

【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 12 P 19/34 (2006.01)

10

C 12 N 9/12 (2006.01)

【F I】

C 12 P 19/34 A

C 12 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】

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。

【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 値の金属カチオンが、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 値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。 30

【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。

【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 値カチオンの存在下で、0.2 : 1 ~ 0.8 : 1 の 2 値カチオン : 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。 40

【請求項 18】

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 値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】

【0175】

図 6 は、10 mM、20 mM および 40 mM の MgCl₂ 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ることを示す。

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 値力チオンを含む、上記無細胞プロセス。

〔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 値力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 値力チオンを含み、該力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。

〔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 値力チオンが、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ロセス。

10

20

30

40

50

口セス。

[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10mM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3g/1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1～8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、40mMに等しいかまたはそれより多くの量、好ましくは60mMより多く、または任意選択で80mM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。

20

[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。

30

40

50