(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2010-46092
(P2010-46092A)
(43)公開日　平成22年3月4日(2010.3.4)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C07C 231/12	(2006.01)	C07C 231/12		4C057
C07C 237/30	(2006.01)	C07C 237/30		4H006
C07C 231/10	(2006.01)	C07C 231/10		
C07C 237/06	(2006.01)	C07C 237/06		

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　（全 179 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-263415 (P2009-263415)
(22)出願日　平成21年11月18日 (2009.11.18)
(62)分割の表示　特願2005-502071 (P2005-502071)の分割
原出願日　平成15年8月19日 (2003.8.19)
(31)優先権主張番号　60/404,395
(32)優先日　平成14年8月19日 (2002.8.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/419,667
(32)優先日　平成14年10月18日 (2002.10.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/432,812
(32)優先日　平成14年12月11日 (2002.12.11)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505061964
プレジデント　アンド　フェローズ　オブ　ハーバード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　クインシー　ストリート　１７
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】進化する新しい分子機能

(57)【要約】
【課題】目的の分子のより効率的な合成、選択、増幅、および進化を可能にするための、これらの核心技術の改善を提供すること。
【解決手段】自然は、タンパク質のような生物学的分子を、多様化、選択、および増幅の繰り返しのラウンドを通して進化させる。自然の力および有機合成の可撓性は、核酸テンプレート合成に一体化される。本発明は、核酸テンプレート合成を実施するための様々なテンプレート構造、核酸テンプレート反応の選択性を増加するための方法、立体選択性核酸テンプレート反応を実施するための方法、核酸テンプレート合成により生じる反応生成物についての選択方法、および核酸テンプレート合成に基づく新しい化学反応の同定方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本明細書中に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（優先情報）
この出願は、（ｉ）米国仮特許出願第６０／４０４，３９５号（２００２年８月１９日出願）、（ｉｉ）米国仮特許出願第６０／４１９，６６７号（２００２年１０月１８日出願）、（ｉｉｉ）米国仮特許出願第６０／４３２，８１２号（２００２年１２月１１日出願）、（ｉｖ）米国仮特許出願第６０／４４４，７７０号（２００３年２月４日出願）、（ｖ）米国仮特許出願第６０／４５７，７８９号（２００３年３月２６日出願）、（ｖｉ）米国仮特許出願第６０／４６９，８６６号（２００３年５月１２日出願）、（ｖｉｉ）米国仮特許出願第６０／４７９，４９４号（２００３年６月１８日出願）の利益を主張する。これらの各々の開示は、本明細書中で参考として援用される。本出願はまた、米国仮特許出願第６０／２７７，０８１号（２００１年３月１９日出願）、同第６０／２７７，０９４号（２００１年３月１９日出願）、同第６０／３０６，６９１号（２００１年６月２０日出願）、および同第６０／３５３，５６５号（２００２年２月１日出願）、ならびに米国特許出願第１０／１０１，０３０号（２００２年３月１９日出願）、および同第１０／１０２，０５６号（２００２年３月１９日出願）、そして国際特許出願第ＵＳ０２／０８５４６（２００２年３月１９日出願）に関する。
【０００２】
（政府の資金供与）
本出願に記載される研究は、部分的に、契約番号Ｎ００００１４－００－１－０５９６、およびグラント番号００００１４－０３－１－０７４９の下で、ｔｈｅ　Ｏｆｆｉｃｅ　ｆｏｒ　Ｎａｖａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈによって資金援助された。米国政府は、本発明に一定の権利を有し得る。
【背景技術】
【０００３】
（本発明の背景）
新機能を有する分子を生成することへの古典的な「化学的アプローチ」が、前世紀を通して、創薬から材料科学の合成方法論に及ぶ範囲での適用に、広く使用されてきた。このアプローチにおいては、研究者らは、候補分子を合成もしくは単離し、これらの候補分子を所望の特性に関してアッセイし、活性化合物の構造を（未知であった場合）決定し、利用可能なアッセイおよび構造データに基づいて構造－活性関係を説明し、次いで、改善された特性を有するように設計された新世代の分子を合成する。コンビナトリアルケミストリー法（例えば、Ｅｌｉｓｅｅｖら、（１９９９）ＣＯＭＢＩＮＡＴＯＲＩＡＬ　ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＩＮ　ＢＩＯＬＯＧＹ　２４３：１５９－１７２；Ｋｕｎｔｚら、（１９９９）ＣＵＲＲＥＮＴ　ＯＰＩＮＩＯＮ　ＩＮ　ＣＨＥＭＩＣＡＬ　ＢＩＯＬＯＧＹ　３：３１３－３１９；Ｌｉｕら、（１９９９）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴＬ．ＥＤ．ＥＮＧ．３８：３６、を参照のこと）がこのアプローチのスループットを上昇させた一方で、その基本的な限界は、依然として変化していない。いくつかの要因が、分子機能をもたらすこの化学的アプローチの有効性を制限する。第一に、新機能をもたらす構造変化を正確に予測する能力は、分子のわずかな高次構造上の再構成、不測の溶媒の相互作用、または結合もしくは反応現象の未知の立体化学的要求のために、しばしば無力である。結果として生じる構造－活性関係の複雑さは、推論的なリガンドの設計もしくは触媒の設計の成功（ハイスループット様式で行われるこれらの努力を含む）をしばしば制限する。第二に、候補化合物の収集物の各メンバーを、選択するよりもむしろアッセイもしくはスクリーニングする必要性は、各実験で探索され得る分子の数を制限する。最後に、合成分子を増幅する方法の欠如は、特徴化、スクリーニング、および構造解明のために生成されなけれ

ばならない物質の最小量の必要性を課す。結果として、およそ10^6個を超える、異なる合成化合物のライブラリを生成することは、困難であり得る。

【０００４】

対照的に、自然は、これらの制限の多くを克服する基本的に異なる方法を用いて、新機能を有するタンパク質を生成する。このアプローチにおいては、所望の特性を有するタンパク質は、そのタンパク質をコードする情報の存続および増幅をもたらす。この情報は、自発性突然変異およびＤＮＡ組み換えを通じて多様化され、次いで、リボソームを用いて、新世代の候補タンパク質に翻訳される。上記の直線的な化学的アプローチと異なり、自然によって使用される工程は、分子進化のサイクルを形成する。このプロセスから明らかになるタンパク質は、所望の活性に関して、単純にスクリーニングされるよりもむしろ直接的に選択されてきた。進化するタンパク質をコードする生物分子（例えば、ＤＮＡ）は増幅され得るため、所望の活性を有する単一のタンパク質分子は、理論上は、その構造をコードするＤＮＡの存続および増殖をもたらし得る。

【０００５】

自然のアプローチの能力と有効性を認めて、研究者らは、新規の結合特性もしくは触媒特性を有する多くのタンパク質および核酸を生成するために、分子進化を利用してきた（例えば、Ｍｉｎｓｈｕｌｌら、（１９９９） ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．３：２８４－９０；Ｓｃｈｍｉｄｔ－Ｄａｎｎｅｒｔら、（１９９９）ＴＲＥＮＤＳ ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬ．１７：１３５－６；Ｗｉｌｓｏｎら、（１９９９）ＡＮＮＵ．ＲＥＶ．ＢＩＯＣＨＥＭ．６８：６１１－４７、を参照のこと）。研究者らによって進化させられたタンパク質および核酸は、研究手段、診断剤、工業試薬、および治療剤としての価値を示してきており、そしてタンパク質および核酸に結合特性もしくは触媒特性を与える分子相互作用についての理解を大きく拡張してきた（Ｆａｍｕｌｏｋら、（１９９８）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．２：３２０－７）。

【０００６】

これまでのところ、核酸中の情報は、タンパク質中もしくは他の核酸中に翻訳されるのみであり得るため、機能をもたらすための自然の有効なアプローチにもかかわらず、自然の分子進化は、２つのタイプの「天然」分子（タンパク質および核酸）に限定される。あいにく、目的の合成分子の多くは、一般に、核酸もしくはタンパク質骨格を有さない。機能的分子を生成する理想的なアプローチは、分子進化の最も強力な局面と合成化学の柔軟性とを結びつける。明らかに、非天然合成の低分子およびポリマーの進化を可能にすることは、自然が生物分子を進化させるのとほとんど同じように、推論的設計を用いて生成することが困難もしくは不可能な新しい合成リガンド、レセプター、および触媒を発見するはるかにより有効な方法をもたらす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

これらの概念が、核酸をテンプレートとする低分子の合成を可能にするためにまとめられた（例えば、ＧａｒｔｎｅｒおよびＬｉｕ（２００１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．Ｓｏｃ．１２３：６９６１－６９６３を参照のこと）が、目的の分子のより効率的な合成、選択、増幅、および進化を可能にするための、これらの核心技術の改善に関する継続的な必要性が、まだある。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

（発明の要旨）

本発明は、目的の分子の、テンプレートに指向する合成、選択、増幅、および進化の範囲を拡張する種々の方法および組成物を提供する。核酸をテンプレートとする合成の間、核酸テンプレート内にコードされる情報は、２つ以上の反応物を、反応の近傍内に集めるために使用される。これらの方法は、例えば、従来のコンビナトリアル化学を用いて作製することがこれまで可能でなかった低分子およびポリマーライブラリの作製を可能にする

。

【０００９】

１つの局面において、本発明は、「オメガ」もしくは「Ω」型構造を有するテンプレートを用いて、核酸をテンプレートとする合成を行う方法を提供する。この型のテンプレートは、距離依存性の核酸をテンプレートとする反応が、その結合する反応単位から遠く離れた塩基によってコードされることを可能にする。本方法は、（ｉ）コドンを含有する第一オリゴヌクレオチドに結合する第一反応単位を含むテンプレート、および（ｉｉ）このコドンにアニーリングし得るアンチコドンを含有する第二オリゴヌクレオチドに結合する第二反応単位を含む移動単位、を提供する工程を包含する。このコドンおよび／もしくはアンチコドンは、互いに間隙を介する第一および第二領域を含む。次いで、このオリゴヌクレオチドは、互いにアニーリングされて、この反応単位を反応の近傍内に集める。これらの間隙を介する領域を有するオリゴヌクレオチドが互いにアニールする場合、コドン（もしくは、アンチコドン）は、対応するアンチコドン（もしくはコドン）にアニーリングしないオリゴヌクレオチドのループを形成する。次いで、共有結合を形成する反応がこの反応単位の間に引き起こされて、反応生成物を生成する。

【００１０】

１つの実施形態において、少なくとも１つの反応単位が、その対応するオリゴヌクレオチドの末端領域の近くに結合される。別の実施形態において、コドンもしくはアンチコドンは、その対応する反応単位から１塩基よりも離れて（例えば、１０塩基、２０塩基、３０塩基もしくはそれより離れて）配置される。第一の間隙を介する領域は、代表的に、その対応するオリゴヌクレオチドの末端の近くに直接配置される。この第一の間隙を介する領域は、好ましくは、例えば、３、４、もしくは５ヌクレオチドを含むが、他の実施形態（例えば、５ヌクレオチドより多い）もまた想定される。第二領域は、例えば、その対応する反応単位から少なくとも２０塩基、もしくは少なくとも３０塩基離れて配置され得る。より特別には、この反応単位に最も近いこの第二領域の末端は、例えば、その反応単位に結合するオリゴヌクレオチドの末端から、少なくとも１０塩基、２０塩基、３０塩基もしくはそれより離れて配置され得る。テンプレートは、付加的な（例えば、２、３、４もしくは４より多い）コドンを含み、この場合、対応する数の移動単位がテンプレートにアニーリングし得、必要に応じて、複数工程の、もしくは代替的な合成を可能にする。

【００１１】

別の局面において、本発明は、「Ｔ」型構造を有するテンプレートを用いて核酸をテンプレートとする合成を行う方法を提供する。このＴ構造は、２つの核酸をテンプレートとする反応が、単一の工程で単一のテンプレート上で生じることを可能にする。本方法は、（ｉ）コドンを含有する第一オリゴヌクレオチドに結合する第一反応単位（例えば、骨格分子）を含むテンプレート、および（ｉｉ）このコドンにアニーリングし得るアンチコドンを有する第二オリゴヌクレオチドに結合する第二反応単位を含む移動単位、を提供する工程を包含する。第一反応単位は、好ましくは、テンプレートの第一オリゴヌクレオチドの近位末端および遠位末端の中間の付加部位に共有結合される。合成の間、このテンプレートのオリゴヌクレオチドおよび移動単位は、互いにアニーリングされて、これら反応単位を反応の近傍内に集め、そしてこれらの反応単位の間に共有結合形成を引き起こす。

【００１２】

Ｔ型構造の１つの実施形態において、テンプレートはまた、第二の、異なる移動単位の第二の、異なるアンチコドン配列にアニーリングし得る第二の、異なるコドンを含む。この実施形態において、第一のコドンは、この結合部位に対して近位に配置され、そして第二のコドン（存在する場合）は、この結合部位に対して遠位に配置される。第二のコドンにアニーリングし得る第二の、異なるアンチコドン配列を有する第三のオリゴヌクレオチドに結合する第三の反応単位を含有する第二の移動単位が提供される場合、この第二の移動単位は、第二のコドン位置でテンプレートと結合し得る。したがって、第一および第二の移動単位がテンプレートと結合される場合、第一の移動単位の第一のアンチコドンは、テンプレートの第一のコドンにアニーリングし、そして第二の移動単位の第二のアンチコ

ドンは、テンプレートの第二のコドンにアニーリングする。このシステムは、単一の工程において単一のテンプレート上で、２つの反応が同時に、もしくは連続的に生じることを可能にする。

【００１３】

別の局面において、本発明は、テンプレートによる合成において、反応物間の反応選択性を増加させるための一連の方法を提供する。１つのアプローチにおいて、本方法は、テンプレートおよび少なくとも２つの移動単位を提供する工程を包含する。このテンプレートは、所定のコドン配列を含有する第一のオリゴヌクレオチドに結合する第一の反応単位を含有する。第一の移動単位は、このコドン配列にアニーリングし得るアンチコドン配列を含有する第二のオリゴヌクレオチドに結合する第二の反応単位を含有する。第二の移動単位は、第二の反応単位と異なる第三の反応単位を含有する。しかし、この第三の反応単位は、コドン配列にアニーリングし得るアンチコドン配列を欠く第三のオリゴヌクレオチドに結合する。テンプレートおよび移動単位は、第一のオリゴヌクレオチドへの第二のオリゴヌクレオチドのアニーリングを可能にする条件下で混合され、それによって、第三の反応単位と第一の反応単位との間の共有結合形成に対して第二の反応単位と第一の反応単位との間の共有結合形成を増強する。

【００１４】

この方法は、第二および第三の反応単位が第一の反応単位とそれぞれ独立に反応し得る場合、特に役に立ち得る。さらに、本方法はまた、第二および第三の反応単位が互いに反応し得る場合、例えば、互いに改変もしくは不活性化する場合に、役に立ち得る。したがって、この型の方法は、一連の別の互換性のない反応が、同じ溶液中で生じることを可能にする（例えば、第二の反応単位と第三の反応単位との間の反応が、第二の反応単位と第一の反応単位との間の反応と互換性のない場合）。本方法は、第一の反応単位と第三の反応単位との間の共有結合形成に対して少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、もしくは少なくとも５０倍、第一の反応単位と第二の反応単位との間の共有結合形成を増強し得る。集合的に、これらの利点は、ワンポット系列化された（ｏｎｅ－ｐｏｔ　ｏｒｄｅｒｅｄ）複数工程での合成を可能にする。ここで、反応の順序は、テンプレートオリゴヌクレオチドの配列によってプログラムされる。したがって、少なくとも２、３、４、５、６、もしくはそれより多数の反応の順序は、これらの反応が、従来のテンプレートによらない化学反応を用いることによって互いに干渉する場合でさえも、単一の溶液中で１つの系列化された様式で生じ得る。

【００１５】

１つの実施形態において、テンプレート、第一の移動単位、および／もしくは第二の移動単位は、捕獲可能部分、例えば、ビオチン、アビジン、もしくはストレプトアビジンに結合する。捕獲可能部分が存在する場合、本方法は、反応混合物から反応生成物を濃縮する方法として、この捕獲可能部分を捕獲する工程を包含し得る。

【００１６】

別のアプローチにおいて、本方法は、（ｉ）第一のコドン配列および第二のコドン配列を有する第一のオリゴヌクレオチドを含有するテンプレート、（ｉｉ）第一の移動単位、（ｉｉｉ）第二の移動単位、および（ｉｖ）第三の移動単位、を提供する工程を包含する。この第一の移動単位は、第一のコドン配列にアニーリングし得る第一のアンチコドン配列を含有する第二のオリゴヌクレオチドに結合する第一の反応単位を含有する。第二の移動単位は、第二のコドン配列にアニーリングし得る第二のアンチコドン配列を含有する第三のオリゴヌクレオチドに結合する第二の反応単位を含有する。第三の移動単位は、第一もしくは第二のコドン配列にアニーリングし得るアンチコドン配列を欠く第四のオリゴヌクレオチド配列に結合する第三の反応単位を含有する。テンプレート、第一の移動単位、第二の移動単位、および第三の移動単位は、次いで、（ｉ）第一のコドン配列への第一のアンチコドン配列のアニーリング、および（ｉｉ）第二のコドン配列への第二のアンチコドン配列のアニーリングを可能にし、それによって、第三の反応単位と第一の反応単位との間の共有結合形成、および／もしくは第三の反応単位と第二の反応単位との間の共有結

合形成に対して、第一の反応単位と第二の反応単位との間の共有結合形成を増強する条件下で混合される。この型の反応は、核酸をテンプレートとする合成による非天然ポリマーの生成に、特に有用であり得る。

【００１７】

１つの実施形態において、テンプレートは、捕獲可能部分、例えば、ビオチン、アビジン、もしくはストレプトアビジンに結合する。この捕獲可能部分はまた、第一および第二の反応単位がテンプレートにアニーリングされる場合、この第一の反応単位と第二の反応単位との間の反応から得られた反応生成物であり得る。捕獲可能部分が存在する場合、本方法は、反応混合物から反応生成物を濃縮する方法として、この捕獲可能部分を捕獲する工程を包含し得る。

【００１８】

したがって、この型の反応はまた、第三の反応単位が第一および／もしくは第二の反応単位と反応し得る場合にも役に立つ。言いかえると、第一の反応単位と第三の反応単位との間の反応、および／もしくは第二の反応単位と第三の反応単位との間の反応は、第一の反応単位と第二の反応単位との間の反応と非互換性であり得る。本方法は、第一の反応単位と第三の反応単位との間の共有結合形成に対して少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、もしくは少なくとも５０倍、第一の反応単位と第二の反応単位との間の共有結合形成を増強し得る。

【００１９】

別の局面において、本発明は、立体選択的な、核酸をテンプレートとする合成を行うための一連の方法を提供する。この合成の立体選択性は、特定のテンプレート、特定の移動単位、特定の反応単位、特定のハイブリダイズされたテンプレートおよび移動単位、特定の立体選択的触媒、または上記の組み合わせの選択の結果として生じ得る。結果として得られた産物は、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％、立体化学的に純粋であり得る。

【００２０】

一般的に、本方法は、（ｉ）必要に応じて反応単位に結合する第一のオリゴヌクレオチドを含有するテンプレート、および（ｉｉ）それぞれが反応単位に結合する第二のオリゴヌクレオチドを含有する、１つ以上の移動単位、を提供する工程を包含する。第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとのアニーリングは、少なくとも２つの反応単位を反応の近傍へと導き、そして反応させて、反応生成物を生成する。ここで、この反応生成物はキラル中心を含み、そしてそのキラル中心において、少なくとも６０％、より好ましくは、少なくとも８０％、そしてより好ましくは、少なくとも９５％、立体化学的に純粋である。この方法は、１つの反応単位がテンプレートに結合し、そして他の反応単位が移動単位に結合する場合に達成され得ると予期される。また、この方法が、テンプレートが反応単位を提供しない場合、そして２つの移動単位が、それらがテンプレートにアニーリングする場合に反応の近傍内へと入って反応生成物を生成する２つの反応単位を提供する場合に、達成され得ることが予期される。

【００２１】

１つのアプローチにおいて、本方法は、少なくとも２つのテンプレート、および少なくとも１つの移動単位を提供する工程を包含する。１つのテンプレートは、第一の立体化学構造を含む第一の反応単位に結合する第一のオリゴヌクレオチドを含有し、他のテンプレートは、第二の、異なる立体化学構造を有する別の第一の反応単位に結合する別の第一のオリゴヌクレオチドを含有する。この移動単位は、テンプレートの第一のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を含む第二のオリゴヌクレオチドに結合する第二の反応単位を含有する。次いで、移動単位の第二の反応単位が第一の立体化学構造の第一の反応単位かもしくは第二の立体化学構造の第一の反応単位のいずれかに優先的に反応して、反応生成物を生成することを可能にする条件下で、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとがアニーリングされる。

【００２２】
結果として得られた反応生成物は、特定の立体化学構造を有し得る。１つの実施形態において、立体化学構造、もしくはテンプレートの第一のオリゴヌクレオチドの高分子構造は、第一の反応単位の中のどれが第二の反応単位と反応するかを決定する。
【００２３】
第二のアプローチにおいて、本方法は、少なくとも１つのテンプレート、および少なくとも２つの移動単位を提供する工程を包含する。テンプレートは、第一の反応単位に結合する第一のオリゴヌクレオチドを含有する。１つの移動単位は、第一の立体化学構造を有する第二の反応単位に結合する第二のオリゴヌクレオチドを含有し、他の移動単位は、第二の、異なる立体化学構造を有する第二の反応単位に結合する別の第二のオリゴヌクレオチドを含有する。第二のオリゴヌクレオチドの配列は、第一のオリゴヌクレオチドの配列に相補的である。次いで、テンプレートの第一の反応単位が第一の立体化学構造の第二の反応単位かもしくは第二の立体化学構造を有する第二の反応単位のいずれかに優先的に反応して、反応生成物を生成することを可能にする条件下で、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとがアニーリングされる。
【００２４】
結果として得られた反応生成物は、特定の立体化学構造を有し得る。１つの実施形態において、立体化学構造、もしくは第二のオリゴヌクレオチドの高分子構造は、第二の反応単位の中のどれが第一の反応単位と反応するかを決定する。
【００２５】
第三のアプローチにおいて、本方法は、少なくとも１つのテンプレート、および少なくとも２つの移動単位を提供する工程を包含する。ここで、移動単位の１つ、もしくは必要に応じて両方は、一対の反応単位（この対の１つの反応単位は、第一の立体化学構造を有し、そしてこの対の他の反応単位は、第二の、異なる立体化学構造を有する）を含む。テンプレートは、第一のコドン配列および第二のコドン配列を含む第一の反応単位を含有する。移動単位の第一の対の１つの移動単位は、第二のオリゴヌクレオチド（第一の立体化学構造を有する第一の反応単位に結合する第一のアンチコドン配列を有する）を含む。移動単位の第一の対の他の移動単位は、別の第二のオリゴヌクレオチド（第一の反応単位の第二の立体化学構造に結合する）を含む。第二の移動単位は、第三のオリゴヌクレオチド（第二の反応単位に結合する第二のアンチコドン配列を有する）を含む。テンプレート、移動単位の第一の対、および第二の移動単位は、アニーリングされて、移動単位の第一の対のメンバーが第二の反応単位に優先的に反応して反応生成物を生成することを可能にする。結果として得られた反応生成物は、特定の立体化学構造を有し得る。
【００２６】
１つの実施形態において、立体化学構造、もしくは第二のオリゴヌクレオチドの高分子構造は、移動単位の第一の対のメンバーの中のどれが優先的に反応して、反応生成物を生成するかを決定する。
【００２７】
１つの実施形態において、本方法は、１つのテンプレート、および少なくとも二対の移動単位を提供する工程を包含する。テンプレートは、第一のコドン配列および第二のコドン配列を含有する第一のオリゴヌクレオチドを含有する。第一の対の１つの移動単位は、第一の立体化学構造を有する第一の反応単位に結合する第一のアンチコドン配列を含む第二のオリゴヌクレオチドを含有する。第一の対の別の移動単位は、第二の、異なる立体化学構造を有する第一の反応単位に結合する第一のアンチコドン配列を含む第二のオリゴヌクレオチドを含有する。移動単位の第二の対の１つの移動単位は、第一の立体化学構造を有する第二の反応単位に結合する第二の、異なるアンチコドン配列を有する第三のオリゴヌクレオチドを含有する。第二の対の他の移動単位は、第二の、異なる立体化学構造を有する第二の反応単位に結合する第二のアンチコドン配列を有する第三のオリゴヌクレオチドを含有する。テンプレート、移動単位の第一の対、および移動単位の第二の対は、アニーリングされて、移動単位の第一の対のメンバーが移動単位の第二の対のメンバーに優先

的に反応して、反応生成物を生成することを可能にする。

【００２８】

１つの実施形態において、立体化学構造、もしくは第二のオリゴヌクレオチドの高分子構造は、移動単位の第一の対のメンバーの中のどれが優先的に反応して反応生成物を生成するかを決定する。加えて、立体化学構造もしくは第三のオリゴヌクレオチドの高分子構造は、移動単位の第二の対のメンバーの中のどれが優先的に反応して反応生成物を生成するかを決定する。

【００２９】

別の局面において、本発明は、テンプレートによる合成反応の産物を濃縮する方法を提供する。本方法は、対応する複数のオリゴヌクレオチド（各オリゴヌクレオチドは、結合する反応生成物を示すヌクレオチド配列を含む）に結合する複数の反応生成物を含有する、分子の第一のライブラリを提供する工程を包含する。第一のライブラリ中の反応生成物の一部分は、予め選択された部分に結合し得る。次いで、第一のライブラリは、結合部分に結合し得る反応生成物がそうすることを可能にする条件下で、結合部分に曝される。未結合の反応生成物は除去され、次いで、結合した反応生成物は結合部分から溶出されて、結合部分に結合された反応生成物に関して、第一のライブラリに対して少なくとも１０倍、より好ましくは少なくとも５０倍に濃縮された、分子の第二のライブラリを作製する。

【００３０】

１つの実施形態において、結合部分、例えば標的生体分子（例えばタンパク質）は、固体支持体上に固定化される。別の実施形態において、第二のライブラリは、結合部分に結合する反応生成物に関して、少なくとも１００倍、もしくは少なくとも１，０００倍濃縮される。さらに、ライブラリを結合部分に曝露する工程、未結合の反応生成物を除去する工程、および結合した反応生成物を溶出する工程が（例えば、一回、二回、三回、もしくはより多くの回数）繰り返され得ることが予期される。これらの工程の繰り返しは、好ましくは、結合部分に結合する反応生成物に関して、少なくとも１０００倍、より好ましくは少なくとも１０，０００倍、もしくは、より好ましくは、少なくとも１００，０００倍濃縮された、第二のライブラリを作製する。

【００３１】

１つの実施形態において、選択されたライブラリメンバーに結合されたオリゴヌクレオチドは、反応生成物を予め選択された結合部分によって結合可能にさせた第一の反応単位を同定する、第一の配列を含む。好ましくは、このオリゴヌクレオチドはまた、反応生成物を予め選択された結合部分によって結合可能にさせた第二の反応単位を同定する第二の配列を含む。選択されたライブラリメンバーに結合されたオリゴヌクレオチドをシークエンシングすることによって、どんな反応物が互いに反応して反応生成物を生成したかを決定することが可能である。したがって、このアプローチを用いて、反応の過程から、選択されたライブラリメンバーの構造を推論することが可能である。

【００３２】

本方法は、濃縮された反応生成物に結合するオリゴヌクレオチドを増幅する工程、および好ましくは、増幅されたオリゴヌクレオチドの配列を決定する工程を、さらに包含する。さらに、反応生成物は、このオリゴヌクレオチドの配列内にコードされた情報を用いることによって、さらに特徴化され得る。例えば、このオリゴヌクレオチドの配列が決定され得、次いで、この配列から、どんな反応単位が反応して反応生成物を生成したかを決定することが可能である。同様のアプローチを用いて、反応生成物を生成する新しい化学反応の存在を同定することが可能である。

【００３３】

別の局面において、本発明は、新しい化学反応の存在を同定するための種々の方法を提供する。１つのアプローチは、対応する複数のオリゴヌクレオチドに（各オリゴヌクレオチドは、結合する反応生成物を示すヌクレオチド配列を含む）結合する複数の反応生成物を含有する、分子のライブラリを提供する工程を包含する。次いで、その対応するオリゴヌクレオチドに結合する特定の反応生成物が選択され、そして特徴化される。この反応生

成物の特徴化、および反応して反応生成物を生成した反応単位の同定に続いて、反応生成物を生成するのに必要な、１つ以上の新しい化学反応を同定することが可能である。

【００３４】

１つの実施形態において、本方法は、反応生成物の選択の後、その対応するオリゴヌクレオチドを増幅する工程を、さらに包含する。次いで、増幅されたオリゴヌクレオチドは、どんな反応単位が反応して反応生成物を生成したかを同定するために、シークエンシングされ得る。オリゴヌクレオチドはまた、より多くの選択された反応生成物の調製に使用するために、増幅され得る。１つの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、突然変異させられ得、そして、結果として得られた突然変異したオリゴヌクレオチドは、第二世代のライブラリの作製に使用され得る。

【００３５】

第二のアプローチは、（ｉ）テンプレート、および（ｉｉ）第一の移動単位、を提供する工程を包含する。テンプレートは、コドンを含む第一のオリゴヌクレオチドに結合する第一の反応単位を含有する。移動単位は、このコドンにアニーリングし得るアンチコドンを含む第二のオリゴヌクレオチドに結合する第二の反応単位を含有する。オリゴヌクレオチドは、アニーリングされて、第一および第二の反応単位を反応の近傍へと導く。共有結合形成反応が反応単位の間に生じて、反応生成物を生成する。次いで、反応生成物が特徴化され、そして、テンプレートによってコードされた、反応して反応生成物を生成した第一および第二の反応単位を同定するための情報を用いて、反応生成物を生成するのに必要な新しい化学反応が同定される。本方法はまた、その特徴化の前に反応生成物を選択する工程を包含する。

【００３６】

第三のアプローチにおいて、本発明は、少なくとも（ｉ）テンプレート、（ｉｉ）第一の移動単位、および（ｉｉｉ）第二の移動単位、を提供する工程を包含する。第一の移動単位は、第一のオリゴヌクレオチドに結合する第一の反応単位を含む。第二の移動単位は、第二のオリゴヌクレオチドに結合する第二の反応単位を含む。テンプレートは、第一および第二のオリゴヌクレオチドにアニーリングし得る配列を含む。本方法の間、このオリゴヌクレオチドはテンプレートにアニーリングされて、これらの反応単位を反応の近傍に導き、そして共有結合形成反応が反応単位の間に生じて反応生成物を生成する。次いで、例えば、テンプレートによってコードされた、互いに反応して反応生成物を生成した第一および第二の反応単位を同定するための情報を用いて、反応生成物が特徴化される。この特徴化に基づいて、次いで、反応生成物を生成するのに必要な１つ以上の新しい化学反応を同定することが可能である。本方法はまた、その特徴化の前に反応生成物を選択する工程を包含する。

【００３７】

本発明の方法は、少数のテンプレートおよび移動単位に対して有用であるが、多数のテンプレート（例えば、１０、５０、１００、１０００、もしくはそれより多数）および各コドンに対する移動単位（例えば、１０、２０、３０、５０、もしくはそれより多数）の使用は、分子の大きなライブラリの合成を可能にし、これは、増幅によって生じる感受性を使用して、同時にスクリーニングされ得る。

【００３８】

本発明は例えば、以下の項目を提供する。

（項目１）

核酸テンプレート化学反応の間の第一反応単位と第二反応単位との間の反応を誘導する方法であって、該方法は、以下の工程：

（ａ）（ｉ）コドンを含む第一オリゴヌクレオチドと結合する第一反応単位を含むテンプレートおよび（ｉｉ）該コドンをアニーリング可能なアンチコドンを含む第二オリゴヌクレオチドと結合する第二反応単位を含む移動単位を提供する工程であって、ここで該コドンまたは該アンチコドンは、第一間隙領域および第二間隙領域を含む、工程；

（ｂ）該第一反応単位および該第二反応単位を反応性近傍に導くため該オリゴヌクレオ

チドを共にアニーリングする工程であって、ここで該第一間隙領域および第二間隙領域を有する該コドンまたは該アンチコドンは、対応するアンチコドンまたはコドンとアニールされないオリゴヌクレオチドのループを生じる、工程；ならびに
（ｃ）反応生成物を産生するために該反応単位との間に共有結合形成反応を誘導する工程、を包含する方法。
（項目２）
前記反応単位の少なくとも一つは、その対応するオリゴヌクレオドの隣接した末端領域に付着される、項目１に記載の方法。
（項目３）
それぞれの前記反応単位は、その対応するオリゴヌクレオチドの隣接する末端部分に付着される、項目２に記載の方法。
（項目４）
前記コドンまたは前記アンチコドンは、その対応する反応単位から少なくとも１０塩基離れて配置される、項目１、２、または３に記載の方法。
（項目５）
前記コドンまたは前記アンチコドンは、その対応する反応単位から少なくとも２０塩基離れて配置される、項目１、２、または３に記載の方法。
（項目６）
前記コドンまたは前記アンチコドンは、その対応する反応単位に直接的に隣接して配置される、項目１、２、または３に記載の方法。
（項目７）
前記第一間隙領域および前記第二間隙領域を含む前記コドンまたは前記アンチコドンにおいて、該第一領域は、その対応するオリゴヌクレオチドの末端に直接的に隣接して配置される、項目１に記載の方法。
（項目８）
前記コドンまたは前記アンチコドンの前記第一領域は、３、４、または５個の隣接したヌクレオチドを含む、項目１または７に記載の方法。
（項目９）
前記コドンまたは前記アンチコドンの前記第一領域は、５個の隣接したヌクレオチドを含む、項目１または７に記載の方法。
（項目１０）
前記第二領域は、前記反応単位から少なくとも２０塩基離れて配置される、項目１または７に記載の方法。
（項目１１）
前記第二領域は、前記反応単位から少なくとも３０塩基離れて配置される、項目１または７に記載の方法。
（項目１２）
前記第一反応単位は、前記第一オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目１に記載の方法。
（項目１３）
前記第二反応単位は、前記第二オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目１または１２に記載の方法。
（項目１４）
核酸テンプレート化学反応の間の第一反応単位と第二反応単位との間の反応を誘導する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）近位端および遠位端を有する第一オリゴヌクレオチドと結合する第一反応単位を含み、ならびにコドン含むテンプレート、そして（ｉｉ）該コドンを用いてアニーリング可能なアンチコドンを含む第二オリゴヌクレオチドと結合する第二反応単位を含む移動単位を提供する工程であって、ここで該第一反応単位は、該第一オリゴヌクレオチドの該近位端および該遠位端の中間にある付着部位に付着される、工程；

（ｂ）該第一反応単位および該第二反応単位を反応性近傍に導くため該オリゴヌクレオチドを共にアニーリングする工程、；ならびに
（ｃ）反応生成物を産生するために該反応単位の間に共有結合形成反応を誘導する工程、を包含する方法。
（項目１５）
前記テンプレートは、第二の、異なるアンチコドン配列をアニーリングすることが可能な第二の、異なるコドンを含む、項目１４に記載の方法。
（項目１６）
前記第一反応単位の前記付着部位に対して、前記第一コドンは、近位に位置され、そして前記第二コドンは、遠位に位置される、項目１５に記載の方法。
（項目１７）
前記第二コドンをアニーリングすることが可能である第二の、異なるアンチコドン配列を含む第三オリゴヌクレオチドと結合する第三反応単位を含む第二移動単位を提供することをさらに包含する、項目１５または１６に記載の方法。
（項目１８）
前記第一移動単位の前記第一アンチコドンは、前記テンプレートの前記第一コドンをアニールし、前記第二移動単位の前記第二アンチコドンは、該テンプレートの前記第二コドンをアニールする、項目１７に記載の方法。
（項目１９）
前記第一移動単位は、前記第二移動単位と同時に、前記テンプレートとアニールし、その結果、前記第二反応単位および前記第三反応単位は、前記第一反応単位と反応する、項目１８に記載の方法。
（項目２０）
前記第一反応単位は、前記第一オリゴヌクレオチドに対して、共有結合される、項目１４に記載の方法。
（項目２１）
前記第二反応単位は、前記第二オリゴヌクレオチドに対して、共有結合される、項目１４または２０に記載の方法。
（項目２２）
前記第三反応単位は、前記第三オリゴヌクレオチドに対して、共有結合される、項目１７に記載の方法。
（項目２３）
前記第一反応単位は、足場分子である、項目１４に記載の方法。
（項目２４）
核酸テンプレート合成における複数の反応物の中で反応選択性を増加する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）所定のコドン配列を含む第一オリゴヌクレオチドと結合する第一反応単位を含むテンプレート、（ｉｉ）該コドン配列をアニーリングすることが可能なアンチコドン配列を含む第二オリゴヌクレオチドと結合する第二反応単位を含む第一移動単位、および（ｉｉｉ）該コドン配列をアニーリングすることが可能であるアンチコドン配列を有しない第三オリゴヌクレオチドと結合する第二反応単位とは異なる第三反応単位を含む第二移動単位を提供する工程；ならびに
（ｂ）該第三反応単位と該第一反応単位との間の共有結合形成と比較して該第二反応単位と該第一反応単位との間の共有結合形成を高めるために、該テンプレートの該第一オリゴヌクレオチドに対する該第一移動単位の該第二オリゴヌクレオチドのアニーリングを可能とする条件の下、該テンプレート、該第一移動単位および第二移動単位を混合する工程、
を包含する、方法。
（項目２５）
前記テンプレートは、捕捉可能な部分と結合される、項目２４に記載の方法。

（項目２６）
前記第一移動単位は、捕捉可能な部分と結合される、項目２４に記載の方法。
（項目２７）
前記第二移動単位は、捕捉可能な部分と結合される、項目２４に記載の方法。
（項目２８）
前記捕捉可能な部分は、ビオチン、アビジン、およびストレプトアビジンよりなる群から選択される、項目２５、２６、または２７に記載の方法。
（項目２９）
前記捕捉可能な部分を捕捉する工程をさらに包含する、項目２８に記載の方法。
（項目３０）
前記第一反応単位は、前記第一オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目２４に記載の方法。
（項目３１）
前記第二反応単位は、前記第二オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目２４に記載の方法。
（項目３２）
前記第三反応単位は、前記第三オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目２４に記載の方法。
（項目３３）
前記第二反応単位および前記第三反応単位は、前記第一反応単位と独立に反応することが可能である、項目２４に記載の方法。
（項目３４）
前記第二反応単位および前記第三反応単位は、相互に反応することが可能である、項目２４または３３に記載の方法。
（項目３５）
前記第二反応単位と前記第三反応単位との間の反応は、前記第一反応単位との、これらそれぞれの反応と両立しない、項目３４に記載の方法。
（項目３６）
複数の移動単位を提供する工程を包含する、項目２４に記載の方法。
（項目３７）
核酸テンプレート合成における複数の反応物の中で反応選択性を増加する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）第一コドン配列および第二コドン配列を含む第一オリゴヌクレオチドを含むテンプレート、（ｉｉ）該第一コドン配列をアニーリングすることが可能な第一アンチコドン配列を含む第二オリゴヌクレオチドと結合する第一反応単位を含む第一移動単位、（ｉｉｉ）前記第二コドン配列をアニーリングすることが可能である第二アンチコドン配列を含む第三オリゴヌクレオチドと結合する第二反応単位を含む第二移動単位、および（ｉｖ）該第一コドン配列または該第二コドン配列をアニーリングすることが可能であるアンチコドン配列を有しない第四オリゴヌクレオチドと結合する第三反応単位を含む第三移動単位を提供する工程；ならびに
（ｂ）該第三反応単位と該第一反応単位との間または、該第三反応単位と該第二反応単位との間の共有結合形成と比較して該第一反応単位と該第二反応単位との間の共有結合形成を高めるために、該第一コドン配列に対する該第一アンチコドン配列のアニーリングならびに該第二コドン配列に対する該第二アンチコドン配列のアニーリングを可能とする条件の下、該テンプレート、該第一移動単位、第二移動単位、および第三移動単位を混合する工程、
を包含する、方法。
（項目３８）
前記テンプレートは、捕捉可能な部分と結合される、項目３７に記載の方法。
（項目３９）

前記捕捉可能な部分は、ビオチン、アビジン、およびストレプトアビジンよりなる群から選択される、項目３８に記載の方法。
（項目４０）
前記捕捉可能な部分は、前記第一移動単位および前記第二移動単位が、前記テンプレートにアニールされる場合、前記第一反応単位と前記第二反応単位との間反応より生じる反応生成物である、項目３８に記載の方法。
（項目４１）
前記第一反応単位は、前記第二オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目３７に記載の方法。
（項目４２）
前記第二反応単位は、前記第三オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目３７に記載の方法。
（項目４３）
前記第三反応単位は、前記第四オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目３７に記載の方法。
（項目４４）
前記第三反応単位は、前記第一反応単位または第二反応単位と反応することが可能である、項目３７に記載の方法。
（項目４５）
前記第三反応単位は、前記第一反応単位および第二反応単位と反応することが可能である、項目３７に記載の方法。
（項目４６）
前記第三反応単位と前記第一反応単位との間の反応は、該第一反応単位と該第二反応単位との間の反応と両立しない、項目４４または４５に記載の方法。
（項目４７）
前記第三反応単位と前記第二反応単位との間の反応は、該第一反応単位と該第二反応単位との間の反応と両立しない、項目４４または４５に記載の方法。
（項目４８）
前記第一反応単位と第二反応単位との間の前記共有結合形成は、位置選択的距離依存性反応を介する、項目３７に記載の方法。
（項目４９）
立体選択的核酸テンプレート合成を実施する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）反応単位と必要に応じて結合する第一オリゴヌクレオチドを含むテンプレート、および（ｉｉ）反応単位と結合する第二オリゴヌクレオチドをそれぞれ含む一以上の移動単位を提供する工程；
（ｂ）少なくとも二つの該反応単位を、反応性近傍へと導き、反応生成物を形成するために該反応単位との間の共有結合の形成を誘導するために、該第一オリゴヌクレオチドおよび該第二ヌクレオチドをアニーリングする工程であって、ここで該反応生成物は、キラル中心を含み、そして該キラル中心で少なくとも６０％の立体化学的な純度である、工程、
を包含する、方法。
（項目５０）
前記反応生成物は、前記キラル中心で少なくとも８０％の立体化学的な純度である、項目４９に記載の方法。
（項目５１）
前記反応生成物は、前記キラル中心で少なくとも９５％の立体化学的な純度である、項目４９に記載の方法。
（項目５２）
前記反応生成物は、前記キラル中心で少なくとも９９％の立体化学的な純度である、項目４９に記載の方法。

（項目５３）
前記キラル中心は、前記反応生成物における前記共有結合に関係する原子にある、項目４９に記載の方法。
（項目５４）
立体選択的核酸テンプレート合成を実施する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）一つのテンプレートは、第一の立体化学的な構造を有する第一反応単位と結合する第一オリゴヌクレオチドを含み、およびその他のテンプレートは、第二の、異なる立体化学的な構造を有する第一反応単位と結合する第一オリゴヌクレオチドを含む、少なくとも、二つのテンプレート、ならびに（ｉｉ）第二オリゴヌクレオチドと結合する第二反応単位を含む少なくとも一つの移動単位、を提供する工程であって、ここで該第二オリゴヌクレオチドの配列は、該第一オリゴヌクレオチドの配列に相補的である、工程；ならびに、
（ｂ）該移動性単位の該第一反応単位が、反応生成物を産生するために該第一の立体化学的な構造を有する該第一反応単位または、第二の立体化学的な構造を有する該第二反応単位のいずれかと優先的に反応することを可能とする条件の下、該第一オリゴヌクレオチドおよび該第二オリゴヌクレオチドを共にアニーリングする工程、
を包含する、方法。
（項目５５）
立体選択的の核酸テンプレート合成を実施する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）第一反応単位に結合する第一オリゴヌクレオチドを含むテンプレート、ならびに（ｉｉ）一つの移動単位は、第一の立体化学的な構造を有する第二反応単位と結合する第二オリゴヌクレオチドを含み、およびその他の移動単位は、第二の、異なる立体化学的な構造を有する第二反応単位と結合する該第二オリゴヌクレオチドを含む、少なくとも二つの移動単位、を提供する工程であって、ここで該第二オリゴヌクレオチドの配列は、該第一オリゴヌクレオチドの配列に相補的である、工程；ならびに
（ｂ）該テンプレートの該第一反応単位が、反応生成物を産生するために該第一の立体化学的な構造を有する該第二反応単位または、第二の立体化学的な構造を有する該第二反応単位のいずれかと優先的に反応することを可能とする条件の下、該第一オリゴヌクレオチドおよび該第二オリゴヌクレオチドを共にアニーリングする工程、
を包含する、方法。
（項目５６）
前記反応生成物は、特定の立体化学的な構造を有する、項目５４または、５５に記載の方法。
（項目５７）
前記第一オリゴヌクレオチドの立体化学的な構造または、高分子のコンフォメーションは、どの前記第一反応単位が、前記第二反応単位と優先的に反応するのかを、決定する、項目５４に記載の方法。
（項目５８）
前記第二オリゴヌクレオチドの立体化学的な構造または、高分子のコンフォメーションは、どの前記第二反応単位が、前記第一反応単位と優先的に反応するのかを、決定する、項目５５に記載の方法。
（項目５９）
項目５４～５８の任意の一つの方法により、産生される反応生成物。
（項目６０）
立体選択的核酸テンプレート合成を実施する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）第一コドン配列および第二コドン配列を含む第一オリゴヌクレオチドを含むテンプレート、（ｉｉ）移動単位の第一対であって、ここで、該第一対の一つの移動単位は、第一の立体化学的な構造を有する第一反応単位と結合する第一アンチコドン配列を伴う第二オリゴヌクレオチドを含み、該第一対のその他の移動単位は、第二の立体化学的な構造を有する該第一反応単位と結合する該第二オリゴヌクレオチドを含む、第一対、な

らびに（ｉｉｉ）移動単位の第二対であって、ここで、該第二対の一つの移動単位は、第一の立体化学的な構造を有する第二反応単位と結合する第二アンチコドン配列を伴う第三オリゴヌクレオチドを含み、該第二対のその他の移動単位は、第二の立体化学的な構造を有する該第二反応単位と結合する該第三オリゴヌクレオチドを含む、第二対、を提供する工程；そして、

（ｂ）移動単位の該第一対のメンバーが、反応生成物を産生するために移動単位の該第二対のメンバーと優先的に反応することを可能とする条件の下、該テンプレート、移動単位の該第一対、および移動単位の該第二対をアニーリングする工程、

を包含する、方法。

（項目６１）

前記反応生成物は、特定の立体化学的な構造を有する、項目６０に記載の方法。

（項目６２）

前記第二オリゴヌクレオチドの立体化学的な構造または、高分子のコンフォメーションは、どの移動単位の前記第一対のメンバーが、前記反応生成物を産生するために優先的に反応するのかを、決定する、項目６０に記載の方法。

（項目６３）

前記第三オリゴヌクレオチドの立体化学的な構造または、高分子のコンフォメーションは、どの移動単位の前記第二対のメンバーが、前記反応生成物を産生するために優先的に反応するのかを、決定する、項目６０または６２に記載の方法。

（項目６４）

項目６０～６３の任意の一つの方法により、産生される反応生成物。

（項目６５）

核酸テンプレート合成生成物を濃縮する方法であって、該方法は、以下の工程：

（ａ）対応する複数のオリゴヌクレオチドに結合す複数の反応生成物を含む、分子の第一ライブラリーを提供する工程であって、ここで、各オリゴヌクレオチドは、該ヌクレオチドと共に結合する反応生成物を示すヌクレオチド配列を含み、およびここで、該反応生成物の一部は、予め選択された結合部分に結合することが可能である工程；

（ｂ）該結合部分に結合可能な反応生成物が該結合部分に対して結合することを可能とする条件の下、該結合部分に分子の該第一ライブラリーを曝す工程；

（ｃ）非結合性の反応生成物を除去する工程；ならびに

（ｄ）該第一ライブラリーと比較して該結合部分に結合する反応生成物について少なくとも５０倍に濃縮された分子の第二ライブラリーを産生するため該結合部分から結合性の反応生成物を溶出する工程、

を包含する、方法。

（項目６６）

工程（ｂ）において、前記結合部分は、固体支持体上に固定化される、項目６５に記載の方法。

（項目６７）

前記結合部分は、標的生体分子である、項目６５または６６に記載の方法。

（項目６８）

前記標的生体分子は、タンパク質である、項目６７に記載の方法。

（項目６９）

工程（ｄ）において、前記第二ライブラリーは、前記結合部分に結合する反応生成物について少なくとも１００倍に濃縮される、項目６５に記載の方法。

（項目７０）

工程（ｄ）において、前記第二ライブラリーは、前記結合部分に結合する反応生成物について少なくとも１，０００倍に濃縮される、項目６５に記載の方法。

（項目７１）

工程（ｂ）、（ｃ）、および（ｄ）の繰り返しをさらに含む、項目６５に記載の方法。

（項目７２）

工程（ｂ）、（ｃ）、および（ｄ）の繰り返しは、前記結合部分に結合する反応生成物について少なくとも１０，０００倍まで濃縮された第三のライブラリーを産生する、項目７１に記載の方法。
（項目７３）
前記ライブラリーは、前記結合部分に結合する反応生成物について少なくとも１００，０００倍まで濃縮される、項目７２に記載の方法。
（項目７４）
前記オリゴヌクレオチドは、前記予め選択された結合部分に結合可能な前記反応生成物を産生する第一反応単位を同定する第一配列を含む、項目６５に記載の方法。
（項目７５）
前記オリゴヌクレオチドは、前記予め選択された結合部分に結合可能な前記反応生成物を産生する第二反応単位を同定する第二配列を含む、項目７４に記載の方法。
（項目７６）
濃縮された反応生成物に結合するオリゴヌクレオチドを増幅するさらなる工程を包含する、項目６５または７１に記載の方法。
（項目７７）
濃縮された反応生成物に結合するオリゴヌクレオチドの配列を決定するさらなる工程を包含する、項目６５、７１、７４、または７５に記載の方法。
（項目７８）
増幅されたオリゴヌクレオチドの配列を決定するさらなる工程を包含する、項目７６に記載の方法。
（項目７９）
前記オリゴヌクレオチドの前記配列の情報から前記反応生成物を特徴付ける工程をさらに含む、項目７７に記載の方法。
（項目８０）
前記反応生成物を産生する新しい化学反応を同定する工程をさらに含む、項目７９に記載の方法。
（項目８１）
前記オリゴヌクレオチドの前記配列の情報から反応生成物を特徴付ける工程をさらに含む、項目７８に記載の方法。
（項目８２）
前記反応生成物を産生する新しい化学反応を同定する工程をさらに含む、項目８１に記載の方法。
（項目８３）
前記反応生成物は、対応する複数のオリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目６５に記載の方法。
（項目８４）
新しい化学反応を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）対応する複数のオリゴヌクレオチドに結合する複数の反応生成物を含む分子のライブラリーを提供する工程であって、ここで各オリゴヌクレオチドは、該ヌクレオチドに結合する反応生成物を示すヌクレオチド配列を含む工程；
（ｂ）その対応するオリゴヌクレオチドに結合する特定の反応生成物を選択する工程；
（ｃ）反応生成物を特徴付ける工程；および
（ｄ）該対応するオリゴヌクレオチドによりコードされる情報を使用することにより、反応生成物を生じる新しい化学反応を同定する工程、
を包含する、方法。
（項目８５）
工程（ｃ）は、どの反応単位が、反応生成物を産生するか同定するために前記対応するオリゴヌクレオチドの配列を決定する工程を含む、項目８４に記載の方法。
（項目８６）

その前記対応するオリゴヌクレオチドを増幅する、工程（ｂ）の後のさらなる工程を包含する、項目８４に記載の方法。
（項目８７）
反応生成物は、その対応するオリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目８４に記載の方法。
（項目８８）
新しい化学反応を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）コドンを含む第一オリゴヌクレオチドに結合する第一反応単位を含むテンプレート、ならびに（ｉｉ）アンチコドンを含む第二オリゴヌクレオチドに結合する第二反応単位を含む移動単位、を提供する工程であって、ここで該コドンおよび該アンチコドンは、共にアニーリング可能である工程；
（ｂ）該第一反応単位および該第二反応単位を反応性近傍へ導くために、オリゴヌクレオチドを共にアニーリングする工程；
（ｃ）反応生成物を産生するために該反応単位との間に共有結合形成反応を誘導する工程；
（ｄ）反応生成物を特徴付ける工程；そして
（ｅ）反応生成物を産生するために反応された第一反応単位および第二反応単位を同定するためのテンプレートによりコードされる情報を使用することにより、反応生成物を生じるための新しい化学反応を同定する工程、
を、包含する方法。
（項目８９）
工程（ｃ）の後であるが工程（ｄ）の前である反応生成物を選択する、工程をさらに含む、項目８８に記載の方法。
（項目９０）
工程（ａ）において、移動単位またはテンプレートは、捕捉可能な部分に結合する、項目８９に記載の方法。
（項目９１）
前記捕捉可能な部分は、ビオチン、アビジン、およびストレプトアビジンよりなる群から選択される、項目９０に記載の方法。
（項目９２）
前記捕捉可能な部分は、ビオチンである、項目９１に記載の方法。
（項目９３）
反応生成物に結合した前記ビオチンは、固体支持体に結合したアビジンまたはストレプトアビジンにより、捕捉される、項目９２に記載の方法。
（項目９４）
前記第一反応単位は、前記第一オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目８８に記載の方法。
（項目９５）
前記第二反応単位は、前記第二オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目８８または９４に記載の方法。
（項目９６）
新しい化学反応を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：
（ａ）（ｉ）第一オリゴヌクレオチドに結合する第一反応単位を含む第一移動単位、（ｉｉ）第二オリゴヌクレオチドに結合する第二反応単位を含む第二移動単位、および（ｉｉｉ）該第一オリゴヌクレオチドおよび該第二オリゴヌクレオチドに対してアニーリング可能な配列を有するテンプレート、を提供する工程；
（ｂ）該第一反応単位および該第二反応単位を反応性近傍へ導く、該テンプレートへ該オリゴヌクレオチドをアニーリングする工程；
（ｃ）反応生成物を産生するために該反応単位との間に共有結合形成反応を誘導する工程；

（ｄ）該反応生成物を特徴付ける工程；そして
（ｅ）反応生成物を産生するために反応する該第一反応単位および該第二反応単位を同定するためのテンプレートによりコードされる情報を使用することにより、反応生成物を生じるための新しい化学反応を同定する工程、
を、包含する方法。
（項目９７）
工程（ｃ）の後であるが工程（ｄ）の前に、反応生成物を選択する、工程をさらに含む、項目９６に記載の方法。
（項目９８）
工程（ａ）において、前記テンプレート、前記第一移動単位または前記第二移動単位は、捕捉可能な部分に結合される、項目９６に記載の方法。
（項目９９）
前記捕捉可能な部分は、ビオチン、アビジン、およびストレプトアビジンよりなる群から選択される、項目９８に記載の方法。
（項目１００）
前記捕捉可能な部分は、ビオチンである、項目９９に記載の方法。
（項目１０１）
前記反応生成物に結合した前記ビオチンは、固体支持体に結合したアビジンまたはストレプトアビジンにより、捕捉される、項目１００に記載の方法。
（項目１０２）
前記第一反応単位は、前記第一オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目９６に記載の方法。
（項目１０３）
前記第二反応単位は、前記第二オリゴヌクレオチドに対して共有結合される、項目９６または１０２に記載の方法。
【００３９】
（定義）
本明細書中で使用される場合、用語「結合する」は、２つ以上の基、部分、化合物、モノマーなどの間（ｂｅｔｗｅｅｎ）、もしくはそれらの中（ａｍｏｎｇ）での相互作用を説明する。２つ以上の実体が、本明細書中で記載されるように、互いに「結合する」場合、それらは、直接的もしくは間接的な共有結合性または非共有結合性相互作用によって連結される。好ましくは、この結合は、共有結合性である。共有結合は、例えば（しかし、限定ではない）、アミド、エステル、炭素－炭素、ジスルフィド、カルバメート、エーテル、チオエーテル、尿素、アミン、もしくは炭酸連結を通してであり得る。この共有結合はまた、リンカー部分、例えば、光開裂性リンカーであり得る。望ましい非共有結合性相互作用としては、水素結合、ファンデルワールス相互作用、双極－双極相互作用、πスタッキング相互作用、疎水性相互作用、磁気相互作用、静電気的相互作用などが挙げられる。また、２つ以上の実体もしくは薬剤は、同じ組成物中に共に存在することによって、互いに「結合」し得る。
【００４０】
本明細書中で使用される場合、用語「生物学的高分子」とは、ポリヌクレオチド（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド）、タンパク質、ペプチド、脂質、もしくは多糖体を指す。生物学的高分子は、天然に生じ得るか、もしくは非天然に生じ得る。好ましい実施形態において、生物学的高分子は、約５，０００ダルトンより大きい分子量を有する。
【００４１】
本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、もしくは「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのポリマーを指す。このポリマーとしては（限定ではなく）、天然ヌクレオシド（すなわち、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオ

キシシチジン）、ヌクレオシドアナログ（例えば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニル－ウリジン、Ｃ５－プロピニル－シチジン、Ｃ５－メチルシチジン、７－デアザアデノシン、８－オキソアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、および２－チオシチジン）、化学的に改変された塩基、生物学的に改変された塩基（例えば、メチル化された塩基）、インターカレートされた塩基、改変された糖（例えば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）、または改変されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエート、および５’－Ｎ－ホスホラミダイト連結）が挙げられる。核酸およびオリゴヌクレオチドはまた、改変された骨格（例えば、ロックト（ｌｏｃｋｅｄ）核酸（ＬＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、および増幅技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、もしくは非酵素性テンプレート指向性複製）を用いた増幅反応のためのテンプレートとして働き得る任意の他のポリマー）を有する塩基の他のポリマーを含む。

【００４２】

本明細書中で使用される場合、用語「低分子」とは、実験室で合成されたか、もしくは天然で見られるかのいずれかである、１０，０００グラム／モルより小さい（必要に応じて、５，０００グラム／モルより小さい、そして必要に応じて、２，０００グラム／モルより小さい）分子量を有する有機化合物を指す。

【００４３】

本明細書中で使用される場合、用語「低分子足場」もしくは「分子足場」とは、少なくとも１つの、機能付与に適切な部位もしくは化学的部分を有する化学的化合物を指す。この低分子足場はもしくは分子足場は、２、３、４、５、もしくはそれより多くの機能付与に適切な部位もしくは化学的部分を有し得る。これらの機能付与部位は、当業者によって理解されるように、保護もしくは遮蔽され得る。この部位はまた、基本となる環状構造および骨格上に見られ得る。

【００４４】

本明細書中で使用される場合、用語「移動単位」とは、例えば（限定ではないが）、基礎的要素（ｂｕｉｌｄｉｎｇ　ｂｌｏｃｋ）、モノマー、モノマー単位、分子足場、もしくはテンプレート介在性化学合成に有用な他の反応物を含む反応単位に結合するアンチコドン配列を有するオリゴヌクレオチドを含有する分子、を指す。

【００４５】

本明細書中で使用される場合、用語「テンプレート」とは、少なくとも１つの、テンプレート介在性化学合成に適切なコドン配列を有するオリゴヌクレオチドを含有する分子、を指す。このテンプレートは、必要に応じて、（ｉ）複数のコドン配列、（ｉｉ）増幅手段（例えば、ＰＣＲプライマー結合部位もしくはそれに相補的な配列）、（ｉｉｉ）それらに結合する反応単位、（ｉｖ）（ｉ）と（ｉｉ）との組み合わせ、（ｖ）（ｉ）と（ｉｉ）との組み合わせ、（ｖｉ）（ｉｉ）と（ｉｉｉ）との組み合わせ、または（ｉ）と（ｉｉ）と（ｉｉｉ）との組み合わせ、を含み得る。

【００４６】

用語「コドン」および「アンチコドン」とは、本明細書中で使用される場合、移動単位を、テンプレート媒介性化学合成の間にテンプレートにアニールさせる、それぞれ、テンプレートおよび移動単位における相補的オリゴヌクレオチド配列をいう。

【００４７】

詳細な説明全体をとおして、組成物が、特定の成分を有する（ｈａｖｉｎｇ）か、含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）か、または含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）と記載される場合、あるいはプロセスが特定のプロセス工程を有する（ｈａｖｉｎｇ）か、含む（包含する）（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）か、または含む（包含する）（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）と記載される場合、本発明の組成物はまた、その記載される成分から本質的になるか、またはその記

載される成分からなること、および本発明のプロセスはまた、その記載されたプロセシング工程から本質的になるか、またはその記載されたプロセシング工程からなることが予測される。さらに、工程の順序または特定の行為を行う順序は、本発明が実施可能である限り、重要ではないことが理解されるべきである。さらに、２以上の工程または行為が、同時に行われ得る。

【図面の簡単な説明】

【００４８】

【図１】図１は、一本鎖核酸テンプレートにより触媒される相補的オリゴヌクレオチドの既知の配列特異的オリゴマー化を示す。

【図２】図２は、反応単位が合成の開始時にテンプレートに結合される、核酸テンプレート合成の一実施形態の模式図である。

【図３】図３は、反応単位が合成の開始時にテンプレートに結合されない、核酸テンプレート合成の第２の実施形態の模式図である。

【図４】図４は、ポリマー合成に適した、核酸テンプレート合成の第３の実施形態の模式図である。

【図５】図５Ａ～Ｆは、核酸テンプレート合成において有用な、種々の例示的テンプレートの模式図である。

【図６】図６Ａ～Ｅは、テンプレートのコドンと、移動単位のアンチコドンとの間のあり得る望ましい相互作用および望ましくない相互作用の模式図である。

【図７】図７Ａ～Ｇは、核酸テンプレート合成において有用な種々のテンプレート構成の模式図である。

【図８】図８は、５’末端から３’末端へ向かって、低分子官能基、ＤＮＡヘアピン、アニーリング領域、コード領域、およびＰＣＲプライマー結合部位を含む、テンプレートを生成するための方法の模式図である。

【図９】図９は、反応生成物のライブラリーを作成するための一般的方法の模式図である。

【図１０】図１０は、標的タンパク質の有効濃度と、その標的に結合するリガンドの割合との間の関係を示すグラフである。

【図１１】図１１Ａ～Ｂは、結合切断触媒（図１１Ａ）および結合形成触媒（図１１Ｂ）についてのライブラリーをスクリーニングするための方法の模式図である。

【図１２】図１２は、結合形成反応の非天然ポリマー触媒を同定するためのインビトロ選択スキームの模式図である。

【図１３】図１３は、結合切断反応の非天然ポリマー触媒を同定するためのインビトロ選択スキームの模式図である。

【図１４】図１４は、テンプレートライブラリーを多様化するための組換え方法における例示的試薬およびその使用の模式図である。

【図１５】図１５は、ヘアピン（Ｈ）ＤＮＡテンプレートおよびヘリックス末端（ｅｎｄ－ｏｆ－ｈｅｌｉｘ）（Ｂ）ＤＮＡテンプレートにより指向される合成反応を示す。反応物を、示された反応時間の後に、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）により分析する。レーン３および４は、反応前に過剰なβ－メルカプトエタノールでクエンチしたテンプレートを含んだ。

【図１６】図１６は、チオール（Ｓ）または一級アミン（Ｎ）に連結されたマッチ（Ｍ）またはミスマッチ（Ｘ）の試薬と、種々の求核剤で官能化されたテンプレートとの間の反応の結果を示す。

【図１７】図１７Ａ～１７Ｂは、変性ＰＡＧＥによって分析される種々のミスマッチ反応物を示す。図１７Ａは、ヨードアセトアミド基に連結されたＨテンプレートが、０個のミスマッチ、１個のミスマッチまたは３個のミスマッチを含むチオール試薬と２５０℃で反応された、反応結果を示す。図１７Ｂは、図１７Ａにおける反応が、その示された温度で１６時間にわたって反復された、反応結果を示す。

【図１８】図１８は、４１塩基のＢテンプレートおよびテンプレートの５’末端に由来す

る１～３０塩基をアニールするように設計された１０塩基試薬を使用して行われた反応を示す。
【図１９】図１９は、５’－ＮＨ２－ｄＴの後ろの９塩基が、種々の骨格アナログと置き換えられた、図１８におけるｎ＝１０反応の反復を示す。
【図２０】図２０は、１２．５ｎＭ、２５ｎＭ、６２．５ｎＭまたは１２５ｎＭのテンプレートおよび試薬の濃度で反復した図１８において記載されたｎ＝１およびｎ＝１０のミスマッチ（ｍｉｓ）反応を示す。
【図２１Ａ】図２１Ａ～２１Ｂは、ＤＮＡコードライブラリーに由来するストレプトアビジンを結合する合成分子を翻訳、選択、および増幅するための方法の模式図である。
【図２１Ｂ】図２１Ａ～２１Ｂは、ＤＮＡコードライブラリーに由来するストレプトアビジンを結合する合成分子を翻訳、選択、および増幅するための方法の模式図である。
【図２２Ａ】図２２Ａは、選択前および選択後での、図２１Ａ～２１Ｂの核酸テンプレートのＰＣＲ増幅プールのＤＮＡ配列決定結果を示す。
【図２２Ｂ】図２２Ｂは、核酸テンプレート合成を使用する非天然分子のライブラリーを作製し、進化させるための方法の模式図である。ここで－R_1は、試薬ライブラリー１から移動した生成物官能性のライブラリーを示し、－R_{1B}は、選択された生成物を示す。
【図２３Ａ】図２３Ａ～Ｄは、例示的なＤＮＡテンプレート反応の模式図である。
【図２３Ｂ】図２３Ａ～Ｄは、例示的なＤＮＡテンプレート反応の模式図である。
【図２３Ｃ】図２３Ａ～Ｄは、例示的なＤＮＡテンプレート反応の模式図である。
【図２３Ｄ】図２３Ａ～Ｄは、例示的なＤＮＡテンプレート反応の模式図である。
【図２４】図２４は、図２３および２５に示される、代表的ＤＮＡテンプレート反応の変性ＰＡＧＥによる分析を示す。
【図２５Ａ】図２５Ａ～２５Ｂは、種々の置換カルボン酸およびアミンについての、ＥＤＣおよびスルホ－ＮＨＳにより、またはＤＭＴ－ＭＭにより媒介されるＤＮＡをテンプレートにしたアミド結合形成反応の模式図である。
【図２５Ｂ】図２５Ａ～２５Ｂは、種々の置換カルボン酸およびアミンについての、ＥＤＣおよびスルホ－ＮＨＳにより、またはＤＭＴ－ＭＭにより媒介されるＤＮＡをテンプレートにしたアミド結合形成反応の模式図である。
【図２６】図２６Ａ～２６Ｂは、特定の核酸テンプレート反応の距離非依存性性質の分析を示す。図２６Ａは、距離非依存性の、核酸テンプレート合成についてのモデルを示す模式図である。図２６Ｂは、図２３Ｂからのゼロ塩基分離アニール化試薬（レーン１～３）または１０塩基分離アニール化試薬（レーン４～６）のいずれかを用いて、相補的なアルデヒド連結テンプレート１１とリンイリド試薬１３との間の、ＤＮＡをテンプレートにしたＷｉｔｔｉｇオレフィン化の変性ＰＡＧＥの結果を示す。
【図２７】図２７は、例示的な、核酸をテンプレートにした複雑性構築反応（ｃｏｍｐｌｅｘｉｔｙ　ｂｕｉｌｄｉｎｇ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）の模式図である。
【図２８】図２８Ａ～２８Ｂは、自己切断リンカー（図２８Ａおよび２８Ｂ）、スカーレスリンカー（図２８Ｃ）、ならびに有用なスカーリンカー（図２８Ｄ）を使用する、ＤＮＡテンプレート合成のためのストラテジーを示す。
【図２９】図２９は、種々のリンカーとの、核酸テンプレート反応からの結果を示す。
【図３０】図３０Ａ～３０Ｂは、自己切断試薬リンカー（図３０Ａ）またはスカーリンカーおよびスカーレスリンカー（図３０Ｂ）を使用する。ＤＮＡテンプレート合成の生成物を精製するためのストラテジーの模式図である。
【図３１Ａ】図３１Ａ～Ｂは、例示的なＤＮＡをテンプレートにした多工程トリペプチド合成を示す。
【図３１Ｂ】図３１Ａ～Ｂは、例示的なＤＮＡをテンプレートにした多工程トリペプチド合成を示す。
【図３２Ａ】図３２Ａ～Ｂは、例示的なＤＮＡをテンプレートにした多工程合成を示す。
【図３２Ｂ】図３２Ａ～Ｂは、例示的なＤＮＡをテンプレートにした多工程合成を示す。
【図３３】図３３は、試薬およびテンプレートが、ジメチルジドデシルアンモニウムカチ

オンと複合体化している、ＤＮＡをテンプレートにしたアミド結合形成反応を示す。
【図３４】図３４は、ヘリックス末端構成（Ｅ）およびオメガ構成（Ω）を使用する、代表的ＤＮＡをテンプレートにしたアミノアシル化反応、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化反応、１，３－二極性付加環化反応、および還元的アミノ化反応での変性ＰＡＧＥゲルを示す。
【図３５】図３５Ａ～３５Ｄは、ＤＮＡをテンプレートにしたアミンアシル化反応（図３５Ａ）、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化反応（図３５Ｂ）、１，３－二極性付加環化反応（図３５Ｃ）、または還元的アミノ化反応（図３５Ｄ）を媒介するためのヘリックス末端構成（Ｅ）、ヘアピン構成（Ｈ）、およびオメガ構成（Ω）の比較を示す棒グラフである。
【図３６】図３６は、オメガ（Ω）構成およびヘリックス末端構成（Ｂ）を使用する、選択されたテンプレート－試薬組み合わせの融解温度を示す表である。
【図３７】図３７は、Ｔ構成を有するテンプレートにより媒介される、ＤＮＡテンプレート反応の効率を示す棒グラフである。
【図３８】図３８Ａ～３８Ｃは、Ｔ構成を有するテンプレートによって媒介される、１つの溶液中の単一のテンプレートに対する２回のＤＮＡテンプレート反応を示す。
【図３９】図３９Ａ～３９Ｃは、Ｈテンプレート（図３９Ａ）またはＢテンプレート（図３９Ｂおよび３９Ｃ）媒介性の立体選択的なＤＮＡをテンプレートにした置換反応における（Ｓ）－ブロミドおよび（Ｒ）－ブロミドからの生成物形成の相対速度を示す模式図である。
【図４０】図４０Ａ～４０Ｄは、反応基間の芳香族塩基が、欠失され、修復される場合の、反応立体選択性に対する結果を示す。これらの図は、１２塩基介在領域の５’末端（図４０Ａ～４０Ｃ）由来または３’末端（図４０Ｄ）由来の芳香族ＤＮＡ塩基を修復した結果としての立体選択性における変化を示す。
【図４１】図４１Ａ～４１Ｂは、右巻きらせん（Ｂ－形態）（図４１Ａ）または左巻きらせん（Ｚ－形態）（図４１Ａおよび４１Ｂ）のヘアピン構成により媒介されるＤＮＡテンプレート反応の立体選択性を示す。
【図４２】図４２Ａ～４２Ｄは、k_S/k_Rを計算するために使用される、例示的な立体選択的なＤＮＡテンプレート反応についての生成物収量　対　時間のグラフを示す。図４２Ａは、図３９Ａに示される反応に対応する；図４２Ｂは、図３９Ｂに示される反応に対応する；図４２Ｃは、図４４Ａに示される反応に対応し、図４２Ｄは、図４４Ｂに示される反応に対応する。
【図４３】図４３Ａ～４３Ｆは、アキラル可撓性リンカーを組み込むテンプレート構造および試薬構造を示す模式図である。
【図４４】図４４Ａ～４４Ｂは、Ｂ－形態（図４４Ａ）およびＺ－形態（図４４Ｂ）のテンプレート－試薬複合体について得られる円偏光二色性スペクトルの図示である。
【図４５】図４５は、低塩濃度および高塩濃度でＣＧリッチ配列を使用する反応の代表的な変性ＰＡＧＥ分析を示す。
【図４６】図４６は、マレイミド、アルデヒド、またはアミンが、単一の溶液中で複数のＤＮＡテンプレート反応の型に供される、ＤＮＡテンプレート合成の模式図である。
【図４７】図４７は、１２反応物１ポットのＤＮＡテンプレート反応において対形式で使用されるテンプレートおよび試薬を示す。
【図４８】図４８は、１２反応物を含む「１ポット」のＤＮＡテンプレート反応、および少なくとも２８のあり得る生成物のうち、６つの配列がプログラムされた生成物のみを生成する少なくとも７つのあり得る反応型を示す。
【図４９】図４９は、反応性基を連続的に曝すかまたは作製することによって、ＤＮＡをテンプレートにしたライブラリーを多様化するための方法の模式図である。
【図５０】図５０Ａ～５０Ｅは、本発明の実施において有用な、例示的な核酸をテンプレートにした脱保護の模式図である。
【図５１】図５１Ａ～５１Ｂは、本発明の実施において有用な、例示的な核酸をテンプレートにした官能基相互変換の模式図である。
【図５２】図５２は、核酸テンプレートに沿った、移動単位のアセンブリを示す模式図で

ある。
【図５３】図５３は、核酸テンプレートに沿ってジカルバメートユニットを重合し、ポリカルバメートを形成することを示す模式図である。
【図５４】図５４は、ポリカルバメートポリマーをヌクレオチド骨格から切断することを示す模式図である。
【図５５】図５５は、ＤＮＡをテンプレートにした大環状フマルアミドライブラリーの合成を示す模式図である。
【図５６】図５６は、図５５の種々のフマルアミドライブラリーメンバーのアミンアシル化工程および環化工程の模式図である。
【図５７】図５７は、ＤＮＡをテンプレートにした大環状フマルアミドライブラリーの合成のための例示的アミノ酸構築ブロックを示す。
【図５８】図５８は、ＤＮＡをテンプレートにした大環状フマルアミドライブラリーの合成において使用されるテンプレートを作製する方法の模式図である。
【図５９】図５９は、大環状フマルアミドライブラリーの合成において有用なアミンアシル化反応および環化反応の模式図である。
【図６０】図６０は、ＰＮＡポリマーに組み込まれ得る代表的モノマー構造を示す。
【図６１】図６１は、機能的ポリマーを作製するための方法の模式図である。示されるように、そのポリマーは、テンプレートになお結合している。
【図６２】図６２は、ＤＮＡをテンプレートにしたアルデヒド重合反応を示す。
【図６３】図６３は、テンプレートの特定の位置に位置したミスマッチコドンとともに４０塩基のテンプレートを使用したＰＮＡ重合反応を示す。
【図６４】図６４は、ＤＮＡをテンプレートにした重合反応の特異性を示す。
【図６５Ａ】図６５Ａは、新たなポリマーおよびプラスチックの合成を指向するために核酸を使用する方法を示す、模式図である。図６５Ｂは、プラスチックを進化させるために、Ｇｒｕｂｂの開環複分解重合触媒の使用を示す模式図である。
【図６５Ｂ】図６５Ａは、新たなポリマーおよびプラスチックの合成を指向するために核酸を使用する方法を示す、模式図である。図６５Ｂは、プラスチックを進化させるために、Ｇｒｕｂｂの開環複分解重合触媒の使用を示す模式図である。
【図６６】図６６は、所望の特性を有するポリマーを作製するための、リガンド多様化、選択、および増幅の反復サイクルを介するプラスチックの進化を示す模式図である。
【図６７】図６７は、ＤＮＡポリマーによって組み込まれ得る例示的官能化ヌクレオチドを示す。
【図６８】図６８は、例示的金属結合ウリジンおよび７－デアザアデノシンアナログを示す。
【図６９】図６９は、図６７のアナログ７の例示的合成を示す。
【図７０】図７０は、図６７の化合物１３への前駆化合物である、化合物３０の例示的合成を示す。
【図７１】図７１は、図６７の化合物１３への前駆化合物である、化合物４０の例示的合成を示す。
【図７２】図７２は、図７１の化合物４０への前駆化合物である、化合物３８の例示的合成を示す。
【図７３】図７３は、例示的デオキシアデノシン誘導体を示す。
【図７４】図７４は、改変デオキシアデノシントリホスフェートの例示的合成を示す。
【図７５】図７５は、ＤＮＡポリメラーゼによって組み込まれるかまたは組み込まれない金属結合官能基を含む改変ヌクレオチドトリホスフェートのまとめを示す。
【図７６】図７６は、ＤＮＡポリメラーゼと適合性である、合成の金属結合ヌクレオチドを含む非天然ポリマーライブラリーを示す。
【図７７】図７７は、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む核酸のライブラリーの生成を示す模式図である。
【図７８Ａ】図７８Ａ～７８Ｃは、特定の反応触媒を同定するための反応スキームを示す

。図７８Ａは、Ｈｅｃｋ反応を触媒する、金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。図７８Ｂは、ヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応を触媒する、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。図７８Ｃは、アルドール反応を触媒する、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。

【図７８Ｂ】図７８Ａ～７８Ｃは、特定の反応触媒を同定するための反応スキームを示す。図７８Ａは、Ｈｅｃｋ反応を触媒する、金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。図７８Ｂは、ヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応を触媒する、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。図７８Ｃは、アルドール反応を触媒する、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。

【図７８Ｃ】図７８Ａ～７８Ｃは、特定の反応触媒を同定するための反応スキームを示す。図７８Ａは、Ｈｅｃｋ反応を触媒する、金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。図７８Ｂは、ヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応を触媒する、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。図７８Ｃは、アルドール反応を触媒する、ポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチドを含む合成ポリマーのインビトロ選択のための例示的スキームの模式図である。

【図７９】図７９は、タンパク質結合選択に供されたＤＮＡ連結合成分子、および１回の選択のための富化因子を示す。

【図８０】図８０は、例示的選択スキームの結果を示す。

【図８１】図８１は、３回の濃縮によって実現される正味濃縮（ｎｅｔ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）を示す。

【図８２】図８２は、標的特異的ＤＮＡ連結合成分子および標的非特異的ＤＮＡ連結合成分子の単一溶液からの分離を示す。

【図８３】図８３は、図７９において選択された例示的な特異的ＤＮＡ連結合成分子を示す。

【図８４】図８４は、例示的な反復されるカルボニックアンヒドラーゼ選択スキームを示す。

【図８５】図８５は、結合形成反応のための１ポット選択を行うための方法の模式図である。

【図８６】図８６は、ＤＮＡテンプレート合成を使用する新たな結合形成反応の発見を確証するための方法の模式図である。

【図８７】図８７は、核酸テンプレート合成を使用する反応の発見の例を示す。

【図８８】図８８は、核酸テンプレート合成を使用して同定されたＣｕ媒介性カップリング反応の発見を示す。

【図８９】図８９は、核酸テンプレート合成を使用して同定されたＰｄ媒介性カップリング反応の発見を示す。

【図９０】図９０は、マイクロアレイベースの配列分析プロトコルの模式図である。

【図９１】図９１は、マイクロアレイベースの配列分析を介して同定されるＰｄ媒介性反応の分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【００４９】

（発明の特定の実施形態の説明）

本明細書中に記載される核酸テンプレート合成は、広い種々の化合物（例えば、合成低分子および非天然ポリマー）の生成、選択、増幅および進化を可能にする。核酸テンプレート合成において、ＤＮＡまたは多の核酸配列によりコードされる情報は、反応生成物の合成に翻訳される。その核酸テンプレートは、代表的には、反応単位と結合する相補的ア

ンチコドン配列にアニールする複数のコード領域を含み、それによって、配列特異的様式で反応単位をともに結合して、反応生成物を作製する。核酸ハイブリダイゼーションは配列特異的であるので、核酸テンプレート反応の結果は、対応する反応生成物への特定の核酸配列の翻訳である。

【００５０】

図１に示されるように、相補的なオリゴヌクレオチドの配列特異的オリゴマー形成を触媒するような一本鎖核酸テンプレートの能力が、示された（Ｉｎｏｕｅら（１９８１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０３，７６６６；Ｉｎｏｕｅら（１９８４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７８，６６９－７６）。この発見のすぐ後に、ＤＮＡテンプレートまたはＲＮＡテンプレートが相補的なＤＮＡまたはＲＮＡの、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのオリゴマー化を触媒し得ることが見出された（Ｉｎｏｕｅら（１９８１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０３，７６６６；Ｏｒｇｅｌら（１９９５）Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．２８，１０９－１１８；Ｒｅｍｂｏｌｄら（１９９４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．３８，２０５；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚら（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．３３，４７７；Ｃｈｅｎら（１９８５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８１，２７１）。ＤＮＡテンプレートまたはＲＮＡテンプレートは、種々の非天然核酸アナログ（ペプチド核酸（Ｂｏｈｌｅｒら（１９９５）Ｎａｔｕｒｅ ３７６，５７８）、ホスホロチオネート含有核酸（Ｈｅｒｒｌｅｉｎら（１９９５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１７，１０１５１－１０１５２）、ホスホロセレネート含有核酸（Ｘｕら（２０００）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２２，９０４０－９０４１；Ｘｕら（２００１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９，１４８－１５２）、およびホスホロアミデート含有核酸（Ｌｕｔｈｅｒら（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ ３９６，２４５－８）、非リボース核酸（Ｂｏｌｌｉら（１９９７）Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．４，３０９－２０）、およびリン酸結合がアミノエチル基で置き変えられたＤＮＡアナログ（Ｇａｔら（１９９８）Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ４８，１９－２８）を含む）の形成を加速することを示した。核酸テンプレートはまた、ヌクレオチドアナログの間のアミンのアシル化を触媒し得る（Ｂｒｕｉｃｋら（１９９６）Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．３，４９－５６）。

【００５１】

しかし、核酸テンプレートが、種々の非天然核酸アナログの形成を加速することが証明されているものの、ほとんど全てのこれらの反応は、天然の核酸骨格の構造と密接に似ている遷移状態を通って進行するように設計されており（図１）、代表的に、ヌクレオチド単位の間の同じ六結合骨格間隔を保持する産物が得られた。この設計の動機は、おそらく、核酸テンプレートによって提供される速度の増強が、反応基の正確なアライメントに依存し、そしてこのアライメントの正確さは、反応物および産物がＤＮＡ骨格およびＲＮＡ骨格の構造を擬態する場合、最大となるという仮定である。核酸テンプレート合成が、核酸骨格に類似する産物のみを生成し得るという仮定を支持する証拠は、有機合成における周知のマクロ環化の困難性に起因する（Ｉｌｌｕｍｉｎａｔｉら（１９８１）Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．１４，９５－１０２；Ｗｏｏｄｗａｒｄら（１９８１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０３，３２１０－３２１３）。分子内対応物と比較して分子内の閉環反応の速度の増強は、急速に減少することが公知である。なぜならば、回転可能な結合が反応基の間に付加され、その結果可撓性の１４炭素リンカーを有する結合反応物は、いかなる速度の加速もほとんど生じないからである（Ｉｌｌｕｍｉｎａｔｉら（１９８１）前出）。

【００５２】

目的の合成分子は、一般的に核酸骨格に類似しないので、核酸配列を合成分子へと翻訳するための核酸テンプレート合成の使用は、核酸テンプレート様式において核酸および核酸アナログ以外の合成分子が合成され得る場合のみ、広範に有用である。重要なことには、本明細書中で示されるように、核酸テンプレート合成は、実際は、一般的な現象であり、種々の反応のために使用され得、多様な範囲の化合物（具体的には、核酸もしくは核酸アナログではない化合物、ならびに核酸もしくは核酸アナログに類似していない化合物を

含む）を生成するために調整される。より具体的には、本発明は、天然の生体ポリマーを超えて、化合物のライブラリーを増幅および進化させる能力を伸ばす。任意の構造の化合物を合成する能力により、新規の骨格および側鎖構造に、広範な化学官能基を取りこむその独自の遺伝的コードを研究者が書くことが可能となり、この能力は、２、３例をあげると、新規の触媒、薬物および高分子の開発を可能にする。例えば、遺伝的選択によるこれらの分子の直接的な増幅および進化は、活性、バイオアベイラビリティー、溶解性または熱安定性、もしくは天然のタンパク質および核酸形成ブロックの限定されたセットを用いて達成することが、困難であるかまたは不可能である、他の物理的特定（例えば、蛍光、スピン標識化または感光性）を有する、人工的な触媒の全く新しいファミリーの発見を可能にする。同様に、変異および選択の繰り返されたサイクルによって合成低分子を増幅し、そして直接進化させるような発達方法は、伝統的な合理的な設計またはコンビナトリアルスクリーニング薬物発見方法によって単離されたものより優れた特性を有する、新規のリガンドまたは薬物の単離を可能にする。さらに、このアプローチを材料科学において重要なポリマーの同定および開発に適用することは、新たなプラスチックまたは他のポリマーの進化を可能にする。

【００５３】

一般的に、本明細書中で行われる核酸テンプレート合成は、以下を包含する　１）必要に応じて、反応単位と結合した、１つ以上の核酸テンプレートを提供する工程；および２）１つ以上の核酸テンプレートと、反応単位と結合したアンチコドンを含む１以上の移動単位とを接触させる工程。移動単位のアンチコドンは、核酸テンプレートにハイブリダイズするように設計される。本発明の特定の実施形態において、移動単位は、アンチコドン単位のハイブリダイゼーション能力および反応単位の化学的官能基を同時に取り込んだ１つの部分を含む。これらの移動単位が、配列特異的様式において核酸テンプレートにハイブリダイズされた後、移動単位および／または核酸テンプレート上に存在する反応単位は、反応生成物と反応しこれを生成するように反応的に近位にされる。好ましくは、一旦反応単位が、反応生成物または反応生成物の中間体を生成するために反応されると、移動単位のオリゴヌクレオチド部分が除去される。重要なことに、核酸テンプレートの配列は、結合した反応生成物およびそれによるその構造の合成履歴（ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｈｉｓｔｏｒｙ）をデコードするために、後に決定され得る。この方法は、１分子を一度に合成するために使用され得、そしてコンビナトリアル方法を用いて、数千から数百万の化合物を合成するために使用され得る。

【００５４】

一実施形態において、テンプレート分子は、必要に応じて、任意の移動単位との相互作用の前に、反応単位と結合される。従って、図２に示されるように、そのテンプレートは、直接またはリンカーを介してかのいずれかで、反応単位に共有結合することによって接続され得る。あるいは、そのテンプレートは、非共有結合によって接続され得る。例えば、そのテンプレートは、一般に、分子上の固定された位置においてビオチン化され得、アビジン部分もしくはストレプトアビジン部分と結合した反応単位と安定に相互作用し得る。合成が容易であるように、その反応単位は、好ましくは、図２に示されるように、いくつかの実施形態において、そのテンプレートの５’末端もしくはその付近に配置される。他の実施形態において、反応単位の配置は、そのテンプレートの内部位置に、または３’末端に反応単位を配置することが好ましい。そのテンプレート分子はまた、移動単位のアンチコドンにアニールし得る少なくとも１つのコドンを含む。合成の間に、その移動単位は、コドンにアニールし、その反応単位をそのテンプレートの反応単位と反応的に近位にされて、反応生成物を精製する。

【００５５】

別の実施形態において、図３に示されるように、そのテンプレートは、最初、反応単位とは結合しないが、２つの移動単位とともに配置された少なくとも２つの反応単位の核酸テンプレート合成を可能にする。そのテンプレート分子は、少なくとも２つのコドンを含み、その各々は、各移動単位内に配置された異なるアンチコドンにアニールし得る。各移

動単位におけるアンチコドンは、テンプレート中の対応するコドンにアニールして、各移動単位の反応単位を互いに反応的に近位になり、反応生成物を生成する。

【００５６】

別の実施形態において、図４に示されるように、そのテンプレートは、一緒になって、同時または連続的にかのいずれかで、配列特異的様式にて複数の移動単位になる。各アニールした移動単位上の反応単位は、次いで、重合プロセスにおいて互いに反応されて、ポリマーを生成する。このアプローチを使用して、種々の非天然ポリマーを生成することが可能である。重合は、段階的プロセスであってもよいし、同時プロセス（それによって、アニールしたモノマーの全てが、一反応シーケンスにおいて反応される）であってもよい。

【００５７】

（Ｉ．テンプレートの考慮事項）

核酸テンプレートが、相補的オリゴヌクレオチドへ連結される配列特異的に漸増する反応物質によって、明らかな構造的要件なしに、広範な種々の化学反応を指向し得る。議論されるように、その核酸媒介性形式は、従来の合成アプローチを使用してできなかった反応を可能にする。合成の間に、テンプレートは、１以上の移動単位にハイブリダイズまたはアニールして、反応生成物の合成を指向し、この反応生成物は、テンプレート合成の特定の工程の間に、テンプレートと結合したままである。次いで、反応生成物は、特定の基準（例えば、予め選択された標的分子に結合する能力）に基づいて、選択またはスクリーニングされる。一旦反応生成物が同定されると、その結合したテンプレートは配列決定されて、その反応生成物の合成履歴がデコードされ得る。さらに、以下により詳細に議論されるように、そのテンプレートは、別の化合物または化合物のライブラリーの合成をもたらすように、進化され得る。

【００５８】

（（ｉ）テンプレート形式）

そのテンプレートは、核酸配列、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡとＲＮＡのハイブリッド、またはＤＮＡおよびＲＮＡの誘導体に基づき得、そして一本鎖または二本鎖であり得る。特定のテンプレートの設計は、企図される核酸テンプレート合成の型に依存して変化し得る。

【００５９】

図５は、本発明の実施において有用であり得る種々のテンプレートを示す。図５Ａ～Ｃは、２つの移動単位の相補的なアンチコドンとの相互作用のための２つのコドンを含むテンプレートの模式図である。これらのテンプレートは、合成の開始時に反応単位がテンプレートに連結されない核酸テンプレート合成の型において使用され得る；例えば、２つの移動単位が、テンプレートにアニールして、それらの反応単位を反応的に近位にし、反応生成物を作製する場合。１つのこのような例が重合である。にもかかわらず、そのテンプレートは、移動単位のアニール前に、反応単位と結合され得る。図５Ｄ～Ｆは、核酸テンプレート合成の型において使用され得るテンプレートの模式図であり、ここで１つの反応単位は、例えば、１つの移動単位がテンプレートにアニールして、その反応単位を、テンプレートに連結される他の反応単位と反応的に近位にし、反応生成物を作製する場合、合成開始時にテンプレートに連結される。

【００６０】

図５Ａは、５’方向から３’方向において、第１のプライマー結合部位（ＰＢＳ１）またはそれらに相補的な配列、第１の移動単位のアンチコドン配列にアニールする第１のコドン（Ｃ１）をコードするヌクレオチド配列、第２の異なる移動単位のアンチコドン配列にアニールする第２のコドン（Ｃ２）をコードするヌクレオチド配列、ならびに第２のプライマー結合部位（ＰＢＳ２）またはそれらに相補的な配列をコードするヌクレオチド配列を含むテンプレートを示す。そのプライマー結合部位は、選択肢的ではあるが、いくつかの実施形態において、テンプレートのＰＣＲベースの増幅を容易に得るために好ましい。以下でより詳細に議論されるように、そのＣ１配列は、第２の移動単位のアンチコドン

配列との交差反応性を最小にするように選択され、そのＣ２配列は、第１の移動単位のアンチコドン配列との交差反応性を最小にするように選択される。図５Ａに示されるように、そのＣ１配列およびＣ２配列は、１以上の介在塩基によって分離される。言い換えると、Ｃ１配列およびＣ２配列は、互いに直接隣接していない。核酸テンプレート合成の間に、第１の移動単位および第２の移動単位の両方は、同時にテンプレートに結合され得る。

【００６１】

図５Ｂは、Ｃ１とＣ２との間に配置される介在塩基が存在しないことを除いて、図５Ａに示されるテンプレートと類似のテンプレートを示す。言い換えると、Ｃ１配列およびＣ２配列は、直接互いに隣接する。図５Ａのテンプレートについて、核酸テンプレート型合成の間、第１の移動単位と第２の移動単位の両方が、同時に、テンプレートに結合し得る。

【００６２】

図５Ｃは、Ｃ１の配列がＣ２の配列と重複することを除いて、図５Ａおよび５Ｂに示されるテンプレートと類似するテンプレートを示す。図５Ａおよび５Ｂのテンプレートとは異なり、核酸テンプレート型合成の間、第１の移動単位および第２の移動単位は、ともに、同時にテンプレートに結合し得ない。このように、テンプレートが合成の開始の前に反応単位と結合しない限り、第３のコドンが、通常存在し、その結果２つの反応単位は、同時にテンプレートにアニールし得、反応が進行し得る。この型のテンプレートは、反応生成物の合成への段階的な合成を必要とし得る。例えば、Ｃ１に対するアンチコドンを有する移動単位が最初に添加され、ハイブリダイズされ、反応し、次いで、Ｃ２に対するアンチコドンを有する移動単位が添加される前に除去される。

【００６３】

図５Ｄ～５Ｆは、テンプレートが、テンプレートに結合する（例えば、共有結合される）反応単位（Ｒ）を含むことを除いて、図５Ａに示されるテンプレートと類似のテンプレートを示す。しかし、図５Ｂおよび図５Ｃの両方に示されるテンプレートがまた図、５Ｄ～５Ｆに示されるように、対応するテンプレートと結合する反応単位（Ｒ）を含み得ることが理解される。テンプレートが反応単位と結合する程度まで、テンプレートのヌクレオチド配列は、さらに、テンプレートと結合する反応単位を独特に同定するヌクレオチドの配列または配列タグを含む。テンプレート媒介合成に続いて、反応単位は、反応生成物を作製するために、反応において関係するテンプレートに実際に結合する反応単位は、配列タグの配列を読むことによって同定され得る。

【００６４】

図５Ｄにおいて、Ｒは、５’末端の近位（例えば、テンプレートの５’末端またはテンプレートの５’末端の下流）の位置においてテンプレートに連結される。図５Ｅにおいて、Ｒは、５’末端と３’末端との間の位置においてテンプレートに連結される。この特定の場合において、Ｒは、Ｃ１とＣ２との間に配置され、以下にさらに詳細に考察されるＴ型テンプレート構造の例を表す。図５Ｆにおいて、Ｒは、３’末端の近位（例えば、テンプレートの３’末端またはテンプレートの３’末端の上流）の位置においてテンプレートに連結される。

【００６５】

図５Ａ～Ｆに示されるテンプレートの各々が、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を含み得ることが企図される。例えば、図５Ａを参照して、テンプレートは、（ｉ）ＰＢＳ１とＣ１との間、（ｉｉ）Ｃ１とＣ２との間、および（ｉｉｉ）Ｃ２とＰＢＳ２との間の配置される制限エンドヌクレアーゼ部位を含み得る。制限エンドヌクレアーゼ部位は、ＰＢＳ１配列、Ｃ１配列、Ｃ２配列、ＰＢＳ２配列、またはこれらの任意の組み合わせを置換するための種々の配列を容易に導入するために、核酸カセットの使用を容易にする。

【００６６】

さらに、テンプレートはまた、移動単位と結合する１つ以上の反応単位と相互作用し得る反応単位において終結する一端にヘアピンループを組み込み得る。例えば、ＤＮＡテンプレートは、５’－アミノ基で終結するヘアピンループを含み得、この５’－アミノ基は

、保護されていても保護されてなくても良い。アミノ基は、非天然ポリマーの形成のための開始点として作用し得るか、または他の移動単位の反応単位による引き続く改変のための低分子足場に結合するために改変され得る。

【００６７】

テンプレートの長さは、企図される核酸テンプレート型合成の型に依存して、非常に変化し得る。例えば、特定の実施形態において、テンプレートは、１０～１０，０００ヌクレオチド長、２０～１，０００ヌクレオチド長、２０～４００ヌクレオチド長、４０～１，０００ヌクレオチド長、または４０～４００ヌクレオチド長であり得る。テンプレートの長さは、もちろん、例えば、コドンの長さ、ライブラリーの複雑性、反応生成物の複雑性および／またはサイズ、スペーサー配列の使用などに依存する。

【００６８】

（ｉｉ）コドン利用

テンプレート配列が本発明の範囲を超えていくことなく、多くの方法で設計され得ることが企図される。例えば、コドンの長さは、決定されなければならず、コドン配列が設定されなければならない。２つのコドン長が使用される場合、４つの天然の塩基を使用すると、１６個のみの可能な組み合わせが、ライブラリーをコードする際に使用されるために利用可能である。コドンの長さが３に増加する（タンパク質をコードする際に自然数（ｎｕｍｂｅｒ　Ｎａｔｕｒｅ）を使用する）場合、可能な組み合わせの数が６４に増加する。コドンの長さが４に増加する場合、可能な組み合わせの数は、２５６に増加する。コドンの長さを決定する際に考慮される他の因子は、ミスマッチ、フレームシフト、ライブラリーの複雑性などがある。コドンの長さが特定の点まで増加するので、ミスマッチの数は、減少する；しかし、過剰に長いコドンは、ミスマッチの塩基対にも関わらずハイブリダイズする。

【００６９】

コドンの長さが変動し得るものの、コドンは、２～５０ヌクレオチド、２～４０ヌクレオチド、２～３０ヌクレオチド、２～２０ヌクレオチド、２～１５ヌクレオチド、２～１０ヌクレオチド、３～５０ヌクレオチド、３～４０ヌクレオチド、３～３０ヌクレオチド、３～２０ヌクレオチド、３～１５ヌクレオチド、３～１０ヌクレオチド、４～５０ヌクレオチド、４～４０ヌクレオチド、４～３０ヌクレオチド、４～２０ヌクレオチド、４～１５ヌクレオチド、４～１０ヌクレオチド、５～５０ヌクレオチド、５～４０ヌクレオチド、５～３０ヌクレオチド、５～２０ヌクレオチド、５～１５ヌクレオチド、５～１０ヌクレオチド、６～５０ヌクレオチド、６～４０ヌクレオチド、６～３０ヌクレオチド、６～２０ヌクレオチド、６～１５ヌクレオチド、６～１０ヌクレオチド、７～５０ヌクレオチド、７～４０ヌクレオチド、７～３０ヌクレオチド、７～２０ヌクレオチド、７～１５ヌクレオチド、７～１０ヌクレオチド、８～５０ヌクレオチド、８～４０ヌクレオチド、８～３０ヌクレオチド、８～２０ヌクレオチド、８～１５ヌクレオチド、８～１０ヌクレオチド、９～５０ヌクレオチド、９～４０ヌクレオチド、９～３０ヌクレオチド、９～２０ヌクレオチド、９～１５ヌクレオチド、９～１０ヌクレオチドの範囲であり得る。しかし、コドンは、好ましくは、３ヌクレオチド長、４ヌクレオチド長、５ヌクレオチド長、６ヌクレオチド長、７ヌクレオチド長、８ヌクレオチド長、９ヌクレオチド長、または１０ヌクレオチド長である。

【００７０】

１つの実施形態において、テンプレートに使用されるコドンのセットは、移動単位の適切なアンチコドンのみがテンプレートのコドン部位にアニールすることを確実にするために、コドンセット内の任意の２つのコドン間のミスマッチの数を最大にする。さらに、テンプレートが、１つのコドンセットの全てのメンバーと異なるコドンセットの全てのコドンとの間にミスマッチを有し、アンチコドンが間違ったコドンセットに不注意に結合しないことを確実にすることが重要である。例えば、コドンｎ塩基長の選択に関して、特定のコドンセット内のコドンの各々（例えば、図５ＡのＣ１）は、ｋミスマッチによって互いに異なり、そして１つのコドンセットのコドンの全て（例えば、図５ＡのＣ１）は、他の

コドンセットの全てのコドン（例えば、図５ＡのＣ２）とｍミスマッチによって異なる。テンプレートの使用に適切な種々のコドンセットについての、ｎ、ｋ、およびｍについての例示的な値を表１に要約する。

【００７１】

【表１－１】

表　1

n	k	m
2	1	1
3	1	1
3	2	1
3	2	2
4	1	1
4	2	1

【００７２】

【表１－２】

n	k	m
4	2	2
4	3	1
4	3	2
4	3	3
5	1	1
5	2	1
5	2	2
5	3	1
5	3	2
5	3	3
5	4	1
5	4	2
5	4	3
5	4	4
6	1	1
6	2	1
6	2	2
6	3	1
6	3	2
6	3	3
6	4	1
6	4	2
6	4	3
6	4	4
6	5	1
6	5	2
6	5	3
6	5	4
6	5	5
7	1	1
7	2	1

【００７３】

【表１－３】

n	k	m
7	2	2
7	3	1
7	3	2
7	3	3
7	4	1
7	4	2
7	4	3
7	4	4
7	5	1
7	5	2
7	5	3
7	5	4
7	5	5
7	6	1
7	6	2
7	6	3
7	6	4
7	6	5
7	6	6
8	1	1
8	2	1
8	2	2
8	3	1
8	3	2
8	3	3
8	4	1
8	4	2
8	4	3
8	4	4
8	5	1
8	5	2

【００７４】

【表１－４】

n	k	m
8	5	3
8	5	4
8	5	5
8	6	1
8	6	2
8	6	3
8	6	4
8	6	5
8	6	6
8	7	1
8	7	2
8	7	3
8	7	4
8	7	5
8	7	6
8	7	7
9	1	1
9	2	1
9	2	2
9	3	1
9	3	2
9	3	3
9	4	1
9	4	2
9	4	3
9	4	4
9	5	1
9	5	2
9	5	3
9	5	4
9	5	5

【００７５】

【表１－５】

n	k	m
9	6	1
9	6	2
9	6	3
9	6	4
9	6	5
9	6	6
9	7	1
9	7	2
9	7	3
9	7	4
9	7	5
9	7	6
9	7	7
9	8	1
9	8	2
9	8	3
9	8	4
9	8	5
9	8	6
9	8	7
9	8	8
10	1	1
10	2	1
10	2	2
10	3	1
10	3	2
10	3	3
10	4	1
10	4	2
10	4	3
10	4	4

【００７６】

【表１－６】

n	k	m
10	5	1
10	5	2
10	5	3
10	5	4
10	5	5
10	6	1
10	6	2
10	6	3
10	6	4
10	6	5
10	6	6
10	7	1
10	7	2
10	7	3
10	7	4
10	7	5
10	7	6
10	7	7
10	8	1
10	8	2
10	8	3
10	8	4
10	8	5
10	8	6
10	8	7
10	8	8
10	9	1
10	9	2
10	9	3
10	9	4
10	9	5

【００７７】

【表１－７】

n	k	m
10	9	6
10	9	7
10	9	8
10	9	9
11	1	1
11	2	1
11	2	2
11	3	1
11	3	2
11	3	3
11	4	1
11	4	2
11	4	3
11	4	4
11	5	1
11	5	2
11	5	3
11	5	4
11	5	5
11	6	1
11	6	2
11	6	3
11	6	4
11	6	5
11	6	6
11	7	1
11	7	2
11	7	3
11	7	4
11	7	5
11	7	6

【００７８】

【表１－８】

n	k	m
11	7	7
11	8	1
11	8	2
11	8	3
11	8	4
11	8	5
11	8	6
11	8	7
11	8	8
11	9	1
11	9	2
11	9	3
11	9	4
11	9	5
11	9	6
11	9	7
11	9	8
11	9	9
11	10	1
11	10	2
11	10	3
11	10	4
11	10	5
11	10	6
11	10	7
11	10	8
11	10	9
11	10	10
12	1	1
12	2	1
12	2	2

【００７９】

【表１－９】

n	k	m
12	3	1
12	3	2
12	3	3
12	4	1
12	4	2
12	4	3
12	4	4
12	5	1
12	5	2
12	5	3
12	5	4
12	5	5
12	6	1
12	6	2
12	6	3
12	6	4
12	6	5
12	6	6
12	7	1
12	7	2
12	7	3
12	7	4
12	7	5
12	7	6
12	7	7
12	8	1
12	8	2
12	8	3
12	8	4
12	8	5
12	8	6

【００８０】

【表１－１０】

n	k	m
12	8	7
12	8	8
12	9	1
12	9	2
12	9	3
12	9	4
12	9	5
12	9	6
12	9	7
12	9	8
12	9	9
12	10	1
12	10	2
12	10	3
12	10	4
12	10	5
12	10	6
12	10	7
12	10	8
12	10	9
12	10	10
12	11	1
12	11	2
12	11	3
12	11	4
12	11	5
12	11	6
12	11	7
12	11	8
12	11	9
12	11	10

【００８１】

【表１－１１】

n	k	m
12	11	11
13	1	1
13	2	1
13	2	2
13	3	1
13	3	2
13	3	3
13	4	1
13	4	2
13	4	3
13	4	4
13	5	1
13	5	2
13	5	3
13	5	4
13	5	5
13	6	1
13	6	2
13	6	3
13	6	4
13	6	5
13	6	6
13	7	1
13	7	2
13	7	3
13	7	4
13	7	5
13	7	6
13	7	7
13	8	1
13	8	2

【００８２】

【表１－１２】

n	k	m
13	8	3
13	8	4
13	8	5
13	8	6
13	8	7
13	8	8
13	9	1
13	9	2
13	9	3
13	9	4
13	9	5
13	9	6
13	9	7
13	9	8
13	9	9
13	10	1
13	10	2
13	10	3
13	10	4
13	10	5
13	10	6
13	10	7
13	10	8
13	10	9
13	10	10
13	11	1
13	11	2
13	11	3
13	11	4
13	11	5
13	11	6

【００８３】

【表１－１３】

n	k	m
13	11	7
13	11	8
13	11	9
13	11	10
13	11	11
13	12	1
13	12	2
13	12	3
13	12	4
13	12	5
13	12	6
13	12	7
13	12	8
13	12	9
13	12	10
13	12	11
13	12	12
14	1	1
14	2	1
14	2	2
14	3	1
14	3	2
14	3	3
14	4	1
14	4	2
14	4	3
14	4	4
14	5	1
14	5	2
14	5	3
14	5	4

【００８４】

【表１－１４】

n	k	m
14	5	5
14	6	1
14	6	2
14	6	3
14	6	4
14	6	5
14	6	6
14	7	1
14	7	2
14	7	3
14	7	4
14	7	5
14	7	6
14	7	7
14	8	1
14	8	2
14	8	3
14	8	4
14	8	5
14	8	6
14	8	7
14	8	8
14	9	1
14	9	2
14	9	3
14	9	4
14	9	5
14	9	6
14	9	7
14	9	8
14	9	9

【００８５】

【表１－１５】

n	k	m
14	10	1
14	10	2
14	10	3
14	10	4
14	10	5
14	10	6
14	10	7
14	10	8
14	10	9
14	10	10
14	11	1
14	11	2
14	11	3
14	11	4
14	11	5
14	11	6
14	11	7
14	11	8
14	11	9
14	11	10
14	11	11
14	12	1
14	12	2
14	12	3
14	12	4
14	12	5
14	12	6
14	12	7
14	12	8
14	12	9
14	12	10

【００８６】

【表１－１６】

n	k	m
14	12	11
14	12	12
14	13	1
14	13	2
14	13	3
14	13	4
14	13	5
14	13	6
14	13	7
14	13	8
14	13	9
14	13	10
14	13	11
14	13	12
14	13	13
15	1	1
15	2	1
15	2	2
15	3	1
15	3	2
15	3	3
15	4	1
15	4	2
15	4	3
15	4	4
15	5	1
15	5	2
15	5	3
15	5	4
15	5	5
15	6	1

【００８７】

【表１－１７】

n	k	m
15	6	2
15	6	3
15	6	4
15	6	5
15	6	6
15	7	1
15	7	2
15	7	3
15	7	4
15	7	5
15	7	6
15	7	7
15	8	1
15	8	2
15	8	3
15	8	4
15	8	5
15	8	6
15	8	7
15	8	8
15	9	1
15	9	2
15	9	3
15	9	4
15	9	5
15	9	6
15	9	7
15	9	8
15	9	9
15	10	1
15	10	2

【００８８】

【表１－１８】

n	k	m
15	10	3
15	10	4
15	10	5
15	10	6
15	10	7
15	10	8
15	10	9
15	10	10
15	11	1
15	11	2
15	11	3
15	11	4
15	11	5
15	11	6
15	11	7
15	11	8
15	11	9
15	11	10
15	11	11
15	12	1
15	12	2
15	12	3
15	12	4
15	12	5
15	12	6
15	12	7
15	12	8
15	12	9
15	12	10
15	12	11
15	12	12

【００８９】

【表１－１９】

n	k	m
15	13	1
15	13	2
15	13	3
15	13	4
15	13	5
15	13	6
15	13	7
15	13	8
15	13	9
15	13	10
15	13	11
15	13	12
15	13	13
15	14	1
15	14	2
15	14	3
15	14	4
15	14	5
15	14	6
15	14	7
15	14	8
15	14	9
15	14	10
15	14	11
15	14	12
15	14	13
15	14	14

【００９０】

適切なアルゴリズムを使用して、同じセット内の任意の２つのコドン間のミスマッチを最大化するコドンのセットを作製することが可能であり、ここでコドンは、任意の２つのコドン間に少なくともｋミスマッチを有するｎ塩基長である。任意の２つのコドン間にお

いて、少なくともミスマッチが存在しなければならないので、ｎ－（ｋ－１）塩基の任意の２つのサブコドンが少なくとも１つのミスマッチを有さなければならない。これは、任意の（ｎ，ｋ）コドンセットについて4^{n-k+1}の上限を設定する。このようなアルゴリズムは、好ましくは、長さｎ－（ｋ－１）の4^{n-k+1}の可能なサブコドンで開始し、次いで、常にｋミスマッチを維持する塩基についてｋ－１塩基を追加する全ての組み合わせを試験する。全ての可能な（ｎ，ｋ）セットは、ｎ≦６について作製され得る。ｎ＞６について、コドンの4^{n-k+1}の上限は、マッチし得ず、実行可能なコドンの「完全な」パッキングは、数学的に不可能である。同じコドンセット内のコドン間に少なくとも１つのミスマッチｋが存在することに加えて、１つのコドンセットの全てのコドンと別のコドンセットの全てのコドンとの間に少なくとも１つのミスマッチｍも存在する。このアプローチを使用して、異なるセットのコドンは、コドンが反復されないように作製され得る。

【００９１】

例として、４つ（ｎ＝５、ｋ＝３、ｍ＝１）のセット（それぞれ、６４コドンを有する）は、異なるコドンセット内の任意の２つのコドン間の少なくとも１つのミスマッチおよび同じセットのコドン間の少なくとも３つのミスマッチを常に有するように選択され得る。

【００９２】

【表２】

表　2: (5,3,1) コドンセット１の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCTC	CCGAG	CCTCT	CCAGA	CGCGT	CGGCA
CGTAC	CGATG	CTCCG	CTGGC	CTTTA	CTAAT
CACAA	CAGTT	CATGG	CAACC	GCCCA	GCGGT
GCTTG	GCAAC	GGCAG	GGGTC	GGTGA	GGACT
GTCTT	GTGAA	GTTCC	GTAGG	GACGC	GAGCG
GATAT	GAATA	TCCGG	TCGCC	TCTAA	TCATT
TGCTA	TGGAT	TGTCG	TGAGC	TTCAC	TTGTG
TTTGT	TTACA	TACCT	TAGGA	TATTC	TAAAG
ACCAT	ACGTA	ACTGC	ACACG	AGCCC	AGGGG
AGTTT	AGAAA	ATCGA	ATGCT	ATTAG	ATATC
AACTG	AAGAC	ATCA	AAAGT		

【００９３】

【表３】

表　3: (5,3,1) コドンセット２ の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCAC	CCGTG	CCTGT	CCACA	CGCCT	CGGGA
CGTTC	CGAAG	CTCGG	CTGCC	CTTAA	CTATT
CACTA	CAGAT	CATCG	CAAGC	GCCGA	GCGCT
GCTAG	GCATC	GGCTG	GGGAC	GGTCA	GGAGT
GTCAT	GTGTA	GTTGC	GTACG	GACCC	GAGGG
GATTT	GAAAA	TCCCG	TCGGC	TCTTA	TCAAT
TGCAA	TGGTT	TGTGG	TGACC	TTCTC	TTGAG
TTTCT	TTAGA	TACGT	TAGCA	TATAC	TAATG
ACCTT	ACGAA	ACTCC	ACAGG	AGCGC	AGGCG
AGTAT	AGATA	ATCCA	ATGGT	ATTTG	ATAAC
AACAG	AAGTC	AATGA	AAACT		

【００９４】

【表４】

表　4: (5,3,1) コドンセット３の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCTG	CCGAC	CCTCA	CCAGT	CGCAT	CGGTA
CGTGC	CGACG	CTCCC	CTGGG	CTTTT	CTAAA
CACGA	CAGCT	CATAG	CAATC	GCCAA	GCGTT
GCTGG	GCACC	GGCTC	GGGAG	GGTCT	GGAGA
GTCGT	GTGCA	GTTAC	GTATG	GACCG	GAGGC
GATTA	GAAAT	TCCGC	TCGCG	TCTAT	TCATA
TGCCA	TGGGT	TGTTG	TGAAC	TTCAG	TTGTC
TTTGA	TTACT	TACTT	TAGAA	TATCC	TAAGG
ACCCT	ACGGA	ACTTC	ACAAG	AGCGG	AGGCC
AGTAA	AGATT	ATCTA	ATGAT	ATTCG	ATAGC
AACAC	AAGTG	AATGT	AAACA		

【００９５】

【表５】

表　５：(5,3,1) コドンセット４の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCAG	CCGTC	CCTGA	CCACT	CGCTT	CGGAA
CGTCC	CGAGG	CTCGC	CTGCG	CTTAT	CTATA
CACCA	CAGGT	CATTG	CAAAC	GCCTA	CGAT
GCTCG	GCAGC	GGCAC	GGGTG	GGTGT	GGACA
GTCCT	GTGGA	GTTTC	GTAAG	GACGG	GAGCC
GATAA	GAATT	TCCCC	TCGGG	TCTTT	TCAAA
TGCGA	TGGCT	TGTAG	TGATC	TTCTG	TTGAC
TTTCA	TTAGT	TACAT	TAGTA	TATGC	TAACG
ACCGT	ACGCA	ACTAC	ACATG	AGCCG	AGGGC
AGTTA	AGAAT	ATCAA	ATGTT	ATTGG	ATACC

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
AACTC	AAGAG	AATCT	AAAGA		

【００９６】

同様に、以下に示すような、４つの（ｎ＝６、ｋ＝４、ｍ＝２）セット（それぞれ、６４コドンを有する）は、異なるコドンセット内の任意の２つのコドン間の少なくとも２つのミスマッチおよび同じセットのコドン間の少なくとも４つのミスマッチを常に有するように選択され得る。

【００９７】

【表６】

表　6: (6,4,2) コドンセット１の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCTCC	TCGAAC	CCGCTG	TCTCCA	CGGTAT	TCATTT
CCAGAA	TGCACT	CGCCGA	TGGGTA	CTCAAG	TGTTGC
CGTGCG	TGACAG	CGAATC	TTCCTC	CTACCT	TTGTCG
CTGGGC	TTTGAT	CTTTTA	TTAAGA	CATCAC	TACTAA
CACGTT	TAGCGT	CAGACA	TATATG	GCGGCT	TAAGCC
CAATGG	ACCCAT	GCCATA	ACGTGA	GGCGAC	ACTGTC
GCTTAG	ACAACG	GCACGC	AGCTTG	GGATCA	AGGCCC
GGGAGG	AGTAAA	GGTCTT	AGAGGT	GTTACC	ATCGCA
GTCTGT	ATGATT	GTGCAA	ATTCGG	GAGTTC	ATATAC
GTAGTG	AACAGC	GACCCG	AAGGAG	TCCGGG	AATTCT
GATGGA	AAACTA	GAAAAT	CCTAGT		

【００９８】

【表７】

表　7: (6,4,2) コドンセット２の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCCTC	TCGGGC	CCGTCG	TCTTTA	CGGCGT	TCACCT
CCAAGA	TGCGTT	CGCTAA	TGGACA	CTCGGG	TGTCAC
CGTATG	TGATGG	CGAGCC	TTCTCC	CTATTT	TTGCTG
CTGAAC	TTTAGT	CTTCCA	TTAGAA	CATTGC	TACCGA
CACACT	TAGTAT	CAGGTA	TATGCG	GCGATT	TAAATC
CAACAG	ACCTGT	GCCGCA	ACGCAA	GGCAGC	ACTACC
GCTCGG	ACAGTG	GCATAC	AGCCCG	GGACTA	AGGTTC
GGGGAG	AGTGGA	GGTTCT	AGAAAT	GTTGTC	ATCATA
GTCCAT	ATGGCT	GTGTGA	ATTTAG	GAGCCC	ATACGC

GTAACG	AACGAC	GACTTG	AAGAGG	TCCAAG	AATCTT
GATAAA	AAATCA	GAAGGT	CCTGAT		

【００９９】

【表８】

表　8: (6,4,2) コドンセット３の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCGAC	TCGCCC	CCGAGG	TCTAAA	CGGGCT	TCAGGT
CCATCA	TGCCAT	CGCATA	TGGTGA	CTCCCG	TGTGTC
CGTTAG	TGAACG	CGACGC	TTCAGC	CTAAAT	TTGGAG
CTGTTC	TTTTCT	CTTGGA	TTACTA	CATACC	TACGCA
CACTGT	TAGATT	CAGCAA	TATCGG	GCGTAT	TAATAC
CAAGTG	ACCACT	GCCCGA	ACGGTA	GGCTCC	ACTTGC
GCTGCG	ACACAG	GCAATC	AGCGGG	GGAGAA	AGGAAC
GGGCTG	AGTCCA	GGTAGT	AGATTT	GTTCAC	ATCTAA
GTCGTT	ATGCGT	GTGACA	ATTATG	GAGGGC	ATAGCC
GTATGG	AACCTC	GACAAG	AAGTCG	TCCTTG	AATGAT
GATTTA	AAAAGA	GAACCT	CCTCTT		

【０１００】

【表９】

表　9: (6,4,2) コドンセット４の配列

コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列	コドン配列
CCCAGC	TCGTTC	CCGGAG	TCTGGA	CGGATT	TCAAAT
CCACTA	TGCTGT	CGCGCA	TGGCAA	CTCTTG	TGTACC
CGTCGG	TGAGTG	CGATAC	TTCGAC	CTAGGT	TTGAGG
CTGCCC	TTTCTT	CTTAAA	TTATCA	CATGTC	TACATA
CACCAT	TAGGCT	CAGTGA	TATTAG	GCGCGT	TAACGC
CAAACG	ACCGTT	GCCTAA	ACGACA	GGCCTC	ACTCAC
GCTATG	ACATGG	GCAGCC	AGCAAG	GGAAGA	AGGGGC
GGGTCG	AGTTTA	GGTGAT	AGACCT	GTTTGC	ATCCGA
GTCACT	ATGTAT	GTGGTA	ATTGCG	GAGAAC	ATAATC
GTACAG	AACTCC	GACGGG	AAGCTG	TCCCCG	AATAGT
GATCCA	AAAGAA	GAATTT	CCTTCT		

【０１０１】

コドンはまた、ＧＣ含有量に対する制御を増加し、従って、コドンおよびアンチコドンの融点に対する制御を増加するように選択され得る。ＧＣ含有量　対　ＡＴ含有量のおいて幅広い範囲を有するコドンセットは、異なる融点に起因して、異なる効率でアニールする）試薬を生じ得る。異なる（ｎ，ｋ）セット間のＧＣ含有量をスクリーニングすることによって、コドンセットについてのＧＣ含有量は、最適化され得る。例えば、４つの（６，４，２）コドンセットは、表６～９に記載され、各々が、同一のＧＣ含有量を有する（すなわち、５０％ＧＣ含有量）を有する４０コドンを含む。各位置においてこれらの４０コドンのみを使用することによって、理論的に全ての試薬が、匹敵する融点を有し、ライブラリー合成に影響し得るアニーリングにおける潜在的なバイアスを除く。反応発見系のような特定の適用について適切な多数のミスマッチを維持するより長いコドンはまた、このアプローチを使用して選択され得る。例えば、低いＧＣコドンを高いＧＣコドンにマッチさせながら、２つの（６，４）セットを一緒に組み合わせることによって、６４コドンを有する（１２，８）セット（全てが５０％ＧＣ含有量を有する）が、反応発見選択における使用ならびに複数のマッチが有利であり得る他の適用のために作製され得る。これらのコドンは、反応発見についての機能的群の組み合わせの３０×３０マトリクスをコードするための必要条件を満足する。

【０１０２】

図６Ａに示されるように、アンチコドンがコドンにのみ結合することが意図されるものの、アンチコドンはまた、相補的な配列が存在する場合、テンプレート上の意図しない配列に結合し得る。このように、アンチコドンは、図６Ｂに示されるように、非コドン配列に不注意に結合し得る。あるいは、図６Ｃおよび６Ｄに示されるように、アンチコドンは、部分的に１つのコドンにそして部分的に別のコドン（図６Ｃ）にまたは非コドン配列（図６Ｄ）にアニーリングすることによって、フレーム外で（ｏｕｔ－ｏｆ－ｆｒａｍｅ）不注意に結合し得る。最後に、図６Ｅに示されるように、アンチコドンは、間違ったコドンにインフレームで結合し得、問題は、各コドンを区別する少なくとも一塩基の違いを必要とすることによって上記に記載されるコドンセットによってアドレスされる。現実に、非コード配列およびフレーム外結合の問題（図６Ｂ～Ｄ）は、リボソームによって避けら

れる。しかし、本明細書中に記載される核酸テンプレート型方法は、リボソームの忠実度を利用しない。従って、図６Ｂ～Ｄのように、間違ったアニーリングを避けるために、テンプレートは、アンチコドンに相補的な配列が、インフレームのコドン位置で排他的に見いだされるように設計され得る。例えば、コドンは、特定の塩基（例えば、「Ｇ」）で開始するかまたは終了するように設計され得る。塩基がテンプレートにおける全ての他の位置から削除される（すなわち、全ての他の位置が、Ｔ、ＣおよびＡに制限される）場合、テンプレートの完全なコドン配列のみが、インフレームコドン配列にある。同様に、コドンは、その配列が独特であり、それ以外でテンプレート中に見られないように十分に長くなるように設計され得る。

【０１０３】

核酸テンプレート型合成が、ポリマーを作製するために使用される場合、スペーサー配列はまた、フレームシフトを妨げるために、コドン間に配置され得る。さらに好ましくは、各ポリマーサブユニットをコードするテンプレートの塩基（ポリマーの「遺伝子コード」）が、表１０から選択されて、フレーム外アニーリングの可能性を除外するかまたは最小化し得る。これらの遺伝子コードは、望ましくないフレームシフトした、核酸テンプレート型ポリマー翻訳を減少し、そして予期される融点の範囲およびフレーム外アニーリングの間に生じるミスマッチの最小数において異なる。

【０１０４】

（表１０：フレーム外アニーリングを除外する核酸テンプレート型ポリマーのための代表的な遺伝子コード）

【０１０５】

【表１０】

配列	可能なコドンの数
VVNT	36個の可能なコドン
NVVT	36個の可能なコドン
SSWT	8個の可能なコドン
SSST	8個の可能なコドン
SSNT	16個の可能なコドン
VNVNTまたはNVNVT	144個の可能なコドン
SSSWTまたはSSWST	16個の可能なコドン
SNSNTまたはNSNST	64個の可能なコドン
SSNWTまたはSWNST	32個の可能なコドン
WSNSTまたはNSWST	32個の可能なコドン

【０１０６】

ここで、Ｖ＝Ａ、Ｃ、またはＧ、Ｓ＝ＣまたはＧ、Ｗ＝ＡまたはＴ、Ｎ＝Ａ、Ｃ、Ｇ、またはＴ。

【０１０７】

現実に、開始コドンおよび終止コドンは、特に、ポリマー合成の文脈において、非コドンへの間違ったアンチコドンのアニーリングを制限するため、および成長するポリマーの

過剰な伸長を妨げるために有用である。例えば、開始コドンは、低分子足場を有する移動単位またはポリマー合成に使用するための開始モノマー単位にアニールし得る；開始モノマー単位は、実施例９Ａに示されるように、光不安定性保護基によってマスクされ得る。終止コドンは、ポリマー合成を終了するために使用される場合、合成に使用される任意の他のコドンと矛盾するべきではなく、他のコドンと同じ一般形式であるべきである。一般的に、終止コドンは、さらなる結合のための反応性基を提供しないことによって重合を停止するモノマー単位をコードし得る。例えば、停止モノマー単位は、実施例９Ａに示されるように、第一級アミンよりもむしろアセトアミドのようなブロックされた反応性基を含み得る。他の実施形態において、停止モノマー単位は、重合を終了させ、そして得られる高分子の精製を促進するビオチン化末端を含み得る。

【０１０８】

（ｉｉｉ）テンプレート構造

先に考察されるように、企図される核酸テンプレート型合成の型に依存して、テンプレートは、特定の反応単位とさらに結合し得る（例えば、共有結合し得る）。核酸テンプレート型合成において有用な種々のテンプレートが図７Ａ～７Ｇに示され、「らせんの末端」または「Ｅ」テンプレート（図７Ａ～Ｃを参照のこと）、「ヘアピン」または「Ｈ」テンプレート（図７Ｄを参照のこと）、「オメガ」または「Ω」テンプレート（図７Ｅ～Ｆを参照のこと）、または「Ｔ」テンプレート（図７Ｇを参照のこと）として称されるテンプレートを含む。

【０１０９】

図７Ａ～Ｃは、アニールされたテンプレート上の反応単位（Ａによって示される）および移動単位（Ｂによって示される）が、１塩基によって（図７Ａ）、１０塩基によって（図７Ｂ）、および２０塩基によって（図７Ｃ）、分離されているＥ型テンプレート構造を示す。図７Ｄは、Ｈ型のテンプレート構造を示し、ここで、反応単位がテンプレート（Ａによって示される）に結合し、そしてテンプレートは、折り畳まれて、複数の分子内結合によって安定化されたヘアピンを作り出す。示されるように、アニールされたテンプレート上の反応単位（Ａによって示される）および移動単位（Ｂによって示される）は、１塩基によって分離される。図７Ｅ～Ｆは、オメガ型のテンプレート構造を示し、ここで、反応単位Ｂを有する移動単位に対するコドンが、１０個の介在するテンプレート塩基（図７Ｅ）または２０個の塩基（図７Ｅ）によってテンプレート上の反応単位Ａから分離される。図７Ｅにおいて、オメガテンプレートは、３塩基不変領域（Ω－３）を含み、そして移動単位がテンプレートにアニールする場合、７塩基ループを作製する。図７Ｆにおいて、オメガテンプレートは、５塩基不変領域（Ω－５）を含み、そして移動単位がテンプレートにアニールする場合、１５塩基ループを作り出す。ループは、移動単位としてより大きくなると、テンプレートの不変領域からさらに離れるコドンにアニールする。図７Ｇは、Ｔ型テンプレート構造を示し、ここで、アニールされたテンプレート上の反応単位（Ａによって示される）および移動単位（Ｂによって示される）は、１塩基によって分離される。図７Ｇにおいて、反応単位Ａは、テンプレートの５’末端および３’末端の中間の位置で結合する。この構造を使用して、反応単位が、テンプレートの５’末端の少なくとも１０塩基、２０塩基、３０塩基、４０塩基、５０塩基、６０塩基、７０塩基またはそれ以上の下流の位置、および／またはテンプレートの３’末端の少なくとも１０塩基、２０塩基、３０塩基、４０塩基、５０塩基、６０塩基、７０塩基またはそれ以上の上流の位置でテンプレートに結合され得ることが企図される。

【０１１０】

Ｅ型テンプレート構造およびＨ型のテンプレート構造が、核酸媒介化学合成を促進する能力は、実施例１に詳細に記載される。しかし、核酸媒介合成を実行する結果として、特定の反応（距離依存性反応と呼ばれる）が、テンプレート上のアニールされた反応単位および移動単位が少数の塩基で分離された場合でさえ、効率的に進行しないことを発見した。Ｅ型テンプレートおよびＨ型のテンプレートを使用する場合、特定の距離依存性反応が、テンプレートの反応性末端においてテンプレート塩基によってのみコードされ得る。新

たなΩ型のテンプレートが、Ｅ型およびＨ型のテンプレート（実施例５を参照のこと）を用いて経験され得る距離依存性問題を克服する。さらに、アニールされた反応単位間の二本鎖核酸の存在は、一本鎖テンプレートが必要とされるので、テンプレート型反応の効率を大きく減少し得ることを発見した。これは、たとえテンプレートが複数の反応をコードするために十分な塩基を含み得るとしても、Ｅ構造またはＨ構造を使用する単一核酸テンプレート型工程において２つ以上の反応を実行することを妨げ得る。新規なＴ型テンプレートが、Ｅ型およびＨ型のテンプレートで経験し得るこの問題を克服する（実施例５を参照のこと）。

【０１１１】

（Ωテンプレート）

Ω構造によって、距離依存性反応が、テンプレートの反応性末端から離れたヌクレオチド塩基によって効率的に指向され得、それらの距離依存性を効率的に克服する。例として、Ω構造において、テンプレートの５塩基は、テンプレートの５’末端において一定に保持される（図７Ｆを参照のこと）。移動単位は、それらの３’末端において、相補的な５塩基を含むが、そうでなければ、テンプレート遠位コード領域に相補的な配列を含む。これによって、移動単位が、テンプレートの遠位コード領域にアニールし得ながら、距離依存性反応が進行することを通常妨げる多数のテンプレート塩基をループではずす（ｌｏｏｐｉｎｇ　ｏｕｔ）ことによって近位に移動単位の反応性基をなお置換し得る。オメガ構造は、テンプレートの末端に相補的な移動単位の５塩基が室温でテンプレートにそれら事自体によってアニールするには不十分であるので、配列特異性を保持する。

【０１１２】

この型のテンプレート構造の有用性は、例えば、核酸テンプレート型還元的アミノ化反応において明らかである。これらの反応は、強く距離依存性であり、アニールされるアミン基とアルデヒド基との間に１つより多くの塩基の距離を有するヘアピン構造またはらせんの末端構造を使用して反応が試みられる場合、非常に少ない生成物が生成される。対照的に、反応末端から２０塩基離れたテンプレートの領域が試薬を補充するために使用される場合でさえ、オメガ構造を使用して、産物を効率的に形成する（実施例５を参照のこと）。移動単位のコード領域がミスマッチである場合、テンプレートの末端に相補的な移動単位の末端における５塩基の存在にも関わらず、生成物は、観察されない。

【０１１３】

距離依存性核酸媒介反応が、テンプレートの反応性末端から離れた塩基によってコードされ得ることによって、オメガ構造は、テンプレートのいずれかにおいてコードされ得る反応の型を拡張する。

【０１１４】

（Ｔテンプレート）

Ｔ構造によって、単一のテンプレートが、２つの距離依存性反応をコードし得、さらに、テンプレートが、単一の溶液または「ワンポット」で２つの異なるヌクレオチド－テンプレート型反応を受け得る。この構造を使用して、テンプレートは、テンプレートの末端よりも中心に位置する塩基の非ワトソン－クリック面を介して、分子足場を提示し得る（図７Ｇを参照のこと）。これによって、２つの移動単位は、テンプレートに結合された反応単位のいずれかの側にアニールし得、そして２つのヌクレオチド－テンプレート型変換の生成物を与えるように、同時にまたは連続的な工程のいずれかで反応し得る。予期されるように、距離依存性反応は、反応性基が近位である場合、この構造を許容する。従って、Ｔ型構造によって、２つの配列特異的核酸テンプレート型反応が、１つの溶液中で１つのテンプレートで（すなわち、一工程で）行われ得る。標的構造を合成するために必要とされる別々のＤＮＡテンプレート型工程の数を減少させることに加えて、この構造は、合成ライブラリーにおける構造的複雑性を構築するために通常使用される３つ以上の構成成分の反応を可能にし得る。

【０１１５】

オメガ構造およびＴ構造は、他のテンプレート構造でより少ない工程で実行され得る幅

広い範囲のテンプレート媒介反応を可能にし、距離依存性反応において特に有用である。利用可能な構造の多様性は、（特に、低分子の合成のための）テンプレートの反応単位の配置において有意な可撓性を提供する。反応単位（例えば、分子足場を含む）が、テンプレートに沿った任意の部位（５’末端（例えば、らせんの末端の構造、オメガ構造）、３’末端（らせんの末端の構造、オメガ構造）、ヘアピンループの末端（例えば、ヘアピン構造）、またはテンプレートの中間（例えば、Ｔ構造）を含む）でテンプレートと結合し得ることが企図される。好ましくは、分子足場は、テンプレートに共有結合される。しかし、特定の実施形態において、分子足場は、他の反応単位と同様に、分子足場が非共有結合（ここで、水素結合）相互作用のみを介して、テンプレートに結合される移動単位を使用して、テンプレートにもたらされ得る。しかし、特定の状況下において、分子足場または別の反応単位をテンプレートに共有結合させて、Ｔ型またはＥ型テンプレート構造を作製することが有利であり得ることが企図される。距離依存性でない反応について、テンプレートに沿った分子足場の位置は、移動単位によってテンプレートにもたらされる反応単位が、たとえ足場および反応性基が多くの塩基によって分離されるとしても、足場と反応し得るので、より可撓性である。

【０１１６】

（ｉｖ）テンプレート合成

テンプレートは、当該分野で周知の方法論を使用して、合成され得る。例えば、核酸配列は、核酸配列を調製するために当該分野で公知の任意の方法を使用して調製され得る。これらの方法としては、インビボおよびインビトロの方法（ＰＣＲ、プラスミド調製、エンドヌクレアーゼ消化、固相合成（例えば、自動化合成器を使用する）、インビトロ転写、鎖分離などを含む）が挙げられる。合成に続いて、テンプレートは、所望の場合、当該分野で公知の標準的なカップリング化学を使用して、目的の反応単位と結合し得る（例えば、共有結合または非共有結合）。

【０１１７】

例として、例えば、実施例９Ｃにおいて考察されるように、示されるオリゴヌクレオチドカセットを使用して、ワンポットモジュール連結反応を介してテンプレートのライブラリーを作製することが可能である。詳細には、単一の溶液において、全ての移動単位アニーリング領域を表す短いオリゴヌクレオチドを一緒にＴ４　ＤＮＡリガーゼと組み合わせることが可能である。オリゴヌクレオチド末端の配列設計に起因して、所望の構築されたテンプレートライブラリーは、連結が完了した場合、唯一の可能な生成物である。この戦略は、n^mテンプレートのライブラリーを組み立てるために、２ｎ×ｍの短いオリゴヌクレオチドを必要とし、ｎは、１つのコドン位置当たりの異なる配列の数を示し、ｍは、ライブラリーのメンバー当たりのコドンの数を示す。従って、コドン当たり６４の可能な配列を有する２つのコドンテンプレートについて、２×６４×２（２５６）個のオリゴヌクレオチドが、64^2（４０９６）テンプレートのライブラリーを構築するために必要とされる。８３員の大環状フマルアミドライブラリーについてのテンプレートのワンポットアセンブリが実施例９Ｂにおいて考察される。所望のテンプレートライブラリーの優れた収率は、４時間の連結反応から生じた。連結に続いて、Ｔ７エキソヌクレアーゼは、非コードテンプレート鎖を分解するために添加された（所望のコード鎖は、その非天然の５’－アミノエチレングリコールリンカーによって保護される）。この手順は、約６時間で、２０ｎｍｏｌの５’官能基化単鎖テンプレートライブラリー（数千のＤＮＡテンプレート型ライブラリー合成および選択のための十分な材料）を提供し得る。各テンプレートの末端において不変の１０塩基プライマー結合領域は、この構築された材料から１，０００分子（10^{-21}ｍｏｌ）の少なさのテンプレートのＰＣＲ増幅を許容するのに十分であった。

【０１１８】

テンプレートを合成するための別のアプローチは、図８に示される。特に、図８は、５’→３’方向に、低分子反応物、ヘアピンループ、アニーリング領域、コード領域、およびプライマー結合部位を含むテンプレートを作製するためのプロトコルを示す。この型の

プロトコルは、種々のテンプレート（特に、本発明の実施において有用なH型のテンプレート）を合成するために使用され得る。

【０１１９】

多数の種々のテンプレートを合成するための効率的な方法は、「スプリット－プール」技術を使用することである。オリゴヌクレオチドは、標準的な３’→５’化学を使用して合成される。最初に、不変の３’末端が合成される。次いで、これは、ｎ個の異なる容器に分割され、ここで、ｎは、テンプレートのその位置において現れる異なるコドンの数である。各容器について、ｎ個の異なるコドンのうちの１つが、不変の３’末端の（成長する）５’末端で合成される。従って、各容器は、５’から３’に、不変の３’末端に結合される異なるコドンを含む。次いで、ｎ個の容器がプールされ、その結果、単一の容器が、不変の３’末端に結合されたｎ個の異なるコドンを含む。コドンの５’末端に隣接する任意の一定の塩基が、ここで合成される。次いで、このプールは、ｍ個の異なる容器に分割され、ここで、ｍは、テンプレートの次（さらに５’側）の位置に現れる異なるコドンの数である。異なるコドンは、ｍ個の容器の各々において（成長するオリゴヌクレオチドの５’末端において）合成される。得られるオリゴヌクレオチドは、単一の容器中にプールされる。分割、合成、およびプールは、必要とされる場合、繰り返されて、オリゴヌクレオチドの全てのコドンおよび不変領域を合成する。

【０１２０】

（ＩＩ．移動単位）

移動単位は、アンチコドン配列および反応単位を含むオリゴヌクレオチドを含む。アンチコドンは、テンプレート内に存在するコドンに相補的であるように設計される。テンプレートに使用される配列ならびにコドンの長さは、アンチコドンの設計する際に考慮する必要がある。テンプレートに使用されるコドンに相補的である任意の分子が、使用され得る（天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドを含む）。特定の他の実施形態において、コドンは、自然界で見出される１つ以上の塩基（すなわち、チミジン、ウラシル、グアニジン、シトシン、およびアデニン）を含む。従って、アンチコドンは、塩基、糖および任意のリン酸基を有する通常自然界で見出される１つ以上のヌクレオチドを含み得る。あるいは、塩基は、通常自然界で見出される糖－リン酸骨格でない骨格（例えば、非天然ヌクレオチド）を介して連結され得る。

【０１２１】

上で考察されるように、アンチコドンは、移動単位を形成するために反応単位の特定の型に結合する。この反応単位は、異なる実体を表し得るか、またはアンチコドン単位の機能性の一部であり得る。特定の実施形態において、各々のアンチコドン配列は、１つのモノマー型に結合する。例えば、アンチコドン配列ＡＴＴＡＧは、イソブチル側鎖を有するカルバメート残基に結合し得、そしてアンチコドン配列ＣＡＴＡＧは、フェニル側鎖を有するカルバメート残基に結合し得る。モノマー単位に対するアンチコドンのこの１対１のマッピングは、合成に使用される核酸テンプレートを配列決定することによって、ライブラリーの任意のポリマーをデコードすることを可能にし、そして元のポリマーの配列を知ることによって、同じポリマーまたは関連ポリマーを合成することを可能にする。テンプレートの配列を変化する（例えば、変異させる）ことによって、異なるモノマー単位が置かれ、それによって関連ポリマーの合成を可能にし、これは、引き続いて選択され、そして進化され得る。特定の好ましい実施形態において、いくつかのアンチコドンは、自然界におけるのと同様に、１つのモノマー単位をコードし得る。

【０１２２】

特定の他の実施形態において、ポリマーライブラリーよりもむしろ低分子ライブラリーが、作製される場合、アンチコドンは、一般的に、低分子骨格を改変するために使用される反応単位または反応物と結合する。特定の実施形態において、この反応物は、反応物を低分子足場の反応性の近位に来させるのに十分長いリンカーを介してアンチコドンと結合する。このリンカーは、好ましくは、分子間反応を可能にし、そして分子内反応を最小化する長さおよび組成物である。この反応物は、核酸テンプレート型合成（実施例２、４お

よび７を参照のこと）において利用され得、そして化学分野において公知の任意の化学基、触媒（例えば、有機金属化合物）、または反応性部分（例えば、求電子基、求核基）であり得る広い範囲の反応によって実証されるような種々の試薬を含む。

【０１２３】

さらに、移動単位における、アンチコドンと反応単位（例えば、モノマー単位または反応物）との間の結合は、共有結合または非共有結合であり得る。この結合は、共有結合を介し得、そして特定の実施形態において、共有結合は、切断可能であり得る。

【０１２４】

従って、アンチコドンは、リンカー部分を介して反応物と結合し得る（実施例３を参照のこと）。連結は、光、酸化、加水分解、酸への曝露、塩基への曝露、還元などによって切断され得る。Ｆｒｕｃｈｔｅｌら（１９９６）、ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．ＥＮＧＬ．３５：１７は、本発明の実施において有用な種々の連結を記載する。リンカーは、低分子足場と反応物の接触を促進し、そして特定の実施形態において、所望の反応に依存して、脱離基としてＤＮＡを位置づける（「自動切断」ストラテジー）か、あるいは「スカーレス」リンカーストラテジー（これは、化学官能基を有する追加の原子を置き残す（ｌｅｖｉｎｇ　ｂｅｈｉｄ）ことなく生成物を生じる）または「有用なスカー」ストラテジー（リンカー部分がリンカー切断に続く後の工程において官能基化するために置き残される）を介してテンプレートに反応性基を連結し得る。

【０１２５】

「自動切断可能」リンカーストラテジーに関して、ＤＮＡ反応性基の結合は、反応の自然な結果として切断される。「スカーレス」リンカーストラテジーにおいて、１つの反応性基のＤＮＡテンプレート型反応は、第２の反応性基を介して結合されたリンカーの切断が続き、化学官能基を提供し得るさらなる原子を置き残すことなく生成物を生じる。あるいは、「有用なスカー」は、リンカー切断の結果として、有用な原子および／または化学基を導入することが有利であり得るという理論において使用され得る。特に、「有用なスカー」は、リンカーの切断に続いて、置き残され、引き続く工程において官能基化され得る。

【０１２６】

アンチコドンおよび反応単位（モノマー単位または反応物）はまた、非共有相互作用（例えば、イオン性、静電性、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、πスタッキングなど、およびこれらの組み合わせ）を介して結合され得る。１例を挙げると、アンチコドンは、ビオチンに結合し得、そしてモノマー単位は、ストレプトアビジンに結合され得る。ビオチンに結合するストレプトアビジンの傾向は、アンチコドンとモノマー単位との間の非共有結合を導いて移動単位を形成する。

【０１２７】

テンプレートへの移動単位の特異的なアニーリングによって、多くの従来の有機合成に使用される濃度よりも低い濃度で移動単位を使用することが可能になる。従って、移動単位は、サブミリモル濃度（例えば、１００μＭ未満、１０μＭ未満、１μＭ未満、１００ｎＭ未満、または１０ｎＭ未満）で使用され得る。

【０１２８】

（ＩＩＩ．化学反応）

種々の化合物および／またはライブラリーは、本明細書中に記載される方法を使用して調製され得る。特定の実施形態において、核酸またはそのアナログでなく、似てもいない化合物が、本発明の方法に従って合成される。特定の他の実施形態において、タンパク質、ペプチドまたはそのアナログでなく、似てもいない化合物が、本発明の方法に従って合成される。

【０１２９】

（ｉ）低分子合成のためのカップリング反応

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される方法を使用して、低分子のような化合物を作製することが可能である。これらの低分子は、天然の産物様、非ポリマー、

および／または非オリゴマーであり得る。低分子における実質的な目的は、多くの薬学的調製物における活性成分としてのその使用に一部起因するが、これらはまた、例えば、触媒、材料、または添加物などとして使用され得る。

【０１３０】

本発明の方法を用いた低分子の合成において、進化可能なテンプレートもまた提供される。このテンプレートは、低分子が構築される際の低分子足場を含み得るか、または低分子足場がテンプレートに添加され得る。低分子足場は、官能基化のための部位を有する任意の化学物質であり得る。例えば、低分子足場は、環を作製する原子に結合する官能基化可能基を有する環系（例えば、コレステロール中で見出されるＡＢＣＤステロイド環系）を含み得る。別の例において、低分子は、モルヒネ、エポシロンまたはセファロスポリン抗生物質のような薬剤の内在構造であり得る。低分子足場において官能基化される部位または基は、当該分野で公知の方法および保護基を用いて保護され得る。低分子足場において使用される保護基は、互いに直交し得、保護基は、一度に１つずつ除去され得る。

【０１３１】

この実施形態において、移動単位は、改変、添加、または低分子足場からの除去において使用するための反応物もしくは構築ブロックと結合するアンチコドンを含む。この反応物または構築ブロックは、例えば、求電子物質（例えば、アセチル、アミド、酸クロリド、エステル、ニトリル、イミン）、求核基（例えば、アミン、ヒドロキシル基、チオール）、触媒（例えば、有機金属触媒）、または側鎖であり得る。移動単位は、ハイブリダイゼーション条件下でテンプレートに接触させる。オリゴヌクレオチドアニーリングの結果として、付着した反応物または構築ブロックは、低分子足場上の部位と反応される。特定の実施形態において、低分子テンプレート上の保護基は、官能化されるべき部位から同時に除去され、移動単位の反応物は、足場上の所望の位置のみに反応する。

【０１３２】

反応条件、リンカー、反応物および官能化される部位は、分子間反応を回避し、分子間反応を促進するように選択される。テンプレートと移動単位との連続または同時の接触は、合成される特定の化合物に依存して使用され得る。特別な目的の特定の実施形態において、化合物の多工程合成は、複雑な化合物の多工程を促進するように、テンプレートが２つ以上の移動単位と連続して接触される工程を提供する。

【０１３３】

足場上の部位が改変された後、新たに合成された低分子は、その合成がコードされたテンプレートとの結合を保持する。テンプレートの配列をデコードすることは、合成のヒストリーのデコンヴォルーションを可能にし、それによって低分子の構造をデコンヴォルーションし得る。このテンプレートはまた、所望の低分子をより多く作製するために増幅され得、そして／またはこのテンプレートは関連する低分子を作製するために進化（変異）され得る。低分子はまた、精製またはスクリーニングのためにテンプレートから切断され得る。

【０１３４】

（（ｉｉ）ポリマー合成のためのカップリング反応）

特定の実施形態において、ポリマー（特に、非天然のポリマー）は、本発明の方法に従って調製される。本発明の方法および系を用いて作製され得る非天然のポリマーは、任意の非天然ポリマーを含む。例示的な非天然ポリマーとしては、ペプチド核酸（ＰＮＡ）ポリマー、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリエステル、ポリアクリレート、ポリアルキレン（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン）、ポリカルボネート、非天然の立体化学を有するポリペプチド、非天然のアミノ酸を有するポリペプチド、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、ポリマーは、少なくとも１０、２５、７５、１００、１２５、１５０以上のモノマー単位を含む。本発明の系を用いて合成されるポリマーは、触媒、製薬、金属キレート剤、触媒などとして使用され得る。

【０１３５】

特定の非天然ポリマーの調製において、アンチコドンに接着されたモノマー単位、および本発明において使用されるモノマー単位は、互いに結合してポリマーを形成し得る任意のモノマーまたはオリゴマーであり得る。モノマー単位は、例えば、カルバメート、Ｄ－アミノ酸、非天然のアミノ酸、ＰＮＡ、尿素、ヒドロキシ酸、エステル、カルボネート、アクリレート、エーテルなどであり得る。特定の実施形態において、図４において示されるように、モノマー単位は、このモノマー単位を、成長（ｇｒｏｗｉｎｇ）ポリマー鎖に連結させるために使用される２つの反応基を有する。好ましくは、２つの反応基は同じではなく、モノマー単位は、方向センスにあるポリマー（例えば、１端は、求電子基であり、そして他端が求核基であり得る）に組み込まれ得る。反応基としては、エステル、アミド、カルボン酸、活性化カルボニル基、酸塩化物、アミン、ヒドロキシル基、チオールなどが挙げられ得るが、これらに限定されない。特定の実施形態において、反応基は遮蔽されるか、または保護され（Ｇｒｅｅｎｅら（１９９９）Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｈｙｎｔｈｅｓｉｓ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ Ｗｉｌｅｙ）、その結果、反応基が脱保護される、所望の時まで重合化は生じ得ない。一旦モノマー単位が、核酸テンプレートに沿って集められると、重合化配列の開始は、重合工程および脱保護化工程のカスケードを生じ、ここで、重合化工程は、引き続く重合化工程において使用される反応基の脱保護化を生じる。

【０１３６】

重合化されるモノマー単位は、核酸テンプレートに沿った幾何学に依存する２つ以上のモノマーを含み得る。重合化されるモノマー単位は、核酸テンプレートに沿って、そして特に、そのコードするアンチコドンおよび任意のスペーサー配列によって空けられた距離を横切って伸縮可能でなければない。特定の実施形態において、モノマー単位は、２つのモノマー（例えば、ジカルバメート、ジウレア、ジペプチドなど）を実際に含む。なお他の実施形態において、モノマー単位は、３つ以上のモノマーを実際に含む。例えば、実施例９Ｃは、各モノマー単位が４つのＰＮＡ分子を含む、ＰＮＡベースのポリマーの合成を開示する。

【０１３７】

このモノマー単位は、当該分野において公知の任意の化学基を含み得る。反応化学基（特に、重合化、ハイブリダイゼーションなどと干渉する反応基）は、好ましくは、公知の保護基を用いてマスクされる（Ｇｒｅｅｎｅら（１９９９）前出）。一般に、これらの反応基を遮蔽するために使用される保護基は、重合化工程で使用される基の保護で使用される基に直交する。

【０１３８】

特定の環境において、化学反応の型は、重合化プロセスのフィデリティーに影響し得ることが発見されている。例えば、化学反応に無関係な距離（例えば、反応単位が介在性塩基によって空間を空けて配置される場合に効率的に生じる反応（例えば、アミンアシル化反応））は、ポリマー鎖の特定の位置で間違ったモノマーの偽取り込みを生じ得る。対照的に、距離に依存する（例えば、さらなる反応単位が介在性塩基によって空間を空けて配置される効率を下げる反応（例えば、還元性アミノ化反応））であるテンプレート媒介性合成について化学反応を選択することによって、重合化プロセスのフィデリティーを制御し得る。実施例９は、テンプレート媒介性合成の間、重合化プロセスのフィデリティーを増大させるために距離依存性化学反応を使用する効果を詳細に考察する。

【０１３９】

（ｉｉｉ）官能基の形質転換

核酸－テンプレート合成は、（ｉ）アンマスク（ｕｎｍａｓｋ）されているか、または（ｉｉ）カップリング反応において使用される官能基に相互転換されるかのいずれかである、官能基形質転換をもたらすように使用され得る。ライブラリーの配列－プログラムされたサブセット内の反応性基を連続的に露出または作製することによって、核酸－テンプレート官能基の相互転換は、ライブラリーの多様性を連続的なアンマスキング（ｕｎｍａｓｋｉｎｇ）によって生成し得る。連続的なアンマスキングアプローチは、分子間の非テ

ンプレート反応様式において、核酸（例えば、単純なアルキルハライド）に連結され得る能力を通常欠いている反応物を、テンプレートの配列特異的サブセットと反応させることによってライブラリー多様性を構築することを可能にするという主要な利点をもたらす。この利点は、生成され得る構造型を有意に増加させる。

【０１４０】

本発明の１つの実施形態は、反応単位に存在する官能基の脱保護またはアンマスキングを含む。この実施形態に従って、核酸テンプレートは、保護された官能基を含む反応単位と結合する。移動単位（テンプレートコドン領域に相補的なオリゴヌクレオチドおよび保護基を除去し得る試薬を含む）は、テンプレートにアニーリングし、そして試薬は保護基と反応し、反応単位から除去される。反応単位をさらに官能化するために、次いで、露出された官能基は核酸に連結しない試薬に供される。いくつかの実施形態において、反応単位は２つ以上の保護官能基を含む。さらに他の実施形態において、保護基は、転写単位に連結された試薬と繰り返しアニーリングすることによって連続的に除去される直交性（ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ）保護基である。

【０１４１】

本発明の別の実施形態は、反応単位上に存在する官能基の相互作用に関する。この実施形態に従って、反応を触媒し得る試薬と結合する転写単位は、反応単位を有するテンプレートにアニールされる。核酸に連結されない試薬は、反応物に添加され、そして転写単位試薬は、未結合の試薬と反応単位との間の反応を触媒し、新しい官能化反応単位を得る。いくつかの実施形態において、反応単位は、異なる転写単位結合試薬への反復曝露によって連続的に相互作用される２つ以上の官能基を含む。

【０１４２】

（ｉｖ）反応条件

核酸テンプレート型反応は、水溶液または非水溶液（例えば、有機）、あるいは１つ以上の水溶液および非水溶液の混合物において生じ得る。水溶液において、反応は、約２～約１２、または好ましくは約２～約１０、またはより好ましくは約４～約１０のｐＨ範囲で実施され得る。好ましくは、ＤＮＡ－テンプレート型化学において使用される反応は、高塩基性条件（例えば、ｐＨ＞１２、ｐＨ＞１０）または高酸性条件（例えば、ｐＨ＜１、ｐＨ＜２、ｐＨ＜４）を必ずしも必要としない。なぜなら、非常に厳しい条件は、合成される核酸テンプレートおよび／または分子（例えば、ポリマー、または低分子）の分解または改変をもたらし得る。水溶液は、１つ以上の無機塩（ＮａＣｌ、Na_2SO_4、ＫＣｌ、Mg^{+2}、Mn^{+2}などが挙げられるが、これらに限定されない）を種々の濃度で含み得る。

【０１４３】

核酸－テンプレート型反応にとって適切な有機溶媒としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：塩化メチレン、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、および有機アルコール（メタノールおよびエタノールが挙げられる）。有機溶媒中の反応成分の定量的溶解を可能にするために、第四級アンモニウム塩（例えば、長鎖テトラアルキルアンモニウム塩）が添加され得る（Ｊｏｓｔら（１９８９）ＮＵＣＬＥＩＣ ＡＣＩＤＳ ＲＥＳ．１７：２１４３；Ｍｅｌ’ｎｉｋｏｖら（１９９９）ＬＡＮＧＭＵＩＲ １５：１９２３－１９２８）。

【０１４４】

核酸－テンプレート型反応は、触媒（例えば、同種触媒、異種触媒、相転移触媒および不斉触媒）を必要とし得る。他の実施形態において、触媒は必要とされない。核酸に連結しない、さらなる補助試薬（ａｃｃｅｓｓｏｒｙ ｒｅａｇｅｎｔ）の存在が、いくつかの実施形態において好ましい。有用な補助試薬としては、例えば、以下が挙げられ得る：酸化剤（例えば、$NaIO_4$）；還元剤（例えば、$NaCNBH_3$）；活性化剤（例えば、ＥＤＣ、ＮＨＳ、およびスルホ－ＮＨＳ）；遷移金属（例えば、ニッケル（例えば、$Ni(NO_3)_2$）、ロジウム（例えば、$RhCl_3$）、ルテニウム（例えば、$RuCl_3$）、銅（例えば、$Cu(NO_3)_2$）、コバルト（例えば、$CoCl_2$）、鉄（例えば、

Ｆｅ（ＮＯ$_3$）$_3$）、オスミウム（例えば、ＯｓＯ$_4$）、チタニウム（例えば、ＴｉＣｌ$_4$またはチタニウムテトライソプロポキシド（ｔｉｔａｎｉｕｍ ｔｅｔｒａｉｓｏｐｒｏｐｏｘｉｄｅ）、パラジウム（例えば、ＮａＰｄＣｌ$_4$）、またはＬｎ；遷移金属リガンド（例えば、ホスフィン、アミンおよびハライド）；ルイス酸；およびルイス塩基。

【０１４５】

好ましくは、反応条件は、使用した反応単位およびオリゴヌクレオチドの性質を適切にするために最適化される。

【０１４６】

（ｖ）化学反応の種類

ポリマー、低分子または他の化合物を合成するための公知の化学反応が、核酸－テンプレート型反応において使用され得る。従って、以下に列挙されるような反応が使用され得る：Ｍａｒｃｈ’ｓ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｏｒｇａｎｉｃ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ，有機の教科書、雑誌（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎなど）、およびＣａｒｒｕｔｈｅｒ’ｓ Ｓｏｍｅ Ｍｏｄｅｒｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ。好ましくは、選択された反応は、核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）とマッチするか、またはテンプレートとして使用される改変された核酸とマッチする。

【０１４７】

核酸－テンプレート化学において有用な反応としては、例えば、以下が挙げられる：置換反応、炭素－炭素結合形成反応、除去反応、アシル化反応、および付加反応。本発明において有用な脂肪族求核置換反応の例示（限定ではない）としては、例えば、Ｓ$_N$２反応、Ｓ$_N$１反応、Ｓ$_N$ｉ反応、アリル転移、脂肪族三方晶系炭素（ａｌｉｐｈａｔｉｃ ｔｒｉｇｏｎａｌ ｃａｒｂｏｎ）での求核置換、およびビニル炭素（ｖｉｎｙｌｉｃ ｃａｒｂｏｎ）での求核置換。

【０１４８】

酸素求核基での特定の脂肪族求核置換反応としては、例えば、アルキルハライドの加水分解、ｇｅｎ－ジハライドの加水分解、１，１，１－トリハライドの加水分解、アルキルエステルまたは無機酸の加水分解、ジアゾケトンの加水分解、アセタールおよびエノールエーテルの加水分解、エポキシドの加水分解、アシルハライドの加水分解、無水物の加水分解、カルボキシエステルの加水分解、アミドの加水分解、アルキルハライドのアルキル化（Ｗｉｌｌｉａｍｓｏｎ反応）、エポキシド形成、無機エステルでのアルキル化、ジアゾ化合物でのアルキル化、アルコールの脱水、エステル交換反応、エポキシドのアルコーリシス、オニウム塩でのアルキル化、シランのヒドロキシル化、アシルハライドのアルコーリシス、無水物のアルコーリシス、カルボン酸のエステル化、カルボキシエステルのアルコーリシス（エステル交換反応）、アミドのアルコーリシス、カルボン酸塩のアルキル化、無水酢酸とエーテルの分割、ジアゾ化合物でのカルボン酸のアルキル化、カルボン酸のアシルハライドでのアシル化、カルボン酸のカルボン酸でのアシル化、オキソニウム塩の形成、過酸化物およびヒドロペルオキシドの調製、無機エステル（例えば、ナイトレート、ニトレート、スルホネート）の調製、アミノからのアルコールの調製、ならびに混合した有機－無機無水物の調製。

【０１４９】

硫黄求核基での特定の脂肪族求核置換反応（酸素アナログよりもより求核の傾向がある）としては、例えば、チオールを形成するためのアルキル炭素でのＳＨによる攻撃、チオエーテルを形成するためのアルキル炭素でのＳによる攻撃、アシル炭素でのＤＨまたはＳＲによる攻撃、ジスルフィドの形成、Ｂｕｎｔｅ塩の形成、硫酸塩のアルキル化、およびアルキルチオシアネートの形成が挙げられる。

【０１５０】

窒素求核剤での脂肪族求核置換反応としては、例えば、アミンのアルキル化、アミンの

Ｎ－アリール化、アミノ基によるヒドロキシの置換、アミノ基転移、アミド基転移、ジアゾ化合物でのアミンのアルキル化、エポキシのアミノ化、オキセタン（ｏｘｅｔａｎ）のアミノ化、アジリジンのアミノ化、アルカンのアミノ化、イソシアニドの形成、アシルハライドによるアミノのアシル化、無水物によるアミンのアシル化、カルボン酸によるアミンのアシル化、カルボキシエステルによるアミンのアシル化、アミドによるアミンのアシル化、他の酸誘導体によるアミンのアシル化、アミンおよびイミドのＮ－アルキル化もしくはＮ－アリール化、アミドおよびイミドのＮ－アシル化、エポキシドからのアジリジンの形成、ニトロ化合物の形成、アジドの形成、イソシアネートおよびイソチオシアネートの形成、ならびにアゾキシ化合物の形成が挙げられる。

【０１５１】

ハロゲン求核剤での脂肪族求核置換反応としては、例えば、アルキル炭素での攻撃、ハライド交換、硫酸のエステルおよび硫酸からのアルキルハライドの形成、アルコールからのアルキルハライドの形成、エーテルからのアルキルハライドの形成、エポキシドからのハロヒドリンの形成、ヨウ化リチウムでのカルボキシエステルの切断、ジアゾケトンのα－ハロケトンへの転換、アミンのハライドへの転換、ｔ－アミンのシアンアミドへの転換（ｖｏｎ　Ｂｒａｕｍ反応）、カルボン酸からのアシルハライドの形成、ならびに酸誘導体からのアシルハライドの形成が挙げられる。

【０１５２】

求核剤として水素を用いた脂肪族求核置換反応としては、例えば、アルカリハライドの還元、トシレートの還元、他のスルホネートおよび類似の化合物の還元、アルコールの水素化分解、エステルの水素化分解（Ｂａｒｔｏｎ－ＭｃＣｏｍｂｉｅ反応）、ニトリルの水素化分解、ハロゲンによるアルコキシルの置換、エポキシドの還元、カルボキシエステルの還元的切断、Ｃ－Ｎ結合の還元、脱硫化、アシルハライドの還元、カルボン酸、エステルおよび無水物のアルデヒドへの還元、ならびにアミドのアルデヒドへの還元が挙げられる。

【０１５３】

特定の炭酸求核剤は、本発明の特定の実施形態において使用するにはあまりにも求核性および／または塩基性であり得るが、炭素求核剤を用いる脂肪族求核置換反応としては、例えば、以下が挙げられる：シランとのカップリング、アルキルハライドのカップリング（Ｗｕｒｔｚ反応）、基Ｉ（ＩＡ）およびＩＩ（ＩＩＡ）有機金属試薬とアルキルハライドおよびスルホネートエステルとの反応、有機カプレートとアルキルハライドおよびスルホネートエステルとの反応、他の有機金属試薬とアルキルハライドよびスルホネートエステルとの反応、ハライド基質とのアリルカップリングおよびプロパギルカップリング、硫酸のエステルおよび硫酸、スルホキシド、およびスルホンと有機金属試薬のカップリング、アルコールを含んだカップリング、カルボン酸エステルと有機金属試薬とのカップリング、エステル結合を含む化合物と有機金属試薬との反応、エポキシドと有機金属試薬の反応、アジリジンとの有機金属試薬との反応、活性水素を保持する炭素でのアルキル化、ケトン、ニトリル、およびカンボン酸エステルのアルキル化、カルボン酸塩のアルキル化、ヘテロ原子に対するα位置でのアルキル化（１，３－ジチアン（ｄｉｔｈｉａｎｅｓ）のアルキル化）、ジヒドロ－１，３－オキサジンのアルキル化（アルデヒド、ケトンおよびカルボン酸のＭｅｙｅｒ合成）、トリアルキルボランでのアルキル化、アルキニル炭素でのアルキル化、ニトリルの調製、アルデヒドおよびケトンへのアルキルハライドの変換、カルボン酸およびそれらの誘導体へのアルキルハライド、アルコール、またはアルカンの変換、有機金属化合物を用いたケトンへのアシルハライドの変換、有機金属化合物を用いたケトンへの無水物、カルボン酸エステルまたはアミドの変換、アシルハライドのカップリング、活性水素を保持する炭素でのアシル化、カルボン酸エステルによるカルボン酸エステルのアシル化（Ｃｌａｉｓｅｎ－Ｄｉｅｃｋｍａｎｎ縮合）、カルボン酸エステルを用いたケトンおよびニトリルのアシル化、カルボン酸塩のアシル化、アシルシアニドの調製、ならびにジアゾケトン、ケトン脱カルボニル化。

【０１５４】

スルホニルの硫黄原子での求核攻撃を含む反応もまた、本発明において使用され得、そして、その反応としては、例えば、以下が挙げられる：硫酸誘導体の加水分解（ＯＨによる攻撃）、硫酸エステルの形成（ＯＲの攻撃）、スルホアミドの形成（窒素の攻撃）、スルホニルハライドの形成（ハライドの攻撃）、塩化スルホニルの還元（水素による攻撃）、およびスルホンの調製（炭素による攻撃）。

【０１５５】

芳香族求電子置換反応はまた、ヌクレオチド－テンプレート化学において使用され得る。水素交換反応は、求電子剤として水素を使用する芳香族求電子反応の例である。窒素求電子を使用する芳香族求電子置換反応は、例えば、以下が挙げられる：ニトロ化およびニトロ－脱水素化、ニトロソ－脱水素化のニトロソ化、ジアゾニウムカップリング、ジアゾニウム基の直接的導入、およびアミノ化またはアミノ脱水素化。硫黄求電子剤でのこの型の反応としては、例えば、以下が挙げられる：スルホン化、スルホ－脱水素化、ハロスルホン化、ハロスルホ－脱水素化、硫化およびスルホニル化。ハロゲン求電子剤を用いる反応としては、例えば、以下が挙げられる：ハロゲン化、およびハロ－脱水素化。炭素求電子剤での芳香族求電子置換反応としては、例えば、以下が挙げられる：フリーデル－クラフツアルキル化、アルキル化、アルキル脱水素化、フリーデル－クラフツアリル化（Ｓｃｈｏｌｌ反応）、フリーデル－クラフツアシル化、二置換ホルムアミドでのホルミル化、ジンクシアニドおよびＨＣｌでのホルミル化（Ｇａｔｔｅｒｍａｎ反応）、クロロホルムでのホルミル化（Ｒｅｉｍｅｒ－Ｔｉｅｍａｎｎ反応）、他のホルミル化、ホルミル－脱水素化、カルボニルハライドでのカルボキシル化、二酸化炭素でのカルボキシル化（Ｋｏｌｂｅ－Ｓｃｈｍｉｔｔ反応）、イソシアネートでのアミド化、Ｎ－アルキルカルバモイル－脱水素化、ヒドロキシアルキル化、ヒドロキシアルキル－脱水素化、アルデヒドおよびケトンのシクロ脱水（ｃｙｃｌｏｄｅｈｙｄｒａｔｉｏｎ）、ハロアルキル化、ハロ－脱水素化、アミノアルキル化、アミドアルキル化、ジアルキルアミノアルキル化、ジアルキルアミノ－脱水素化、チオアルキル化、ニトリルとのアシル化（Ｈｏｅｓｃｈ反応）、シアン化およびシアノ－脱水素化。酸素求電子剤を用いる反応としては、例えば、ヒドロキシル化およびヒドロキシ－脱水素化が挙げられる。

【０１５６】

再転位反応としては、例えば、以下が挙げられる：フリース再転位、ニトロ基の移動、ニトロソ基の移動（Ｆｉｓｃｈｅｒ－Ｈｅｐｐ再転位）、アリールアゾ基の移動、ハロゲンの移動（Ｏｒｔｏｎ再転位）、アルキル基の移動など。芳香族環上の他の反応としては、フリーデル－クラフトアルキル化の反転、芳香族アルデヒドの脱炭酸化、芳香族酸の脱炭酸化、Ｊａｃｏｂｓｅｎ反応、脱酸素化、脱スルホン化、ハイドロ－脱スルホン化、脱ハロゲン化、ハイドロ－脱ハロゲン化、および有機金属化合物の加水分解。

【０１５７】

脂肪族求電子置換反応もまた、有用である。S_E1、S_E2（前）、S_E2（後）、S_Ei、付加－除去、および周期的なメカニズムを用いる反応が、本発明において使用され得る。脱離基として水素を用いるこの型の反応としては、例えば、水素交換（デューテリオ－脱水素化、重水素化）、二重結合の移動、およびケト－エノール互変が挙げられる。水素求電子剤との反応としては、例えば、アルデヒドおよびケトンのハロゲン化、カルボン酸およびアシル－ハライドの水素化、ならびにスルホキシドおよびスルホンの水素化が挙げられる。窒素求電子剤との反応としては、例えば、脂肪族ジアゾニウムカップリング、活性水素を有する炭素でのニトロソ化、ジアゾ化合物の直接的形成、α－アジドアミドへのアミノの転換、活性化部位での直接的アミノ化、ならびにニトレン（ｎｉｔｒｅｎｅ）による挿入が挙げられる。硫黄またはセレニウム求電子剤との反応としては、例えば、ケトンおよびカルボン酸エステルのスルフェニル化、スルホン化およびセレニル化が挙げられる。カルボン求電子との反応としては、例えば、脂肪族炭素でのアシル化、β－ケトエステルまたはケトンへのアルデヒドの転換、シアン化、シアノ－脱水素化脱水素化、アルカンのアルキル化、Ｓｔｏｒｋ　ｅｎａｍｉｎｅ反応、およびカルベンによる挿入が挙げられる。金属求電子剤との反応としては、例えば、有機金属化合物での金属化、金属お

よび強塩基での金属化、ならびにシリルエノールエーテルへのエノレートの転換が挙げられる。脱離基として金属を用いる脂肪族求電子置換反応としては、例えば、水素による金属の置換、有機金属試薬と酸素との反応、有機金属試薬と過酸化物との反応、トリアルキルボランのボーレートへの酸化、Ｇｒｉｇｎａｒｄ試薬の硫化化合物への転換、ハロ－脱金属化、有機金属化合物のアミンへの転換、有機金属化合物のケトンへの転換、アルデヒド、カルボン酸エステルおよびアミド、シアノ脱金属化、金属でのトランスメタル化（ｔｒａｎｓｍｅｔａｌａｔｉｏｎ）、金属ハライドでの金属転移、有機金属化合物での金属転移、アルキルハライドの還元、メタロ－脱ハロゲン化、有機金属化合物由来の金属によるハロゲンの置換、脂肪酸の脱カルボキシル化、アルコキシドの切断、アシル基によるカルボキシル基の置換、βケトエステルおよびβ－ジケトンの塩基性切断、ハロホルム（ｈａｌｏｆｏｒｍ）反応、非エノール化ケトンの切断、Ｈａｌｌｅｒ－Ｂａｕｅｒ反応、アルカンの切断、脱シアン化、およびヒドロ－脱シアン化が挙げられる。窒素での求電子置換反応としては、例えば、ジアゾ化、ヒドラジンのアジドへの転換、Ｎ－ニトロ化、Ｎ－ニトロソ－脱水素化、アゾ化合物へのアミンの転換、Ｎ－ハロゲン化、Ｎ－ハロ－脱水素化、一酸化炭素とのアミンの反応、ならびに二酸化炭素とのアミンの反応が挙げられる。

【０１５８】

芳香族求核置換反応はまた、本発明において使用され得る。S_NAr機構、S_N1機構、ベンジン（ｂｅｎｚｙｎｅ）機構、$S_{RN}1$機構または他の機構によって進行する反応が、例えば、使用され得る。酸素求核剤での芳香族求核置換反応としては、例えば、ヒドロキシ－脱ハロゲン化、スルホネート塩のアルカリ融合、およびＯＲまたはＯＡｒの置換が挙げられる。硫化求核剤での反応は、例えば、ＳＨまたはＳＲの置換が挙げられる。窒素求核剤を用いる反応としては、例えば、NH_2、ＮＨＲ、またはNR_2の置換、およびアミノ基によるヒドロキシ基の置換が挙げられる。ハロゲン求核での反応としては、例えば、ハロゲンの導入が挙げられる。求核剤としてハロゲンを用いる芳香族求核置換反応としては、例えば、フェノールおよびフェノールエステルおよびフェノールエーテルの還元、ならびにハライド化合物およびニトロ化合物の還元が挙げられる。炭素求核剤での反応としては、例えば、Ｒｏｓｅｎｍｕｎｄ－ｖｏｎ　Ｂｒａｕｎ反応、アリールハライド、エーテルおよびカルボキシルエステルと有機金属化合物とのカップリング、活性化ハロゲンを含む炭素でのアリール化、アリール基質のカルボン酸、それらの誘導体、アルデヒド、およびケトンへの転換、ならびにＵｌｌｍａｎｎ反応が挙げられる。脱離基としてハロゲンを用いる反応としては、例えば、窒素複素環のアルキル化、アリール化、およびアミン化が挙げられる。脱離基としてN^{2+}を用いる反応としては、例えば、ヒドロキシ－脱ジアゾ化、硫黄含有基による置換、ヨウ素－脱ジアゾ化、ならびにＳｃｈｉｅｍａｎｎ反応が挙げられる。再転位反応としては、例えば、ｖｏｎ　Ｒｉｃｈｔｅｒ再転位、Ｓｏｍｍｅｌｅｔ－Ｈａｕｓｅｒ再転位、アリールヒドロキシアミンの再転位、ならびにＳｍｉｌｅｓ再転位が挙げられる。

【０１５９】

フリーラジカルを含む反応もまた、使用され得るが、ヌクレオチド－テンプレート型化学において使用されるフリーラジカル反応は、ヌクレオチドテンプレートの改変または切断を回避するように注意深く選択されるべきである。限定ではなく、フリーラジカル置換反応が、本発明において使用され得る。特定のフリーラジカル置換反応としては、例えば、以下が挙げられる：ハロゲンによる置換、アルキルカーボンでのハロゲン化、アリルハロゲン化、ベンジンハロゲン化、アルデヒドのハロゲン化、脂肪族炭素でのヒドロキシル化、芳香族炭素でのヒドロキシル化、カルボン酸へのアルデヒドの酸化、環状エーテルの形成、ヒドロペルオキシドの形成、過酸化物の形成、アシル酸化、アシルオキシ－脱水素化、クロロスルホン化、アルカンのニトロ化、アミドへのアルデヒドの直接的転換、アルキル炭素でのアミド化およびアミノ化、感受性（ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｌｅ）位置での単純カップリング、アルキンのカップリング、ジアゾニウム塩による芳香族化合物のアリール化、ジアゾニウム塩による活性化アルケンのアリール化（Ｍｅｅｒｗｅｉｎアリール化）、有機パラジウム化合物によるアルケンのアリール化およびアリキル化（Ｈｅｃｋ反応）

、ビニルチン化合物によるアルケンのアリール化およびアルキル化（Ｓｔｉｌｌｅ反応）、過酸化物による芳香族化合物のアルキル化およびアリール化、芳香族化合物の光化学アリール化、アルキル化、アシル化、ならびに窒素複素環のカルバルコキル化（ｃａｒｂａｌｋｏｘｙｌａｔｉｏｎ）。N^{2+}が脱離基である特定の反応としては、例えば、水素によるジアゾニウム基の置換、クロリンもしくはブロミンによるジアゾニウム基の置換、ニトロ－脱ジアゾ化、硫黄含有基によるジアゾニウム基の置換、ジアゾニウム塩によるアリール二量化、ジアゾニウム塩のメチル化、ジアゾニウム塩のビニル化、ジアゾ塩のアリール化、ならびにジアゾニウム塩のアルデヒド、ケトンまたはカルボン酸への転換が挙げられる。脱離基として金属を用いるフリーラジカル置換反応としては、例えば、Ｇｒｉｇｎａｒｄ試薬のカップリング、ボランのカップリング、および他の有機金属試薬のカップリングが挙げられる。脱離基としてハロゲンを用いる反応が含まれる。種々の脱離基を用いる他のフリーラジカル置換反応としては、例えば、Ｒａｎｅｙ　Ｎｉｃｋｅｌを用いる脱硫酸化、有機リチウム化合物へのスルフィドの転換、脱カルボキシル二量体化（ｄｅｃａｒｂｏｘｙｌａｔｉｖｅ　ｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ（Ｋｏｌｂｅ反応））、Ｈｕｎｓｄｉｅｃｋｅｒ反応、脱カルボキシアリール化、ならびにアルデヒドおよびアシルハライドの脱カルボニル化が挙げられる。

【０１６０】

炭素－炭素多重結合への付加を含む反応もまた、ヌクレオチド－テンプレート型化学において使用される。付加反応において使用され得る任意の機構としては、例えば、求電子付加、求核付加、フリーラジカル付加、および環状機構が挙げられる。結合された系への付加を含む反応もまた、使用され得る。シクロプロパン環への付加もまた、利用され得る。特定の反応としては、例えば、以下が挙げられる：異性化、水素ハライドの付加、二重結合の水和、三重結合の水和、アルコールの付加、カルボン酸の付加、H_2Sおよびチオールの付加、アンモニアおよびアミンの付加、アミドの付加、ヒドラジン酸の付加、二重結合および三重結合の水素化、二重結合および三重結合の他の還元、結合された系の二重結合および三重結合の還元、芳香族環の水素化、シクロプロパンの還元切断、ハイドロボレーション、他のハイドロメタレーション（ｈｙｄｒｏｍｅｔａｌａｔｉｏｎ）、アルカンの付加、アルケンおよび／またはアルキンのアルケンおよび／アルケンへの付加（例えば、ｐｉ－カチオン環化反応、ヒドロ－アルケニル付加）、エン（ｅｎｅ）反応、Ｍｉｃｈａｅｌ反応、カルボニルに結合していない二重結合および三重結合への有機金属の付加、アルキンへの２つのアルキル基の付加、活性化二重結合への有機金属化合物の１，４－付加、活性化二重結合へのボランの付加、活性化二重結合へのスズおよび水素化水銀の付加、活性化二重結合および三重結合のアシル化、アルコール、アミン、カルボキシエステル、アルデヒドなどの付加、二重結合および三重結合のカルボニル化、ハイドロカルボキシル化、ハイドロホルミル化、アルデヒドの付加、ＨＣＮの付加、シランの付加、ラジカル付加、ラジカル環化、二重結合および三重結合のハロゲン化（ハロゲン、ハロゲンの付加）、ハロラクトン化、次亜ハロゲン酸および次亜ハロゲン酸塩の付加（ハロゲン、酸素の付加）、硫化化合物の付加（ハロゲン、硫黄の付加）、ハロゲンおよびアミノ基の付加（ハロゲン、窒素の付加）、ＮＯＸおよびNO_2Xの付加（ハロゲン、窒素の付加）、XN_3の付加（ハロゲン、窒素の付加）、アルキルハライドの付加（ハロゲン、炭素の付加）、アシルハライドの付加（ハロゲン、炭素の付加）、ヒドロキシル化（酸素、酸素の付加）（例えば、OsO_4との非対称ジヒドロキシル化反応）、芳香族環のジヒドロキシル化、エポキシ化（酸素、酸素の付加）（例えば、Ｓｈａｒｐｌｅｓｓ非対称エポキシ化）、ジエンの光酸化（酸素、酸素の付加）、ヒドロキシスルフェニル化（酸素、硫黄の付加）、オキシアミノ化（ｏｘｙａｍｉｎａｔｉｏｎ）（酸素、窒素の付加）、ジアミノ化（ｄｉａｍｉｎａｔｉｏｎ）（窒素、窒素の付加）、アジリジンのホルミル化（窒素の付加）、アミノスルフェニル化（窒素、硫黄の付加）、アシルアシルオキシ化（ａｃｙｌａｃｙｌｏｘｙｌａｔｉｏｎ）およびアシルアミド化（酸素、炭素、または窒素、炭素の付加）、１，３－二極性付加（酸素、窒素、炭素の付加）、Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応、ヘテロ原子Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応、全炭素３　＋２シクロ付加、アルケンの二量体化

、二重結合および三重結合へのカルベンおよびカルベノイドの付加、アルケンの三量体化および四量体化、ならびに他の環付加反応。

【０１６１】

炭素－炭素多重結合への付加を含む反応に加えて、炭素－ヘテロ多重結合への付加反応は、ヌクレオチド－テンプレート型化学において使用され得る。例示的な反応としては、例えば、以下が挙げられる：アルデヒドおよびケトンへの水の付加（水和物の形成）、炭素－窒素二重結合の加水分解、脂肪族ニトロ化合物の加水分解、ニトリルの加水分解、アルデヒドおよびケトンへのアルコールおよびチオールの付加、アルコールの還元アルキル化、イソシアネートへのアルコールの付加、ニトリルのアルコーリシス、キサトエートのホルミル化、カルボニル化合物へのH_2Sおよびチオールの付加、亜硝酸付加生成物の形成、アルデヒドおよびケトンへのアミンの付加、アルデヒドへのアミドの付加、アンモニアまたはアミンの還元アルキル化、Ｍａｎｎｉｃｈ反応、イソシアネートへのアミンの付加、ニトリルへのアンモニアまたはアミンの付加、二硫化炭素および二酸化炭素へのアミンの付加、カルボニル化合物へのヒドラジン誘導体の付加、オキシムの形成、アルデヒドのニトリルへの転換、アルデヒドおよびケトンからのｇｅｍ－ジハライドのホルミル化、アルデヒドおよびケトンのアルコールへの還元、炭素－窒素二重結合の還元、ニトリルのアミンへの還元、ニトリルのアルデヒドへの還元、Ｇｒｉｇｎａｒｄ試薬または有機リチウム試薬のアルデヒドおよびケトンへの付加、他の有機金属のアルデヒドおよびケトンへの付加、アルデヒドおよびケトンへのトリアルキルアリルシランの付加、アルデヒドへの結合されたアルケンの付加（Ｂａｙｌｉｓ－Ｈｉｌｌｍａｎ反応）、Ｒｅｆｏｒｍａｔｓｋｙ反応、有機金属化合物を用いるカルボン酸塩のケトンへの転換、酸誘導体へのＧｒｉｇｎａｒｄ試薬の付加、CO_2およびCS_2への有機金属化合物の付加、Ｃ＝Ｎ化合物への有機金属化合物の付加、Ｃ＝Ｎ化合物へのカルベンおよびジアゾアルカンの付加、ニトリルおよびイソシアネートへのＧｒｉｇｎａｒｄ試薬の付加、Ａｌｄｏｌ反応、Ｍｕｋａｉｙａｍａ　Ａｌｄｏｌおよび関連反応、カルボキシエステルまたはアミドとアルデヒドまたはケトンとの間のＡｌｄｏｌ型反応、Ｋｎｏｅｖｅｎａｇｅｌ反応（例えば、Ｎｅｆ反応、Ｆａｖｏｒｓｋｉｉ反応）、Ｐｅｔｅｒｓｏｎアルケニル化反応、CO_2およびCS_2への活性化水素化合物の付加、Ｐｅｒｋｉｎ反応、Ｄａｒｚｅｎグリシド酸エステル濃縮物、Ｔｏｌｌｅｎ反応、Ｗｉｔｔｉｎｇ反応、Ｔｅｂｂｅアルケニル化、Ｐｅｔａｓｉｓアルケニル化、代替的アルケニル化、Ｔｈｏｒｐｅ反応、Ｔｈｏｒｐｅ－Ｚｉｅｇｌｅｒ反応、シランの付加、シアノヒドリン形成、ＨＣＮのＣ＝Ｎ結合およびＣ＝Ｎ結合への付加、Ｐｒｉｎ反応、ベンゾイン濃縮物、Ｃ＝Ｏ化合物、Ｃ＝Ｓ化合物、Ｃ＝Ｎ化合物へのラジカルの付加、Ｒｉｔｔｅｒ反応、アルデヒドおよびケトンアシル化、アルデヒドへのアルデヒドの付加、イソシアネートへのイソシアネートの付加（カルボジイミドの形成）、ニトリルへのカルボン酸塩の転換、アルデヒドおよびケトンからのエポキシドの形成、エピスルフィドおよびエピスルフォンの形成、β－ラクトンおよびオキサンの形成（例えば、Ｐａｔｅｒｎｏ－Ｂｕｃｈｉ反応）β－ラクタムの形成など。イソシアネートへの付加を含む反応としては、イソシアネートへの水の付加、Ｐａｓｓｅｒｉｎｉ反応、Ｕｇ反応、ならびにメタル化アルジミンの形成が挙げられる。

【０１６２】

除去反応（α除去、β除去およびγ除去を含む）、ならびに押し出し反応（ｅｘｔｒｕｓｉｏｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）は、ヌクレオチドテンプレート化学を使用して行われ得るが、使用される試薬および条件の強度が考慮されるべきである。好ましい除去反応は、Ｅ１、Ｅ２、Ｅ１ｃＢ、またはＥ２Ｃ機構を通る反応を含む。例示的な反応としては、例えば、水素が一方の面から除去される反応（例えば、アルコールの脱水、エーテルをアルケンへ切断すること、Ｃｈｕｇａｅｖ反応、エステル分解、四級水酸化アンモニウムの切断、強塩基での四級アンモニウム塩の切断、アミン酸化物の切断、ケト－イリドの熱分解、トルエン－ｐ－スルホニルヒドラゾン（ｓｏｌｆｏｎｙｌｈｙｄｒａｚｏｎｅ）の分解、スルホキシドの切断、セレノキシドの分解、スルホンの分解、アルキルハライドの脱水素ハロゲン化（ｄｅｈｙｄｒｏｇａｌｏｇｅｎａｔｉｏｎ）、アシルハライドの脱水素ハロ

ゲン化、スルホニルハライドの脱水素ハロゲン化、ボランの除去、アルケンからアルキンへの変換、アシルハライドの脱カルボニル化）、いずれの脱離原子も水素でない反応（例えば、ビシナルジオールの脱酸素、環式チオカーボネート（ｔｈｉｏｎｏｃａｒｂｏｎａｔｅ）の切断、エポキシドからエピスルフィドおよびアルケンへの変換、Ｒａｍｂｅｒｇ－Ｂａｃｋｌｕｎｄ反応、アジリジンからアルケンへの変換、ビシナルジハライドの脱ハロゲン化、α－ハロアシルハライドの脱ハロゲン化、ならびにハロゲンおよびヘテロ基の除去）、断片化反応（ｆｒａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）（すなわち、炭素が、正の脱離基または電子除去（ｅｌｅｃｔｒｏｆｕｇｅ）である反応（例えば、γアミノハライドおよびγ－ヒドロキシルハライドの断片化、１，３－ジオールの断片化、β－ヒドロキシカルボン酸の脱カルボキシル化、β－ラクトンの脱カルボキシル化、α，β－エポキシヒドラゾンの断片化、架橋二環式（ｂｒｉｇｅｄ　ｂｉｃｙｃｉｃ）化合物からのＣＯの除去、および架橋二環式化合物からのCO_2の除去）、Ｃ≡ＮまたはＣ≡Ｎ結合が形成される反応（例えば、アルドキシムまたは類似の化合物の脱水、ケトキシムからニトリルへの変換、非置換アミドの脱水、およびＮ－アルキルホルムアミドからイソシアニドへの変換）、Ｃ＝Ｏ結合が形成される反応（例えば、β－ヒドロキシアルケンの熱分解）、ならびにＮ＝Ｎ結合が形成される反応（例えば、ジアゾアルケンを得るための除去）が挙げられる。押し出し反応は、例えば、ピラゾリンからN_2の押し出し、ピラゾールからN_2の押し出し、トリアゾリンからN_2の押し出し、ＣＯの押し出し、CO_2の押し出し、SO_2の押し出し、Ｓｔｏｒｙ合成、および２倍の押し出しによるアルケン合成が挙げられる。

【０１６３】

再転位（例えば、求核基再転位、求電子基再転位、プロトン向性（ｐｒｏｔｏｔｒｏｐｉｃ）再転位、およびフリーラジカル再転位を含む）はまた、ヌクレオチドテンプレート化学を使用して行われ得る。１，２再転位および非－１，２再転位の両方が、行われ得る。例示的な反応としては、以下が挙げられる：例えば、Ｒ、Ｈ、およびＡｒの炭素間移動（例えば、Ｗａｇｎｅｒ－Ｍｅｅｒｗｅｉｎ反応および関連する反応、Ｐｉｎａｃｏｌ再転位、環拡大反応、環縮小反応、アルデヒドおよびケトンの酸触媒再転位、ジエンオン（ｄｉｅｎｏｎｅ）－フェノール再転位、Ｆａｖｏｒｓｋｉｉ再転位、Ａｒｎｄｔ－Ｅｉｓｔｅｒｔ合成、アルデヒドの同族体化、およびケトンの同族体化）、他の基の炭素間移動（例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノなどの移動；ホウ素の移動；およびＮｅｂｅｒ再転位）、ＲおよびＡｒの炭素－窒素間移動（例えば、Ｈｏｆｉｎａｕｎ再転位、Ｃｕｒｔｉｕｓ再転位、Ｌｏｓｓｅｎ再転位、Ｓｃｈｍｉｄｔ再転位、Ｂｅｃｋｍａｎ再転位、Ｓｔｉｅｇｌｉｔｓ再転位、および関連する再転位）、ＲおよびＡｒの炭素－酸素間移動（例えば、Ｂａｅｙｅｒ－Ｖｉｌｌｉｇｅｒ再転位、およびヒドロペルオキシドの再転位）、窒素－炭素間移動、酸素－炭素間移動、および硫黄－炭素間移動（例えば、Ｓｔｅｖｅｎｓ再転位、およびＷｉｔｔｉｇ再転位）、ホウ素－炭素間移動（例えば、ボランからアルコールへの変換（１級または他）、ボランからアルデヒドへの変換、ボランからカルボン酸への変換、ビニルボラン（ｖｉｎｙｌｉｃ　ｂｏｒａｎｅ）からアルケンへの変換、ボランおよびアセチリドからのアルケンの形成ならびに、ボランおよびアセチリドからのケトンの形成）、電子環開閉再転位（ｅｌｅｃｔｒｏｃｙｃｌｉｃ　ｒｅａｒｒａｎｇｅｍｅｎｔ）（例えば、シクロブテンおよび１，３－シクロヘキサジエンの再転位、またはスチルベンからフェナントレンへの変換）；シグマトロピー再転位（例えば、水素の（１，ｊ）シグマトロピー移動、炭素の（１，ｊ）シグマトロピー移動、ビニルシクロプロパンからシクロペンテンへの変換、Ｃｏｐｅ再転位、Ｃｌａｉｓｅｎ再転位、Ｆｉｓｃｈｅｒインドール合成、（２，３）シグマトロピー再転位、およびベンジジン再転位）、他の環再転位（例えば、アルケンの複分解、ジ－π－メタン再転位および関連する再転位、ならびにＨｏｆｍａｎｎ－Ｌｏｆｆｌｅｒ反応および関連する反応）、ならびに非環式再転位（例えば、ヒドリドシフト、Ｃｈａｐｍａｎ再転位、Ｗａｌｌａｃｈ再転位、およびジオトロピック（ｄｙｃｔｒｏｐｉｃ）再転位）。

【０１６４】

酸化反応および還元反応はまた、ヌクレオチドテンプレート化学を使用して行われ得る。例示的な反応は、例えば、直接的電子移動、ヒドリド移動、水素原子移動、エステル中間体の形成、置換機構、または付加－除去機構を含み得る。例示的な酸化としては、以下が挙げられる：例えば、水素の除去（例えば、六員環の芳香族化、炭素－炭素二重結合を得る脱水、アルコールからアルデヒドおよびケトンへの酸化または脱水素、フェノールおよび芳香族アミンからキノンへの酸化、ケトンの酸化的開裂、アルデヒドの酸化的開裂、アルコールの酸化的開裂、オゾン分解、二重結合および芳香族環の酸化的開裂、芳香族側鎖の酸化、酸化的脱炭酸、ならびにビス脱炭酸（ｂｉｓｄｅｃａｒｂｏｘｙｌａｔｉｏｎ））、水素の酸素での置換を含む反応（例えば、メチレンからカルボニルへの酸化、メチレンからＯＨ、CO_2R、もしくはＯＲへの酸化、アリールメタンの酸化、エーテルからカルボン酸エステルへの酸化、ならびに関連する反応、芳香族炭化水素からキノンへの酸化、アミンもしくはニトロ化合物からアルデヒド、ケトンもしくはジハライドへの酸化、１級アルコールからカルボン酸もしくはカルボン酸エステルへの酸化、アルケンからアルデヒドもしくはケトンへの酸化、アミンからニトロ化合物およびヒドロキシアミンへの酸化、１級アミン、オキシム、アジド、イソシアネート、またはニトロソ（ｎｏｔｒｏｓｏ）化合物、からニトロ化合物への酸化、チオールおよび他の硫黄化合物からスルホン酸への酸化）、酸素が基質に付加される反応（例えば、アルケンからα－ジケトンへの酸化、３級アミンからアミンオキシドへの酸化、チオエステルからスルホキシドおよびスルホンへの酸化、ならびにカルボン酸からペルオキシ酸への酸化）、ならびに酸化的カップリング反応（例えば、カルバノイン（ｃａｒｂａｎｏｉｎ）に関連するカップリング、シリルエノールエーテルもしくはリチウムエノレートの二量体化、ならびにチオールからジスルフィドへの酸化）。

【０１６５】

例示的な還元反応としては、例えば、以下が挙げられる：水素による酸素の置換を含む反応、（例えば、カルボニルから、アルデヒドおよびケトンにおけるメチレンへの還元、カルボン酸からアルコールへの還元、アミドからアミンへの還元、カルボン酸エステルからエーテルへの還元、環式無水物からラクトン、および酸誘導体からアルコールへの還元、カルボン酸エステルからアルコールへの還元、カルボン酸およびカルボン酸エステルからアルカンへの還元、エポキシドの完全な還元、ニトロ化合物からアミンへの還元、ニトロ化合物からヒドロキシルアミンへの還元、ニトロソ化合物およびヒドロキシルアミンからアミンへの還元、オキシムから１級アミンまたはアジリジンへの還元、アジドから１級アミンへの還元、窒素化合物の還元、ならびにスルホニルハライドおよびスルホン酸からチオールへの還元）、基質からの酸素の除去（例えば、アミンオキシドおよびアゾキシ化合物の還元；スルホキシドおよびスルホンの還元、ヒドロペルオキシドおよびペルオキシドの還元、ならびに脂肪族ニトロ化合物からオキシムまたはニトリルへの還元）、開裂を含む還元（例えば、アミンおよびアミドの脱アルキル、アゾ化合物、アゾキシ化合物、およびヒドラゾ化合物からアミンへの還元、ならびにジスルフィドからチオールへの還元）、還元的カップリング反応（例えば、アルデヒドおよびケトンから１，２－ジオールへの２分子還元、アルデヒドまたはケトンからアルケンへの２分子還元、アシロインエステル縮合、ニトロ化合物からアゾキシ化合物への還元、ならびにニトロ化合物からアゾ化合物への還元）、ならびに有機基質が酸化されかつ還元される反応（例えば、Ｃａｎｎｉｚｚａｒｏ反応、Ｔｉｓｈｃｈｅｎｋｏ反応、Ｐｕｍｍｅｒｅｒ再転位、およびＷｉｌｌｇｅｒｏｄｔ反応）。

【０１６６】

（（ｖｉ）立体選択性）

核酸のキラル性質は、核酸テンプレート合成が、核酸に存在するキラル基を超えるキラル基の補助なしで、立体選択性を進行させ得、それにより、配列のみならず、立体化学的情報もまた、テンプレートから生成物へ移る可能性を引き起こす。以前の研究により、核酸テンプレートのキラリティーが、（Ｌ）－ヌクレオチドよりも、（Ｄ）－ヌクレオチドのテンプレート指向性連結についての優先性を誘導し得ることが実証された（Ｋｏｚｌｏ

ｖら（２０００）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．３９：４２９２－４２９５；Ｂａｌｌｉら（１９９７）Ａ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．４：３０９－３２０）。

【０１６７】

核酸テンプレート合成の間に、核酸テンプレート移動単位、触媒または前述のものの組み合わせのキラリティーを、核酸骨格に似ていない反応生成物に移すことが可能である。いくつかの実施形態において、キラル中心を有する反応単位は、テンプレートと結合され、その移動単位と結合された反応単位は、アキラルである一方で、他の実施形態においては、その移動単位の反応単位はキラルであり、そのテンプレートの反応単位はアキラルである。あるいは、両方の反応単位は、キラル中心を有し得る。これらの場合の各々において、そのテンプレートのキラリティーは、キラル反応単位の立体異性体のうちのどちらが、他の反応単位と優先的に（すなわち、より高い速度定数で）反応するかを指示する。

【０１６８】

有用なテンプレート構成としては、Ｈ型、Ｅ型、Ω型、およびＴ型の構成が挙げられる。１以上のテンプレートまたは移動単位ヌクレオチドは、非ヌクレオチドリンカーで置き換えられ得るが、反応単位に最も近いヌクレオチドの置換は、立体選択性の喪失を引き起こし得る。好ましくは、５以上の連続する芳香族ヌクレオチドは、反応単位に隣接し、より好ましくは、６以上の連続する芳香族ヌクレオチドが、反応単位に隣接する。

【０１６９】

高塩濃度において、（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇ反復に富む二本鎖ＤＮＡ配列は、通常の右巻きらせん（Ｂ－形態）よりむしろ、左巻きらせん（Ｚ－形態）を採り得る。ＤＮＡテンプレート合成の間に、Ｚ－形態におけるテンプレート－移動単位複合体は、反応単位の一方の立体異性体との優先的な反応を引き起こす一方、Ｂ－形態におけるテンプレート－移動単位複合体は、反応単位の他方の立体異性体との優先的な反応を引き起こす。従って、いくつかの実施形態において、高濃度（例えば、少なくとも２．５Ｍ、または少なくとも５Ｍ）の塩（例えば、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）または硫酸ナトリウム（Na_2SO_4）が、ＤＮＡテンプレート合成の間に使用される。他の実施形態において、塩濃度は低い（例えば、１００ｍＭ以下）かまたは全く存在しない。ＤＮＡテンプレート立体特異的反応の原理は、実施例６においてより詳細に議論される。

【０１７０】

（（ｖｉｉ）他のミスマッチな反応）

核酸テンプレート合成の間に、オリゴヌクレオチドは、関与する反応が交差反応性であり、よって伝統的な合成条件下ではミスマッチであるとしても、同じ溶液内でいくつかの異なる型の合成反応を同時に指向し得ることが発見された（実施例７を参照のこと）。結果として、核酸テンプレート合成は、合成ライブラリー前駆体を複数の反応型の生成物へ１ポットで多様化することを可能にする。

【０１７１】

一実施形態において、単一の反応単位と関連づけられた１以上のテンプレートが、２以上の移動単位（各々、テンプレート反応単位と反応し得る異なる試薬と結合される）に曝される。他の実施形態において、単一の試薬と結合された１以上の移動単位は、２以上のテンプレート（各々、その試薬と反応し得る異なる反応単位と結合される）に曝される。核酸テンプレート合成の条件下で、単一溶液中に、通常の合成反応において、互いに交差反応する複数の反応単位（テンプレートおよび／または移動単位に結合される）を有することが可能である。本明細書中に記載される核酸テンプレート化学は、濃度効果に起因して、互いと反応しない、非常に低い反応物濃度を利用する。それらの局所的濃度が、反応を引き起こすように増大されるのは、反応物が、そのテンプレートへの移動単位におけるオリゴヌクレオチドのアニーリングをもたらした場合のみである。いくつかの実施形態において、単一の付属的試薬（すなわち、核酸にも核酸アナログにも連結されない試薬）（例えば、還元剤、酸化剤、または活性化剤）が、反応系に添加される。他の実施形態において、付属的試薬は添加されない。全ての場合において、相補的オリゴヌクレオチドと結合される（すなわち、相補的コドン／アンチコドン配列を含む）、反応単位および試薬は

、反応して反応生成物を形成し、このことは、核酸テンプレート合成が単一の官能基を複数の異なる型の生成物へ指向する選択的１ポット変換能力を実証する。

【０１７２】

別の実施形態において、テンプレートおよび移動単位は、上記のように提供されるが、そのテンプレート反応単位および移動単位試薬は、複数の異なる反応型を使用して互いに反応する。いくつかの実施形態において、複数の異なる付属的試薬は、反応系に添加される。繰り返すと、相補的テンプレート／移動単位配列から得られた反応生成物のみが、適切な量で形成される。

【０１７３】

特定の実施形態において、複数の移動単位試薬は、各テンプレート反応単位と反応し得、移動単位試薬のいくつかは、互いに交差反応し得る。いくつかの異なる交差反応正官能基の存在下ですら、相補的テンプレート／移動単位配列から得られた反応生成物のみが、適切な量で形成される。これらの知見は、種々の付属的試薬を要する、有意に異なる速度の反応が、テンプレートおよび試薬がともに、いくつかの異なる交差反応性官能基を含む場合ですら、同じ溶液中で核酸テンプレート合成によって指向され得ることを示す。核酸テンプレートが、非テンプレート反応を、適切な速度での進行から排除する濃度において複数の反応を指向する能力は、単一溶液中で、空間的に離れたセットの反応を模倣する。

【０１７４】

（（ｖｉｉｉ）新たな化学反応の同定）

本発明の別の局面において、図１２に例示されるように、核酸テンプレート合成は、２以上の反応単位の間の以前は未知の化学反応を発見するために使用され得る。反応の発見を容易にするために、複数のテンプレートが合成され、各々、異なるオリゴヌクレオチドに連結される異なる反応単位を含む。各テンプレートオリゴヌクレオチドは、コード領域（これは、テンプレートに結合される反応単位を同定する）、およびアニーリング領域を含む。いくつかの実施形態において、他の配列は、例えば、ＰＣＲプライマー部位を含むテンプレートオリゴヌクレオチドに含まれる。複数の移動単位もまた調製され、各々、異なるオリゴヌクレオチドに連結される異なる試薬を含む。

【０１７５】

新たな結合形成反応について試験するために、１以上のテンプレートが、テンプレートに対する移動単位のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、１以上の移動単位と合わされる。いくつかの実施形態において、非ＤＮＡ連結付属分子は、その反応系に添加される（例えば、活性化剤または触媒）。他の実施形態において、反応条件（例えば、反応持続時間、温度、溶媒、およびｐＨを含む）を、異なる速度にて、かつ異なる条件下で進行する反応を選択するために変化させる。

【０１７６】

粗反応混合物を、次いで、特定の反応生成物について選択する。その反応生成物は、好ましくは、ヌクレオチド配列が、その反応生成物を生成した結合形成反応をコードするそれぞれのテンプレートとなお結合される。いくつかの実施形態において、その移動単位は、捕捉可能な分子（例えば、ビオチン）とカップリングされる。反応生成物の作製および選択後、その結合されたテンプレートを、ストレプトアビジンでビオチンを捕捉することにより選択し得る。一実施形態において、そのストレプトアビジンは、固相に（例えば、磁性ビーズに連結することによって）固定化される。その選択されたテンプレートは、次いで、ＰＣＲにより増幅されて、ＤＮＡ配列決定に供され、反応単位および試薬の正体を決定する。別の実施形態において、上記のアプローチにより明らかにされる反応は、水性溶媒および有機溶媒の両方において、伝統的な反応分析方法（例えば、薄層クロマトグラフィー、ＮＭＲ、ＨＰＬＣ、および質量分析を含む）を使用して、非ＤＮＡテンプレート形式において特徴付けられる。

【０１７７】

理論的には、発見された反応のうちのいくつかは、効率的に進めるためにそのＤＮＡテンプレートのいくつかの局面を必要とすることがあり得る。しかし、この系において発見

された反応の、全てではないとしても、大部分が、代表的な非ＤＮＡテンプレート合成濃度（例えば、約０．１Ｍ）で行われる場合、ＤＮＡテンプレートの非存在下で生じる。このように発見された反応はまた、ＤＮＡテンプレート低分子ライブラリー合成に本質的に十分適している。この実施形態の図示による例は、末端アルキンと１つのアルケンとの間の新たなパラジウム媒介性カップリング反応の発見を記載している実施例１２に見られる。

【０１７８】

（（ｉｘ）生成物ライブラリーの調製）

伝統的なライブラリー合成と核酸テンプレートライブラリー合成との間の主な事実上の差異は、各操作の規模である。スクリーニングおよび化合物同定に必要とされる材料の量に起因して、伝統的なコンビナトリアル合成は、代表的には、１つのライブラリーメンバーにつき、ｎｍｏｌ～μｍｏｌ規模で進められる。対照的に、核酸テンプレートライブラリー合成は、各核酸連結合成分子のごくわずかな量（例えば、約10^{-20}ｍｏｌ）しか、選択およびＰＣＲ増幅に必要とされないので、ｆｍｏｌ～ｐｍｏｌ規模で行われ得る。規模におけるこの非常に大きな差異は、核酸テンプレートライブラリーの単一溶液形式と合わせて、核酸テンプレートライブラリー合成に必要な材料の調製を有意に単純化する。

【０１７９】

ライブラリーは、本明細書中に記載されるテンプレート媒介性合成を介して生成され得る。例えば、そのテンプレートは、１以上の反応単位（例えば、足場分子）を含み得る。しかし、各場合において、そのテンプレートは、オリゴヌクレオチドと結合された特定の反応単位を同定するコード配列を含む。テンプレートのライブラリーは、最初に、上記のリンカーを介してデコードオリゴヌクレオチドに結合された試薬を使用して、１以上の核酸テンプレート結合形成反応に供される。その状況に依存して、そのテンプレートライブラリーは、結合形成反応の複数の反復に供され得る。ここで各中間体生成物は、その後の回の反応の前に精製される。他の環境において、その中間体生成物は、反応反復の間に精製されない。好ましくは、２０未満の結合形成反応が、ライブラリーを作製するために必要とされる。他の実施形態において、１０未満の結合形成反応工程しか、必要とされず、より好ましくは、完全なライブラリーを作製するために、３～７の間の工程しか必要とされない。

【０１８０】

最終回の核酸テンプレート結合形成反応が行われた後に、必要であれば、付属的試薬が添加されて、反応生成物上の曝された反応性官能基が保護され得る。いくつかの実施形態において、付属的試薬は、反応生成物とのその後の反応（例えば、環化反応）を開始するために添加される。テンプレートオリゴヌクレオチドに結合される反応生成物の得られたライブラリーは、次いで、精製され、そして／または本明細書中で議論されるように選択される。この分野の当業者に理解されるように、低分子もしくはポリマーのライブラリーは、本明細書中に議論される原理を使用して合成され得る。

【０１８１】

類似のアプローチを使用すると、反応単位と最初に結合されていないテンプレートオリゴヌクレオチドのライブラリーから、非天然ポリマーのライブラリーを作製することが可能である。この場合、そのテンプレートは、２以上のコドンをコードし、これらのコドンは、モノマー単位に結合した対応するアンチコドンにアニールされる場合に、そのモノマー単位を配列特異的様式で一緒になる。その移動単位は、次いで、各移動単位上のアンチコドンをテンプレート上の相補的コドンにハイブリダイズさせる条件下でテンプレートに接触される。テンプレートに沿った、そのモノマー単位の重合は、次いで、ポリマーを生成する。その重合は、段階的であってもよいし、隣接するモノマー間での１つの反応が、次のモノマーの結合をもたらす１つの大きな反応において形成される鎖と本質的に同時であってもよい。いくつかの実施形態において、その官能基または各モノマーの基は、保護され、そして重合前に脱保護されなければならない。新たに合成されたポリマーは、次いで、アンチコドンおよびテンプレートから切断され得、本明細書中に記載されるように、

所望の活性または特性について選択され得る。ＤＮＡテンプレートポリマー合成反応は、実施例９Ａおよび９Ｃにおいてより詳細に記載される。

【０１８２】

（ＩＶ．選択およびスクリーニング）

所望の活性（例えば、触媒活性、結合親和性、または活性アッセイにおける特定の影響）を有する反応生成物についての選択および／またはスクリーニングは、任意の標準的なプロトコルに従って行われ得る。例えば、親和性選択は、ライブラリーベースの選択法（例えば、ファージディスプレイ、ポリソームディスプレイ、およびｍＲＮＡ融合タンパク質ディスプレイペプチド）において使用される原理に従って行われ得る。触媒活性についての選択は、遷移状態アナログアフィニティーカラムに対する親和性選択（Ｂａｃａら（１９９７）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ　９４（１９）：１００６３－８）または機能ベースの選択スキーム（Ｐｅｄｅｒｓｅｎら（１９９８）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ　９５（１８）：１０５２３－８）によって行われ得る。少量のＤＮＡ（約10^{-20}ｍｏｌ）が、ＰＣＲによって増幅され得る（Ｋｒａｍｅｒら（１９９９）ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ（Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．編）１５．１－１５．３，Ｗｉｌｅｙ）ので、これらの選択は、現在の方法による反応分析について必要とされる１０分の１より小さな規模で行われ得、よって、実に広い検索を経済的かつ効率的にする。

【０１８３】

（（ｉ）標的分子に結合するための選択）

標的分子に結合する鋳型および反応生成物を、選択（またはスクリーニング）し得る。この文脈において、選択または分離とは、標的分子に結合したライブラリーメンバーを、標的分子に結合していないライブラリーメンバーから分離する任意のプロセスを意味する。選択は、当該分野に公知の種々の方法によって達成され得る。

【０１８４】

本発明の鋳型は、直接的な選択および増幅のための組み込み機能を含む。最も多い適用において標的分子への結合は、好ましくは、鋳型および得られる反応生成物が、特定の標的分子と優先的に結合して、おそらく、特定の生物学的効果を妨げるか、または誘導するほど選択的である。最終的に、本発明を用いて同定された結合分子は、治療用薬および／または診断用薬として利用され得る。一旦、選択が完結すると、選択された鋳型を、必要に応じて、増幅するか、または配列決定し得る。十分な量が存在する場合、選択され反応生成物た反応生成物を、鋳型から分離して精製し得（例えば、ＨＰＬＣ、カラムク反応生成物ロマトグラフィーまたは他のクロマトグラフィーの方法による）、そして特徴付け得る。

【０１８５】

（（ｉｉ）標的分子）

結合アッセイは、例えば、表面（例えば、金属、プラスチック、合成物、ガラス、セラミックス、ゴム、皮膚または細胞）；ポリマー；触媒；あるいは標的生体分子（例えば、核酸、タンパク質（酵素、レセプター、抗体および糖タンパクを含む）、シグナル分子（例えば、ｃＡＭＰ、イノシトール３リン酸、ペプチドまたはプロスタグランジン）、炭水化物、あるいは脂質）に結合する反応生成物を単離して、同定するのに敏速な方法を提供する。結合アッセイは、標的分子の機能に対する反応生成物の効果についての活性アッセイと有利に組み合わせられる。

【０１８６】

選択ストラテジーは、ほとんどの任意標的に対して選択し得るように実施され得る。重要なことには、選択ストラテジーは、標的分子またはライブラリー中の分子についての詳細な構造情報を全く必要としない。全プロセスは、ライブラリー中の分子と特定の標的との特異的認識および結合に関する結合親和性によって、駆動される。種々の選択手順の例を以下に記載する。

【０１８７】

本発明のライブラリーは、任意の公知または公知でない標的物と本質的に結合し得る分子を含む。標的分子の結合領域には、酵素の触媒部位、レセプター上の結合ポケット（例えば、Ｇタンパク質結合レセプター）、タンパク質－タンパク質相互作用またはタンパク質－核酸相互作用に関係するタンパク質表面領域（好ましくは、高温点領域）、あるいはＤＮＡ上の特定部位（例えば、主溝）が挙げられる。標的物の天然の機能は、反応生成物の結合によって、刺激され得（アゴナイズされ）るか、減少され得（アンタゴナイズされ）るか、作用が及ぼされ得ないか、あるいは、完全に変更され得る。これは、正確な結合様式および反応生成物が標識物上に占める特定の結合部位に依存している。

【０１８８】

タンパク質上の機能的部位（例えば、タンパク質－タンパク質相互作用または触媒部位）は、タンパク質上の他のさらに中間の表面領域よりも、分子に結合する傾向が多い。さらに、これらに機能部位は、通常、主に結合エネルギーの責任を負うように見えるより小さな領域；いわゆる、「高温点領域」を含む（Ｗｅｌｌｓら、（１９９３）ＲＥＣＥＮＴ，ＰＲＯＧ．ＨＯＲＭＯＮＥ　ＲＥＳ，．４８：２５３－２６２）。この現象が、特定標的物の生物学的機能に影響を及ぼす分子に対して、選択を容易にする。

【０１８９】

テンプレート分子と反応生成物との間の連鎖により、種々の選択ストラテジーを用いる結合分子の敏速な同定が可能である。本発明は、任意の公知標的物に対して結合分子を広く同定し得る。さらに公知でない新規標的物を、公知でない抗原（エピトープ）に対する結合分子を単離し、そして、それらの結合分子を同定および確証に使用することによって、発見し得る。別の好ましい実施形態において、標的分子は、化学反応の遷移状態を模倣する；選択により得られる１つ以上の反応生成物が、遷移状態を安定化して、化学反応を触媒するように設計される。

【０１９０】

（（ｉｉｉ）結合アッセイ）

本発明のテンプレート型合成は、他のディスプレイ方法（例えば、ファージディスプレイ（Ｓｍｉｔｈ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２８：１３１５－１３１７）に類似した選択手順を容認する。ファージディスプレイ選択は、ペプチド（Ｗｅｌｌｓら、（１９９２）ＣＵＲＲ．ＯＰ．ＳＴＲＵＣＴ．Ｂｉｏｌ．２：５９７－６０４）、タンパク質（Ｍａｒｋｓら、（１９９２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１６００７－１６０１０）および抗体（Ｗｉｎｔｅｒら、（１９９４）ＡＮＮＵ．ＲＥＶ．ＩＭＭＵＮＯＬ．１２：４３３－４５５）においてうまく用いられる。同様な選択手順はまた、他の型のディスプレイシステム（例えば、リボソームディスプレイ（Ｍａｔｔｈｅａｋｉｓら、（１９９４）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．Ｓｃｉ．９１：９０２２－９０２６）およびｍＲＮＡディスプレイ（Ｒｏｂｅｒｔｓら、（１９９７）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．Ｓｃｉ．９４：１２２９７－３０２））に活用される。しかしながら、本発明のライブラリーは、従来のリボソーム仲介翻訳を必要としないで、標的物特異的分子の直接的な選択を可能にする。本発明はまた、以前は核酸テンプレートから直接的に合成されなかった低分子のディスプレイを可能にする。

【０１９１】

ライブラリー由来の結合分子の選択を、任意のフォーマットにおいて行い、最適な結合分子を同定した。代表的には、結合選択は、所望の標的分子を固定化して、潜在的な結合剤のライブラリーを加えて、洗浄により非結合剤を除去する工程を包含する。固定化された標的物に対して低い親和性を示す分子が流出すると、概して、より強い親和性を有する分子が標的分子に付着して残存する。ストリンジェントな洗浄後、標的物に結合して残存する多くの個体群を、好ましくは、例えば、酸、カオトロピック塩、熱、公知のリガンドとの競合的な溶出を用いて、あるいは標的物および／またはテンプレート分子のタンパク質分解性放出によって溶出する。溶出された鋳型は、多くの増幅種類を導くＰＣＲに適しており、それによって本質的に各々の選択された鋳型は、非常に増加したコピー数で、クローニング、配列決定、および／またはさらなる強化もしくは多様化に利用され得る。

【０１９２】
結合アッセイにおいて、リガンド濃度が、標的物濃度よりも非常に少ないとき（ＤＮＡテンプレートライブラリーの選択の間にありえるように）、標的物に結合したリガンドの分画は、標的タンパク質の有効濃度により決定される（図１０を参照のこと）。標的物に結合したリガンドの分画は、［標的物］＝リガンド－標的物複合体のK_dで中間点（５０％結合）を有する標的物の濃度のＳ字形関数である。この関係は、特定の選択性のストリンジェンシー（選択の間に標的物に結合して残存するのに必要とされる最小リガンド親和性）が、標的物濃度により決定されることを示唆する。それゆえ、選択ストリンジェンシーは、標的物の有効量を変えることにより制御可能である。
【０１９３】
標的分子（ペプチド、タンパク質、ＤＮＡまたは他の抗原）は、固体支持体（例えば、容器壁、マイクロタイタープレートウェル壁）上に固定化され得る。ライブラリーは、好ましくは、ワンポットの水性結合緩衝液に溶解して、固体化された標的分子の存在下で平衡化される。非結合剤を緩衝液で洗い流す。合成的な部分を通してではなく、付着されたＤＮＡテンプレートを通して標的分子に結合し得るこれらの分子は、ＰＣＲプライマー結合部位を欠く官能性のないテンプレートを有する結合されたライブラリーを洗浄することにより除去される。次いで、残存する結合されたライブラリーメンバーを、例えば、変性により溶出し得る。
【０１９４】
あるいは、詳細には、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルから溶出される広がった標的物についての場合にあり得るように、標的分子が容器壁に十分に吸着することが不確かな場合、標的分子は、ビーズに固定化され得る。ついで、誘導体化されたビーズは、ベンチトップ遠心機にビーズを簡単に沈降させることにより高親和性ライブラリーメンバーを非結合剤から分離するのに使用され得る。あるいは、ビーズは、親和性カラムを作成するのに使用され得る。そのような場合、ライブラリーは、結合するように１回以上カラムを通して通過される。次いで、非結合ライブラリーメンバーを洗浄して除去する。磁気性ビーズは、本質的に上記の変異体であり；標的物が磁気性ビーズに付着して、次いでこれらを選択の際に使用する。
【０１９５】
標的分子を固定化するのに利用可能な多くの反応性基質（例えば、－NH_2基または－ＳＨ基を有する基質）がある。標的分子は、セファロースビーズに共有結合したＮＨＳエステルまたはマレイミド基との結合により固定化され得、そして標的分子の公知の特性の完全性が確認され得る。活性化されたビーズは、－NH_2基または－ＣＯＯＨ基に対する付着部位で利用可能である（これは、カップリングに用いられ得る）。あるいは、標的分子は、ニトロセルロースまたはＰＶＤＦ上にブロットされる。ブロット法を使用する場合、標的物の固定化後、ライブラリーメンバーとブロットとの非特異的結合を阻止するために、ブロットをブロックするべきである（例えば、ＢＳＡまたは類似のタンパク質を用いて）。
【０１９６】
標的分子に結合するライブラリーメンバーは、変性、酸またはカオトロピック塩によって、放出され得る。あるいは、溶出条件は、バックグランドを減少させるため、所望の特異性を選択するためにより特異的であり得る。溶出は、標的分子と固定化する表面との間または反応生成物とテンプレートとの間でリンカーを開裂するタンパク質分解を用いて、達成され得る。溶出はまた、標的分子に対して公知の競合的リガンドとの競合により達成され得る。あるいは、ＰＣＲ反応は、選択手順の終りで、洗浄された標的分子の存在下で直接行なわれ得る。このように結合分子は、選択可能である標的物から溶出可能である必要はない。なぜなら、反応生成物自体ではなくテンプレートだけが、さらなる増幅またはクローニングに必要とされるからである。実際、幾つかの標的分子は、最も強力なリガンドと非常に堅く結合するので、溶出が困難である。
【０１９７】

細胞表面に発現可能なタンパク質と結合する分子（例えば、イオンチャネルまたは膜貫通型レセプター）に対する選択のために、細胞自体を選択剤として使用し得る。好ましくは、最初に、ライブラリーは、細胞表面上に標的分子を発現しない細胞に曝露されて、他の細胞表面エピトープに特異的または非特異的に結合するライブラリーメンバーを除去する。あるいは、標的分子を欠く細胞は、選択プロセスにおいて大過剰に存在して、標的分子を有する細胞から（例えば、蛍光活性化セルソーティイング（ＦＡＣＳ）によって）分離可能である。いずれかの方法おいて、標的分子を有する細胞を、次いで、使用して、標的分子を有するライブラリーメンバーを単離する（例えば、細胞を沈降させることによってか、あるいは、ＦＡＣＳソーティングによって）。例えば、標的分子をコードする組換えＤＮＡは、細胞株に導入され得る；形質変換されない細胞ではなく、形質転換される細胞に結合するライブラリーメンバーは、標的分子結合剤について豊富である。このアプローチはまた、いわゆる減法であり、抗体ライブラリー上のファージディスプレイに使用されている（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、（１９９８）ＩＭＭＵＮＯＴＥＣＨ　４　：１－２０）。

【０１９８】

選択手順はまた、レセプターが、選択された結合分子と一緒に細胞質、細胞核または他の細胞区画（例えば、ゴルジまたはリソソーム）中に通過するように内部移行される細胞表面レセプターへの結合の選択に関する。特定の選択された結合分子に対する解離速度定数に依存して、これらの分子は、主に細胞内区画内に局在化し得る。内部移行したライブラリーメンバーはまた、細胞を洗浄することによって（好ましくは、変性を用いて）、細胞表面に付着した分子と区別する。さらに好ましくは、標準亜細胞細分化技術を、所望の亜細胞区画において選択されたライブラリーメンバーを単離するのに用いる。

【０１９９】

別の選択プロトコルはまた、ライブラリーの各メンバーに添付される公知の弱いリガンドを含む。公知のリガンドは、標的分子の規定された部分と相互作用することによって選択を導き、同じ領域に結合する分子の選択を集めて、協同的効果を提供する。詳細には、これは、非常に低い効力のリガンドでなく所望の生物学的な機能を有するリガンドの親和性を増加させるのに有用であり得る。

【０２００】

選択または分離のための他の方法はまた、本発明の使用に利用可能である。これらには、例えば以下が挙げられる：免疫沈降（直接または間接）、ここで、標的分子は、ライブラリーメンバーと一緒に捕獲される；アガロースまたはポロアクリルアミドゲルにおける流動性シフトアッセイ、ここで選択されたライブラリーメンバーは、ケル中で標的分子と共に遊走する；ライブラリーメンバーを有する標的分子を単離するための塩化セシウム勾配遠心分離；ライブラリーメンバーで標識された標的分子を同定するための質量分析。一般的に、ライブラリーメンバー／標的分子複合体が、標的に結合しないライブラリーメンバーから分離され得る方法が有用である。

【０２０１】

選択プロセスは、最適化によく適しており、ここで、連続して、結合分子の選択で開始し、最適化された結合分子で終わる選択工程がなされる。各工程の手順は、種々のロボットシステムを使用して自動化され得る。このように、本発明は、最終的に最適化された結合分子を生成する完全な自動システムに適したライブラリーおよび標的分子を供給することを可能にする。理想の条件下で、この工程は、全手順の間ロボットシステム外の外部からの仕事を必要とせずに実施される。

【０２０２】

本発明の選択方法は、結合に関する標的分子の機能を改変し得る反応生成物を同定するための二次選択または二次スクリーニングと組み合わされ得る。従って、本明細書中に記載される方法は、任意のタンパク質または核酸に結合し、そして、それらの機能を改変する結合分子を単離するかまたは生成するために使用され得る。例えば、核酸テンプレート化学物質は、（１）触媒を阻害することによって標的酵素の触媒活性に影響するか、また

は、基質結合を改変する；（２）レセプターへの結合を阻害することによってか、もしくは、レセプターへの結合の特異性を改変することによって、タンパク質レセプターの機能性に影響する；（３）タンパク質サブユニットの四次構造を崩壊することによって、タンパク質マルチマーの機能性に影響する；かまたは、（４）低分子またはイオンの輸送を崩壊させることによって、タンパク質の輸送特性を改変する、結合分子を同定、単離または生成するために使用され得る。

【０２０３】

機能性アッセイは、選択プロセスに含まれ得る。例えば、結合アッセイに関して選択した後、選択されたライブラリーメンバーは、所望の機能性効果（例えば、細胞シグナル伝達に対する効果）について直接試験され得る。これは、例えば、ＦＡＣＳ方法論によって、実施され得る。

【０２０４】

本発明の結合分子は、結合とは別に、他の特性に関して選択され得る。例えば、結合の安定性に関する選択は、所望の操作環境中で相互作用する。特定のプロテアーゼの存在下での安定性が所望の安定性である場合、そのプロテアーゼは、選択の間に使用される緩衝培地の一部となり得る。同様に、その選択は、血清、もしくは細胞抽出物、または水性か、もしくは有機性の任意の型の培地中で、実施され得る。しかし、テンプレートを崩壊、または分解する条件は、後の増幅を可能にするために、避けるべきである。

【０２０５】

（ｉｖ）他の選択

他の所望の特性（例えば、触媒活性または他の機能性活性）に関する選択もまた。実施され得る。一般的に、選択は、所望の活性を有するライブラリーメンバーが、この原理に基づいて、他のライブラリーメンバーから単離可能であるように、設計されるべきである。例えば、ライブラリーメンバーは、標的分子（例えば、金属イオン）の存在下で、または特定のｐＨまたは塩濃度条件下で、コンフォメーションを折りたたむ能力または、コンフォメーションを顕著に変化させる能力に関してスクリーニングされ得る。折りたたまれたライブラリーメンバーは、目的の条件下で、非変性ゲル電気泳動を実施することによって、単離され得る。折りたたまれたライブラリーメンバーは、ゲル中で異なる位置に移動し、そして、後に、ゲルから抽出され、単離され得る。

【０２０６】

同様に、特定のリガンドの存在下での蛍光発光する反応生成物は、ＤＮＡテンプレートを介してビーズに結合した翻訳されたポリマーのＦＡＣＳに基づいた分類によって選択され得る。標的リガンドの非存在下では生じないが、存在下で蛍光を生じるビーズが単離され、特徴付けられる。任意のビーズ上の核酸テンプレートの同種の集団を有する有用なビーズは、各ビーズが単一のヌクレオチド配列のみに対して露出されるような、ビース上のスプリット－プール（ｓｐｌｉｔ－ｐｏｏｌ）合成技術を使用して調製され得る。あるいは、スプリット－プール技術を使用して、種々の抗テンプレート（それぞれは、単一の異なるテンプレートのみに対して相補的である）がビーズ上に合成され得、次いで、溶液相ライブラリーを捕捉するためにアニーリングし得る。

【０２０７】

ビオチン末端化生体高分子は、これらの生体高分子を、アビジンに対する基質を介して結合したレジン上を通過させることによって、結合破壊反応の実際の触媒作用に関して、選択され得る（図１１Ａ）。基質を触媒する生体高分子は、このレジンを装填したカラムから自己溶出物を分割する。同様に、ビオチン末端化生体高分子が、結合形成反応の触媒に関して選択され得る（図１１Ｂを参照のこと）。１つの基質が、レジンに結合され、第２番目の基質がアビジンに結合される。基質間の結合形成を触媒する生体高分子は、基質と一緒に反応し、生体高分子のレジンへの結合を生じる生体高分子の能力によって選択される。

【０２０８】

ライブラリーメンバーはまた、テンプレートが結合するかまたは結合するようになるポ

リマーの合成に対する触媒効果に関して選択され得る。例えば、ライブラリーメンバーは、ポリマー化され得るモノマー単位の選択に影響し得、ならびに、ポリマー化反応（例えば、空間的配置、立体規則性、活性）がどのように生じるかに影響する。合成されたポリマーは、標準的技術（例えば、電気泳動、ゲルろ過、遠心沈降、または種々の疎水性の溶媒への分配）を使用して、特異的特徴（例えば、分子量、密度、疎水性、立体規則性、立体選択性）に関して選択され得る。次いで、このポリマーの合成に関する付属的なテンプレートが同定され得る。

【０２０９】

事実上２つの基質分子間の結合形成を生じるか、または２つの生成物分子中に結合の切断を生じる任意の反応を触媒するライブラリーメンバーは、図１２および図１３に提案されるスキームを使用して選択され得る。触媒（例えば、ヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ触媒、Ｈｅｃｋカップリング触媒、アルドール反応触媒、またはオレフィン複分解触媒）を形成する結合を選択するために、ライブラリーメンバーは、それらの５’末端またはチオール末端を介して１つの基質に共有結合される。その反応の他の基質は、ビオチンに結合する誘導体として合成される。ライブラリー－基質結合体の希釈溶液が、基質－ビオチン結合体と合わされる場合、結合形成を触媒するライブラリーメンバーはビオチン基を、ライブラリーメンバー自体に共有結合させる。次いで、触媒を形成する活性な結合は、活性な結合を固定したストレプトアビジンで捕捉し、不活性なライブラリーメンバーを洗い流すことにより、不活性な結合メンバーから分離され得る（図１２）。

【０２１０】

類似した様式で、結合切断反応（例えば、逆アルドール反応、アミド加水分解、除去反応、または過ヨウ素酸塩切断後のオレフィンのジヒドロキシル化）を触媒するライブラリーメンバーが選択され得る。この場合、ライブラリーメンバーは、この結合切断反応がビオチン部分のライブラリーメンバーからの切断を引き起こすように、ビオチン化基質に共有結合される（図１３）。反応条件下でのインキュベーション後、不活性なライブラリーメンバーではなく、活性な触媒は、それらのビオチン基の喪失を生じる。次いで、不活性なポリマーを捕捉するために、ストレプトアビジン結合ビーズが使用され得るのに対して、活性な触媒は、ビーズから溶出され得る。関連する結合形成および結合の切断の選択は、触媒性ＲＮＡの展開および触媒性ＤＮＡの展開において、首尾よく使用されたきた（Ｊａｓｃｈｋｅら、（２０００）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．４：２５７－６２）。これらの選択は、複合的なターンオーバー触媒作用を明白に選択しないが、この様式で選択されたＲＮＡおよびＤＮＡは、それらの基質部分から分離される場合、一般的に複合的なターンオーバー触媒であることが証明されている（Ｊａｓｃｈｋｅら、（２０００）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．４：２５７－６２；Ｊａｅｇｅｒら、（１９９９）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ ９６：１４７１２－７；Ｂａｒｔｅｌら（１９９３）ＳＣＩＥＮＣＥ ２６１：１４１１－８；Ｓｅｎら、（１９９８）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．２：６８０－７）。

【０２１１】

単純に活性な触媒を展開させることに加えて、上記のインビトロ選択は、他の触媒発見アプローチを使用して、達成が困難な強力な問題に、非天然のポリマーライブラリーを展開させるために使用される。触媒間の基質特異性は、所望の基質の存在下で、活性な触媒を選択し、次いで、１つ以上の望ましくない基質の存在下での不活性な触媒を選択することによって、選択され得る。所望の基質および所望でない基質が、一つ以上の立体中心で、それらの構造が異なる場合、光学異性体選択的な触媒またはジアステレオ異性体選択的な触媒が、選択のラウンドから現れ得る。同様に、金属選択性は、所望の金属の存在下で、活性な触媒を選択し、所望でない金属の存在下での不活性な触媒を選択することによって、展開され得る。逆に、広い物質許容性を有する触媒は、連続する選択ラウンド間で、基質構造を変動することによって、展開され得る。

【０２１２】

（ｖ）反復選択

溶離液を一次選択から二次選択にロードすることによって、選択を反復することで、正味の濃縮度を増加させる。テンプレートの介在性増幅は、必要とされない。例えば、炭酸脱水酵素ビーズへの結合に関する選択は、リガンドの３３０倍の富化を可能にした。溶出液の新鮮な炭酸脱水素酵素ビーズへの直接的な適用（実施例１１を参照のこと）は、炭酸脱水素酵素リガンドをコードするテンプレートを１０，０００倍以上富化する。その選択が３回繰り返される場合、５，０００，０００倍の正味のリガンドの富化が観察された。この結果は、ライブラリー選択を反復することによって、所望の分子の非常に大きな富化を生じ得ることを示す。特定の実施形態において、選択の１番目のラウンドは、結合するリガンドの数の少なくとも５０倍の増加を提供する。好ましくは、富化における増加は、１００倍より高く、より好ましくは、１０００倍より高く、そして、さらにより好ましくは、１００，０００倍より高い。後の選択ラウンドは、さらに、元のライブラリーより１００倍、好ましくは、１，０００倍、より好ましくは１００，０００倍、そして最も好ましくは、１，０００，０００倍、富化を増加させる。

【０２１３】

あるいは、ライブラリーに高親和性結合剤を富化するために、選択された合成分子をコードするＤＮＡテンプレートのＰＣＲ増幅の後、翻訳、選択および増幅にさらなるラウンドが行われ得る。結合緩衝液および洗浄緩衝液の塩濃度を増加させ、結合の持続時間を減少させ、結合温度および洗浄温度を上昇させ、そして、洗浄添加剤（例えば、ＤＮＡまたは無関係のタンパク質）の濃度を増加させることによって、選択のストリンジェンシーを、段階的に増加する。

【０２１４】

重要なことは、インビボの選択が、結合親和性に加えて特異性に対しても選択し得ることである。結合特異性に対するライブラリースクリーニング方法は、代表的に、目的の各標的または非標的に対して完全なスクリーニングを繰り返すことを必要とする。対照的に、特異性に対する選択は、標的結合に対する選択ならびに１つ以上の非標的に結合できないことに対する選択によって、単一の実験で実施され得る。従って、ライブラリーは、非標的に結合するライブラリーメンバーを除去することによって、前もって枯渇され得る。あるいは、またはさらに、標的分子への結合に対する選択は、実施例１１に記載されるように、過剰の１つ以上の非標的の存在下で実施され得る。特異性を最大化するために、非標的は、相同な分子であり得る。標的分子がタンパク質である場合、適切な非標的タンパク質としては、例えば、アルブミンのような一般的に乱雑なタンパク質が挙げられる。結合アッセイが、標的分子の特定の部分のみを標的として設計される場合、非標的は、その部分が変化されたかまたは除去された分子に対する変形物であり得る。

【０２１５】

（ｖｉ）増幅および配列決定

選択のラウンドが、一旦完了すると、現在あるいは、以前は、選択された反応生成物と結合しているか、または結合していたテンプレートは、配列決定を促進する任意の適切な技術、または他の後のテンプレートの操作を使用して増加される。天然のオリゴヌクレオチドは、当該分野の方法の任意の状態によって増幅され得る。これらの方法としては、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）；核酸配列ベースの増幅（例えば、Ｃｏｍｐｔｏｎ（１９９１）ＮＡＴＵＲＥ　３５０：９１－９２を参照のこと）；増幅したアンチセンスＲＮＡ（例えば、ｖａｎ　Ｇｅｌｄｅｒら、（１９８８）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：７７６５２－７７６５６を参照のこと）、自己維持配列複製系（ｓｅｌｆ－ｓｕｓｔａｉｎｅｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ）（Ｇｎａｔｅｌｌｉら、（１９９０）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ　８７：１８７４－１８７８）；ポリメラーゼとは独立した増幅（例えば、Ｓｃｈｍｉｄｔら、（１９９７）　ＮＵＣＬＥＩＣ　ＡＣＩＤＳ　ＲＥＳ．２５：４７９７－４８０２を参照のこと）、およびクローニングしたＤＮＡフラグメントを保有するプラスミドのインビボでの増幅が挙げられる。ＰＣＲ方法の記述は、例えば、Ｓａｉｋｉら、（１９８５）ＳＣＩＥＮＣＥ　２３０：１３５０－１３５４；Ｓｃｈａｒｆら、（１９８６

）ＳＣＩＥＮＣＥ ２３３：１０７６－１０７８；および米国特許第４，６８３，２０２号中に見出される。リガーゼ媒介増幅方法（例えば、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）もまた使用され得る。一般に、選択された核酸配列の正確で、効率の良い増幅を可能にする任意の方法が、本発明の方法において使用され得る。増幅後の配列の比例した発現量が、増幅前の混合物中の配列の相対的な比率を反映することが、必要ではないが、そうであることが好ましい。

【０２１６】

非天然のヌクレオチドに関しては、効率的な増幅手順の選択範囲は少ない。非天然のヌクレオチドは、特定の酵素（ポリメラーゼを含む）によって組み込まれ得るので、各伸長サイクルの間に、ポリメラーゼを添加することによって、手動でポリメラーゼ連鎖反応を行なうことが可能である。

【０２１７】

ヌクレオチドアナログを含むオリゴヌクレオチドに関しては、増幅のための方法は、少数しか存在しない。非酵素媒介性の増幅スキームが使用されてもよい（Ｓｃｈｍｉｄｔら、（１９９７） ＮＵＣＬＥＩＣ ＡＣＩＤＳ ＲＥＳ．２５：４７９７－４８０２）。骨格を改変したオリゴヌクレオチド（ｂａｃｋｂｏｎｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）（例えば、ＰＮＡおよびＬＮＡ）に関しては、この増幅方法が使用され得る。あるいは、標準的ＰＣＲを使用して、ＰＮＡオリゴヌクレオチドテンプレートまたはＬＮＡオリゴヌクレオチドテンプレートからＤＮＡを増幅し得る。テンプレートを増幅する前、もしくは、その間、またはテンプレートを相補する前、もしくはその間に、変異誘発または組換えさせて、次のラウンドの選択またはスクリーニングのための展開したライブラリーを作り出す。

【０２１８】

（（ｖｉｉ）配列決定）

配列決定は、標準的ジデオキシ鎖末端方法、または化学的配列決定（例えば、Ｍａｘａｍ－Ｇｉｌｂｅｒｔ配列決定手順を使用する）によってなされ得る。あるいは、テンプレート（または、長いテンプレートが使用される場合、その可変部分）の配列は、チップへのハイブリダイゼーションによって決定され得る（実施例１２を参照のこと）。例えば、検出可能部分（例えば、蛍光部分）と結合した一本鎖テンプレート分子は、一本鎖核酸または公知の配列の核酸アナログの多数のクローン集団を有するチップ上に露出され、各クローン集団は、チップ上の特定のアドレス可能な位置に存在する。テンプレート配列は、チップ配列にアニーリングすることが可能になる。次いで、検出可能部分のチップ上の位置が、決定される。検出可能部分の位置およびその位置に固定化された配列に基づいて、テンプレートの配列が決定され得る。多数のこのようなオリゴヌクレオチドが、チップまたは他の固体支持体上のアレイに固定され得ることが企図される。

【０２１９】

（ｖｉｉｉ）多様化）

本発明のライブラリーは、ＤＮＡレベルで変異を導入する（例えば、誤りがちのＰＣＲ（Ｅｒｒｏｒ－Ｐｒｏｎｅ ＰＣＲ）（Ｃａｄｗｅｌｌら（１９９２） ＰＣＲ ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＰＰＬ．２：２８））ことによって、またはＤＮＡをインビトロの相同組み換えに供する（Ｓｔｅｍｍｅｒ（１９９４）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ ９１：１０７４７；Ｓｔｅｍｍｅｒ（１９９４）ＮＡＴＵＲＥ ３７０：３８９）ことによって、展開され得る。

【０２２０】

変異および組換えを使用する低分子の展開は、単純な富化を越える二つの強力な利点を提供する。ライブラリーの全体の多様性が、作製される分子の数（代表的に、10^{12}～10^{15}）より非常に少ない場合、全ての可能なライブラリーメンバーが選択の開始時に存在する。この場合、選択条件が、展開の進行のラウンドにつれて変化し得るので、多様化はなお有効である。例えば、選択のより後のラウンドは、高ストリンジェンシーの下で実施され得、非標的分子への結合に対する対抗選択に関与し得る。多様化は、選択のより

早いラウンドの間に捨てられるライブラリーメンバーに、選択条件の変化した、その適性が、他のメンバーに比較してより大きい、後のラウンドで再び現れる機会を与える。さらに、10^{15}分子より大きい理論上の多様性を有する合成ライブラリーを生成することが事実上可能である。この場合、多様性は、元のライブラリーには決して存在しない分子が、選択された分子に対する類似性に基づいて、後の選択ラウンドで現れることを可能にする。このことは、同時に、巨大なタンパク質配列空間の１つの小さな部分集合を探索するタンパク質展開の方法と類似している。

【０２２１】

（（ｖｉｉｉ）（ａ）誤りがちのＰＣＲ）

ランダム点変異形成は、誤りがちのＰＣＲ（Ｃａｄｗｅｌｌら、（１９９２）ＰＣＲ ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＰＰＬＩＣ．２：２８－３３）条件下でのＰＣＲ増幅工程を行なうことにより実施される。これらの分子の遺伝子コードは、天然のタンパク質の遺伝子コードが構築される様式と類似して、関連する化学基に対する関連するコドンを指定するために記載されるので、選択された分子をコードするテンプレートのランダム点変異は、化学的に関連するアナログに対する結果を多様化する。誤りがちのＰＣＲが、本質的に、通常のＰＣＲより効率的ではないので、誤りがちのＰＣＲによる多様化は、好ましくは、天然のｄＡＴＰ、天然のｄＴＴＰ、天然のｄＣＴＰ、天然のｄＧＴＰのみとともに、化学的ハンドル（ｃｈｅｍｉｃａｌ ｈａｎｄｌｅ）またはビオチン基を欠如するプライマーを使用して実施される。

【０２２２】

（（ｖｉｉｉ）（ｂ）組換え）

ライブラリーは、組換えを使用して多様化され得る。例えば、組換えられるべきテンプレートは、図１４に示される構造を有し得、そのコドンは、５塩基の非パリンドローム制限エンドヌクレアーゼ切断部位（例えば、ＡｖａＩＩ（Ｇ／ＧＷＣＣ、Ｗ＝ＡまたはＴ）によって切断される部位、Ｓａｕ９６Ｉ（Ｇ／ＧＮＣＣ、Ｎ＝Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣ）によって切断される部位、ＤｄｅＩ（Ｃ／ＴＮＡＧ）によって切断される部位、または、ＨｉｎＦＩ（Ｇ／ＡＮＴＣ）によって切断される部位）によって分離される。選択後、所望の分子をコードするテンプレートは、市販の制限酵素を用いて、酵素的に消化される。次いで、消化されたフラグメントは、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼを用いてインタクトなテンプレート中に組換えられる。コドンを分離する制限部位は、非パリンドロームであるので、テンプレートのフラグメントは、再結合のみして、インタクトな組換えテンプレートを形成し得る（図１４）。ＤＮＡをテンプレートとした組換えテンプレートの翻訳は、組換え低分子を提供する。このような方法で、天然のタンパク質間でのアミノ酸残基の組換えと類似した様式で、所望の活性を有する合成低分子間の官能基が組換えられる。組換えが、点突然変異のみより効率的な分子の配列空間を探索することがよく理解される（Ｍｉｎｓｈｕｌｌら、（１９９９）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．３：２８４－９０；Ｂｏｇａｒａｄら、（１９９９）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ ９６：２５９１－５；Ｓｔｅｍｍｅｒ ＮＡＴＵＲＥ ３７０： ３８９－３９１）。

【０２２３】

ライブラリーメンバーを多様化する好ましい方法は、例えば、ＷＯ ０２／０７４９７８；ＵＳ Ｐａｔｅｎｔ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．２００３－００２７１８０－Ａ１；およびＢｉｔｔｋｅｒら、（２００２）ＮＡＴＵＲＥ ＢＩＯＴＥＣＨ．２０（１０）：１０２４－９に記載されるように、相同ではないランダムな組換えを介する。

【０２２４】

（（ｉｉｉｖ）（ｃ）ランダムカセット式変異形成）

ランダムカセット式変異形成は、固定した開始配列から多様化したライブラリーを作製するために有用である。従って、このような方法は、例えば、ライブラリーが選択に供され、一つ以上のライブラリーメンバーが単離され、そして配列決定された後に、使用され得る。一般に、開始配列上に変異を有するオリゴヌクレオチドのライブラリーは、従来の

化学合成、誤りがちのＰＣＲ、または他の方法によって生成される。例えば、オリゴヌクレオチドのライブラリーは、コドンにおける各ヌクレオチド位置に対して、ヌクレオチドが、その位置の開始配列に対して９０％の確率で同一性を有し、１０％の確率で異なるように生成され得る。オリゴヌクレオチドは、合成される場合、完全なテンプレートであり得るか、またはテンプレートの多様なライブラリーを形成するために、他のオリゴヌクレオチドと後に連結したフラグメントであり得る。

【０２２５】

（Ｖ．使用）

本発明の方法および組成物は、所望の性質を有する分子を生成するための新規の方法を示す。このアプローチは、分子生物学者が数十年間利用してきた非常に強力な遺伝的方法と有機化学の可撓性および能力を結合させる。遺伝的選択による、非天然のポリマーを調製し、増幅し、そして展開する能力は、活性、バイオアベイラビリティー、安定性、蛍光性、感光性、または、タンパク質および核酸中に見出される限定された一連の成分を使用して達成するのが困難であるかもしくは不可能である他の性質を有する新規のクラスの触媒を生じ得る。同様に、変異形成および選択の周期を繰り返すことにより、低分子を調製し、増幅し、そして展開するための新規の系を展開することにより、よりゆっくりした従来の薬物発見方法によって単離された薬物より優れた性質を有する新規のリガンドまたは薬物の単離につながり得る。

【０２２６】

例えば、分子に選択的に結合する人工のレセプターとして、または、化学反応に対する触媒として有用な非天然の生体高分子が単離され得る。これらの分子の特徴づけは、ポリカルバメート、ポリウレア、ポリエステル、ポリカルボネート、非天然の側鎖および空間配置を有するポリペプチド、または、結合特性または触媒特性を有する二次構造または三次構造を形成するための他の非天然のポリマーの能力に重要な見識を提供する。

【０２２７】

本発明は、さらに、新規の化学反応の発見を可能にする。化学反応の分野は、以前にはアクセスできなかった分子へのアクセスを提供する新規の化学反応の発見によって、効率の良い合成を可能にし、新規の化学的な原理を明らかにすることで、絶えず変化している。前例となる文献に基づいた反応性の予測に導かれて、化学者は、代表的に、現在の合成方法論における特定の欠点を克服するための新規反応を探索する。現在まで、多数の多様な反応物質が、多数の異なる条件下で、互いに反応するそれらの能力に関して同時に評価される、化学反応に対する広範囲の、偏りのない探索を行なうことは可能ではなかった。数千の多様な反応を実行するのに必要な物質の量およびこのような実験の結果を分析する困難さの両方は、現在の反応発見アプローチを使用するこの目的を解決困難にする。化学反応に対する広範な、偏りのない探索は、従来の見識または発明者らの官能基の反応性を予測する能力に制限されないので、魅力的である。

【０２２８】

新規の化学反応および化学反応性を発見する本発明の方法は、既存の方法を上回るいくつかの利点を有する。例えば、いくつかの基は、種々の条件下で、特定の反応の効率を試験するための高処理スクリーニングを構築した（Ｋｕｎｔｚら、（１９９９）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．３：３１３－３１９；Ｆｒａｎｃｉｓら、（１９９８）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．２：４２２－４２８；Ｐａｗｌａｓら、（２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．Ｓｏｃ．１２４：３６６９－３６７９；Ｌｏｂｅｒら、（２００１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２３：４３６６－４３６７；Ｅｖａｎｓら、（２００２）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．６：３３３－３３８；Ｔａｙｌｏｒら、（１９９８）ＳＣＩＥＮＣＥ　２８０：２６７－２７０；およびＳｔａｍｂｕｌｉら、（２００１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２３：２６７７－２６７８）；しかし、このスクリーニングは小さな一組の反応型に限定されている。反応は、蛍光分光法、比色法、サーモグラフ分析、および従来のクロマトグラフィーを使用する高処理様式で、分析された（Ｄａｈｍｅｎら、（２００１）ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ－ＳＴＵＴＴＧＡＲＴ

１４３１－１４４９およびＷｅｎｎｅｍｅｒｓ（２００１）ＣＯＭＢＩＮＡＴＯＲＩＡＬ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ ＆ ＨＩＧＨ ＴＨＲＯＵＧＨＰＵＴ ＳＣＲＥＥＮＩＮＧ ４：２７３－２８５）。化学反応性に対して最も高処理のスクリーニングは、小さな一組の反応型のみに対して有用である。というのは、スクリーニングは、反応の特定の性質（例えば、アミンの消失またはプロトンの生成）に依存するためである。結果として、高処理スクリーニング方法は、既知であるかまたは予測される触媒を発見するのに有用であるが、目的の反応とは異なる新規の反応性を発見するためには、あまり適していない。化学反応に対する偏りのない探索は、反応条件および反応物質の両方を、広範囲に、数千の規模の種々の反応で実用的な高効率の様式で、試験する。化学反応を発見する本発明の方法は、反応性への新規の見識および化学合成に対して有用な新規の反応を導き得る予期しない、前例のない反応性を発見する機会をより多く提供する。

【０２２９】

反応物および条件の非常に大きく、かつ、多様な収集物から新規の反応を発見することは、（１）特定の基質または生成物に依存しない反応性のための一般的なアッセイ、および（２）反応条件の空間および反応物質の空間が広く探索されるようなアッセイ反応の全体的な効率の上昇、を必要とする。例えば、触媒核酸を展開する研究者は、日常的に、核酸を展開するプールに一つの反応物質を接触させ、別の反応物質を、容易に固定化され得るハンドル（例えば、ビオチン）に結合することによって、結合形成触媒を選択する（Ｗｉｌｓｏｎら（１９９９）ＡＮＮＵ．ＲＥＶ．ＢＩＯＣＨＥＭ．６８：６１１－６４７；Ｊａｓｃｈｋｅ（２００１）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＳＴＲＵＣＴ．ＢＩＯＬ．１１：３２１－３２６；Ｊａｓｃｈｋｅら、（２０００）ＣＵＲＲ．ＯＰＩＮ．ＣＨＥＭ．ＢＩＯＬ．４：２５７－２６２；Ｊａｓｃｈｋｅ（２００１）ＢＩＯＬ．ＣＨＥＭ．３８２：１３２１－１３２５）。活性な核酸は、ハンドルに結合するようになり、そして、不活性な配列から分離される。この型の選択は、特定の基質および生成物の消費または生成に依存しないので、この選択の型で試験され得る反応物の範囲は、現在の反応性スクリーニングで評価され得る反応物の範囲より大きい。

【０２３０】

核酸テンプレート合成は、核酸触媒に依存しない新規の化学反応性を発見するために、結合形成の選択を使用する方法を提供する（Ｇａｒｔｎｅｒら、（２００２）、ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．４１：１７９６－１８００；Ｇａｒｔｎｅｒら、（２００１）前出）。核酸テンプレートは、反応幾何学（ｒｅａｃｔｉｏｎ ｇｅｏｍｅｔｒｙ）に対して、明白な必要条件なしに、高い配列特異的様式で、広範な種々の化学反応に関連し得る。反応物を適切に設計した核酸配列に付着させることによって、前例のない数千の反応物を、各反応物をコードする個々の配列を含む単一のポット（ｐｏｔ）中で試験することが可能になる。核酸の結合した反応物のプールは、第二核酸結合反応物プールのメンバーとの共有結合形成に関して、正確に選択される（単にスクリーニングされるのでは無い）。ＰＣＲ増幅およびＤＮＡ配列決定は、反応物のどの組合せが、結合形成を首尾よく受けるかを明らかにする。

【０２３１】

特定の実施形態において、検索可能な反応は、水性培地または実質的に水性培地中で生じ得る変化である。他の実施形態において、検索可能な反応は、核酸を迅速に、分解しない反応に制限される。ＤＮＡの公知の化学的頑健性は、異なる温度、ｐＨ範囲、および添加剤（例えば、遷移金属）に及ぶ広範な反応条件が、提案したアプローチに適合性であることを示唆している。ＤＮＡテンプレートＨｅｃｋ反応は、遷移金属触媒反応が、ＤＮＡテンプレートフォーマット中で、実行可能であることを示し、このことは、ＤＮＡが多くの遷移金属複合体（Ｐｄ、Ｎｉ、Ｍｎ、Ｐｔ、Ｒｕ、Ｏｓ、Ｃｕ、Ｅｕ、およびＲｈを含有するものが挙げられる）と適合性であるという広範な証拠（Ｐａｔｏｌｓｋｙら、（２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２４：７７０－７７２；Ｗｅｉｚｍａｎら、（２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２４：１５６８－１５６９；Ｇａｒｔｎｅｒら、（２００２）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．４１：１７９６－１８００；Ｃ

ｚｌａｐｉｎｓｋｉら、（２００１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２３：８６１８－８６１９；Ｈｏｌｍｌｉｎら、（１９９８）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２０：９７２４－９７２５；Ｂａｓｈｋｉｎら、（１９９４）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１１６：５９８１－５９８２；Ｍａｇｄａら、（１９９４）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１１６；７４３９－７４４０；および、Ｄａｎｄｌｉｋｅｒら、（１９９７）ＳＣＩＥＮＣＥ２７５：１４６５－１４６８）と一致する。さらに、公知の水適合性有機反応物の数の急速な増加（Ｌｉら、Ｏｒｇａｎｉｃ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｉｎ ａｑｕｅｏｕｓ ｍｅｄｉａ、Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９７）および水性溶媒中で作用することの固有の利点は、新規の反応の発見に関して水が、リッチな培地であることを示唆する。この試みにおいて、発見された反応は、核酸をテンプレートとしない標準的な様式で実施される場合、一般的に有用であり得、そして、核酸テンプレート合成ライブラリーを生成するのに使用するための天然の候補でもある。

【０２３２】

核酸テンプレート化学物質は、反応物の構造に無関係に、新規の結合形成反応を探索するのに効率的な特定の実施形態において、インビトロの選択およびＰＣＲ増幅と組み合わされる。共有結合形成、分析に必要な最小スケール、および広範な種々の反応条件と核酸との適合性を直接選択する能力は、一つ以上の実験における反応物および反応条件の数千の組合せを試験し得る前例のない反応性に対する第一の探索を可能にし得る。

【０２３３】

反応の一般性およびＤＮＡテンプレート合成の隔たりのある独立性は、選択による新規の化学反応を発見するための系を可能にする。結合形成に関してインビボでの選択に適した、ＤＮＡを結合した反応物（すなわち、テンプレートおよび／または移動単位）は、図９のプールＡおよびプールＢと呼ばれる一つまたは二つの形態で存在する。プールＢの各反応物は、官能基をコードするビオチン化したＤＮＡ（コード領域）の短い断片に結合した、試験された官能基を含む。プールＡの各反応物は、試験された、対応するコード領域である官能基、およびプールＢのコード領域の一つを補完する「アニーリング領域」またはアンチコドンである官能基を含む。プールＡ中の各官能基は、全ての可能なアニーリング領域の一つに結合する。この配置は、プールＡ中の任意の官能基が、同一のＤＮＡ二本鎖上のプールＢ中の任意の官能基に結合することを可能にし、このことは、反応物質が相互に反応性である場合、ＤＮＡテンプレート結合形成に対する機会を提供する。結合形成のためのインビトロ選択に適したフォーマット中のＤＮＡを結合した反応物質のこれらの二つのプールは、低分子反応物質、コード領域、およびプールＡの場合には、アニーリング領域のライブラリーを効率的に結合させる方法の開発を必要とする。

【０２３４】

本発明の系は、低分子／標的の結合の対の同定に、特に有用である。例えば、本発明のＤＮＡテンプレート低分子ライブラリーは、標的ライブラリー中の一つ以上の化合物に結合するか、またはそれらと相互作用する本発明のライブラリー内の低分子が同定されるように、他の溶液または潜在的な標的化合物の固相ライブラリーと接触され得る。好ましくは、結合対は、選択（例えば、成分の一つのタグ付けによる選択、もう一方を同定するためのＰＣＲと組み合わせた選択）によって同定され得る。本発明のこの局面の特定の好ましい実施形態において、標的ライブラリーは、ポリペプチドおよび／またはタンパク質を含む。

【０２３５】

本明細書中で記載されるとおり、本発明はまた、核酸テンプレート合成の新規モデルを提供し、それは、同時にマッチしない反応物およびワンポットの複数の工程の連続した合成（例えば、特定の配列の単一のトリペプチドのみが生成されるように、三つのＤＮＡ結合アミノ酸および一つのテンプレートをインキュベートする）を含む。本発明はまた、有機溶媒（例えば、ジクロロメタン、ジメチルホルムアミド）中の核酸テンプレート合成を提供する。

【０２３６】

本発明の系のなお別の適用は、核酸テンプレート合成に対する新規のテンプレートを同定し、そして／または展開することである。例えば、本発明は、各種の生成物を産生する反応に関与するのに十分な薬剤と接触する場合、最も有効に生成物の生成を導く核酸テンプレートの同定を可能にする。

【０２３７】

本発明はまた、化学反応経路の開発に通じるのに有用な情報を提供する。例えば、本発明に従うと、研究者は、複合的な化学反応（例えば、ビオチン脱離基の喪失によって選択され得る大環状化）が生じることを可能にする核酸テンプレート基質のライブラリー内から選択し得る。うまくいく反応条件が同定される場合、本発明の系は、関与する成分の容易な同定を可能にする。従って、新規の化学反応は、その反応に有用である可能性のある試薬および／または経路のこれまでの知識なしに開発され得る。

【０２３８】

（ＶＩ．キット）

本発明はまた、本発明の方法に使用するためのキットおよび組成物を提供する。キットは、本発明を実施するのに有用な任意のアイテムまたは組成物を含み得る。キットは、テンプレート（例えば、ヘリックスの末端構造、ヘアピン構造、オメガ構造、およびＴ構造）、アンチコドン、移動単位、モノマー単位、構築物、反応物質、低分子足場、緩衝液、溶媒、酵素（例えば、熱安定性ポリメラーゼ、逆転写酵素、リガーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、Ｋｌｅｎｏｗフラグメント、ポリメラーゼ、アルカリホスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ）、リンカー、保護基、ポリヌクレオチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、塩、酸、塩基、固体支持体、またはこれらの任意の組合せを備え得るが、これらに限定されない。

【０２３９】

非天然のポリマーを調製するためのキットは、本明細書中に記載される方法を使用する非天然のポリマーを調製するために必要なアイテムを備えるべきである。このようなキットは、テンプレート、アンチコドン、移動単位、モノマー単位、またはこれらの組合せを備え得る。低分子を合成するためのキットは、テンプレート、アンチコドン、移動単位、構築物、低分子足場、またはこれらの組合せを備え得る。

【０２４０】

本発明のキットはまた、ポリヌクレオチドテンプレートを増幅し、そして／または展開するために必要なアイテム（例えば、ＰＣＲに対しては、熱安定性ポリメラーゼ、ヌクレオチド、緩衝液およびプライマー）を備え得る。他の特定の実施形態において、本発明のキットは、ＤＮＡ混合を行なうのに一般的に使用されるアイテム（例えば、ポリヌクレオチド、リガーゼ、およびヌクレオチド）を備える。

【０２４１】

本明細書中に記載されるテンプレートおよび移動単位に加えて、本発明はまた、複合低分子、足場、または本明細書中に記載される本発明の方法の任意の一つ以上によって調製される非天然のポリマーを含有する組成物を含む。

【０２４２】

新規の化学反応または官能性を同定するためのキットは、反応単位（反応物質）と関連するテンプレート、反応単位（反応物質）と関連する移動単位、試薬、酸、塩基、触媒、溶媒、ビオチン、アビジン、アビジンビーズなどを備え得る。キットはまた、反応基と結合するテンプレートを生成するための試薬（例えば、ビオチン、ポリヌクレオチド、反応単位、ＤＮＡ　ｐｏｌ　ＩのＫｌｅｎｏｗフラグメント、ヌクレオチド、アビジンビーズなど）を備え得る。キットはまた、ＰＣＲのための試薬（例えば、緩衝液、熱安定性ポリメラーゼ、ヌクレオチド、プライマーなど）を備え得る。

【０２４３】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態およびそれらの等価物における本発明の実施に適用され得るさらなる重要な情報、例示および手引きを含む。

【実施例】

【０２４４】
実施例１および実施例２は、核酸テンプレート合成に使用するための材料の調製を記載し、特定の合成反応を記載する。実施例３は、多工程の合成を議論する。実施例４は、核酸テンプレート合成と、有機溶媒との適合性を記載する。実施例５は、特定のＤＮＡテンプレート合成の実施に有用な特定のテンプレート構築物を記載する。実施例６は、核酸テンプレート合成における立体選択性を記載する。実施例７は、単一の溶液中での別のミスマッチな反応に関するＤＮＡテンプレート合成の使用を記載する。実施例８は、核酸テンプレート合成によって実施され得る官能基の変換反応を記載する。実施例９は、例示的な化合物およびライブラリーの合成を記載する。実施例１０は、ＤＮＡを非天然のポリマーに翻訳するためのポリメラーゼの使用を記載する。実施例１１は、インビトロの選択プロトコルを記載する。実施例１２は、新規の化学反応の発見に対するＤＮＡテンプレート合成の適用を記載する。

【０２４５】
（実施例１：一般的なＤＮＡテンプレート合成）
核酸テンプレート合成は、極端に用途が広く、種々の化学的化合物の合成を可能にする。この実施例は、二つの異なるＤＮＡテンプレート構築物を使用するＤＮＡテンプレート合成を実施することが可能であることを示す。

【０２４６】
図１５に示されるように、求電子性マレイミド基を有するヘアピン（Ｈ）構築物またはヘリックスの末端（Ｅ）構築物を備えるテンプレートを調製し、それらの、チオール試薬と結合する相補的ＤＮＡオリゴヌクレオチドを含む移動単位との反応性を試験した。Ｈテンプレートおよびテンプレートの両方が、ＤＮＡを結合したチオールの等価物の一つと効率良く反応し、２５℃で数分間でチオエステル生成物を産生した。ＤＮＡテンプレート反応の速度（K_{app}＝約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$）は、それらの反応基の相対的な向きの違いにも関わらず、Ｈ構築物およびＥ構築物に関して類似していた。対照的に、不一致の配列を含む試薬を使用する場合、または、過剰のβ－メルカプトエタノールを用いて前もってクエンチしたテンプレートを使用する場合、生成物は、観察されなかった（図１５を参照のこと）。従って、生じる生成物の構造が天然のＤＮＡバックボーンの構造とは著しく異なっていても両方のＤＮＡテンプレートとも配列特異的ＤＮＡテンプレート反応を補助する。テンプレートとしない分子間の反応生成物は、ＤＮＡテンプレート反応の特異性を示すその反応条件下（ｐＨ７．５、２５℃、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、６０ｎＭ　テンプレート移動単位）では、ほとんど観察されないか、全く観察されなかった。

【０２４７】
実際、種々の反応型（S_N2置換、α，β－不飽和カルボニル系およびビニルスルフォンへの添加剤）、求核試薬（チオールおよびアミン）および反応物質の構造に及ぶ配列特異的ＤＮＡテンプレート反応は、全て、良好な収率および卓越した配列選択性を伴なって進行した（図１６を参照のこと）。チオール（Ｓ）または第一級アミン（Ｎ）に結合した、マッチした（Ｍ）かまたはマッチしない（Ｘ）試薬を、図１６に示した種々の求電子試薬で官能性を持たせた１当量のテンプレートと混合した。チオール試薬との反応を、ｐＨ７．５で以下の条件下で行なった：ＳＩＡＢおよびＳＢＡＰ：３７℃、１６時間；ＳＩＡ：２５℃、１６時間、ＳＭＣＣ、ＧＭＢＳ、ＢＭＰＳ、ＳＶＳＢ：２５℃、１０分間。アミン試薬との反応を、２５℃で、ｐＨ８．５で、７５分間行なった。予期される生成物の量は、質量分析によって確認した。各場合、ミスマッチの試薬ではなく、マッチした試薬は、遷移状態の幾何学におけるかなりの変異、立体障害、高次構造上の可塑性にも関わらず、効率的に生成物を生じた。集合的に、これらの知見は、核酸テンプレート合成が、種々の反応型を補助し得る一般的現象であって、核酸バックボーンに類似する構造の作製に限定されないことを示唆する。

【０２４８】
配列識別能は、核酸の合成反応生成物への正確な翻訳に関して重要である。ＤＮＡテンプレート合成の配列識別能を試験するために、ヨードアセトアミド基に結合したヘアピン

テンプレートを、０、１または３の不適合物を含むチオール含有移動単位と反応させた。２５℃で、不適合物を含まないチオール含有移動単位の初期の反応速度は、単一の不適合物を含む移動単位の反応速度より２００倍速かった（k_{app}＝２．４×１０^{4}$M^{-1}$$s^{-1}$対１．１×１０^{2}$M^{-1}$$s^{-1}$；図１７Ａ）。さらに、ミスマッチの試薬のアニーリングから生じる少量の生成物は、反応温度を、ミスマッチ試薬の融解温度T_mを上回るまで上昇させることによって、除去し得る（図１７Ｂ）。図１７Ｂ中では、図１７Ｂの反応は、示した温度で１６時間繰り返される。計算した試薬のT_m値は、３８℃（マッチ）および２８℃（単一のミスマッチ）であった。生成物の形成と温度との間の反比例関係は、生成物形成が単純な分子間の機構ではなく、むしろＤＮＡテンプレート機構によって進行することを示す。

【０２４９】

反応の一般性および配列特異性に加えて、ＤＮＡテンプレート合成はまた、特定の状況下で、顕著な距離依存性を示す。マレイミド基またはα－ヨードアセトアミド基に連結されたＨテンプレートおよびＥテンプレートの両方は、これまで試験したテンプレート上のどこにでも（テンプレート上の反応基から３０塩基まで離れても）アニールしたミスマッチではない、マッチしたチオール試薬を用いて配列特異性反応を促進した。１塩基離れてアニールされた反応物は、２塩基、３塩基、４塩基、６塩基、８塩基、１０塩基、１５塩基、２０塩基、または３０塩基離れてアニールされた反応物と同様な速度で反応した（図１８）。４１塩基のＥテンプレートおよび１０塩基の試薬を使用した図１８に示される反応は、テンプレートの５’末端から１～３０塩基にアニーリングするように設計された。図１８の動力学的プロフィールは、２回の試行の平均を示す（偏差＜１０％）。「ｎ＝１ミス」試薬は、３個のミスマッチを含んでいた。全ての場合において、テンプレート反応速度は、テンプレートなし（ミスマッチ）の反応の速度よりも数百倍速い（k_{app}＝１０^{4}～１０^{5}$M^{-1}$$s^{-1}$対５×１０^{1}$M^{-1}$$s^{-1}$）。３０塩基の介在性の距離で、生成物は、おそらく２００員環に似ている遷移状態を通じて効率的に形成される。

【０２５０】

ＤＮＡテンプレート合成の距離非依存性の原理をさらに特徴付けるために、一連の修飾Ｅテンプレートが、初めて合成され、ここで、介在性塩基は、（ｉ）塩基間相互作用、（ｉｉ）ＤＮＡ骨格のコンフォメーションの優先度、（ｉｉｉ）荷電したリン酸骨格、および（ｉｖ）骨格の親水性の可能な寄与を評価するために設計された一連のＤＮＡアナログによって置換された。介在性塩基が図１９におけるアナログのいずれかと置換されたテンプレートは、生成物形成の速度に対してほとんど影響しなかった。

【０２５１】

図１９に示される実験において、図１８におけるｎ＝１０の反応は、５’－NH_2－ｄＴの後の９塩基が示された骨格アナログで置換されたテンプレートを使用して繰り返された。介在性の塩基に相補的なＤＮＡオリゴヌクレオチドの五つの等価物を、「ＤＮＡ＋クランプ（ｃｌａｍｐ）」反応に添加した。試薬は完全にマッチした（０）か、または三個のミスマッチを含む（３）かのいずれかであった。ゲルは、２５℃での２５分後の反応を示す。図１９は、ＤＮＡに特異的な骨格構造エレメントが、ＤＮＡテンプレート合成に依存しない観察された距離の原因ではないことを示す。しかし、一本鎖介在性領域に相補的な１０塩基ＤＮＡオリゴヌクレオチド「クランプ」の付加は、有意に生成物形成を減少させ（図１９）、このことは、この領域の柔軟性が、効率的なＤＮＡテンプレート合成に重要であることを示唆する。

【０２５２】

距離非依存性反応速度は、ＤＮＡテンプレートフォーマットにおける結合形成現象が、これらの非テンプレート対応物に対して十分に加速され、その結果、結合形成ではなく、むしろ、ＤＮＡアニーリングが律速である場合に説明され得る。従って、ＤＮＡアニーリングが少なくとも部分的に律速である場合、生成物形成の速度は、試薬の濃度が低下するにつれて減少するはずである。なぜなら、テンプレート結合形成とは異なり、アニーリングは、二分子過程であるからである。図２０は、実験の結果を示し、図１８に記載される

ｎ＝１、ｎ＝１０、およびｎ＝１のミスマッチの（ｍｉｓ）反応は、テンプレートおよび１２．５ｎＭ、２５ｎＭ、６２．５ｎＭ、または１２５ｎＭの試薬濃度を用いて繰り返した。図２０は、反応基間の１～１０の介在性塩基を有するＥテンプレートの場合には、反応物の濃度の減少は、観測される反応速度の顕著な減少をもたらしたことを示す。この観察は、ＤＮＡテンプレート合成における近接効果が、ＤＮＡアニーリングが律速になるまで結合形成速度を増強し得ることを示唆する。

【０２５３】

これらの知見は、ＤＮＡのワンポットライブラリーを、ＰＣＲ増幅および選択について適切な合成分子の溶液相ライブラリーへ翻訳するために、ＤＮＡテンプレート合成を使用する可能性をもたらす。上記の配列特異性は、試薬の混合物が、予想されたとおりに、テンプレートの相補的な混合物と反応し得ることを示唆する。最終的に、観察された距離非依存性は、異なるテンプレートコドンが、反応速度を減少することなく異なる反応をコードするように使用され得ることを示唆する。

【０２５４】

このアプローチの実証として、８塩基コード領域において各々異なるＤＮＡ配列を有する、１，０２５のマレイミド連結テンプレートのライブラリーを合成した（図２１Ａ～図２１Ｂ）。これらの配列の１つ、５’－ＴＧＡＣＧＧＧＴ－３’は、テンプレートへのビオチン基の結合をコードするために任意に選択された。１，０２５の異なるオリゴヌクレオチドに連結されたチオール試薬のライブラリーもまた作成された。３’－ＡＣＴＧＣＣＣＡ－５’に連結された試薬は、ビオチン基を含んだが、他の１，０２４の試薬（移動単位）は、ビオチンを含まなかった。等モル比の全ての１，０２５のテンプレートと１，０２５の試薬とは、２５℃で１０分間ワンポットで混合され、そして得られた生成物は、ストレプトアビジンへの結合についてインビトロで選択された。この選択で残存する分子は、ＰＣＲによって増幅され、そして制限消化およびＤＮＡ配列決定によって分析された。

【０２５５】

制限エンドヌクレアーゼＴｓｐ４５Ｉ（これは、ＧＴＧＡＣを切断し、従ってビオチンコードテンプレートを切断するが、他のテンプレートのいずれも切断しない）を用いる消化は、１：１の比の選択後の非ビオチンコードテンプレートに対するビオチンコードテンプレートを示した。図２２Ａに示される実験では、レーン１およびレーン５は、ストレプトアビジン結合選択前のＰＣＲ増幅ライブラリーを表し；レーン２およびレーン６は、選択後のＰＣＲ増幅ライブラリーを表し、；レーン３およびレーン７は、ＰＣＲ増幅した真のビオチンコードテンプレートを表し、；そして、レーン４は、２０ｂｐのラダーを表す。レーン５～レーン７は、Ｔｓｐ４５Ｉで消化した。選択前後の増幅したテンプレートのＤＮＡ配列決定の記録もまた、ビオチンをコードしないテンプレートの配列およびビオチンをコードするテンプレートの配列と一緒に示す。図２２Ａに要約した結果は、選択されなかったライブラリーと比較して、１，０００倍の富化を示す。選択前後のＰＣＲ増幅したプールのＤＮＡ配列決定は、類似した程度の富化を示唆し、そして、ビオチンをコードするテンプレートが、選択および増幅後の主要な生成物であることを示した（図２２Ａ）。

【０２５６】

１，０２５の試薬の同時配列特異性反応を支持するＤＮＡテンプレート合成の能力（これらの各々は、１，０２４：１の比率のパートナーのテンプレートに対する非パートナーのテンプレートに直面する）は、ワンポットでの合成ライブラリを生成するための方法としてその可能性を示す。

【０２５７】

総合すると、これらの結果は、図２２Ｂに示される特異的特性（例えば、アビジンへの結合）を有する合成ライブラリーメンバーを翻訳し、選択し、そして増幅することが可能であることを示している。さらに、これらの結果は、核酸テンプレート合成が、核酸骨格に対する構造に関連しない生成物を形成するための種々の化学反応物質を単にコードするのではなく、それらの化学反応物質に関連し得る驚くほど一般的な現象であることを示唆

している。試験したいくつかの反応に関しては、ＤＮＡテンプレートフォーマットは、結合形成の速度を、１０塩基のＤＮＡオリゴヌクレオチドの、その相補体へのアニーリングの速度より速く加速し、その結果驚くべき距離の非依存性を生じる。長い距離のＤＮＡテンプレート反応の手軽な性質はまた、非極性の反応物質の体積を縮小する水の性質（Ｃ．－Ｊ．Ｌｉら、Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ　ｉｎ　Ａｑｕｅｏｕｓ　Ｍｅｄｉａ，Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ：Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９９７を参照のこと）および反応基間の介在性一本鎖ＤＮＡの考えられる緻密さ（ｃｏｍｐａｃｔｎｅｓｓ）に、一部起因し得る。

【０２５８】

（材料および方法）

（ＤＮＡ合成）

ＤＮＡオリゴヌクレオチドを、標準的なプロトコルを用いてＰｅｒＳｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｅｘｐｅｄｉｔｅ　８９０９　ＤＮＡ合成機で合成し、そして逆相ＨＰＬＣによって精製した。オリゴヌクレオチドを、分光光度的および変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）に続くエチジウムブロマイドまたはＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を用いる染色およびＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｅａｇｌｅ　Ｅｙｅ　ＩＩ濃度計を用いる定量化によって定量化した。ホスホルアミダイト（５’－NH_2－ｄＴ基、５’テトラクロロフルオレセイン基、無塩基の骨格スペーサー基、Ｃ３骨格スペーサー基、９－結合ポリエチレングリコールスペーサー基、１２－結合飽和炭化水素スペーサー基、および５’ビオチン基の合成を可能にする）を、Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｓｔｅｒｌｉｎｇ、Ｖｉｒｇｉｎｉａ、ＵＳＡから購入した。チオール連結オリゴヌクレオチド試薬を、Ｃ３ジスルフィドコントロールドポアガラス（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｓｔｅｒｌｉｎｇ、Ｖｉｒｇｉｎｉａ、ＵＳＡ）上で合成した。

【０２５９】

（テンプレートの官能化）

５’－NH_2－ｄＴ基を有するテンプレートを、適切な求電子性Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ、ＵＳＡ）を用いる反応によって種々の求電子性官能基に変換した。反応を、２ｍｇ／ｍＬ求電子性ＮＨＳエステル、１０％　ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、および１００μｇまでの５’－アミノテンプレートを含む２００ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）中で２５℃で１時間実施した。所望の生成物を、逆相ＨＰＬＣによって精製し、そしてゲル電気泳動およびＭＡＬＤＩ質量分析法によって特徴付けた。

【０２６０】

（ＤＮＡテンプレート合成反応）

反応を、所望の温度（他に述べられない限り２５℃）で、５０ｍＭ　Ｎ－［３－モルホリノプロパン］スルホン酸（ＭＯＰＳ）（ｐＨ７．５）および２５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む緩衝液中で、等モル量の試薬（移動単位）およびテンプレートを混合することによって開始した。試薬およびテンプレートの濃度は、他に示されない限り６０ｎＭであった。種々の時点で、アリコートを取り出し、過剰のβ－メルカプトエタノールでクエンチし、そして変性ＰＡＧＥによって分析した。反応生成物を、これらの固有の蛍光を用いるデンシトメトリーによってか、染色後のデンシトメトリーによって定量化した。代表的な生成物をまた、ＭＡＬＤＩ質量分析法によって確認した。

【０２６１】

（アビジン結合についてのインビトロでの選択）

ライブラリ翻訳反応の生成物（図２１Ａ～図２１Ｂ）を、エタノール沈澱によって単離し、そして結合緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８）、１Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）中に溶解した。生成物を、３０μｇのストレプトアビジン連結磁気ビーズ（Ｒｏｃｈｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）とともに１００μＬの全容積で室温で１０分間インキュベートした。ビーズを、結合緩衝液で１６回洗浄し、そして７０℃で１０分間１００μＬの結合緩衝液中の１μｍｏｌの遊離ビオチンでの処理によっ

て溶出した。溶出した分子を、エタノール沈澱によって単離し、そしてプライマー５’－ＴＧＧＴＧＣＧＧＡＧＣＣＧＣＣＧ（配列番号３５）およびプライマー５’－ＣＣＡＣＴＧＴＣＣＧＴＧＧＣＧＣＧＡＣＣＣＣＧＧＣＴＣＣＴＣＧＧＣＴＣＧＧ（配列番号３６）を用いて、標準的なＰＣＲプロトコル（２ｍＭ　$MgCl_2$、５５℃のアニーリング、２０サイクル）によって増幅した。自動ＤＮＡ配列決定は、プライマー５’－ＣＣＡＣＴＧＴＣＣＧＴＧＧＣＧＣＧＡＣＣＣ（配列番号３７）を使用した。

【０２６２】

（ＤＮＡ配列決定）

図において提供されていない配列は、以下の通りである：図１６　ＳＩＡＢ反応およびＳＢＡＰ反応においてマッチした試薬：５’－ＣＣＣＧＡＧＴＣＧＡＡＧＴＣＧＴＡＣＣ－ＳＨ（配列番号３８）；図１６　ＳＩＡＢ反応およびＳＢＡＰ反応においてミスマッチな試薬：５’－ＧＧＧＣＴＣＡＧＣＴＴＣＣＣＣＡＴＡＡ－ＳＨ（配列番号３９）；図１６、および図１７Ａ～図１７Ｂにおける他の反応についてのミスマッチな試薬；５’－ＦＡＡＡＴＣＴＴＣＣＣ－ＳＨ（Ｆ＝テトラクロロフルオレセイン）（配列番号４０）；１つのミスマッチを含む図１６における試薬：５’－ＦＡＡＴＴＣＴＴＡＣＣ－ＳＨ（配列番号４１）；図１５、図１６、ＳＭＣＣ反応、ＧＭＢＳ反応、ＢＭＰＳ反応、およびＳＶＳＢ反応、ならびに図１７Ａ～図１７Ｂ：におけるＥテンプレート：５’－（NH_2ｄＴ）－ＣＧＣＧＡＧＣＧＴＡＣＧＣＴＣＧＣＧＡＴＧＧＴＡＣＧＡＡＴＴＣＧＡＣＴＣＧＧＧＡＡＴＡＣＣＡＣＣＴＴＣＧＡＣＴＣＧＡＧＧ（配列番号４２）；図１６、ＳＩＡＢ反応、ＳＢＡＰ反応、およびＳＩＡ反応におけるＨテンプレート：５’－（NH_2ｄＴ）－ＣＧＣＧＡＧＣＧＴＡＣＧＣＴＣＧＣＧＡＴＧＧＴＡＣＧＡＡＴＴＣ（配列番号４３）；図１９におけるクランプオリゴヌクレオチド：５’－ＡＴＴＣＧＴＡＣＣＡ（配列番号４４）。

【０２６３】

（実施例２：ＤＮＡテンプレート合成における使用のための例示的な反応）

この実施例は、ＤＮＡテンプレート合成が、反応基のＤＮＡに類似する構造に対する正確な配列を必要とすることなく、化学反応の適度な収集に関連し得ることを示す。さらに、この実施例はまた、１０００を越えるテンプレートのライブラリーを、対応するチオエステル生成物へと、同時にワンポットで同時に変換させ、これらの一つを、ストレプトアビジンへの結合についてインビトロでの選択によって富化し、そしてＰＣＲによって増幅することが可能であることを示す。

【０２６４】

本明細書中で詳細に記載されるように、種々の化学反応（例えば、ピリミジン光二量体化以外のＤＮＡテンプレート有機金属カップリング反応および炭素－炭素結合形成反応）が、低分子を構築するために、使用され得る。これらの反応は、多様なセットの構造のＤＮＡテンプレート構築物を可能にすることによって、非天然の合成分子のインビトロでの発展に向けて、重要な工程を示している。

【０２６５】

主要な反応物に加えて、非ＤＮＡ連結の活性化剤、触媒または他の試薬を必要とする反応に関するＤＮＡテンプレート合成の能力もまた、本明細書中において示されている。ＤＮＡテンプレート骨格の構造的模倣を必要とせずに、このような反応を媒介するＤＮＡテンプレート合成の能力を試験するために、アミン連結テンプレート（１）とベンズアルデヒド連結試薬またはグリオキサール連結試薬（３）との間のＤＮＡテンプレート還元的アミノ化を、ミリモル濃度のシアノホウ化水素ナトリウム（$NaBH_3CN$）と共に室温にて水溶液中で実施し得る（図２３Ａを参照のこと）。重要なことに、テンプレート配列および試薬配列が相補的であった場合、生成物が効率的に形成したが、試薬の配列がテンプレートの配列と相補的でなかった場合のコントロール反応、または$NaBH_3CN$を除外した場合のコントロール反応は、有意な生成物を与えなかった（図２３Ａ～図２３Ｄおよび図２４を参照のこと）。二本鎖ＤＮＡの構造をしっかりと模倣する生成物を生成するためのＤＮＡテンプレート還元的アミノ化は、すでに報告されている（例えば、Ｌｉら、（

２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．、１２４、７４６およびＧａｔら、（１９９８）ＢＩＯＰＯＬＹＭＥＲＳ、４８，１９を参照のこと）が、上記の結果は、ホスホリボース骨格に無関係の構造を生成するための還元的アミノ化が、効率的かつ配列特異的に起こり得ることを示している。

【０２６６】

図２５Ａ～図２５Ｂを参照すると、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシルスルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）によって媒介される、アミン連結テンプレート４および５とカルボキシレート連結試薬６～９との間のＤＮＡテンプレートアミド結合形成は、ｐＨ６．０、２５℃で良好な収率でアミド生成物を生成する。生成物の形成は、（ｉ）配列特異的であり、（ｉｉ）ＥＤＣの存在に依存し、そして（ｉｉｉ）アミンまたはカルボキシレートの立体障害に対して非感受性であった。効率的なＤＮＡテンプレートアミド形成はまた、ＥＤＣおよびスルホ－ＮＨＳの代わりに、水溶性活性化剤４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド（ＤＭＴ－ＭＭ）によって媒介された（図２４および図２５Ａ～図２５Ｂ）。多数の市販のキラルのアミンおよびカルボン酸とともに、これらの条件下でのＤＮＡをテンプレートとするアミド結合形成の効率および一般性は、この反応を構造的に多種多様な低分子ライブラリーの今後のＤＮＡテンプレート合成における魅力的な候補にする。

【０２６７】

炭素－炭素結合形成反応はまた、化学合成および生物学的合成の両方で重要であり、従っていくつかのこのような反応が核酸テンプレートフォーマットで利用され得る。ニトロアルカン連結試薬（１０）とアルデヒド連結テンプレート（１１）との反応（ニトロ－アルドール反応またはＨｅｎｒｙ反応）およびマレイミド連結テンプレート（１２）への１０の共役付加（ニトロ－Ｍｉｃｈａｅｌ付加）の両方は、ｐＨ７．５～８．５、２５℃で効率的かつ高い配列特異性で進行した（図２３Ａおよび図２４）。さらに、安定化リンイリド（ｐｈｏｓｐｈｏｒｕｓ　ｙｌｉｄｅ）試薬１３とアルデヒド連結テンプレート１４または１１との間の配列特異的ＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇ反応は、ｐＨ６．０～８．０、２５℃にて優れた収率で、対応するオレフィン生成物を与えた（図２３Ｂおよび図２４）。同様に、ニトロン連結試薬１５および１６とオレフィン連結テンプレート１２、１７または１８との間のＤＮＡテンプレート１，３－二極性付加環化もまた、ｐＨ７．５、２５℃で配列特異的に生成物を与えた（図２３Ｂ、図２３Ｃおよび図２４）。

【０２６８】

上記される反応に加えて、有機金属カップリング反応もまた、本発明において利用され得る。例えば、ＤＮＡテンプレートＨｅｃｋ反応を、水溶性Ｐｄプレ触媒の存在下で実施した。マレイミド１２、アクリルアミド１７、ビニルスルホン１８またはシナムアミド（ｃｉｎｎａｍａｍｉｄｅ）２０を含む１７０ｍＭ Na_2PdCl_4、ヨウ化アリール連結試薬１９および種々のオレフィン連結テンプレートの存在下では、ｐＨ５．０、２５℃で適度な収率のＨｅｃｋカップリング生成物を与えた（図２３Ｄおよび図２４）。オレフィン１７、１８および２０を用いるカップリングについて、テンプレートおよび試薬の添加に先立って、１当量のＰｄあたり２当量の$P(p-SO_3C_6H_4)_3$を添加すると、代表的には、２倍まで全収率が増加した。配列ミスマッチを含むコントロール反応またはＰｄプレ触媒を欠いているコントロール反応は、生成物を与えなかった。

【０２６９】

上記実施例１は、特定のＤＮＡテンプレート反応が、距離非依存性を示すことを示す。距離非依存性は、ＤＮＡテンプレート反応における結合形成の速度がテンプレート－試薬のアニーリングの速度より大きい場合に生じ得る。化学的性質の部分集合のみがこのカテゴリーに分類されるが、試薬がテンプレートの反応性端から種々の距離でアニールされる場合、比較できる生成物収率をもたらす任意のＤＮＡテンプレート反応は、特定の関心事である。なぜなら、ＤＮＡテンプレート反応は、種々のテンプレートの位置でコードされ得るからである。反応物が、コードしているライブラリーに対する距離によって分離され

る場合、効率的に生じる、この実施例における、開発されたＤＮＡテンプレート反応の能力を評価するために、還元的アミノ化、アミド形成、ニトロ－アルドール付加、ニトロ－Ｍｉｃｈａｅｌ付加、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化、二極性付加環化、およびＨｅｃｋカップリング反応の収率を、０塩基（ｎ＝０）または１０塩基（ｎ＝１０）がアニールされた反応性基を分離した場合（図２６Ａ）に比較した。本明細書中で記載される反応または実施例１中の反応のうちで、マレイミドに対するアミド結合形成、ニトロ－アルドール付加、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化、Ｈｅｃｋカップリング、チオールのマレイミドへの共役付加、およびチオールとα－ヨードアミドとの間のS_N2反応は、反応性基が０塩基または１０塩基で分離される場合に、比較可能な生成物形成を示す（図２６Ｂ）。図２６Ｂは、アニールした反応物質を分離する０塩基（レーン１～３）または１０塩基（レーン４～６）のどちらかで、相補的な１１と１３との間のＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇオレフィン化の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す。ｎ＝０およびｎ＝１０の反応に対する見かけの２乗の速度定数は、３倍異なる（ｋａｐｐ（ｎ＝０）＝９．９×10^3 $M^{-1}s^{-1}$に対して、ｋａｐｐ（ｎ＝１０）＝３．５×10^3 $M^{-1}s^{-1}$）が、両方の距離で、１３時間後に、生じる生成物は、ほぼ定量的である。配列のミスマッチを含むコントロール反応は、検出可能な生成物を産生しない。これらの発見は、これらの反応物が、生成物の形成を顕著に損なうことなく、テンプレートの反応性末端から離れたヌクレオチドによって、合成の間に、コードされ得ることを示唆する。

【０２７０】

直接上記されるＤＮＡテンプレートS_N2反応、共役付加反応、ビニルスルホン付加反応、アミド結合形成反応、還元的アミノ化反応、ニトロ－アルドール反応（Ｈｅｎｒｙ反応）、ニトロＭｉｃｈａｅｌ反応、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化反応、１，３－二極性付加環化反応およびＨｅｃｋカップリング反応に加えて、種々のさらなる試薬もまた、本発明の方法において利用され得る。例えば、図２７に示されるように、有力な水性ＤＮＡテンプレート合成反応としては、限定することなく、Ｌｅｗｉｓ酸触媒化アルドール付加反応、Ｍａｎｎｉｃｈ反応、Ｒｏｂｉｎｓｏｎ環化（ａｎｎｕｌａｔｉｏｎ）反応、ケトンおよびアルデヒドへのアリルインジウム、亜鉛および錫の付加反応、Ｐｄ補助アリル置換反応、Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ付加環化反応、ならびにヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応が挙げられ、これらは、水性溶媒中で効率的に利用され得、そして重要な複雑なビルディング反応である。

【０２７１】

まとめると、これらの結果は、ＤＮＡテンプレート合成の反応範囲をかなり拡張する。多種多様な反応は、対応する反応物が相補的な配列とともにプログラムされる場合にのみ、効率的かつ選択的に進行し得る。公知のＤＮＡテンプレート反応のレパートリーを増強することによって、これまでに報告されているアミド結合形成反応（Ｓｃｈｍｉｄｔら、（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５；４７９２；Ｂｒｕｉｃｋら、（１９９６）Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，３，４９を参照のこと）、イミン形成反応（Ｃｚｌａｐｉｎｓｋｉら、（２００１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１２３、８６１８）、還元的アミノ化反応（Ｌｉら、（２００２）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１２４、７４６；Ｇａｔら、（１９８８）Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ、４８：１９）、S_N2反応（Ｇａｒｔｎｅｒら、（２００１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１２３；６９６１；Ｘｕら、（２００１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、１９：１４８；Ｈｅｒｒｌｅｉｎら、（１９９５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１１７：１０１５１）、チオールの共役付加（Ｇａｒｔｎｅｒら、（２００１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１２３：６９６１）、およびホスホエステルまたはホスホンアミドの形成（Ｏｒｇｅｌら、（１９９５）Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．、２８：１０９；Ｌｕｔｈｅｒら、（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ、３９６、２４５）に加えて、炭素－炭素結合形成反応および有機金属反応（ニトロ－アルドール付加、ニトロ－Ｍｉｃｈａｅｌ付加、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化、二極性環化付加、およびＨｅｃｋカップリング）を含み、これらの結果は、ＤＮＡのライブラリを、構造的および機能的に多様な合成生成物のライブラリへと配列特異的に変換し得る。

【０２７２】
所望の分子をコードするわずかな量のテンプレートは、ＰＣＲによって増幅され得るので、ＤＮＡテンプレート反応の収率は、おそらく、従来の合成的変換の収率よりもかなり低い。それにもかかわらず、この実施例で議論した多くの反応は、効率的に進行した。
【０２７３】
（材料および方法）
官能化したテンプレートおよび試薬を、代表的には、５’－NH_2末端化オリゴヌクレオチド（テンプレート１について）、５’－NH_2－（CH_2O）$_2$末端化オリゴヌクレオチド（他の全てのテンプレートについて）または３’－OPO_3－CH_2CH（CH_2OH）（CH_2）$_4$$NH_2$末端化ヌクレオチド（全ての試薬について）を、０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．２）中の適切なＮＨＳエステル（ＤＭＦ中２０ｍｇ／ｍＬ溶液の０．１容量）と２５℃で１時間、反応させることによって調製して、図２３Ａ～図２３Ｄおよび図２５Ａ～図２５Ｂに示される構造のテンプレートおよび試薬を提供した。アミノ酸連結試薬６～９について、０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．２）中の３’－OPO_3CH_2CH（CH_2OH）（CH_2）$_4$$NH_2$末端化オリゴヌクレオチドを、ＤＭＦ中１００ｍＭビス［２－（スクシンイミジルオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（ＢＳＯＣＯＥＳ、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ、ＵＳＡ）溶液の０．１容量と２５℃で１０分間、続いて３００ｍＭ　水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）中の３００ｍＭアミノ酸の０．３容量と２５℃で３０分間反応させた。
【０２７４】
官能化したテンプレートおよび試薬を、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５を用いるゲル濾過、続いて逆相ＨＰＬＣ（０．１酢酸トリエチルアンモニウム－アセトニトリル勾配）によって精製し、そしてＭＡＬＤＩ質量分析法によって特徴付けた。
【０２７５】
図２３Ａ～図２３Ｄに記載されるＤＮＡテンプレート反応については、各テンプレートの一つの等価物と、他に特定されない限り、６０ｎＭの最終濃度での試薬との反応は、２５℃で行った。条件：（ａ）３ｍＭ　$NaBH_3CN$、０．１Ｍ　Ｎ－［２－モルホリノエタン］スルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液ｐＨ６．０、０．５Ｍ　ＮａＣＩ、１．５時間；ｂ）０．１Ｍ　Ｎ－ｔｒｉｓ［ヒドロキシメチル］メチル－３－アミノプロパンスルホン酸（ＴＡＰＳ）緩衝液ｐＨ８．５、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１２時間；ｃ）０．１Ｍ　ｐＨ８．０　ＴＡＰＳ緩衝液、１Ｍ　ＮａＣｌ、５℃、１．５時間；ｄ）５０ｍＭ　ＭＯＰＳ緩衝液ｐＨ７．５、２．８Ｍ　ＮａＣｌ、２２時間；ｅ）１２０ｎＭ　１９，１．４ｍＭ　Na_2PdCl_4、０．５Ｍ　ＮａＯＡｃ緩衝液ｐＨ５．０、１８時間；（ｆ）Na_2PdCl_4と、Ｐ（ｐ－$SO_3C_6H_4$）$_3$の２つの等価物とを、水中で１５分間予め混合し、次いで、０．５Ｍ　ＮａＯＡｃ緩衝液ｐＨ５．０、７５ｍＭ　ＮａＣｌ中の反応物質に２時間添加する（最終［Ｐｄ］＝０．３ｍＭ、［１９］＝１２０ｎＭ）。１３からの生成物のオレフィン幾何学および１４および１６からのシクロ添加生成物の領域化学（ｒｅｇｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）は、推測されるが、確認されていない（図２３Ａ～図２３Ｄ）。生成物は、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびＭＡＬＤＩ質量分析法によって、特徴付けられた。特定の条件下での全ての反応に関して、マッチしたテンプレートおよび試薬配列との反応の生成物収率は、試薬配列を混合したコントロール反応の生成物収率より２０倍高かった。
【０２７６】
図２５Ａ～図２５Ｂに記載される反応に対する条件は：６０ｎＭ　テンプレート、１２０ｎＭ　試薬、０．１Ｍ　ＭＯＰＳ緩衝液ｐＨ７．０中の５０ｍＭ　ＤＭＴ－ＭＭ、１Ｍ　ＮａＣｌ、２５℃で１６時間；または６０ｎＭ　テンプレート、１２０ｎＭ　試薬、２０ｍＭ　ＥＤＣ、１５ｍＭ　スルホ－ＮＨＳ、０．１Ｍ　ＭＥＳ緩衝液ｐＨ６．０、１Ｍ　ＮａＣｌ、２５℃で１６時間であった。図２５Ａ～図２５Ｂ中の表の各列には、試薬と配列に相補的なテンプレートとの間のＤＭＴ－ＭＭ媒介反応の産生後、ＥＤＣ反応およびスルホ－ＮＨＳ媒介反応を行なった。全ての場合、ミスマッチ試薬とのコントロール反応

は、検出可能な生成物をほとんど産生しないか、または、全く産生せず、生成物は、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびＭＡＬＤＩ質量分析によって、特徴づけられた。

【０２７７】

図２４は、図２３Ａ～図２３Ｄおよび図２５Ａ～図２５Ｂに列挙される代表的なＤＮＡテンプレート反応の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析を示す。試薬およびテンプレートの構造は、図２３Ａ～図２３Ｄおよび図２５Ａ～図２５Ｂ中の番号付けに対応する。レーン：１、３、５、７、９、１１：図２３Ａ～図２３Ｄおよび図２５Ａ～図２５Ｂに列挙される条件下でのマッチ（相補的または「Ｍ」）試薬とテンプレートとの反応（４と６との間の反応は、ＤＭＴ－ＭＭによって媒介される）。レーン２、４、６、８、１０、１２：それぞれ、レーン１、３、５、７、９および１１の条件と同一の条件下でのミスマッチ（非相補的または「Ｘ」）試薬とテンプレートとの反応。

【０２７８】

オリゴヌクレオチドテンプレートの配列および試薬は、以下のとおりである（５’～３’向き、ｎは、テンプレートおよび試薬が、図２６Ａに示されるようにアニーリングされる場合の反応基間の塩基の数をいう。１：ＴＧＧＴＡＣＧＡＡＴＴＣＧＡＣＴＣＧＧＧ［配列番号４５］；２および３（マッチ）：ＧＡＧＴＣＧＡＡＴＴＣＧＴＡＣＣ［配列番号４６］；２および３（ミスマッチ）：ＧＧＧＣＴＣＡＧＣＴＴＣＣＣＣＡ［配列番号４７］；４および５：ＧＧＴＡＣＧＡＡＴＴＣＧＡＣＴＣＧＧＧＡＡＴＡＣＣＡＣＣＴＴ［配列番号４８］；６～９（マッチ）（ｎ＝１０）：ＴＣＣＣＧＡＧＴＣＧ［配列番号４９］；６（マッチ）（ｎ＝０）：ＡＡＴＴＣＧＴＡＣＣ［配列番号５０］；６～９（ミスマッチ）：ＴＣＡＣＣＴＡＧＣＡ［配列番号：５１］；１１、１２、１４、１７、１８、２０：ＧＧＴＡＣＧＡＡＴＴＣＧＡＣＴＣＧＧＧＡ［配列番号５２］；１０、１３、１６、１９（マッチ）：ＴＣＣＣＧＡＧＴＣＧＡＡＴＴＣＧＴＡＣＣ［配列番号５３］；１０、１３、１６、１９（ミスマッチ）：ＧＧＧＣＴＣＡＧＣＴＴＣＣＣＣＡＴＡＡＴ［配列番号５４］；１５（マッチ）：ＡＡＴＴＣＧＴＡＣＣ［配列番号５５］；１５（ミスマッチ）：ＴＣＧＴＡＴＴＣＣＡ［配列番号５６］；ｎ＝１０対ｎ＝０の比較に対するテンプレート：ＴＡＧＣＧＡＴＴＡＣＧＧＴＡＣＧＡＡＴＴＣＧＡＣＴＣＧＧＧＡ［配列番号５７］。

【０２７９】

反応収率は、変性ＰＡＧＥに続いて、エチジウムブロマイド染色、ＵＶ可視化、ならびに生成物のバンドおよびテンプレート出発物質のバンドの電荷結合素子（ＣＣＤ）ベースのデンシトメトリーによって定量化した。収率計算は、テンプレートおよび生成物が、１塩基あたり等しい強度で染色されることを仮定し；生成物が定量化の間に部分的に二本鎖である収率計算の場合について、染色強度の変化は、より高い見掛けの収率を生じ得る。

【０２８０】

（実施例３：ＤＮＡテンプレートによってプログラムされた多工程低分子合成）

この実施例は、ＤＮＡテンプレート化学反応による多工程の低分子合成を行なうことが可能であることを示す。

【０２８１】

ＤＮＡテンプレート合成は、ＤＮＡ骨格の構造の模倣を必要とすることなく、高配列特異性を有する広範な種々の強力な化学反応に関連し得る。しかし、有用な複雑さの合成分子に対するこのアプローチの適用は、ＤＮＡテンプレート反応の生成物が、後のＤＮＡテンプレート変換を受けることを可能にする一般的な方法の開発を必要とする。

【０２８２】

多工程のＤＮＡテンプレート低分子合成は、一般のＤＮＡテンプレート合成に関連する課題を超えた２つの大きな課題に直面している。第一に、試薬を適切なテンプレートに指向するために使用されるＤＮＡは、テンプレートに対する望ましくないハイブリダーゼーションを防ぐために、引き続くＤＮＡテンプレート合成工程の前に、ＤＮＡテンプレート反応の生成物から除去されなければならない。第２に、多工程合成は多くの場合、中間生成物の精製および単離を必要とする。これらの課題に取り組むために、（ｉ）ここで解読

するＤＮＡオリゴヌクレオチドと化学試薬（反応単位）を連結すること、（ｉｉ）任意のＤＮＡテンプレート合成工程後に、生成物を精製することについて、３つの異なるストラテジーを開発した。

【０２８３】

可能な場合、ＤＮＡテンプレート合成のために理想的な試薬－オリゴヌクレオチドのリンカーは、その試薬の脱離基としてオリゴヌクレオチドを位置付ける。この「自動切断」リンカーのストラテジーの下で、オリゴヌクレオチド－試薬の結合は、反応の自然な化学的結果として切断される（図２８Ａを参照のこと）。

【０２８４】

ＤＮＡテンプレート化学反応に適用されるこのアプローチの第１の例としては、ダンシル化したＷｉｔｔｉｇのホスホラン試薬（１）を合成し、ここで、解読するＤＮＡオリゴヌクレオチドをアリールホスフィン基の１つに接着させた（Ｈｕｇｈｅｓ（１９９６）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３７、７５９５）。アルデヒド連結されたテンプレート２を用いる、ＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇのオレフィン化は、試薬からテンプレートへの、蛍光性のダンシル基の効率的な転移を生じ、オレフィン３を提供した（図２８Ａ）。自動切断リンカーの第２の例としては、ＤＮＡに連結されたチオエステル４が、ｐＨ７．０においてＡｇ（Ｉ）で活性化される（Ｚｈａｎｇら（１９９９）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１２１、３３１１）場合に、アミノ末端のテンプレート５をアシル化し、アミド生成物６を生じた（図２８Ｂ）。

【０２８５】

リボソーム性タンパク質生合成は、ＲＮＡテンプレートペプチド結合形成を媒介する同様の自動切断リンカーの様式でアミノアシル化ｔＲＮＡを使用する。自動切断リンカーを使用するＤＮＡテンプレート反応後に、未反応の試薬から、そして切断したオリゴヌクレオチドから離れた所望の生成物を精製するために、ビオチン化した試薬オリゴヌクレオチド、およびストレプトアビジン連結した磁気ビーズを用いて粗反応物を洗浄する工程を利用した（図３０Ａを参照のこと）。このアプローチは未反応のテンプレートから反応したテンプレートを分離しないが、未反応のテンプレートを、その後のＤＮＡテンプレート反応および精製工程において取り除き得る。

【０２８６】

１つより多くの官能基を有する試薬を、解読されるＤＮＡオリゴヌクレオチドに第２リンカーストラテジーおよび第３リンカーストラテジーを介して連結し得る。「スカーレス（ｓｃａｒｌｅｓｓ）リンカー」のアプローチ（図２８Ｃ）において、上記試薬の１つの官能基を、ＤＮＡテンプレート結合形成の間に保持して、一方では第２の官能基を使用して、さらなる所望されない化学的官能基を導入せずに、切断され得るリンカーを取り付ける。ＤＮＡテンプレート反応に続いて、第２の官能基を介して取り付けられたリンカーの切断が起こり、所望の生成物を提供する（図２８Ｃ）。例えば、（Ｄ）－Ｐｈｅ誘導体７のような一連のアミノアシル化試薬を合成した。ここで、α－アミンが、その解読するオリゴヌクレオチドに、カルバモイルエチルスルホンリンカーを介して接続される（Ｚａｒｌｉｎｇら（１９８０）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１２４，９１３）。この試薬およびアミン末端化テンプレート（５）を使用するＤＮＡテンプレートアミド結合の形成の生成物（８）を、水性塩基で処理して、そのリンカーの定量的排除および自発性脱カルボキシル化をもたらし、上手く転移されるアミノ酸基を含む生成物９を提供する（図２８Ｃ）。このスルホンリンカーは、ｐＨ７．５以下の緩衝液中で、２５℃で２４時間より長く安定であるが、ｐＨ１１．８の緩衝液に３７℃で２時間曝露された場合には定量的切断を受ける。

【０２８７】

いくつかの場合において、リンカー切断の結果として１つ以上の原子の新たな化学基を導入することが有利であり得る。第３リンカーストラテジーの下で、リンカーの切断は、その後の段階において官能化され得る「有用なスカー（ｓｃａｒ）」を生成する（図２８Ｃ）。この種類のリンカーの例として、解読するＤＮＡオリゴヌクレオチドに１，２－ジ

オールを介して連結された、（Ｌ）－Ｐｈｅ誘導体１０のようなアミノ酸試薬を生成した（Ｆｒｕｃｈａｒｔら（１９９９）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．，４０，６２２５）。アミン末端化テンプレート（５）とのＤＮＡテンプレートアミド結合の形成の後、このリンカーを、ｐＨ５．０の５０ｍＭ過ヨウ化ナトリウム（$NaIO_4$）水溶液を用いる酸化によって定量的に切断して、その後の官能化のために（例えば、ＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇオレフィン化、還元的アミノ化またはニトロアルドール付加において）適切な、アルデヒド基を含む生成物１２を提供する。

【０２８８】

図２９は、自己切断リンカー、スカーレスリンカーまたは有用なスカーリンカーを使用する、例示的なＤＮＡテンプレート合成実験の結果を示す。示される反応を、変性ＰＡＧＥにより分析した。レーン１～３を、ＤＮＡ染色を用いずにＵＶ光を使用して可視化した。レーン４～１０を、エチジウムブロマイドでの染色後のＵＶ透過照明によって可視化した。１～３についての条件は、以下の通りであった：各々１当量の試薬およびテンプレート、０．１Ｍ　ＴＡＰＳ緩衝液（ｐＨ８．５）、１Ｍ　ＮａＣｌ、２５℃にて１．５時間。４～６について条件は、以下の通りであった：３当量の４、０．１Ｍ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ７．０）、１Ｍ亜硝酸ナトリウム（$NaNO_2$）、１０ｍＭ硝酸銀（$AgNO_3$）、３７℃で８時間。８～９についての条件は、以下の通りであった：０．１Ｍ　３－（シクロヘキシルアミノ）－１－プロパンスルホン酸（ＣＡＰＳ）緩衝液（ｐＨ１１．８）；６０ｍＭ　β－メルカプトエタノール（ＢＭＥ）、３７℃で２時間。最後に、１１～１２についての条件は、以下の通りであった：５０ｍＭ水性$NaIO_4$、２５℃にて２時間。R_1＝ＮＨ（CH_2）$_2$ＮＨ－ダンシル；R_2＝ビオチン。

【０２８９】

スカーレスリンカーまたは有用なスカーリンカーを使用するＤＮＡテンプレート反応から生成される所望される生成物を、ビオチン化試薬オリゴヌクレオチドを使用して、容易に精製し得る（図３０Ｂ）。所望の生成物と一緒になった試薬オリゴヌクレオチドを、まず、ストレプトアビジンを連結した磁気ビーズ上に捕捉する。塩基対形成によって試薬に結合したテンプレートの未反応のものをすべて、４Ｍの塩化グアニジニウムを含む緩衝液でビーズを洗浄することによって、取り除く。ビオチン化分子は、これらの条件下ではストレプトアビジンビーズに結合したままである。次いで、反応した試薬および未反応の試薬がビーズに結合したままで、リンカー切断緩衝液（上記の実施例においては、ｐＨ１１の緩衝液または過ヨウ化ナトリウム（$NaIO_4$）含有緩衝液のいずれか）を用いてビーズを溶出することによって、所望の生成物を純粋な形態で単離する。

【０２９０】

上記のようにして生成する特異的ライブラリーの一例として、ＤＮＡテンプレートアミド形成、スカーレス（ｔｒａｃｅｌｅｓｓ）リンカー切断、およびストレプトアビジン結合ビーズを用いる精製という３つの反復サイクルを使用して、非天然トリペプチドを生成した（図３１Ａ～Ｂ）。各アミノ酸試薬を、上記のスルホンリンカーを介して、独特のビオチン化１０塩基ＤＮＡオリゴヌクレオチドに結合した。上記トリペプチド合成を指向するようにプログラムされた３０塩基のアミン末端化テンプレートは、上記３種の試薬と相補的である連続１０塩基領域を３つ含んだ。これは、多工程ＤＮＡテンプレート低分子ライブラリー合成において使用されるストラテジーを模倣した。

【０２９１】

第１工程において、２当量の１３を、２０ｍＭ　ＥＤＣ、１５ｍＭ　スルホ－ＮＨＳ、０．１Ｍ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．５）および１Ｍ　ＮａＣｌを用いて２５℃にて１０分間処理することによって、活性化した。その後、このテンプレートを、０．１Ｍ　ＭＯＰＳ（ｐＨ７．５）および１Ｍ　ＮａＣｌ（２５℃）中に添加し、１時間反応させた。その後、１４中の遊離アミン基を、第２回および第３回のＤＮＡテンプレートアミド形成およびリンカー切断において、以下の条件を使用してジペプチド１５およびトリペプチド１６を生成した：２当量の試薬、５０ｍＭ　ＤＭＴ－ＭＭ、０．１Ｍ　ＭＯＰＳ緩衝液（ｐＨ７．０）、１Ｍ　ＮａＣｌ、２５℃にて６時間。各工程の後の望ましい生成物を、アビジ

ン結合ビーズ上で捕捉し、０．１Ｍ　ＣＡＰＳ緩衝液（ｐＨ１１．８）、６０ｍＭ　ＢＭＥ（３７℃で２時間）で溶出することによって、精製した。各反応および精製の進行の後に、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった（図３１Ｂ、下）。レーン３、６および９は、混ざった（ｓｃｒａｍｂｌｅｄ）オリゴヌクレオチド配列を含む試薬を使用する、コントロール反応を示す。

【０２９２】

各反応、精製、およびスルホンリンカー切断工程の進行の後に、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。テンプレート１６に結合した最終トリペプチドを、制限エンドヌクレアーゼＥｃｏＲＩで消化し、上記トリペプチドを含む消化フラグメントを、ＭＡＬＤＩ質量分析法により特徴付けた。２ｎｍｏｌ（約２０μｇ）の出発材料で開始して、10^6回より多くのインビトロ選択およびＰＣＲ反応のためのテンプレートとして役立つために十分なトリペプチド生成物を、生成した（Ｋｒａｍｅｒら（１９９９）ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬ．ＢＩＯＬ．３：１５．１）（１／１０，０００分子生存選択を仮定する）。出発材料テンプレートを酢酸無水物でキャップした場合、または相補的試薬の代わりに配列ミスマッチを含むコントロール試薬を使用した場合には、有意な生成物は生成されなかった（図３１Ｂ）。

【０２９３】

上記で開発した３つのリンカーストラテジーすべてを使用する非ペプチド性多工程ＤＮＡテンプレート低分子合成もまた、実施した（図３２Ａ～３２Ｂ）。アミン末端化３０塩基テンプレートを、ジオールリンカーを含むアミノアシルドナー試薬（１７）と、ビオチン化１０塩基オリゴヌクレオチドとを使用するＤＮＡテンプレートアミド結合形成に供して、アミド１８を得た（２０ｍＭ　ＥＤＣ、１５ｍＭスルホ－ＮＨＳ、０．１Ｍ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．５）、１Ｍ　ＮａＣｌ中で２当量の１７、１０分間、２５℃、その後、０．１Ｍ　ＭＯＰＳ（ｐＨ７．５）、１Ｍ　ＮａＣｌ中のテンプレートに１６℃にて８時間添加した）。その後、所望の生成物を、ストレプトアビジンビーズ上で粗反応物を捕捉した後に$NaIO_4$でリンカーを除去してアルデヒド１９を生成することによって、単離した。１９とビオチン化自己切断リン酸試薬２０とのＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇ反応により、フマルアミド２１を得た（３当量の２０、０．１Ｍ　ＴＡＰＳ（ｐＨ９．０）、３Ｍ　ＮａＣｌ（２５℃にて４８時間）。第２ＤＮＡテンプレート反応からの生成物を、ストレプトアビジンビーズを洗浄して反応試薬および未反応試薬を除去することによって、部分精製した。第３ＤＮＡテンプレート段階において、フマルアミド２１を、ＤＮＡテンプレート結合体付加（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２３：６９６１）に供した。この付加には、上記スルホンリンカーを介してビオチン化オリゴヌクレオチドに結合したチオール試薬２２を使用した（３当量の２２、０．１Ｍ　ＴＡＰＳ（ｐＨ８．５）、１Ｍ　ＮａＣｌ、２５℃にて２１時間）。望ましい結合体付加生成物（２３）を、ストレプトアビジンビーズを用いる固定化により精製した。ｐＨ１１緩衝液を用いるリンカー切断によって、最終生成物を３つの結合形成反応、２つのリンカー切断工程、および３つの精製について５～１０％の単離収率で得た（図３２Ａ～３２Ｂ）。最終生成物を、ＥｃｏＲＩで消化し、上記低分子結合テンプレートフラグメントの質量を、ＭＡＬＤＩ質量分析法により確認した（正確な質量：２５６８、実測質量：２５６６±５）。上記のトリペプチドの例においてと同様に、この多工程合成の間に使用した上記の３つの試薬の各々は、上記ＤＮＡテンプレート上の独特の位置にてアニールし、配列ミスマッチを含むコントロール反応は、生成物を生じなかった（図３２Ｂ、下）。図３２Ｂにおいて、下のレーン３、６および９は、コントロール反応を示す。予期したとおり、Ｗｉｔｔｉｇ試薬を省略したコントロール反応（工程２）もまた、第３工程の後に生成物を生じなかった。

【０２９４】

まとめると、化合物１６および２４のＤＮＡテンプレート合成は、ＤＮＡが、構造上核酸と無関係のオリゴマー低分子および非オリゴマー低分子の両方の配列プログラムした多工程合成を指向する能力を示す。

【０２９５】
（実施例４：有機溶媒中の例示的な反応）
本明細書中に示されるように、種々のＤＮＡテンプレート反応が、水性媒体中で生じ得る。ＤＮＡテンプレート反応が、有機溶媒中で生じ得、従って、ＤＮＡテンプレート合成の範囲を大いに拡大することもまた、発見されてきた。具体的には、ＤＮＡテンプレートおよびＤＮＡ試薬は、長鎖テトラアルキルアンモニウムカチオンと複合体を形成して（Ｊｏｓｔら（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７，２１４３；Ｍｅｌ’ｎｉｋｏｖら（１９９９）Ｌａｎｇｍｕｉｒ，１５，１９２３－１９２８を参照のこと）、CH_2Cl_2、$CHCl_3$、ＤＭＦおよびメタノールを含む無水有機溶媒中の反応成分の定量的解離が可能になる。驚いたことに、ＤＮＡテンプレート合成が、実は、高い配列選択性を有する無水有機溶媒において生じ得ることが、見出された。
【０２９６】
図３３は、上記試薬およびテンプレートを、別個容器中でジメチルジドデシルアンモニウムカチオンと複合体化するか、または水中にてプレアニールし、凍結乾燥させ、CH_2Cl_2中に溶解し、そして一緒に混合するかのいずれかである、ＤＮＡテンプレートアミド結合形成反応を示す。マッチした反応（しかし、ミスマッチ反応は、そうではない）は、反応物が水溶液中でプレアニールした場合、およびそれらを最初にCH_2Cl_2中にて混合した場合の両方において、生成物を提供した（図３３）。ＤＮＡテンプレートアミド形成および無水ＤＭＦにおけるＰｄ媒介性Ｈｅｃｋカップリングもまた、配列特異的に進行した。
【０２９７】
有機溶媒中での配列特異的ＤＮＡテンプレート合成のこれらの知見は、有機媒体中のテトラアルキルアンモニウム複合体化ＤＮＡ中の少なくともいくつかの二次構造の存在を意味し、ＤＮＡレセプターおよびＤＮＡ触媒を、有機溶媒中での立体選択的結合特性または立体選択的触媒特性の方へ進化させることを可能にするはずである。具体的には、共役付加、付加環化、置換反応、およびＰｄ媒介性カップリングを含む、水性媒体中で生じることが公知であるＤＮＡテンプレート反応は、有機溶媒中でもまた実施され得る。
【０２９８】
水中で実施することが非効率または不可能な有機溶媒中の反応が使用され得ることが、企図される。例えば、水中でのＲｕ触媒オレフィン置換が、報告されている（Ｌｙｎｎら（１９９８）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２０，１６２７－１６２８；Ｌｙｎｎら（２０００）、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２２，６６０１－６６０９；Ｍｏｈｒら（１９９６）Ｏｒｇａｎｏｍｅｔａｌｌｉｃｓ １５，４３１７－４３２５）一方で、水性転移系は、官能基の同一性に対して極端に感受性である。しかし、有機溶媒におけるＲｕ触媒オレフィン転移の官能基許容性は、有意により強靭である。有機溶媒中で使用するためのいくつかの例示的な反応としては、基底状態の出発物質よりも極性が弱い遷移状態を通って進行し得る、ニトロンとオレフィンとの間の１，３－二極性環状付加が挙げられるがこれに限定されない。
【０２９９】
（実施例５：核酸テンプレート合成のための新規な構造）
本実施例は、核酸テンプレート合成の範囲をさらに拡大する２つの異なるテンプレート構造を開示する。
【０３００】
核酸テンプレート化学反応の間に、テンプレートの一部が、オリゴヌクレオチド結合試薬の相補的配列にアニールし、そのテンプレートおよび移動単位上に、反応的に近接して、官能基を保持する。テンプレート構造は、生じる反応の性質に対して顕著な効果を有し得、種々の二次構造を有するテンプレート－試薬複合体をランダムに設計することによって、反応条件を操作する可能性を生じる。
【０３０１】
ヘリックス末端（「Ｅ」）テンプレートおよびヘアピン（「Ｈ」）テンプレートを使用

するＤＮＡテンプレート合成の経過の間（実施例１参照）、２つの課題が出現した。第１に、いくつかのＤＮＡテンプレート反応は、テンプレートおよび移動単位（試薬）上のアニールした反応基がごく少数の塩基により隔てられている場合には、効率的には進行しない。上記Ｅ構造またはＨ構造を使用して、「距離依存性」反応は、上記テンプレートの反応性末端にあるテンプレート塩基によってコードされるに過ぎない。第２に、アニールする反応基の間の二本鎖ＤＮＡの存在は、テンプレート反応の効率を大いに減少し得る。なぜなら、特定の環境下では、一本鎖テンプレートは、可撓性である必要があるからである。これは、テンプレートオリゴヌクレオチドは、複数の反応をコードするために十分な塩基を含み得るけれども、上記Ｅ構造またはＨ構造を使用する単一ＤＮＡテンプレート段階において２つ以上の反応を実施する可能性を排除し得る。本実施例は、２つのテンプレート構造を考察する。これらは、これらの課題各々を克服する。

【０３０２】

特定のＤＮＡテンプレート反応（例えば、１，３－二極性付加環化および還元性アミノ化）の距離依存性は、そのテンプレートの２つの個別かつ空間的に分離している領域に試薬がアニールすることを可能にする新規な構造を設計することによって、克服され得ると、仮定した。「オメガ」または「Ω」構造（図７参照）において、そのテンプレートオリゴヌクレオチドは、遠位コード領域に加えて、例えば、そのテンプレートの反応性５’末端に、少数の定常塩基を含む。このΩ構造のための移動単位のオリゴヌクレオチドは、そのテンプレートの定常領域と相補する塩基を、その反応性３’末端に含み、その後に、そのテンプレートの任意の場所でコード領域と相補する塩基を含む。上記定常領域は、相補的コード領域の非存在下でアニールするには不十分な長さであるように設計される。このテンプレートのコード領域と移動単位とが、相補的でありかつアニールする場合、その定常領域の増加した有効モル濃度は、それらのアニーリングを含む。定常領域のアニーリングは、他の二本鎖テンプレート－試薬複合体において突出物（Ωに似ている）を形成し、基をそのテンプレートおよび試薬の末端に、反応的に近くに配置する。この設計により、距離依存性ＤＮＡテンプレート反応が、そのテンプレートの反応性末端から遠位にある塩基によりコードされることが可能になる。

【０３０３】

Ω構造を使用するＤＮＡテンプレート合成の効率を、標準的Ｅ構造およびＨ構造の効率と比較した。研究したΩ構造は、（ｉ）テンプレートの５’末端に３～５個の定常塩基を含み、その後に、（ｉｉ）５～１７塩基のループ、および（ｉｉｉ）１０塩基コード領域を含む。比較の基礎として、４つの異なる種類のＤＮＡテンプレート反応を実施した。これらは、集合的に、今日までに観察された距離依存性に範囲に及ぶ。

【０３０４】

アミンアシル化反応は、アミン基とカルボン酸基とがかなりの距離（例えば、３０塩基）により隔てられている場合でさえ効率的に進行する、距離非依存性反応を示す。予期したとおり、アミンアシル化（２０ｍＭ　ＤＭＴ－ＭＭ（ｐＨ７．０）、３０℃で１２時間）は、試薬およびテンプレート上の反応基の間の距離が小さい構造および大きい構造の両方のすべてにおいて、効率的に（４６～９６％収率）進行した（図３４、レーン１～５；および図３５Ａ）。このΩ構造は、テンプレートおよび試薬の反応末端に３塩基、４塩基、または５定常塩基があり、アニールした反応物の間に１０塩基または２０塩基がある、効率的アミンアシル化を媒介した（ｎ＝１０または２０）。重要なことには、遠位コード領域が３つの配列ミスマッチを含むコントロール反応は、テンプレートおよび試薬の末端に相補的な３～５塩基の定常領域が存在するにも関わらず、有意な生成物を生成しなかった（代表的な例について、図３４レーン５参照）。従って、このΩ構造は、距離非依存性アミンアシル化反応の効率または配列特異性を妨害しなかった。

【０３０５】

ＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇオレフィン化反応は、アルデヒドおよびホスホランが多数のテンプレート塩基により隔てられている場合には、生成物収量は、代表的には、介在距離に関わらず１２時間以上の反応の後で優れているけれども、有意に遅い速度で進行

する。しかし、上記Ｅ構造またはＨ構造におけるたった２時間だけの反応（ｐＨ７．５、３０℃）の後、オレフィン生成物の収量は、反応物をたった１塩基だけ隔てた場合（ｎ＝１）よりも、反応物を１０塩基以上（ｎ＝１０または２０）隔てた場合により、３分の１～６分の１であった（図３４レーン６～７および図３５Ｂ）。対照的に、反応末端に４つまたは５つの定常塩基を有するΩ構造は、テンプレートのコード領域と反応末端とを１０塩基または２０塩基が隔てた場合でされ、２時間の反応の後に、効率的かつ配列特異的なＷｉｔｔｉｇ生成物形成を生じた（図３４レーン８～９および図３５Ｂ）。これらの結果は、Ω構造中のテンプレートの反応末端における定常領域および移動単位により、アルデヒド部分とホスホラン部分とが、ｎ＝１である場合のＥ構造を用いて達成される有効濃度に匹敵する有効濃度にて反応することを可能にする（図３４）。

【０３０６】

現在まで研究された多くのＤＮＡテンプレート反応のうち、１，３－二極性付加環化および還元的アミノ化反応は、最も顕著な距離依存性を示す。両方の反応は、アニールする反応基が１０塩基または２０塩基隔たっている場合に、上記Ｅ構造またはＨ構造を使用して標準的反応条件下低い効率～中程度の効率（７～４４％収率）で進行する（図３４レーン１０～１１および１４～１５、ならびに図３５Ｃ～３５Ｄ）。この距離依存性は、これらまたは他の同様に距離依存性の反応をコードし得るＤＮＡテンプレート上の位置を制限する。対照的に、１，３－二極性付加環化および還元的アミノ化の両方は、４つまたは５つの定常塩基を有するΩ構造を使用してテンプレート官能化末端から１５～２５塩基離れているテンプレート塩基によりコードされる場合に、効率的（９７％までの収率）かつ配列特異的に進行する（図３４レーン１２～１３および１６～１７、ならびに図３５Ｃ～３５Ｄ）。これらの結果は、テンプレートΩ構造により、距離依存性反応がテンプレートの反応末端から離れたＤＮＡ塩基により効率的に指向されることを可能にすることを示す。距離非依存性反応の効率を保存しつつこれらの反応の距離依存性を克服することによって、Ω構造は、一本鎖３０塩基テンプレート中の事実上任意の連続塩基部分集合が、任意の実行可能なＤＮＡテンプレート反応をコードすることを可能にし得る。興味深いことに、その反応末端にたった３つの連続塩基しか有さないΩ構造は、Ｅ構造と比較してこれらの反応の効率を一貫して改善しない（図３５Ｃ～３５Ｄ）。このことは、４また５つの定常塩基が、Ω構造において都合の良い近接効果を完全に実現するために必要とされ得ることを、示唆する。

【０３０７】

Ω構造の観察された特性の基礎となる構造的特徴を探索するために、ｎ＝１０試薬およびｎ＝２０試薬を使用するΩ－５構造およびＥ構造の熱変性を、特徴付けた。すべてのテンプレート－試薬の組み合わせについて、ただ１つの協働的融解遷移が観察された。５塩基定常領域を欠くＥ構造試薬と比較して、Ω－５試薬は、アニーリングの際に淡色性を約５０％増加したが、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）または１Ｍ　ＮａＣｌ含有５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）のいずれかにおける融解温度に有意には影響を与えなかった（図３６）。これらの結果は、コード領域が一旦アニールすると定常領域が二次構造を形成するけれども、Ω構造におけるテンプレート－試薬のアニーリングがコード領域の相互作用により支配されるモデルと一致する。従って、コード領域と定常領域との間のループを部分的に整列するエントロピーコストは、定常領域のアニーリングの際に生じる都合の良い相互作用により相殺され得る。

【０３０８】

任意の長さのＤＮＡテンプレートは、合成するのが容易であり、同じ溶液中の反応物間の望ましくない交差反応性は、非相補的反応物が分子間で反応するのを可能にするには低すぎる濃度を使用して回避され得る。ＤＮＡテンプレート合成のこれらの特徴により、１つより多くのＤＮＡテンプレート反応が、１つの溶液中の１つのテンプレートに対して生じることが可能になり、これにより、さらなるＤＮＡテンプレート段階および生成物精製に関係する努力が節約される。

【０３０９】

１工程当たり複数のＤＮＡテンプレート反応は、Ｅ構造、Ｈ構造またはΩ構造を使用して困難であり得る。なぜなら、第１反応の後にテンプレートにアニールしたままである試薬オリゴヌクレオチドは、比較的強固な二重螺旋を形成し、この二重螺旋は、テンプレートに沿ってさらに遠くに離れているアニールした第２試薬が、テンプレートの反応末端に遭遇することを防ぎ得る。これを克服するために、テンプレート上の反応基を、オリゴヌクレオチドの末端～中央から除去して、その反応基を塩基の非Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ面に結合した。この「Ｔ」構造（図７Ｇ参照）は、２つのＤＮＡテンプレート反応が１つのテンプレート上にて同じ溶液中で配列特異的に生じるのを許容するように設計した。１つのＤＮＡテンプレート反応は、第１移動単位のオリゴヌクレオチドの５’末端に試薬を結合する。もう１つのＤＮＡテンプレート反応は、第２移動単位のオリゴヌクレオチドの３’末端に試薬を結合する。

【０３１０】

ＤＮＡテンプレート反応中のＴ構造の実効性（ｖｉａｂｌｉｔｙ）を試験するために、Ｔ構造を使用するアミンアシル化、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化、１，３－二極性付加環化、および還元的アミノ反応の効率を研究した。Ｔ構造は、Ｅ構造またはＥ構造の効率以上の効率で、これらの４つの反応を配列特異的に指向した（図３７．ｎ＝１の場合に６９～１００％収率）。この４つの反応の各々についてＴ構造を使用する距離依存性について観察された程度は、上記の知見と一致した（図３７と図３５を比較する）。まとめると、これらの結果は、Ｔ構造が、配列特異的かつ効率的なＤＮＡテンプレート合成を媒介し得ることを示す。

【０３１１】

一旦、Ｔ構造が効率的なＤＮＡテンプレート合成を支持する能力が確立されると、Ｔ構造が１つの溶液中の１つのテンプレートにおいて２つのＤＮＡテンプレート反応を指向する能力を、研究した。Ｔ構造を使用する２つの異なる２反応スキームを、実施した。図３８Ａに示される第１スキームにおいて、ベンズアルデヒド結合Ｔテンプレート（１）を、ホスフィン結合試薬（２）およびα－ヨードアミド結合試薬（３）と１つの溶液（ｐＨ８．５、１Ｍ　ＮａＣｌ）と合わせた（２５℃で１時間）。このホスフィン結合オリゴヌクレオチドは、アルデヒドの５’側のテンプレートの１０塩基と相補し（ｎ＝４）、一方、ヨウ素結合オリゴヌクレオチドは、アルデヒドの３’側の１０塩基を相補した（ｎ＝０）。ホスフィンとα－ヨウドアミドとの間のＤＮＡテンプレートS_N2反応は、対応するホスホランを生成した。その後、この対応ホスホランは、ＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇ反応に関与して、１時間後に５２％の全体収率でシンナミド４を生じた（図３８Ｂレーン９～１０）。いずれかの試薬中に配列ミスマッチを含むコントロール反応は、検出可能な生成物を生じなかった。テンプレート上のアルデヒド基を欠くさらなるコントロール反応は、S_N2反応生成物のみを生じ（図３８Ｂレーン３～４）、一方、ホスフィン基またはα－ヨウドアミド基のいずれかを欠くコントロール反応は、いかなる検出可能な生成物も生じなかった（図３８Ｂレーン５～８）。

【０３１２】

図３８Ｃに示されるＴ構造により媒介される第２の２反応スキームにおいて、アミン結合Ｔテンプレート（５）を、ｎ＝－１のプロパルギルグリシン結合５’試薬（６）と、およびｎ＝１のフェニルアジド結合３’試薬’（７）と、合わせた。ｐＨ７．０の２０ｍＭＤＭＴ－ＭＭを付加してアミド形成を誘導し、その後、５００μＭ硫酸銅（ＩＩ）およびアスコルビン酸ナトリウムを添加して最近報告されたＳｈａｒｐｌｅｓｓ改変Ｈｕｉｓｇｅｎ　１，３－二極性付加環化をすると、３２％の全収率にて、１，４－二置換トリアゾイルアラニン付加物が提供された。

【０３１３】

まとめると、これらの知見は、Ｔ構造により、２つの配列特異的ＤＮＡテンプレート反応が、１つの溶液中で１つのテンプレートにおいて生じることが可能になることを示す。重要なことには、上記のＴ構造テンプレートは、１サイクルのプライマー伸長と、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼを使用する標準的ＰＣＲ増幅との両方のための効率的なテンプレー

トとして受容された。これは、ＤＮＡテンプレートの非Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ面に対する改変についての、いくつかのＤＮＡポリメラーゼの公知の許容性と一致した。標的構造を合成するために必要な別個のＤＮＡテンプレート工程の数を減少することに加えて、この構造はまた、３成分反応が、ＤＮＡテンプレート様式で実施されるべき合成ライブラリー中の構造複雑度を構築するために一般的に使用されるのを可能にし得る。

【０３１４】

要するに、Ω構造およびＴ構造が、ＤＮＡテンプレート合成の範囲を有意に広げる。距離依存性ＤＮＡテンプレート反応が、テンプレートの反応末端から遠く離れている塩基によりコードされるのを可能にすることによって、Ω構造は、２つのＤＮＡテンプレート上にいずれの位置でもコードされ得る反応の型を拡大し得る。Ｔ構造により、ＤＮＡテンプレート反応が、１工程において１つのテンプレートにおいて生じることが可能になる。

【０３１５】

（材料および方法）

（オリゴヌクレオチド合成）

他のように特定されない限り、５’官能化オリゴヌクレオチドについて、２－[２－（４－モノメトキシトリチル）アミノエトキシ]エチル－（２－シアノエチル）－Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル－ホスホロアミダイトを使用し（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡ）、そして３’官能化オリゴヌクレオチドについて、（２－ジメトキシトリチルオキシメチル－６－フルオレニルメトキシカルボニルアミノ－ヘキサン－１－スクシノイル）－長鎖アルキルアミノ－ＣＰＧを使用し（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡ）、ＤＮＡオリゴヌクレオチドを、以前に記載された通り（Ｃａｌｄｅｒｏｎｅら（２００２）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．ＥＮＧＬ．４１：４１０４（２００２）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．１１４：４２７８）に合成および官能化した。Ｔ構造についてのテンプレートの場合、アミン基を、５’－ジメトキシトリチル－５－[Ｎ－（トリフルオロアセチルアミノヘキシル）－３－アクリルイミド]－２’－デオキシウリジン－３’－[（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）]－ホスホロアミダイト（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡ）を使用し、その後、以前に報告された（Ｃａｌｄｅｒｏｎｅら（２００２）上記）通り、アシル化した。

【０３１６】

（アミンアシル化）

アミン標識ＤＮＡおよびカルボン酸標識ＤＮＡを、水性１００ｍＭ　ＭＯＰＳ緩衝液、１Ｍ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．０）（テンプレートＤＮＡ中６０ｎＭ、試薬ＤＮＡ中１２０ｍＭ）中で、２０ｍＭ　ＤＭＴ－ＭＭの存在下で合わせた。反応は、２５℃で１２時間進行した。

【０３１７】

（Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化）

アルデヒド標識ＤＮＡおよびホスホラン標識ＤＮＡを、水性１００ｍＭ　ＭＯＰＳ緩衝液、１Ｍ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．５）（テンプレートＤＮＡ中６０ｎＭ、試薬ＤＮＡ中１２０ｍＭ）中で合わせた。反応は、３０℃で２時間進行した。

【０３１８】

（１，３－二極性付加環化）

ジアルデヒド標識ＤＮＡを、室温にて１時間、２６０ｍＭ塩酸Ｎ－メチルヒドロキシルアミン中でインキュベートした（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２４：１０３０４）。その後、水性５０ｍＭ　ＭＯＰＳ、２．８Ｍ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．５）（最終塩酸Ｎ－メチルヒドロキシルアミン濃度０．７５ｍＭ、テンプレートＤＮＡ中６０ｎＭおよび試薬ＤＮＡ中９０ｎＭ）中でスクシンイミドＤＮＡと合わせた。反応は、３７℃にて１２時間進行した。

【０３１９】

（還元的アミノ化）

アミン標識ＤＮＡおよびアルデヒド標識ＤＮＡを、水性１００ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液、１Ｍ　ＮａＣｌ（ｐＨ６．０）（テンプレートＤＮＡ中６０ｎＭ、試薬ＤＮＡ中１２０ｍＭ）中で、合わせた。ナトリウムシアノボロヒドリドを、１Ｍ　ＮａＯＨ中の５Ｍストックとして、最終濃度３８ｍＭまで添加した。反応は、２５℃で２時間進行した。反応を、１５ｍＭメチルアミンの存在下でエタノール沈殿により停止した。

【０３２０】

（化合物１～４のＴ構造媒介性変換）

５’－ホスフィン結合オリゴヌクレオチド（２）を、Ｎ－スクシンイミジルヨードアセテート（ＳＩＡ）を、以下に列挙するＴ（ｎ＝－４）オリゴヌクレオチドを使用して、１２－（４－モノメトキシトリチルアミノ）ドデシル－（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）－ホスホロアミダイト由来のアミンに結合し（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡ）、その後、以前に記載された（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００２）前出）通りに４－ジフェニルホスフィノ安息香酸で処理することによって、生成した。３’－Ω－ヨードアミド結合試薬（３）を、Ｔ（ｎ＝１）オリゴヌクレオチド（以下参照）とＳＩＡとを以前に記載された（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００１）前出）のように反応させることによって調製した。アルデヒド標識テンプレート（１）、「Ｔテンプレート」オリゴヌクレオチド（以下参照）を、パラホルミル安息香酸Ｎ－ヒドロキシスクシイミジルエステルとして記載した（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００２）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．４１：１７９６（２００２）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．１１４：１８７４））通りに反応させることによって、調製した。テンプレート１を、１Ｍ　ＮａＣｌを含む水性２００ｍＭ　Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（２－エタンスルホン酸）（ＨＥＰＥＳ）緩衝液（ｐＨ８．５）中の試薬２および３と合わせた（６３ｎＭテンプレートおよび１２５ｎＭの各試薬）。反応は、２５℃にて１時間まで進行した。

【０３２１】

これらの反応の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析の結果が、図３８Ｂに示される。アルデヒド基を含む３０塩基のＴ構造テンプレート（１）が、レーン１～２およびレーン５～１０中に存在した。アルデヒド基を欠くが他は（１）と同一であるテンプレートが、レーン３および４に存在した。ＤＮＡ結合ホスフィン試薬（２）が、レーン３～６およびレーン９～１０に存在した。ＤＮＡ結合α－ヨードアミド試薬（３）が、レーン３～４およびレーン７～１０に存在した。レーン１、３、５、７および９は、３０分間後の反応を示す。レーン２、４、６、８および１０は、１時間後の反応を示す。

【０３２２】

（化合物５～８のＴ構造媒介性変換）

５’－プロパルギルグリシン結合オリゴヌクレオチド（６）を、対応するＴ（ｎ＝－１）５’－アミン結合試薬オリゴヌクレオチド（以下参照）と、９：１の２００ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．２：ＤＭＦ中の２ｍｇ／ｍＬビス（スルホスクシンイミジル）スベレートと２５℃にて１０分間合わせ、その後、３００ｍＭ　ＮａＯＨ中の３００ｍＭラセミプロパルギルグリシン０．３容量を用いて２５℃にて２時間処理することによって、生成した。３’－アジド結合オリゴヌクレオチド（７）を、Ｔ（ｎ＝１）アミン結合試薬オリゴヌクレオチド（以下参照）と、９：１の２００ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．２：ＤＭＦ中の２ｍｇ／ｍＬ　（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル）－４－アジドベンゾエートと２５℃にて２時間合わせることによって、生成した。試薬６および７を、ゲル濾過および逆相ＨＰＬＣにより精製した。テンプレート５と、試薬６および７とを、１Ｍ　ＮａＣｌおよび２０ｍＭ　ＤＭＴ－ＭＭの存在下で、水性１００ｍＭ　ＭＯＰＳ（ｐＨ７．０）中で、２５℃にて１２時間（６０ｎＭテンプレート、１２０ｎＭ試薬）合わせた。その後、硫酸銅（ＩＩ）五水和物およびアスコルビン酸ナトリウムを、各々５００μＭまで添加した。２５℃にて１時間後、反応を、エタノール沈殿により停止した。

【０３２３】

（使用したＤＮＡオリゴヌクレオチド配列）

Ｅテンプレートまたはωテンプレート：５’－H_2Ｎ－ＧＧＴ　ＡＣＧ　ＡＡＴ　ＴＣＧ　ＡＣＴ　ＣＧＧ　ＧＡＡ　ＴＡＣ　ＣＡＣ　ＣＴＴ[配列番号５８]。Ｈテンプレート：５’－H_2Ｎ－ＣＧＣ　ＧＡＧ　ＣＧＴ　ＡＣＧ　ＣＴＣ　ＧＣＧ　ＧＧＴ　ＡＣＧ　ＡＡＴ　ＴＣＧ　ＡＣＴ　ＣＧＧ　ＧＡＡ　ＴＡＣ　ＣＡＣ　ＣＴＴ[配列番号５９]。Ｔテンプレート：５’－ＧＧＴ　ＡＣＧ　ＡＡＴ　ＴＣＧ　ＡＣ（ｄＴ－NH_2）ＣＧＧ　ＧＡＡ　ＴＡＣ　ＣＡＣ　ＣＴＴ[配列番号６０]。Ｅ試薬またはＨ試薬（ｎ＝１）：５’－ＡＡＴ　ＴＣＧ　ＴＡＣ　Ｃ－NH_2[配列番号６１]。Ｅ試薬またはＨ試薬（ｎ＝１０）：５’－ＴＣＣ　ＣＣＡ　ＧＴＣ　Ｇ－NH_2[配列番号６２]。Ｅ試薬またはＨ試薬（ｎ＝２０）：５’－ＡＡＧ　ＧＴＧ　ＧＴＡ　Ｔ－NH_2[配列番号６３]。ミスマッチＥ試薬またはミスマッチＨ試薬：５’－ＴＣＣ　ＣＴＧ　ＡＴＣ　Ｇ－NH_2[配列番号６４]。Ω－３試薬（ｎ＝１０）：５’－ＴＣＣ　ＣＧＡ　ＧＴＣ　ＧＡＣ　Ｃ－NH_2[配列番号６５]。Ω－４試薬（ｎ＝１０）：５’－ＴＣＣ　ＣＧＡ　ＧＴＣ　ＧＴＡ　ＣＣ－NH_2[配列番号６６]。Ω－５試薬（ｎ＝１０）：５’－ＴＣＣ　ＣＧＡ　ＧＴＣ　ＧＧＴ　ＡＣＣ－NH_2[配列番号６７]。Ω－３試薬（ｎ＝２０）：５’－ＡＡＧ　ＧＴＧ　ＧＴＡ　ＴＡＣ　Ｃ－NH_2[配列番号６８]。Ω－４試薬（ｎ＝２０）：５’－ＡＡＧ　ＧＴＧ　ＧＴＡ　ＴＴＡ　ＣＣ－NH_2[配列番号６９]。Ω－５試薬（ｎ＝２０）：５’－ＡＡＧ　ＧＴＧ　ＧＴＡ　ＴＧＴ　ＡＣＣ－NH_2[配列番号７０]。ミスマッチΩ－３試薬：５’－ＴＣＣ　ＣＴＧ　ＡＴＣ　ＧＡＣ　Ｃ－NH_2[配列番号７１]。ミスマッチΩ－４試薬：５’－ＴＣＣ　ＣＴＧ　ＡＴＣ　ＧＴＡ　ＣＣ－NH_2[配列番号７２]。ミスマッチΩ－５試薬：５’－ＴＣＣ　ＣＴＧ　ＡＴＣ　ＧＧＴ　ＡＣＣ－NH_2[配列番号７３]。Ｔ試薬（ｎ＝１）：５’－ＧＧＴ　ＡＴＴ　ＣＣＣ　Ｇ－NH_2[配列番号７４]。Ｔ試薬（ｎ＝２）：５’－ＴＧＧ　ＴＡＴ　ＴＣＣ　Ｃ－NH_2[配列番号７５]。Ｔ試薬（ｎ＝３）：５’－ＧＴＧ　ＧＴＡ　ＴＴＣ　Ｃ－NH_2[配列番号７６]。Ｔ試薬（ｎ＝４）：５’－ＧＧＴ　ＧＧＴ　ＡＴＴ　Ｃ－NH_2[配列番号７７]。Ｔ試薬（ｎ＝５）：５’－ＡＧＧ　ＴＧＧ　ＴＡＴ　Ｔ－NH_2[配列番号７８]。Ｔ試薬（ｎ＝－１）：５’－NH_2－ＧＴＣ　ＧＡＡ　ＴＴＣ　Ｇ[配列番号７９]。２についてのＴ試薬（ｎ＝－４）：５’－[C_{12}－アミンリンカー]－ＡＡＴ　ＴＣＧ　ＴＡＣ　Ｃ[配列番号８０]。

【０３２４】

反応収量は、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびその後の生成物およびテンプレート出発物質のバンドのエチジウムブロマイド染色、ＵＶ透過照明、およびＣＣＤベースの濃度測定によって、定量した。収量計算は、テンプレートおよび生成物が変性しており、従って、１塩基について匹敵する強度で染色されたと仮定した。定量の間に生成物が部分的に二本鎖である場合について、染色強度の変化は、より大きい見かけの収量を生じ得る。代表的な反応生成物を、ＭＡＬＤＩ質量分析法および変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、特徴付けた。

【０３２５】

融解曲線を、Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３　ＵＶ－可視光分光光度計にて、Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ　８９０９０Ａ　Ｐｅｌｔｉｅｒ熱コントローラーを使用して得た。２６０ｎｍにおけるテンプレート－試薬対（各々１．５μＭ）の吸光度を、リン酸緩衝化生理食塩水（「ＰＢＳ」、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ塩化カリウム、１．４ｍＭリン酸カリウム、１０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．４））または高塩リン酸緩衝液（「ＨＳＢ」、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）、１Ｍ　ＮａＣｌ）のいずれかにおいて、２０℃から８０℃まで１℃ごとに１分間保持して測定した。

【０３２６】

（実施例６：核酸テンプレート合成における立体選択性）

本実施例は、立体選択的核酸テンプレート合成を実施することが可能であることを示す。ＤＮＡのキラル性質は、ＤＮＡテンプレート合成が、ＤＮＡ中に存在するキラル基を超えるキラル基の補助を受けることなく、立体選択的に進行し得、それにより、配列だけではなく立体化学的情報もまた、テンプレートから生成物へと移り得る。

【０３２７】
ＤＮＡテンプレート型求核置換反応の文脈において、立体選択性を試験した。（Ｓ）－または（Ｒ）－２－ブロモプロピオンアミドに直接的にそれらの５’アミノ末端で結合したヘアピン構造テンプレートは、２５℃において３’チオール連結試薬オリゴヌクレオチドを組み合わせた（図３９Ａ）（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００１）上記；Ｇａｒｔｎｅｒら（２００３）ＡＮＧＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．４２：１３７０）。ヘアピンテンプレートの正確な構造およびその相補的な試薬（図３９Ａ）は、以下であった：

【０３２８】
【化１】

テンプレート：　5'-BrCH(CH_3)CONH-TCG CGA GCG TAC GCT CGC GAG GTA CGA ATT C-3' [配列番号　81]

試薬　：　5'-GAA TTC GTA CC-(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号　82]

【０３２９】
反応条件下でのブロミドの安定性を、いくつかの独立した方法によって確認した。チオエーテル生成物形成の初期速度を、変性ゲル電気泳動によって決定し、そして生成物を、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法によってさらに特徴づけた。生成物形成の見かけの速度は、（Ｒ）－ブロミド連結テンプレートよりも、（Ｓ）－ブロミド連結テンプレートについて４．０±０．２倍高かった。テンプレート－試薬アニーリングが部分的に速度を決定し得るので、この値は、k_S/k_Rの実際の比の下限であり、アニーリング速度は、ブロミドの立体化学によって影響されないとみなされる。

【０３３０】
驚くべきことに、（Ｓ）－ブロミドを支持する類似の優先性がまた、１２個のヌクレオチドがテンプレート－試薬複合体においてチオールおよびブロミドを分離した場合でさえ、らせん末端テンプレート構造を使用して観察された（図３９Ｂ）。らせん末端テンプレートの正確な構造およびその相補性試薬（図３９Ｂ）は、以下の通りであった：

【０３３１】
【化２】

テンプレート　：　5'- BrCH(CH_3)CONH-TAC GCT CGC GAT GGT ACG AAT TC-3' [配列番号　83]

試薬　：　5'-GAA TTC GTA CC-(CH_2)$_3$SH-3'

【０３３２】
立体選択性は、ブロミドまたはチオールがテンプレートに結合するか否かに対して非依存性であるようであった（図３９Ｂおよび３９Ｃ）。チオールおよびその相補的な試薬（図３９Ｃ）に結合したらせん末端テンプレートの正確な構造は、以下の通りであった：

【０３３３】
【化３】

テンプレート：　5'-GAA TTC GTA CAT AGC GCT CGC AT-(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 84]

試薬：　5'- BrCH(CH_3)CONH-TGT ACG AAT TC-3' [配列番号　85]

【０３３４】
類似の選択性は、（Ｓ）－および（Ｒ）－ブロミドから生じるチオエーテル生成物が、

２つの異なる長さのテンプレートを使用して区別された、両方のブロミド立体異性体を含む偽動力学的分割から現れた（k_S/k_R＝４．２±０．４～４．９±０．３）。まとめると、これらの知見は、ＤＮＡテンプレートのキラリティーが、ＤＮＡ骨格が似ていないＤＮＡテンプレート型合成の生成物に移され得ることを示す。

【０３３５】

観察される立体選択性の起源を調べるために、チオールまたはブロミドの近くのヌクレオチドが、可撓性のアキラルなリンカーで置き換えられた一連のテンプレートおよび試薬アナログを合成した。類似の長さ（７２結合）のアキラルなポリエチレングリコールリンカーを用いて、らせん末端の反応のいずれかにおいてブロミドおよびチオールを分離する１２個のテンプレートヌクレオチドを置換することによって、立体選択性の喪失を生じた。立体選択性はまた、３つまたは５つの連続したメチレンまたはエーテル酸素からなる可撓性のアキラルなリンカーが、テンプレートオリゴヌクレオチドの５’末端とチオール基またはブロミド基との間、または試薬オリゴヌクレオチドの３’末端とチオールまたはブロミドとの間に挿入された。従って、反応物間のキラルなリンカーは、このＤＮＡテンプレート型合成において立体選択性のために必要とされる。これらの結果はまた、チオールとブロミドの両方が、反応の速度決定工程に関与し、これは、S_N2機構と一致する。

【０３３６】

遠位塩基スタッキングまたは塩基対形成相互作用における一本鎖ＤＮＡおよび二本鎖ＤＮＡコンホメーションの公知の選択性は、ブロミドまたはチオールから遠位の基が、立体選択性を誘導することにおいて重要な役割を果たし得ることを示唆する。これらの可能性を試験するために、５’ブロミドに最も近い１２個のテンプレートヌクレオチドのちの１１個を、キラル無塩基性（ａｂａｓｉｃ）ホスホリボースリンカーとのらせん末端反応で置換され、芳香族塩基がプロトンで置換された（図４０Ａ）。らせん末端テンプレートの正確な構造は、塩基２～１２が、無塩基性ホスホリボース単位（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡからの対応するホスホラミダイトから調製された）で置換したことを除いて、図３９と同じであった。たとえ、ブロミドに最も近い５’チミジンヌクレオチドが変化しなかったとしても、生じる反応は、立体選択性ではなく、これは、ブロミドに最も近いヌクレオチドが、観察される立体選択性を誘導するには十分ではなかったことを示す。

【０３３７】

次いで、５’末端からの１１個の失われた芳香族塩基の各々が、回復され（図４０Ｂ）、そして各得られたテンプレートについての（Ｓ）－ブロミドおよび（Ｒ）－ブロミドの反応についての速度を測定した。驚くべきことに、５塩基までが回復された場合、立体選択性は、観察されなかった。６～１１塩基が回復された場合、立体選択性は、k_S/k_R＝４．３にまで着実に増加した（図４０Ｃ）。５’末端の代わりに、無塩基領域の３’末端からの失われた芳香族塩基の回復はまた、いくつかの塩基が回復された後でのみ立体選択性を誘導した（この場合、５～１１塩基）（図４０Ｄ）。まとめると、これらの知見は、立体選択性が、いずれかの反応物に隣接するヌクレオチドのコンホメーションから生じ、立体選択性を導くコンホメーションが、少なくとも５～６個の連続した芳香族塩基を必要とすることを示唆する。

【０３３８】

この立体選択性のモデルは、テンプレート－試薬複合体が、たとえ、全ての反応物の共有結合構造および絶対的な立体化学が保存されたとしても、立体選択性を変化させ得ることを予測する。（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇ反復がリッチな二本鎖ＤＮＡ配列は、高い塩濃度において、通常の右手らせん（Ｂ－形態）よりもむしろ左手らせん（Ｚ－形態）を選び得る（Ｒｉｃｈら（１９８４）Ｊ．ＡＮＮＵ．ＲＥＶ．ＢＩＯＣＨＥＭ．５３：７９１－８４６；Ｂｅｈｅら，（１９８１）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ　７８：１６１９－１６２３；Ｍａｏら（１９９９）ＮＡＴＵＲＥ　３９７：１４４－１４６）。ブロミド連結（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチヘアピンテンプレートおよび相補的なチオール連結試薬（未反応ジスルフィドとして保護される）が調製された。等モル比で組み合わせた場

合、低塩（１００ｍＭ　ＮａＣｌ）において得られるテンプレート－試薬複合体の円偏光二色性（ＣＤ）スペクトルは、Ｂ形態ＤＮＡの特徴であった（例えば、図４２Ｄを参照のこと）。高塩濃度（５Ｍ　ＮａＣｌまたは２．５Ｍ　Na_2SO_4）の存在下において、同じテンプレート－試薬複合体は、Ｚ形態ＤＮＡに代表的なＣＤスペクトルを示した。対照的に、通常の配列のテンプレート－試薬複合体のＣＤスペクトルは、低塩条件および高塩条件の両方において、Ｂ形態ＤＮＡの代表であった（例えば、図４２Ｄを参照のこと）。

【０３３９】

混合または（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチ配列のいずれかを使用するブロミド連結テンプレートとチオール連結試薬との間のＤＮＡテンプレート型反応の立体選択性は、低塩濃度または高塩濃度の存在下で試験された。低塩濃度または高塩濃度の存在下での混合配列テンプレートおよび試薬（Ｂ形態ＤＮＡ）は、それぞれ、４．３倍または３．２倍だけ（Ｓ）－ブロミドを支持した（図４１Ａ）。低塩濃度（Ｂ形態ＤＮＡ）での（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチテンプレートおよび試薬は、（Ｓ）－ブロミドの反応についての４．４倍の優先度を示した（図４１Ａ）。顕著なことに、Ｚ形態ＤＮＡを誘導する高塩濃度の存在下においてこの反応を繰り返すことは、立体選択性における１４倍の変化を生じ、ここで、３．２倍の（Ｒ）－ブロミドを支持する（$k_S/k_R=0.31$）（図４１Ｂ）。ＤＮＡ二重らせんの巻き方の方向を変化させる結果としての立体選択性の反転は、このＤＮＡテンプレート型反応の立体選択性を決定する際に、テンプレートおよび試薬のコンホメーションに関係する理論と一致する。

【０３４０】

これらの実験は、立体選択性が、核酸テンプレート型有機合成の間に与えられ得ることを実証する。反応物の部分的に拘束された提示とともに、塩基スタッキングに依存するＤＮＡのコンホメーションは、観測される立体選択性を担うようである。これらの実験は、さらに、１つの絶対的な立体化学を有する単一の構造が、その高分子の構造が変更された場合に反対の立体選択性を誘導し得ることを実証する。

【０３４１】

（オリゴヌクレオチド）

混合配列および（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチ配列を含むテンプレートおよび使用されるそれらの対応する試薬の実際の構造は、以下の通りである：

【０３４２】

【化４】

混合配列　：

テンプレート：　5'-GAA TTC TGG ACA CTT AGC TAT TCA TCG AGC GTA CGC TCG ATG AAT AGC-$(CH_2)_3$SH-3' [配列番号　86]

試薬　：　5'-BrCH(CH_3)CONH-TAA GTG TCC AGA ATT C-3' [配列番号　87]

(5-Me-C)G-リッチ配列　：

テンプレート：　5'-GAA TTC C*GC* GC*G C*GC* AC*G C*GC* GC*G C*GG AGC GTA CGC TCC* GC*G C*GC* GC*G-$(CH_2)_3$SH-3' [配列番号　88]

試薬　：　5'- BrCH(CH_3)CONH-TGC* GC*G C*GC* GGA ATT-3' [配列番号　89]

【０３４３】

Ｃ＊＝５－メチルシトシン。混合配列および（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチ配列の両方におけるチオールは、円偏光二色性測定のためにジスルフィド（－（CH_2）$_3$Ｓ－Ｓ（ＣＨ

$_2$）$_3$ＯＨ）として保護された。
【０３４４】
（ＤＮＡ合成および分析）
ＤＮＡオリゴヌクレオチドを、標準的なホスホラミダイトプロトコルを使用して、ＰｅｒＳｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｅｘｐｅｄｉｔｅ　８０９０ＤＮＡ合成機で合成し、そして酢酸トリエチルアンモニウム（ＴＥＡＡ）／CH_3CN勾配を用いて逆相ＨＰＬＣによって精製した。オリゴヌクレオチドは、ＵＶによっておよびエチジウムブロマイドでの染色後の変性ＰＡＧＥによって定量された。変性ＰＡＧＥによるＤＮＡの定量を、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｅａｇｌｅ　Ｅｙｅ　ＩＩデンシトメーターを用いて行った。合成的に改変されたオリゴヌクレオチドアナログは、Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎａ，ＵＳＡから購入した対応するホスホラミダイトまたは制御多孔性ガラス（ＣＰＧ）ビーズを使用して組み込まれた。
【０３４５】
（ＤＮＡ官能基化）
（２－ブロモプロピオンアミド－ＮＨＳエステル）
２００ｍｇのＮ－ヒドロキシスクシンイミド（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ，ＵＳＡ）を、１．１当量の２－ブロモプロピオン酸（ラセミ、（Ｒ）－または（Ｓ）－のいずれか）および２当量の１－（３－ジエチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド（ＥＤＣ）（Ａｌｄｒｉｃｈ）とともに、無水CH_2Cl_2中に溶解した。２－ブロモプロピオン酸エナンチオマーは、キラルＨＰＬＣ（ヘキサン中５％イソプロパノール、（Ｒ，Ｒ）ＷＨＥＬＫ　Ｏ１キラル相、２２０ｎｍで検出）によって判断した場合、＞９５％のエナンチオ純度であった。この反応を室温で維持し、ＴＬＣ（ＥｔＯＡｃ）によって判断して、１．５時間後に完了させた。粗反応混合物を、２．５％硫酸水素ナトリウム（$NaHSO_4$）とともに抽出して、過剰のＥＤＣを除去した。有機相をブラインで洗浄し、硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）で乾燥し、そして減圧下で濃縮した。残渣を乾燥し、そしてＤＮＡ官能基化のために直接的に使用した。
【０３４６】
（オリゴヌクレオチドの５’－官能基化）
上記のように調製されたＮＨＳエステルを、ＤＭＳＯ中に溶解させた。１５０μｇまでの５’アミノＤＮＡオリゴヌクレオチドを、２時間、室温において、２００ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）中で３ｍｇ／ｍＬ　ＮＨＳエステル（最終反応＝１０％ＤＭＳＯ）と組み合わせた。官能基化オリゴヌクレオチドを、ゲル濾過および逆相ＨＰＬＣによって精製し、そして変性ＰＡＧＥおよびＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によって特徴付けた。
【０３４７】
（３’－チオール改変オリゴヌクレオチド）
３’チオール基を、３’－ジスルフィド連結ＣＰＧ（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎａ，ＵＳＡ）を使用して、標準的な自動化ＤＮＡ合成によって組み込んだ。オリゴヌクレオチド合成に続いて、ジスルフィドは、１時間、室温で、５０ｍＭ　ＤＴＴ，１Ｍ　ＴＡＰＳ（ｐＨ＝８．０）で切断し、ＤＮＡテンプレート型反応において使用される前に、ゲル濾過によって精製した。
【０３４８】
（ＤＮＡテンプレート型反応）
反応を、他に示さない限り、２５℃で、５０ｍＭ　ＭＯＰＳ（ｐＨ＝７．５）および２５０ｍＭ　ＮａＣｌ中の６０ｎＭテンプレートおよび６０ｎＭ試薬で行った。反応アリコートを、２分～１２０分の時点で取り出し、過剰のβ－メルカプトエタノールでクエンチした。開始物質および生成物を、クエンチした反応混合物からエタノール沈殿させ、変性ＰＡＧＥによって分析し、上記のように定量した。生成物形成の相対的な初期速度を、生の収率対時間の当てはめから決定し、k_S/k_Rを計算するために使用した。代表的なデータを図４２に示す。
【０３４９】

図４２に示される代表的なデータセットについて、初期速度から誘導される見かけの二次速度定数は以下の通りである：

図３９Ａおよび４２Ａ：

$k_{R,app}$＝１．９４×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{S,app}$＝７．０７×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{rac,app}$＝４．５８×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$

図３９Ｂおよび４２Ｂ：

$k_{R,app}$＝５．８３×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{S,app}$＝２１．９×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{rac,app}$＝１３．６×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$

図４２Ｃおよび４４Ａ、低塩：

$k_{R,app}$＝４．００×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{S,app}$＝１７．６×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{rac,app}$＝９．８８×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$

図４２Ｃおよび４４Ａ、高塩：

$k_{R,app}$＝５．９４×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{S,app}$＝１８．８×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{rac,app}$＝１０．８×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$

図４２Ｄおよび４４Ｂ、低塩：

$k_{R,app}$＝６．１１×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{S,app}$＝２５．４×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{rac,app}$＝１２．１×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$

図４２Ｄおよび４４Ｂ：

$k_{R,app}$＝２４．６×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{S,app}$＝７．６６×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$；$k_{rac,app}$＝１３．６×１０^{3}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$

（ブロミド安定性の評価）

反応条件下でのブロミドの構造および構造的安定性を、いくつかの独立した方法によって確認した。各ブロミド連結テンプレートまたは試薬オリゴヌクレオチドを、２５℃で７２時間まで、３７℃で４８時間まで、チオールの非存在下での反応条件下で、予備的にインキュベートした。予備的インキュベーションに続いて、立体選択性を、上記のように測定し、常に、予備的インキュベーションの結果として変化しないことが見出された。さらに、ブロミド連結テンプレート（（Ｒ）、（Ｓ）およびラセミック）の大スケール（２５０ｐｍｏｌ）の量を、１６時間の反応条件下で各々インキュベートし、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によって分析した。ブロミド置換（水またはクロリドによる）の証拠は、表１１および１２において示されるように、観察されなかった。

【０３５０】

【表１１】

表 11: らせん末端テンプレート(予想される質量＝7202.1)

異性体	観察された質量
(*R*) ブロマイド:	インキュベーション前 ＝7203.3±7
	インキュベーション後 ＝7206.4±7
(*S*) ブロマイド:	インキュベーション前 ＝7206.0±7 インキュベーション後 ＝7201.9±7
(±) ブロマイド:	インキュベーション前 質量＝7201.7±7 インキュベーション後 質量＝7204.7±7

【０３５１】

【表１２】

表　12: ヘアピンテンプレート(予想される質量＝9682.4)

異性体	観察された質量
(*R*)ブロマイド:	インキュベーション前質量＝9686.6±10 インキュベーション後質量＝9685.7±10
(*S*)ブロマイド:	インキュベーション前質量＝9683.8±10 インキュベーション後質量＝9680.6±10
(±)ブロマイド:	インキュベーション前質量＝9680.6±10 インキュベーション後質量＝9684.7±10

【０３５２】

最終的に、上記ブロミド連結ＤＮＡの低分子アナログ（Ｎ－メチル２－ブロモプロピオンアミドの両方のエナンチオマー）についての低分子アナログを、反応条件下で１６時間インキュベートし、（Ｓ）－エナンチオマーおよび（Ｒ）－エナンチオマーを分割する条件下で、キラルＨＰＬＣによって分析した。保持時間の変化は観察されなかった。

【０３５３】

（アキラル可撓性リンカーを使用する立体選択性）

図４３は、ＤＮＡテンプレート型S_N2反応の間の立体選択性を失う改変テンプレートまたは試薬構造を示す。全ての場合において、$k_{S,app}/k_{R,app}$値は、０．９５～１．０９（±０．０９）の範囲内に入り、これは、少なくとも３つの独立した実験の平均および標準偏差を反映する。アキラルリンカーおよびそれらの対応する試薬を含むテンプレートの実際の構造は、以下の通りであった：

【０３５４】

【化５】

図 43A:

テンプレート 5'-BrCH(CH_3)CONH-[(CH_2)$_2$O]$_2$OPO_3^--{[(CH_2)$_2$O]$_6$OPO_3^-}$_3$-GGT ACG AAT TC-3' [配列番号 90]

試薬 : 5'-GAA TTC GTA CC-(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 91]

図 43B:

テンプレート : 5'-GAA TTC GTA CA-(CH_2)$_3$OPO_3^--{[(CH_2)$_2$O]$_6$OPO_3^-}$_3$-(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 92]

試薬 : 5'- BrCH(CH_3)CONH-TGT ACG AAT TC-3' [配列番号 93]

図 43C:

テンプレート : 5'- BrCH(CH_3)CONH-[(CH_2)$_2$O]$_2$OPO_3^--AC GCT CGC GAT GGT ACG AAT TC-3' [配列番号 94]

試薬 : 5'-GAA TTC GTA CC-(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 95]

図 43D:

テンプレート : 5'-GAA TTC GTA CAT AGC GCT CGC A-(CH_2)$_3$OPO_3^--(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 96]

試薬 : 5'- BrCH(CH_3)CONH-TGT ACG AAT TC-3' [配列番号 97]

図 43E:

テンプレート : 5'- BrCH(CH_3)CONH-TAC GCT CGC GAT GGT ACG AAT TC-3' [配列番号 98]

試薬 : 5'-GAA TTC GTA CC-(CH_2)$_3$OPO_3^--(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 99]

図 43F:

テンプレート : 5'-GAA TTC GTA CAT AGC GCT CGC AT-(CH_2)$_3$SH-3' [配列番号 100]

試薬 : 5'-BrCH(CH_3)CONH-[(CH_2)$_2$O]$_2$OPO_3^--TGT ACG AAT TC-3' [配列番号 101]

【０３５５】

（Ｂ－ＤＮＡおよびＺ－ＤＮＡの円偏光二色性（ＣＤ））

ＤＮＡテンプレートおよび試薬を上記のように調製した。チオール連結試薬は、脱保護されず、ＣＤ分析の間、それらのジスルフィド形態を保持した。ＣＤサンプルは、１００ｍＭまたは５Ｍ　ＮａＣｌのいずれかとともに、５０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ＝７．５）中に２１５ｎＭテンプレートおよび２１５ｎＭ保護試薬を含んだ。ＤＮＡを欠くバッ

クグラウンドサンプルはまた、各サンプルについて調製された。ＣＤ測定を、２．０ｎｍ分解能を有するＪＡＳＣＯ偏光分光計で３６０ｎｍ～２００ｎｍを２ｎｍ／秒で走査して、２５℃で１ｍｍ経路キュベット中で実行した。Ｂ－形態およびＺ－形態テンプレート－試薬複合体の得られたＣＤを図４４に示す。図４４Ａは、Ｂ－ＤＮＡの特徴である正常（混合組成）配列を含むテンプレート－試薬複合体の円偏光二色性（ＣＤ）スペクトルを示す。図４４Ｂは、低塩濃度でのＢ－ＤＮＡコンホメーションを有する（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチ複合体および高塩濃度でのＺ－ＤＮＡコンホメーションを有する（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチ複合体のＣＤスペクトルを示す。混合配列および（５－Ｍｅ－Ｃ）Ｇリッチ配列を含むテンプレートの正確な構造、ならびに使用されるそれらの対応する試薬は、以下の通りである：

【０３５６】

【化６】

混合配列　：

テンプレート：　5'-GAA TTC TGG ACA CTT AGC TAT TCA TCG AGC GTA CGC TCG ATG AAT AGC-$(CH_2)_3$SH-3' [配列番号　102]

(チオールは、円偏光二色性測定のためにジスルフィド[$(CH_2)_3$S-S$(CH_2)_3$OH]として保護された　).

試薬：　5'-BrCH(CH_3)CONH-TAA GTG TCC AGA ATT C-3' [配列番号　103]

(5-Me-C)G-リッチ配列　：

テンプレート：　5'-GAA TTC C*GC* GC*G C*GC* AC*G C*GC* GC*G C*GG AGC GTA CGC TCC* GC*G C*GC* GC*G-$(CH_2)_3$SH-3' [配列番号　104]

(チオールは、円偏光二色性測定のためにジスルフィド[$(CH_2)_3$S-S$(CH_2)_3$OH]として保護された　).

試薬　：　5'- BrCH(CH_3)CONH-TGC* GC*G C*GC* GGA ATT-3' [配列番号　105]

C*＝5-メチルシトシン

【０３５７】

（Ｂ－形態ＤＮＡおよびＺ－形態ＤＮＡによって誘導される立体選択性）

図４５は、１００ｍＭ　ＮａＣｌ（レーン１～３）または５Ｍ　ＮａＣｌ（レーン４～６）（６時間の時点）においてＣＧリッチ配列を使用する反応の、代表的な変性ゲル電気泳動分析を示す。レーン１および４：ラセミブロミド；レーン２および５：（Ｒ）－ブロミド；レーン３および６：（Ｓ）－ブロミド。ブロミド連結試薬は、可視ではない。類似の結果を、ＮａＣｌの代わりに、Na_2SO_4を使用して観察した。

【０３５８】

（ＮａＣｌの代わりに、Na_2SO_4の存在下でのＤＮＡテンプレート型反応）

観察される立体選択性がクロライドの存在によって影響しなかったことを確認するために、図３９および４４に示される実験を、ＮａＣｌの代わりに、Na_2SO_4の存在下で繰り返した（ナトリウムの濃度を一定に維持する）。３つの独立した試験の結果は、ＮａＣｌの存在下で報告された結果と非常に類似し、以下の通りである：

ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での図３９Ａ：k_S/k_R＝５．４±０．５

ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での図３９Ｂ：k_S/k_R＝３．９±０．３
ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での図３９Ｃ：k_S/k_R＝４．７±０．７
ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での低塩、図４４Ａ：k_S/k_R＝３．７±０．７
ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での高塩、図４４Ａ：k_S/k_R＝３．１±０．６
ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での低塩、図４４Ｂ：k_S/k_R＝３．６±０．５
ＮａＣｌの代わりにNa_2SO_4での高塩、図４４Ｂ：k_S/k_R＝０．２５±０．０３

（代表的生成物のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析）

図３９の代表的なＤＮＡテンプレート型反応（２４０ｐｍｏｌスケール）からの生成物を、調製用変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、続いて、一晩３７℃で、０．１Ｍ酢酸トリエチルアンモニウムで抽出した。凍結乾燥した生成物を、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析に供し、この結果を表１３に要約する。全ての場合において、観察される質量が予期された質量と一致する。

【０３５９】

【表１３】

表　13

図	予想される質量	観察された質量
39A	13067.5	13015.6±65
39B	10562.0	10587.2±53
39C	10558.1	10600.1±53

【０３６０】

（実施例７：単一溶液でのそれ以外のミスマッチな反応の指示）

この実施例は、たとえ関係する反応物が交差反応性であり、従って、従来の合成条件下でミスマッチであるとしても、オリゴヌクレオチドが、同じ溶液中でいくつかの異なる合成反応型を同時に指示し得ることを実証する。これらの知見はまた、複数の、必ずしも同時ではない適合性の反応型を使用して、生成物に合成ライブラリー前駆体のワンポット多様化を実行することが可能であることを実証する。

【０３６１】

ＤＮＡテンプレートが、空間的分離無しに、異なる反応型を使用して、多様化を媒介する能力を、それぞれ、マレイミド基で５’末端で官能基化された異なるＤＮＡ配列の３つのオリゴヌクレオチドテンプレート（１ａ～３ａ）、およびアミン、チオール、またはニトロアルカン基で３’末端において官能基化された３つのオリゴヌクレオチド試（４ａ～６ａ）薬を調製することによって、最初に試験した（図４６）。３つの試薬それぞれのＤＮＡ配列は、テンプレートの各々の５’末端近くの１０塩基に相補的な異なる１０塩基アニーリング領域を含んだ。１ａと４ａ、２ａと５ａ、または３ａと６ａを３つの別々の容器においてｐＨ８．０で組み合わせて、予期されるＤＮＡテンプレート型アミン結合体付加物、チオール結合体付加物、またはニトロ－マイケル付加生成物７～９を生じた（図４６、レーン１～３）。

【０３６２】

１ａ～６ａを組み合わせる際に作製され得る９個の可能な反応生成物を区別するために、テンプレートオリゴヌクレオチドの長さを、１１塩基、１７塩基、または２３塩基を含むように変化させ、そして試薬オリゴヌクレオチドの長さを、１４塩基、１６塩基、または１８塩基を含むように変化させた。オリゴヌクレオチド長の差は、ＤＮＡテンプレート型反応の効率に有意に影響しなかった反応性基から遠位の伸長を使用して達成された。こ

の設計によって、９個全ての可能な反応生成物（ＤＮＡの２５塩基、２７塩基、２９塩基、３１塩基、３３塩基、３５塩基、３５塩基、３７塩基、３９塩基、または４１塩基に結合される）が、変性ポリヌクレオチドゲル電気泳動によって区別され得た。

【０３６３】

３個全てのテンプレート（１ａ～３ａ）を含む溶液が、３つ全ての試薬（４ａ～６ａ）を含む溶液（ｐＨ８．０）と組み合わされた。生じる反応は、長さが２５塩基、３３塩基、および４１塩基の３つの所望の生成物７、８、および９を排他的に作製し、これは、相補的なテンプレート－試薬対に対応する３つの反応のみが行われたことを示す（図４６、レーン４）。他の６つの可能な反応生成物の形成は、デンシトメトリーによって検出されなかった（＜５％反応）。対照的に、個々の反応テンプレートおよび異なる１０塩基アニーリング領域よりもむしろ同じものを含む試薬は、全ての可能な生成物の形成を可能にした（図４６、レーン５）。これは、ＤＮＡテンプレート型合成が、異なる型の生成物内に単一の官能基の選択的なワンポット変換を導く能力（本実施例において、メレイミドを第２級アミン、チオエーテル、またはα－分枝ニトロアルカンに）を実証する。

【０３６４】

この多様化様式が、非ＤＮＡ連結アクセサリー試薬を必要とするワンポット反応を支持する能力を試験するために、長さが１４塩基または１４塩基の２つのアルデヒド連結試薬（それぞれ、４ｂまたは５ｂ）および相補的な１１塩基アミン連結テンプレート（１ｂ）または１７塩基ホスホラン連結テンプレート（２ｂ）を用いて実行した。１ｂおよび４ｂをｐＨ８．０において、３ｍＭ　$NaBH_3CN$の存在下で組み合わせて、ＤＮＡテンプレート型還元的アミノ化生成物１０を生じ、同じ条件下での２ｂおよび５ｂは、Ｗｉｔｔｉｎｇオレフィン化生成物１１を作製した（図４６）。４つ全ての反応物を一緒にワンポットで混合して、組み合わせた個々のＷｉｔｔｉｎｇオレフィン化反応物または還元的アミノ化反応物と同一の生成物の分布を生じた（図４６）。アミン１ｂとアルデヒド５ｂとの間、またはホスホラン２ｂとアルデヒド４ｂとの間の反応は検出されなかった（図４６、レーン８対レーン９）。

【０３６５】

このアプローチの一般性は、異なるアクセサリー試薬に必要とされる複数の反応型を含むことによって、探索された。長さ１１塩基、１７塩基または２３塩基の３つのアミン連結テンプレート（１ｃ～３ｃ）を、それぞれ、ｐＨ８．０において、３ｍＭ　$NaBH_3CN$、１０ｍＭ　１－（３－ジメチル－アミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド（ＥＤＣ）、および７．５ｍＭ　Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）の存在下で、１４塩基長、１６塩基長、または１８塩基長のアルデヒド連結試薬、カルボン酸連結試薬、またはマレイミド連結試薬（４ｃ～６ｃ）とともに組み合わせた。６個全ての反応物を含む反応は、同じ３つ還元的アミノ化、アミンアシル化、または結合体付加生成物（１２～１４）（１つのテンプレートおよび１つの試薬を含む個々の反応から生成され、そして非ＤＮＡテンプレート型反応から生じる検出可能な量の６個の可能な所望されない生成物を生成しない）を与えた（図４６、レーン１０～１４）。まとめると、これらの結果は、ＤＮＡテンプレート型合成が、いくつかの交差反応性の基の間の同時の反応をワンポットで指示して、配列プログラムされたサブセットの多くの可能な生成物のみを生じ得る。

【０３６６】

上記３つの実施例それぞれが、単一の官能基（マレイミド、アルデヒド、またはアミン）を異なる反応型の生成物に多様化した。ＤＮＡテンプレート型合成ライブラリーを複数の反応型の生成物にワンポットで多様化するためのより一般的な形式は、試薬およびテンプレートの両方に連結された異なる官能基の同時の反応を含む。この可能性を試験するために、上記３つの実施例において使用される官能基（アミン、アルデヒド、マレイミド、カルボン酸、ニトロアルカン、ホスホラン、およびチオール）の全てを集合的に含む、６個のＤＮＡ連結求核性テンプレート（１５～２０）および６個のＤＮＡ連結求電子性試薬（２１～２５）調製した（図４７）。これらの１２個のＤＮＡ連結反応物は、これらの６

個の反応の見かけの二次反応定数が、１０倍よりも大きく変動するものの、理論的に、同時のアミン結合体付加、チオール結合体付加、ニトロ－マイケル付加、還元的アミノ化、アミンアシル化、およびＷｉｔｔｉｎｇオレフィン化を同じポットで受け得る。

【０３６７】

異なる長さのオリゴヌクレオチドを使用することによって単一のポットで１２個全ての試薬およびテンプレートを組み合わせる結果を決定することは、作製され得る多数（少なくとも２８個）の可能な生成物に起因して困難である。従って、１５塩基、２０塩基、２５塩基、３０塩基、３５塩基、または４０塩基のような試薬の長さは、変動するが、テンプレートの長さは、１１塩基に固定された（図４７）。３ｍＭ　$NaBH_3CN$、１０ｍＭ　ＥＤＣ、および７．５ｍＭ　スルホ－ＮＨＳの存在下で、ｐＨ８．０において別々に反応された場合、６個の相補的なテンプレート－試薬対の各々が、予期されるアミン結合体付加、チオール結合体付加、ニトロ－マイケル付加、還元的アミノ化、アミンアシル化、またはＷｉｔｔｉｎｇオレフィン化の生成物を生成した（図４７）。反応効率は、異なる最適な反応条件の間で妥協しなければならないにも関わらず、対応する個々の反応に対して５０％よりも大きかった。テンプレート１５～２０はまた、３’－ビオチン化形態で調製された。ビオチン化テンプレートは、それらの非ビオチン化対応物と区別可能でない反応性を示した（図４７）。

【０３６８】

次いで、１２個の反応物を含む６個の別々の反応それぞれは、３ｍＭ　$NaBH_3CN$、１０ｍＭ　ＥＤＣ、および７．５ｍＭ　スルホ－ＮＨＳの存在下で、ｐＨ８．０において実施された（図４８）。各反応は、５個の非ビオチン化テンプレート（１５～２０）および６個の試薬（２１～２５）とともに、異なるビオチン化テンプレート（１５、１６、１７、１８、１９、または２０）を含んだ。これらの反応を、１５～２０を含む溶液と、２１～２５を含む溶液と組み合わせることによって、開始した。各ビオチン化テンプレートから生じた生成物を、ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズを用いて捕捉し、そして変性ゲル電気泳動によって同定した。各反応における６個の試薬が独特の長さのオリゴヌクレオチドを含んだので、ビオチン化テンプレートおよび任意の試薬を含む任意の反応生成物の形成が検出され得た。６個全ての場合において、ビオチン化テンプレートは、各反応における５個までの他の生成物を形成する可能性にもかかわらず、そのＤＮＡ配列によってプログラムされる単一の生成物のみを形成した（図４８）。まとめると、これらの知見は、種々の非ＤＮＡ連結アクセサリー試薬を必要とする有意に異なる速度の反応が、テンプレートおよび試薬の両方が、たとえいくつかの異なる交差反応性の官能基を含むとしても、同じ溶液においてＤＮＡテンプレート型合成によって指示され得る。ＤＮＡテンプレートが、認識可能な速度で進行することから非テンプレート型反応を排除する濃度で複数の反応を指示する能力は、単一の溶液において空間的に分離されたセットの反応を模倣する。

【０３６９】

従来の合成方法と比較して、ＤＮＡテンプレート型合成による低分子のライブラリーを作製することは、ＤＮＡ連結試薬を調製することの必要性、水性のＤＮＡ適合性化学の制限、および特徴付け方法（例えば、分子生物学的スケール（ｐｇ～μｇ）の反応に適切な質量分析法および電気泳動）における信頼性を含むいくつかの因子によって制限される。他方、ＤＮＡテンプレート型合成は、（ｉ）所望の特性を有する合成分子の直接的なインビトロ選択（スクリーニングに対して）および増幅を可能にし、（ｉｉ）前例のない多様性のある合成ライブラリーの調製を可能にし、そして（ｉｉｉ）活性なライブライリーメンバーの選択および同定のために最小量の材料のみを必要とする。さらに、この実施例は、現在の合成方法を使用して可能ではない反応性の潜在的に有用な様式が、ＤＮＡテンプレート型形式で達成され得ることを示す。例えば、６個の異なる型の反応が、必要とされる非ＤＮＡ連結アクセサリー試薬が適合性であれば、１つの溶液において同時に実行され得る。この反応様式は、単一の溶液において異なる反応タイプを使用する合成低分子ライブラリーの多様化を可能にする。

【０３７０】
（材料および方法）
（テンプレートおよび試薬の合成）
オリゴヌクレオチドを、標準的な自動化固相技術を使用して合成した。改変ホスホラミダイトおよび制御多孔性ガラス支持体を、Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡから得た。他に示さない限り、官能基化テンプレートおよび試薬を、５’－$H_2N(CH_2O)_2$末端オリゴヌクレオチド（テンプレートのため）または３’－$OPO_3-CH_2CH(CH_2OH)(CH_2)_4NH_2$末端オリゴヌクレオチド（試薬のため）を、２５℃で、２ｍｇ／ｍＬの適切なＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ，ＵＳＡ）を含む水性２００ｍＭ ｐＨ７．２リン酸ナトリウム緩衝液：ＤＭＦの９：１混合物中で反応させることによって合成した。

【０３７１】
アルデヒドおよびニトロアルカン連結オリゴヌクレオチド（４ｂ、４ｃ、５ｂ、６ａ、１７、２４、および２６、図４６および４７）について、ＮＨＳエステルを、適切なカルボン酸（ＤＭＦ中、９００ｍＭ）を等量のジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＭＦ中、９００ｍＭ）およびＮＨＳ（ＤＭＦ中、９００ｍＭ）と９０分間、組み合わせることによって作製した。ホスホラン連結オリゴヌクレオチド（２ｂおよび２０、図４６および４７）を、上記ｐＨ７．２の緩衝液において、適切なアミノ末端オリゴヌクレオチドと、ヨード酢酸のＮＨＳエステル（ＳＩＡ，Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ，ＵＳＡ）の０．１容量の２０ｍｇ／ｍＬ ＤＭＦ溶液とを９０分間反応させ、続いて、ＤＭＦ中の４－ジフェニルホスフィノ安息香酸の０．１容量の２０ｍｇ／ｍＬ溶液を添加して、調製した。チオール連結テンプレート１６を、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＦ，Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ，ＵＳＡ）と適切なオリゴヌクレオチドと１５分間、反応させ、０．１容量の３００ｍＭ ２－アミノエタンチオールを添加して合成した。試薬５ａを、３’－$OPO_3-CH_2SS(CH_2)_3$ＯＤＭＴ官能基化制御多孔性ガラス（ＣＰＧ）支持体を使用して合成し、そして製造業者のプロトコルに従って使用前に還元して合成した。

【０３７２】
３’ビオチン化オリゴヌクレオチドを、ビオチン－ＴＥＧ ＣＰＧ（Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡ）を使用して調製した。ビオチン化テンプレートから生じる生成物を、１．０５当量のストレプトアビジン結合磁気ビーズ（Ｒｏｃｈｅ）と混合すること、４Ｍ塩酸グアニジニウムで２回洗浄すること、および１ｍＭビオチンを含む水性１０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．６）を用いて８０℃で溶出することによって、精製した。

【０３７３】
（リンカーの合成）
ＤＮＡオリゴヌクレオチドと１ａ～６ｃにおける官能基との間のリンカーは、以下の通りである。１ｂおよび１ｃ：ＤＮＡ－５’－NH_2；１ａ、２ａ～２ｃ、３ａおよび３ｃ：ＤＮＡ－５’－$O(CH_2)_2O(CH_2)_2-HN-$；５ａ：ＤＮＡ－３’－Ｏ－$(CH_2)_3SH$；４ａ～４ｃ、５ｂ、５ｃ、６ａおよび６ｃ：ＤＮＡ－３’－Ｏ－$CH_2CH(CH_2OH)(CH_2)_4NH-$。図４６における可能な全ての生成物（レーン５、９および１４）を生成するために使用されるオリゴヌクレオチド配列にて、アニーリング領域に下線を付している：Ｒ－ＴＡＴＣＴＡＣＡＧＡＧ－３’[配列番号１０６]（１ａ～１ｃ）；Ｒ－ＴＡＴＣＴＡＣＡＧＡＧＴＡＧＴＣＴ－３’[配列番号１０７]（２ａ～２ｃ）；Ｒ－ＴＡＴＣＴＡＣＡＧＡＧＴＡＧＴＣＴＡＡＴＧＡＣ－３’[配列番号１０８]（３ａ～３ｃ）；５’－ＣＡＧＣＣＴＣＴＧＴＡＧＡＴ－Ｒ[配列番号１０９]（４ａ～４ｃ）；５’－ＣＴＣＡＧＣＣＴＣＴＧＴＡＧＡＴ－Ｒ[配列番号１１０]（５ａ～５ｃ）；５’－ＧＧＣＴＣＡＧＣＣＴＣＴＧＴＡＧＡＴ－Ｒ[配列番号１１１]（６ａ～６ｃ）。官能化されたテンプレートおよび試薬を、ゲル濾過（Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５）およびそ

の後の逆相ＨＰＬＣ（０．１Ｍ酢酸トリエチルアンモニウム／アセトニトリル勾配）によって、精製した。代表的な官能化されたテンプレートおよび試薬を、ＭＡＬＤＩ質量分析法によりさらに特徴付けた。

【０３７４】

（反応条件）

すべての反応を、別個の容器にて純水中に試薬およびテンプレートを溶解した後にそれらを５０ｍＭ水性ＴＡＰＳ緩衝液（ｐＨ８．０）、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ中に２５℃にて１６時間、ＤＮＡ結合反応物６０ｎＭ（図４７）または１２．５ｎＭ（図４７および４８）と合わせることによって、実施した。$NaBH_3CN$、ＥＤＣおよびスルホ－ＮＨＳが、記載したように適切な場合には存在した。生成物を、エチジウムブロマイド染色およびＵＶ透過照明を使用して、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。荷電状態の変化、結合した官能基、および部分的二次構造は、同じ長さの種々の官能化されたオリゴヌクレオチドについて、穏やかなゲル移動度変化を生じた（図４６～４８）。

【０３７５】

（実施例８：ＤＮＡテンプレート官能基変換）

カップリング反応は、分子の多様性を構築するために有用であるが、ＤＮＡテンプレート官能基変換の発達は、生成し得る構造の型を有意に拡大し得る。ＤＮＡテンプレート合成を使用して、カップリング反応において使用する官能基を脱マスクまたは相互変換することにより、官能基を変換し得る。配列をプログラムされたライブラリー部分集合内の反応性基を露出するかまたは作製することによって、ＤＮＡテンプレート官能基の相互変換により、ライブラリーの多様性が、配列脱マスクにより生成されることが可能になる（図４９）。図４９において、ＰＧ１～ＰＧ３は、３つの異なる保護基を示し、Ａ～Ｆは、足場分子の脱保護された官能基と反応可能な反応物を示す。連続的脱マスクアプローチは、ＤＮＡに結合される能力を通常は欠く反応物（例えば、単純なアルキルハライド）が、分子内非テンプレート性反応様式で配列を特定されたテンプレート部分集合と反応することにより、ライブラリーの多様性に寄与すること可能にするという、大きな利点を提供する。この利点は、生成され得る構造の型を有意に増加する。他方、連続的脱マスクは、「工程」ごとにより多くの操作を必要とするという欠点を有する。なぜなら、以前に使用された低分子反応物は、ＤＮＡテンプレート官能基脱マスクの間に除去されなければならないからである。この除去は、単純なゲル濾過カートリッジを使用して、ライブラリー全体に対して迅速に実施され得る。

【０３７６】

（ＤＮＡテンプレート脱保護）

第１の種類のＤＮＡテンプレート官能基変換は、保護形態からアミン基、チオール基、アルコール基、カルボキシレート基またはアルデヒド基を、配列特異的に脱マスクする。Ｓｔａｕｄｉｎｇｅｒ反応において、アジドは、ホスフィンと反応して、アザイリドを生じる（Ｓｔａｕｄｉｎｇｅｒら（１９１９）ＨＥＬＶ．ＣＨＩＭ．ＡＣＴＡ．２：６３５～６４６）。この反応は、水性媒体において実施される場合に、そのアザイリドは、自然加水分解して、アミンおよびホスフィンオキシドを提供する（Ｓｃｒｉｖｅｎら（１９８８）ＣＨＥＭ．ＲＥＶ．８８：２９７～３６８）。ＤＮＡ結合アリールホスフィン試薬およびＤＮＡ結合アルキルホスフィン試薬は、アジド結合ＤＮＡテンプレートと合わされた場合に、配列特異的アミン脱保護を可能にする（図５０Ａ）。ＤＮＡ結合ホスフィンおよびＤＮＡ結合アジドは、両方とも、以前のＤＮＡテンプレート反応において首尾良く使用されている。代替的ＤＮＡテンプレートアミン脱保護として、ｏ－ニトロベンゼンスルホンアミド（アミンと市販のｏ－ニトロベンゼンスルホニルクロライドとから調製する）の求核性芳香族ｉｐｓｏ－置換は、遊離アミンを生じ得る（図５０Ｂ）。この反応は、脱プロトン化チオフェノールの存在下で効率的に進行することが公知であり、従って、ｐＨ＞８にて、ｏ－ニトロベンゼンスルホンアミド結合テンプレートに対するチオフェノール結合試薬のＤＮＡテンプレート攻撃により、配列特異的アミン脱保護が可能になり得る（Ｆｕｋｕｙａｍａら（１９９９）ＳＹＮＬＥＴＴ　８：１３０１～１３０３）。

【０３７７】
一旦最適化されると、ＤＮＡテンプレートアミン脱保護反応は、アルコールおよびチオールについての脱保護反応を含むように広げられ得る。Ｋｕｓｕｍｏｔｏおよび共同研究者らは、４－アミノブチリルエステルが、自発的分子内ラクタム形成して、２－ピロリドンおよび遊離ヒドロキシル基を、優れた収率で生じることを報告している（Ｋｕｓｕｍｏｔｏら（１９８６）ＢＵＬＬ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．ＪＰＮ．５９：１２９６～１２９８）。Ｋａｈｎｅおよび共同研究者らは、水性媒体においてこの反応を有効に使用した（Ｔｈｏｍｓｏｎら（１９９９）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２１：１２３７～１２４４）。ＤＮＡテンプレートヒドロキシル基脱保護が、図５０Ｃにおいて示される。ラクタム形成が遅い場合、この反応は、加熱され得るか、またはＬｅｗｉｓ酸が、添加され得る。なぜなら、配列特異性には、アミン脱保護は必要ではないからである。４－アジドブチリルチオエステルを使用する同様なＤＮＡテンプレートチオール脱保護が、図５０Ｃに示される。これらの基は、広範な条件下で加水分解に対して安定であることが、企図される。

【０３７８】
パラジウム媒介性脱アリル化もまた、ＤＮＡテンプレートのカルボキシレート脱保護、アミン脱保護、ヒドロキシル脱保護、またはチオール脱保護において使用され得る。アリルオキシカルボニル（Ａｌｌｏｃ）エステル、カルボネート、チオカルボネート、およびカルバメートが、図５０Ｄにおいて示されるようなＤＮＡ結合Ｐｄリガンド（例えば、２，２’－ビス（ジフェニルホスフィノ）－１，１’－ビナフチル（ＢＩＮＡＰ）試薬（公知のＢＩＮＡＰ－６－ブタン酸から調製する））を用いて、ｐＭ～μＭ濃度の水溶性Ｐｄ源（例えば、Na_2PdCl_4）の存在下で、処理される（Ｂａｙｓｔｏｎら（１９９８）Ｊ．ＯＲＧ．ＣＨＥＭ．６３：３１３７～３１４０）。ＤＮＡ結合Ｐｄリガンドは、相補的テンプレートでのＰｄの有効モル濃度を増加するが、ミスマッチしたテンプレートでは増加せず、これにより、対応するＡｌｌｏｃエステル基、カルボネート基、ヒドロキシル基、チオール基、およびアミン基からの、それぞれ、カルボキシレート基、ヒドロキシル基、チオール基、およびアミン基の配列特異的脱保護が可能になる（図５０Ｄ）（Ｇｎｅｔら（１９９４）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　５０：４９７～５０３）。ＰｄからのＢＩＮＡＰリガンド解離速度は、Ｐｄ媒介性アリールアミン化の間に測定されており、基質と生成物との結合速度および解離速度よりもかなり遅いことがわかっていることは、特に心強い（Ｓｉｎｇｈら（２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２４：１４１０４～１４１１４）。このＰｄ源およびＤＮＡ結合Ｐｄリガンドは、高濃度でプレインキュベートされ得、その後、生じた複合体は、６０ｎＭ濃度で相補的テンプレートまたはミスマッチテンプレートのいずれかに添加され得る。この手順はまた、リガンド－金属解離がＤＮＡアニーリングおよびＰｄ触媒性脱アリル化と比較して遅い場合に、配列特異的Ａｌｌｏｃ脱保護を生じる。

【０３７９】
最後に、遷移金属塩（Sc^{3+}およびYb^{3+}を含む）は、アセタール加水分解を触媒してアルデヒドを生じることが公知である（Ｆｕｋｕｚａｗａら（２００１）ＣＨＥＭ．ＬＥＴＴ．５：４３０～４３６）。図５０Ｅに示されるクラウンエーテルをオリゴヌクレオチドに結合体化すると、ランタニドトリフレートの存在下でのＤＮＡテンプレートアルデヒド脱保護が可能になる。これらのクラウンエーテル－Ln^{3+}複合体は、水性アルドール反応を触媒すると同時に１当量のLn^{3+}を完全に封鎖することが、以前に報告されている（Ｋｏｂａｙａｓｈｉら（２００１）ＯＲＧ．ＬＥＴＴ．３）。アルデヒド脱保護は、非常に配列特異的である。なぜなら、遊離Ln^{3+}は、無視できるからである。

【０３８０】
（ＤＮＡテンプレート官能基相互変換）
第２の種類のＤＮＡテンプレート官能基変換は、ＤＮＡテンプレート反応により形成されるかまたは使用される基を、相互変換する。２つの官能基の相互変換が、図５１に示される。２，６－二置換ピリジンＮ－オキシドの存在下でのルテニウム（ＩＩ）ポルフィリンは、広範な種類の単純な電子欠乏オレフィンの顕著に効率的なエポキシド化を触媒する

（Ｈｉｇｕｃｈｉら（１９８９）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ ＬＥＴＴ．３０：６５４５～６５４８；Ｇｒｏｖｅｓら（１９８５）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１０７：５７９０～５７９２；Ｚｈａｎｇら（２００２）ＯＲＧ．ＬＥＴＴ．４：１９１１～１９１４；Ｙｕら（２０００）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２２：５３３７～５３４２）。一本鎖ＤＮＡは、Ｒｕ（ＩＩ）と複合体化した水性テトラキス（４－カルボキシフェニル）ポルフィリン複合体の存在下で安定であり、Ｒｕ（ＩＩ）－ＤＮＡ結合体は、以前に報告されている（Ｈａｒｔｍａｎｎら（１９９７）Ｊ．ＢＩＯＬ．ＩＮＯＲＧ．ＣＨＥＭ．２：４２７～４３２；Ｐａｓｃａｌｙら（２００２）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１２４：９０８３～９０９２）。ＤＮＡ結合Ｒｕ（ＩＩ）ポルフィリン触媒を使用するＤＮＡテンプレートオレフィンエポキシド化が、図５１Ａに示される。これは、市販のテトラキス（４－カルボキシフェニル）ポルフィリンをアミン末端オリゴヌクレオチドに結合することによって、調製される（Ｈｏｌｍｌｉｎら（１９９９）ＢＩＯＣＯＮＪＵＧ．ＣＨＥＭ．１０：１１２２～１１３０）。生じるＤＮＡ結合ポルフィリンは、以前に記載されるように$Ru_3(CO)_{12}$を用いて金属化される。この官能基の相互変換は、ＤＮＡテンプレートＷｉｔｔｉｇオレフィン化およびＨｅｃｋカップリングの生成物がエポキシド付加反応のための基質になることを可能にすることによって、いくつかの多様な反応を橋渡しする。

【０３８１】

第２の官能基の相互変換として、ランタニドトリフレート触媒性水性Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒおよびヘテロ Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ付加環化は、水中で効率的に進行し、ＤＮＡ結合Ｌｅｗｉｓ酸キレート剤（例えば、ビナフトール、ビス－トリフィラミド、または図５０Ｅに示されるクラウンエーテル）は、テンプレート結合アルデヒドと、溶液中の遊離ジエンとの間の配列特異的Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応を可能にする（図５１Ｂ）。Ｄａｎｉｓｈｅｆｓｋｙのジエンが使用される場合、この官能基変換は、α，β－不飽和ケトンを提供し、このケトンは、その後のＤＮＡテンプレート結合体付加反応の基質として役立つ。完全に配位したLn^{3+}錯体（例えば、クラウンエーテルから生じる錯体）は、速度論的に安定であり、なおかつ容易なリガンド交換を介して効率的な触媒を可能にすると、報告されている（Ｃｈａｐｐｅｌｌら（１９９８）ＩＮＯＲＧ．ＣＨＥＭ．３７：３９８９～３９９８）。さらに、ＤＮＡ結合ランタニド複合体は、水溶液中で安定な発光剤として以前に使用されており、従って、これらの複合体は、ＤＮＡ中に存在する官能基と適合性である（Ｌｉら（１９９７）ＢＩＯＣＯＮＪＵＧ．ＣＨＥＭ．８：１２７～１３２）。

【０３８２】

（実施例９：例示的化合物および化合物ライブラリーの合成）

（Ａ．ポリカルバメートライブラリーの合成）

本実施例は、増幅可能なポリカルバメートライブラリーを生成するためのストラテジーを示す。

【０３８３】

（概説）

上記ライブラリーをコードするために使用される可能な１６種のジヌクレオチドコドンのうち、１種が、開始コドンの機能を割当てられ、１種が、終止コドンとして役立つように割当てられる。その後、人工的遺伝コードが、残りの１４種までのジヌクレオチドの各々を異なるモノマーに割当てて作製される。幾何学的理由により、１つのモノマーは、実際には、２つの側鎖を含むジカルバメートを含む。各モノマー内において、上記ジカルバメートは、シリルエノールエーテルリンカーを介して、（ｔＲＮＡアンチコドンと同様に）対応するジヌクレオチドに結合される。これは、フルオライドを用いる処理により、そのネイティブＤＮＡと遊離カルバメートとを遊離させる。

【０３８４】

このジヌクレオチド部分は、活性化５’－２－メチルイミダゾールリン酸として存在し、これは、中性水性条件または塩基性水性条件下でなおも比較的安定である、ヌクレオチ

ドのテンプレート特異的オリゴマー化についての優れた脱離基として作用することが実証されている（Ｉｎｏｕｅら（１９８２）Ｊ．ＭＯＬ．ＢＩＯＬ．１６２：２０１；Ｒｅｍｂｏｌｄら（１９９４）Ｊ．ＭＯＬ．ＥＶＯＬ．３８：２０５；Ｃｈｅｎら（１９８５）Ｊ．ＭＯＬ．ＢＩＯＬ．１８１：２７１；Ａｃｅｖｅｄｏら（１９８７）Ｊ．ＭＯＬ．ＢＩＯＬ．１９７：１８７；Ｉｎｏｕｅら（１９８１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１０３：７６６６；Ｓｃｈｗａｒｔｚら（１９８５）ＳＣＩＥＮＣＥ ２２８：５８５）。このジカルバメート部分は、ビニルオキシカルボネートリンカーを介して連結された環状形態で存在する。このビニルカルボネート基は、中性水性条件または塩基性水性条件において安定であることが実証されており、アミンの付加によってカルバメートを非常に高い収率で提供することがさらに示されている（Ｏｌｏｆｓｏｎら（１９７７）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ ＬＥＴＴ．１８：１５６３；Ｏｌｏｆｓｏｎら（１９７７）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ ＬＥＴＴ．１８：１５６７；Ｏｌｏｆｓｏｎら（１９７７）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ ＬＥＴＴ．１８：１５７１）。

【０３８５】

新生ポリカーバメート鎖からのアミンによって攻撃された場合、ビニルカルボネートリンカーは、ｍ－クレゾールの芳香族化によって駆動されて、遊離アミンを遊離する。この遊離アミンは次いで、求核試薬として作用して、次のビニルオキシカルボネートを攻撃し、成長するカルバメート鎖の重合を増殖させる。このようなストラテジーは、重合の間の任意の時点で１つのみの求核試薬が存在することを確実にすることにより、交差反応性および二方向性重合の可能性を最小にする。

【０３８６】

上記のモノマーを用いて、ポリカーバメートへのＤＮＡの人工的翻訳は、３段階プロセスとして概説され得る。第１段階では、ライブラリーをコードする一本鎖ＤＮＡテンプレートを用いて、モノマーのジヌクレオチド部分のアセンブリを導き、３’ヒドロキシル基の代わりに３’メチルエーテルを保有する「停止」モノマーで終結する（図５２）。

【０３８７】

一旦、これらのヌクレオチドがアセンブルされると、ｏ－ニトロベンジルカルバメートにおいてコードする「開始」モノマーは光脱保護されて、カルバメート重合を開始する一級アミンを明らかにする。重合は、ＤＮＡ骨格に沿って５’から３’の方向に進行し、各求核試薬の攻撃は、新たなアミン求核試薬のその後の露出をもたらす。「停止」モノマーの攻撃は、アミンではなくアセトアミドを遊離させ、それにより、重合を終結させる（図５３）。この段階ではＤＮＡは安定な二本鎖形態で存在するので、温度およびｐＨのような変数は、重合効率を最適にするために利用され得る。

【０３８８】

重合後、ポリカーバメートは、フッ素を用いた処理により、ＤＮＡのリン酸骨格から切断され得る。その結果のフェノール放出によって駆動されるエノールエーテルリンカーの脱ケイ酸およびリン酸の除去は、そのコードする一本鎖ＤＮＡへとそのカルボキシ末端での共有結合により連結したポリカーバメートを提供する（図５４）。

【０３８９】

この段階では、ポリカーバメートは、エステル結合の塩基加水分解により、ＤＮＡから完全に遊離され得る。この遊離したポリカーバメートは、ＨＰＬＣによって精製され得、そしてその所望の特性がインタクトであるかを確認するために再試験され得る。遊離ＤＮＡは、ＰＣＲを用いて増幅され得、誤りがちなＰＣＲ（Ｃａｄｗｅｌｌら（１９９２）ＰＣＲ ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＰＰＬ．２：２８）またはＤＮＡシャッフリング（Ｓｔｅｍｍｅｒ（１９９４）ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．ＵＳＡ ９１：１０７４；Ｓｔｅｍｍｅｒ（１９９４）ＮＡＴＵＲＥ ３７０：３８９；米国特許第５，８１１，２３８号）を用いて変異誘発され、そして／または配列決定されてポリカーバメートポリマーの一次構造が明らかにされる。

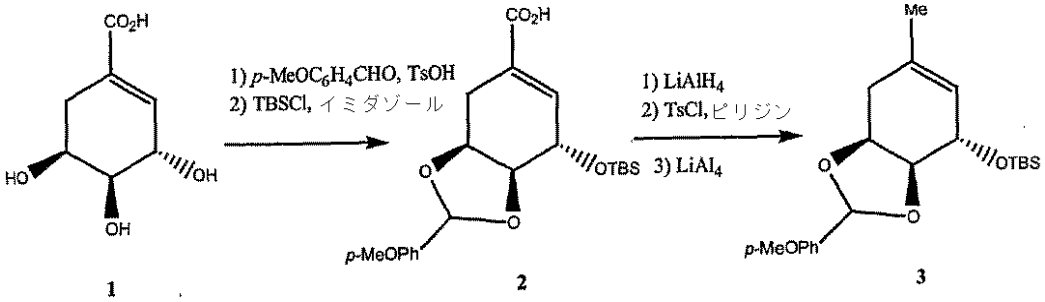
【０３９０】

（モノマー単位の合成）

モノマーが合成された後、ＤＮＡ足場におけるモノマーのアセンブリおよび重合は、自然に生じるべきである。シキミ酸１（市販される、生合成（Ｄａｖｉｓ（１９５５）ＡＤＶ．ＥＮＺＹＭＯＬ．１６：２８７）により入手可能またはＤ－マンノースからの短い合成（Ｆｌｅｅｔら（１９８４）Ｊ．ＣＨＥＭ．ｓｏｃ．９０５；Ｈａｒｖｅｙら（１９９１）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　ＬＥＴＴ．３２：４１１１）によって入手可能）は、モノマー合成についての便利な開始点として作用する。ｓｙｎヒドロキシル基は、ｐ－メトキシベンジリデンとして保護され、そして残りのヒドロキシル基は、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルエーテルとして作用して、２が得られる。次いで、保護されたシキミ酸のカルボキシレート部分は、塩化アルミニウムリチウム（ＬＡＨ）還元、得られるアルコールのトシル化、およびＬＡＨを用いたさらなる還元によって完全に除去されて、３を提供する。

【０３９１】

【化７】



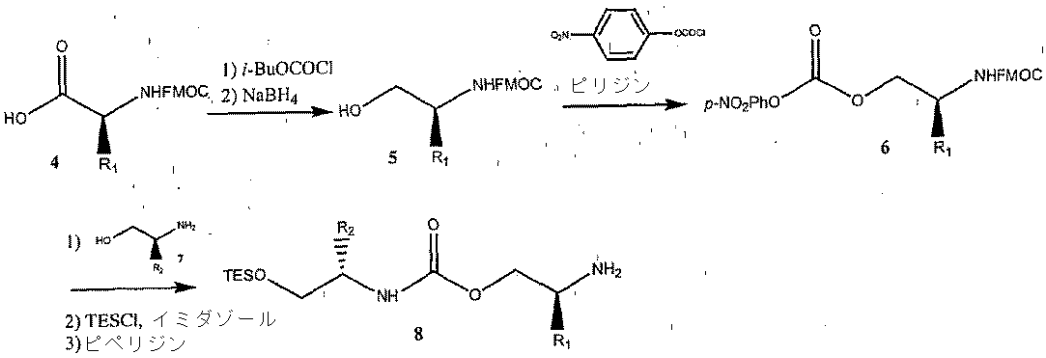
1　　2　　3

【０３９２】

市販でかつ合成によって入手可能なＮ保護アミノ酸は、各モノマーのジカルバメート部分についての出発物質として作用し得る。反応性側鎖は、光不安定性のエーテル、エステル、アセタール、カルバメートまたはチオエーテルとして保護される。以前に開発された化学（Ｃｈｏら（１９９３）ＳＣＩＥＮＣＥ　２６１：１３０３）を用いて、所望のアミノ酸４は、イソブチルクロロホルメートとの混合無水物形成、続いて水素化ホウ素ナトリウムでの還元によって、対応するアミノアルコール５へと変換される。次いで、アミノアルコールは、ｐ－ニトロフェニルクロロホルメートでの処理によって、活性化されたカルボネートへと変換されて６が得られ、６は次いで、第２のアミノアルコール７とカップリングし、以下のヒドロキシル基シリル化およびＦＭＯＣ脱保護に続いて、カルバメート８を提供する。

【０３９３】

【化８】



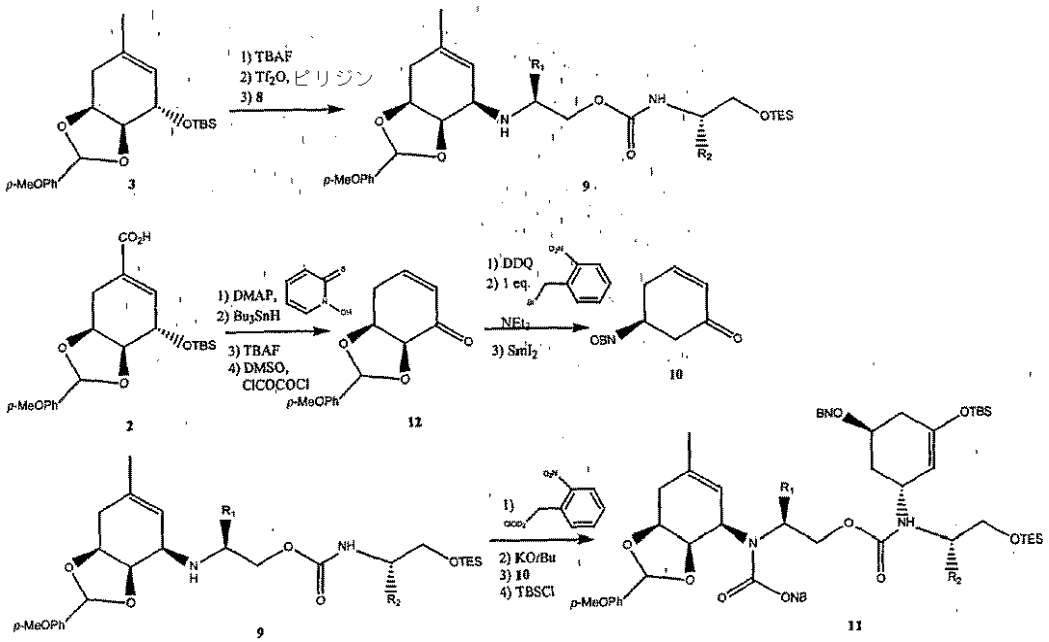
【０３９４】

シキミ酸由来リンカー上へのカルバメート８のカップリングは、以下の通りに進行する。３のアリル性ヒドロキシル基は、ｔｅｔｒａ－ブチルアンモニウムフルオリド（ＴＢＡＦ）で脱保護され、トリフレート無水物で処理されて、２級トリフレートを形成し、次いでアミノカルバメート８で置換されて９が得られる。３におけるビニル性メチル基の存在は、ＳＮ２’付加から得られる、所望でない生成物の量を最小化することを補助するはずである（Ｍａｇｉｄ（１９８０）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　３６：１９０１）。脱プロト

ン化されたカルバメートの、α，β－不飽和エステルへのＭｉｃｈａｅｌ付加は、充分に証明されている（Ｃｏｌｌａｄｏら（１９９４）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　ＬＥＴＴ．３５：８０３７；Ｈｉｒａｍａら（１９８５）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．Ｓｏｃ．１０７：１７９７；Ｎａｇａｓａｋａら（１９８９）ＨＥＴＥＲＯＣＹＣＬＥＳ　２９：１５５；Ｓｈｉｓｈｉｄｏら（１９８７）Ｊ．ＣＨＥＭ．Ｓｏｃ．９９３；Ｈｉｒａｍａら（１９８９）ＨＥＴＥＲＯＣＹＣＬＥＳ　２８：１２２９）。同様に、この二級アミンを、ｏ－ニトロベンジルカルバメート（ＮＢＯＣ）として保護し、そして得られた化合物を、カルバメート窒素において脱プロトン化する。この脱プロトン化を、代表的には、水素化ナトリウムまたはカリウムｔｅｒｔ－ブチルオキシドのいずれかを用いて実施し得る（Ｃｏｌｌａｄｏら（１９９４）前出；Ｈｉｒａｍａら（１９８５）前出；Ｎａｇａｓａｋａら（１９８９）前出；Ｓｈｉｓｈｉｄｏら（１９８７）前出；Ｈｉｒａｍａら（１９８９）前出）が、他の塩基を利用して、ニトロベンジルプロトンの脱プロトン化を最小にし得る。脱プロトン化カルバメートをα，β－不飽和ケトン１０へと付加し、続いて得られたエノラートをｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド（ＴＢＳＣｌ）でトラップすることによって、シリルエノールエーテル１１が得られるはずである。以前に見出された、５－置換エノン（例えば、１０）への共役付加の立体選択性（Ｈｏｕｓｅら（１９６８）Ｊ．ＯＲＧ．ＣＨＥＭ．３３：９４９；Ｓｔｉｌｌら（１９８１）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　３７：３９８１）は、１１が、そのジアステレオマーよりも優先的に形成されることを示唆する。ケトン１０（フッ素切断可能カルバメートホスフェートリンカーに対する前駆体）は、ワンポット脱炭酸（Ｂａｒｔｏｎら（１９８５）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　４１：３９０１）、続いてフッ化テトラブチルアンモニウム（ＴＢＡＦ）での処理、得られたアルコールのＳｗｅｒｎ酸化により１２を得ること、２，３－ジクロロ－５，６－ジシアノ－１，４－ベンゾキノン（ＤＤＱ）での脱保護、障害がより少ないアルコールの選択的ニトロベンジルエーテル形成、およびヨウ化サマリウムでα－ヒドロキシル基の還元によって、２から合成され得る（Ｍｏｌａｎｄｅｒ（１９９４）ＯＲＧＡＮＩＣ　ＲＥＡＣＴＩＯＮＳ　４６：２１１）。

【０３９５】

【化９】



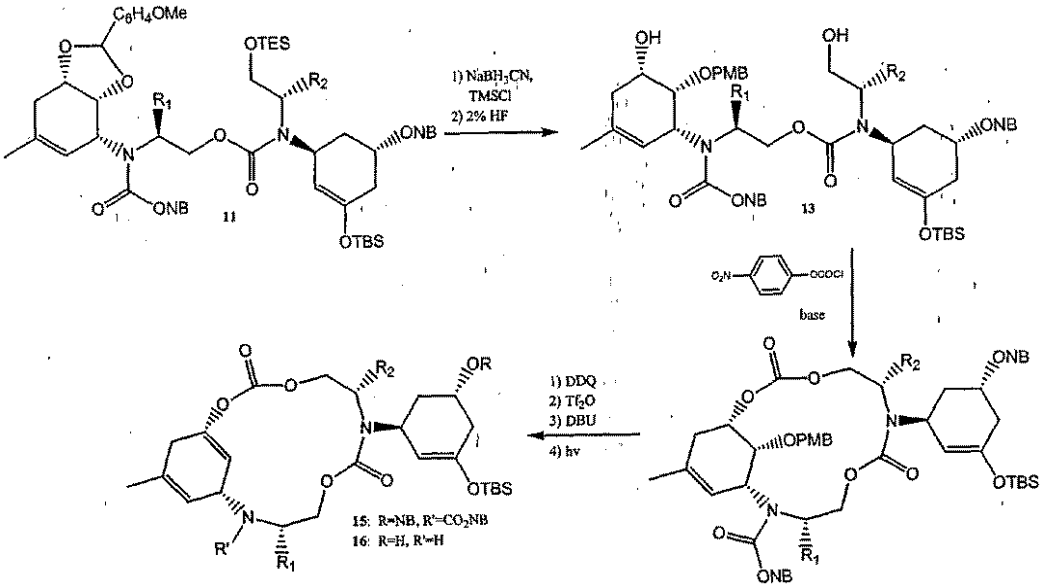
【０３９６】

１１のｐ－メトキシベンジリジエン基を、シアノ水素化ホウ素ナトリウムおよびトリメチルシリルクロリド（ＴＭＳＣｌ）を使用して、α－ヒドロキシｐ－メトキシベンジル（ＰＭＢ）エーテルに変換し（Ｊｏｈａｎｓｓｏｎら（１９８４）Ｊ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．２３７１）、そしてＴＥＳ基を、２％のＨＦを用いて脱保護化し（ＴＢＳエーテルに影響

を与えないはずの条件（Ｂｏｓｃｈｅｌｌｉら、ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　ＬＥＴＴ．２６：５２３９））、１３を得る。先例（Ｊｏｈａｎｓｓｏｎら（１９８４）Ｊ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．２３７１；Ｓｕｔｈｅｒｌｉｎら（１９９３）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　ＬＥＴＴ．３４：４８９７）によれば、ＰＭＢ基は、障害のより大きな二級アルコール上に残るはずである。２つの遊離ヒドロキシル基を、クロロ蟻酸ｐ－ニトロフェノール（または別のホスゲンアナログ）溶液への１３の非常にゆっくりとした添加により、大環状化して１４を提供し得る。ＰＭＢエーテルを脱保護し、そして得られたアルコールをトリフレートに変換し、立体障害性の塩基を用いて反応速度条件下で除去して、ビニルオキシカルボネート１５を得る。ニトロベンジルエーテルおよびニトロベンジルカルバメートの光脱保護は、アルコール１６を生じる。

【０３９７】

【化１０】

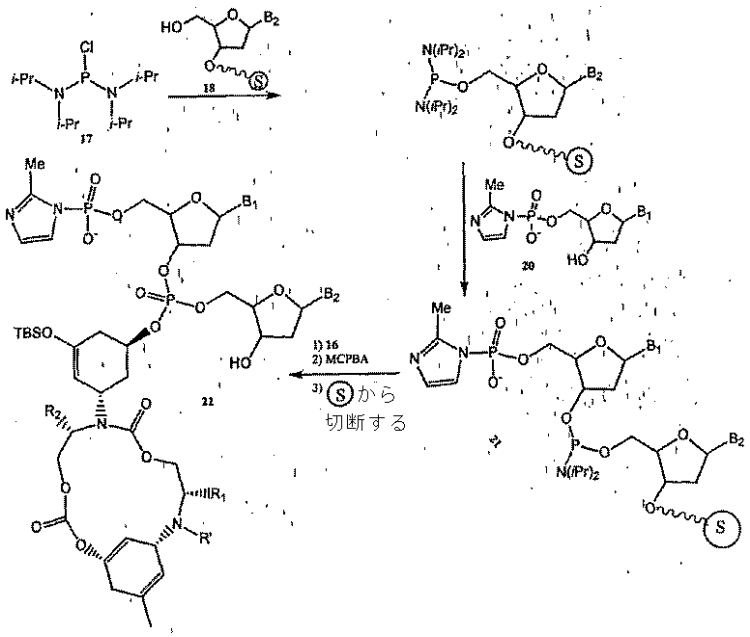


【０３９８】

モノマー合成を、３つの成分の連続的なカップリングによって完了する。クロロジイソプロピルアミノホスフィン１７を、PCl_3とジイソプロピルアミンとの反応によって合成する（Ｋｉｎｇら（１９８４）Ｊ．ＯＲＧ．ＣＨＥＭ．４９：１７８４）。樹脂結合ヌクレオシド（または３’－ｏ－ニトロベンジルエーテル保護ヌクレオシド）１８を１７にカップリングして、ホスホルアミダイト１９を得る。１９とヌクレオシド２０とのその後のカップリング（Ｉｎｏｕｅら（１９８１）Ｊ．ＡＭ．ＣＨＥＭ．ＳＯＣ．１０３：７６６６）は、２１を提供する。次いで、アルコール１６を２１と反応させ、ｍ－クロロ過安息香酸（ＭＣＰＢＡ）またはI_2を使用した慎重な酸化、続いての樹脂からの切断（または光脱保護）の後に、完成したモノマー２２を生じる。１７とアルコールとの連続的なカップリングのこのストラテジーを成功裏に使用して、３つの異なるアルコキシ置換基を保有するホスフェートを良好な収率で生成する（Ｂａｎｎｗａｒｔｈら（１９８７）ＨＥＬＶ．ＣＨＩＭ．ＡＣＴＡ　７０：１７５）。

【０３９９】

【化１１】



【０４００】

カルバメート重合を開始および終結させるために使用される独特の開始モノマーおよび停止モノマーを、上記スキームの簡単な改変によって合成し得る。

【０４０１】

（Ｂ）大環状フマルアミドライブラリー）

本実施例は、ＤＮＡテンプレート合成を用いて、低分子のライブラリーを作製し得ることを実証する。特に、図５５に示すとおり、ＤＮＡテンプレート大環状フマルアミドライブラリーを作製することが可能である。

【０４０２】

このライブラリー合成スキームは、頑強なＤＮＡテンプレートアミンアシル化および分子内Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化反応を用いて、多様で部分的に剛直な大環状フマルアミドを生成する。このフマルアミド基は中性溶液に対して安定であるが、上昇した有効モル濃度において提示された場合、求電子試薬を充分に捕捉する。それゆえ、標的タンパク質活性部位において見出される求電子試薬側鎖は、フマルアミド官能基によって共有結合によって捕捉され得る。ライブラリー合成において重要な工程は、以下である：（ｉ）スルホンリンカーを用いたＤＮＡテンプレートアミンアシル化、（ｉｉ）ジオールリンカーを用いたＤＮＡテンプレートアミンアシル化、（ｉｉｉ）ホスホランリンカーを用いたＤＮＡテンプレートアミンアシル化、および（ｉｖ）それらの対応するＤＮＡテンプレートに連結された大環状フマルアミドを得る、分子内Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化（図５５）。

【０４０３】

大環状化は、潜在的に、ライブラリー合成のうち、最も取り組みがいのある工程である。これを試験するために、７つのモデル的な工程３の基質を調製して、第３ＤＮＡテンプレート工程およびその後の大環状化を確認した（図５６）。各基質は、種々の立体障害、立体化学および骨格長さの種々のR_1基およびR_2基を含んでいた。モデル基質を、ＤＮＡテンプレートアミンアシル化条件下で、カルボン酸およびホスホランの両方を含む４つのビオチン化ＤＮＡ連結試薬のうちの１つと各々混合した。アミド結合痙性およびＷｉｔｔｉｇ大環状化の両方を評価するために、２段階精製ストラテジーを実行した。ＤＮＡテンプレートアミンアシル化の１０個の生成物（図５６および図５５における工程３）を、ストレプトアビジン連結磁気ビーズを用いた捕捉により、未反応のテンプレートから精製した。次いで、捕捉された中間体を、ｐＨ８．０の緩衝液で処理して、Ｗｉｔｔｉｇオレフィン化媒介大環状化を誘導した。大環状化は、磁気ビーズから自己溶出する、フマルアミド生成物（ビオチン化試薬オリゴヌクレオチドを欠く）を作製した。あらゆる場合に、

アミンアシル化および大環状化は、中間体における広範囲の立体多様性、立体化学的多様性および骨格多様性にもかかわらず、効率的に進行した（図５６）。６以下のｐＨ（ホスホランを形成するには低すぎる）でのコントロール反応またはｐＨ８．０であるがアルデヒド基を欠くコントロール反応は、何の生成物も溶出できなかった。まとめると、ＤＮＡテンプレートアミンアシル化－Ｗｉｔｔｉｇ大環状化の順番は、所望の大環状フマルアミドを生成するための高度に効率的な経路である。

【０４０４】

大環状化工程を確認した後、ＤＮＡテンプレート大環状フマルアミドライブラリーを合成した。パイロットライブラリーを、４×４×５＝８０の大環状分子と、カルボニックアンヒドラーゼまたはアビジンに結合することについてのポジティブコントロールとしてアリールスルホンアミド、デスチオビオチン基のいずれかもしくはその両方の基を含む３個の大環状分子とを含む８３個の大環状フマルアミドに制限した。試薬のオリゴヌクレオチドは、３’末端において連結した２つの一定の塩基がいずれかの側において、上記で報告した通り、スルホン、ジオールまたはホスホランリンカーを通してアミノアシルドナーに対して隣接した６塩基のコドンからなっていた。図５７に示した１９のＤＮＡ連結アミンアシル化試薬のうちの複数μｇの量の各々を、上記に記載の通り、市販の遊離アミノ酸、リンカー前駆体および試薬オリゴヌクレオチドから出発して、１日で作製した。構築ブロックを選択して、構造的および機能的な基の多様性をサンプリングした。この構築ブロックは、アルキル側鎖、アルケニル側鎖、アリール側鎖、極性側鎖、複素環式側鎖、負に荷電した側鎖、および正に荷電した側鎖を保有する、（Ｌ）α－アミノ酸および（Ｄ）α－アミノ酸、α，α’－二置換アミノ酸、ならびにβ－アミノ酸を包含する（図５７）。１９の試薬の各々を、１回のテンプレート反応において成功裏に試験し、そして生成物を、３０％より高い効率分散で作製した。１９の試薬は全て、高い配列特異性で反応し、５当量の試薬を用いた場合でさえ、不一致のテンプレートを用いた場合、有意な生成物を作製しなかった。

【０４０５】

大環状フマルアミドをコードするテンプレートのライブラリーを、単一の溶液中のモジュラーコード領域カセットから調製した（図５８）。全ての試薬アニーリング領域を表すオリゴヌクレオチドを、単一の溶液中で、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼと一緒に混合した。オリゴヌクレオチド末端の配列設計に起因して、所望の組み立てられたテンプレートライブラリーは、ライゲーションが完了した場合の可能な生成物のみである。所望のテンプレートライブラリーの優れた収率は、４時間のライゲーション反応から生じた。ライゲーション後、Ｔ７エキソヌクレアーゼを添加して、非コードテンプレート鎖を分解した（所望のコード鎖は、その非天然５’－アミノエチレングリコールリンカーによって保護される）。この手順は、２０ｎｍｏｌの５’官能基化された一本鎖テンプレートライブラリーを、６時間で提供した。各テンプレートの末端における一定の１０塩基プライマー結合領域は、この組み立てられた材料から、１，０００分子（10^{-21}ｍｏｌ）程度に少ないテンプレートのＰＣＲ増幅を可能にするために十分であった。３つの陽性コントロールテンプレートを添加して、８３のテンプレートを含むライブラリーを生じ、これらのテンプレートを次いで、３．０当量の、工程１の５つの試薬と混合して、第一のライブラリー合成工程を生成した。生成物を上記のように精製し、次いで、工程２のコード領域と相補的な新たな５つの試薬を用いて、第二のＤＮＡテンプレートライブラリー合成工程に供した。療法のＤＮＡテンプレートパイロットライブラリー工程の効率は、変性ゲル電気泳動およびデンシトメトリーによって、７０％を超えると判断された。

【０４０６】

工程３の前の脱保護のためのモデルとして、ＤＮＡに結合したＡｌｌｏｃカルバメートのＰｄにより媒介される脱保護を、約１当量の遊離アミノ基の切断によって判断される場合、優れた効率で実施された。各ライブラリー合成工程からの生成物を、質量分析法によって分析した。脱保護工程を排除することを望んで、出発物質における側鎖アミンの保護および脱保護の必要を試験した。なぜなら、α－アミンのより低いpK_aは、側鎖アミン

をプロトン化するｐＨでのα－アミンの選択的反応を可能にし得るからである。実際に、α－アミン基は、ｐＨ６．０において、保護されていない側鎖アミンの存在下でＤＮＡテンプレート反応において、選択的かつ効率低にアシル化され得ることが見出された。これは、工程２における第二のＤＮＡテンプレートアミド形成に続く脱保護工程に対する必要性を排除し得る。

【０４０７】

次いで、いくつかのモデル基質を合成して、第三のＤＮＡテンプレート工程および引き続く大環状化を評価した。各モデル構造は、テンプレートに結合した中間体からなり、この中間体は、種々の数の結合によって分離された遊離アミン基およびジオールリンカーを含み、ライブラリー合成の間、様々な大きさの基をシミュレートした。モデル基質を、各々、カルボン酸とホスホランとの療法を含有するいくつかのビオチン化ＤＮＡ結合試薬の１つと、ＤＮＡテンプレートアミド形成条件下（ｐＨ６．０、２０ｍＭ　ＥＤＣ、１５ｍＭ　スルホ－ＮＨＳ）で混合した。ＤＮＡテンプレートアミド形成は、６０％より高収率で進行し、そして生成物を、アビジン結合した磁気ビーズで捕捉した。ビーズに結合した生成物を、１０ｍＭ　$NaIO_4$でｐＨ８．５で処理し、ジオール切断を行った。得られたアルデヒド基を、自発的Ｗｉｔｔｉｎｇオレフィン化反応でホスホランと反応させて、ビオチン基のない環状フマルアミドを得、これは、アビジン結合ビーズから自己溶出する（図５９）。重要なことには、モデル基質の全てが、大環状化を６０％より高い収率で起こした。このことは、この反応が、種々の基質構造に許容性であることを示唆する。コントロール反応は、このフマルアミド形成が、（ｉ）過ヨウ素酸塩切断、（ｉｉ）ホスホラン基の存在、および（ｉｉｉ）首尾よいＤＮＡテンプレートアミド形成（アビジン結合ビーズ上への捕捉のために必要とされる）に依存することを確認した。

【０４０８】

（Ｃ）ＰＮＡポリマーライブラリー形成

有意な成功にもかかわらず、テンプレート依存性重合の一般性および配列特異性は、依然として、大部分が調査されていない。例えば、容易に官能基化される、リボース骨格を欠く合成モノマーの、効率および配列特異的テンプレート重合は、報告されていない。このような系は、これらの合成モノマーからなるポリマーの、現在ＤＮＡ、ＲＮＡおよびタンパク質についてのみ利用可能な翻訳（重合）、選択、および増幅の反復されるサイクルを介する進化の可能性を生じる。

【０４０９】

合成ポリマー進化のための系の最低限の要件は、以下である：（ｉ）オリゴマー化が隣接してアニールされるモノマーの間で排他的に進行することを確実にするための、距離依存的な核酸テンプレートモノマーカップリング反応；（ｉｉ）インビトロ選択のための全長産物の十分な収率を提供するための、効率的な核酸テンプレートオリゴマー化；（ｉｉｉ）ポリマー選択の間の適切なテンプレートの生存を確実にするための、各合成ポリマーの、そのコードテンプレートへの安定な結合；および（ｉｖ）あつらえの官能基をポリマーに導入するための、容易に官能基化される合成モノマー骨格。

【０４１０】

ＤＮＡテンプレート合成によってポリマーを生成する可能性を試験する目的で、ＤＮＡテンプレートアミンアシル化、Ｗｉｔｔｉｎｇオレフィン化、還元的アミノ化、およびオレフィン副分解反応を、それらがＤＮＡ配列を官能基化されたペプチド核酸（ＰＮＡ）ポリマーに翻訳する能力について試験した。産生されたＰＮＡモノマーは安定であり、そして広範な種々の官能基を含む市販のα－アミノ酸から容易に合成され得る（Ｈａａｉｍａら、（１９９６）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３５：１９３９－１９４２；Ｐｕｓｃｈｌら、（１９９８）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．３９：４７０７）。官能基化された側鎖を含むＰＮＡは、それらがＤＮＡに配列特異的にハイブリダイズする能力を保持することが公知である（Ｈａａｉｍａら、（１９９６）前出；Ｐｕｓｃｈｌら（１９９８）前出）。

【０４１１】

最初のストラテジーにおいて、ＰＮＡは、官能性ポリマーの骨格として働き、そして各モノマーの官能基を表示する。別のストラテジーにおいて、ＤＮＡテンプレートＰＮＡ重合は、反応性官能基を組織化し、これらの官能基の間での第二の重合反応（例えば、オレフィン副分解またはＷｉｔｔｉｎｇオレフィン化反応）を可能にして、目的の合成ポリマー骨格を形成する。

【０４１２】

両方のストラテジーにおいて、テンプレートは、５’官能基化された一本鎖ＤＮＡライブラリー（可変塩基の中心領域を含む、５０～２００塩基）から構成される。これらのテンプレートは、より長いテンプレートについては酵素により触媒されるライゲーションと組み合わせた、標準的な固相オリゴヌクレオチド合成によって作製される。モノマー構造は、（ｉ）ブレンステッド酸基および塩基基、（ｉｉ）求核性基および求電子性基、（ｉｉｉ）ＰＮＡ重合後副分解のために適切な結合体化オレフィン、ならびに（ｉｖ）化学的に強力な遷移金属と錯体を形成し得る、金属結合基を含む化学官能基を提供するように、選択される。これらの官能基を含む例示的なモノマー構造は、図６０に示される。各モノマーをコードするＤＮＡ塩基（これらのポリマーの「遺伝コード」）は、表１０に示される実施例から選択され、アウトオブフレームのアニーリングの可能性を生じる。これらの遺伝コードは、所望でないフレームシフトしたＤＮＡテンプレートポリマー翻訳を防止するべきである。

【０４１３】

10^{15}までの異なる配列を含む、５’官能基化ヘアピンＤＮＡテンプレートのライブラリーは、各ＤＮＡテンプレート重合の効率および配列忠誠度を最適化する条件下で、モノマーのセットと混合される。次いで、合成ポリマー鎖は、それらのＤＮＡテンプレートから、変性によって脱アニールされ、そして３’ＤＮＡヘアピンプライマーは、ＤＮＡポリメラーゼを使用して伸張され、現在は解放された一本鎖合成ポリマーに結合したヘアピンＤＮＡテンプレートを生成する（図６１）。ライブラリーは、ゲル電気泳動およびＭＡＬＤＩ質量分析法によって特徴付けられ、そして個々の代表的なライブラリーメンバーはまた、単一テンプレート反応から特徴付けられて、正確な反応効率を確認する。

【０４１４】

一旦、ＤＮＡ結合ＰＮＡのライブラリーが特徴付けられると、これらは、以下についての３つの型のインビトロ選択に供され得る：（ｉ）フォールディング、（ｉｉ）標的結合、または（ｉｉｉ）触媒作用。選択の前に、予測される金属結合能力を有するポリマーが、１つ以上の水適合性金属供給源と共にインキュベートされる。フォールディングについての選択は、実施例１０に記載される、ゲル電気泳動選択を使用して実施される。金属の存在下ではフォールディング可能であるが非存在下では不可能であるポリマーは、次の２つの型の選択のための、特に魅力的な出発点として働く。

【０４１５】

標的結合についての選択は、溶液層のポリマーライブラリーを、固定された標的またはビオチン化標的のいずれかと共に、その後、ストレプトアビジン結合したビーズとインキュベートすることによって、実施され得る。非結合剤が、洗浄によって除去され、そして所望の結合特性を有するポリマーが、化学的変性または過剰の本物の有利リガンドを添加することによって、溶出される。官能基化ＰＮＡ進化の１サイクルを完了するために、所望のＰＮＡライブラリーメンバーに対応するＤＮＡテンプレートが、５’官能基化ヘアピンプライマーを含む１つのプライマー、およびビオチン化された第二のプライマー（必要に応じて、誤りやすいＰＣＲ（Ｃａｌｄｗｅｌｌら（１９９２）、ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．１９９２，２，２８－３３）によって多様化される）を使用するＰＣＲによって、増幅され、次いで、一本鎖ＤＮＡに変性され、そしてストレプトアビジンビーズと共に洗浄されて、非コードテンプレート鎖を除去される。得られた選択された一本鎖５’官能基化ＤＮＡのプールは、進化サイクルを完了し、そして引き続く回のＤＮＡテンプレート翻訳、選択、多様化、および増幅に入る。

【０４１６】

結合形成反応または結合切断反応を触媒する合成ポリマーの選択もまた実施され得る。結合形成触媒（例えば、ヘテロディールズ－アルダー、Ｈｅｃｋカップリング、アルドール反応、またはオレフィン複分解触媒）を選択するために、官能基化ＰＮＡライブラリーメンバーが、それらの５’ヘアピン末端を介して、１つの基質に共有結合される。この反応の他方の基質は、ビオチンに結合した誘導体として合成される。ライブラリー－基質結合体の希薄溶液が、基質－ビオチン結合体と反応される場合、結合形成を触媒するライブラリーメンバーは、自己ビオチン化を誘導する。次いで、活性な結合形成触媒が、不活性なライブラリーメンバーから、前者を固定されたストレプトアビジンで細くすることによって、分離する。類似の様式で、結合切断反応（例えば、逆アルドール反応、アミド加水分解、脱離反応またはオレフィンジヒドロキシル化、引き続く過ヨウ素酸ナトリウム切断）を触媒する、官能基化されたＰＮＡもまた、選択され得る。この場合、ライブラリーメンバーは、ビオチン化された基質に結合され、その結果、結合破壊反応が、ビオチン部分のライブラリーメンバーからの脱結合を引き起こす。活性な触媒は、ストレプトアビジン結合ビーズから自己溶出するが、不活性触媒は、結合したままである。

【０４１７】

（ＰＮＡポリマーライブラリー形成の評価）

ペプチド核酸（ＰＮＡ）は、それらが配列特異的にＤＮＡを結合する公知の能力、およびそれらの合成的に接近可能なアミノ酸からの単純な調製に起因して、合成ポリマー進化のための魅力的な候補である。ＰＮＡをＤＮＡテンプレートまたはＲＮＡテンプレート上にオリゴマー化するための以前の努力は、カップリグ反応としてアミンアシル化を使用し、そして最も効率的に、かつ配列特異的に進行した（Ｂｏｅｈｌｅｒら、（１９９５）Ｎａｔｕｒｅ ３７６：５７８－５８１；Ｓｃｈｍｉｄｔら、（１９９７）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：４７９２－４７９６）。

【０４１８】

５つのＰＮＡテンプレートが、種々の水性アミンアシル化条件を使用して、相補的な２０塩基のアニーリング領域を含むＤＮＡテンプレートの存在下で混合される場合、全長ＰＮＡの適量のみの形成（収率２０％未満）（５つの連続的なカップリング反応を表す）が観察された。しかし、なおより問題があることは、テンプレートにおけるミスマッチの４塩基アニーリング領域の位置に無関係な、より高分子量の生成物の形成であった。これらの観察は、ＰＮＡが、アミンアシル化化学を使用して、隣接してアニーリングしない場合でさえもカップリングし得、予測されない生成物混合物をもたらすことを示す。

【０４１９】

ＤＮＡテンプレートアミンアシル化反応において以前に観察された距離非依存性は、アミンアシル化媒介ＰＮＡカップリングの乏しい位置選択性が起源であることが意図される。この例は、この問題を、距離非依存性アミンアシル化反応を、距離依存性のＤＮＡテンプレート反応（例えば、還元的アミノ化反応）で置き換えることによって克服することが可能であることを示す。

【０４２０】

このことを試験するために、チミン含有ＰＮＡモノマーアミノアルデヒドを合成し、そしてＥｄｅおよびＢｒａｙの方法（Ｅｄｅら（１９９７）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ ＬＥＴＴＥＲＳ ３８，７１１９－７１２２）に従って、スレオニン結合樹脂とカップリングさせた。標準的なＦＭＯＣペプチド合成を使用して、このペプチドを、３ＰＮＡモノマー伸張させ（最終配列：NH_2－ｇａｃｔ－ＣＨＯ）、そして樹脂から水性酸性切断して、所望のテトラマーペプチドアルデヒド１を得た（図６２）。

【０４２１】

５’－アミン末端ヘアピン、および１（５’－ＡＧＴＣ－３’）と相補的な５つの連続する「コドン」の反復を含むＤＮＡテンプレートを、水性のｐＨ８．５の緩衝液中８μｍの１と混合した。この反応物をアニーリングし（９５℃から２５℃）、そして$NaCNBH_3$を添加して８０ｍＭにした。この反応物を、Ｓｅｐｈａｄｅｘカラムを用いる緩衝液充填によってクエンチし、そして変性（５０％ホルムアミド中９５℃で１０分間）および

１５％変性ＰＡＧＥに供した。図６２において、レーン１および２は、出発テンプレートがほとんど完全に消費され、そしてより高分子量の生成物が、９０％を超える収率で形成されたことを示す。ＤＮＡテンプレートの除去に引き続く生成物のゲル精製は、ＤＮａｓｅＩおよびＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析を用いて、ｇａｃｔＰＡＮアルデヒドの全長ペンタマーを確認した。この結果は、ＤＮＡテンプレート還元的アミノ化が、ＰＮＡアルデヒドの非常に効率的なオリゴマー化を媒介し得ることを示す。

【０４２２】

この反応の位置特異性および配列特異性を試験する目的で、オリゴマー化反応を、種々のテンプレート配列を使用して繰り替えした。ミスマッチのＤＮＡテンプレートコドン（５’－ＡＴＧＣ－３’）が、テンプレートの第二、第三、第四、または第五の４塩基コード領域（すなわち、コドン）に導入される場合、それぞれ１の正確な１コピー、２コピー、３コピーまたは４コピーのカップリングに対応する生成物の非常に効率的な形成が観察された（図６２のレーン４～１４を参照のこと）。ミスマッチのコドンが、最初のコード位置のみに位置するか、または５つ全てのコード位置に位置する場合、生成物の形成は観察されなかった（図６２のレーン３～１５を参照のこと）。全ての場合において、第一のミスマッチコドンにおけるオリゴマー化は、ＤＮＡテンプレートＰＮＡアルデヒドカップリングが、官能基の隣接を必要とすること（すなわち、非常に距離依存性であること）、そして従って、理想的には、テンプレート重合に適切であることを示す。

【０４２３】

この系の配列特異性は、８つの異なるミスマッチコドン（ＡＴＴＣ、ＡＴＧＣ、ＡＴＣＣ、ＡＧＧＣ、ＡＧＣＣ、ＡＣＴＣ、ＡＣＧＣ、またはＡＣＣＣ）を第三のコード領域に含むＤＮＡテンプレートを使用するオリゴマーか実験を実施することによって、プローブされた。これらのコドンのうちの４つが、１つの塩基のみが、マッチした配列（ＡＴＧＣ）とは異なる場合でさえも、各場合において、１の２つのみのコピーが、テンプレートにカップリングされた（図６２のレーン５から１２を参照のこと）。この高度な配列特性は、異なるＤＮＡ配列のライブラリーが、この系（ＤＮＡテンプレート低分子系に類似）を使用して、対応するポリマーのライブラリーに忠実に翻訳される可能性を増加させる。

【０４２４】

所望の特性（例えば、結合特性または触媒特性）を有する合成ポリマーは、核酸テンプレート合成を効率よく使用して以前に達成されたものを超える長さを必要とし得ることが企図される。上記系が効率的かつ配列特異的な様式で、より長いポリマーを生成する能力を試験する目的で、上記マッチコドンまたはミスマッチコドンの１０の反復を、対応するＰＮＡアルデヒドポリマーにコードする、４０塩基のコード領域で、ＤＮＡテンプレートを翻訳した。ＰＮＡペプチドアルデヒド濃度が１６μＭであり、そしてＮａＣＮＢＨ$_3$との反応時間が１５分間であったことを除いて、重合を、図６２においてのように実施した。これらの実験の結果を、図６３に示す。ここで、レーンは、テンプレート（示される位置にミスマッチを有する）と反応物（テンプレートおよびｇａｃｔモノマー）との間で変化する。図６３が示すように、変性ＰＡＧＥとＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法との両方が、１５分後に、全長４０マーのＰＮＡの重合に対応する単一の優勢な生成物を明らかにした。ミスマッチコドンを、テンプレート上の第一のコード位置、第三のコード位置、第五のコード位置、第七のコード位置、または第九のコード位置に導入することによって、再度、短縮が生じた（それぞれ、図６３のレーン４、６、８、１０、および１２）。ＤＮＡ配列の、４０ＰＮＡ塩基（１０のカップリング）へのこの効率的な翻訳は、結合特性または触媒特性を有する、ＤＮＡおよびＲＮＡのオリゴヌクレオチドと類似の長さであるが、全体が合成構築ブロックから作製されているポリマーを提供する。

【０４２５】

配列が規定された合成ポリマーのライブラリーをこの様式で作製する挑戦的な要件は、密接に関連した配列の複数のモノマーの存在下で、配列特異性を維持することである。複数のＰＮＡ構築ブロックを単一の溶液中で使用する、ＤＮＡテンプレート重合の特異性を研究する目的で、配列ＮＨ$_2$－ｇｖｖｔ－ＣＨＯ（ｖ＝ｇ、ａまたはｃ）の９個のＰＮＡ

アルデヒドテンプレートを合成した。さらに、コドン５のｇｖｖｔに相補的な９個のコドンのうちの１つを含む、そして他の９個の位置でＡＧＴＣを含む、９個のＤＮＡテンプレートを調製した。反応条件は、$NaCNBH_3$との反応時間がさらに５分間まで短縮され、そしてインキュベーションが３７℃で行われていたことを除いて、図６３からのものと同一であった。図６４の各パネルの最初の２つのレーンは、陽性コントロール重合を示す。各さらなるセットの４つのレーンは、以下に対応する：（ｉ）２０ｐｍｏｌのテンプレート、（ｉｉ）１４．４μＭのｇａｃｔとの反応、（ｉｉｉ）１４．４μＭのｇａｃｔおよび強調されたコドンに相補的な１．６μＭのＰＮＡアルデヒドとの反応、ならびに（ｉｖ）１４．４μＭのｇａｃｔ、および０．２μＭの、強調されたコドンに相補的なＰＮＡを除く配列ｇｖｖｔの各ＰＮＡアルデヒド。予測されるように、９個のテンプレートの各々が、１がその反応（３７℃、５分間）に含まれる唯一のＰＮＡ構築ブロックである場合に１の４つのコピーへの組み込みに対応する、単一の優勢な短縮産物に翻訳された（図６４を参照のこと）。しかし、５番目のコード配列に相補的なＰＮＡアルデヒドが１に加えて含まれた場合に、全長産物が、９個全てのテンプレートについて、効率的に生成された。全てのＰＮＡアルデヒドテトラマーが、５番目のコード領域に相補的なＰＮＡを除いて、その反応に含まれる場合に、短縮産物のみが、効率的に生成された（図６４を参照のこと）。

【０４２６】

一緒になって、これらの実験は、ＤＮＡテンプレートＰＮＡアルデヒド重合が、異なるＰＮＡ構築ブロックの混合物が単一の溶液中に存在する場合でさえも、配列特異性を維持することを明らかにする。

【０４２７】

（Ｄ）進化プラスチック（Ｅｖｏｌｖｉｎｇ　Ｐｌａｓｔｉｃｓ）

本発明のなお別の実施形態において、核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、これらの誘導体）は、重合化触媒に結合される。核酸が、複合体構造に折りたたまれ得るために、その核酸は成長する高分子鎖の重合化を指向するおよび／またはその重合化に影響を与えるために使用され得る。例えば、核酸は、重合されるモノマー単位の選択、およびどのような重合化反応がおこるか（例えば、立体化学、立体規則性、活性）に影響し得る。この合成高分子は、分子量、密度、疎水性、立体規則性、立体選択性などのような特定の特性について選択され得、そしてその合成を指向する触媒の不可欠な部分を形成する核酸は、増幅され、そして進化され得る（図６５Ａ）。リガンドの多様化、選択、および増幅の繰り返しサイクルは、所望の特性への、触媒および高分子の真の進化を可能にする。

【０４２８】

例として、ＤＮＡ分子のライブラリーは、ジヒドロイミダゾールリガンドを介してＧｒｕｂｂｓのルテニウムベース開環副分解重合（ＲＯＭＰ）触媒（Ｓｃｈｏｌｌら（１９９９）、Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．１（６）：９５３）に結合され、潜在的な触媒分子の大きく、多種多様なプールを作製し、その各々は、官能化リガンドの性質によって独特である（図６５Ｂを参照のこと）。比較的大きいＤＮＡ－デヒドロイミダゾール（ＤＮＡ－ＤＨＩ）リガンドでの触媒の官能基化は、触媒の活性を変更し得る。各ＤＮＡ分子は、独自の立体電子形状（ｓｔｅｒｅｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ　ｓｈａｐｅ）にフォールディングする潜在性を有し、この形状は、潜在的に重合化反応における異なる選択性および／または活性を有する（図６６）。従って、ＤＮＡリガンドのライブラリーは、種々のモノマーの付加の際にプラスチックのライブラリーに「翻訳」され得る。特定の実施形態において、それ自体を成長高分子に共有結合的に挿入し得、従って、その作製がコードされたＤＮＡでタグ化された高分子を作製し得るＤＮＡ－ＤＨＩリガンドが、使用される。図６５Ａに示される合成スキームを使用して、デヒドロイミダゾール（ＤＨＩ）リガンドは、２つの化学操作（そのうちの１つはＤＮＡをリガンドに結合するために使用され、他方はＤＨＩ骨格にペンダントオレフィン（ｐｅｄａｎｔ　ｏｌｅｆｉｎ）を結合するのに使用される）を含んで生成される。副分解の速度は、オレフィン置換および触媒の同定に基づいて広く変化することが知られている。これらの可変基の変化を通して、ペンダントオレフィンの組

み込みの速度は、$k_{ペンダントオレフィン副分解} << k_{ROMP}$であるように調節され得、それによって、ＤＮＡタグおよび対応するポリマー末端の挿入の前に、中程度から高分子量のポリマーが形成されるのを可能にする。ビニルエーテル（ｖｉｎｙｌｉｃ ｅｉｔｈｅｒ）が、ポリマー末端を官能化するため（Ｇｏｒｄｏｎら（２０００）、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．７：９－１６）、および減少された分子量のポリマーを生成するために、ＲＯＭＰにおいて通常使用される。

【０４２９】

ライブラリーからのポリマーは、引き続いて、所望の特性に基づいて、電気泳動、ゲル濾過、遠心分離沈降、異なる疎水性の溶媒への分配などによって、選択される。誤りがちな（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲまたはＤＮＡシャッフリングのような技術を介するコード核酸の増幅および多様化、それに続くＤＨＩ骨格への接着は、選択された活性において富化された潜在的ＲＯＭＰ触媒の別のプールの生成を可能にする（図６６）。この方法は、ポリマー性材料およびそれを作製する触媒を産生するための新しいアプローチを提供する。

【０４３０】

（実施例１０：テンプレート合成による触媒の開発）

ＤＮＡを非天然の進化可能なポリマーへと翻訳する代替のアプローチは、いくつかのＤＮＡポリメラーゼが、特定の改変ヌクレオチド三リン酸基質を受け入れる能力を利用する（Ｐｅｒｒｉｎら（２００１）、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２３，１５５６；Ｐｅｒｒｉｎら（１９９９）、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １８：３７７－９１；Ｇｏｕｒｌａｉｎら（２００１）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２９：１８９８－１９０５；Ｌｅｅら（２００１）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２９，１５６５－７３；Ｓａｋｔｈｉｅｖｅｌら（１９９８）、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．３７：２８７２－２８７５）。Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ水素結合に関与しない基への改変を保有する、いくつかのデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、天然ＤＮＡテンプレートの反対側に、高い配列忠実度で挿入されることが公知である。重要なことには、改変されたヌクレオチドを含む一本鎖ＤＮＡは、ＤＮＡポリメラーゼによって触媒された、天然または改変のモノヌクレオチドの取込みに効率的なテンプレートとして役立ち得る。

【０４３１】

現在までにＤＮＡポリメラーゼによって組み込まれた官能基化ヌクレオチドを、図６７に示す。ＤＮＡポリメラーゼによる改変ヌクレオチド取込みの最も初期の例の１つにおいて、Ｔｏｏｌｅおよび共同研究者は、ＰＣＲ条件下でのＶｅｎｔ ＤＮＡポリメラーゼによる５－（１－ペンチニル）－デオキシウリジン１の受け入れ性を報告した（Ｌａｔｈａｍら（１９９４）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２：２８１７－２２）。いくつかのさらなる５－官能化デオキシウリジン（２－７）誘導体は続いて、ＰＣＲに適切な耐熱性ＤＮＡポリメラーゼによって受け入れられることが見出された（Ｓａｋｔｈｉｅｖｅｌら（１９９８）前出）。ＤＮＡポリメラーゼによって受け入れられた最初の官能化プリンであるデオキシアデノシンアナログ８は、デオキシウリジンアナログ７と一緒にＴ７ ＤＮＡポリメラーゼによってＤＮＡへと取り込まれた（Ｐｅｒｒｉｎら（１９９９）、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １８：３７７－９１）。７および８の両方を含むＤＮＡライブラリーは、金属非依存性ＲＮＡ切断活性について好首尾に選択された（Ｐｅｒｒｉｎら（２００１）、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２３：１５５６－６３）。Ｗｉｌｌｉａｍｓおよび共同研究者は、いくつかのデオキシウリジン誘導体をＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼによる受け入れ性について近年試験し、そして受け入れ性は、剛性のアルキン基またはトランスアルケン基を保有するＣ５改変ウリジンを用いた場合に最大であると結論した（例えば、９および１０（Ｌｅｅら（２００１）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２９：１５６５－７３））。Ｃ７官能化７－デアザ－デオキシアデノシンについての類似の研究（Ｇｏｕｒｌａｉｎら（２００１）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２９：１８９８－１９０５）は、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼに

よる、７－アミノプロピル－（１１）、シス－７－アミノプロペニル－（１２）、および７－アミノプロピニル－７－デアザデオキシアデノシン（１３）の受け入れ性を明らかにした。

【０４３２】

単純な一般的な酸性官能基および一般的な塩基性官能基を用いて、キラル金属中心は、核酸の化学的範囲を有意に拡張する。化学的に強力な金属中心と結合することを目的とした官能基が、これまで核酸ポリマーに組み込まれてきた。天然ＤＮＡは、標的分子を立体特異的に結合し得るか（Ｌｉｎら（１９９７）、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，４：８１７－３２；Ｌｉｎら（１９９８）、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．５；５５５－７２；Ｓｃｈｕｌｔｚｅら（１９９４）、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３５：１５３２－４７）または、リン酸ジエステル結合操作（Ｓａｎｔｏｒｏら（１９９７）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：４２６２－６；Ｂｒｅａｋｅｒら（１９９５）、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：６５５－６０；Ｌｉら（２０００）、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３９：３１０６－１４；Ｌｉら（１９９９）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６、２７４６－５１）、ＤＮＡ脱プリン化（Ｓｈｅｐｐａｒｄら（２０００）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：７８０２－７８０７）およびポルフィリンメタレーション（Ｌｉら（１９９７）、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３６：５５８９－９９；Ｌｉら（１９９６）、Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．３：７４３－７）を触媒し得る、複雑な３次元構造に折り畳まる能力を示してきた。Ｃｕ、Ｌａ、Ｎｉ、Ｐｄ、Ｒｈ、ＲｕまたはＳｃのような、化学的に強力な水適合性金属と結合する能力が増強された非天然核酸は、顕著に拡張された触媒的特性を保有し得る。例えば、十分規定された構造に折り畳まれたＰｄ結合オリゴヌクレオチドは、高度な位置特異性または立体特異性で、Ｐｄ媒介性カップリング反応を触媒する能力を保有し得る。同様に、キラルＳｃ結合部位を形成する非天然核酸は、エナンチオ選択性環化付加触媒またはアルドール付加触媒として働き得る。従って、触媒活性についてのインビトロ選択と組み合わせ、これらの非天然ポリマーへとＤＮＡ配列を翻訳するＤＮＡポリメラーゼの能力は、ランダムライブラリーからの所望の触媒の直接進化を可能にする。

【０４３３】

このアプローチで触媒を進化させることは、有機金属触媒発見への最近のコンビナトリアルのアプローチ（Ｋｕｎｔｚら（１９９９）、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．３：３１３－３１９；Ｆｒａｎｃｉｓら（１９９８）、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２、４２２－８）を刺激してきた、特定の化学的特性を用する触媒活性部位を合理的に設計する困難に取り組む。例えば、Ｈｏｖｅｙｄａおよび共同研究者らは、ペプチドリガンドの連続スクリーニングよって、Ｔｉベースのエナンチオ選択性エポキシ化触媒を同定した（Ｓｈｉｍｉｚｕら（１９９７）、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．３６）。連続スクリーニングはまた、金属カチオンと錯体化するとき、エナンチオ選択性エポキシ化触媒を形成するペプチドリガンドを同定するために、Ｊａｃｏｂｓｅｎおよび共同研究者らによって使用された（Ｆｒａｎｃｉｓら（１９９９）、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３８：９３７－９４１）。近年、ホスフィン側鎖を含むペプチドライブラリーが、Ｐｄ存在下で酢酸シクロペンテニルへのマロン酸エステル付加を触媒する能力についてスクリーニングされた（Ｇｉｌｂｅｒｓｏｎら（２０００）、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２２：６５２２－６５２３）。

【０４３４】

本発明のアプローチは、所望の特性を有する触媒が、多様化、増幅、翻訳、および選択の進化サイクル後にワンポットの溶液相ライブラリーから自発的に出現することを可能にする点で、従来のコンビナトリアル触媒の発見の試みとは根本的に異なる。このストラテジーは、10^{15}までの異なる触媒が、単一の実験で産出され、所望の特性について選択されることを可能にする。ワンポットインビトロ選択との、我々のアプローチの適合性は、金属結合または発熱のような触媒作用に関連する現象についてのスクリーニングではなく、触媒作用反応についての直接選択を可能にする。さらに、基質立体特異性または金属

選択性のような、迅速にスクリーニングすることが難しい特性は、我々のアプローチを使用して、直接選択され得る。　多くのＣ５官能基化されたウリジンアナログおよびＣ７官能基化された７－デアザアデノシンアナログに対する重要な中間体を、非天然ＤＮＡポリマーへの組み込みのために合成した。さらに、デオキシリボヌクレオチド三リン酸としての６個のＣ８官能基化アデノシンアナログの合成を完了した。

【０４３５】

（金属結合ヌクレオチドの合成）

金属結合ウリジンおよび７－デアザアデノシンアナログの合成についてのストラテジーを、図６８に示す。両経路は、金属結合官能基のＮＨＳエステルとアミノ修飾デオキシリボヌクレオチド三リン酸との間のアミド結合形成で終結する（７および１３）。アナログ７およびアナログ１３ならびに７のアセチル化誘導体は、ＰＣＲに適する熱安定性ＤＮＡポリメラーゼを含むＤＮＡポリメラーゼによって許容されることが、これまで示されてきた（Ｐｅｒｒｉｎら（２００１）前出；Ｐｅｒｒｉｎら（１９９９）前出；Ｌａｔｈａｍら（１９９４）、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　１２ｖ１ＰＲＥ　２２：２８１７－２２；Ｇｏｕｒｌａｉｎら（２００１）、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９：１８９８－１９０５；Ｌｅｅら（２００１）、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９、１５６５－７３；Ｓａｋｔｈｉｖｅｌら（１９９８）、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３７：２８７２－２８７５）。このアプローチは、幅広い種類の金属結合配位子を、いずれかのヌクレオチドアナログに迅速に取り組むことを可能にする。以前に報告された（Ｓａｋｔｈｉｖｅｌら（１９９８）前出）経路に従い、アミノ修飾されたデオキシリボヌクレオチド三リン酸７が合成されている。図６９に示されるように、Ｎ－アリルトリフルオロアセトアミドとの市販の５－ヨード－２’－デオキシウリジン（２２）のＨｅｃｋカップリングは化合物２３を生成した。トリメチルホスフェート、オキシ塩化リン（$POCl_3$）、およびプロトンスポンジ（ｐｒｏｔｏｎ　ｓｐｏｎｇｅ）（１，８－ビス（ジメチルアミノ）－ナフタレン）、その後のトリ－ｎ－ブチルアンモニウムピロホスフェートでの化合物２３の処理により、５’－三リン酸基が導入され、次いでトリフルオロアセトアミド基が水性アンモニアで除去され、Ｃ５修飾ウリジン中間体７を生成した。

【０４３６】

７－デアザアデノシンアナログについての重要な中間体であるＣ７修飾７－デアザアデノシン中間体１３を合成した。図７０に示したように、ジエトキシエチルシアノアセテート２４を、公知のプロトコル（Ｄａｖｏｌｌ（１９６０）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８２：１３１－１３８）に従って、ブロモアセタール２５およびエチルシアノアセテート２６から合成した。チオ尿素での２４の縮合により、ピリミジン２７を得、これをラネーニッケルで脱硫し、次いで希塩酸を用いてピロロピリミジン２８に環化した。$POCl_3$での２８の処理により、４－クロロ－７－デアザアデノシン２９を得た。１３におけるプロパギルアミンの配置についてＳｏｎｏｇａｓｈｉｒａカップリングパートナーとしての役割を果たすヨウ化アリール基を、２９とＮ－ヨードスクシンイミドとの反応によって組み込み、ブロモアセタール２５から１３％の全体収量中の４－クロロ－７－ヨード－７－デアザアデノシン３０を生成した。図７１は、保護したデオキシリボシルクロライド３８（図７２に示したように、デオキシリボースから生成される）を用いる、化合物３０のグリコシル化、その後の７－ヨード－アデノシン３９（Ｇｏｕｒｌａｉｎら（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９：１８９８－１９０５）を得るアンモニア分解を示す。Ｎ－プロピニルトリフルオルアセトアミドを用いる、３９のＰｄ媒介性Ｓｏｎｏｇａｓｈｉｒａカップリング（Ｓｅｅｌａら（１９９９）Ｈｅｌｖ．Ｃｈｅｍ．Ａｃｔａ　８２：１８７８－１８９８）で、４０を得、次いで、これを５’ヌクレオチド三リン酸に変換し、そしてアンモニアで脱保護して、Ｃ７修飾７－デアザアデノシン中間体１３を得る。

【０４３７】

金属結合ウリジンアナログおよび金属結合アデノシンアナログのライブラリーを作製す

るために、ＮＨＳエステルとして種々の金属結合基を、Ｃ５修飾ウリジン中間体７およびＣ７修飾７－デアザアデノシン中間体１３に結合させ得る。例示的な金属結合基は、図６８に示され、ホスフィン基、チオピリジル基、およびヘミセレン部分が挙げられる。例えば、図７３に示した化合物４１および４２のようなさらなるアデノシン誘導体は、８－ブロモ－デオキシアデノシン（３１）に対してアルキルトリフルオロアセトアミドおよびビニルトリフルオロアセトアミドをカップリングすることによって調製され得る。次いで、これらの中間体を、図６８に示したＮＨＳエステルで結合させて、種々の金属結合８－官能化デオキシアデノシン三リン酸を生成する。

【０４３８】

ＤＮＡポリメラーゼ受容の構造的要件の調査し、かつ潜在的な金属結合官能基を提供する代替的な官能化アデニンアナログとして、６個の８修飾デオキシアデノシン三リン酸（図７４）を合成した。すべての官能基を、８－ブロモ－デオキシアデノシン（３１）に付加することによって組み込み、これを、塩化スカンジウム（$ScCl_3$）の存在下でデオキシアデノシンを臭素化することによって調製し、これが、生成物収量を非常に増加させることを見出した。メチルアデノシン（３２）、エチルアデノシン（３３）、およびビニルアデノシン（３４）を、対応するアルキルスズ試薬と３１とのＰｄ媒介性Ｓｔｉｌｌｅカップリング（Ｍａｍｏｓら（１９９２）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３３：２４１３－２４１６）によって合成した。メチルアミノアデノシン（３５）（Ｎａｎｄａｎａｎら（１９９９）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４２：１６２５－１６３８）、エチルアミノアデノシン（３６）、およびヒスタミノアデノシン（３７）を、水中またはエタノール中の対応するアミンを用いて２３を処理することによって調製した。３２～３７の５’ヌクレオチド三リン酸を、上記のように合成した。

【０４３９】

（ポリメラーゼによるヌクレオチドの受容）

図７５に示した金属結合官能基を含む修飾ヌクレオチド三リン酸の、ＤＮＡポリメラーゼ酵素によって受容される能力を研究した。合成ヌクレオチド三リン酸を、イオン交換および逆相ＨＰＬＣによって精製し、そしてＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼ、３種の天然のデオキシヌクレオチド三リン酸、ｐＵＣ１９テンプレートＤＮＡ、および２種のＤＮＡプライマーを含むＰＣＲ反応物に加えた。プライマーを、長さが５０塩基対～２００塩基対の範囲のＰＣＲ産物を生成するように選択した。コントロールのＰＣＲ反応物は、４種の天然のデオキシヌクレオチド三リン酸を含み、そして非天然のヌクレオチドを含まなかった。ＰＣＲ反応物を、ゲル電気泳動によって分析し、そしてその結果は、官能化ウリジンアナログ２、３、７、１３、２８、２９、および３０が、３０回のＰＣＲサイクルにわたってＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼによって効率良く取り込まれたが、ウリジンアナログ３１および３２は、効率良く取り込まれなかったことを示した（図７５を参照のこと）。これらの結果は、金属結合官能基を含む合成ヌクレオチドが、鋳型として読み取られ得、かつ構築ブロックとしてＤＮＡポリメラーゼを使用して非天然の核酸中に取り込まれ得ることを実証する。８修飾アデノシン三リン酸３２および３３は、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼによって受容されなかった。このことは、Ｃ８での修飾の拒絶の可能性を示唆する(図７５を参照のこと)。

【０４４０】

特になお興味深い官能化ヌクレオチドは、Ｔａｑ耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｆｕ耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ、またはＶｅｎｔ耐熱性ＤＮＡポリメラーゼとマッチせず、これらを、他の市販のＤＮＡポリメラーゼ（Ｅ．ｃｏｌｉ ＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗフラグメント、Ｔ７ ＤＮＡポリメラーゼまたはＴ４ ＤＮＡポリメラーゼ、あるいはＭ－ＭｕＬＶ逆転写酵素が挙げられる）を使用して、プライマー伸長に関与するそれらの能力について試験し得る。

【０４４１】

（ポリマーライブラリーの生成）

ＤＮＡポリメラーゼにマッチする合成金属結合ヌクレオチドを含む非天然ポリマーライ

ブラリーを、作製した。２つのプライマー結合領域に挟まれた４０個のランダム塩基からなりかつ図７６に示したイミダゾール結合チミン塩基を含む、10^{15}個の様々な修飾核酸のライブラリーを作製した。これらのライブラリーを、３種の方法：標準的なＰＣＲ、誤りがちの（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲ、および大量のテンプレートと化学量論的量のたった１種のプライマーを使用するプライマー伸長によって効率良く生成した。得られる二本鎖ライブラリーを変性し、そして上記に記載したアビジンベースの精製系を使用して、所望の鎖を単離した。Cu^{2+}の存在下でのみ折りたたまるポリマーについて、このライブラリーにおける２ラウンドのインビトロ選択を、折りたたまれた核酸についてのゲル電気泳動を使用して実施した。

【０４４２】

最も有望なポリメラーゼ受容性金属結合ヌクレオチド（２８～３０（図７５）が挙げられる）を含む核酸のライブラリーもまた、生成し得る。ライブラリーは、ＰＣＲ増幅によってか、または２つの１５塩基定常プライミング領域に挟まれた２０ヌクレオチド～４０ヌクレオチドのランダム領域からなる合成ＤＮＡテンプレートライブラリーのプライマー伸長によって生成し得る（図７７）。プライミング領域は、プールのまたは個々のライブラリーメンバーのＤＮＡ配列決定を可能にするために、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む。一方のプライマーは、その５’末端に一次アミン基を含み、ライブラリーの暗号鎖になる。他方のプライマーは、ビオチン化５’末端を含み、非暗号鎖となる。ＰＣＲ反応物は、１種または２種の非天然金属結合デオキシリボヌクレオチド三リン酸、３種または２種の天然のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、および非天然のヌクレオチドにマッチするＤＮＡポリメラーゼを含む。ＰＣＲの後にライブラリーの二本鎖が生成され、次いで、ライブラリーメンバーを変性し、そして非暗号鎖をストレプトアビジンが結合した磁気ビーズで洗浄することによって除去して、ライブラリー中にビオチン化した鎖が残っていないことを確認した。10^{15}までの様々なメンバーのライブラリーが、この方法によって生成され得、この方法は、以前に報告されたコンビナトリアル金属結合触媒の発見研究に関する組み合わせの多様性を大きく上回る。

【０４４３】

次いで、各々のライブラリーを、水溶液中で、以下の非限定的な水適合性金属塩リストからの目的の金属と共にインキュベートする：$ScCl_3$、$CrCl_3$、$MnCl_2$、$FECl_2$、$FeCl_3$、$CoCl_2$、$NiCl_2$、$CuCl_2$、$ZnCl_2$、$GaCl_3$、YCl_3、$RuCl_3$、$RhCl_3$、Na_2PdCl_4、$AgCl$、$CdCl_2$、$InCl_3$、$SnCl_2$、$La(OTf)_3$、$Ce(OTf)_3$、$Pr(OTf)_3$、$Nd(OTf)_3$、$Sm(OTf)_3$、$Eu(OTf)_3$、$Gd(OTf)_3$、$Tb(OTf)_3$、$Dy(OTf)_3$、$Ho(OTf)_3$、$Er(OTf)_3$、$Tm(OTf)_3$、$Yb(OTf)_3$、$Lu(OTf)_3$、$IrCl_3$、$PtCl_2$、$AuCl$、$HgCl_2$、$HgCl$、$PbCl_2$、および$BiCl_3$（Ｋｏｂａｙａｓｈｉら（１９９８）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２０：８２８７－８２８８；Ｆｒｉｎｇｕｅｌｌｉら（２００１）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２００１：４３９－４５５）。金属は、部分的に、触媒されるべき特定の化学反応に基づいて選択される。例えば、Ｌｅｗｉｓ酸によって触媒されることが公知のアルドール縮合またはヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ反応のような反応を目的としたライブラリーは、$ScCl_3$と共にか、またはランタニドトリフレートのうちの１種と共にインキュベートされる（Ｆｒｉｎｇｕｅｌｌｉら（２００１）前出）。他の事例において、目的の変換を触媒することがこれまでに公知でない金属もまた、前例のない活性を有するポリマーを発展させるために使用される。金属とインキュベートしたライブラリーは、結合していないより小さな反応成分から２５塩基またはそれより長いＤＮＡオリゴヌクレオチドを分離するゲル濾過カートリッジ（例えば、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓから入手可能）を使用して、結合していない金属塩から精製される。

【０４４４】

ポリマーライブラリー（または個々のライブラリーメンバー）の、目的の金属に結合す

る能力は、結合していない金属を含まない金属化ライブラリーを、様々な金属の存在下ではっきりと着色する金属染色試薬（例えば、ジチオオキサミド、ジメチルグリオキシム、またはイソチオシアネートカリウム（ＫＳＣＮ）（Ｆｒａｎｃｉｓら（１９９８）Ｃｙｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：４２２－８）もしくはＥＤＴＡ（Ｚａｉｔｏｕｎら（１９９７）Ｊ．Ｐｈｙｓ．Ｃｈｅｍ．Ｂ　１０１：１８５７－１８６０））で処理することによって確認する。金属結合の概算レベルを、金属を含まない既知濃度の溶液、およびＥＤＴＡ基を含む（これは、Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡから市販のホスホラミダイトを使用して導入され得る）ポジティブコントロールのオリゴヌクレオチドの溶液との分光光度比較によって測定する。

【０４４５】

（核酸ポリマーの選択）

一旦、官能化ＤＮＡのライブラリーを、合成し特徴付けすると、これらは、（ｉ）折りたたみ、（ｉｉ）標的結合性、または（ｉｉｉ）触媒作用について、３つの型のインビトロ選択に供される。

【０４４６】

（ｉ）折りたたみ。非変性ゲル電気泳動は、本発明の修飾核酸のライブラリーを適用するために、目的の特定の金属の存在下で核酸の折りたたみについて選択するために、簡便な選択として使用され得る。将来のライブラリーメンバーと類似する分子において、この選択アプローチを試験するために、公知であるか（Ｓｃｈｕｌｔｚｅら（１９９４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３５：１５３２－１５４７）または非常に複雑に折りたたまれた状態であると予測される（ＳａｎｔａＬｕｃｉａ（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：１４６０－１４６５）３種の６０塩基ＤＮＡオリゴヌクレオチドを合成した。各々のオリゴヌクレオチドは、２つの１５塩基プライマー結合配列に挟まれた、コアの３０塩基配列を含んだ。構造化されていないコントロールオリゴヌクレオチドは、ポリＴコアおよびＥｃｏＲ　Ｉ制限部位を含んだ。完全に反転した繰り返しを含む第２のコア配列は、非常に安定したヘアピンを形成することが予測され、一方で、ポリＧコアを含む第３のコア配列は、溶液中で分子内Ｇカルテットへと折りたたまれることが公知である（Ｃｈｅｎｇら（１９９７）Ｇｅｎｅ　１９７：２５３－２６０）。３種のＤＮＡ配列を、等モル比で混合し、そしてその混合物を、調製用の非変性ゲル電気泳動に供した。ＤＮＡのうち移動度の大きい部分を回収し、そして分析用の電気泳動によって比較して、ポリＴオリゴヌクレオチド、ヘアピンオリゴヌクレオチド、およびポリＧオリゴヌクレオチドを確認した。この結果は、折りたたまれたＤＮＡが、折りたたまれたＤＮＡ分子と折りたたまれていないＤＮＡ分子との混合物から、非変性ゲル電気泳動によって容易に分離され得ることを示す。この選択アプローチは、金属結合ポリマーライブラリーに対して適用され得、ここで、金属結合能が予測されるポリマーは、選択前に、１以上の水適合性金属供給源と共にインキュベートされる。金属の存在下で折りたたまれ得るが、金属の非存在下では折りたたまれ得ないポリマーは、次の２つの型の選択に対して、特に魅力的な開始点としての役割を果たす。

【０４４７】

（ｉｉ）標的結合性。標的結合性についての選択は、溶液相ポリマーライブラリーを、固定化した標的またはビオチン化した標的のいずれかと共にインキュベートし、その後、ストレプトアビジンが結合したビーズとインキュベートすることによって実施され得る。結合しないものを洗浄によって取り除き、そして所望の結合特性を有するポリマーを、化学変性によってかまたは過剰な真の遊離リガンドを添加することによって溶出する。官能化ＤＮＡ進化の１回のサイクルを完了するために、そのＤＮＡテンプレートを、５’官能化ヘアピンプライマーを含む１種のプライマー、およびビオチン化した第２のプライマーを使用して、ＰＣＲによって増幅させ、必要に応じて、誤りがちなＰＣＲ（Ｃａｌｄｗｅｌｌ（１９９２）ＰＣＲ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ａｐｐｌｉｃ．２：２８－３３）によってか、または非相同的ランダム組換え法によって多様化させ、次いで、一本鎖ＤＮＡに変性させ、そしてストレプトアビジンビーズで洗浄して、非コーディングテンプレート鎖を除去

する。得られる選択した一本鎖の、５’官能化ＤＮＡのプールは、進化のサイクルを完了し、そしてその後のＤＮＡをテンプレートとする翻訳、選択、多様化、および増幅のラウンドに入る。

【０４４８】

（ｉｉｉ）触媒作用。結合形成反応または結合切断反応を触媒する合成ポリマーについての選択が、実施され得る。実質的に、２つの基質分子間の結合形成を引き起こす反応、または２つの生成物分子への結合の切断を生じる反応を触媒するライブラリーメンバーは、図１２および１３に提示したスキームを使用して選択され得る。図１２に示したように、結合を形成する触媒（例えば、ヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ触媒、Ｈｅｃｋカップリング触媒、アルドール反応触媒、またはオレフィン移動触媒）について選択するために、ライブリーメンバーは、一方の基質に、その５’アミノ末端またはチオール末端を介して共有結合される。その反応の他方の基質は、ビオチンに結合する誘導体として合成される。ライブラリー－基質結合体の希釈溶液を、基質－ビオチン結合体と反応させる場合、結合形成を触媒するライブラリーメンバーは、ビオチン基をそれらに共有結合させる。次いで、活性な結合形成触媒は、固定化したストレプトアビジンで固定化し、そして不活性なポリマーを洗浄して除くことによって不活性なライブラリーメンバーから分離され得る。例として、活性なＨｅｃｋカップリング触媒、活性なヘテロディールスアルダー触媒、および活性なアルドール付加触媒が、それぞれ、図７８Ａ，７８Ｂ、および７８Ｃに示したように実施され得る。

【０４４９】

類似の様式において、結合切断反応（例えば、過ヨウ素酸の切断に続く、逆アルドール反応、アミド加水分解、脱離反応、またはオレフィンジヒドロキシル化）を触媒するライブラリーメンバーもまた、図１３に示したように選択され得る。この場合において、金属化ライブラリーメンバーは、ビオチン化基質に共有結合し、その結果、結合切断反応が、ライブラリーメンバーからのビオチン部分の切断を引き起こす。反応条件下でのインキュベートの際に、不活性なライブララリーメンバーではなく活性な触媒が、それらのビオチン基の損失を誘導する。次いで、ストレプトアビジンが結合したビーズを使用して、不活性なポリマーを回収し、その間に、活性な触媒をビーズから溶出させ得る。関連する結合形成および結合切断選択は、触媒性ＲＮＡ進化および触媒性ＤＮＡ進化において首尾よく使用され得る（Ｊａｅｓｃｈｋｅ（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ、４：２５７－６２）。これらの選択は、複数の繰り返し触媒について明確に選択しないが、このような様式で選択されたＲＮＡおよびＤＮＡは、一般的に、それらの基質部分から分離された場合には、複数の繰り返し触媒であることが証明されている（Ｊａｅｓｃｈｋｅら（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．４：２５７－６２；Ｊａｅｇｅｒら（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：１４７１２－７；Ｂａｒｔｅｌら（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１４１１－８；Ｓｅｎら（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：６８０－７）。

【０４５０】

３種の重要かつ多様な結合形成反応（Ｈｅｃｋカップリング、ヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ付加環化、およびアルドール付加）の触媒が、本明細書中に記載される技術を使用して作製され得ることが意図される。３種すべての反応は、水適合性であり（Ｋｏｂａｙａｓｈｉら（１９９８）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２０：８２８７－８２８８；Ｆｒｉｎｇｕｅｌｌｉら（２００１）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２００１：４３９－４５５；ＬＩら（１９９７）Ｏｒｇａｎｉｃ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｑｕｅｏｕｓ Ｍｅｄｉａ）、そして金属によって触媒されることが公知である。

【０４５１】

（進化する官能化ＤＮＡポリマー）

各々の選択のラウンドの後に、活性なライブラリーメンバーを、非天然のヌクレオチドを用いるＰＣＲによって増幅し得、そしてさらなる選択のラウンドに供して、所望の触媒作用についてライブラリーを富化する。ライブラリーは、誤りがちなＰＣＲを使用するラ

ンダムな変異誘発によってか、または非相同組換えによって多様化され得、そして選択前および選択後に、ＤＮＡ配列決定によって特徴付けられ得る。誤りがちなＰＣＲは、通常のＰＣＲよりも本質的に効率が低いので、誤りがちなＰＣＲは、天然のヌクレオチドのみを用いて行われる。次いで、変異誘発したＤＮＡ鋳型を、上記のように非天然の核酸ポリマーに翻訳する。

【０４５２】

単純に進化する活性触媒に加えて、本明細書中に記載されるインビトロ選択は、現在の触媒発見アプローチを使用して達成するのが困難な特性を有する触媒を進化させるために使用され得る。例えば、触媒間の基質特異性は、所望の基質の存在下で活性な触媒について選択し、次いで、１以上の所望でない基質の存在下で不活性な触媒について選択することによって進化され得る。この戦略を使用して、前例のない位置選択性および立体選択性を有する触媒のライブラリーを進化させ得ることが意図される。例として、公知の触媒によって現在達成されておらず、そしてまた現在の触媒発見法によって解決されそうもない４つの型の基質特異性としては：（ｉ）パラ－クロライドで作用するがメタ－クロライドで作用しないＨｅｃｋ触媒、（ｉｉ）エノレートアクセプターとしてケトンを受容するがアルデヒドは受容しないアルドール触媒、（ｉｉｉ）オレフィン求ジエン体を拒否するヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ触媒、および（ｉｖ）トランス－トランス末端ジエンを受容するがシス－トランス末端ジエンを受容しないヘテロＤｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ触媒、が挙げられる。重要な立体的かつ電子的な基の整列した三次元配置を含む金属結合ポリマーは、理想的には、このような問題を解決するのに適し得る。同様に、金属選択性は、所望の金属の存在下で活性な触媒について選択し、そして所望でない金属の存在下での活性に対して選択することによって進化され得る。広範な基質寛容性を有する触媒は、連続的な選択ラウンド間の基質構造を変化させることによって進化され得る。上記の方法によって進化された触媒の特徴付けは、強力かつ前例のない選択性を有する類似の低分子触媒の開発に新たな洞察を提供し得る。

【０４５３】

さらに、ＤＭＦおよびCH_2Cl_2中での配列特異的なＤＮＡテンプレート型合成の考察は、ＤＮＡテトラアルキルアンモニウムカチオン複合体が、有機溶媒中で塩基対構造を形成し得ることを示唆する。これらの知見は、わすかに改変したバージョンの上記の選択を使用して、有機溶媒中で非天然の核酸触媒を進化させる可能性を向上させる。実際の結合形成選択反応および結合切断選択反応は、有機溶媒中で行われ、次いで、粗反応物をエタノール沈殿して、テトラアルキルアンモニウムカチオンを除去し、そして水溶液中で、ビオチン化したライブラリーメンバーとビオチン化していないライブラリーメンバーとの固定化アビジン分離を実施する。次いで、選択したライブラリーメンバーのＰＣＲ増幅を、上記のように行う。有機溶媒中で機能する反応触媒の連続的進化は、触媒され得る反応の範囲、および得られる進化した非天然ポリマー触媒の有用性の両方を大幅に拡大する。

【０４５４】

（実施例１１：タンパク質結合性および親和性についてのインビトロ選択）

本実施例は、タンパク質結合親和性を有する、核酸に結合した合成低分子についてのインビトロ選択が実施され得ることを実証する。これらの選択は、（ｉ）タンパク質結合性について、これまでに報告された合成分子スクリーニングよりも非常に大きな感度（10^{-20}ｍｏｌ）を提供し、（ｉｉ）迅速に反復して、10^6倍よりも大きい活性分子の正味の富化を達成し得、そして（ｉｉｉ）結合特異性について選択するのに適し得る。

【０４５５】

選択におけるすべての分子が同時に処理されるので、選択は、スクリーニングよりも非常に高い潜在的スループットを提供する。選択は、代表的には、洗練された装置を必要とせず、そして所望の分子の正味の富化を増加させるために反復され得る。結合特異性のような特定の特性は、スクリーニングするのは困難であるが、容易に選択され得る。最終的に、研究成果および天然の選択は、通常は、増幅可能な核酸に関連付けられ、選択がスクリーニングよりもはるかに高い感度を提供することを可能にする。オリゴヌクレオチドの

、対応する合成分子への共有結合は、核酸を鋳型とした有機合成の結果としてか、または合成分子への核酸の結合の結果としてのいずれかで、合成分子が選択され、次いで同定されることを可能にする。これらの魅力にもかかわらず、合成分子についての選択は、ほとんど開発されていない。

【０４５６】

最初に、３６塩基～４２塩基のＤＮＡオリゴヌクレオチドに結合した種々の合成低分子（図７９を参照のこと）を、各々の低分子が、固有のＤＮＡ配列に連結するように合成した。その低分子を、６種のタンパク質に対するそれらの公知の結合親和異性について（図７９を参照のこと）か、または結合しないネガティブコントロールとしてのいずれかで選択した。ＤＮＡ結合タンパク質リガンドとＤＮＡ結合ネガティブコントロールとを含む溶液を使用して、タンパク質結合活性を有するライブラリーメンバーの小画分を含む、ＤＮＡテンプレート型合成低分子ライブラリーを刺激した。

【０４５７】

タンパク質親和性についての選択を、ＤＮＡに結合した合成低分子の混合物を、ビーズに共有結合した標的タンパク質と共に１～２時間インキュベートすることによって実施した。結合しないものを、大量の塩緩衝液でビーズを洗浄することによって除去した。次いで、結合した分子をＰＣＲ増幅して、選択で残存したＤＮＡオリゴヌクレオチドを増幅した。公知のタンパク質リガンドをコードする配列を、ＤＮＡコード化と区別した。結合しなかったものを配列特異的な制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、それらの相対比をゲル電気泳動および濃度測定によって定量可能にした。各々の選択の効率を、ＤＮＡ結合非結合物（「富化因子」）に対してＤＮＡ結合タンパク質リガンドが富化された程度によって評価した。

【０４５８】

考慮したタンパク質－低分子相互作用の間で、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）に対するグルタチオンアミドの結合性は、最も低い親和性（K_d＝約１０μＭ）の間であり、従って、ＤＮＡに結合した合成低分子についてのタンパク質結合性選択のストリンジェントな試験を示す。これらの選択の感度および効率を測定するために（図８０を参照のこと）、ＤＮＡに結合したグルタチオン分子（１）の数を10^3分子～10^7分子に変化させた。１００倍～10^6倍モル過剰のネガティブコントロールであるＮ－ホルミル－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ結合ＤＮＡ（２）を、（１）と結合させ、そして得られた混合物を、ＧＳＴを結合させたアガロースビーズへの結合性について選択した。この選択は、ネガティブコントロールと比べて、１００倍～10^4倍強く、わずか１０，０００コピーのＤＮＡに結合したグルタチオンを富化した（図８０）。選択の間、ＤＮＡに結合した分子の濃度はμＭ未満であったが、ＧＳＴが、約１０μＭを超える有効濃度で固定されており、そのため、（１）の有意な画分がＧＳＴへの結合を維持することが可能であったので、この選択は成功であった。これらの結果は、適度なタンパク質親和性（例えば、K_d＝約１０μＭ）についての選択が、この形式において可能であることを実証する。

【０４５９】

このアプローチの一般性を評価するために、類似の選択を、ＧＳＴに加えて、ストレプトアビジン、脱炭酸酵素、パパイン、トリプシン、およびキモトリプシンについて実施した（図７９）。総合的に、これらの６つの機能的に多様なタンパク質は、図７９に示したリガンドに、８桁を超える大きさに広がる予測された親和性（K_d＝約１４μＭ～約４０ｆＭ）を伴って結合する（Ｄ’Ｓｉｌｖａ（１９９０）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２７１：１６１－１６５）（Ｊａｉｎら（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：２１００－２１０５；Ｇｒｅｅｎ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚ．１８４：５１－６７；Ｏｔｔｏら（１９９７）Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．９７：１３３－１７２）。これらの事象の各々において、選択富化された10^{-16}ｍｏｌ以下の公知の低分子リガンドは、結合していないネガティブコントロールに対して少なくとも５０倍までででＤＮＡに結合した（図７９）。このことは、ＤＮＡ結合体が、図７９におけるリガンドが、それらの同族のタンパク質標的に結合する能力を損なわないことを示し、そしてこれらの選択が、広範な無関係のタンパ

ク質に対して適用可能であり得ることを示唆する。

【０４６０】

さらに、選択は、所望の分子の正味の富化を増加させるために繰り返され得る。ＤＮＡに結合した合成分子を用いる可能性を試験するために、ＤＮＡに結合したフェニルスルホアミド（３）：ＤＮＡに結合したＮ－ホルミル－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ（２）の１：１，０００混合物を、脱炭酸酵素への結合性についての選択に供した。第１の選択で残存する分子を溶出し、そして新たに固定した脱炭酸酵素を使用する第２の選択に直接供した。ＰＣＲ増幅および制限消化は、選択の第１ラウンドが、１：３の比の（３）：（２）を産生したことを明らかにした。これは、ＤＮＡに結合したフェニルスルホンアミドについて３３０倍の富化を示す。選択の第２ラウンドは、さらに、３０倍を超えるまで３を富化し、その結果、選択の２回のラウンド後に、（３）：（２）の比は、１０：１（10^4倍を超える正味の富化）を上回った。同様に、３ラウンドの繰り返し選択を使用して、（３）：ＤＮＡに結合したビオチン（４）の１：10^6の開始比を、予めＤＮＡに結合したフェニルスルホンアミド（３）を含む溶液中に、５×10^6だけ富化した（図８１を参照のこと）。これらの知見は、ＤＮＡに結合した合成分子についての大変な正味の富化が、繰り返し選択を通して達成され得ることを実証し、そしてＤＮＡテンプレート型合成ライブラリー内の10^6（現在、単一のライブラリーにおいて生成され得る、異なる低分子のおよそ最も多い数）中のわずか一部を表す所望の分子が、この様式において効率良く単離され得ることを示唆する。

【０４６１】

結合親和性に加えて、結合特異性が、合成分子に関して広く重要な特性である。結合特異性についてのライブラリースクリーニング法は、代表的には、目的の各標的または非標的についての完全なスクリーニングを繰り返すことを必要とする。対照的に、特異性についての選択は、原則として、単一の実験において、１以上の非標的に対する標的結合性ならびに結合不能について選択することによって実施され得る。ＤＮＡに結合した合成低分子の間の特異性についての選択を確認するために、ＤＮＡに結合したビオチン（４）、ＤＮＡに結合したキモスタチン（５）、およびＤＮＡに結合したアンチパイン（６）を、それぞれ、２４：４：１の比で単一溶液中に混合した。ビオチンは、キモトリプシンまたはパパインに対して有意な親和性を有さないので、キモスタチンは両方のプロテアーゼに結合し、そしてアンチパインはパパインのみに結合する（図８２を参照のこと）。この混合物は、主に非結合性分子を含むライブラリーを、非特異的な結合物の微量画分で、そして標的に特異的な結合物のより小さい画分でさえ刺激する。

【０４６２】

この混合物を、パパインに対する結合性について選択の２回のラウンドに供した場合、５および６の両方が、予期したように、４を犠牲にして富化された（図８２）。しかし、上記の混合物を、キモトリプシンが結合したビーズで洗浄し、そして過剰な遊離のキモトリプシンの存在下でパパインに対する結合性について選択した場合、パパインに特異的なリガンド（６）のみが富化された（図８２）。上記の選択が、単一の溶液から標的に特異的なＤＮＡに結合した合成分子と非特異的なＤＮＡに結合した合成分子を分離する能力は、関連するタンパク質（例えば、キナーゼ、プロテアーゼ、またはグリコトランスフェラーゼ）の大きなファミリーのうちの単一のメンバーに排他的に結合し、そして一般に低分子の生物学的効力を減少させる（例えば、それらを隔離するか、外へ出するか、または代謝することによって）タンパク質に結合しない合成分子を発見することに対するそれらの使用を示唆する。

【０４６３】

要約すると、本実施例は、タンパク質結合活性を有するＤＮＡに結合した合成低分子についてのインビトロ選択を実施することの実行可能性を実証する。核酸テンプレート型（または核酸に結合した）ライブラリーに対して本明細書で開発した方法の適用は、これまでは生物学的分子に対してのみ利用可能であった強力な選択および増幅戦略を使用して、所望の特性を有する合成分子の発見において、重要な役割を果たし得る。

【０４６４】
（材料および方法）
（ＤＮＡ合成）
ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、標準的なホスホラミダイトプロトコルを使用して、ＰｅｒＳｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｅｘｐｅｄｉｔｅ　８０９０　ＤＮＡ合成機で合成した。すべての試薬は、Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡから購入した。グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）選択のためのテンプレートは、５’－アミノ修飾因子Ｃ１２を使用して合成し、そして他のすべてのテンプレートは、５’－アミノ修飾因子Ｃ５を使用して合成した。
【０４６５】
（化合物（１）の合成）
グルタチオンを、標準的なＢｏｃ化学を使用して、室温にて固相上で合成した。２００ｍｇ　ＰＡＭ樹脂（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｃｈｅｍ　Ｔｅｃｈ）を、２ｍＬ　ＤＭＦ中で２０分間膨潤させた。Ｎ－Ｂｏｃ－グリシン（Ｓｉｇｍａ、６４０μｍｏｌ、１１２ｍｇ）、ジイソプロピルカルボジイミド（５７０μｍｏｌ、８９μＬ）、および４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ、５７μｍｏｌ、７ｍｇ）を、樹脂に加え、そして４時間攪拌した。樹脂を、ＤＭＦで洗浄し、次いで、ＤＭＦ／CH_2Cl_2（１：１）で洗浄した。Ｎ－Ｂｏｃ保護基を、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）：ｍ－クレゾール（９５：５）の３分間の洗浄を２回行って除去した。次いで、樹脂を、ＤＭＦ：CH_2Cl_2（１：１）およびＤＭＦ：ピリジン（１：１）で洗浄した。８００μＬの１－メチル－２ピロリジノン中の、Ｎ－Ｂｏｃ－Ｃｙｓ（Ｆｍ）－ＯＨ（ＣｈｅｍＩｍｐｅｘ、８００μｍｏｌ、３２０ｍｇ）、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ェート（Ａｌｄｒｉｃｈ、７２０μｍｏｌ、２７４ｍｇ）、２，６－ルチジン（１．２ｍｍｏｌ、１３１μｌ）およびＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ、７５０μｍｏｌ、１３１μｌ）の溶液を、１５分間攪拌し、そして樹脂に加え、３０分間攪拌した。次いで、樹脂をＤＭＦ／CH_2Cl_2（１：１）で洗浄した。システイン上のＮ－Ｂｏｃ保護基を除去するために、１．７５ｍＬ　CH_2Cl_2中の、トリメチルシリルトリフレート（ＴＭＳ－Ｏｔｆ）（２．８ｍｍｏｌ、０．５ｍＬ）および２，６－ルチジン（４．５８ｍｍｏｌ、０．５ｍＬ）の溶液を樹脂に加え、そして１時間攪拌した。次いで、樹脂を、メタノールで洗浄し、そしてＤＭＦ：CH_2Cl_2（１：１）で洗浄した。Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ－ＯＦｍ（ＣｈｅｍＩｍｐｅｘ、８００μｍｏｌ、４３８ｍｇ）を上記ようにカップリングした。完全に保護したグルタチオンを、トリフルオロメタンスルホン酸：ｍ－クレゾール：チオアニソール：ＴＦＡ（２：１：１：８）の溶液を用いて樹脂から切り出し、１時間攪拌した。この混合物を濾過し、そして濾液をヘキサン中に抽出した。粗抽出物を、ヘキサン中で分取用の薄層クロマトグラフィーを使用して精製した。粗生成物（R_f＝０．３５）を含むシリカを、ヘキサン：酢酸エチル（４：１）を用いて広範に洗浄した。濾液を、減圧下で単離して、黄褐色の固体を得た。この合成についての収率は、最適化されなかった。
【０４６６】
９０μｌ　ＤＭＦ中の保護したグルタチオンの溶液（１．１μｍｏｌ、４ｍｇ）を、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ、１１μｍｏｌ、１．３ｍｇ）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ、１１μｍｏｌ、２．３ｍｇ）、およびＤＭＡＰ（５．７μｍｏｌ、０．７ｍｇ）と共に、１時間攪拌した。その混合物を、遠沈し、そして上清をＣＰＧビーズ上の５’－アミノ末端保護ＤＮＡに加えた。この混合物を、２時間攪拌し、次いで、そのビーズを、ＤＭＦ、CH_3CNで洗浄し、そして窒素で乾燥させた。
【０４６７】
（化合物（２ａ）の調製）
Ｎ－ホルミル－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ（ＭＬＦ）を、Ｓｉｇｍａから購入し、化合物（１）について記載した条件を使用して、ＣＰＧビーズ上の５’－アミノ末端保護ＤＮＡにカップリングした。

【０４６８】
（化合物（２ｂ）の調製）
ＭＬＦ（１０μｍｏｌ～１００μｍｏｌ、０．１７Ｍ）を、乾燥ＤＭＦに、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１当量）（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）、Ｏ－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ェート（０．９当量）（Ａｌｄｒｉｃｈ）、およびＤＩＰＥＡ（２．３当量）と共に溶解させた。この溶液を、室温で１時間攪拌し、次いで、ＣＰＧビーズ上の固有配列の５’－アミノ末端保護ＤＮＡに加えた。この混合物を、室温で１時間攪拌した。次いで、ビーズをＤＭＦ、次いでCH_3CNで洗浄し、そして窒素下で乾燥させた。

【０４６９】
（化合物（３）の調製）
Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨ（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）を、化合物（２ｂ）について記載した方法を使用して、ＣＰＧビーズ上のアミノ末端保護ＤＮＡに付着させた。Ｆｍｏｃ基を、ＤＭＦ中の２０％ピペリジンでの２分間の洗浄を３回行って除去した。次いで、この混合物を、ＤＭＦで洗浄し、次いで、CH_3CNで洗浄した。次いで、α－アミンを、アセトアルデヒド／ピリジン／テトラヒドロフラン（１：１．１：１８）中の５％　１－メチルイミダゾールの溶液で、室温にて１０分間キャップした。次いで、ビーズを、ＤＭＦおよびCH_3CNで洗浄し、そしてCH_2Cl_2中の３％トリクロロ酢酸、１％チオアニソールで、室温にて５分間処理して、Ｍｍｔ保護基を除去した。この混合物を、CH_3CNで洗浄し、そして窒素で乾燥させた。Ｆｍｏｃ－Ｐｈｇ－ＯＨ（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）を、化合物（２ｂ）について記載した方法を使用して、Ｌｙｓ－結合ＤＮＡのε－アミンに付着させた。Ｆｍｏｃ保護基の除去後、４－カルボキシベンゼンスルホンアミド（Ａｌｄｒｉｃｈ）を、化合物（２ｂ）について記載した方法を使用して、ビーズに付着させた。このビーズを、ＤＭＦで洗浄し、次いで、CH_3CNで洗浄し、そして窒素で乾燥させた。

【０４７０】
（化合物（４ａ，４ｂ）の調製）
５’－ビオチン修飾ホスホラミダイト（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡ）を、ＤＮＡ合成における最終モノマーとして使用した。

【０４７１】
（化合物（５）の調製）
化合物（２ｂ）について記載した条件を使用して、キモスタチン（Ｓｉｇｍａ）をＣＰＧビーズ上のアミノ末端が保護されたＤＮＡに結合した。

【０４７２】
（化合物（６）の調製）
アンチパイン（Ｓｉｇｍａ，１．５μｍｏｌ，０．９ｍｇ）を、ＤＭＦ中３００ｍＭ　ＤＣＣおよび３００ｍＭ　ＮＨＳの溶液３０μＬに添加した。室温で１時間撹拌した後、この溶液を、０．１Ｍ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ６．０）中の５’アミノ終端ＤＮＡ（約２００～３００μＭ）４５μＬに添加した。このＤＮＡは、予め、ＣＰＧビーズから取り除いており、次のセクションに記載したように、ＨＰＬＣにより精製した。２時間後、この溶液を、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５を使用するゲル濾過およびその後の逆相ＨＰＬＣによって精製した。

【０４７３】
ＤＮＡに１－６連結した、合成基の構造全体を図８３に示す。

【０４７４】
（ＤＮＡ連結合成分子の特徴づけ）
低分子－ＤＮＡ結合体を、５５℃にて１時間、メチルアミン：水酸化アンモニウム（１：１）の溶液を用いてＣＰＧビーズから取り除いた。この溶液を、真空下で乾燥し、次いで、ＴＥＡＡ／CH_3CN勾配を使用する逆相ＨＰＬＣにより精製し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により分析した。ストック溶液の濃度を、ＵＶ－Ｖｉｓ分光法を使用して測定

し、選択実験のために限界希釈物を調製した。サンプルを、－２０℃にて水中に保存した。

【０４７５】

（固定化した標的タンパク質の調製）

ＮＨＳ－活性型Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を、製造業者の指示書に従って準備した。ウマＧＳＴ、ウシ炭酸脱水酵素（ＣＡ）、パパイン、Ｎα－ｐ－トシル－Ｌ－リジンクロロメチルケトン（ＴＬＣＫ）処理したウシキモトリプシン、およびＮ－ｐ－トシル－Ｌ－フェニルアラニンクロロメチルケトン（ＴＰＣＫ）処理したウシトリプシンを、Ｓｉｇｍａから購入した。代表的に、タンパク質を、２０～１００μＭの濃度にて、リン酸緩衝化生理食塩（ＰＢＳ）緩衝液（ｐＨ７．４～７．６）中に溶解した。タンパク質濃度を、ＵＶ－Ｖｉｓ分光法を使用して測定した。タンパク質を４℃にて１６時間ビーズと共にインキュベートした。このビーズを、Ｔｒｉｓ緩衝液で２時間キャッピングし、次いで、１Ｍ ＮａＣｌを含有する適切な選択緩衝液で激しく洗浄し、次いで、適切な選択緩衝液（表１４を参照のこと）中に移した。ビーズを、ビーズが使用される最初の容量と同じ容量の選択緩衝液中で、４℃にて最大１ヶ月間保存した。使用前に、パパインビーズを、５．５ｍＭ システインＨＣｌ、１．１ｍＭ ＥＤＴＡおよび０．０６７ｍＭ β－メルカプトエタノールの溶液を使用して、４℃にて２０分間活性化した。ストレプトアビジン磁性粒子（Ｒｏｃｈｅ）を、使用前に選択緩衝液で３回洗浄した。

【０４７６】

（表１４：選択緩衝液および洗浄緩衝液）

【０４７７】

【表１４】

タンパク質	選択緩衝液の組成	洗浄緩衝液の組成
GST	PBS pH 7.4	
炭酸脱水酵素	10mM Tris pH 7.4, 0.1 M NaCl	10 mM Tris pH 7.4, 0.25-0.5 M NaCl
パパイン	50 mM Tris pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA	50 mM Tris pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA
トリプシン	50 mM Tris pH 8.0, 0.1 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$	50 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$
キモトリプシン	50 MM Tris pH 8.0, 0.1 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$	50 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$
ストレプトアビジン	10 mM Tris pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA	10 mM Tris pH 7.4, 1.0 M NaCl, 1 mM EDTA

【０４７８】

（ＧＳＴ選択）

化合物（１）（結合リガンド）の量を、10^3分子と10^7分子の間と見積もり、化合物（２ａ）（非結合リガンド）を10^2～10^6モル過剰で使用した。（１）および（２ａ）を、４０μＬのＧＳＴビーズに添加し、４℃にて１時間撹拌した。混合物を５．０μｍの低結合Ｄｕｒａｐｏｒｅメンブレンスピンフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に移し、２×１５０μＬ ＰＢＳ（ｐＨ７．４）、１×１００μＬ ０．１Ｍ Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、０．５Ｍ ＮａＣｌおよび１×１５０μＬ ＰＢＳで洗浄した。結合したリガ

ンドを、室温にて、１００μＬの０．１Ｍグルタチオン（Ｓｉｇｍａ）を用いてビーズを撹拌するこよによって溶離した。溶離液を３Ｍ酢酸ナトリウムおよび１Ｌグリコーゲンを用いてエタノール沈殿した。沈殿を直接ＰＣＲに用いた。

【０４７９】

（炭酸脱水酵素選択）

化合物（２ｂ）（非結合リガンド）および化合物（３）（結合リガンド）を、４０μＬの再懸濁ビーズに添加し、選択緩衝液を用いて４００μＬまで希釈した。比率は、ＧＳＴ選択についての比率と同様にした。この混合物を、４℃で１～２時間攪拌した。次いで、室温にて選択を行った。各混合物を、スピンフィルターに移し、４００μＬの洗浄緩衝液で３回、４００μＬの選択緩衝液で１回洗浄した。この樹脂を、６０μＬの選択緩衝液でスピンフィルターから取り除き、得られたビーズをＰＣＲに供した。

【０４８０】

（パパイン選択）

化合物（４ａ）（非結合リガンド）および化合物（５）または（６）（結合リガンド）を、パパインビーズと共にインキュベートし、炭酸脱水酵素選択について記載したように選択した。

【０４８１】

（キモトリプリシン選択）

化合物（４ａ）（非結合リガンド）および化合物（５）（結合リガンド）を、キモトリプシンビーズと共にインキュベートし、炭酸脱水酵素選択について記載したように選択した。

【０４８２】

（トリプシン選択）

化合物（４ａ）（非結合リガンド）および化合物（６）（結合リガンド）を、トリプシンビーズと共にインキュベートし、炭酸脱水酵素選択について記載したように選択した。

【０４８３】

（ストレプトアビジン選択）

化合物（３）（非結合リガンド）および化合物（４ｂ）（結合リガンド）を、１５μＬのストレプトアビジン磁性粒子と共にインキュベートし、室温にて２０分間撹拌した。ＭＰＣ－Ｓマグネット（Ｄｙｎａｌ）を使用して、このビーズを、０．１Ｍ　ＮａＯＨ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（１００～２００μＬ）で２回、洗浄緩衝液（１００～２００μＬ）で４回、そして、選択緩衝液で１回洗浄した。次いで、ビーズを、１５μＬの二重蒸留H_2O中に再懸濁した。

【０４８４】

（炭酸脱水酵素選択の反復）

10^8分子の化合物（３）および10^{11}分子の化合物（２ｂ）を、４０μＬの炭酸脱水酵素ビーズと共に１時間インキュベートし、次いで、記載したように選択した。最初の選択ラウンドの後、５μＬの再懸濁アガロースビーズをＰＣＲで除去した。６Ｍのグアニジン－ＨＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（４０μＬ）をビーズに添加し、混合物を９０℃まで１５分間加熱した。Ｗｉｚａｒｄ　Ｍｉｎｉｃｏｌｕｍｎ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用してビーズをフィルターで取り除いた。濾液を、Ｃｅｎｔｒｉｓｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ）を使用して選択緩衝液に緩衝液交換した。炭酸脱水酵素ビーズの新しいアリコートを溶離したテンプレートに添加した。２回目の選択ラウンドの後、アガロースビーズを３０μＬのH_2O中に懸濁し、そのうちの１５μＬをＰＣＲに使用した。ＰＣＲ生成物をＨｉｎｄＩＩＩで消化し、図８４の結果を生じた。

【０４８５】

３回の反復選択を、わずかな変更を伴って本質的には上記のように行った。調製した炭酸脱水酵素ビーズを、$ZnSO_4$（１ｍＭ）と共に１時間インキュベートし、次いで、２Ｍ　ＮａＣｌを含有する選択緩衝液で激しく洗浄した。このビーズを、選択緩衝液に戻し

、反復選択のために直接使用した。10^9分子の化合物（３）および10^{15}分子の化合物（４ｂ）をビーズに添加し、上記のように選択した。最初の選択ラウンド後、３μＬのアリコートをＰＣＲのために取った。２回目の選択ラウンドを上記のように行い、８μＬのビーズのアリコートをＰＣＲのために取った。３回目の選択ラウンド後、得られたビーズを３０μＬの二重蒸留H_2Oを使用してスピンフィルターから取り除き、１５μＬの再懸濁ビーズをＰＣＲのために使用した。

【０４８６】

（パパイン親和性およびパパイン特異性選択）

親和性選択：6×10^9分子の化合物（６）、2.3×10^{10}分子の化合物（５）および1.4×10^{11}分子の化合物（４ａ）を、１時間、４０μＬのパパインビーズに添加した。ビーズを、パパイン洗浄緩衝液（１００μＬ）で３回、１００μＬのパパイン選択緩衝液で１回洗浄した。ビーズを、３０μＬの二重蒸留H_2Oでスピンフィルターから取り除いた。再懸濁したビーズの３μＬのアリコートをＰＣＲのために取った。ＤＮＡ結合体を、７０μＬの６ＭグアニジンHClを添加し、混合物を９０℃まで１５分間加熱することによって、ビーズから溶離した。溶離した物質を、炭酸脱水酵素選択の反復に記載したように緩衝液交換した。２回目の選択ラウンド後、３０μＬのH_2Oを用いてアガロースビーズをスピンフィルターから取り除き、再懸濁したビーズの１５μＬをＰＣＲのために使用した。

【０４８７】

特異性選択：等量のアンチパイン、キモスタチンおよびビオチンを、４０μＬのキモトリプシン選択緩衝液中のキモトリプシンアガロースビーズに添加し、１時間インキュベートした。ビーズをスピンダウンし、フロースルーを４０μＬの新しいキモトリプシンビーズに添加し、１時間インキュベートした。ビーズをスピンダウンし、１５μＬのパパイン選択緩衝液中１００μＭのキモトリプシンをこのフロースルーに添加し、次いで、１時間インキュベートした。この溶液を４０μＬのパパインビーズに添加し、上記のように選択した。低分子－ＤＮＡ結合体を溶離し、上記のように緩衝液交換し、１５μＬの１００μＭキモトリプシンと共に１時間インキュベートし、次いで、２回目の選択ラウンドに供した。３０μＬのH_2Oでビーズをスピンフィルターから取り除き、１５μＬをＰＣＲのために使用した。

【０４８８】

（汚染コントロール）

これらの実験の高感度に起因して、これらの研究を通じて２つの重要な汚染コントロールを使用した。１つ目は、リガンド－ＤＮＡ結合体をタンパク質結合ビーズに添加しなかったこと以外は、上記のように各選択を行い、緩衝液の汚染およびサンプル間の交差汚染の試験を可能にした。２つ目は、選択からの物質を加えないＰＣＲ反応を、プライマー、ｄＮＴＰおよびＰＣＲ緩衝液中の汚染について試験するために使用した。

【０４８９】

選択に残ったテンプレートを、ＰＣＲを用いて増幅した。全ての反応が、１μＭの各プライマーと２５０μＭの各ｄＮＴＰ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含んだ。ＧＳＴ選択のために、沈殿したＤＮＡをＰＣＲ反応において使用し、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で増幅した。ＰＣＲ条件は以下の通りであった；工程１：９４℃、２分；工程２：９４℃、３０秒；工程３：５５℃、１分；工程４：７２℃、３０秒；工程５：工程２×２９の実行；工程６：７２℃、５分；工程７：４℃に維持。全ての他の選択のために、アガロースビーズ（３～１５μＬ）を、Ｔａｑポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いるＰＣＲ反応に直接使用した。ＰＣＲ条件は以下の通りであった；工程１：９４℃、２分；工程２：９４℃、３０秒；工程３：５５℃、１分；工程４：７２℃、３０秒；工程５：工程２×２４の実行；工程６：４℃。

【０４９０】

次いで、ＰＣＲ産物を、リガンドをコードするＤＮＡを消化する制限酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，５～１０単位）で１～２時間消化した。消化した産物を

３％アガロースゲル上での電気泳動により分析し、エチジウムブロマイド染色およびＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｅａｇｌｅ　Ｅｙｅ　ＩＩシステムでのデンシトメトリにより定量した。

【０４９１】

（富化の算出）

富化を、既知の濃度のストック溶液により決定した、選択に導入された結合リガンドの分画に対する、制限消化により決定した、選択で残った結合リガンドの分画の割合として算出する。

【０４９２】

（鋳型およびプライマーのＤＮＡ配列）

制限エンドヌクレアーゼの切断部位に下線を付す。

【０４９３】

（グルタチオンＳトランスフェラーゼ選択のためのＤＮＡ配列）

【０４９４】

【数１】

GSH-テンプレート **(1)**: 5’-GCC TCT GCG ACC GTT CGG AAG CTT CGC GAG TTG CCC AGC GCG (*Hind* III) [配列番号　112]

MLF-テンプレート **(2a)**: 5’-GCC TCT GCG ACC GTT CGG GAA TTC CGC GAG TTG CCC AGC GCG (*Eco* RI) [配列番号　113]

プライマー1: 5’-GCC TCT GCG ACC GTT CGG [配列番号　114]

プライマー2: 5’-CGC GCT GGG CAA CTC GCG [配列番号　115]

【０４９５】

（炭酸脱水酵素選択のためのＤＮＡ配列）

【０４９６】

【数２】

フェニルスルホンアミド－鋳型 **(3)**: 5’-CGA TGC TAG CGA AGG AAG CTT CCA CTG CAC GTC TGC (*Hind* III) [配列番号　116]

MLF-テンプレート **(2b)**: 5’-CGA TGC TAG CGA AGG GAA TTC CCA CTG CAC GTC TGC (*Eco* RI) [配列番号　117]

ビオチン-テンプレート **(4b)**: 5’-CGA TGC TAG CGA AGG GAA TTC CCA CTG CAC GTC TGC (*Eco* RI) [配列番号　118]

プライマー1: 5’CGA TGC TAG CGA AGG [配列番号　119]

プライマー2: 5’-GCA GAC GTG CAG TGG [配列番号　120]

【０４９７】

（プロテアーゼ選択のためのＤＮＡ配列）

【０４９８】

【数３】

キモスタチン－テンプレート (5): 5'-GCA GTC GAC TCG ACC GGA TCC GGC TAC GAC GTG CAC (*BaM* HI) [配列番号 121]

アンチパイン-テンプレート(6): 5'-GCA GTC GAC TCG ACC CAG CTG GGC TAC GAC GTG CAC (*Pvu* II) [配列番号 122]

ビオチン－テンプレート (4a): 5'-GCA GTC GAC TCG ACC AAG CTT GGC TAC GAC GTG CAC (*Hind* III) [配列番号 123]

プライマー1: 5'-GCA GTC GAC TCG ACC [配列番号 124]

プライマー2: 5'-GTG CAC GTC GTA GCC. [配列番号 125]

【０４９９】

（実施例１２：新規化学反応の同定）

本実施例によって、核酸テンプレート型の合成を介した新規化学反応の存在を同定することが可能であることを実証する。新規化学反応を、結合形成反応を選択し、それを特徴づける為の実験の結果として同定する。

【０５００】

新規の結合形成反応を同定するためのワンポッド選択を、図８５に概説した。簡潔にいうと、ｎプールＡ反応物とｍプールＢビオチン化反応物とを組み合わせると、ｎ×ｍの起こり得る反応の組み合わせが利用可能である。このテンプレートとなる反応を特定のセットの反応条件のもとで、そのテンプレート（例えば、反応物Ａ２７）の特定の組み合わせを、特定の組み合わせの移動単位（例えば、反応物　ビオチン化ＢＩＩ）と反応させる。この反応生成物を、アビジン結合ビーズによって捕捉する。反応していないテンプレートは、そのアビジンによって捕捉されず、洗浄することによって取り除かれる。次いで、そのアビジンで捕捉した反応生成物を、例えば、ＰＣＲによって、増幅し得、そして、そのコドン配列を決定するために、配列決定し得る。示されるように、その増幅したテンプレートは、反応物Ａ２７についての配列タグ（コード領域）および反応物Ｂ１１コドン配列（アニーリング領域）を含んでいた。

【０５０１】

図８６は、そのメンバーを新たに同定した化学反応によって生成した化合物ライブラリーを生成するスキームの概略図を提供する。結合形成反応について選択するために、フェニル基（Ａ１Ｂ１およびＡ１Ｂ２）または第１級アミン（Ａ２Ｂ１およびＡ２Ｂ２）のいずれかと、カルボン酸（Ｂ１）またはメチルエステル（Ｂ２）のいずれかを表す２つのビオチン化プールＢ反応物を調製した。その２つのコード領域および２つのアニーリング領域は、様々な制限消化部位を含み、混合物における、４つのプールメンバーの各々の相対的な定量を可能にする。６つ全ての反応物（２５０ｍｏｌの各プールＡ反応物および５００ｆｍｏｌの、Ｂ１およびＢ２の各々）を、ＤＭＴ－ＭＭ（アミンとカルボン酸との間でのアミド形成を媒介すると知られている（Ｇａｒｔｎｅｒら（２００２），ＡＧＮＥＷ．ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．４１：１７９６－１８００；Ｋｕｎｉｓｈｉｍａら（２００２）ＴＥＴＲＡＨＥＤＲＯＮ　５７：１５５１－１５５８）の存在下またはその非存在下のいずれかで、単一のポッドの中において組み合わせた。この粗反応物を、ストレプトアビジン結合磁気ビーズに通過させて、結合形成反応物をコードするテンプレートを選択し、そして、変性剤で洗浄して、プールＢのメンバーと結合形成しなかったプールＡメンバーを取り除いた。この選択した分子を、遊離したビオチンおよびホルムアミドを用いて溶離させた。初期総反応物のうちの５ｆｍｏｌに対応する溶離物の画分を、ＰＣＲによって増幅して、そして、ＤＮＡ配列決定および制限消化に供して、４つ（すなわち、そのカルボ

ン酸とフェニル基との反応、そのエステルとフェニル基との反応、そのカルボン酸とアミン基との反応、およびそのエステルとアミン基との反応）の存在し得る反応コード配列の比率を決定した（図８６）。

【０５０２】

ＤＭＴ－ＭＭの非存在下で、それらの反応物を組み合わせると、選択後のＰＣＲ生成物形成がごく僅か生じた。対照的に、強力なＰＣＲ生成物が、その反応物がＤＭＴ－ＭＭ（図８６）と組み合わされたときに、観測され、これは、反応プールＡメンバーを捕捉する有効性および洗浄工程の流れの良さと矛盾しない。この結果によって、結合形成反応についての選択後のＰＣＲ生成物の収量は、反応物のプールにおける結合形成の存在についての簡単なスクリーンとしての役割を果たし得ることを示唆する。その結合形成試薬の同一性を決定するために、それらのＰＣＲ生成物を、ＭｓｅＩおよびＴｓｐＩ４５を用いて消化した。ここで、ＭｓｅＩは、Ａ１ではなくＡ２についてのコード領域を切断し、そしてＴｓｐ４５Ｉは、Ｂ１でなく、Ｂ２を切断する。ＤＭＴ－ＭＭの非存在下での反応の後に、選択することによって、４つの存在し得る反応コードプールＡメンバーの混合物を生じたことを、フラグメントの消化の分析によって明らかにした（図８６）。対照的に、ＤＭＴ－ＭＭの存在下の反応の後に、選択することによって、Ａ２Ｂ１配列が生じたが、他の３つの配列は存在しなかった。このことは、結合形成をコードするＤＮＡについての強力な増強を示す。選択したＰＣＲ産物のＤＮＡ配列決定は、制限消化分析と矛盾を生じない。これらの結果によって、新規反応を発見するための、提案された方法およびシステムの基礎的な原理を実証する。

【０５０３】

提案した反応発見システムが、未反応の組合せの非常に規模の大きい過剰量から単一の反応組合せを選択する能力を試験するために、そのシステムを、３つの可能性（アミン＋カルボン酸、アミド＋エステルおよびアミン＋エステル）をもってプログラムし、そして、未反応の組合せ（アミド＋エステルならびにアミノ＋エステル）に対する傾向がある集団中でその対応するＤＮＡ結合反応物を１００倍にして組み合わせる。アミドカップリング試薬ＤＭＴ－ＭＭにおいて、結合形成反応について得られた混合物のインビトロ選択は、そのアミンとカルボン酸との間の結合形成をコードするテンプレートを、１０００倍を超えて増強することを生じる。ＤＭＴ－ＭＭが取り除かれた場合、なんら増強は観測されなかった。この結果によって、計画された３０×３０で９００の可能性から単一の反応性結合形成の組合せを選択およびデコードする可能性がさらに支持される。

【０５０４】

（新規反応発見の検証（実施例Ａ））

この実施例は、ＤＮＡテンプレート型合成を使用する、新しい化学反応を発見することが実際に可能であることを示す。図８７に示されるＤＮＡ連結官能基を含有する２５の反応混合物を、ω構造、プールＡの反応物に対する１ポットアセンブリ法、および最適化したコドンセットを使用して、本質的に図９に記載されるように作製した。このセットの中でも２５の可能性のある反応は、Ｈｕｉｓｇｅｎのアジドとアルキンとの間の、１，３－二極環付加（Ｈｕｉｓｇｅｎら（１９８９）ＰＵＲＥ　ＡＰＰＬ．ＣＨＥＭ．６１：６１３）である。Ｓｈａｒｐｌｅｓｓおよび共同実験者らは、最近、触媒量の$CuSO_4$およびアスコルビン酸ナトリウムが、このプロセスの位置選択性および効率を劇的に改善し、室温での強固な反応を可能にすることを報告した（Ｒｏｓｔｏｕｔｓｅｕら（２００２）ＡＮＧＥＷ　ＣＨＥＭ．ＩＮＴ．ＥＤ．ＥＮＧＬ．４１：２５９６）。反応発見の選択を、$CuSO_4$およびアスコルビン酸ナトリウムの有無のいずれかでの、この２５反応マトリクスを使用する１ｐｍｏｌスケールで実施した。

【０５０５】

銅およびアスコルビン酸塩の存在下で、結合形成反応後のＰＣＲ増幅および制限消化による配列分析により、アルケンおよびアジドをコードする反応物をコードするプールＡテンプレートを富化した（図８７Ｂのレーン２を参照のこと）。対照的に、銅およびアスコルビン酸塩を除外した結果、アルケンおよびアジドをコードする鋳型は富化しなかった（

図８７Ｂのレーン３を参照のこと）。それゆえ反応発見選択システムは、アルケンおよびアジドのＣｕ（Ｉ）媒介カプリングを、うまく「再発見した」。

【０５０６】

（新規反応発見の検証（実施例Ｂ））

この実施例は、実施例Ａで同定された反応がまた、９６－反応マトリクスにおいて同定され得ることを示す。簡単には、図８８に示されるＤＮＡ結合官能基を有する９６－反応マトリクスが生成した。プールＡは、１２個の反応物（Ａ１～Ａ１２）を含み、プールＢは、８個のビオチン化された反応物（Ｂ１～Ｂ８）を含んだ。合わせると、９６の異なる反応が可能であった。

【０５０７】

反応物（各１０ｆｍｏｌ）を、ｐＨ６．０にて５００μＭ　Ｃｕ（Ｉ）の存在下で混合した。反応選択および増幅後、１つのオリゴヌクレオチド配列が富化された。詳細には、反応物Ａ２と反応物Ｂ５との間の反応をコードするテンプレートについて２７倍の富化があった。実施例Ａのような反応生成物は、Ｈｕｉｓｇｅｎ付加環化反応から生じたように見える。対照的に、Ｃｕ（Ｉ）が存在しないとき、ＰＣＲ生成物は極めてわずかであり、いかなる反応物の組み合わせにおいても富化しなかった。

【０５０８】

（新規反応発見の検証（実施例Ｃ））

この実施例は、テンプレート型核酸合成を用いて新規化学反応を発見し得ることを示す。詳細には、この実施例は、新規Ｐｄ媒介カップリング反応の発見を説明する。

【０５０９】

反応物のライブラリーを作成して、混合し、テンプレート型核酸Ｐｄ媒介カップリング反応の能力を試験した。反応物の２つのプール（図８９を参照のこと）を合成して、１２個のプールＡ反応物（Ａ１～Ａ１２）および８個のビオチン化されたプールＢ反応物を得た。合わせると、９６の異なる反応が可能であった。反応物（各１０ｆｍｏｌ）を、ｐＨ７．０にて１ｍＭ　Ｐｄ（ＩＩ）の存在下で混合した。反応選択および増幅後、５つのオリゴヌクレオチド配列が１０倍～２２倍の間で富化された。５つのオリゴヌクレオチド配列の分析から、反応は、（ｉ）反応物Ａ２と反応物Ｂ１（ｉｉ）反応物Ａ２と反応物Ｂ４（ｉｉｉ）反応物Ａ２と反応物Ｂ８（ｉｖ）反応物Ａ９と反応物Ｂ１（ｖ）反応物Ａ１０と反応物Ｂ４との間で生じることが明らかになった。

【０５１０】

富化されたオリゴヌクレオチドを配列決定するための代替として、反応生成物に付着したオリゴヌクレオチド配列の同定を、マイクロアレイ分析により決定した（図９０を参照のこと）。反応マトリクス中に含まれるべき各々のテンプレートに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドのライブラリーを合成した。次いで、各テンプレートに相補的な個々のアンチセンスオリゴヌクレオチド（図９０の１’～９’）を、マクロアレイの別個のアドレス可能位置に固定化した。マイクロアレイに固定化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は公知である。テンプレート型核酸合成後、得られる反応生成物に付着したオリゴヌクレオチド（例えば、図９０のテンプレート１に付着したＰ１およびテンプレート８に付着した生成物Ｐ８）は、検出可能な部分（例えば、フルオロフォア）の増幅させたテンプレートへの取り込みを可能にする条件下で、増幅された。次いで、増幅されたオリゴヌクレオチドを変性して、テンプレートオリゴヌクレオチド（例えば、実施例９０のオリゴヌクレオチド１およびオリゴヌクレオチド８）を、その固定化された相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる条件下で、マイクロアレイと結合させた。洗浄して非結合物質を除去した後、次いで、マイクロアレイをスキャンして、特定の位置にて検出可能な部分の検出をさらに介して特定の結合を検出した。検出可能な部分の位置およびその位置に固定化された相補的オリゴヌクレオチドの公知の配列に基づいて、結合したテンプレートの配列および反応生成物を生成した反応物を決定し得る。

【０５１１】

実施例Ｂ（ＣＵ（Ｉ）を用いる９６の反応マトリクス）および上記実施例Ｃ（Ｐｄ（イ

オン）を用いる９６反応マトリクス）の後に、この型のマイクロアレイ分析アプローチを使用した。このマイクロアレイ分析は、ＤＮＡ配列決定の結果と一致することが分かった。さらに、このマイクロアレイ分析は、従来の配列決定方法論より直接的で、より高感度で、そして、有意に高速（少なくとも）であることが分かった。

【０５１２】

例として、Ｐｄ（ＩＩ）が媒介する反応の種々の産物を、このマイクロアレイシステムにより転出し、結果を図９１にまとめる。図９１は、プールＡの反応物がプールＢのビオチン化反応物と反応し、産物を生じることをまとめる。図９１はまた、バックグラウンドを上回るシグナルのレベルと、各生成物についてのＤＮＡをテンプレートとする反応収率をまとめる。特に興味深いのは、１ｍＭ　Ｐｄ（ＩＩ）の存在下、ｐＨ７における、ＤＮＡ連結した末端アルキンＡ２とＤＮＡ連結したアクリルアミドＢ８との間の結合形成の配列分析アプローチの両方を使用する発見である（図８９および９１を参照のこと）。この反応は、効率的にＤＮＡをテンプレートとするアリールヨウ化物とオレフィンとのＨｅｃｋカップリング反応と匹敵し、Ｐｄ供給源の不在下では進行しない。末端アルキンとアリールヨウ化物との間のＰｄ媒介性のカップリングは公知であるが（Ａｍａｔｏｒｅら（１９９５）Ｊ．ＯＲＧ．ＣＨＥＭ．６０：６８２９）、シンプルなオレフィンまたは電子不足のオレフィンを用いる末端アルキンのＰｄ媒介性のカップリングは、新型の反応スキームであるようである。この新しく発見された反応スキームは、現在、より慣用的な大規模反応を使用して、より詳細に特徴付けられ得る。

【０５１３】

（参考としての援用）

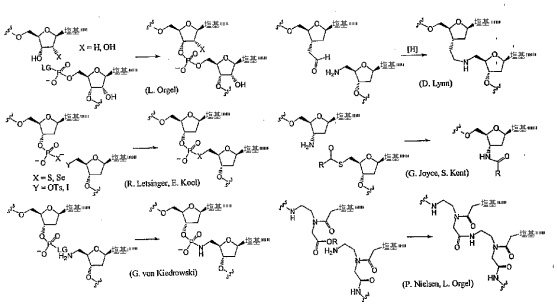
本明細書中に引用される刊行物、特許、特許出願の各々の全内容は、あらゆる目的のために、本願に参考として援用される。

【０５１４】

（等価物）

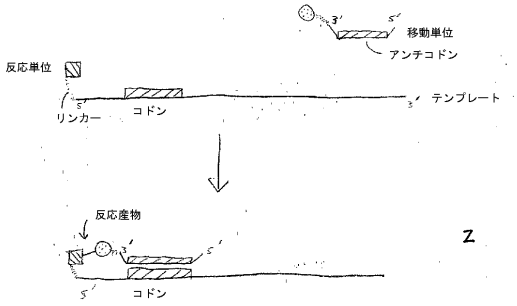
本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱することなく、他の具体的な形態において実施され得る。したがって、以上の実施形態は、例示された全ての観点ではなく、むしろ、本明細書中に記載された本発明に限定しているとみなされるべきである。本発明の範囲は、従って、以上の説明ではなく、むしろ、添付の特許請求の範囲によって示され、添付の特許請求の範囲の意味および等価の範囲内の、全ての変更が、本発明に包含されることが意図される。

【図１】



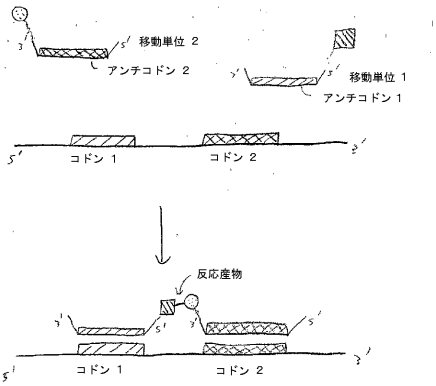
1

【図２】



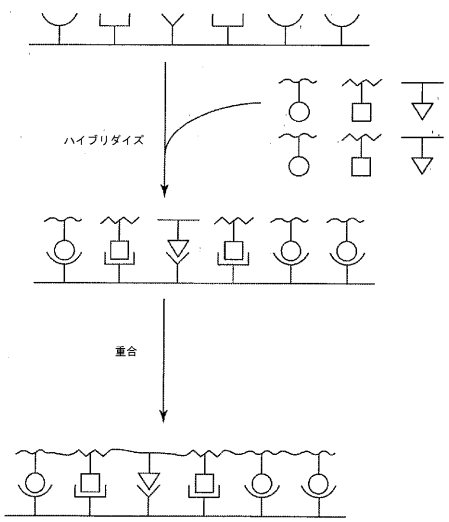
2

【図３】



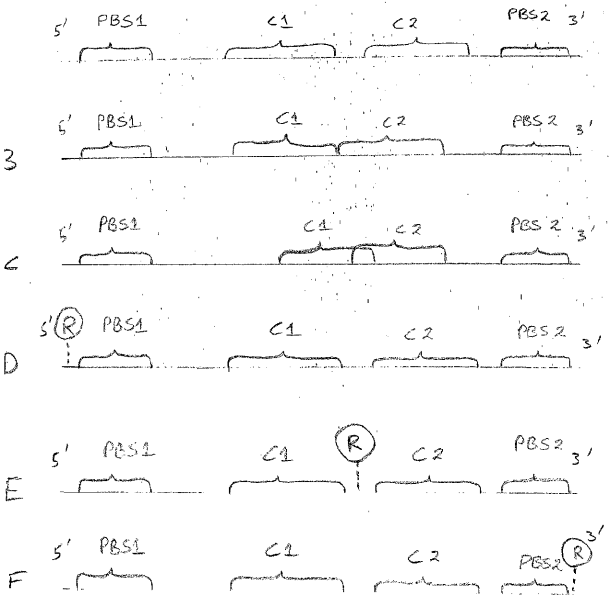
3

【図４】



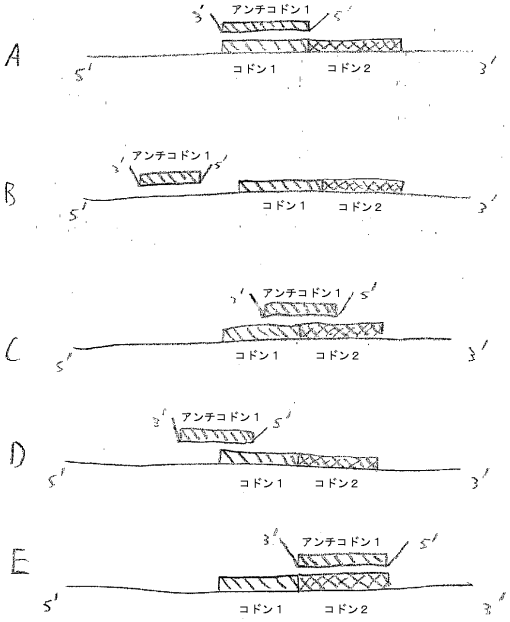
4

【図５】



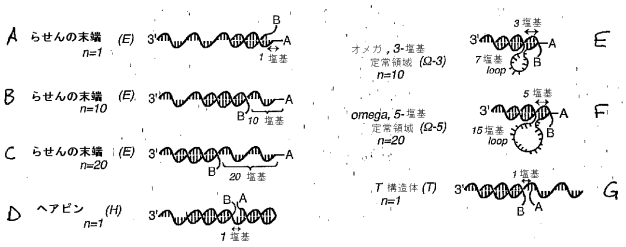
5

【図６】



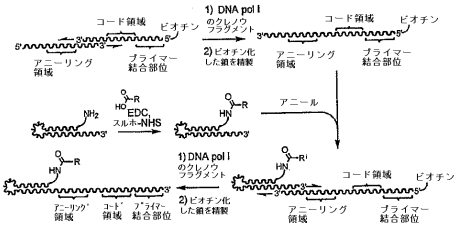
6

【図７】



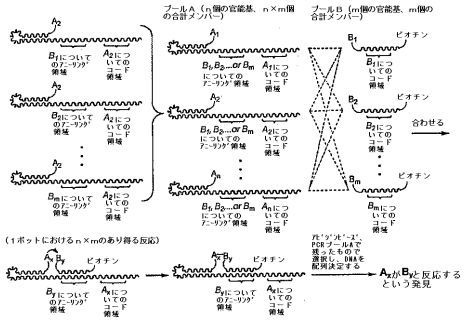
7

【図８】



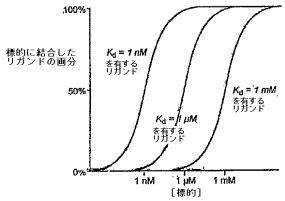
8

【図９】



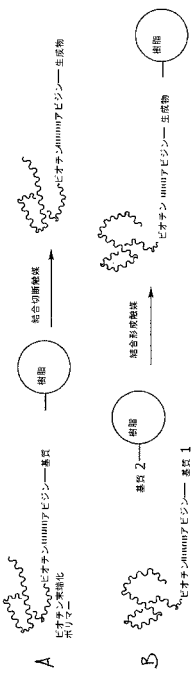
9

【図１０】



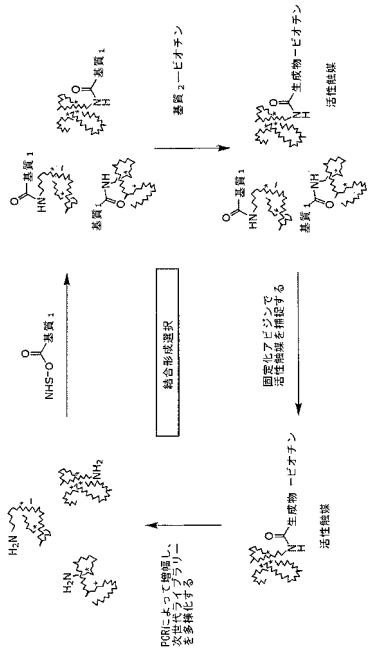
10

【図１１】



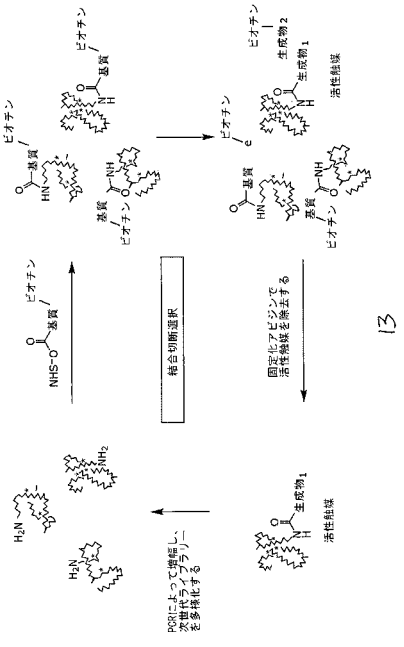
11

【図１２】



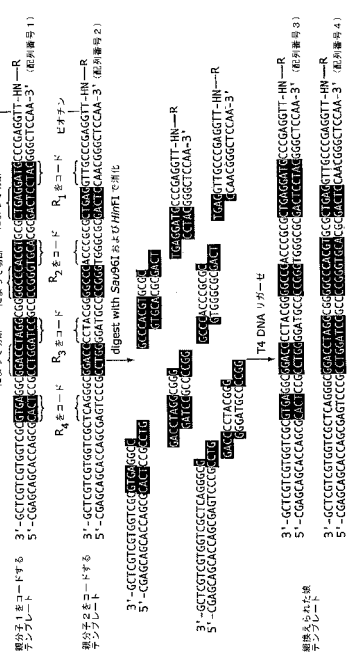
12

【図１３】



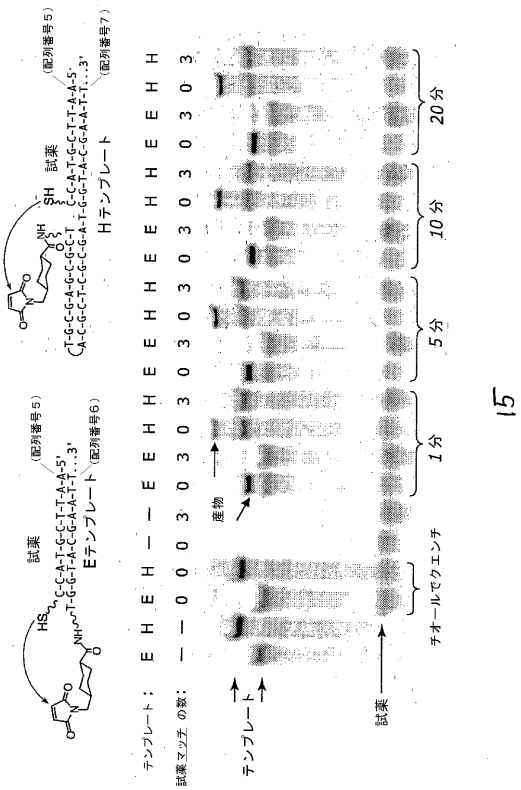
13

【図１４】



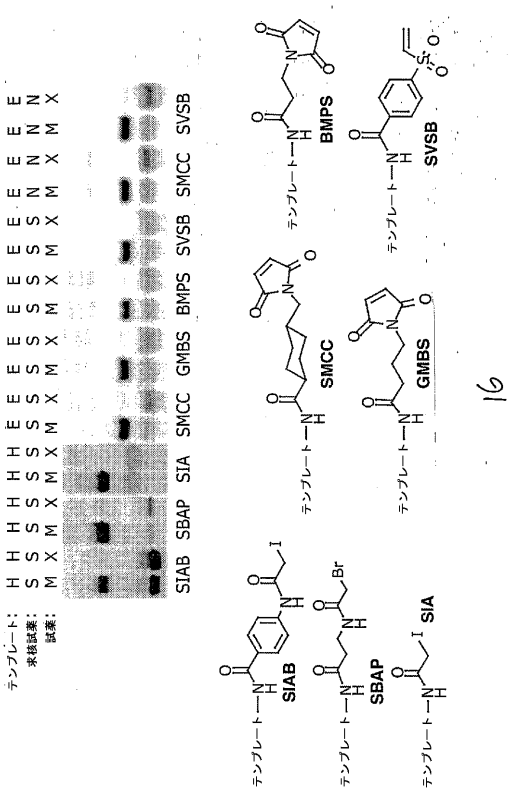
14

【図１５】



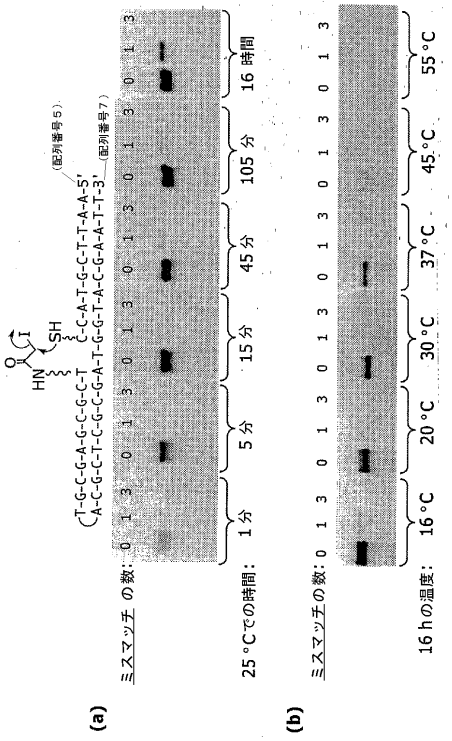
15

【図１６】



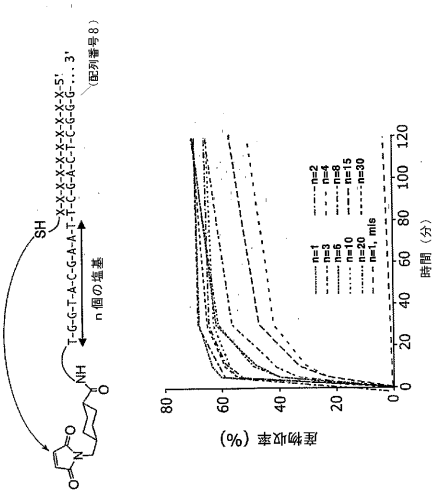
16

【図１７】



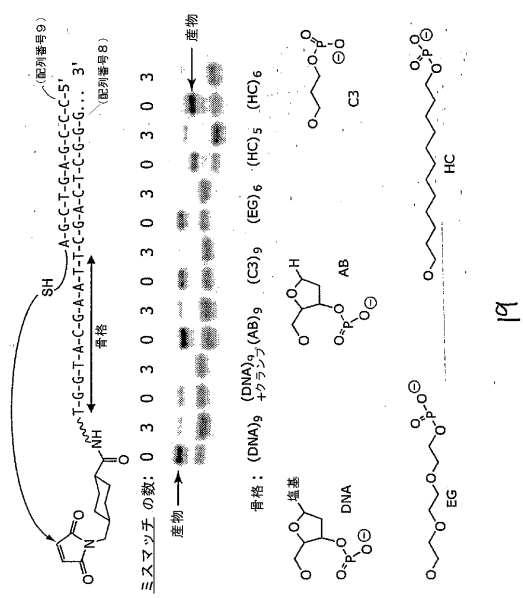
17

【図１８】



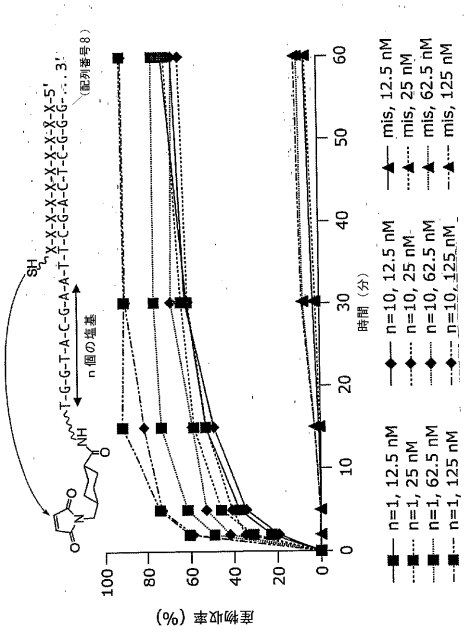
18

【図１９】



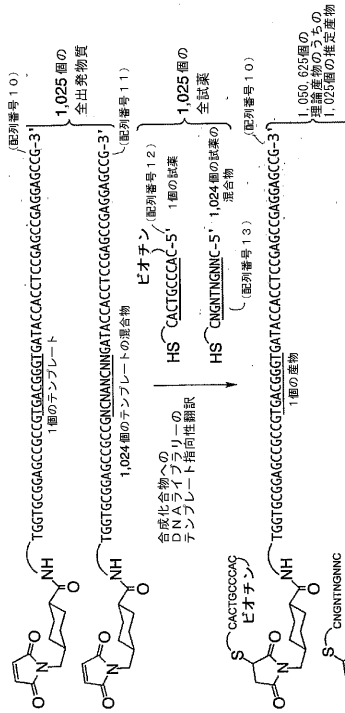
19

【図２０】



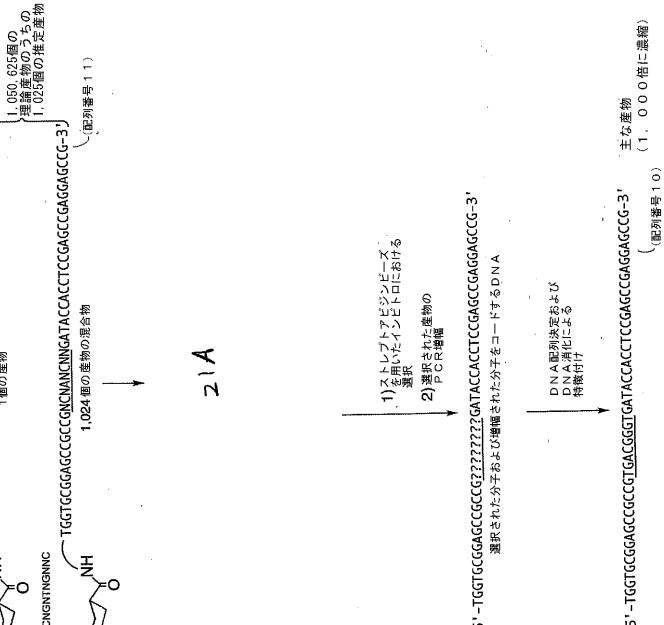
20

【図２１Ａ】



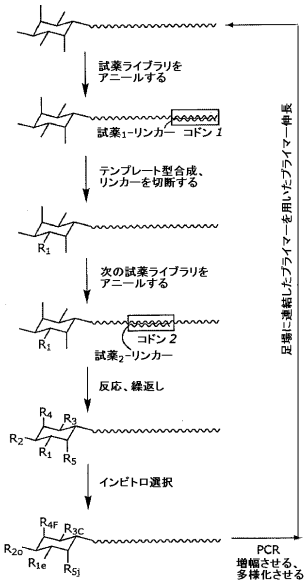
21A

【図２１Ｂ】

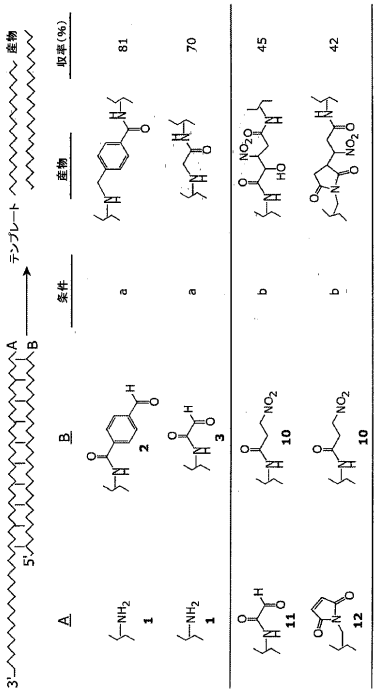


21B

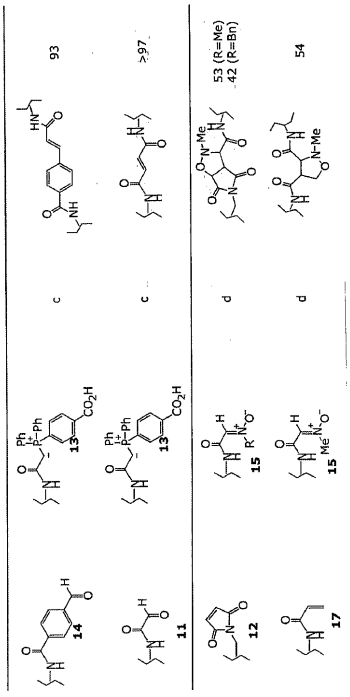
【図２２Ｂ】



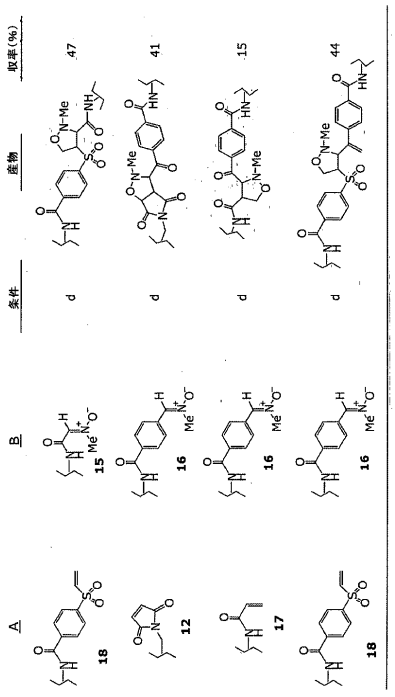
【図２３Ａ】



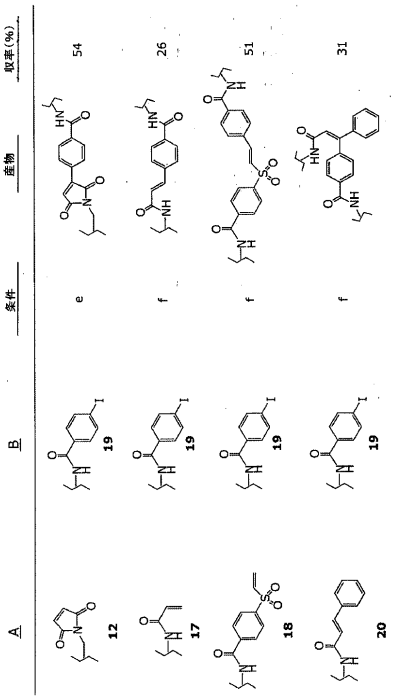
【図２３Ｂ】



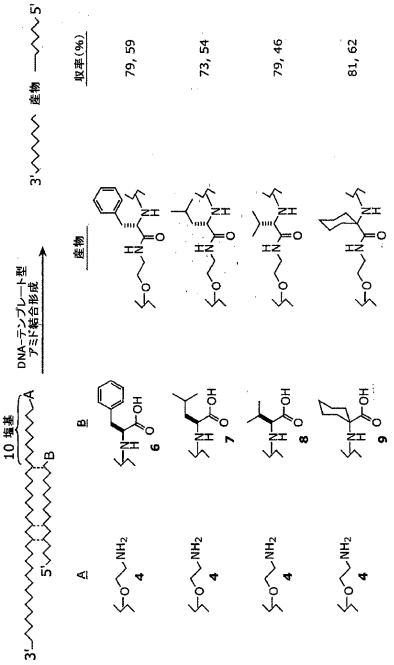
【図２３Ｃ】



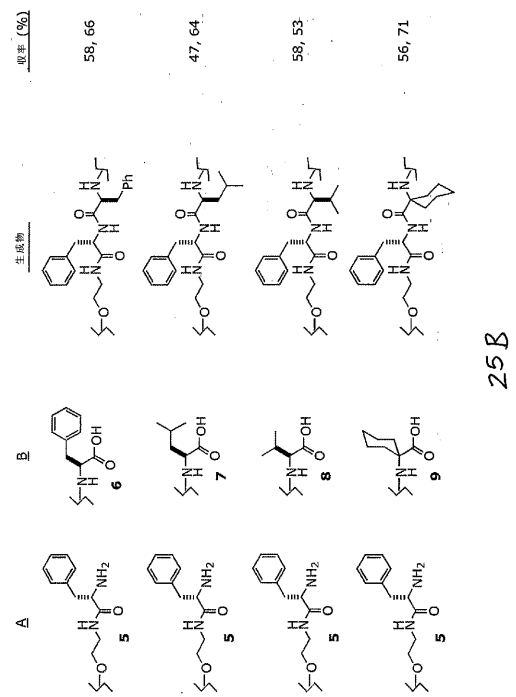
【図２３Ｄ】



【図２５Ａ】

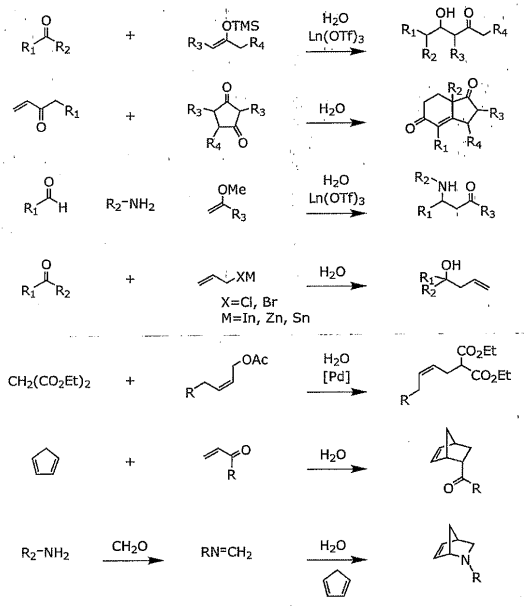


【図２５Ｂ】



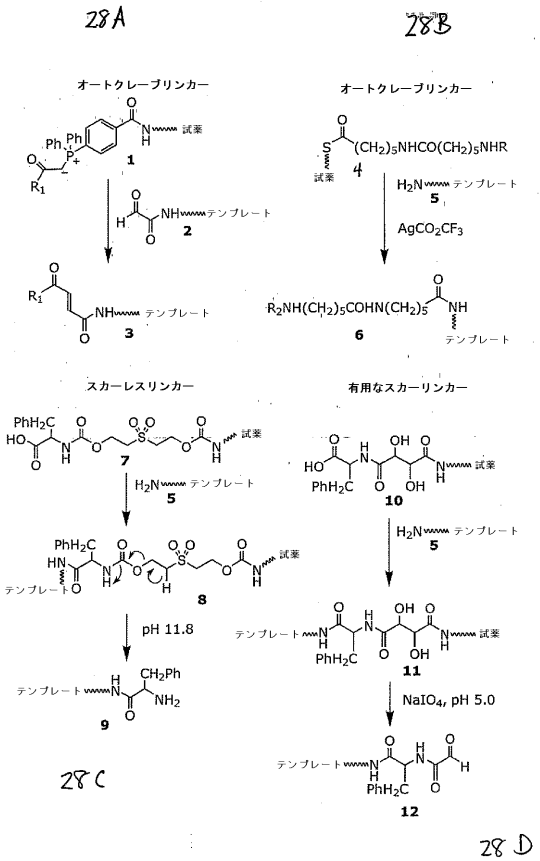
25B

【図２７】

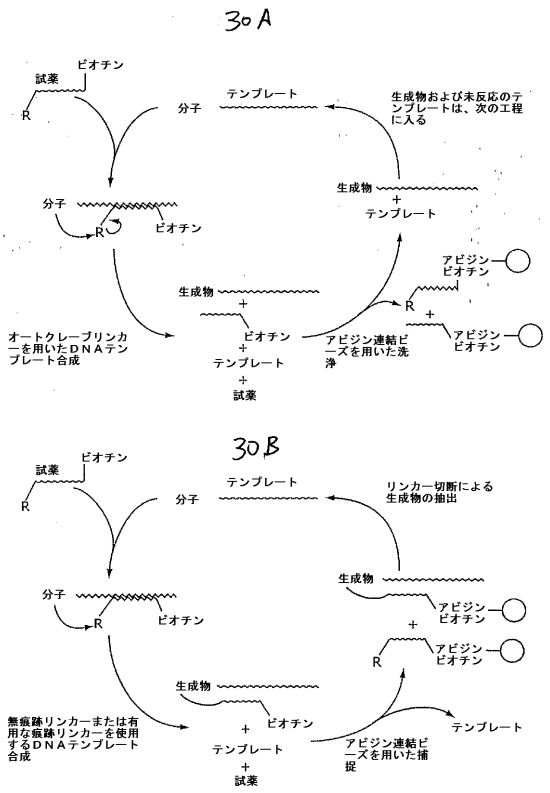


27

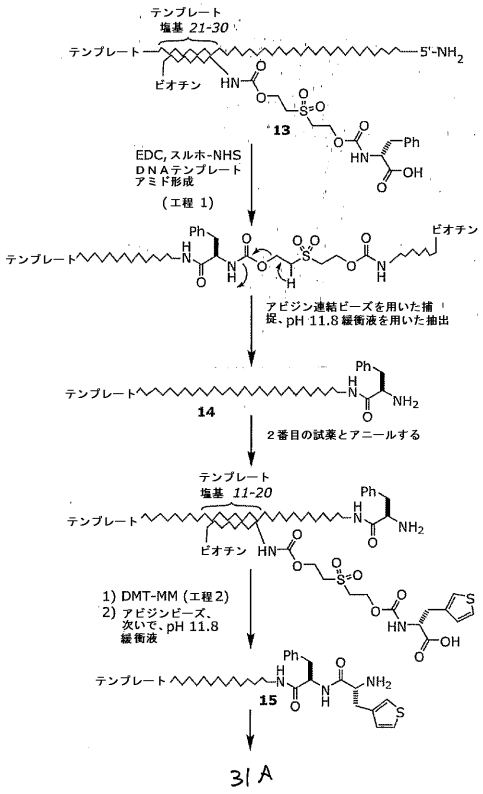
【図２８】



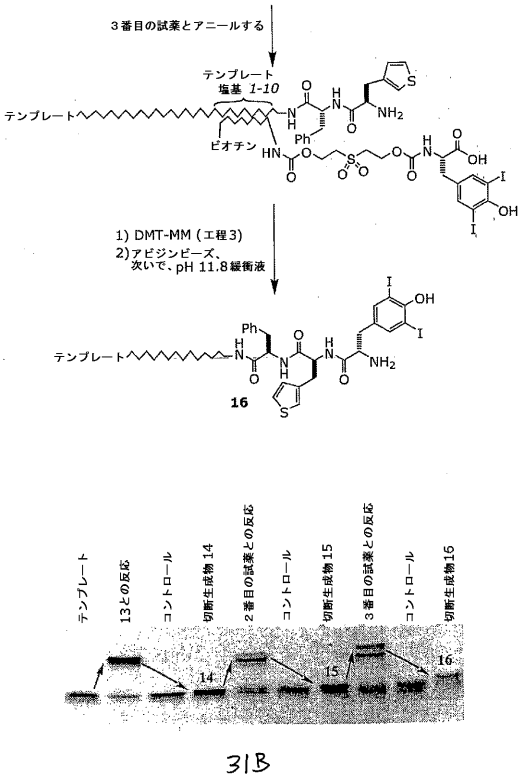
【図３０】



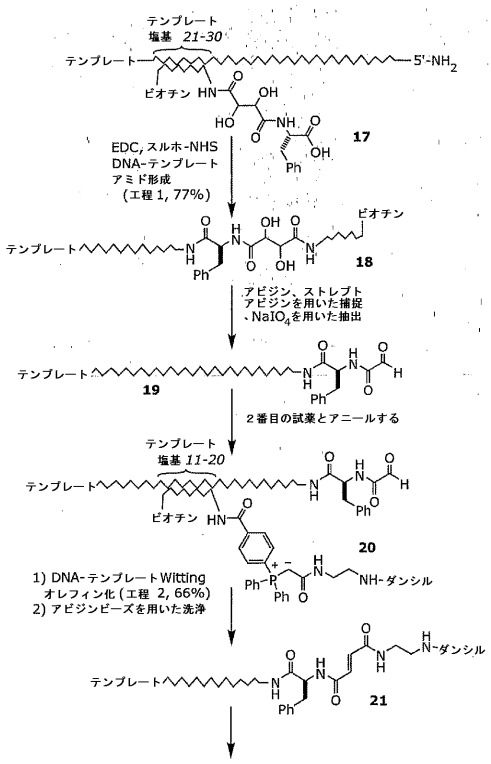
【図３１Ａ】



【図３１Ｂ】

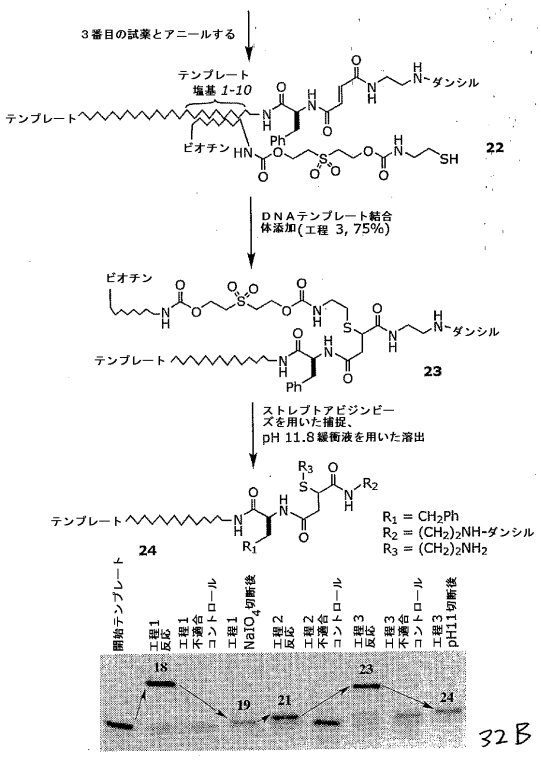


【図３２Ａ】



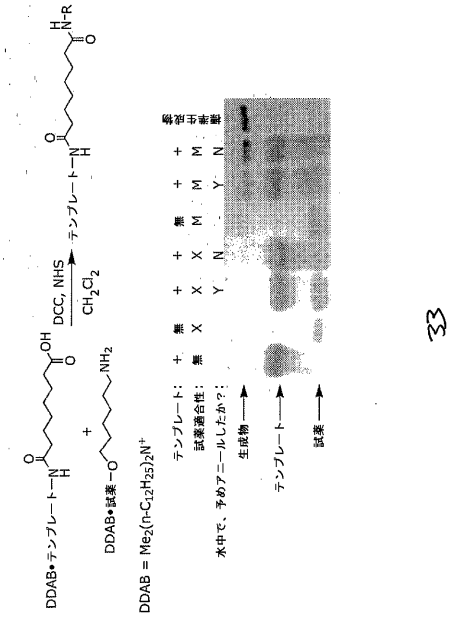
32 A

【図３２Ｂ】



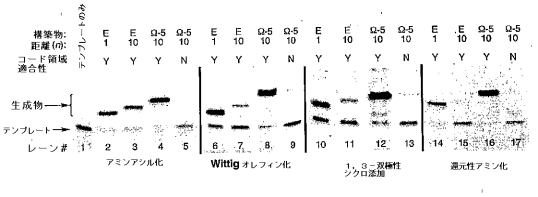
32 B

【図３３】



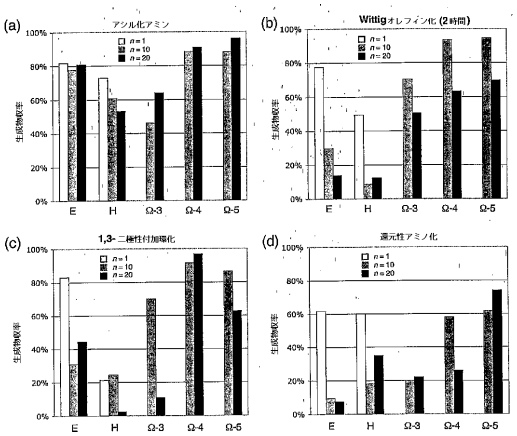
33

【図３４】



34

【図３５】

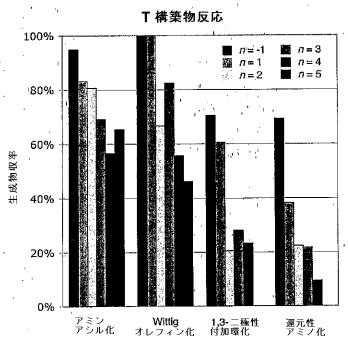


【図３６】

構築物	緩衝液	T_m (°C)
E (*n*=10)	PBS	45
Ω (*n*=10)	PBS	46
E (*n*=10)	HSP	55
Ω (*n*=10)	HSP	54
E (*n*=20)	PBS	40
Ω (*n*=20)	PBS	39

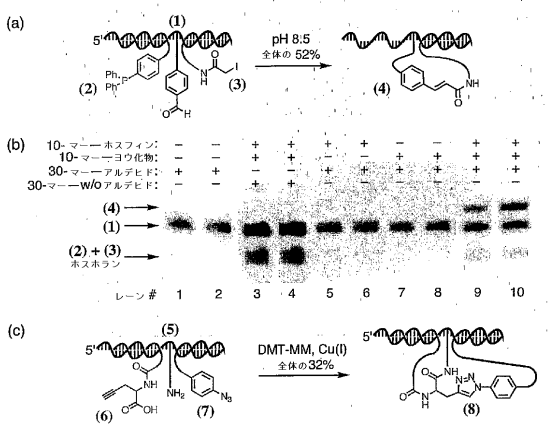
36

【図３７】



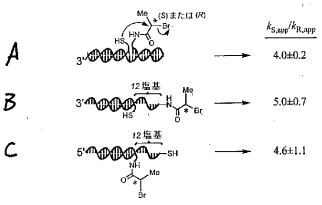
37

【図３８】



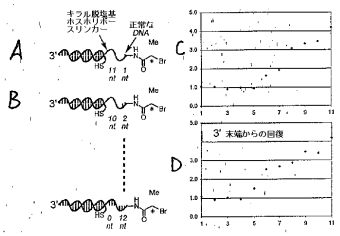
38

【図３９】



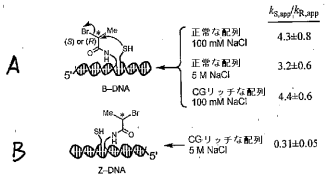
39

【図４０】



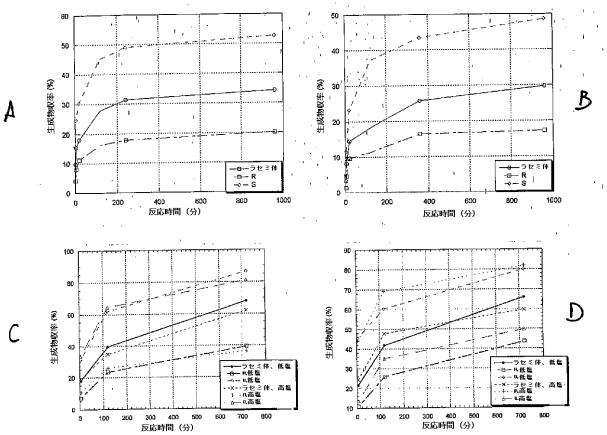
40

【図４１】



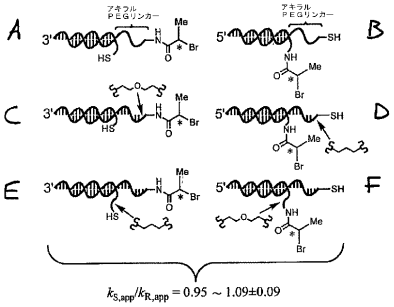
41

【図４２】



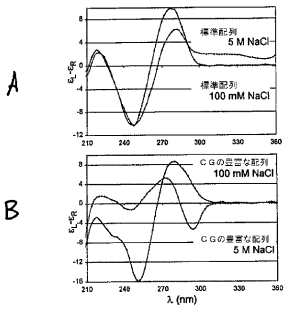
42

【図４３】



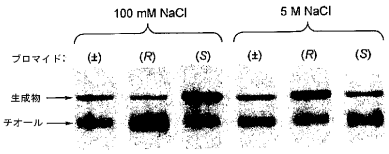
43

【図４４】



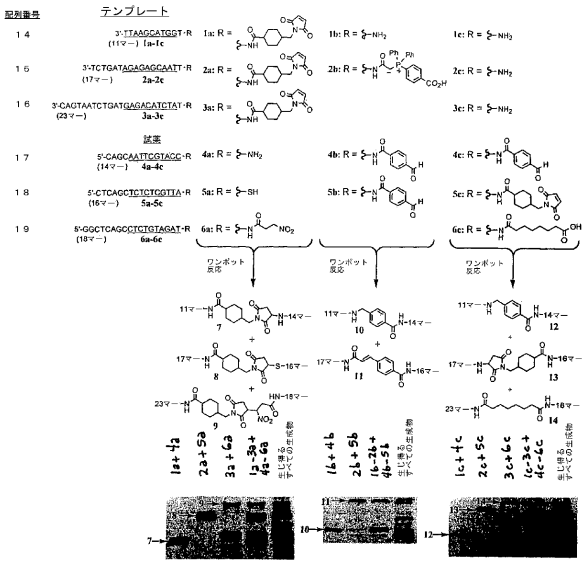
44

【図４５】



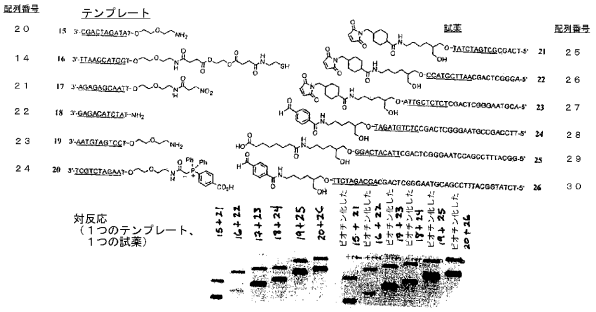
45

【図４６】



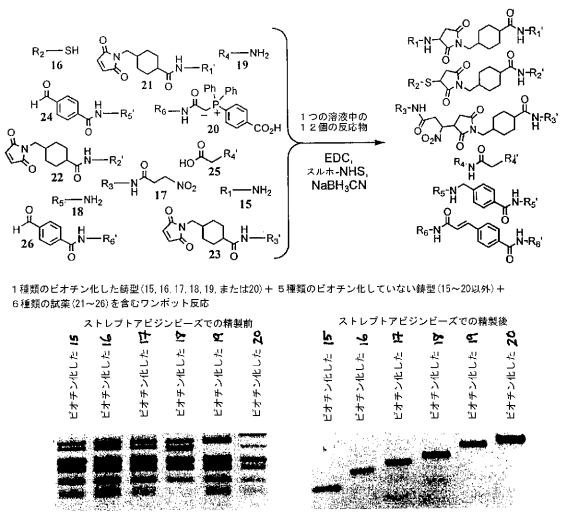
46

【図４７】



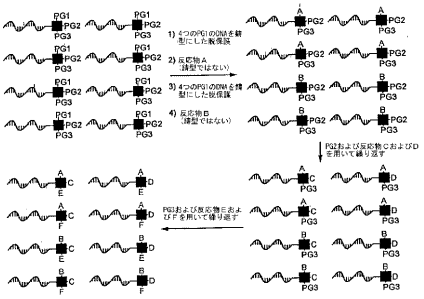
47

【図４８】



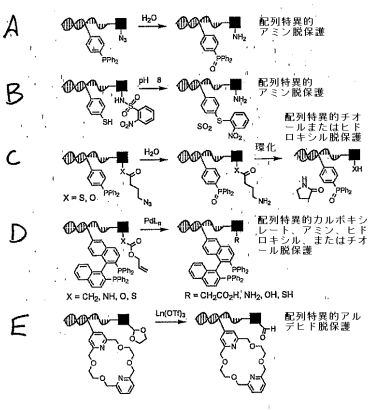
48

【図４９】



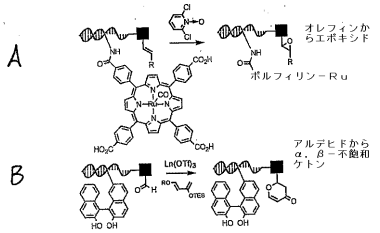
49

【図５０】



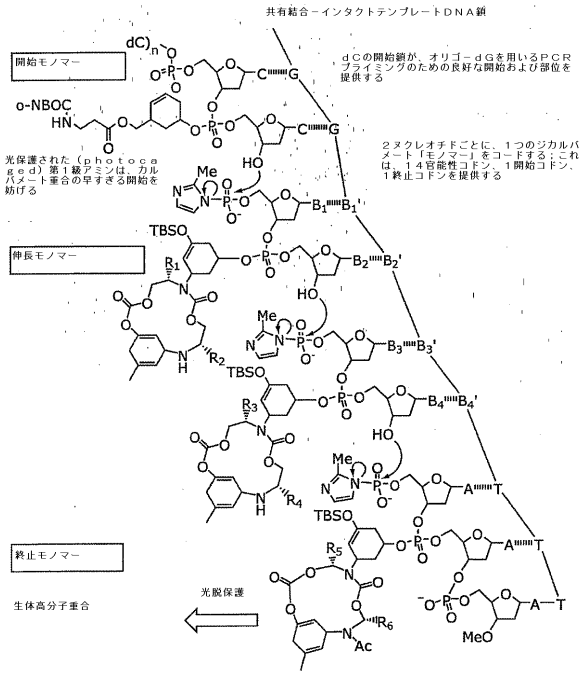
50

【図５１】



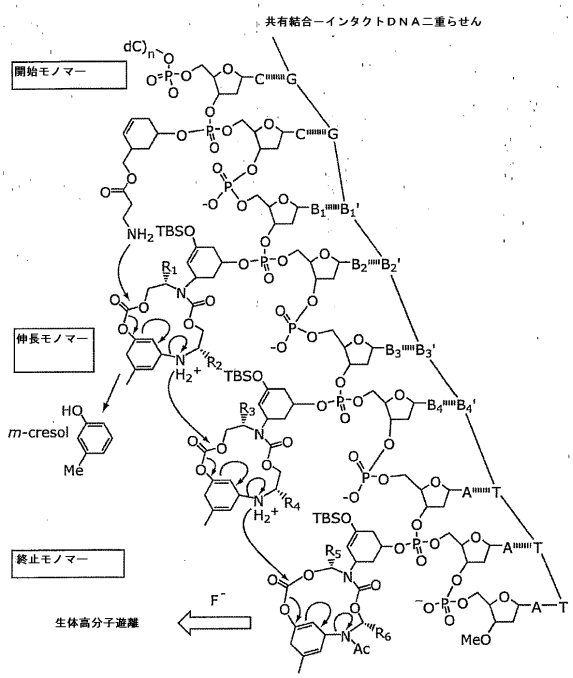
51

【図５２】



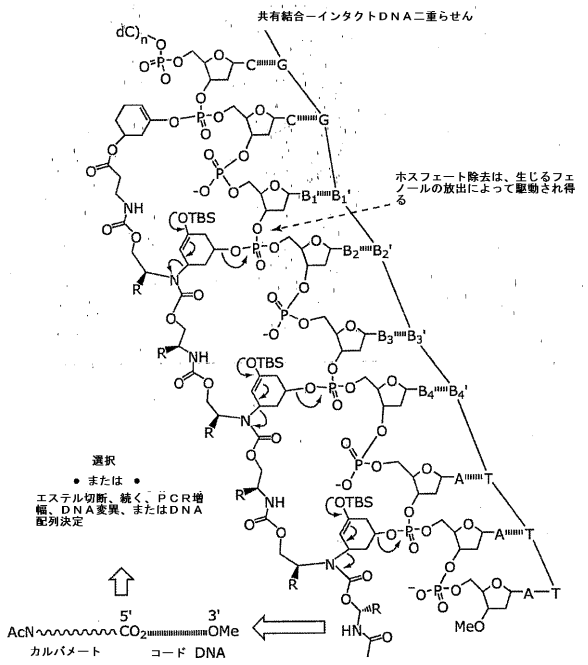
52

【図５３】



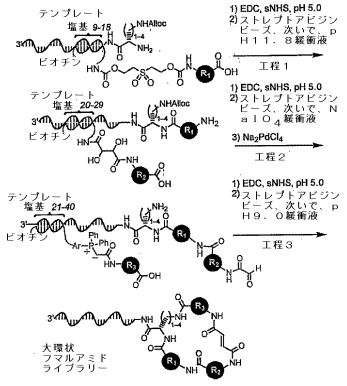
53

【図５４】



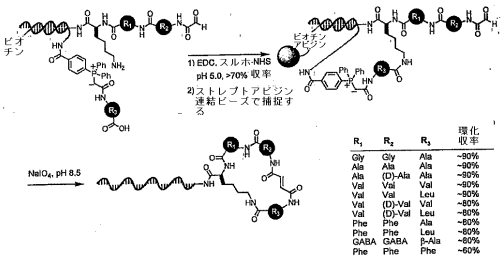
54

【図５５】



55

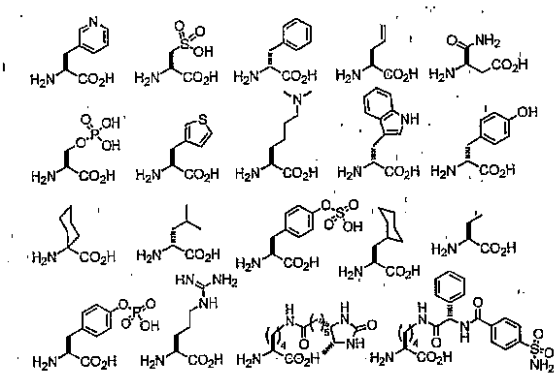
【図５６】



R1	R2	R3	環化収率
Gly	Gly	Ala	~90%
Ala	Ala	Ala	~90%
Ala	(D)-Ala	Ala	~90%
Val	Val	Val	~90%
Val	Val	Leu	~80%
Val	(D)-Val	Val	~80%
Val	(D)-Val	Leu	~80%
Phe	Phe	Ala	~80%
Phe	Phe	Leu	~80%
GABA	GABA	β-Ala	~80%
Phe	Phe	Phe	~60%

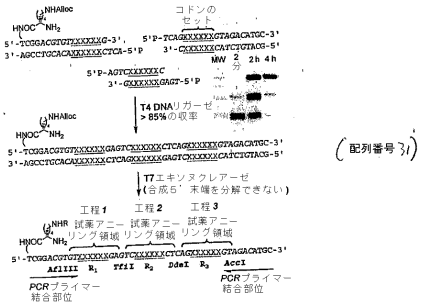
56

【図５７】



57

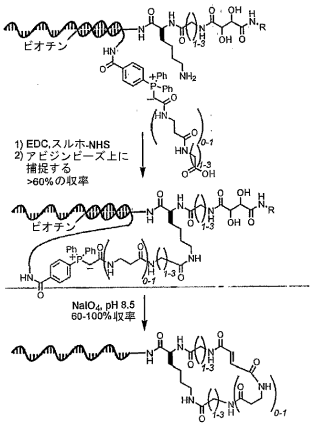
【図５８】



(配列番号31)

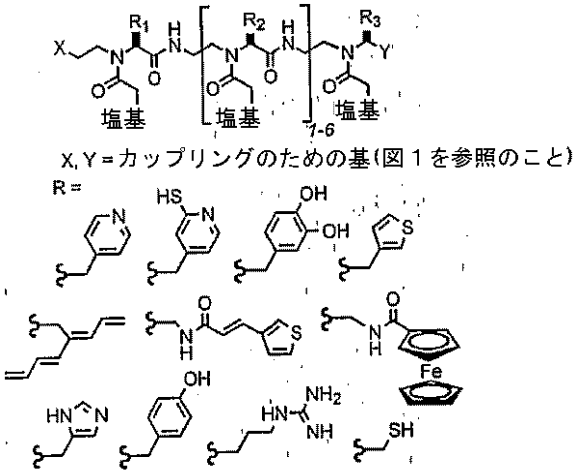
58

【図５９】



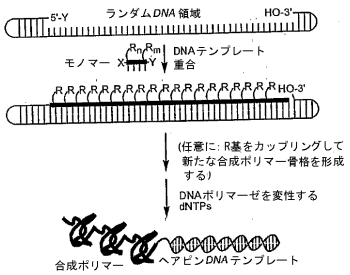
59

【図６０】



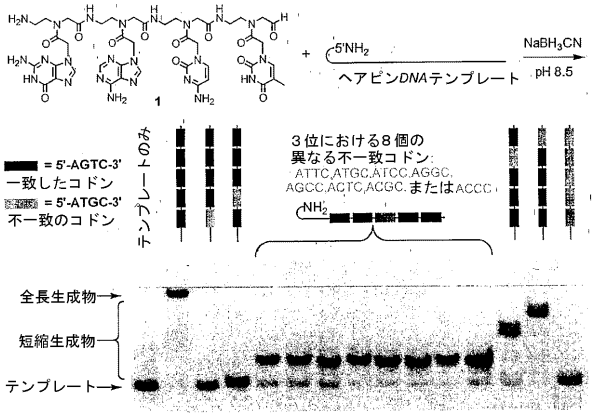
60

【図６１】



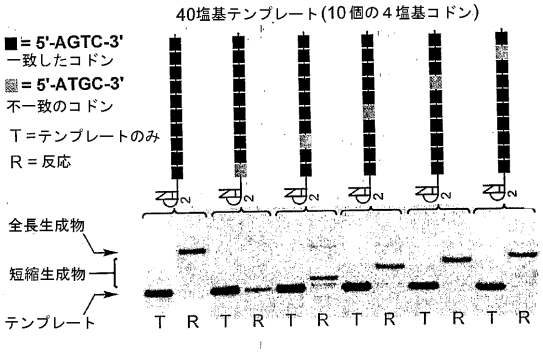
61

【図６２】



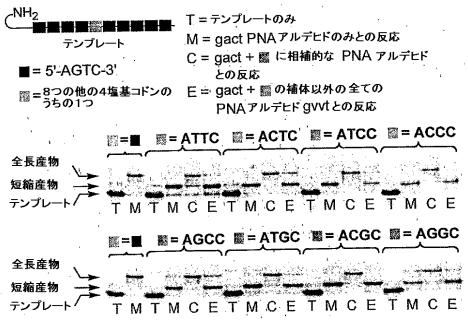
62

【図６３】



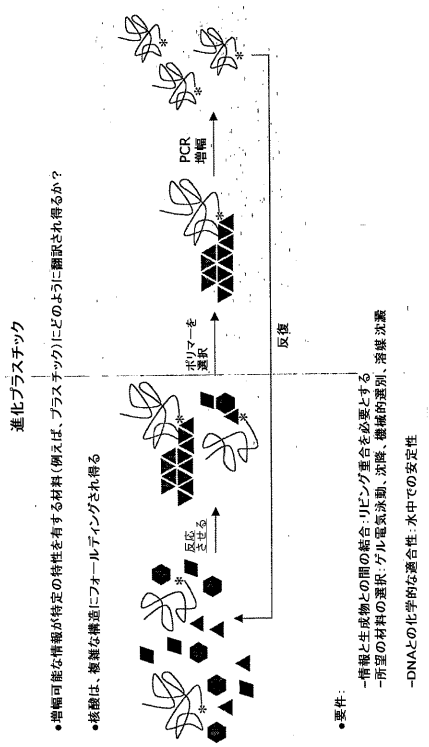
63

【図６４】



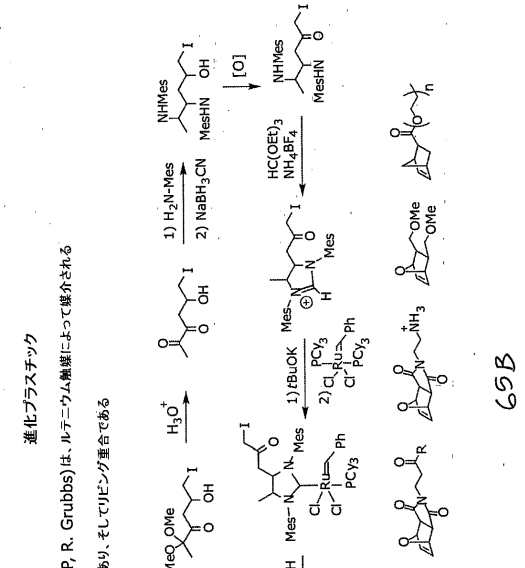
64

【図６５Ａ】



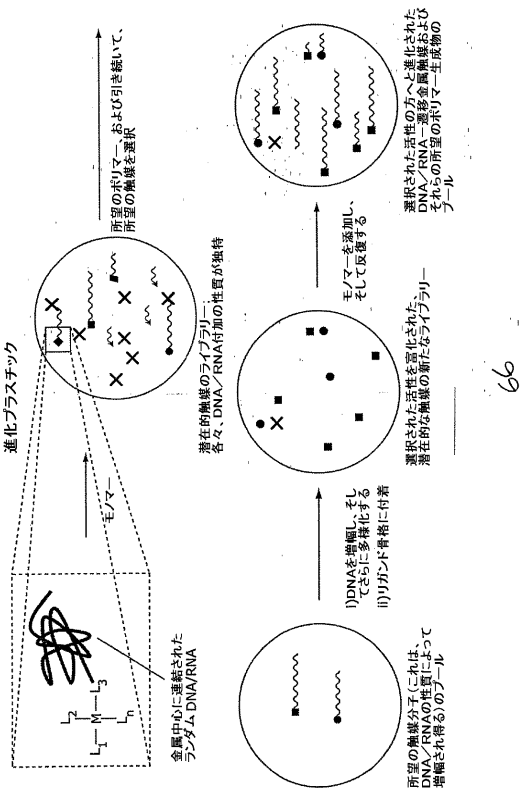
65A

【図６５Ｂ】



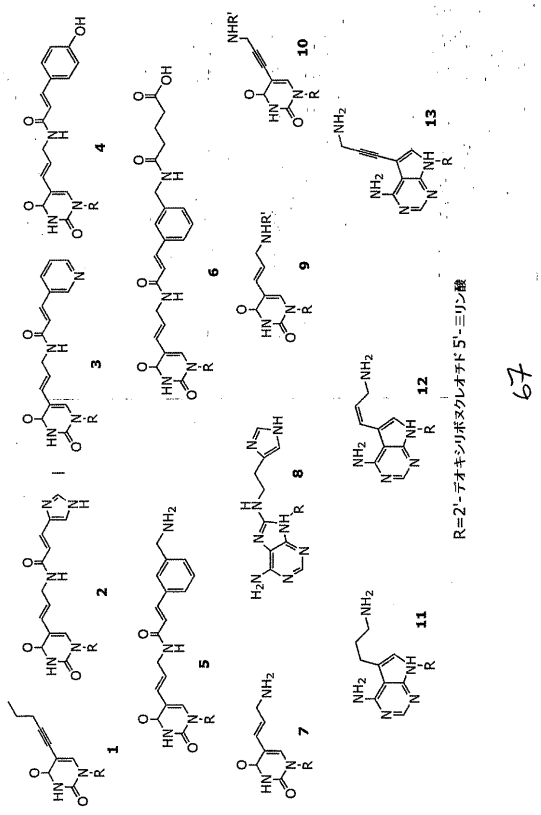
65B

【図６６】



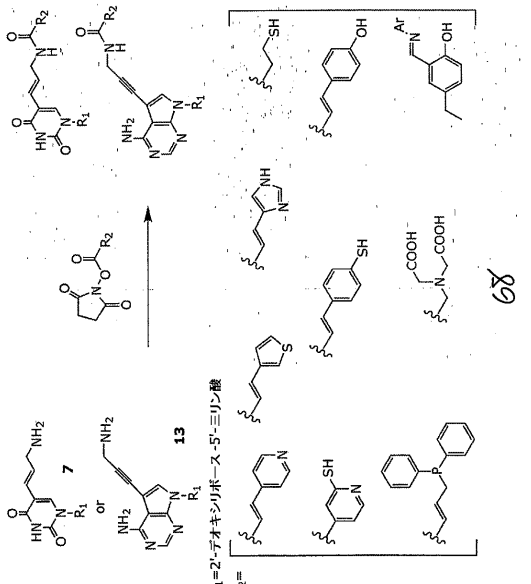
66

【図６７】



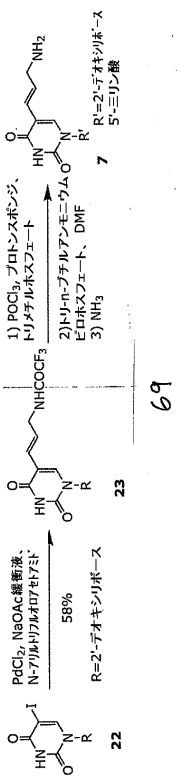
67

【図６８】

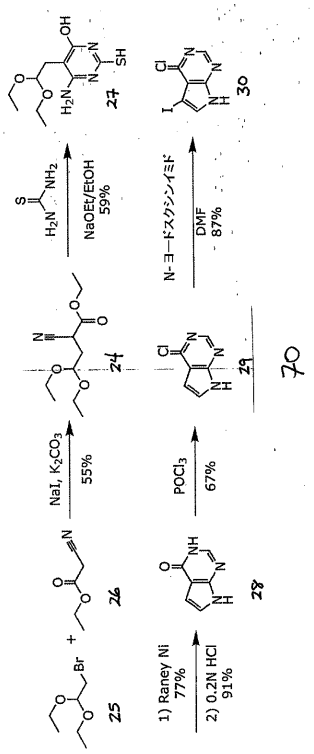


68

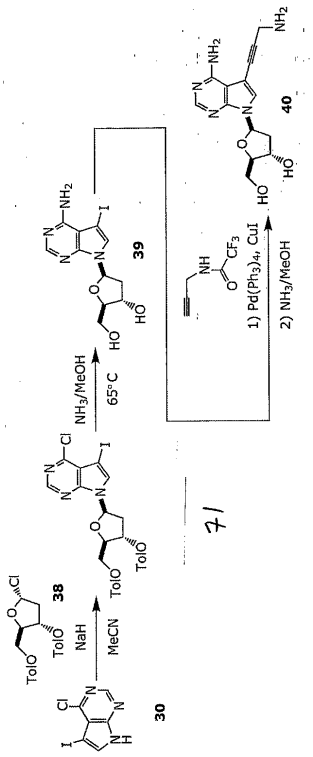
【図６９】



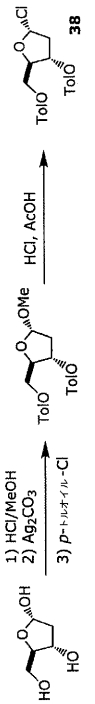
【図７０】



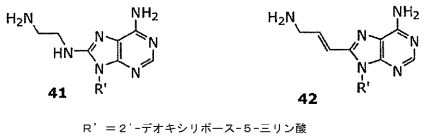
【図７１】



【図７２】

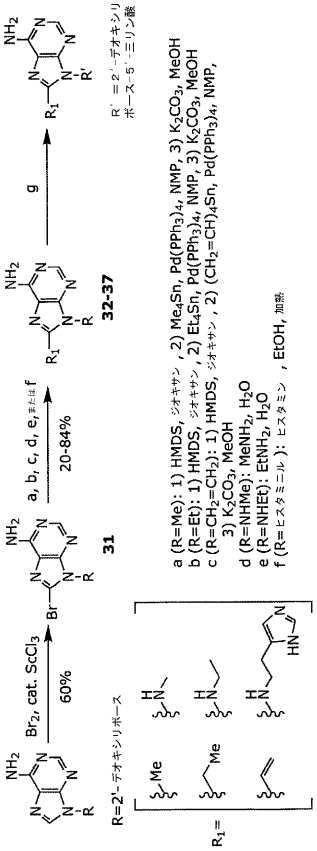


【図７３】



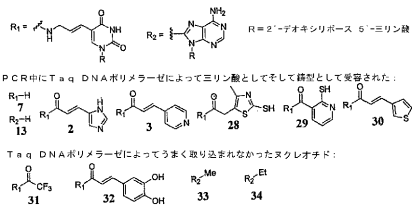
73

【図７４】



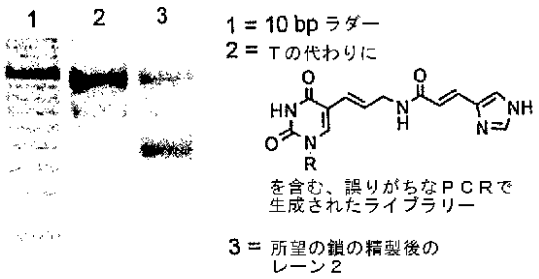
74

【図７５】



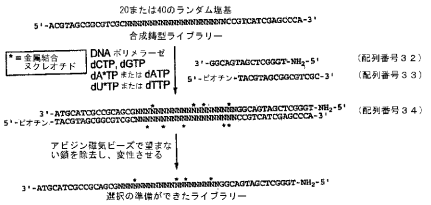
75

【図７６】



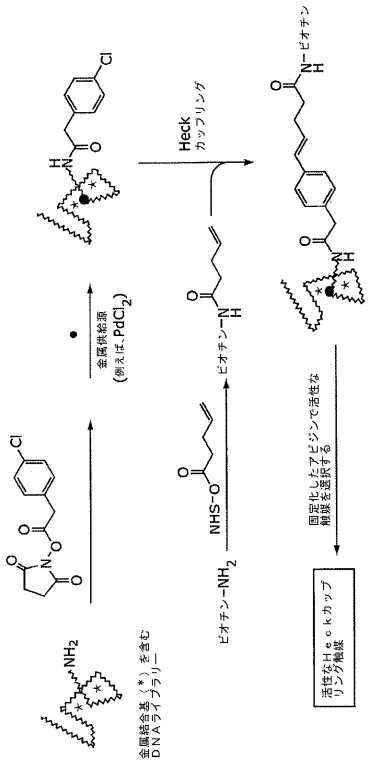
76

【図７７】



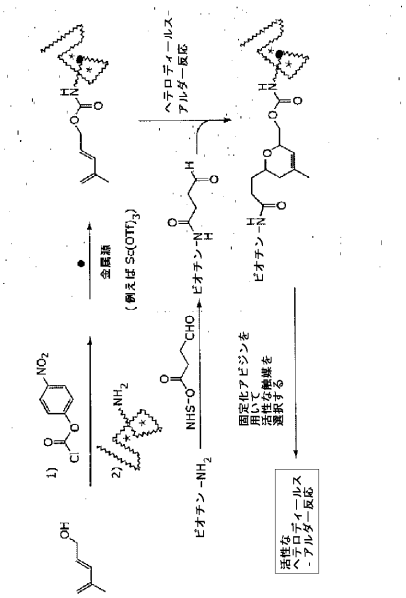
77

【図７８Ａ】

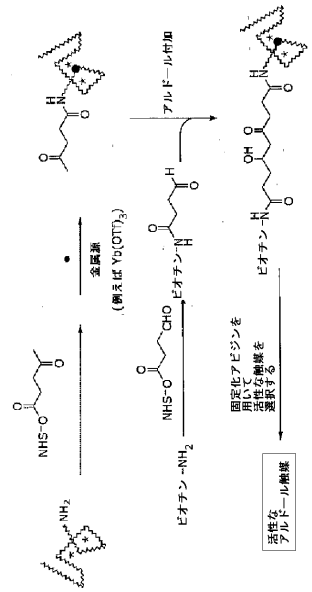


78A

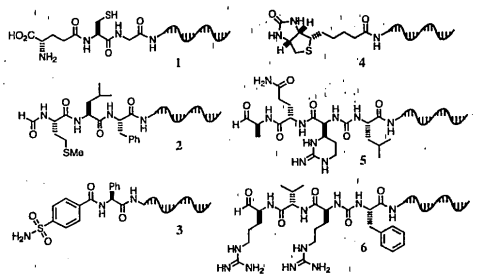
【図７８Ｂ】



【図７８Ｃ】

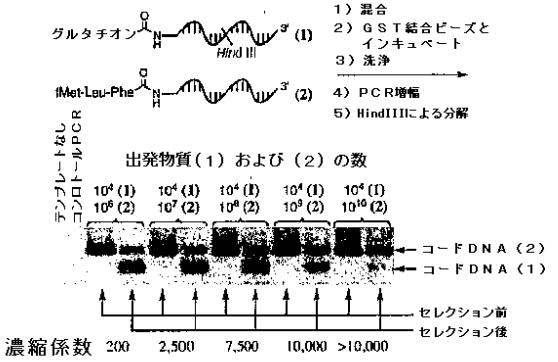


【図７９】

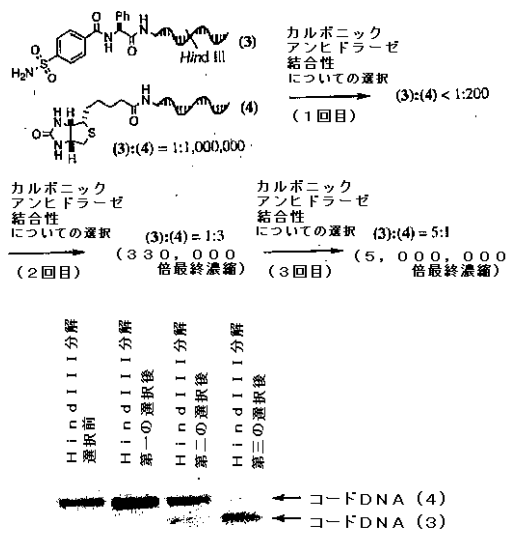


DNA結合分子	標的タンパク質	予測活性	濃縮係数	感度（mol）
1	グルタチオンSートランスフェラーゼ	K_d = 10 μM	2,500	10^{-20}
3	カルボニックアンヒドラーゼ	K_d = 0.9 nM	330	10^{-20}
4	ストレプトマイシン	K_d = 40 fM	4,400	10^{-18}
5	パパイン	IC_{50} = 14 μM	64	10^{-16}
5	キモトリプシン	IC_{50} = 290 nM	76	10^{-16}
6	パパイン	IC_{50} = 270 nM	98	10^{-16}
6	トリプシン	K_d = 100 nM	125	10^{-17}

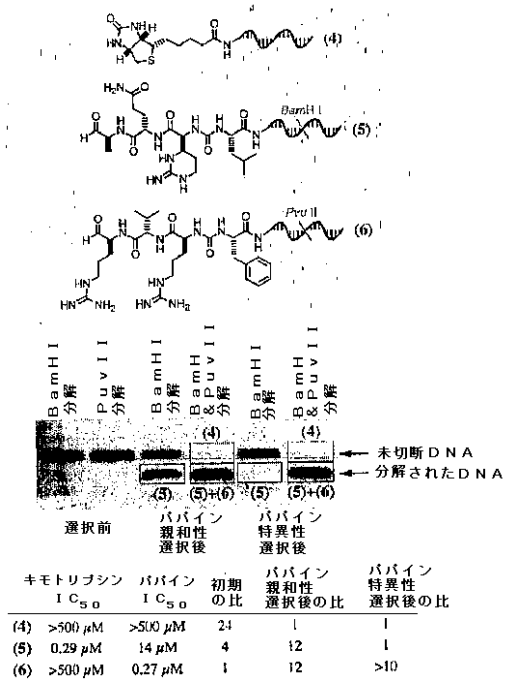
【図８０】



【図８１】

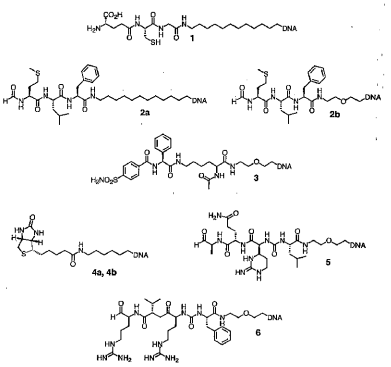


【図８２】

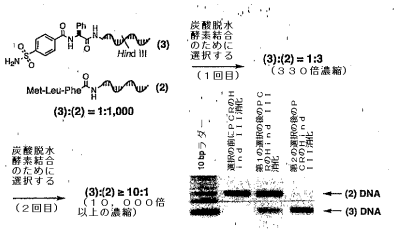


	キモトリプシン IC_{50}	パパイン IC_{50}	初期の比	パパイン親和性選択後の比	パパイン特異性選択後の比
(4)	>500 μM	>500 μM	24	1	1
(5)	0.29 μM	14 μM	4	12	1
(6)	>500 μM	0.27 μM	1	12	>10

【図８３】

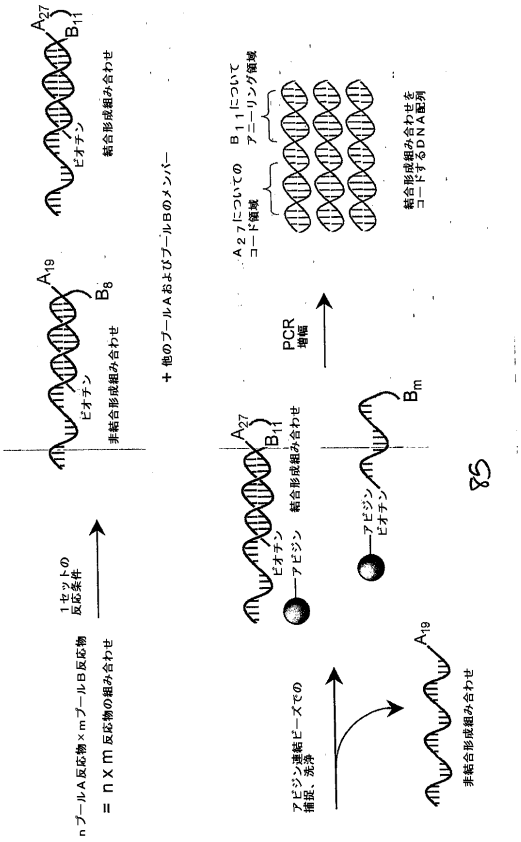


【図８４】



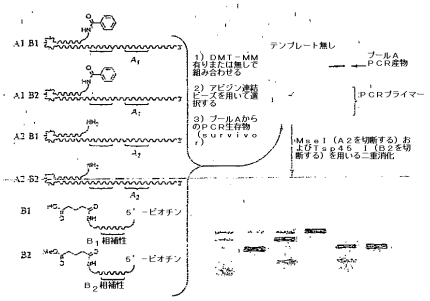
84

【図８５】



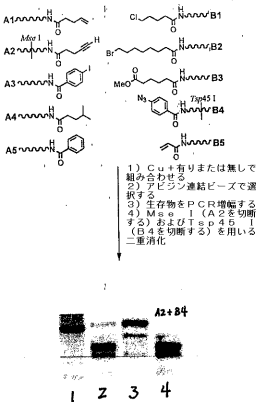
85

【図８６】



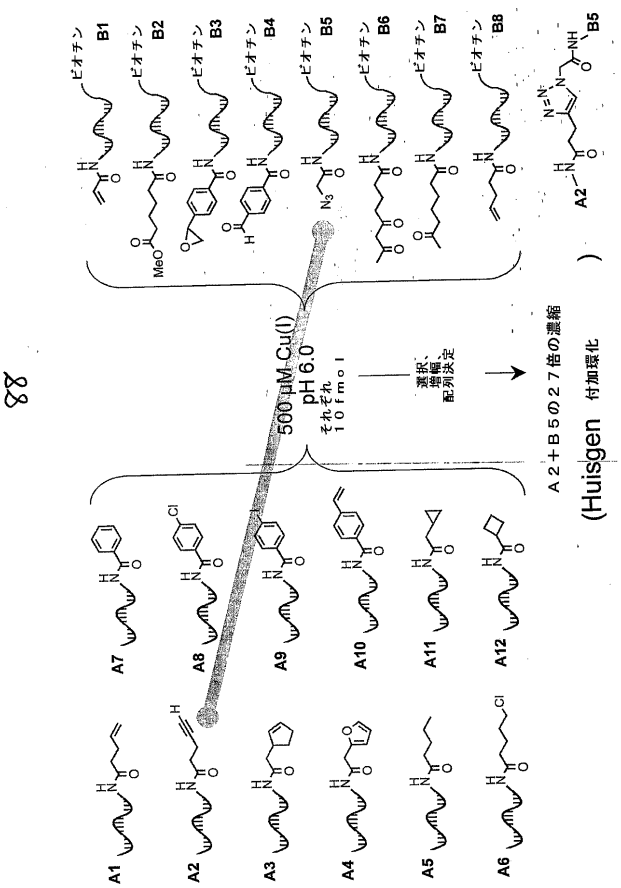
86

【図８７】



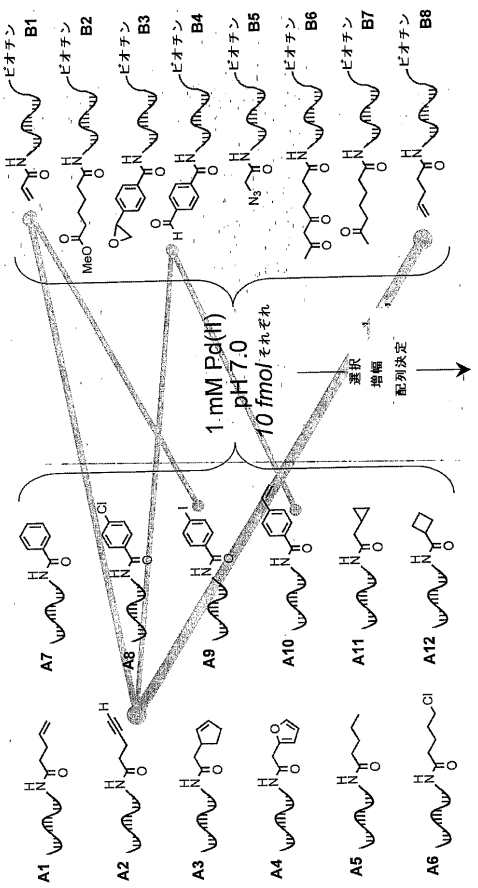
87

【図８８】



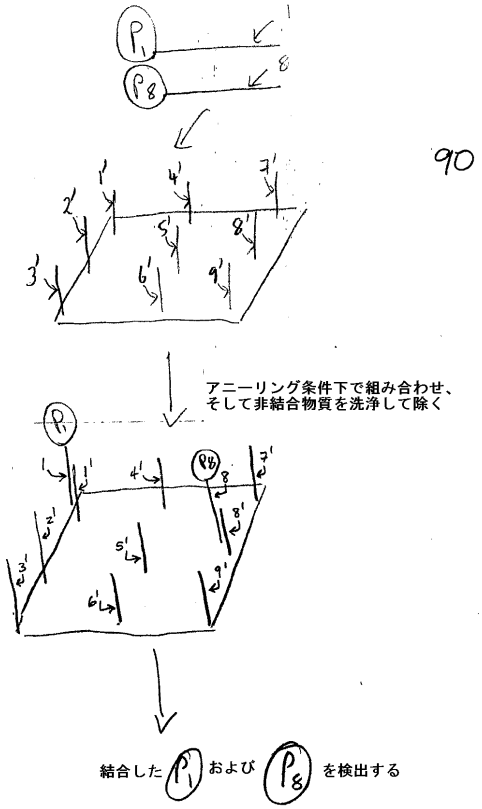
88

【図８９】



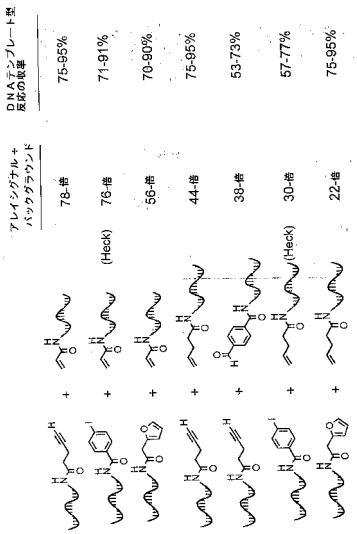
89

【図９０】



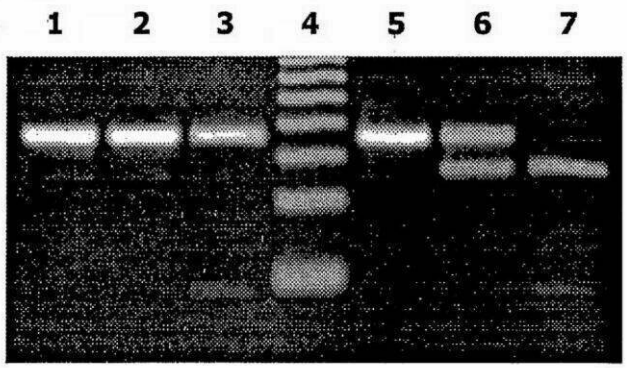
90

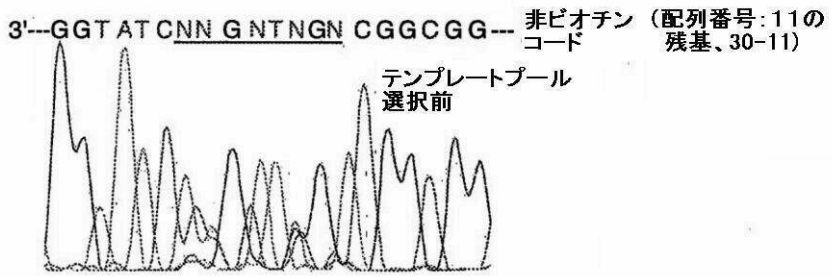
【図９１】

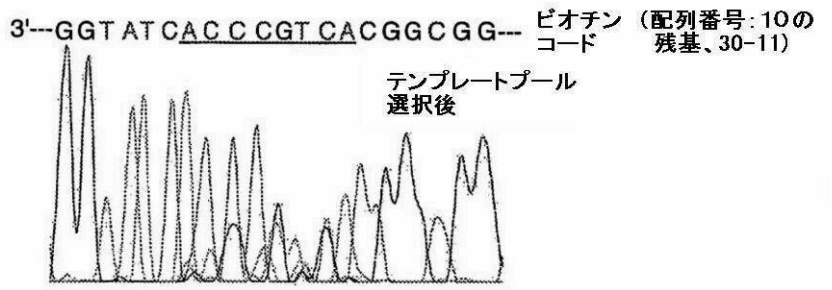


91

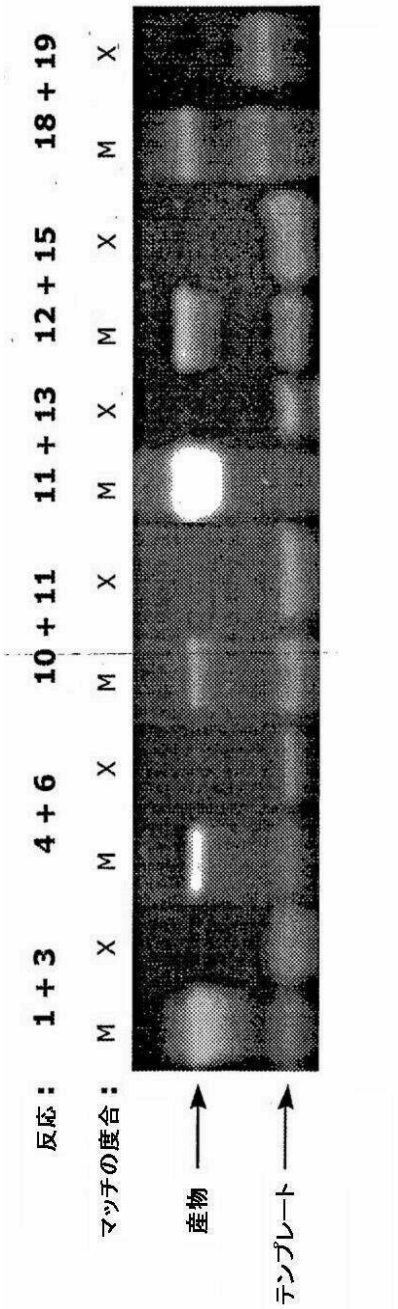
【図２２Ａ】


1
2
3
4
5
6
7

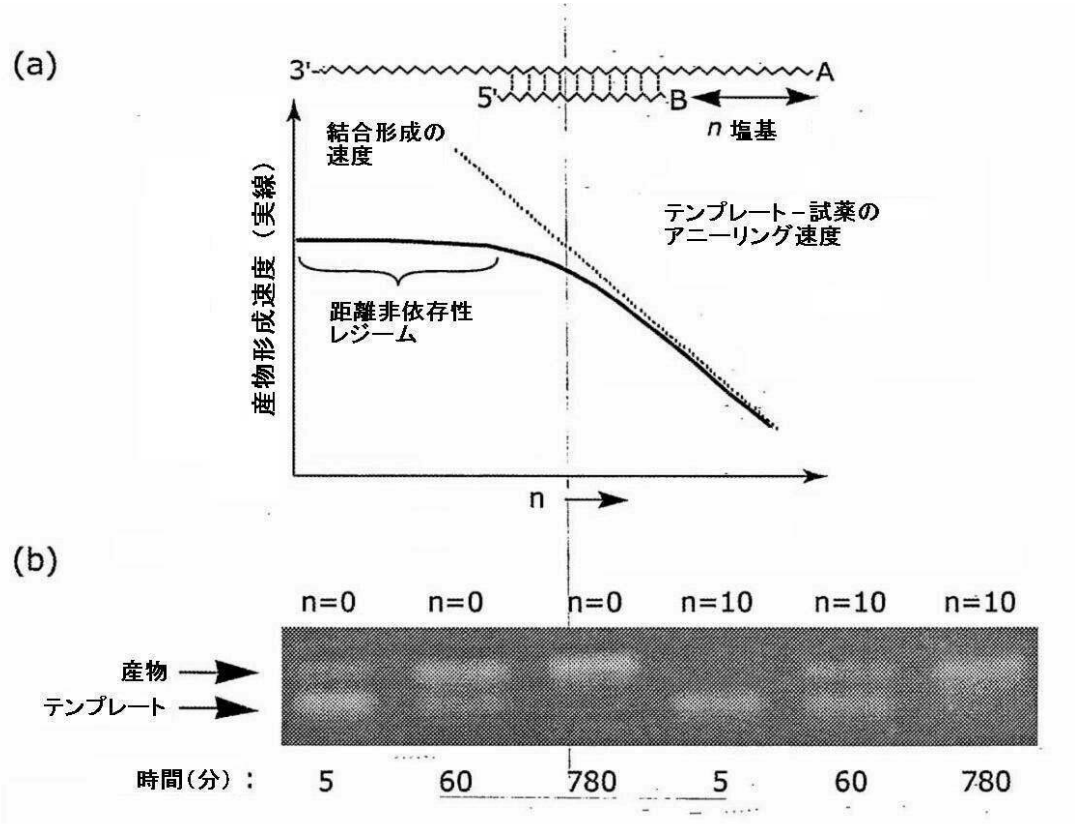

3'---GGTATCNN GNTNGN CGGCGG---
非ビオチン（配列番号：11の残基、30-11）コード
テンプレートプール選択前


3'---GGTATCACCCGTCACGGCGG---
ビオチン（配列番号：10の残基、30-11）コード
テンプレートプール選択後

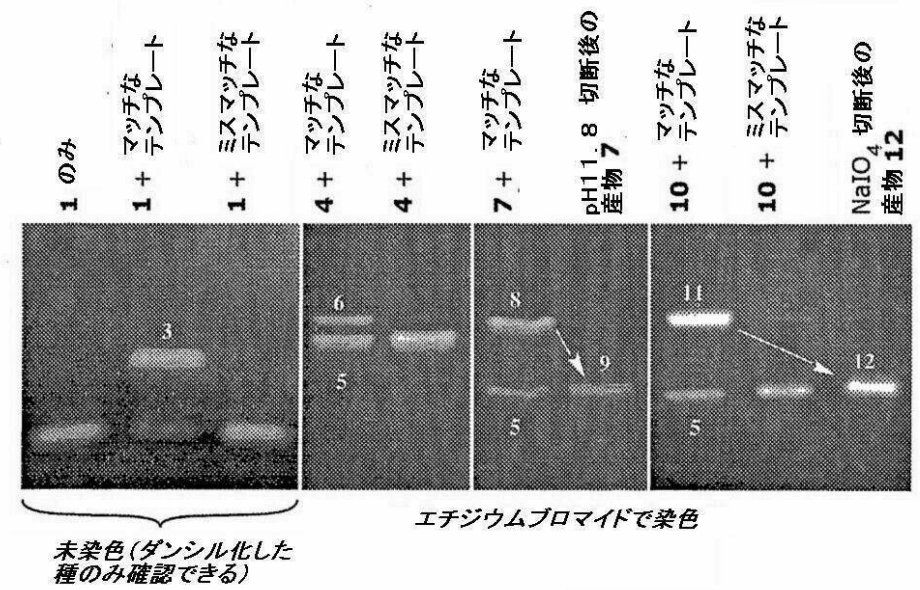
【図２４】



【図２６】


(a)
3'
A
5'
B
n 塩基
結合形成の速度
テンプレート－試薬のアニーリング速度
産物形成速度（実線）
距離非依存性レジーム
n
(b)
n=0
n=0
n=0
n=10
n=10
n=10
産物
テンプレート
時間（分）：
5
60
780
5
60
780

【図２９】


1 のみ
1 + マッチなテンプレート
1 + ミスマッチなテンプレート
4 + マッチなテンプレート
4 + ミスマッチなテンプレート
7 + マッチなテンプレート
pH11.8 切断後の産物 7
10 + マッチなテンプレート
10 + ミスマッチなテンプレート
NaIO4 切断後の産物 12
3
6
5
8
9
5
11
12
5
未染色（ダンシル化した種のみ確認できる）
エチジウムブロマイドで染色

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C07C 235/06	*(2006.01)*	C07C 235/06		
C07C 233/65	*(2006.01)*	C07C 233/65		
C07C 233/09	*(2006.01)*	C07C 233/09	B	
C07C 315/04	*(2006.01)*	C07C 315/04		
C07C 317/44	*(2006.01)*	C07C 317/44		
C07C 231/02	*(2006.01)*	C07C 231/02		
C07C 237/08	*(2006.01)*	C07C 237/08		
C07C 237/20	*(2006.01)*	C07C 237/20		
C07C 237/24	*(2006.01)*	C07C 237/24		
C07C 237/22	*(2006.01)*	C07C 237/22		
C07H 21/04	*(2006.01)*	C07H 21/04	B	

(31)優先権主張番号 60/444,770
(32)優先日 平成15年2月4日(2003.2.4)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/457,789
(32)優先日 平成15年3月26日(2003.3.26)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/469,866
(32)優先日 平成15年5月12日(2003.5.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/479,494
(32)優先日 平成15年6月18日(2003.6.18)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 デービッド アール. リュー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２０, レキシントン, フォックス ラン レーン １
(72)発明者 ゼブ ジェイ. ガートナー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４３, ソマービル, ディミック ストリート ６６－アパートメント ナンバー１
(72)発明者 ジェフリー ビー. ドヨン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３４, オールストン, アルディー ストリート. ７１－アパートメント ナンバー３
(72)発明者 クリストファー ティー. カルデロン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１２４１, ケンブリッジ, プリマス ストリート ６－アパートメント ナンバー１
(72)発明者 マシュー ダブリュー. カナン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８, ケンブリッジ, ラングドン ストリート ４４
(72)発明者 シャオユ リ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４１, ケンブリッジ, マーセラ ストリート ２２－アパートメント ナンバー３
(72)発明者 トーマス エム. スナイダー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８, ケンブリッジ, カークランド ストリート ７０－アパートメント ナンバー９
(72)発明者 ダニエル エム. ローゼンバウム

アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４３，　ソマービル，　ビーコン　ストリート　６９　－アパートメント　ナンバー３

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 HA08 HA20
4C057 BB01 CC01 DD01 MM01 MM04 MM05
4H006 AA02 AC24 AC25 AC53 BJ50 BN10 BU32 BU38 BU42 BV22
BV62 BV72 TA02