

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
【部門区分】第 1 部門第 1 区分  
【発行日】令和 7 年 2 月 3 日(2025.2.3)

【公開番号】特開 2024-99814(P2024-99814A)  
【公開日】令和 6 年 7 月 25 日(2024.7.25)  
【年通号数】公開公報(特許)2024-138  
【出願番号】特願 2024-74647(P2024-74647)  
【国際特許分類】

C 1 2 P 19/34(2006.01)

10

C 1 2 N 9/12(2006.01)

【F I】

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 N 9/12

【手続補正書】

【提出日】令和 7 年 1 月 23 日(2025.1.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10 mM より高い濃度で存在するヌクレオチド塩の使用を含む、酵素による DNA の合成のための無細胞プロセスであって、前記塩は、ナトリウムイオンのイオン半径より大きいイオン半径を有する 1 価カチオンを含み、

前記プロセスは、1 種またはそれより多くの 2 価金属カチオンの使用をさらに含む、上記無細胞プロセス。

【請求項 2】

30

ヌクレオチド塩の使用を含む、酵素による DNA の合成のための無細胞プロセスであって、前記ヌクレオチド塩は、少なくとも 10 mM の濃度で存在し、

(a) イオン半径がナトリウムイオンのイオン半径より大きい 1 価カチオンを含むヌクレオチド塩、または

(b) 2 種またはそれより多くのヌクレオチド塩であって、各塩は、異なる 1 価カチオンを含み、該カチオンの少なくとも 1 種は、ナトリウムイオンのイオン半径より大きいイオン半径を有する、ヌクレオチド塩のいずれかであり、

前記プロセスは、1 種またはそれより多くの 2 価金属カチオンの使用をさらに含む、上記無細胞プロセス。

40

【請求項 3】

前記ヌクレオチド塩が、少なくとも 15 mM の濃度で存在する、請求項 1 または 2 に記載の無細胞プロセス。

【請求項 4】

1 種またはそれより多くの前記 1 価カチオンが、独立して、アルカリ金属、遷移金属、または多原子イオンから選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

【請求項 5】

1 種またはそれより多くの前記 1 価カチオンが、独立して、カリウム、アンモニウム、アンモニウムの誘導体、ルビジウム、セシウム、またはフランシウムを含む群から選択さ

50

れる、請求項 4 に記載の無細胞プロセス。

【請求項 6】

1 種またはそれより多くのプライマーまたはプライマーゼの使用をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

【請求項 7】

テンプレートの使用をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

【請求項 8】

前記 1 種またはそれより多くの 2 価の金属カチオンが、マグネシウム、マンガン、カルシウム、ベリリウム、亜鉛、およびストロンチウムを含む群から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の DNA を合成するための無細胞プロセス。 10

【請求項 9】

前記 2 価の金属カチオンの前記ヌクレオチドに対する比率が、前記反応混合物中、1 : 1 であるかまたは 1 : 1 より小さい、請求項 8 に記載の無細胞プロセス。

【請求項 10】

前記プロセスが、ナトリウムおよび / またはリチウムヌクレオチド塩の 10 mM の最大濃度を使用する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

【請求項 11】

化学的な変性剤の使用をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。 20

【請求項 12】

pH 緩衝剤が添加されず、

前記ヌクレオチド塩が、セシウムイオンを含む、請求項 11 に記載の無細胞プロセス。

【請求項 13】

pH 緩衝剤は添加されるが、追加の塩または界面活性剤は添加されず、

前記ヌクレオチド塩が、アンモニウムイオンを含む、請求項 11 に記載の無細胞プロセス。

【請求項 14】

ラージスケールでの DNA の合成のためである、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。 30

【請求項 15】

酵素による無細胞の DNA の合成におけるセシウムカチオンを含むヌクレオチド塩の使用。

【請求項 16】

前記酵素による無細胞の DNA の合成が 2 価カチオンの存在下で、0.2 : 1 ~ 0.8 : 1 の 2 価カチオン : ヌクレオチドの比率で、行われる、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

前記無細胞の DNA の合成が、最小量の緩衝剤中で行われる、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 18】 40

DNA ポリメラーゼを使用して DNA テンプレートを増幅する方法であって、前記反応混合物中の 2 価カチオンのヌクレオチドに対する比率を 0.5 : 1 またはそれより小さく維持することが必要であり、セシウムイオンを含むヌクレオチド塩の使用を含む、上記方法。

【請求項 19】

酵素による無細胞の DNA の合成における、ルビジウムカチオンを含むヌクレオチド塩の使用。

【請求項 20】

無細胞での DNA テンプレートを増幅する方法であって、前記テンプレートおよび DNA ポリメラーゼを、40 mM に等しいかまたはそれより多くの量の塩の形態のヌクレオチ 50

ドと接触させることを含み、前記塩は、アンモニウムイオンを含む、上記方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の、無細胞プロセス、使用、方法、無細胞の方法または酵素による合成であって、該酵素は、DNA ポリメラーゼである、上記無細胞プロセス、使用、方法、無細胞の方法または酵素による合成。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0175

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0175】

図 6 は、10 mM、20 mM および 40 mM の  $MgCl_2$  の存在下で、様々な dNTP 濃度（セシウムおよびアンモニウム塩）の測定された pH を示す。NaOH 濃度は、DNA 合成反応で使用されるテンプレート DNA を変性させるために使用されたものである。この実験の目的のために、全ての他の DNA 合成反応要素は、開始時の pH に影響を与えないことがわかっているため省略された。全てのケースにおいて、特定の pH 安定化緩衝液（例えばトリス）は添加されなかった。30 mM 未満の dNTP 塩濃度においてアンモニウム dNTP の緩衝能力がセシウム dNTP より大きいことは明らかであり、予測通りである。興味深いことに、30 mM より高い dNTP 塩の濃度で、セシウム dNTP 反応およびアンモニウム dNTP 反応の平均 pH は、それぞれ約 7 および 7.5 で類似している。データから、dNTP それ自体のリン酸基は、十分な濃度で存在する場合、pH を約 7 に調節するように作用することが示唆される。DNA ポリメラーゼ酵素は、約 pH 7 で効率的に機能できるため、これは、高濃度の dNTP 塩の使用を必要とする工業的なスケールの合成反応にとって利点である。重要なことに、これは、工業的なスケールの反応のために、DNA 合成は、高い生産性を達成するために、特定の緩衝液なしで、または低濃度で行うことができることを示す。

20

国際出願時の特許請求の範囲

〔項 1〕

ヌクレオチド塩の使用を含む、酵素による DNA の合成のための無細胞プロセスであって、前記塩は、ナトリウムイオンのイオン半径より大きいイオン半径を有する 1 価カチオンを含む、上記無細胞プロセス。

30

〔項 2〕

前記ヌクレオチド塩が、10 mM より高い濃度で存在する、請求項 1 に記載の無細胞プロセス。

〔項 3〕

ヌクレオチド塩の使用を含む、酵素による DNA の合成のための無細胞プロセスであって、前記ヌクレオチド塩は、少なくとも 10 mM の濃度で存在し、

(a) イオン半径がナトリウムイオンのイオン半径より大きい 1 価カチオンを含むヌクレオチド塩、または

(b) 2 種またはそれより多くのヌクレオチド塩であって、各塩は、異なる 1 価カチオンを含み、該カチオンの少なくとも 1 種は、ナトリウムイオンのイオン半径より大きいイオン半径を有する、ヌクレオチド塩のいずれかである、上記無細胞プロセス。

40

〔項 4〕

前記ヌクレオチド塩が、少なくとも 15 mM、少なくとも 20 mM、少なくとも 25 mM、少なくとも 30 mM、少なくとも 35 mM または少なくとも 40 mM の濃度で存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

〔項 5〕

1 種またはそれより多くの前記 1 価カチオンが、独立して、アルカリ土類金属、遷移金属、または多原子イオンから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の無細胞プ

50

ロセス。

〔項 6〕

1 種またはそれより多くの前記 1 価カチオンが、独立して、カリウム、アンモニウム、アンモニウムの誘導体、ルビジウム、セシウム、またはフランシウムを含む群から選択される、請求項 5 に記載の無細胞プロセス。

〔項 7〕

1 種またはそれより多くのプライマーまたはプライマーゼの使用をさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

〔項 8〕

テンプレートの使用をさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。 10

〔項 9〕

1 種またはそれより多くの 2 価の金属カチオン、好ましくは、マグネシウム、マンガン、カルシウム、ベリリウム、亜鉛、およびストロンチウムを含む群から選択される金属カチオンの使用をさらに含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の DNA を合成するための無細胞プロセス。

〔項 10〕

前記 2 価の金属カチオンの前記ヌクレオチドに対する比率が、前記反応混合物中、1 : 1 であるかまたは 1 : 1 より小さく、好ましくは 1 : 1 より小さい、請求項 9 に記載の無細胞プロセス。 20

〔項 11〕

前記プロセスが、ナトリウムおよび / またはリチウムヌクレオチド塩の 10 mM の最大濃度を使用する、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

〔項 12〕

化学的な変性剤、好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウムまたは水酸化アンモニウム、およびピロホスファターゼの使用をさらに含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。

〔項 13〕

pH 緩衝剤が添加されず、好ましくは、追加の塩または界面活性剤が添加されない、請求項 12 に記載の無細胞プロセス。 30

〔項 14〕

前記ヌクレオチド塩が、セシウムイオンを含む、請求項 13 に記載の無細胞プロセス。

〔項 15〕

pH 緩衝剤は添加されるが、追加の塩または界面活性剤は添加されない、請求項 12 に記載の無細胞プロセス。

〔項 16〕

前記ヌクレオチド塩が、アンモニウムイオンを含む、請求項 15 に記載の無細胞プロセス。

〔項 17〕

ラージスケールでの、好ましくは少なくとも 3 g / l での DNA の合成のためである、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の無細胞プロセス。 40

〔項 18〕

酵素による無細胞の DNA の合成におけるセシウムカチオンを含むヌクレオチド塩の使用。

〔項 19〕

前記酵素による無細胞の DNA の合成が、低いレベルの 2 価カチオンの存在下で行われ、任意選択で、0.2 : 1 ～ 0.8 : 1 の 2 価カチオン : ヌクレオチドの比率で、好ましくは 0.2 : 1 ～ 0.5 : 1 の比率で行われる、請求項 18 に記載の使用。

〔項 20〕

前記無細胞の DNA の合成が、最小量の緩衝剤中で行われ、該緩衝剤は、任意選択で p 50

H 緩衝液を単独で含み、界面活性剤または追加の塩を含まない、請求項 18 に記載の使用。

〔項 21〕

DNA ポリメラーゼを使用して DNA テンプレートを増幅する方法であって、前記反応混合物中の 2 価カチオンのヌクレオチドに対する比率を 0.5 : 1 またはそれより小さく維持することが必要であり、セシウムイオンを含むヌクレオチド塩の使用を含む、上記方法。

〔項 22〕

酵素による無細胞の DNA の合成における、ルビジウムカチオンを含むヌクレオチド塩の使用。

10

〔項 23〕

無細胞での DNA テンプレートを増幅する方法であって、前記テンプレートおよび DNA ポリメラーゼを、40 mM に等しいかまたはそれより多くの量、好ましくは 60 mM より多く、または任意選択で 80 mM より多くの量の塩の形態のヌクレオチドと接触させることを含み、前記塩は、アンモニウムイオンを含む、上記方法。

〔項 24〕

低減された濃度の 2 価カチオン、好ましくはマグネシウムの条件下で実行される酵素による DNA 合成であって、ナトリウムイオンのイオン半径より大きいイオン半径を有する 1 価カチオンを含む塩の形態でのヌクレオチドの使用を含む、上記 DNA 合成。

〔項 25〕

請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の、無細胞プロセス、使用、方法、無細胞の方法または酵素による合成であって、該酵素は、DNA ポリメラーゼであり、任意選択で鎖置換型のポリメラーゼである、上記無細胞プロセス、使用、方法、無細胞の方法または酵素による合成。

20

30

40

50