

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-546987
(P2024-546987A)

(43)公表日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	Z Z N A
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全46頁)				
(21)出願番号	特願2024-536093(P2024-536093)	(71)出願人	524226427	
(86)(22)出願日	令和4年12月16日(2022.12.16)		アンサ バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年7月5日(2024.7.5)		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル シックスティーフ イフス ストリート 1 1 9 8 スイート 2 5 0	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/081871	(74)代理人	100102978	
(87)国際公開番号	WO2023/115040		弁理士 清水 初志	
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)	(74)代理人	100205707	
(31)優先権主張番号	63/290,320		弁理士 小寺 秀紀	
(32)優先日	令和3年12月16日(2021.12.16)	(74)代理人	100160923	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(74)代理人	100119507	
			弁理士 刑部 俊	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチド合成の方法

(57)【要約】
本明細書に開示されるのは、核酸分子のデノボ酵素合成のための組成物及び方法である。具体的には、とりわけ、本開示の組成物及び方法は、デノボ酵素合成によって生成された核酸分子生成物中の非終結の低減を提供する。本開示の組成物及び方法はまた、非終結の低減を促進するためのホスファターゼ酵素の使用を含む。

【選択図】 図 1 D

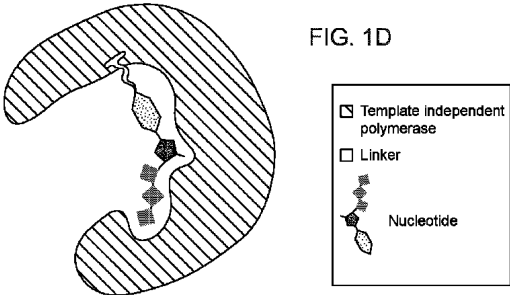


FIG. 1D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

(i) 複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を提供することであって、前記コンジュゲートが、各々、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合的に結合したヌクレオチドを含む、前記提供することと、

(ii) ポリヌクレオチドを含む試料を前記コンジュゲート試薬と接触させることであって、前記コンジュゲートの前記ポリメラーゼが、前記ポリヌクレオチドの3'ヒドロキシルへの、前記ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートの前記ヌクレオチドの共有結合的付加を触媒する、前記接触させることと
を含む、核酸合成の方法であって

前記コンジュゲート試薬が、ホスファターゼとインキュベートされるか、またはインキュベートされており、前記ホスファターゼが、遮蔽されていないヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去することができる、前記方法。

【請求項 2】

(i) ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を提供することと、

(ii) 前記コンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることと
を含む方法であって、

前記コンジュゲートが、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合したヌクレオチドを含み、

前記ホスファターゼが、遮蔽されていないヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去することができる、方法。

【請求項 3】

前記ヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記コンジュゲートの付加後に、前記ポリヌクレオチドに結合した前記ポリメラーゼを除去するために、前記リンカーを切断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記コンジュゲート試薬を前記ホスファターゼとインキュベートすることをさらに含み、

前記インキュベートすることにより、少なくとも1つの遮蔽されていないヌクレオチドの少なくとも1つの末端5'ホスフェートが加水分解される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ホスファターゼとの前記コンジュゲート試薬の前記インキュベーションが、前記試料を前記コンジュゲート試薬と接触させる前に行われる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料を前記コンジュゲート試薬と接触させる前に、前記ホスファターゼが前記コンジュゲート試薬から除去される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ホスファターゼとの前記コンジュゲート試薬の前記インキュベーションが、前記試料を前記コンジュゲート試薬と接触させた後に行われる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

伸長されたポリヌクレオチドを合成するために、請求項 1 または 3～8 のいずれか1項に記載のステップの各々を1回以上繰り返すことをさらに含む、請求項 1 または 3～8 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ホスファターゼが、前記コンジュゲートの遮蔽されたヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去しない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記遮蔽されていないヌクレオチドが、ポリメラーゼに結合していない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記遮蔽されていないヌクレオチドが、コンジュゲートの一部であり、
前記ポリメラーゼが、折り畳まれていないか、または不適切に折り畳まれており、
前記ヌクレオチドが、前記ホスファターゼから前記ヌクレオチドが遮蔽されないように、
前記ポリメラーゼに結合されているか、または複数のヌクレオチドが、前記ポリメラーゼに結合されている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ホスファターゼが、アルカリホスファターゼまたは非アルカリホスファターゼである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ポリメラーゼが、テンプレート非依存性ポリメラーゼを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記テンプレート非依存性ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT)、またはそのバリエーションである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ポリメラーゼが、テンプレート依存性ポリメラーゼを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ポリメラーゼが、DNA ポリメラーゼを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ポリメラーゼが、RNA ポリメラーゼを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ポリヌクレオチド合成における非終結の割合が、ホスファターゼとインキュベートされていないこと以外は同一のコンジュゲート試薬を使用した同じ合成と比較して低下する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ホスファターゼが、前記遮蔽されていないヌクレオチドの前記末端 5' ホスフェートを除去する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 2 2】

複数のコンジュゲートを含む組成物であって、
各コンジュゲートが、ポリメラーゼに結合したヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含み、
前記組成物の連結したポリメラーゼによって遮蔽されるヌクレオチドの純度が、前記組成物中のヌクレオチドの総量に対して、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、もしくは約 99.9% 超、または約 99.9% である、前記組成物。

【請求項 2 3】

前記複数のコンジュゲートが、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、約 1% 未満、約 0.5% 未満、約 0.1% 未満、約 0.05% 未満、または約 0.01% 未満の遮蔽されていないヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

ホスファターゼをさらに含む、請求項 2 2 または 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記複数のコンジュゲートが、核酸分子を 1 ヌクレオチドだけ延長することができる、

10

20

30

40

50

請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記複数のコンジュゲートが、核酸分子を 1 つ以下のヌクレオチドだけ延長することができる、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記核酸分子が、一本鎖である、請求項 25 または 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記核酸が、二本鎖である、請求項 25 または 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

核酸分子を、請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含む、所定の配列を含むポリヌクレオチドを合成する方法。 10

【請求項 30】

前記所定の配列を含むポリヌクレオチド生成物を生成する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記ポリヌクレオチド生成物が、前記生成物中の全てのポリヌクレオチドと比較して、前記所定の配列ではない配列を含むポリヌクレオチドを約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、約 1 % 未満、約 0.5 % 未満、約 0.1 % 未満、約 0.05 % 未満、または約 0.01 % 未満有する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記核酸分子が、一本鎖である、請求項 29 に記載の方法。 20

【請求項 33】

前記核酸分子が、二本鎖である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含む組成物を処理することを含む方法であって、

前記組成物をホスファターゼと接触させるステップを含み、

前記ホスファターゼが、遮蔽されていないヌクレオチドの末端 5' ホスフェートを除去することができる、方法。

【請求項 35】

核酸分子合成における 1 つ以上の非終結反応を低減する方法であって、 30

前記合成が、1 つ以上の遮蔽されていないヌクレオチドを含む環境において行われ、

前記低減が、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることを含み、

前記ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートが、リンカーによって前記ポリメラーゼにテザリングされたヌクレオチドを含み、

前記ホスファターゼが、前記 1 つ以上の遮蔽されていないヌクレオチドの末端 5' ホスフェートを除去することができる、前記方法。

【請求項 36】

ホスファターゼの存在下で行われる合成反応で生じる非終結の数が、ホスファターゼの非存在下であること以外は同じ条件下で行われる合成と比較して低減する、請求項 36 に記載の方法。 40

【請求項 37】

前記ヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドである、請求項 34～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本開示は、核酸合成の方法を含む技術に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年12月16日に出願された米国仮出願第63／290,320号の優先権及び利益を主張するものであり、その開示全体は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

配列表への参照

本出願は、電子的に提出され、参照により本明細書に組み込まれる配列表（A B B - 0 0 6 W O _ _ S L . x m l という名前のXMLファイル、2022年12月13日に生成され、サイズが15,606バイト）を含む。

【背景技術】

【0004】

背景

酵素的ポリヌクレオチド合成は、DNA基質に結合するテンプレート非依存性核酸ポリメラーゼ（例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ）の一連の反復、付加されるヌクレオチド（例えば、保護されたヌクレオチド）の組み込み、それに続く、将来の一連のヌクレオチド組み込みを可能にする脱保護ステップによって達成することができる。酵素的核酸合成は、ヌクレオチドの付加後の非終結に起因して、望ましくないさらなる挿入をもたらす。これにより、単一の延長ステップで2つ以上のヌクレオチドの付加をもたらす。各ステップにおいて厳密に1つのヌクレオチドの付加を達成することは、オリゴヌクレオチドの正確な合成を生成するために必須であり、たとえ小さな挿入誤差率であっても、より長いオリゴヌクレオチドでは高い割合の不正確な配列をもたらす。したがって、ステップごとに2つ以上のヌクレオチドの付加をもたらすプロセスを防止するために、酵素的核酸合成の改善された方法及び／または技術を開発する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

概要

本開示は、とりわけ、ポリヌクレオチド合成の方法を提供する。このような方法は、例えば、一塩基付加の確度を向上させることを含む、オリゴヌクレオチド合成の精度及び確度を向上させるために使用することができる。

【0006】

いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、オリゴヌクレオチド合成反応における非終結を低減する方法である。

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、コンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることを含む、方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、方法は、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることを含む、上記コンジュゲートは、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合したヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含み、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの1つ以上の末端5'ホスフェートを除去することができる。

【0008】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を接触させることであって、上記コンジュゲートは、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合的に結合したヌクレオチドを含む、接触させることと、ポリヌクレオチドを含む試料を上記コンジュゲート試薬と接触させることと、を含み、コンジュゲートの上記ポリメラーゼは、コンジュゲートのヌクレオチドの、上記ポリヌクレオチドの3'ヒドロキシルへの共有結合的付加を触媒し、上記コンジュゲート試薬はホスファターゼとインキュベートされるか、またはインキュベートされており、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去することができる。いくつかの実施形態では、共有結合的に付加されたヌクレオチドは、遮蔽さ

10

20

30

40

50

れたヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、末端 5' ホスフェートは、例えば、遮蔽されていないヌクレオチドの α ホスフェート、 β ホスフェート、 χ ホスフェート、 δ ホスフェート、 ε ホスフェート、 ϕ ホスフェート、または γ ホスフェートであり得る。

【0009】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート組成物を含む上記コンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることを含み、上記コンジュゲートは、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合的に連結したヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含み、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの末端 5' ホスフェートを除去することができる。

【0010】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を提供することであって、上記コンジュゲートが、それぞれ、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合的に結合したヌクレオチドを含む、提供することと、(ii) ポリヌクレオチドを含む試料を上記コンジュゲート試薬と接触させることであって、コンジュゲートの上記のポリメラーゼが、上記ポリヌクレオチドの 3' ヒドロキシルへの、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートのヌクレオチドの共有結合的付加を触媒し、上記コンジュゲート試薬がホスファターゼによりインキュベートされるか、またはインキュベートされており、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの末端 5' ホスフェートを除去することができる、核酸合成の方法を提供する。いくつかの実施形態では、共有結合的に付加されたヌクレオチドは、遮蔽されたヌクレオチドである。

【0011】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を提供することと、(ii) コンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることと、を含む方法を提供し、上記コンジュゲートは、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合的に結合したヌクレオチドを含み、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの末端 5' ホスフェートを除去することができる。

【0012】

いくつかの実施形態では、リンカーは切断可能なリンカーである。

【0013】

いくつかの実施形態では、本開示は、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を提供することであって、上記コンジュゲートが、リンカーを介してポリメラーゼに共有結合的に結合したヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含む、提供することと、ポリヌクレオチドを含む試料を上記コンジュゲート試薬と接触させることと、を含み、上記コンジュゲートの上記ポリメラーゼは、コンジュゲートの遮蔽されたヌクレオチドの、上記ポリヌクレオチドの 3' ヒドロキシルへの共有結合的付加を触媒し、上記コンジュゲート試薬は、ホスファターゼとインキュベートされるか、またはインキュベートされており、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドから 1 つ以上の末端 5' ホスフェートを除去することができる、核酸合成の方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、上記コンジュゲートの付加後に、ポリヌクレオチドに結合しているポリメラーゼを（例えば、ヌクレオチドをポリメラーゼにテザリングさせるリンカーを介して）除去するために、上記リンカーを切断することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供される方法は、ポリヌクレオチドを合成するために本方法の各ステップを 1 回以上繰り返すことを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、上記コンジュゲート試薬を上記ホスファターゼとインキュベートすることを含み、上記インキュベートは、少なくとも 1 つの遮蔽されていないヌクレオチドの少なくとも 1 つの末端 5' ホスフェートを加水分解する。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供される方法は、上記コンジュゲート試薬を上記ホスファターゼとインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

上記コンジュゲート試薬と上記ホスファターゼとの上記インキュベートは、上記試料を上記コンジュゲート試薬とインキュベートする前に行われる。いくつかの実施形態では、上記ホスファターゼは、上記試料を上記コンジュゲート試薬とともにインキュベートする前に、上記コンジュゲート試薬から除去される。いくつかの実施形態では、上記コンジュゲート試薬を上記ホスファターゼとインキュベートすることは、上記試料を上記コンジュゲート試薬と接触させた後に行われる。

【0015】

いくつかの実施形態では、上記ポリヌクレオチド合成における非終結の割合は、ホスファターゼと接触していないこと以外は同一のコンジュゲート試薬を使用する同じ合成と比較して、低下する。

【0016】

いくつかの実施形態では、上記ホスファターゼは、上記コンジュゲートの遮蔽されたヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去しない。

【0017】

いくつかの実施形態では、上記遮蔽されていないヌクレオチドは、ポリメラーゼに結合していない。いくつかの実施形態では、上記遮蔽されていないヌクレオチドは、コンジュゲートの一部であり、ポリメラーゼは、折り畳まれていないか、または不適切に折り畳まれており、ヌクレオチドは、ホスファターゼからヌクレオチドが遮蔽されないようにポリメラーゼに結合されているか、または複数のヌクレオチドがポリメラーゼに結合されている。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去する。

【0018】

いくつかの実施形態では、上記ポリメラーゼは、テンプレート非依存性ポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、上記テンプレート非依存性ポリメラーゼは、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT)、またはそのバリエーションである。

【0019】

いくつかの実施形態では、上記ホスファターゼは、アルカリホスファターゼまたは非アルカリホスファターゼである。

【0020】

いくつかの実施形態では、上記ポリメラーゼは、テンプレート依存性ポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、上記ポリメラーゼは、DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、上記ポリメラーゼは、RNAポリメラーゼを含む。

【0021】

本開示は、複数のコンジュゲートを含む組成物を提供し、各コンジュゲートは、ポリメラーゼに結合したヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含み、組成物における、結合されたポリメラーゼによって遮蔽されたヌクレオチドの純度は、組成物中のヌクレオチド (遮蔽及び非遮蔽) の総量に対して、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、もしくは約99.9%超、または約99.9%である。

【0022】

いくつかの実施形態では、上記複数のコンジュゲートは、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、約0.1%未満、約0.05%未満、または約0.01%未満の遮蔽されていないヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書中に提供される組成物は、少なくとも1つのホスファターゼを含む。いくつかの実施形態では、ホスファターゼはアルカリホスファターゼまたは非アルカリホスファターゼである。

【0024】

いくつかの実施形態では、複数のコンジュゲートは、核酸分子を1ヌクレオチドだけ延

10

20

30

40

50

長することができる。いくつかの実施形態では、複数のコンジュゲートは、核酸分子を1つ以下のヌクレオチドだけ延長することができる。

【0025】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、一本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸は、二本鎖である。

【0026】

いくつかの態様では、本開示は、核酸分子を本明細書に提供される組成物と接触させることを含む、所定の配列を含むポリヌクレオチドを合成する方法を提供する。

【0027】

いくつかの実施形態では、方法は、所定の配列を含むポリヌクレオチド生成物を生成する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド生成物は、生成物中の全てのポリヌクレオチドと比較して、所定の配列ではない配列を含むポリヌクレオチドを、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、約0.1%未満、約0.05%未満、または約0.01%未満有する。

10

【0028】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、一本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸分子は、二本鎖である。いくつかの実施形態では、本明細書において提供される方法は、上記組成物をホスファターゼと接触させるステップを含む、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含む組成物を処理することを含み、上記ホスファターゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの末端5'ホスフェートを除去することができる。

20

【0029】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、核酸分子合成における1つ以上の非終結反応を低減する方法であり、合成は、1つ以上の遮蔽されていないヌクレオチドを含む環境において行われ、低減することは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることを含み、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、リンカーによってポリメラーゼにテザリングされたヌクレオチドを含み、各ヌクレオチドは、1つ以上のホスフェートを含み、各ヌクレオチドは、末端5'ホスフェートを含み、ホスファターゼは、末端5'ホスフェートを1つ以上の遮蔽されていないヌクレオチドから除去することができる。

30

【0030】

いくつかの実施形態では、ホスファターゼの存在下で行われる合成反応において生じる非終結の数は、同じ条件下だがホスファターゼの非存在下で行われる合成と比較して減少する。

【0031】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。

【図面の簡単な説明】

【0032】

前述及び他の目的、特徴及び利点は、同様の参照文字が異なる図面を通して同じ部分を参照する添付の図面に示されるように、本開示の特定の実施形態の以下の説明から明らかになるであろう。図面は必ずしも一定の比率ではなく、代わりに、本開示の様々な実施形態の原理を例示することに重点を置いている。

40

【0033】

【図1A】ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート試薬に存在し得る例示的な遮蔽されていないヌクレオチドの図である。図1Aは、間違った位置にテザリングされた例示的な遮蔽されていないヌクレオチド（例えば、デオキシヌクレオシド三リン酸または「dNTP」）を有する例示的なテンプレート非依存性ポリメラーゼを示す。

【0034】

【図1B】ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート試薬に存在し得る例示的な遮蔽されていないヌクレオチドの図である。例示的なテザリングされたヌクレオチド（例えば、dNTP）を有する例示的な折り畳まれていないテンプレート非依存性ポリメラーゼを示

50

す。

【0035】

【図1C】ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート試薬に存在し得る例示的な遮蔽されていないヌクレオチドの図である。例示的なコンジュゲート試薬中に存在する例示的な「遊離」（または非テザリング）ヌクレオチド（例えば、dNTP）を例示する。そのような遊離dNTPは、例えば、ヌクレオチドとポリメラーゼとの間のリンカーの切断（例えば、不安定性による）、または例えば、コンジュゲート合成後のコンジュゲートからの遊離ヌクレオチドの不完全な除去に起因して、そのようなポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート試薬中に存在し得る。図1A、図1B、及び図1Cの各ヌクレオチドは、ホスファターゼを介した触媒除去にアクセス可能な5'ホスフェート基を有する。

10

【0036】

【図1D】例示的な遮蔽されたヌクレオチド（例えば、dNTP）を含む例示的なポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを示す。この図では、例示的なヌクレオチドは、折り畳まれたポリメラーゼの触媒部位にテザリングされ、その5'ホスフェートでのホスファターゼ切断からテザリングされたポリメラーゼによって立体的に妨げられる。

【0037】

【図2A-1】ホスファターゼの存在下（+Phos）または非存在下（-Phos）でA、C、T、またはGポリメラーゼコンジュゲートを使用した、例示的な一本鎖DNA基質への例示的な一塩基付加反応の結果を示す。得られた合成オリゴヌクレオチドを毛細管電気泳動によって分析した。x軸は、オリゴヌクレオチドのおおよそのヌクレオチド長を示し、y軸は、517nmでの相対蛍光を示す。示された時点で反応を終了した。

20

【図2A-2】図2A-1の説明を参照。

【0038】

【図2B】ホスファターゼの存在下または非存在下における図2Aからの21分41秒の時点の結果の拡大図を示す。特定のヌクレオチドが、パネルの各セットに示される。矢印は、+2付加を示す。

【0039】

【図3A-1】以下の例示的なホスファターゼバリエーションの存在下で、T-ポリメラーゼコンジュゲートを使用して一本鎖DNA基質上での一塩基付加反応の毛細管電気泳動分析の結果のグラフ表示を示す：ウシ（*B. taurus*）（Quick CIP、NEB）、ホッコクアカエビ（*P. borealis*）（エビアルカリホスファターゼ、NEB）、南極バクテリア（*Antarctic bacterium*）TAB5（*Antarctic*ホスファターゼ、NEB）、または大腸菌（*E. coli*）（Takara Bio）ホスファターゼ。合成反応を室温（24℃）で行った。対照合成反応をホスファターゼなしで行った。示された時点で反応を終了した。x軸は、オリゴヌクレオチドの相対電気泳動（おおよそのヌクレオチド長による）を示し、y軸は、517nmでの相対蛍光を示す。

30

【図3A-2】図3A-1の説明を参照。

【0040】

【図3B】以下の例示的なホスファターゼバリエーションの存在下で、T-ポリメラーゼコンジュゲートを使用した一本鎖DNA基質への例示的な一塩基付加反応の毛細管電気泳動分析の結果のグラフ表示を示す。ウシ（Quick CIP、NEB）、ホッコクアカエビ（エビアルカリホスファターゼ、NEB）、南極バクテリアTAB5（*Antarctic*ホスファターゼ、NEB）、または大腸菌（Takara Bio）ホスファターゼ。合成反応を37℃（ホスファターゼあり及びなし）で行い、30分後に終了した。矢印は、+2付加の予想サイズを示す。

40

【0041】

【図4】SeqStudio Genetic Analyzerを使用して、x軸に沿ったサイズによって区別される得られた合成されたポリヌクレオチドを用いて、ホスファターゼの存在下または非存在下で実施される、例示的な50量体ポリヌクレオチドの例示

50

的なコンジュゲートベースのポリヌクレオチド合成の結果のグラフ表示を示す。スターターオリゴ及び正しい50量体合成生成物に対応するピークがラベル付けされる。

【発明を実施するための形態】

【0042】

詳細な説明

本開示の様々な実施形態の詳細は、以下の説明に述べられる。本開示の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、ならびに特許請求の範囲から明らかであろう。

【0043】

定義

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシド及び1つ以上のリン酸基を含む分子を指す。「ヌクレオシド」は、核酸塩基（例えば、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、またはウラシル）及び5炭素糖（例えば、リボースまたは2'-デオキシリボース）を含む分子を指す。例示的なヌクレオチドは、ヌクレオシド-リン酸塩、ヌクレオシドニリン酸塩、ヌクレオシド三リン酸塩、ヌクレオシド四リン酸塩、ヌクレオシド五リン酸塩、またはヌクレオシド六リン酸塩であり得るか、またはそれらを含むが、これらに限定されない。本明細書に提供されるように、TdT及びTdTバリエーションは、いくつかの実施形態では、核酸塩基への修飾を含むヌクレオチド類似体を含む任意のヌクレオシドポリホスフェートを組み込むことができる。

10

【0044】

本明細書で使用される場合、「非終結」または「挿入」は、2つ以上のヌクレオチドがサイクル的ヌクレオチド延長の単一のステップの間に付加されるときに生じる。これは、未切断の5'ホスフェートを有する遮蔽されていないヌクレオチドがオリゴヌクレオチドに付加されるときに生じ得る。

20

【0045】

本明細書で使用される場合、「ホスファターゼ」という用語は、ヌクレオチド、特に不適切に形成されたコンジュゲートの一部として遮蔽されていない、またはポリメラーゼにテザリングされていないヌクレオチドの5'ホスフェートを除去することができる酵素を指す。本明細書で使用される特定のホスファターゼ酵素を指さない場合、ホスファターゼはまた、全てのホスファターゼ酵素、ホスファターゼ活性を有する操作された酵素、またはヌクレオチドから1つ以上のホスフェート基（複数可）を除去することができるその機能的断片を含むことを意味する。ホスファターゼはまた、ホスファターゼ活性を有する操作された酵素またはその機能的断片を含む、ヌクレオチドから1つ以上のホスフェート基（複数可）を除去することができる任意の生体分子（例えば、ポリペプチドまたはリボザイム）を指すことができる。

30

【0046】

本明細書で使用される場合、「保護されたヌクレオチド」または「遮蔽されたヌクレオチド」という用語は、その5'ホスフェートを除去することができるホスファターゼからのテザリングされたポリメラーゼ（または例えばブロック基等の他の実体または成分）によって立体的に阻害されるヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、そのようなヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに付加された後、及び上記テザリングされたポリメラーゼの除去の前に、後続のヌクレオチド付加を阻害する可能性が高い。

40

【0047】

本明細書で使用される場合、「保護されていないヌクレオチド」または「遮蔽されていないヌクレオチド」という用語は、その5'ホスフェートを除去することができるホスファターゼからのテザリングされたポリメラーゼ（または例えばブロック基などの他の実体または成分）によって立体的に妨げられていないヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、遮蔽されていないヌクレオチドは、誤って折り畳まれたポリメラーゼなどのポリメラーゼにテザリングされてもよく、または誤った位置でテザリングされてもよい。遮蔽されていないヌクレオチドは、ポリメラーゼからテザリングされていなくてもよい（または遊離であってもよい）。ホスファターゼに曝露されていない遮蔽されていないヌクレオ

50

チドは、遮蔽されたヌクレオチドが適切に付加された後、挿入としてポリヌクレオチドに誤って付加される可能性がより高い。

【0048】

ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート及びポリヌクレオチド合成

とりわけ、本開示は、ポリメラーゼヌクレオチドコンジュゲートを提供する。当業者に理解されるように、高精度かつ正確なポリヌクレオチド合成に関連する様々な課題がある。例えば、とりわけ、ポリメラーゼは、ヌクレオチドの共有結合的付加を誤って触媒する可能性があり、これは、制御された段階的な核酸合成（例えば、挿入または非終結）でポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを使用するとき、1ステップ当たり2つ以上のヌクレオチドの付加をもたらし得る。そのようなコンジュゲートをホスファターゼと組み合わせること（例えば、ホスファターゼの存在下でポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを提供すること）を含む、本明細書で提供される技術は、そのような課題を克服する。これらの技術は、前述の合成アプローチ（例えば、ホスファターゼの非存在下で行われるもの）と比較してエラーを減らす、より高精度で精密な段階的付加を達成するのに役立つ。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、ホスファターゼの存在下で提供される。いくつかの実施形態では、本開示は、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬を提供し、ポリメラーゼ及びヌクレオチドは、リンカーを介して連結されている。いくつかの実施形態では、リンカーは切断可能である。

20

【0050】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート試薬は、ホスファターゼの存在下に存在する。

【0051】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、ホスファターゼの存在下でテンプレート（例えば、スタートオリゴまたは初期オリゴヌクレオチド）と組み合わせられる。

【0052】

ポリヌクレオチドを段階的に合成するための典型的なプロセスは、サイクル的なステップを介して、スターターオリゴ（すなわち、初期オリゴヌクレオチド）に個々のヌクレオチドを段階的に付加することを含む。例えば、いくつかの実施形態では、ステップは、オリゴヌクレオチドへのポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートの付加、ポリメラーゼによって触媒されるオリゴヌクレオチドの3'末端へのヌクレオチドの共有結合的付加、及び付加されたヌクレオチドからのポリメラーゼの切断を含む。これらのステップは、伸長されたポリヌクレオチドが、ステップが1回以上繰り返される前のポリヌクレオチドよりも1以上長いヌクレオチドを有するように、所望の伸長されたポリヌクレオチドが合成されるまで繰り返すことができる。

30

【0053】

とりわけ、本明細書に提供されるのは、核酸合成の方法である。いくつかの実施形態では、核酸合成の方法は、1つ以上のホスファターゼの存在下で、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート（例えば、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート）を含むコンジュゲート試薬を接触させる（例えば、インキュベートする）ステップを含む。いくつかの実施形態では、複数のヌクレオチドは、同じヌクレオチド（例えば、A、G、T、またはCなど）である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、異なるヌクレオチド（例えば、A、G、T、及び／またはCなど）である。そのようないくつかの実施形態では、ホスファターゼの存在下で行われる合成は、ホスファターゼの非存在下での同じ合成と比較して、1つ以上の点（例えば、より高精度で、より効率的に、より正確に）で改善される。

40

【0054】

いくつかの実施形態では、ホスファターゼの存在下で行われる合成は、遮蔽されてい

50

いヌクレオチドの核酸への付加を防止する。本明細書に提供される方法は、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させる（例えば、インキュベートする）ステップを含み、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを核酸合成に使用する場合（例えば、追加のヌクレオチド挿入につながる非終結）、ホスファターゼなしまたはホスファターゼによるコンジュゲート試薬の処理なしの合成と比較して、ステップ当たり2つ以上のヌクレオチドの付加をもたらすプロセスの割合が低減する。

【0055】

非終結

段階的核酸合成の各ステップにおいて精密に1つのヌクレオチド付加を達成することは、より長いオリゴヌクレオチドの正確な合成を生成するために不可欠である。これらの付加を確度及び精度を持って実施することは、業界では依然として課題となっている。例えば、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを使用した段階的な核酸合成は、挿入及び／または非終結の影響を受けやすく、その結果、サイクル的ヌクレオチド延長の単一のステップで核酸に2つ以上のヌクレオチドが付加され得る。

【0056】

遮蔽されていないヌクレオチドは、その5'ホスフェートでのホスファターゼ切断からのテザリングされたポリメラーゼによって立体的に妨げられていないか、部分的にしか立体的に妨げられていない。オリゴヌクレオチド合成中、ポリメラーゼは、遮蔽されていないヌクレオチドの共有結合的付加を誤って触媒する可能性があり、これは、核酸合成（例えば、挿入または非終結）において、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを使用する場合、ステップ当たり2つ以上のヌクレオチドの付加をもたらす得る。本明細書に提供される技術は、この課題を克服して、前述の合成アプローチと比較してエラーを低減して、正確かつ精度高い段階的付加を達成するのに役立つ。

【0057】

いくつかの実施形態では、非切断5'ホスフェートを有する遮蔽されていないヌクレオチドがオリゴヌクレオチドに付加されるときに、非終結が生じ得る。本明細書に提供されるように、いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、ヌクレオチド（例えば、ヌクレオチドトリホスフェート等の）の5'ホスフェート（例えば、末端5'ホスフェート）を加水分解する。いくつかの実施形態では、末端5'ホスフェートは、ヌクレオチドの α ホスフェート、 β ホスフェート、 χ ホスフェート、 δ ホスフェート、 ε ホスフェート、 ϕ ホスフェート、または γ ホスフェートであり得る。本明細書に提供されるように、いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートのヌクレオチドまたは遊離ヌクレオチドの5'ホスフェート（例えば、末端5'ホスフェート）を加水分解する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるホスファターゼは、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートのヌクレオチドの5'ホスフェート、例えば、ヌクレオチドの1つ以上の5'末端ホスフェート（複数可）を加水分解し、オリゴヌクレオチド合成中に加水分解されたヌクレオチドが核酸に付加されるのを防止する。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートの遮蔽されていないヌクレオチドの5'ホスフェートを加水分解する。そのようないくつかの実施形態では、5'ホスフェートの加水分解は、オリゴヌクレオチド合成中に遮蔽されていないヌクレオチドが核酸に付加されるのを防止する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるホスファターゼは、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中の、遮蔽されていないヌクレオチドの1つ以上の5'ホスフェート（複数可）を加水分解し、オリゴヌクレオチド合成中の上記遮蔽されていないヌクレオチドが核酸に付加されるのを防止する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるホスファターゼは、1つ以上のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含む組成物中の1つ以上の遊離ヌクレオチドの1つ以上の5'ホスフェート（複数可）を加水分解し、オリゴヌクレオチド合成中に遊離ヌクレオチドが核酸に付加されるのを防止する。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、1つ以上のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含む組成物中

10

20

30

40

50

に存在する1つ以上の遊離ヌクレオチドの5'ホスフェートを加水分解する。そのようないくつかの実施形態では、5'ホスフェートの加水分解は、オリゴヌクレオチド合成中に1つ以上の遊離ヌクレオチドが核酸に付加されるのを防止する。

【0058】

遮蔽されていないヌクレオチド

コンジュゲート試薬中の遮蔽されていないヌクレオチドの存在は、オリゴヌクレオチド合成における非終結（すなわち、挿入）をもたらし得る。いくつかの実施形態では、遮蔽されていないヌクレオチドは、核酸合成中にオリゴヌクレオチドに付加された後、後続のヌクレオチド付加を阻害する可能性が低い。

【0059】

いくつかの実施形態では、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のヌクレオチドの画分は、ポリメラーゼによって遮蔽されない。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、遮蔽されていないヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のポリメラーゼ分子は、テザリングされたヌクレオチドの5'ホスフェートへのホスファターゼのアクセスを立体的に妨げない。いくつかの実施形態では、テザリングされたヌクレオチドは、遮蔽されていないヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中の遮蔽されていないヌクレオチドは、その5'ホスフェートを除去することができるホスファターゼからのテザリングされたポリメラーゼによって立体的に妨げられない。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のヌクレオチドの5'ホスフェート（例えば、末端5'ホスフェート）を除去することは、核酸合成中にヌクレオチドが核酸に付加されるのを防止する。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中の遮蔽されていないヌクレオチドの5'ホスフェート（例えば、末端5'ホスフェート）を加水分解する。そのようないくつかの実施形態では、例えば、5'末端ホスフェートが連続的に、すなわち、第1のヌクレオチドから、次いで第2のヌクレオチド等から除去されるなど、2つ以上の5'末端ホスフェートが除去される。したがって、いくつかのそのような実施形態では、1つ以上の5'末端リン酸塩は除去され得るが、所与のヌクレオチドにおいては、単一の5'末端ホスフェートが存在し、除去され、その時点で異なるホスフェートは、少なくとも1つの5'末端ホスフェートを有するヌクレオチドの5'末端ホスフェートになる。

【0060】

いくつかの実施形態では、遮蔽されていないヌクレオチドは、不適切に形成されたコンジュゲートの一部である。いくつかの実施形態では、不適切に形成されたコンジュゲートは、誤って折り畳まれたポリメラーゼ、ヌクレオチドが間違った位置に付着しているポリメラーゼ、及び／または複数のヌクレオチドが付着しているポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、不安定性または不完全な精製のゆえに、ポリメラーゼから遊離またはテザリングしていない。いくつかの実施形態では、遊離またはテザリングされていないヌクレオチドは、遮蔽されていないヌクレオチドである。

【0061】

遮蔽されていないヌクレオチドの例

ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートにおけるヌクレオチドの遮蔽の欠如は、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートの調製中または付加反応自体中のいくつかのプロセスに起因して生じ得る。ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含む組成物中のポリメラーゼに結合していないヌクレオチドは、遮蔽されていないヌクレオチドとみなされる。遮蔽されていないヌクレオチドを含むポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートをもたらすプロセスの非限定的な例としては、ヌクレオチドとポリメラーゼとの間のリンカーの自発的な切断（例えば、図1A～1Dのリンカーを参照）、折り畳まれていないポリメラーゼ（例えば、図1Bを参照）、誤った位置に結合したヌクレオチドを有するポリメラーゼ（例えば、図1Aを参照）、複数の結合したヌクレオチドを含むポリメラーゼ（すなわち、単一のポリメラーゼ上に）、または非拘束の遊離ヌクレオチド（例えば

、図 1 C を参照) が挙げられる。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドとポリメラーゼとの間のリンカーの自発的な切断は、不安定性のゆえに発生し得、その結果、コンジュゲート試薬中に遊離ヌクレオチドが生じる。

【 0 0 6 2 】

遮蔽されたヌクレオチド

いくつかの実施形態では、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のヌクレオチドの画分は、ポリメラーゼによって遮蔽される。遮蔽されたヌクレオチドの非限定的な例としては、正しく折り畳まれたポリメラーゼの触媒部位にテザリングされているヌクレオチドが挙げられる (例えば、図 1 D の例示的な概略図を参照されたい)。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、遮蔽されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート内のポリメラーゼ分子は、テザリングされたヌクレオチドの 5' ホスフェート (例えば、5' 末端ホスフェート) へのホスファターゼのアクセスを立体的に妨げる。いくつかの実施形態では、5' ホスフェート (例えば、5' 末端ホスフェート) は、例えば、 α -ホスフェート、 β -ホスフェート、 χ -ホスフェート、 δ -ホスフェート、 ε -ホスフェート、 ϕ -ホスフェート、または γ -ホスフェートであり得る。いくつかの実施形態では、テザリングされたヌクレオチドは、遮蔽されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中の遮蔽されたヌクレオチドは、その 5' ホスフェートを除去することができるホスファターゼからのテザリングされたポリメラーゼによって立体的に妨げられる。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中の遮蔽されたヌクレオチドの 5' ホスフェート (例えば、5' 末端ホスフェート) を加水分解することができない。

10

20

【 0 0 6 3 】

ホスファターゼ

ホスファターゼは、典型的には、水を使用して、リン酸モノエステルをリン酸イオン及びアルコールに切断する。ホスファターゼ酵素は、その基質の加水分解を触媒する。

【 0 0 6 4 】

ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のヌクレオチドの 5' ホスフェートは、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチドへのヌクレオチドの付加に必要である。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のヌクレオチドの 5' ホスフェートの除去は、オリゴヌクレオチド合成中にヌクレオチドが核酸に付加されることを防止する。

30

【 0 0 6 5 】

本明細書に開示されるのは、ホスファターゼをコンジュゲート試薬に追加して、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のヌクレオチドの 5' ホスフェート基を加水分解することを含む方法である。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中の遮蔽されていないヌクレオチドからホスフェート部分を除去する。いくつかの実施形態では、方法は、遮蔽されていないヌクレオチドの 5' ホスフェート基をポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートに加水分解することができるホスファターゼを付加することを含む。

40

【 0 0 6 6 】

ホスファターゼの種類

本明細書に記載の方法のための任意の好適なホスファターゼ、ホスファターゼ活性を有する操作された酵素、またはその機能的断片は、本開示によって企図される。いくつかの実施形態では、ホスファターゼはヌクレオチダーゼである。ホスファターゼ活性を有する酵素は、酵素クラス E. C 3. 1. 3. -、エステル結合に作用するヒドロラーゼ、例えば、リン酸モノエステルヒドロラーゼに含まれる。しかしながら、好適なホスファターゼ活性 (アピラーゼ等) を有する酵素は、他の酵素クラスに見出され得る。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、任意選択により、無機リン酸基質、例えば、ピロリン酸を加水分解することが可能であってもよい。

50

【0067】

いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、固体支持体に固定化される。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、検出可能な標識を含む。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、組換えポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、野生型ホスファターゼである。いくつかの実施形態では、野生型ホスファターゼは、それが天然に発現される生物から単離される。

【0068】

アルカリホスファターゼ（ALP、ALKP、ALPase、Alk Phos）、または塩基性ホスファターゼは、リン酸モノエステルの加水分解を触媒する血漿膜結合糖タンパク質であり、アルカリ性pH環境で最適に活性である。アルカリホスファターゼは、86キロダルトンのホモ二量体タンパク質酵素である。各単量体は、5つのシステイン残基、2つの亜鉛原子、及びその触媒機能に不可欠な1つのマグネシウム原子を含有する。

10

【0069】

アルカリホスファターゼの非限定的な例としては、ウシ（Quick仔牛腸アルカリホスファターゼ、またはCIP、NEB）、ホッコクアカエビ（Pandalus borealis）（エビアルカリホスファターゼ、NEB）、南極バクテリアTAB5（Antarcticホスファターゼ、NEB）、及び大腸菌（Takara Bio）ホスファターゼが含まれる。アルカリホスファターゼの追加の非限定的な例としては、胎盤アルカリホスファターゼ（PLAP）及びヒト腸アルカリホスファターゼが挙げられる。

20

【0070】

非アルカリホスファターゼは、酸ホスファターゼであり得る。非アルカリホスファターゼの非限定的な例は、酒石酸耐性酸ホスファターゼである。

【0071】

本明細書に記載の方法で使用されるホスファターゼをコードする例示的なアミノ酸配列を、表1に示すが、これらに限定されない。

【0072】

（表1）例示的なアルカリホスファターゼ配列

30

40

50

ホスファターゼ	アミノ酸配列	配列番号
アルカリホスファターゼ (大腸菌)	MKQSTIALALLPLLFTPVTKARTPEMPVLENRAAQGDITA PGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEI TAARNYAEGAGGFFKGIDALPLTGQYTHYALNKKTGKP DYVTDSAASATAWSTGVKTYNGALGVDIHEKDHPTILE MAKAAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSRKCYGPS ATSEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNARADVTLGGGAKTF AETATAGEWQGKTLREQAQARGYQLVSDAASLNSVTEA NQQKPLLGLFADGNMPVRWLGPATYHGNIDKPAVTCT PNPQRNDSVPTLAQMTDKAIELLSKNEKGFFLQVEGASID KQDHAANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIV TADHAHASQIVAPDTKAPGLTQALNTKDGAVMVMSYG NSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTM KAALGLK	2
アルカリホスファターゼ-アイソザイム1 (大腸菌)	RTPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLS DKPAKNIILLIGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKGIDAL PLTGQYTHYALNKKTGKPDYVTDSAASATAWSTGVKTY NGALGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELQDAT PAALVAHVTSRKCYGPSATSEKCPGNALEKGGKGSITEQ LLNARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAQAR GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVRWL GPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIEL LSKNEKGFFLQVEGASIDKQDHAANPCGQIGETVDLDEA VQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTKAPGLT QALNTKDGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPH AANVVGLTDQTDLFYTMKAALGLK	3

10

20

30

40

50

アルカリホ スファター ゼ-アイソ ザイム 2 (大腸菌)	TPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPA KNIILLIGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKGIDALPLTGQYTH YALNKKTGKPDYVTDASAASATAWSTGVKTYNGALGVDIHEK DHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSRKC GPSATSEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNARADVTLGGGAKTFA ETATAGEWQGKTLREQAQARGYQLVSDAASLNSVTEANQQK PLLGLFADGNMPVRWLGPATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDS VPTLAQMTDKAIELLSKNEKGFFLQVEGASIDKQDHAANPCG QIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIVAPD TKAPGLTQALNTKDGAVMVMSYGNSEEDSSEHTGSQLRIAAY GPHAANVVGLTDQTDLFYTMKAALGLK	4
アルカリホ スファター ゼ (ウシ)	MQGACVLLLLGLWLQLSLAFIPVEEEDPAFWNRQAAQALDVA KKLQPIQKAANKVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNDKLG ETPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGN YRTIGVSAARAQYVNCNTTRGNEVTSVMNRKAKAGKSVGVVT TTRVQHASPAGAYAHTVNRDWYSDADLPADAQTYGCQDIAT QLVNNMDIDVILGGGRKYMFPDPEYPHDASVNGVRKDK RNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDSSVTHLMGLFEP ADMKYNVQQDPTKDPTLEEMTEAALQVLSRNPQGFYLFVEG GRIDHGHDSKAYMALTEAVMFDNAIAKANELTSELDTLILVT ADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKASDKKSYTSILYGNGPGY VLGGGSRPDVNDSEDPSYRQQAAPVLSSETHGGEDVAVFAR GPQAHLVHGVQEETFVAHVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSGLS AAHLAASAPSLALLAGAMLLLLAPALY	5
アルカリホ スファター ゼ (ホッコク アカエビ)	KAYWNKDAQDALDKQLGKIKLREKQAKNVIFFLGDGMSLSTVT AARIYKGGLTGKFEREKISWEEFDFAALSKTYNTDKQVTD SATAYLTVGKTNQGVIGLDANTVRTNCSYQLDESLFTYSIAHW FQEAGRSTGVVTSTRVTHATPAGTYAHVADRDWENDSDVH DREDPEICDDIAEQLVFREPGKNFKVIMGGGRRGFFPEEALDIE DGIPGEREDGKHLITDWLDDKASQGATASYVWNRDDLAVDI RNTDYLMLGFSYTHLDTVLTRDAEMDPTLPMTKVAIEMLT DENGFFLLVEGGRIDHMHANQIRQSLAETLDMEEAVSMALS MTDPEETIILVTADHGHTLTITGYADRNTDILDFAGISDLDDR YTILDYGSPPGYHITEDGKRYEPTEDLDKINFRYASAAPKHSV THDGTDVGIWVNGPFAHLFTGVYEENYIPHALAYAACVGTGR TFCDEK	6

10

20

30

40

50

腸型アルカリホスファターゼ (ヒト (H.sapiens))	VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLG DGLGVPTVTATRILKGQKNGKLGPEPLAMDRFPYLALSKT YNVDRQVPDSAATATAYLCGVKANFQTIGLSAAARFNQCN TTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAH TVNRNWYSDADMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGG RKYMFPMPGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQG AWYVWNRTELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPT LDPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVA YQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSHVFSFG GYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNGPGYVFNSGVRP DVNESESGSPDYQQQAAVPLSSETHGGEDVAVFARGPQ AHL VHGVQE QSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD	7
--------------------------------------	---	---

10

【0073】

ポリヌクレオチド合成

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを合成する方法は、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを核酸と接触させること（例えば、インキュベートすること）を含み、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートのポリメラーゼは、そのテザリングされたヌクレオチドを使用して核酸を延長する。

20

【0074】

上記のように、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させる（例えば、インキュベートする）ステップを含む核酸合成の方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることは、サイクル的延長反応の前または間に行われる。いくつかの実施形態では、核酸合成の段階的方法におけるホスファターゼの存在は、1ステップ当たり2つ以上のヌクレオチドの付加につながる非終結及びプロセスを低減する。いくつかの実施形態では、ホスファターゼで処理された（例えば、インキュベートされた）コンジュゲート試薬の使用は、未処理のコンジュゲート試薬と比較して、コンジュゲート試薬が核酸合成の段階的方法で

30

【0075】

ホスファターゼの付加または除去のタイミング

ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、ホスファターゼとともに保存され、系内に残ってもよく（DNA延長反応中にも）、またはホスファターゼは、コンジュゲートがDNAに付加される前の特定のインキュベーション期間、及びDNA付加反応の開始時に除去されてもよい。

【0076】

いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬とともにインキュベートされる。いくつかの実施形態では、コンジュゲート試薬とホスファターゼとのインキュベーションは、試料をコンジュゲート試薬と接触させる前に行われる。いくつかの実施形態では、試料をコンジュゲート試薬と接触させる前に、ホスファターゼはコンジュゲート試薬から除去される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート試薬のホスファターゼとのインキュベーションは、試料をコンジュゲート試薬と接触させた後に行われる。

40

【0077】

ホスファターゼ濃度

ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート（例えば、コンジュゲート試薬）と接触ま

50

たはインキュベートされるホスファターゼの濃度は、例えば、コンジュゲート濃度、ホスファターゼ活性の単位、モル濃度、または mg/mL に対して増加するホスファターゼ対コンジュゲートの倍率増加の化学量論的比率で表すことができる。

【0078】

任意の好適なコンジュゲート対ホスファターゼの化学量論的比率を、本明細書に記載される方法において使用することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲート対ホスファターゼの化学量論的比は、約1:1～約1:500である。いくつかの実施形態では、コンジュゲート対ホスファターゼの化学量論的比率は、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:10、約1:15、約1:20、約1:25、約1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:55、約1:60、約1:65、約1:70、約1:75、約1:80、約1:85、約1:90、約1:95、約1:100、約1:105、約1:110、約1:115、約1:120、約1:125、約1:130、約1:135、約1:140、約1:145、約1:150、約1:155、約1:160、約1:165、約1:170、約1:175、約1:180、約1:185、約1:190、約1:195、約1:200、約1:225、約1:250、約1:275、約1:300、約1:325、約1:350、約1:375、約1:400、約1:425、約1:450、約1:475、または約500である。

10

【0079】

任意の好適なホスファターゼ対コンジュゲートの化学量論的比率を、本明細書に記載される方法において使用することができる。いくつかの実施形態では、ホスファターゼ対コンジュゲートの化学量論比は、約1:1～約1:500である。いくつかの実施形態では、コンジュゲート対ホスファターゼの化学量論的比率は、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:10、約1:15、約1:20、約1:25、約1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:55、約1:60、約1:65、約1:70、約1:75、約1:80、約1:85、約1:90、約1:95、約1:100、約1:105、約1:110、約1:115、約1:120、約1:125、約1:130、約1:135、約1:140、約1:145、約1:150、約1:155、約1:160、約1:165、約1:170、約1:175、約1:180、約1:185、約1:190、約1:195、約1:200、約1:225、約1:250、約1:275、約1:300、約1:325、約1:350、約1:375、約1:400、約1:425、約1:450、約1:475、または約500である。

20

30

【0080】

任意の好適なホスファターゼ濃度を、本明細書に記載の方法で使用することができる。いくつかの実施形態では、ホスファターゼ濃度は、約0.01 mg/mL ～約10.5 mg/mL である。いくつかの実施形態では、ホスファターゼ濃度は、約0.1 mg/mL 、約0.15 mg/mL 、約0.25 mg/mL 、約0.5 mg/mL 、約0.75 mg/mL 、約1 mg/mL 、約1.25 mg/mL 、約1.5 mg/mL 、約1.75 mg/mL 、約2 mg/mL 、約2.25 mg/mL 、約2.5 mg/mL 、約2.75 mg/mL 、約3、約3.25 mg/mL 、約3.5 mg/mL 、約3.75 mg/mL 、約4 mg/mL 、約4.25 mg/mL 、約4.5 mg/mL 、約4.75 mg/mL 、約5、約5.25 mg/mL 、約5.5 mg/mL 、約5.75 mg/mL 、約6 mg/mL 、約6.25 mg/mL 、約6.5 mg/mL 、約6.75 mg/mL 、約7、約7.25 mg/mL 、約7.5 mg/mL 、約7.75 mg/mL 、約8 mg/mL 、約8.25 mg/mL 、約8.5 mg/mL 、約8.75 mg/mL 、約9、約9.25 mg/mL 、または約9.5 mg/mL 、約9.75 mg/mL 、約10 mg/mL 、約10.25 mg または約10.5 mg/mL である。

40

【0081】

コンジュゲートに対するホスファターゼの任意の好適な倍率増加は、本明細書に記載される方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、コンジュゲートに対するホスファターゼの倍率増加は、約2倍から約500倍までである。いくつかの実施形態では、コンジ

50

ユゲートに対するホスファターゼの倍率増加は、約 2 倍、約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 35 倍、約 40 倍、約 45 倍、または約 50 倍、約 55 倍、約 60 倍、約 65 倍、約 70 倍、約 75 倍、約 80 倍、約 85 倍、約 90 倍、約 95 倍、約 100 倍、約 105 倍、約 110 倍、約 115 倍、約 120 倍、約 125 倍、約 130 倍、約 135 倍、約 140 倍、約 145 倍、または約 150 倍、約 155 倍、約 160 倍、約 165 倍、約 170 倍、約 175 倍、約 180 倍、約 185 倍、約 190 倍、約 195 倍、約 200 倍、約 225 倍、約 250 倍、約 275 倍、約 300 倍、約 325 倍、または約 350 倍、約 375 倍、約 400 倍、約 425 倍、約 450 倍、約 475 倍、または約 500 倍である。

【0082】

ホスファターゼに対するコンジュゲートの任意の好適な倍率増加は、本明細書に記載される方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、ホスファターゼに対するコンジュゲートの倍率増加は約 2 倍～約 500 倍である。いくつかの実施形態では、ホスファターゼに対するコンジュゲートの倍率増加は約 2 倍、約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 35 倍、約 40 倍、約 45 倍、または約 50 倍、約 55 倍、約 60 倍、約 65 倍、約 70 倍、約 75 倍、約 80 倍、約 85 倍、約 90 倍、約 95 倍、約 100 倍、約 105 倍、約 110 倍、約 115 倍、約 120 倍、約 125 倍、約 130 倍、約 135 倍、約 140 倍、約 145 倍、または約 150 倍、約 155 倍、約 160 倍、約 165 倍、約 170 倍、約 175 倍、約 180 倍、約 185 倍、約 190 倍、約 195 倍、約 200 倍、約 225 倍、約 250 倍、約 275 倍、約 300 倍、約 325 倍、または約 350 倍、約 375 倍、約 400 倍、約 425 倍、約 450 倍、約 475 倍、または約 500 倍である。

【0083】

任意の好適な濃度のホスファターゼを本明細書に記載の方法で使用するすることができる。いくつかの実施形態では、ホスファターゼの濃度は約 0.5 μM ～約 500 μM である。いくつかの実施形態では、ホスファターゼの濃度は、約 0.5 μM 、約 1 μM 、約 2 μM 、約 5 μM 、約 10 μM 、約 15 μM 、約 20 μM 、約 25 μM 、約 30 μM 、約 35 μM 、約 40 μM 、約 45 μM 、約 50 μM 、約 55 μM 、約 60 μM 、約 65 μM 、約 70 μM 、約 80 μM 、約 85 μM 、約 90 μM 、約 95 μM 、約 100 μM 、約 105 μM 、約 110 μM 、約 115 μM 、約 120 μM 、約 125 μM 、約 130 μM 、約 135 μM 、約 140 μM 、約 145 μM 、約 150 μM 、約 155 μM 、約 160 μM 、約 165 μM 、約 170 μM 、約 180 μM 、約 185 μM 、約 190 μM 、約 195 μM 、約 200 μM 、約 225 μM 、約 250 μM 、約 275 μM 、約 300 μM 、約 325 μM 、約 350 μM 、約 375 μM 、約 400 μM 、約 425 μM 、約 450 μM 、約 475 μM 、または約 500 μM である。

【0084】

非終結の割合

いくつかの実施形態では、核酸合成の段階的方法におけるホスファターゼの存在は、1 ステップ当たり 2 つ以上のヌクレオチドの付加につながる非終結及びプロセスを低減する。本明細書に記載の方法で生成されるポリヌクレオチドまたは核酸は、非終結事象が発生した場合、挿入を含むと言われる。いくつかの実施形態では、ホスファターゼの存在下での核酸合成は、ホスファターゼの非存在下での核酸合成と比較して、非終結の割合を約 50 %～約 100 % 低減させる。いくつかの実施形態では、非終結の割合は、ホスファターゼの非存在下での核酸合成と比較して、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、または約 100 % 低減する。いくつかの実施形態では、ホスファターゼの存在下で生成される挿入を伴う核酸合成生成物の総量は、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、約 1 % 未満、約 0.5 % 未満、約 0.1 % 未満、約 0.05 % 未満、または約 0.01 % 未満である。いくつかの実施形態では、ホスファターゼの存在下で生成された核酸合成産物には、挿入を伴う核酸合成産物は存在しない。

【0085】

最終生成物

いくつかの実施形態では、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることを含む、所定の配列を含むポリヌクレオチドを合成する方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、接触することは、コンジュゲート試薬をホスファターゼとインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、所定の配列を含むポリヌクレオチド生成物の不均一な集団を生成する。所定の配列を含むポリヌクレオチド生成物の不均一な集団は、「最終生成物」と称され得る。

【0086】

いくつかの実施形態では、複数のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを含むコンジュゲート試薬をホスファターゼと接触させることは、ヌクレオチドの挿入（すなわち、非終結）を防止し、その結果、これらの挿入が所定の配列には存在しない。いくつかの実施形態では、最終生成物は核酸を含み、その割合は標的配列を含み、その割合は標的配列を含まない。いくつかの実施形態では、最終生成物は、所定の配列ではない（すなわち、「標的」配列ではない）である配列を含むポリヌクレオチドと比較して、約99%未満、約95%未満、約90%未満、約85%未満、約80%未満、約75%未満、約70%未満、約65%未満、約60%未満、約55%未満、約50%未満、約45%未満、約40%未満、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、約0.1%未満、約0.05%未満、または約0.01%未満を含む。いくつかの実施形態では、最終生成物は、所定の（「標的」）配列ではない配列を含むポリヌクレオチドを実質的に存在しない。

【0087】

最終製品の解析

当該技術分野で知られる任意の好適な方法を使用して、最終生成物を分析することができる。最終生成物は、延長反応の開始後いつでも核酸合成生成物を分析することによって評価することができる（例えば、反応時間経過）。分析は、例えば、以前に実証されたように、毛細血管電気泳動（CE）によって行うことができる（Smith and Nelson, Curr Protoc Nucleic Acid Chem. Chapter 10: Unit 10.9, 2003; Durney et al. Anal Bioanal Chem. 407: 6923-6938, 2015）。CEは、単一ヌクレオチド分解能を有するポリヌクレオチド生成物の存在量を分離し、報告することができる。本明細書に提供される核酸合成の方法によって生成される各核酸産物の相対的存在量は、CEによって分析することができる。出発物質（すなわち、ヌクレオチドが組み込まれている初期のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド）及び延長生成物の存在量を比較することによって、延長反応が完了する程度を決定することが可能である。出発物質及び延長種の経時的な変化は、本明細書に記載されるように、回転率を示す。転換率を決定するためのこのアプローチは、以前に実証されている（Palluk et al. Nat Biotech. 36(7): 645-650, 2018）。代替的に、核酸合成産物の分析は、前述の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を使用して行うことができる（Jensen and Davis, Biochemistry. 57(12): 1821-1832, 2018）。

【0088】

CE及びRP-HPLCは、それぞれ、CE及びRP-HPLCの電気泳動図及びクロマトグラムにおけるピークの曲線下面積を決定することによって、核酸合成産物中の各種の純度を決定するためにも使用され得る。電気泳動図及びクロマトグラムに曲線を適合させ、曲線下面積（AUC）を計算するのに適した任意の好適なソフトウェアパッケージを使用して、複数のヌクレオチド生成物中の各ポリヌクレオチド生成物の存在量を決定し得る。

【0089】

任意の好適なポリヌクレオチド配列決定方法を、分析（例えば、ポリヌクレオチド生成物、例えば、中間生成物、例えば、最終生成物等の配列の分析）に使用することができる。例えば、シーケンシング方法は、ロングリードシーケンシング、次世代シーケンシング、ショートリードシーケンシング、ショットガンシーケンシング、サンガーシーケンシング、高スループットシーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、及び／または質量分析によるシーケンシングであり得る。配列決定は、最終生成物中の所定の配列を同定するのに好適であり得る。配列決定は、事前に定義された配列ではない最終生成物中の配列の割合を決定するのに好適であり得る。

10

【0090】

最終生成物のサイズの分析のための当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、最終生成物の純度を判定することができる。例えば、ゲル電気泳動及び／または質量分析を使用して、最終生成物の純度を決定することができる。

【0091】

コンジュゲート

本明細書に開示されるのは、ポリメラーゼに結合したヌクレオチドを含むコンジュゲートを含む組成物であり、組成物中の全ヌクレオチドと比較して、組成物の連結したポリメラーゼによって遮蔽されたヌクレオチドの純度は、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、または約99.9%遮蔽されたヌクレオチドよりも大きい。いくつかの実施形態では、連結されたポリメラーゼによって遮蔽されたヌクレオチドの純度は、実質的に不純物を含まない。

20

【0092】

本明細書中に提供されるのは、コンジュゲートを使用した核酸合成の方法であり、コンジュゲートは、ポリメラーゼ及びヌクレオチドを含み、ポリメラーゼ及びヌクレオチドは、リンカーを介して連結される。いくつかの実施形態では、リンカーは、選択的に切断可能な結合を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。リンカーは、ヌクレオチド（例えば、野生型ヌクレオチド、例えば、野生型ヌクレオチドに対して1つ以上の修飾を含む修飾ヌクレオチドなど）の塩基、糖、またはリン酸に結合することができる。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体である。コンジュゲートのポリメラーゼ部分は、その連結したヌクレオチドを付加することによって核酸を伸長することができ（すなわち、ポリメラーゼは、それが核酸の3'末端に連結しているヌクレオチドの付着を触媒することができる）、リンカーが切断されるまで、リンカーを介して伸長された核酸に付着したままである。

30

【0093】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ及びヌクレオチドは共有結合的に連結しており、ヌクレオチドの結合原子とそれが結合するポリメラーゼとの間の距離は、例えば、約4~100 Å、約15~40 Å、または約20~30 Åの範囲、またはヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体がテザリングされているTdTBリアント上の位置に適切な距離であり得る。

40

【0094】

ポリメラーゼ及びヌクレオチドを含むコンジュゲートを核酸とインキュベートすると、（別のコンジュゲート分子のヌクレオチドを使用するのとは対照的に）そのテザリングされたヌクレオチドを使用して核酸を優先的に伸長させる。

【0095】

リンカーヌクレオチド結合

いくつかの実施形態では、本開示のリンカーは、ピリミジンの「5」位または7-デアザプリンの「7」位に結合される。他の実施形態では、リンカーは、核酸塩基の環外アミンに、例えば、以下で論じられるように、シトシンの環外アミンをニトロベンジル部分でN-アルキル化することによって結合されてもよい。リンカーは、当業者には明白である

50

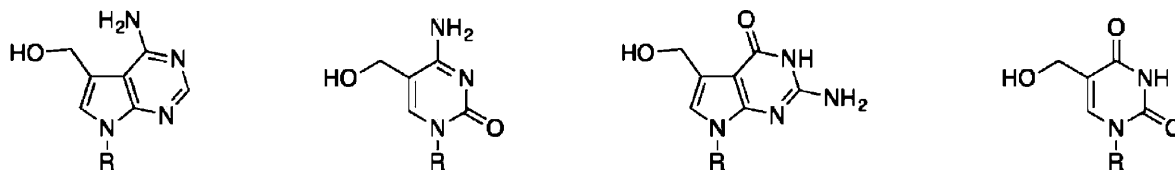
うように、ヌクレオチドのホスフェート、糖、または塩基等のコンジュゲートを形成するために、ヌクレオチドの任意の好適な原子に結合されてもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドの3'末端への付加後にポリメラーゼがヌクレオチドに結合したままであるように、ヌクレオチドの α -ホスフェート、糖、または塩基に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヌクレオチドの β ホスフェート、 χ ホスフェート、 δ ホスフェート、 ε ホスフェート、 ϕ ホスフェート、または γ ホスフェートに結合している。いくつかの実施形態では、リンカーはヌクレオチドの末端ホスフェートに結合している。

【0096】

特定のポリメラーゼは、ヌクレオチドの特定の部分の修飾に対する高い耐容性を有し、例えば、ピリミジンの5位及びプリン7位の修飾は、いくつかのポリメラーゼによって十分に耐容される (He and Seela, *Nucleic Acids Research* 30.24 (2002): 5485-5496.; または Hot tin et al., *Chemistry*. 2017 Feb 10; 23 (9): 2109-2118) を参照されたい。いくつかの実施形態では、リンカーはこれらの位置に結合される。

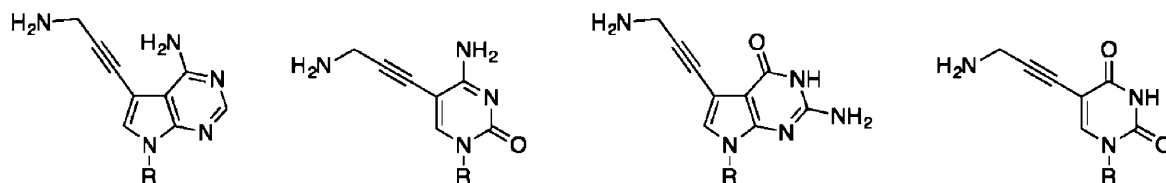
【0097】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、最初に、リンカー及びヌクレオチドを含む中間化合物 (本明細書において「リンカー-ヌクレオチド」と称される) を合成することによって調製され、次いで、中間化合物は、ポリメラーゼに結合される。非限定的な例として、いくつかの実施形態では、天然のヌクレオシドと比較した置換を有するヌクレオシド、例えば、5-ヒドロキシメチルまたは5-プロパルギルアミノ置換基を有するピリミジン、または7-デアザプリン (7-ヒドロキシメチルまたは7-プロパルギルアミノ置換基を有する) は、リンカー-ヌクレオチドを調製するための有用な出発物質であり得る。リンカー-ヌクレオチドの調製に有用であり得る5-及び7-ヒドロキシメチル置換基を有するヌクレオシドの例示的なセットを以下に示す。



【0098】

リンカー-ヌクレオチドの調製に有用であり得る5-及び7-デアザ-7-プロパルギルアミノ置換基を有するヌクレオシドの例示的なセットを以下に示す。



【0099】

これらのヌクレオシドはまた、デオキシリボヌクレオシド三リン酸塩として市販されている。

【0100】

いくつかの実施形態では、（例えば、中間化合物を含む）調製方法であって、コンジュゲートは、リンカーヌクレオチドを含む。任意の好適なヌクレオチドを使用してもよい。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、ヌクレオチドポリホスフェートまたは修飾ヌクレオチドポリホスフェートを含む。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、ヌクレオチド三リン酸塩または修飾ヌクレオチド三リン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、ヌクレオチド四リン酸または修飾ヌクレオチド四リン酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、ヌクレオチド五リン酸または修飾ヌクレオチド五リン酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、ヌクレオチド六リン酸または修飾ヌクレオチド六リン酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含む。いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、O-またはN-結合修飾を含む。いくつかの実施形態では、OまたはN結合修飾は、リンカーヌクレオチドのヌクレオチド部分をポリヌクレオチドに組み込んだ後に除去可能である。いくつかの実施形態では、O-またはN-結合修飾は、光分解プロセスによって除去可能である。いくつかの実施形態では、光分解プロセスは、UV光への曝露を含み、UV光は365nm及び／または405nmの波長を含む。いくつかの実施形態では、O-またはN-結合修飾は、化学プロセスによって除去可能である。いくつかの実施形態では、化学プロセスは、ベータ除去反応、Pd触媒脱アリル化、及び還元反応から選択される。いくつかの実施形態では、O-またはN-結合修飾は、酵素プロセスによって除去可能である。いくつかの実施形態では、酵素プロセスは、アルキルトランスフェラーゼまたはメチルトランスフェラーゼによる除去を含む。

10

20

【0101】

いくつかの実施形態では、O-またはN-結合修飾は、修飾核酸塩基を含むポリヌクレオチドにおけるWatson-Crick塩基対合を低減または除去する。いくつかの実施形態では、O-またはN-結合修飾は、修飾核酸塩基を含むポリヌクレオチドにおける二次構造を低減または除去する。方法のいくつかの実施形態では、OまたはN結合修飾の除去後、修飾核酸塩基は、天然核酸塩基を含む。いくつかの実施形態では、天然核酸塩基は、グアニン、シトシン、アデニン、チミン、またはウラシルである。

30

【0102】

リンカーポリメラーゼ結合

本明細書に提供されるコンジュゲートは、リンカーを介してヌクレオチドにテザリングされたポリメラーゼを含む。

【0103】

ヌクレオチドをポリメラーゼにテザリングするための任意の好適なリンカーは、本明細書に記載される方法で使用されることが企図される。いくつかの実施形態では、リンカーは、スルフヒドリル特異的結合化学を使用してポリメラーゼのシステイン残基に特異的に結合する。例示的なスルフヒドリル特異的付着化学には、限定されないが、オルト-ピリジルジスルフィド（OPSS）、マレイミド官能基、3-アリールプロピオロニトリル官能基、アレナミド官能基、ヨードアセチルまたはブロモアセチルなどのハロアセチル官能基、特定のアミノ酸配列に囲まれたスルフヒドリルと好ましく反応することができるアルキルハライドまたはペルフルオロアリール基が含まれる（Zhang, Chi, et al. Nature chemistry 8, (2015) 120-128.）。システイン残基の特異的標識のための他の結合化学は、当業者には明白であるか、または関連する文献及びテキスト（例えば、Kim, Younggyu, et al, Bioconjugate chemistry 19.3 (2008): 786-791.）に記述されている。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、リンカーは、アミン反応性官能基（例えば、NHSエステル、スルホ-NHSエステル、テトラまたはペンタフルオロフェニルエステル、イソチオシ

50

アネート、塩化スルホニルなど)を介してリジン残基に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、遺伝的に挿入された非天然アミノ酸、例えば、p-プロパルギルオキシフェニルアラニンまたはp-アジドフェニルアラニンへの付着を介してポリメラーゼに付着され、アジド-アルキンHuisgen環付加を受けることができるが、部位特異的標識に好適な多くの好適な非天然アミノ酸が存在し、文献において見出すことができる(例えば、Lang and Chin., Chemical reviews 114, 9 (2014): 4764-4806.に記載のように)。

【0105】

いくつかの実施形態では、リンカーはポリメラーゼN末端に特異的に結合してもよい。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは変異してN末端セリンまたはトレオニン残基を有し、これは特異的に酸化されてN末端アルデヒドを生成して、例えばヒドラジドへの後続のカップリングを行うことができる。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、チアゾリジンを形成するためにアルデヒドで特異的に標識され得るN末端システイン残基を有するように変異される。いくつかの実施形態では、N末端システイン残基は、天然化学ライゲーションを介してペプチドリンカーで標識することができる。

【0106】

いくつかの実施形態では、ペプチドタグ配列は、例えば、ビオチンリガーゼ、トランスグルタミナーゼ、リボ酸リガーゼ、細菌ソルターゼ、及びホスホパンテティニルトランスフェラーゼを使用して文献に示されるように、酵素によって合成基で特異的に標識され得るポリメラーゼに挿入され得る(例えば、Stephanopoulos & Francis Nat. Chem. Biol. 7, (2011) 876-884の参照74-78に記載されているように)。

【0107】

いくつかの実施形態では、リンカーはポリメラーゼに融合した標識ドメインに結合される。例えば、対応する反応性部分を有するリンカーを使用して、SNAPタグ、CLIPタグ、ハロタグ、及びアシルキャリアータンパク質ドメインを共有結合的に標識し得る(例えば、Stephanopoulos & Francis Nat. Chem. Biol. 7, (2011) 876-884の参照79-82に記載されているように)。

【0108】

いくつかの実施形態では、リンカーは、Carrico et al. (Nat. Chem. Biol. 3, (2007) 321-322)に記載されるように、ポリメラーゼ内に特異的に生成されるアルデヒドに結合する。例えば、酵素ホルミルグリシン生成酵素(FGE)によって認識されるアミノ酸配列をポリメラーゼに挿入した後、それをFGEに曝露してもよく、FGEは、認識配列中のシステイン残基をホルミルグリシンに特異的に変換する(すなわち、アルデヒドを生成する)。次いで、このアルデヒドは、例えば、リンカーのヒドラジドまたはアミノオキシ部分で特異的に標識され得る。

【0109】

いくつかの実施形態では、リンカーは、リンカーの部分のポリメラーゼに融合された部分への非共有結合的な結合を介してポリメラーゼに結合され得る。そのような結合戦略の例としては、ポリメラーゼをリンカーのビオチン部分に結合することができるストレプトアビジンに融合すること、またはポリメラーゼをリンカーのジゴキシゲニン部分に結合することができる抗ジゴキシゲニンに融合することが挙げられる。いくつかの実施形態では、部位特異的標識は、容易に逆転され得るポリメラーゼへのリンカーの付着をもたらし得る(例えば、還元剤を使用して、例えばTCEPを使用して切断することができるシステインとジスルフィド結合を形成するオルト-ピリジルジスルフィド(OPSS)基)、他の付着化学物質は永続的な付着を生成する。

【0110】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、当業者には明白であろうように、ポリメラーゼの特定の位置への、テザリングされたヌクレオチドの特異的な付着を確実にするために、変異される。例えば、マレイミドまたはオルト-ピリジルジスルフィドなどのスルフ

10

20

30

40

50

ヒドリル特異的結合化学では、野生型ポリメラーゼ中のアクセス可能なシステイン残基は、それらの位置での標識を防ぐために非システイン残基に変異され得る。この「反応性システインフリー」のバックグラウンドでは、システイン残基は、所望の付着位置での変異によって導入され得る。これらの変異は、優先的に、ポリメラーゼの活性を妨げない。

【0111】

タンパク質への合成基の部位特異的結合のための他の戦略は、当業者には明白であり、文献（例えば、Stephanopoulos & Francis Nat. Chem. Biol 7 (2011) 876-884）に概説される。

【0112】

遮蔽

10

本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ（例えば、テンプレート非依存性ポリメラーゼ）は、付加されたヌクレオチドへの結合の切断を引き起こすいくつかの刺激にさらされるまで、付加されたヌクレオチドへのテザリングを介して核酸に結合したままである。この状況では、以下の場合、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートによるさらなる延長が妨げられる（すなわち、ヌクレオチドが「遮蔽」される）：1）結合したポリメラーゼ分子が、他のコンジュゲートが延長されたDNA分子の3' OHにアクセスするのを妨げる、及び2）、システム内の他のヌクレオチドが、延長された核酸の3' 末端に結合したままのポリメラーゼの触媒部位にアクセスするのを妨げられる。（遮蔽の程度は、これらの相互作用の両方が妨害される程度として説明され得る。）その後の延長を可能にするために、組み込まれたヌクレオチドをポリメラーゼにテザリングするリンカーを切断し、核酸からポリメラーゼを放出し、したがって、その後の伸長のためにその3' OH基を再曝露することができる。

20

【0113】

遮蔽を用いるいくつかの実施形態では、リンカーは、当業者には明白であろうように、核酸塩基、糖、または α -ホスフェート中の任意の原子に結合することができる。

【0114】

本明細書に提供される核酸合成のための方法であって、終結を達成するために遮蔽効果を用いる方法は、遮蔽の終結機構がそれらの核酸への組み込みを妨げない場合があるため、核酸が遊離（すなわち、テザリングされていない）ヌクレオシド三リン酸の非存在下で優先的にコンジュゲートに曝露される延長ステップを含む。

30

【0115】

いくつかの実施形態では、さらなる伸長の終結は「完了」であってもよく、これは、核酸分子がコンジュゲートによって伸長された後、反応中にさらなる伸長が生じ得ないことを意味する。他の実施形態では、さらなる伸長の終結は「不完了」であってもよく、これは、さらなる伸長が反応中に生じ得るが、初期伸長と比較して実質的に低減された速度、例えば、100倍遅い、または1000倍遅い、または10,000倍遅い、またはそれ以上で生じ得ることを意味する。不完了な終結を達成するコンジュゲートは、反応が適切な量の時間後に停止されるとき、（例えば、核酸合成及び配列決定のための方法において）依然として、主に単一のヌクレオチドによって核酸を延長するために使用され得る。いくつかの実施形態では、コンジュゲートを含有する試薬は、テザリングされたヌクレオチドを含まないポリメラーゼをさらに含有し得るが、それらのポリメラーゼは、混合物中に遊離dNTPがないため、反応に有意に影響を及ぼすべきではない。

40

【0116】

終結を達成するために遮蔽効果を用いるコンジュゲートに基づく試薬は、全てのポリメラーゼが活性コンフォメーションで折り畳まれたままであるポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートのみを優先的に含有する。いくつかの場合では、コンジュゲートのポリメラーゼ部分が折り畳まれていない場合、そのテザリングされたヌクレオチドは、他のコンジュゲート分子のポリメラーゼ部分によりアクセスしやすくなり得る。これらの場合、遮蔽されていないヌクレオチドは、他のコンジュゲート分子によってより容易に組み込まれ得、終結機構を回避する。

50

【0117】

終結を達成するために遮蔽効果を用いるポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、好ましくは、単一のヌクレオチド部分でのみ標識される。触媒部位にアクセスすることができる複数のヌクレオチドで標識されたポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、場合によっては、複数のヌクレオチドを同じ核酸に組み込むことができる。したがって、追加のテザリングされたヌクレオチドは、反応中に核酸への追加の、望ましくないヌクレオチドの組み込みをもたらし得る。さらに、一度にそのポリメラーゼの（埋め込まれた）触媒部位を占有できるのは1つのテザリングされたヌクレオチドのみであるため、他のテザリングされたヌクレオチド（複数可）は、以下で論じられるように、他のコンジュゲート分子のポリメラーゼ部分へのアクセス可能性が増加し得る。

10

【0118】

終結を達成するために遮蔽効果を用いるポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、ヌクレオチドの核酸への迅速な組み込みを可能にするために、ヌクレオチドが生産的立体構造においてそのテザリングされたポリメラーゼ分子の触媒部位に頻繁にアクセスすることを依然として可能にする、可能な限り短いリンカーを優先的に含む。そのようなコンジュゲートはまた、できるだけ触媒部位に近いリンカーのポリメラーゼへの結合位置を優先的に用いてもよく、より短いリンカーの使用を可能にする。リンカーの長さは、テザリングされたヌクレオチドまたはテザリングされた核酸が到達することができる付着点からの最大距離を決定する。より小さい距離は、後述するように、他のポリメラーゼ-ヌクレオチド分子に対するテザリング部分のアクセス可能性の低減につながり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、約24及び28 Å長である。短いリンカー、例えば、長さが8～15 Åのリンカーは、遮蔽を増加させ得るが、長いリンカー、例えば、50 Å、70 Åまたは100 Åより長いリンカーは、遮蔽を低減させ得る。遮蔽効果は、ポリメラーゼの構造、リンカーの長さ、リンカーの構造、ポリメラーゼへのリンカーの結合位置、ポリメラーゼの触媒部位へのヌクレオチドの結合親和性、ポリメラーゼへの核酸の結合親和性、ポリメラーゼの好ましいコンフォメーション、及びリンカーの好ましいコンフォメーションを含むがこれらに限定されない因子の組み合わせによって影響され得る。

20

【0119】

遮蔽への1つの寄与は、コンジュゲートによって伸長された核酸の3'OHが、別のコンジュゲートのポリメラーゼ部分の触媒部位に到達するのを遮断する立体効果であり得る。立体効果はまた、テザリングされたヌクレオチドが、そのようなアプローチ中に生じるであろうコンジュゲート間の衝突のために、別のポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート分子の触媒部位に到達するのを妨げ得る。これらの立体効果は、あるコンジュゲート分子のテザリングされたヌクレオチド（または伸長された核酸）と別のコンジュゲート分子との間の生産的相互作用を完全にブロックする場合に完全な終結をもたらし得るか、またはそれらがそのような分子間相互作用のみを妨げる場合に不完全な終結をもたらし得る。

30

【0120】

遮蔽への別の寄与は、ポリメラーゼの触媒部位に対するテザリングされたヌクレオチドの結合親和性から生じる。コンジュゲートのテザリングされたヌクレオチドは、そのテザリングされたポリメラーゼの触媒部位に対して高い有効濃度を有するので、多くの時間その部位に結合したままでいてもよい。ヌクレオチドがそのテザリングされたポリメラーゼ分子の触媒部位に結合している場合、他のポリメラーゼ分子による組み込みには利用できない。したがって、テザリングは、分子間取り込み（すなわち、ヌクレオチドがテザリングされていないポリメラーゼ分子によって触媒される取り込み）に利用可能なヌクレオチドの有効濃度を低減させる。この遮蔽効果は、あるコンジュゲート分子のヌクレオチド部分を別のコンジュゲート分子のポリメラーゼ部分によって使用して核酸が伸長される速度を低減させることによって終結を増強することができる。

40

【0121】

遮蔽への別の寄与は、核酸分子の3'領域のポリメラーゼ分子の触媒部位への結合親和

50

性から生じる。コンジュゲートによる伸長後、核酸は、その3'末端ヌクレオチドを介してコンジュゲートにテザリングされ、連結されたポリメラーゼの触媒部位に対して高い有効濃度を有するため、核酸は、その部位に多くの時間結合したままであり得る。核酸がそのテザリングされたポリメラーゼ分子の触媒部位に結合している場合、他のコンジュゲート分子による伸長には利用できない。この効果は、第1のコンジュゲートによって伸長された核酸が他のコンジュゲート分子によってさらに伸長される割合を低減させることによって、終結を増強することができる。

【0122】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートは、テザリングされたヌクレオチド（または伸長後テザリング核酸）が別のコンジュゲート分子の触媒部位に近づくのを立体的に妨げる追加の部分を含む。そのような部分には、ポリメラーゼのループに挿入され得るポリペプチドまたはタンパク質ドメイン、ならびに挿入された非天然アミノ酸または特定のポリペプチドタグに部位特異的にライゲーシオンされ得るポリマーなどのそれら及び他のかさばる分子が含まれる。

【0123】

ポリメラーゼ

上述のように、ポリメラーゼ（例えば、テンプレート非依存性ポリメラーゼ）及びヌクレオチドを含むコンジュゲートが核酸またはポリヌクレオチドとインキュベートされるとき、それは、（別のコンジュゲート分子のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを使用するのは対照的に）テザリングされたヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを核酸またはポリヌクレオチドに組み込むことによって、核酸またはポリヌクレオチドを優先的に伸長させる（すなわち、延長させる）。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のポリメラーゼは、活性コンフォメーションで折り畳まれる。他の実施形態では、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート中のポリメラーゼは、折り畳まれない。

【0124】

ポリヌクレオチドを延長することができる、ヌクレオチドをポリヌクレオチドに組み込むことができる、またはヌクレオチド類似体をポリヌクレオチドに組み込むことができる任意のポリメラーゼは、本明細書に記載される方法で使用されることが想定される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは一本鎖である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは二本鎖である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは固体支持体上に固定化される。

【0125】

DNA合成用途については、具体的には、テンプレート非依存性ポリメラーゼ、例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）またはDNAヌクレオチジレキソトランスフェラーゼを使用してもよく、これらの用語は、E. C. クラス2.7.7.31について記載されるような活性を有する酵素を指すために互換的に使用されてもよい。

【0126】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、テンプレート非依存性ポリメラーゼを含むコンジュゲートを使用する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、ホモポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、ポリメラーゼ末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）、またはその変異型（例えば、非野生型TdT、例えば、修飾TdT）を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート非依存性ポリメラーゼは、TdTまたはそのバリエーション（すなわち、修飾TdT）である。いくつかの実施形態では、TdTまたはそのバリエーションは、配列番号1に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。方法のいくつかの実施形態では、TdTは、配列番号1またはその一部と同一の配

列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、T d Tは、特定のT d Tの一部（例えば、配列番号1の配列、例えば、配列番号1の配列など）と同一の配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、所与のT d Tは、配列番号1に記載されるものなどの特定のT d Tの長さに対して切り捨てられてもよい。いくつかの実施形態では、T d Tは、配列番号1の環状置換であってもよい。いくつかの実施形態では、T d T変異形は、参照T d T（例えば、野生型T d T、修飾T d Tなど）に対して1つ以上のアミノ酸置換、挿入、欠失を含む、及び／またはその環状置換体を含む。

【0127】

方法のいくつかの実施形態では、ポリメラーゼは融合タンパク質である。方法のいくつかの実施形態では、融合タンパク質は、マルトース結合タンパク質（MBP）を含む。

10

【0128】

方法のいくつかの実施形態では、T d Tまたはそのバリエーションは、共有結合または非共有結合；アミノ酸タグ（例えば、ポリアミノ酸タグ、ポリ-Hisタグ、6Hisタグ（配列番号8））；化合物（例えば、ポリエチレングリコール）；タンパク質-タンパク質結合対（例えば、ビオチン-アビジン）；親和性カップリング；捕捉プローブ；またはこれらの任意の組み合わせを含むリンカー部分に作動可能に結合してもよい。リンカー部分は、T d Tバリエーションから分離してもよく、またはT d Tバリエーションの一部であってもよい。

【0129】

>末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（T d T）

20

【0130】

M G G R D I V D G S E F S P S P V P G S Q N V P A P A V K K I S Q Y A C Q R R T
T L N N Y N Q L F T D A L D I L A E N D E L R E N E G S A L A F M R A S S V L K
S L P F P I T S M K D T E G I P S L G D K V K S I I E G I I E D G E S S E A K A
V L N D E R Y K S F K L F T S V F G V G L K T A E K W F R M G F R T L S K I Q S
D K S L R F T Q M Q K A G F L Y Y E D L V S C V N R P E A E A V S M L V K E A V
V T F L P D A L V T M T G G F R R G K M T G H D V D F L I T S P E A T E D E E Q
Q L L H K V T D F W K Q Q G L L L Y A D I L E S T F E K F K Q P S R K V D A L D
H F Q K C F L I L K L D H G R V H S E K S G Q Q E G K G W K A I R V D L V M S P
Y D R R A F A L L G W T G S R Q F E R D L R R Y A T H E R K M M L D N H A L Y D
R T K R V F L E A E S E E E I F A H L G L D Y I E P W E R N A（配列番号1）

30

【0131】

一本鎖核酸を延長する能力を有するポリメラーゼの例示的な例としては、限定されないが、ポリメラーゼTheta（Kent et al., eLife 5（2016）：e13740）、ポリメラーゼmu（Fuarez et al., Nucleic acids research 34.16（2006）：4572-4582.；またはMcElhinny et al., Molecular cell 19.3（2005）：357-366.）、またはテンプレート非依存性活性が誘導されるポリメラーゼ、例えば、テンプレート非依存性ポリメラーゼのエLEMENTの挿入によって誘導されるポリメラーゼ（Juarez et al., Nucleic acids research 34.16（2006）：4572-4582）が挙げられる。他のDNA合成用途において、ポリメラーゼは、テンプレート依存性ポリメラーゼ、すなわち、DNA指向性DNAポリメラーゼであってもよい（この用語は、IUBMB命名法を使用して活性2.7.7.7を有する酵素を指すために互換的に使用される）。

40

【0132】

RNA合成用途などのいくつかの実施形態では、テザリングされたりボヌクレオチドを使用してもよい。いくつかのそのような実施形態では、とりわけ、大腸菌ポリ（A）ポリメラーゼ（IUBMB EC 2.7.7.19）またはポリ（U）ポリメラーゼなどのRNA特異的ヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてもよい。RNAヌクレオチジルトランスフェラーゼは、特定のrNTPに対する基質特異性に影響を与える修飾、例えば

50

、単一点変異を含むことができる (Lunde et al., Nucleic acids research 40.19 (2012): 9815-9824.)。いくつかの実施形態では、RNAヌクレオチジルトランスフェラーゼとリボヌクレオチドとの間の非常に短いテザリングを使用して、ヌクレオチドの高い有効濃度を誘導し、それによって、ヌクレオチジルトランスフェラーゼの天然基質ではない可能性がある rNTP の組み込みを強制してもよい。

【0133】

リンカー

いくつかの実施形態では、リンカーを含む本開示のコンジュゲートにおいて、リンカーは、ヌクレオチドをポリメラーゼに接続する原子を含む。リンカーは、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドの塩基、糖、または α -ホスフェートをポリメラーゼに結合することができる。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ及びヌクレオチドは共有結合的に連結しており、ヌクレオチドの結合原子とそれが結合するポリメラーゼとの間の距離は、例えば、約 4 ~ 100 Å、約 15 ~ 40 Å、または約 20 ~ 30 Å の範囲、またはヌクレオチドがテザリングするポリメラーゼ上の位置に適切な距離であり得る。ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドをポリメラーゼにテザリングするための任意の好適なリンカーは、本明細書に記載される方法において企図される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリエーテルまたはポリエチレングリコール (PEG) を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1 つ以上のペプチド結合を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1 つ以上のサルコシンを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1 つ以上のグリシンを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1 つ以上のプロリンを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、カルバメートを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、塩基対合に関与しない核酸塩基の原子においてヌクレオチドに結合する。そのような実施形態では、リンカーは、糖の「位」に結合した単環式または多環式環系の任意の原子 (例えば、ピリミジンまたはプリンまたは 7-デアザプリンまたは 8-アザ-7-デアザプリン) にポリメラーゼを接続する少なくとも原子であるとみなされる。いくつかの実施形態では、リンカーは、塩基対合に関与する核酸塩基の原子においてヌクレオチドに結合する。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヌクレオチドの糖または α -ホスフェートに連結される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヌクレオチドがそれがテザリングされているポリメラーゼの活性部位にアクセスすることを可能にするのに十分な長さである。本明細書により詳細に記載されるように、コンジュゲートのポリメラーゼは、それが核酸の 3' 末端に連結しているヌクレオチドの付加を触媒することができる。

【0134】

リンカーの切断

本明細書に記載されるように、リンカーは、ヌクレオチド上の様々な位置 (例えば、本開示のコンジュゲートの) に結合され得、様々な切断戦略が使用され得る。切断戦略は、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドとポリメラーゼとを結合するリンカーの種類によって決定されることを理解されたい。リンカーを切断するための任意の好適な方法は、本明細書に記載される方法において企図される。

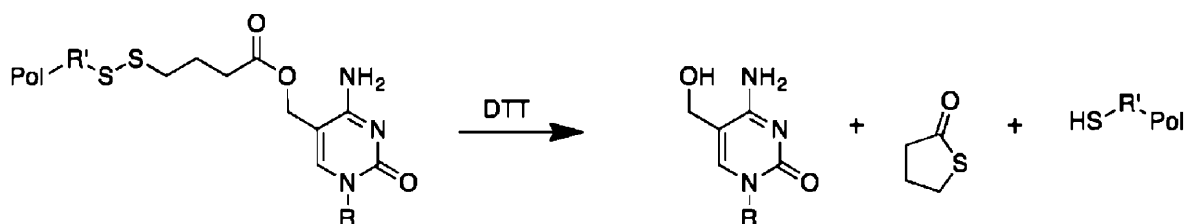
【0135】

いくつかの実施形態では、リンカーは切断され、リンカーの切断の後に、リンカーの保持部分 (すなわち瘢痕) から化学基を含むヌクレオチドが形成される。リンカー切断後の例示的な非限定的な化学基 (すなわち、瘢痕) を以下に示す。いくつかの実施形態では、化学基は、化学的、光分解的、または酵素的プロセスによって除去される。

【0136】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ジチオスレイトール (DTT)、 β -メルカプトエタノール、またはトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) などの任意の好適な還元剤への曝露によって切断されてもよい。例えば、ピリミジンの 5 位または 7-デアザプリンの 7 位に結合した 4- (ジスルファニル) ブタノイルオキシメチル基を含むリンカーは、還元剤 (例えば、DTT) によって切断して、核酸塩基上に 4-メルカ

プトブタノイルオキシメチル癬痕を生成してもよい。この癬痕は、2-オキシチオランを除去するために分子内チオラクトン化を受け得、核酸塩基上により小さいヒドロキシメチル癬痕を残す。シトシンの5位に結合したこのようなリンカーの例を以下に示すが、この戦略は、任意の好適な核酸塩基に適用可能である。

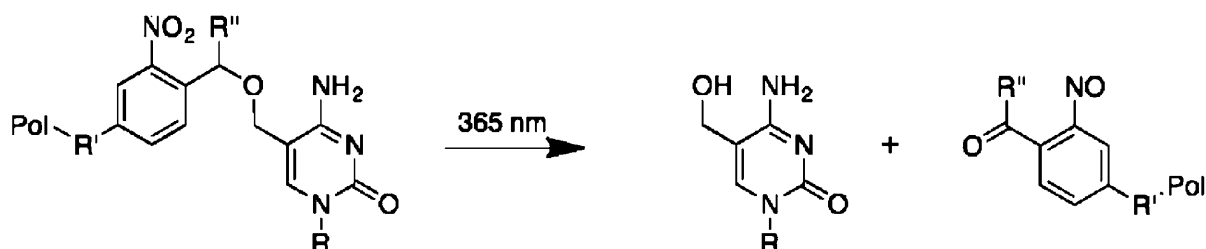


10

【0137】

他の実施形態では、リンカーは、光への曝露によって切断され得る。例えば、(2-ニトロベンジル)オキシメチル基を含むリンカーは、例えば、以下のシトシンについて示されるように、ヒドロキシメチル癬痕を残して、365 nmの光で切断され得るが、戦略は、任意の好適な核酸塩基に適用可能である：

20



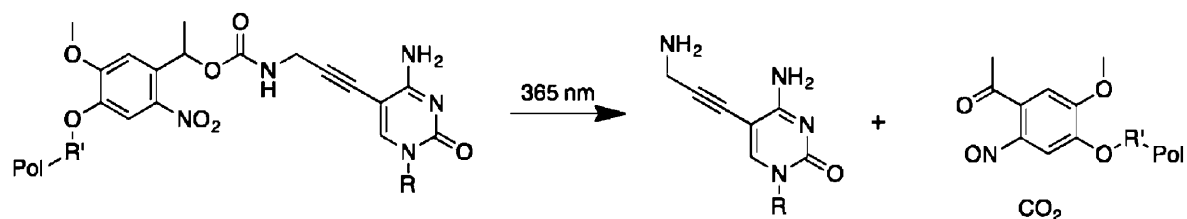
30

(式中、例えば、 $R' = H$ または $R' = CH_3$ または $R' = i-Bu$)。

【0138】

他の実施形態では、リンカーは、365 nmの光で切断されてプロパルギルアミノ癬痕を有する核酸塩基を放出し得る3-((2-ニトロベンジル)オキシ)カルボニル)アミノプロピニル基を含み得る。この戦略は、任意の好適な核酸塩基に適用可能である。

40

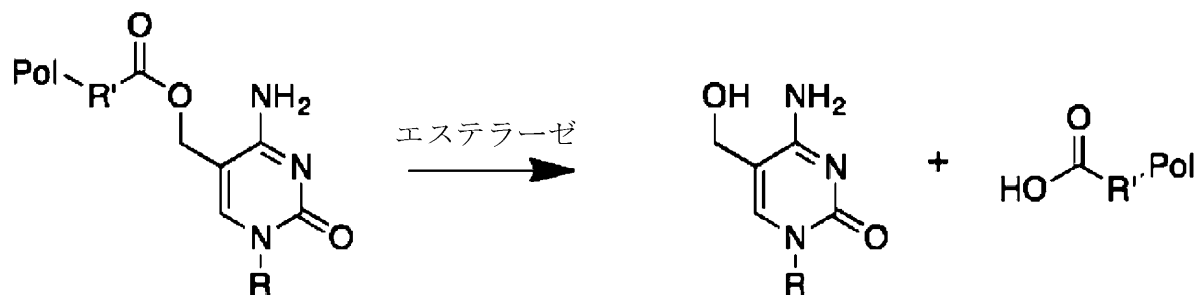


【0139】

他の実施形態では、リンカーは、例えば以下のシトシンについて示されるように、ヒドロキシメチル癬痕を有する核酸塩基を放出するために好適なエステラーゼで切断され得る

50

アシルオキシメチル基を含み得るが、戦略は任意の好適な核酸塩基に適用可能である。



10

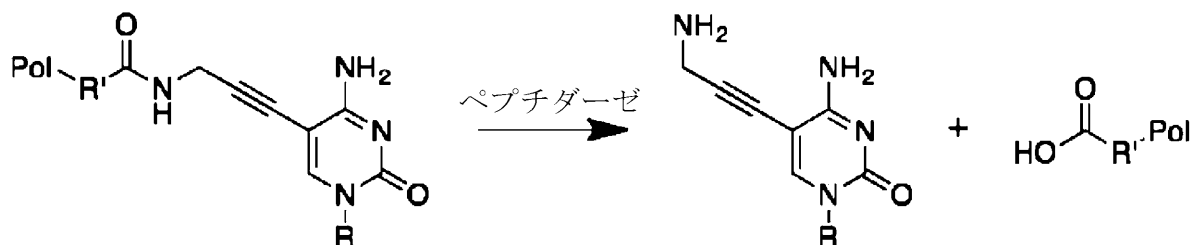
【0140】

そのような実施形態では、リンカーは、エステル結合に向かってエステラーゼの活性を増加させる、エステルに隣接する追加の原子（上記の R' に含まれる）を含んでもよい。

【0141】

他の実施形態では、リンカーは、例えば以下の 5-プロパルギルアミノシトシンについて示されるように、プロパルギルアミノ痕を有する核酸塩基を放出するためにペプチダーゼで切断され得る N-アシル-アミノプロピニル基を含み得るが、戦略は任意の好適な核酸塩基に適用可能である。

20



30

【0142】

そのような実施形態では、リンカーは、アミド結合に向かってペプチダーゼの活性を増加させるアミドに隣接する追加の原子（上記の R' に含まれる）を含んでもよい。

【0143】

等価物及び範囲

当業者は、本明細書に提供される技術に従って、特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、またはルーチンの実験以外を使用して確認することができるであろう。本開示の範囲は、本明細書の開示に限定されることを意図するものではなく、むしろ添付の特許請求の範囲に記載されるようなものである。

40

【0144】

特許請求の範囲において、「1つの (a)」、「1つの (a n)」、及び「その (the)」などの冠詞は、その反対が示されるか、または別途に文脈から明白でない限り、1つまたは2つ以上を意味し得る。群の1つ以上の要素の間に「または」を含む請求項または記載は、その反対が示されるか、または別途文脈から明白でない限り、1つ、2つ以上、または全ての群の要素が、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、またはそうでなければ関連している場合に、満たされると考えられる。本開示は、群のちょうど1つのメンバーが所与の生成物またはプロセスに存在するか、使用されるか、またはそれ以外の場合に関連する実施形態を含む。本開示は、グループメンバーのうち

50

の2つ以上、または全てが、所与の製品またはプロセスに存在するか、使用されるか、またはそれ以外の場合に関連する実施形態を含む。

【0145】

「含む (comprising)」という用語は、オープンであることを意図しており、追加の要素またはステップを含めることを可能にするが、必要としないことにも留意されたい。「含む (comprising)」という用語が本明細書で使用される場合、「からなる (consisting of)」という用語も包含及び開示される。

【0146】

範囲が与えられている場合、端点は含まれる。さらに、別段の指示がない限り、または他の方法で当業者の文脈及び理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈が別段の指示を明確にしない限り、本開示の異なる実施形態では、範囲の下限の単位の10分の1まで、記載された範囲内の任意の特定の値またはサブ範囲を想定することができることが理解されるべきである。

10

【0147】

本明細書で使用される「約」という用語は、当業者に容易に知られている各値の正常な誤差範囲を指す。用語「約」値または本明細書におけるパラメータへの参照は、値またはパラメータ自体の実装を含む（及び説明する）。例えば、「約X」を参照する説明は、「X」の説明を含む。いくつかの実施形態では、「約」は、列挙された値の最大+/-10%の値、例えば、+/-1%、+/-2%、+/-3%、+/-4%、+/-5%、+/-6%、±8%、±9%、または±10%を意味する。

20

【0148】

全ての引用源、例えば、本明細書で引用される参考文献、刊行物、データベース、データベースエントリ、及び技術は、引用文に明示的に記載されていない場合でも、参照により本願に組み込まれる。引用源及び本願で記述が矛盾する場合、本願の記述が優先される。

【0149】

セクション及び表の見出しは、限定を意図するものではない。

【実施例】

【0150】

以下は、本開示によって提供される技術を実施するための特定の実施形態の例である。これらの実施例は、例証目的で提示されているにすぎず、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度等）に関して精度を保証するように努力がなされてはいるが、いくつかの実験誤差及び偏差は、もちろん、許容されるべきである。

30

【0151】

本明細書に開示されるものの実施には、別段の指示がない限り、当該技術分野の技能の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技法、及び薬理学の従来の方法が用いられる。そのような技法は、文献で完全に説明されている。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992) を参照され

40

50

たい。

【0152】

実施例1：ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートの調製

1. ポリメラーゼ (TdT) の生成

位置182に位置する単一のシステインを有するマウスTdTを発現する誘導性プラスミドを作製した (Pal luk et al. 完全なプロトコルについては、Nature Biotechnology、2018を参照されたい)。ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲート調製のさらなる詳細については、その全体が参照により本明細書に取り込まれる、米国特許公開第No. 2019/0112627号「Nucleic Acid Synthesis and Sequencing Using Tethered Nucleoside Triphosphates」も参照されたい。

10

【0153】

2. ポリメラーゼのタンパク質発現及び精製

TdT発現は、プラスミドの耐性マーカーのための抗生物質を含有するTB培地中のBL21 (DE3) ゴールド細胞 (Agilent) を使用して行った。50mLの一晩培養物を使用して、400mLの発現培養物を1/20ボリュームで接種した。細胞を37℃で増殖させ、それらがOD0.6に達するまで200rpmで振盪した。IPTGを0.5mMの最終濃度まで追加し、発現を16~20時間、16℃で行った。細胞を8000Gで10分間遠心分離によって採取し、20mLの緩衝液A (20mMのTris-HCl、0.5MのNaCl、pH8) + 5mMのイミダゾール中に再懸濁した。細胞溶解は、超音波処理を使用して行い、続いて30,000Gで20分間遠心分離した。上清を、1mLのNi-NTAアガロース (Qiagen) を含有する重力カラムに適用した。カラムを20体積の緩衝液A + 40mMイミダゾールで洗浄し、結合したタンパク質を4mLの緩衝液A + 500mMイミダゾールを使用して溶出した。タンパク質をVivaspin20カラム (MWCO 10kDa、Sartorius) で約0.15mLに濃縮し、次いで、Pur-A-Lyzer (商標) 透析キットMini 12000チューブ (Sigma) を使用して、200mLのTdTストック緩衝液 (100mMのNaCl、200mMのK₂HPO₄、pH6.5) に対して一晩透析した。

20

【0154】

Ni精製試料をHiTrap Q HPアニオンカラムに適用した。タンパク質を、100%Q緩衝液A (100mMのNaCl、20mMのK₂HPO₄、pH6.5) から100%Q緩衝液B (1MのNaCl、20mMのK₂HPO₄、pH6.5) までの線形勾配で溶出した。SDS-PAGE解析を使用してTdTを含有した画分を同定し、これらの試料をプールして濃縮した。

30

【0155】

3. ポリメラーゼへの、テザリングされたヌクレオチドの付着

TdT-ヌクレオチドコンジュゲートを調製するために、システイン (すなわち、マレイミド) に部位特異的にコンジュゲートすることが可能な部分を有する切断可能なリンカー-ヌクレオチドを最初に合成した。例示的なリンカー-ヌクレオチドは、米国特許公開第2019/0112627号「Nucleic Acid Synthesis and Sequencing Using Tethered Nucleoside Triphosphates」に記載されている。次に、等モルのTdT及びリンカー-ヌクレオチドを、4℃の、500mMのNaCl、20mMのK₂HPO₄中、pH6.5で一晩インキュベートした。TdTコンジュゲートを、20mMのTrisアセテート、50mMの酢酸カリウム (pH7.9) 中で予め平衡化したS200サイズの除外カラム (Cytiva) を使用して、未反応のリンカー-ヌクレオチドから分離した。得られるコンジュゲートは、ポリメラーゼに結合 (またはテザリング) された少なくとも1つのTdT-ヌクレオチドを含むコンジュゲートを含む。

40

【0156】

実施例2：ホスファターゼは、合成速度論に影響を与えることなく、コンジュゲートベ

50

スのポリヌクレオチド合成中の望ましくない挿入を防止する

本明細書に記載されるように、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを使用して、所与のコンジュゲートの単一のヌクレオチドをオリゴヌクレオチドの遊離3'末端に組み込むことができ、一方、ポリメラーゼは、制御された方法で後続のヌクレオチド付加を防止することを含む組み込み後も結合したままであり得る。しかしながら、2つ以上のヌクレオチドの挿入は、ポリヌクレオチド合成のためにコンジュゲート溶液を使用するとき

に生じ得、コンジュゲートベースのポリヌクレオチド合成精度に悪影響を及ぼす。ホスファターゼが、コンジュゲートベースのポリヌクレオチド合成中の挿入を防止することによって合成精度を向上させることができるかどうかを試験するために、以下のように、ホスファターゼを伴うまたは伴わないA、T、C、またはGヌクレオチドポリメラーゼコンジュゲートを使用して、遊離オリゴヌクレオチドの3'末端に単一ヌクレオチド取り込み反応を行った。

10

【0157】

実施例1で調製されたA、T、C、またはGリンカーヌクレオチドにコンジュゲートされた1 μ MのTdTの溶液を、pH8のTrisまたはHEPES緩衝液中で、二価金属（例えば、マグネシウムまたはコバルト）、50mMの塩（例えば、酢酸カリウムまたはNaCl）、50nMの2つのスターターDNAオリゴのうちの1つ（Aについては、5'-6-FAM-T35-3'（配列番号9）、及びT、C及びGについては、5'-6-FAM-T41GCGGCGCGTTTCGCGCCGCGC-3'（配列番号10）を使用した）とともに、NEBから購入した2 μ Mの仔牛アルカリ腸ホスファターゼをNEBの存在下または非存在下でインキュベートした。ホスファターゼを、pH8の緩衝剤（例えば、TrisまたはHEPES緩衝液）及び塩（例えば、50mMのNaClまたは酢酸カリウム）を含有する溶液に予め緩衝交換した。反応を、6.6秒、11.6秒、19.2秒、65秒、3分21秒、9分52秒、及び21分41秒で、40mMのEDTAを追加することによって反応を停止させるまで、24°Cでインキュベートした。

20

【0158】

反応の完了後、コンジュゲート中のヌクレオチドとTdTとを接続するリンカーを、切断酵素または還元剤などの試薬を使用して切断して、オリゴヌクレオチドからTdTを除去した。次いで、オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動によって分析して、反応生成物を長さによって区別した。具体的には、得られたオリゴヌクレオチド付加反応生成物を、スターターオリゴに結合した6-FAMフルオレセインの蛍光を検出することによってサイズ決定した。その結果を図2Aに示す。結果は、第1のピーク（スターターオリゴ）、第2のピーク（単一のヌクレオチドが付加されたスターターオリゴ、すなわち「+1の付加」）、及び後の時点で出現する第3のピーク（2つのヌクレオチドが付加されたスターターオリゴ、すなわち「+2の付加」）を示す。すなわち、初期時点の間、延長+1オリゴ（一塩基取り込み、右ピーク）の割合は、完全に到達するまで、スターターオリゴ（左ピーク）と比較して増加する。

30

【0159】

後の時点で示されるように、図2Bに再び示される最終21分41秒の時点で、スターターオリゴ（+2）への2つのヌクレオチドの付加による別のピークが、ホスファターゼの非存在下で出現し始める。+2付加ピークは、図2Bに標識され、望ましくない挿入に対応する。しかしながら、反応がホスファターゼの存在下で行われる場合、+2付加の出現は著しく低減するが、+1付加の割合は著しく影響を受けない。したがって、ホスファターゼで処理されたコンジュゲート試薬を使用した合成（例えば、ホスファターゼの存在下での合成）は、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートによるA、C、T、及びGヌクレオチドの基質への単一ヌクレオチド付加の精度を向上させ、望ましくない挿入を阻害する。

40

【0160】

実施例3：いくつかのホスファターゼバリエーションは、合成速度論に影響を与えることなく、コンジュゲートベースのポリヌクレオチド合成中の望ましくない挿入を防止する

50

実施例 1 で調製した T リンカーヌクレオチドにコンジュゲートした 2 μ M の T d T 溶液を、pH 8 の T r i s または H E P E S 緩衝液中で、二価金属（例えば、マグネシウムまたはコバルト）、50 mM の塩（例えば、酢酸カリウムまたは N a C l ）、2 mM のホスファターゼ（または対照としてホスファターゼなし）、及び 50 nM の D N A オリゴ（5'-6-F A M-T 3 2 C C C-3'）（配列番号 1 1）とともに、24 $^{\circ}$ C（図 3 A）または 37 $^{\circ}$ C（図 3 B）でインキュベートした。40 mM の E D T A を追加することによって、反応を 3.8 秒、11.6 秒、19.2 秒、65 秒、3 分 21 秒、9 分 52 秒、21 分 41 秒、及び 30 分でクエンチした。ホスファターゼを、pH 8（例えば、T r i s または H E P E S）及び塩（例えば、50 mM の N a C l または酢酸カリウム）の緩衝剤を含む溶液に予め緩衝交換した。以下のホスファターゼバリエーションを試験した：ウシ（Q u i c k C I P、N E B）、ホッコクアカエビ（エビアルカリホスファターゼ、N E B）、南極バクテリア T A B 5（A n t a r c t i c ホスファターゼ、N E B）、及び大腸菌（T a k a r a B i o）ホスファターゼ。

10

20

30

40

50

【0161】

反応の完了後、コンジュゲート中のヌクレオチドと T d T とを接続するリンカーを、切断酵素または還元剤等の試薬を使用して切断して、オリゴヌクレオチドから T d T を除去した。得られた 3 A 中の合成オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動によって分析して、オリゴ集団を長さによって区別し、「0」はスターターオリゴのピークを表すように割り当てられ、「+1」は、その 3' 末端に単一の組み込まれた T を有するスターターオリゴのピークを表し、3 B では、結果は、「ホスファターゼなし」対照において 2 つの組み込まれたヌクレオチド「+2 付加」を有するオリゴについて可視的なピークを示す。

【0162】

具体的には、キャピラリー電気泳動及び出発オリゴに結合した 6-F A M フルオレセインの蛍光検出を使用してオリゴヌクレオチドを分析し、反応生成物を長さで区別した。24 $^{\circ}$ C で 3.8 秒～21 分 41 秒の可変付加時間後に得られたオリゴヌクレオチド付加反応生成物を図 3 A に示す。37 $^{\circ}$ C で 30 分間の付加時間後に得られたオリゴヌクレオチド付加反応生成物を図 3 B に示し、矢印は +2 付加の予想されるサイズを示す。

【0163】

示されるように、+2 付加の出現は、「ホスファターゼなし」と比較して試験された全ての時点で有意に減少する（図 3 B）が、+1 付加は、全てのホスファターゼの存在下で 21 分 41 秒の時点で完了する（図 3 A）。さらに、T A B 5 ホスファターゼバリエーションを除く全てが、「ホスファターゼなし」と比較して、ヌクレオチド取り込みの速度論に目に見える影響を与えなかった。したがって、試験した全てのホスファターゼバリエーションは、ポリヌクレオチド合成中の望ましくない挿入を阻害するのに好適であり、ほとんどのバリエーションは、高速組み込み速度論が望ましい場合にも好適である。

【0164】

実施例 4. ホスファターゼは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートを使用した 50 量体のポリヌクレオチドの段階的に制御された合成中の望ましくない挿入を阻害する。

ヌクレオチドポリメラーゼコンジュゲートを使用した環状ポリヌクレオチド合成を行って、定義された 50 量体配列：

5'-A A C C G A C C A A G C T A C G G T T C A G A A A A T T C G C G A T G C A A T T C G C G A T C A G C-3'（配列番号 1 2）

を作製した。

【0165】

合成は、表面に結合した D N A にハイブリダイゼーションした F A M 標識 D N A オリゴ（スターターオリゴ）：

5'-6-F A M-C T G A C A G A G A T G A T G A A G T C A C A T G A G A C A T G A A C T G A G T C T T T T-3'（配列番号 1 3）

の 3' 末端から開始して行った。

【0166】

2つの50量体の合成反応を行い、1つはホスファターゼの存在下で、もう1つはホスファターゼなしで行った。TdT-ヌクレオチドコンジュゲートを介してヌクレオチドを循環的に付加することによって、出発分子上でDNA延長を行った。表面に結合したポリヌクレオチドの3'末端に1つのヌクレオチドを付加する各DNA延長サイクルを、以下のように(24~37℃の温度で)行った。

【0167】

1.ヌクレオチド付加:TrisまたはHEPES緩衝液中の、TdT-ヌクレオチドコンジュゲート(A、T、C、またはGのいずれかに対応する)、二価金属(例えば、コバルトまたはマグネシウム)、及び50mMの塩(例えば、酢酸カリウムまたはNaCl)の溶液を、3μMの大腸菌ホスファターゼの有無にかかわらず、pH8で、表面に結合したDNA(例えば、スターターオリゴ)に追加した。

10

【0168】

2.オリゴ結合TdTの除去:表面結合オリゴにTdT-ヌクレオチドコンジュゲートを付加するのに十分な時間インキュベートした後、40mMのEDTAを追加してTdT延長反応を終了させ、コンジュゲート中のヌクレオチドとTdTとを接続するリンカーを、切断酵素または還元剤などの試薬を使用して切断した。

【0169】

3.表面の再生:次いで、0.5MのNaClを含むNaOH pH11の溶液を使用して、表面から全ての非結合反応成分を洗い流した。

【0170】

20

ステップ1~3を繰り返して、所望のポリヌクレオチド配列を作製した。

【0171】

得られた合成ポリヌクレオチドを表面から取り出し、SeqStudio Genetic Analyzer(ThermoFisher)DNA Analyzer上でFAM蛍光を検出することによって分析して、ポリヌクレオチドの集団を長さによって区別した。結果を図4に示す。

【0172】

図4に示すように、ホスファターゼを含まない合成は、50塩基を超える生成物(1つ以上の非終結事象または挿入を有する生成物を表す)を全基質の40%オーダーで示す。しかしながら、ホスファターゼの存在下では、50塩基を超える合成オリゴヌクレオチドは、合成集団の約10%のみを構成し、各合成ステップにおける挿入速度の有意な低減を示す。さらに、ホスファターゼの存在または非存在下では、欠失(付加が起らなかったサイクル)に検出可能な変化はない。

30

【0173】

上記の結果は、コンジュゲートベースのポリヌクレオチド合成中のホスファターゼの存在が、ホスファターゼを含まない反応と比較して、多段階合成反応における欠失速度に影響を及ぼさない、挿入の実質的な(少なくとも4倍の)低下をもたらすことを示す。これは、ポリメラーゼ-ヌクレオチドコンジュゲートによるポリヌクレオチド合成の質の有意な改善を表す。

【0174】

40

他の実施形態

使用されている言葉は、限定ではなく説明の言葉であり、その広範な態様における本開示の真の範囲及び精神から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で変更が行われ得ることが理解されるべきである。

【0175】

本開示は、いくつかの説明された実施形態に関してある程度の長さで、ある程度の特異性を伴って説明されてきたが、それは、任意のそのような特異性または実施形態、または任意の特定の実施形態に限定されるべきであることを意図するものではなく、従来技術を考慮してそのような特許請求の範囲の最も広い可能な解釈を提供し、したがって、本開示の意図された範囲を効果的に包含するように、添付の特許請求の範囲を参照して解釈され

50

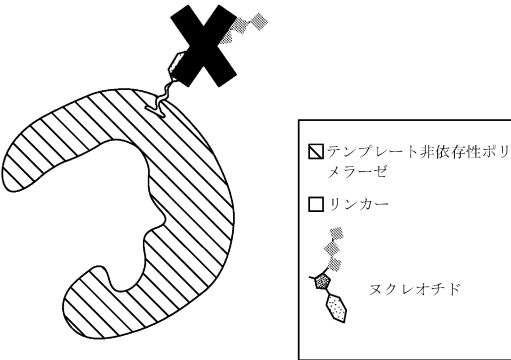
るべきである。

【 0 1 7 6 】

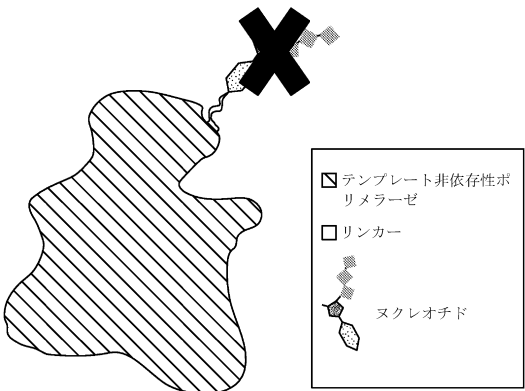
本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含み本明細書が優先される。加えて、セクションの見出し、材料、方法、及び実施例は例示にすぎず、限定することを意図するものではない。

【図面】

【図 1 A】



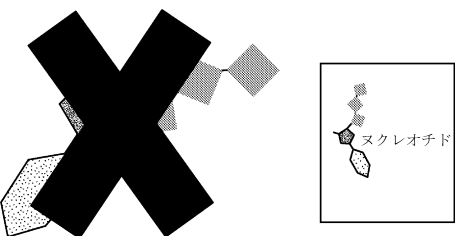
【図 1 B】



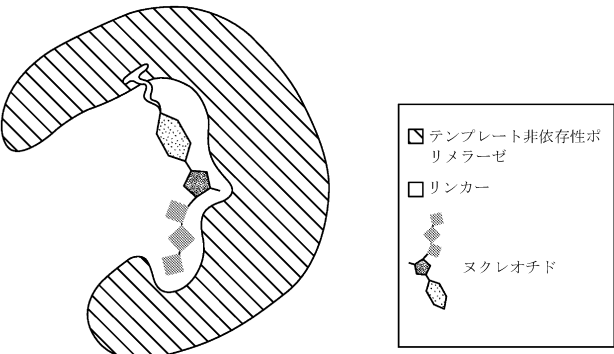
10

20

【図 1 C】



【図 1 D】

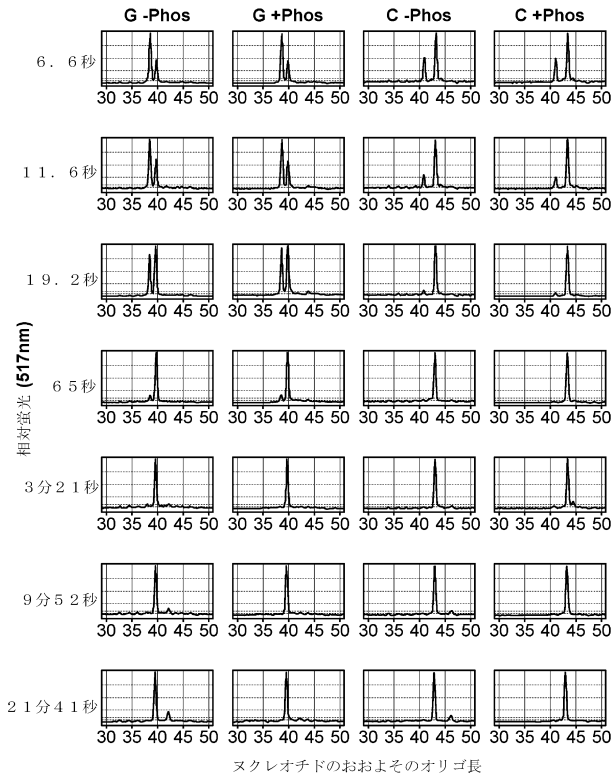


30

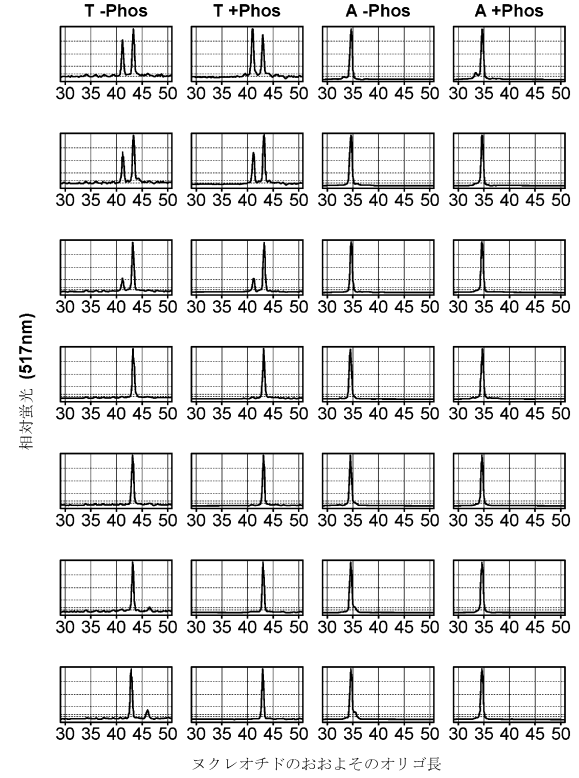
40

50

【図 2 A - 1】



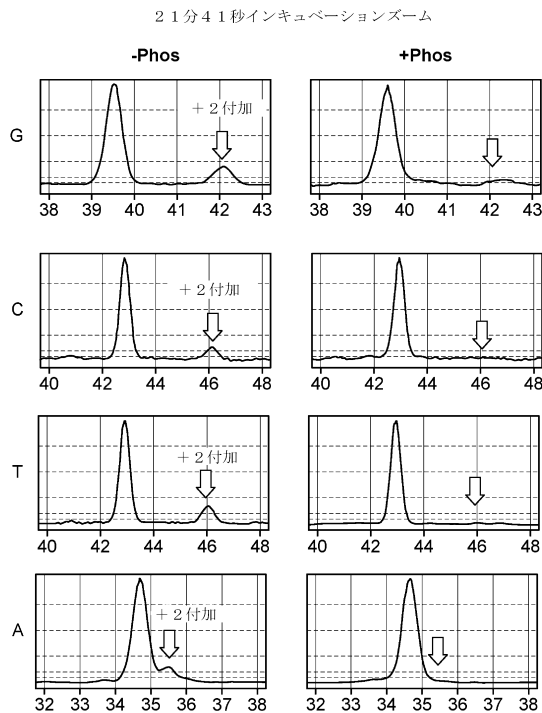
【図 2 A - 2】



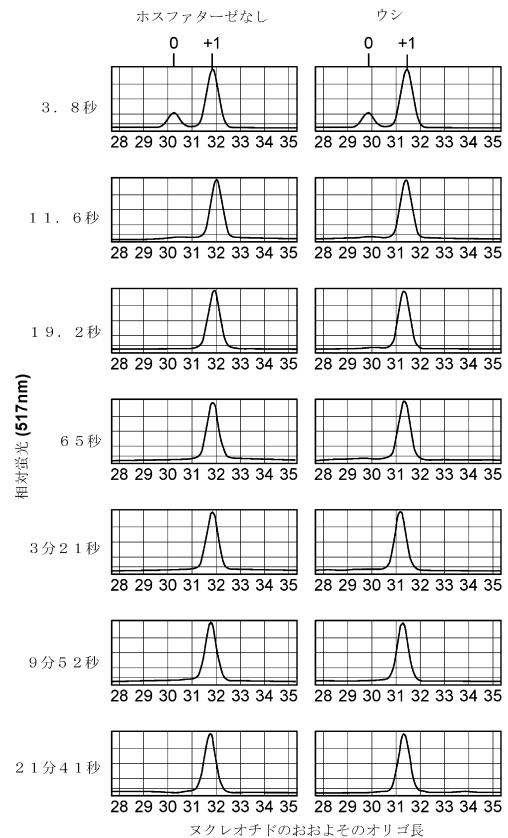
10

20

【図 2 B】



【図 3 A - 1】

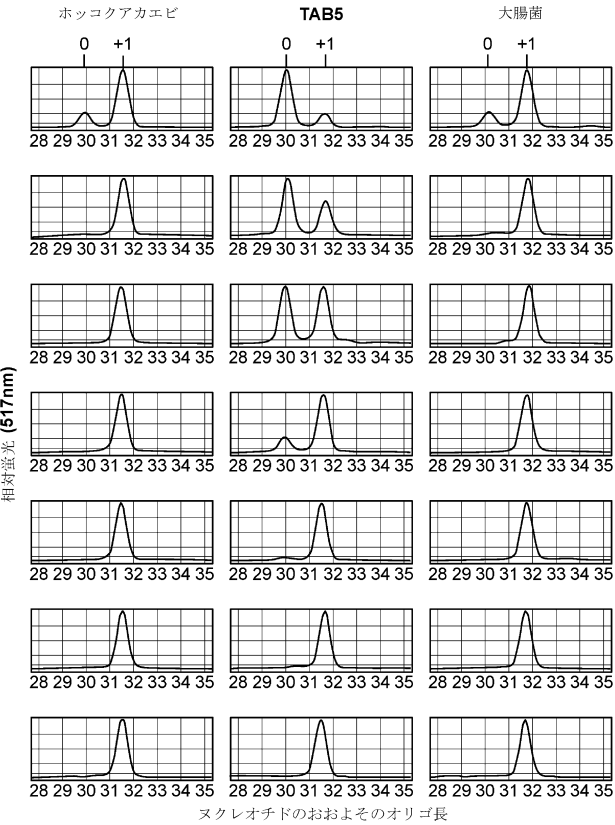


30

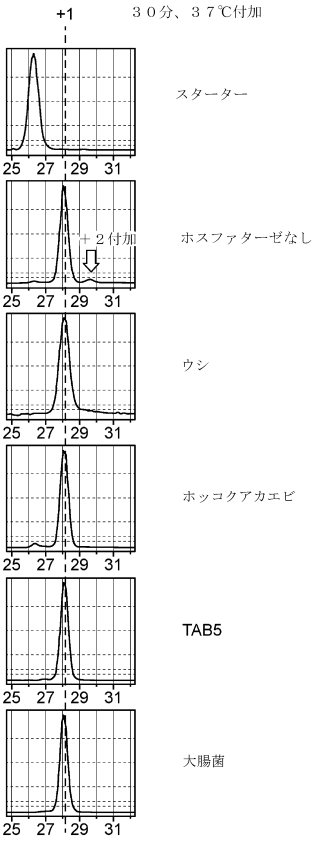
40

50

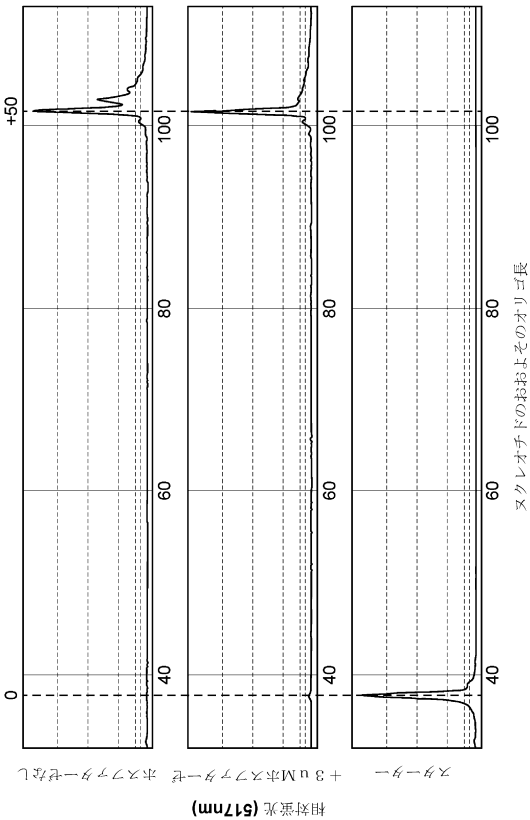
【図 3 A - 2】



【図 3 B】



【図 4】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024546987000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 9/12, C12Q 1/6844, C12N 9/16 (2023.01)

ADD. C12P 19/34 (2023.01)

CPC - INV. C12N 9/1241, C12Y 207/07, C12Q 1/6844, C12N 9/16, C12Y 301/03005, C12Y 301/03031

ADD. C12P 19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, D	PALLUCK et al. De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. Nature biotechnology. 1 August 2018, Vol. 36, No. 7, pg 1-6; especially abstract; pg 2, col 1, para 1 - col 2, para 1; pg 4, col 1, para 1 - col 2, para 2; pg S2, col 2, para 3; pg S3, col 1, para 2 - col 2, para 1; Figure 1	1-8, 10-15, 20-21, 34-37
Y, D		16-18
Y, D	US 2019/0112627 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 18 April 2019 (18.04.2019); abstract; para [0071], [0073], [00231]	18-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2023

Date of mailing of the international search report

JUN 08 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81871

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81871

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 9, 19, 25-33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-8, 10-18, 20-21, 34-37 directed to methods of nucleic acid synthesis, treating a composition, or reducing one or more non-termination reactions.

Group II: Claims 22-24, directed to a composition comprising a plurality of conjugates.

Continued on Supplemental Page

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8, 10-18, 20-21, 34-37

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81871

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires methods for nucleic acid syntheses, treating a composition, or reducing one or more non-termination reactions, comprising providing a conjugate reagent comprising a plurality of polymerase-nucleotide conjugates, and contacting with a phosphatase, not required by Group II.

Group II requires a composition of matter comprising a plurality of conjugates, wherein each conjugate comprises a nucleotide or modified nucleotide attached to a polymerase, and wherein purity of nucleotides shielded by a linked polymerase of the composition is above a purity level with reference to total quantity of nucleotides in the composition, not required by Group I.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I-II is a nucleotide or modified nucleotide attached to a polymerase.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2019/0112627 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter 'Univ California').

Univ California discloses a nucleotide or modified nucleotide attached to a polymerase (abstract - "a conjugate comprising a polymerase and a nucleoside triphosphate, where the polymerase and the nucleoside triphosphate are covalently linked via a linker that comprises a cleavable linkage. A set of such conjugates, where the conjugates correspond to G, A, T (or U) and C is also provided. Methods for synthesizing a nucleic acid of a defined sequence are also provided.").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I-II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)

Claims 9, 19, 25-33 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note,

Claim 36 is objected to under PCT Rule 66.2(a)(iii) as containing the following defect in the form or contents thereof: As drafted, the claim depends on claim 36. For the purposes of this application, claim 36 is construed as though depending from claim 35.

Claim 37 is objected to under PCT Rule 66.2(a)(iii) as containing the following defect in the form or contents thereof: As drafted, the claim depends on claims 34-37. For the purposes of this application, claim 37 is construed as though depending from claims 34-36.

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396
弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741
弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926
弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 エストリン エリック
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル シックスティーフィフス ストリー
ト 1 1 9 8 スイート 2 5 0 アンサ バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 パリュック セバスチャン
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル シックスティーフィフス ストリー
ト 1 1 9 8 スイート 2 5 0 アンサ バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 アーロー ダニエル
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル シックスティーフィフス ストリー
ト 1 1 9 8 スイート 2 5 0 アンサ バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド内