスクリーニングアッセイにおいても使用することができる。これらの方法を行うのに有用な標識法、プロテアーゼアッセイ、ならびに結合アッセイは一般的に当業者に周知である。

10

【0228】

一部の態様において、アレイは、所定のPNA鎖を重複PNA配列の配列として提示するのに使用することができる。例えば、既知遺伝子のPNA配列は任意の長さおよび任意の適切な重複フレームの重複配列セグメントに分けられ、それぞれの配列セグメントに対応するPNA鎖は、本明細書において開示されたようにインサイチューで合成される。このように合成された個々のPNAセグメントは、所定のPNA鎖のアミノ末端から開始して並べることができる。

20

【0229】

一部の態様において、試料は、複数のランダムPNA鎖を有するアレイに適用される。所定のヌクレオチド配列と、例えば、90%以上の同一性を有する相同ドメインを確かめるためにランダムPNA鎖をスクリーニングおよびBLAST検索することができる。次いで、一部の局面では、PNA配列全体を合成および使用して、関心対象の疾患の潜在的なマーカーおよび/または原因を特定することができる。

【0230】

一部の態様において、アレイは1種類または複数種の遺伝因子のハイスループットスクリーニングに用いられる。遺伝子に関連するDNAまたはRNAの発現は、PNAのハイブリダイゼーションの際に調査され、遺伝子と疾患との関係を評価するのに使用することができる。

30

【0231】

別の例において、アレイは1種類または複数種のバイオマーカーを特定するのに使用することができる。バイオマーカーは疾患の診断、予後、処置、および管理に使用することができる。バイオマーカーは、疾患状態、疾患の段階、および疾患処置に対する反応に応じて個体において発現されてもよく、存在しなくてもよく、異なるレベルでもよい。バイオマーカーは、例えば、DNA、RNA、PNA、タンパク質(例えば、キナーゼなどの酵素)、糖、塩、脂肪、脂質、またはイオンでもよい。

【0232】

アレイはまた、治療目的、例えば、1種類または複数種の生理活性剤の特定にも使用することができる。生理活性剤を特定するための方法は、複数種の試験化合物をアレイに適用する工程、および生理活性剤として少なくとも1種類の試験化合物を特定する工程を含んでもよい。試験化合物は、低分子、アプタマー、オリゴヌクレオチド、化学物質、天然抽出物、ペプチド、タンパク質、抗体断片、抗体様分子、または抗体でもよい。生理活性剤は治療剤または治療標的の修飾物質でもよい。いくつかの態様において、試験化合物は、ハイブリダイズしたDNA、RNA、またはPNA配列である。治療標的は、ホスファターゼ、プロテアーゼ、リガーゼ、シグナル伝達分子、転写因子、タンパク質輸送体、タンパク質ソーター、細胞表面受容体、分泌因子、および細胞骨格タンパク質を含んでもよい。

40

【0233】

一つの局面において、医療診断において使用するためのアレイも提供される。アレイは、

50



薬物またはワクチンの投与に対する反応を確かめるために使用することができる。例えば、ワクチンに対する個体の反応は、誘導された免疫応答に関連する特定の遺伝子を提示するPNA鎖またはPNA-DNAキメラオリゴヌクレオチド鎖を有するアレイを用いて個体の遺伝子発現レベルを検出することによって確かめることができる。別の診断用途は、バイオマーカーの存在について個体を試験することである。ここで、試料は対象から採取され、1種類または複数種のバイオマーカーの存在について試験される。

#### 【0234】

アレイはまた、対象が治療的処置に反応する可能性を示すバイオマーカーの存在または非存在に基づいて患者集団を層別化するのに使用することもできる。アレイは、既知のバイオマーカーを特定して適切な治療群を確かめるのに使用することができる。例えば、ある状態を有する対象からの試料をアレイに適用することができる。アレイへの結合によって、状態のバイオマーカーの存在が分かる場合がある。以前の研究から、バイオマーカーは処置後の正のアウトカムと関連するのに対して、バイオマーカーの非存在は処置後の負または中立のアウトカムに関連することが分かる場合がある。患者にバイオマーカーがあるので、医療専門家によって、処置を受ける群に患者が層別化される場合がある。

10

#### 【0235】

一部の態様において、試料中の関心対象の発現遺伝子の存在または非存在を検出する方法が、関心対象の遺伝子のDNAまたはRNA配列を含むと疑われる試料と接触させた本発明に開示されるアレイを得る工程;およびアレイの1つまたは複数の特徴との結合の存在または非存在を検出することによって関心対象の遺伝子が試料中に発現しているかどうかを確かめる工程を含み得る。一部の態様において、関心対象の遺伝子のDNAまたはRNA配列は、体液、例えば、羊水、房水、硝子体液、胆汁、血清、母乳、脳脊髄液、耳垢、乳び、内リンパ、外リンパ、糞便、女性の膺液、胃酸、胃液、リンパ、粘液、腹水、胸膜液、膿、唾液、皮脂、精液、汗、滑液、涙、膺分泌物、嘔吐物、または尿から得られてもよい。

20

#### 【0236】

一部の態様において、ワクチン候補を特定する方法は、ワクチン候補が以前に投与された対象から得られた試料と接触させた、本明細書において開示されたアレイを得る工程であって、試料が複数のDNAまたはRNA配列を含む、工程;およびアレイの1つまたは複数の特徴に対する複数のDNAまたはRNA配列の結合特異性を確かめる工程を含んでもよい。一部の態様において、前記特徴は、既知ヌクレオチド配列に由来する部分配列を含む複数の別個の入れ子状の重複PNA鎖を含む。

30

#### 【実施例】

#### 【0237】

以下は、本発明を実施するための特定の態様の実施例である。本実施例は例示のみの目的で提供され、いかなるやり方でも本発明の範囲を限定することを目的としない。使用された数値(例えば、量、温度など)に関して精度を確保するための努力がなされたが、もちろん、いくらかの実験誤差および偏差が許容されるはずである。

#### 【0238】

本発明の実施では、特に定めのない限り、当該技術の範囲内でタンパク質化学、生化学、組換えDNA法、および薬理学の従来法が用いられる。このような技法は文献において十分に説明されている。例えば、T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3<sup>rd</sup> Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992)を参照されたい。

40

#### 【0239】

50

実施例1:PNA配列の合成

以下の通りに、場所特異的なPNA配列合成がアレイ上で行われる。前記のように、ウェーハが、2000~4000rpm(好ましくは2500~3000rpm)で10~180秒間(好ましくは、60~120秒間)、光塩基発生剤を含むフォトレジスト組成物でスピコーティングされる。ウェーハおよびフォトレジストは遠紫外線スキャナーツールの中で、光マスクによって規定されるパターンに従って248nm紫外線に露光され、フォトレジスト中にある光活性カップリング溶液には光塩基発生剤が存在するので、紫外線に露光された場所には塩基が発生する。露光エネルギーは1mJ/cm<sup>2</sup>~100mJ/cm<sup>2</sup>(好ましくは30~60mJ/cm<sup>2</sup>)でもよい。

【0240】

UV露光後、ウェーハの表面はベークモジュールにおいてポストベークされる。ポストベーク温度は少なくとも60秒間(まれに180秒超)にわたって75~115℃でもよい。UV露光領域において生じた塩基によって、アミノ基にある保護基が取り除かれる。次いで、フォトレジストは取り去られる。

【0241】

次いで、R2-酢酸を活性化剤と共にスピコーティングすることによって、遊離アミノ基は、活性化されたR2-酢酸にカップリングされ、ベークモジュールの中で55~115℃の温度で60~240秒間にわたって反応される。過剰なR2-酢酸は除去される。

【0242】

活性化されたR2-酢酸が付加された後に、ウェーハの表面に置換混合物が添加されることで、モノアミノ保護エチレンジアミンを用いた置換反応が行われる。この置換混合物はウェーハ上にスピコーティングされ、ベークモジュールの中で55~115℃の温度で30秒~300秒間(好ましくは120秒間)にわたって反応される。一部の態様において、モノアミノ保護基は、前述した任意のアミノ保護基でよい。

【0243】

次に、ペプチド核酸単量体酢酸とのカップリング反応が行われる。活性化されたPNA単量体酢酸を活性化剤と共にスピコーティングし、90~300秒間にわたって反応させることによって、置換されたアミンは、活性化されたPNA単量体酢酸にカップリングされる。

【0244】

任意で、支持体上にある反応しなかったアミノ基が次のカップリング分子と反応しないようにするために、キャッピング溶液コートが表面に適用される。キャッピング溶液は、溶媒、ポリマー、およびカップリング分子を含む。キャッピング溶液は1500~3500rpmで少なくとも30秒間にわたってウェーハ上にスピコーティングされ、ベークモジュールの中で、1サイクルを完了するために55~95℃の温度で30秒~90秒間(好ましくは60秒間)にわたって反応される。

【0245】

望ましいPNA配列をアレイ上の特定の部位に得るために、毎回、異なる核酸単量体を用いて、このサイクル全体を所望のように繰り返すことができる。

【0246】

実施例2:長いPNA配列の収率

実施例1に記載のように、64mer長のPNA配列

AGCAATTTTGCATCTTTTAAAAGGGGTTTTCCCAATATTATGGTTCGTCCCCCTTTAAAGG

AT (SEQ ID NO: 1)

をウェーハ上で成長させ、以下に説明するように、配列重合の収率をフルオレセインプロセスを用いて計算した。配列の収率を求めるために、2当量のジイソプロピルカルボジイミド(VWR)および2当量のヒドロキシベンゾトリアゾール(Hobt)(Anapsec)で活性化した2重量%のフルオレセインカルボン酸5(6)-FAM(Anaspec)を3000rpmで60秒間に

10

20

30

40

50

わたってウェーハ上にスピンコーティングし、ベークモジュールの中で65℃で5分間ベークした。次いで、ウェーハをエチレンジアミン(VWR)で10分間洗浄し、次いで、N-メチル-ピロリドン(NMP)で2分間洗浄し、次いで、IPAで40秒間洗浄し、遠心力で脱水した。次いで、付加するたびに、蛍光を共焦点顕微鏡で測定して配列の収率を求めた。

【0247】

本実施例は、上記の64mer PNA配列の工程収率データを示す。蛍光によって工程収率を測定するために、カップリング効率を求める目的でPNA配列に蛍光色素分子をカップリングした。カップリングされたフルオレセイン色素の量から、成長した配列の量が直接測定される。

【0248】

工程収率を計算するのに用いた式は、

$$\text{工程収率} = (F_n / F_1)^{1/n-1}$$

であった。式中、 $F_1$ および $F_n$ は、1番目の工程および $n$ 番目の工程での、蛍光スキャナ装置から読み取ったフルオレセインカップリング強度を示す。カップリング収率は、式：

$$E = 10^{1/C \cdot \log(F)}$$

を用いて計算した。式中、 $F$ は完全長の比に等しく、 $C$ =カップリングの回数=長さ-1である。すると、完全長の比 $F$ は、

$$F = 10^{(N+1) \cdot \log(E/100\%)}$$

によって示される。

【0249】

(表1) PNA配列の工程収率

長さ	フルオレセイン 強度	長さ	フルオレセイン 強度
1	65520.14	33	54682.72348
2	65146.6752	34	54628.04075
3	64716.70715	35	54098.14876
4	64088.95509	36	53979.13283
5	63954.36828	37	53682.2476
6	63397.96528	38	53617.8289
7	63328.22751	39	53317.56906
8	63157.2413	40	52821.71567

10

20

30

40

50

9	62689.87771	41	52568.17143
10	62470.46314	42	52321.10103
11	62276.80471	43	52090.88818
12	62027.69749	44	51882.52463
13	61760.97839	45	51633.48851
14	61155.7208	46	51525.05819
15	60690.93732	47	51447.7706
16	60508.86451	48	50979.59589
17	60194.21842	49	50525.87748
18	59821.01426	50	50429.87832
19	59623.60491	51	50303.80362
20	59033.33123	52	50193.13525
21	58584.67791	53	50097.7683
22	58479.22549	54	49972.52387
23	58315.48366	55	49482.79314
24	57889.78063	56	49096.82735
25	57542.44194	57	48851.34322
26	57237.467	58	48445.87707
27	56859.69972	59	48189.11392
28	56615.20301	60	47899.97924
29	56162.28138	61	47646.10935
30	55623.12348	62	47469.81874
31	55361.6948	63	47251.45758
32	54940.94592	64	46996.29971

10

20

30

## 【0250】

表1は、それぞれの単量体層での蛍光シグナル強度を示す。表2は、カップリング工程の工程収率効率、64mer、75mer、および100merの全収率を示す。75merおよび100merの全収率は個々の工程収率に基づいて計算した。それぞれのPNA単量体のカップリング効率は64merPNA鎖それぞれの全長にわたって、それぞれの場合で99.4%を超えると計算された。

40

## 【0251】

(表2)アレイ上でのPNA配列決定の結果

50

	<u>収率</u>
それぞれのカップリングされた単量体の工程収率	99.4%
64mer長配列の全収率	71.73%
75mer長配列の理論上の収率	67.74%
100mer長配列の理論上の収率	59.49%

## 【0252】

次に、本発明者らは、規定された長さ(例えば、64mer)のPNA配列の合成に基づいて、アレイ上にある配列の長さの分布を求めた。各カップリング工程において、望ましいカップリングが起こらない配列の長さは、キャッピング溶液が用いられたときの長さとして定められる。完全配列より短い、それぞれの配列の長さの工程収率に従う長さの分布は、以下の式：

$$F(N) = 10(N+1) \cdot \log(E/100\%) - 10(N) \cdot \log(E/100\%)$$

によって示される。式中、F(N)は、完全長配列より短い長さNでの、アレイ上にある配列の比率であり、Eは平均カップリング効率パーセントである。それぞれの長さNでのEの正確な値はまた、それぞれの長さでの、オリゴマーの正確な数を得るのにも使用することができる。

## 【0253】

完全長配列の比率は、以下の式：

$$F(N) = 10(N) \cdot \log(E/100\%)$$

によって示され、F(N)は、完全長配列(これ以上、カップリング工程が無い)のアレイ上にある配列の比率であり、Eは平均カップリング効率である。

## 【0254】

実施例3: PNA配列とオリゴヌクレオチドDNA配列とのハイブリダイゼーション

PNA配列の生物学的活性を確かめるために、64mer長のPNA配列  
GTGGAAATTTGACATAGTCTCAGATGCCTATTaTATTACCGAGAGAGTAGTCTGAAATGCCT

TA (SEQ ID NO: 2) (マッチ配列),

GTGGAAATTTGACATAGTCTCAGATGCCTATTcTATTACCGAGAGAGTAGTCTGAAATGCCT

TA (SEQ ID NO: 3) (一塩基ミスマッチ配列), および

GTGGAAATTTTGTGGTGAAGGACTGTATATAAAtTGTGTCATAGTTTGTACCTAAAATGCCT

TA (SEQ ID NO: 4) (ミスマッチ配列)

を前記の方法に従ってアレイ上に合成した。

## 【0255】

マッチ配列に相補的なオリゴヌクレオチドDNA配列

TAAGGCATTTGACACTACTCTCTCGGTAATAtAATAGGCATCTGAGACTATGTCAAATTTCC

AC (SEQ ID NO: 5)

(相補ペア配列)を合成し(IDT)、当業者に周知の技法によってAtto-633色素(Atto-tec)で標識した。

## 【0256】

マッチ配列、一塩基ミスマッチ配列、およびミスマッチ配列を含むチップのハイブリダイゼーションは、相補ペア配列を標識することによって行った。この相補ペア配列を、0.1 X Ssarc緩衝液(60mM塩化ナトリウム(Sigma)、6mMクエン酸ナトリウム(Sigma)、

0.72重量% N-ラウロイルザルコシナトリウム塩溶液(Sigma))で1:1000に希釈した。ハイブリダイゼーションをハイブリダイゼーションチャンバーにおいて45℃で2時間、行った。次いで、チップを40℃の0.1X Ssarc緩衝液で5分間にわたって2回洗浄し、その後、DI水でリンスした。次いで、チップを共焦点顕微鏡で調べた。上記の方法を用いて一核酸塩基変異が特定されたことを示す結果を図6に示した。結果から、特異的な相補的PNA配列を含むマイクロアレイとのハイブリダイゼーションを用いた、特異的なDNA配列(一塩基配列変種の識別を含む)を特定する感度および特異性が実証された。

【0257】

#### 実施例4:PNA-DNAキメラの合成

##### パート1-PNA配列の合成

PNA-DNAキメラをアレイ表面に作製するために、まず、特定の部位にある望ましい配列のPNAオリゴを、実施例1に示したプロトコールに従ってチップ上に合成した。

【0258】

##### パート2-PNA-DNAキメラ合成工程

以下の通りに、アレイ上にある特定の場所で、配列特異的DNAヌクレオチドがPNA配列末端に付加される。PNA配列を含むウェーハが2000~4000rpm(好ましくは2500~3000rpm)で10~180秒間、好ましくは、60~120秒間にわたってフォトレジストでスピニングされ、遠紫外線スキャナーツールの中で、光マスクによって規定されるパターンに従って248nm紫外線に露光され、フォトレジスト中にある光活性カップリング溶液には光塩基発生剤が存在するので、紫外線に露光された場所には塩基が発生する。露光エネルギーは1mJ/cm<sup>2</sup>~100mJ/cm<sup>2</sup>(好ましくは30~60mJ/cm<sup>2</sup>)でもよい。

【0259】

UV露光後、ウェーハの表面はベークモジュールにおいてポストベークされる。ポストベーク温度は少なくとも60秒間(まれに180秒超)にわたって75℃~115℃でもよい。生じた塩基によって、露光された領域にあるPNA配列のアミノ基保護が脱保護される。次いで、フォトレジストは取り去られる。

【0260】

逆DNAアミダイトがホスホロアミダイト活性化溶液(例えば、テトラゾール触媒を含む)で活性化され、次いで、遊離アミンにカップリングされる。

【0261】

任意で、支持体上にある反応しなかったアミノ基が次のカップリング分子と反応しないようにするために、キャッピング溶液コートが表面に適用される。キャッピング溶液は、溶媒、ポリマー、およびカップリング分子を含む。キャッピング溶液は1500~3500rpmで少なくとも30秒間にわたってウェーハ上にスピニングされ、ベークモジュールの中で、1サイクルを完了するために55℃~95℃の温度で30秒~90秒間(好ましくは60秒間)にわたって反応される。次いで、カップリング工程で形成された亜リン酸トリエステルは、水およびピリジンの存在下でヨウ素酸化によって成し遂げられる安定型に変換される。

【0262】

##### パート3-逆DNAオリゴヌクレオチド合成

以下の通りに、アレイ上にある、それぞれのPNA-DNAキメラ末端において、場所特異的なDNA配列逆合成(5'→3')が行われる。前記のように、ウェーハが、2000~4000rpm(好ましくは2500~3000rpm)で10~180秒間(好ましくは、60~120秒間)にわたって、光塩基発生剤を含有するフォトレジスト組成物でスピニングされる。ウェーハおよびフォトレジストは、遠紫外線スキャナーツールの中で、光マスクによって規定されるパターンに従って248nm紫外線に露光され、光活性カップリング溶液には光酸発生剤が存在するので、紫外線に露光された場所には酸が発生する。露光エネルギーは1mJ/cm<sup>2</sup>~100mJ/cm<sup>2</sup>(好ましくは30~60mJ/cm<sup>2</sup>)でもよい。

【0263】

UV露光後、ウェーハの表面はベークモジュールにおいてポストベークされる。ポストベ

10

20

30

40

50

ーク温度は少なくとも60秒間(まれに180秒超)にわたって75 ~ 115 てもよい。生じた酸によって、露光された領域にあるDNA配列3'末端のヒドロキシル基保護が脱保護される。次いで、フォトレジストは取り去られる。

【0264】

逆DNAアミダイトがホスホロアミダイト活性化溶液(例えば、テトラゾール触媒を含む)で活性化され、次いで、遊離ヒドロキシル基にカップリングされる。

【0265】

任意で、支持体上にある反応しなかったアミノ基が次のカップリング分子と反応しないようにするために、キャッピング溶液コートが表面に適用される。キャッピング溶液は、溶媒、ポリマー、およびカップリング分子を含む。キャッピング溶液は1500~3500rpmで少なくとも30秒間にわたってウェーハ上にスピンコーティングされ、ベークモジュールの中で、1サイクルを完了するために55 ~ 95 の温度で30秒~90秒間(好ましくは60秒間)にわたって反応される。次いで、カップリング工程で形成された亜リン酸トリエステルは、水およびピリジンの存在下でヨウ素酸化によって成し遂げられる安定型に変換される。

【0266】

実施例5:PNA配列およびPNA-DNAキメラの収率

実施例3に記載したように、31mer長のPNA配列と3つのDNAオリゴマーAGCAATTTTGCATCTTTTAAAAGGGGTTTTC-(CGC) (SEQ ID NO: 6)

をウェーハ上に成長させ、以下で説明するようにフルオレセインに基づく工程収率検出プロセスを用いて、付加するたびに配列の工程収率を求めた。(CGC)は前記配列のDNAオリゴマー部分である。2当量のジソプロピルカルボジイミド(VWR)および2当量のヒドロキシベンゾトリアゾール(Hobt)(Anapsec)で活性化した2重量%のフルオレセインカルボン酸5(6)-FAM(Anaspec)を3000rpmで60秒間にわたってウェーハ上にスピンコーティングし、ベークモジュールの中で65 で5分間ベークした。DNAオリゴマーの収率を計算するために、6-FAMホスホロアミダイト(Jena Biosciences)を、アセトニトリルに溶解した2当量のベンジルチオ-テトラゾール(TCI)で活性化し、3000rpmで60秒間にわたってウェーハ上にスピンコーティングし、室温で5分間にわたって反応させた。次いで、ウェーハをエチレンジアミン(VWR)で10分間洗浄し、次いで、N-メチル-ピロリドン(NMP)で2分間洗浄し、次いで、IPAで40秒間洗浄し、遠心力で脱水した。次いで、蛍光をNikon A1R共焦点顕微鏡で測定して配列の収率を求めた。結果を表3に示した。表3の結果から、それぞれのタイプの付加について以下の平均工程収率:

- PNA配列の各層の工程収率=99.4%
- PNA-DNAキメラ工程の工程収率=97.4%
- DNAオリゴマーの工程収率=98.96%

が得られた。

【0267】

(表3)PNA-DNAキメラ配列の工程収率

長さ	フルオレセイン
	強度
1	65520.14
2	65146.6752
3	64716.70715
4	64088.95509

5	63954.36828	
6	63397.96528	
7	63328.22751	
8	63157.2413	
9	62689.87771	
10	62470.46314	
11	62276.80471	10
12	62027.69749	
13	61760.97839	
14	61155.7208	
15	60690.93732	
16	60508.86451	
17	60194.21842	
18	59821.01426	
19	59623.60491	20
20	59033.33123	
21	58584.67791	
22	58479.22549	
23	58315.48366	
24	57889.78063	
25	57542.44194	
26	57237.467	
27	56859.69972	30
28	56615.20301	
29	56162.28138	
30	55623.12348	
31	55361.6948	
32	53940.94592	
33	53382.72348	
34	52828.04075	40

## 【 0 2 6 8 】

実施例6: PNA-DNAキメラとオリゴヌクレオチドDNA配列とのハイブリダイゼーション  
およびポリメラーゼを用いた伸長

上記のプロトコールに従って合成したPNA-DNAキメラ配列の生物学的活性を確かめるために、34mer長のPNA-DNAキメラ配列

5'-GTGGAAATTTGACATAGTCTCAGATGCCTAT(TAT)-3' (SEQ ID NO: 7)

を実施例3に従って合成した。(TAT)はPNA-DNAキメラのDNAオリゴマー部分である。  
1個の追加ヌクレオチドを含むPNA-DNAキメラの配列に相補的な4種類のオリゴヌクレ



オチドDNA配列

S1: CACCTTTAAACTGTATCAGAGTCTACGGATAATAa (SEQ ID NO: 8)

S2: CACCTTTAAACTGTATCAGAGTCTACGGATAATAc (SEQ ID NO: 9)

S3: CACCTTTAAACTGTATCAGAGTCTACGGATAATAg (SEQ ID NO: 10)

S4: CACCTTTAAACTGTATCAGAGTCTACGGATAATAt (SEQ ID NO: 11)

を合成した(IDT)。

【0269】

プライマー伸長反応において正しい相補的ヌクレオチドが組み込まれることを検出するためにプライマー伸長反応を行った。Alexa 405 ddATP、Alexa 488 ddCTP、Alexa 555 ddGTP、Alexa 647 ddTTPを当業者に周知の技法によって合成した。4種類のチップそれぞれにおけるハイブリダイゼーションおよびポリメラーゼ伸長を以下の通りに行った。オリゴマーS1、S2、S3、およびS4を、1X DNA Polymerase Buffer(Clontech)、20nmolのMgCl<sub>2</sub>、1ユニットのTitanium Taq DNA Polymerase(Clontech)、および4種類全ての標識ddNTPで標識された単量体(それぞれ25pmole)で1:1000(100nM)に希釈した。ハイブリダイゼーションをハイブリダイゼーションチャンバーの中で、55℃で30分間にわたって行い、その後、チップを0.1X Ssarc緩衝液で、40℃で5分間にわたって2回洗浄し、その後、DI水でリンスした。次いで、チップを、ddNTPに使用した色素の4種類の波長を備えるNikon A1R共焦点顕微鏡で調べた。結果を表4に示した。

【0270】

(表4)PNA-DNAキメラ配列のハイブリダイゼーションおよび伸長

配列	405nm	488nm	561nm	640nm
S1(a)	950.02	875.54	1047.8	65124.23
S2(c)	1051.3	954.2	65531.25	875.6
S3(g)	800.3	65014.78	802.5	1068.9
S4(t)	65121.13	1012.98	946.6	780.9

【0271】

実施例7:PNA配列ハイブリダイゼーションを用いたジェノタイピング

ジェノタイピングSNPに基づく用途についてPNA合成を試験した。周知の変異であるC677TおよびA1298CのあるMTHFR領域のジェノタイピングを、20種類のDNA試料を用いて試験した。これらのDNA試料には、リアルタイムPCRを用いて確かめられた既知のジェノタイピング結果があった。

【0272】

PNA配列は以下の通りであった。

10

20

30

40

50

GGAGAAGGTGTCTGCGGGAG(C)CGATTTTCATCATCACGCAGC (SEQ ID NO: 12),

GGAGAAGGTGTCTGCGGGAG(T)CGATTTTCATCATCACGCAGC (SEQ ID NO: 13)

(SEQ2),

GGAGGAGCTGACCAGTGAAG(A)AAGTGTCTTTGAAGTCTTCG (SEQ ID NO: 14)

(SEQ3),

GGAGGAGCTGACCAGTGAAG(C)AAGTGTCTTTGAAGTCTTCG (SEQ ID NO: 15)

(SEQ4)

10

【 0 2 7 3 】

PNA配列を、上記で示した方法を用いてチップ上に合成した。SNPの場所を( )の領域に示し(括弧で囲み)、配列の中央に合成した。

【 0 2 7 4 】

当業者に公知の方法を用いて、試料(口腔スワブ(buccal swab))からDNAを抽出した。抽出したDNA試料に対して、フォワードプライマーおよびビオチン標識リバースプライマーを用いる標準的なPCR反応を行った。チップ上にあるPCR産物のハイブリダイゼーションを、ハイブリダイゼーション緩衝液0.1X Ssarc緩衝液、60mM塩化ナトリウム(Sigma)(80ul)、6mMクエン酸ナトリウム(Sigma)、0.72重量%N-ラウロイルザルコシンナトリウム塩溶液(Sigma)で希釈したPCR産物(20ul)を用いて行った。ハイブリダイゼーションをハイブリダイゼーションチャンバーの中で、55 で2時間にわたって行い、その後、チップを0.1X Ssarc緩衝液で、40 で5分間にわたって2回洗浄した。この後に、PBS緩衝液で希釈した1ng/ml Atto 488ストレプトアビジン(Rockland)とインキュベートし、チップをPBS緩衝液で2回洗浄し、DI水でリンスした。次いで、チップをNikon A1R共焦点顕微鏡で調べ、結果を表5および表6に図示した。

20

【 0 2 7 5 】

(表5) 677C T変異の結果(PNA)

試料ID	元々の結果	SEQ ID NO: 12 (C)	SEQ ID NO: 13 (T)	比 (C/T)	計算された結果
MT1	ホモ接合性 野生型C/C	65521.21	18343.16	3.571969606	ホモ接合性 野生型C/C

30

40

50

MT2	ホモ接合性 野生型C/C	65227.42	17390.41	3.750769533	ホモ接合性 野生型C/C
MT3	ホモ接合性 野生型C/C	65093.45	18262.83	3.564258661	ホモ接合性 野生型C/C
MT4	ホモ接合性 野生型C/C	65386.72	16498.11	3.963285491	ホモ接合性 野生型C/C
MT5	ホモ接合性 野生型C/C	65245.82	17957.35	3.633376862	ホモ接合性 野生型C/C
MT6	ホモ接合性 野生型C/C	65399.12	15087.35	4.334698937	ホモ接合性 野生型C/C
MT7	ホモ接合性 野生型C/C	65408.94	16166.17	4.046038115	ホモ接合性 野生型C/C
MT8	ヘテロ接合性 C/T	32656.73	29003.56	1.125955917	ヘテロ接合性 C/T
MT9	ヘテロ接合性 C/T	31140.4	28860.93	1.078981169	ヘテロ接合性 C/T
MT10	ヘテロ接合性 C/T	30317.09	27075.3	1.119732376	ヘテロ接合性 C/T
MT11	ヘテロ接合性 C/T	29953.05	30101.53	0.99506736	ヘテロ接合性 C/T
MT12	ヘテロ接合性 C/T	34884.62	32957.31	1.058478984	ヘテロ接合性 C/T
MT13	ヘテロ接合性 C/T	28468.43	30134.87	0.944700608	ヘテロ接合性 C/T
MT14	ヘテロ接合性 C/T	29909.26	26689.12	1.12065366	ヘテロ接合性 C/T
MT15	ホモ接合性 変異体T/T	16202.94	65103.75	0.248878751	ホモ接合性 変異体T/T
MT16	ホモ接合性 変異体T/T	16759.95	65465.38	0.256012415	ホモ接合性 変異体T/T

10

20

30

40

50

MT17	ホモ接合性 変異体 T/T	18019.34	65327.52	0.275830768	ホモ接合性 変異体 T/T
MT18	ホモ接合性 変異体 T/T	15153.13	65116.35	0.232708529	ホモ接合性 変異体 T/T
MT19	ホモ接合性 変異体 T/T	16837.25	65198.8	0.258244784	ホモ接合性 変異体 T/T
MT20	ホモ接合性 変異体 T/T	16315.66	65431.64	0.249354288	ホモ接合性 変異体 T/T
テンプレート なし	テンプレートなし 対照	931.04	1010.87		テンプレートなし 対照

10

【 0 2 7 6 】

(表 6) 1298A C変異の結果(PNA)

試料ID	元々の 結果	SEQ ID NO: 14 (A)	SEQ ID NO: 15 (C)	比 (A/C)	計算された 結果
MT1	ホモ接合性 野生型 A/A	65379.46	18466.16	3.540501111	ホモ接合性 野生型 C/C
MT2	ホモ接合性 野生型 A/A	65471.94	15279.46	4.284964259	ホモ接合性 野生型 C/C
MT3	ホモ接合性 野生型 A/A	65031.65	16581.28	3.92199215	ホモ接合性 野生型 C/C
MT4	ホモ接合性 野生型 A/A	65219.55	17032.97	3.829018075	ホモ接合性 野生型 C/C
MT5	ホモ接合性 野生型 A/A	65122.87	15781.57	4.126514029	ホモ接合性 野生型 C/C
MT6	ホモ接合性 野生型 A/A	65211.42	16471.62	3.959016782	ホモ接合性 野生型 C/C
MT7	ホモ接合性 野生型 A/A	65284.01	16098.4	4.055310466	ホモ接合性 野生型 C/C
MT8	ヘテロ接合性 A/C	25864.99	26219.09	0.986494573	ヘテロ接合性 C/T

20

30

40

50

MT9	ヘテロ接合性 A/C	27535.6	33971.8	0.810542862	ヘテロ接合性 C/T
MT10	ヘテロ接合性 A/C	29798.31	25928.75	1.149238201	ヘテロ接合性 C/T
MT11	ヘテロ接合性 A/C	31306.14	30412.04	1.02939954	ヘテロ接合性 C/T
MT12	ヘテロ接合性 A/C	34735.37	26137.17	1.328964459	ヘテロ接合性 C/T
MT13	ヘテロ接合性 A/C	34293.84	32393	1.058680579	ヘテロ接合性 C/T
MT14	ヘテロ接合性 A/C	34029.48	29563.14	1.151077998	ヘテロ接合性 C/T
MT15	ホモ接合性 変異体C/C	17863.25	65072.67	0.274512326	ホモ接合性 変異体 T/T
MT16	ホモ接合性 変異体C/C	15361.46	65400.42	0.234883201	ホモ接合性 変異体 T/T
MT17	ホモ接合性 変異体C/C	16092.89	65285.28	0.246501049	ホモ接合性 変異体 T/T
MT18	ホモ接合性 変異体C/C	16038.93	65184.73	0.246053485	ホモ接合性 変異体 T/T
MT19	ホモ接合性 変異体C/C	16752.2	65398.01	0.256157641	ホモ接合性 変異体 T/T
MT20	ホモ接合性 変異体C/C	16298.91	65253.44	0.249778556	ホモ接合性 変異体 T/T
テンプレート なし	テンプレートなし 対照	931.04	1010.87		テンプレートなし 対照

10

20

30

40

## 【 0 2 7 7 】

この方法では、SNPの場所は、理想的には、合成した配列の中心の近くにある。

## 【 0 2 7 8 】

## 実施例8: PNA-DNAキメラおよびプライマー伸長を用いたジェノタイピング

ジェノタイピングSNPに基づく用途についてPNA-DNAキメラを試験した。20種類のDNA試料を用いて、周知の変異であるC677TおよびA1298CのあるMTHFR領域のジェノタイピングを試験した。これらのDNA試料には、リアルタイムPCRを用いて確かめられた既知のジェノタイピング結果があった。上記で示した方法に従って、677C T変異については34mer長のPNA-DNAキメラプライマー配列

50

5'-CTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG(GAG)-3' (SEQ ID NO: 16)

、および、1298A C変異については、

CTGAAGATGTGGGGGGAGGAGCTGACCAGTG(AAG)-3' (SEQ ID NO: 17)

を、合成した(PNA-DNAキメラのDNAヌクレオチド部分を括弧で囲んだ)。

【0279】

当業者に公知の方法を用いて、試料(口腔スワブ)からDNAを抽出した。抽出したDNA試料に対して、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いる標準的なPCR反応を行った。それぞれのチップでのハイブリダイゼーションおよびポリメラーゼ伸長を以下の通りに行った。PCR産物を、1X DNA Polymerase Buffer(Clontech)、20nmolのMgCl<sub>2</sub>、1ユニットのTitanium Taq DNA Polymerase(Clontech)、および4種類全ての標識ddNTPで標識された単量体(それぞれ25pmol)に溶解して混合した。ハイブリダイゼーションをハイブリダイゼーションチャンバーの中で、55℃で30分間にわたって行い、その後、チップを0.1X Ssarc緩衝液で、40℃で5分間にわたって2回洗浄し、その後、DI水で洗浄した。次いで、チップを、ddNTPに使用した色素の4種類の波長を備えるNikon A1R共焦点顕微鏡で調べ、結果を表7および表8に図示した。

【0280】

(表7)677C T変異の結果(PNA-DNAキメラ)

試料ID	元々の結果	405nm (A)	488nm (C)	561 nm (G)	640 nm (T)	比 (C/T)	計算された結果
MT1	ホモ接合性 野生型C/C	987.88	65381.38	1068.03	1022.91	63.9170406	ホモ接合性 野生型C/C
MT2	ホモ接合性 野生型C/C	1079.22	65379.69	1003.71	1088.7	60.0529898	ホモ接合性 野生型C/C
MT3	ホモ接合性 野生型C/C	890.15	65426.33	1054.07	984.99	66.4233444	ホモ接合性 野生型C/C

10

20

30

40

50

MT4	ホモ接合性 野生型C/C	1019.28	65082.83	1072.37	1005.67	64.7158909	ホモ接合性 野生型C/C
MT5	ホモ接合性 野生型C/C	1054.92	65520.82	885.87	919.46	71.26010919	ホモ接合性 野生型C/C
MT6	ホモ接合性 野生型C/C	856.58	65086.76	1063	1081.46	60.18415845	ホモ接合性 野生型C/C
MT7	ホモ接合性 野生型C/C	1014.84	65048.37	1012.61	1020.77	63.72480578	ホモ接合性 野生型C/C
MT8	ヘテロ接合性 C/T	1086.58	28940.21	916.77	25640.7	1.128682524	ヘテロ接合性 C/T
MT9	ヘテロ接合性 C/T	1045.85	34602.61	903.71	33874.1	1.021506402	ヘテロ接合性 C/T
MT10	ヘテロ接合性 C/T	920.14	30597.21	1085.44	32891.41	0.930249266	ヘテロ接合性 C/T
MT11	ヘテロ接合性 C/T	1065.78	26105.81	883.95	25875.75	1.00889095	ヘテロ接合性 C/T
MT12	ヘテロ接合性 C/T	1087.05	28716.64	1028.78	30765.41	0.933406706	ヘテロ接合性 C/T
MT13	ヘテロ接合性 C/T	1096.23	30296.19	1097.06	29260.09	1.035410007	ヘテロ接合性 C/T
MT14	ヘテロ接合性 C/T	999.32	31152.26	1083.28	28772.12	1.082723831	ヘテロ接合性 C/T
MT15	ホモ接合性 変異体 T/T	959.46	920.49	983.83	65264.85	0.014103917	ホモ接合性 変異体 T/T
MT16	ホモ接合性 変異体 T/T	999.03	1017.52	1098.91	65228.95	0.015599209	ホモ接合性 変異体 T/T
MT17	ホモ接合性 変異体 T/T	908.97	1031.03	1083.42	65170.19	0.015820577	ホモ接合性 変異体 T/T
MT18	ホモ接合性 変異体 T/T	1053.12	1000.45	961.54	65066.09	0.015375905	ホモ接合性 変異体 T/T

10

20

30

40

50

MT19	ホモ接合性 変異体 T/T	1070.32	1075.46	1009.19	65326.99	0.016462721	ホモ接合性 変異体 T/T
MT20	ホモ接合性 変異体 T/T	1059.73	915.48	854.63	65287.66	0.014022252	ホモ接合性 変異体 T/T
テンプレート なし	テンプレートなし 対照	1005.16	931.04	1018.61	1010.87		テンプレートなし 対照

10

## 【 0 2 8 1 】

(表 8) 1298A C変異の結果(PNA-DNAキメラ)

試料ID	元々の 結果	405nm (A)	488nm (C)	561 nm (G)	640 nm (T)	比 (A/C)	計算された 結果
MT1	ホモ接合性 野生型 A/A	65488.6	860.42	898.56	1053.57	76.11236373	ホモ接合性 野生型 A/A
MT2	ホモ接合性 野生型 A/A	65344.12	942.87	1005.5	859.47	69.30342465	ホモ接合性 野生型 A/A
MT3	ホモ接合性 野生型 A/A	65439.64	943	1040.81	1048.08	69.39516437	ホモ接合性 野生型 A/A
MT4	ホモ接合性 野生型 A/A	65352.13	1015.9	850.32	978.43	64.32929422	ホモ接合性 野生型 A/A
MT5	ホモ接合性 野生型 A/A	65258.17	1047.97	999.32	858.43	62.27102875	ホモ接合性 野生型 A/A
MT6	ホモ接合性 野生型 A/A	65327.7	871.43	984.33	971.42	74.96609022	ホモ接合性 野生型 A/A
MT7	ホモ接合性 野生型 A/A	65222.79	1032.19	1093.43	894.49	63.18874432	ホモ接合性 野生型 A/A
MT8	ヘテロ接合性 A/C	32437.6	29322.89	851.72	897.02	1.106221113	ヘテロ接合性 A/C
MT9	ヘテロ接合性 A/C	28901.78	32234.2	972.78	930.13	0.896618498	ヘテロ接合性 A/C
MT10	ヘテロ接合性 A/C	31930.24	34009.27	902.33	1072.67	0.938868726	ヘテロ接合性 A/C
MT11	ヘテロ接合性 A/C	31187.77	33959.45	1066.13	858.62	0.918382659	ヘテロ接合性 A/C

20

30

40

50



MT12	ヘテロ接合性 A/C	35160.88	34129.73	1085.9	978.16	1.030212662	ヘテロ接合性 A/C	10
MT13	ヘテロ接合性 A/C	26032.4	34987.94	980.73	1047.35	0.744039232	ヘテロ接合性 A/C	
MT14	ヘテロ接合性 A/C	32902.79	33518.34	1024.53	998.06	0.981635427	ヘテロ接合性 A/C	
MT15	ホモ接合性 変異体 C/C	853.23	65405.7	866.06	1096.1	0.013045193	ホモ接合性 変異体 C/C	
MT16	ホモ接合性 変異体 C/C	861.56	65469.41	1045.55	1093.83	0.013159734	ホモ接合性 変異体 C/C	
MT17	ホモ接合性 変異体 C/C	948.8	65335.08	1094.53	1025.03	0.014522061	ホモ接合性 変異体 C/C	
MT18	ホモ接合性 変異体 C/C	853.16	65190.22	964.72	901.27	0.013087239	ホモ接合性 変異体 C/C	20
MT19	ホモ接合性 変異体 C/C	1014.49	65003.94	1015.66	922.79	0.015606592	ホモ接合性 変異体 C/C	
MT20	ホモ接合性 変異体 C/C	926.32	65437.85	945.85	1063.8	0.014155722	ホモ接合性 変異体 C/C	
テンプレート なし	テンプレートなし 対照	1043.98	1043.85	986.73	1073.34		テンプレートなし 対照	30

## 【 0 2 8 2 】

この方法では、チップ上に合成した配列はSNP場所のすぐ前の領域を含み、それによって、ポリメラーゼは、SNPの身元に対応するマッチするオリゴマーを選択的に付加することができる。

## 【 0 2 8 3 】

PNA-DNAキメラはDNA配列にハイブリダイズし、対応するマッチDNA単量体に応じて正確に伸長することができた。PNA-DNAキメラは、SNPに基づいたジェノタイピング結果を正確に突き止める高いマッチ/ミスマッチ比を得ることができる。マッチ/ミスマッチ配列の比はPNA配列の場合は3.5~4であるのに対して、PNA-DNAキメラ配列の場合は65~70である。従って、配列の収率が高く、かつDNAオリゴマーが存在するためにチップ上でポリメラーゼ伸長工程を行う能力があるPNA-DNAキメラは、SNPに基づくジェノタイピングおよびDNA配列決定を含むが、これに限定されない様々なゲノミクス用途のための、高精度ハイスループットシステムを提供する。

10

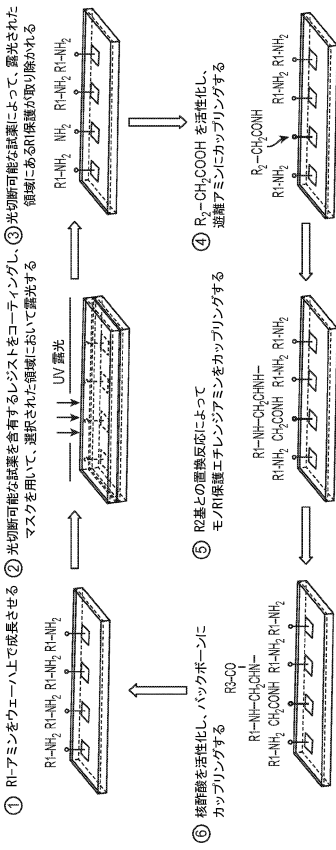
20

30

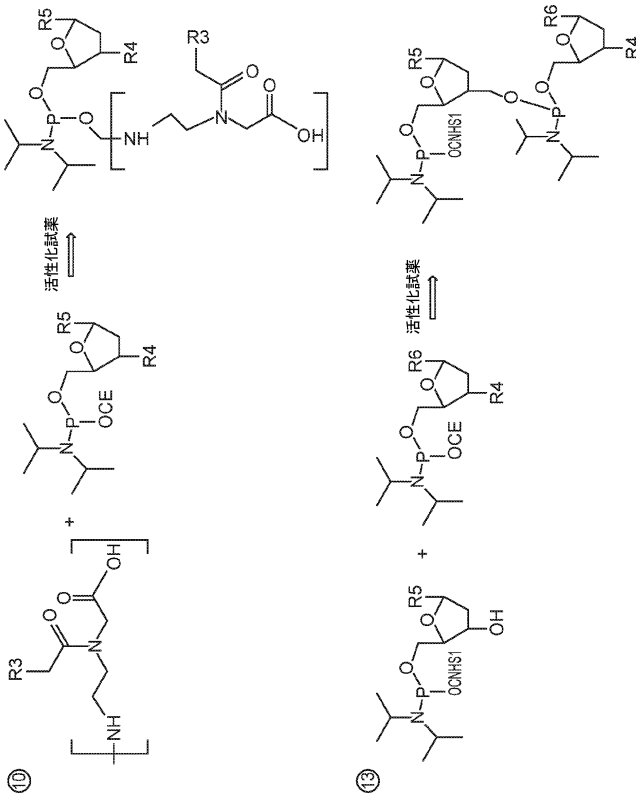
40

50

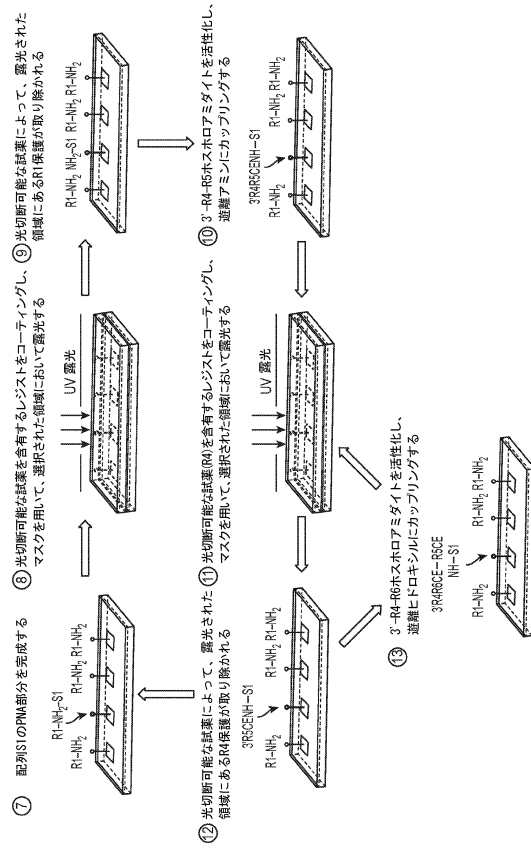
【図面】  
【図1】



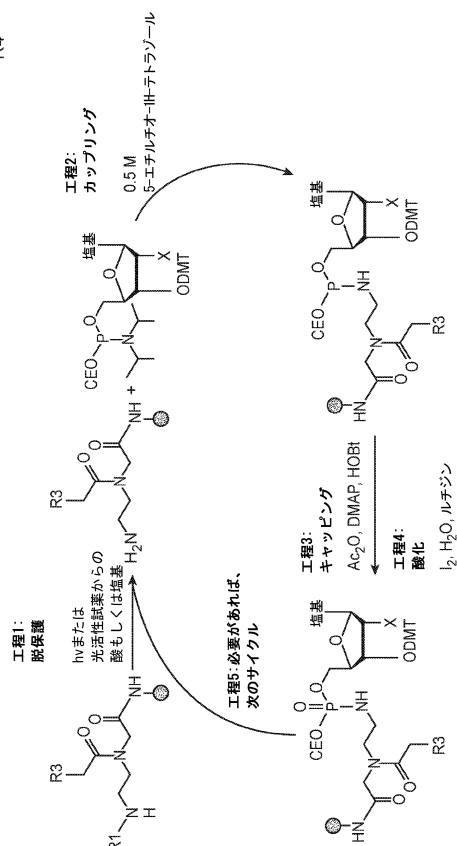
【図2B】



【図2A】

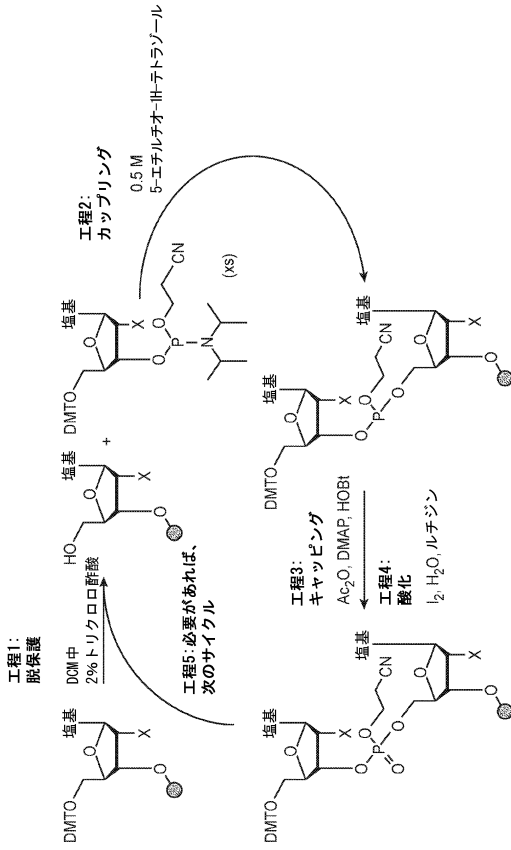


【図3】

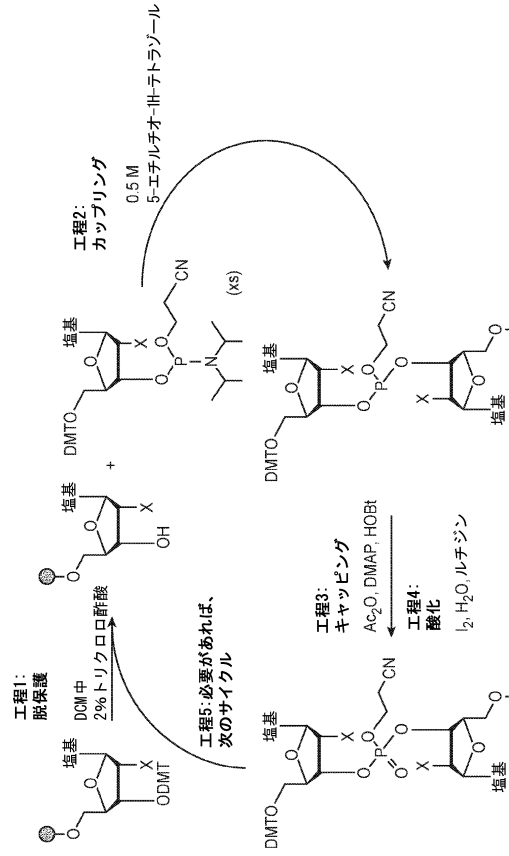


式中、⑩は前の配列(ウエーハ)に共有結合により取り付けられたものを表す  
Xは水素またはH、Pgを基、式中、Pは保護基である  
塩基は、必要があれば、N-Pgであるか、またはNで保護された窒素塩基を表す

【 図 4 】



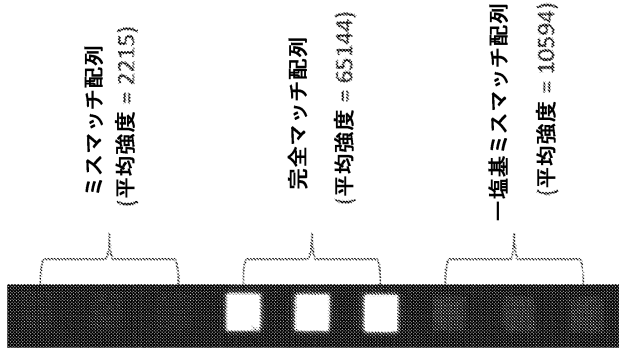
【 図 5 】



10

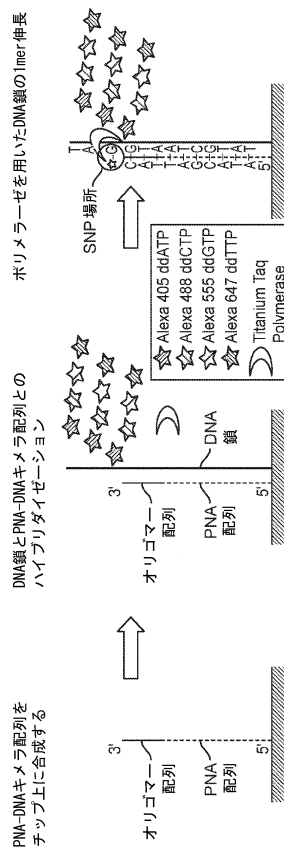
20

【 図 6 】



30

【 図 7 】



40

50

【配列表】

2022061994000001.app

10

20

30

40

50

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和 4 年 2 月 2 日 ( 2 0 2 2 . 2 . 2 )

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

本願明細書に記載された発明。

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

弁理士 井上 隆一  
(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
(72)発明者 ラジャセカラン ジョン ジェイ .  
アメリカ合衆国 9 4 0 7 0 カリフォルニア州 サン カルロス ハワード アベニュー 1 0 2 1  
ヴィブラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー内