

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07H 1/08

(11) 공개번호 특2001-0032074
(43) 공개일자 2001년04월16일

(21) 출원번호	10-2000-7005197	(87) 국제공개번호	W0 99/25724
(22) 출원일자	2000년05월13일	(87) 국제공개일자	1999년05월27일
번역문제출일자	2000년05월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 98/23756		
(86) 국제출원출원일자	1998년11월10일		
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그레나다 그루지야 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아 짐바브웨		
(30) 우선권주장	8/970,115 1997년11월13일 미국(US)		
(71) 출원인	프로토진 러보러터리즈, 인코퍼레이티드 추후제출		
(72) 발명자	미국 캘리포니아주 (우편번호: 94025) 멘로 파크 컨스티튜션 드라이브 303 브레넨토머스옴. 미국캘리포니아주(우편번호:94109)샌프란시스코브로드웨이#15051998 프라우엔도르프알브레흐트더블유.		
(74) 대리인	미국캘리포니아주(우편번호:94587)유니온시티클로버34708 김명신		

심사청구 : 없음

(54) **끓는점이 높은 용매를 사용하여 올리고뉴클레오타이드를합성하는 방법**

요약

본 발명은 개방 환경의 고체 받침판 표면상에서 소단위체로 이루어진 분자의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 동안 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 본 발명은 반응성 화학성분으로 기능화된 적어도 하나의 결합 사이트를 포함하는 개방 고체 받침판 표면을 설치하는 단계, 및 실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액을 상기 받침판 표면상으로 주입하고, 상기 결합 사이트와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 액체 시약 용액은 상기 고체 받침판상에서의 합성 동안 반응 상당히 높은 반응 수율을 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 상당히 감소시키기를 특징으로 한다.

대표도

도1

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 받침판 표면상에서 끓는점이 높은 유기 용매를 사용하는 화학반응에 관한 것이고, 특히 받침판 표면상에서 공간적으로 분리되어 있는 작고, 개방된 각각의 반응 사이트에서의 고체상 합성에 관한 것이다.

배경기술

DNA, RNA 및 펩티드 단편의 서열을 측정하는 것은 진단시약, 법의학, 분자생물학 연구 및 약물 유전학의 발달에 지대한 역할을 해왔다. 그러나, 최근 관심사는 서열 자체를 측정하는 것에서 생화학 경로 및 병의 상태에 있어서 서열의 기능을 측정하는 것으로 바뀌고 있다. 대부분의 생화학 경로에 대한 유전적 영향은 처음 생각, 일반적으로 관여하는 다수의 유전자, 유전자내 다수의 돌연변이 및 복잡한 상호작용보다 더 복잡하기 때문에, 다수개의 DNA 서열 에세이를 동시에 실시하는 향상된 생산성에 대한 필요성이 대두되었다.

많은 유사한 측정을 동시에 달성할 수 있는 한가지 방법은 다수의 DNA, RNA 또는 펩티드 프로브 에세이를 복잡한 생물학적 샘플에 의해 동시에 프로브화될 수 있는 마이크로어레이(microarray)상으로 레이아웃하는 것이다. 상기 어레이내 각각의 프로브는 예를 들어 미지의 샘플내 DNA 또는 RNA과의 하이브리드(특정된 결합)를 형성하거나 또는 형성하지 않음으로써 샘플내 서열이 존재하는지 또는 존재하지 않는지에 대한 정보를 제공한다.

일반적으로, 이러한 형태의 에세이는 특정 핵산 서열, 대개 DNA 또는 RNA 서열 존재하는지에 대해 테스트하는데, 그외 다른 특정 결합 에세이도 가능하다. 당 기술분야에 잘 알려진 바와 같이, 이는 관심있는 예정된 특정 서열과 합성된 올리고뉴클레오티드를 이용함으로써 성취된다. 일반적으로, 상기 특정 서열은 게놈 또는 돌연변이 데이터베이스, 또는 공지되거나 추정된 유전자 또는 서열에 대한 상동성에 대한 조사 또는 목록화된 상기 서열의 돌연변이에 기초한다. 많은 서열들이 존재하는지 또는 존재하지 않는지는 완전하게 또는 엄밀하게 부합되는 서열만이 결합되도록 하는 조건하에서 하이브리드를 형성함으로써 동시에 확인할 수 있다.

동시의 마이크로어레이 분석에 의해 실시되는 중요한 다수의 에세이에 대한 예는 많이 있다. 질병 진단에 있어서 생산성을 향상시키기 위해서, 각각이 가령 낭성섬유증을 일으키는 것으로 알려진 돌연변이에 대응하는 500개의 다른 프로브는 원인이 되는 돌연변이 중 어떤 것이 존재한다면 이 돌연변이를 나타내는 어레이의 특징이 형광성으로 되도록 환자의 DNA와 하이브리드를 형성한 어레이가 제조될 수 있다. 또 다른 유용한 예에 있어서, 기능이 알려지지 않은 많은 유전자에 대응하는 DNA 서열이 마이크로어레이로 형성될 수 있다. 정상 조직 샘플 및 병결린 조직 샘플 모두로부터 제조된 메신저 RNA는 동시에 많은 다른 유전자에 대응하는 많은 다른 서열상에서 프로브 하이브리드형성의 강도 차이를 측정함으로써 비교 가능하다. 정상 조직에 비해 병결린 조직에서 다르게 하이브리드된 유전자는 병의 경로에 관련되고, 기능의 원인이 된다. 부가적으로, 분자 생물학 및 약학적 발견에 있어서 많은 예가 있는데, 여기서 질병 상태의 중요한 특성, 가령 항생제에 대한 내성, 가혹정도(severity) 등에 대한 유전자형 지시를 측정하기 위해서 다수의 DNA 서열의 존재 또는 부재가 분석될 필요가 있다.

최종적으로, 약물/수용체 상호작용이 후보약물(가령, 작은 유기분자) 또는 생물학적 수용체를 마이크로어레이 표면에 묶고, 상기 약물 및 수용체가 마이크로어레이 표면에 결합하는 정도를 관찰함으로써 측정될 수 있는 많은 용도가 있다.

또한, 마이크로어레이에 대한 관련되지만 특이한 다수의 화학적 특징을 만들 필요가 종종 있다. 또한, 묶여있는 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드 어레이의 합성은 당 기술분야에 통상적으로 공지되어 있다. T-백 방법(T-bag method) 또는 디스크 디자인으로 알려진 유사한 합성에 접근하기 위한 한가지 방법에 있어서, 고체 받침판 비드의 각 패킷 또는 디스크의 어레이는 선택된 아미다이트로 처리하기 위해서 4개의 아미다이트 서브셋으로 물리적으로 분류된다. 각 비드 패킷을 일반적인 시약을 처리한 후, 상기 패킷은 이후의 합성 사이클을 위해 4개의 서브셋으로 다시 재분류하여야 한다. 큰 올리고뉴클레오티드 어레이를 제조하는데 있어서 상기 분류 및 재분류는 너무 고되고, 노동 집약적이다.

받침판에 결합된 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 또 다른 어레이 접근으로는 서던(Southern)외 다수, 미국특허 제5,436,327호가 있는데, 이 합성은 2개의 유리판 사이의 아주 좁은 갭(gap)에서 실시된다. 이 기술은 다수의 다른 시약이 유리 표면에 특정 사이트에 정확하게 사용되어야 하기 때문에 실제로 비실용적이고, 성가신 작업일 뿐만 아니라, 이 접근으로는 올리고뉴클레오티드를 연속적으로 합성할 수 없다. 더우기, 서던은 포스포라미다이트 합성용 표준 시약을 사용하기 때문에, 이 기술은 휘발성이 높은 용매(가령, 아세트니트릴 및 디클로로메탄을 예로 들 수 있는데, 이는 이후에 보다 자세하게 기술된다.)의 빠른 증발을 방지하기 위해서 밀폐된 환경하에서 실시되어야 한다.

개방된 고체 받침판 표면상에서 올리고뉴클레오티드의 어레이를 합성하기 위한 한가지 바람직한 접근은 브레넨(Brennan)이 미국특허 제5,474,796호에서 개시하고 있는데, 이는 드롭-온-디맨드(drop-on-demand) 잉크젯 장치를 통해 특정 시약의 운반을 조절한다. 브레넨은 압전기 펌프에 의해 매우 미소량의 화학반응물 용액이 받침판 표면상의 기능화된 결합 사이트에 첨가되는 받침판 표면상에서 다수의 화학반응을 유도하는 일반적인 방법을 제시한다. 기능성 결합 사이트는 표면장력이 다른 기능화되지 않은 코팅물질을 사용함으로써 각각으로부터 분리되어 있다.

브레넨은 이 개방된 표면 방법을 일반적인 화학적 합성에 적용할 수 있도록 하기 위해서 이 시스템과 함께 사용될 수 있는 용매의 특성에 대해서는 특정하고 있지 않은 반면에, 실제로 대부분의 화학반응은 아세트니트릴 또는 디클로로메탄과 같은 휘발성이 높고, 끓는점이 낮은 용매에서 실시된다. 개방 합성 장치내에서 이루어지는 이러한 종래의 용매를 사용하는 것의 한가지 문제점은 송액된 드롭(drop)이 너무 작은 경우 용매가 매우 빨리 증발하는 경향이 있다는 것이다. 이는 브레넨에서 사용된 압전기 송액펌프

장치를 사용하는 경우 특히 그러한데, 왜냐하면 송액된 드롭의 양이 일반적으로 약 20피코리터 내지 2마이크로리터이기 때문이다. 이러한 미소한 크기의 범위에서는 드롭의 전체 부피비에 대한 증기압 및 표면적이 너무 높아서 이러한 표준 고수율 DNA 합성 용매가 완전히 반응하기 전에 증발해버린다.

증발속도는 드롭 표면적에 관한 함수이며, $1/R^2$ (여기서, R은 드롭의 반지름이다)에 관한 함수인데, 즉 드롭이 작으면 작을수록 증발속도는 더 빠르다. 23°C에서, 100 마이크로미터의 아세토니트릴(ACN) 드롭은 1cm가 이동되기 전에 증발되어 날아간다. 일단 용매가 증발되면, 아미다이트 커플링 반응은 중지되고, 두꺼운 점착성 또는 결정질 잔류물만이 남게 된다.

CPG(controlled pore glass)상에서의 종래의 고체상 올리고뉴클레오타이드 합성에 있어서, 예를 들어 테트라졸 활성, 디메톡시트리틸 보호 뉴클레오타이드 포스포르아미다이트 커플링 단계를 위한 바람직한 용매는 아세토니트릴이다. 이 용매는 포스포르아미다이트 커플링을 위한 다른 일반적인 용매 형태, 가령 테트라히드로푸란, 디메톡시에탄 및 니트로메탄보다 훨씬 더 우수하다. 아세토니트릴은 높은(> 99%) 수율의 커플링을 촉진하기 위해서 산도, 점성도, 유전상수 용해도 및 그외 특성들이 이상적으로 조합되어 있다. 97% 이하의 단계적 커플링 수율은 쓸모없는 절단되거나 삭제된 생성물의 혼합물을 생성한다.

아세토니트릴(ACN)은 유감스럽게도 끓는점(81°C)이 다소 낮고, 받침판 표면상의 드롭은 개방 시스템에서 매우 빨리 증발된다. DNA 합성을 위한 상기에 제시되어 있는 일반적으로 사용되는 기타 용매(즉, 테트라히드로푸란, 디메톡시에탄 및 니트로메탄)도 아세토니트릴과 유사한 끓는점 및 증발속도를 갖는다. 따라서, 이러한 용매는 개방 합성 시스템에서도 매우 빨리 증발하는 경향이 있다.

한가지 해결책은 보다 큰 직경의 반응 사이트를 위해 부피를 더 크게 확장시키기 위해서 더 빨리 일련의 시약 드롭을 송액하는 것이다. 그러나, 이 기술은 약 500 마이크로미터 이하의 직경에 대해서는 효과가 없으며, 500 마이크로미터 이상의 직경은 많은 어레이 접근시 너무 크다. 더우기, 용매 및 반응 표면의 온도를 낮춤으로써 증발속도를 느리게 할 수 있지만, 이 경우 커플링 반응속도가 매우 감소될 수 있다. 결국, 드롭의 증발속도는 ACN에 의한 헤드 스페이스 증기의 포화 또는 상대습도를 증가시킴으로써 느리게 할 수 있다. 그러나, 실제로 안정한 ACN 습도 조절은 달성하기 어렵고, 상기 합성 장치는 클라우드용기(cloud chamber)로 작용하는 경향이 있다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명의 목적은 시약 용매의 미소량 송액시 증발을 상당히 감소시킬 수 있는 개방 표면상에서 물질을 합성하기 위한 조성물 및 그 합성방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 반응 수율을 상당히 높게 유지하는 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 종래의 드롭-온-디맨드 송액 어셈블리를 통해 송액되는 시약 용액 조성물 및 그 송액방법을 제공한다.

상기 목적에 따라서, 본 발명은 개방 환경 고체 받침판 표면상에서 소단위체로 이루어진 분자의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 동안 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (A)반응성 화학성분으로 기능화된 적어도 하나의 결합 사이트를 포함하는 개방 고체 받침판 표면을 설치하는 단계, (B)실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액을 받침판 표면상으로 주입하고, 상기 결합 사이트와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 시약 용액은 이 시약용 표준 유기 용매와 비교해서 상대적으로 끓는점이 높은 적어도 하나의 용매에 함유된 반응물을 포함한다. 상기와 같은 끓는점이 높은 용매는 고체 받침판상에서의 합성동안 상당히 높은 반응 수율을 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 감소시킨다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 어레이 기능화 결합 사이트를 포함하는 실질적으로 평면 개방 고체 받침판 표면을 설치하는 단계를 포함하는 개방 표면상에서 물질의 어레이를 합성하는 방법이 제공된다. 각 결합 사이트는 비반응성 소수성 물질의 표면장력 장벽에 의해 분리된다. 다음 단계는 실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액을 각각의 결합 사이트에 고정된 분자의 적어도 하나의 소단위체와 접촉시키기 위한 기능화된 각 결합 사이트에서 받침판 표면상에 주입하는 것을 포함한다. 각 시약 용액은 끓는점이 적어도 약 140°C인 극성 비양성자성 용매에 포함된 뉴클레오시드 시약을 함유한다. 높은 끓는점으로 인해, 분자가 증대되는 동안 개방 환경에서 미소량의 시약 용액의 증발은 상당히 감소된다. 더우기, 실질적으로 높은 커플링 수율이 유지된다.

주입단계는 시약 용액의 드롭-온-디맨드 송액을 이용하여 실시된다. 상기 송액은 송액량이 약 20피코리터 내지 약 2마이크로리터로 정확하게 조절되기만 한다면 종래의 밸브 송액장치 또는 압전기 펌프장치를 통해 제공될 수 있다. 더우기, 주입단계는 포스포르아미다이트 방법에 의해 각각의 결합 사이트에서 불연속적이고 단계적인 중합체 합성에 의해 더 실시될 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 뉴클레오시드 시약 용액은 상대적으로 미소량으로 올리고뉴클레오타이드 합성에 제공된다. 시약 용액에는 뉴클레오타이드 시약 및 끓는점이 적어도 약 140°C인 극성 유기 비양성자성 용매가 포함된다. 소량이 송액되는 경우, 올리고뉴클레오타이드가 증대되는 동안 개방 환경내 시약 용액의 증발은 상당히 감소되지만, 반면에 커플링 수율은 상당히 높게 유지된다.

이러한 비양성자성 용매는 유기물이 바람직하며, 디니트릴, 글라임(glyme), 디글라임, 트리글라임, 디메틸포름아미드(DMF), 헥사메틸포스포트리아미드(HMPA) 및 트리메틸포스페이트 그룹으로부터 선택된다. 이 그룹은 바람직하게 아세토니트릴 용액의 산도 특성과 유사한 산도 특성을 포함한다. 보다 명확하게 말하자면, 디니트릴 그룹은 본질적으로 말로노니트릴, 숙시노니트릴, 글루타로니트릴 및 아디포니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택된다. 그러나, 상기 극성 유기 비양성자성 용매는 발레로니트릴 및 카프로니트릴과 같은 모노니트릴 그룹으로부터 선택될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 어셈블리의 장점에 대한 다른 목적 및 특징은 첨부되는 도면을 참고로 하여 하기 본 발명을 실시하기 위한 최적방법 및 청구의 범위로부터 보다 쉽고 명백하게 될 것이다.

도 1은 본 발명의 시약 용액을 받침판 표면의 기능화된 결합 사이트의 어레이로 주입하는 합성 장치의 상부 사시도,

도 2a 및 도 2b는 도트-간격 인터페이스에서 표면장력 장벽 효과를 도시하는 기능화된 결합 사이트 및 받침판 표면의 확대 측면도이다.

발명을 실시하기 위한 최적방법

제한되지 않는 하기 구체예를 참고로 하여 본 발명을 보다 상세히 기술한다. 당업자라면 본 발명을 다양하게 변형시킴으로써 첨부되는 청구의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않는 바람직한 구체예를 작성할 수 있다. 더 잘 이해하기 위해서 비슷한 성분은 여러 개의 숫자를 사용하여 비슷한 참고 숫자로 지정된다는 것을 숙지해야 할 것이다.

본 발명은 서열이 정의된 올리고뉴클레오타이드를 증대시키기 위해 특히 적당하며, 본 발명의 방법 및 조성물은 소단위체로 이루어진 분자의 합성, 특히 서열 추가 합성에 사용될 수 있다. 그러므로, "서열 단위" 또는 "소단위체"라는 용어는 보다 복잡한 분자, 가령 올리고뉴클레오타이드 및 펩티드 사슬을 형성하기 위한 동일하거나 상이한 종류의 다른 성분에 결합하는 성분으로 정의된다. "개방 환경"이라는 용어는 휘발성 용매의 증발을 조절하기 위해서 밀폐되거나 증기로 포화된 시스템에 속하지 않는 환경으로 정의된다.

이제, 소단위체 또는 서열 단위를 액체 시약 용액(12)내 개방 고체 받침판 표면(11)에 연속적으로 첨가함으로써 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 소단위체로 이루어진 분자를 제조하기 위한 고체상의 미소규모 합성 장치, 일반적으로 (10)으로 지정된 장치를 도시하는 도 1 및 도 2를 논하기로 한다. 상기 합성 장치는 작고, 미세한 방울(13)이 개방 환경 영향하의 고체 받침판 표면(11)상의 기능화된 결합 사이트(14)에 정확하게 주입되도록 배열되는데, 이는 이후에 보다 자세히 논의된다. 본 발명에 따르면, 주입된 시약 용액(12)에는 화학반응동안 증발을 용이하게 조절할 수 있는 끓는점이 높은 극성 비양성자성 유기 용매내 함유된 화학 반응물이 포함된다. 개방 시스템용으로 끓는점이 낮은 표준 용매를 사용하는 종래의 기술과 달리, 분자의 증대, 가령 아마이드트 커플링을 완료시키기 위해서, 이러한 끓는점이 높은 용매는 노출된 받침판 표면(11)으로부터 작은 시약 용액 방울의 증발을 상당히 감소시킬 수 있다. 또한, 개방 환경하에서의 분자 합성은 휘발성 용매의 증발을 조절하기 위해서 밀폐 시스템 또는 증기 포화 시스템을 필요로 하지 않고, 높은 반응 수율을 유지하면서 충분히 연장될 수 있다. 앞서 개시한 바와 같이, 용매가 일단 증발되면, 커플링 반응은 두꺼운 점착성 또는 결정질 잔류물로 멈춰버린다.

일반적으로, 개방 환경 분자 합성용으로 개발된 용매 시스템은 종종 상대적으로 끓는점이 낮은 용매를 포함한다. 따라서, 이러한 끓는점이 낮은 용매를 이후에 개시되는 대체 용매와 유사한 용매 특성을 나타내는 상대적으로 끓는점이 높은 용매로 대체함으로써, 개방 환경 반응은 이러한 용매의 증발을 조절할 필요없이 달성될 수 있다. 본 발명은 끓는점이 낮은 용매가 개방 환경내에서 문제가 되는 어떠한 분자 합성에도 일반적으로 적용될 수 있으며, 상대적으로 끓는점이 높은 용매로 대체하는 것은 유기 분자 합성 및 생물중합체, 가령 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 및 펩티드 핵산에 대해 특히 유용하고 유익하다.

바람직한 형태에 있어서, 극성 유기 용매의 끓는점은 1기압(atm)하에서 적어도 약 140°C인데, 이는 표준 DNA 용매, 아세트니트릴의 약 81°C의 낮은 끓는점과 대조된다. 따라서, 상대적으로 높은 끓는점은 1atm에서 약 140°C의 용매의 끓는점으로 정의되고, 반면에 상대적으로 낮은 끓는점은 아세트니트릴, 테트라히드로푸란, 디메톡시에탄 및 니트로메탄과 같은 표준 DNA 용매, 및 에탄올, 아세톤 및 피리딘과 같은 그외 끓는점이 낮은 용매에 대한 1atm에서 100°C 이하의 끓는점으로 정의될 수 있다.

이와 같은 더 높은 끓는점은 미세하거나 작은 양의 방울이 개방 환경에 일반적으로 약 20피코미터 내지 약 2피코미터 크기 범위로 가해지는 경우, 방울은 일반적인 환경의 실험실 합성 조건의 개방 환경하에서 빨리 증발하지 않으므로 화학 반응이 연장되거나 또는 완료될 수 있다. 중요하게는, 끓는점이 높은 용매를 증기압이 높은 용매와 혼합하여 첨가하는 경우, 끓는점이 높은 용매의 낮은 증기압은 종래의 표준 DNA 용매의 증기압에 비해 증기압을 상당히 낮추는 경향이 있다. 또한, 중요한 증발 요인이 화학 반응을 방해하기 전에 높은 수율의 DNA 합성을 완료할 수 있다.

더우기, 적어도 약 97%의 단계적인 높은 커플링 수율을 촉진시키기 위해서, 이러한 끓는점이 높은 용매 시스템은 현재 사용되는 끓는점이 낮은 표준 용매와 유사한 산도, 유전상수 및 용해도 특성을 가지는 것이 바람직하다. 본 발명에 따르면, 이러한 끓는점이 더 높은 용매는 표준 용매보다 휘발성이 더 낮을 뿐만 아니라, 상당히 높은 반응 수율을 유지하기 위해서 표준 용매와 유사한 용매 특성을 포함한다. 예를 들면, 아세트니트릴/테트라졸 쌍과 유사한 높은-수율의 아마이드트 커플링을 제공하고, 반면에 작은 드롭의 표면 어레이 합성에 필수적인 증발 속도를 감소시키는 끓는점이 높은 용매/활성제 조합물도 있다. 1개의 표준 DNA 용매, 아세트니트릴에 비해 다른 후보 용매의 상대적인 증발시간은 적어도 약 50개의 요인에 의해 상당히 증가되었다.

가장 바람직한 끓는점이 높은 극성 비양성자성 유기 용매는 디니트릴, 구체적으로 말로노니트릴, 속시노니트릴, 글루타로니트릴, 아디포니트릴 및 피멜로니트릴의 그룹으로부터 결정되었다. 끓는점이 낮은 아세트니트릴(81°C)에 배해서 상기 용매들의 끓는점은 말로노니트릴 218°C, 속시노니트릴 265°C, 글루타로니트릴 286°C, 아디포니트릴 298°C 및 피멜로니트릴 310°C으로 상당히 더 높다. 그러므로, 더 바람직하게, 상대적으로 높은 끓는점은 1atm에서 적어도 약 200°C이다.

더우기, 이러한 용매 시스템의 증기압은 휘발성이 더 높은 표준 DNA 용매의 증기압보다(가령, 아세트니

트릴은 실온에서 7mm이다) 상당히 더 낮다. 그러므로, 증기압 및 표면적 대 디니트릴 그룹으로부터의 용매를 함유하는 50피코미터 시약 용액 방울에 대한 전체 부피 비는 아세토니트릴 용매를 함유하는 유사한 크기의 방울에 대한 부피비보다 상당히 더 낮다.

따라서, 이러한 용매는 실온에서 또는 표준 합성 환경하에서 훨씬 더 느린 속도로 증발된다. 예를 들면, 0.1마이크로리터 방울의 디니트릴 용매의 증발 반감기는 약 1시간 이상으로 약 10초인 아세토니트릴에 비해 더 길다. 그러므로, 유사한 반응 환경하에서, 중합체 합성동안의 불리한 증발 영향은 본 발명에서는 찾을 수 없다.

중요하게, 상기에 기술한 바와 같이, 이러한 용매 시스템은 산도, 점성도, 유전상수 및 용해도 특성과 같은 포스포르아미다이트에 대한 아세토니트릴과 유사한 용매 특성을 가진다. 예를 들면, 디니트릴/아세토니트릴 유사체 그룹은 아세토니트릴과 유사한 산도를 가지며, 테트라졸 및 S-에틸 테트라졸과 같은 산 촉매 및 표준 포스포르아미다이트와의 매우 높은 커플링 수율(99%)을 제공한다. 아디포니트릴 또는 글루타로니트릴 및 산촉매로서 S-에틸 테트라졸은 가장 바람직한 용매/활성제 쌍으로 발견되었다.

또한, 비양성자성 유기 용매의 모노니트릴 그룹은 개방 환경에서 상당히 유리한 작은 방울 중합체 합성으로 결정되었다. 이러한 모노니트릴 용매에는 141°C의 높은 끓는점을 갖는 발레로니트릴; 163°C의 높은 끓는점을 갖는 카프로니트릴; 190°C의 높은 끓는점을 갖는 벤조니트릴이 포함된다. 상기 모노니트릴의 증기압은 실온에서 각각 5.0mm, 1.0mm 및 0.5mm인데, 이는 표준 DNA 용매보다 상당히 더 낮다. 그러므로, 0.1마이크로리터 방울의 증발 반감기가 실온에서 약 1시간 이상인 상기 모노니트릴은 아세토니트릴보다 훨씬 더 느리게 증발된다.

상기 모노니트릴은 포스포르아미다이트를 위한 내부용매로서 디니트릴보다 우수하지 못한 용매로 단정되어 왔지만, 그럼에도 불구하고 모노니트릴은 우세한 알킬 잔기로 인해 포스포르아미다이트를 위한 아세토니트릴과 유사한 용매 특성(가령, 산도)을 갖고 있다.

또한, 가령 디에틸렌 글리콜 디메틸 에테르(디글라임(diglyme)) 및 트리에틸렌 글리콜 디메틸 에테르(트리글라임(triglyme))와 같은 산화 용매의 극성 비양성자성 그룹도 중합체 합성을 위한 끓는점이 높은 용매로 적당한 것으로 판명되었다. 상기 산화 용매는 디니트릴보다 약간 더 염기성임에도 불구하고 포스포르아미다이트에 우수한 용해도를 제공한다. 따라서, 더 높은 커플링 수율을 얻기 위해서는 더 산성인 촉매가 필요하다. 상기 산성 촉매 중 하나는 피리딘 히드로클로리드(Py·HCl)이다.

디글라임의 끓는점은 162°C이고, 반면에 트리글라임의 끓는점은 216°C이다. 게다가, 상기 산화 용매의 실온에서의 증기압은 각각 1.5mm 및 0.5mm이다. 다시 말해서, 증기압이 표준 DNA 용매의 증기압보다 더 낮기 때문에, 0.1마이크로리터 드롭의 증발 반감기는 표준 DNA 용매의 증발 반감기보다 더 길다. 상기 용매의 커플링 수율은 98%이었다.

상기에 기술한 용매보다 포스포르아미다이트에 우수한 용해도를 제공하고, Py·HCl과의 보다 적당한 커플링 수율을 제공하는 그외 끓는점이 높은 용매에는 핵사메틸 포스포릭 트리아미드(HMPA), N-메틸 피롤리돈(NMP) 및 디메틸포름아미드(DMF)가 있다. 그러나, 상기 용매는 H-포스포네이트 커플링 화학적 성질을 갖는 용도를 위해 피리딘과 조합되는 것이 보다 적당하다.

본 발명의 방법 및 용매 시스템은 DNA 합성 외 기타 유기 합성과 함께 사용될 수도 있다. 하기 실시예 2에 기술한 바와 같이, 끓는점이 높은 용매는 500개의 다른 아미노산 히드록사메이트 설포아미드 유도체 라이브러리를 산출하는 아미노산 히드록사메이트 유도체의 조합적 합성에 사용될 수도 있다.

본 발명은 이후에 참고문헌으로 전문으로 통합되는 미국특허 제5,474,796(이후부터 '796 특허라 칭함)의 송액장치와 함께 사용하기에 특히 적당하다. 요약하면, 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 개방되고 기능화된 반응 사이트(14)는 비반응성 소수성 표면장력 장벽에 의해 분리되고, 정의되며, 특정 시약은 드롭-온-디맨드 잉크젯 장치(15)를 사용하여 각각의 사이트로 송액된다. 바람직하게, 각 반응성 또는 기능화된 결합 사이트(14)의 크기는 일반적으로 약 20 내지 약 2000 미크론이다. 화학 반응물 용액은 압전기 또는 솔레노이드 노즐을 사용하거나 또는 작은 방울을 조절가능하게 정확하게 투여할 수 있는 그외 다른 노즐 시스템을 사용하여 받침판 표면(11)상의 기능화된 결합 사이트(14)로 전달된다. 분사된 방울의 초기 크기는 일반적으로 노즐 구멍의 직경 및 액체 매질의 점성도와 표면장력에 의해 결정된다. 일반적인 방울(13)의 크기는 약 25 내지 약 250 미크론 범위이다.

화학 반응물 및 끓는점이 높은 극성 비양성자성 유기 용매를 함유하는 시약 용액은 압전기 펌프(도시되어 있지 않음)를 사용하여 각 결합 사이트의 화학 반응물 용액이 다른 인접한 결합 사이트의 시약 용액으로부터 표면장력에 의해 분리되는 양으로 기능화된 결합 사이트(14)로 송액될 수 있다. 요약하면, 압전기 펌프에서, 시약 용액은 유입구를 통해 압전기 펌프의 상부판과 반대쪽 하부판 사이에 형성되어 있는 공간으로 삽입된다. 상부판과 하부판 사이의 전압차를 적용함으로써 압전기가 압축되고, 시약 용액의 미소방울은 노즐을 통해 나가게 된다.

도 2a에 잘 도시된 바와 같이, 시약 용액의 미소한 방울(13)은 기능화된 결합 사이트(14)로 주입된다. 기능화된 결합 사이트(14) 및 주변 표면(16)상의 시약 용액(12)(도 2b)의 습윤성의 차이로 인해서, 기능화된 결합 사이트(14)상의 시약 용액 비드(bead)의 미소한 방울(13)과 용액내 반응물은 고체 받침판 표면과 반응한다.

본 발명에 사용될 수 있는 압전기 펌프는 액체의 미소한 방울(13)을 매우 정확한 방식으로 받침판 표면(11)에 송액시킨다. 피코펌프 디자인은 잉크젯 프린팅에서 사용되는 펌프와 유사하고, 3000Hz 이하에서 50 미크론 또는 65 피코리터의 방울이 제조될 수 있다.

본 장치에 관한 상기 기술로부터, 본 발명의 방법은 개방 환경 고체 받침판 표면(11)상에서 소단위체로 이루어진 분자의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 동안 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 것으로 이해될 수 있다. 본 방법은 (A)반응성 화학성분으로 기능화된 적어도 하나의 결합 사이트(14)를

포함하는 개방 고체 받침판 표면을 설치하는 단계, (B)실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액(12)을 상기 받침판 표면(11)상으로 주입하고, 상기 결합 사이트(14)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 시약 용액은 이 시약용 표준 유기 용매와 비교해서 상대적으로 끓는점이 높은 적어도 하나의 용매에 함유된 반응물을 함유한다. 상기와 같은 끓는점이 높은 용매는 고체 받침판(11)상에서의 합성동안 상당히 높은 반응 수율을 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 감소시킨다.

주입단계는 시약 용액(12)의 드롭-온-디맨드 송액을 이용하여 실시된다. 상기 송액은 송액량이 약 20피코리터 내지 약 2마이크로리터로 정확하게 조절되지만 한다면 종래의 송액장치 또는 압전기 펌프장치(15)를 통해 제공될 수 있다. 더우기, 주입단계는 포스포르아미다이트 방법 또는 H-포스포메이트 방법에 의해 각각의 결합 사이트에서 불연속적인 단계적 합성에 의해 더 실시될 수 있다.

더 구체적으로 본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법은 개방 환경 고체 받침판 표면상에서 제공된다. 상기 방법은 (A)반응성 화학성분으로 기능화된 적어도 하나의 결합 사이트(14)를 포함하는 개방 고체 받침판 표면(11)을 설치하는 단계, (B)실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액(12)을 상기 받침판 표면(11)상으로 주입하고, 상기 결합 사이트(14)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 이 구체예에서, 시약 용액(12)은 적어도 약 140°C의 끓는점을 갖는 끓는점이 높은 극성 비양성자성 유기 용매에 포함된 반응물을 포함한다. 이 기술은 고체 받침판상에서 올리고뉴클레오티드 합성동안 올리고뉴클레오티드의 커플링 수율을 상당히 높게 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 상당히 감소시킨다.

단계 A 및 단계 B는 적어도 하나의 연속적인 올리고뉴클레오티드 사슬을 형성하기 위해서 같거나 또는 다른 화학 반응물을 사용하여 반복될 수 있다. 개방 받침판 표면(11)이 기능화된 반응 사이트(14) 어레이(도 1)를 포함하는 경우, 주입단계는 시약 용액을 어레이의 선택된 반응 사이트(14)로 개별적으로 주입시킴으로써 성취될 수 있다. 게다가, 주입단계는 각 반응 사이트(14)의 시약 용액이 표면장력에 의해 다른 결합 사이트의 시약 용액으로부터 분리되는 양으로 시약 용액을 선택된 각 반응 사이트(14)로 주입시킴으로써 성취될 수 있다. 이는 기능화된 각 결합 사이트(14) 주변의 주위 받침판 표면(16)(이는 비반응성, 소수성 물질로 이루어지는 것이 바람직하다)에 비해 더 높은 표면장력을 갖는 기능화된 각각의 반응 사이트(14)의 받침판 표면을 설치함으로써 실시될 수 있다.

하기 실시예는 상기에 기술된 발명을 이용하는 방법을 보다 자세하게 개시할 뿐만 아니라, 본 발명의 여러 가지 양태를 실시하기 위한 최상의 방법을 기술한다. 하기 실시예는 본 발명의 참된 범위를 제한하는 것이 아니라, 본 발명의 실례로서 제공되는 것으로 이해될 수 있다.

실시예

(실시예 1)

어레이판 상에서의 올리고뉴클레오티드의 합성

친유성 플루오로알킬크실란(fluoroalkylxysilane)에 의해 분리된 합성용 기능화된 아미노알킬실란 스폿(spot)이 설치된 패턴형 유리 어레이판상에서 올리고뉴클레오티드 합성을 실시하였다. 어레이는 500개의 직경이 0.5mm인 스폿을 포함하였다. '796 특허에 개시된 바와 같이, 1차 패턴닝을 위해서 아미노프로필-1,1,2,2-테트라히드로옥틸 실록산 및 테트라데카플루오로-1,1,2,2-테트라히드로옥틸 실록산을 사용하여 어레이를 합성하였다.

짧은 아미노프로필 링커(linker)의 긴사슬 히드록실알킬 링커로의 변환은 어레이를 디옥산:DCM(1:1)내 p-니트로페닐클로로포르메이트와 2시간동안 처리시킴으로써 성취되었다. 반응되지 않은 아미노프로필 그룹은 아세트산 무수물과 피리딘의 1:1 혼합물을 사용하여 캡핑(capping)하였다. 그후, 얻어지는 카르바메이트 중간체를 아세토니트릴내 6-아미노헥사놀과 하루동안 반응시킴으로써 유리아를 함유하는 히드록실로 변환시켰다. 패턴형 표면을 활성화제로서 TOTU를 사용하여 아세토니트릴내 5'-DMT-뉴클레오시드-3'숙시네이트와 2시간동안 처리함으로써 잘라낼 수 있는 링커를 합성하였다.

표준 포스포르아미다이트 방법에 따라서, 이와 같이 제조된 스폿상에 올리고뉴클레오티드를 모았다. 표준 포스포르아미다이트 및 S-에틸 테트라졸을 아디포니트릴(ADN) 또는 글루타로니트릴(GLN) 및 아세토니트릴(ACN)의 혼합물에 용해시켰다. 정의된양의 끓는점이 낮은 아세토니트릴을 첨가함으로써 용매의 점성도 및 제트로부터 드롭 형성을 조절할 수 있다. 90% ADN 및 10% ACN의 혼합물이 드롭 형성 및 시약의 점성도에 대해 최적임이 판명되었다.

적당하게 보호되는 뉴클레오티드 및 활성 시약은 '796 특허에 개시된 바와 같은 마이크로펌프 장치를 사용하여 각 스폿으로 송액되었다. 그외 모든 단계(DMT 디블록킹, 세척)는 표면에 적당한 시약을 대량으로 흘려보냄으로써 어레이 상에서 배치 방법으로 실시되었다. 그후, 어레이를 고속으로 회전시킴으로써 시약을 표면으로부터 제거시켰다.

합성한 후, 올리고뉴클레오티드를 표면으로부터 잘라내고, 수성 암모니아에 의해 탈보호시켰다. 생성물(가령, T10)을 HPLC 및 HPCE에 의해 분석하였는데, 이는 CPG 상에서의 표준 올리고뉴클레오티드 합성에 상당하거나, 또는 더 우수한 품질을 나타내었다. 이로써 단계적인 합성 수율이 약 98% 이상이라는 결론을 얻었다.

(실시예 2)

아미노산 히드록사메이트 유도체의 조합적 합성

실시예 1에 기술한 바와 같이 패턴형 어레이를 사용하였다. 먼저, 아미노산을 어레이에 커플링하고, 그후 다양성을 얻기 위해서 다른 설포닐클로리드를 사용하여 유도하였다. Fmoc 보호 아미노산 및 활성화제(HATU)를 DMF:CH2CL2(9:1)에 용해시켰다. 상기 두 시약을 '796 특허에 개시되어 있는 바와 같이

단일 스폿으로 송액하였다. 15분후, 어레이를 회전시켜 상기 시약을 제거하였다. 그후, 어레이 표면에 DMF내 10%의 피페리딘 용액을 대량으로 흘려보냄으로써 아미노산의 Fmoc 보호기를 제거하였다. DMF 및 THF를 사용하여 세척한후, 피리딘에 용해된 다른 설포닐 클로리드는 유도하기 위한 각 스폿으로 보냈다. 10분의 반응시간이 지난후, 회전시켜 시약을 제거하고, 어레이를 피리딘으로 세척하였다. 피리딘, DMF, DMSO 및 DCE를 사용하여 최종적으로 세척한후, 500개의 다른 아미노산 히드록사메이트 설포아미드 유도체 라이브러리를 산출하기 위해서 밀봉 공간내에서, 합성된 화합물을 48시간동안 물/디옥산(1:1.75)내 2M 히드록실아민으로 잘랐다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(A)반응성 화학성분으로 기능화된 적어도 하나의 결합 사이트를 포함하는 개방 고체 받침판 표면을 설치하는 단계,

(B)실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액을 상기 받침판 표면상으로 주입하고, 상기 결합 사이트와 접촉시키는 단계로 이루어고, 상기 고체 받침판상에서 합성하는 동안 상당히 높은 반응 수율을 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 상당히 감소시키기 위해서 상기 액체 시약 용액은 상기 시약 용 표준 유기 용매와 비교해서 상대적으로 끓는점이 높은 적어도 하나의 용매에 함유된 반응물을 함유하는 개방 환경 고체 받침판 표면상에서 소단위체로 이루어진 분자의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 동안 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 분자는 상대적으로 끓는점이 낮은 용매를 사용하여 합성되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 끓는점이 낮은 용매는 아세트니트릴, 메틸렌 클로리드, 아세톤, 에탄올, 피리딘 및 테트라히드로푸란으로 구성되는 용매 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 분자는 유기 분자인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 분자는 올리고뉴클레오티드, 펩티드 및 펩티드 핵산으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 끓는점이 높은 용매는 극성 비양성자성 유기 용매인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 끓는점이 높은 용매의 끓는점은 적어도 약 140°C인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 끓는점이 높은 용매의 끓는점은 적어도 약 200°C인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 비양성자성 유기 용매는 디니트릴, 모노니트릴, 글라임, 디글라임, 트리글라임, 디메틸포름아미드(DMF), 핵사메틸포스포리드리아미드(HMPA) 및 트리메틸포스페이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 디니트릴 그룹은 아세토니트릴 용액의 산도와 상당히 유사한 산도를 함유하는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 디니트릴 그룹은 속시노니트릴, 글루타로니트릴, 아디포니트릴 및 피멜로니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

적어도 하나의 연속적인 올리고뉴클레오티드 사슬을 형성하기 위해서 단계 (A) 및 단계 (B)를 반복하는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

합성은 포스포라아미다이트 방법에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

합성은 H-포스포메이트 방법에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 15

제 6 항에 있어서,

상기 비양성자성 용매는 모노니트릴 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 모노니트릴 그룹은 발레로니트릴, 벤조니트릴 및 카프로니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 17

제 1 항에 있어서,

상기 분자는 소단위체를 연속적으로 첨가함으로써 합성되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 분자는 올리고뉴클레오티드 사슬, 펩티드 사슬 또는 그의 하이브리드 중 하나인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 19

제 1 항에 있어서,

상기 개방 받침판 표면은 기능화된 반응 사이트의 어레이를 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 주입단계는 상기 어레이의 선택된 반응 사이트에 시약 용액을 개별적으로 주입시킴으로써 달성되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 교체 받침판 표면은 평면인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 22

제 20 항에 있어서,

상기 주입단계는 각 반응 사이트의 시약 용액이 다른 결합 사이트의 시약 용액으로부터 표면장력에 의해 분리되는 양으로 선택된 각 반응 사이트에 시약 용액을 주입함으로써 더 달성되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

기능화된 각 반응 사이트의 받침판 표면은 기능화된 각 결합 사이트 주위의 받침판 표면에 비해 더 높은 표면장력을 갖는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 기능화된 각 결합 사이트 주위의 받침판 표면은 비반응성 소수성 물질로 구성되는 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 25

제 22 항에 있어서,

선택된 반응 사이트로 주입된 시약 용액의 양은 약 20피코리터 내지 약 2마이크로리터인 것을 특징으로 하는 액체 시약 용액의 증발을 감소시키는 방법.

청구항 26

(A)반응성 화학성분으로 기능화된 적어도 하나의 결합 사이트를 포함하는 개방 고체 받침판 표면을 설치하는 단계,

(B)실질적으로 조절되는 미소량의 액체 시약 용액을 상기 받침판 표면상으로 주입하고, 상기 결합 사이트와 접촉시키는 단계로 이루어고, 상기 고체 받침판상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 동안 상당히 높은 반응 수율을 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 상당히 감소시키기 위해서 상기 액체 시약 용액은 상기 시약용 표준 유기 용매와 비교해서 적어도 약 140℃의 끓는점이 높은 극성 비양성자성 유기 용매에 함유된 반응물을 함유하는 개방 환경 고체 받침판 표면상에서 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

상기 끓는점이 높은 용매의 끓는점은 적어도 약 200℃인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 28

제 26 항에 있어서,

상기 비양성자성 유기 용매는 디니트릴, 모노니트릴, 글라임, 디글라임, 트리글라임, 디메틸포름아미드(DMF), 헥사메틸포스포트리아미드(HMPA) 및 트리메틸포스페이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서,

상기 디니트릴 그룹은 아세토니트릴 용액의 산도와 상당히 유사한 산도를 함유하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

상기 디니트릴 그룹은 숙시노니트릴, 글루타로니트릴, 아디포니트릴 및 피멜로니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 31

제 26 항에 있어서,

상기 비양성자성 용매는 모노니트릴 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

상기 모노니트릴 그룹은 발레로니트릴, 벤조니트릴 및 카프로니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 33

제 26 항에 있어서,

상기 주입단계는 상기 시약 용액의 드롭-온-디맨드(drop-on-demand) 송액을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

상기 시약 용액의 드롭-온-디맨드 송액은 압전기 펌프 장치를 통해 실시되는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 35

제 34 항에 있어서,

상기 주입단계는 포스포르아미다이트 방법에 의해 상기 각 결합 사이트에서 불연속적이고 단계적인 올리고뉴클레오티드 합성을 더 실시하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드 사슬의 고체상을 미소규모로 화학적으로 합성하는 방법.

청구항 36

올리고뉴클레오티드를 증대시키는 동안 상당히 높은 커플링 수율을 유지하면서 개방 환경내 시약 용액의 증발을 상당히 감소시키기 위해서, 뉴클레오티드 시약 및 적어도 약 140℃의 끓는점을 갖는 극성 유기 비양성자성 용매로 이루어진 개방 환경 고체 받침판 표면상에서 상대적으로 미소량의 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 뉴클레오시드 시약 용액.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

주입된 시약 용액의 양은 약 20피코리터 내지 약 2마이크로리터인 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

청구항 38

제 37 항에 있어서,

상기 끓는점이 높은 용매의 끓는점은 적어도 약 200℃인 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

청구항 39

제 38 항에 있어서,

상기 비양성자성 용매는 디니트릴 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

상기 디니트릴 그룹은 아세토니트릴 용액의 산도 특성과 상당히 유사한 산도 특성을 함유하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 디니트릴 그룹은 말로노니트릴, 숙시노니트릴, 글루타로니트릴, 아디포니트릴 및 피멜로니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

상기 비양성자성 용매는 모노니트릴 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

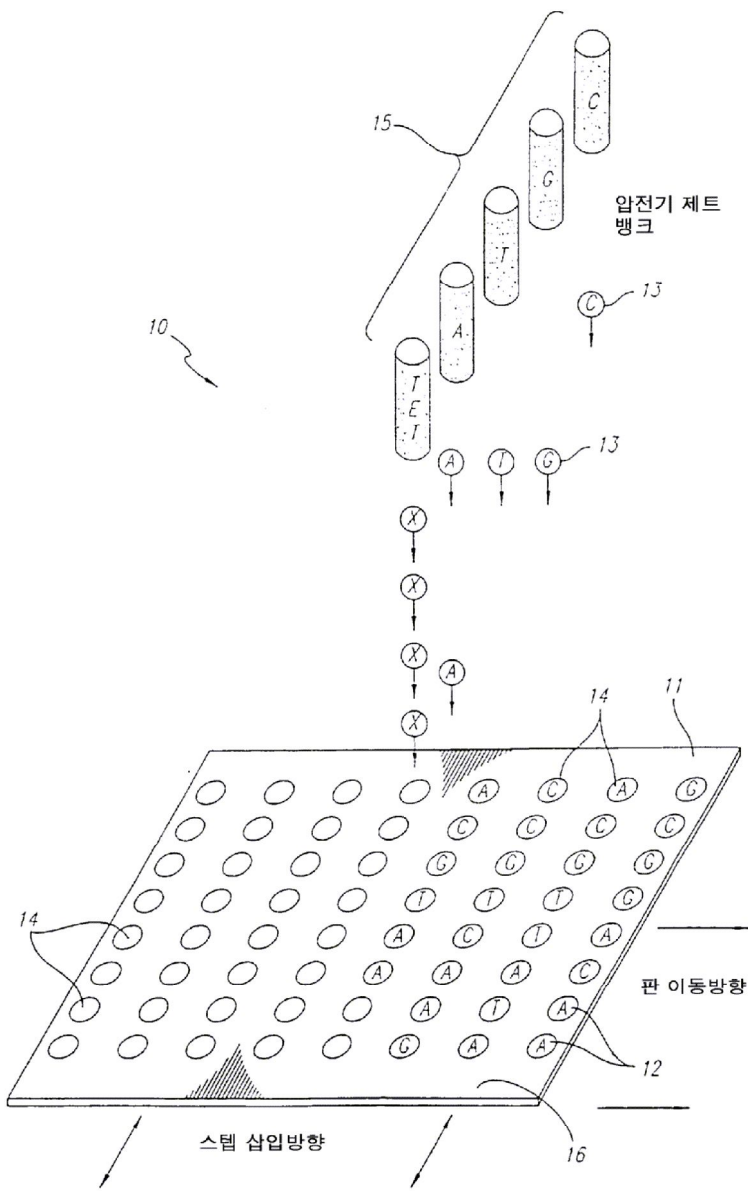
청구항 43

제 42 항에 있어서,

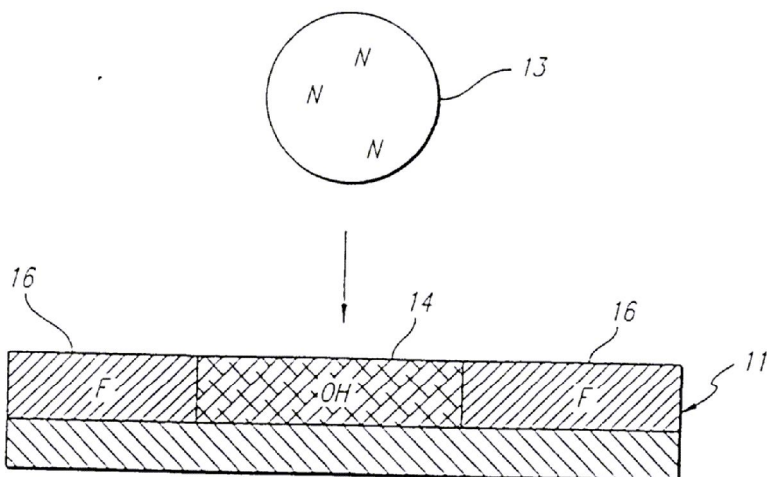
상기 모노니트릴 그룹은 발레로니트릴, 벤조니트릴 및 카프로니트릴로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뉴클레오시드 시약 용액.

도면

도면1



도면2a



도면2b

