

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5745842号  
(P5745842)

(45) 発行日 平成27年7月8日 (2015.7.8)

(24) 登録日 平成27年5月15日 (2015.5.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

請求項の数 74 (全 166 頁)

(21) 出願番号 特願2010-513408 (P2010-513408)  
 (86) (22) 出願日 平成20年6月19日 (2008.6.19)  
 (65) 公表番号 特表2010-530759 (P2010-530759A)  
 (43) 公表日 平成22年9月16日 (2010.9.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/067507  
 (87) 国際公開番号 W02008/157696  
 (87) 国際公開日 平成20年12月24日 (2008.12.24)  
 審査請求日 平成23年6月17日 (2011.6.17)  
 (31) 優先権主張番号 60/945,031  
 (32) 優先日 平成19年6月19日 (2007.6.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/981,916  
 (32) 優先日 平成19年10月23日 (2007.10.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509349026  
 ストラトス ゲノミクス インコーポレイ  
 テッド  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9812  
 1 シアトル スイテ 500 エルリオ  
 ット アベニュー 2401  
 (74) 代理人 100097456  
 弁理士 石川 徹  
 (72) 発明者 マルク スタマトイオス ココリス  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9801  
 1 ボトフエル ノルトフエアスト 1  
 96トフ ストリート 10535

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 拡張によるハイスループット核酸配列決定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸を配列決定するための方法であって、

- a) テンプレートに方向づけられた合成によって作製される娘鎖を提供することであって、該娘鎖が該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを含み、該個々のサブユニットがテザー、少なくとも1つのプローブ又は核酸塩基残基、及び少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む、前記提供；  
 b) 該少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を切断して、該娘鎖の複数のサブユニットより長い長さのエキスパンドマーを産生することであって、該エキスパンドマーが該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列における遺伝情報を解析するためのテザー及びレポーターエレメントを含む、前記切断；及び、  
 c) 該エキスパンドマーのレポーターエレメントの検出；  
 を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記遺伝情報を解析するためのレポーターエレメントが、前記エキスパンドマーのテザーと会合されている、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記遺伝情報を解析するためのレポーターエレメントが、前記少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、前記娘鎖と会合されている、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝情報を解析するためのレポーターエレメントが、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断後に、前記エキスパンドマーと会合されている、請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記エキスパンドマーが、前記少なくとも1つのプローブ又は核酸塩基残基の全体又は一部を更に含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記遺伝情報を解析するためのレポーターエレメントが、前記少なくとも1つのプローブ若しくは核酸塩基残基であるか又はこれに会合されている、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記少なくとも1つの選択的に切断可能な結合が、共有結合である、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも1つの選択的に切断可能な結合が、テザー内結合である、請求項1記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つの選択的に切断可能な結合が、前記娘鎖のプローブ若しくは核酸塩基残基の間の又はその中の結合である、請求項1記載の方法。

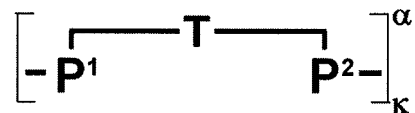
【請求項10】

前記少なくとも1つの選択的に切断可能な結合が、前記娘鎖のプローブ若しくは核酸塩基残基と標的テンプレートの間の結合である、請求項1記載の方法。

【請求項11】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

【化1】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

αは、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び

Kは、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含む。)

【請求項12】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有するテンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項11記載の方法：

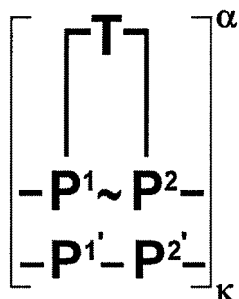
10

20

30

40

## 【化 2】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1'</sup>は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；P<sup>2'</sup>は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

20

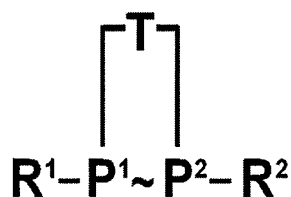
は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列に相補的である。 )。

## 【請求項 1 3】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のオリゴマー基質構築物から形成される、請求項11記載の方法：

## 【化 3】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

40

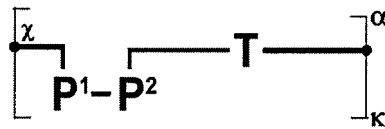
～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；並びに

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表す。 )。

## 【請求項 1 4】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

## 【化 4】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

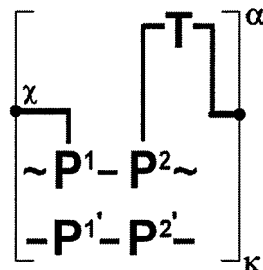
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

## 【請求項 15】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有する  
テンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項14記載の方法：

## 【化 5】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1</sup>'は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

P<sup>2</sup>'は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列に相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

## 【請求項 16】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のオリゴマー基質構築物から形成される、請求項14記載の方法：

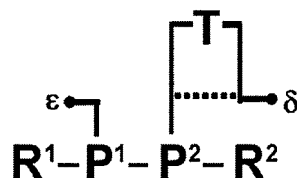
10

20

30

40

## 【化 6】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P¹は、第一のプロープ部分を表し；

P²は、第二のプロープ部分を表し；

R¹及びR²は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

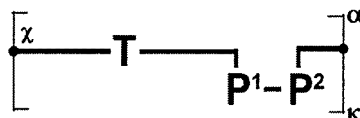
は、第二のリンカー基を表し；並びに

" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

## 【請求項 17】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

## 【化 7】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P¹は、第一のプロープ部分を表し；

P²は、第二のプロープ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

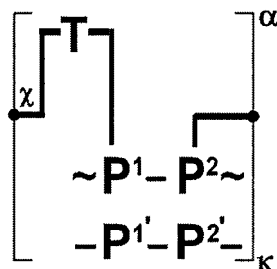
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

## 【請求項 18】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有するテンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項17記載の方法：

## 【化 8】



(式中、

Tは、テザーを表し；

10

20

30

40

50

$P^1$  は、第一のプローブ部分を表し；

$P^2$  は、第二のプローブ部分を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

$P^1'$  は、 $P^1$  が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

$P^2'$  は、 $P^2$  が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、3よりも大きい整数であり；

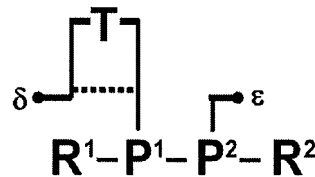
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

#### 【請求項 19】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のオリゴマー基質構築物から形成される、請求項17記載の方法；

#### 【化 9】



(式中、

Tは、テザーを表し；

$P^1$  は、第一のプローブ部分を表し；

$P^2$  は、第二のプローブ部分を表し；

$R^1$  及び  $R^2$  は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

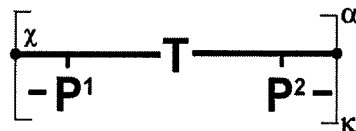
は、第二のリンカー基を表し；並びに

" " は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

#### 【請求項 20】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法；

#### 【化 10】



(式中、

Tは、テザーを表し；

$P^1$  は、第一のプローブ部分を表し；

$P^2$  は、第二のプローブ部分を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含

10

20

30

40

50

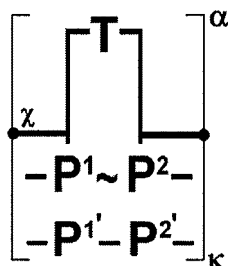
み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 2 1】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有する  
テンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項20記載の方法：

【化 1 1】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1</sup>' は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

P<sup>2</sup>' は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

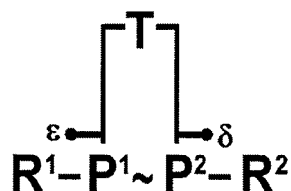
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列に相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 2 2】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のオリゴマー基質構築物から形成される、請求項20記載の方法：

【化 1 2】



40

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

は、第一のリンカー基を表し；並びに

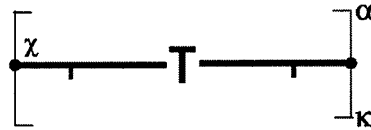
は、第二のリンカー基を表す。 )。

50

## 【請求項 2 3】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

## 【化 1 3】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

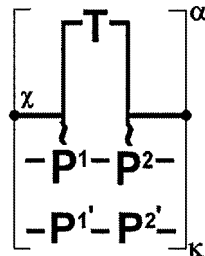
は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

## 【請求項 2 4】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有する  
テンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項23記載の方法：

20

## 【化 1 4】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1</sup>' は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

P<sup>2</sup>' は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

40

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

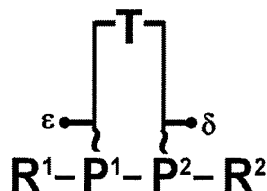
は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

## 【請求項 2 5】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のオリゴマー基質構築物から形成される、請求項23記載の方法：



【化 1 5】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P¹は、第一のプロープ部分を表し；

P²は、第二のプロープ部分を表し；

～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

R¹及びR²は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

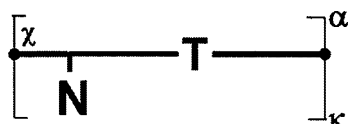
は、第一のリンカー基を表し；並びに

は、第二のリンカー基を表す。 )。

【請求項 2 6】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

【化 1 6】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

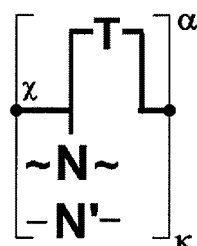
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 2 7】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有するテンプレート - 娘鎖二重鎖を構成する、請求項26記載の方法：

【化 1 7】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

10

20

30

40

50

N' は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

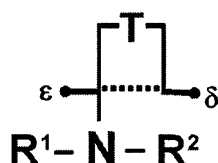
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列に相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 2 8】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のモノマー基質構築物から形成される、請求項26記載の方法：

【化 1 8】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R¹及びR²は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

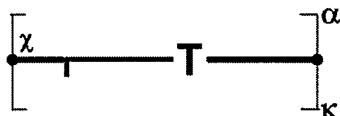
は、第二のリンカー基を表し；並びに

" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

【請求項 2 9】

前記エクスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

【化 1 9】



(式中、

Tは、テザーを表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 3 0】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有するテンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項29記載の方法：

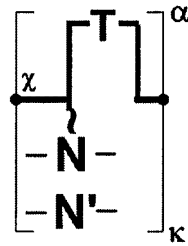
10

20

30

40

## 【化 2 0】



(式中、

10

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列に相補的であり；及び

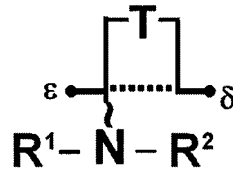
は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

20

## 【請求項 3 1】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のモノマー基質構築物から形成される、請求項29記載の方法：

## 【化 2 1】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

は、第二のリンカー基を表し；並びに

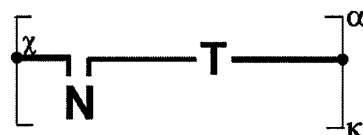
" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

40

## 【請求項 3 2】

前記エクスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

## 【化 2 2】



(式中、

50

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

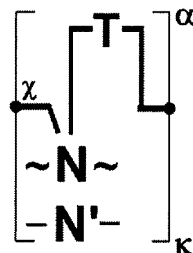
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 3 3】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、下記構造を有する  
テンプレート - 娘鎖二重鎖を含む、請求項32記載の方法：

【化 2 3】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

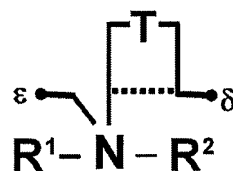
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列に相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 3 4】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のモノマー基質構築物から形成される、請求項32記載の方法：

【化 2 4】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

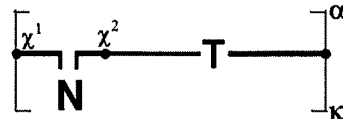
は、第二のリンカー基を表し；並びに

" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

## 【請求項 3 5】

前記エキスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

## 【化 2 5】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；

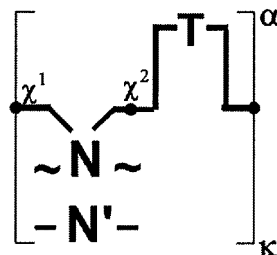
<sup>1</sup>は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表し；及び

<sup>2</sup>は、テザー間結合を表す。 )。

## 【請求項 3 6】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、テンプレート鎖と二重鎖化され、下記構造を有するテンプレート - 娘鎖二重鎖を産生する、請求項35記載の方法：

## 【化 2 6】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；

<sup>1</sup>は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表し；及び

<sup>2</sup>は、テザー間結合を表す。 )。

## 【請求項 3 7】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のモノマー基質構築物から形成される、請求項35記載の方法：

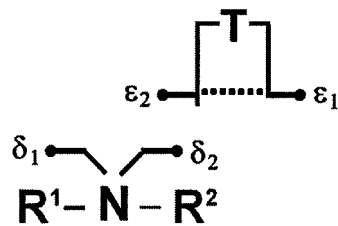
10

20

30

40

## 【化 2 7】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

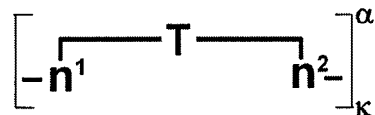
R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；ε<sub>1</sub>及びε<sub>2</sub>は、同じ又は異なる第一のリンカー基を表し；δ<sub>1</sub>及びδ<sub>2</sub>は、同じ又は異なる第二のリンカー基を表し；並びに

" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。)

## 【請求項 3 8】

前記エクスパンドマーが、下記構造を含む、請求項1記載の方法：

## 【化 2 8】



(式中、

Tは、テザーを表し；

n<sup>1</sup>及びn<sup>2</sup>は、各々、核酸塩基残基の第一の部分及び第二の部分を表し；

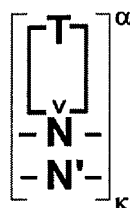
kは、m個のサブユニットの鎖内の第m番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；並びに

αは、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含む。)

## 【請求項 3 9】

前記娘鎖が、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前に、テンプレート鎖と二重鎖化され、下記構造を有する二重鎖娘鎖を産生する、請求項38記載の方法：

## 【化 2 9】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

Vは、核酸塩基残基の内部切断部位を表し；

10

20

30

40

50

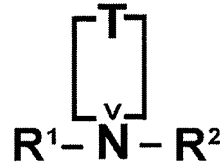
は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、10よりも大きい整数であり；及び

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的である。 )。

【請求項 4 0】

前記娘鎖が、下記構造を有する複数のモノマー基質構築物から形成される、請求項38記載の方法：

【化 3 0】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

Vは、核酸塩基残基の内部切断部位を表し；及び

$\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表す。 )。

20

【請求項 4 1】

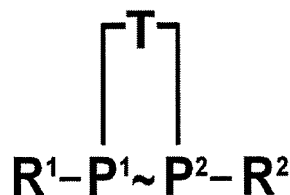
標的核酸を配列決定するためのテンプレートに方向づけられた合成における使用のためのオリゴマー基質構築物であって、第一及び第二のプロープ部分の各々がテンプレートに方向づけられた合成に適した末端基を有する該第二のプロープ部分へ結合された第一のプロープ部分、並びに、該第一及び第二のプロープ部分の少なくとも1つに結合されているテザーの少なくとも第一末端を有する第一末端及び第二末端を有するテザーを含み、ここで該オリゴマー基質構築物は、テンプレートに方向づけられた合成において使用される場合、拘束されたエキスパンドマーを含む娘鎖を形成することが可能であり、該拘束されたエキスパンドマーは、該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを有するものであり、ここで該個々のサブユニットは、テザー、該第一及び第二のプロープ部分、並びに、切断により該娘鎖の複数のサブユニットよりも長い長さのエキスパンドマーを産生する少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む、前記オリゴマー基質構築物。

30

【請求項 4 2】

下記構造を有する、請求項41記載のオリゴマー基質構築物：

【化 3 1】



40

(式中、

Tは、テザーを表し；

$\text{P}^1$ は、第一のプロープ部分を表し；

$\text{P}^2$ は、第二のプロープ部分を表し；

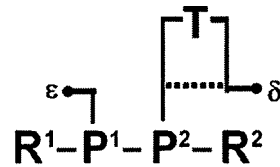
50

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；並びに  
 $R^1$  及び  $R^2$  は、テンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表す。  
 )。

【請求項 4 3】

下記構造を有する、請求項41記載のオリゴマー基質構築物：

【化 3 2】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

$P^1$  は、第一のプローブ部分を表し；

$P^2$  は、第二のプローブ部分を表し；

$R^1$  及び  $R^2$  は、テンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し

；

は、第一のリンカー基を表し；

は、第二のリンカー基を表し；並びに

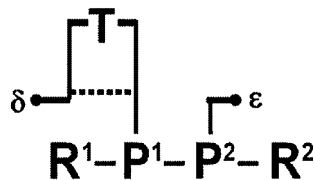
" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

20

【請求項 4 4】

下記構造を有する、請求項41記載のオリゴマー基質構築物：

【化 3 3】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

$P^1$  は、第一のプローブ部分を表し；

$P^2$  は、第二のプローブ部分を表し；

$R^1$  及び  $R^2$  は、テンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し

；

は、第一のリンカー基を表し；

は、第二のリンカー基を表し；並びに

" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

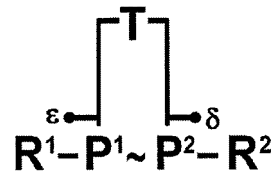
40

【請求項 4 5】

下記構造を有する、請求項41記載のオリゴマー基質構築物：



## 【化 3 4】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、テンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し

；

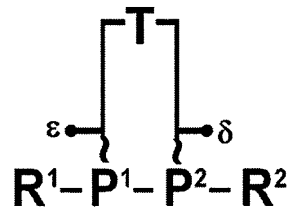
εは、第一のリンカー基を表し；並びに

δは、第二のリンカー基を表す。 )。

## 【請求項 4 6】

下記構造を有する、請求項41記載のオリゴマー基質構築物：

## 【化 3 5】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、テンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し

；

εは、第一のリンカー基を表し；並びに

δは、第二のリンカー基を表す。 )。

## 【請求項 4 7】

標的核酸を配列決定するためのテンプレートに方向づけられた合成における使用のためのモノマー基質構築物であって、テンプレートに方向づけられた合成に適した末端基を有する核酸塩基、並びに、該核酸塩基残基に結合されているテザーの少なくとも第一末端を有する第一末端及び第二末端を有するテザーを含み、ここで該モノマー基質構築物は、テンプレートに方向づけられた合成において使用される場合、拘束されたエキスパンドマーを含む娘鎖を形成することが可能であり、該拘束されたエキスパンドマーは、該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを有し、ここで該個々のサブユニットは、テザー、該核酸塩基残基、及び、切断により該娘鎖の複数のサブユニットよりも長い長さのエキスパンドマーを産生する少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む、前記モノマー基質構築物。

## 【請求項 4 8】

下記構造を有する、請求項47記載のモノマー基質構築物：

10

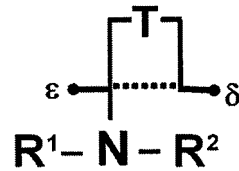
20

30

40

50

【化 3 6】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

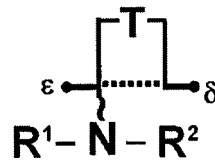
は、第二のリンカー基を表し；並びに

" は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

【請求項 49】

下記構造を有する、請求項47記載のモノマー基質構築物：

【化 3 7】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、第一のリンカー基を表し；

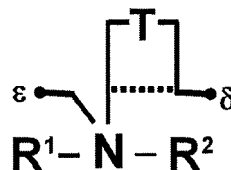
は、第二のリンカー基を表し；並びに

" は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

【請求項 5 0】

下記構造を有する、請求項47記載のモノマー基質構築物：

【化 3 8】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

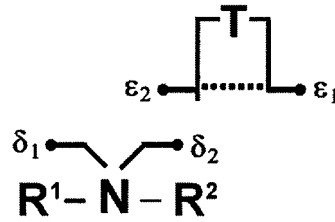
は、第一のリンカー基を表し；

は、第二のリンカー基を表し；並びに  
 " "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

【請求項 5 1】

下記構造を有する、モノマー基質構築物：

【化 3 9】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表し；

<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>は、同じ又は異なる第一のリンカー基を表し；

<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>は、同じ又は異なる第二のリンカー基を表し；並びに

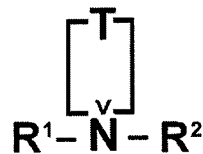
" "は、切断可能なテザー内架橋を表す。 )。

20

【請求項 5 2】

下記構造を有する、請求項47記載のモノマー基質構築物：

【化 4 0】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

Vは、核酸塩基残基の内部切断部位を表し；並びに

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、該娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための同じ又は異なる末端基を表す。 )。

【請求項 5 3】

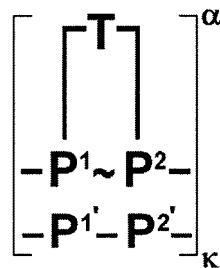
テンプレート鎖と二重鎖化された娘鎖を含む、標的核酸を配列決定するためのテンプレートに方向づけられた合成における使用のための二重鎖娘鎖であって、該娘鎖は、拘束されたエキスパンドマーを含み、かつ該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを有し、ここで該個々のサブユニットは、テザー、少なくとも1つのプローブ又は核酸塩基残基、及び、切断により該娘鎖の複数のサブユニットよりも長い長さのエキスパンドマーを産生する少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む、前記二重鎖娘鎖。

40

【請求項 5 4】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

## 【化 4 1】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1'</sup>は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；P<sup>2'</sup>は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

20

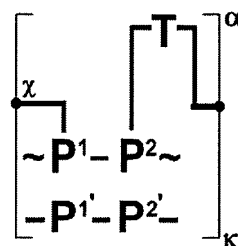
は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的である。 )。

## 【請求項 5 5】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

## 【化 4 2】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

～は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1'</sup>は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；P<sup>2'</sup>は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

40

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり

50

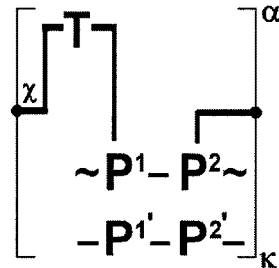
; 及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 5 6】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 3】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1'</sup>は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

P<sup>2'</sup>は、P<sup>2</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり

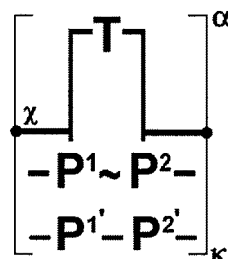
; 及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 5 7】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 4】



40

(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

P<sup>1'</sup>は、P<sup>1</sup>が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

50

$P^{2'}$  は、 $P^2$  が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、3よりも大きい整数であり；

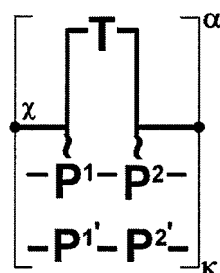
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 5 8】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 5】



(式中、

Tは、テザーを表し；

$P^1$  は、第一のプロープ部分を表し；

$P^2$  は、第二のプロープ部分を表し；

~ は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

$P^{1'}$  は、 $P^1$  が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

$P^{2'}$  は、 $P^2$  が相補的であるテンプレート鎖の少なくとも1つのヌクレオチド残基の連続ヌクレオチド配列を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、3よりも大きい整数であり；

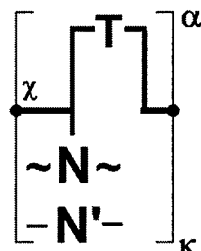
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 5 9】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 6】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

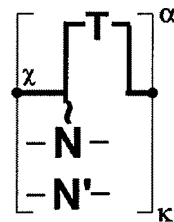
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 6 0】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 7】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

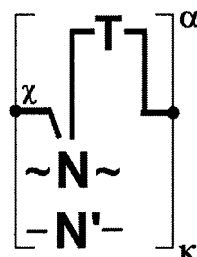
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 6 1】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 8】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも

10

20

30

40

50

大きい整数であり；

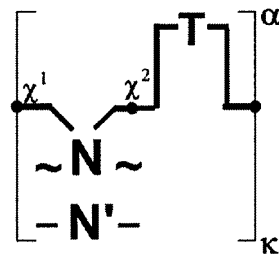
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 6 2】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 4 9】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

~は、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的であり；

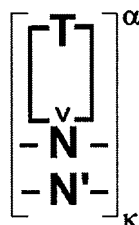
<sup>1</sup>は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表し；及び

<sup>2</sup>は、テザー間結合を表す。 )。

【請求項 6 3】

下記構造を有する、請求項53記載の二重鎖娘鎖：

【化 5 0】



40

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

N'は、Nが相補的であるテンプレート鎖のヌクレオチド残基を表し；

Vは、核酸塩基残基の内部切断部位を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；及び

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列と相補的である

50



。 )。

【請求項 6 4】

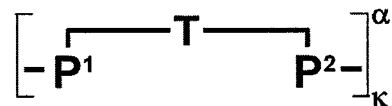
標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列における遺伝情報を解析するための複数のテザー及びレポーターエレメントを含む、エキスパンドマーであって、該エキスパンドマーが拘束されたエキスパンドマーから産生され、該拘束されたエキスパンドマーが、該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを有し、ここで該個々のサブユニットは、テザー、少なくとも1つのプローブ又は核酸塩基残基を含むものであり、及び、切断により該鎖の複数のサブユニットよりも長い長さのエキスパンドマーを産生する少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む、前記エキスパンドマー。

10

【請求項 6 5】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 1】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

κは、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び

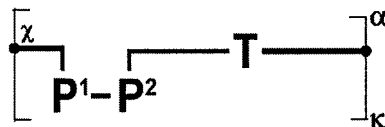
αは、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含む。 )。

20

【請求項 6 6】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 2】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

κは、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

αは、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

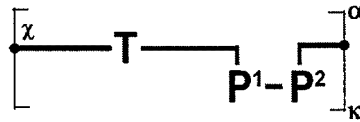
は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 6 7】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

40

【化 5 3】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

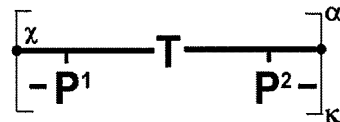
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 6 8】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 4】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプロープ部分を表し；P<sup>2</sup>は、第二のプロープ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

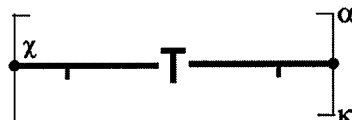
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 6 9】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 5】



(式中、

Tは、テザーを表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種

10

20

30

40

50

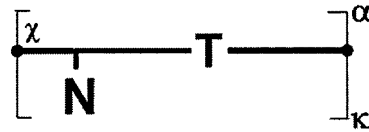
を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 7 0】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 6】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

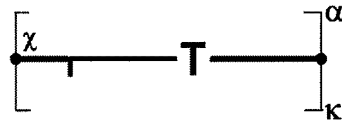
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 7 1】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 7】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

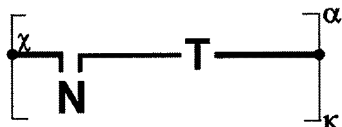
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種類を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 7 2】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 8】



40

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

50

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、10よりも大きい整数であり；

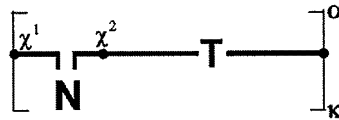
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【請求項 7 3】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 5 9】



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；

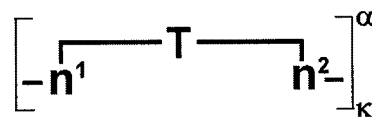
<sup>1</sup>は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表し；及び

<sup>2</sup>は、テザー間結合を表す。 )。

【請求項 7 4】

下記構造を有する、請求項64記載のエキスパンドマー：

【化 6 0】



(式中、

Tは、テザーを表し；

$n^1$ 及び $n^2$ は、各々、核酸塩基残基の第一部分及び第二部分を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、10よりも大きい整数であり；並びに

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含む。 )。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2007年6月19日に出願された米国特許仮出願第60/945,031号；2007年10月23日に出願された米国特許仮出願第60/981,916号；及び、2007年10月25日に出願された米国特許仮出願第61/000,305号の米国特許法第119条(e)の下での恩典を主張するものであり、これらは全てそれらの全体が引用により本明細書中に組込まれている。

【0002】

10

20

30

40

50

(背景)

(技術分野)

本発明は概して、核酸配列決定、更にはそれに関連している方法及び生成物に関する。

【背景技術】

【0003】

(関連技術の説明)

核酸配列は、生物が機能しかつ再生するために必要な情報をコードしており、本質的に生命の設計図である。従ってそのような配列の決定は、いかにしてかつどこで生物体が生存するかの純粋な研究、更にはそのような創薬の応用科学において有用な道具である。医薬品において、配列決定道具は、癌、心臓疾患、自己免疫疾患、多発性硬化症、又は肥満症を含む様々な病理に関する診断及び治療の開発に使用することができる。産業において、配列決定は、改善された酵素プロセス又は合成生物体をデザインするために使用することができる。生物学において、そのような道具は、例えば、生態系の健全性を調べるために使用することができ、その結果広範な有用性がある。

【0004】

個体特有のDNA配列は、ある種の疾患へのそれらの易罹患性に関する価値のある情報を提供する。この配列は、早期検出をスクリーニングしかつ予防的治療を受ける機会を患者に提供するであろう。更に患者個人の設計図があるならば、臨床医は、薬効を最大化し、かつ有害な薬物反応のリスクを最小化するために、個人別の療法を投与することが可能であろう。同様に病原生物の設計図の決定は、感染症の新規治療、及びより強固な病原体の監視に繋ぐことができる。全ゲノムDNA配列決定は、最新の医薬品の基礎を提供するであろう。

【0005】

DNA配列決定は、所与のDNAポリマーの化学構成要素の順番を決定するプロセスである。ヌクレオチドと称されるこれらの化学構成要素は、4種の共通の形でDNA中に存在する：デオキシアデノシン(A)、デオキシグアノシン(G)、デオキシシチジン(C)、及びデオキシチミジン(T)。二倍体ヒトゲノムの配列決定は、およそ60億のヌクレオチドの配列の順番を決定することを必要としている。

【0006】

現在ほとんどのDNA配列決定は、Frederick Sangerにより開発されたチェーンターミネーション法を用いて実行される。サンガー配列決定法と称されるこの技術は、配列情報を誘導するために、DNA合成の配列特異的伸長停止、及び蛍光修飾されたヌクレオチドレポーター基質を使用する。この方法は、改変ポリメラーゼ連鎖反応を使用することにより、1000塩基長までの標的核酸鎖又はリード長を配列決定する。この改変された反応において、配列決定は、選択された塩基型(A、C、G又はT)で無作為に断続され、この断続された配列の長さは、キャピラリーゲル電気泳動により決定される。次にこの長さは、どの塩基型がその長さに位置しているかを決定する。多くの重複するリード長が作製され、かつそれらの配列は、データ処理を用いオーバーレイされ、そのデータの最も信頼できるフィットを決定する。この配列のリード長を作製するプロセスは、非常に煩雑かつ高価であり、現在より高い効率を有する新規方法により取って代わられつつある。

【0007】

ヒトゲノムの最初の完全な配列を作製する「ヒトゲノムプロジェクト」においては、サンガー法を使用し、ほとんどの配列データが提供された。このプロジェクトは、10年以上かけ、ほぼ30億ドルかけて完了した。これらの著しい処理量と経費の限界を考えると、DNA配列決定技術は、科学界により提唱された定まった目標を達成するためには劇的改善を必要とすることは明白である。その目的のために、1塩基当たりの処理量と経費がサンガー配列決定の限界をはるかに超えている多くの第二世代の技術が、配列決定市場で増大するシェアを獲得しつつある。依然これらの「合成による配列決定」法は、個人別の医薬品のための全ゲノム配列決定のような市場により必要とされる処理量、経費、及び品質の目標を実現するには不十分である。

## 【 0 0 0 8 】

例えば454 Life Sciences社は、平均リード長200ヌクレオチドで、7.5時間以内に1億個の塩基を処理することができる装置(例えばGenome Sequencer)を作製している。それらのアプローチは、ビーズの表面上に数百の塩基長である標的核酸の均質コロニーを作製するためにポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)の変法を使用する。このプロセスは、エマルジョンPCRと称される。数十万個のそのようなビーズは次に「ピコタイタープレート」上に配置される。このプレートは次に、追加の配列決定のために調製され、これにより各核酸塩基型が順次プレート上で洗浄される。塩基を取り込んでいる標的を伴うビーズは、発光反応を触媒するために使用することができるピロリン酸エステル副産物を生成し、次に光がカメラにより検出される。

10

## 【 0 0 0 9 】

Illumina社は、核酸配列決定を行うために、ヌクレオチド及び蛍光標識の可逆的終結を使用する同様のプロセスを有する。Illumina社の1G Analyzerに関する平均リード長は、40ヌクレオチド未満である。Illumina社は、配列標的を増幅するためにエマルジョンPCRを使用する代わりに、アレイ表面上でPCRコロニーを増幅するアプローチを有する。454社及びIllumina社の両アプローチは、シグナル強度を増大するために複雑なポリメラーゼ増幅を使用し、律速配列伸張サイクル時に塩基測定を実行し、並びにリード長に比例する測定シグナル対ノイズを低下する取り込みエラーのために、限定されたリード長を有する。

## 【 0 0 1 0 】

Applied Biosystems社は、DNAを読むために、配列決定ごとの合成よりもむしろ、可逆的に終結するライゲーションを使用する。454社のGenome Sequencerのように、この技術は、試料を増幅するためにビーズ-ベースのエマルジョンPCRを使用する。このビーズの大半はPCR産物を保有していないので、これらの研究者らは次に、DNAでコートされたビーズを選択するための濃縮工程を使用する。ピオチンコートされたビーズが、ストレプトアビジンで被覆されたスライドガラスアレイ上に播種され、固定される。その後固定されたビーズは、8merプローブハイブリダイゼーション(各々4種の異なる蛍光色素で標識された)、ライゲーション、及び切断(ライゲーションの次のラウンドのための部位を作出するために、5番目と6番目の塩基の間で)のプロセスへと進められる。各プローブは、2塩基コードシステムを使用し、4及び5位で2つの塩基を調べ、これはカメラにより記録される。Illumina社のアプローチ同様、Applied Biosystems社のSOLiDプラットフォームに関する平均リード長は、40ヌクレオチド未満である。

20

30

## 【 0 0 1 1 】

DNAの単独の分子を直接測定することによるポリメラーゼ増幅工程の時間と経費を避けるために、別のアプローチが開発中である。Visigen Biotechnologies社は、操作されたDNAポリメラーゼへの第二の蛍光分子の取り込み、及びヌクレオチド同定のための蛍光共鳴エネルギー移動(Forster Resonance Energy Transfer)(FRET)の使用により配列決定される、蛍光標識された塩基を測定している。この技術は、ナノメーター未満により及び非常に大きい統計学的変動を有するポリメラーゼ取り込み作用により分離されている塩基シグナル分離の問題点に直面している。

## 【 0 0 1 2 】

40

LingVitae社により開発されたプロセスは、固定されたプラスミドベクターへ挿入されたcDNAを配列決定する。このプロセスは、標的核酸を切断し、かつオリゴマーを標的にライゲーションする、クラスIIS制限酵素を使用する。典型的には、その制限酵素により生じた5'又は3'突出末端の1又は2個のヌクレオチドは、ライゲーション混合物中のどのオリゴマーライブラリーが、標的の切断粘着末端に追加されるかを決定する。各オリゴマーは、それが交換するヌクレオチド(類)を独自に同定する「シグナル」配列を含む。この切断及びライゲーションプロセスはその後繰り返される。この新規分子は次に、様々なオリゴマーについて特異的なタグを用いて配列決定される。このプロセスの生成物は、「デザインポリマー」と称され、常にそれが交換する核酸よりもより長い核酸からなる(例えばジヌクレオチド標的配列は、100塩基対と同程度多くに「増大された」ポリヌクレオチド配

50

列により交換される)。このプロセスの利点は、望ましいならば2本鎖産物を増幅することができることである。欠点は、このプロセスは必ず循環され、同時に複数の制限切断が行われる場合には、テンプレートの連続性が失われることである。

【0013】

Klessの米国特許第7,060,440号は、ポリメラーゼを用いる重合によるオリゴマー取り込みが関与している配列決定プロセスを開示している。基質として末端終結されたオリゴマーを用いるサンガー法の変法を使用し、ゲル電気泳動又はキャピラリークロマトグラフィーにより、シーケン斯拉ダーを構築する。末端ライゲーションによりオリゴマーの共役(coupling)は周知であるが、テンプレートに方向づけられたプロセスにおけるオリゴマーを共役する(couple)ためのポリメラーゼの使用が、新たな利点のために利用された。

10

【0014】

修飾されたポリメラーゼ(及びリガーゼ)が、遺伝子操作及び生体探査(bioprospecting)を通じて利用可能となり、並びにポリメラーゼ修飾によるエキソヌクレアーゼ活性の排除法は既にわかっているため、重合技術は能力を高めると考えられる。例えばWilliamsの公開された米国特許出願第2007/0048748号は、色素-標識されたヌクレオチド及び他の修飾されたヌクレオチドの取り込みのための変異体ポリメラーゼの使用を開示している。これらのポリメラーゼの基質は、 $\gamma$ -リン酸標識されたヌクレオチドも含む。キメラ及び変異体ポリメラーゼにより増大した取り込み速度及びエラー率の低下の両方が認められた。

【0015】

加えて非合成方法を使用し未変性DNAを配列決定するために、学術チーム及び産業チームの両方により多大な努力が払われている。例えばAgilent Technologies社は、共同研究大学と共に、ナノ細孔を通しDNAをスレッド化し(thread)、それが通過する間に測定を行う、単分子検出法を開発している。Visigen社及びLingVitae社のように、この方法は、類似サイズの再現性のある細孔サイズを開発するという問題点に加え、ナノメーター以下の寸法により分離される個別の核酸塩基から識別できるシグナルを効率的かつ正確に得るという問題点を克服しなければならない。従ってその構成要素部品の検出によるDNAの直接配列決定は、鎖内のヌクレオチドの小さいサイズ(中心から中心まで約4 Å)と、その場合の対応するシグナル対ノイズ及びシグナル分解能の限界のために、依然ハイスループットプロセスにおいては実現されていない。直接検出は更に、完全に線状のポリマーに伸ばすことは容易でないという、DNA固有の二次構造により複雑になっている。

20

30

【0016】

DNA配列決定の分野において著しい進歩がなされたにも関わらず、当該技術分野において新規かつ改善された方法が必要とされ続ける。本発明は、これらの必要性を満たし、かつ更なる関連のある利点を提供するものである。

【発明の概要】

【0017】

(簡単な概要)

大まかに言うと、現存するハイスループット核酸配列決定技術により示された空間分解能の問題点を克服する方法及び対応する装置及び生成物が明らかにされる。これは、より容易に検出される伸張された長さの代理ポリマーの核酸情報をコードすることにより実現される。この代理ポリマー(本明細書において「エクスパンドマー(Xpandomer)」と称される)は、標的核酸の当初の遺伝情報を保存するが、その配列データの個々のエレメントの線形分離(linear separation)も増大する、テンプレートに方向づけられた合成(template-directed 合成)により形成される。

40

【0018】

一実施態様において、本方法は、a) テンプレートに方向づけられた合成によって作製される娘鎖を提供する段階であって、該娘鎖が該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを含み、該個々のサブユニットがテザー(tether)、少なくとも1つのプローブ又は核酸塩基残基、及び少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む段階; b) 該少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を切断

50

して、該娘鎖の複数のサブユニットより長い長さのエキスパンドマーを産生する段階であって、該エキスパンドマーが該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列における遺伝情報を解析するためのテザー及びレポーターエレメントを含む段階；並びに、c) 該エキスパンドマーのレポーターエレメントを検出する段階；を含む、標的核酸を配列決定する方法について開示する。

【 0 0 1 9 】

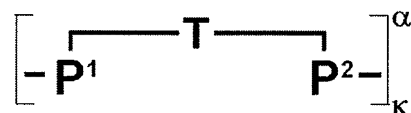
より詳細な実施態様において、遺伝情報を解析するための該レポーターエレメントは、該エキスパンドマーのテザー、少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断前の娘鎖、及び/又は少なくとも1つの選択的に切断可能な結合の切断後のエキスパンドマーと会合されることができる。このエキスパンドマーは、少なくとも1つのプローブ又は核酸塩基残基の全体又は一部を更に含むことができ、並びに該遺伝情報を解析するためのレポーターエレメントは、少なくとも1つプローブ若しくは核酸塩基残基に会合できるか、又はプローブ若しくは核酸塩基残基それら自身であってよい。更にこの選択的に切断可能な結合は、共有結合、テザー内結合、娘鎖のプローブ若しくは核酸塩基残基の間の若しくは内部の結合、及び/又は娘鎖のプローブ若しくは核酸塩基残基と標的テンプレートの間の結合であってよい。

【 0 0 2 0 】

更なる実施態様において、エキスパンドマーは、下記構造(I)から(X)を有する：

構造(I)：

【化1】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

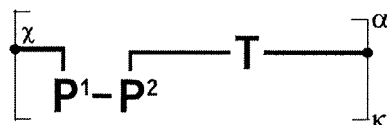
は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含む。)

【 0 0 2 1 】

構造(II)：

【化2】



(式中、

Tは、テザーを表し；

P<sup>1</sup>は、第一のプローブ部分を表し；

P<sup>2</sup>は、第二のプローブ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び



は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【 0 0 2 2 】

構造(III):

【 化 3 】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

P¹は、第一のプロープ部分を表し；

P²は、第二のプロープ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；及び

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

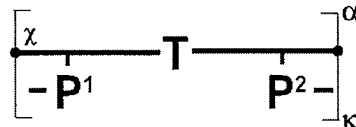
20

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【 0 0 2 3 】

構造(IV):

【 化 4 】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

P¹は、第一のプロープ部分を表し；

P²は、第二のプロープ部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、3よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

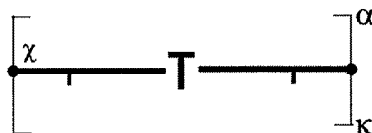
40

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【 0 0 2 4 】

構造(V):

【 化 5 】



(式中、

Tは、テザーを表し；

50

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、3よりも大きい整数であり；

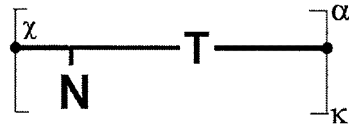
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【 0 0 2 5 】

構造(VI):

【 化 6 】



10

(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、10よりも大きい整数であり；

20

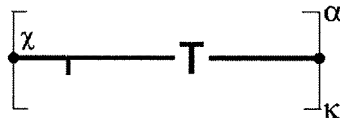
は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【 0 0 2 6 】

構造(VII):

【 化 7 】



30

(式中、

Tは、テザーを表し；

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで $m$ は、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

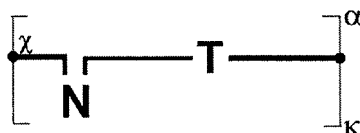
は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

40

【 0 0 2 7 】

構造(VIII):

【 化 8 】



(式中、

Tは、テザーを表し；

50

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；及び

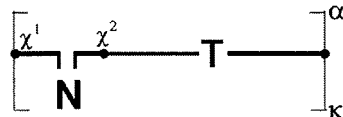
は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表す。 )。

【 0 0 2 8 】

構造(IX):

【 化 9 】

10



(式中、

Tは、テザーを表し；

Nは、核酸塩基残基を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；

20

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含み；

<sup>1</sup>は、隣接サブユニットのテザーとの結合を表し；及び

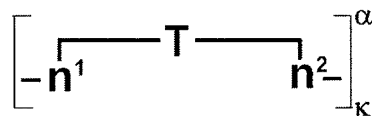
<sup>2</sup>は、テザー間結合を表す。 )。

【 0 0 2 9 】

構造(X):

【 化 1 0 】

30



(式中、

Tは、テザーを表し；

n<sup>1</sup>及びn<sup>2</sup>は、各々、核酸塩基残基の第一の部分及び第二の部分を表し；

は、m個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここでmは、10よりも大きい整数であり；及び

40

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表し、ここで該種の各々は、該標的核酸の一部の連続ヌクレオチド配列の配列情報を含む。 )。

【 0 0 3 0 】

更なる実施態様において、標的核酸を配列決定するためのテンプレートに方向づけられた合成における使用のためのオリゴマー基質構築物を開示する。オリゴマー基質構築物は、第一及び第二のプロープ部分の各々がテンプレートに方向づけられた合成に適した末端基を有する該第二のプロープ部分へ結合された第一のプロープ部分、並びに、該第一及び第二のプロープ部分の少なくとも1つに結合されているテザーの少なくとも第一末端を有する第一末端及び第二末端を有するテザーを含み、ここで該オリゴマー基質構築物は、テンプレートに方向づけられた合成において使用される場合、拘束されたエキスパンドマー

50

を含み、かつ該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを有する娘鎖を形成することが可能であり、ここで該個々のサブユニットは、テザー、該第一及び第二のプロープ部分、並びに少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む。

#### 【0031】

別の実施態様において、標的核酸を配列決定するためのテンプレートに方向づけられた合成における使用のためのモノマー基質構築物を開示する。モノマー基質構築物は、テンプレートに方向づけられた合成に適した末端基を有する核酸塩基、並びに、該核酸塩基残基に結合されているテザーの少なくとも第一末端を有する第一末端及び第二末端を有するテザーを含み、ここで該モノマー基質構築物は、テンプレートに方向づけられた合成において使用される場合、拘束されたエキスパンドマーを含む娘鎖を形成することが可能であり、かつ該標的核酸の全体又は一部の連続ヌクレオチド配列に対応する配列に共役された複数のサブユニットを有し、ここで該個々のサブユニットは、テザー、該核酸塩基残基、及び少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む。

#### 【0032】

なお更なる実施態様において、テンプレート鎖と二重鎖化された娘鎖を含むテンプレート-娘鎖二重鎖、更にはテンプレート鎖及びオリゴマー又はモノマー基質構築物から前記二重鎖を形成する方法を開示する。

本発明のこれら及び他の態様は、添付図面及び以下の詳細な説明を参照し明らかにされるであろう。この目的のために、より具体的に特定の手順、化合物及び/又は組成物を説明する様々な参考文献を本明細書において記載し、これらはそれらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0033】

(図面の簡単な説明)

図面において、同じ参照番号は、同様のエレメントを確定している。図面中のエレメントのサイズ及び相対位置は、必ずしも縮尺ど通りに描かれてはなく、これらのエレメントの一部は、図面のわかりやすさを向上するために任意に拡大されかつ配置されている。更に、描かれたエレメントの特定の形状は、その特定のエレメントの実際の形状に関する情報を伝えることを意図するものではなく、単に該図面における認識を容易にするために選択されている。

【図1】図1A及び1Bは、核酸標的中のヌクレオチド配列を決定するために解像されなければならない核酸塩基間の限定された分離を図示している。

【図2】図2Aから2Dは、本発明において有用な基質のいくつかの代表的構造を概略的に図示している。

【図3】図3A、3B及び3Cは、標的核酸からのエキスパンドマーの合成に関する簡略化された工程を図示する概略図である。

【図4】図4は、エキスパンドマーを配列決定するためのFRETナノ細孔型装置を図示する単純モデルである。

【図5】図5は、赤(red)、緑(green)及び青(blue)の蛍光発光のためのチャンネルによるプロットであり、いかにしてアナログシグナルが、エキスパンドマー内にコードされた遺伝子配列情報に対応するデジタル情報に解読され得るかを図示している。添付表(図6)は、いかにしてこれらのデータが解読されたかを示している。3つの多状態蛍光分子を使用することにより、塩基の配列は、エキスパンドマーがナノ細孔を通りスプールするにつれて、実時間で単独の分子からデジタル型で高分解能で読みとることができる。

【図6】図6は、そこから図5のデータが派生されるルックアップテーブルである。

【図7】図7A-Eは、ライゲーション生成物のゲルである。

【図8】図8は、オリゴマー性エキスパンドマーの総括である。

【図9】図9は、モノマー性エキスパンドマーの総括である。

【図10】図10Aから10Eは、記号的及び図形的形で、クラスIエキスパンドマー、中間体

10

20

30

40

50

及び前駆体を描いている。これらの前駆体は、一リン酸エステル(monophosphate)の場合はエクспローブ(Xprobe)、及び三リン酸エステル(triphosphate)の場合はエクスマー(Xmer)と称される。

【図11】図11は、末端終結されたヘアピンプライマー及びクラスI基質構築物を使用する溶液ライゲーションによる、エクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図12】図12は、二重末端ヘアピンプライマー及びクラスI基質構築物を使用する溶液ライゲーションによる、エクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図13】図13は、クラスI基質構築物を使用する、プライマーを伴わない、固定されたテンプレート上のライゲーションによる、エクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

10

【図14】図14は、固定されたプライマーヘアニールされたテンプレート上で可逆的に終結されたクラスI基質構築物を使用する、循環式段階的ライゲーションによるエクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図15】図15は、プライマーを伴わないクラスI基質構築物を使用する乱交雑集成体及び化学共役によるエクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図16】図16は、ヘアピンプライマー及びクラスI三リン酸基質構築物を使用する、溶液重合によるエクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図17】図17は、クラスI三リン酸基質構築物及びポリメラーゼを使用する、固定されたテンプレート上のエクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図18】図18Aから18Eは、記号的及び図形的言語で、クラスIIエクスパンドマー、エクスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。

20

【図19】図19Aから19Eは、記号的及び図形的言語で、クラスIIIエクスパンドマー、エクスパンドマー中間体及び基質構築物を描いている。

【図20】図20は、ハイブリダイゼーション及び無プライマー化学共役を組合せている、クラスII基質構築物を使用する、固定されたテンプレート上でのエクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図21】図21は、プライマー、クラスII基質構築物及びリガーゼを使用する、固定されたテンプレート上のエクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図22】図22Aから22Eは、記号的及び図形的言語で、クラスIVエクスパンドマー、エクスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。

30

【図23】図23Aから23Eは、記号的及び図形的言語で、クラスVエクスパンドマー、エクスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。

【図24】図24は、アダプタープライマー及びクラスV三リン酸基質構築物を使用する溶液重合による、エクスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図25】図25は、デオキシアデノシン(A)、デオキシシトシン(C)、デオキシグアノシン(G)、及びデオキシチミジン(T)の構造を図示している。

【図26】図26A及び26Bは、官能基により誘導体化されたヌクレオチドを図示している。

【図27】図27A及び27Bは、誘導体化された核酸塩基を取り込んでいるプローブメンバーを図示している。

【図28】図28Aから28Dは、より詳細に本発明のクラスI-IV基質を図示しており、ここでプローブ骨格における選択的に切断可能な結合の切断部位の例を示し、かつこれらの切断部位を橋かけしているループ末端連結を指摘している。

40

【図29】図29Aから29Dは、より詳細に本発明のクラスI-IV基質を図示しており、ここでプローブ骨格における選択的に切断可能な結合の切断部位の例を示し、かつこれらの切断部位を橋かけしているループ末端連結を指摘している。

【図30】図30は、エクспローブ又はエクスマーなどの、「プローブ-ループ」構築物を集成する一法を図示している。

【図31】図31は、ループがレポーター構築物を含む、クラスI基質構築物を集成する方法を図示している。

【図32】図32Aから32Cは、ポリマー性テザーとしてのPEGの使用を図示している。

50

【図 3 3】図33Aから33Dは、ポリマー性テザーとしてのポリ-リジン、及びポリ-リジン足場から誘導された dendritic 性構築物を図示している。

【図 3 4】図34Aから34Cは、セグメントからレポーター構築物集成と共に組み入れられたテザーループ閉鎖の選択された方法を図示している。

【図 3 5】図35A及び35Bは、前駆体ブロックのランダム重合による個々のレポーターセグメントの合成方法を図示している。

【図 3 6】図36Aから36Iは、レポーター構築物を図示している。

【図 3 7】図37は、レポーター構築物を集成するための組成物及び化学的方法並びにそれらの対応するレポーターコードを示す表である。

【図 3 8】図38Aから38Fは、標的核酸の末端官能基化における使用に適したアダプターである。

10

【図 3 9】図39は、dsDNAテンプレート上の終端ANH官能基の導入のためのアダプターカセットである。

【図 4 0】図40は、エキスパンドマー合成のためのテンプレートの固定及び調製に関する概略である。

【図 4 1】図41Aから41Eは、選択された物理的伸展法(stretching method)を図示している。

【図 4 2】図42Aから42Cは、選択された電気伸展法を図示している。

【図 4 3】図43Aから43Dは、ゲルマトリクスにおける伸展のための方法、試薬、及びアダプターを図示している。

20

【図 4 4】図44Aから44Cは、「牽引タグ(drag tag)」の構築及び使用を説明している。

【図 4 5】図45は、乱交雑ハイブリダイゼーション/ライゲーションに基づくエキスパンドマーの合成のための方法を説明している。

【図 4 6】図46A及びBは、ギャップ充填のために使用される核酸塩基を説明している。

【図 4 7】図47A及びBは、ギャップ発生のシミュレーションを説明している。

【図 4 8】図48A及びBは、ギャップ発生のシミュレーションを説明している。

【図 4 9】図49は、いかにしてギャップが2mer及び3merにより充填されるかを図示している。

【図 5 0】図50A及びBは、2mer及び3merの組合せを使用する、ギャップ充填シミュレーションを説明している。

30

【図 5 1】図51は、二次構造を破壊するための2mer及び3merアジュバントを図示している。

【図 5 2】図52は、アジュバントとして有用な塩基を説明している。

【図 5 3】図53は、二次構造を減少するために使用されるヌクレオチド置換を説明している。

【図 5 4】図54は、磁気ビーズ輸送によるナノ細孔検出モデルを説明している。

【図 5 5】図55は、従来型ナノ細孔検出法を図示している。

【図 5 6】図56は、横断式電極ナノ細孔検出法を図示している。

【図 5 7】図57は、顕微鏡検出法を図示している。

【図 5 8】図58は、電子顕微鏡による検出を図示している。

40

【図 5 9】図59は、原子間力顕微鏡を用いる検出を図示している。

【図 6 0】図60Aから60Eは、記号的及び図形的言語で、クラスVIエキスパンドマー、エキスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。これらの前駆体は、RT-NTPと称される。

【図 6 1】図61は、可逆的に終結されたクラスVI三リン酸基質構築物及びポリメラーゼを使用する、固定されたテンプレート上での、エキスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図 6 2】図62Aから62Eは、記号的及び図形的言語で、クラスVIIエキスパンドマー、エキスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。これらの前駆体は、RT-NTPと称される。

50

【図 6 3】図63Aから63Eは、記号的及び図形的言語で、クラスVIIIエキスパンドマー、エキスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。これらの前駆体は、RT-NTPと称される。

【図 6 4】図64Aから64Eは、記号的及び図形的言語で、クラスIXエキスパンドマー、エキスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。これらの前駆体は、RT-NTPと称される。

【図 6 5】図65は、クラスIX三リン酸基質構築物及びポリメラーゼを使用する、固定されたテンプレート上でのエキスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【図 6 6】図66Aから66Eは、記号的及び図形的言語で、クラスXエキスパンドマー、エキスパンドマー中間体、及び基質構築物を描いている。これらの前駆体は、XNTPと称される。

10

【図 6 7】図67は、ヘアピンプライマー及びクラスX三リン酸基質構築物を使用する、溶液重合によるエキスパンドマーの合成方法の簡約された概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

(詳細な説明)

下記説明において、ある特定の詳細は、様々な実施態様の完全な理解を提供するために示されている。しかし当業者は、本発明はこれらの詳細を伴わずに実践されてもよいことを理解するであろう。別の場合、周知の構造は、本実施態様の不必要に曖昧な説明を避けるために、詳細には示さず、又は説明しない。文脈がそうでないことを必要としない限りは、本明細書及び後続の請求項を通じ、用語「らを含む」並びに「を含む」及び「を含んでいる」などのその様々な変形は、開放された非排他的な意味で、すなわち「を含んでいるが、これらに限定されるものではない」として解釈されるべきである。更に本明細書に提供された表題は、単に便宜上のものであり、請求される発明の範囲又は意味を説明するものではない。

20

【0035】

本明細書を通じて「一実施態様」又は「ある実施態様」の言及は、本実施態様に結びつけて説明された特定の特性、構造又は特徴が少なくとも一実施態様において含まれることを意味する。従って本明細書を通じて様々な場所での語句「一実施態様において」又は「ある実施態様において」の出現は、必ずしも全て同じ実施態様に言及するものではない。更に特定の特性、構造又は特徴は、1つ以上の実施態様における任意の好適な様式で組合せられてよい。同じく本明細書及び添付された請求項において使用される単数形「ある(a, an)」及び「その(the)」は、その文脈が別に明確に指摘しない限りは、複数の指示対象を含む。用語「又は」は、その文脈が別に明確に指摘しない限りは、「及び/又は」を含む意味で一般に使用されることも注意されなければならない。

30

【0036】

(定義)

本明細書において使用される下記の用語は、その文脈が別に指摘しない限りは、以下に特定された意味を有する。

「核酸塩基」は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、又はそれらの複素環式誘導体、アナログ、若しくは互変異性体などの、複素環式塩基である。核酸塩基は、天然存在型又は合成型であることができる。核酸塩基の非限定的例は、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン、8-アザプリン、メチル又は臭素により8位で置換されたプリン、9-オキソ-N6-メチルアデニン、2-アミノアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、7-デアザ-アデニン、N4-エタノシトシン、2,6-ジアミノプリン、N6-エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5-(C3-C6)-アルキニルシトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、チオウラシル、シュードイソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン、7,8-ジメチルアロキサジン、6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、4-メチル-インドール、エテノアデニン、米

40

50

国特許第5,432,272号及び第6,150,510号、並びにPCT出願WO 92/002258、WO 93/10820、WO 94/22892、及びWO 94/24144、並びにFasmanの文献(「生化学及び分子生物学の実践ハンドブック(Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology)」、385-394頁、1989、CRC Press社、ボカラトン、LO)に開示された非天然型の核酸塩基であり、並びに全てそれらの全体が引用により本明細書中に組込まれている。

【0037】

「核酸塩基残基」は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、それらの断片、及び相補的ヌクレオチドに結合する特性を有する関連分子を含む。デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチド、並びにそれらの様々なアナログは、本定義の範囲内であることが意図されている。核酸塩基残基は、オリゴマー及びプローブのメンバーであることができる。「核酸塩基」及び「核酸塩基残基」は、本明細書において互換的に使用されてよく、文脈が別に指摘しない限りは、一般に同義語である。

10

【0038】

「ポリヌクレオチド」は、核酸とも称され、1つのヌクレオチドのペントースの3'位が、ホスホジエステル基により、次ヌクレオチドの5'位へ結合されている、一連の共有結合されたヌクレオチドである。DNA(デオキシリボ核酸)及びRNA(リボ核酸)は、ヌクレオチド残基が、ホスホジエステル結合により特異的配列で連結されている生物学的に生じるポリヌクレオチドである。本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」又は「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチドの線状骨格を有する任意のポリマー化合物を包含している。オリゴヌクレオチドは、オリゴマーとも称され、一般に比較的短い鎖状のポリヌクレオチドである。

20

【0039】

「相補的」は一般に、当業者に理解されるように、標準的ワトソン-クリック塩基対を形成するために二重鎖化する特異的ヌクレオチドをいう。しかし本明細書において言及される相補的は、A、T、G又はCヌクレオチド及びロックされた(locked)核酸と普遍的塩基対形成が可能である、2'-デオキシイノシン及び5-ニトロインドール-2'-デオキシリボシドを含むが、これらに限定されるものではないヌクレオチドアナログの塩基対形成も含み、このことは二重鎖の熱安定性を増強する。当業者は、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーが、ハイブリダイゼーションにより形成された二重鎖内のマッチ又はミスマッチの度合の決定因子であることを認めるであろう。

30

【0040】

「核酸」は、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドである。核酸分子は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、又は両方の組合せであることができる。核酸は、配列決定のために標的化される場合には、一般に「標的核酸」又は「標的配列」と称される。核酸は、配列決定のために標的化された分子の混合物又はプールであることができる。

【0041】

「プローブ」は、核酸塩基残基の短い鎖であって、一般に1本鎖であり、かつ核酸の標的配列に対し相補的である2個以上の連続する核酸塩基残基を一般にいう。「基質メンバー」及び「基質構築物」において具体化されるように、プローブは、長さが最大20個の核酸塩基残基であることができる。プローブは、任意の組合せで修飾された核酸塩基残基及び修飾された核酸塩基内結合を含んでよい。プローブの骨格は、エステル結合、ホスホジエステル結合、ホスホロアミド結合、ホスホネート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロチオラート結合、アミド結合及びそれらの任意の組合せを含むが、これらに限定されるものではない数多くの共有結合型のいずれかにより一緒に連結されることができる。本プローブは、下記部分を含むが、これらに限定されるものではない5'及び3'末端連結も有してよい：ーリン酸エステル、三リン酸エステル、ヒドロキシル、水素、エステル、エーテル、グリコール、アミン、アミド、及びチオエステル。

40

【0042】

「選択的ハイブリダイゼーション」は、特異的な相補的結合をいう。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プローブ、核酸塩基残基、及びそれらの断片は、標的核酸鎖に、

50



非特異的結合を最小化するハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件下で、選択的にハイブリダイズする。当該技術分野において公知であるように、高ストリンジェンシー条件を使用し、完全なマッチが好ましい選択的ハイブリダイゼーション条件を実現することができる。塩濃度、温度、界面活性剤、PEG、及びベタインなどのGC中和剤などのハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増大、すなわち二重鎖核酸の連続鎖に沿って、CがGと塩基対形成し、並びにAがT又はUと塩基対形成する正確なマッチのための必要要件を増大するように、変動されることができる。

【0043】

「テンプレートに方向づけられた合成」、「テンプレートに方向付けられた集成」、「テンプレートに方向づけられたハイブリダイゼーション」、「テンプレートに方向づけられた結合」及びいずれか他のテンプレートに方向づけられたプロセスは、それにより核酸塩基残基又はプローブが、相補的標的核酸に選択的に結合し、かつ新生娘鎖へ取り込まれるプロセスをいう。テンプレートに方向づけられた合成により作製された娘鎖は、それから合成される1本鎖化された標的に対し相補的である。標的鎖の対応する配列は、その娘鎖の配列がわかっているならば、それから推測され得ることは注意されなければならない。「テンプレートに方向づけられた重合」及び「テンプレートに方向づけられたライゲーション」は、得られる娘鎖が、それぞれ重合又はライゲーションされる、テンプレートに方向づけられた合成の特別な場合である。

【0044】

「連続」は、配列が、断続又は喪失された核酸塩基を伴わずに続くことを示す。テンプレート鎖のヌクレオチドの連続配列は、娘鎖の連続配列に相補的であると言われる。

「基質」又は「基質メンバー」は、標的テンプレートへの結合特異性を有する、オリゴマー、プローブ又は核酸塩基残基である。基質は一般に、テザーと組合せられ、基質構築物を形成する。娘鎖の主要骨格を形成する基質構築物の基質は、娘鎖の基質又は基質メンバーでもある。

【0045】

「基質構築物」は、娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成のための試薬であり、かつ一般にライブラリーの形で提供される。基質構築物は一般に、標的テンプレートへの相補的結合のための基質メンバー、及びテザーメンバー又はテザーが結合され得るテザー付着部位のいずれかを含む。基質構築物は、本発明に適合された様々な形で提供される。基質構築物は、「オリゴマー性基質構築物」、「プローブ基質構築物」とも称される)及び「モノマー性基質構築物」、「核酸塩基基質構築物」とも称される)の両方を含む。

【0046】

「サブユニットモチーフ」又は「モチーフ」は、ポリマー骨格の反復サブユニットをいい、該サブユニットは、反復サブユニットを特徴づける全部の形状を有するが、遺伝情報をコードしている種-特異的エレメントも有する。相補的核酸塩基残基のモチーフは、各モチーフの基本的相補配列結合核酸塩基エレメントの可能な組合せの数に従う、基質構築物のライブラリーで提示される。この核酸塩基結合エレメントが4種(例えば、A、C、G及びT)である場合、4種のエレメントの組合せの可能性のあるモチーフの数は $4^x$ であり、ここで $x$ はそのモチーフ内の核酸塩基残基の数である。しかし縮重対形成塩基を基にした、リボ核酸塩基残基又は他の核酸塩基残基のセットにおけるウラシルのチミジンとの置換を基にした他のモチーフは、モチーフを有する基質構築物のより大きいライブラリー(又はより小さいライブラリー)をもたらすことができる。モチーフは、レポーターテザーを作出するレポーターなどの、種-特異的レポーター構築物によっても提示される。一般に特定の基質種を同定するレポーター構築物モチーフと、該モチーフの結合相補性及び特異性の間には、1対1の相関関係が存在する。

【0047】

「エキスパンドマー中間体」は、基質構築物から集成された中間体生成物(本明細書において「娘鎖」とも称される)であり、かつ標的核酸テンプレートを使用する、基質構築物のテンプレートに方向付けられた集成により形成される。任意に、基質の重合又はライ

10

20

30

40

50

ゲーション、テザーからテザーの連結又はテザーから基質の連結を含むことができる、近接(abut)された基質構築物間の他の連結が形成される。本エキスパンドマー中間体は、2つの構造を含み；すなわち、拘束されたエキスパンドマーと主要骨格である。拘束されたエキスパンドマーは、該娘鎖内のテザー全てを含むが、本方法の必要に応じて、基質を全て若しくは一部含むか、又は含まないことができる。主要骨格は、近接された基質の全てを含む。主要骨格が断片化又は解離されるプロセス工程下では、拘束されたエキスパンドマーは、最早拘束されず、これらのテザーが伸展される(stretched out)につれて伸長されるエキスパンドマー産物である。「二重鎖娘鎖」は、標的テンプレートにハイブリダイズ又は二重鎖化されるエキスパンドマー中間体をいう。

【0048】

「主要骨格」は、娘鎖の基質の連続した又はセグメント化された骨格をいう。通常遭遇する主要骨格は、未変性ポリヌクレオチドのリボシル5'-3'ホスホジエステル骨格である。しかし、娘鎖の主要骨格は、ホスホジエステル結合により連結されないか、又はホスホジエステル結合と他の骨格結合の混合により連結される、核酸塩基のアナログ及びオリゴマーのアナログを含んでよく、非限定的に下記の連結を含む：ホスホロチオエート、ホスホロチオラート、ホスホネート、ホスホロアミデート、及びホスホノ-PNA、セリン-PNA、ヒドロキシプロリン-PNAを含むペプチド核酸「PNA」骨格結合、並びにそれらの組合せ。娘鎖がその二重鎖型(すなわち二重鎖娘鎖)であり、かつ基質がサブユニット間で共有結合されていない場合、これらの基質はそれでもなお連続し、該娘鎖の主要骨格を形成する。

【0049】

「拘束されたエキスパンドマー」は、それが拡張される前の立体配置のエキスパンドマーである。拘束されたエキスパンドマーは、娘鎖の全てのテザーメンバーを含む。これは、主要骨格に付着しているテザー1個につき少なくとも1つの結合又は連結により、拡張から拘束されている。この拡張プロセス時に、該娘鎖の主要骨格は、断片化されるか又は解離され、拘束されたエキスパンドマーをエキスパンドマーへ変換する。

【0050】

「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、拘束されたエキスパンドマーの骨格をいう。これは、娘鎖の形成において主要骨格に沿って同時集成された合成による共有骨格である。場合によっては、両方の骨格は分離できないことがあるが、両方はそれらの組成中に同じ基質又は基質の一部を有してもよい。拘束されたエキスパンドマー骨格は常にテザーを含むのに対し、主要骨格はテザーメンバーを含まない。

【0051】

「エキスパンドマー」又は「エキスパンドマー産物」は、基質構築物のテンプレートに方向付けられた集成によりそれ自身合成される、拘束されたエキスパンドマーの拡張により作製された合成分子構築物である。このエキスパンドマーは、そこから作製された標的テンプレートに対し延長される。これは、配列情報を含む、サブユニット、モチーフの各サブユニット、ライブラリーメンバーの各モチーフ、テザー及び任意に基質の一部又は全体の鎖状体形成により構成され、それらの全ては、形成可能な基質構築物に由来している。エキスパンドマーは、標的テンプレートよりもより長いように拡張されるようにデザインされ、これによりその長さに沿った標的テンプレートの配列情報の線密度を低下する。加えてエキスパンドマーは任意に、レポーターのサイズ及び存在量を増大するためのプラットフォームを提供し、これは次に検出に関するシグナル対ノイズを改善する。より低い線形情報密度及びより強力なシグナルは、テンプレート鎖の配列の検出及び解読に必要な分解能を増大し、かつ感度を低下する。

【0052】

「選択的に切断可能な結合」は、例えば、ホスホロチオラート結合、光切断可能な結合、ホスホロアミド結合、3'-O-B-D-リボフラノシル-2'結合、チオエーテル結合、セレノエーテル結合、スルホキシド結合、ジスルフィド結合、デオキシリボシル-5'-3'ホスホジエステル結合、又はリボシル-5'-3'ホスホジエステル結合、更には当該技術分野において公知の他の切断可能な結合の選択的切断のための条件などの、制御された条件下で破壊され

ることができる結合をいう。選択的に切断可能な結合は、テザー内結合、又はプローブ若しくは核酸塩基残基の間若しくは内部であることができ、又はプローブとテンプレート鎖の間のハイブリダイゼーションにより形成された結合であることができる。選択的に切断可能な結合は、共有結合に限定されるものではなく、水素結合、疎水結合、イオン結合、結合型環積層相互作用、ファンデルワールス相互作用などを基にしたものなどの非共有結合又は会合であることができる。

#### 【0053】

「部分」は、例えば、テザー、分子又はプローブの様々なパーツなどの、それらに分割され得る2つ以上のパーツの1つである。

「テザー」又は「テザーメンバー」は、一般に線形の次元を有し、かつ2つの反対端の各々に末端部分を伴う、ポリマー又は分子構築物をいう。テザーは、少なくとも1つの末端部分で連結により基質へ付着され、基質構築物を形成する。該テザーの末端部分は、基質への切断可能な連結又は「拘束された立体配置」でテザーを拘束するのに役立つ切断可能なテザー内連結へ接続されてよい。娘鎖が合成された後、各末端部分は、他のテザーへ直接又は間接に共役する末端連結を有する。共役されたテザーは、拘束されたエクスパンドマーを含み、これは更に娘鎖を含む。テザーは、「拘束された立体配置」及び「拡張された立体配置」を有する。拘束された立体配置は、基質構築物及び娘鎖において認められる。エクスパンドマー産物において認められるように、テザーの拘束された立体配置は、拡張された立体配置に対する前駆体である。拘束された立体配置から拡張された立体配置への転移は、娘鎖の主要骨格又はテザー内連結内であってよい選択的に切断可能な結合の切断を生じる。拘束された立体配置のテザーは、テザーが追加されて「主要骨格」の集成後に娘鎖を形成する場合にも使用される。テザーは任意に、基質の配列情報をコードすることができるその長さに沿った1種以上のレポーター又はレポーター構築物を含むことができる。テザーは、エクスパンドマーの長さを拡張し、これにより配列情報線密度を低下する手段を提供する。

#### 【0054】

「テザー構築物」は、1つ以上のテザーセグメント、又はポリマー、グラフトコポリマー、ブロックコポリマー、親和性リガンド、オリゴマー、ハプテン、アプタマー、デンドリマー、連結基又は親和性結合基(例えばビオチン)を含む、レポーター構築物若しくはレポーター前駆体などの、テザーを集成するための他の構成成分で構成されたテザー又はテザー前駆体である。

#### 【0055】

「テザーエレメント」又は「テザーセグメント」は、一般に2つの終末端による線形次元を有するポリマーであり、ここで各末端は、テザーエレメントを連ねるための末端連結を形成する。テザーエレメントは、テザー構築物のセグメントであってよい。そのようなポリマーは、以下を含むが、これらに限定されるものではない：ポリエチレングリコール、ポリグリコール、ポリピリジン、ポリイソシアニド、ポリイソシアナート、ポリ(トリアリールメチル)メタクリレート、ポリアルデヒド、ポリピロリノン、ポリ尿素、ポリグリコールホスホジエステル、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリビニルエステル、ポリスチレン、ポリアミド、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリブチラート、ポリブタジエン、ポリブチロラクトン、ポリピロリジノン、ポリビニルホスホネート、ポリアセトアミド、多糖、ポリヒアルロネート、ポリアミド、ポリイミド、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリテレフタレート、ポリシラン、ポリウレタン、ポリエーテル、ポリアミノ酸、ポリグリシン、ポリプロリン、N-置換ポリリジン、ポリペプチド、側鎖N-置換ペプチド、ポリ-N-置換グリシン、ペプトイド、側鎖カルボキシル-置換ペプチド、ホモペプチド、オリゴヌクレオチド、リボ核酸オリゴヌクレオチド、デオキシ核酸オリゴヌクレオチド、ワトソン-クリック塩基対形成を防止するように修飾されたオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアナログ、ポリシチジル酸、ポリアデニル酸、ポリウリジル酸、ポリチミジン、ポリリン酸エステル、ポリヌクレオチド、ポリリボヌクレオチド、ポリエチレングリコール-

ホスホジエステル、ペプチドポリヌクレオチドアナログ、トレオシル-ポリヌクレオチドアナログ、グリコール-ポリヌクレオチドアナログ、モルホリノ-ポリヌクレオチドアナログ、ロックされたヌクレオチドオリゴマーアナログ、ポリペプチドアナログ、分岐ポリマー、櫛状ポリマー、星状ポリマー、樹枝状ポリマー、ランダム、グラジエント及びブロックコポリマー、陰イオン性ポリマー、陽イオン性ポリマー、ステムループ、剛性セグメント及び軟性セグメント形成ポリマー。

【0056】

「ペプチド核酸」又は「PNA」は、核酸へのハイブリダイゼーションに適している核酸塩基残基を有するが、アミノ酸又はそれらの誘導体若しくはアナログを含む骨格を伴う、核酸アナログである。

10

「ホスホノ-ペプチド核酸」又は「pPNA」は、骨格が、N-(2-ヒドロキシエチル)ホスホノグリシン又はN-(2-アミノエチル)ホスホノグリシンなどのアミノ酸アナログを含み、かつ核酸塩基ユニット間の連結が、ホスホノエステル又はホスホノアミド結合を介している、ペプチド核酸である。

【0057】

「セリン核酸」又は「SerNA」は、骨格がセリン残基を含むペプチド核酸である。そのような残基は、アミド又はエステル連結を介して連結されることができる。

「ヒドロキシプロリン核酸」又は「HypNA」は、骨格が4-ヒドロキシプロリン残基を含むペプチド核酸である。そのような残基は、アミド又はエステル連結を介して連結されることができる。

20

【0058】

「レポーターエレメント」は、関連する「レポーター検出特性」も構成する、シグナル伝達エレメント、分子複合体、化合物、分子又は原子である。他のレポーターエレメントは、FRET共鳴ドナー又はアクセプター、色素、量子ドット、ビーズ、デンドリマー、アップコンバートする蛍光分子、磁気粒子、電子散乱体(例えばホウ素)、質量、金ビーズ、磁気共鳴、イオン化可能基、極性基、疎水基を含むが、これらに限定されるものではない。更に他のものは、蛍光標識、例えば非限定的に以下のものである: 臭化エチジウム、SYBRグリーン、テキサスレッド、アクリジンオレンジ、ピレン、4-ニトロ-1,8-ナフタルイミド、TOTO-1、YOYO-1、シアニン3(Cy3)、シアニン5(Cy5)、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、FITC、ローダミン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、蛍光タンパク質、DOXYL(N-オキシル-4,4-ジメチルオキサゾリジン)、PROXYL(N-オキシル-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン)、TEMPO(N-オキシル-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン)、ジニトロフェニル、アクリジン、クマリン、Cy3及びCy5(Biological Detection Systems社)、エリトロシン、クマリン酸、ウンベリフェロン、テキサスレッドローダミン、テトラメチルローダミン、Rox、7-ニトロベンゾ-1-オキサ-1-ジアゾール(NBD)、オキサゾール、チアゾール、ピレン、フルオレセイン又はランタミドなど; 同様に、放射性同位元素(例えば、 $^{33}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ )、エチジウム、ユーロピウム、ルテニウム、及びサマリウム、若しくは他の放射性同位元素; 又は、質量タグ、例えば、C5位で修飾されたピリミジン又はN7位で修飾されたプリンなどであって、該質量修飾基が、例えばハロゲン、エーテル若しくはポリエーテル、アルキル、エステル若しくはポリエステル、又は一般型XR(ここで、Xは連結基であり、かつRは質量修飾基である)、化学発光標識、スピン標識、酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、及びオキシダーゼなど)、抗体断片、及び親和性リガンド(オリゴマー、ハプテン、及びアプタマーなど)であり得る。レポーターエレメントのテザーとの会合は、共有又は非共有、及び直接又は間接であることができる。代表的な共有会合は、リンカー及びゼロ-リンカー結合を含む。テザー骨格への又はデンドリマー若しくは側鎖などのテザーに結合したエレメントへの結合が含まれる。代表的な非共有結合は、水素結合、疎水結合、イオン結合、結合型環積層相互作用、ファンデルワールス相互作用などを含む。リガンドは例えば、レポーターエレメント上の結合部位との特異的親和性結合により会合される。直接会合は、テザー合成時、テザー合成後、及びエキスパンドマー合成の前後に生じるこ

30

40

50

とができる。

【0059】

「レポーター」は、1種以上のレポーターエレメントで構成される。レポーターは、「タグ」及び「標識」として公知のものを含む。エキスパンドマーのプロープ又は核酸塩基残基は、レポーターとみなすことができる。レポーターは、標的核酸の遺伝情報の解析に役立つ。

「レポーター構築物」は、検出可能なシグナル(類)を作製することができる1種以上のレポーターを含み、ここで検出可能なシグナル(類)は一般に配列情報を含む。このシグナル情報は、「レポーターコード」と称され、その後遺伝子配列データへ解読される。レポーター構築物は、テザーセグメント、又はポリマー、グラフトコポリマー、ブロックコポリマー、親和性リガンド、オリゴマー、ハプテン、アプタマー、デンドリマー、連結基若しくは親和性結合基(例えばビオチン)を含む他の構造上の成分も含んでよい。

10

【0060】

「シグナル」とも称される「レポーター検出特性」は、測定装置へ直接的又は間接的にレポーターの遺伝子配列情報を伝達するために使用される、全ての可能性のある測定可能な又は検出可能なエレメント、性質又は特性を説明する。これらは、蛍光、多波長蛍光、発光スペクトル、蛍光消光、FRET、発光、吸光度、反射率、色素放出、量子ドット放出、ビーズ画像、分子複合体画像、磁化率、電子散乱、イオン質量、磁気共鳴、分子複合体寸法、分子複合体インピーダンス、分子電荷、誘起双極子、インピーダンス、分子質量、量子状態、電荷容量、磁気スピン状態、誘導可能な極性、核壊変、共鳴、又は相補性を含むが、これらに限定されるものではない。

20

【0061】

「レポーターコード」は、レポーター構築物の測定されたシグナルからの遺伝情報である。レポーターコードは解読され、配列-特異的遺伝情報データを提供する。

「エキスプローブ(Xprobe)」は、拡張可能なオリゴマー性基質構築物である。各エキスプローブは、プローブメンバー及びテザーメンバーを有する。このテザーメンバーは一般に1つ以上のレポーター構築物を有する。5'-リン酸エステル修飾を伴うエキスプローブは、エキスパンドマー合成のための酵素的ライゲーション-ベースの方法と適合性がある。5'及び3'リンカー修飾を伴うエキスプローブは、エキスパンドマー合成のための化学的ライゲーション-ベースの方法と適合性がある。

30

【0062】

「エクスマー(Xmer)」は、拡張可能なオリゴマー性基質構築物である。各エクスマーは、オリゴマー性基質メンバー及びテザーメンバーを有し、このテザーメンバーは一般に1つ以上のレポーター構築物を有する。エクスマーは、エキスパンドマー合成のためのポリメラーゼ-ベースの方法と適合性のある5'-三リン酸エステルである。

【0063】

「RT-NTP」は、テンプレート依存型酵素的重合と適合性がある、拡張可能な5'-三リン酸エステルで修飾されたヌクレオチ德基質構築物(「モノマー性基質」)である。RT-NTPは、修飾されたデオキシリボヌクレオチド三リン酸(「DNTP」)、リボヌクレオチド三リン酸(「RNTP」)、又は機能的に同等なアナログ基質を有し、これらは、まとめてヌクレオチド三リン酸基質(「NTPS」)と称される。RT-NTPは、2つの個別の機能成分を有し；すなわち、核酸塩基5'-三リン酸エステル及びテザー又はテザー前駆体である。娘鎖の形成後、該テザーは、制御されたRT拡張を可能にする位置で、各ヌクレオチドの間に付着される。RT-NTPのひとつのクラス(例えばクラスIX)において、テザーはRT-NTP重合後に付着される。場合によっては、RT-NTPは、可逆的なターミネーター、及び隣接テザーへ直接選択的に架橋するテザーを有する。各テザーは、それにテザー化されているヌクレオチドを特異的に同定するレポーターにより、独自にコードされることができる。

40

【0064】

「XNTP」は、テンプレート依存型酵素的重合と適合性がある、拡張可能な5'-三リン酸エステルで修飾されたヌクレオチ德基質である。XNTPは、2つの個別の機能成分を有し；

50

すなわち、核酸塩基5'-三リン酸エステル、及びヌクレオチド内切断により制御されたRT拡張を可能にする位置で各ヌクレオチド内に付着されているテザー又はテザー前駆体である。

【0065】

「プロセッシブ(Processive)」とは、一般に連続しておりかつ方向性を持って進行する基質の共役プロセスをいう。理論に結びつけられるものではないが、リガーゼ及びポリメラーゼの両方は、例えば基質が新生娘鎖に断続を伴わずに徐々に増えて付加される場合に、プロセッシブな挙動を示す。ハイブリダイゼーションとライゲーションの工程、又はハイブリダイゼーションと重合の工程は、その正味の作用が新生娘鎖のプロセッシブな成長である場合には、独立した工程としては認められない。全てではないが一部のプライマー依存型プロセスは、プロセッシブである。

10

【0066】

「乱交雑(promiscuous)」とは、テンプレート上の複数のポイントから一度に進行し、かつプライマー依存型でない基質の共役プロセスをいい、これは鎖伸長がひとつよりも多い起点から平行して(同時に)起こることを示している。

【0067】

「一塩基伸長」は、モノマー性基質が1個ずつ付加される循環式段階的プロセスをいう。一般にこの共役反応は、可逆的なブロック基を使用することにより、任意の一工程における単基質伸長を超えた進行が制限される。

「単プローブ伸長」は、オリゴマー性基質が1個ずつ付加される循環式段階的プロセスをいう。一般にこの共役反応は、可逆的なブロック基を使用することにより、任意の一工程における単基質伸長を超える進行が抑止される。

20

【0068】

「に対応する」又は「対応している」は、ここでは、標的核酸配列の全体又は一部と相補的であり、従ってこれ「に対応している」、プローブ、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアナログ、又は娘鎖の連続した1本鎖化された配列に関して使用される。プローブの相補的配列は、その標的に対応すると言うことができる。別に言及しない限りは、プローブの相補的配列及び標的の相補的配列の両方共、個別に連続した配列である。

【0069】

「ヌクレアーゼ-耐性」は、DNA又はRNAホスホジエステル結合が一般に切断される条件下で、ヌクレアーゼ酵素に対し耐性である結合をいう。ヌクレアーゼ酵素は、DNase I、エキソヌクレアーゼIII、マングベーンヌクレアーゼ、RNase I、及びRNase Hを含むが、これらに限定されるものではない。この技術分野の業者は、所与の結合の相対的ヌクレアーゼ耐性を容易に評価することができる。

30

【0070】

「リガーゼ」は一般に、3'-OH 5'-三リン酸エステルのヌクレオチド、オリゴマー、及びそれらのアナログを結合するための酵素である。リガーゼは、tRNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、サーマス・フィリフォルミス(*Thermus filiformis*)DNAリガーゼ、大腸菌(*Escherichia coli*)DNAリガーゼ、Tth DNAリガーゼ、サーマス・スコトダクタス(*Thermus scotoductus*)DNAリガーゼ、熱安定性リガーゼ、Ampligase熱安定性DNAリガーゼ、VanC型リガーゼ、9°N DNAリガーゼ、Tsp DNAリガーゼ、及び生物資源探査により発見された新規リガーゼを含む、NAD<sup>+</sup>-依存型リガーゼを含むが、これらに限定されるものではない。同じくリガーゼは、T4 RNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、Pfu DNAリガーゼ、DNAリガーゼI、DNAリガーゼIII、DNAリガーゼIV、及び生物資源探査により発見された新規リガーゼを含む、ATP-依存型リガーゼも含むが、これらに限定されるものではない。これらのリガーゼは、野生型、変異体アイソフォーム、及び遺伝子操作された変種を含む。

40

【0071】

「ポリメラーゼ」は一般に、3'-OH 5'-三リン酸エステルのヌクレオチド、オリゴマー、及びそれらのアナログを連結するための酵素である。ポリメラーゼは、DNA-依存型DNAポリメラーゼ、DNA-依存型RNAポリメラーゼ、RNA-依存型DNAポリメラーゼ、RNA-依存型RN

50

Aポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、T3 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、クレノウ断片、サーモフィラス・アクアティカス(Thermophilus aquaticus)DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、VentR(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)、Deep VentR(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)、Bst DNAポリメラーゼラージ断片、Stoeffel断片、9°N DNAポリメラーゼ、9°N DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Tfi DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、RepliPhi Phi29ポリメラーゼ、Tli DNAポリメラーゼ、真核生物DNAポリメラーゼ、テロメラーゼ、Therminator(商標)ポリメラーゼ(New England Biolabs社)、KOD HiFi(商標)DNAポリメラーゼ(Novagen社)、KOD1 DNAポリメラーゼ、Q- レプリカーゼ、末端転移酵素、AMV逆転写酵素、M-MLV逆転写酵素、Phi6逆転写酵素、HIV-1逆転写酵素、生物資源探査により発見された新規ポリメラーゼ、並びにUS 2007/0048748、US 6,329,178、US 6,602,695、及びUS 6,395,524(引用により組込まれている)に列記されたポリメラーゼを含むが、これらに限定されるものではない。これらのポリメラーゼは、野生型、変異体アイソフォーム、及び遺伝子操作された変種を含む。

10

#### 【0072】

「解読する」又は「解析する」は、ひとつのフォーマットを別のフォーマットに移行することを説明する動詞であり、標的テンプレート塩基配列の遺伝情報を、レポーターの並び方に移行することをいう。

「遺伝子外(extragenetic)」は、主要骨格の一部ではない娘鎖の任意の構造をいい；例えば、遺伝子外レポーターは、その主要骨格に存在する核酸塩基それ自身ではない。

20

#### 【0073】

「ヘテロ-コポリマー」は、異なるユニット(例えば、モノマーサブユニット種)の「コポリマー」の鎖への組合せにより形成された物質である。ヘテロ-コポリマーは、個別の「サブユニット」構築物から構築される。「サブユニット」は、よく規定されたモチーフからなるポリマーの領域であり、ここで各モチーフは種であり、かつ遺伝情報を運ぶ。用語ヘテロ-コポリマーは本明細書において、全てのブロックが、各モチーフが種-特異的エレメントを有するような反復モチーフで構築されたブロックであるポリマーを説明するためにも使用される。娘鎖及びエキスパンドマーは両方とも、ヘテロ-コポリマーであり、これにより各サブユニットモチーフは、標的テンプレート配列の1つ以上の塩基をコードし、かつその標的配列全体は、モチーフの配列により更に定義されている。

30

#### 【0074】

「固形支持体」は、分子、化合物、細胞、又は他の実体の付着のための表面を有する固形物質である。固形支持体の表面は、平坦であるか、又は平坦でないことができる。固形支持体は、多孔質又は非孔質であることができる。固形支持体は、表面を備えるチップ又はアレイであることができ、かつこれは、ガラス、ケイ素、ナイロン、ポリマー、プラスチック、セラミック、又は金属を含むことができる。固形支持体は、ナイロン、ニトロセルロース、若しくは高分子性メンブレンなどのメンブレン、又はプレート若しくはディッシュであることもでき、かつガラス、セラミック、金属、又は例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、若しくはポリアロマーなどのプラスチックからなることができる。固形支持体は、任意の形状のビーズ、樹脂又は粒子であることもできる。このような粒子又はビーズは、ガラス又はセラミック、及び/又は1種以上のポリマー、例えばナイロン、ポリテトラフルオロエチレン、テフロン(商標)、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、セファロース、アガロース、セルロース、セルロース誘導体、若しくはデキストランなどの、任意の好適な材料で構成されることができ、並びに/又は金属、特に常磁性金属、例えば鉄を含むことができる。

40

#### 【0075】

「可逆的ブロック」又は「ターミネーター」は、部分上の第二の化学基に結合された場合に、第二の化学基が特定の化学反応に侵入することを妨害する化学基をいう。合成有機化学及び生物有機化学において、広範な保護基が公知であり、これらは特定の化学基に適

50

しており、かつ特定の化学プロセスと適合性があり、このことはこれらはそれらのプロセス時に特定の基を保護し、かつ引き続き除去又は修飾されることを意味している(例えば、Metzkerらの論文、Nucleic Acids Res., 22(20): 4259, 1994を参照されたい)。

#### 【0076】

「リンカー」は、2つの分子又は部分が意図された様式で機能することができるように、これらを連結し、かつこれら2つの分子又は部分の間に空間を提供する、分子又は部分である。例えばリンカーは、一方の端の反応基を介してオリゴヌクレオチドアナログ分子に、及び他端の反応基を介して例えばビーズ表面などの固形支持体に、共有結合されたジアミン炭化水素鎖を含むことができる。関心対象のヌクレオチド及び基質構築物へのリンカーの共役は、当該技術分野において公知である共役剤により達成することができる(例えば、Efimovらの論文、Nucleic Acids Res. 27: 4416-4426, 1999を参照されたい)。有機分子を誘導体化及び共役する方法は、有機化学及び生物有機化学の技術分野において周知である。リンカーは、切断可能又は可逆的であることもできる。

#### 【0077】

(全般的概要)

大まかにいうと、単分子標的核酸の複製に関する方法及び対応する装置及び生成物が説明されている。そのような方法は、増大した処理量及び精度で、標的核酸を配列決定することが可能である「エキスパンドマー」を利用する。エキスパンドマーは、線形に拡張されたフォーマットで標的核酸のヌクレオチド配列データをコード化(解析)し、これにより任意にシグナル強度の増幅を伴い、空間的分解能を改善している。これらのプロセスは、本明細書において「拡張による配列決定」又は「SBX」と称されている。

#### 【0078】

図1Aに示されたように、未変性二重鎖核酸は、極めてコンパクトな線形データ密度を有し；二重らせん(1)の各鎖の順次積層された塩基(2)間の中心から中心までの離隔距離は約3.4 Åであり、従っていかなる精度及び速度でも直接造影又は配列決定することは極めて困難である。2本鎖形が変性され、1本鎖ポリヌクレオチド(3,4)を形成する場合、得られる塩基毎の離隔距離は類似しているが、二次構造のドメインにより問題が複雑となる。

#### 【0079】

図1Bに示されたように、遺伝子外テザーT(8,9)により結びつけられた短いオリゴマー(6,7)の鎖状体形成としてここで図示されているエキスパンドマー(5)は、配列決定されるべき核酸標的に関する合成的代替又は「代理」である。テンプレートに対し相補的な塩基は、このエキスパンドマーへ取り込まれるが、この一定間隔で間をあけたテザーは、短いオリゴマー(ここでは各々円形で描かれた4個の核酸塩基で示されている)の間の距離が増大するように働く。本エキスパンドマーは、合成二重鎖中間体がテンプレート鎖を複製することにより最初に形成されるプロセスにより製造される。この娘鎖は、これらのオリゴマーにより形成された線状骨格と折り畳まれたテザーで構成された拘束されたエキスパンドマー骨格の両方を有する点で、独特である。これらのテザーは次に、広げられるか又は「拡張され」、前記生成物を伸長されたテザーの鎖に変換する。比喩的に、本娘鎖は、1本の線状骨格(主要骨格)と、「アコーディオン状」の折り畳みを伴う他の骨格(拘束されたエキスパンドマー)の、ふたつの重ね合わされた骨格として見ることができる。この娘鎖内の結合の選択的切断は、アコーディオン状の折り畳みを拡張させ、エキスパンドマー産物を作製することを可能にする。このプロセスは、以下により詳細に説明されるが、図1Bに示されたようなオリゴマー1個につき4個の核酸塩基の選択及びテザーの詳細は、単に例証を目的としており、決して本発明を限定するために構築されるものではないことは注意されなければならない。

#### 【0080】

前記エキスパンドマー内の隣り合うオリゴマー間の分離距離「D」は、ここでプロセス-依存性に変動することができ、テザーTの長さにより決定される。示されるように、テザーTの長さは、基質構築物、そこからエキスパンドマーが製造されるビルディングブロックへとデザインされる。この離隔距離Dは、例えば0.5nmよりも大きい、又は2nmよりも大



きい、又は5nmよりも大きい、又は10nmよりも大きい、又は50nmよりも大きいように選択することができる。この離隔距離が増大するにつれ、個々のオリゴマーを識別又は「分離」するプロセスは、次第に容易になっていく。このことは、オリゴマーの代わりに、別のエキスパンドマー種の個々の核酸塩基が、テザーの鎖上に一緒に並んだ場合にも、当てはまる。

#### 【0081】

再度図1Aを参照し、未変性DNAは、半保存的複製のプロセスにより複製し；新規DNA分子の各々は、テンプレート鎖(3)及び未変性娘鎖(4)の「二重鎖」である。この配列情報は、塩基対の配列に固有の遺伝情報を保存している「テンプレートに方向づけられた合成」のプロセスにより、テンプレートから未変性娘鎖へ受け継がれる。この未変性娘鎖は次に、次世代未変性娘鎖のためのテンプレートなどとなり始める。エキスパンドマーは、酵素的又は化学的共役プロセスであることができる、テンプレートに方向づけられた合成の類似のプロセスにより形成される。しかし未変性DNAとは異なり、エキスパンドマーは一旦形成されると、半保存的複製の生物学的プロセスにより複製されることはできず、PCRなどのプロセスによる増幅には適していない。該エキスパンドマー産物は、望ましくない二次構造を制限するようにデザインされている。

#### 【0082】

図2Aから2Dは、代表的クラスIエキスパンドマー基質(20,21,22,23)を示している。これらは、それらからエキスパンドマーが合成されるビルディングブロックである。他のエキスパンドマー基質(本明細書において10のクラスが明らかにされている)は、後続節で扱われている。ここに示されたエキスパンドマー基質構築物は、ふたつの機能成分を有し；すなわち、プローブメンバー(10)及びループ立体配置内の「テザー」メンバー(11)である。このループは、最終生成物の伸長されたテザー「T」を形成する。単に説明の便宜上、該プローブメンバーは再度、図2Bに示されたように、4個の核酸塩基残基(14,15,16,17)で描かれている。

#### 【0083】

これらの基質構築物は、例えばリガーゼとの使用に適した5'-ーリン酸エステル、3'-OH(本明細書において「エクスポーブ」と称す)として、又はポリメラーゼとの使用に適した5'-三リン酸エステル、3'-OH(本明細書において「エクスマー」と称す)などの、R基により末端修飾されることができる。他のR基は、様々なプロトコールにおいて使用することができる。図3Bに示された第一の例において、本発明者らは、リガーゼ-依存型プロセスによる標的核酸のテンプレート鎖からのエキスパンドマーの合成におけるエクスポーブの使用を提示する。

#### 【0084】

プローブメンバー(10)の4つの核酸塩基残基(14,15,16,17)は、テンプレートの4つのヌクレオチドの連続配列に対し相補的であるように選択される。従って各「プローブ」は、4つのヌクレオチドの相補配列で該テンプレートとハイブリダイズするようにデザインされる。多くのそのようなプローブ配列のライブラリーを供給することにより、該テンプレートの連続相補的複製物が形成され得る。この娘鎖は、「エキスパンドマー中間体」と称される。エキスパンドマー中間体は、二重鎖型又は1本鎖型を有する。

#### 【0085】

前記テザーループは、第二及び第三の核酸塩基残基(15,16)で、プローブメンバー(10)へ結合される。第二及び第三の核酸塩基残基(15,16)は、「V」により描かれた「選択的に切断可能な結合」(25)により互いに結合もされる。この切断可能な結合の切断は、テザーループの拡張を可能にする。線状化されたテザーは、娘鎖の主要ポリヌクレオチド骨格の選択的に切断可能な結合部位を「橋かけする」と言うことができる。これらの結合の切断は、その主要骨格を破壊し、より長いエキスパンドマーを形成する。

#### 【0086】

選択的に切断可能な結合(25)の選択的切断は、以下により詳細に考察されるように、ホスホロチオラート結合の化学切断、リボシル5'-3'ホスホジエステル連結のリボヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼ消化、光切断可能な結合の切断などを含むが、これらに限定されるものではない様々な様式で行われることができる。

【0087】

図2Aに示された基質構築物(20)は、レポーターエレメントの付着のための、楕円(26)によりここで表された単独のテザーセグメントを有する。このセグメントには、スパーサテザーセグメント(12,13)が側方に位置し、これら全てが集合的にテザー構築物を形成している。例えばこのテザーセグメントを構築するために、1個から多数のデンドリマー(類)、ポリマー(類)、分岐ポリマー(類)又はそれらの組合せを使用することができる。図2Bの基質構築物(21)に関して、テザー構築物は、レポーターエレメント(27,28,29)付着のための3つのテザーセグメントで構成され、その各々には、スパーサテザーセグメントが側方に位置する。レポーターエレメントの組合せは、「レポーター構築物」を集合的に形成し、独自のデジタルレポーターコード(プローブ配列同定のため)を作製する。これらのレポーターエレメントは、蛍光分子、FRETタグ、ビーズ、リガンド、アプタマー、ペプチド、ハプテン、オリゴマー、ポリヌクレオチド、デンドリマー、ステムループ構造、親和性標識、質量タグなどを含むが、これらに限定されるものではない。図2Cにおける基質構築物(22)のテザーループ(11)は、「裸」である。この構築物においてコードされた遺伝情報は、テザー上ではコードされないが、例えばタグ付きヌクレオチドの形で、プローブ(10)と会合される。図2Dの基質構築物(23)は、一般的原理を図示している：アスタリスク(\*)により示されるように、このプローブの配列情報は、配列決定プロトコールにおいてより容易に検出される修飾された形で基質構築物においてコードされるか又は「解析される」。この配列データは、線状に伸長されたエキスパンドマーポリマーを形成する選択的に切断可能な結合(25)が切断された後物理的により良く分解されるので、アスタリスク(\*)は、そのために有益であるコードされた遺伝情報の任意の形状を表している。この基質構築物の1つ又は複数のバイオインフォマティクスエレメント(\*)は、それらの形状に関わらず、直接検出可能であるか、又は集成後の標識工程においてそれに検出可能なエレメントが付加される前駆体であることができる。場合によっては、遺伝情報は、例えば多状態の質量タグのような、基質構築物それ自身の分子特性がコードされている。別の場合には、遺伝情報は、FRETドナー：アクセプター対の1種以上の蛍光分子、又はナノ分子バーコード、又はリガンド若しくはリガンドの組合せ、又は当該技術分野から引き出されたいくつかのその他の標識技術の形によりコードされている。様々な実施態様が、以下により詳細に考察されている。

【0088】

前記テザーは一般に、以下の多数の機能を働く：(1)エキスパンドマー中間体を形成する隣接テザーへ直接又は間接に逐次連結すること；(2)主要骨格中又はテザー内の選択された結合の切断時にテザーの伸長された鎖を形成するために、伸展及び拡張すること(図1B参照のこと)；並びに/又は、(3)その会合された基質の核酸塩基残基配列情報をコードしている、「タグ」若しくは「標識」とも称されるレポーターエレメントの取り込みのための分子構築物を提供すること。前記テザーは、その構成要素レポーターエレメントの空間的分離、存在量、情報密度、及びシグナル強度を調節することにより、コード化機能を最適化するようにデザインされることができる。広範なレポーター特性は、基質構築物内にコードされた遺伝情報のシグナル強度を増幅するために有用である。レポーター、分子バーコード、親和性結合、分子タグ付け及び他のレポーターエレメントに関する文献は、当該技術分野の業者に周知である。

【0089】

基質構築物の各基質が、x個の核酸塩基を含む場合、x核酸塩基の可能性のある逐次的組合せを全て表しているライブラリーは、 $4^x$ 種のプローブを含む(A、T、C又はGからの核酸塩基を選択する場合)ことを認めることができる。他の塩基が使用される場合は、より少ない又はより多い組合せが必要とされる。これらの基質ライブラリーは、各基質構築物が、(1)配列決定される核酸の可能性のある標的配列のいずれかひとつと相補的なプローブ(又は少なくとも1つの核酸塩基残基)、及び(2)その特定のプローブ(又は核酸塩基)が相補

的である標的配列のアイデンティティをコードしている独自のレポーター構築物：を含むように、デザインされる。2つの核酸塩基を含むプローブのライブラリーは、16種の独自のメンバーを有し；3種の核酸塩基を含むプローブのライブラリーは、64種の独自のメンバーを有する：などである。代表的ライブラリーは、4種の個別の核酸塩基それら自身を有するが、テザーの手段を収容する(accommodate)ように構成される。

#### 【0090】

エクスパンドマーの合成は、図3Aから3Cに図示されている。ここに描かれた基質はエクスプローブであり、この方法は、自由溶液中におけるプライマー-依存型プロセスライゲーションを伴うハイブリダイゼーションとして説明することができる。

多くの周知の分子生物学プロトコル、例えば標的DNAの断片化及び末端アダプターのライゲーションのためのプロトコルを、配列決定法で使用するために適合することができ、かつここで使用し、配列決定のための標的DNA(30)が調製される。ここで本発明者らは、大まかに、該断片の末端のポリッシュ(polishing)プロセス及び配列決定プライマーとの使用のためにデザインされたアダプター(31,32)の平滑末端ライゲーションのプロセスで、当業者が熟知していることを図示している。これらの働きは、図3Aの工程Iに示されている。工程II及びIIIにおいて、標的核酸は変性され、該アダプターと相補的な好適なプライマー(33)とアニールされる。

#### 【0091】

図3Bにおいて、工程IIIのプライミングされたテンプレート鎖は、基質構築物(36)及びリガーゼ(L)のライブラリーと接触され、並びに工程IVにおいて、条件が、プライマー-テンプレート二重鎖の遊離3'-OHでのハイブリダイゼーション、その後のライゲーションに好ましくように調節される。任意に工程Vにおいて、このリガーゼは解離し、かつ工程VI及びVIIにおいて、ハイブリダイゼーション及びライゲーションのプロセスが認められ、プライマー末端への基質(37,38)の累積性の付加による伸長を生じる。プライミングは、1本鎖化されたテンプレートの両端でアダプターから生じることができ、新生エクスパンドマー鎖の成長は、単に単純化のために1個のプライマーから進行するように、ここでは示されている。この鎖の伸長は、工程VI及びVIIで表され、これらは連続して(断続されることなく、徐々に増えるように)繰り返される。これらの反応は、自由溶液において生じ、かつ十分量の生成物が合成されるまで進行する。工程VIIIにおいて、完成されたエクスパンドマー中間体(39)の形成が示されている。

#### 【0092】

長さが比較的長い連続ヌクレオチド配列は、この様式で効率的に複製され、エクスパンドマー中間体を形成する。長いテンプレート鎖断片に対応する連続リード長(「コンティグ」)は、この技術により実現することができることを認めることができる。数十億のこれらの単分子SBX反応は、1個のチューブ内での効率的バッチプロセスにおいて同時に行われ得ることは、当業者には明らかであろう。引き続きこれらの合成のショットガン生成物が配列決定される。

#### 【0093】

図3Cにおいて、前記SBXプロセスの次工程が描かれている。工程IXは、二重鎖エクスパンドマー中間体の変性、それに続く骨格内の選択的に切断可能な結合の切断を示し、この選択的に切断可能な結合は、テザーループを「開き」、線状に伸長されたエクスパンドマー産物(34)を形成するようにデザインされている。そのような選択的切断は下記を含むが、これらに限定されるものではない、当業者に公知のいくつかの技術により実現することができる：Magらの論文(「架橋されたヌクレオチド間5'-ホスホロチオエート連結を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage)」、Nucleic Acids Research, 19(7):14371441, 1991)に説明された金属陽イオンによるホスホロチオエート切断、Magらの論文(「非キラルヌクレオチド間ホスホロアミデート連結を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral int

ernucleotide phosphoramidate linkages)」、Nucleic Acids Research, 17(15): 597359 88, 1989)に説明されたホスホロアミデートの酸触媒された切断、Gutらの論文(「一塩基多型の効率的遺伝子タイピングの新規手法(A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms)」、Nucleic Acids Research, 28(5): E13, 2000)及び別のEcksteinらの論文(「ホスホロチオエート含有DNAによる制限エンドヌクレアーゼ加水分解の阻害(Inhibition of restriction endonuclease hydrolysis by phosphorothioate-containing DNA)」、Nucleic Acids Research, 25; 17(22): 9495, 1989)に説明されたホスホジエステル連結による選択的ヌクレアーゼ切断、並びにSauerらの論文(「光切断及び電荷タグ付けによる一塩基多形のMALDI質量分析(MALDI mass spectrometry analysis of single nucleotide polymorphisms by photocleavage and charge-tagging)」、Nucleic Acids Research, 31, 11 e63, 2003)、Valloneらの論文(「MALDI-TOF MSにおけるUV光で切断可能なオリゴヌクレオチドを使用するSNPs遺伝子タイピング(Genotyping SNPs using a UV-photocleavable oligonucleotide in MALDI-TOF MS)」、Methods Mol. Bio. 297:169-78, 2005)、及びOrdoukhanianらの論文(「汎用光切断可能なDNAビルディングブロックのデザイン及び合成、光で誘起するハイブリダイゼーションへの適用(Design and synthesis of a versatile photocleavable DNA building block, application to photo triggered hybridization)」、J. Am. Chem. Soc. 117, 9570-9571, 1995)に説明された選択的光切断可能なリンカーで修飾されたホスホジエステル骨格の選択的切断。

#### 【0094】

洗浄工程及びストリンジェンシー条件の調節などの基本的プロセスの改良は、経験を積んだ分子生物学者の十分技術の範囲内である。本プロセスの変形は、例えば、標的鎖の固定及び解析、エクスパンドマーの合成時の二次構造を減少するための伸展及び他の技術、拡張後標識化、末端官能基化を含み、並びに基質の連結のためのリガーゼの変更を含み、以下の材料において考察される。

#### 【0095】

エクスパンドマーの合成は、核酸の検出及び配列決定を促進するように実行され、これは全ての種類の核酸に適用可能である。前記プロセスは、(未変性核酸の小さいヌクレオチド-から-ヌクレオチド距離に対し拡張された)配列情報をコードしている骨格エレメント(又はサブユニット)の長さの「拡張」又は「伸長」のための方法であり、任意に(未変性ヌクレオチドについて観察されたほぼ識別不可能な低い強度のシグナルに対し)シグナル強度を増加するようにも働く。従ってエクスパンドマーの拡張された合成骨格中に取り込まれたレポーターエレメントは、検出されることができ、かつ当該技術分野において周知の検出法(例えば、CCDカメラ、原子間力顕微鏡、又はゲート質量分析計)を含む、様々な検出法を用いて、更には超並列ナノ細孔センサーアレイなどの方法、又は方法の組合せにより、処理できる。検出技術は、最適シグナル対ノイズ、処理量、経費、及び同様の要因を基に選択される。

#### 【0096】

図4に目を向けると、検出技術の単純モデルが示されている：すなわち、 $\lambda_1$ 波長の光により励起される、メンブレン(44)中のFRETドナー(42)を伴うナノ細孔(40)。エクスパンドマー産物(41)は伸長しかつナノ細孔(40)を通り矢印(45)の方向へ運搬されるので、励起された蛍光分子からの波長 $\lambda_2$ の放出の一連のバーストが細孔近傍において検出される。この放出波長( $\lambda_2$ )は、テザーの長さ及びナノ細孔を通過するエクスパンドマーの速度の関数として時間的に間隔が空けられる。これらのアナログシグナルの捕獲及びそれらのデジタル処理により、この配列情報は、エクスパンドマーから直接読むことができる。この検出方法において、ナノ細孔及びメンブレンは、それを通りエクスパンドマーが移動することができる多くの経路を有することができることは注記されなければならない。前記FRET検出は、そこに各経路に沿って少なくとも1つの励起されたFRETドナーを必要とする。対照的に、コールターカウンターベースのナノ細孔は、シグナル対ノイズを犠牲にして、追加の移動細孔のみを有することができる。

#### 【0097】

図4のナノ細孔-ベースの検出技術は、図2Bに示された構造のエキスプローブ鎖を描いているが、このテザー構築物は、テザーに沿って配置された箱状のレポーターメンバー(27, 28, 29)により示されているように、マルチ-エレメントレポーター構築物を含む。関連のあるナノ細孔配列決定技術は、例えば、Brantonらの米国特許第6,627,067号、及びLeeらの文献(Lee, JW及びA Meller., 2007、「個々のDNA鎖におけるヌクレオチド塩基の直接ナノスケール測定による迅速配列決定(Rapid sequencing by direct nanoscale reading of nucleotide bases in individual DNA chains)」、New High Throughput Technologies for DNA Sequencing and Genomics, 2、Elsevier社)に明らかにされている。

【0098】

図5は、いかにしてここではFRETアクセプター蛍光分子で構成されたマルチ-エレメントレポーター構築物が、FRETゲートに配置された検出器に出現するかを明示している。この放出のマルチ-チャンネルプロットにおいて、アナログシグナルは、一般に規則的時間間隔で集められ、かつデジタルコードの型(ここではレポーターコード、本例に関してエキスプローブIDと称され)として解析され、エキスプローブサブユニットのアイデンティティ及び順番、従って図示されたエキスパンドマーの遺伝子配列を明らかにし得ることを認めることができる。レポーターの様々な組合せを使用し、説明されたエキスプローブのA、T、G又はCの4-塩基の任意の組合せを逐次的にコードしているレポーターコードのライブラリーを作製することができる。この例において、3種の蛍光分子の組合せを使用し、22のレポーターコードが作製される。この方式において、配列ACTGには、GCCGが続く；AAATが続くことが認められる。縦に配置された点線は、蛍光定量データ及びエキスパンドマーの対応するサブユニット(概略的に示される)を分けている。このプロットの直ぐ下側の解釈的アルゴリズムは、いかにして一定間隔で配置されたアナログシグナルが、判読可能な遺伝子配列へ翻訳されるかを示している。

【0099】

図5に図示されたエキスプローブ基質構築物は、該基質の配列アイデンティティをコード化するために、各々がスパーサーテザーセグメントが側方に配置された、3種のレポーター標識されたセグメントで構成されたマルチ-エレメントテザー構築物を使用しており、これは更に詳述される。第一のテザーセグメントは、レポーターコード#1(左から右へ読む)であり、赤チャンネルの高シグナルとして読みとられる。第二のテザーセグメントは、レポーターコード#9であり、高緑シグナル及び低赤シグナルとして読みとられる。第三のテザーセグメントは、レポーターコード#8であり、低青シグナル及び低赤シグナルとして読みとられる。レポーターコード#1は、クロック又は同期化シグナルとして使用され；レポーターコード#9は、第一のプローブ部分「AC」をコードし；レポーターコード番号#8は、そのプローブの第二部分「TG」をコードしている。まとめると、「1-9-8」の逐次的レポーターコードは、エキスプローブの特定の種(エキスプローブID117)に対応しており、これは次に計画的に配列断片「ACTG」に対応している。3つのエキスプローブIDは、プロット「ACTGGCCGAAAT (配列番号1)」に示された連続配列全体をコードしている。この蛍光分子放出、レポーターコード及び配列断片を解読するための表、並びにレポーター構築物の対応する物理的表示は、エキスパンドマーの構造的サブユニットに従い、図面の点線により分けられており、その結果その配列情報が解読されかつデジタル化される方法は容易に認めることができる。

【0100】

図6は、それから図5の例が調製される蛍光分子標識の表である。これは、検出可能なシグナルの形で情報を解析するために、多状態レポーターコードの組合せの使用をより一般的に図示している。本例のレポーター構築物を形成するために、22の可能な放出状態を有する蛍光分子が使用される。1個のオリゴマーにつき3種の蛍光分子標識は、A、T、C及びGの可能性のある全ての4mer組合せをコードするためにとても適している。テザーの長さを増加することにより、蛍光分子標識放出の間の分解能は改善され、検出工程の精度は利益を得、その原理は一般に適用可能である。

【0101】

10

20

30

40

50

この種類のテザー構築物で使用可能なレポーターは、蛍光分子のみではなく、多くの種類のものであり、かつ対応する広範なハイスループット及び正確な検出技術、そうでなければ限定された分解能のために未変性核酸の配列決定に有用ではないかもしれない技術を用いて測定されることができる。ナノ細孔センサーアレイなどの、本技術の検出方法の超並列状態は、エクスパンドマーのより多くの測定可能な特徴により促進される。配列決定検出プロセスの不充分さは、不完全な又は短い反応生成物を除去するためのエクスパンドマーのバッチの予備精製により低下されることができる。精製及びエクスパンドマーの検出器への提示を促進する手段の両方のために利用することができる、合成されたエクスパンドマーを末端-修飾する方法が提供される。更に読み取りプロセスは、キャップ形成、キャップ除去、ヌクレオチド伸長、標識、又は他の並列処理方法へ制限的には拘束されない。

10

#### 【0102】

図7Aは、自由溶液中の基質のプロセッシブライゲーション及びプライマー-開始されたテンプレートに方向づけられたライゲーションを明らかにするための、20個の塩基の5'側突出を伴うようにデザインされた部分的二重鎖テンプレートを説明している。図7Bは、図7Aに説明されたプライマー-テンプレートフォーマットを使用する基質のライゲーションを明らかにしているゲルの写真である。この例に関して、配列5'リン酸エステルCA3'のジヌクレオチドオリゴマー性基質は、プライマー及びT4 DNAリガーゼの存在下でテンプレートにハイブリダイズされる。次に非二重鎖の突出末端(もしあれば)は、ヌクレアーゼ消化され、このライゲーション生成物は、20%アクリルアミドゲル上で分離される。このライゲーションは、確実にライゲーションされたサブユニットを含む、生成物ポリマーを生じる。バンド化パターンにより示されるように、このリガーゼ陽性反応は、レーン1、3、5、7及び9を流れ、これらは次第により長いテンプレート(各々、4、8、12、16及び20塩基)を含み、2mer基質(エキソヌクレアーゼ保護された二重鎖の増加した長さ)の逐次的ライゲーションを明らかに示している。レーン2、4、6、8及び10は、リガーゼを含まない陰性対照であり、ライゲーションされない生成物の完全なエキソヌクレアーゼ消化を示している。

20

#### 【0103】

図7Cは、基質のテンプレートに方向づけられたライゲーションを示す第二のゲルである。4つの次第により長い陽性対照テンプレートは、再度伸長プライマーと二重鎖化され、アッセイされた(各々、4、8、12、及び16テンプレート塩基)。再度配列5'リン酸エステルCA3'のジヌクレオチドオリゴマー性基質は、プライマー及びT4 DNAリガーゼの存在下で、テンプレートとハイブリダイズされる。非二重鎖の末端-突出(もしあれば)は、ヌクレアーゼ消化され、このライゲーション生成物は、20%アクリルアミドゲル上で分離される。オリゴマー性基質(再度2mer)は、レーン1、2、3及び4においてテンプレートとライゲーションするが、レーン5及び6においてはライゲーションせず、そこではこのテンプレート鎖は、5'(リン酸エステル)CA 3'ジヌクレオチドとのミスマッチを含むように見える(レーン5テンプレート-5'CGCG3'; レーン6テンプレート-5'GGGG3')。

30

#### 【0104】

図7Dに示されたゲルの結果は、ビス(アミノ修飾された)テトラヌクレオチドプローブの多数のテンプレートに方向づけられたライゲーションを示している。この脂肪族アミノ修飾因子は、図26に説明された連結及び組成物のものであった。この例に関して、配列5'(リン酸エステル)C(アミノ)A(アミノ)CA3'のテトラヌクレオチドオリゴマー性基質は、プライマー及びT4 DNAリガーゼの存在下で、一連の次第に長くなる(伸長プライマーと二重鎖化された)相補的テンプレートにハイブリダイズされた。次に非二重鎖の末端-突出(もしあれば)は、ヌクレアーゼ消化され、これらのライゲーション生成物は、20%アクリルアミドゲル上で分離される。このライゲーションは、確実にライゲーションされたサブユニットを含む、生成物ポリマーを生じる。レーン1及び2は、16mer及び20merサイズの対照を表す。レーン3、4、5、6、7、8、及び9は、次第に長くなる相補的テンプレート(各々、4、6、8、12、16、18、及び20テンプレート塩基)のライゲーション生成物を示す。複数の

40

50

テトラマーライゲーションが、より長いテンプレート反応について認められる(レーン6-9)。レーン10は、テンプレート-プローブミスマッチ(テンプレート-5'CGCG3')に起因した、本質的に完全なリガーゼ阻害を示す。

#### 【0105】

図7Eに示されたゲルの結果は、ビス(アミノ修飾された)ヘキサヌクレオチドプローブの多数のテンプレートに方向づけられたライゲーションを示している。この脂肪族アミノ修飾因子は、図26に説明された連結及び組成物のものであった。この例に関して、配列5'(リン酸エステル)CA(アミノ)C(アミノ)ACA3'のヘキサヌクレオチドオリゴマー性基質は、プライマー及びT4 DNAリガーゼの存在下で、一連の次第に長くなる(伸長プライマーと二重鎖化された)相補的テンプレートにハイブリダイズされた。次に非二重鎖の末端-突出(もしあれば)は、ヌクレアーゼ消化され、これらのライゲーション生成物は、20%アクリルアミドゲル上で分離される。このライゲーションは、確実にライゲーションされたサブユニットを含む、生成物ポリマーを生じる。レーン1及び2は、16mer及び20merサイズの対照を表す。レーン3、4、5、6、7、8、及び9は、次第に長くなる相補的テンプレート(各々、4、6、8、12、16、18、及び20テンプレート塩基)のライゲーション生成物を示す。複数のテトラマーライゲーションが、より長いテンプレート反応について認められる(レーン5-9)。レーン10は、テンプレート-プローブミスマッチ(テンプレート-5'CGCG3')に起因した、ほぼ完全なリガーゼ阻害を示す。

#### 【0106】

基質は、プローブメンバー(すなわち、エキスパンドマー中間体を集成するためにテンプレート-特異的結合するメンバーとしてのオリゴマー)、及びモノマー(すなわち、テンプレート-特異的結合するエレメントとしての個々の核酸塩基メンバー)の両方を含む。本発明者らは、一番目を「プローブ型」基質及び二番目を「モノマー型」基質と称す。図8に図示されているように、プローブ型エキスパンドマーは、5つの基本的亜属を有するのに対し、図9は、モノマー型エキスパンドマーの5つの基本的亜属を図示している。図8及び9の表は、3つの縦列を含み：亜群(横列)の特徴として、第一列は基質構築物を、第二列はエキスパンドマー中間体を、及び第三列はエキスパンドマー産物を説明している。これらの表は、本明細書において以下により詳細に明らかにされるものの製造及び使用法と共に、概要としてここで提示されている。図8及び9において、「P」はプローブメンバーを、「T」はテザーメンバー(又はループテザー若しくはテザーアーム前駆体)を、「N」はモノマー(個々の核酸塩基又は核酸塩基残基)を、及び「R」は末端基をいう。

#### 【0107】

より詳細には、図8の表において、下記の命名が使用される：

Pは、プローブ基質メンバーであり、 $P^1$ - $P^2$ で構成され、ここで $P^1$ は第一のプローブ部分であり、及び $P^2$ は第二のプローブ部分であり；

Tはテザーであり；

括弧は、娘鎖のサブユニットを示し、ここで各サブユニットは、種-特異的プローブメンバーを有するサブユニットモチーフであり、更にここで前記サブユニットモチーフの前記プローブメンバーは、ここでは $P^1$ -' $P^2$ 'と表示されるテンプレート鎖の対応する連続ヌクレオチド配列に対し連続的に相補的であり、かつ該エキスパンドマー中間体の主要骨格を形成し、かつここでテザーメンバーは、任意にプローブ部分と一緒に拘束されたエキスパンドマー骨格を形成する。エキスパンドマー中間体内の1つ以上の選択的に切断可能な結合の切断は、サブユニットの拡張を可能にし、エキスパンドマー産物を作製し、そのサブユニットも括弧で示されており；

#### 【0108】

は、サブユニットモチーフのライブラリーから選択されたサブユニットモチーフの種を表示し；

は、プローブメンバー又はテザーの第一の終端又は部分に付着された第一のリンカー基であり；制御された条件下で、は、隣接サブユニットの近接する終端のリンカー基と、直接的に又はクロスリンカーを介して、選択的に反応し、共有的又は同等に耐久性の

ある連結を形成することが可能であり；

は、プローブメンバー又はテザーの第一終端又は部分に付着された第二リンカー基であり；制御された条件下で、は、隣接サブユニットの近接する終端のリンカー基と、直接的に又はクロスリンカーを介して、選択的に反応し、共有的又は同等に耐久性のある連結を形成することが可能であり；

【0109】

は、隣接サブユニットとの結合を表し、かつリンカー基と の反応の生成物の連結であり；

～は、選択的に切断可能な結合を示し、これは複数の選択的に切断可能な結合が存在する場合に、同じ又は異なることができ；

$R^1$ は、ヒドロキシル、水素、三リン酸エステル、一リン酸エステル、エステル、エーテル、グリコール、アミン、アミド、及びチオエステルを含むが、これらに限定されるものではなく；

$R^2$ は、ヒドロキシル、水素、三リン酸エステル、一リン酸エステル、エステル、エーテル、グリコール、アミン、アミド、及びチオエステルを含むが、これらに限定されるものではなく；並びに

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで  $= 1, 2, \dots, m$ であり、ここで $m > 3$ 、及び一般に $m > 20$ 、及び好ましくは $m > 50$ 、及びより優先的には $m > 1000$ である。

【0110】

より詳細に、かつ図9の表の文脈において、下記の命名が使用される；

Nは、核酸塩基残基であり；

Tはテザーであり；

括弧は、娘鎖のサブユニットを示し、ここで各サブユニットは、種-特異的核酸塩基残基を有するサブユニットモチーフであり、更にここで該サブユニットモチーフの該核酸塩基残基は、ここではN'と表示されるテンプレート鎖の対応する連続ヌクレオチド配列に対し連続的に相補的であり、かつ該エキスパンドマー中間体の主要骨格を形成し、かつここでテザーメンバーは、任意に核酸塩基残基と一緒に、拘束されたエキスパンドマー骨格を形成する。エキスパンドマー中間体内の1つ以上の選択的に切断可能な結合の切断は、サブユニットの拡張を可能にしてエキスパンドマー産物を作製し、そのサブユニットも括弧で示されており；

【0111】

$n^1$ は、核酸塩基残基の第一部分であり；

$n^2$ は、核酸塩基残基の第二部分であり；

は、プローブメンバー又はテザーの第一の終端又は部分に付着された第一のリンカー基であり；制御された条件下で、は、隣接サブユニットの近接する終端のリンカー基と、直接的に又はクロスリンカーを介して、選択的に反応し、共有的又は同等に耐久性のある連結を形成することが可能であり；

は、プローブメンバー又はテザーの第一終端又は部分に付着された第二リンカー基であり；制御された条件下で、は、隣接サブユニットの近接終端のリンカー基と、直接又はクロスリンカーを介して、選択的に反応し、共有的又は同等に耐久性のある連結を形成することが可能であり；

【0112】

は、隣接サブユニットとの結合を表し、かつ連結基と の反応の生成物の連結であり；

$^1$ は、連結基  $^1$ と  $^1$ の反応の生成物の連結であり；

$^2$ は、連結基  $^2$ と  $^2$ の反応の生成物の連結であり；

～は、選択的に切断可能な結合を示し、これは複数の選択的に切断可能な結合が存在する場合に、同じ又は異なることができ；

$R^1$ は、ヒドロキシル、水素、三リン酸エステル、一リン酸エステル、エステル、エーテ

10

20

30

40

50



ル、グリコール、アミン、アミド、及びチオエステルを含むが、これらに限定されるものではなく；

$R^2$ は、ヒドロキシル、水素、三リン酸エステル、一リン酸エステル、エステル、エーテル、グリコール、アミン、アミド、及びチオエステルを含むが、これらに限定されるものではなく；並びに

は、 $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを表し、ここで  $i = 1, 2, \dots, m$ であり、ここで $m > 10$ 、及び一般に $m > 50$ 、及び典型的には $m > 500$ 又は $> 5,000$ である。

#### 【0113】

(オリゴマー性構築物)

エクスパンドマー前駆体及び構築物は、テンプレートに方向付けられた集成のために使用される基質(オリゴマー性又はモノマー性)を基にふたつの範疇に分けることができる。これらのオリゴマー基質を基にしたエクスパンドマー構造、前駆体及びそれらの合成方法が、以下に考察される。

#### 【0114】

前記基質構築物は一般に、エクスパンドマーへの試薬前駆体であり、テザーメンバー及び基質を有する。ここで考察される基質は、一般に複数の核酸塩基残基で作製された、オリゴマー基質又はプローブである。プローブ1個につき2~20個の核酸塩基残基の、一般にプローブ1個につき2~10個、典型的には2、3、4、5若しくは6個の核酸塩基残基のコンビナトリアル-型ライブラリーの作製により、エクスパンドマー前駆体(基質構築物)の合成における試薬として有用なプローブライブラリーが作製される。

#### 【0115】

このプローブは、ふたつのプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ を有するものとして、一般に以下に説明されている。これらのプローブ部分は一般に、ジヌクレオチドとして本図面中に描かれているが、概して $P^1$ 及び $P^2$ は、各々少なくとも1個の核酸塩基残基を有する。2個の核酸塩基残基を伴うプローブの例において、プローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ は、単独の核酸塩基残基であろう。各々に関する核酸塩基残基の数は、エクスパンドマー合成方法に関して適宜選択され、 $P^1$ 及び $P^2$ においては等しくなくてよい。

#### 【0116】

サブユニット間連結を作出するために 及び リンカー基が使用される基質構築物に関して、広範な好適な市販の化学(Pierce社、Thermo Fisher Scientific, 米国社)を、この目的に適合することができる。共通のリンカー化学は、例えば、アミンとのNHS-エステル、スルフヒドリルとのマレイミド、アミンとのイミドエステル、アミンとの反応のためのカルボキシルとのEDC、スルフヒドリルとのピリジリジスルフィドなどを含む。他の実施態様は、その後更に反応し、連結を形成することができる、ヒドラジド(HZ)及び4-ホルミル安息香酸エステル(4FB)のような官能基の使用に参与している。より詳細には、広範なクロスリンカー(ヘテロ-及びホモ-二官能性)が、広く利用可能であり(Pierce社)、これは Sulfo-SMCC(スルホスクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサ-1-カルボキシラート)、SIA(N-スクシンイミジルヨードアセテート)、Sulfo-EMCS([N-e-マレイミドカプロイルオキシ]スルホスクシンイミドエステル)、Sulfo-GMBS(N-[g-マレイミドブチリルオキシ]スルホスクシンイミドエステル)、AMAS(N-(a-マレイミドアセトキシ)スクシンイミドエステル)、BMPS(N-EMCA (N-e-マレイミドカプロン酸)-[ -マレイミドプロピルオキシ]スクシンイミドエステル)、EDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩)、SANPAH(N-スクシンイミジル-6-[4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ]ヘキサノエート)、SADP(N-スクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオナート)、PMPI(N-[p-マレイミドフェニル]イソシル(isocy)), BMPH(N-[ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド,トリフルオロ酢酸塩)アネート(anate)), EMCH([N-e-マレイミドカプロン酸]ヒドラジド,トリフルオロ酢酸塩)、SANH(スクシンイミジル4-ヒドラジドニコチネートアセトンヒドラゾン)、SHTH(スクシンイミジル4-ヒドラジドテレフタレート塩酸塩)、及びC6-SFB(C6-スクシンイミジル4-ホルミル安息香酸エステル)を含むが、これらに限定

10

20

30

40

50

されるものではない。同じくLetsingerらの特許(「修飾されたヌクレオシド間連結を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチド」、米国特許第6,242,589号)に明らかにされた方法は、ホスホロチオラート連結に適合することができる。

#### 【0117】

更に、良く確立された保護/脱保護化学が、共通のリンカー部分に関して広く利用可能である(Benoitonの著書、「ペプチド合成化学(Chemistry of Peptide Synthesis)」、CRC Press社、2005)。アミノ保護は、9-フルオレニルメチルカルバメート(Fmoc-NRR')、*t*-ブチルカルバメート(Boc-NRR')、ベンジルカルバメート(Z-NRR'、Cbz-NRR')、アセトアミドトリフルオロアセトアミド、フタルイミド、ベンジリアミン(Bn-NRR')、トリフェニルメチルアミン(Tr-NRR')、及びベンジリデンアミン*p*-トルエンスルホンアミド(Ts-NRR')を含むが、これらに限定されるものではない。カルボキシル保護は、メチルエステル、*t*-ブチルエステル、ベンジルエステル、*S*-*t*-ブチルエステル、及び2-アルキル-1,3-オキサゾリンを含むが、これらに限定されるものではない。カルボニルは、ジメチルアセタール1,3-ジオキサン、及び1,3-ジチアン*N,N*-ジメチルヒドラゾンを含むが、これらに限定されるものではない。ヒドロキシル保護は、メトキシメチルエーテル(MOM-OR)、テトラヒドロピラニルエーテル(THP-OR)、*t*-ブチルエーテル、アリルエーテル、ベンジルエーテル(Bn-OR)、*t*-ブチルジメチルシリルエーテル(TBDMS-OR)、*t*-ブチルジフェニルシリルエーテル(TBDPS-OR)、酢酸エステル、ピバル酸エステル、及び安息香酸エステルを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0118】

前記テザーは、3個のレポーター基を持つレポーター構築物として描かれることが多いが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、かつプローブ構成要素を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する分子バーコードを含むことができるか、又はこのテザーは裸のポリマーであってよい(レポーターを有さない)。裸のポリマーである場合、このレポーターは、プローブそれ自身であるか、又はこのプローブに付着された第二テザー上であってよい。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、かつレポーターは、エクスパンドマー産物の集成後に親和性結合又は共有結合される。

#### 【0119】

先に考察されたように、図8は、クラスI、II、III、IV、及びVの5つのクラスに識別される本発明のオリゴマー性構築物の概要を提供する。これらのクラスは、エクスポーブ及びエクスマーの両方に適用する。各クラスを、以下に詳細に考察する。

#### 【0120】

(クラスIオリゴマー性構築物)

図10に目を移すと、クラスIオリゴマー性構築物がより詳細に説明されている。図10Aから10Cは、これらの分子を基質として及びSBXプロセスのヘテロ-コポリマー生成物として示すために適合された表記を利用する。これらの図は、左から右へと読み、最初にプローブ基質構築物(エクスパンドマーのオリゴマー性前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエクスパンドマー産物を示す。

#### 【0121】

図10Aに示されたように、クラスI基質構築物は、オリゴマー性プローブメンバー(-P<sup>1</sup>~P<sup>2</sup>-)(100)及びテザーメンバー-T(99)を有する。このテザーは、2つの末端連結(108,109)により、プローブ部分P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>へ付着される。これらの拘束は、テザーが、伸長又は拡張するのを防ぎ、その結果拘束された立体配置内にある。テンプレートに方向付けられた集成下で、基質は、標的テンプレートと二重鎖を形成し、その結果これらの基質が近接される。

#### 【0122】

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、前記基質構築物を使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、R<sup>1</sup>=5'-リン酸エステル及びR<sup>2</sup>=3'-OHは、ライゲーションプロトコールにおいて、並びにR<sup>1</sup>=5'-三リン酸エステル及びR<sup>2</sup>=3'-OHはポリメラーゼプロトコ

ールに関して使用が認められる。任意に $R^2$ は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成されることができる。 $R^1$ 及び $R^2$ は、一般型XRであり、ここでXは連結基であり及びRは官能基であることができる。

#### 【0123】

図10A及び10Bの波形符号(～)は、プローブメンバーのふたつの部分を分離している選択的に切断可能な結合を示す。このテザーの末端連結は、選択的に切断可能な結合により分離されるプローブメンバーのふたつの部分に付着されている。前記テザーは、第一のプローブ部分を第二のプローブ部分に連結し、選択的に切断可能な結合を橋かけしているループを形成する。プローブメンバーが無傷である(切断されない)場合、プローブメンバーは、テンプレート配列と高忠実度で結合することができ、このテザーは、「拘束された立体配置」でループとされる。この結合が切断される場合、テザーループは開くことができ、このテザーは「拡張された立体配置」にある。

#### 【0124】

基質構築物は、エキスパンドマーを作製するための中間体組成物である、娘鎖のテンプレート-依存型の集成のために使用される試薬である。図10Bは、反復サブユニット(括弧内に示される)を有するヘテロ-コポリマーである、二重鎖娘鎖を示す。娘鎖主要骨格( $-P^1 \sim P^2-$ )及び標的テンプレート鎖( $-P^1'P^2'-$ )は、二重鎖(95)として示されている。娘鎖の各サブユニットは、プローブメンバー及びテザーメンバーT(99)からなる反復モチーフであり、このテザーメンバーは拘束された立体配置にある。これらのモチーフは、上付き文字「」によりここで示される、種-特異的変動性を有する。この娘鎖内の各特定のサブユニットは、テンプレートに方向づけられたプロセスによりモチーフのライブラリーから選択され、かつそのプローブは、テンプレート鎖上の相補的ヌクレオチドの対応する配列に結合する。この方式において、前記プローブの核酸塩基残基の配列は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーを形成する。

#### 【0125】

この娘鎖は、更に「拘束された立体配置」においてテザーからなる「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体からなる。テザー(99)がそれらの「拡張された立体配置」に変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。

#### 【0126】

前記娘鎖は、「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格の、ふたつの骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されたプローブ基質からなる。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、プローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ の間の選択的に切断可能な連結を迂回し、連結された骨格部分により形成され、各骨格部分は、 $P^1$ からテザーから $P^2$ への線状の連結であり、ここで $P^2$ は次の骨格部分の $P^1$ に更に連結している。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけ又はループ形成し、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断され及び主要骨格が断片化される場合には、共有的に無傷であり続けることが認められる。

#### 【0127】

図10Cは、テンプレート鎖の解離後及び主要骨格の選択的に切断可能な結合の切断後の、クラスIエキスパンドマー産物の代表である。テンプレート鎖の解離の方法は、熱変性、又はヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。前記エキスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニットを有し、ここで は、娘鎖を作製している $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを示し、ここで  $i = 1, 2, 3 \sim m$ であり、 $m > 3$ 、及び一般に $m > 20$ 、及び好ましくは $m > 50$ 、及びより優先的には $m > 1000$ である。各サブユニットは、テザー(99)並びにプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ で形成される。ここで「拡張された立体配置」内であるテザーメンバーTは、隣接サブユニットと共有的に連結され続ける、切断されたプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ の間のその長さに伸展されて認められる。サブユニットモチーフ

の各サブユニットは、エクスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向付けられた集成により確立された種-特異的遺伝情報を含む。

【0128】

図10Dは、分子モデルとしての図10Aの基質構築物を示し、ここでこのプローブメンバー(100)は、4個の核酸塩基残基(101,102,103,104)により任意に表され、その中のふたつ(102,103)は、末端連結(108,109)によりテザー(99)に結合されている。テザーのこれらふたつの末端連結間は、プローブメンバー(100)内で「V」(110)として示される、選択的に切断可能な結合である。この結合は、図10Aにおいて言及されたプローブ部分P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>と結合している。ここで示されたテザーは、3つのレポーター(105,106,107)を有し、これはモチーフ種特異的であることもできる。

10

【0129】

図10Eは、該基質中の選択的に切断可能な結合の切断後の生成物エクスパンドマーを示す。切断は、拘束されたエクスパンドマーの拡張を生じ、かつこれは「E」(黒色矢印)により示される。選択的に切断可能な結合の残基(110a,110b)は、この切断事象に印を付けている。このサブユニットは、添付されている図10Cにおいて括弧により表されるような、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示される。

【0130】

前記エクスパンドマー産物(図10E)において、主要骨格はここで断片化され、プローブメンバーは切断され、各々P<sup>1</sup>(92)とP<sup>2</sup>(94)を分離しているため、共有的に無傷ではない。この切断プロセスにより、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となり始める。前記エクスパンドマーは、配列内に各鎖状体形成されたサブユニットを含む。プローブ部分P<sup>1</sup>、テザー、及びプローブ部分P<sup>2</sup>は、各サブユニット内で連結されている。以前には拘束された立体配置にあったエクスパンドマーのテザーメンバー(99)は、ここでは拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エクスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、レポーターのサイズ及び存在量の増加のためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

20

【0131】

図11は、クラスIエクスパンドマーの実施態様を作製するための方法の簡約された概略図を描いており；この方法は、図10D及び10Eに示された基質及び生成物の作製及び使用を図示している。本方法は、自由溶液中で実行されてよく、近接するエクスプローブを共有的に共役するために、リガーゼ(L)を使用することが説明されている。テンプレート内の二次構造を緩和する方法は、後続節において考察される。ハイブリダイゼーション及びライゲーションに適合された条件は、当該技術分野において周知であり、かつそのような条件は、本技術分野の業者により容易に最適化されることができる。

30

【0132】

リガーゼは、tRNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、サーマス・フィリフォルミスDNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Tth DNAリガーゼ、サーマス・スコトダクタスDNAリガーゼ、熱安定性リガーゼ、Ampligase熱安定性DNAリガーゼ、VanC型リガーゼ、9°N DNAリガーゼ、Tsp DNAリガーゼ、及び生物資源探査により発見された新規リガーゼを含む、NAD<sup>+</sup>-依存型リガーゼを含むが、これらに限定されるものではない。同じくリガーゼは、T4 RNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、Pfu DNAリガーゼ、DNAリガーゼI、DNAリガーゼII、DNAリガーゼIV、及び生物資源探査により発見された新規リガーゼを含む、ATP-依存型リガーゼも含むが、これらに限定されるものではない。これらのリガーゼは、野生型、変異体アイソフォーム、及び遺伝子操作された変種を含む。

40

【0133】

図11を参照し、合成のための調製において、標的核酸(110)が提供され、かつそれらの末端は、アダプターの平滑末端化されたライゲーションのための調製においてポリッシュされる。工程Iは、ヘアピンプライマー(120)の標的核酸へのライゲーションを示す。プライマーの自由5'末端は、除去可能なブロック基(119)によりブロックされる。これらのブ

50

ライマーは、標的核酸の両方の鎖をプライミングする。これらのアダプターは一般に過剰に添加される。プライマーの反応性末端(hot end)上のブロック基は、工程IIにおいて除去され、テンプレートのふたつの鎖は、変性により分離される。工程IIIにおいて、プライミングされた1本鎖化されたテンプレート(111)は、工程IVに示されたような、相補的プローブ基質(113)のハイブリダイゼーション及びプライマーの反応性末端でのライゲーションを可能にする条件下で、基質構築物ライブラリー(図示のために構築物(112)により表される)及びリガーゼLと接触される。一般に、ハイブリダイゼーション及びライゲーションは、非特異的副反応を減少するために、該基質の融解温度よりも高い温度で実行される。この例の各基質構築物は、3種のレポーターと共に整列されたテザーを含む。各プローブ基質は、ふたつのテザー付着部位の間に選択的に切断可能な結合(「V」と記される)を有する。工程Vにおいて、第二の基質構築物(114)が、テンプレートに方向づけられたハイブリダイゼーション及びライゲーションにより付加され、これが続く。工程VIにおいて、完全に伸長されたエクスパンドマー中間体(117)の形成が明らかにされている。この中間体は、テンプレート鎖から変性され、かつ示された切断部位で選択的に切断され、これにより配列決定に適した生成物エクスパンドマーを形成することができる。一部の実施態様において、変性は不要であり、かつテンプレート鎖は適所で消化されることができる。

#### 【0134】

図12は、クラスIエクスパンドマーの別の実施態様の製造に関する第二の方法の簡略された概略図である。合成のための調製において、標的核酸(120)が提供され、これらの末端は、アダプター(121,122)の平滑末端ライゲーションのための調製においてポリッシュされる。工程Iは、ダブル-ブロックされたヘアピンプライマー前駆体の標的核酸へのライゲーションを示している。これらの二重鎖ヘアピンプライマーの一端は、テンプレート鎖又はアダプターのライゲーション及び鎖状体形成を防止することが意図された除去可能なブロック基(125a,125b,125c, 125d)によりブロックされている。これらのアダプターは一般に、過剰に添加される。これらのブロック基は、工程IIにおいて除去され、テンプレートの2本の鎖は、変性により分離される。工程IIIにおいて、ヘアピンプライマーは、自己アニールし、引き続きの基質構築物のライゲーションのためのプライミング部位(126,127)を形成し、これは二方向に、すなわち3'から5'方向へ及び5'から3'方向へと進むことができる。工程IVにおいて、これらのプライミングされたテンプレートは、相補的プローブ基質のハイブリダイゼーション及びライゲーションを許容し得る条件下で、基質構築物ライブラリー(128)と接触される。相補的プローブ基質のハイブリダイゼーション及び新生娘鎖の末端でのライゲーションのプロセスにより、ライゲーションは徐々に増えるように進行し(すなわち明らかな前進性を伴い成長する末端を伸長する)。本例において、各基質構築物は、レポーター基と共に整列されたテザーループを含む。工程Vにおいて、完成されたエクスパンドマー中間体(129)の形成が描かれている。任意にこのテンプレート鎖は、ヌクレアーゼ消化により除去され、エクスパンドマーを遊離することができる。この中間体は、示された切断部位で選択的に切断され、これにより配列決定に適した生成物エクスパンドマーを形成することができる。前記生成物エクスパンドマーは、自由溶液中で形成される。

#### 【0135】

図13において、固定されたテンプレート鎖に頼る方法が示されている。ここでテンプレート鎖は、アダプター(131)によりビーズ(又は他の固相支持体)に係留されている。このテンプレートは、基質構築物(132)と接触状態で示されており、工程Iにおいて、これらの条件はハイブリダイゼーションが生じるように適合される。ハイブリダイズされた近接している基質構築物の「島」が形成されることを認めることができる。工程IIにおいて、リガーゼLの添加は、近接している基質構築物のライゲーションを生じ、これによりギャップにより分離されたライゲーションされた中間体の複数の連続配列を形成する。工程IIIにおいて、条件は、低分子量又はミスマッチでハイブリダイズされた物質の解離に好ましいように調節され、並びに工程IVにおいて、より長い伸長生成物の形成に好ましいように、工程IIからIIIの反応が1回以上反復される。この無プライマープロセスは、本明細書に

において「乱交雑ライゲーション」と称される。ライゲーションは、二方向に伸長することができ、かつ切れ目の入った連結部はリガーゼにより封止されることができ、これによりギャップが充填される。工程Vにおいて、所望の生成物の長さを最適化した後、固定された二重鎖は洗浄され、未反応の基質及びリガーゼが除去される。その後工程VIにおいて、娘鎖(ここでは1本鎖エクスパンドマー中間体として示される)(138,139)が、テンプレートから解離される。この中間体の選択的に切断可能な結合の選択的切断は、エクスパンドマー産物の形成を生じる(示さず)。この実施態様において、固定されたテンプレートは再利用されることができる。一旦エクスパンドマー産物が配列決定されたならば、コンティグが、共通配列を構築するためにデータの重複及び並置に関する周知のアルゴリズムにより集成されることができる。

10

#### 【0136】

図14に関して、固定されたプライマーを使用する方法が示されている。工程Iにおいて、末端-適合されたテンプレート(142)(又は固定されたプライマーの性質に応じたランダムテンプレート配列)が、固定されたプライマー(140)へアニールされる。工程IIにおいて、固定されたテンプレート(143)は、そのメンバーは(144)として示される基質構築物ライブラリーと接触され、条件はテンプレートに方向づけられたハイブリダイゼーションのために調節される。この例において、プローブメンバーの基質構築物3'OH末端(R基)は、更なる伸長を可逆的にブロックするように置換されている(146)。工程IIIにおいて、隣接基質構築物及びプライマーの近接する末端、又は成長している新生娘鎖の自由端はライゲーションされ、並びに新生娘鎖の3'OH末端は、ブロックしているR基(146)の除去により活性化される。工程IV及びVにおいて示されるように、この段階的循環式付加のプロセスは、複数回反復されることができる。典型的には、未反応の基質を除去するために、各伸長工程の間で、洗浄工程が使用される。

20

#### 【0137】

従って本プロセスは、「循環式単塩基伸長」と称されるものに類似しているが、より適切にはここで「循環式単プローブ伸長」と称される。リガーゼLが示されているが、このプロセスは、リガーゼ、ポリメラーゼ、又はテンプレートに方向づけられた合成におけるオリゴマーの結合に適している任意の化学共役プロトコールにより実行されることができる。この化学共役は、ハイブリダイズされたプローブの近接している末端で自発的に発生することができるか、又は縮合剤を工程IIIの開始時に添加することができ、各々本サイクルの工程Vを確実にする。末端をブロックするR基は、テンプレート上又は溶液中において自由に進む(free run-on)重合が生じないように構成される。工程VIは、完全なエクスパンドマー中間体(149)の形成を示し；最早基質は付加されることはできない。この中間体は、テンプレートから解離され、その後先に説明されたように骨格を開くために1本鎖化された生成物が切断される。

30

#### 【0138】

本方法は、例えば固定されたプライマーの非ランダム選択により、核酸混合物中の特定の標的の選択的配列決定のために、及び配列決定するアレイ上の解析された配列決定法のために、適用することができる。あるいは、普遍的プライマー又はランダムプライマーが、示されたように使用される。

40

#### 【0139】

図15は、固定されたテンプレート(150)上の乱交雑ハイブリダイゼーションの方法(工程I)を説明し、ここでライブラリーの基質構築物(152)は、近接しているプローブと共に、白三角として描かれている選択的に反応性である化学官能基(156)により修飾される。基質構築物の化学官能基の詳細は、破線円により示された拡大部分(図15a)内に示されている。ある密度のハイブリダイゼーション時に、共役は工程IIに示されたように開始され、この共役反応の、黒三角として描かれている架橋された生成物(157)により連結された、高分子量エクスパンドマー中間体を生じる。架橋されたプローブの詳細は、工程IIの生成物における、破線円内に示された拡大部分(図15b)内に示されている。このプロセスには、選択的解離並びに低分子量生成物及び可能性のあるミスマッチ生成物の除去の工程が続

50

くことができる。乱交雑化学共役の本方法に関する共役化学は、一部の業者に公知であり、例えばBurginらの米国特許第6,951,720号に開示された技術を含む。

#### 【0140】

別の実施態様において、生成物エクスパンドマーを集成するポリメラーゼ-ベースの方法が明らかにされている。一般に基質三リン酸エステル(エクスマー)は、ポリメラーゼが関与する反応に適した基質である。好適なポリメラーゼの選択は、実験プロトコルを最適化するプロセスの一部である。例証のためであり、限定を意図するものではない、図16に示されたように、テンプレート(160)及びプライマー(161)を含有する反応混合物は、テンプレートに方向づけられた重合のために最適化された条件下で、基質構築物(162)のライブラリー及びポリメラーゼ(P)と接触される。工程Iにおいて、ポリメラーゼは、ジヌクレオチドエクスマー(2個のレポーターを伴うテザー)をテンプレート鎖に徐々に付加し始める。このプロセスは、工程II及びIIIにおいても続く。付加された各プローブサブユニットは、テンプレートの連続した相補的コピーを形成するために、テンプレートの次の隣接オリゴマーへ特異的に結合することにより選択された特定の種である。理論に結びつけられるものではないが、このポリメラーゼは、新生鎖に付加されたプローブ種の到来(incoming)が、テンプレートの次の利用可能な連続セグメントに特異的に相補的であることを確実にすることを補助すると考えられる。Loeb及びPatelは、増大した活性及び改善された忠実度を伴う変異体DNAポリメラーゼを開示している(米国特許第6,329,178号)。例えばWilliamsは、米国特許出願第2007/0048748号において、ポリメラーゼは、増大した取り込み速度及びエラー率の低下のために修飾されることができ、エラー率は、ハイブリダイゼーション精度ではなく、むしろポリメラーゼ処理能に明らかに連鎖していることを示している。工程IIIは、完成されたエクスパンドマー中間体(168)を生じる。1本鎖化されたエクスパンドマー中間体は次に、テンプレート鎖の変性に関与することができるプロセスにより処理される(図示せず)。娘鎖の主要骨格は、選択的に切断され、テザーを拡張し、これにより先に説明されたように、配列決定プロトコルにおける使用に適したエクスパンドマー産物を形成する。

#### 【0141】

図17に示されたように、エクスパンドマーのポリメラーゼが駆動したテンプレートに方向づけられた合成は、別の技術により実現することができる。ここで工程Iにおいては、固定されたプライマー(170)に、処理されたテンプレート鎖(171)がアニールされる。工程IIにおいて、ポリメラーゼPは、反応混合物中のそのような構築物のライブラリー(174により描かれる)からの特異的に相補的な基質構築物(175)と漸進性に共役する。条件及び試薬溶液は、プロセッシブポリメラーゼ活性に好ましいように調節される。ここに示されるように、工程IIのハイブリダイゼーション及び工程IIIの重合は、個別の活性であるが、このポリメラーゼのこれらの活性はその方式で分離される必要はない。工程IVにおいて、相補的基質構築物の徐々に増えるプロセッシブ付加は、循環的に継続し(断続されることなく連続して)、工程IVから生じる描かれたような完全に負荷されたエクスパンドマー中間体(177)を生じる。このエクスパンドマー中間体は、先に説明されたように、配列決定プロトコルにおけるその使用のための調製において、解離され、かつ拡張されることができる。本方法は、好適な固定されたプライマーの選択により、それ自身解析された配列決定方法にも役立つことに注意されたい。更に、二次構造を緩和するためにテンプレートを伸展する方法は、この方法に容易に適合され、かつ後続節において考察されている。

#### 【0142】

ポリメラーゼは、DNA-依存型DNAポリメラーゼ、DNA-依存型RNAポリメラーゼ、RNA-依存型DNAポリメラーゼ、RNA-依存型RNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、T3 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、クレノウ断片、サーモフィラス・アクアティカスDNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、VentR(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)、Deep VentR(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)、Bst DNAポリメラーゼラージ断片、Stoeffel断片、9°N DNAポリメラーゼ、9°N DNAポリメラーゼ、Pfu DN

Aポリメラーゼ、Tfi DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、RepliPhi Phi29ポリメラーゼ、Tli DNAポリメラーゼ、真核生物DNAポリメラーゼ、テロメラーゼ、Therminator(商標)ポリメラーゼ(New England Biolabs社)、KOD HiFi(商標)DNAポリメラーゼ(Novagen社)、KOD1 DNAポリメラーゼ、Q- レプリカーゼ、末端転移酵素、AMV逆転写酵素、M-MLV逆転写酵素、Phi6逆転写酵素、HIV-1逆転写酵素、生物資源探査により発見された新規ポリメラーゼ、並びにUS 2007/0048748、US 6,329,178、US 6,602,695、及びUS 6,395,524(引用により組込まれている)に列記されたポリメラーゼを含むが、これらに限定されるものではない。これらのポリメラーゼは、野生型、変異体アイソフォーム、及び遺伝子操作された変種を含む。

#### 【0143】

10

(クラスII及びIIIオリゴマー性構築物)

図18Aから18Eを参照し、(異性体クラスIIIオリゴマー性構築物と共に)、エクスプローブ又はエクスマーのいずれかであることができる、クラスIIオリゴマー性構築物がより詳細に説明される。

図18Aから18Cは、左から右へと読み、最初にプローブ基質構築物(エクスパンドマーのオリゴマー性前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエクスパンドマー産物を示す。

#### 【0144】

図18Aに示されたように、クラスII基質構築物は、オリゴマー性プローブメンバー(-P<sup>1</sup>-P<sup>2</sup>-)(180)及びテザーメンバー-T(181)を有する。このテザーは、第一の末端部分の1つの末端連結(184)により、プローブ部分P<sup>2</sup>へ付着される。テザーの遠位端(186)で、第二末端部分は、リンカー基を有し、かつR<sup>2</sup>の近位に配置される。この第二末端部分は、これをこの位置に拘束するための、切断可能なテザー内架橋(187)も有する。切断可能な架橋(187)は、点線により示され、これは例えばジスルフィド結合を示すことができる。これらの拘束は、テザーが、伸長又は拡張するのを防ぎ、その結果拘束された立体配置内にある。第二リンカー基は、R<sup>1</sup>の近くのプローブメンバーの遠位端(189)の近くに配置される。テンプレートに方向付けられた集成下で、基質は、標的テンプレートとの二重鎖を形成し、その結果これらの基質は近接される。制御された条件下で、近接している基質のリンカー基及びは連結し、これらの隣接基質構築物の間に結合を形成する(図18B及び18Cに示される)。これらの連結基は、隣接する近接された基質構築物へのこれらの連結反応を制限するように、基質構築物上に配置される。この基質構築物は、それら自身とは優先的に連結しない。、及びに関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、全般的オリゴマー性構築物の説明において詳述される。

20

30

#### 【0145】

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、R<sup>1</sup>=5'-リン酸エステル及びR<sup>2</sup>=3'-OHは、ライゲーションプロトコールにおいて、並びにR<sup>1</sup>=5'-三リン酸エステル及びR<sup>2</sup>=3'-OHはポリメラーゼプロトコールに関して使用が認められる。任意にR<sup>2</sup>は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成されることができる。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、一般型XRであることができ、ここでXは連結基であり及びRは官能基である。

40

#### 【0146】

基質構築物は、エクスパンドマーを作製するための中間体組成物である、娘鎖のテンプレート-依存型の集成のために使用される試薬である。図18Bは、反復サブユニット(括弧内に示される)のヘテロ-コポリマーである、二重鎖娘鎖を示す。娘鎖主要骨格(~P<sup>1</sup>-P<sup>2</sup>~)及び標的テンプレート鎖(-P<sup>1</sup>'P<sup>2</sup>'-)は、二重鎖(185)として示されている。娘鎖の各サブユニットは、プローブメンバー及びテザーメンバーを含む反復モチーフである。これらのモチーフは、上付き文字「」によりここで示される、種-特異的変動性を有する。この娘鎖内の各特定のサブユニットは、テンプレートに方向づけられたプロセスによりモチー

50



フのライブラリーから選択され、かつそのプローブは、テンプレート鎖上の相補的ヌクレオチドの対応する配列に結合する。この方式において、前記プローブの核酸塩基残基の配列は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーを形成する。

#### 【0147】

各波形符号(～)は、選択的に切断可能な結合を示す。プローブメンバーの部分 $P^1$ 及び $P^2$ の間の内部結合は、選択的に切断可能な結合ではないが、プローブ間結合(サブユニット間)は、テザー及びエキスパンドマーの拡張に必要とされるので、必ず選択的に切断可能である。一実施態様において、個別のサブユニットのプローブ間に、直接結合は形成されず、これにより後続の選択的切断の必要性が排除される。

#### 【0148】

前記娘鎖は、更に「拘束された立体配置」においてテザーからなる「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体からなる。テザーがそれらの「拡張された立体配置」に変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、隣接サブユニットのプローブメンバーへの橋かけにより形成された連結により、及び依然存在するならばテザー内連結により拘束される。この連結は、第一のサブユニットのテザーメンバーを、隣接第二サブユニットの近接している末端に付着し、並べて置かれた(collocated)第一のサブユニットのリンカー基及び第二サブユニットのリンカー基の連結により形成される。

#### 【0149】

前記娘鎖は、「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格の、ふたつの骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されたプローブ基質からなる。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、サブユニット基質間の選択的に切断可能な連結を迂回し、結合で連結された骨格部分により形成され、各骨格部分は、テザーから $P^2$ から $P^1$ への線状の連結であり、各結合は、 $P^1$ を次の骨格部分のテザーへ連結している。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけ又はループ形成し、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断され及び主要骨格が断片化される場合には、共有的に無傷であり続けることが認められる。

#### 【0150】

図18Bにおいて、リンカー基及びは架橋され、かつここでサブユニット間結合を形成する。結合が形成された後、テザー内結合は破壊され得るが、これはここで無傷のまま示されている(基質内の点線)。一般に結合の形成は、第一のサブユニット上のリンカー基の近さ及び第二の近接するサブユニットのリンカー基の位置で左右されるので、これらは並べて置かれ、基質構築物のテンプレートに方向付けられた集成の期間又はその後接触される。

#### 【0151】

更なる実施態様において、この架橋は、ふたつのリンカー基を一緒にするための、テンプレートへのハイブリダイゼーションのみに左右される。更に別の実施態様において、結合連結は、隣接プローブ間のホスホジエステル結合の形成を伴う、主要骨格に沿ったプローブメンバーPの酵素的共役により進められる。ここに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成され、かつ基質間結合は、これらが選択的に切断可能であることを示すように、波形符号(～)により描かれる。標的テンプレート鎖の解離又は分解、選択的に切断可能な結合(これはテザー内結合を含む)の切断の後に、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となり始める。

#### 【0152】

図18Cは、テンプレート鎖の解離後及び選択的に切断可能な結合(主要骨格内の結合及び既に切断されていない場合のテザー内連結を含む)切断後の、クラスIIエキスパンドマー産物の代表である。テンプレート鎖の解離の方法は、熱変性、又はヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。前記エキスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニットを有し、ここで、娘鎖を作製しているm個のサブユニットの鎖内の番目のサブユニットを示し、ここで $i=1, 2, 3 \sim m$ であり、 $m>3$ 、及び一般に $m>20$ 、及び好ましくは $m>$

10

20

30

40

50

50、及びより優先的には $m > 1000$ である。各サブユニットは、テザー、並びにプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ で形成される。テザーT(181)は、その拡張された立体配置において認められ、かつ $P^2$ と隣接サブユニットの $P^1$ の間のその長さに伸展される。サブユニットモチーフの各サブユニットは、エキスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向付けられた集成により確立された種-特異的遺伝情報を含む。

【0153】

図18Dは、分子モデルとしての図18Aの基質構築物を示し、ここでこのプローブメンバー(180)は、4個の核酸塩基残基(81,82,83,84)により表され、これらはテザー(184)の第一末端部分の連結によりテザー(181)に結合されている。第二末端部分のテザー内結合(85)は、テザーの遠位端にある。リンカー基( ) (86)も、この第二末端部分に配置され、対応する第二リンカー基( ) (87)は該リンカー基( )の反対側のプローブの末端に係留されている。ここで示されたテザーループは、3つのレポーター(78,79,80)を有し、これはモチーフ種特異的であることもできる。

【0154】

図18Eは、生成物エキスパンドマーへの取り込み後の基質構築物を示す。これらのサブユニットは切断及び拡張され、並びに図18Aに見られるようなリンカー基及びの連結により形成される結合(88)により連結される。このサブユニットは、添付されている図18Cにおいて括弧により表されるような、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示される。「E」は再度、拡張を示す。

【0155】

エキスパンドマー産物(図18E)において、隣接サブユニットのプローブ間の直接結合は切断されているので、主要骨格は断片化され、共有的に連続していない。この切断プロセスにより、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となる。以前には拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、ここでは拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エキスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、レポーターのサイズ及び存在量の増加のためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

【0156】

このテザーは、3つのレポーター基を伴うレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、プローブ構成要素を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する分子バーコードを含むことができるか、又はテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体がテザー上に整列され、レポーターは、エキスパンドマー産物の集成後に、親和性結合又は共有結合される。

【0157】

図19Aから19Eに図示されたクラスIIIオリゴマー性構築物は、先に考察されたクラスII構築物の異性体である。クラスIIの説明は、このクラスの理解に十分であるので、更なる説明は含まれない。

このクラスは、全てのクラスが、鏡像の適用(すなわち、 $R^1$ 基と $R^2$ 基の交換)を反映することができることを強調するために役立てることができる。更にこれは、説明されたクラスは完全ではないが、本発明が包含している多くの可能性のある配置のいくつかを反映していることを意図することを例示するために役立つ。

【0158】

図20は、クラスIIエキスパンドマーの第一の実施態様を作製する方法の簡約された概略図を描いており；この方法は、図18D及び18Eに示された基質及び生成物の作製及び使用を図示している。本方法は、固相化学により実行される。テンプレートの二次構造を緩和する方法は、後続節において考察される。ハイブリダイゼーション及び化学共役に適合された好適な条件は、当該技術分野において周知であり、かつこれらの条件は、本技術分野の業者により容易に最適化されることができる。

## 【0159】

図20の工程Iは、固定されたテンプレート(200)及び基質試薬(201)のライブラリーを含む反応混合物を示している。これらの基質構築物は、テンプレートに方向づけられたハイブリダイゼーションにおいてテンプレートに特異的に結合することが認められる。この結合の相補性及び忠実度を最適化するように、条件は調節される。挿入図(図20a参照)に示されたように、各近接している基質構築物は、テザーの遠位面上の官能基(202)を近位にし、ここでは隣接三角形により表示されるテザー内架橋(203)及び近接しているプローブメンバーの官能基(204)によりテザーシステムに結合されたように示されている。

## 【0160】

工程IIにおいて、架橋反応は、ふたつの官能基及びに關与するプローブメンバーのハイブリダイズされた近くに近接された末端の間で生じ、これにより挿入図(図20b参照)に示されたように、白楕円形で描かれたサブユニット間テザー-対-プローブ結合(205)が形成される。ハイブリダイゼーションは、乱交雑にテンプレート上の様々な位置で平行して生じ、並びに化学共役は、ハイブリダイゼーション(工程III)、ストリンジェント融解及び/又は洗浄(工程IV)、及び化学共役(工程V)のサイクルで生じることができる。このサイクルは、エキスパンドマー中間体を形成するために集成された連続サブユニットの数を増大するように、反復されることができる。工程VIは、長さの異なる2本の連続生成物鎖を伴う完成されたエキスパンドマー中間体を図示している。同様の方法を、クラスIIIエキスパンドマーで利用することができる。

## 【0161】

図21は、固定されたテンプレート上のクラスII基質のプロセッシブライゲーション方法を図示している。工程Iは、テンプレート(212)にアニールしているプライマー(210)を示しており、このプライマーは、挿入図(図21a参照)で(214)として示された化学反応性の官能基に適合されている。次にクラスII基質(216)を含む反応混合物が、工程IIで添加される。挿入図(図21a)に示されたように、これらの基質構築物は、プローブ-テザーメンバーの反対末端上に(217)及び(214)反応性を有する。第一の基質構築物は、テンプレートに方向づけられたハイブリダイゼーションにおいて、テンプレートに特異的に結合することが認められる。条件は、該結合の相補性及び忠実度を最適化するように調節される。次にリガーゼを使用し、第一のプローブをプライマーへ共有結合する(工程II)。

## 【0162】

工程III及びIVにおいて、基質構築物のプロセッシブハイブリダイゼーション及びライゲーションのプロセスは、工程IVにおいて形成された示されたエキスパンドマー中間体を構築するために、継続される。これに続き、工程Vにおいて、基(217)及び基(214)の間で架橋が行われ(図21b参照)、図21cに(219)として描かれた結合が生じる。挿入図(図21b及び21c)に示されたように、テザー上の官能基(217)は、結合が形成されるまで、隣接三角形により表されたテザー内架橋(211)により拘束される。完成されたエキスパンドマー中間体は、テンプレート鎖から任意に解離され、切断され、配列決定に適したエキスパンドマー産物を形成する。同様の方法を、クラスIIIエキスパンドマーで利用することができる。この方法は、三リン酸基質構築物を置換することによりポリメラーゼとの使用に適合することもできる。

## 【0163】

(クラスIV及びVオリゴマー性構築物)

図22Aから22Eを参照し、クラスIVオリゴマー性構築物をより詳細に説明する。

図22Aから22Cは、左から右へと読み、最初にプローブ基質構築物(エキスパンドマーのエクスポーブ又はエクスマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエキスパンドマー産物を示す。

## 【0164】

図22Aは、テザーT(220)に付着されたプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ を伴う、オリゴマー性プローブメンバー(229)を有するクラスIV基質構築物を示す。テザーTは、好適な連結により、各々テザーの第一及び第二末端部分で、 $P^1$ 及び $P^2$ に付着される。第一末端部分のリンカー

基及び第二末端部分の は、各々、プローブの $R^1$ 及び $R^2$ 末端の近くに配置される(別の実施態様において、これらの官能基の位置は逆であることができる)。制御された条件下で、官能基 (222)及び (221)は反応し、図22Bに示されたように連結 を形成する。これらの連結基は、隣接する近接された基質構築物へのこれらの連結反応を制限するように、基質構築物上に配置される。この基質構築物は、それら自身とは優先的に連結しない。

、及び に関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、全般的オリゴマー性構築物の説明において詳述される。

#### 【0165】

$R^1$ 及び $R^2$ は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、 $R^1 = 5'$ -リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、ライゲーションプロトコールにおいて、並びに $R^1 = 5'$ -三リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHはポリマーゼプロトコールに関して使用が認められる。任意に $R^2$ は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成されることができる。 $R^1$ 及び $R^2$ は、一般型XRであることができ、ここでXは連結基であり及びRは官能基である。

#### 【0166】

基質構築物は、エクスパンドマーを作製するための中間体組成物である、娘鎖のテンプレートに方向づけられた集成のために使用される試薬である。図22Bは、反復サブユニット(括弧内に示される)のヘテロ-コポリマーである、二重鎖娘鎖を示す。娘鎖主要骨格( $-P^1 \sim P^2-$ )及び標的テンプレート鎖( $-P^1'P^2'-$ )は、二重鎖(228)として示されている。娘鎖の各サブユニットは、プローブメンバー及びテザーメンバーを含む反復モチーフである。これらのモチーフは、上付き文字「」によりここで示される、種-特異的変動性を有する。この娘鎖内の各特定のサブユニットは、テンプレートに方向づけられたプロセスによりモチーフのライブラリーから選択され、かつそのプローブは、テンプレート鎖上の相補的ヌクレオチドの対応する配列に結合する。この方式において、前記プローブの核酸塩基残基の配列は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーを形成する。

#### 【0167】

波形符号( $\sim$ )は、選択的に切断可能な結合を示す。プローブメンバーの部分 $P^1$ 及び $P^2$ の間の内部結合は、テザー及びエクスパンドマーの拡張に必要とされるので、必ず選択的に切断可能である。一実施態様において、個別のサブユニットのプローブ間に、直接結合は形成されない。

#### 【0168】

前記娘鎖は、更に「拘束された立体配置」においてテザーからなる「拘束されたエクスパンドマー」と称されるエクスパンドマー前駆体からなる。図22Cに示されたように、テザーがそれらの「拡張された立体配置」に変わる場合、この拘束されたエクスパンドマーは、エクスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、隣接サブユニットのテザーメンバーへの橋かけにより形成された 連結により、及びプローブ連結により拘束される。この 連結は、第一のサブユニットのテザーメンバーを、隣接第二サブユニットのテザーに付着し、並べて置かれた第一のサブユニットのリンカー基、及び第二サブユニットのリンカー基 の連結により形成される。

#### 【0169】

前記娘鎖は、「主要骨格」及び「拘束されたエクスパンドマー」の骨格の、ふたつの骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されたプローブ基質からなる。「拘束されたエクスパンドマー骨格」は、サブユニットプローブ基質を迂回している 連結により、一緒に連結された各サブユニットのテザーの線状の連結である。この 連結は、第一サブユニットの官能基 の、近接された第二サブユニットの官能基との反応から生じる。拘束されたエクスパンドマー骨格は、主要骨格の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけ又はループ形成し、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断され及び主要骨格が断片化される場合には、共有的に無傷であり続けることが認められる。

10

20

30

40

50

## 【0170】

図22Bにおいて、リンカー基及びは架橋され、かつここでサブユニット間結合を形成する。一般に、結合の形成は、第一のサブユニット上のリンカー基、及び第二の近接するサブユニットのリンカー基の並び置かれに左右されるので、これらは、基質構築物のテンプレートに方向付けられた集成の期間又はその後に接触される。

## 【0171】

更なる実施態様において、結合架橋は、ふたつのリンカー基を一緒にするための、テンプレートへのハイブリダイゼーションのみに左右される。更に別の実施態様において、結合の形成は、隣接プローブ間のホスホジエステル結合による、主要骨格に沿ったプローブメンバーPの酵素的共役により進められる。図22Bに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成され、かつプローブ部分間結合は、これが選択的に切断可能であることを示すように、波形符号(~)により描かれる。標的テンプレート鎖の解離又は分解、選択的に切断可能な結合の切断の後に、拘束されたエクスパンドマーは解放され、図22Cに示されたようにエクスパンドマー産物となる。

10

## 【0172】

これに関して、図22Cは、テンプレート鎖の解離後及び主要骨格の選択的に切断可能な結合の切断後の、クラスIVエクスパンドマー産物の代表である。テンプレート鎖の解離の方法は、熱変性、又はヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。前記エクスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニットを有し、ここで、娘鎖を作製しているm個のサブユニットの鎖内の番目のサブユニットを示し、ここで $m > 3$ 、及び一般に $m > 20$ 、及び好ましくは $m > 50$ 、及びより優先的には $m > 1000$ である。各サブユニットは、テザー(220)、並びにペンダントプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ で形成される。テザーTは、その拡張された立体配置において認められ、かつ隣接サブユニット間のその長さに伸展される。サブユニットモチーフの各サブユニットは、エクスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向付けられた集成により確立された種-特異的遺伝情報を含む。

20

## 【0173】

図22Dは、分子モデルとしての図22Aの基質構築物を示し、ここでこのプローブメンバーは、4個の核酸塩基残基(白丸)により表され、これらはテザーの第一末端部分の連結によりテザーに結合されている。図22Aにおいてとして示されたリンカー基(221)も、テザーの第一末端部分である。図22Aにおいてとして示されたリンカー基(222)は、テザー(220)の遠位端の第二末端部分上に配置される。ここで示されたテザーループは、3つのレポーター(800,801,802)を有し、これはモチーフ種特異的であることもできる。「V」(225)として示された選択的に切断可能な結合は、プローブメンバー(229)内に位置される。

30

## 【0174】

図22Eは、生成物エクスパンドマーへの取り込み後の基質構築物を示す。これらのサブユニットは線分により示されたように(225a,225b)切断され、かつ拡張され、並びに図22Aに見られるようなリンカー基及びの連結により形成される結合(223,224)により連結される。サブユニットは、添付されている図22Cにおいて括弧により表されるような、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示される。

40

## 【0175】

図22Eのエクスパンドマー産物において、隣接サブユニットのプローブ間の直接結合は切断されているので、主要骨格は断片化され、共有的に連続していない。この切断プロセスにより、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となる。以前には拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、ここでは拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エクスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、レポーターのサイズ及び存在量の増加のためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

## 【0176】

このテザーは、3つのレポーター基を伴うレポーター構築物として描かれているが、様

50

々なレポーター立体配置は、テザー上に整列されることができ、プローブ構成要素を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する分子バーコードを含むことができるか、又はテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体がテザー上に整列され、レポーターは、エキスパンドマー産物の集成後に、親和性結合又は共有結合される。

#### 【0177】

クラスV基質構築物は、クラスIV構築物に類似しており、主な差異は、切断可能なリンカーの位置である。図23Aから23Cは、左から右へと読み、最初にプローブ基質構築物(エキスパンドマーのエキスポーブ又はエクスマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエキスパンドマー産物を示す。

10

#### 【0178】

図23Aは、ふたつの選択的に切断可能な末端連結(234,238)(ふたつの垂直な「~」として描かれる)で付着されたテザーT(239)の第一及び第二末端部分を有する、クラスV基質構築物を図示している。次にこれらの切断可能な連結は、オリゴマー性プローブメンバー(235)の第一及び第二のプローブ部分 $P^1$ 及び $P^2$ に付着される。該第一及び第二末端部分のリンカー基(230)及び(231)は、プローブの $R^1$ 及び $R^2$ 末端の近くに配置される(同じくこれらの官能基の位置は逆であることができる)。制御された条件下で、官能基及びは反応し、連結を形成する。これらの連結基は、隣接する近接された基質構築物へのこれらの連結反応を制限するように、基質構築物上に配置される。この基質構築物は、それら自身とは優先的に連結しない。、及びに関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、全般的オリゴマー性構築物の説明において詳述される。

20

#### 【0179】

$R^1$ 及び $R^2$ は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、 $R^1 = 5'$ -リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、エキスポーブにおいて認められるようなライゲーションプロトコールにおいて、並びに $R^1 = 5'$ -三リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHはエクスマーにおいて認められるようなポリメラーゼプロトコールに関して使用が認められる。任意に $R^2$ は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成されることができる。 $R^1$ 及び $R^2$ は、一般型XRであることができ、ここでXは連結基であり及びRは官能基である。

30

#### 【0180】

基質構築物は、エキスパンドマーを作製するための中間体組成物である、娘鎖のテンプレートに方向づけられた集成のために使用される試薬である。図23Bは、反復サブユニット(括弧内に示される)のヘテロ-コポリマーである、二重鎖娘鎖を示す。娘鎖主要骨格(- $P^1$ - $P^2$ -)及び標的テンプレート鎖(- $P^1$ ' $P^2$ '-)は、二重鎖(236)として示されている。娘鎖の各サブユニットは、プローブメンバー及びテザーメンバーを含む反復モチーフである。これらのモチーフは、上付き文字「」によりここで示される、種-特異的変動性を有する。この娘鎖内の各特定のサブユニットは、テンプレートに方向づけられたプロセスによりモチーフのライブラリーから選択され、かつそのプローブは、テンプレート鎖上の相補的ヌクレオチドの対応する配列に結合する。この方式において、前記プローブの核酸塩基残基の配列は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーを形成する。

40

#### 【0181】

波形符号(~)は、選択的に切断可能な結合を示す。これらの結合は、プローブメンバーの部分 $P^1$ 及び $P^2$ をテザーと接続し、テザー及びエキスパンドマーの拡張に必要とされるので、必ず選択的に切断可能である。一実施態様において、個別のサブユニットのプローブ間に、直接結合は形成されない。

#### 【0182】

前記娘鎖は、更に「拘束された立体配置」においてテザーからなる「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体からなる。図23Cに示されたように、テ

50

ザーがそれらの「拡張された立体配置」に変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、隣接サブユニットのテザーメンバーへの橋かけにより形成された 連結により、及び選択的に切断可能な連結(234,238)により拘束される。この 連結は、第一のサブユニットのテザーメンバーを、隣接第二サブユニットのテザーに付着し、並べて置かれた第一のサブユニットのリンカー基 及び第二サブユニットのリンカー基 の連結により形成される。

#### 【0183】

前記娘鎖は、「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格の、ふたつの骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されたプローブ基質からなる。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、サブユニットプローブ基質を迂回している 連結により、一緒に連結された各サブユニットのテザーの線状の連結である。この 連結は、第一サブユニットの官能基 の、近接された第二サブユニットの官能基との反応から生じる。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格に接続している選択的に切断可能な結合を超えて橋かけ又はループ形成し、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断され及び主要骨格が解離又はそうではなく断片化される場合には、共有的に無傷であり続けることが認められる。

#### 【0184】

図23Bにおいて、リンカー基 及び は架橋され、かつここでサブユニット間結合 を形成する。一般に、 結合の形成は、第一のサブユニット上のリンカー基 、及び第二の近接するサブユニットのリンカー基 の並び置かれに左右されるので、これらは、基質構築物のテンプレートに方向付けられた集成の期間又はその後に接触される。

#### 【0185】

一部のプロトコールにおいて、前記架橋反応は、ふたつの反応基を一緒にするための、テンプレートへのハイブリダイゼーションのみに左右される。別のプロトコールにおいて、前記連結は、隣接プローブ間のホスホジエステル結合の形成による、プローブメンバーの酵素的共役により進行される。図23Bに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成されている。このテザーは、ここで 結合により隣接サブユニットへ結合され、かつ拘束されたエキスパンドマー骨格を含む。選択的に切断可能な結合(～)の切断時に、拘束されたエキスパンドマーは、主要骨格から分離され、エキスパンドマー産物となり、並びにここでその拘束されないテザーは、図23Cに示されたように、それらの完全長まで線状に拡張される。

#### 【0186】

これに関して、図23Cは、主要骨格を解離する選択的に切断可能な結合の切断後の、クラスVエキスパンドマー産物の代表である。このエキスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニット を有し、ここで は、娘鎖を作製しているm個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを示し、ここで $m > 3$ 、及び一般に $m > 20$ 、及び好ましくは $m > 50$ 、及びより優先的には $m > 1000$ である。各サブユニットは、その拡張された立体配置で認められるテザーT(239)により形成され、かつ隣接サブユニット間のその長さに伸展される。サブユニットモチーフ の各サブユニットは、エキスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向付けられた集成により確立された種-特異的遺伝情報を含む。

#### 【0187】

図23Dは、分子モデルとしての図23Aの基質構築物を示し、ここでこのプローブメンバー(235)は、4個の核酸塩基残基(白丸)により表され、これらはテザーの第一及び第二末端部分へふたつの切断可能な連結(234,238)により結合されている。図23Aにおいて として示されたリンカー基(232)も、テザーの第一末端部分にあり、及び図23Aにおいて として示されたリンカー基(233)は、テザー第二末端部分のものである。ここで示されたテザーループは、3つのレポーター(237a,237b,237c)を有し、これはモチーフ種特異的であることもできる。

#### 【0188】

図23Eは、生成物エキスパンドマーへの取り込み後の基質構築物を示す。これらのサブ

10

20

30

40

50

ユニットは切断され(234a, 234b, 238a, 238b)、拡張され、かつ図23Aに見られるようなリンカー基及びの連結により形成される結合(249, 248)により連結される。サブユニットは、添付されている図23Cにおいて括弧により表されるような、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示される。

【0189】

図23Eのエキスパンドマー産物において、主要骨格(235)は切断(解離)されている。この切断プロセスにより、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となる。以前には拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、ここでは拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エキスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、レポーターのサイズ及び存在量の増加のためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

【0190】

このテザーは、3つのレポーター基を伴うレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、プローブ構成要素を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する単独のレポーター、プローブ種を同定する分子バーコードを含むことができるか、又はテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体がテザー上に整列され、レポーターは、エキスパンドマー産物の集成後に、親和性結合又は共有結合される。

【0191】

クラスVエキスパンドマーの製造及び使用は、図24において図示されている。工程Iの合成に関して説明すると、1本鎖化されたテンプレート(245)は、配列決定プライマー(246)と接触されかつアニールされる。次にこのプライマー集成体(247)は、クラスV基質構築物のライブラリー及びポリメラーゼと接触される(工程II)。工程IIIにおいて、これらの基質は、テンプレートに方向づけられた重合において段階的に付加される。工程IVにおいて、娘鎖の主要骨格の重合は完了され、かつ近接しているテザー副アームの反応性官能基は架橋され、テザー-から-テザーの結合を形成する。最後に工程Vにおいて、テザーループシステムの切断可能な結合が切断され、オリゴマー性娘鎖及びテンプレートから合成的テザー-から-テザー骨格が放出される。従って、このエキスパンドマー(249)は、テザー連結で全体的に構築され、合成中間体の残余物から放出される(drift)時に、自発的に拡張することが示されている。ここで標的ポリヌクレオチド配列に対応する遺伝情報が、テザーの連続サブユニットにおいてコードされている。

【0192】

(エキスマーの製造及び使用)

クラスI実施態様は、エキスプローブ及びエキスマーを含む。エキスプローブは一リン酸エステルであるが、エキスマーは三リン酸エステルである。「エキスマー」は、エキスパンドマーの酵素依存型のテンプレートに方向づけられた合成で重合されることができ、拡張可能なオリゴヌクレオチド三リン酸基質構築物である。エキスプローブのように、エキスマー基質構築物は、図10A及び10Cに図示されている特徴的「プローブ-ループ」型を有し、ここで $R^1$ は5'-三リン酸エステルであり、及び $R^2$ -は3'-OHである。前記基質構築物は、オリゴ核酸塩基三リン酸エステル又はオリゴマーアナログ三リン酸エステルであるが、このプローブメンバー(すなわち該オリゴマー)は、テザー構築物、及び図10Dに示され、かつその機能は図10Eに更に図示されているようなテザーの末端連結の間の選択的に切断可能な結合により修飾されていることに注意されたい。

【0193】

DNA及びRNAポリメラーゼは、Klessの米国特許第7,060,440号に開示されたようなプライマー-依存型プロセッシングプロセスにおいて、効率及び忠実度のレベルで、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、及びテトラヌクレオチドのオリゴヌクレオチド三リン酸を取り込むことができる。長さ $n$ ( $n=2, 3, 4$ 又はそれよりも大きい)のオリゴヌクレオチド三リン酸で修飾されたテザーは、エキスパンドマーへのポリメラーゼ-ベースの取り込みの基質



として使用されることができる。図16及び17に示された方法における使用に適した酵素は、例えば、DNA-依存型DNAポリメラーゼ、DNA-依存型RNAポリメラーゼ、RNA-依存型DNAポリメラーゼ、RNA-依存型RNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、T3 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、クレノウ断片、サーモフィラス・アクアティカスDNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、VentR(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)、Deep VentR(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)、Bst DNAポリメラーゼラージ断片、Stoeffel断片、9°N DNAポリメラーゼ、9°N DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Tfi DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、RepliPhi Phi29ポリメラーゼ、Tli DNAポリメラーゼ、真核生物DNAポリメラーゼ、テロメラーゼ、Therminator(商標)ポリメラーゼ(New England Biolabs社)、KOD HiFi(商標)DNAポリメラーゼ(Novagen社)、KOD1 DNAポリメラーゼ、Q-レプリカーゼ、末端転移酵素、AMV逆転写酵素、M-MLV逆転写酵素、Phi6逆転写酵素、HIV-1逆転写酵素、生物資源探査により発見された新規ポリメラーゼ、並びにUS 2007/0048748、US 6329178、US 6602695、及びUS 6395524(引用により組込まれている)に列記されたポリメラーゼを含む。これらのポリメラーゼは、野生型、変異体アイソフォーム、及び遺伝子操作された変種を含む。

#### 【0194】

エクスマー重合は、エクスパンドマー合成の方法であり、例えば2mer基質が三リン酸エステルとして提供されているものが、図16に図示されている。エクスマーは漸進性に重合されるので、合成方法による循環式配列決定に典型的に関連している伸長工程、架橋工程、末端活性化工程、及び高ストリンジェンシー洗浄工程は、本アプローチにおいて任意に削除される。従って本反応は、溶液中で実行されることができる。エクスマーによるエクスパンドマー合成は同じく、図17に図示されているように、固定されたテンプレートにより実行されることもでき、ここでは4merエクスマー三リン酸エステルが、プライマーに依存したテンプレートに方向づけられた合成において漸進性に重合されている。

#### 【0195】

5'三リン酸エステルエクスマーの強固な合成において、様々な方法が使用される。Burgess及びCookの文献(「ヌクレオシド三リン酸の合成(Syntheses of Nucleoside Triphosphates)」、Chem. Rev. 100(6):2047-2060, 2000)により説明されるように、これらの方法は、ヌクレオシドホスホロアミダイトを使用する反応、活性化されたヌクレオシドリン酸のピロリン酸の求核攻撃を介した合成、活性化されたヌクレオシドピロリン酸のリン酸の求核攻撃を介した合成、活性化されたリン酸シントンの二リン酸の求核攻撃を介した合成、ヌクレオシド由来の活性化されたホスファイト又はホスホロアミダイトが関与する合成、三リン酸エステル求核試薬による5'-O-脱離基の直接置換が関与する合成、及び生体触媒法を含む(しかしこれらに限定されるものではない)。ポリメラーゼと互換性のあるジヌクレオチド基質を作製する代表的な方法は、5'-リン酸基を活性化するためにN-メチルイミダゾールを使用し;ピロリン酸(トリブチルアンモニウム塩)との後続反応は、三リン酸エステルを生成する(Abramovaらの論文、「ジヌクレオチド5'-三リン酸の容易かつ効果的の合成(A facile and effective synthesis of dinucleotide 5'-triphosphates)」、Bioorganic and Med Chem 15, 6549-6555, 2007)。

#### 【0196】

以下により詳細に考察されるように、本エクスマーテザー構築物は、デザイン、組成及び連結が、エクスプローブに使用されるテザーに関連している。多くの実施態様において、遺伝情報は、このテザー上にコードされており、従って各基質構築物の各テザーは、種-特異的テザーである。このテザー上にコードされた情報は、遺伝情報をデジタル化するレポーターコードでコードされている。例えば、テザー上の5ビットのバイナリーコードは、 $32(2^5)$ 種の独自の配列コードを生じるであろう。この戦略は、テザーの配向とは無関係に、2merライブラリーの1つのプローブメンバーにつき2個の核酸塩基残基の16種全ての組合せについて独自にコードするために使用されることができる。エクスプローブコーディングと同様に、様々な官能基化及び標識戦略がエクスマーに関して考察され、これは以

下を含む(しかしこれらに限定されるものではない): テザー足場の一部としての、官能基化されたデンドリマー、ポリマー、分岐ポリマー、ナノ粒子、及びナノ結晶、更には適した検出技術により検出される、レポーター化学及びレポーターシグナル。塩基特異的標識は、共有結合又は親和性に方向付けられた結合により、エクスマー重合の前又は後のいずれかに、(テザーへの付着を介して)導入されることができる。

#### 【0197】

(エクスプローブ及びエクスマーのデザイン及び合成)

選択的に切断可能な結合を伴うプローブオリゴマーで始まり、引き続きテザー及びレポーター-テザー構築物が続く、合成及び切断の戦略の概要が、以下に示されている。

#### 【0198】

エクスプローブ又はエクスマー-ベースのSBX法のひとつの目的は、一般に好適な前駆体組成物のハイブリダイゼーション、ライゲーション、重合、又は化学的架橋から選択されたプロセス又はプロセスの組合せであるテンプレートに方向づけられた合成により可能な限り完全にかつ効率的に標的核酸の複製物(ここでは「基質」と称される)を集成することである。エクスプローブ及びエクスマー基質は、この目的のための試薬ライブラリー(例えば、配列決定キットの部品として)として供給される。このライブラリーは一般に事実上コンビナトリアルであり、かつ標的ポリヌクレオチドにおいて認められるような任意の又は全ての相補的配列に特異的に結合するために選択されたプローブメンバーを含む。この目的のためのライブラリーに必要なプローブの数は、プローブサイズの間数である。各プローブは、配列断片であるとみなすことができ、かつ標的ポリヌクレオチドの相補的配列断片の連続配列の連続コピーを形成するためには、十分に多様なプローブメンバーが存在しなければならない。各オリゴマーがダイマーであるプローブに関して、A、T、C及びGの16種の可能性のある種組合せが存在する。各オリゴマーがトリマーであるプローブに関して、A、T、C及びGの64種の可能性のある種組合せが存在し、これが続く。ランダムゲノム断片を配列決定する場合、恐らくそのような種全てが、試薬ライブラリーにおいて必要とされるであろう。

#### 【0199】

エクスプローブ及びエクスマーは、5種の異なる機能クラスに分類されるオリゴマー性基質構築物である。オリゴマー性基質構築物は、修飾されたオリゴ核酸塩基又は「プローブ」メンバー、及びテザーメンバー(「T」)のふたつの異なる機能成分を有する。本プローブは、「プローブ-ループ」構築により、テザーメンバーに結合され、ここでこのテザー-ループは、最終生成物エクスパンドマーの線状化されたテザーメンバーの前駆体である。各テザー-Tは、それに対しテザー化されているプローブ配列を独自に同定する、レポーター(通常「タグ」又は「標識」と称される)、又はそれらの組合せによりコードされることができる。この方法において、集成されたエクスパンドマーの配列情報は、より迅速に検出される。

#### 【0200】

前記オリゴマーは、エクスプローブのプローブ部分である。このプローブは、x個のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はより一般に核酸塩基残基(この場合xは、2、3、4、5、6、又はそれ以上であることができる)の鎖を有する修飾されたオリゴ核酸塩基である。これらの考察において、長さ2、3、4、5又は6個の核酸塩基残基を有するプローブは、各々、2mer、3mer、4mer、5mer、又は6merと称される。

#### 【0201】

基質構築物試薬は、当該技術分野において公知のように、オリゴヌクレオチド5'-3'ホスホジエステル骨格、ヌクレオチドA、T、G及びC(図25の表に示された構造)を有するオリゴマー、又は他のハイブリダイズ可能な核酸アナログ、例えばペプチド骨格、ホスホノ-ペプチド骨格、セリン骨格、ヒドロキシプロリン骨格、混合型ペプチド-ホスホノ-ペプチド骨格、混合型ペプチド-ヒドロキシプロリン骨格、混合型ヒドロキシプロリン-ホスホノ-ペプチド骨格、混合型セリン-ホスホノ-ペプチド骨格、トレオース骨格、グリコール骨格、モルホリノ-骨格などを有するものにより合成されることができる。デオキシリボ核

酸オリゴマー及びリボ核酸オリゴマー、及びこれらふたつの混合型オリゴマーも、プローブとして使用されてよい。他の塩基も、チミジンに関するウラシル、及び縮重塩基としてのイノシンなどのように、置換されてよい。相補性を有する核酸塩基の断片化された残基も、使用されることができる。

#### 【0202】

当該技術分野において公知の縮重塩基及びゆらぎ塩基のより完全な列挙は、以下を含むが、これらに限定されるものではない：キサンチン、ヒポキサンチン、又はキサンチン及びヒポキサンチンの複素環式誘導体、アナログ、若しくは互変異性体、8-アザプリン、8位でメチル-若しくはプロモ-により置換されたプリン、9-オキソ-N<sup>6</sup>-メチルアデニン、2-アミノアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、7-デアザ-アデニン、N<sup>4</sup>-エタノシトシン、2,6-ジアミノプリン、N<sup>6</sup>-エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5-(C3-C6)-アルキニルシトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、チオウラシル、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、シュードイソシトシン、イソグアニン、7,8-ジメチルアロキサジン、6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、4-メチル-インドール、エテノアデニン、並びに米国特許第5,432,272号及び第6,150,510号、PCT公開WO 92/002258、WO 93/10820、WO 94/22892、及びWO 94/22144に開示された核酸塩基、並びにFasmanの著書「生化学及び分子生物学実践ハンドブック(Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology)」、385-394頁、CRC Press社、ボカラトン、LA、1989年(各々それらの全体が引用により本明細書中に組込まれている)に説明された核酸塩基。

#### 【0203】

当該技術分野において公知であるように、オリゴマーは、ヌクレオチド修飾因子を含むようにデザインされることができる。一部の実施態様において、これらは、1個又は複数のテザーメンバーのための付着点として働く。誘導体化されたオリゴマーの合成に適したプリン及びピリミジン誘導体は、当該技術分野において周知である。そのような修飾された塩基のふたつの代表は、図26A及び26Bに示されており、ここでは5-アミノ-修飾されたシトシン誘導体及び8-アミノ-修飾されたグアニン残基が描かれている。

#### 【0204】

図27A及び27Bに図示されているように、4merオリゴマーを例とすると(ここでは5'-リン酸エステルとして図示されている)、オリゴマー上のこれら4つの塩基位置のいずれか2つは、公知の化学により付着点を作製するように修飾されることができる。図27Aにおいては、プローブ残基2及び3(「V」として描かれた選択的に切断可能な結合の反対側にある)で修飾されたヌクレオチドが、図示されている。この図は、オリゴマーのシトシン及びグアニンに付着されたアミノリンカーを伴う4merオリゴマーを図示している。図27Bは、オリゴマーのシトシン及びグアニンへのベンズアルデヒド官能基を伴う4merオリゴマーを図示している。詳細は、当該技術分野において周知の方法に例証されている。簡潔化のために、本明細書に提供されたほとんどの例示は、別に記さない限りは4merを仮定しているが、他の基質構築物ライブラリー又はライブラリーの組合せを本発明の実践において利用することができることは理解される。

#### 【0205】

(切断)

一般に、エクスポープ及びエクスマー基質構築物は、テザーの制御された拡張を可能にする選択的に切断可能な結合を有する。先に言及したように、そのような選択的切断は、当業者に公知のいくつかの技術により実現することができ、これは金属陽イオンによるホスホロチオラート骨格切断、ホスホロアミデート骨格修飾の酸切断、骨格保護のためのヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエート修飾を使用する標準ホスホジエステル連結の選択的ヌクレアーゼ切断、ニトロベンジル修飾された骨格リンカーの光切断、及びジスルフィド結合の還元を含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0206】

選択的に切断可能な結合を含むための基質プローブの修飾は、図28Aから28D及び図29A

から29Dに図示されている。図28Aは、DNA/RNA二重鎖エクスパンドマー中間体において、リボヌクレアーゼHにより切断され易いリボシル2'-OH基を伴うエクスプローブダイマーの例を示す。従ってエクスプローブ内の他のヌクレオチド(類)は、RNase切断に対し耐性である(例えば、2'-O-メチルペントース、2'デオキシリボース核酸塩基、「ロックされた」LNA核酸塩基、及びグリコール-又はペプチド-連結された核酸塩基)ことを条件として、この結合は選択的に切断可能である。これらの切断部位は、その他の利用があり、例えば最後から2番目の5'-核酸塩基のリボヌクレオチドとアダプターは、エクスパンドマーと固定された支持体の間に切断可能なリンカーを提供する。

#### 【0207】

図28Bは、2個のヌクレオチドを共役するホスホジエステル結合を伴うエクスプローブを示す。この図に加え図28A、28C及び28Dにおいて、プローブの選択的に切断可能な結合に橋かけするためのテザーは、(282)及び(284)で示されている。この結合は、例えばサブユニットテザーと一緒に結合しているその他の結合がヌクレアーゼ耐性である場合は、マンガبینヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、DNase I、又は他のDNAaseにより、選択的に切断可能である。例えばテザー付着点間の標準のリン酸連結と、無傷であり続けるヌクレオチド骨格位置でのホスホロチオエート連結を伴う2merライブラリーの合成は、所望の切断パターンを提供する。図28Cは、3'-ホスホロチオラート結合により一緒に保持されたエクスプローブダイマーであり、及び図28Dでは、5'-ホスホロチオラート結合により一緒に保持されている。これらの結合は、例えば、Gishらの論文(「ホスホロチオエート化学を基にしたDNA及びRNA配列決定(DNA and RNA sequence determination based on phosphorothioate chemistry)」、Science 240(4858): 1520-1522, 1988)に説明されたヨードエタノールでの化学攻撃によるか、又はVyleらの論文(「オリゴデオキシリボヌクレオチド及び3'-チオチミン含有DNAにおける配列-及び鎖-特異的切断(Sequence- and strand-specific cleavage in oligodeoxyribonucleotides and DNA containing 3'-thiothymidine)」、Biochemistry, 31(11): 3012-8, 1992)に説明された二価金属陽イオンによる切断により、選択的に切断可能である。他の骨格切断の選択肢は、以下を含むが、これらに限定されるものではない: Valloneらの論文(「MALDI-TOF MSにおけるUV光切断可能なオリゴヌクレオチドを使用するSNPs遺伝子タイピング(Genotyping SNPs using a UV-photocleavable oligonucleotide in MALDI-TOF MS)」、Methods Mol. Bio. 297:169-78, 2005)に説明されたUV誘導した光レドックス切断(ニトロベンジル光切断基の適合による)、Obikaらの論文(「配列特異的三重鎖形成により引き起こされたオリゴヌクレオチドP3' N5'ホスホロアミデートの酸媒介型切断(Acid-Mediated Cleavage of Oligonucleotide P3' N5' Phosphoramidates Triggered by Sequence-Specific Triplex Formation)」、Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 26(8,9): 893-896, 2007)に説明されたホスホロアミデート連結の酸切断、及びNauwelaertsらの論文(「二糖ヌクレオシド取り込みによる遺伝情報を喪失しないDNAの切断(Cleavage of DNA without loss of genetic information by incorporation of a disaccharide nucleoside)」、Nucleic Acids Research, 31(23): 6758-6769, 2003)に説明された3'-O-B-D-リボフラノシル-2'-デオキシ骨格修飾の過ヨウ素酸が触媒した切断。

#### 【0208】

エクスプローブのように、エクスパンドマーを作製するためのポリ-エクスマー骨格の切断は、様々な方法により達成される。図29Aに示されたように、例えばRNase消化可能なリボヌクレオチド塩基を含むエクスマーは、そのエクスマー内の他のヌクレオチド(類)はRNase切断に対し耐性である(例えば、2'-O-メチルペントース及び2'デオキシリボース核酸塩基、「ロックされた」LNA核酸塩基、及びグリコール-又はペプチド-連結された核酸塩基)ことを条件として、その位置で選択的に切断されることができる。図29Aに説明されたエクスマーに関して、5'塩基は、標準2'ヒドロキシルリボヌクレオチドシチジンであり、及び3'塩基は、RNase耐性2'デオキシリボヌクレオチドグアニンである。このエクスマーのデザインは、エクスパンドマーを拡張するためのエクスマー骨格の選択的RNase切断を可能にする。あるいは図29Bに示されたように、DNaseを使用し、非-ホスホロチオエー

ト保護された骨格連結を全て切断することができる。従って例えばテザー付着点間の標準のリン酸連結と、無傷であり続けるヌクレオチド骨格位置でのホスホロチオエート連結を伴う2merライブラリーは、所望の切断パターンを提供する。図29Cは、3'-ホスホロチオエート結合により一緒に保持されたエクスマーダイマーであり、図29Dは、5'-ホスホロチオエート結合により一緒に保持されている。これらの結合は、例えば、先に言及されたような、ヨードエタノールによる化学攻撃によるか、又は二価の金属陽イオンでの切断により、選択的に切断可能である。他の骨格切断の選択肢は、UV誘導した光レドックス切断(ニトロベンジル光切断基の適合による)及びホスホロアミデート連結の酸切断を含むが、これらに限定されるものではなく、これらは両方とも先に図28において列記されている。図29Aから29Dにおいて、プローブの選択的に切断可能な結合を橋かけするためのテザーは、(292)及び(294)で示されている。

10

#### 【0209】

図30に目を移すと、クラスI「プローブ-ループ」基質構築物合成のためのスキームの第一の一般的実施態様において、プローブ上の第二及び第三の位置の2つの核酸塩基残基(円形)は、テザーの2つの末端L1'及びL2'のための付着点L1及びL2を作製するように修飾されている。このテザーは、ここでは個別に予備-集成されたように示され、かつ合成工程において該プローブメンバーへ結合されている(矢印)。テザー内ジスルフィド結合(2個の三角形で描かれる)は、これらの基質構築物の集成及び使用において使用されることができる。エクスパンドマー産物への還元剤の導入は、テザーと一緒に保持しているジスルフィド橋を選択的に破壊し、その結果エクスパンドマー骨格の拡張を可能にするであろう。光切断可能な結合も、集成時のテザーの折り畳みにおいて有用であり、その後光への曝露時に解放及びほどける(unfolding)。

20

#### 【0210】

別の実施態様において、この基質のホスホジエステル骨格は、以下の文献に説明されたように、テザーのための付着点を作製するように修飾されることができる：Cookらの論文(「新規陽イオン骨格置換基：アミノエチルホスホネートを伴うオリゴヌクレオチド(Oligonucleotides with novel, cationic backbone substituents: aminoethylphosphonates)」, *Nucleic Acids Research* 22(24): 5416-5424, 1994)、Agrawalらの論文(「2個の異なるレポーター基の付着のためのオリゴヌクレオチドの位置特異的官能基化(Site specific functionalization of oligonucleotides for attaching two different reporter groups)」, *Nucleic Acids Research* 18(18): 5419-5423, 1990)、De Mesmaekerらの論文(「可能性のあるインターカレート置換基を保有するアンチセンスオリゴヌクレオチドのためのアミド骨格修飾：RNA-及びDNA-相補体による対応する二重鎖の熱力学的安定性に対する影響(Amide backbone modifications for antisense oligonucleotides carrying potential intercalating substituents: Influence on the thermodynamic stability of the corresponding duplexes with RNA- and DNA- complements)」, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7(14): 1869-1874, 1997)、Shawらの論文(「DNAの天然のホスホジエステルの擬態としてのボラノホスフェート(Boranophosphates as mimics of natural phosphodiester in DNA)」, *Curr Med Chem.* 8(10):1147-55, 2001)、Cookらの特許(米国特許第5,378,825号)、及びAgrawalの論文(「アミノ基によるオリゴヌクレオチドの官能基化及びアミノ特異的レポーター基の付着(Functionalization of Oligonucleotides with Amino Groups and Attachment of Amino Specific Reporter Groups)」, *Methods in Molecular Biology* Vol. 26, 1994)。前記プローブメンバーを作製する核酸塩基残基は、エクスパンドマーの官能性を変更するために、核酸塩基アナログにより置換されることができる。例えばロックされた核酸(「LNA」)は、プローブ二重鎖の安定性を増大するために使用されることができる。エクスパンドマーの化学共役が意図される場合(酵素的ライゲーションの代わりに)、プローブの5'及び3'末端は、化学架橋を可能にするために更に誘導体化されることができる。

30

40

#### 【0211】

(レポーター構築物のデザイン、組成及び合成)

50

一実施態様において、テザーは、それにテザー化されている核酸塩基残基(又は図8のエクスプローブ、エクスマー、及び他のオリゴマー基質の「プローブ」)又は核酸塩基(図9のXNTP、RT-NTP、及びモノマー性基質)の配列を独自に同定する「レポーター構築物」によりコードされている。レポーターは、基質に固有の配列情報及び基質がエクスパンドマーに取り込まれるために固有の配列情報を「解析」又は「コード化」するために利用される一般にテザーに会合されたレポーター又はレポーターの組合せである。一部の実施態様において、テザーは、単にスペーサーであり、及びレポーターは、基質であるか、又は基質に会合されている。

#### 【0212】

図31は、図30の方法に類似しているが、予備-集成されたテザーがレポーター基(テザーの3つの長方形部分として示される)を含み、「レポーター構築物」と称される、基質テザー集成の方法を描いている。レポーター構築物及びテザーは、様々なポリマー化学により作製されてよく、これらの使用及び合成はここにより詳細に考察されている。

#### 【0213】

本発明の実践において、テザーは、様々な機能を働くことができ、例えば：(1)核酸塩基骨格に沿って隣接テザーと直接又は間接に逐次的に連結するためのテザーとして、(2)骨格の切断時に、エクスパンドマーと称されるテザー化されたサブユニットの伸長された鎖を形成するために、伸展又は拡張するためのスペーサーとして、及び/又は、(3)任意にテザーが会合されている個別の基質構築物の核酸塩基又はオリゴマー性配列情報をコード化しているレポーター構築物又はレポーター前駆体を含む。

#### 【0214】

レポーター構築物は、レポーターコードの物理的顕在化(manifestation)であり、これは事実上バイオインフォマティカルでデジタルである。レポーターコードは、それにレポーター構築物及びテザーが付着されているプローブ又は核酸塩基配列断片に会合された遺伝情報を解析又はコード化している。このレポーター構築物は、構成要素レポーターの空間的分離、存在量、及びシグナル強度の調節により、レポーターコードの可検出性を最適化するようにデザインされている。本レポーター構築物は、ポリマー、デンドリマー、ビーズ、アプタマー、リガンド及びオリゴマーを含むが、これらに限定されるものではない、広範なシグナルエレメント及び構造エレメントを取り込むことができる。これらのレポーター構築物は、様々なポリマー化学により作製され、かつ以下に考察されている。

#### 【0215】

一実施態様において、レポーター構築物は、ポリマーテザーによりプローブ又は核酸塩基へ付着されている。これらのテザーは、以下のセグメント又はセグメント類を含むが、これらに限定されるものではない、1種以上の耐久性のある水-又は溶媒-可溶性ポリマーにより構成されることができる：ポリエチレングリコール、ポリグリコール、ポリピリジン、ポリイソシアニド、ポリイソシアナート、ポリ(トリアリールメチル)メタクリレート、ポリアルデヒド、ポリピロリノン、ポリ尿素、ポリグリコールホスホジエステル、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリビニルエステル、ポリスチレン、ポリアミド、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリブチラート、ポリブタジエン、ポリブチロラクトン、ポリピロリジノン、ポリビニルホスホネート、ポリアセトアミド、多糖、ポリヒアルロネート、ポリアミド、ポリイミド、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリテレフタレート、ポリシラン、ポリウレタン、ポリエーテル、ポリアミノ酸、ポリグリシン、ポリプロリン、N-置換ポリリジン、ポリペプチド、側鎖N-置換ペプチド、ポリ-N-置換グリシン、ペプチド、側鎖カルボキシル-置換されたペプチド、ホモペプチド、オリゴヌクレオチド、リボ核酸オリゴヌクレオチド、デオキシ核酸オリゴヌクレオチド、ワトソンクリック塩基対形成を防ぐように修飾されたオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアナログ、ポリシチジル酸、ポリアデニル酸、ポリウリジル酸、ポリチミジン、ポリリン酸、ポリヌクレオチド、ポリリボヌクレオチド、ポリエチレングリコール-ホスホジエステル、ペプチドポリヌクレオチドアナログ、トレオシル-ポリヌクレオチドアナログ、グリコール-ポリヌクレオチド

アナログ、モルホリノ-ポリヌクレオチドアナログ、ロックされたヌクレオチドオリゴマーアナログ、ポリペプチドアナログ、分岐ポリマー、櫛状ポリマー、星状ポリマー、樹枝状ポリマー、ランダム、グラジエント及びブロックコポリマー、陰イオン性ポリマー、陽イオン性ポリマー、ステム-ループ、剛性セグメント及び柔軟セグメントを形成するポリマー。このようなポリマーは、例えば図30及び図31に説明されたように、基質構築物上の付着点で円形とされている。

#### 【0216】

前記テザーは一般に、拡張に対し耐性であるか、又はコンパクトであるように折り畳まれている。ポリエチレングリコール(PEG)、ポリエチレンオキシド(PEO)、メトキシポリエチレングリコール(mPEG)、及び多種多様な同様の構成されたPEG誘導体(PEG)が、本発明の  
10 実践において利用することができる広範に利用可能なポリマーである。様々な二官能性及びヘテロ二官能性の末端クロスリンカーにより修飾されたPEGは利用可能であり、広範な長さで合成されている。PEGは一般に、水、メタノール、ベンゼン、ジクロロメタン、及び多くの一般的な有機溶媒に可溶性である。PEGは一般に、典型的には生物学的化学とは非特異的に相互作用しない柔軟なポリマーである。

#### 【0217】

図32Aは、PEGポリマーの反復構造を図示している。図32Bは、例えば標準リンカー化学を用い、アミン-終結されたリンカー(図示せず)によりプローブ骨格に固定された裸のPEG  
20 テザーを伴う、エクスプローブ又はエクスマーを示している。図32Cは、選択的に切断可能な結合(「V」)でプローブ骨格の切断後の同じ基質構築物を示しており、このPEGポリマーの柔軟性は、エクスパンドマーの伸長に順応している。一部の実施態様において、PEGポリマーセグメントは、拡張した長さを提供するか、又は例えばテザーアームを基質へ接続する終端連結近傍のテザーのステムのような立体的問題点を最小化するために、テザー上で区分的に(piecewise)集成されている。

#### 【0218】

テザーとして利用されかつレポーターのための「足場」を提供することができる他のポリマーは、例えば、ポリ-グリシン、ポリ-プロリン、ポリ-ヒドロキシプロリン、ポリ-システイン、ポリ-セリン、ポリ-アスパラギン酸、ポリ-グルタミン酸などを含む。追加されたシグナル収容能力又は複雑性のための官能基-リッチな足場を構築するために、側鎖  
30 官能性を使用することができる。

#### 【0219】

図33Aは、ポリ-リジンの構造を示す。図33Bから33Dに説明されたテザー構築物の実施態様において、ポリ-リジンテザーセグメントは、レポーター付着のための足場を作出している。図33Bにおいて、リジン側鎖の -アミノ基(矢印により示される)は、レポーターコードを増幅する、多数のレポーターエレメントの基質構築物への付着のための官能性を提供  
する。図33Cは、ポリ-リジン側鎖(矢印)により基質構築物へ付着されたスターバースト型デンドリマーを図示している。

#### 【0220】

図33Dは、集成後標識及び「シグナル増幅」工程においてタグ付き相補的オリゴマーの添加により検出することができるデンドリマーオリゴマーの負荷を図示している。これは  
40 普遍的テザーの調製に有用な方法を提供し - プローブへの複数のオリゴマー性レポーター基を伴うタグなしデンドリマー複合体の付着、その後のプローブ-結合されたデンドリマーの1種又は2種の相補的タグ付きプローブの選択による処理により、個別の基質種に特異的に「ペイントされた(painted)」デンドリマーが得られる。様々なプローブ/テザー構築物が、様々な相補的タグ付きプローブによりペイントされることができる。

#### 【0221】

本アプローチの更なる実施態様において、レポーターシステムの骨格は、各々同じFRETドナーを介して励起される2種の識別可能な蛍光レポーターを用いバイナリー様式で空間的にコードされた8つの独自のオリゴヌクレオチドを含む。テザー構築物のその各々の基  
50 質構築物への共役の前又は後に、このテザー構築物は、適切なプローブ-特異的バイナリ

ーコードを作出するのに好適な蛍光レポーターエレメントの混合物とのハイブリダイズによりコードされた配列である。レポーターシステムの骨格としてコードされた未標識のデンドリマー、ポリマー、分岐ポリマー、又はビーズを使用するこのアプローチの変形が利用される。オリゴヌクレオチドは再度、レポーター構築物のバイナリーコーディングのために使用されることができる。このアプローチの利点は、シグナル強度が有意に増幅されること、及びコーディングが単独のハイブリダイゼーション事象に依存していないことであり、これら両方とも測定及び/又はコーディングエラーの可能性を減少させる。

#### 【0222】

更に別の実施態様は、例えば同様にバイナリーコードされたレポーター構築物を作製するために、前述のオリゴヌクレオチドコーディング戦略を、親和性-結合された異種特異性リガンドと交換する。9ビットバイナリーコーディング戦略を使用し、この非普遍的レポーター構築物は、その最も単純な形で、単独の共役化学のみを利用し、テザーの全てを同時に標識する。

#### 【0223】

SBXアプローチの柔軟性を考えると、広範なレポーターが、独自の測定可能なシグナルを発生するために使用される。各テザーは、1つ又は多数の個別のレポーターセグメントにより独自にコードされている。それにレポーター部分が付着されている足場は、デンドリマー、ビーズ、ポリマー、及びナノ粒子を含むが、これらに限定されるものではない広範な現存する構造的特徴を用い構築されることができる。コーディングスキームに応じて、1つ又は多数の個別に分離されたレポーター足場が、各テザーのレポーターコードのために使用されることができる。レポーター部分のレポーター足場への直接及び間接付着のためには、下記を含む(しかし限定されない)いくつかの選択肢が利用可能である：テザー構築物へ組込まれた化学反応性ポリマー(類)のレポーターコーディング；テザー骨格へ組込まれたデンドリマー(類)上の化学的に反応性の表面基のレポーターコーディング；及び、テザーへ組込まれたビーズ(類)上の化学的に反応性の表面基のレポーターコーディング。本文脈において「ビーズ」は、任意の結晶性ポリマー性ラテックス、又は複合の粒子又はミクロスフェアを示すよう広範にみなされる。3種の例全てについて、レポーター存在量は、多数のレポーターが共に負荷されているポリマーのレポーター足場への付着により、有意に増加され得る。これらのポリマーは、100残基のポリ-リジンと同等に単純であることができ、より有利には、標識されたオリゴマー性プローブなどであることができる。

#### 【0224】

サイズが減少されたテザー構築物も、使用されることができる。例えばこのテザー構築物は、スペーシングユニットの挿入、その結果のレポーターテザーのサイズの減少のための指示された方法を用い、プロセッシング後工程において長くすることができる。

#### 【0225】

前記基質構築物のサイズ及び質量の減少は、標識されないテザーを使用することによっても達成することができる。嵩高なレポーター(及び一部のコード化の実施態様において、そのテザー質量の90%以上を構成するデンドリマーのようなレポーター足場)を除去することにより、ハイブリダイゼーション及び/又は共役の反応速度論が増強され得る。その後集成後のテザー標識を使用することができる。レポーターは、塩基配列情報をコード化するために空間的又はコンビナトリアル戦略を用い、テザー構築物に沿って分布されている1種以上の連結化学に結合される。単純なバイナリーコーディングスキームは、エクスパンドマー集成後標識のために、わずかに1種の反応性連結化学を使用することができる。数百の独自のリンカーを必要とし得るようなより複雑化された標識スキームは、エクスパンドマー標識のためにオリゴヌクレオチドをベースにした戦略を用いる。別の標識後エクスプローブ又はエクスマーの実施態様は、標識されたプローブのライブラリーのハイブリダイゼーションによる、レポーター付着のために、エクスパンドマーの切断及び拡張後残存するP<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>に由来する得られたヌクレオチド配列(図10参照)を使用する。同様に他の標識及び/又は検出技術は、より空間的に分離されたヌクレオチドを直接同定することができる。



## 【0226】

所望のレベルの精度で基質構築物に付着するテザー及びレポーター構築物が利用されるが、その理由は不正確な共役は、不十分な検出に繋がり、かつポリマー終結又はレポーターコードのスクランブル化(例えば非対称レポーターコードが使用される)にも繋がり得るからである。SBXプロセスの忠実度は、基質構築物の合成純度に関連付けられることができる。完全長生成物の濃厚化のためにテザー/レポーター構築物を精製した後、この構築物は、ヘテロ二官能性(指向性のレポーターコーディング)又はホモ二官能性(対称又は配向されたレポーターコーディング)オリゴヌクレオチドプローブへ直接共役されることができる。ポリマー合成の全ての方法のように、高純度の完全長の拡張可能なプローブ構築物を確実にするために、基質構築物の合成及び集成の完了後、精製(サイズ、アフィニティ、HPLC、電気泳動など)が利用される。

10

## 【0227】

(レポーターを提示するクラスI基質構築物の合成)

テザー上に展示されたレポーター又はレポーター前駆体を伴うクラスI基質構築物の合成は、様々な方法で実現することができる。ジスルフィド橋を介して基質構築物のテザー付着末端の近くに接続されるヘアピンテザーポリマーを集成するために、段階的プロセスを使用することができる。これは、テザーのプローブへの共役が高度に有利であるように、反応性末端に配向している。4種全てのヌクレオチドのためのアミノ-修飾因子C6ホスホロアミダイトが市販されており(Glen Research社、米国)、例えばテザーを付着し、完成された基質構築物を形成するために使用される。あるいは、ベンズアルデヒド修飾されたヌクレオチドの形のリンカー化学を利用することができる。サイズ及び/又はアフィニティ精製は、正確に集成された基質構築物の濃厚化に有用である。

20

## 【0228】

プローブヘテロ二官能基化は、オリゴ及びペプチド合成に関して慣習的であるように固形支持体マトリックス上で、又は溶液中で好適な精製方法により、有利に実行されることができる。広範な標準規格品(off-the-shelf)のヘテロ二官能性及びホモ二官能性架橋剤が、例えばアミン、カルボキシル、チオール、及びヒドロキシル部分の修飾のため、並びに様々な堅固かつ選択的連結化学を作製するために、利用可能である。C6アミノ修飾因子は、4種全てのデオキシリボヌクレオチドに利用可能であり、かつ4種全てのリボヌクレオチドについて利用可能に作製されることができるので、ここで説明された官能基化戦略は、標準規格品のアミンベースの架橋方法を、良く確立されたアミン保護/脱保護化学と共に使用する。しかし当該技術分野において公知の広範なホスホロアミダイト及び架橋化学を考えると、ここに説明されない方法も考慮することができ、同等の生成物を生じる。

30

## 【0229】

前記プローブのヘテロ二官能基化の必要性は、レポーターコーディング戦略が、デジタル的に対称のコーディングを作製するか、又はコード配向を同定するために指向性のランドマーク(パリティビット)を使用する場合には、削除することができる。この場合、テザー上のレポーター構築物いずれかの共役配向は、独自のプローブ特異性配列の同定を生じるので、2種の内部アミンプローブ修飾因子で十分である。

## 【0230】

40

円形で末端が官能基化されたテザーを形成するために、化学的(例えば、クロスリンカー)又は酵素的(例えば核酸プローブハイブリダイゼーション及びライゲーション)に触媒された共有結合を用い、1つ又は多くのポリマーセグメントを、逐次的に集成することができる。ポリマー合成方法に関する当該技術分野の現状を考えると、化学的架橋合成アプローチが、代表的実施態様を構成している。多くのポリマー合成方法について慣習的であるように、固形支持体マトリックスを、合成の足場として使用することができる。ポリマーセグメントは、異なる末端官能基化を有する混合された対セグメントとして、又は結合された対であるジスルフィド橋を介して対形成された異なるホモ二官能性末端部分(例えばヒドラジドとアミン)を有する2つのポリマーセグメントとして、末端官能基化を基に一度に1つ集成されることができる。

50

## 【0231】

リンカー及びレポーターの両エレメント部分を含む標識化学が開発され、かつ高いシグナル収量並びに安定性、低いポリマー交差反応性及びもつれ、並びにこれらの化学をエクスパンドマー骨格に付与する構造上の剛性(硬化(stiffening))を基に最適化されており、これらは以下に考察されるように試料調製及び検出のために重要であり得る。

## 【0232】

先に考察された図31において、完成したヘアピンテザー/レポーター構築物が、オリゴヌクレオチドプローブとは無関係に集成され、次にホモ二官能性又はヘテロ二官能性リンカー化学により、プローブメンバーへ結合される。別の実施態様において、図34に示されたように、テザーは、固定されたプローブ配列上での構築により段階的に円形とされる。このレポーター構築物及びテザーは、オリゴヌクレオチドプローブに直接連結されたヘテロ二官能性(指向性)又はホモ二官能性(対称又は配向された)テザーセグメントにより合成される。図34Aに示されたプローブ配列は、4merであり、かつ選択的に切断可能な結合(「V」)により分離されたプローブ部分P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>(第二及び第三の円形)を含む。固形状態の合成技術が、該レポーター構築物の合成において使用される。この合成は、テザーループの閉鎖により統合される。図34Aの工程Iにおいて、第一レポーター基(342)を伴う第一テザーセグメント(341)は、L1及びL1'(小さい長方形で描かれたように、プローブ部分のひとつ上のリンカーL1はブロックされている)により示された特異的官能基化学を用いて付加される。工程IIにおいて、第二レポーター基(345)を伴う第二テザーセグメント(344)が、L2'及びL2'により示された特異的官能基化学を用いて付加される。工程IIIにおいて、レポーター基(347)を伴う第三のテザーセグメント(346)が、L2及びL1'で示された特異的官能基化学を用いて付加される。工程IV、及びプローブのP<sup>2</sup>部分上のL1部位からのブロック基(再度小さい長方形で描かれる)の除去後において、L1'及びL1共役後にループは閉鎖される。

## 【0233】

図34Bに図示されているような更に別の実施態様において、テザーがプローブ上に方向付けられて配置されること(しかしこれは全てのコード化戦略には必要ない)を確実にするために、ヘテロ二官能性リンカー化学を再度使用することができる。プローブ4merは、再度選択的に切断可能な結合(「V」)により分離されたプローブ部分P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>(第二及び第三の円形)で描かれている。工程Iにおいて、レポーターセグメント(342,345)を伴う2つのテザー(341,344)は、P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>上の官能基L1及びL2と接触され;これらの化学は、各テザーに特異的である。この段階でこれらのテザーは、テザー内結合(隣接している三角形により描かれる)により安定化されてよい。工程IIにおいて、レポーターセグメント(347)を伴う第三のテザー(346)が、先駆体セグメント上のブロック基(小さい長方形で描かれる)の除去後、テザーを「キャップ形成」するために使用される。このキャップセグメントも、セグメント内結合(再度隣接している三角形により描かれる)により安定化される。

## 【0234】

図34Cに目を移すと、予め形成されたテザーの末端連結を分離するためのプローブ部分P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>の付加を基にした実施態様が示されている。工程Iにおいて、予め形成されたテザーが、L1をL1'と接触することにより、P<sup>1</sup>と最初に反応される。工程IIにおいて、次のテザーが、L2をL2'と接触することにより、P<sup>2</sup>と反応される。このテザーは、テザー内結合(隣接している三角形により描かれる)により安定化され、これはP<sup>1</sup>をP<sup>2</sup>近傍とする。これら2つのプローブ部分は次に工程IIIにおいて連結され、P<sup>1</sup>とP<sup>2</sup>(第二及び第三の円形)の間に選択的に切断可能な結合(「V」)を形成する。P<sup>1</sup>及びP<sup>2</sup>のライゲーションは、該プローブ部分の相補的テンプレートへの二重鎖形成により、任意に促進されてよい。

## 【0235】

図35Aにおいて、レポーター構築セグメントの合成に関する別の実施態様が明らかにされている。固体状態化学的方法を使用し、切断可能なリンカー(351)は、最初に固形基質(350)上に係留される。可逆的な連結を伴う第一のテザーセグメント(352)が、工程Iにおいて該リンカーと反応され、次に工程IIにおいて、本例においては、反応性モノマーの4:1

の化学量論的混合物として示されている、モノマーM1及びM2のコンビナトリアルライブラリーと反応される。この様式でランダムコポリマー合成が行われ、独自のテザーセグメント組成物を作製する。ペプチド又はアミノ酸モノマーが使用される場合は、これは、例えば様々な長さのランダムコポリマーペプチドテザーを生じる、混合無水物化学により実行することができる(Semkinらの論文「混合無水物法による樹脂上のペプチド合成(Synthesis of peptides on a resin by the mixed anhydride method)」、Chemistry of Natural Compounds, 3(3):182-183,1968; Merrifield らの論文「固相ペプチド合成I、テトラペプチドの合成(Solid Phase Peptide Synthesis I. The Synthesis of a Tetrapeptide)」、J. Am. Chem. Soc. 85(14):2149-2154,1963)。工程IIIにおいて、L1でブロックされた(小さい長方形で描かれる)末端リンカーエレメント(356)が、次にこのペプチドセグメントに付加される。固相支持体からの該セグメントの切断後(図示せず)、テザーセグメントは、一部は図34に説明されているような様々な方法を用いて、レポーター構築物へ取り込まれることができる。

10

#### 【0236】

図35Bにおいて、この実施態様の代替が明らかにされている。ランダムに取り込まれたペプチド断片を伴うレポーター構築物は、工程I、II及びIIIにおいて前述のように合成されるが、工程IIIにおいて、末端リンカー基(358)は、ヘテロ位官能性リンカーL2を備えている。先の例とは異なり、モノマーは同じ割合で提供される。固相支持体からの切断後(図示せず)、このレポーター構築物は、先の例のテザーへの更なる取り込みに利用可能であり、ヘテロ二官能性リンカーである。レポーター構築物は、以下により詳細に説明されるように、プローブ配列断片の遺伝情報をコード化するために役立つ。

20

#### 【0237】

ポリペプチドは、有用なレポーター構築物であり、テザーとしても役立つ。ランダム、周期、交互、及びブロックコポリマーは、ホモポリマーと共に、例えば、テザーセグメント及びテザー構築物組成物のために利用することができる。ポリペプチドセグメントは、例えばヒドラジド又は4-ホルミル安息香酸エステル(4FB)へのアミン変換のためのヘテロ二官能性クロスリンカーを含むスクシンイミジルを使用し、末端官能基化されることができる。ポリペプチドは、化学合成によるか、又は生物学的システム(細菌、酵母、バキュロウイルス/昆虫、哺乳類)におけるクローニング及び過剰発現によるかのいずれかにより作製されることができる。このセグメント望ましい長さに応じて、テザーセグメントは、 $N > 2$ (短いセグメント)から $N > 1000$ (長いセグメント)の範囲であることができる。適宜、アミン側鎖基の保護化学を使用することができる。標準規格品のクロスリンカー使用の代替として、ポリペプチドは、直接付着されたヒドラジド、4FB、及びNHS部分により、化学的に合成されることができる。

30

#### 【0238】

ヒドラジド又は4-ホルミル安息香酸エステル(4FB)へのチオールの変換のためにマレイミド含有ヘテロ二官能性クロスリンカーを使用して官能基化されたポリペプチドセグメント末端も、テザー及びレポーター構築物の合成において使用することができる。ヒドラジド(HZ)又は4-ホルミル安息香酸エステルへのカルボキシルの変換のためにEDCクロスリンカーを使用して官能基化されたポリペプチドセグメント末端も、同様に利用することができる。

40

#### 【0239】

レポーター構築物により修飾されたテザーを有するオリゴマー性基質構築物の5つのクラス全ての合成は、前記合成方法の使用により実現される。同様に、レポーター構築物で修飾されたテザーを有するモノマー性基質の合成も、前記合成機序により実現されてよい。これらの変形に関する化学は一般に、図8及び9に示されたエクスパンドマー種の部類(genera)に適用可能である。本発明者らはここで、レポーター構築物を伴うエクスパンドマーの遺伝情報をコード化する戦略及び運搬則を考える。

#### 【0240】

(レポーター構築物及びレポーターコード戦略)

50

「レポーターコード」は、特定のレポーター構築物のレポーター内に組織化されている特定のシグナル又はシグナル配列のデジタル表示である。「レポーター構築物」は遺伝子外情報の物理的顕在化であるが、このレポーターコードは、そのデジタル同等物である。

デジタルコード化は、ある規則に従うレポーターコードを必要とする。例えば、4merエクスプローブライブラリーの可能性のある組合せ全てを同定するためには、少なくとも256種のレポーターコードが必要とされる。可能性のあるレポーター構築物組合せよりもより多いレポーターコードを有することは、ギャップタグ付け、位置情報の提供、又はパリティエラー若しくは高次エラーの同定などの他の目的のために余分な状態を使用することができるので、利点である。

#### 【0241】

レポーターコードを物理的に提示するために、数多くの戦略を考慮することができる。本テザーは、1つ又は多数のコード可能なセグメントへ分割されることができ、その各々は、エクスパンドマー集成の前後いずれかに標識されることができ、標識されたテザー構築物セグメントの可変性のシグナルレベル(標識の量)、長さ(シグナルの持続期間)、及び形状を使用し、コーディングの選択肢を増大することができる。コーディングは、多重化可能な(multiplexable)標識の使用により拡張することもできる。例えば質量タグ標識法を使用し、スペクトル的に個別のタグの広範なライブラリーを単独のレポーターセグメントを独自にコード化するために使用することができ、単独のテザー構築物セグメント上でクラスター化された3種のタグの組合せにおいて使用される14種の個別の質量タグは、364種の独自の3-質量スペクトルを生じるであろう。マルチ-セグメント化されたテザーに 20  
関して、ほとんど又は全てのテザー骨格を標識しているポストエクスパンドマー集成体は、該エクスパンドマーの剛性を増大する追加の恩恵を有することができ、これは検出の操作をより容易にしかつ安定性を改善する可能性がある。

#### 【0242】

図36A(及び同じく図2A)は、エクスプローブ又はエクスマーの単独のレポーターセグメントを伴うテザーを図示している。このアプローチは、質量分析タグなどの高度に多重化可能なレポーター標識から恩恵を得、スペクトル的に個別のアウトプットの広範なライブラリーを作製する。切断可能な質量タグは、正確な質量スペクトルを作製するために、最小値のイオン化状態へと容易にイオン化することができる切断可能なレポーターの分子又は分子複合体である。慎重に制御される場合、質量分析計は、わずか数百のそのような質量タグレポーターを検出することができる。このレポーターコードの例は、コード状態を 30  
決定するために、テザー骨格上のレポーターの位置情報を必要としない(しかし位置情報は、ひとつのレポーターコードを次のものから識別するためには必要である)。この特徴は、テザー構築を簡略化し、かつテザー長の必要性を潜在的に短くする。

#### 【0243】

一実施態様において、切断可能な質量タグ標識を使用し、長くされたエクスパンドマーは、ナノ細孔イオン給源を介した検出(エレクトロスプレーイオン化、大気圧化学イオン化、光イオン化)、又は表面沈着(surface deposition)(ナノ櫛、ナノチャネル、層流、電気泳動など)、それに続くレーザー、イオンビーム若しくは電子ビーム給源による脱離イオン化(マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)、脱離エレクトロスプレーイオン化(DESI)、シリカ上の脱離イオン化(DIOS)、二次イオン質量分析(SIMS))による検出のため 40  
に提示されることができ。

#### 【0244】

2つの検出状態(「1」及び「0」)を持つ9-ビットテザー構築物の例は、512種のコードアイデンティティをもたらす、これは図36Bに説明されている。一実施態様において、テザー構築物は、コールドター式ナノ細孔検出器で測定される電気インピーダンスの2つのレベルを生じるセグメント「1」及び「0」からなる。第二の実施態様において、テザー構築物は、導電性セグメント「1」及び非導電性セグメント「0」からなる。第三の実施態様において、テザー構築物は、蛍光セグメント「1」及び非蛍光セグメント「0」からなる。複数の異なるレポーターエレメントを、この種のコーディングのために考慮することができる 50

。これらのアプローチのいずれかのために、テザー集成体及びプローブ付着化学が同定されることができ、レポーターセグメントの組成のみが変更される必要がある。この単純なフォーマットにより、標識は、エキスパンドマー集成の前後いずれかに行うことができる。標識されないレポーターセグメントは、著しく重量感が少なく (less massive)、従って完全に標識されたレポーター構築物よりもはるかに高い濃度で使用できるので、後標識が望ましい。この戦略に応じて、ポリマーセグメントは、(1) 共役可能な又は反応性表面化学 (例えば、ポリ-リジン、ポリ-グルタミン酸) を介してコードされるか、(2) 非反応性 (例えば、PEG、低反応性ポリマー) であるか、又は (3) 反応性ポリマー及び非反応性ポリマーの両方の混合物であることができる。反応基は、第一級アミン (-NH<sub>2</sub>)、カルボキシル (-COOH)、チオール (-SH)、ヒドロキシル (-OH)、アルデヒド (-CHO)、及びヒドラジド (-R-N-N) 部分を含むが、これらに限定されるものではない。反応性セグメントの標識は、反応基の脱保護を含んでよいが、これはエキスパンドマー中間体の形成後、エキスパンドマーを作製するための骨格切断後、又は最良の結果を生じるのに適するよう SBX プロセスの任意の他の時点で、基質構築物に対し直接行われることができる。

#### 【0245】

追加のレベルは、図36Cに示されたように可能である。例えばバイナリーの指向性の (非対称レポーター構築物) コーディング戦略は、4種の塩基基質に関する最低でも必要とされる256コード (キャップ形成セグメントがコードされる場合には512コード) を作製するために、少なくとも8つのレポーターコーディングセグメント及び9番目のセグメントとして、コード可能なキャップ形成セグメント (テザーループ閉鎖のため及び可能な中心の基質構築物ランドマークとして) を必要とする。

#### 【0246】

図36Dに目を移すと、各レポーターは3種の検出状態を持つ7-ビットレポーター構築物が示され、2187の検出可能なコードアイデンティティを生じる。柔軟なポリマースペーサーの使用は、立体的理由のために使用されてよい。

図36Eにおいて、先の7-ビットレポーター構築物の剛性の同等物が示されている。

#### 【0247】

図36Fは、1セグメントにつき合計8の個別の状態又は標式の組合せを持つ剛性の4-セグメントテザー構築物の例を説明している。テザー構築物セグメントの3つを標識するために標識組合せの7つを使用すると、343の独自のコードアイデンティティを生じ、かつサブユニット境界の同定、パリティ、又は他の機能的目的のために利用可能なセグメントが1つ残る。この実施態様は、1~3種の異なる標識が、各セグメントに取り込まれ、様々なレポーター型及びレポーター構築物化学の組合せが意図されている図37に示されたように、1セグメント当たり少なくとも8の独自の組合せを生じる混合式標識法を使用することができる。質量タグ及び蛍光標識の選択肢は、とりわけ、説明されたように利用されることができる。エキスパンドマー集成後のテザー構築物の標識は、図37に説明されたような3つのクロスリンカー部分の存在量及びアイデンティティにより指示される。回折限界及び近接場測定の実用技術を使用することが望ましい場合、テザーセグメント長は、回折限界測定について100~1000nmの桁、又は近接場測定について<100nmであることができる。他の検出方法のために、より短いテザーを使用することができる。

#### 【0248】

1セグメントにつき合計22の個別の標式組合せを持つ剛性の3-セグメントテザー構築物が、図36Gに説明されている。テザー構築物セグメントの2つを標識するために図37に説明された21の標識組合せを使用すると、441の独自のテザー構築物アイデンティティを生じ、かつエキスプローブサブユニット境界の同定のために利用可能な1セグメントを残す。この実施態様は、1~3種の異なる標識が、各セグメントに取り込まれ、1セグメント当たり最大22の独自の組合せを生じる (図37) ことができる混合式標識法を使用する。質量タグ及び蛍光標識の選択肢は、とりわけ、本実施態様のために利用されることができる。図37に説明されたように、エキスパンドマー集成後のテザー構築物の標識は、3つの化学部分の存在量及びアイデンティティにより指示される。

## 【0249】

反応基の存在量及び空間寸法(ポリマー骨格からの半径距離)が変動することができるレポーター/テザーセグメントをデザインすることにより、少なくとも下記の3種の総コード状態が可能であるコーディングレベルを実現することができる：高度「2」、中等度「1」、及び低度「0」(図36H)。他方で、3種の標識、2つのレベルのコーディング戦略(すなわち1レポーターにつき21状態)は、441のコードを生じるためにわずかに2つのレポーターコーディングセグメントを必要とし、かつコード配向のために追加のセグメントを使用することができる(図36I)。

## 【0250】

レポーターコーディングは、いくつかのアプローチを使用して、レポーター構築物及び関連した検出技術に固有のエラーを低下するようにデザインすることができる。ナノ細孔コールドター式検出の場合、エキスパンドマーが細孔を通過する速度及びそれが引き起こす電流変動は、細孔内のエキスパンドマー部分の電荷状態、電解質濃度、ナノ細孔表面の電荷状態、印加電圧、エキスパンドマー移動を制限する摩擦作用、及びエキスパンドマーとナノ細孔の両方の相対寸法を含むが、これらに限定されるものではない多くの要因によって左右され得る。この速度が予測可能でない場合、電流変動の解釈は、レポーター測定値の割当を解決するために、時間(及び定速度)を利用することができない。ひとつのコード化実施態様は、3状態コード化を使用し、この問題点を解決する。レポーターのシグナルは、標識がナノ細孔を通り電解質伝導度を引き起こすインピーダンスである。レポーターに関するインピーダンスの3種の可能性のあるレベルを提供することにより、1ビットの情報、次の標識への転換(transition)によりコードされる。デザインにより、この転換は常に、他の2つの状態の1つへの変化である。これら3つの状態が標識されたA、B及びCである場合、レポーターの配列は、2つのA、2つのB、又は2つのCを一緒に有さない。この方法において、情報は、レベル転換でコード化され、従ってナノ細孔を通る速度とは無関係である。ひとつのコード化スキームは、AからB、BからC、及びCからAの全ての転換に値「0」を割当てるとのに対し、転換BからA、CからB、及びAからCは、値「1」に割当てられるものである。例えば検出された配列ABACBCAは、0,1,1,1,0,0と解釈される。

## 【0251】

タイミングは逐次標識を信頼できるように解決することはできないが、これは単独のテザー構築物上の標識配列の、次の逐次的テザーの標識配列の分離を識別するには十分であることができる。レポーター標識配列のいずれかの末端での(基質構築物付着点での)追加のスペーサーテザー長さは、時間内にテザー構築物のコードを描写する大きいタイミングギャップを提供することができる。

## 【0252】

そのようなタイミングが不十分である場合、フレームシフトエラーが発生し得る。フレームシフトエラーは、検出器が、多数のテザー構築物コード(フレーム)からの一連の標識は読みとるが、コードのスタート(フレームのスタート)を正確に描写しない場合に、生じる。これは誤ったコードを生じる。これを解決するひとつの実施態様は、対応する塩基配列(これは典型的には1~4塩基長である)を同定するのに必要な数よりもより多くのコード内のビット数の追加である。例えば4塩基配列を独自に同定するためには、8塩基が必要とされる。各2ビット対は、単独の塩基を説明している。各塩基に関するパリティビットを追加することにより、このテザー構築物コードは、12ビットに増加される。高いパリティエラー率(ほぼ50%)は、誤った状態変化から生じるフレームシフトエラーを示している。誤った状態変化に加え、このナノ細孔検出技術において生じ得る別のエラー型は、読み違い状態のエラーである。単独のレポーターエラーは、パリティビットを使用し、特定の塩基に対し分離されることができ、その後値「不明の塩基」を割当てられることができる。

## 【0253】

電氣的にインピード、導電性又は蛍光のいずれかのセグメントを用い標識されたエキスパンドマーは、様々なナノ細孔、ナノ櫛、又はナノチャネルフォーマットを用い、溶液中で測定することができる。あるいはこのエキスパンドマーは、とりわけ、ナノ櫛、ナノチ

ャネル、層流又は電気泳動沈着法を用い、空間的に別個の線状のポリマーとして表面沈着されることができる。溶液法のように、表面伸長されたエクスパンドマーの直接検出は、標識されたテザーセグメントのシグナル特性を測定することにより実行することができる。沈着物質の組成(伝導性、絶縁性)及び下側にある基質(伝導性、絶縁性、蛍光)に応じて、様々な検出技術を、標識検出のために考慮することができる。

#### 【0254】

(更なるSBX法)

クラスI-Vオリゴマー性基質構築物を使用する数多くのSBX法が、先の図面において図示されている(図11-17、20、21、24)。本発明者らは、ここでこれらのプロトコルを補充する任意の方法を考察する。

#### 【0255】

(末端官能基化)

図38は、標的末端アダプターの調製及び使用を図示している。図38Aは、二官能性の共役可能な末端(「L1」及び「L2」)及び酵素的にライゲーション可能な末端(5'リン酸及び3'-OH)を持つアダプターを形成するための、二重鎖化された末端官能基化された相補的オリゴヌクレオチドを図示している。これらのアダプターは、追加の官能性を伴うようにデザインすることもできる。例えば図38Bに示されたように、入れ子式の骨格クロスリンカー(「L3」)及び切断可能な結合(「V」)を持つ末端官能基化されたアダプターを合成することができる。簡略化のために、切断可能な結合Vは、エクスパンドマーを解放又は拡張するために使用されるものと同じ切断可能な結合化学(又は酵素学)であることができるが、独立した切断工程間で識別することが望ましい場合には、他の切断可能なリンカーを利用することができる。図38C及び38Dは、図38Bの多官能性アダプターの構築工程を示す。示されたように、各アダプター鎖に相補的な表面テザー化されたオリゴヌクレオチドを伴う磁気ビーズ(2種の異なるビーズ混合物)を使用し、異なるように修飾されたオリゴヌクレオチドセグメントを集成することができる。一旦集成されると、セグメントを酵素的にライゲーションして、アニールされたセグメントを共有的に連結することができる。本アプローチにより、各セグメントは、標準オリゴヌクレオチド合成に利用可能でない方式で、個別に修飾されることができる。

#### 【0256】

前記エクスパンドマーの操作は、効率的な試料の提示及び検出に有用であることができる。例えば終端親和性標識を使用し、電気泳動的に伸長ができるように、エクスパンドマーの一方の末端を選択的に修飾することができる。3'又は5'末端のいずれか(両方ではない)への嵩高で電荷中性の修飾因子の付着は、エクスパンドマー上で電気泳動的牽引(drag)を生じ、検出器へと移動する際に、非修飾末端が伸長されることを引き起こす。非限定的にマイクロビーズ、ナノ粒子、ナノ結晶、ポリマー、分岐ポリマー、タンパク質及びデンドリマーを含む末端修飾因子を使用し、その終端に独自の示差的特性を、いくつか例をあげると電荷(+/-/中性)、浮力(+/-/中性)、疎水性、及び常磁性などを付与することにより、エクスパンドマーが検出器に提示される構造(伸長)、位置、及び速度に影響を及ぼすことができる。提供された例において、末端修飾は、エクスパンドマーが伸長することを可能にする牽引力を生じる；しかし、この末端修飾がエクスパンドマーを検出器に向けて又は検出器を通り引っ張るために使用される場合には、反対の戦略も利用することができる。このアプローチにより、末端修飾因子の引っ張り、エクスパンドマー伸長を促進する。テンプレート鎖上の末端アダプターは任意に、完成されたエクスパンドマーにおけるフレーム登録及びバリデーションのシグナルを合成するために使用される核酸を1種以上含んでもよい(図54参照)。

#### 【0257】

親和性修飾因子の取り込みは、エクスパンドマー合成(ハイブリダイゼーション、ライゲーション、洗浄、切断)の前、途中又は後のいずれかで行うことができる。例えば、アダプター配列に相補的である終端に親和性タグを付けたプライマーは、エクスパンドマー合成前に、高度に特異的条件下で、ssDNA標的に予備負荷されることができる。このプラ

10

20

30

40

50

イマー及びその親和性タグは、完全長エクスパンドマーへ取り込まれ、かつその末端を選択的に修飾するように使用されることができる。可能性のあるより洗練されたアプローチは、末端修飾因子の酵素的取り込みである。例えば末端転移酵素(TdT)は、1本鎖又は2本鎖DNA分子の3'ヒドロキシル末端へのデオキシヌクレオチドの付加を触媒するテンプレートとは無関係のポリメラーゼである。TdTは、修飾されたヌクレオチド(ビオチン)を3'末端へ付加することが明らかにされている(Igloiらの論文「DNA配列決定及びPCRに適したプライマーを生じるオリゴヌクレオチドへのフルオレセイン-又はビオチン-riboUTPの酵素的付加(Enzymatic addition of fluorescein- or biotin--riboUTP to oligonucleotides results in primers suitable for DNA sequencing and PCR)」、BioTechniques 15, 486-497, 1993)。多種多様な酵素が、この目的に適しており、RNAリガーゼ、DNAリガーゼ、及びDNAポリメラーゼを含む(しかし限定されない)。

10

#### 【0258】

図38E及び38Fにおいて、ヘアピンアダプターが図示されている。ヘアピンアダプターは、自己-プライミングするテンプレート鎖を生じるための、平滑末端のライゲーションにおける使用が認められる。本アプローチのひとつの利点は、娘鎖が、テンプレート鎖に共有的に共役され続け、かつ融解後より迅速に再アニールされ、ライゲーションされていない材料及び低分子量断片を除去することである。図38Fに示されたように、これらのアダプターは、精製又は下流での取り扱いのために、包埋された予め形成されたリンカー官能性を含むことができ、かつエクスパンドマー娘鎖のより効率的収集のための切断部位も含むことができる。

20

#### 【0259】

(標的テンプレートの調製及び解析)

エクスプローベースのSBX法を使用する長い連続したDNAの全ゲノムの配列決定を実行するために、DNAは、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、必要ならばギャップ充填、拡張及び測定のために操作可能な形で調製されると推定される。このエクスパンドマー集成プロセスは、一部の実施態様において、(1)複雑性及び交差ハイブリダイゼーション作用を減少するため、(2)洗浄を改善するため、(3)改善されたハイブリダイゼーションを促進するよう標的的操作(伸長)を可能にするため、及び/又は、(4)ナノ細孔センサーが使用される場合、検出プロセスとの継ぎ目のないインターフェイスを提供するために、DNA標的の表面固定により改善される。以下に詳細に説明されるように、標的テンプレートの調製、解析及び表面付着の方法は、データの品質及び配列集成を改善すると予想される。

30

#### 【0260】

ほとんどの全ゲノム配列決定法は、標的ゲノムのより操作可能な小片への断片化を必要とする。ヒトゲノムにおける最大染色体(染色体1)は、~227Mbであり、最小染色体(染色体22)は~36Mbである。本明細書に説明されたほとんどの高度にプロセッシブでかつ連続した実施態様に関して、36Mbの連続した配列決定は、高効率で配列決定される長さからはほど遠い。しかしSBXに固有の長いリード長的能力を利用し、>1kbのDNA断片長が標的化される。従って数多くの戦略を利用し、ゲノム断片化を実現し、本明細書に開示されたようなSBX法と適合性があるDNA標的セットを調製することができる。

40

#### 【0261】

一実施態様は、全ゲノムの1~10Kb小片(平均5Kb)への断片化に関連している。これは、制限酵素によるか又は流体力学的/機械的剪断によるかのいずれかにより実行することができる。その後これらの断片は、平滑末端化され、配列アダプター(「SA」)又は配列アダプター-デンドリマー(「SAD」)構築物への平滑末端ライゲーションのための調製において修復される。SA又はSAD構築物の非平滑末端は、該アダプターの多量体集成を防止するために、ライゲーションが不可能であるようにデザインされる。存在する任意のSA又はSADにライゲーションされた標的は、遊離のアダプターからアフィニティ精製で分離されることができる。この時点で、捕獲デンドリマーが該SA構築物に導入されない場合はライゲーションが行われ(効率的に過剰なデンドリマーを使用し)、引き続き精製し、標的-SAD複合

50



体を単離することができる。一旦精製されると、この複合体は、アッセイ表面へ容易に付着される。この目的のために、1つの反応位置につき1つの標的複合体のみが付着されることが望ましい。あるいは捕獲デンドリマーは、アッセイ表面と代わりに会合されることができ、この場合精製された標的-SA複合体は、既に位置されかつ該表面へ共有的に付着されたデンドリマーへ直接付着されることができる。表面上のDNA標的集成の同様の方法は、Hongらの論文(「ナノスケールで制御された表面上のDNAマイクロアレイ(DNA microarrays on nanoscale-controlled surface)」、Nucleic Acids Research, 33(12): e106, 2005)に明らかにされている。

#### 【0262】

「解析」法と称される別のアプローチは、ゲノムの0.5~5Mb小片への粗い断片化(稀に切断する制限酵素の使用又は流体力学的/機械的剪断による)、引き続きのそのような断片の、遺伝子/遺伝子座特異的オリゴヌクレオチド捕獲プローブで構成された修飾されたマイクロアレイ(又は分割された表面)への捕獲に関連している。慣習的マイクロアレイ及びオリゴヌクレオチド捕獲プローブのセットは、多くの商業的供給業者(ArrayIt社、Euorfin-Operon社、Affymetric社)から広く入手することができる。この追加の解析は、後の(backend)配列集成のための利点を提供することができる。これらの大きい断片の捕獲は、捕獲プローブを特異的標的DNAと結合又は二重鎖化させるための、部分的又は完全な標的変性のいずれかに関連している。非特異的ハイブリダイゼーションを減少するためには、テンプレート間の交差ハイブリダイゼーションを防ぐよう、希釈された条件下で捕獲アレイを負荷することが必要である。

#### 【0263】

線状ゲノム分解能~3Mbを提供するために、大きい表面上に整列され得る各々分割された捕獲プローブセットがデザインされている。効率的ゲノム解析を提供するために、各々個別の捕獲プローブセットは、0.5~1.5Mb毎にゲノム上で線状に分離された、3~5の遺伝子/遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドで構成されることができる。この捕獲プローブは、標的断片に対し完全に独自であるように選択され、その結果この方法に特異性及び冗長性の両方を提供する。3Gbゲノムの3Mb分解能を考えると、本アプローチは、およそ1000の遺伝子/遺伝子座特異的プローブで構成された捕獲アレイが必要である。マイクロアレイ対応のヒト遺伝子標的に特異的なオリゴヌクレオチド捕獲プローブセットは、標準規格品が広く入手可能である(Operon Biotechnologies社、ハンツビル AL, 米国)。

#### 【0264】

一旦非特異的結合事象が洗浄除去されると、次に各捕獲アレイは、非解析法に関して先に考察されたものと同じ様式でゲノム調製プロセスの残りの独立した反応として進むことができる。主な違いは、標的試料はここでSBXアッセイ表面上で又は個別の溶液ベースの反応として位置的に解析されることができ、従ってデータ取得後配列集成の複雑性を低下するということである。

#### 【0265】

別の実施態様は、テザー化されないエクスポーズ標的のハイブリダイゼーション及びエクspandマー生成を有することである。この場合、SBXアッセイは自由溶液中で実行される。このアプローチは、例えばプローブハイブリダイゼーション及びライゲーションの前又はその期間中に標的DNAを伸長する手段として、並びに検出前に切断されたエクspandマーを延長又は拡張する手段として、静止条件又は層流条件下での電気泳動、磁気、牽引タグ、又は正/負の浮力の末端官能性などの、物理的操作のひとつ又は組合せを使用することができる。固定化を伴わないエクspandマーの自由溶液合成は、ポリメラーゼ及びリガーゼ(プライマーを伴う又は伴わない)を用いて行うことができ、かつ化学ライゲーション法を用いても行うことができる。三リン酸基質構築物及び一リン酸基質構築物の両方を使用することができる。複数の及び混合された核酸標的からのエクspandマーの同時合成が考えられる。一般に、三リン酸基質構築物は、溶液中で連続してプロセス重合することが可能であり、かつ例えば自由溶液中で集中的に平行して単分子配列決定するための、単チューブプロトコールに適合することができる。

## 【0266】

(核酸標的の表面集成)

配列決定のための標的核酸の調製方法のひとつは、図39に示されたような、末端官能基化された2本鎖化DNA標的を使用する。この例に関して、各アダプターは典型的には、例えばスクシンイミジル4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン(SANH)連結化学及びアミン修飾された末端アダプターオリゴヌクレオチド二重鎖を使用する、更なる処理に有用なANH基(反応性ヒドラジド)を備えている。同様にアミン反応性SANHを使用し、反応性ヒドラジド部分を作製することができる。SANHは、アルデヒド様4-ホルミル安息香酸エステル(4-FB)と容易に共役し、安定したヒドラゾン共有結合を形成する。アミン反応性C6-スクシンイミジル4-ホルミル安息香酸エステル(C6 SFB)を使用し、反応性ベンズアルデヒド部分を生成することができる。末端官能基化された相補的オリゴヌクレオチドは二重鎖化され、二官能性共役可能な末端(SANH及びアミン)及び酵素的にライゲーション可能な末端(3'OH及び5'リン酸エステル)を形成する。アダプターのライゲーションは、表面にテザー化されたアルデヒド基に架橋されることができる末端官能基化されたdsDNA標的を作製する。図39は、SANH及びアミン修飾された末端アダプターオリゴヌクレオチド二重鎖を用い官能基化されたdsDNA標的末端を図示している。

10

## 【0267】

多くの説明されたSBX法に関して、核酸標的は、平坦なコートされた固形支持体(ステンレス鋼、ケイ素、ガラス、金、ポリマー)へ共有的にテザー化されてよい。図40に説明されたように、標的付着点は、SAM単層の4FB誘導体化により作製することができる。この方法は、図39のANHアダプターを使用し、図40の工程Iにおいて、ANHは、単層の4FBヘッドと反応され、かつこのテンプレートが変性される(工程II)。同じく末端標識されたテンプレートの他方の鎖は分離反応において捕獲され得る。工程IIIにおいて、1本鎖化されたテンプレートの3'末端の遊離アミンは次に、例えばここでは浮力ビーズとして示されたビーズと反応され、その結果この標的テンプレートは伸張されることができる。これらの捕獲複合体は、末端官能基化されたポリマーの化学量論的に釣り合いのとれた混合物のランダム自己集成(例えば、標的付着に関してチオール-PEG-ヒドラジド；自己集成された単層「SAM」キャップ形成に関してチオール-PEG-メトキシ)によるか、又はリソグラフ技術を使用する空間的に分解された反応性付着点のパターンニングによるかのいずれかにより、集成されることができる。パターン化されたリソグラフ法は、一定間隔の標的付着点を生じるが、これは単独の分子付着を行うのは困難であるのに対し、ランダム自己集成法は、恐らくより多様な標的付着間隔を生じるが、高い割合で単独の分子付着を有するであろう。広範な一官能性、二官能性、及びヘテロ二官能性クロスリンカーが、様々な商業的供給業者から市販されている。クロスリンカーと互換性のある一官能性、二官能性、及びヘテロ二官能性ポリマー(ポリエチレングリコール、ポリ-L-リジン)も、多種多様な商業的供給業者から市販されている。

20

30

## 【0268】

表面 $100\text{cm}^2$ 上の標的10億個のDNA標的密度は、標的面積 $10\mu\text{m}^2$ あたりの平均を必要とするであろう。この範囲の標的の間隔は、5000塩基長の標的核酸でテザー化されたビーズ(100~1000nmビーズ直径；5Kb dsDNA =  $1700\mu\text{m}$ )の著しい交差反応を防ぐのに十分な標的の分離を提供する。標的及び/又はビーズ(>1ビーズ/標的)の交差反応性が許容できないほど高いことが決定された場合には、標的面積は、容易に拡張することができる。

40

## 【0269】

(ビーズ又はナノ粒子を使用する標的伸長)

図40に示されたように、標的DNAの自由端でテザー化されたビーズ又はナノ粒子(400)を利用し、例えばエクスプロブライブラリーハイブリダイゼーション時に、伸長し、及び標的をその1本鎖化された高次構造内に保持することができる。伸長された高次構造内の標的の保持は、より低い温度で形成する標的分子内の二次構造の頻度及び安定性を有意に低下する。二次構造の影響の低下又は更には除去は、効率的で高い忠実度の基質構築物集成を促進する。

50

## 【0270】

1本鎖化された標的への伸長力の適用に関する様々なアプローチが使用されてよい。例えば、常磁性ビーズ/ナノ粒子/ポリマーは、制御された方向性のある表面テザー化された標的へ伝えるための磁界の使用を可能にする。更に磁力線の方法を制御することにより、常磁性ビーズ/粒子は、洗浄工程時に基質表面上のエクスプローブ負荷された標的をガイド及び保持するために使用することができる。この表面に沿って標的を隔離することにより、剪断力に起因した標的の喪失は最小化することができる。磁界伸長の代替として、各々水よりも大きい又は小さい密度のいずれかである正及び負の浮力のビーズ/粒子を使用し、伸長力を提供することができる。全てのビーズ/粒子は、非特異的相互作用(ビーズ凝集、プローブ結合)を最小化するために必要に応じ表面がコートされ、かつアダプター修飾された標的への共有的架橋を可能にするために、官能基化される。

10

## 【0271】

図41Aから41Dは、代表的ビーズベースの標的伸長戦略を図示している。外部磁界(B)に引きつけられた末端テザー化された常磁性ビーズ/粒子を使用する標的伸長は、図41Aに図示されている。外部磁界に引きつけられた末端テザー化された常磁性ビーズ/粒子を使用する基質表面上の標的隔離(標的の剪断を低下するために)は、図41Bに図示されている。図41C及び41Dは、各々、末端テザー化された負の浮力のビーズ/粒子(水よりも高い密度)及び正の浮力のビーズ/粒子(水よりも低い密度)を使用する、標的伸長を図示している。標的の反対末端を官能基化するために、末端テザー化された部分を使用する、例えば正及び負の両方の浮力のビーズを使用する標的伸長のための自由溶液法は、標的の二次構造を減少するための洗練された代替を提供する。

20

## 【0272】

エクスパンドマーの調製におけるこれらの伸長戦略の使用は、図41Eに図示されている。ここで工程Iにおいて、固定されたテンプレート(416)は、アダプタープライマー(417)を介して標的に対し二重鎖化された浮力ビーズを用いて伸張される。次にこのテンプレートは、工程IIにおいて、基質構築物と接触され、これらは次に1本鎖化された標的にライゲーションされ、特徴的プローブ-ループ構築物並びに一方はポリヌクレオチドの主要骨格により及び他方は拘束されたエクスパンドマー骨格による2つの骨格を伴う、2本鎖化されたエクスパンドマー中間体(411)を生じる。工程IIIにおいて、このテンプレート鎖は変性され、かつ工程IVにおいて、1本鎖化されたエクスパンドマー中間体は、主要骨格内の選択的に切断可能な結合で切断され、ループがほどけ及び完全に伸長された代理骨格を伴うエクスパンドマー産物(419)の伸長を生じる。

30

## 【0273】

(ポリマー末端修飾を使用するDNA標的伸長)

図40に説明された方法の代替は、標的を伸長するために、表面テザー化されたDNA標的の自由端に共有的に連結された長い官能基化されたポリマー(ビーズの代わりに)を使用する。多孔質基質を通るポリマー末端修飾の電気-伸展及びスレッド化、それに続く基質内のポリマーの捕獲(隔離)は、二次構造が著しく自由な完全に伸長された1本鎖化された標的DNAを生じる。図42Aは、この方法を図示しており、これは基質内の細孔を通る標的鎖のスレッド化を示している。多孔質基質は、ゲルマトリックス、多孔質酸化アルミニウム、及び多孔質メンブレンを含むが、これらに限定されるものではない。完全に伸長されたポリマーの捕獲は、制御された化学官能基化により実現することができ、ここではポリマーの多孔質基質への架橋又は結合は、標的の完全な伸長後選択的に開始することができる。様々な架橋又は結合戦略が利用可能である。例えばカルボキシル官能基化された伸長されたポリマーのアミン官能基化された多孔質基質への架橋は、架橋剤1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC)の導入により実現することができる。

40

## 【0274】

更なる実施態様は、図42Bに図示されており、これはポリマーの、該ポリマーへ架橋するか又は結合する官能基化された表面への電気伸展である。この場合このポリマーは、基質を通りスレッド化される必要はないが、代わりに該表面上の官能基に架橋又は結合する

50

。このアプローチに関して、基質は、ゲルマトリックス、多孔質酸化アルミニウム、多孔質メンブレン、及び非孔質導電性表面様金を含むが、これらに限定されるものではない。多孔質及び非孔質の両方の基質は、標準規格品の架橋化学(ヒドラジド-アルデヒド；金-チオール)又は結合化学(ピオチン-ストレプトアビジン)を用いて官能基化されることができる。

#### 【0275】

代替として、帯電されたポリマーセグメントを捕獲するために変動する(高、低、基底)電界領域を使用する、筐体に収められた(enclosed)電氣的ゲート開閉システムを使用することができる。この方法は、図42Cに図示されており、これはポリマー及び標的DNAをその伸長された位置に保持するために使用することができる、ファラデー箱型筐体を作製する。このアプローチは、電界の効果的分割又は封じ込めを必要とし、かつゲート開閉パラメータを修飾することにより調節可能な標的伸長(SBX合成を通じて)を可能にする利点を有する。ファラデー箱の外側での基質構築物に対する電界の影響は、最小である。

#### 【0276】

関連した方法において、弾性が低い標的核酸へ一定の伸展力を伝えるために、弾性ポリマーが使用される。この方法は、磁気ビーズ、浮力変形、密度変形(重力)、又は電気伸展を含む、ここに説明された伸長方法のいずれかへの補充として使用することができる。該ポリマー内に蓄えられた弾性力は、より一貫した緩衝された伸長力を標的鎖へ提供する。

#### 【0277】

(電気直線化(electro straightening)によるゲルマトリックススペースの標的基質)

図43Aにおいて、1本鎖化された標的DNA整列(固形支持体への付着に対し)の代替法を示しており、ここでこの標的は、篩ゲルマトリックス(430)へ共有的に付着される。図43b(挿入図)において、基質構築物は、まっすぐ伸展されている係留されたテンプレートに会合しているように見える。電界を標的伸長及び基質構築物提示に使用することができる。このアプローチは、標的密度及び標的伸長(電気直線化)の点で、DNA標的アレイに関して他の方法に勝る利点を有する。例えばDNAを、アクリレート修飾された末端アダプター(オリゴヌクレオチドへ付着された)を介してアクリルアミドへ架橋することは、慣習的に行われている。Acrydite(商標)は、利用可能なホスホロアミダイトであり(Matrix Technologies社、ハドソン、NH、米国)、これはメタクリル5'末端修飾をオリゴヌクレオチドへ取り込むために広範に使用されており：Acrydite基内の二重結合は、アクリルアミドの活性化された二重結合と反応する(Kenneyらの論文「電気泳動及びゲル固定されたAcryditeプローブを使用する変異タイピング(Mutation typing using electrophoresis and gel-immobilized Acrydite prpbcs)」、Biotechniques, 25(3):516-21, 1998)。アミン官能基化されたアガロースも、標準規格品で入手でき(G Biosciences社、セントルイス、MO、米国)、これも同様に標準規格品のアミン反応性架橋化学を使用し、DNAへの架橋に使用することができる(Spagnaらの論文「アミンアガロースゲルへ結合することによるアスペルギルス・ニジェール由来の $\alpha$ -グルコシダーゼの安定化(Stabilization of a  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel)」、J. of Mol. Catalysis B: Enzymatic 11(2,3): 63-69, 2000)。

#### 【0278】

先に説明された固形支持体付着法のように、DNA断片は、末端アダプターで有用に官能基化され、例えば5'-Acrydite修飾を作製する。標的の均一性を確実にするために、dsDNA標的は変性される(及び変性状態で維持される)一方で、篩マトリックスに架橋する。標的は、尿素、アルカリpH、及び熱融解を含むが、これらに限定されるものではない様々な現存する技術を用い、変性されることができる。一旦ゲルマトリックスへと架橋されると、変性された標的DNAは、好適な電界の適用によりまっすぐにされ得る(電気泳動に類似)。厳密な温度管理、ハイブリダイゼーション適合性溶液の添加を伴う、ゲルマトリックス内のこれらの変性剤の拡散、電気泳動、及び中和は、基質構築物ハイブリダイゼーションを実行する環境を提供する。例えばエクスポーズは、電気泳動によりテザー化された標的へ連続して提示されることができる。このフォーマットは、プローブの再利用を可能にし

、かつエクスプローブ流量を超える良好な制御を提供する。

【0279】

ゲルマトリックスアレイ5mm×50mm×20mmの標的密度は、反応容積 $5.0 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$ を生じ、これは平坦な表面上に整列される場合よりも実質的に大きい。図43Cは、アシルアミド、ビス-アクリルアミド、及びAcryditeオリゴヌクレオチド末端修飾の化学構造を示す。図43Dは、共有的に付着されたDNA標的を伴うポリアクリルアミドゲルマトリックスを図示している。

【0280】

基質構築物の酵素的プロセッシングは、ゲルマトリックス内で行うことができる。ポリメラーゼ(PCR)及びリガーゼを使用する酵素アッセイは、アクリルアミドゲルパッドに共有的に共役されたオリゴヌクレオチドの修飾のために、慣習的に使用される(Proudnikovらの論文「DNA及びDNA-オリゴヌクレオチドマイクロチップ製造のためのポリアクリルアミドゲル内のDNAの固定(Immobilization of DNA in Polyacrylamide Gel for the Manufacture of DNA and DNA-Oligonucleotide Microchips)」、Analytical Biochemistry, 259(1): 34-41, 1998)。例えばリガーゼは、受動拡散、電気泳動、又は両方の組合せのいずれかにより、ゲルマトリックス内の集成されたエクスプローブ標的へ送達される。広範なマトリックス密度及び細孔サイズが考慮されるが、受動拡散は、相対的に低密度のマトリックス及び大きい細孔から恩恵を受ける。電気泳動によるリガーゼの能動送達は、電荷修飾因子(ポリマー及びデンドリマー)を酵素へ付着し、マトリックスを通るその移動を増強することにより実現することができる。

【0281】

末端修飾され1本鎖化された標的ポリヌクレオチドをゲルマトリックスを通り電気泳動するために、様々なゲルマトリックス法がある。末端修飾を使用し、標的の一端への牽引を引き起こすことができる。ゲルを通り標的を引っ張るために、陽イオン末端修飾が該標的の他端で行われる。標的がゲルマトリックスを通り進む間に、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーに傾斜を付けるか若しくは変更するために、温度勾配又はゾーンもゲルにおいて誘導することができる。酵素的プロセッシングは、ゲルマトリックス内で、又はこのハイブリダイズされた標的-基質複合体がゲルマトリックスを出た後で行われることができる。本プロセスは、所望の平均エクスパンドマー長を作製するために、必要に応じ反復されることができる。

【0282】

図44は、合成後エクスパンドマー操作のための牽引タグの使用を図示している。この牽引タグ(菱形で描かれている)は、伸展及び運搬技術の溶液-同等物として役立つ(Meagherらの論文「両端が牽引タグで修飾されたDNAの自由溶液電気泳動(Free-solution electrophoresis of DNA modified with drag-tags at both ends)」、Electrophoresis, 27(9): 1702-12, 2006)。図44Aにおいて、牽引タグは、1本鎖化されたテンプレートの5'末端上で官能基化されたアダプターヘリンカー化学により付着されている(牽引タグのL1'は、テンプレートのL1に結合する)。示されたこの工程において、基質構築物の段階的付加が既に進行していることが示されている。図44Bにおいて、牽引タグは、相補的アダプターへのアニーリングにより付加される。図44Cにおいて、エクスパンドマーは、リンカー(L1'を伴う小さい四角で示される)を3'-アダプターに付着するように最初に処理され、次に工程IIにおいてリンカー(L1)が、それに牽引タグを付着するために使用される。1本又は2本鎖化されたDNAの3'-OH末端を伸長する末端転移酵素は、ビオチン化されたヌクレオチドなどの、リンカー-修飾されたヌクレオチド三リン酸を重合する。他の酵素も、修飾された塩基又はオリゴマーを付加するために使用することができる。図44Cにおいて、牽引タグは、エクスパンドマー中間体の3'末端に付加される。牽引タグは、ナノ粒子、ビーズ、ポリマー、分岐ポリマー及びデンドリマーを含むが、これらに限定されるものではない。

【0283】

(基質構築物ハイブリダイゼーション及びライゲーションによるギャップ及びギャップ充填)

10

20

30

40

50

ライゲーション法における複数の変種を使用し、ギャップ管理及びギャップ充填に対処することができる。一実施態様において、循環式段階的ライゲーションが使用され、ここではプローブは、標的ポリヌクレオチドへ二重鎖化された表面テザー化されたプライマーから逐次的に集成される。別の実施態様において、基質構築物の「乱交雑」ハイブリダイゼーション及びライゲーションが、一般にプライマーを伴わずに、全標的DNA配列にわたり同時に生じる。

#### 【0284】

循環式及び乱交雑の両ライゲーションアプローチに関して、例えば4mer基質構築物の一部(例えば25%)及び5mer基質構築物の一部(例えば20%)は、ライゲーションを可能にするために、隣接してハイブリダイズすることが可能である。これらの隣接二重鎖のある割合は、測定エラー(ライゲーションされる場合)又はライゲーション失敗のいずれかを生じる、ミスマッチ配列を含むことがある。ライゲーションされないプローブは、次のハイブリダイゼーションラウンド前に除去されるので、ライゲーション失敗(ミスマッチに起因した)のほとんどの場合、因果関係(consequence)を伴わない。このハイブリダイゼーション/洗浄/ライゲーション/洗浄サイクルは、望ましいならば数百回反復されることができる(6分/サイクル=220サイクル/日及び720サイクル/3日間; 10分/サイクル=144サイクル/日及び432サイクル/3日間)。

#### 【0285】

循環式プロセス(図14にエクスプローブで図示)において、エクスプローブは、標的DNAに二重鎖化された表面テザー化されたプライマーの1つの末端から逐次的に集成される; 1サイクルあたり1エクスプローブ。これは、標的リード長が下記の仮説を使用し計算される場合である: 20%完全なプローブ二重鎖忠実度を伴う、25%隣接ハイブリダイゼーション(4merの)は、400サイクル後に、わずかに20の逐次的4merライゲーションを生じるであろう( $400 \times 25\% \times 20\%$ )。これらの仮説を使用し、400サイクルアッセイ(6分/サイクルで1.5日)は、平均生成物長80ヌクレオチドを生じるであろう。

#### 【0286】

乱交雑プロセス(図45にクラスIエクスプローブで図示)において、エクスプローブのハイブリダイゼーション及びライゲーション反応がDNA標的テンプレートを通じて自然発生的かつ同時に生じることができる場合、はるかに長いDNAテンプレートの複製を、はるかに少ないサイクルを用いて達成することができる。ハイブリダイゼーション及び洗浄の各サイクル後、ライゲーションを使用し、両方が隣接しかつ100%正しい(correct)残余の二重鎖を接続することができる。他方、よりストリンジェントな洗浄を使用し、比較的小さいライゲーション生成物(8mer以下は全て; 一部は12mer)に加え、全てのライゲーションしていない4merは除去することができる。1,000~10,000ヌクレオチド標的配列を通じて発生するライゲーション反応により、アッセイの進行性は、劇的に上昇する。エクスプローブのハイブリダイゼーション及びライゲーションのための乱交雑アプローチは、DNA標的テンプレート長とは無関係であるので、標的テンプレートの大半は、本連続方法に必要なサイクルの一部で複製され得る。そのような調節がハイブリダイゼーション/ライゲーション反応の忠実度及び/又は品質を増大する場合、反応速度論の制限を補償するために、より長いサイクル時間を使用することができる。

#### 【0287】

図45は、乱交雑プロセスの逐次的進行を図示している。工程Iは、DNA標的に沿った複数の遺伝子座でハイブリダイズしている4merエクスプローブを図示している。工程IIは、隣接エクスプローブのハイブリダイゼーション及びライゲーションを図示し; ライゲーションされたエクスプローブは安定化され、その結果ハイブリダイズされ続けるが、ライゲーションされないエクスプローブは融解される。工程III及び工程IVは、ハイブリダイゼーション、それに続くライゲーション及びライゲーションされないエクスプローブの熱融解の別のサーマルサイクルを図示している。各サイクルは優先的に、存在するライゲーションされたエクスプローブ鎖を伸長する。工程IVに図示されたように、反復されたサイクルの後、このDNA標的は、プローブ長よりもより短いエクスプローブ脱離ギャップにより飽

10

20

30

40

50

和され、ここで二重鎖化は生じない。エクスパンドマーを完成するために、エクスプローブは、工程Vに図示されたように、酵素的又は化学的手段により、ギャップを超えて連結される。

#### 【0288】

(標準ギャップ充填)

図45の工程Vのエクスプローブで図示されたように、ハイブリダイゼーション及びライゲーション循環プロセスの完了後、配列ギャップは充填され、連続するエクスパンドマーを作製することができる。標的DNA骨格に沿ったギャップは、よく確立されたDNAポリメラーゼ/リガーゼベースのギャップ充填プロセスを用いて充填することができる(Stewartらの論文「反復性ギャップライゲーションによるアレル割合を評価するための定量アッセイ (A quantitative assay for assessing allelic proportions by iterative gap ligation)」、Nucleic Acids Research, 26(4):961-966, 1998)。これらのギャップは、エクスプローブの隣接鎖が互いに向き合い、かつそれらの間に長さ1、2又は3個のヌクレオチドギャップを有する場合に生じる(図45において図示されたように4merクラス1エクスプローブを仮定)。ギャップ充填は、化学架橋を介しても行うことができる(Burginらの論文)。ギャップ充填が完了した後、周期的な1、2又は3個のヌクレオチド充填物を伴うライゲーションされたエクスプローブで主に構成されている、標的DNA相補物(compliment)は、適宜処理され(精製、切断、末端修飾、レポーター標識)、測定可能なエクスパンドマーを作製することができる。SBXアッセイ生成物は、検出工程前にバッチ処理において調製及び精製されるので、検出は効率的であり、かつ任意の並行する生化学処理により律速されない。

#### 【0289】

ヌクレオチド特異的レポーターシグナル由来のギャップを識別するために、修飾されたデオキシヌクレオチド三リン酸(これは既に標識されているか又はアッセイ後標識されることが可能である)を使用し、ギャップ配列を同定することができる。好適なデオキシヌクレオチド三リン酸は、図46A(リンカー修飾された塩基)及び46B(ビオチン修飾された塩基)において図示されている。

#### 【0290】

ギャップの長さ及び頻度は、サイクル回数、ハイブリダイゼーションストリンジェンシー、ライブラリー戦略(ショットガン対化学量論的調節を伴うサブライブラリー)、標的テンプレート長(100b~1Mb)、及び反応密度(0.1~10B)を含む、数多くの合成変数によって左右される。ギャップ頻度及びギャップ長は、最大ストリンジェンシー条件を使用することにより、有意に低下することができ、但しこれらの条件は、特定されたアッセイ時間範囲と適合可能であることとする。標的長及び反応密度も、アラインメントの忠実度及びギャップ充填の確率の両方に関して、重要な要因である。

#### 【0291】

ハイブリダイゼーションの乱交雑プロセスは、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーを改善し、かつ隣接基質構築物アラインメントの頻度を増大するために、サーマルサイクリング法を使用することができる。このハイブリダイゼーション、ライゲーション及び熱融解は、標的配列の大半がプローブと二重鎖化されるまで、慣習的に正確なサーマルサイクリング下で継続する。弱く結合した非特異的プローブ-標的二重鎖は、再度正確な熱制御下で、簡単な洗浄工程により除去することができる。標的DNAに沿って任意の隣接してハイブリダイズされたオリゴマー性構築物を連結し、より長くかつより安定した配列を作製するために、酵素的又は化学的ライゲーションを実行することができる。酵素的ライゲーションは、ミスマッチされたプローブ-標的は効率的にライゲーションされないのので、追加の二重鎖忠実度のクロスチェックを提供するという追加の恩恵がある。正確なサーマルサイクリング条件下で第二の洗浄を使用し、連結されない基質構築物を、DNA骨格から融解除去することができ、より長い中間体が維持されるであろう。より長いライゲーションされた配列は、複製がほとんど完成するまで、標的DNAと共に複数の遺伝子座で成長する。ハイブリダイゼーション/洗浄/ライゲーション/洗浄プロセスは、標的テンプレ

ートの大半が複製されるまで、ゼロから多数回まで反復される。

【0292】

塩基のスタッキングに起因した基質構築物安定性と組合せられた温度サイクリングを利用し、隣接ハイブリダイゼーション事象を濃厚化することができる。「タッチダウンPCR」の概念に類似したサーマルサイクリング条件を使用し、安定性がより低い非隣接二重鎖を除去することができる。例えば、ハイブリダイゼーション温度と上限融解温度(「 $T_m$ 」)の間を繰り返しサイクリングすることにより、隣接プローブハイブリダイゼーション事象のオリゴライブラリーに関する推定(単独プローブ融解により決定される - すなわち塩基のスタッキングは安定化されない)は、積極的に選択され得る。十分な濃厚化効率により、このサイクル数は、有意に低下することができる。これは、単独浴の条件又は多浴条件で実行することができる。

10

【0293】

小さいライブラリーサイズ(例えば4mer基質構築物で、256)により、このライブラリーは、例えより狭い範囲の融解温度であってもこれを基にサブライブラリーに分割されることができる。 $T_m$ バイアスが、塩基修飾、ハイブリダイゼーション溶解補助剤などにより制御できない場合、この戦略は、本方法に顕著な恩恵をもたらすことができる。更にこのプローブの化学量論は、依然ライブラリー/サブライブラリーに存在し得る残留バイアスを補償するために、(上方又は下方)調節されることができる。

【0294】

コンピュータモデリングを行い、ギャップ発生及び標的DNAテンプレート上でハイブリダイズされている連続して接続された基質構築物の長さの統計を評価した。このモデルは、256の4merエクスポーブの完成したライブラリーによるハイブリダイゼーション/ライゲーション-熱融解サイクルをシミュレーションしている。ここに提示されたこのモデルの結果は、下記のモデルプロセスを基にしている：

20

i)このハイブリダイゼーション/ライゲーション工程は、ランダム位置でランダムに配列決定されたDNAテンプレートにランダムに出会い、かつそれらがマッチした場合にハイブリダイズする、ランダム4merエクスポーブをシミュレートしている。エクスポーブは、いずれのヌクレオチドも重複することができない。ハイブリダイゼーションは、3ヌクレオチド長よりも大きい標的上の全ての位置が、ハイブリダイズされるまで続く；

【0295】

30

ii)この熱融解工程は、長さMの4merエクスポーブよりも短い鎖内にある全てのエクスポーブの除去によりシミュレーションされる(ここで $M=2, 3, 4, 5\dots$ )。より長い鎖はDNAテンプレート上に残る。「鎖」はここで、それらの間にギャップを有さない、複数の連続するエクスポーブとして定義される；

iii)このサイクルの反復は、i)及びii)により定義され、その結果エクスポーブは、マルチ-エクスポーブ鎖の存在する遺伝子座でランダムに崩壊(build off)される。このサイクリングは、2つの連続するサイクルの間で変化が生じない場合に停止する。

【0296】

図47及び図48は各々、ランダムDNAテンプレート上のモデル100回の試行の統計を図示しているふたつのグラフを有する。プロセッシングな目的に関して、このDNA標的は、300ヌクレオチド長であることが選択された(しかしここで考察された統計は、テンプレート長が5000ヌクレオチドである場合、変化しない)。図47は、 $M=3$ の結果を示し、ここで $M=3$ よりも短い鎖は、DNAテンプレートを「融解除去」される。図47Aは、最終サイクルでの鎖長の統計を示している。この分布は、平均ヌクレオチド長 $\sim 28$ である12mer( $M=3$ )から一部稀に大きい160merまでの範囲の疑似指数であるように見える。図47Bは、5 $\sim$ 20サイクルの範囲が、鎖「成長」のこの方法を使用しDNAテンプレートを完成するために必要であること、並びにこの試行の90%は、12サイクル後は完成されたことを示している。図48A及び48Bは、 $M=4$ であり、よりストリンジェントな熱融解である場合の、同じ種類の情報を示している。この場合、平均鎖長は、 $\sim 40$ ヌクレオチドに増加しているが、試行の90%が完成するためには、 $\sim 18$ サイクルが必要である。より長い鎖長は、予想されたようにギャ

40

50



ップを有する確率を低下する。このM=4のデータに関してヌクレオチド位置を充填しない平均確率は、平均0.039(およそ25に1)である。

【0297】

(3mer及び2mer基質構築物によるギャップ充填)

前述の基本的4merハイブリダイゼーション実施態様の伸長は、3塩基及び2塩基の配列ギャップを充填するために、各々、3mer及び2merの基質構築物を使用する。図49は、比較的短いエクスプローブの逐次的又は同時付加によるギャップ充填の例を示している。大部分の標的テンプレートが、4merハイブリダイゼーションに続き、エクスプローブとうまく二重鎖化される場合、残存するギャップのほとんどは、長さ1、2又は3塩基のいずれかである。割合が中から高である2及び3塩基ギャップが、比較的小さいエクスプローブにより充填されかつライゲーションされる場合に、エクスパンドマーの平均サイズは著しく増加することができる。これらの比較的小さいプローブのハイブリダイゼーションは、ほとんどの標的が二重鎖化された後に行われるので、温度ストリンジェンシーは、各々、3mer及びその後2mer二重鎖化を可能にするよう低下することができる。比較的小さいエクスプローブの二重鎖安定性は、塩基スタッキング安定化のために、増大される。ライゲーション後、残存するギャップは、ヌクレオチドを挿入するためのポリメラーゼを用いて充填され、その後残存する全ての隣接5'リン酸エステル及び3'ヒドロキシルを連結するために再度ライゲーションされる。このポリメラーゼ取り込まれたリンカー修飾されたヌクレオチドは、取り込みの前又は後のいずれかに、ギャップ標識することができる。これらの標識は、この塩基を同定することができるか又はできない。図50のチャートにまとめられた統計モデルを基に、完全長エクスパンドマーポリマーは、95%以上の標的配列の対象範囲を有する(16塩基よりも大きい)。このモデルに従い、3mer/2merエクスプローブギャップ充填の使用は、標識されない塩基の割合を1/6に押し下げ(高効率の取り込みを想定)、これは5000塩基標的配列に関して、標的レプリコンを通じて50未満の識別されない単塩基ギャップを伴う、ほとんど連続した配列の5000塩基を生じる。従って、未同定のギャップ配列の99%よりも大きい16×対象範囲が同定される。

【0298】

これらの比較的小さい3mer及び2merエクスプローブによるギャップ充填は、例えば、3倍まで平均エクスパンドマー長を伸長する。図50A及び50Bに示された統計モデルの結果をまとめているチャートは、平均長3mer/2merギャップ充填されたエクスパンドマーは、説明された条件下で、130塩基の配列の範囲にあることを示している。更にこの様式で合成されたエクスパンドマー配列の5000ギガ塩基は、わずか2.5ngの標的配列のエクスパンドマーへの変換と同等であり、この塩基によるその集団からのエクスパンドマー断片の最も長い10%のサイズ選択は、平均長が381塩基の範囲である、500ギガ塩基の配列を作製するが、エクスパンドマー断片の最も長い2%のサイズ選択は、平均長が554塩基の範囲である、100ギガ塩基の配列を作製する。これらの断片長は、ポリメラーゼによる単独塩基ギャップ充填を必要とせず、実現することができる。4merエクスプローブハイブリダイゼーションが、ギャップ充填を伴わずに行われる場合、統計モデルは、これらの断片の最長の10%及び2%の平均長は、各々、106及び148塩基であることを示している。

【0299】

(標的二次構造の低下のためのアジュバントの添加)

長い表面テザー化された1本鎖化された標的DNAは、分子内の二次構造のために、チャレンジするハイブリダイゼーション標的を提示することができる。図41Eに説明されたような、末端テザー化されたビーズの添加は、これらの分子内形成の出現を低下し、かつそれらが生じる場合にそれらを不安定にする。しかしアジュバントの添加により、基質構築物ハイブリダイゼーションを効果的にブロックすることができる、二次構造の形成の更なる縮小が必要であることを認めることができる。

【0300】

非標識2mer及び/又は3merオリゴヌクレオチドプローブの、例えばエクスプローブハイブリダイゼーション混合物への添加は、この目的に役立つことができる。エクスパンドマ

10

20

30

40

50

への取り込みの可能性をなくすために、これらのプローブは、ライゲーションできないように合成される(5'リン酸エステル又は3'ヒドロキシルではない)。2mer及び/又は3merアジュバントは、それらの小さいサイズのために、4merエクスプローブのハイブリダイゼーション温度では、安定した二重鎖を形成することはできないが；しかし中から高の濃度でのこの反応混合物中のそれらの存在は、そうでなければ二重鎖化することができる分子内ヌクレオチド配列のアクセスを弱くかつ一過性にブロックすることにより、標的二次構造の頻度及び安定性を低下する。図51は、いかにして2mer又は3merアジュバントが、二次構造形成を阻害するかの図である(単に簡略化のために、4merエクスプローブはこの図では示さなかった)。ピーステザーによりもたらされた伸長力と組合せて、アジュバントは、二次構造形成の頻度を著しく縮小する。

10

#### 【0301】

これらのジヌクレオチド及び/又はトリヌクレオチドアジュバントは、全ての必要な配列組合せを作製するために、標準ヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド、普遍的ヌクレオチド(5-ニトロインドール、3-ニトロピロール及びデオキシイノシン)、又はそれらの任意の組合せにより構成されることができる。図52は、この目的に使用される一般的な普遍的塩基置換を示している。

標的二次構造を減少する別のアプローチは、未変性DNAと比べ減少された二次構造安定性を有する合成cDNA標的を作製するための、標的DNAの複製である。図53は、米国特許出願第2005/0032053号(「低下した二次構造を伴う核酸分子」)に図示された、いくつかのヌクレオチドアナログを列記しており、これらは説明された合成cDNA標的へ取り込まれることができる。これらのアナログは、N4-エチルデオキシシチジン、2-アミノアデノシン-5'-リン酸、2-チオウリジナーリン酸、イノシナーリン酸、ピロロピリミジナーリン酸及び2-チオシチジナーリン酸を含み(しかしこれらに限定されない)、これらはcDNA二次構造を減少することが明らかにされている。このアプローチは、二次構造を減少するために、標的の伸長及びハイブリダイゼーション用アジュバントと共に使用することができる。

20

#### 【0302】

(検出及び測定)

先に言及したように、本エクスパンドマーは、いくつかの技術により標識及び測定されることができる。SBX法の大量のデータ出力能は、ナノ細孔をベースにしたセンサーアレイ又は同等の技術によく合致されている。一実施態様において、ナノ細孔アレイは、質量分析計の前面イオン化給源として機能し、ここでエクスパンドマー上のレポーターコードは、切断可能な質量分析用タグである。別の実施態様は、電気インピーダンス/コンダクタンス又はFRETなどの、ナノ細孔センサーの使用に関連している。

30

#### 【0303】

ひとつの検出実施態様は、図54に描かれたようなナノ細孔アレイを使用する。この実施態様において、DNA標的は、固定された固形支持体に係留されないが、ナノ細孔基質を通りスレッド化されたその係留しているプローブを有する磁気ビーズに係留されることを除いて、エクスパンドマーは先に説明された方法を用いて集成される。更に2つの励起波長に関する多数のFRETドナー蛍光分子は、ナノ細孔入り口ヘテザー化される(小さい四角で示された)。このFRETアクセプター蛍光分子は、エクスパンドマー上に取り込まれたレポーターを構成する。エクスパンドマーの連結されたエクスプローブが切断された後、このエクスパンドマーは、静電気力、磁力、重力及び/又は機械的力であることができ、かつ当初のDNA標的を伸長するために使用されるビーズ(エクスパンドマーの先端に付着されて示される)により促進されることができる力により、伸展される。最終の測定工程において、エクスパンドマーは、ナノ細孔構造の下側に示された磁気ビーズに磁力を適用することにより、ナノ細孔を通り引き出される。ナノ細孔入り口のドナー蛍光分子は、光源( $\lambda_1$ )により励起され、これらのレポーターがドナー蛍光分子へ近接するように進む際に、これらは励起されかつそれらの特徴となる(signature)蛍光( $\lambda_2$ )を放出し、これは会合されたヌクレオチド配列に解読される。

40

#### 【0304】

50

図54は、レポーターコードにおいて配列をコード化している一実施態様も図示している。各テザー上に、4つのレポーター部位が存在し、各々2つのFRETアクセプター蛍光分子の組合せが負荷されている。これは、相対強度レベルを用い4種の測定可能な状態を、各部位上に提供する。アクセプター蛍光分子の蛍光が赤色及び緑色である場合、4種のヌクレオチドへのこれらの状態のコーディングは以下である：A：緑色＞赤色、C：赤色のみ、G：緑色のみ、及びT：赤色＞緑色。

#### 【0305】

別の実施態様において、本エキスパンドマーは、質量分析計を用い測定される質量タグレポーターにより標識される。このエキスパンドマーは、レポーターを逐次的にエレクトロスプレーイオン化装置へ供給する狭いキャピラリーへ計量される。この個別の質量タグレポーターの質量分析計による測定を可能にするために、この質量タグは、質量タグのイオン化の直前、途中又は後に、レポーター足場から光切断されてよい。磁場型、四重極型又は飛行時間型(「TOF」)をベースにした質量分析計を、質量タグ検出に使用することができる。この装置は、限定された数の質量の離れたタグを識別することのみが必要である。このことは、この装置の感度及び処理量を改善するために使用することができる。同じく、イオン化及び検出を並行して行うために多チャンネルを有する装置を使用し、何倍も処理量を増加する。

#### 【0306】

質量分析計アプローチの検出の一実施態様は、100を超えるチャンネルを同時に読むことができるマルチ-チャンネル式TOF質量検出器である。好適な装置は、チャンネル使用を最大化する濃度及び速度でエキスパンドマーを多チャンネルへ供給し、その結果良好な品質データの出力を最大化するマルチ-チャンネル式イオン化給源を使用する。このようなイオン化給源は、質量タグレポーターセグメントの適切な分離を有することが必要である。質量タグは、ナノ細孔から出現する時に、光切断され、かつイオン化されることができる。この分散の必要要件は高くはなく、その結果短い飛行管が必要な要件の全てである。極めて高い測定出力は、マルチ-チャンネル質量分析計検出アプローチにより可能である。例えば、1秒につき10,000レポーターコードの速度(1レポーターコードにつき4ヌクレオチド測定)で読む100ナノ細孔イオンチャンネルのアレイは、>4 Mb/秒の装置の処理量を実現するであろう。

#### 【0307】

別の実施態様において、このナノ細孔は、コールターカウンターに類似した様式(図55)で使用される。この実施において、エキスパンドマーの電荷密度は、未変性DNAのそれに類似するようにデザインされる。これらのレポーターは、例えばナノ細孔検出器において測定される際に、3レベルのインピーダンスを生じるようにデザインされる。これらのエキスパンドマーは、1M KClなどの、高濃度の電解質を含む自由溶液において提示される。このナノ細孔は、直径2~15nmであり、長さ4~30nmである。テザー構築物標識の良好な分解能を実現するために、これらは、同じ長さに基づくか又はより長いように選択される。これらの標識の直径は、3つのレベルで異なることができる。テザー構築物連結の近くのエキスパンドマーセグメントは、レポーター(例えばPEG)を有さず、このセグメントは、特定のインピーダンスレベルを有するであろう。これら3つのレポーターレベルの1つは、等価であることができる。インピーダンスのレベルと時間的反応の両方に参与している異なるインピーダンスの特徴は、セグメント長、電荷密度、及び分子密度を変動することにより作出することができる。例えば3つの異なるインピーダンスレベルを実現するために、標識されたテザー構築物セグメントは、各々異なる長さ及び電荷密度を有する3種の異なるポリマー型の1つに共役するよう化学的にコードされることができる。

#### 【0308】

このエキスパンドマーがナノ細孔検出器を通過する場合、電流は、存在する標識型に従い変調される。ナノ細孔内に存在する帯電されたポリマーの量は、電解質種の電流及び輸送速度(translocation velocity)の両方に影響を及ぼす。

ナノ細孔によるポリマー-ベースの検出は、米国特許第6,465,193号及び第7,060,507号

に開示されており、例えば、ポリマーの物理的パラメータは、予想されるようにナノ細孔からの電気出力を変調することが示されている。これらの特許及び関連する技術分野は、本明細書に完全に引用として取り込まれている。

#### 【0309】

ナノ細孔ベースの検出装置の別の実施態様(図56)において、ナノ細孔に添えられた側方電極を使用し、ナノ細孔において横方向にインピーダンス又は伝導度が測定されるのに対し、電圧は固形支持体フィルムを超えて印加される。これは、輸送機能をインピーダンス機能から分離するという利点を有する。エキスパンドマーがナノ細孔を通り運搬される時、電流の変調が再度測定される。エキスパンドマーをナノ細孔を通して運搬するためには、牽引タグ、磁気ビーズ、電気泳動的伸展技術などと一緒に、マイクロ流体技術及びマイクロピペッティング技術が使用される。例えば、ELFSEとも称される末端-標識自由-溶液電気泳動は、自由-溶液エキスパンドマー電気泳動に使用することができる自由-流出する(free-draunung)DNAの電荷摩擦バランスを破壊する方法である(Slaterらの論文「DNAの末端-標識自由-溶液電気泳動(End-labeled free-solution electrophoresis of DNA)」、Electrophoresis, 26: 331-350, 2005)。

#### 【0310】

大きいDNA断片をテザー化、伸展、標識、及び測定する方法は、よく確立されている(Schwartzらの論文「DNA分析のためにナノスリットを使用する単分子バーコード化システム(A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis)」、PNAS, 104(8):2673-2678, 2007; 及び、Blanchらの論文「テザー化されたDNAの動電学的伸展(Electrokinetic Stretching of Tethered DNA)」、Biophysical Journal, 85: 2539-2546, 2003)。しかし未変性核酸の全ゲノムの配列決定を目的とする単核酸塩基分解能は、これらの技術の能力を超えている。図57から59において、いくつかの「単-分子」エキスパンドマー検出法が描写されている。図57において、顕微鏡で撮像され、かつエキスパンドマー構造のより大きい空間分解能の利点がある様々な直接造影技術のいずれかが着想されている。エキスパンドマー分子は、一般に平面上に平らに配置され、その長さに沿って走査される。例は、光学顕微鏡及び蛍光顕微鏡を含む。高分解能の顕微鏡の使用は、ほとんどの場合において分解能>100nmが限界であり、これは長いテザーでは依然可能である(例えば1レポーターにつき100nm)。より高い分解能(例えば1レポーターにつき<100nmのテザーを必要とする)は、全内部反射蛍光顕微鏡(TIRF: Starr, T.E.らの論文、Biophys. J. 80, 1575-84, 2001)、ゼロ-モード導波管(Levine M.J.らの論文、Science, 299, 682-85, 2003)、又は近視野光学顕微鏡(NSOM: de Langらの論文、J. Cell Sci. 114, 4153-60 2001)、又は共焦点レーザー走査顕微鏡などの技術を用いて実現することができる。局所的FRETの場合、励起相互作用は<10nmに局所化され、これはテザー長~10nm/レポーターにつながる。

#### 【0311】

電子顕微鏡による大きいDNA分子の検出及び分析は、よく確立されている(Montoliuらの論文「ポリアミンを伴う電子顕微鏡による巨大DNA分子の可視化: 酵母の内在性及び人工染色体の分析への適用(Visualization of large DNA molecules by electron microscopy with polyamines: application to the analysis of yeast endogenous and artificial chromosomes)」、J. Mol. Bio. 246(4):486-92, 1995)が、しかしこれらの方法を使用するポリヌクレオチドの正確かつハイ-スループットの配列決定は、困難であることが証明されている。図58において、透過型電子顕微鏡(TEM)及び走査型電子顕微鏡(SEM)が、エキスパンドマーの検出に関して概念的に示されている。ここで焦点が合わされた電子ビームを使用し、同じく一般に表面上に平らであるエキスパンドマーを走査する。エキスパンドマーの構造の態様は、骨格上の遺伝情報の解読に役立つ。標本固定及びスパッタコーティング技術は、分子の個別のかつ原子サイズの特徴を画像化することができ、これは倍率を増強するために使用することができる。

#### 【0312】

ナノ電極-ゲート開閉式電子トンネルコンダクタンス分光法も同じく関心対象であり、

これは2つのナノ電極チップ間のトンネル電子ビームが、これらのチップ間のエクスパンドマーの運搬により変調される(Leeらの論文「迅速なDNA配列決定能を伴う個々の分子のナノ電極ゲート開閉式検出(Nanoelectrode -Gated Detection of Individual molecules with Potential for Rapid DNA Sequencing)」、Solid State Phenomena 121-123: 1379-1386, 2007)。このエクスパンドマーは、そのスクリーニング-伝導作用(screening-conduction effect)により、トンネル電流を攪乱し、これは好適なレポーターの使用により、未変性DNAよりも増幅されることができる。この技術は、標本固定及び真空の必要性がないこと、及び理論上、電極ゲートの大規模平行アレイを利用し多くのエクスパンドマーを平行して読みとることができるという利点がある。

#### 【0313】

10

図59において、原子間力顕微鏡が、概念的に図示されている。単純な実施態様において、感度の良いカンチレバーに搭載されたナノチューブは、表面をさっと一掃し、かつ探針と試料表面の間の引力及び反発力は、走査される表面の位相画像へと翻訳される。この技術は、非常に高い分解能で実現することができるが、比較的遅い走査速度を有する(M. Milesの論文、Science 277, 1845-1847 (1997))。走査型トンネル電子顕微鏡(STM)は、表面を画像化する関連技術であるが；しかしこの探針は、その表面にはタッチせず、むしろ表面と探針の間のトンネル電流が測定される。ここでエクスパンドマーは、表面上に平坦に置かれ、レコード上のレコード針のように、探針チップにより物理的に走査される。

#### 【0314】

(配列集成)

20

公開されたヒトゲノム参照配列(又は他の参照配列)を、SBXにより作製された膨大な量の配列データの集成を補助するための、アラインメント道具として使用することができる。エクスパンドマー-ベースのSBXについて説明された長いリード長の能力は、小さい位置的に同定された配列ギャップを含む可能性があるにも関わらず、全ゲノム配列の集成を単純化しかつ忠実度を改善する。先に考察したように、本プロセスは更に、アッセイ反応表面上の寸法的に限られた位置での連続断片の分割により単純化することができる。この実施態様において、本解析方法は、集成時間及びエラーを劇的に減少することができる。

#### 【0315】

(モノマー性構築体)

30

図9は、本発明のモノマー性構築物の概要を提供している。4つのRT-NTPクラス(VI、VII、VIII、及びIX)並びに1つのXNTPクラス(X)を含む、全部で5つのクラスが区別されている。各クラスを、以下に個別に考察する。

クラスVIからXのモノマー性構築物は、これらは基質として単独の核酸塩基残基を使用する点で、クラスIからVのオリゴマー性構築物から区別される。以下の説明において、Nは、任意の核酸塩基残基をいうが、ここでは典型的にはヌクレオチド三リン酸又はアナログである。これは、例えば塩基の複素環への、リボース基への、又は核酸塩基残基の - リン酸エステルへの付着点を、テザー上に有する(本明細書においても説明される)。説明されたように、テンプレートに方向づけられた合成の主要な方法は、ポリメラーゼを使用するが、化学的及び酵素的ライゲーション方法を含む、テンプレートに方向づけられた合成を実行することができる任意の方法が適している。

40

#### 【0316】

サブユニット間連結を作製するために 及び リンカー基が使用される基質構築物に関して、広範な好適な市販の化学(Pierce社、Thermo Fisher Scientific社、米国)がこの目的に適合されることができる。一般的リンカー化学は、例えば、アミンとのNHS-エステル、スルフヒドリルとのマレイミド、アミンとのイミドエステル、アミンとの反応のためのカルボキシルとのEDC、スルフヒドリルとのピリジリジスルフィドなどを含む。他の実施態様は、ヒドラジド(HZ)及び4-ホルミル安息香酸エステル(4FB)などの官能基の使用に関連しており、これは次に更に反応され、連結を形成する。より詳細には、広範なクロスリンカー(ヘテロ-及びホモ-二官能性)が、広く入手可能であり(Pierce社)、これはSulfo-SMCC(スルホスクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシラート

50

)、SIA(N-スクシンイミジルヨードアセテート)、Sulfo-EMCS([N-e-マレイミドカプロイルオキシ]スルホスクシンイミドエステル)、Sulfo-GMBS(N-[g-マレイミドブチリルオキシ]スルホスクシンイミドエステル)、AMAS(N-(a-マレイミドアセトキシ)スクシンイミドエステル)、BMPS(N-EMCA (N-e-マレイミドカプロン酸)-[ -マレイミドプロピルオキシ]スクシンイミドエステル)、EDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩)、SANPAH(N-スクシンイミジル-6-[4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ]ヘキサノエート)、SADP(N-スクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオナート)、PMPI(N-[p-マレイミドフェニル]イソシル)、BMPH(N-[ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩)アネート)、EMCH([N-e-マレイミドカプロン酸]ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩)、SANH(スクシンイミジル4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン)、SHTH(スクシンイミジル4-ヒドラジドテレフタレート塩酸塩)、及びC6-SFB(C6-スクシンイミジル4-ホルミル安息香酸エステル)を含むが、これらに限定されるものではない。同じく Letsinger らの特許(「修飾されたヌクレオシド間連結を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチド」、米国特許第6,242,589号)に明らかにされた方法は、ホスホロチオエート連結を形成するために適合することができる。

#### 【0317】

更に、よく確立された保護/脱保護化学が、共通のリンカー部分に関して広範に利用可能である(Benoitonの文献「ペプチド合成化学(Chemistry of Peptide Synthesis)」、CRC Press, 2005)。アミノ保護は、9-フルオレニルメチルカルバメート(Fmoc-NRR')、t-ブチルカルバメート(Boc-NRR')、ベンジルカルバメート(Z-NRR'、Cbz-NRR')、アセトアミドトリフルオロアセトアミド、フタルイミド、ベンジルアミン(Bn-NRR')、トリフェニルメチルアミン(Tr-NRR')、及びベンジリデンアミンp-トルエンスルホンアミド(Ts-NRR')を含むが、これらに限定されるものではない。カルボキシル保護は、メチルエステル、t-ブチルエステル、ベンジルエステル、S-t-ブチルエステル、及び2-アルキル-1,3-オキサゾリンを含むが、これらに限定されるものではない。カルボニルは、ジメチルアセタール1,3-ジオキサン、及び1,3-ジチアンN,N-ジメチルヒドラゾンを含むが、これらに限定されるものではない。ヒドロキシル保護は、メトキシメチルエーテル(MOM-OR)、テトラヒドロピラニルエーテル(THP-OR)、t-ブチルエーテル、アリルエーテル、ベンジルエーテル(Bn-OR)、t-ブチルジメチルシリルエーテル(TBDMS-OR)、t-ブチルジフェニルシリルエーテル(TBDPS-OR)、酢酸エステル、ピバル酸エステル、及び安息香酸エステルを含むが、これらに限定

#### 【0318】

本明細書において、テザーは、3個のレポーター基を持つレポーター構築物として描かれることが多く、様々なレポーター立体配置がこのテザー上に整列されることができ、かつ基質を同定するために単独のレポーターを、基質を同定するために複数のレポーターを含むことができるか、又はこのテザーは、裸のポリマー(レポーターを有さない)であることができる。レポーターは、検出の同期化、エラー補正、冗長性、又は他の機能のために使用することができることに注意されたい。裸のポリマーの場合、これらのレポーターは、基質それ自身であるか、又は基質に付着された第二テザー上であってよい。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、かつレポーターは、エキスパンドマー産物の集成後に、親和性結合又は共有結合される。

#### 【0319】

レポーターコーディング戦略は、先に明らかにしており、かつ以下に更に考察する。例えば、各モノマーの2ビットバイナリーコーディングは、4つの独自のコード配列(11、10、01、00)を作製し、これらは各配列塩基を同定するために使用することができ(アデニン「A」、シトシン「C」、グアニン「G」、チミジン「T」)、基質共役は方向性があると仮定される。非方向性であるならば、三番目のビットは、明白なコーディングを提供する。あるいは、単独の4-状態多重化されたレポーター構築物は、各配列塩基に関する独自のレポーターコードを提供する。様々な官能基化及び標識化戦略が、テザー構築物に関して考察され、これは例えば、レポーター足場の一部としての官能基化された dendrimer、ポ

リマー、分岐ポリマー、ナノ粒子、及びナノ結晶、更には例えば蛍光、FRET発光又は励起、電荷密度、サイズ又は長さを含む好適な検出技術により検出される検出特性を伴うレポーター化学を含むことができる。塩基特異的標識は、エキスパンドマーの集成の前後いずれかで、標識された基質としてテザーへ取り込むことができる。一旦エキスパンドマーが完全に解放されかつ伸長された場合は、このレポーターコードは、広範な検出方法を用い、検出され、かつ分析される。

モノマー性基質として適している基質ライブラリーは、修飾されたATP、GTP、CTP、TTP及びUTPを含む(しかし限定されない)。

#### 【0320】

(クラスVIモノマー性構築物)

10

図60は、クラスVIモノマー性基質構築物(RT-NTP型)をより詳細に説明している。図60Aから60Cは、左から右へと読み、最初にモノマー性基質構築物(単独の核酸塩基残基を有するエキスパンドマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエキスパンドマー産物を示す。

#### 【0321】

図60Aに示されたように、クラスVIのモノマー性基質構築物は、基質核酸塩基残基Nへ第一末端部分の連結(601)により付着されたテザーT(600)を有する。リンカー基は、 $R^1$ の近位のテザーの第一末端部分(603)に配置されている。テザーの遠位端(604)で、第二リンカー基を伴う第二末端部分は、 $R^2$ の近位に配置されている。テザーの第二末端部分は、テザー内選択的に切断可能な架橋により(又は他の拘束により)核酸塩基の近位で第一末端部分に固定されている。このテザー内切断可能な架橋(605)は、ここでは点線により示されており、これは例えばジスルフィド結合又は光切断可能なリンカーを示すことができる。この拘束は、テザーが、伸長又は拡張するのを防ぎ、かつこれはその「拘束された立体配置」にあると言われる。テンプレートに方向づけられた集成下で、基質は、標的テンプレートと二重鎖を形成し、その結果これらの基質は近接されている。制御された条件下で、近接している基質の並べて置かれたリンカー基及びは連結し、これらの隣接基質構築物間に結合を形成する。モノマー性基質構築物のリンカー基及びは、位置の拘束のために、基質内結合を形成しない。、及びに関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、一般的モノマー性構築物の説明に詳述されている。

20

#### 【0322】

30

$R^1$ 及び $R^2$ は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、 $R^1 = 5'$ -リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、ライゲーションプロトコールにおける使用が、並びに $R^1 = 5'$ -三リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、ポリメラーゼプロトコールにおける使用が認められる。任意に $R^2$ は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成される。 $R^1$ 及び $R^2$ は、一般的型XRであることができ、ここでXは連結基であり、及びRは官能基である。

#### 【0323】

40

集成の際に、このモノマー性基質構築物は、1本鎖化されたテンプレートをガイドとして使用するテンプレートに方向づけられた重合のプロセスにより、新生娘鎖の伸長可能な終端上で最初に重合される。一般にこのプロセスは、プライマーから開始され、 $5'$ から $3'$ 方向に進行する。娘鎖を形成するために、一般にDNAポリメラーゼ又は他のポリメラーゼが使用され、条件は、テンプレート鎖の相補的コピーが得られるように選択される。引き続きリンカー基は、隣接サブユニットテザーのリンカー基と並べて置かれ、選択的に架橋し、テザー間、サブユニット間結合である結合を形成する。この結合は、連続鎖内のテザーと結合し、図60Bに示されるような、「二重鎖娘鎖」と称される中間体を形成する。結合が形成された後、テザー内結合は破壊されてよい。

#### 【0324】

この二重鎖娘鎖(図60B)は、括弧内に示されたサブユニットのヘテロ-コポリマーである

50

。主要骨格( $\sim N \sim$ )、テンプレート鎖( $-N' -$ )、及びテザー(T)は、二重鎖化された娘鎖として示されており、ここでは、複数の反復サブユニットを示している。娘鎖の各サブユニットは、反復「モチーフ」であり、これらのモチーフは、ここでは上付きのにより示されている、種特異的変動性を有する。この娘鎖は、モチーフ種のライブラリーから、テンプレートに方向づけられたプロセスにより選択されたモノマー性基質構築物種から形成され、各基質構築物種 of モノマー基質は、標的テンプレート鎖上の対応する相補的ヌクレオチドに結合する。この方式で、娘鎖の核酸塩基残基の配列(すなわち主要骨格)は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーである。

#### 【0325】

各波形符号( $\sim$ )は、基質間結合としてここで示された選択的に切断可能な結合を示している。これらは、選択的に切断可能であり、エキスパンドマーそれ自身を分解することなく、テザー(及びエキスパンドマー)を解放及び拡張する。

前記娘鎖は、「拘束された立体配置」においてテザーで更に構成される「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体で構成される。テザーがそれらの「拡張された立体配置」へ変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、サブユニット間 連結、基質付着、及び任意に依然存在するならばテザー内連結により拘束されている。この 連結は、第一サブユニットのテザー第一末端部分を、第二サブユニットの近接する末端でテザー第二末端部分へ付着し、かつ並べて置かれたリンカー基の第一サブユニットの 及び第二サブユニットの の連結により形成される。

#### 【0326】

前記娘鎖は、2つの骨格「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されかつ重合されたモノマー性基質で構成されている。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、モノマー基質間の選択的に切断可能な連結を迂回し、 結合で連結された骨格部分により形成され、各骨格部分はテザーである。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけし、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断されかつ主要骨格が断片化される場合には、依然共有的に無傷であり続けることを認めることができる。

#### 【0327】

テザー 結合(リンカー基 及び の架橋)は一般に、モノマー性基質の酵素的共役により進行され、例えば隣接塩基間のホスホジエステル結合により、主要骨格を形成する。ここに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成されており、並びに基質間は、選択的に切断可能であることを示している波形符号( $\sim$ )により描かれている。標的テンプレート鎖の解離又は分解、選択的に切断可能な結合(これはテザー内結合を含む)の切断後、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となる。テンプレート鎖の解離法は、熱変性、ヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。例えば主要骨格のホスホジエステル結合がヌクレアーゼにより消化され、かつテザー-から-テザーの結合がヌクレアーゼ耐性である場合、選択的切断の方法は、ヌクレアーゼ消化を使用する。

#### 【0328】

図60Cは、テンプレート鎖の解離後及び選択的に切断可能な結合(主要骨格内のもの、及び既に切断されていない場合はテザー内連結を含む)の切断後の、クラスVIエキスパンドマー産物の代表である。このエキスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニット を含み、ここでは、娘鎖を作製しているm個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを意味し、ここで  $= 1, 2, 3 \sim m$  であり、 $m > 10$ 、一般に $m > 50$ 、及び典型的には $m > 500$ 又は $> 5,000$ である。各サブユニットは、その拡張された立体配置でテザーで形成され、かつ隣接サブユニットの 連結間のその長さに伸展される。ペンダント基質が、各サブユニット内でテザーに付着されている。サブユニットモチーフ の各サブユニットは、エキスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向づけられた集成により確立された種特異的遺伝情報を含む。

#### 【0329】



図60Dは、分子モデルとしての図60Aの基質構築物を示し、ここで核酸塩基残基(606)で表されたモノマー基質メンバーは、テザー第一末端部分の連結(607)により、テザーに結合されている。図60Aにおいて として示されたリンカー基(608)も、同じく第一末端部分上に配置されている。図60Aにおいて として示された第二リンカー基(609)は、テザーの遠位端で第二末端部分上に配置されている。選択的に切断可能なテザー内連結(602)は、接している三角形により描かれているが、これは第一及び第二末端部分を連結することによりテザーを拘束するように示されている。リンカー基 及び は、相互作用しないよう、及び好ましくは各々、基質の $R^1$ 及び $R^2$ 側の近くに並置するように、位置されている。ここで示されたテザーループ(600)は、3つのレポーター(590,591,592)を有し、これらも、モチーフ種特異的であることができる。

10

#### 【0330】

図60Eは、生成物エクスパンドマーへの取り込み後の基質構築物を示している。これらのサブユニットは、切断されかつ拡張されており、図60Aに言及されたようにリンカー基 及び を連結することにより形成される、白色楕円として描かれた 結合(580,581)により連結されている。サブユニットは、添付されている図60Cにおいて括弧により表されているように、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示されている。

#### 【0331】

図60Eのエクスパンドマー産物において、隣接サブユニットの基質間の直接結合は切断されているので、主要骨格は断片化され、かつ共有的に連続していない。この切断プロセスを通じて、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となり始める。以前は拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、この時点では拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エクスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、かつレポーターのサイズ及び存在量を増大するためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

20

#### 【0332】

このテザーは3つのレポーター基を持つレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、かつモノマーを同定する単独のレポーターを含むことができるか、又はこのテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、エクスパンドマー産物の集成後、レポーターは、親和性結合又は共有結合される。

30

#### 【0333】

ここで図61に目を移すと、モノマー性基質構築物による一塩基伸長(SBE)の方法が示されている。末端-適合された標的テンプレート(又は固定されたプライマーの性質によって左右されるランダム標的テンプレート配列)が、固定されたプライマーに最初にアニールされる。工程Iの前に、固定されたテンプレート(611)は、そのメンバーが図示されているモノマー性基質構築物ライブラリー(612)及びポリメラーゼ(P)と接触される。条件は、テンプレートに方向づけられた重合のために調節される。この例において、第一のモノマー性基質の5'末端(図60A及び60Dの $R^2$ )は重合され、新生鎖を開始する。この基質は、更なる伸長を可逆的にブロックするように、3'末端(図60A及び60Dの $R^1$ )で置換されている。これは拡大図61a(点線)により詳細に示されており、ここでモノマー性基質は、プライマーに近接して示される。この基質は5'-三リン酸エステルであり、ポリメラーゼの作用によりプライマーとホスホジエステル結合が形成される。図61cに示された反応性官能基(図60Aの )は、典型的には(反応又は他の手段により)付加された第一基質(図61aにおいて長方形で示される)において不活性化されることは注意されなければならない。

40

#### 【0334】

図61の工程Iにおいて、ブロック基は除去され(遊離している長方形)、別のモノマーの付加(伸長)が可能になる。3'末端を可逆的にブロックする方法は、可変3'ヒドロキシル末端を再生するため、アリル基の除去を触媒するPdの使用、又は3'-O-(2-ニトロベンジル)末端化されたヌクレオチドの使用を含み、ここでJuらの論文(「切断可能な蛍光ヌクレオ

50

チド可逆的ターミネーターを使用する合成による4色DNA配列決定(Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators)」、PNAS 26 ; 103(52): 1963519640, 2006、及び「光切断可能な蛍光ヌクレオチドを使用するチップ上合成による4色DNA配列決定(Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides)」、PNAS 26 ; 102(17):5926-31, 2005)に説明されたように、末端部分を光切断するために、活性ヒドロキシルは、UV源への曝露により再生されることができる。再生された3'-OHは、図61b拡大図により詳細に示されている。この観点において、隣接基質構築物とプライマーの近接する末端は重合され、かつ新生娘鎖の3'OH末端は、ブロック基の除去により活性化される。工程IIにおいて、テンプレートは、モノマー性基質構築物ライブラリーと接触され、ここで官能性基は、制御された条件下で反応性であり、かつモノマー基質は新生娘鎖へ重合される。この重合は、図61cに示されたように近接された基質構築物の基(608)及び基(609)を並べて置く。工程IIIにおいて、制御された条件下で、これらの基は反応し、図61dに詳細に示されたように、結合(580)を形成する。

#### 【0335】

示されたように、工程II、III及びIVの循環は、追加の基質(構築物)により、各時点で新生娘を伸長する。典型的には洗浄工程を使用し、工程間で未反応の試薬を除去することができる。従ってこのプロセスは、文献において循環式「単塩基伸長」と称されるものと類似している。このプロセスは、ポリメラーゼPと共に示されているが、テンプレートに方向づけられた合成において基質構築物を結合するのに適したリガーゼ又は化学ライゲーションプロトコールに適合されてよい。工程Vは、エキスパンドマー(605)のための娘鎖中間体を示している。この中間体は、例えば娘鎖の主要骨格を攻撃するヌクレアーゼにより、テンプレート及びプライマーから解離され、これにより拘束されたテザーが緩和され、かつエキスパンドマー産物を解放することができる。

#### 【0336】

全てのSBE法のように、サイクル間の効率的洗浄は、望ましくない副反応を減少する助けとなる。高い二次構造でのテンプレート領域を通じた一塩基取り込みを更に促進するために、伸長温度は、各伸長サイクルを通じて変動することができ、並びに/又はベタイン、TMACl、若しくはPEGなどの添加剤若しくはアジュバントも、二次構造の作用を中和するために添加することができる(通常のポリメラーゼ伸長プロトコールにおいて行われるように)。必要ならば、基質構築物種の化学量論を、C又はGのようなある種の塩基にとって好ましい反応バイアスを補償するように、変動することができる。

#### 【0337】

クラスVIエキスパンドマーを作製する別の方法は、ポリメラーゼ-ベースのプロセッシング重合を行うことである。可逆的に終端をブロックするR基が存在せずに、RT-NTPの正確な重合を触媒することが明らかにされているDNA及びRNAポリメラーゼ、更には任意の同様に機能する酵素は、このアプローチについて考慮することができる。

#### 【0338】

広範な架橋化学が、当該技術分野において公知であり、かつ結合の形成に有用である。これらは、アミンとのNHS-エステル、スルフヒドリルとのマレイミド、アミンとのイミドエステル、スルフヒドリルとのEDC及びアミンとの反応のためのカルボキシル、スルフヒドリルとのピリジリジスルフィドなどの使用を含む。他の実施態様は、サブユニットに連結するために更に反応されることができる、ヒドラジド(HZ)及び4-ホルミル安息香酸エステル(4FB)のような官能基の使用に関連している。ひとつの選択肢において、2つの異なる連結化学 1/ 1及び 2/ 2(本明細書の別の部分ではL1/L1'及びL2/L2'とも称される)は、各々、 1及び 2結合を形成するように反応され、かつRT-NTP基質構築物のふたつのセットを示差的に官能基化するために使用することができる。例えば、SBEのひとつのサイクルが、 1/ 2官能基化されたRT-NTPセットにおいて実行される場合、後続のSBEサイクルは、 2/ 1セットを使用し、並べて置かれた 2/ 2対の反応を生じ、 1を形成するであろう。これらの架橋対の順番の活性化は、架橋エラー及び望ましくない副反応を最

小化するために有用である。

#### 【0339】

(クラスVIIモノマー性構築物)

クラスVII分子は、先に説明されたクラスVIのアナログである。主な違いは、切断可能な結合が、基質間の代わりに、テザーと基質の間であることである。図62において、クラスVIIモノマー性基質構築物(RT-NTP型)は、より詳細に説明されている。図62Aから62Cは、左から右へと読み、最初にモノマー性基質構築物(単独の核酸塩基残基を有するエキスパンドマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエキスパンドマー産物を示す。

#### 【0340】

図62Aに示されたように、クラスVIIのモノマー性基質構築物は、基質核酸塩基残基Nへ第一末端部分の切断可能なリンカー(621)により付着されたテザーT(620)を有する。別のリンカー基(622)は、R<sup>1</sup>の近位のテザーの第一末端部分に配置されている。テザーTの遠位端で、第二リンカー基(623)を伴う第二末端部分は、R<sup>2</sup>の近位に位置される。テザーの第二末端部分は、テザー内選択的に切断可能な架橋(624)により(又は他の拘束により)核酸塩基の近位で第一末端部分に固定されている。このテザー内切断可能な架橋は、ここでは点線により示されており、これは例えばジスルフィド結合又は光切断可能なリンカーを示すことができる。この拘束は、テザーが、伸長又は拡張するのを防ぎ、かつその「拘束された立体配置」にある。テンプレートに方向づけられた集成下で、基質は、標的テンプレートと二重鎖を形成し、その結果これらの基質は近接されている。制御された条件下で、並べて置かれた近接している基質のリンカー基及びは連結し、これらの隣接基質構築物間に結合を形成する。モノマー性基質構築物のリンカー基及びは、位置の拘束のために、基質内結合を形成しない。、及びに関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、一般的モノマー性構築物の説明に詳述されている。

#### 【0341】

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、R<sup>1</sup> = 5'-リン酸エステル及びR<sup>2</sup> = 3'-OHは、ライゲーションプロトコールにおける、かつR<sup>1</sup> = 5'-三リン酸エステル及びR<sup>2</sup> = 3'-OHは、ポリメラーゼプロトコールにおける使用が認められる。任意にR<sup>2</sup>は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成される。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、一般的型XRであることができ、ここでXは連結基であり、及びRは官能基である。

#### 【0342】

集成の際に、このモノマー性基質構築物は、1本鎖化されたテンプレートをガイドとして使用するテンプレートに方向づけられた重合のプロセスにより、新生娘鎖の伸長可能な終端上で最初に重合される。一般にこのプロセスは、プライマーから開始され、5'から3'方向に進行する。娘鎖を形成するために、一般にDNAポリメラーゼ又は他のポリメラーゼが使用され、条件は、テンプレート鎖の相補的コピーが得られるように選択される。引き続き、リンカー基は、隣接サブユニットテザーのリンカー基と並べて置かれ、架橋が引き起こされ、テザー間、サブユニット間結合である結合を形成する。この結合は、連続鎖内のテザーと結合し、図62Bに示されるような、「二重鎖娘鎖」と称される中間体を形成する。結合が形成された後、テザー内結合は破壊されてよい。

#### 【0343】

この二重鎖娘鎖(図62B)は、括弧内に示されたサブユニットのヘテロ-コポリマーである。主要骨格(～N～)、テンプレート鎖(～N'～)、及びテザー(T)は、二重鎖化された娘鎖として示されており、ここでは、複数の反復サブユニットを示している。娘鎖の各サブユニットは、反復「モチーフ」であり、これらのモチーフは、ここでは上付きのにより示されている、種特異的変動性を有する。この娘鎖は、モチーフ種のライブラリーから、テンプレートに方向づけられたプロセスにより選択されたモノマー性基質構築物種から形

成され、各基質構築物種のモノマー基質は、標的テンプレート鎖上の対応する相補的ヌクレオチドに結合する。この方式で、娘鎖の核酸塩基残基の配列(すなわち主要骨格)は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーである。

#### 【0344】

各波形符号(～)は、テザーの基質リンカーへのかとしてここで示された選択的に切断可能な結合を示している。これらは、選択的に切断可能であり、エキスパンドマーそれ自身を分解することなく、テザー(及びエキスパンドマー)を解放及び拡張する。

前記娘鎖は、「拘束された立体配置」内のテザーで更に構成される「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体で構成される。テザーがそれらの「拡張された立体配置」へ変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、サブユニット間 連結、基質への切断可能な連結、及び任意に依然存在するならばテザー内連結により拘束されている。この 連結は、第一サブユニットのテザー第一末端部分を、第二サブユニットの近接する末端でテザー第二末端部分へ付着し、かつ並べて置かれたリンカー基の第一サブユニットの 及び第二サブユニットの 連結により、形成される。

#### 【0345】

前記娘鎖は、2つの骨格「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマーの骨格」を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されかつ重合されたモノマー性基質で構成されている。拘束されたエキスパンドマー骨格は、基質へ接続している選択的に切断可能な連結を迂回し、 結合で連結された骨格部分により形成され、各骨格部分はテザーである。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格に接続された選択的に切断可能な結合を超えて橋かけし、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断されかつ主要骨格が解離又は断片化される場合には、依然共有的に無傷であり続けることを認めることができる。

#### 【0346】

テザー 結合(リンカー基 及び の架橋)は一般に、モノマー性基質の酵素的共役により進行され、例えば隣接塩基間のホスホジエステル結合により、主要骨格を形成する。ここに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成されており、並びに基質間は、波形符号(～)により描かれ、これらは選択的に切断可能であることを示している。標的テンプレート鎖の解離又は分解、選択的に切断可能な結合(これはテザー内結合を含む)の切断後、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となり始める。テンプレート鎖の解離法は、熱変性、ヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。例えば主要骨格のホスホジエステル結合がヌクレアーゼにより消化され、及びテザー-から-テザーの結合がヌクレアーゼ耐性である場合、選択的切断の方法は、ヌクレアーゼ消化を使用する。

#### 【0347】

図62Cは、テンプレート鎖の解離後及び選択的に切断可能な結合(主要骨格内のもの、及び既に切断されていない場合はテザー内連結を含む)の切断後の、クラスVIIエキスパンドマー産物の代表である。このエキスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニット を含み、ここでは、娘鎖を作製しているm個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを意味し、ここで  $m = 1, 2, 3 \sim m$  であり、 $m > 10$ 、一般に  $m > 50$ 、及び典型的には  $m > 500$  又は  $> 5,000$  である。各サブユニットは、その拡張された立体配置でテザー(620)で形成され、かつ隣接サブユニットの 連結間のその長さに伸展される。主要骨格は、完全に除去されている。サブユニットモチーフ の各サブユニットは、エキスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向づけられた集成により確立された種特異的遺伝情報を含む。

#### 【0348】

図62Dは、分子モデルとしての図62Aの基質構築物を示し、ここで核酸塩基残基(626)で表されたモノマー基質メンバーは、選択的に切断可能な連結(625)により、テザー第一末端部分に連結されている。図62Aにおいて として示されたリンカー基(629)も、同じく第一末端部分上に配置されている。図62Aにおいて として示された第二リンカー基(628)は

10

20

30

40

50

、テザーの遠位端で第二末端部分上に配置されている。選択的に切断可能なテザー内連結(627)は、接している三角形により描かれているが、これは第一及び第二末端部分を連結することによりテザーを拘束するように示されている。リンカー基 (629)及び (628)は、相互作用しないよう、及び好ましくは各々、基質の $R^1$ 及び $R^2$ 側の近くに並置するように、位置されている。ここで示されたテザーループ(600)は、3つのレポーター(900,901,902)を有し、これらも、モチーフ種特異的であることができる。

#### 【0349】

図62Eは、生成物エクスパンドマーへの取り込み後の、基質構築物を示している。これらのサブユニットは、切断されかつ拡張されており、図62Aに言及されたようにリンカー基 及び を連結することにより形成される、白色楕円として描かれた 結合(910)により連結されている。サブユニットは、添付されている図62Cにおいて括弧により表されているように、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示されている。

10

#### 【0350】

図62Eのエクスパンドマー産物において、主要骨格は解離又は断片化され、かつエクスパンドマーから分離されている。この切断プロセスを通じて、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となり始める。以前は拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、この時点では拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エクスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、かつレポーターのサイズ及び存在量を増大するためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

20

#### 【0351】

このテザーは3つのレポーター基を持つレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、かつモノマーを同定する単独のレポーターを含むことができるか、又はこのテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、エクスパンドマー産物の集成後、レポーターは、親和性結合又は共有結合される。

#### 【0352】

(クラスVIIIモノマー性構築物)

クラスVIII分子は、先に説明されたクラスVIのアナログである。主な違いは、リンカー基 が、テザーの代わりに、基質へ直接接続されていることである。図63において、本発明者らは、クラスVIIIモノマー性基質構築物(RT-NTP型)をより詳細に説明している。図63Aから63Cは、左から右へと読み、最初にモノマー性基質構築物(単独の核酸塩基残基を有するエクスパンドマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエクスパンドマー産物を示す。

30

#### 【0353】

図63Aに示されたように、クラスVIIIのモノマー性基質構築物は、基質核酸塩基残基Nへ第一末端部分の連結(631)により付着されたテザーT(630)を有する。テザー(632)の遠位端で、第二リンカー基 を伴う第二末端部分は、優先して $R^2$ の近位に位置される。テザーの第二末端部分は、テザー内選択的に切断可能な架橋により(又は他の拘束により)核酸塩基に近接している第一末端部分に固定されている。このテザー内切断可能な架橋(633)は、ここで点線により示されており、これは例えばジスルフィド結合又は光切断可能なリンカーを示すことができる。この拘束は、テザーが、伸長又は拡張するのを防ぎ、かつこれはその「拘束された立体配置」にあると言われる。リンカー基 (635)は、優先して $R^1$ の近位のモノマー基質へ付着される。テンプレートに方向づけられた集成下で、基質は、標的テンプレートと二重鎖を形成し、その結果これらの基質は近接されている。制御された条件下で、近接している基質のリンカー基 及び は並べて置かれかつ連結し、これらの隣接基質構築物間に結合を形成する。モノマー性基質構築物のリンカー基 及び は、位置の拘束のために、基質内結合を形成しない。 、 及び に関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、一般的モノマー性構築物の説明に詳述されている。

40

50

## 【0354】

$R^1$ 及び $R^2$ は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、 $R^1 = 5'$ -リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、ライゲーションプロトコールにおける使用が、並びに $R^1 = 5'$ -三リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、ポリメラーゼプロトコールにおける使用が認められる。任意に $R^2$ は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成される。 $R^1$ 及び $R^2$ は、一般的型XRであることができ、ここでXは連結基であり、及びRは官能基である。

## 【0355】

集成の際に、このモノマー性基質構築物は、1本鎖化されたテンプレートガイドとして使用するテンプレートに方向づけられた重合のプロセスにより、新生娘鎖の伸長可能な終端上で最初に重合される。一般にこのプロセスは、プライマーから開始され、 $5'$ から $3'$ 方向に進行する。娘鎖を形成するために、一般にDNAポリメラーゼ又は他のポリメラーゼが使用され、条件は、テンプレート鎖の相補的コピーが得られるように選択される。引き続き、リンカー基は、ここで隣接サブユニットテザーのリンカー基と並べて置かれ、架橋を引き起こされ、サブユニット間結合である結合を形成する。この結合は、サブユニット間に第二連結を提供し(重合された基質間連結が最初である)、連続鎖内のテザーと結合し、図63Bに示されるような、「二重鎖娘鎖」と称される中間体を形成する。

## 【0356】

この二重鎖娘鎖(図63B)は、括弧内に示されたサブユニットの、ヘテロ-コポリマーである。主要骨格( $\sim N \sim$ )、テンプレート鎖( $-N' -$ )、及びテザー(T)は、二重鎖化された娘鎖として示されており、ここでは、複数の反復サブユニットを示している。娘鎖の各サブユニットは、反復「モチーフ」であり、これらのモチーフは、ここでは上付きのにより示されている、種特異の変動性を有する。この娘鎖は、モチーフ種のライブラリーから、テンプレートに方向づけられたプロセスにより選択されたモノマー性基質構築物種から形成され、各基質構築物種は、標的テンプレート鎖上の対応する相補的ヌクレオチドに結合する。この方式で、娘鎖の核酸塩基残基の配列(すなわち主要骨格)は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーである。

## 【0357】

各波形符号( $\sim$ )は、基質間結合としてここで示された選択的に切断可能な結合を示している。これらは、選択的に切断可能であり、エキスパンドマーそれ自身を分解することなく、テザー(及びエキスパンドマー)を解放及び拡張する。

前記娘鎖は、「拘束された立体配置」内のテザーで更に構成される「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体で構成される。テザーがそれらの「拡張された立体配置」へ変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、サブユニット間連結、基質付着、及び任意に依然存在するならばテザー内連結により拘束されている。この連結は、第一サブユニットの基質を、第二サブユニットの近接する末端でテザー第二末端部分へ付着し、かつ並べて置かれたリンカー基の第一サブユニットの及び第二サブユニットのの連結により、形成される。

## 【0358】

前記娘鎖は、2つの骨格「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されかつ重合されたモノマー性基質で構成されている。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、モノマー基質間の選択的に切断可能な連結を迂回し、結合で連結された骨格部分により形成され、各骨格部分は基質に連結されたテザーであり、これは次に隣の骨格部分テザーへ結合により連結する。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけし、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断されかつ主要骨格が断片化される場合には、依然共有的に無傷であり続けることを認めることができる。

## 【0359】

テザー 結合(リンカー基 及び の架橋)は一般に、モノマー基質の酵素的共役により進行され、例えば隣接塩基間のホスホジエステル結合により、主要骨格を形成する。ここに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成されており、並びに基質間連結は、選択的に切断可能であることを示している波形符号(～)により描かれている。標的テンプレート鎖の解離又は分解、選択的に切断可能な結合(これはテザー内結合を含む)の切断後、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となる。テンプレート鎖の解離法は、熱変性、ヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。例えば主要骨格のホスホジエステル結合がヌクレアーゼにより消化され、及びテザー-から-テザーの結合がヌクレアーゼ耐性である場合、選択的切断の方法は、ヌクレアーゼ消化を使用する。

10

## 【0360】

図63Cは、テンプレート鎖の解離後及び選択的に切断可能な結合(主要骨格内のもの、及び既に切断されていない場合はテザー内連結を含む)の切断後の、クラスVIIIエクスパンドマー産物の代表である。このエクスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニット を含み、ここでは、娘鎖を作製している $m$ 個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを意味し、ここで  $= 1, 2, 3 \sim m$ であり、 $m > 10$ 、一般に $m > 50$ 、及び典型的には $m > 500$ 又は $> 5,000$ である。各サブユニットは、その拡張された立体配置でテザーで形成され、かつ隣接サブユニットの 連結間のその長さに伸展される。ペンダント基質は、各サブユニット内のテザーに付着されている。サブユニットモチーフ の各サブユニットは、エクスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向づけられた集成により確立された種特異的遺伝情報を含む。

20

## 【0361】

図63Dは、分子モデルとしての図63Aの基質構築物を示し、ここで核酸塩基残基(634)で表されたモノマー基質メンバーは、テザー第一末端部分の連結(631)によりテザーへ結合されている。図63Aにおいて として示された第二リンカー基(639)も、テザーの遠位端で第二末端部分上に配置されている。選択的に切断可能なテザー内連結(633)は、接している三角形により描かれているが、これは第一及び第二末端部分を連結することによりテザーを拘束するように示されている。図63Aにおいて として描かれたリンカー基(638)も、基質に付着されている。リンカー基 (638)及び (639)は、相互作用しないよう、及び好ましくは各々、基質の $R^1$ 及び $R^2$ 側の近くに並置するように、位置されている。ここで示されたテザーループは、3つのレポーター(900,901,902)を有し、これらも、モチーフ種特異的であることができる。切断可能なテザー内架橋(633)も、図63Dと図63Eに示されており、これらは (639)よりも基質に近いように位置されている。図60D及び図60Eにおいて、これらの位置はスイッチされる。この位置付けは、いずれかの場所であることができ、一実施態様において、両方のリンカー機能は、単独の多官能基に対するものであることができる。

30

## 【0362】

図63Eは、生成物エクスパンドマーへの取り込み後の基質構築物を示している。これらのサブユニットは、切断されかつ拡張されており、図63Aに言及されたようにリンカー基 及び を連結することにより形成される、白色楕円として描かれた 結合(970,971)により連結されている。サブユニットは、添付されている図63Cにおいて括弧により表されているように、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示されている。

40

## 【0363】

図63Eのエクスパンドマー産物において、主要骨格は断片化され、隣接サブユニットの基質間の直接結合が切断されているので、共有的に連続していない。この切断プロセスを通じて、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となる。以前は拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、この時点では拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エクスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、かつレポーターのサイズ及び存在量を増大するためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検

50

出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

#### 【0364】

このテザー(630)は3つのレポーター基を持つレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、かつモノマーを同定する単独のレポーターを含むことができるか、又はこのテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、エキスパンドマー産物の集成後、レポーターは、親和性結合又は共有結合される。

#### 【0365】

(クラスIXモノマー性構築物)

クラスIX基質構築物は、主要骨格が集成された後、そこに遊離のテザーが付着される2つのテザー付着点を有するので、他のRT-NTPからは区別される。図64は、クラスIXモノマー性基質構築物(RT-NTP型)を詳細に説明している。図64Aから64Cは、左から右へと読み、最初にモノマー性基質構築物(単独の核酸塩基残基を有するエキスパンドマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエキスパンドマー産物を示す。

#### 【0366】

図64Aに示されたように、クラスIXのモノマー性基質構築物は、2つのテザー付着部位であるリンカー基<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>を持つ基質核酸塩基残基Nを有する。第一及び第二テザー末端部分のリンカー基<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>を有する遊離テザーT(640)も示されている。このテザーの第一及び第二末端部分は、テザー内選択的に切断可能な架橋(647)により、遊離テザーを拘束し、かつリンカー基<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>が並べて置かれることを助ける。この切断可能な架橋は、ここで点線により示されており、これは例えばジスルフィド結合又は光切断可能なリンカーを示すことができる。この拘束は、テザーが、伸長又は拡張するのを防ぎ、かつこれはその「拘束された立体配置」にあると言われる。リンカー基<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>は、各々、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>にの近位に配向されたモノマー基質に付着される。テンプレートに方向づけられた合成下で、基質は、標的テンプレートと二重鎖を形成し、ひとつの基質構築物のリンカー基、例えば<sub>1</sub>、及び近接された基質構築物のリンカー基、例えば<sub>2</sub>は、並べて置かれる。制御された条件下で、これらの並べて置かれたリンカーは、遊離テザーの末端上の並べて置かれたリンカーと接触される。2つの選択的連結反応が生じ、<sub>1</sub>と<sub>1</sub>は<sup>1</sup>を形成し、並びに<sub>2</sub>と<sub>2</sub>は<sup>2</sup>を形成し；これらの隣接基質は、ここで拘束されたテザーにより橋かけされる。<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>に関する好適な連結及び保護/脱保護化学は、一般的モノマー性構築物の説明に詳述されている。

#### 【0367】

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された末端基である。例えば、R<sup>1</sup>=5'-リン酸エステル及びR<sup>2</sup>=3'-OHは、ライゲーシオンプロトコールにおける使用が、並びにR<sup>1</sup>=5'-三リン酸エステル及びR<sup>2</sup>=3'-OHは、ポリメラーゼプロトコールにおける使用が認められる。任意にR<sup>2</sup>は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基と共に構成されることができる。あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、化学共役のためにリンカー末端基と共に、又はハイブリダイゼーションのみのプロトコールのためにリンカー基を伴わずに構成される。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、一般的型XRであることができ、ここでXは連結基であり、及びRは官能基である。

#### 【0368】

集成の際に、このモノマー性基質構築物(テザーを伴わない)は、1本鎖化されたテンプレートをガイドとして使用するテンプレートに方向づけられた重合のプロセスにより、新生娘鎖の伸長可能な終端上で重合される。一般にこのプロセスは、プライマーから開始され、5'から3'方向に進行する。娘鎖を形成するために、一般にDNAポリメラーゼ又は他のポリメラーゼが使用され、条件は、テンプレート鎖の相補的コピーが得られるように選択される。リンカー基<sub>1</sub>は、ここで隣接モノマー基質のリンカー基<sub>2</sub>と並べて置かれる。主要骨格の重合後、遊離のテザーは架橋され、2つのテザー末端及び2つの隣接基質の間に、<sup>1</sup>結合及び<sup>2</sup>結合を形成する。

10

20

30

40

50



一実施態様において、遊離テザーは、配列情報を有さず、「裸の」と称される。この場合、単独のリンカー化学を使用することができ、そのためリンカー基<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>は同じであり、並びにリンカー基<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>は、1つの結合型と同じである。

#### 【0369】

遊離テザーが情報の基本型を有する(レポーター中として)実施態様においては、種特異的遊離テザーが存在する。一般に4種の塩基型が存在し、対応する塩基情報を伴う4つの遊離テザー型を必要とする。いくつかの方法を使用し、遊離テザー種をその正確な塩基と連結することができる。ひとつの方法において、4つのヘテロ特異的連結化学を使用し、リンカー対<sub>1</sub>及び<sub>1</sub>を更に区別し、ここでは対<sub>1</sub>及び<sub>1</sub>と表記され、ここでは4つの型のひとつであり、結合型<sup>1</sup>を形成する。1つの型の<sub>1</sub>及び<sub>1</sub>は、互いにのみ結合するであろう。この方法において、リンカー対<sub>2</sub>及び<sub>2</sub>は、<sub>1</sub>及び<sub>1</sub>が形成された後にのみ、結合が引き起こされる。第二方法において、各保護基は1つのリンカー型に会合されている、異なる選択的脱保護可能な保護基が、リンカー基を選択的にブロックするために使用される。第一サイクルにおいて、1つの塩基型では保護は存在せず、かつその会合された遊離テザー型は、<sub>1</sub>を<sub>1</sub>へ結合し、<sup>1</sup>結合を形成する。第二のサイクルにおいて、1つの型の保護基は1つの塩基型から除去され、かつその会合された遊離テザー型は、<sub>1</sub>を<sub>1</sub>へ結合し、<sup>1</sup>結合を形成する。後者のサイクルは、次の2つの塩基型について反復され、それが完了した後、リンカー対<sub>2</sub>及び<sub>2</sub>の結合が引き起こされる。結合エラーを低下するために、各工程間に、洗浄工程が含まれる。一般性を失うことなく、残りの説明が、<sup>1</sup>結合及び<sup>2</sup>結合に関してあてはまるであろう。テザーが付着されかつ結合が形成された後に、テザー内結合は破壊されてよいことに注意されたい。

#### 【0370】

図64Bに示されたように、<sup>1</sup>結合は、サブユニット間に連結を提供し(重合された基質間連結への付加)、「二重鎖娘鎖」と称される中間体を形成する。主要骨格(〜N〜)、テンプレート鎖(〜N'〜)、及びテザー(T)は、二重鎖化された娘鎖として示されており、ここでは、複数の反復サブユニットを示している。娘鎖の各サブユニットは、反復「モチーフ」であり、これらのモチーフは、ここでは上付きのにより示されている、種特異的変動性を有する。この娘鎖は、モチーフ種のライブラリーから、テンプレートに方向づけられたプロセスにより選択されたモノマー性基質構築物種から形成され、各基質構築物種のモノマー基質は、標的テンプレート鎖上の対応する相補的ヌクレオチドに結合する。この方式で、娘鎖の核酸塩基残基の配列(すなわち主要骨格)は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーである。

#### 【0371】

各波形符号(〜)は、基質間結合としてここで示された選択的に切断可能な結合を示している。これらは、選択的に切断可能であり、エキスパンドマーそれ自身を分解することなく、テザー(及びエキスパンドマー)を解放及び拡張する。

前記娘鎖は、「拘束された立体配置」内のテザーで更に構成される「拘束されたエキスパンドマー」と称されるエキスパンドマー前駆体で構成される。テザーがそれらの「拡張された立体配置」へ変わる場合、この拘束されたエキスパンドマーは、エキスパンドマー産物に変わる。これらのテザーは、隣接基質への連結、及び任意に(依然存在するならば)テザー内連結により拘束されている。

#### 【0372】

前記娘鎖は、2つの骨格「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されかつ重合されたモノマー性基質で構成されている。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、モノマー基質間の選択的に切断可能な連結を迂回し、<sup>1</sup>結合で連結された骨格部分により形成され、各骨格部分は基質に連結されたテザーであり(<sup>2</sup>結合による)、これは次に隣の骨格部分テザーへ<sup>1</sup>結合により連結する。拘束されたエキスパンドマー骨格は、主要骨格の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけし、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断されかつ主要骨格が断片化される場合には、依然共有的に無傷であり続けることを認めることが

できる。

#### 【0373】

テザー結合(リンカー基及びの架橋)は一般に、モノマー基質の酵素的共役により進行され、例えば隣接塩基間のホスホジエステル結合により、主要骨格を形成する。ここに示された構造において、娘鎖主要骨格は形成されており、並びに基質間連結は、選択的に切断可能であることを示している波形符号(~)により描かれている。標的テンプレート鎖の解離又は分解、選択的に切断可能な結合(これはテザー内結合を含む)の切断後、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となり始める。テンプレート鎖の解離法は、熱変性、ヌクレアーゼによる選択的消化、又は化学分解を含む。例えば主要骨格のホスホジエステル結合がヌクレアーゼにより消化され、及びテザー-から-テザーの結合がヌクレアーゼ耐性である場合、選択的切断の方法は、ヌクレアーゼ消化を使用する。

10

#### 【0374】

図64Cは、テンプレート鎖の解離後及び選択的に切断可能な結合(主要骨格内のもの、及び既に切断されていない場合はテザー内連結を含む)の切断後の、クラスIXエクスパンドマー産物の代表である。このエクスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニットを含み、ここで は、娘鎖を作製しているm個のサブユニットの鎖内の 番目のサブユニットを意味し、ここで =1、2、3~mであり、m>10、一般にm>50、及び典型的にはm>500又は>5,000である。各サブユニットは、モノマー基質及び次の隣接サブユニットとの<sup>1</sup>連結へ連結されたその拡張された立体配置でテザー(640)で形成される。サブユニットモチーフの各サブユニットは、エクスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向づけられた集成により確立された種特異的遺伝情報を含む。

20

#### 【0375】

図64Dは、分子モデルとしての図64Aの基質構築物を示し、ここで核酸塩基残基(641)で表されたモノマー基質メンバーは、遊離テザーのための付着点である<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>として図64aに示された2つの連結(642,643)を有する。この遊離テザーは、テザーの第一及び第二末端部分上の図64Aに<sub>1</sub>及び<sub>2</sub>として示されたリンカー基(644,645)である2つのリンカー基と共に示されている。選択的に切断可能なテザー内連結(647)は、第一及び第二末端部分を連結することによりテザーを拘束することが示されている。これらのリンカー基は、モノマー基質間のテザー末端の架橋を促進し、かつモノマー基質を超える架橋を防ぐように、位置されている。

30

#### 【0376】

ここで示されたテザーループは、3つのレポーター(900,901,902)を有し、これらも、モチーフ種特異的であることができるが、主要骨格内の正確な塩基に正確に連結される方法を必要とする。

図64Eは、生成物エクスパンドマーへの取り込み後の基質構築物を示している。これらのサブユニットは、切断されかつ拡張されており、テザー間<sup>1</sup>結合(930,931)、及びテザー間<sup>2</sup>結合(932,933)により連結されている。各サブユニットは、モノマー基質に連結されたテザーであり、次の<sup>1</sup>結合に接続される。サブユニットは、添付されている図64Cにおいて括弧により表されているように、反復サブユニットに括弧をつけている縦の点線により示されている。

40

#### 【0377】

図64Eのエクスパンドマー産物において、主要骨格は断片化され、隣接サブユニットの基質間の直接結合が切断されているので、共有的に連続していない。この切断プロセスを通じて、拘束されたエクスパンドマーは解放され、エクスパンドマー産物となる。以前は拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、この時点では拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エクスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、かつレポーターのサイズ及び存在量を増大するためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

50

## 【0378】

このテザーは3つのレポーター基を持つレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、かつモノマーを同定する単独のレポーターを含むことができるか、又はこのテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、エキスパンドマー産物の集成後、レポーターは、親和性結合又は共有結合される。

## 【0379】

図65は、クラスIXのRT-NTP基質構築物を使用するエキスパンドマーの合成方法を明らかにしている。標的テンプレート(650)は、最初に選択され、かつ固定されたプライマーヘアニールされる。工程Iにおいて、このプライマーは、娘鎖のテンプレートに方向づけられた合成により伸長される。このプロセスは工程IIで続き、及び図65aの拡大図(点線矢印)は、娘鎖を示している。テンプレート鎖、プライマー、及び重合されたクラスIX核酸塩基基質構築物(テザーを含まず)が図示され、テザー試薬の化学付加に関する鍵と鍵穴の記号で描かれた化学官能基を伴う各基質構築物が描かれている。これらの官能基は、各モノマーが塩基特異的テザー付着部位及び普遍的付着部位を有するように、選択される。工程IIIにおいて、4つの種特異的リンカーを伴うヘアピンテザーが導入される。これらのテザーは、図65bの拡大図(点線矢印)に示されたような塩基特異的リンカーに従う塩基特異的様式で、主要骨格へ連結される。ここで白色及び黒色の円形は、普遍的化学付着化学を示し、菱形及びフォーク型は、塩基特異的付着化学を示している。工程IV及び図65cの拡大図(点線矢印)において、全ての塩基特異的連結が完成した後、普遍的リンカーが結合の形成を引き起こす。テザー及び主要骨格の両方の上の普遍的リンカーは、連結エラーを避けるために、それらの塩基特異的リンカーのカウンターパートに対し非常に近傍にあることに注意されたい。このテザー試薬の化学付着は、完成されたように示されており、かつ拘束されたエキスパンドマーは、このテンプレート上に形成されている。その後エキスパンドマーは、テンプレートからの解離、及び選択的に切断可能な結合(主要骨格及びテザー内結合の)の切断により解放される(図示されず)。

## 【0380】

(クラスXモノマー性構築物)

クラスX基質構築物は、XNTPとも称され、テザーが各モノマー基質内に含まれ、基質内テザーを形成し、各XNTP基質は、基質内に選択的に切断可能な結合を有し、これが一旦切断されると、拘束されたテザーの拡張が可能である点がRT-NTPと異なる。図66において、本発明者らは、クラスXモノマー性基質構築物をより詳細に説明している。図66Aから66Cは、左から右へと読み、最初にモノマー性基質構築物(単独の核酸塩基残基を有するエキスパンドマー前駆体)、次に中央に中間体二重鎖娘鎖、及び右側に配列決定のために調製されたエキスパンドマー産物を示す。

## 【0381】

図66Aに示されたように、クラスXのモノマー性基質構築物は、選択的に切断可能な結合(665)により分離された2つの部分(662,663)を有する基質核酸塩基残基Nを有し、各部分はテザーの一端(660)に付着している。これらのテザー末端は、ヘテロ環、リボース基、又はリン酸骨格のリンカー基修飾へ付着することができる。このモノマー基質は、ホスホリボシル骨格内に位置された基質内切断部位も有し、その結果切断は、拘束されたテザーの拡張を提供する。例えばクラスX ATPモノマーの合成のために、8-[(6-アミノ)ヘキシル]-アミノ-ATP又はN6-(6-アミノ)ヘキシル-ATP上のアミノリンカーが第一テザー付着点として使用され、並びに、橋かけしない修飾の(N-1-アミノアルキル)ホスホリアミデート又は(2-アミノエチル)ホスホネートなどの混合された骨格リンカーは、第二テザー付着点として使用されることができる。更に、例えばホスホリアミデート(3' O-P-N 5')又はホスホチオラート(3' O-P-S 5')などの橋かけする骨格修飾を、主要骨格の選択的切断に使用することができる。

## 【0382】

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、前記基質構築物が使用される合成プロトコールに関して適切に構成された

末端基である。例えば、 $R^1 = 5'$ -三リン酸エステル及び $R^2 = 3'$ -OHは、ポリメラーゼプロトコールのためである。この $R^1$  5'三リン酸エステルは、アミノエチルホスホネート又は3'-O-P-S-5'ホスホロチオラートなどの混合型骨格修飾を含むことができ、それぞれテザー連結及び骨格切断を可能にする。任意に $R^2$ は、循環式単基質付加のための可逆的なブロック基により構成されることができる。あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、化学共役のためにリンカー末端基により構成されることができる。 $R^1$ 及び $R^2$ は、一般的型XRであることができ、ここでXは連結基であり、及びRは官能基である。

#### 【0383】

集成の際に、このモノマー性基質構築物は、1本鎖化されたテンプレートをガイドとして使用するテンプレートに方向づけられた重合のプロセスにより、新生娘鎖の伸長可能な終端上で最初に重合される。一般にこのプロセスは、プライマーから開始され、5'から3'方向に進行する。娘鎖を形成するために、一般にDNAポリメラーゼ又は他のポリメラーゼが使用され、条件は、テンプレート鎖の相補的コピーが得られるように選択される。

#### 【0384】

図66Bに示されたように、この核酸塩基残基は、次へ1つのサブユニットを重合し、「二重鎖娘鎖」と称される中間体を形成する。主要骨格( $\sim N \sim$ )、テンプレート鎖( $\sim N' \sim$ )、及びテザー(T)は、二重鎖化された娘鎖として示されており、ここでは、複数の反復サブユニットを示している。娘鎖の各サブユニットは、反復「モチーフ」であり、これらのモチーフは、ここでは上付きのにより示されている、種特異的変動性を有する。この娘鎖は、モチーフ種のライブラリーから、テンプレートに方向づけられたプロセスにより選択された、モノマー性基質構築物種から形成され、各基質構築物種のモノマー基質は、標的テンプレート鎖上の対応する相補的ヌクレオチドに結合する。この方式で、娘鎖の核酸塩基残基の配列(すなわち主要骨格)は、標的テンプレート鎖の連続した相補的コピーである。

#### 【0385】

図66Bに示された核酸塩基残基上の(「V」)は、基質を、第一部分及び第二部分に分割する選択的に切断可能な結合を意味する。切断時に、1つのサブユニットの第一部分(669)は、隣接サブユニットの第二部分(668)に及びサブユニット内で連結され続け、各部分は、テザーにより互いに橋かけられるであろう。これらは、必ず選択的に切断可能であり、エキスパンドマーそれ自身を分解することなく、テザー(及びエキスパンドマー)を解放及び拡張する。

#### 【0386】

前記娘鎖は、2つの骨格「主要骨格」及び「拘束されたエキスパンドマー」の骨格を有することを認めることができる。この主要骨格は、連続して近接されかつ重合されたモノマー性基質で構成されている。「拘束されたエキスパンドマー骨格」は、モノマー基質内で選択的に切断可能な連結を迂回し、かつ骨格部分に連結している基質内結合により形成され、各骨格部分は依然無傷の核酸塩基残基の2つの部分に連結されたテザーである。拘束されたエキスパンドマー骨格は、各モノマー内の選択的に切断可能な結合を超えて橋かけし、かつこれらの選択的に切断可能な結合が切断されかつモノマーが図66Cに示された部分 $n^1$ 及び $n^2$ に断片化される場合には、依然共有的に無傷であり続ける。

#### 【0387】

切断は、モノマー基質の酵素的共役により進行され、例えば隣接塩基間のホスホジエステル又は混合型骨格結合により、主要骨格を形成する。ここに示された構造において、娘鎖主要骨格が形成されている。標的テンプレート鎖の解離又は分解、並びに選択的に切断可能な結合の切断後、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となる。テンプレート鎖の解離法は、例えば熱変性を含む。

#### 【0388】

図66Cは、テンプレート鎖の解離後及び選択的に切断可能な結合の切断後の、クラスXエキスパンドマー産物の代表である。このエキスパンドマー産物鎖は、複数のサブユニットを含み、ここでは、娘鎖を作製している $m$ 個のサブユニットの鎖内の番目のサブユ

10

20

30

40

50

ニットを意味し、ここで  $m = 1, 2, 3 \sim m$  であり、 $m > 10$ 、一般に  $m > 50$ 、及び典型的には  $m > 500$  又は  $> 5,000$  である。各サブユニットは、モノマー基質の位置  $n^1$  及び  $n^2$  に連結されたその拡張された立体配置でテザーで形成され、かつ各サブユニットは、モノマー重合結合により次に連結される。サブユニットモチーフの各サブユニットは、エキスパンドマー中間体(娘鎖)のテンプレートに方向づけられた集成により確立された種特異的遺伝情報を含む。

#### 【0389】

図66Dは、分子モデルとしての基質構築物を示し、ここで核酸塩基メンバー(664)は、核酸塩基の第一部分及び第二部分に結合され、各部分はテザーへの付着部位(662,663)を伴う。テザー(660)は、レポーター基(900,901,902)を含む。核酸塩基のこれら2つの部分を分離する選択的に切断可能な結合は、「V」(665)により示されている。

10

#### 【0390】

図66Eは、エキスパンドマー産物を示している。このサブユニットは、図66Cにおいて  $n^1$  及び  $n^2$  として示された、核酸塩基部分(669,668)に付着された、拡張されたテザー(660)を含み、各サブユニットは、核酸塩基間結合により結合される。この切断プロセスを通じて、拘束されたエキスパンドマーは解放され、エキスパンドマー産物となり始める。以前は拘束された立体配置にあったテザーメンバーは、この時点では拡張された立体配置にあり、これによりテンプレート標的の配列情報を線状に伸展するように機能する。テザーの拡張は、エキスパンドマーに沿った配列情報の線密度を低下し、かつレポーターのサイズ及び存在量を増大するためのプラットフォームを提供し、これは次にテンプレート配列の検出及び解読のためのシグナル対ノイズを改善する。

20

#### 【0391】

このテザーは3つのレポーター基を持つレポーター構築物として描かれているが、様々なレポーター立体配置が、テザー上に整列されることができ、かつモノマーを同定する単独のレポーターを含むことができるか、又はこのテザーは裸のポリマーであることができる。場合によっては、1種以上のレポーター前駆体が、テザー上に整列され、エキスパンドマー産物の集成後、レポーターは、親和性結合又は共有結合される。

#### 【0392】

図67は、クラスXのXNTP基質構築物によるエキスパンドマーの集成方法を示す。第一図において、テンプレートをプライミングするためにヘアピンプライマーが使用され、このテンプレートは、ポリメラーゼ及びクラスXモノマー基質と接触される。モノマー基質のテンプレートに方向づけられた付加により、徐々に新生娘鎖を伸長するための重合は、工程Iに示されている。拡大図(図67a)は、これをより詳細に図示している。テンプレート鎖に相補的な娘鎖は、内部切断部位(「V」)により修飾された核酸塩基基質で構成されることが示されている。工程IIにおいて、エキスパンドマー中間体を形成するプロセスは完成され、及び工程IIIにおいて、進行中の、中間体の切断、解離及び娘鎖の拡張のプロセスが示されている。拡大図(図67b)において、テザーの拘束を緩和する核酸塩基基質の内部切断が示されており、これはエキスパンドマーの骨格を拡張、伸長する。

30

#### 【実施例】

#### 【0393】

40

(実施例1)

(選択的に切断可能なリボシル-5'-3'ヌクレオチド間結合を持つキメラ2merエクスポーブ「CA」の合成)

オリゴマー性基質構築物は、プローブメンバー及びテザーメンバーで構成され、かつ一般的「プローブ-ループ」構築を有する。プローブメンバー合成は、固相オリゴマー合成の良く確立された方法を使用し実現される。これらの方法において、核酸塩基の樹脂上の新生プローブ鎖への付加は、例えばホスホロアミダイト化学(米国特許第4,415,732号及び第4,458,066号)により達成され、並びに数ミリグラム又は数グラムの合成オリゴマーは、容易に入手可能な自動合成装置を用い、経済的に合成することができる。典型的固相オリゴヌクレオチド合成は、脱保護、共役、キャップ形成、及び酸化の4工程の反復実行に関

50

連している。しかし、クラスIエクスプローブ基質構築物のプローブ内の少なくとも1つの結合は、選択的に切断可能な結合であり、少なくとも2つのプローブ部分は、テザーメンバーの受容のために修飾されている。この選択的に切断可能な結合は、テザー付着のために選択されたプローブ部分の間に位置している(すなわち、テザー付着の第一点及び第二点は、各々、プローブの第一部分及び第二部分上のどこかに位置されることのみ必要であり、これらの部分は選択的に切断可能な結合により結合されているので、「間」は、「隣接核酸塩基メンバーの間」の意味に限定されるものではない)。この実施例において、リボヌクレアーゼHにより選択的に切断可能であるリボシル5'-3'ヌクレオチド間結合は、選択的に切断可能な結合であり、かつテザー付着の2つの点は、2merプローブの第一及び第二の核酸塩基残基である。

10

#### 【0394】

リンカー修飾されたエクスプローブの合成は、例えばGlen Research社(スターリング, VA, 米国)、BioGenex社(サンラモン, CA, 米国)、Dalton Chemical Laboratories社(トロント, カナダ)、Thermo Scientific社(米国)、Link Technologies社(英国)などから市販のホスホロアミダイトを使用し実現されるか、又は特別注文により合成することができる。良く確立された合成方法を使用し、説明されたプローブを調製することができ、ここでは本実施例においてアミノ修飾因子C6デオキシアデノシンである3'核酸塩基が、5'-ジメトキシトリチル-N6-ベンゾイル-N8-[6-(トリフルオロアセチルアミノ)-ヘキサ-1-イル]-8-アミノ-2'-デオキシアデノシン-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を使用し、普遍的支持体へ最初に付着され、引き続き5'-ジメトキシトリチル-N-ジメチルホルムアミジン-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]-シチジン, 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を使用しアミノ修飾因子C6シチジンが付加され、ここでこの5'シチジンはリボヌクレオチドである。化学リン酸化試薬の添加、それに続く標準的切断、脱保護、及び精製の方法は、この合成を完成する。このジヌクレオチド生成物は、中心に切断可能なリボシル-5', 3'結合及び各塩基上にアミノリンカーを伴う、5'リン酸(アミノC6-シトシン)(アミノC6-デオキシアデノシン)3'である。

20

#### 【0395】

本実施例のためのエクスプローブテザーは、ビス-N-スクシンイミジル-[ペンタエチレングリコール]エステル(Pierce社, ロクフォード IL; 製品番号21581)から構築される。修飾されたpCAオリゴマーのリンカーアミンは、製造業者の指示に従いビス(NHS)PEG5と架橋される。循環式PEG-プローブ構築に関して予想される分子量の生成物が得られる。

30

#### 【0396】

(実施例2)

(選択的に切断可能なホスホロチオラート結合を持つ4merエクスプローブ「TATA」の合成)

選択的に切断可能な結合として、ホスホロチオラート連結を持つエクスプローブ4merを合成することができる。下記実施例について、5'リン酸(dT)(アミノC6-dA)(dT)(アミノC6-dA)3'テトラヌクレオチドの合成が説明されている。

#### 【0397】

最初に5'メルカプト-デオキシチミジンを、Magらの論文(「橋かけされたヌクレオチド間5'-ホスホロチオエート連結を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage)」, Nucl Acids Res 19:1437-41, 1991)に説明されたように調製する。チミジンは、ピリジン中の2当量のp-トルエンスルホンクロリドと、室温で反応し、得られる5'-トシレートを、エタノールからの結晶化により単離する。このトシレートは、5当量のナトリウムトリチルチオレート(現場で調製)により、5'-(S-トリチル)-メルカプト-5'-デオキシ-チミジンに転換する。この5'-(S-トリチル)-メルカプト-チミジンヌクレオチドを精製し、テトラゾールの存在下で、2-シアノエトキシ-ビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン)と反応し、3'-O-ホスホロアミダイトビルディングブロックを生成する。

40

50

## 【0398】

自動合成を開始するために、アミノ修飾因子C6デオキシアデノシンを、普遍的支持体に、5'-ジメトキシトリチル-N6-ベンゾイル-N8-[6-(トリフルオロアセチルアミノ)-ヘキサ-1-イル]-8-アミノ-2'-デオキシアデノシン-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を使用し、最初に付着し、その後先に調製されたメルカプトチミジンホスホロアミダイトを添加する。次のアミノC6 dAホスホロアミダイトの添加の前に、S-トリチル基を、50mM水性硝酸銀により、最初に脱保護し、この樹脂を水で洗浄する。この樹脂を典型的には、次にDTTなどの還元剤により処理し、この切断時に偶発的に形成されたジスルフィドを除去する。次にこのカラムを再度水で、及びアセトニトリルで洗浄し、遊離チオールを、標準条件で、テトラゾールの存在下、アミノC6デオキシアデノシンホスホロアミダイトと反応させ、これにより終端デオキシアデノシンと3-メルカプト-チミジンの間に橋かけするS3'-P5'ホスホロチオラート結合を持つ「ATA」を形成する。次のサイクルにおいて、標準デオキシチミジンホスホロアミダイトを添加する。最後に、化学リン酸化試薬の添加、それに続く標準的切断、脱保護、及び精製の方法は、この合成を完成する。このテトラヌクレオチド生成物は、5'リン酸(dT)(アミノC6-dA)(dT)(アミノC6-dA)3'である。

10

## 【0399】

このホスホロチオラート結合は、例えばAgCl、酸又はヨードエタノールにより選択的に切断可能である(Magらの論文「橋かけされたヌクレオチド間5'-ホスホロチオエート連結を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage)」、Nucl Acids Res 19:1437-41, 1991)。この選択的に切断可能な結合は、第二及び第三の核酸塩基の間であるので、このテザーは、この結合を橋かけするようにデザインされ、かつ選択的に切断可能な結合のいずれかの側の任意の2個の核酸塩基(又は任意の2つの主要骨格付着点)に付着されることができる。ゼロリンカー及びリンカー化学の方法は、例えば実施例1に説明されたような、オリゴマーの合成において使用される第1級アミンを有するリンカーの提供を含む。「TATA」オリゴマー上のこのアミン修飾されたリンカーは、典型的にはオリゴマー合成時に保護され、かつオリゴヌクレオチド合成の完了の正常な過程において脱保護される。

20

## 【0400】

次に本実施例のためのエクスプローブテザーは、ビスエポキシド活性化されたポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル(SigmaAldrich社, セントルイス MO, 製品番号475696)から構築される。アミンの活性化されたPEG末端基によるエポキシド反応を希釈液中で実行し、あらゆる競合する連結反応を最小化する。同様の反応性が、混合された無水物又は酸クロリドによっても得られ、かつテザーの付着を配向するために、ヘテロ二官能性連結基を利用することができる。テザー化された反応生成物を、分取的HPLCにより分離し、かつ質量分光法により特徴付ける。循環された4mer PEG-プローブ構築物に関しておよその分子量(約2.5Kd)の生成物が得られる。およそ $M_n = 500$ のPEGテザーの分布が、この方法で得られる。これは、約40 (約3.36 /PEGユニット)のテザーに対応する。

30

## 【0401】

(実施例3)

(選択的に切断可能な5'-3'ホスホジエステル結合を持つ3merエクスプローブ「CTA」の合成)

40

選択的に切断可能な結合としてのホスホジエステル連結を伴うエクスプローブを合成することもできる。下記の実施例に関して、橋かけしないホスホロチオエート修飾を伴う5'リン酸エステル(アミノC6-dC)(アミノC6-dT)(dA)3'トリヌクレオチドの合成が説明されている。ホスホジエステル結合は、様々なヌクレアーゼにより攻撃される。橋かけしないイオウを伴うホスホロチオエート結合は、本実施例において、ヌクレアーゼ-耐性結合として使用される。

## 【0402】

50

3'から5'方向への自動合成に関して、CPG固定されたデオキシアデノシン固形支持体(5'-ジメトキシトリチル-N-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシン,3'-スクシノイル-長鎖アルキルアミノ-CPG 500)を使用する。この第一サイクルにおいて、アミノ修飾因子C6デオキシチミジンホスホロアミダイト(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)を共役する。キャップ形成前に、固定されたdAを、Beaucage試薬としても公知の硫化剤(Glen Research社, スターリング VA; カタログ番号40-4036)と、製造業者のプロトコールに従い反応させる。この試薬は一般に、合成装置の個別のポートを通り添加される。チオール化後、アミノ修飾されたC6デオキシチミジン(5'-ジメトキシトリチル-N-ジメチルホルムアミジン-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'-デオキシチミジン,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)を共役する。キャップ形成前に、固定されたdCを、Beaucage試薬としても公知の硫化剤(Glen Research社, スターリング VA; カタログ番号40-4036)と、製造業者のプロトコールに従い反応させる。得られる「CTA」3merは、TとAの間にホスホロチオエート結合を、及びCとTの間にホスホジエステル結合を有する。化学リン酸化試薬の添加、それに続く標準的切断、脱保護、及び精製の方法は、この合成を完成する。

#### 【0403】

ホスホロチオエート連結のヌクレアーゼ攻撃に対する抵抗は、例えばMatsukuraらの論文(「オリゴデオキシヌクレオチドのホスホロチオエートアナログ; ヒト免疫不全ウイルスの複製及び細胞変性作用の阻害因子(Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus)」、PNAS 84:7706-10, 1987)、Agrawalらの論文(「ヒト免疫不全ウイルスの阻害因子としてのオリゴデオキシヌクレオシドホスホロアミデート及びホスホロチオエート(Oligodeoxynucleotide phosphoroamidates and phosphorothioates as inhibitors of human immunodeficiency virus)」、PNAS 85:7079-83, 1988)、及び米国特許第5770713号によく特徴付けられている。C及びTは両方とも、リンカー又はゼロ-リンカー修飾され、この誘導体化は、テザーメンバーの付着に役立つ。

#### 【0404】

(実施例4)

(選択的に切断可能な5' N-P-O 3'ホスホロアミデート結合を持つ3merエクスポープ「ATA」の合成)

アミノ修飾因子C6デオキシアデノシンは、5'-ジメトキシトリチル-N6-ベンゾイル-N8-[6-(トリフルオロアセチルアミノ)-ヘキサ-1-イル]-8-アミノ-2'-デオキシアデノシン-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を用い、普遍的支持体へ最初に付着し、引き続き次ぎのサイクルにおいて、MMT-ブロックされた5'アミノ-dT(5'モノメトキシトリチルアミノ-2'-デオキシチミジン)を添加する。脱ブロック後、この5'-アミノ末端を、アミノ修飾されたC6デオキシアデノシンホスホロアミダイトと、標準条件下で反応する。化学リン酸化試薬の添加、それに続く標準的切断、脱保護、及び精製の方法は、合成を完成する。トリヌクレオチド5'(アミノC6-dA)(O-P-N)(dT)(O-P-O)(アミノC6-dA)3'は、5'アミノC6-dAと最後から2番目のdTの間にホスホロアミデート結合を有する。

#### 【0405】

このホスホロアミデート結合は、Magらの論文(「非キラルヌクレオチド間ホスホロアミデート連結を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of oligodeoxynucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoroamidate linkages)」、Nucl. Acids Res. 17: 5973-5988, 1989)に説明されたような、80%酢酸を用いるオリゴマーの処理により、ホスホジエステル結合が無傷であり続ける条件下で、選択的に切断可能である。5'N-P-Oホスホロアミデート結合に橋かけするためにテザーを付着することにより、この種のダイマーを含むエクスパンドマーは、主要骨格のホスホロアミデート結合の選択的切断により拡張することができる。

#### 【0406】



## (実施例5)

(内部光切断可能な結合を持つ6merエクスポープ「CACCAC」の合成)

修飾されないデオキシシトシン及びデオキシアデノシンホスホロアミダイトによる標準の3'から5'への合成後、アミノ-修飾されたC6 dC(5'-ジメトキシトリチル-N-ジメチルホルムアミジン-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'-デオキシシチジン,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社; カタログ番号10-1019)を共役し、これによりCACトリマーを形成する。次のサイクルに関して、光切断可能なリンカーが、(3-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-(2-ニトロフェニル)-プロパン-1-イル-[(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; Glen Research社; カタログ番号10-4920)を共役する。次のサイクルにおいて、第二のアミノ-修飾されたdCを付加し、引き続き2つの最終ラウンドで、各々、dA及びdCホスホロアミダイトを標準付加する。得られる生成物「CAC-pc-CAC」は、第三及び第四の塩基位置にアミノ-リンカーを含み、かつ2つのアミノ-修飾された塩基の間に光切断可能なニトロベンゼン構築物により形成された選択的に切断可能な結合を橋かけするテザーの付加により修飾することができる。光切断可能なリンカーで修飾されたホスホジエステル骨格の選択切断は、例えば、Sauerらの論文(「光切断及び電荷タグ付けによる一塩基多型のMALDI質量分析解析(MALDI mass spectrometry analysis of single nucleotide polymorphism by photocleavage and charge-tagging)」、Nucleic Acids Research 31,11 e63, 2003)、Valloneらの論文(「MALDI-TOF MSにおけるUV切断可能なオリゴヌクレオチドを使用するSNPs遺伝子型解析(Genotyping SNPs using a UV-photocleavable oligonucleotide in MALDI-TOF MS)」、Methods Mol. Bio. 297:169-78, 2005)、及びOrdoukhanianらの論文(「多用途の光切断可能なDNAビルディングブロックのデザイン及び合成、光誘起型ハイブリダイゼーションへの適用(Design and synthesis of a versatile photocleavable DNA building block, application to phototriggered hybridization)」、J. Am. Chem. Soc. 117, 9570-9571, 1995)に明らかにされている。

【0407】

## (実施例6)

(エクスマー基質構築物の合成)

エクスマー基質構築物は、エクスポープのデザイン及び組成に密接に関連している。エクスマーライブラリーは、例えば、エクスポープの5'-ピロリン酸化により合成される。5'-リン酸エステルのピロリン酸処理の確立された手法は、例えばAbramovaらの論文(「ジヌクレオチド5'-三リン酸の容易かつ効果的合成(A facile and effective synthesis of dinucleotide 5'-triphosphates)」、Bioorganic Medicinal Chemistry 15: 6549-55, 2007)を含む。この方法において、オリゴマーの終端リン酸エステルを、最初にセチルトリメチルアンモニウム塩としての終端リン酸エステルを、求核触媒としてDMAP(4-ジメチルアミノピリジン)又は1-MeIm(1-メチルイミダゾール)を使用し、DMF/DMSO中で等モル量のトリフェニルホスフィン( $\text{Ph}_3\text{P}$ )及び2,2'-ジピリジルジスルフィド( $\text{PyS}_2$ )と反応することにより、引き続きのピロリン酸との反応に関する必要性に応じて活性化する。この生成物を、アセトン中の $\text{LiClO}_4$ により沈殿し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製する。

【0408】

様々な他の方法は、5'三リン酸エステルエクスマーの強固な合成と考えることができる。Burgess及びCookの論文(Chem Rev 100(6):2047-2060)に説明されているように、これらの方法は、ヌクレオシドホスホロアミダイトを使用する反応、活性化されたヌクレオシドリン酸へのピロリン酸エステルの求核攻撃を介した合成、活性化されたヌクレオシドピロリン酸へのリン酸エステルの求核攻撃を介した合成、活性化されたリン酸シントンの二リン酸エステルの求核攻撃を介した合成、ヌクレオシド由来の活性化された垂リン酸エステル又はホスホロアミダイトが関与する合成、三リン酸エステル求核試薬による5'-O-脱離基の直接置換が関与する合成、及び生体触媒法を含むが、これらに限定されるものではない。ポリメラーゼ適合性のジヌクレオチド基質を作製するひとつの具体的方法は、5'

ーリン酸基を活性化するために、N-メチルイミダゾールを使用し；ピロリン酸エステル(トリブチルアンモニウム塩)との後続の反応は、その三リン酸エステルを生成する(Bogachevの論文、1996)。別の手法において、トリヌクレオチドホスホロアミデートは、Kayushinにより合成された(Kayushin ALらの論文、1996、「トリヌクレオチドホスホロアミダイト合成の簡便法(A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites)」、Nucl Acids Res 24:3748-55)。

【0409】

(実施例7)

(ポリメラーゼ-ホスホロアミデート切断を持つエクスパンドマー合成)

エクスパンドマーの合成は、5'-三リン酸エステル末端及び3'-OH末端を伴い調製された基質構築物を用いて実行される。Klessの特許である米国特許第7,060,440号は、三リン酸オリゴマーを重合するためのポリメラーゼの使用を開示しており、及びこの方法は、ここでエクスパンドマーの合成に適合される。この基質構築物は、ヌクレオチド間5' N-P-Oホスホロアミデート選択的に切断可能な結合を伴う2merプロンプター “pppCA” 及びPEGテザール構築物からなる。テンプレート鎖及び仲間(companion)プライマーを合成し、かつ精製後、使用する。配列：

【化11】

“TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号2)

を、テンプレートとして使用する。配列：

【化12】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。このプライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。プライマー及びテンプレートのアニーリングは、二重鎖プライマー及び遊離3'-OH及び5'末端1本鎖化された長さ20塩基の突出を伴うテンプレートを形成する。この基質構築物及びSequenase(商標)ブランドの組換えT7 DNAポリメラーゼ(US Biochemicals社、クリーブランド、OH)を次に添加し、その重合を、最適重合に調節された条件下で30分間続ける。エクスマー重合を確認するために、この重合反応の試料は、ゲル装加緩衝液と混合し、20%TBEアクリルアミドゲル(Invitrogen社、米国)上で、ポリメラーゼ陰性対照及びMWマーカールと共に、電気泳動する。

【0410】

このエクスパンドマー中間体は、Magらの論文の手順(「非キラルヌクレオチド間ホスホロアミデート連結を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoramidate linkages)」、Nucl. Acids Res., 17: 5973-88, 1989)に従い、80%酢酸により5時間室温で処理し、ホスホロアミデート結合を選択的に切断し、これは同様に電気泳動により確認する。

【0411】

(実施例8)

(ポリメラーゼ-ホスホロチオエート切断を持つエクスパンドマー合成)

エクスパンドマーの合成は、5'-三リン酸エステル末端及び3'-OH末端を伴い調製された基質構築物を用いて実行される。Klessの特許である米国特許第7,060,440号は、三リン酸オリゴマーを重合するためのポリメラーゼの使用を開示している。この基質構築物は、“pppCA”である。この基質構築物は、選択的に切断可能なヌクレオチド間ホスホロチオエート骨格連結及びPEG 2000テザール構築物を伴いデザインされている。テンプレート鎖及び仲間プライマーを合成し、かつ精製後、使用する。配列：

【化13】

“TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号2)

を、標的テンプレートとして使用する。配列

【化 1 4】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。このプライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。プライマー及びテンプレートのアニーリングは、二重鎖プライマー及び遊離3'-OH及び5'末端1本鎖化された長さ20塩基の突出を伴うテンプレートを形成する。この基質構築物及びTherminator(商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社、米国)を、重合に最適化された緩衝液及び塩と共に次に添加する。重合は、最適重合に調節された条件下で60分間続く。エクスマー重合を確認するために、この重合反応の試料は、ゲル装加緩衝液と混合され、20%TBEアクリルアミドゲル(Invitrogen社、米国)上で、ポリメラーゼ陰性対照及びMWマーカールと共に、電気泳動する。

10

【0 4 1 2】

エクスパンドマー中間体のホスホロチオラート結合は、例えばAgCl、酸又はヨードエタノールにより、選択的に切断可能である(Magらの論文、「橋かけされたヌクレオチド間5'-ホスホロチオエート連結を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage)」、Nucleic Acids Research, 19(7):14371441,1991)。切断は、ゲル電気泳動により確認する。

20

【0 4 1 3】

(実施例9)

(リガーゼによるエクスパンドマーキメラ合成)

エクスパンドマーの合成は、5'-リン酸エステル末端及び3'-OH末端を伴い調製された基質構築物を用いて実行される。この基質構築物は、キメラ“5'pdC rA~dC dA 3'”の4merであり、ここで5'側の最後から2番目のアデノシンはリボヌクレオチドであり、この基質の残りはデオキシリボヌクレオチドである。この基質構築物は、1個の選択的に切断可能なヌクレオチド間リボシル5'-3'ホスホジエステル結合(“~”により示される)及びPEG 2000テザーループ構築物を伴うようにデザインされ、ここでテザーは、この4merの終端“C”及び“A”で付着されている。テンプレート鎖及び仲間プライマーを、合成し、かつ精製後、使用する。配列：

30

【化 1 5】

“TGTGTGTGTGTGTGTGTGTG ATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号2)

を、標的テンプレートとして使用する。配列

【化 1 6】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。このプライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。プライマー及びテンプレートのアニーリングは、二重鎖プライマー及び遊離3'-OH及び5'末端1本鎖化された長さ20塩基の突出を伴うテンプレートを形成する。この基質構築物及びT4 DNAリガーゼ(Promega社、マジソン、WI、米国；カタログ番号M1801)を次に、一過性プロンプハイブリダイゼーション及びライゲーションのために最適化された温度、緩衝液及び塩で、添加する。ライゲーションは、6時間継続する。エクスプロンプライゲーションを確認するために、ライゲーション反応の試料は、ゲル装加緩衝液と混合し、20%TBEアクリルアミドゲル(Invitrogen社、カールスバッド、CA、米国)上で、ポリメラーゼ陰性対照及びMWマーカールと共に、電気泳動する。

40

【0 4 1 4】

第二工程において、このエクスパンドマー中間体を、リボヌクレアーゼHにより処理し、RNase不安定な5'-3'ホスホジエステル結合を切断し、エクスパンドマー産物を生成し、これは同じくゲル電気泳動により確認する。

50

## 【0415】

## (実施例10)

## (リン酸エステルリンカー構築体の調製)

テザーリンカーは、Agrawalの論文において考察されたように(「2つの異なるレポーター基の付着のためのオリゴヌクレオチドの位置指定官能基化(Site specific functionalization of oligonucleotides for attaching two different reporter groups)」、Nuc. Acids Res. 18:5419-23, 1990)、ホスホロチオエートSジエステル又はホスホロアミデートN-アミドにも付着されてよい。アミノヘキシルホスホロアミデート(N-1アミノアルキル)リンカー及びホスホロチオエートの2種の異なるヌクレオチド間骨格連結の官能基化の方法が明らかにされている。Agrawalにより説明されたように調製されたC6アミンを、本発明の核酸塩基間テザー構築物の合成のためのリンカーとして使用する。N3'-P5'結合の誘導体化も報告されている(Sinyakovらの論文、「ヌクレオチド間ホスホロアミデート結合を含むオリゴヌクレオチドの官能基化(Functionalization of the oligonucleotides containing an internucleotide phosphoroamidate bond)」、Russian J Bioorganic Chem, 29:100-102, 2003)。

10

## 【0416】

## (実施例11)

## (テザー構築物へのヘテロ二官能性経路)

選択的に切断可能な結合を含む修飾されたオリゴマーの合成は、実施例1-5において説明されている。ここで4merの第二位置にC6-アミノ修飾された塩基及び第三位置に4-ホルミル安息香酸エステル-リンカー修飾された塩基を伴う4merが、標準のオリゴマー合成化学により調製される。この第二及び第三の塩基は、リボシル5'-3'ホスホジエステル結合、デオキシリボシル5'-3'ホスホジエステル結合、ホスホロチオラート結合(5'0-P-S3'若しくは5'S-P-03')、ホスホロアミデート結合(5'0-P-N3'若しくは5'N-P-03')、又は光切断可能な結合から選択された選択的に切断可能な結合により隔てられている。C6リンカーのアミンを、Sulfo EGSと反応し、活性エステルNHS基を形成する。次にヘテロ二官能性テザーループ合成を、修飾されたプローブメンバーの、アミン及びヒドラジド末端終結基で官能基化されたテザーとの反応により実現する。テザー-環状化された末端生成物が得られる。

20

## 【0417】

## (実施例12)

## (色素-標識されたテザー構築物)

単独のレポーターを持つエクスプローブ基質構築物を調製する。第一及び第二塩基上にC6アミンを伴う2merを、標準方法を用いて最初に合成する。この第一及び第二の塩基は、リボシル5'-3'ホスホジエステル結合、デオキシリボシル5'-3'ホスホジエステル結合、ホスホロチオラート結合(5'0-P-S3'若しくは5'S-P-03')、ホスホロアミデート結合(5'0-P-N3'若しくは5'N-P-03')、又は光切断可能な結合から選択された選択的に切断可能な結合により隔てられている。この実施例において、テザーは、1個の内部リンカー基を持つ種-特異的末端-官能基化されたPEG2000分子であり、このリンカーはテザー中央部(mid-tether)に配置されたマレイミド-官能基化されたリンカーである。レポーターは、デンドリマー上のスルフヒドリル部分を介して、テザー上のマレイミドリリンカー基に付着された色素-標識されたデンドリマーである。これにより得られるレポーター構築物は、テザー上に1個のレポーターを含む。シスタミンデンドリマー(Dendritic Nanotechnologies社、マウントプレザント, MI, 米国; カタログ番号DNT-294 G3、直径5.4nm、デンドリマー半分につき16個の表面アミン)が、レポーターとして使用される。特異的色素の付着によるか、又は色素のデンドリマー上のアミン基への組合せにより、この基質構築物種は、同定のために独自に標識される。

30

40

## 【0418】

## (実施例13)

## (ペプチド-標識されたテザー構築物)

50

単独のレポーターを持つエクスプローブ基質構築物を調製する。第一及び第二塩基上にC6アミンを伴う2merを、標準方法を用いて最初に合成する。この第一及び第二の塩基は、リボシル5'-3'ホスホジエステル結合、デオキシリボシル5'-3'ホスホジエステル結合、ホスホリチオラート結合(5'0-P-S3'若しくは5'S-P-03')、ホスホロアミデート結合(5'0-P-N3'若しくは5'N-P-03')、又は光切断可能な結合から選択された選択的に切断可能な結合により隔てられている。この実施例において、テザーは、1個の内部リンカー基を持つ種-特異的末端-官能基化されたPEG2000分子であり、この事例においてこのリンカーはテザー中央部に配置されたマレイミド-官能基化されたリンカーである。レポーターは、デンドリマー上のスルフヒドリル部分を介して、テザー上のマレイミドリリンカー基に付着された色素-標識されたデンドリマーである。これにより得られるレポーター構築物は、テザー上に1個のレポーターを含む。シスタミンデンドリマー(Dendritic Nanotechnologies社、マウントプレザント, MI, 米国; カタログ番号DNT-294 G3、直径5.4nm及びデンドリマー半分につき16個の表面アミン)が、レポーターとして使用される。特異的色素の付着によるか、又は色素のデンドリマー上のアミン基への組合せにより、この基質構築物種は、同定のために独自に標識される。官能基化されたアミンである、特異的ペプチドのデンドリマーへの付着により、この基質構築物種を、後の同定のためにタグ付けする。付着されたペプチドの寸法及び電荷を、検出装置における検出特徴として使用する。

【0419】

(実施例14)

(テザーレポーター構築物へのヘテロ二官能性経路)

複数のレポーターを伴う基質構築物を調製する。2merの第一位置にC6-アミノ修飾された塩基及び第二位置に4'-ホルミル安息香酸エステル修飾された塩基(4FB)を伴う2merのライブラリーを、標準有機化学により調製する。この第一及び第二の塩基は、リボシル5'-3'ホスホジエステル結合、デオキシリボシル5'-3'ホスホジエステル結合、ホスホリチオラート結合(5'0-P-S3'若しくは5'S-P-03')、ホスホロアミデート結合(5'0-P-N3'若しくは5'N-P-03')、又は光切断可能な結合から選択された選択的に切断可能な結合により隔てられている。このアミンは、Sulfo EGSと反応し、活性エステルNHS基を形成する。第二工程において、種-特異的二官能性アミンレポーターセグメント(セグメント1)を、この活性NHS基と反応し、並びに種-特異的二官能性ヒドラジドレポーターセグメント(セグメント4)を、4FBと反応する。次にセグメント1上の遊離アミンを、Sulfo EGSと反応し、活性エステルNHSを形成する。アミン及び4FB末端基を伴うレポーターセグメントの対(セグメント2及び3)からなる種-特異的ヘテロ二官能性キャップを、次にこの構築物と反応し、そのテザーループを閉じる。

【0420】

これにより得られたレポーター構築物は、テザー構築物上に4つのレポーターを含む。この実施例において、レポーターは、各ポリマーセグメントにチオエーテル結合により共有結合するためにシスタミンリンカーを伴うポリアミンデンドロンであり(Dendritic Nanotechnologies社、マウントプレザント MI, 米国; カタログ番号DNT-294: G4、直径4.5nm、デンドリマー半分につき32個の表面アミン)、このポリマーメンバーは、各々内部リンカー基を伴う、末端-官能基化されたPEG2000である。各テザーセグメントは、単独のレポーターで構成される。4つの方向性をもって共役されたセグメントにより、 $2^4$ の可能性があるレポーターコード組合せが利用可能である。

【0421】

(実施例15)

(合成後標識によるレポーター構築物へのヘテロ二官能性経路)

複数のレポーターを持つ基質構築物を調製する。2merの第一位置にC6-アミノ修飾された塩基及び第二位置に4'-ホルミル安息香酸エステル修飾された塩基(4FB)を伴う4merのライブラリーを、標準有機化学により調製する。この第二及び第三の塩基は、リボシル5'-3'ホスホジエステル結合、デオキシリボシル5'-3'ホスホジエステル結合、ホスホリチオラート結合(5'0-P-S3'若しくは5'S-P-03')、ホスホロアミデート結合(5'0-P-N3'若しくは5'N-P-03')、又は光切断可能な結合から選択された選択的に切断可能な結合により隔てられている。この実施例において、テザーは、1個の内部リンカー基を持つ種-特異的末端-官能基化されたPEG2000分子であり、この事例においてこのリンカーはテザー中央部に配置されたマレイミド-官能基化されたリンカーである。レポーターは、デンドリマー上のスルフヒドリル部分を介して、テザー上のマレイミドリリンカー基に付着された色素-標識されたデンドリマーである。これにより得られるレポーター構築物は、テザー上に1個のレポーターを含む。シスタミンデンドリマー(Dendritic Nanotechnologies社、マウントプレザント, MI, 米国; カタログ番号DNT-294 G3、直径5.4nm及びデンドリマー半分につき16個の表面アミン)が、レポーターとして使用される。特異的色素の付着によるか、又は色素のデンドリマー上のアミン基への組合せにより、この基質構築物種は、同定のために独自に標識される。官能基化されたアミンである、特異的ペプチドのデンドリマーへの付着により、この基質構築物種を、後の同定のためにタグ付けする。付着されたペプチドの寸法及び電荷を、検出装置における検出特徴として使用する。

N-P-03')、又は光切断可能な結合から選択された選択的に切断可能な結合により隔てられている。このアミンは、Sulfo EGSと反応し、活性エステルNHS基を形成する。第二工程において、種-特異的二官能性アミンレポーターセグメント(セグメント1)を、この活性NHS基と反応し、並びに種-特異的二官能性ヒドラジドレポーターセグメント(セグメント4)を、4FBと反応する。次にセグメント1上の遊離アミンを、Sulfo EGSと反応し、活性エステルNHSを形成する。アミン及び4FB末端基を伴うレポーターセグメントの対(セグメント2及び3)からなる種-特異的ヘテロ二官能性キャップを、次にこの構築物と反応し、そのテザーループを閉じる。

#### 【0422】

これにより得られたレポーター構築物は、テザー構築物上に4つのレポーターを含む。この実施例において、テザー構築物の標識後が説明されている。レポーター付着に使用される16merオリゴマーを、各テザーセグメントに共有結合する。各テザーセグメントは、官能基化されたPEG分子の一部で構成される。このレポーターは、16merオリゴマープロープとの共役のためにシスタミンリンカーを伴う、色素標識されたポリアミンデンドリマーである(Dendritic Nanotechnologies社、マウントプレザント MI、米国；カタログ番号DNT-294: G5、直径4.5nm、デンドリマー半分につき64個の表面アミン)。このエキスパンドマーの集成後、色素-標識されたデンドリマーを、オリゴマー性テザーセグメントとハイブリダイズする。この標識の方法は、DeMatteiらの論文に説明された方法に類似している(「単独部位ssDNA官能基化されたデンドロンの自己集成によるデザインされたデンドリマー合成(Designed Dendrimer Syntheses by Self-Assembly of Single-Site, ssDNA Functionalized Dendrons)」、Nano Letters, 4:771-77, 2004)。

#### 【0423】

(実施例16)

(色素-標識されたレポーターエレメント)

実施例14及び15を参照し、デンドリマー性レポーターエレメントの表面アミンを、活性エステル化学により標識する。Alexa Fluor 488(緑色)及びAlexa Fluor 680(赤色)が、Molecular Probes社(ユージーン, OR)からsNHS活性エステルとして一工程付着のために入手可能である。密度及び色素比を変動し、各レポーターエレメント上に識別可能な分子タグを作製する。

#### 【0424】

(実施例17)

(多状態レポーターエレメント)

色素の様々なパレットを、当業者に公知であるように、M-FISH及びSKYにおいて使用した技術に類似した技術により選択し、デンドリマー性レポーターへ複合する。従って各テザーのレポーターエレメントは、「空間アドレス」を構成し、これにより複数の色素結合部位を有する単独のデンドリマー性構築物は、複数のレポーターコードを作製することができる。実施例14及び15に説明されたテザー構築物を参照し、5-状態のスペクトルアドレスは、625種のレポーターコード組合せを作製する。

#### 【0425】

(実施例18)

(PEG-5000スパーサーテザー)

テザーセグメントを、SBX反応物に対する結合親和性をほとんど又は全く有さない、耐久性のある水溶液/有機溶媒可溶性ポリマーで構築する。修飾されたPEG 5000を、ポリリジン5000レポーターの側方に位置する柔軟なテザースパーサーに使用する。遊離PEG末端を、プローブメンバーへの付着のために官能基化する。このポリマーは、ヘテロ二官能性リンカー化学を使用するプローブ付着点の架橋により環状化する。

#### 【0426】

(実施例19)

(質量タグレポーター組成物の調製)

テザーを、以下のように合成する：切断可能な質量タグを、標準アミン共役化学を使用

10

20

30

40

50

し、ポリ-L-リジンペプチドで官能基化されたG5デンドリマー(Dendritic Nanotechnologies社, マウントプレザント MI)に共有結合する。このG5デンドリマーは、直径~5.7nmであり、かつ128個の反応性表面基を提供する。10,000分子量のポリリジンペプチドで官能基化されたG5デンドリマーの10個のストリング(string)は、~57nmデンドリマーセグメント内に集散的に約100,000個のレポーター付着部位を提供する。合計約10,000の質量タグが、この完全に集成されたセグメント上での検出に利用可能であり、これは利用可能な結合部位のわずかに10%の占拠と想定される。先に説明された3種の質量タグレポーターコーディング法(図37)を使用し、各質量タグの約3,300コピーが測定に利用可能である。代替として、10,000分子量のポリ-L-リジンで官能基化された単独G9デンドリマー(2048個の反応基を有する)は、レポーター構築物の12nmセグメント内に利用可能な約170,000個の質量タグ付着部位を有する。

10

#### 【0427】

質量タグにより配列を検出するために、光切断可能なリンカーの使用による測定点での質量タグレポーターの制御放出法を使用する。テザーの逐次断片化は、不要である。エクスパンドマーポリマーの各サブユニットと会合された質量タグレポーターを、一工程において測定する。例えば350ダルトン~710ダルトンの範囲の13セットの質量タグレポーター(すなわち質量タグレポーターの30ダルトンラダー)は、各々3質量タグの286の組合せを有する。この様式において、256の異なる4merのいずれかひとつは、3質量タグレポーターのわずかにひとつの特定の組合せに関連される。エクスパンドマーのコード化された配列情報は、これらのサブユニットの質量分光法により容易に検出される。エクスパンドマーのサブユニットは空間的に良好に分離されているので、このエクスパンドマーの操作及び検出技術は、高度に洗練される必要はない。

20

#### 【0428】

(実施例20)

(非標識基質構築物の直接分析)

基質構築物ライブラリーを合成する；これらのテザーは、レポーターを含まない。エクスパンドマー産物の調製後、エクスパンドマー産物の個々の塩基を、電子トンネル分光法により分析する。

#### 【0429】

(実施例21)

(非標識基質構築物のハイブリダイゼーション-支援分析)

オリゴマー性基質構築物ライブラリーを合成する；これらのテザーは、レポーターを含まない。エクスパンドマー産物の調製後、標識されたプローブの完成されたセットを次に、エクスパンドマー産物とハイブリダイズし、これらの二重鎖化されたプローブを、逐次的に分析する。

30

#### 【0430】

(実施例22)

(Lys-Cys-PEG-ポリグルタミン酸-PEG-Cys-COOHテザーによるデオキシアデノシン三リン酸の合成)

BOC-保護されたアミノ側鎖を伴うリジンを、樹脂上に固定し、並びに標準ペプチド合成方法を使用し、システイン残基と反応させる。このリジンのアミノ側鎖は、RT-NTPテザーの反応性官能基であろう(クラスVI、VII参照)。このシステインは、テザー内ジスルフィド結合の最初の半分を形成する。システイン上の脱保護されたアミンを、SANH(Pierce-Thermo Fisher社, 米国；カタログ番号22400: Bioconjugate Toolkit)により修飾し、ヒドラジドを形成する。

40

#### 【0431】

個別に、スパーサーセグメントを、ビス-アミノPEG2000(Creative PEGWorks社, ウィンストンセラム NC；カタログ番号PSB 330)から、C6-SFB(Pierce-Thermo Fisher社, 米国；カタログ番号22400: Bioconjugate Toolkit)による遊離アミンの官能基化により調製し、ビス-4FB PEGスパーサーセグメントを形成し；この生成物を精製する。

50

ビス-4FB PEGスペーサーセグメントを次に、システイン上のヒドラジドリンカーにカップルし、末端反応基として4FB基を残し、この樹脂を洗浄する。

【0432】

別に、ポリグルタミン酸セグメント(各々、メチル-キャップ付きPEGの5 PEO ユニットにより -カルボキシルで誘導体化されたグルタミン酸)を調製する。このc-末端を、EDC 共役剤及びジアミノヘキサンにより、アミンへ変換する。SANHを使用し、ジ-ヒドラジド終結されたポリグルタミン酸セグメントを形成し、この生成物を精製する。このジヒドラジド-終結されたポリグルタミン酸セグメントを、樹脂上の末端4FB基と反応し、末端ヒドラジドを形成し、この樹脂を洗浄する。

【0433】

別に、PEG-2000スペーサーセグメント(アミン及びカルボキシル末端を持つ、Creative PEGWorks社; PHB-930)を、SFBと反応し、4FB末端基を作製する。このスペーサーセグメントを、樹脂上のヒドラジド基と反応させ、カルボキシル-終結された鎖を形成する。樹脂は再度洗浄する。

システイン残基を、標準ペプチド合成試薬を用い、遊離カルボキシルへ共役する。システインの末端カルボキシルは、O-ベンジル保護されている。得られる生成物を再度洗浄し、樹脂から切断する。切断により作製された遊離カルボキシルはその後、EDC、アミノヘキシル、及びSANHにより修飾し、反応性ヒドラジドを形成する。

【0434】

別に、C6アミン修飾されたデオキシアデノシン三リン酸(N6-(6-アミノ)ヘキシル-dATP, Jena Bioscience社, ジェナ DE; カタログ番号NU-835)を、SFB(Pierce社Bioconjugate Toolkit, カタログ番号22419)により処理し、4FB官能基を形成する。修飾された塩基を先行する工程の反応性ヒドラジドと組み合わせることにより、テザー-プローブ基質構築物を集成する。リジン側鎖のBOCは、使用前に除去する。一般に酸化条件下で、これらのシステインは会合し、テザー内ジスルフィド結合を形成し、テザーを拘束されたコンパクトな形状で安定化する。

【0435】

(実施例23)

(RT-NTP三リン酸ライブラリーの合成)

テザー内SS-結合を持つテザー化されたヌクレオチド三リン酸塩基A、T、C及びGを、実施例22に説明したように調製するが、各塩基に使用されるPEG化されたグルタミン酸セグメントの電荷及び物理パラメータは、個別のレポーター特性を提供するように選択する。

【0436】

(実施例24)

(ポリグルタミン酸テザー化されたRT-NTPを使用するSBEによるエクスパンドマー合成)

ジスルフィドテザー内結合を持つ修飾されたRT-NTPアデノシン及びグアノシンヌクレオチド三リン酸を調製する。これらの塩基は、3'-位で可逆的にブロックされるように、更に修飾する。アリル-ベースの可逆的なブロック化学は、Ruparelの論文に説明されている(「合成によるDNA配列決定のための可逆的ターミネーターとしての3'-O-アリル光切断可能な蛍光ヌクレオチドのデザイン及び合成(Design and synthesis of a 3'-O-allyl photocleavable fluorescent nucleotide as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis)」、PNAS, 102:5932-37, 2005)。修飾された塩基のテザーは、一般に図61に示されたように、官能基及び官能基を持つように構築される。官能基は、テザーのペンダントシステインのカルボキシルであり、かつ官能基は、プリンへのテザーの付着の近傍のリジンの側鎖アミンである。これらのテザーは、核酸塩基-特異的修飾されたポリグルタミン酸セグメントを含むように、更に修飾する。

【0437】

配列

10

20

30

40



## 【化 17】

TCTCTCTCTCTCTCATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号4)

を、テンプレートとして使用する。配列

## 【化 18】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。このプライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。エクスパンドマー合成の方法は、本質的に図61に説明されている。SBEの第一のプライミングサイクルにおいて、修飾された核酸塩基を、重合に適した条件下で、クレノウポリメラーゼにより付加し、単独の塩基は、プライマーの3'-OH末端上の新生鎖に付加される。この基質構築物は3'位でブロックされているので、更なる重合は生じない。

10

## 【0438】

付加された第一のRT-NTP上のアミノ側鎖( )リンカー基は、キャップ形成され、かつSBE反応を通じて維持されるであろう。このテザーの終端カルボキシル基を脱保護し、この基質上の3'OHを脱ブロックし；この複合体は、次のラウンドのSBEの前に、洗浄する。

## 【0439】

SBEの第二サイクルにおいて、別の核酸塩基を、新生エクスパンドマー中間体へ重合する。第一核酸塩基上のリンカー基の遊離アミンと第二核酸塩基のテザー上のカルボキシルリンカー基の間に、EDC及びSulfo-NHS(Pierce社、カタログ番号22980及び24510)を架橋剤として使用し、結合を形成する。テザーのリンカー基上のカルボキシルを脱保護し、基質上の3'OHを、脱ブロックし；この複合体は、次のラウンドのSBEの前に、洗浄する。

20

SBEのサイクルは、複数回反復し、これにより拘束された立体配置でエクスパンドマー中間体を形成することができる。結合された核酸塩基の成長している鎖内の各テザーは、拘束されたエクスパンドマー立体配置内にある。

## 【0440】

(実施例25)

(クラスXエクスパンドマーを形成するためのヌクレアーゼ及びTCEP切断)

30

実施例24のエクスパンドマー中間体を、ヌクレアーゼで切断し、テザーセグメント及び結合により連結された個別の核酸塩基で構成されたエクスパンドマー産物を形成する。このヌクレアーゼは、テンプレート及び任意の会合されたプライマーも分解し、生成物を遊離する。テザー内ジスルフィド連結を、還元剤(TCEP, Pierce社、カタログ番号20490)の添加により切断する。

このエクスパンドマー産物を、短縮型シントロン及びヌクレアーゼ消化副生物を除去するために、濾過しかつ精製する。線状化されたエクスパンドマーの検出及び分析は、多種多様な現存する方法及び次世代の方法を用いて行うことができる。

## 【0441】

(実施例26)

40

(テザー内光切断可能なリンカーを持つデオキシアデノシン三リン酸の合成)

グリシンを、樹脂上に固定し、かつシステインと反応させる。次にシステインアミノ基を、脱保護し、グルタミン酸塩と反応させ、このグルタミン酸は、Holmesらの論文(「コンビナトリアル有機合成のための試薬：固相合成のための新規O-ニトロベンジル光解離性リンカーの開発(Reagents for combinatorial organic synthesis: development of a new O-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis)」, J Org Chem, 60: 2318-19, 1995)に説明されたものから適合された2-ニトロベラトリルアミンリンカーなどの、Oベンジル保護されたカルボキシルを末端とする光解離性リンカーで修飾された側鎖を有する。このシステインは、RT-NTPテザーの「官能基」であろう。グルタミン酸上の脱保護されたアミンを、SANH(Pierce-Thermo Fisher社、米国；カタログ番号22400: Bioc

50

onjugate Toolkit)により修飾し、ヒドラジドを形成する。グルタミン酸の側鎖は、テザーの合成後、光切断可能なテザー内リンカーを形成する。

【0442】

別にスパーサーセグメントを、ビス-アミノPEG 2000(Creative PEGWorks社, ウィンストンセラム, NC, 米国; カタログ番号PSB 330)から、遊離アミンのC6-SFB(Pierce社, Bioconjugate Toolkit, カタログ番号22423)による官能基化により調製してビス-4FB PEGスパーサーセグメントを形成し、この生成物を精製する。ビス-4FB PEGスパーサーセグメントを次に、グルタミン酸上のヒドラジドリンカーに共役し、4FB基が終端反応基として脱離し、この樹脂を洗浄する。

【0443】

別に、ポリグルタミン酸セグメント(t-ブチル保護された側鎖を伴う)を調製する。C-終端は、EDC共役剤及びジアミノヘキサンにより、アミンに変換される。SANHを使用してジヒドラジド終結されたポリグルタミン酸セグメントを形成し、この生成物を精製する。ジヒドラジド-終結されたポリグルタミン酸セグメントを、樹脂上の終端4FB基と反応させて樹脂上の終端ヒドラジドを形成し、この樹脂を洗浄する。

【0444】

PEG-2000スパーサーセグメント(遊離アミノ末端及びFMOC-保護されたアミノ末端を有する; カタログ番号PHB-0982, Creative PEGWorks社)を、C6 SFBにより修飾し、4FB及びFMOC-アミノ修飾されたPEGスパーサーセグメントを形成する。4FB末端を、樹脂上のヒドラジド基と反応し、FMOCアミノ-終結された鎖を形成する。この樹脂も洗浄する。

リジン残基を、ペプチド結合により、スパーサーの遊離アミンに共役する。リジン残基を、BOCにより側鎖上で保護し、リジンの $\alpha$ -アミンを、FMOCにより保護する。光切断可能なリンカーのOベンジル終端カルボキシル及びリジンのBOC-保護された側鎖を、次に脱保護し、EDC/Sulfo-NHSで架橋し、テザーを環状化する。

得られる生成物を再度洗浄し、その後樹脂から切断する。切断により生成された遊離グリシンカルボキシルを、次にEDC、アミノヘキシル、及びSANHにより修飾し、反応性ヒドラジドを形成する。

【0445】

別に、C6アミン修飾されたデオキシアデノシン三リン酸(N6-(6-アミノ)ヘキシル-dATP, Jena Bioscience社, ジェナ DE; カタログ番号NU-835)は、SFB(Pierce社Bioconjugate Toolkit, カタログ番号22419)を処理し、4FB官能基を形成する。修飾された塩基を先行する工程の反応性ヒドラジドと組合せ、テザー-ブロープ基質構築物を集成する。光切断可能なテザー内リンカーは、拘束されたコンパクトな形状にテザーを安定化する。その後FMOCを除去し、遊離終端アミンを、Sulfo-EMCS(Pierce社; カタログ番号22307)と反応し、終端マレイミド官能基を導入する。

【0446】

(実施例27)

(光切断可能なRT-NTPを使用するSBEによるエクスパンドマー合成)

光切断可能なテザー内結合を持つ修飾されたRT-NTPアデノシン及びグアノシンヌクレオチド三リン酸を調製する。これらの塩基は、3'-位で可逆的にブロックされるように、更に修飾する。アリル-ベースの可逆的なブロック化学は、Ruparelの論文に説明されている(「合成によるDNA配列決定のための可逆的ターミネーターとしての3'-O-アリル光切断可能な蛍光ヌクレオチドのデザイン及び合成(Design and synthesis of a 3'-O-allyl photocleavable fluorescent nucleotide as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis)」、PNAS, 102:5932-37, 2005)。修飾された塩基のテザーは、一般に図61に示されたように、官能基及び官能基を持つように構築される。リンカー基は、テザーの終端ペンダントリジンのアミンであり、かつリンカー基は、テザーの付着点の近傍のシステインのスルフヒドリルである。これらのテザーは、種-特異的修飾されたポリグルタミン酸セグメントを含むように、更に修飾する。

【0447】

10

20

30

40

50

配列

【化 19】

TCTCTCTCTCTCTCATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号4)

を、テンプレートとして使用する。配列

【化 20】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。このプライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオ  
レセイン)を、標識として使用する。エクスパンドマー合成の方法は、本質的に図61に説  
明されている。SBEの第一のプライミングサイクルにおいて、修飾された核酸塩基(A)を、  
重合に適した条件下で、クレノウポリメラーゼにより付加し、単独の塩基は、プライマー  
の3'-OH末端上の新生鎖に付加される。この基質構築物は3'位でブロックされているの  
で、更なる重合は生じない。この固定されたプライマー-テンプレート複合体を次に洗浄  
し、未反応の基質を除去する。

【0448】

付加された第一のRT-NTP上のスルフヒドリル側鎖( )リンカー基は、キャップ形成され  
、かつSBE反応を通じて維持されるであろう。このテザーの終端カルボキシル基を脱保護  
し、この基質上の3'OHを、脱ブロックし；この複合体を、次のラウンドのSBEの前に、洗  
浄する。

【0449】

SBEの第二サイクルにおいて、別の核酸塩基(G)を、新生エクスパンドマー中間体へ重合  
する。第一核酸塩基上のアミノ( )リンカー基)と第二塩基のテザー上のスルフヒドリル(  
リンカー基)の間に、架橋試薬GMBS(Pierce社；カタログ番号22309)を使用し、結合を  
形成する。第二RT-NTP上のアミノリンカー基を脱保護し、この基質の3'OHを脱ブロック  
し；この複合体を、次のラウンドのSBEの前に、洗浄する。

SBEのサイクルは、複数回反復し、これにより拘束された立体配置でエクスパンドマー  
中間体を形成することができる。結合された核酸塩基の成長している鎖内の各テザーは  
、拘束されたエクスパンドマー立体配置内にある。

【0450】

(実施例28)

(クラスXエクスパンドマーを形成するためのヌクレアーゼ及び光切断)

実施例27のエクスパンドマー中間体を、ヌクレアーゼで切断し、テザーセグメント及び  
結合により連結された個別の核酸塩基で構成されたエクスパンドマー産物を形成する。  
このヌクレアーゼは、テンプレート及び任意の会合されたプライマーも分解し、生成物を  
遊離する。テザー内光切断可能な連結は、UV光への曝露により切断される。

このエクスパンドマー産物を、短縮型シントン及びヌクレアーゼ消化副生物を除去する  
ために、濾過しかつ精製する。線状化されたエクスパンドマーの検出及び分析は、多種多  
様な現存する方法及び次世代の方法を用いて行うことができる。

【0451】

(実施例29)

(インサイチュにおけるRT-NTPテザーの合成)

固形支持体上の標準ペプチド合成方法を使用し、構造(樹脂-C')-Glu-Cys-(Gly-Ala)<sub>10</sub>-  
Pro-Ser-Gly-Ser-Pro-(Ala-Gly)<sub>10</sub>-Cys-Lys (配列番号5)を有するペプチドを調製する。  
この終端アミンは、SANH(Pierce社，カタログ番号22400)と反応され、ヒドラジドリンカ  
ーを作製する。

別に、C6アミン修飾されたデオキシアデノシン三リン酸(N6-(6-アミノ)ヘキシル-dATP,  
Jena Bioscience社，ジェナ DE；カタログ番号NU-835)を、SFB(Pierce社Bioconjugate T  
oolkit，カタログ番号22419)により処理し、4FB官能基を形成する。修飾された塩基を先  
の工程の反応性ヒドラジドと組合せることにより、テザー-プローブ基質構築物を集成す

10

20

30

40

50

る。

【0452】

次にこの構築物を、樹脂から切断する。脱保護及び一般に酸化条件下で、これらのシステムは会合し、テザー内ジスルフィド結合を形成し、ヘアピンを安定化し、これは終端遊離カルボキシル(テザー上のペンダントリンカー基)及びテザー付着点近傍のリジン(側鎖アミンリンカー基)を含む。

これらのジスルフィドは、クラスII、III、VI、VII、及びVIII基質構築物において描かれた(図8及び9参照)テザー内安定化の代表であるが、ここではクラスVI、VII及びVIIIのモノマー性基質構築物をより詳細に言及し図示されている。ほどけたテザーの長さは、残基C-Cペプチド結合長3.8 と仮定し、約10nmであるが、ヘアピン内の水素結合のためコンパクトな形状と想定される。

10

【0453】

Gellmanの論文(「フォルダマーの説明(Foldamers, a manifesto)」、Acc Chem Res 31: 173-80, 1998)により説明されたように、単にペプチドのみではなく広範なポリマーを、コンパクトな形状に折り畳むことができる。このようなポリマーは、オリゴピリジン、ポリイソシアニド、ポリイソシアナート、ポリ(トリアリールメチル)メタクリレート、ポリアルデヒド、ポリプロリン、RNA、オリゴピロリノン、及びオリゴ尿素を含み、これらは全てコンパクトな二次構造へ折り畳まれかつ好適な条件下で拡張する能力を示す。従ってここで提示されたペプチドの例は、非常に大きいクラスのテザー化学の代表であり、ここで拡張されないテザーへの拘束は、例えばテザー内架橋に加え、水素結合及び疎水性相互作用を含むことができる。

20

【0454】

(実施例30)

(エクスプローブを使用するエクスパンドマー合成)

ひとつのSBX実施態様において、256種の4merエクスプローブのエクスプローブライブラリーが、表面テザー化されかつ伸長された1本鎖DNA標的に、ハイブリダイゼーションのために提示される。このハイブリダイゼーション工程は、長いエクスプローブ鎖を促進するために慣習的である正確なサーマルサイクリング下で継続される。弱く結合した非特異的プローブ-標的二重鎖を、再度正確な温度制御下で、単純な洗浄工程により除去する。酵素的ライゲーションを、標的DNAに沿って任意のエクスプローブ鎖を連結するために実行し、引き続き2回目洗浄する。ハイブリダイゼーション/洗浄/ライゲーション/洗浄のサイクルを繰り返すことにより、より長いライゲーションされた配列が、標的テンプレートの複製がほとんど完成されるまで、標的DNAに沿って複数の部位において成長する。

30

【0455】

この標的DNAに沿って充填されないギャップが、良く確立されたDNAポリメラーゼ及びリガーゼベースのギャップ充填プロセス(Leeの論文「リガーゼ連鎖反応(Ligase Chain Reaction)」、Biologicals, 24(3): 197-199, 1996)を用い、充填される。このギャップに取り込まれたヌクレオチドは、独自のレポーターコードを有し、ギャップヌクレオチドを示す。場合によっては1、2又は3種のヌクレオチドギャップ充填剤による相補的二重鎖化されライゲーションされたエクスプローブを伴う当初のDNA標的で構成される完成されたエクスパンドマー中間体は、切断され、エクスパンドマーを作製する。本実施例のための切断可能なリンカーは、3'-O-P-N5'基質骨格修飾である。選択的切断は、室温での酢酸の添加により触媒される。

40

【0456】

このエクスパンドマーは、短縮型生成物を除去するために、濾過されかつ精製され、引き続き伸長され、連結されたレポーターコードの線状構造を形成する。エクスパンドマー産物の検出及び分析は、多種多様な現存する方法を用いて行うことができる。

【0457】

(実施例31)

(ポリメラーゼを使用するXNTPエクスパンドマー合成)

50

クラスXエクスパンドマーの合成は、リン酸エステルで橋かけしない2-アミノエチルホスホネート及び橋かけしているホスホロチオラート(3'-O-P-S 5')からなる混合された骨格を有する修飾された8-[(6-アミノ)ヘキシル]-アミノ-デオキシアデノシン三リン酸基質構築物を使用し、実行する。ヌクレオチド内テザーを、2-アミノエチルホスホネートリンカー及び8-[(6-アミノ)ヘキシル]-アミノ-デオキシATP上のC6アミノリンカーに付着する。配列

【化21】

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号6)

を、テンプレートとして使用する。配列

【化22】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。プライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。プライマー及びテンプレートのアニーリングは、二重鎖プライマー並びに遊離3'-OH及び5'末端1本鎖化された長さ20塩基の突出を伴うテンプレートを形成する。次にこの基質構築物及びポリメラーゼを添加し、最適重合のために調節された条件下で、重合を60分間継続する。この重合反応の試料を、ゲル装加緩衝液と混合し、20%TBEアクリルアミドゲル(Invitrogen社、米国)上で、無ポリメラーゼ陰性対照及びMWマーカーと共に、電気泳動し、XNTP重合を確認する。

【0458】

このエクスパンドマー中間体を、二価の陽イオンにより処理し(Magらの論文、1991、「架橋されたヌクレオチド内5'-ホスホロチオエート連結を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage)」、Nucleic Acids Research, 19(7):14371441)、テザー付着とデオキシリボースの間のホスホロチオラート結合を選択的に切断し、このことは電気泳動により確認する。

【0459】

(実施例32)

(ポリメラーゼを使用するXNTPエクスパンドマー合成)

クラスXエクスパンドマーの合成は、リン酸エステルで橋かけしない(N-1-アミノアルキル)ホスホロアミデート及び橋かけするホスホロチオラート(3'-O-P-S5')からなる混合された骨格を有する修飾されたN<sup>6</sup>-(6-アミノ)ヘキシル-デオキシアデノシン三リン酸基質構築物を使用し、実行する。ヌクレオチド内テザーは、N-1-アミノアルキル基及びN<sup>6</sup>-(6-アミノ)ヘキシル-デオキシATP上のC6アミノリンカーに付着される。配列

【化23】

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号6)

を、テンプレートとして使用する。配列

【化24】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。プライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。プライマー及びテンプレートのアニーリングは、二重鎖プライマー並びに遊離3'-OH及び5'末端1本鎖化された長さ20塩基の突出を伴うテンプレートを形成する。次にこの基質構築物及びポリメラーゼを添加し、最適重合のために調節された条件下で、重合を60分間継続する。この重合反応の試料を、ゲル装加緩衝液と混合し、20%TBEアクリルアミドゲル(Invitrogen社、米国)上で、無ポリメラーゼ陰性対照及びMWマーカーと共に、電気泳動し、XNTP重合を確認する。

【0460】

10

20

30

40

50

このエキスパンドマー中間体を、ヨードエタノールによるか(Gishらの論文「ホスホロチオエート化学を基にしたDNA及びRNA配列決定(DNA and RNA sequence determination based on phosphorothioate chemistry)」、Science, 240(4858): 1520-1522, 1988)、又はVyleらの論文(「オリゴデオキシリボヌクレオチドにおける配列-及び鎖-特異的切断並びに3'-チオチミジンを含むDNA(Sequence- and strand-specific cleavage in oligodeoxyribonucleotides and DNA containing 3'-thiothymidine)」、Biochemistry, 31(11): 3012-8, 1992)に説明されたような二価金属陽イオンによる切断により処理し、テザー付着とデオキシリボースの間のホスホロチオラート結合を選択的に切断し、このことは電気泳動により確認する。

【0461】

10

(実施例33)

(リガーゼを使用するXNTPエキスパンドマー合成)

クラスXエキスパンドマーの合成は、リン酸エステルで橋かけしない2-アミノエチルホスホネート及び橋かけするホスホロアミデート(3'-O-P-N-5')からなる混合型骨格を有する修飾された8-[(6-アミノ)ヘキシル]-アミノ-デオキシアデノシン-リン酸基質構築物を使用し、実行する。ヌクレオチド内テザーは、2-アミノエチルリンカー及び8-[(6-アミノ)ヘキシル]-アミノ-デオキシAMP上のC6アミノリンカーに付着される。配列

【化25】

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCTACCGTCCGTCCC” (配列番号6)

20

を、テンプレートとして使用する。配列

【化26】

“5'GGGACGGACGGTAGAT” (配列番号3)

を、プライマーとして使用する。プライマー上の5'末端HEX(5'ヘキサクロロ-フルオレセイン)を、標識として使用する。プライマー及びテンプレートのアニーリングは、二重鎖プライマー並びに遊離3'-OH及び5'末端1本鎖化された長さ20塩基の突出を伴うテンプレートを形成する。次にこの基質構築物及びリガーゼを添加し、最適ライゲーションのために調節された条件下で、ライゲーションを5時間継続する。このライゲーション反応の試料を、ゲル装加緩衝液と混合し、20%TBEアクリルアミドゲル(Invitrogen社、米国)上で、無ポリメラーゼ陰性対照及びMWマーカールと共に、電気泳動し、XNTPライゲーションを確認する。

30

【0462】

このエキスパンドマー中間体を、Magらの論文の手順に従い(「非キラルヌクレオチド内ホスホロアミデート連結を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及び選択的切断(Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoroamidate linkages)」、Nucl. Acids Res. 17: 5973-88, 1989)、80%酢酸により室温で5時間処理し、テザー付着点とデオキシリボースの間のホスホロアミデート結合を選択的に切断し、このことは電気泳動により確認する。

【0463】

40

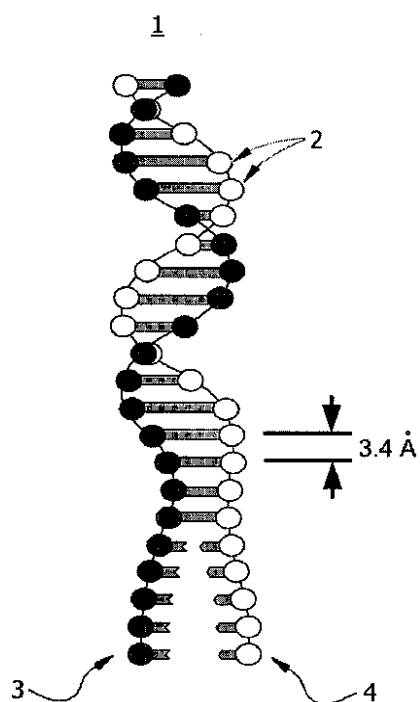
先に説明された様々な実施態様を組合せ、更なる実施態様を提供することができる。本明細書において言及された及び/又は「出願データシート」に列記された米国特許及び米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許公報は全て、それらの全体が引用により本明細書中に組込まれている。本実施態様の態様は、必要ならば、様々な特許、出願及び公報の概念を用い修飾し、より更なる実施態様を提供することができる。これらの変更及びその他の変更を、先の詳細な説明を考慮し、本実施態様に行うことができる。一般に、下記の特許請求の範囲において、使用された用語は、特許請求の範囲を、本明細書及び特許請求の範囲に開示された特定の実施態様に限定するものと解釈されるべきではないが、当該特許請求の範囲に権利を与えられる同等物の完全な範囲と共に、全ての可能性のある実施態様を含むものと解釈されるべきである。従って特許請求の範囲

50

は、本開示に限定されない。

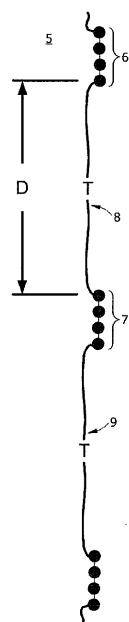
【図 1 A】

**Fig. 1A**

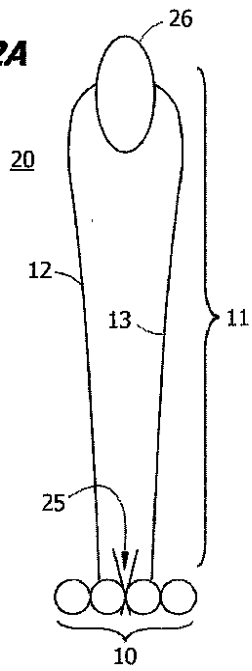


【図 1 B】

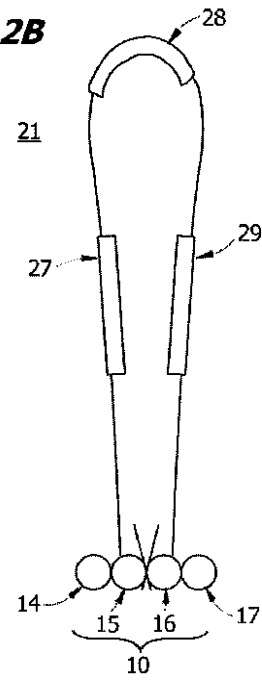
**Fig. 1B**



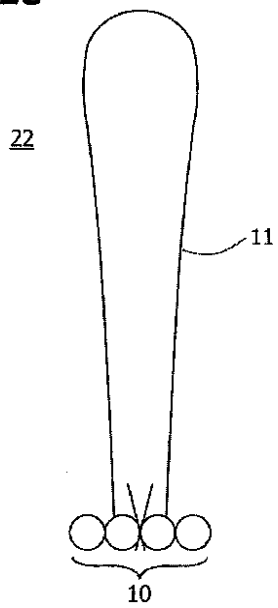
【図 2 A】

**Fig. 2A**

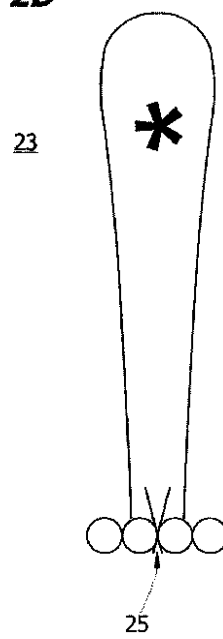
【図 2 B】

**Fig. 2B**

【図 2 C】

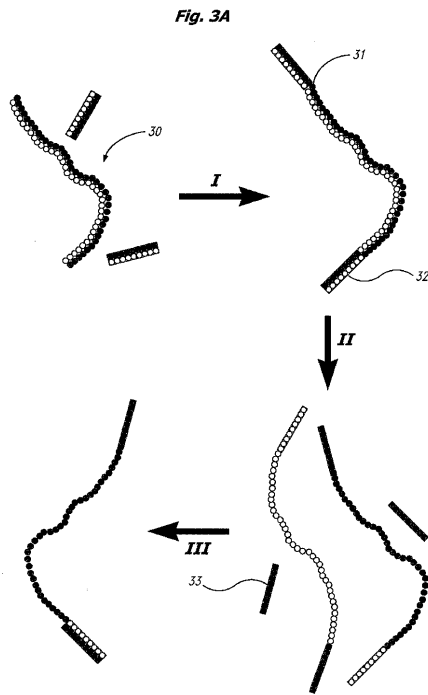
**Fig. 2C**

【図 2 D】

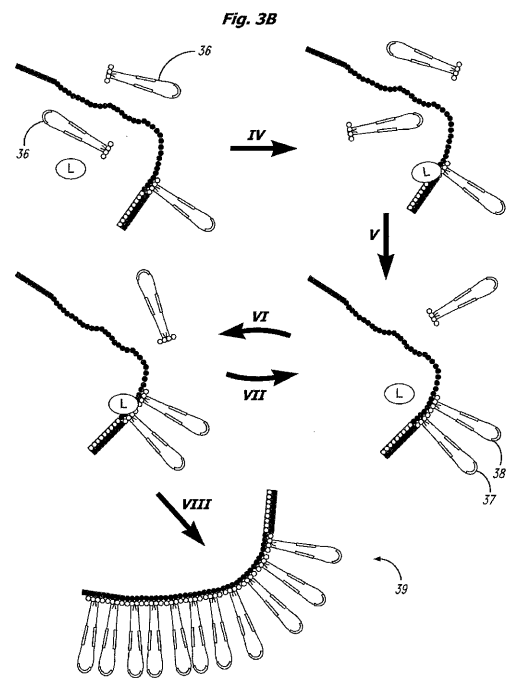
**Fig. 2D**



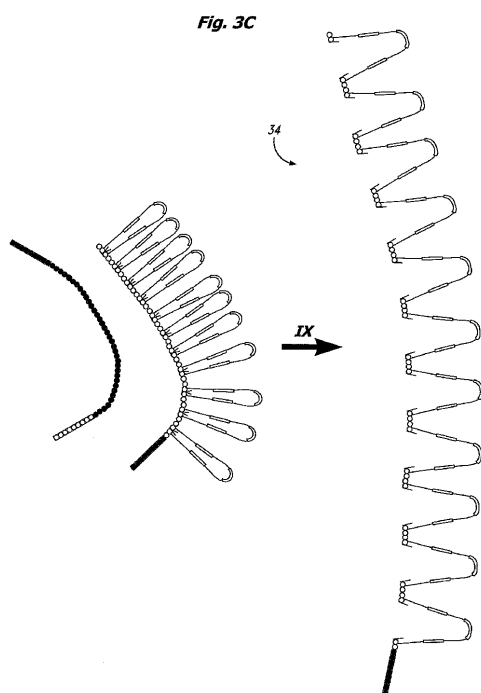
【図 3 A】



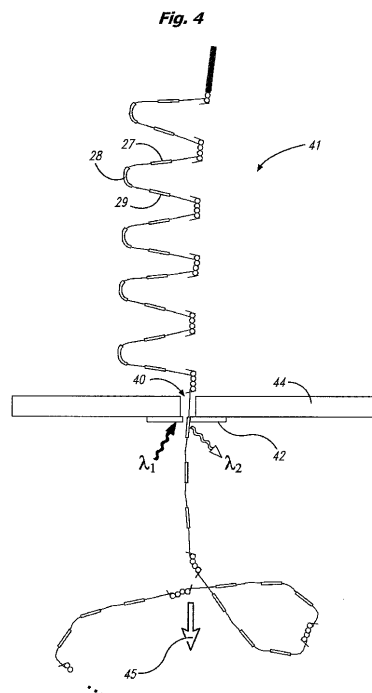
【図 3 B】



【図 3 C】

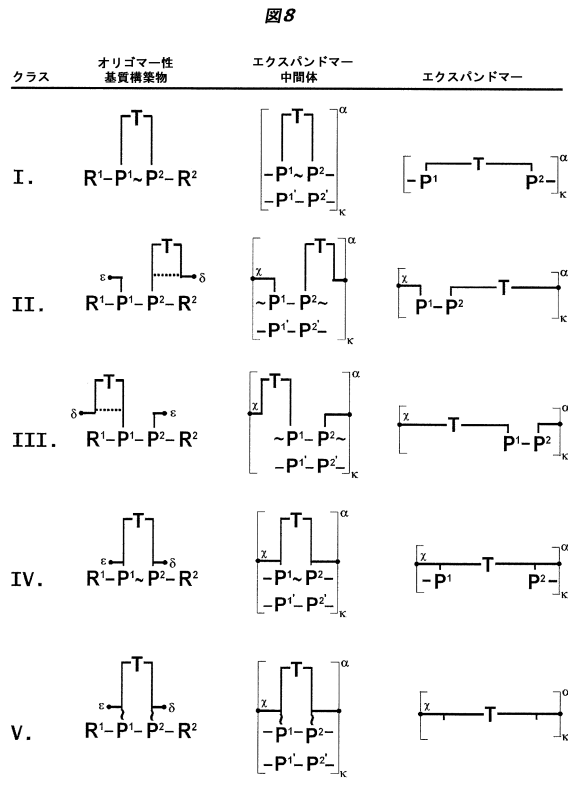


【図 4】

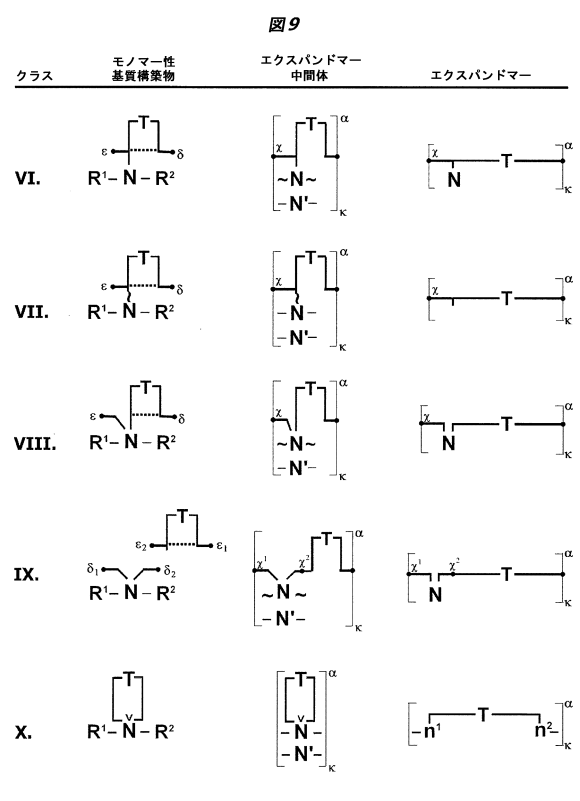




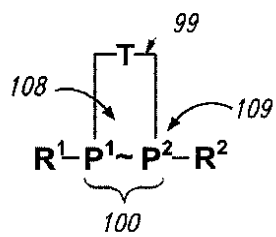
【図 8】



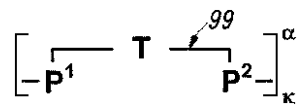
【図 9】



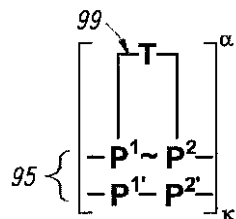
【図 10 A】

**Fig. 10A**

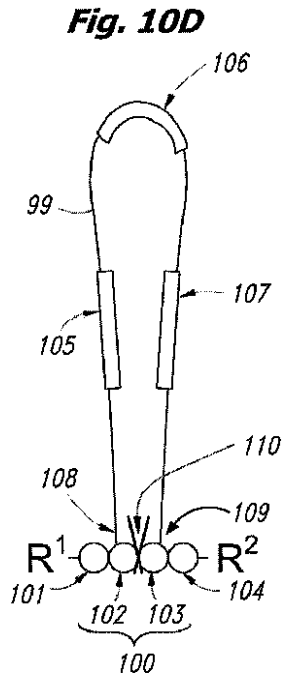
【図 10 C】

**Fig. 10C**

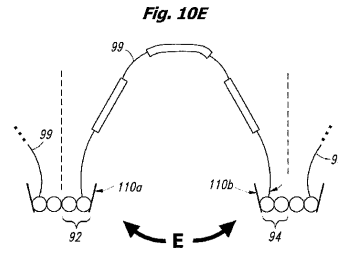
【図 10 B】

**Fig. 10B**

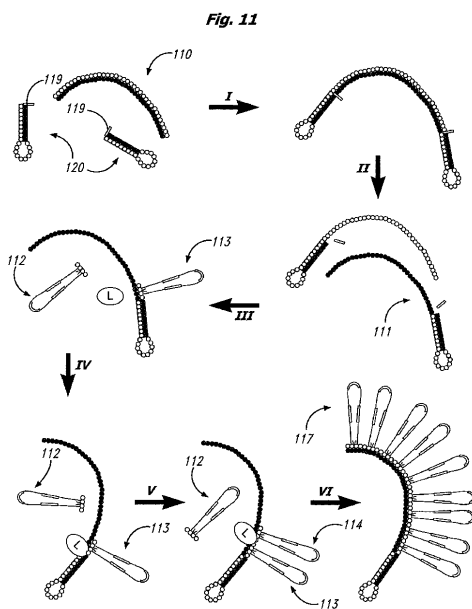
【図10D】



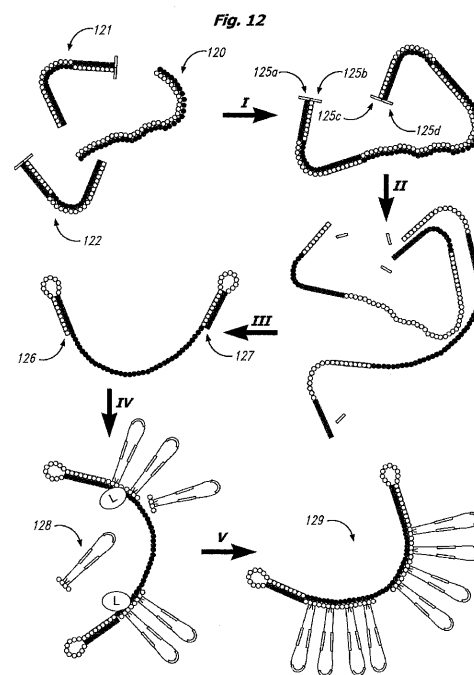
【図10E】



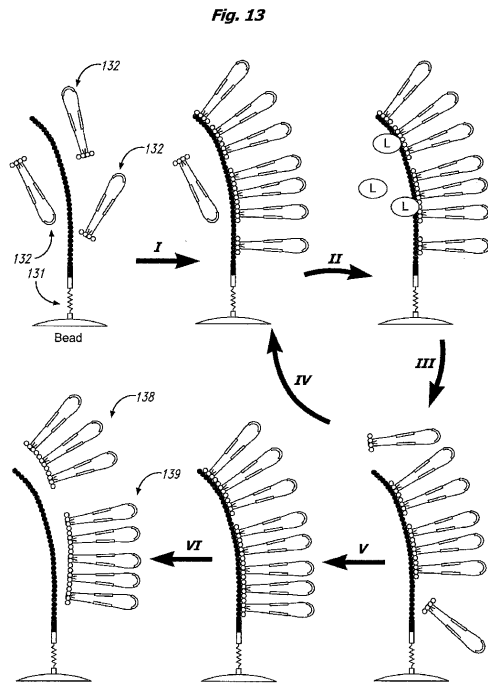
【図11】



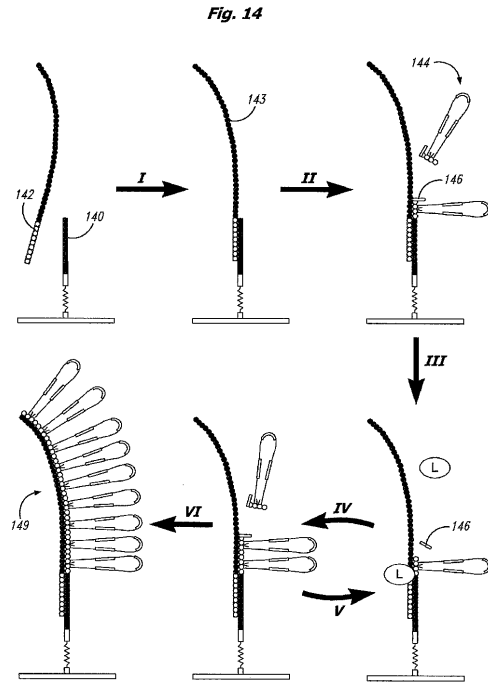
【図12】



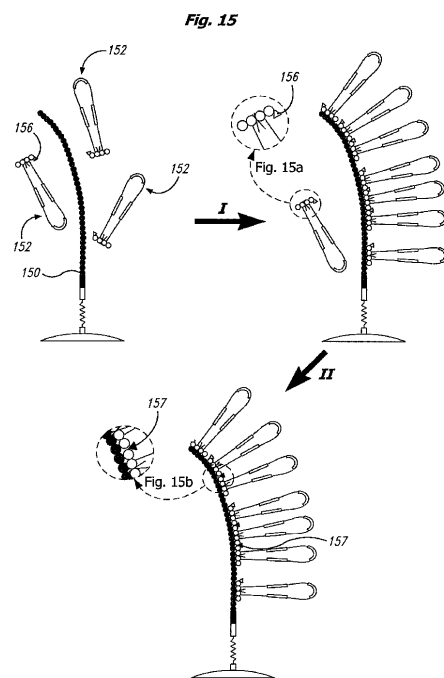
【図 13】



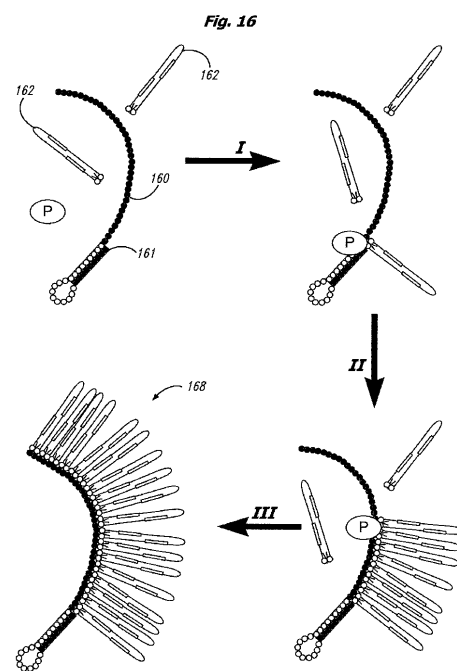
【図 14】



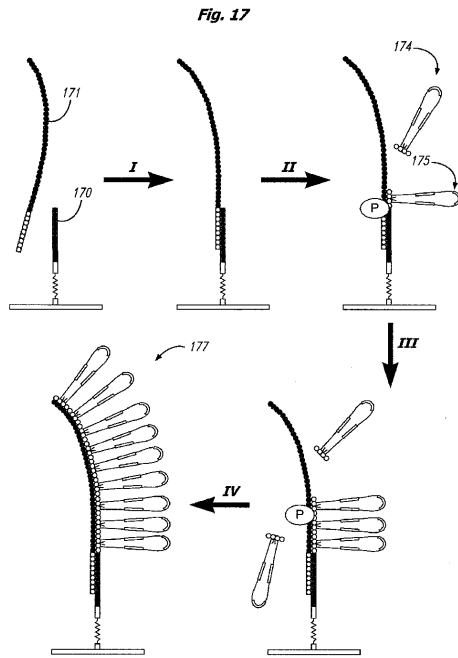
【図 15】



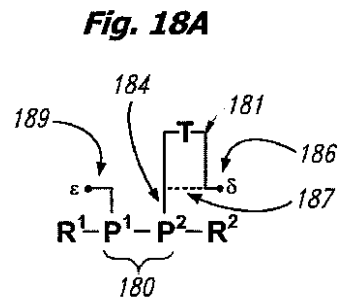
【図 16】



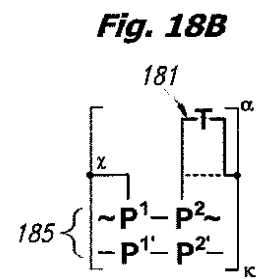
【図 17】



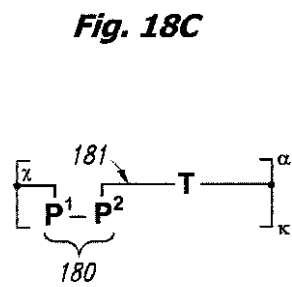
【図 18 A】



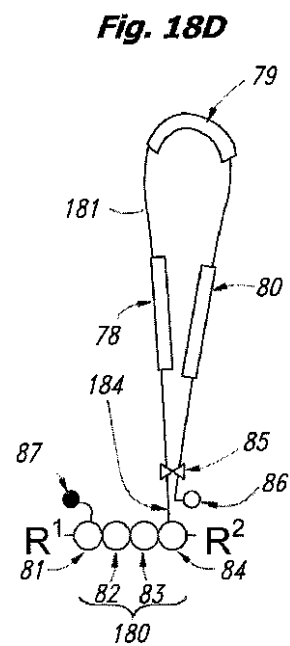
【図 18 B】



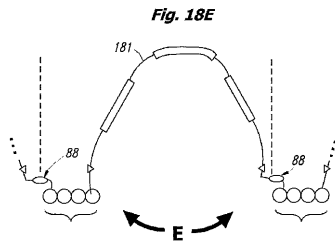
【図 18 C】



【図 18 D】

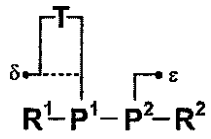


【図 18E】



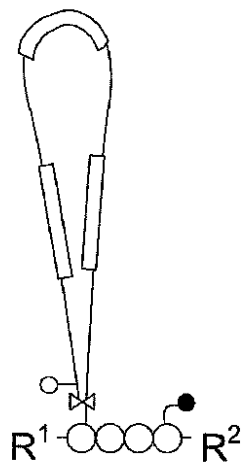
【図 19A】

FIG. 19A



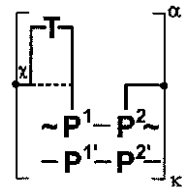
【図 19D】

FIG. 19D



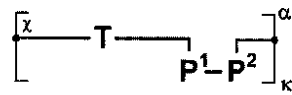
【図 19B】

FIG. 19B



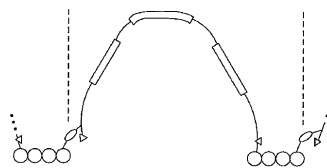
【図 19C】

FIG. 19C

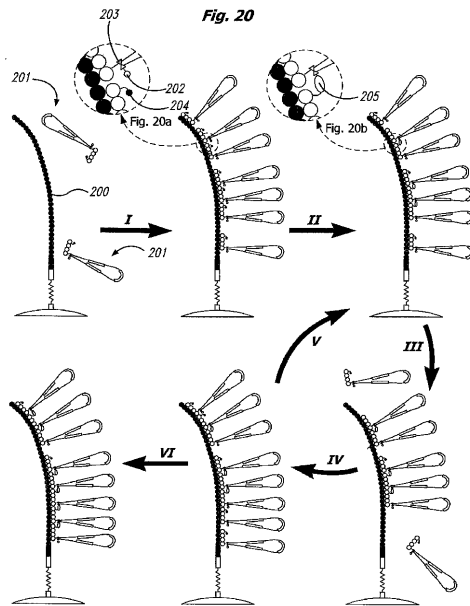


【図 19E】

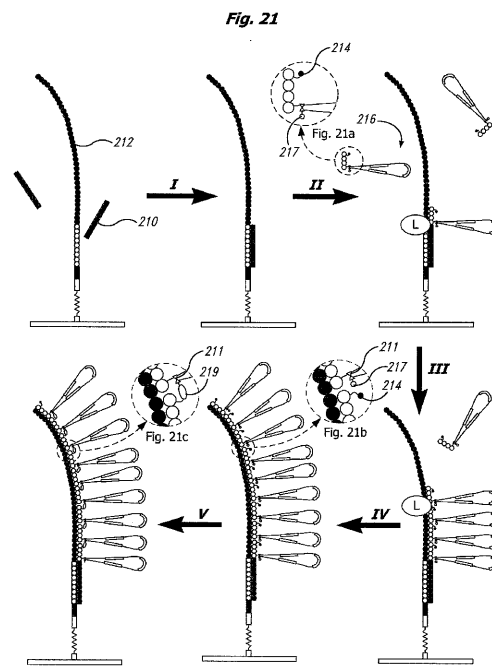
FIG. 19E



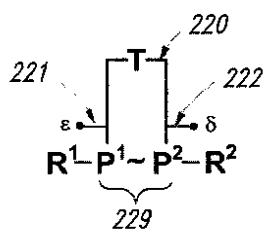
【図 20】



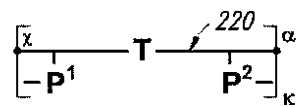
【図 21】



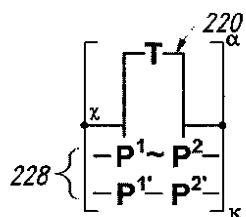
【図 22A】

**Fig. 22A**

【図 22C】

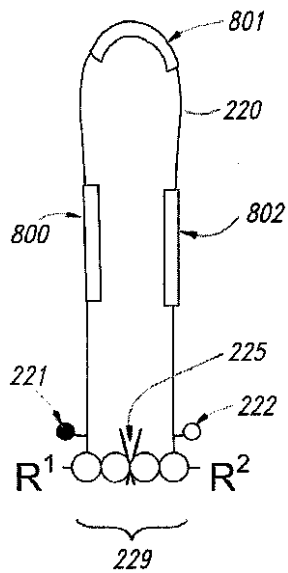
**Fig. 22C**

【図 22B】

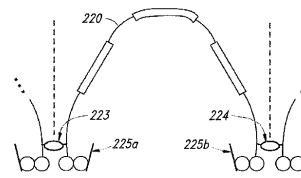
**Fig. 22B**



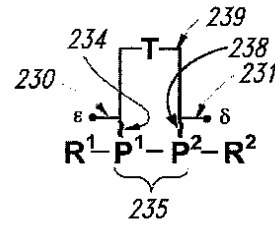
【図 22 D】

**Fig. 22D**

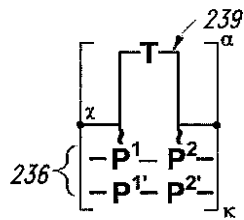
【図 22 E】

**Fig. 22E**

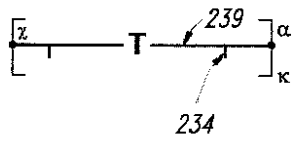
【図 23 A】

**Fig. 23A**

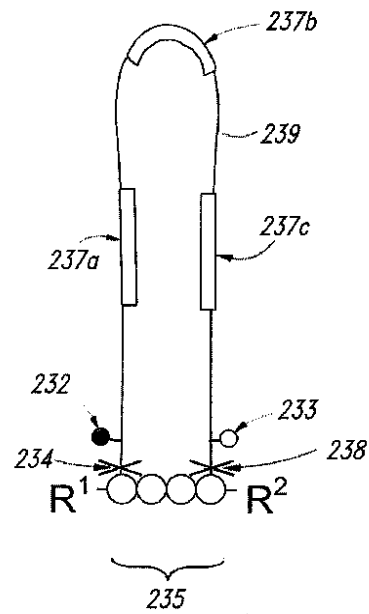
【図 23 B】

**Fig. 23B**

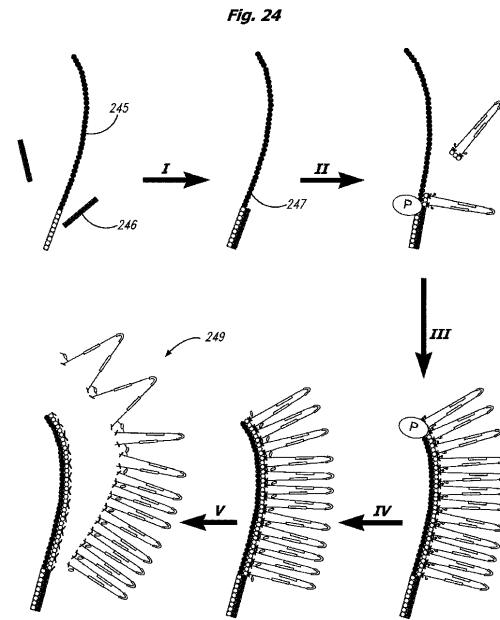
【図 23 C】

**Fig. 23C**

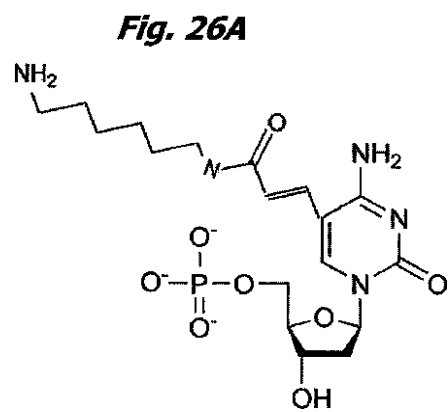
【図 23 D】

**Fig. 23D**

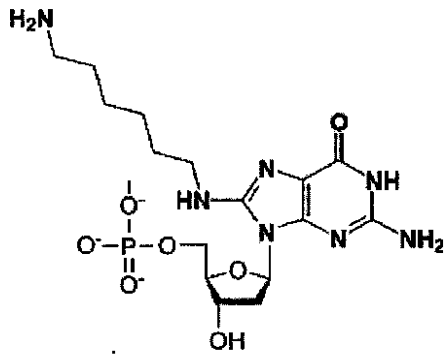
【圖 24】



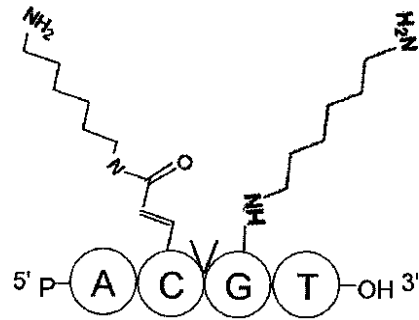
【 図 2 6 A 】



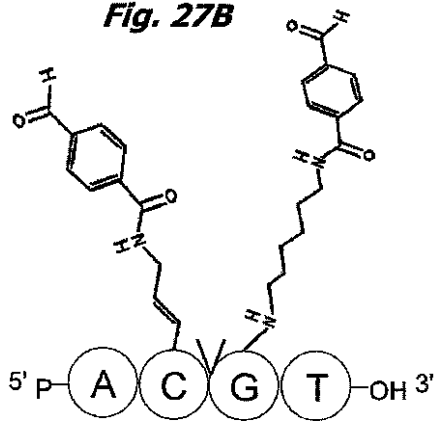
【 図 26 B 】

**Fig. 26B**

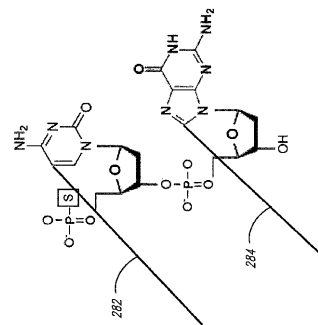
【 図 27 A 】

**Fig. 27A**

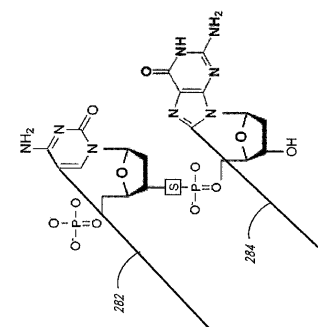
【 図 27 B 】

**Fig. 27B**

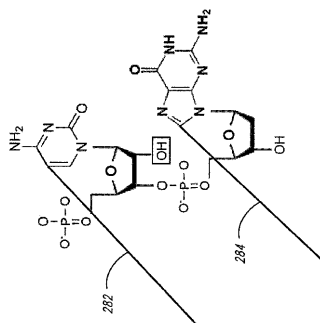
【 図 28 B 】

**Fig. 28B**

【 図 28 C 】

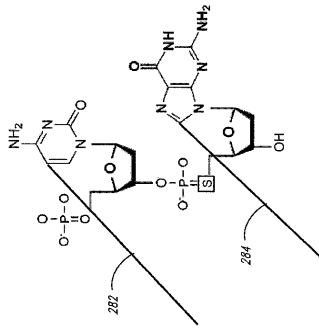
**Fig. 28C**

【 図 28 A 】

**Fig. 28A**

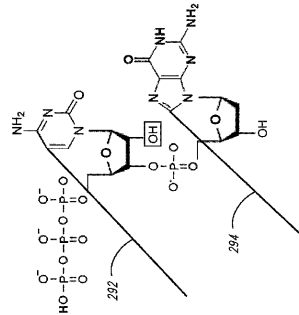
【 図 28 D 】

Fig. 28D



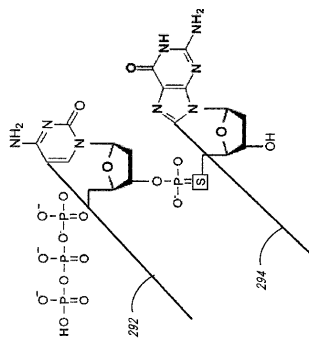
【 図 29 A 】

Fig. 29A



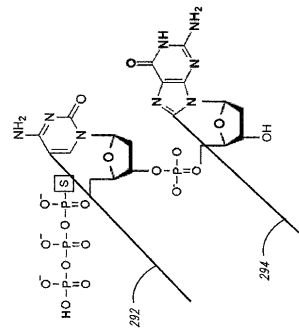
【 図 29 D 】

Fig. 29D



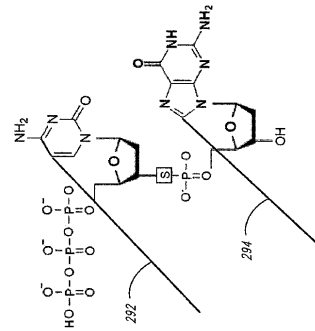
【 図 29 B 】

Fig. 29B



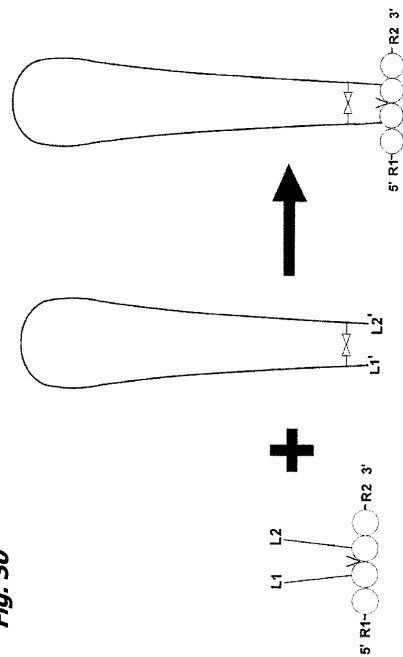
【 図 29 C 】

Fig. 29C

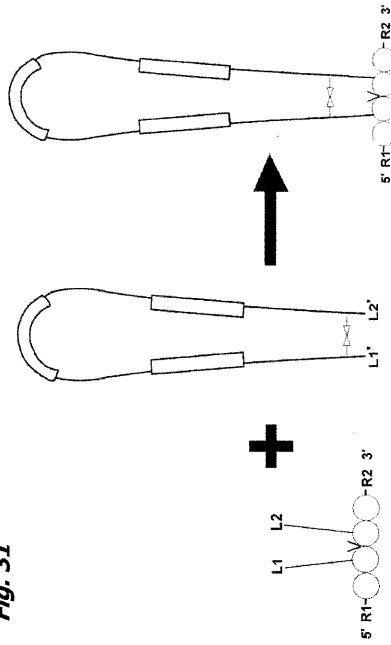


【 図 30 】

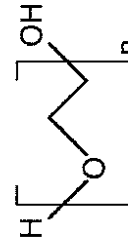
Fig. 30



【 図 3 1 】



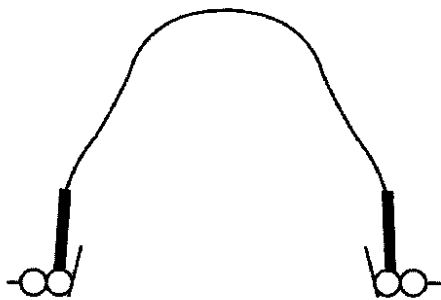
【 図 3 2 A 】

**Fig. 32A**

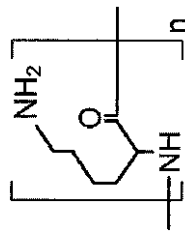
【 図 3 2 B 】

**Fig. 32B**

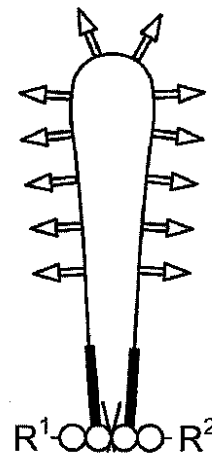
【 図 3 2 C 】

**Fig. 32C**

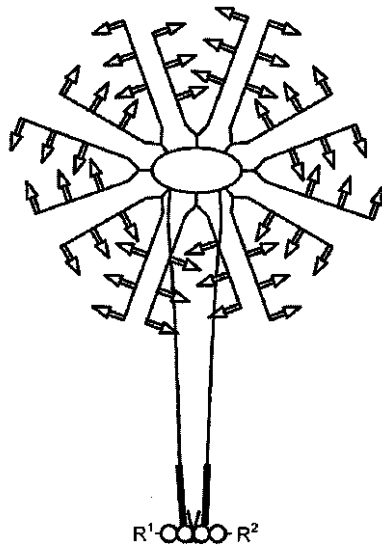
【 図 3 3 A 】

**Fig. 33A**

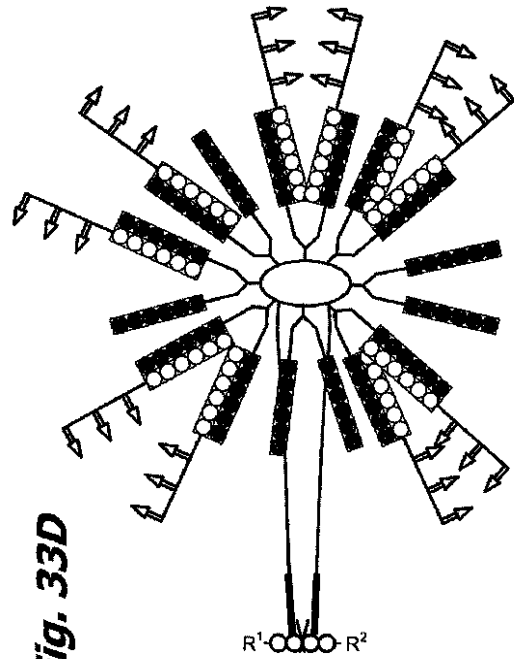
【 図 3 3 B 】

**Fig. 33B**

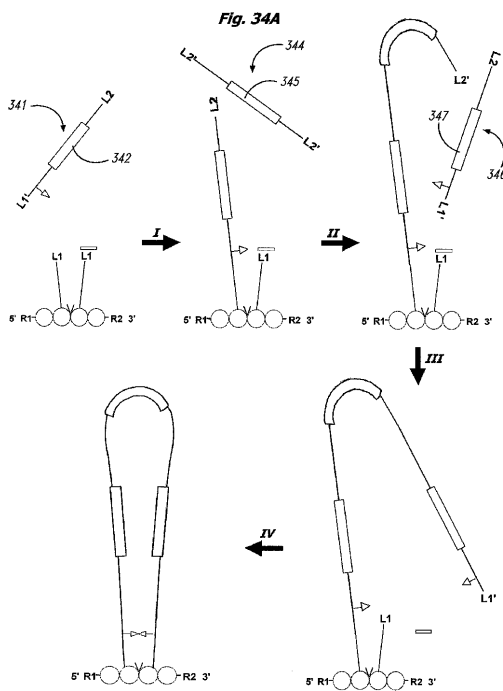
【図 33C】

**Fig. 33C**

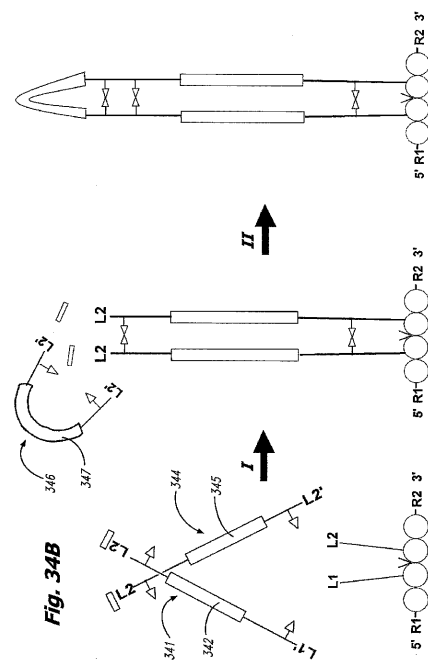
【図 33D】

**Fig. 33D**

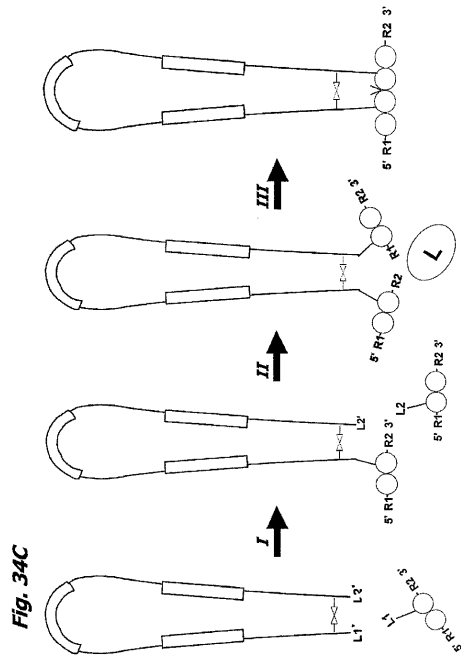
【図 34A】

**Fig. 34A**

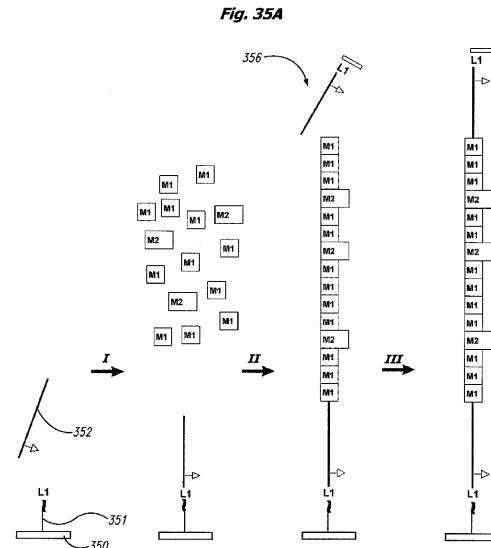
【図 34B】



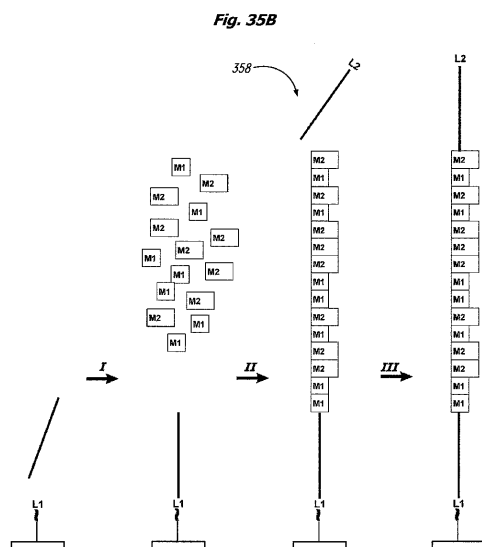
【図 34C】



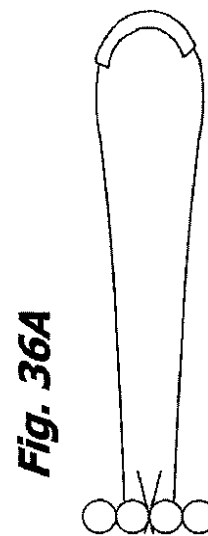
【図 35A】



【図 35B】



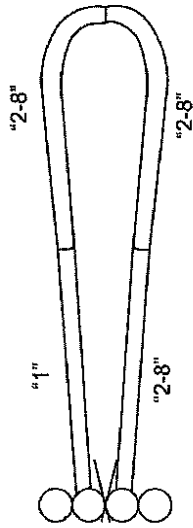
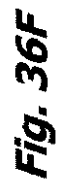
【図 36A】



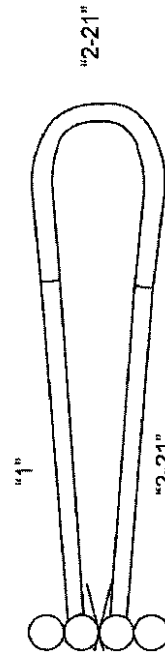




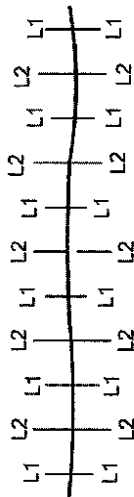
【 図 3 6 F 】



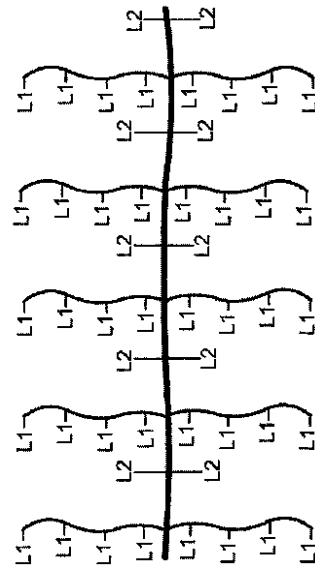
【 図 3 6 G 】



【 図 3 6 H 】



【 図 3 6 I 】



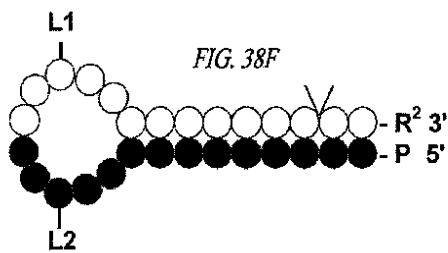
【図 37】

標識 ID	質量 (M)	蛍光 (F)	化学リンカー
1	M1	RED	HYDRAZINE
2	M2	GREEN	AMINE
3	M3	BLUE	CARBOXYL
4	m1	red	hydrazine
5	m2	green	amine
6	m3	blue	carboxyl
7	m1-m2	red-green	hydrazine
8	m1-m3	red-blue	hydrazine
9	m1-M2	red-GREEN	hydrazine
10	m1-M3	red-BLUE	hydrazine
11	M1-m2	RED-green	amine
12	M1-m3	RED-blue	amine
13	m2-m3	green-blue	amine
14	M2-m3	GREEN-blue	amine
15	m2-M3	green-Blue	amine
16	m1-m2-m3	red-green-blue	amine
17	M1-m2-m3	RED-green-blue	amine
18	m1-M2-m3	red-GREEN-blue	amine
19	m1-m2-M3	red-green-BLUE	amine
20	M1-M2-m3	RED-GREEN-blue	amine
21	m1-M2-M3	red-GREEN-BLUE	amine
22	M1-m2-M3	RED-green-BLUE	amine

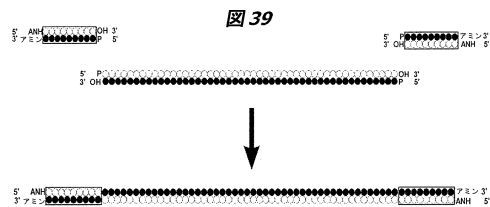
【図 38 A】



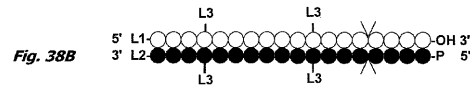
【図 38 F】



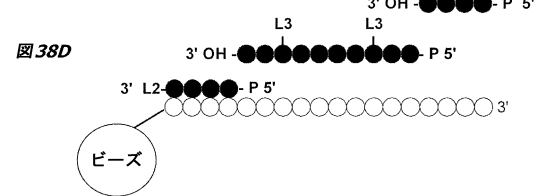
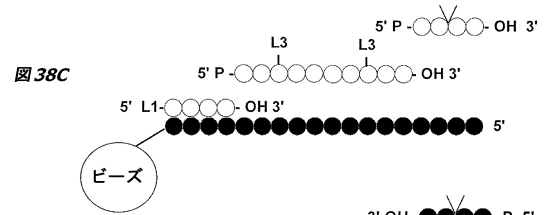
【図 39】



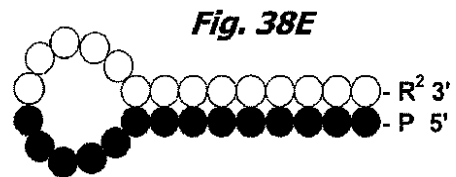
【図 38 B】



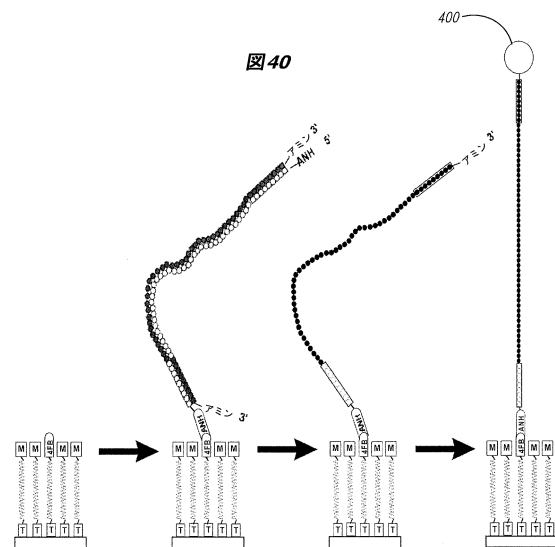
【図 38 C - D】



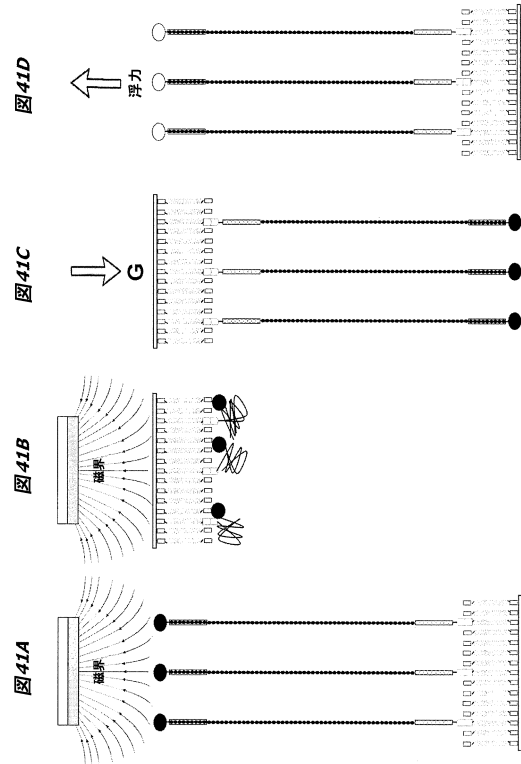
【図 38 E】



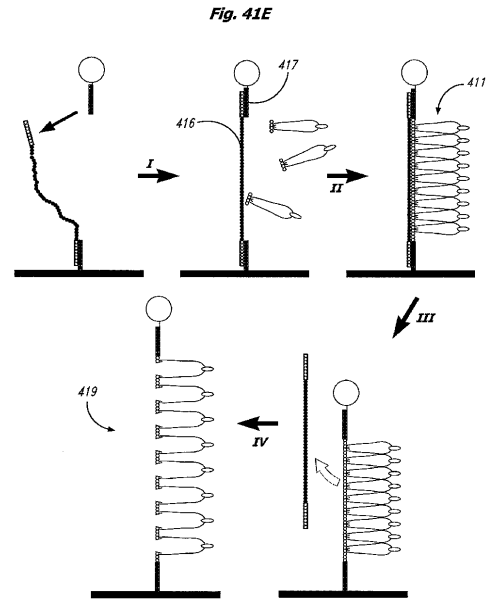
【図 40】



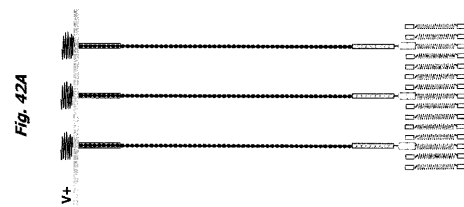
【図 41 A - D】



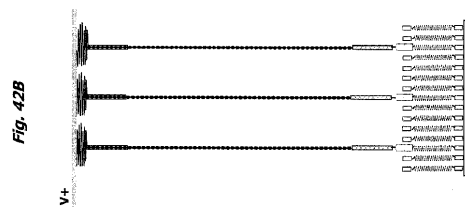
【図 41 E】



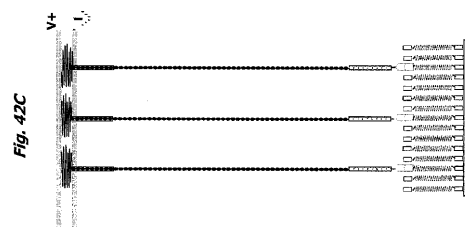
【図 42 A】



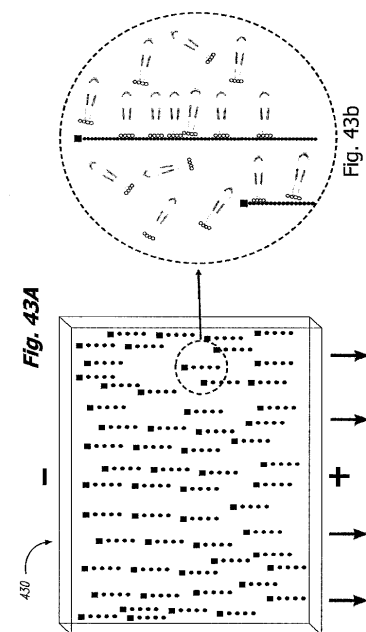
【図 42 B】



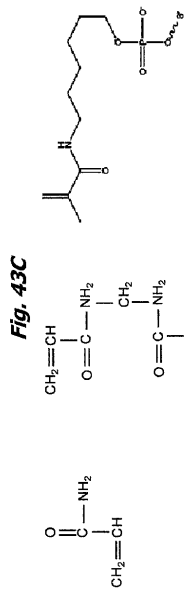
【図 42 C】



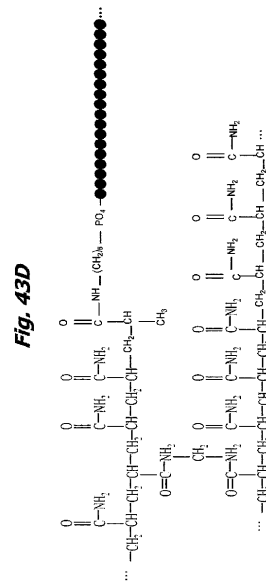
【図 43 A - 43 b】



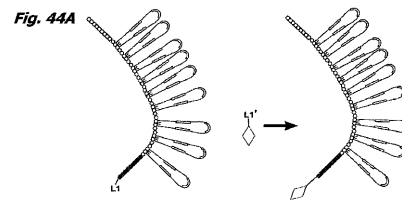
【 図 4 3 C 】



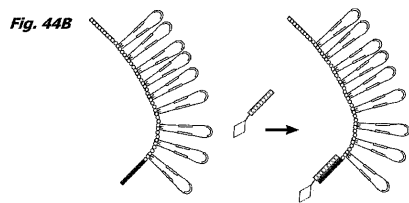
【 図 4 3 D 】



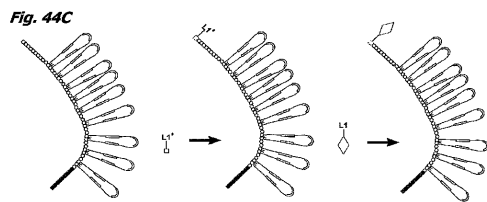
【 図 4 4 A 】



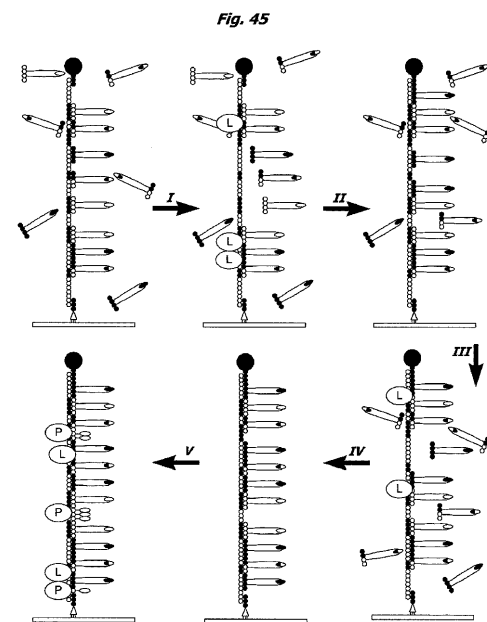
【 図 4 4 B 】



【 図 4 4 C 】

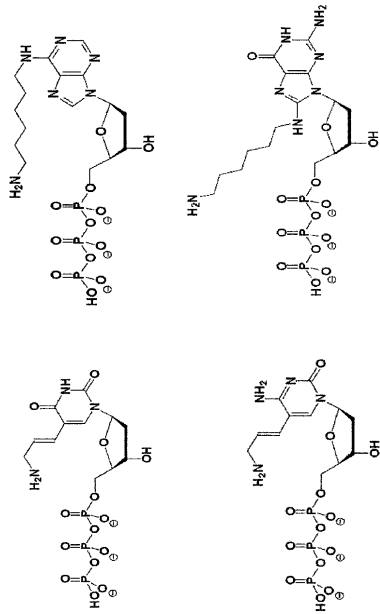


【 図 4 5 】



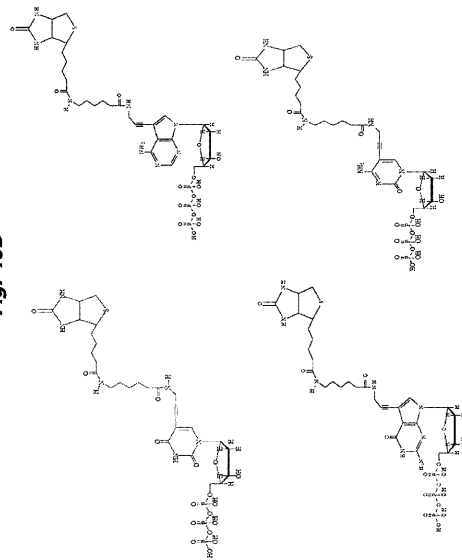
【図 46A】

Fig. 46A



【図 46B】

Fig. 46B



【図 47A - B】

図 47B

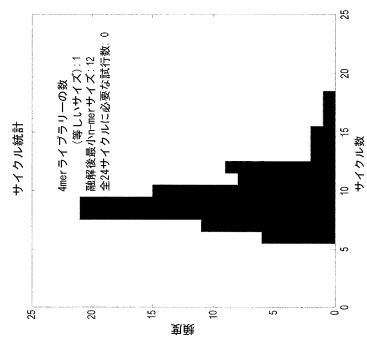
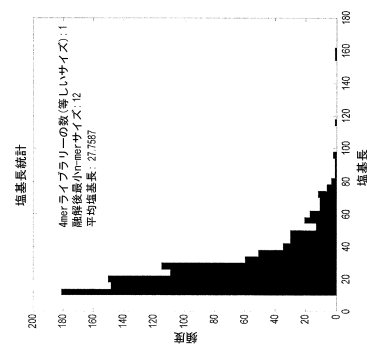


図 47A



【図 48A - B】

図 48B

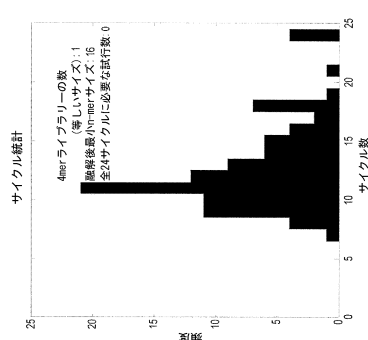
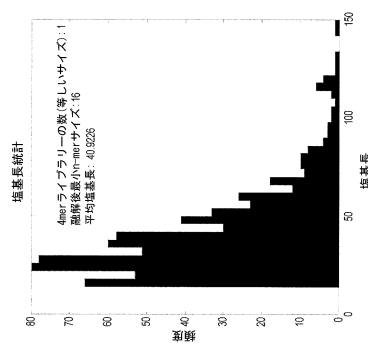
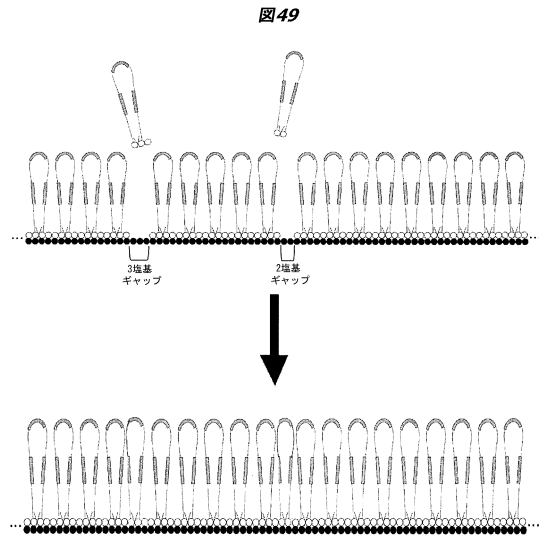


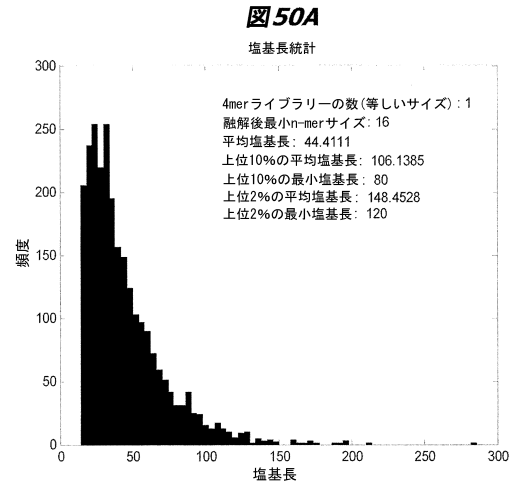
図 48A



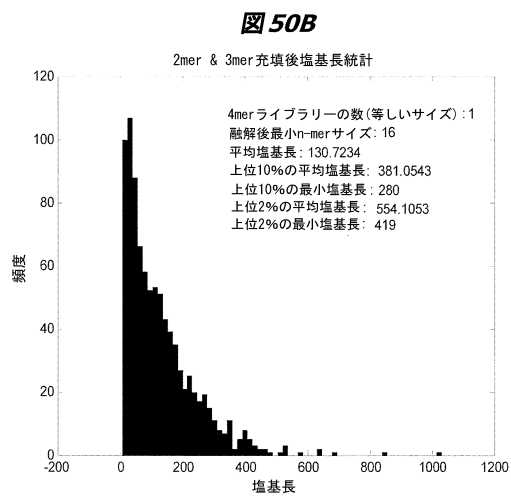
【図 49】



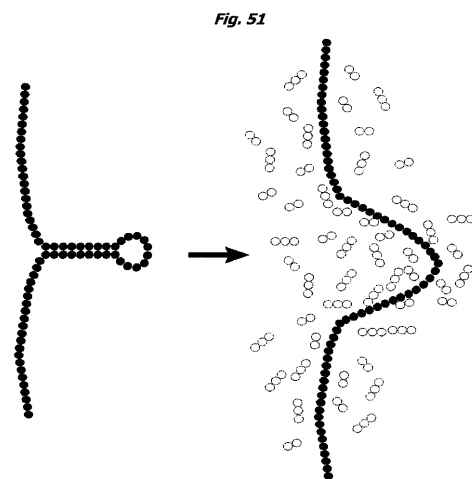
【図 50 A】



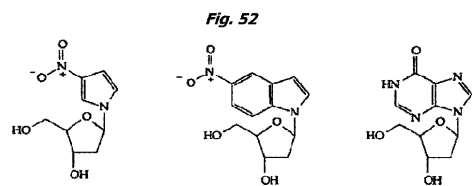
【図 50 B】



【図 51】

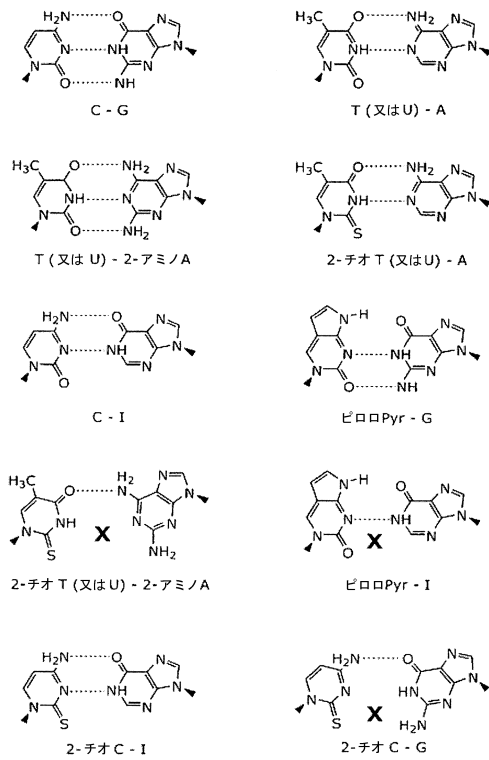


【図 52】



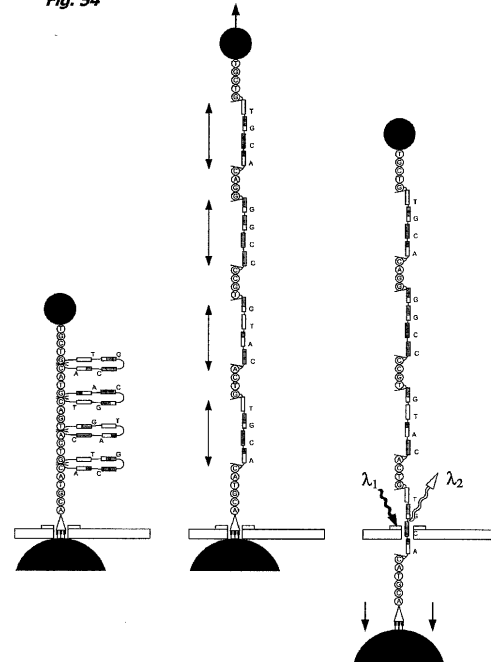
【図 53】

図 53



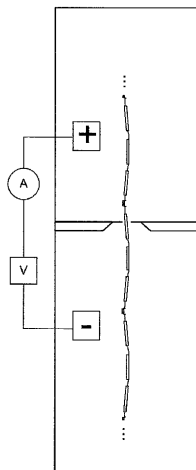
【図 54】

Fig. 54



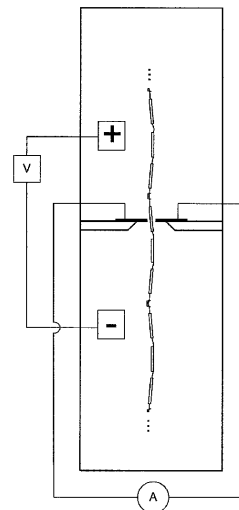
【図 55】

Fig. 55



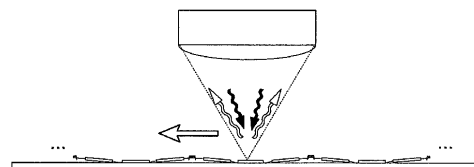
【図 56】

Fig. 56



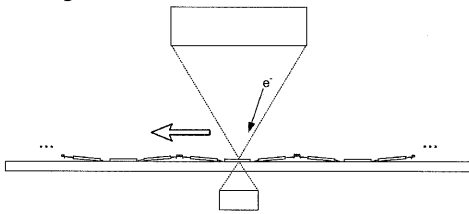
【図 57】

Fig. 57



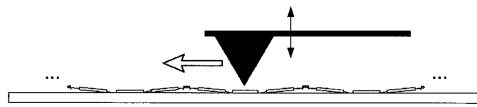
【図 58】

Fig. 58



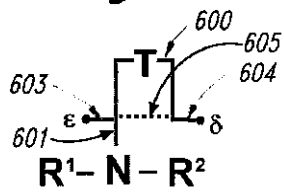
【図 59】

Fig. 59



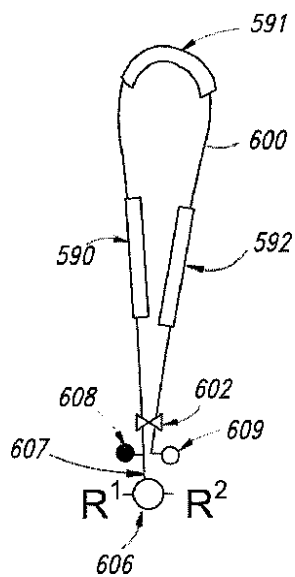
【図 60A】

Fig. 60A



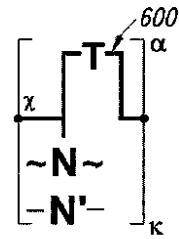
【図 60D】

Fig. 60D



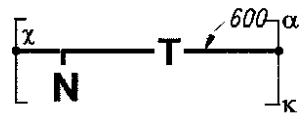
【図 60B】

Fig. 60B



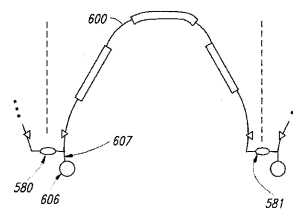
【図 60C】

Fig. 60C



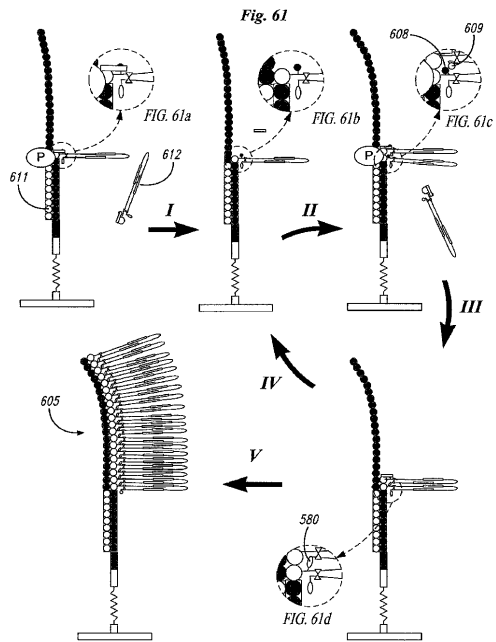
【図 60E】

Fig. 60E

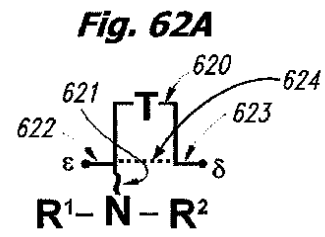




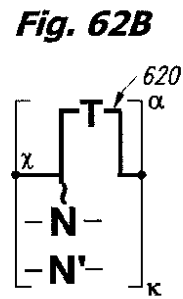
【図 6 1】



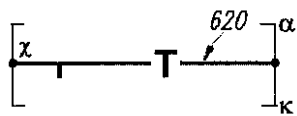
【図 6 2 A】



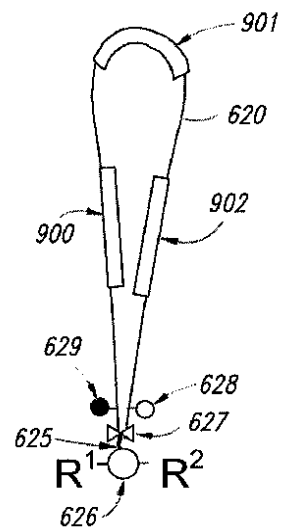
【図 6 2 B】



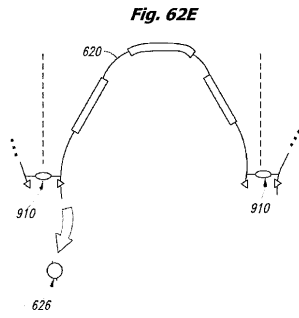
【図 6 2 C】

**Fig. 62C**

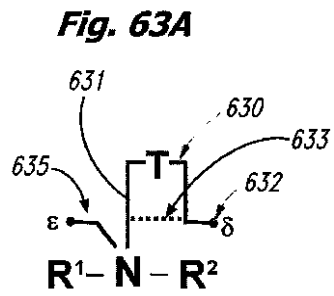
【図 6 2 D】

**Fig. 62D**

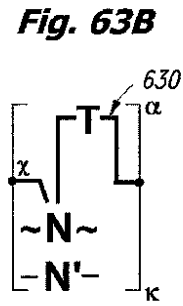
【図 62E】



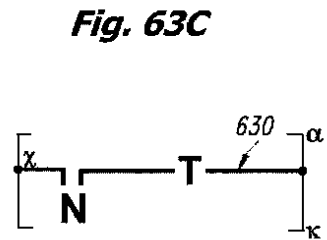
【図 63A】



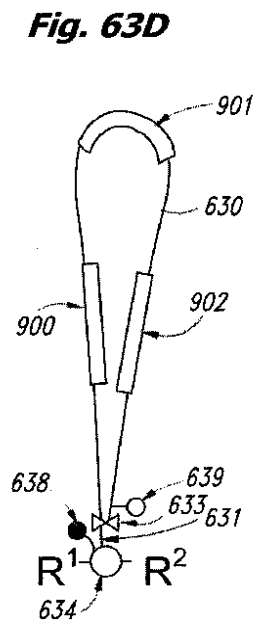
【図 63B】



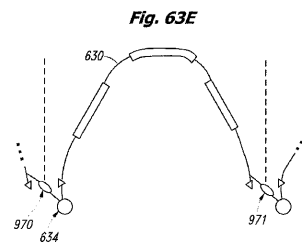
【図 63C】



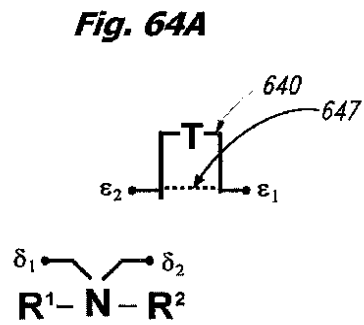
【図 63D】



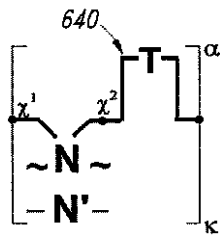
【図 63E】



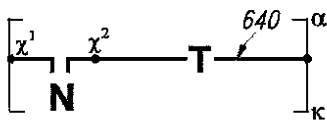
【図 64A】



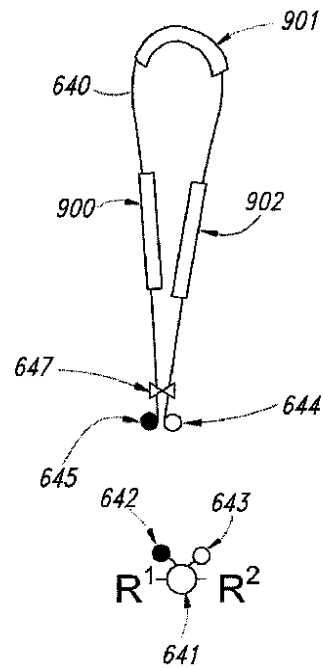
【 図 6 4 B 】

**Fig. 64B**

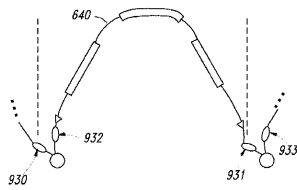
【 図 6 4 C 】

**Fig. 64C**

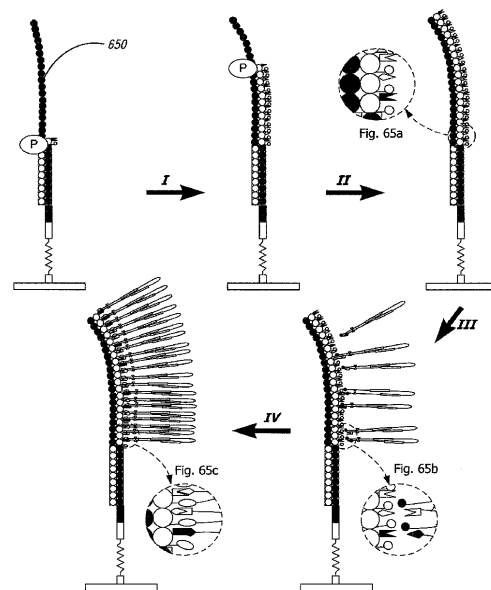
【 図 6 4 D 】

**Fig. 64D**

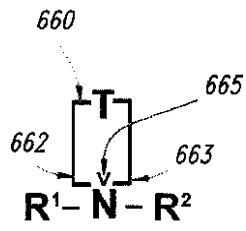
【 図 6 4 E 】

**Fig. 64E**

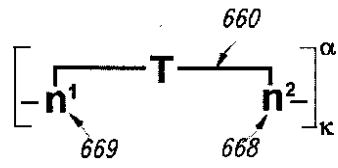
【 図 6 5 】

**Fig. 65**

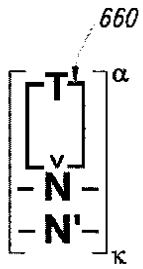
【 図 6 6 A 】

**Fig. 66A**

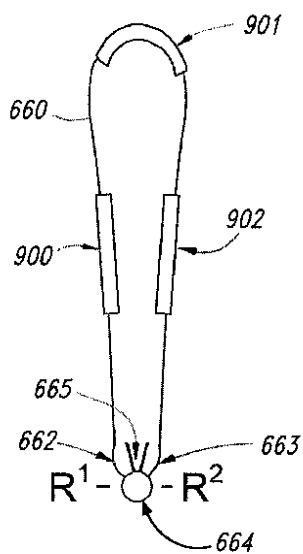
【 図 6 6 C 】

**Fig. 66C**

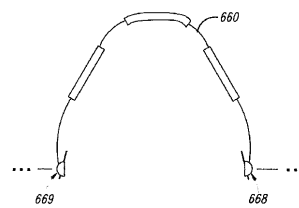
【 図 6 6 B 】

**Fig. 66B**

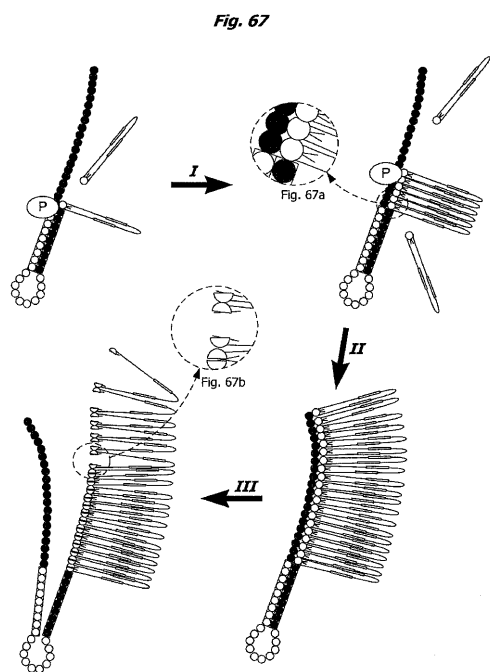
【 図 6 6 D 】

**Fig. 66D**

【 図 6 6 E 】

**Fig. 66E**

【図 67】



【配列表】

0005745842000001.app

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/000,305

(32)優先日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ロベルト エヌ・ムクルエル

アメリカ合衆国 ワシントン州 98040 メルセル イスランド ソウトフエアスト 46ト  
フ ストリート 9242

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 米国特許出願公開第2002/0182601(US,A1)

国際公開第2006/084132(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/68

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS(JDreamIII)