

【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】平成20年11月20日(2008.11.20)

【公表番号】特表2008-523786(P2008-523786A)

【公表日】平成20年7月10日(2008.7.10)

【年通号数】公開・登録公報2008-027

【出願番号】特願2007-537994(P2007-537994)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 F

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成20年10月3日(2008.10.3)

【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

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 のプール中での、異なる複数の予め特定された配列及び少なくとも 1 の内部相同性(internal homology)領域を有する複数のポリヌクレオチド構造物の製造方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) それぞれ上記複数のポリヌクレオチド構造物の配列を特定する、部分的オーバーラップ配列を含む構築用オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；

(b) その構築用オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも 1 の下記(i)～(iii)条件下でインキュベートするステップ：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件；並びに

(c) 上記予め特定された配列を有さない構造物から予め特定された配列を有する構造物を分離し、予め特定された配列及び少なくとも 1 の内部相同性領域を有する複数のポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項 2】

ポリヌクレオチド構造物は、少なくとも 1 の内部相同性領域を有する複数のポリペプチドをエンコードする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

1 以上のポリヌクレオチド構造物の配列の少なくとも一部分は、少なくとも 1 の他のポリヌクレオチド構造物との相同性が減少するようにコドン再配置されている請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 10、100 又は 1,000 ポリヌクレオチド構造物が 1 のプール中に製造される請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

ポリヌクレオチド構造物は複数の RNA i 分子をエンコードする請求項 1 又は 4 に記載

の方法。

【請求項 6】

更に、次のステップの少なくとも一つを含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法：ポリヌクレオチド構造物をベクターへ導入するステップ、ポリヌクレオチド構造物を宿主細胞へ導入するステップ、ポリヌクレオチド構造物からポリペプチド又はリボ核酸を発現するステップ、又はポリヌクレオチド構造物から発現されたポリペプチド又はリボ核酸の物理的又は機能的特徴をアッセイするステップ。

【請求項 7】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 2 個のポリヌクレオチド構造物の単一の反応混合物中でのアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 下記(i)及び(ii)を含む構築用オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ：

(i) 該ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する、部分的オーバーラップ配列；及び  
(ii) 1 以上の構築用オリゴヌクレオチド上の配列タグ、但し目的の配列を有するポリヌクレオチド構造物を特定する一組の構築用オリゴヌクレオチドは、不適当なクロスオーバー産物を特定する一組の構築用オリゴヌクレオチドと比較して配列タグの識別可能な相補物(complement)を有する；

(b) その構築用オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件並びに少なくとも 1 の下記(i)～(iii)条件に曝すステップ：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件；並びに

(c) 不適当なクロスオーバー産物から、サイズ又は電気泳動移動性に基づいて目的の配列を有するポリヌクレオチド構造物を分離し、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項 8】

サイズ分離はカラムクロマトグラフィーにより行われる請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも 2 個の相同性の内部領域を有する請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 2 個のポリヌクレオチド構造物の、単一の反応混合物中でのアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 該ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する部分的オーバーラップ配列を含む構築用オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し第 1 のポリヌクレオチド構造物の末端を特定する構築用オリゴヌクレオチドは相補的領域を有し、第 2 のポリヌクレオチド構造物の末端を特定する構築用オリゴヌクレオチドは異なる相補的領域を有する；及び

(b) その構築用オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも 1 の下記(i)～(iii)条件に曝すステップ：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件；並びに

(c) 直鎖状産物から環状化産物を分離し、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項 11】

直鎖状産物をエキソヌクレアーゼで消化することにより、環状化産物を直鎖状産物から分離する請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ゲル電気泳動を使用して、環状化産物を直鎖状産物から分離する請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 2 個のポリヌクレオチド構造物の、単一の反応混合物中でのアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 該ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する部分的オーバーラップ配列を含む構築用オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ：

(b) 架橋用オリゴヌクレオチドを構築用オリゴヌクレオチドのプールへ提供するステップ、但し架橋用オリゴヌクレオチドは正しいポリヌクレオチド構造物の末端に相補的であるが、不適当なクロスオーバー産物の両末端には非相補的である；

(c) その構築用オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件及びライゲーション条件におき、直鎖状及び環状化産物の混合物を形成するステップ；

(d) その混合物を変性して一本鎖環状及び直鎖状産物の混合物を形成するステップ；

(e) その混合物を一本鎖エキソヌクレアーゼと接触させ、直鎖状フラグメントを除去するステップ；

(f) 一本鎖環状産物をプライマー対と鎖伸長条件下で接触させるステップ、但しプライマー対は、目的のポリヌクレオチド構造物の配列へフランキングし、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物の複数のコピーを形成する。

【請求項 14】

少なくとも1の内部相同性領域を有する少なくとも3、5、10又は100個のポリヌクレオチド構造物が単一の反応混合物中でアセンブルされる請求項7～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】

構築用オリゴヌクレオチドのプールはオーバーラップする領域内で相補的な正鎖及び負鎖を有する請求項7～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

構築用オリゴヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチド構造物形成前に増幅される請求項7～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

ポリヌクレオチド構造物は更に、より長いポリヌクレオチド構造物中にアセンブルされる請求項1又は7～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

ポリヌクレオチド構造物は、更なるアセンブリ前に(i)増幅、(ii)エラー減少プロセス、又はいずれかの順での(i)及び(ii)で処理される請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

更にアセンブリは下記ステップを含む請求項17に記載の方法：

(a) ポリヌクレオチド構造物を変性し又は制限酵素と接触させるステップ；及び

(b) ポリヌクレオチド構造物をハイブリダイゼーション条件並びに1以上の下記(i)～(iii)条件に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、より長いポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

まとめ

本発明は、個々に又は一緒に使用できるMullis(Mullisら(1986)Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.51Pt1:263)及びStemmer(Stemmerら(1995) Gene 164:49)のDNAアセンブリ方法を様々に改良をすることにより有用な、高忠実度合成DNA構造物の費用効果のある製造を可能とする方法を提供する。本発明の改良は、下記技術の進歩を含む：アセンブリ用のオリゴヌクレオチドのコンピュータ的設計、即ち「構築用オリゴヌクレオチド」(以下、「構造体オリゴヌクレオチド」とも記す)の設計、及び精製、即ち「選択用オリゴヌクレオチド」(以下、「選択オリゴヌクレオチド」とも記す)；構築用オリゴヌクレオチドアセンブリの複合化、即ち、同一のプール中での複数の異なるアセンブリの製造；構築用オリゴヌクレオチド増幅技術；並びに構築用オリゴヌクレオチドエラー減少技術。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

又、本発明は、不適當なクロスオーバー産物と比較して正確なアセンブリ産物間の区別を可能とする方法に基づき、1のプール中での2以上の少なくとも1の内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法を提供する。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、正確にアセンブルされた産物が不適當なアセンブリ産物からサイズに基づき(例えばカラム又はゲルを使用して)識別できるように、識別可能な配列タグの相補物を含むものとして設計される。あるいは、末端を形成する構造体オリゴヌクレオチド(例えば、二本鎖構造物の一本鎖に関しては5'及び3'最末端構造体オリゴヌクレオチド)は、正確な環状産物の環化を可能とする相補的配列を有するように設計され、一方、不適當なクロスオーバー産物は直鎖状で残る。環状産物は次に、サイズに基づき又はエキソヌクレアーゼを使用して直鎖状産物から分離され、直鎖状産物を破壊する。例えば架橋用オリゴヌクレオチド(以下、「架橋オリゴヌクレオチド」とも記す)は、正確にアセンブルされた産物の環化を促進するために使用される。