

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-522234
(P2023-522234A)

(43)公表日 令和5年5月29日(2023.5.29)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12		4 B 0 5 0
C 1 2 Q	1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68		4 B 0 6 4
C 1 2 P	19/34 (2006.01)	C 1 2 P	19/34	A	
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁)

(21)出願番号 特願2022-563942(P2022-563942)
 (86)(22)出願日 令和3年4月16日(2021.4.16)
 (85)翻訳文提出日 令和4年12月19日(2022.12.19)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2021/059861
 (87)国際公開番号 WO2021/213903
 (87)国際公開日 令和3年10月28日(2021.10.28)
 (31)優先権主張番号 20170405.3
 (32)優先日 令和2年4月20日(2020.4.20)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁(EP)
 (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,A
 T,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

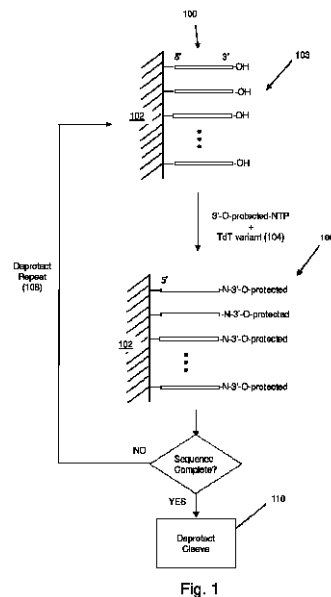
(71)出願人 516304610
 ディーエヌエー スクリプト
 フランス国 9 4 2 7 0 ル クルムラン
 -ピセトル, アヴニョ ドゥ フォンテ
 スプロ 6 7 - イメブル オカベ
 (74)代理人 110002077
 園田・小林弁理士法人
 (72)発明者 ソスキヌ, ミカエル
 フランス国 9 5 1 3 0 フランコンビル
 , リュ デュ プレシ プシャール 1 3 9
 シャンピオン, エリーズ
 (72)発明者 フランス国 7 5 0 1 3 パリ, リュ ド
 ウ トルピアック, 1 9 8 ビス
 F ターム(参考) 4B050 CC03 DD11 EE01
 4B063 QQ42 QQ52 QR06 QR32
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ変異体およびその使用

(57)【要約】

本発明は、可逆的にブロックされたヌクレオシド三リン酸をポリヌクレオチドに組み込む際に向上した効率を示す、様々な種由来の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)変異体、および任意の所定の配列のポリヌクレオチドを合成する際のそのようなTdTの使用に関する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44 または 47 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 変異体であって、

配列番号 2 については、61 位のロイシンが置換され、170 位のシステインが置換され、204 位のアルギニンが置換され、326 位のアルギニンが置換され、かつ 329 位のグリシンが置換されており；

配列番号 5 については、48 位のロイシンが置換され、158 位のシステインが置換され、192 位のアルギニンが置換され、314 位のアルギニンが置換され、かつ 317 位のグリシンが置換されており；

10

配列番号 8 については、61 位のロイシンが置換され、171 位のチロシンが置換され、205 位のアルギニンが置換され、327 位のアルギニンが置換され、かつ 329 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 11 については、61 位のロイシンが置換され、171 位のチロシンが置換され、205 位のアルギニンが置換され、324 位のアルギニンが置換され、かつ 327 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 14 については、61 位のグリシンが置換され、205 位のアルギニンが置換され、327 位のアルギニンが置換され、かつ 330 位のグルタミン酸が置換されており；

20

配列番号 17 については、61 位のアルギニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、158 位のアラニンが置換され、192 位のアルギニンが置換され、311 位のアルギニンが置換され、かつ 314 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 20 については、61 位のアルギニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、171 位のプロリンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、205 位のアルギニンが置換され、321 位のスレオニンが置換され、かつ 324 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 23 については、61 位のアルギニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、171 位のアラニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、205 位のアルギニンが置換され、322 位のアラニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、かつ 325 位のグルタミン酸が置換されており；

30

配列番号 26 については、61 位のアルギニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、171 位のアラニンは置換されていないとしても、または置換されていなくてもよく、205 位のアルギニンが置換され、322 位のアルギニンが置換され、かつ 325 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 29 については、48 位のメチオニンが置換され、158 位のシステインが置換され、192 位のアルギニンが置換され、310 位のアルギニンが置換され、かつ 313 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 32 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

40

配列番号 35 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 38 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 41 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

50

配列番号 44 については、48 位のメチオニンが置換され、158 位のシステインが置換され、192 位のアルギニンが置換され、309 位のアルギニンが置換され、かつ 312 位のグルタミン酸が置換されており；ならびに

配列番号 47 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

(i) テンプレートなしで核酸断片を合成することができ、かつ (ii) 核酸断片の遊離 3'-ヒドロキシルに 3'-O-修飾ヌクレオチドを組み込むことができる、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 変異体。

【請求項 2】

10

配列番号 2、8 もしくは 11 の 61 位または配列番号 5 の 48 位のロイシンに対する前記置換が、R または Q からなる群から選択され；

配列番号 2 の 170 位または配列番号 5、29 もしくは 44 の 158 位または配列番号 32、35、38、41 もしくは 47 の 171 位のシステインに対する前記置換が、G、R、P、A、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のシステインに対する置換が G または R からなる群から選択され；

配列番号 8 もしくは 11 の 171 位のチロシンに対する前記置換が、G、R、P、A、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のチロシンに対する置換が G または R からなる群から選択され；

配列番号 17 の 158 位または配列番号 23 もしくは 26 の 171 位のアラニンに対する前記置換が、G、R、P、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のアラニンに対する置換が G または R からなる群から選択され；

20

配列番号 20 の 171 位のプロリンに対する前記置換が、G、R、A、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のチロシンに対する置換が G または R からなる群から選択され；

配列番号 2 の 204 位または配列番号 5、17、29 もしくは 44 の 192 位または配列番号 8、11、14、20、23、26、32、35、38、41 もしくは 47 の 205 位のアルギニンに対する前記置換が、L または N からなる群から選択され；

配列番号 2 の 326 位または配列番号 5 の 314 位または配列番号 8 もしくは 14 の 327 位または配列番号 11 の 324 位または配列番号 17 の 311 位または配列番号 20 の 321 位または配列番号 23 もしくは 26 の 322 位または配列番号 29 の 310 位または配列番号 32、35、38、41 もしくは 47 の 323 位または配列番号 44 の 309 位のアルギニンに対する前記置換が、P、N または A からなる群から選択され；

30

配列番号 20 の 321 位のスレオニンに対する前記置換が、P、N または A からなる群から選択され；

配列番号 2 もしくは 5 の 329 位のグリシンに対する前記置換が、N、L、T または S からなる群から選択され；

配列番号 8 もしくは 14 の 330 位または配列番号 11 の 327 位または配列番号 17 の 311 位または配列番号 20 の 324 位または配列番号 23 もしくは 26 の 325 位または配列番号 29 の 313 位または配列番号 32、35、38、41 もしくは 47 の 326 位または配列番号 44 の 312 位のグルタミン酸に対する前記置換が、N、L、T または S からなる群から選択される、

40

請求項 1 に記載の TdT 変異体。

【請求項 3】

配列番号 2 については、327 位のグルタミンが置換されており；

配列番号 5 については、315 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 8 については、328 位のグルタミンが置換されており；

配列番号 11 については、325 位のグルタミンが置換されており；

配列番号 14 については、328 位のグルタミンが置換されており；

配列番号 17 については、312 位のグルタミンが置換されており；

50

配列番号 20 については、322 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 23 については、323 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 26 については、323 位のメチオニンが置換されており；
 配列番号 29 については、311 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 32 については、324 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 35 については、324 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 38 については、324 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 41 については、324 位のグルタミンが置換されており；
 配列番号 44 については、310 位のグルタミンが置換されており；かつ
 配列番号 47 については、324 位のグルタミンが置換されている、

10

請求項 1 または 2 に記載の T d T 変異体。

【請求項 4】

前記グルタミンが、T、F、L、M、I、V および Y からなる群から選択されるアミノ酸で置換されている、請求項 3 に記載の T d T 変異体。

【請求項 5】

前記 3'-O-修飾ヌクレオチドが、3'-O-アミノ-2'-デオキシヌクレオシド三リン酸、3'-O-アジドメチル-2'-デオキシヌクレオシド三リン酸および 3'-O-アシル-2'-デオキシヌクレオシド三リン酸からなる群から選択される、請求項 1、2、3 または 4 のいずれかに記載の T d T 変異体。

【請求項 6】

20

配列番号 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45 または 48 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む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) 変異体であって、配列番号 3 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 327 が A であり、かつアミノ酸位 330 が N であり；

配列番号 6 については、アミノ酸位 48 が R であり、アミノ酸位 158 が R であり、アミノ酸位 192 が L であり、アミノ酸位 314 が P であり、かつアミノ酸位 317 が N であり；

配列番号 9 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 327 が A であり、かつアミノ酸位 330 が N であり；

30

配列番号 12 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が A であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 324 が P であり、かつアミノ酸位 327 が N であり；

配列番号 15 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 328 が P であり、かつアミノ酸位 331 が N であり；

配列番号 18 については、アミノ酸位 48 が R であり、アミノ酸位 158 が R であり、アミノ酸位 192 が L であり、アミノ酸位 311 が P であり、かつアミノ酸位 314 が N であり；

40

配列番号 21 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が P であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 321 が A であり、かつアミノ酸位 324 が N であり；

配列番号 24 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が A であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 322 が A であり、かつアミノ酸位 325 が N であり；

配列番号 27 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 327 が A であり、かつアミノ酸位 330 が N であり；

50

配列番号 30 については、アミノ酸位 48 が R であり、アミノ酸位 158 が R であり、アミノ酸位 192 が L であり、アミノ酸位 310 が P であり、かつアミノ酸位 313 が N であり；

配列番号 33 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 323 が P であり、かつアミノ酸位 326 が N であり；

配列番号 36 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 323 が A であり、かつアミノ酸位 326 が N であり；

配列番号 39 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 323 が P であり、かつアミノ酸位 326 が N であり；

10

配列番号 42 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 323 が A であり、かつアミノ酸位 326 が N であり；

配列番号 45 については、アミノ酸位 48 が R であり、アミノ酸位 158 が R であり、アミノ酸位 192 が L であり、アミノ酸位 310 が A であり、かつアミノ酸位 313 が N であり；

配列番号 48 については、アミノ酸位 61 が R であり、アミノ酸位 171 が R であり、アミノ酸位 205 が L であり、アミノ酸位 323 が P であり、かつアミノ酸位 326 が N であり；

20

(i) テンプレートなしで核酸断片を合成することができ、かつ (i i) 核酸断片の遊離 3' - ヒドロキシルに 3' - O - 修飾ヌクレオチドを組み込むことができる、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) 変異体。

【請求項 7】

配列番号 3 については、アミノ酸位 328 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 6 については、アミノ酸位 315 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 9 については、アミノ酸位 328 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

30

配列番号 12 については、アミノ酸位 325 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 15 については、アミノ酸位 329 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 18 については、アミノ酸位 312 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 21 については、アミノ酸位 322 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 24 については、アミノ酸位 323 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

40

配列番号 27 については、アミノ酸位 328 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 30 については、アミノ酸位 311 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 33 については、アミノ酸位 324 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 36 については、アミノ酸位 324 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 39 については、アミノ酸位 324 が Q であるか、または T、F、L もしくは

50

M からなる群から選択され；

配列番号 4 2 については、アミノ酸位 3 2 4 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 4 5 については、アミノ酸位 3 1 1 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；かつ

配列番号 4 8 については、アミノ酸位 3 2 4 が Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択される、

請求項 6 に記載の T d T 変異体。

【請求項 8】

前記 3' - O - 修飾ヌクレオチドが、3' - O - アミノ - 2' - デオキシヌクレオシド三リン酸、3' - O - アジドメチル - 2' - デオキシヌクレオシド三リン酸および 3' - O - アリル - 2' - デオキシヌクレオシド三リン酸からなる群から選択される、請求項 6 または 7 のいずれかに記載の T d T 変異体。

【請求項 9】

配列番号 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45 または 48 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む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) 変異体であって、(i) テンプレートなしで核酸断片を合成することができ、かつ (ii) ポリヌクレオチドの遊離 3' - ヒドロキシルに 3' - O - 修飾ヌクレオチドを組み込むことができる、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) 変異体。

20

【請求項 10】

所定の配列を有するポリヌクレオチドを合成する方法であって、

(a) 遊離 3' - ヒドロキシルを有する 3' - 末端ヌクレオチドを有するイニシエーターを提供する工程；

b) (i) 伸長条件下で、遊離 3' - O - ヒドロキシルを有するイニシエーターまたは伸長された断片と、3' - O - ブロックヌクレオシド三リン酸および請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の T d T 変異体とを、イニシエーターまたは伸長された断片が、3' - O - ブロックヌクレオシド三リン酸の組み込みによって伸長されて、3' - O - ブロック伸長断片が形成されるように接触させること、および (ii) 伸長された断片を脱ブロックして、遊離 3' - ヒドロキシルを有する伸長された断片を形成することをポリヌクレオチドが形成されるまで繰り返す工程、

30

を含む方法。

【請求項 11】

前記 3' - O - ブロックヌクレオシド三リン酸が、3' - O - NH₂ - ヌクレオシド三リン酸、3' - O - アジドメチル - ヌクレオシド三リン酸、または 3' - O - アリル - ヌクレオシド三リン酸である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ヌクレオチド組み込み反応を実施するためのキットであって、

a) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の T d T 変異体、b) 1 または複数の 3' - O - 保護ヌクレオシド三リン酸、および c) 任意選択的に少なくとも 1 つのイニシエーター

40

を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

所定の配列の合成ポリヌクレオチドは、分子診断、ゲノムおよび診断配列決定、核酸増幅、治療抗体開発、合成生物学、核酸ベースの治療、DNA 折り紙、DNA ベースのデータストレージなどを含む多くの技術の中心である。近年、テンプレートフリーポリメラーゼ (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 (T d T) など) を使用する酵素ベースの方法、例えば、Y b e r t ら、国際特許公開第 W O 2 0 1 5 / 1 5 9 0 2

50

3号; Hiatt et al, U.S. patent 5763594; Jensen et al, Biochemistry, 57:1821-1832 (2018); などが、そのような酵素の証明された効率および穏やかな非毒性反応条件の利益のため、化学ベースの合成方法を補足すること、またはそれと置き換えることにおいて関心を集めている。酵素ベースの合成におけるほとんどの手法は、ポリヌクレオチド産物中の所望の配列を得るために、可逆的にブロックされたヌクレオシド三リン酸の使用を必要とする。しかしながら、残念なことに、天然のTdTは、非修飾ヌクレオシド三リン酸と比較して、そのような修飾ヌクレオシド三リン酸を組み込みの効率が大幅に低下する。

【0002】

上記を考慮して、より高い効率で可逆的にブロックされたヌクレオシド三リン酸を組み込むことができる変異体TdTなどの新しいプレートフリーポリメラーゼが利用可能であれば、プレートフリーの酵素ベースのポリヌクレオチド合成の分野は進歩すると思われる。

10

【発明の概要】

【0003】

本発明は、可逆的にブロックされたヌクレオシド三リン酸をポリヌクレオチドに組み込む際に向上した効率を示す、様々な種由来の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)変異体、および任意の所定の配列のポリヌクレオチドを合成する際のそれらの使用に関する。

【0004】

20

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44または47から選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%同一のアミノ酸配列を含む末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)変異体に関し、ここで、

配列番号2については、61位のロイシンが置換され、170位のシステインが置換され、204位のアルギニンが置換され、326位のアルギニンが置換され、かつ329位のグリシンが置換されており；

配列番号5については、48位のロイシンが置換され、158位のシステインが置換され、192位のアルギニンが置換され、314位のアルギニンが置換され、かつ317位のグリシンが置換されており；

30

配列番号8については、61位のロイシンが置換され、171位のチロシンが置換され、205位のアルギニンが置換され、327位のアルギニンが置換され、かつ329位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号11については、61位のロイシンが置換され、171位のチロシンが置換され、205位のアルギニンが置換され、324位のアルギニンが置換され、かつ327位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号14については、61位のグリシンが置換され、205位のアルギニンが置換され、327位のアルギニンが置換され、かつ330位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号17については、61位のアルギニンは置換されていないも、または置換されていなくてもよく、158位のアラニンが置換され、192位のアルギニンが置換され、311位のアルギニンが置換され、かつ314位のグルタミン酸が置換されており；

40

配列番号20については、61位のアルギニンは置換されていないも、または置換されていなくてもよく、171位のプロリンは置換されていないも、または置換されていなくてもよく、205位のアルギニンが置換され、321位のスレオニンが置換され、かつ324位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号23については、61位のアルギニンは置換されていないも、または置換されていなくてもよく、171位のアラニンは置換されていないも、または置換されていなくてもよく、205位のアルギニンが置換され、322位のアラニンは置換されていないも、または置換されていなくてもよく、かつ325位のグルタミン酸が置換されており；

50

配列番号 26 については、61 位のアルギニンは置換されていても、または置換されていなくてもよく、171 位のアラニンは置換されていても、または置換されていなくてもよく、205 位のアルギニンが置換され、322 位のアルギニンが置換され、かつ 325 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 29 については、48 位のメチオニンが置換され、158 位のシステインが置換され、192 位のアルギニンが置換され、310 位のアルギニンが置換され、かつ 313 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 32 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 35 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 38 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 41 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号 44 については、48 位のメチオニンが置換され、158 位のシステインが置換され、192 位のアルギニンが置換され、309 位のアルギニンが置換され、かつ 312 位のグルタミン酸が置換されており；ならびに

配列番号 47 については、61 位のメチオニンが置換され、171 位のシステインが置換され、205 位のアルギニンが置換され、323 位のアルギニンが置換され、かつ 326 位のグルタミン酸が置換されており；

ここで、T d T 変異体は、(i) テンプレートなしで核酸断片を合成することができ、かつ (i i) 核酸断片の遊離 3' - ヒドロキシルに 3' - O - 修飾ヌクレオチドを組み込むことができる。

【 0 0 0 5 】

いくつかの実施形態では、配列番号 2、8 もしくは 11 の 61 位または配列番号 5 の 48 位のロイシンに対する上記置換は、R または Q からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号 2 の 170 位または配列番号 5、29 もしくは 44 の 158 位または配列番号 32、35、38、41 もしくは 47 の 171 位のシステインに対する上記置換は、G、R、P、A、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のシステインに対する置換は G または R からなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、配列番号 8 もしくは 11 の 171 位のチロシンに対する上記置換は、G、R、P、A、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のチロシンに対する置換は G または R からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号 17 の 158 位または配列番号 23 もしくは 26 の 171 位のアラニンに対する上記置換は、G、R、P、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のアラニンに対する置換は G または R からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号 20 の 171 位のプロリンに対する上記置換は、G、R、A、V、S、N、Q または D からなる群から選択され、他の実施形態では、前述の位置のチロシンに対する置換は G または R からなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、配列番号 2 の 204 位または配列番号 5、17、29 もしくは 44 の 192 位または配列番号 8、11、14、20、23、26、32、35、38、41 もしくは 47 の 205 位のアルギニンに対する上記置換は、L または N からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号 2 の 326 位または配列番号 5 の 314 位または配列番号 8 もしくは 14 の 327 位または配列番号 11 の 324 位または配列番号 17 の 311 位または配列番号 20 の 321 位または配列番号 23 もしくは 26 の 3

10

20

30

40

50

22位または配列番号29の310位または配列番号32、35、38、41もしくは47の323位または配列番号44の309位のアルギニンに対する上記置換は、P、NまたはAからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号20の321位のスレオニンに対する上記置換は、P、NまたはAからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号2もしくは5の329位のグリシンに対する上記置換は、N、L、TまたはSからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号8もしくは14の330位または配列番号11の327位または配列番号17の311位または配列番号20の324位または配列番号23もしくは26の325位または配列番号29の313位または配列番号32、35、38、41もしくは47の326位または配列番号44の312位のグルタミン酸に対する上記置換は、N、L、TまたはSからなる群から選択される。

10

【0006】

さらなる実施形態では、本発明は、配列番号2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44または47から選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%同一のアミノ酸配列を含む末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)変異体に関し、上記置換およびさらなる置換は以下の通りである：

配列番号2については、327位のグルタミンが置換されており；

配列番号5については、315位のグルタミン酸が置換されており；

配列番号8については、328位のグルタミンが置換されており；

配列番号11については、325位のグルタミンが置換されており；

20

配列番号14については、328位のグルタミンが置換されており；

配列番号17については、312位のグルタミンが置換されており；

配列番号20については、322位のグルタミンが置換されており；

配列番号23については、323位のグルタミンが置換されており；

配列番号26については、323位のメチオニンが置換されており；

配列番号29については、311位のグルタミンが置換されており；

配列番号32については、324位のグルタミンが置換されており；

配列番号35については、324位のグルタミンが置換されており；

配列番号38については、324位のグルタミンが置換されており；

配列番号41については、324位のグルタミンが置換されており；

30

配列番号44については、310位のグルタミンが置換されており；かつ

配列番号47については、324位のグルタミンが置換されており；

ここで、TdT変異体は、(i)テンプレートなしで核酸断片を合成することができ、かつ(ii)核酸断片の遊離3'-ヒドロキシルに3'-O-修飾ヌクレオチドを組み込むことができる。いくつかの実施形態では、グルタミンおよびグルタミン酸の前述の置換は、T、F、LまたはMである。

【0007】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45または48から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)変異体に関し、ここで、

40

配列番号3については、アミノ酸位61はRであり、アミノ酸位171はRであり、アミノ酸位205はLであり、アミノ酸位327はAであり、かつアミノ酸位330はNであり；

配列番号6については、アミノ酸位48はRであり、アミノ酸位158はRであり、アミノ酸位192はLであり、アミノ酸位314はPであり、かつアミノ酸位317はNであり；

配列番号9については、アミノ酸位61はRであり、アミノ酸位171はRであり、アミノ酸位205はLであり、アミノ酸位327はAであり、かつアミノ酸位330はNであり；

50

配列番号 12 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は A であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 324 は P であり、かつアミノ酸位 327 は N であり；

配列番号 15 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 328 は P であり、かつアミノ酸位 331 は N であり；

配列番号 18 については、アミノ酸位 48 は R であり、アミノ酸位 158 は R であり、アミノ酸位 192 は L であり、アミノ酸位 311 は P であり、かつアミノ酸位 314 は N であり；

配列番号 21 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は P であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 321 は A であり、かつアミノ酸位 324 は N であり；

配列番号 24 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は A であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 322 は A であり、かつアミノ酸位 325 は N であり；

配列番号 27 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 327 は A であり、かつアミノ酸位 330 は N であり；

配列番号 30 については、アミノ酸位 48 は R であり、アミノ酸位 158 は R であり、アミノ酸位 192 は L であり、アミノ酸位 310 は P であり、かつアミノ酸位 313 は N であり；

配列番号 33 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 323 は P であり、かつアミノ酸位 326 は N であり；

配列番号 36 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 323 は A であり、かつアミノ酸位 326 は N であり；

配列番号 39 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 323 は P であり、かつアミノ酸位 326 は N であり；

配列番号 42 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 323 は A であり、かつアミノ酸位 326 は N であり；

配列番号 45 については、アミノ酸位 48 は R であり、アミノ酸位 158 は R であり、アミノ酸位 192 は L であり、アミノ酸位 310 は A であり、かつアミノ酸位 313 は N であり；

配列番号 48 については、アミノ酸位 61 は R であり、アミノ酸位 171 は R であり、アミノ酸位 205 は L であり、アミノ酸位 323 は P であり、かつアミノ酸位 326 は N であり；

ここで、T d T 変異体は、(i) テンプレートなしで核酸断片を合成することができ、かつ (i i) 核酸断片の遊離 3' - ヒドロキシルに 3' - O - 修飾ヌクレオチドを組み込むことができる。

いくつかの実施形態では、前述の T d T 変異体において、配列番号 3 については、アミノ酸位 328 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 6 については、アミノ酸位 315 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 9 については、アミノ酸位 328 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 12 については、アミノ酸位 325 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

10

20

30

40

50

配列番号 15 については、アミノ酸位 3 2 9 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 18 については、アミノ酸位 3 1 2 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 21 については、アミノ酸位 3 2 2 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 24 については、アミノ酸位 3 2 3 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 27 については、アミノ酸位 3 2 8 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 30 については、アミノ酸位 3 1 1 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 33 については、アミノ酸位 3 2 4 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 36 については、アミノ酸位 3 2 4 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 39 については、アミノ酸位 3 2 4 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 42 については、アミノ酸位 3 2 4 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；

配列番号 45 については、アミノ酸位 3 1 1 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択され；かつ

配列番号 48 については、アミノ酸位 3 2 4 は Q であるか、または T、F、L もしくは M からなる群から選択される。

【0008】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45 または 48 から選択されるアミノ酸配列を含む末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 変異体に関する。

【0009】

いくつかの実施形態では、前述の TdT 変異体のそれぞれに対する同一性パーセント値は、示されている配列番号と少なくとも 80% の同一性であり、いくつかの実施形態では、上記の同一性パーセント値は、示された配列番号と少なくとも 90% の同一性であり、いくつかの実施形態では、上記の同一性パーセント値は、示された配列番号と少なくとも 95% の同一性であり、いくつかの実施形態では、上記の同一性パーセント値は、少なくとも 97% の同一性であり、いくつかの実施形態では、上記の同一性パーセント値は、少なくとも 98% の同一性であり、いくつかの実施形態では、上記の同一性パーセント値は、少なくとも 99% の同一性である。本明細書で使用される場合、参照配列を変異体配列と比較するために使用される同一性パーセント値は、変異体配列の置換を含む明示的に指定されたアミノ酸位置を含まない。すなわち、パーセント同一性関係は、参照タンパク質の配列と、変異体中の置換を含む明示的に指定された位置の外側の変異体タンパク質の配列との間である。したがって、例えば、参照配列および変異体配列がそれぞれ 100 個のアミノ酸を含み、変異体配列が 25 位および 81 位に突然変異を有する場合、パーセント同一性は配列 1 ~ 24、26 ~ 80 および 82 ~ 100 に関するものとなる。上記 (ii) に関して、いくつかの実施形態では、そのような 3'-O-修飾ヌクレオチドは、3'-O-NH₂-ヌクレオシド三リン酸、3'-O-アジドメチル-ヌクレオシド三リン酸、3'-O-アシル-ヌクレオシド三リン酸、3'-O-(2-ニトロベンジル)-ヌクレオシド三リン酸、3'-O-ニトロ-ヌクレオシド三リン酸または 3'-O-プロパルギル-ヌクレオシド三リン酸を含み得る。他の実施形態では、そのような 3'-O-修飾ヌクレオチドは、3'-O-NH₂-ヌクレオシド三リン酸または 3'-O-アジドメチル-ヌクレオシド三リン酸を含み得る。

10

20

30

40

50

【0010】

本発明はさらに、核酸断片に1または複数の3'-O-修飾ヌクレオチドを連続的に付加することによってテンプレートなしで核酸分子を合成するための、本発明のTdT変異体の使用に関する。いくつかの実施形態では、そのような方法は、(a)遊離3'-ヒドロキシルを有するオリゴヌクレオチドを含むイニシエーターを提供する工程；(b)酵素的延長条件下で、3'-O-可逆的ブロックヌクレオシド三リン酸の存在下で、本発明のTdT変異体をイニシエーターまたは延長されたイニシエーターと反応させる工程、を含む。いくつかの実施形態では、そのような方法は、(c)延長されたイニシエーターを脱ブロックして、遊離3'-ヒドロキシルを有する延長されたイニシエーターを形成する工程、および(d)所定の配列の核酸分子が合成されるまで工程(b)および(c)を繰り返す工程、をさらに含む。

【0011】

さらなる実施形態では、本発明は、上記の変異体TdT_sをコードする核酸分子、そのような核酸分子を含む発現ベクター、および前述の核酸分子または前述の発現ベクターを含む宿主細胞を含む。なおさらなる実施形態では、本発明は、本発明の変異体TdTを産生する方法であって、宿主細胞が、前記変異体TdTをコードする核酸の発現を可能にする培養条件下で培養され、変異体TdTが任意選択的に回収される方法を含む。本発明はまた、任意の所定の配列のテンプレートフリーポリヌクレオチド伸長を行うためのキットであって、本発明のTdT変異体を含むキットを含む。そのようなキットは、DNA伸長のためのA、C、GおよびTのための3'-O-ブロックデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)、またはRNA伸長のためのrA、rC、rGおよびUのための3'-O-ブロックリボヌクレオシド三リン酸(rNTP)をさらに含み得る。

【0012】

本発明は、野生型TdTまたは以前に利用可能であったTdT変異体よりも高い効率またはより高い割合で3'-O-修飾ヌクレオチドを組み込む能力を有する新しいTdT変異体を提供することによって、3'-O-修飾ヌクレオシド三リン酸の効率的な組み込みに関連する、テンプレートフリー酵素的核酸合成の分野における問題を有利に克服する。いくつかの実施形態では、本発明はまた、野生型TdTと比較して安定性が増加した新規なTdT変異体を提供することによって、上記分野の問題を有利に克服する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本発明のTdT変異体を用いたテンプレートフリー酵素的核酸合成の方法の工程を図式的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、様々な変更および代替形態を受け入れることができるが、その詳細は、例として図面に示されており、詳細に説明される。本発明を記載された特定の実施形態に限定することを意図するものではないことを理解されたい。本発明の精神および範囲内にあるすべての変更、等価物、および代替形態を網羅することが意図されている。本発明の態様の指針は、例えばSambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoryを含む、当業者に周知の多くの利用可能な参考文献および論文に見い出される。

【0015】

本発明は、テンプレート鎖を使用せずに所定の配列のポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAを合成するために使用することができるTdTポリメラーゼの変異体を提供する。本発明のTdT変異体は、修飾ヌクレオチド、より具体的には3'-O-可逆的ブロックヌクレオシド三リン酸を、ポリヌクレオチド合成の酵素ベースの方法で使用可能にする。本発明の変異体は、特定の残基におけるそれらの突然変異または置換に従って記載され、その位置は特定の配列番号について指定される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

本発明の T d T 変異体は、それらの B R C T 様 N 末端アミノ酸配列を有さない天然 T d T に由来する。そのような切断型配列は、本明細書では「切断型野生型」 T d T と呼ばれることがある。より具体的には、本発明の T d T 変異体は、以下の天然 T d T に由来する。

表 1

名称	種	NCBI アクセッション番号	配列番号
B10 切断型野生型	カナリア (<i>Serinus canaria</i>)	XP_030097130.1	2
B10 変異体	カナリア (<i>Serinus canaria</i>)	XP_030097130.1	3
B10 タグ化変異体	カナリア (<i>Serinus canaria</i>)	XP_030097130.1	4
B19 切断型野生型	キボウシマイコドリ (<i>Neopelma chrysocephalum</i>)	XP_027527888.1	5
B19 変異体	キボウシマイコドリ (<i>Neopelma chrysocephalum</i>)	XP_027527888.1	6
B19 タグ化変異体	キボウシマイコドリ (<i>Neopelma chrysocephalum</i>)	XP_027527888.1	7
B57 切断型野生型	ヨウスコウアリゲーター (<i>Alligator sinensis</i>)	XP_025069068.1	8
B57 変異体	ヨウスコウアリゲーター (<i>Alligator sinensis</i>)	XP_025069068.1	9
B57 タグ化変異体	ヨウスコウアリゲーター (<i>Alligator sinensis</i>)	XP_025069068.1	10
B59 切断型野生型	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	AAI29712.1	11
B59 変異体	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	AAI29712.1	12
B59 タグ化変異体	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	AAI29712.1	13
B63 切断型野生型	タイガースネーク (<i>Notechis scutatus</i>)	XP_026526500.1	14
B63 変異体	タイガースネーク (<i>Notechis scutatus</i>)	XP_026526500.1	15
B63 タグ化変異体	タイガースネーク (<i>Notechis scutatus</i>)	XP_026526500.1	16
F15 切断型野生型	ブラウントラウト (<i>Salmo trutta</i>)	XP_029608991.1	17
F15 変異体	ブラウントラウト (<i>Salmo trutta</i>)	XP_029608991.1	18
F15 タグ化変異体	ブラウントラウト (<i>Salmo trutta</i>)	XP_029608991.1	19
F24 切断型野生型	デンキウナギ (<i>Electrophorus electricus</i>)	XP_026869907.1	20
F24 変異体	デンキウナギ (<i>Electrophorus electricus</i>)	XP_026869907.1	21
F24 タグ化変異体	デンキウナギ (<i>Electrophorus electricus</i>)	XP_026869907.1	22
F32 切断型野生型	キノボリウオ (<i>Anabas testudineus</i>)	XP_026209749.1	23
F32 変異体	キノボリウオ (<i>Anabas testudineus</i>)	XP_026209749.1	24
F32 タグ化変異体	キノボリウオ (<i>Anabas testudineus</i>)	XP_026209749.1	25
F57 切断型野生型	グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>)	XP_008428203.1	26
F57 変異体	グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>)	XP_008428203.1	27
F57 タグ化変異体	グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>)	XP_008428203.1	28
N100 切断型野生型	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	XP_001012479.1	29
N100 変異体	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	XP_001012479.1	30
N100 タグ化変異体	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	XP_001012479.1	31
N100or 切断型野生型	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	XP_001012479.1	32

10

20

30

40

50

N100or 変異体	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	XP__001012479.1	33
N100or タグ化変異体	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	XP__001012479.1	34
N14 切断型野生型	ハイアカコロブス(<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>)	XP__023062037.1	35
N14 変異体	ハイアカコロブス(<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>)	XP__023062037.1	36
N14 タグ化変異体	ハイアカコロブス(<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>)	XP__023062037.1	37
N27 切断型野生型	イノシシ(<i>Sus scrofa</i>)	XP__003133204.1	38
N27 変異体	イノシシ(<i>Sus scrofa</i>)	XP__003133204.1	39
N27 タグ化変異体	イノシシ(<i>Sus scrofa</i>)	XP__003133204.1	40
N35 切断型野生型	アムールトラ(<i>Panthera tigris altaica</i>)	XP__007080320.1	41
N35 変異体	アムールトラ(<i>Panthera tigris altaica</i>)	XP__007080320.1	42
N35 タグ化変異体	アムールトラ(<i>Panthera tigris altaica</i>)	XP__007080320.1	43
N72 切断型野生型	スイギュウ(<i>Bubalus bubalis</i>)	XP__006061247.1	44
N72 変異体	スイギュウ(<i>Bubalus bubalis</i>)	XP__006061247.1	45
N72 タグ化変異体	スイギュウ(<i>Bubalus bubalis</i>)	XP__006061247.1	46
N93or 切断型野生型	キバラマーモット(<i>Marmota flaviventris</i>)	XP__027786017.1	47
N93or 変異体	キバラマーモット(<i>Marmota flaviventris</i>)	XP__027786017.1	48
N93or タグ化変異体	キバラマーモット(<i>Marmota flaviventris</i>)	XP__027786017.1	49

10

20

【0017】

いくつかの実施形態では、T d T 変異体は、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）；化合物（例えば、ポリエチレングリコール）；タンパク質-タンパク質結合ペア（例えば、ビオチン-アビジン）；アフィニティーカップリング；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動作可能に連結され得る。リンカー部分は、T d T 変異体とは別個であってもよく、T d T 変異体の一部であってもよい（例えば、以下の配列番号のペアによって例示される組換えHisタグ化ポリメラーゼ：（3、4）、（6、7）、（9、10）、（12、13）、（15、16）、（18、19）、（21、22）、（24、25）、（27、28）、（30、31）、（33、34）、（36、37）、（39、40）、（42、43）、（45、46）および（48、49））。典型的には、リンカー部分は、T d T 変異体のヌクレオチド結合活性または触媒活性に干渉しない。

30

40

【0018】

上記の実施形態のいくつかでは、3' O - 修飾ヌクレオシド三リン酸を組み込む際の変異体T d Tの効率は、以前に利用可能であったT d T野生型または変異体の効率の少なくとも105%であり、他の実施形態では、3' O修飾ヌクレオシド三リン酸を組み込む際の変異体T d Tの効率は、以前に利用可能であったT d T野生型または変異体の効率の少なくとも110%であり、他の実施形態では、3' O修飾ヌクレオシド三リン酸を組み込む際の変異体T d Tの効率は、以前に利用可能であったT d T野生型または変異体の効率の少なくとも150%である。

【0019】

上記の本発明のT d T変異体はそれぞれ、示された置換の存在を条件として、特定の配

50

列番号と配列同一性パーセントを有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この様式で記載される本発明の T d T 変異体と指定された配列番号との間の配列相違の数およびタイプは、置換、欠失および/または挿入によるものであり得、置換、欠失および/または挿入されたアミノ酸は、任意のアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、そのような欠失、置換および/または挿入は、天然に存在するアミノ酸のみを含む。いくつかの実施形態では、置換は、Grantham, Science, 185:862-864 (1974)に記載されているような、保存的または同義のアミノ酸変化のみを含む。すなわち、アミノ酸の置換は、その同義アミノ酸のセットのメンバーの間でのみ起こり得る。いくつかの実施形態において、使用され得る同義アミノ酸のセットを表 2 A に示す。

10

表 2 A : アミノ酸の同義セット I

アミノ酸	同義セット
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Gly, Ala, Thr, Pro, Ser
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Cys, Ser, Thr
His	His, Glu, Lys, Gln, Thr, Arg
Gln	Gln, Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg
Asn	Asn, Gln, Asp, Ser
Lys	Lys, Glu, Gln, His, Arg
Asp	Asp, Glu, Asn
Glu	Glu, Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

20

30

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、使用され得る同義アミノ酸のセットを表 2 B に示す。

表 2 B : アミノ酸の同義セット I I

40

50

アミノ酸	同義セット
Ser	Ser
Arg	Arg, Lys, His
Leu	Ile, Phe, Met, Leu
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Met, Ile Val
Gly	Gly
Ile	Met, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Gln, Glu, His
Asn	Asn, Asp
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

10

20

【0021】

ヌクレオチド組み込み活性の測定

本発明の変異体によるヌクレオチド組み込みの効率は、例えばBouleら（以下に引用）；Bentolillaら（以下に引用）；およびHiattらの米国特許第5808045号（後者は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、延長（extension）または伸長（elongation）アッセイによって測定することができる。簡潔には、そのようなアッセイの一形態では、遊離3'-ヒドロキシルを有する蛍光標識オリゴヌクレオチドを、可逆的にブロックされたヌクレオシド三リン酸の存在下で、TdT延長条件下で被験変異体TdTと所定の期間反応させ、その後、延長反応を停止させ、ゲル電気泳動による分離後に延長産物および非延長イニシエーターオリゴヌクレオチドの量を定量する。そのようなアッセイにより、変異体TdTの組み込み効率は、他の変異体の効率または野生型もしくは参照TdTもしくは他のポリメラーゼの効率と容易に比較することができる。いくつかの実施形態では、変異体TdTの効率の尺度は、同等のアッセイで野生型TdTを使用した延長産物の量に対する変異体TdTを使用した延長産物の量の割合（パーセンテージとして示される）であり得る。

30

【0022】

いくつかの実施形態では、以下の特定の延長アッセイを使用して、TdTの組み込み効率を測定することができる：使用されるプライマーは以下の通りである：

5'-AAAAAAAAAAGGGG-3'（配列番号50）

プライマーはまた、5'末端にATTO蛍光色素を有する。使用される代表的な修飾されたヌクレオチド（表3においてdNTPとして示される）としては、3'-O-アミノ-2',3'-ジデオキシヌクレオチド-5'-三リン酸（ONH₂, Firebird Biosciences）、例えば3'-O-アミノ-2',3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸が挙げられる。異なる被験変異体ごとに、一本のチューブを反応に使用する。試薬を、水から出発し、次いで表3の順序で、チューブに添加する。37℃で30分後、ホルムアミド（Sigma）の添加によって反応を停止させる。

40

B

50

表 3 : 延長活性アッセイの試薬

試薬	濃度	体積
H ₂ O	—	12 μL
活性バッファー	10x	2 μL
dNTP	250 μM	2 μL
精製酵素	20 μM	2 μL
蛍光プライマー	500nM	2 μL

10

活性バッファーは、例えば、CoCl₂が補充されたTdT反応バッファー（New England Biolabsから入手可能）を含む。

【0023】

アッセイの産物を従来のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析する。例えば、上記アッセイの産物は、16%ポリアクリルアミド変性ゲル（Bio-Rad）において分析することができる。ゲルは、ポリアクリルアミドをガラスプレートの内側に注ぎ、それを重合させることによって分析の直前に作製される。ガラスプレート内のゲルは、電気泳動工程のためにTBEバッファー（Sigma）が充填された適合タンクに取り付けられる。分析される試料は、ゲルの上部に装填される。室温で3~6時間、ゲルの上部と底部との間に500~2,000Vの電圧を印加する。分離後、ゲル蛍光を、例えばTyphoonスキャナー（GE Life Sciences）を用いてスキャンする。ImageJソフトウェア（imagej.nih.gov/ij/）またはその等価物を使用してゲル画像を分析して、修飾ヌクレオチドの組み込みのパーセンテージを計算する。

20

【0024】

ヘアピン完了アッセイ。一態様では、本発明は、ポリヌクレオチド（すなわち、「試験ポリヌクレオチド」）の3'末端にdNTPを組み込むポリメラーゼ、例えばTdT変異体の能力を測定する方法を含む。そのような方法の1つは、遊離3'ヒドロキシルを有する試験ポリヌクレオチドを、それが実質的に一本鎖のみであるが、TdT変異体などのポリメラーゼによる延長時に、一本鎖ループおよび二本鎖ステムを含む安定なヘアピン構造を形成し、それにより、二本鎖ポリヌクレオチドの存在による3'末端の延長の検出を可能にする反応条件下で提供することを含む。二本鎖構造は、限定するものではないが、二本鎖構造へのインタカレーション時に優先的に蛍光を発する蛍光色素、延長されたポリヌクレオチド上のアクセプター（またはドナー）と、新たに形成されたヘアピンステムと三重鎖を形成するオリゴヌクレオチド上のドナー（またはアクセプター）との間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、試験ポリヌクレオチドに両方とも結合し、ヘアピンの形成時にFRET近接するFRETアクセプターおよびドナーなどを含む様々な方法で検出することができる。いくつかの実施形態では、単一ヌクレオチドによる延長後の試験ポリヌクレオチドのステム部分は、4~6塩基対長の範囲にあり、他の実施形態では、そのようなステム部分は、4~5塩基対長であり；さらに他の実施形態では、そのようなステム部分は4塩基対長である。いくつかの実施形態では、試験ポリヌクレオチドは10~20ヌクレオチドの範囲の長さを有し、他の実施形態では、試験ポリヌクレオチドは12~15ヌクレオチドの範囲の長さを有する。いくつかの実施形態では、延長を伴わないステムと延長を伴うステムとの間の融解温度の差を最大にするヌクレオチドを用いて試験ポリヌクレオチドを延長させることが有利または好都合である。したがって、いくつかの実施形態では、試験ポリヌクレオチドはdCまたはdGで伸長される（したがって、試験ポリヌクレオチドはステム形成のための適切な相補的ヌクレオチドを有するように選択される）。

30

40

【0025】

ヘアピン完了アッセイのための例示的な試験ポリヌクレオチドには、dGTPで延長することによって完了するp875（5'-CAGTTAAACT）（配列番号51）；dCTPで延長することによって完了するp876（5'-GAGTTAAACT）

50

(配列番号52) ; および dGTP を用いて延長することによって完了する p877 (5'-CAGCAAGGCT) (配列番号53) が含まれる。そのような試験ポリヌクレオチドについての例示的な反応条件は : 2.5 ~ 5 μM の試験ポリヌクレオチド、1 : 4000 希釈の Gel Red (登録商標) (Biotium, Inc., Fremont, CA 製のインタカレート色素)、200 mM のカコジル酸 KOH pH 6.8、1 mM の CoCl₂、0 ~ 20 % の DMSO ならびに所望の濃度の 3'-ONH₂ dGTP および TdT を含み得る。ヘアピンの完了は、360 nm に設定された励起フィルターおよび 635 nm に設定された吸収フィルター (emission filter) を使用して、28 ~ 38 °C の反応温度で TECAN リーダーなどの従来の蛍光計を使用して、Gel Red (登録商標) 色素の蛍光の増加によってモニターすることができる。本発明のこの態様のいくつかの実施形態では、TdT 変異体は、以下の工程によって、ヌクレオシド三リン酸のテンプレートフリー組み込みに対するそれらの能力について試験され得る : (a) 遊離 3'-ヒドロキシルを有する試験ポリヌクレオチド、TdT 変異体およびヌクレオシド三リン酸を、試験ポリヌクレオチドが一本鎖であるがヌクレオシド三リン酸の組み込み時に二本鎖ステム領域を有するヘアピンを形成する条件下で組み合わせる工程、ならびに (b) TdT 変異体がヌクレオシド三リン酸を組み込む能力の尺度として形成された二本鎖ステム領域の量を検出する工程。いくつかの実施形態では、ヌクレオシド三リン酸は、3'-O-ブロックヌクレオシド三リン酸である。

【0026】

オリゴヌクレオチドのテンプレートフリー酵素的合成

一般に、テンプレートフリー (または同等に、「テンプレート非依存」) 酵素的 DNA 合成の方法は、図 1 に示されているような、所定のヌクレオチドが各サイクルにおいてイニシエーターまたは成長鎖にカップリングされる工程の反復サイクルを含む。テンプレートフリー酵素的合成の一般的な要素は、以下の参考文献に記載されている : Ybertら、国際特許公開 WO/2015/159023 号パンフレット ; Ybertら、国際特許公開 WO/2017/216472 号パンフレット ; Hyman、米国特許第 5436143 号明細書 ; Hiattら、米国特許第 5763594 号明細書 ; ensen et al, *Biochemistry*, 57:1821-1832 (2018) ; Mathews et al, *Organic & Biomolecular Chemistry*, DOI: 0.1039/c6ob01371f (2016) ; Schmitz et al, *Organic Lett.*, 1(11):1729-1731 (1999)。

【0027】

イニシエーターポリヌクレオチド (100) は、例えば、遊離 3'-ヒドロキシル基 (103) を有する固体支持体 (102) に結合して提供される。イニシエーターポリヌクレオチド (100) (または後続のサイクルにおける伸長されたイニシエーターポリヌクレオチド) に、イニシエーターポリヌクレオチド (100) (または伸長されたイニシエーターポリヌクレオチド) の 3' 末端への 3'-O-保護-dNTP の酵素的組み込みにより、効な条件下で、3'-O-保護-dNTP およびテンプレートフリーポリメラーゼ、例えば TdT またはその変異体 (例えば、Ybertら、国際公開第 2017/216472 号 ; Championら、国際公開第 2019/135007 号パンフレット) を添加する (104)。この反応は、3'-ヒドロキシルが保護されている伸長されたイニシエーターポリヌクレオチドを生成する (106)。伸長配列が完了していない場合、次いで追加の別のサイクルが実施される (108)。伸長されたイニシエーターポリヌクレオチドが競合配列 (competed sequence) を含む場合、その後 3'-O-保護基を除去または脱保護することができ、所望の配列を元のイニシエーターポリヌクレオチドから切断することができる (110)。そのような切断は、様々な一本鎖切断技術のいずれかを使用して、例えば、元のイニシエーターポリヌクレオチド内の所定の位置に切断可能なヌクレオチドを挿入することによって行うことができる。例示的な切断可能なヌクレオチドは、ウラシル DNA グリコシラーゼによって切断されるウラシルヌクレオチドであり得る。伸長されたイニシエーターポリヌクレオチドが完了した配列を含まない場合、

その後 3' - O - 保護基を除去して遊離 3' - ヒドロキシル (1 0 3) を露出させ、伸長されたイニシエーターポリヌクレオチドをヌクレオチド付加および脱保護の別のサイクルに供する。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用される場合、ヌクレオチドまたはヌクレオシドの 3' - ヒドロキシルなどの特定の基に関して「保護された」および「ブロックされた」という用語は互換的に使用され、化学的または酵素的過程の際の基への化学的变化を防ぐ特定の基に共有結合的に結合している部分を意味することを意図している。特定の基がヌクレオシド三リン酸の 3' - ヒドロキシル、または 3' 保護 (またはブロック) ヌクレオシド三リン酸が組み込まれた延長断片 (または「延長中間体」) であるときはいつでも、防止された化学変化は、酵素的カップリング反応による延長断片 (または「延長中間体」) のさらなるまたはその後の伸長である。

10

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用される場合、「イニシエーター」 (または同等の用語、例えば、「イニシエーティング断片」、「イニシエーター核酸」、「イニシエーターオリゴヌクレオチド」など) は、通常、その末端に遊離 3' - ヒドロキシルを有する、T d T などのプレートフリーポリメラーゼによってさらに伸長することができる短いオリゴヌクレオチド配列を指す。一実施形態では、イニシエーティング断片は DNA イニシエーティング断片である。代替的な実施形態では、イニシエーティング断片は RNA イニシエーティング断片である。いくつかの実施形態では、イニシエーティング断片は、3 ~ 1 0 0 ヌクレオチド、特に 3 ~ 2 0 ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、イニシエーティング断片は一本鎖である。代替的な実施形態では、イニシエーティング断片は二本鎖である。いくつかの実施形態では、イニシエーターオリゴヌクレオチドは、その 5' 末端によって合成支持体に結合していてもよく、他の実施形態では、イニシエーターオリゴヌクレオチドは、例えば共有結合を介して合成支持体に直接結合している相補的オリゴヌクレオチドと二重鎖を形成することによって、合成支持体に間接的に結合していてもよい。いくつかの実施形態では、合成支持体は、固体平面の固体の離散領域であり得るか、またはビーズであり得る固体支持体である。

20

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、イニシエーターは、T d T が 3' - O - 保護 d N T P を結合し得る遊離ヒドロキシルを有する非核酸化合物、例えば B a i g a、米国特許公開第 2 0 1 9 / 0 0 7 8 0 6 5 号および米国特許公開第 2 0 1 9 / 0 0 7 8 1 2 6 号を含み得る。

30

【 0 0 3 1 】

合成が完了した後、所望のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、切断によってイニシエーターおよび固体支持体から放出され得る。多種多様な切断可能な結合または切断可能なヌクレオチドをこの目的のために使用することができる。いくつかの実施形態では、所望のポリヌクレオチドを切断すると、切断された鎖上に天然の遊離 5' - ヒドロキシルが残る。しかし、代替的な実施形態では、切断工程は、後続の工程で、例えばホスファターゼ処理によって除去され得る部分、例えば 5' - リン酸を残し得る。切断工程は、化学的、熱的、酵素的または光化学的方法によって実施することができる。いくつかの実施形態では、切断可能なヌクレオチドは、特異的グリコシラーゼ (例えば、それぞれ、ウラシルデオキシグリコシラーゼとそれに続くエンドヌクレアーゼ V I I I および 8 - オキソグアニン DNA グリコシラーゼ) によって認識されるデオキシウリジンまたは 8 - オキソ - デオキシグアノシンなどのヌクレオチドアナログであり得る。いくつかの実施形態では、切断は、最後から 2 番目の 3' ヌクレオチドとしてデオキシイノシンを有するイニシエーターを提供することによって達成することができ、これは、イニシエーターの 3' 末端でエンドヌクレアーゼ V によって切断され、放出されたポリヌクレオチド上に 5' - リン酸を残し得る。一本鎖ポリヌクレオチドを切断するためのさらなる方法は、参照により組み込まれる以下の参考文献に開示されており：米国特許第 5 , 7 3 9 , 3 8 6 号、同第 5 , 7 0 0 , 6 4 2 号、同第 5 , 8 3 0 , 6 5 5 号；および米国特許公開第 2 0 0 3 /

40

50

0186226号および同第2004/0106728号；ならびにUrdea and Hornの米国特許第5367066号に記載されている。

【0032】

いくつかの実施形態では、グリコシラーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼによる切断は、二本鎖DNA基質を必要とし得る。

【0033】

図1に戻ると、いくつかの実施形態では、各合成ステップにおいて、3'-O-保護dNTPの存在下で、TdTなどのテンプレートフリーポリメラーゼを使用して、ヌクレオチドの要求された配列がイニシエーター核酸にカップリングされる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドを合成する方法は、(a)遊離3'-ヒドロキシル(103)を有するイニシエーター(例えば、(100))を提供する工程；(b)延長条件下で、イニシエーターまたは遊離3'-ヒドロキシルを有する延長中間体とテンプレートフリーポリメラーゼとを、3'-O-保護ヌクレオシド三リン酸の存在下で反応させて、3'-O-保護延長中間体(106)を生成する工程(104)；(c)延長中間体を脱保護して、遊離3'-ヒドロキシルを有する延長中間体を生成する工程；ならびに(d)ポリヌクレオチドが合成される(110)まで工程(b)および(c)を繰り返す工程(108)；を含む。(「延長中間体」および「伸長断片」という用語は互換的に使用されるときがある)。いくつかの実施形態では、イニシエーターは、例えばその5'末端によって固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドとして提供される。上記の方法はまた、反応または延長の工程の後、ならびに脱保護工程の後に洗浄工程を含んでもよい。例えば、反応の工程は、所定のインキュベーション期間または反応時間の後に、例えば洗浄によって、組み込まれていないヌクレオシド三リン酸を除去するサブ工程を含んでもよい。そのような所定のインキュベーション期間または反応時間は、数秒、例えば30秒~数分、例えば30分であり得る。

10

20

30

40

50

【0034】

合成支持体上のポリヌクレオチドの配列が逆相補的部分配列を含む場合、逆相補的領域の水素結合の形成によって二次分子内または交差分子構造が作出され得る。いくつかの実施形態では、環外アミンのための塩基保護部分は、保護された窒素の水素が水素結合に関与することができず、それにより、そのような二次構造の形成が妨げられるように選択される。すなわち、塩基保護部分は、例えばヌクレオシドAとTとの間およびGとCとの間の通常の塩基ペアリングにおいて形成されるような水素結合の形成を防止するために使用することができる。合成の終わりに、塩基保護部分は除去することができ、ポリヌクレオチド産物は、例えば、そのイニシエーターから切断することによって固体支持体から切断することができる。

【0035】

塩基保護基を有する3'-O-ブロックdNTPモノマーを提供することに加えて、熱安定性テンプレートフリーポリメラーゼを使用して高温で伸長反応を行うことができる。例えば、40を超る活性を有する熱安定性テンプレートフリーポリメラーゼを使用することができ、または、いくつかの実施形態では、40~85の範囲の活性を有する熱安定性テンプレートフリーポリメラーゼを使用することができ、またはいくつかの実施形態では、40~65の範囲の活性を有する熱安定性テンプレートフリーポリメラーゼを使用することができる。

【0036】

いくつかの実施形態では、伸長条件は、水素結合または塩基スタッキングを阻害する溶媒を伸長反応混合物に添加することを含み得る。そのような溶媒としては、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノールなどの低誘電率の水混和性溶媒が挙げられる。同様に、いくつかの実施形態では、伸長条件は、限定するものではないが、n-ブタノール、エタノール、塩化グアニジニウム、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、塩化マグネシウム、フェノール、2-プロパノール、ドデシル硫酸ナトリウム、チオウレア、尿素などを含むカオトロピック剤の提供を含み得る。いくつかの実施形態では、伸長条件は、二次構造抑

制量の DMSO の存在を含む。いくつかの実施形態では、伸長条件は、二次構造の形成を阻害する DNA 結合タンパク質の提供を含むことができ、そのようなタンパク質には、限定するものではないが、一本鎖結合タンパク質、ヘリカーゼ、DNA グリコラーゼなどが含まれる。

【0037】

塩基保護されていない 3' - O - ブロック dNTP は、市販の販売業者から購入することができ、または公開されている技術、例えば米国特許第 7057026 号；Guo et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 105(27):9145-9150(2008)；Benner, U.S. patents 7544794 and 8212020；国際特許公開第 WO2004/005667 号、第 WO91/06678 号；Canard et al, Gene (本明細書に引用)；Metzker et al, Nucleic Acids Research, 22:4259-4267(1994)；Meng et al, J. Org. Chem., 14:3248-3252(3006)；米国特許公開第 2005/037991 号を使用して合成することができる。塩基保護された 3' - O - ブロック dNTP は、以下に記載のように合成することができる。

10

【0038】

塩基保護 dNTP が使用される場合、図 1 の上記方法は、塩基保護部分を除去する工程 (e) をさらに含んでもよく、(例えば) アシルまたはアミジン保護基の場合には工程 (e) は濃アンモニアで処理することを含み得る。

20

【0039】

上記の方法はまた、反応または延長の工程の後、ならびに脱保護工程の後に (1 または複数の) キャッピング工程および洗浄工程を含んでもよい。上述のように、いくつかの実施形態では、非延長遊離 3' - ヒドロキシルを、キャッピングされた鎖のさらなる伸長を完全に防止する化合物と反応させるキャッピング工程を含めることができる。いくつかの実施形態において、そのような化合物は、ジデオキシヌクレオシド三リン酸であり得る。他の実施形態では、遊離 3' - ヒドロキシルを有する非延長鎖は、それらを 3' - エキソヌクレアーゼ活性、例えば Exo I で処理することによって分解することができる。例えば、Hyman の米国特許第 5436143 号を参照されたい。同様に、いくつかの実施形態では、脱ブロックされない鎖を処理して、鎖を除去するか、またはさらなる延長に対して不活性にすることができる。

30

【0040】

いくつかの実施形態において、伸長工程 (延長工程またはカップリング工程とも呼ばれることもある) のための反応条件は、以下を含み得る：2.0 μM の精製 TdT；125 ~ 600 μM の 3' - O - ブロック dNTP (例えば、3' - O - N₃- ブロック dNTP)；約 10 ~ 約 500 mM のカコジル酸カリウムバッファー (pH 6.5 ~ 7.5 の間) および約 0.01 ~ 約 10 mM の二価カチオン (例えば、CoCl₂ または MnCl₂)、ここで、伸長反応は、50 μL の反応体積において、RT ~ 45 °C の範囲内の温度で 3 分間行うことができる。3' - O - ブロック dNTP が 3' - O - N₃- ブロック dNTP である実施形態では、脱ブロック工程のための反応条件は、以下を含み得る：700

40

【0041】

特定の用途に応じて、脱ブロックおよび/または切断の工程は、様々な化学的または物理的条件、例えば、光、熱、pH、特定の化学結合を切断することができる酵素などの特異的試薬の存在を含み得る。3' - O - ブロッキング基および対応する脱ブロッキング条件を選択する際の指針は、参照により組み込まれる以下の参考文献に見出すことができる：Benner、米国特許第 7544794 号および第 8212020 号；米国特許第 5

50

808045号；米国特許第8808988号；国際特許公開第WO91/06678号；および以下に引用される参考文献。いくつかの実施形態では、切断剤（脱ブロッキング試薬または脱ブロッキング剤と呼ばれることもある）は、例えばジチオスレート（DTT）などの化学的切断剤である。代替的な実施形態では、切断剤は、3'-リン酸ブロッキング基を切断し得る、例えばホスファターゼなどの酵素的切断剤であり得る。脱ブロッキング剤の選択は、使用される3'-ヌクレオチドブロッキング基のタイプ、1または複数のブロッキング基が使用されているかどうか、イニシエーターが生細胞または生物体または固体支持体に結合しているかどうかなどに依存し、穏やかな処理を必要とすることが当業者によって理解されると思われる。例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）などのホスフィンを使用して3'-O-アジドメチル基を切断することができ、パラジウム錯体を使用して3'-O-アリル基を切断することができ、または亜硝酸ナトリウムを使用して3'-O-アミノ基を切断することができる。特定の実施形態では、切断反応は、TCEP、パラジウム錯体または亜硝酸ナトリウムを含む。

10

【0042】

上述したように、いくつかの実施形態では、直交脱ブロッキング条件を使用して除去することができる2つ以上のブロッキング基を使用することが望ましい。以下の例示的なブロッキング基のペア（表4）を並列合成実施形態で使用することができる。本発明のこれらの実施形態で使用するために、他のブロッキング基ペア、または3つ以上を含む基が利用可能であり得ることが理解されよう。

表4：ブロッキング基の例示的なペア

20

3'-O-NH ₂	3'-O-アジドメチル
3'-O-NH ₂	3'-O-アリル
3'-O-NH ₂	3'-O-リン酸
3'-O-アジドメチル	3'-O-アリル
3'-O-アジドメチル	3'-O-リン酸
3'-O-アリル	3'-O-リン酸

【0043】

生細胞上でオリゴヌクレオチドを合成するには、穏やかな脱ブロックまたは脱保護条件、すなわち、細胞膜を破壊せず、タンパク質を変性させず、重要な細胞機能に干渉しない条件などが必要である。いくつかの実施形態では、脱保護条件は、細胞生存に適合する生理的条件の範囲内である。そのような実施形態では、酵素的脱保護は、生理的条件下で行われ得るので望ましい。いくつかの実施形態では、特異的酵素的に除去可能なブロッキング基は、それらの除去のために特異的酵素と会合する。例えば、エステルまたはアシルベースのブロッキング基は、アセチルエステラーゼなどのエステラーゼまたは同様の酵素で除去することができ、リン酸ブロッキング基は、T4ポリヌクレオチドキナーゼなどの3'-ホスファターゼで除去することができる。例として、3'-O-リン酸を、100 mM トリス-HCl（pH 6.5）の溶液としての10 mMのMgCl₂、5 mMの2-メルカプトエタノール、および1単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼでの処理によって除去することができる。反応は37 °Cの温度で1分間進行させる。

30

40

【0044】

「3'-リン酸ブロック」または「3'-リン酸保護」ヌクレオチドは、3'位のヒドロキシル基がリン酸含有部分の存在によってブロックされているヌクレオチドを指す。本発明による3'-リン酸ブロックヌクレオチドの例は、ヌクレオチジル-3'-リン酸モノエステル/ヌクレオチジル-2'、3'-環状リン酸、ヌクレコチジル-2'-リン酸モノエステルおよびヌクレオチジル-2'または3'-アルキルリン酸ジエステル、ならびにヌクレオチジル-2'または3'-ピロリン酸である。置換が脱リン酸化を妨げず、ホスファターゼにより遊離3'-OHをもたらすことを条件として、チオリン酸またはそのような化

50

合物の他のアナログも使用することができる。

【0045】

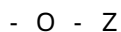
3'-O-エステル保護dNTPまたは3'-O-リン酸保護dNTPの合成および酵素的脱保護のさらなる例は、以下の参考文献に記載されている：Canard et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 92:10859-10863 (1995); Canard et al, Gene, 148:1-6 (1994); Cameron et al, Biochemistry, 16(23):5120-5126 (1977); Rasolonjatovo et al, Nucleosides & Nucleotides, 18(4&5):1021-1022 (1999); Ferrero et al, Monatshefte für Chemie, 131:585-616 (2000); Taunton-Rigby et al, J. Org. Chem., 38(5):977-985 (1973); Uemura et al, Tetrahedron Lett., 30(29):3819-3820 (1989); Becker et al, J. Biol. Chem., 242(5):936-950 (1967); Tsien、国際特許公開第WO1991/006678号。

10

【0046】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、プリンまたはピリミジン塩基と、それに共有結合的に結合した除去可能な3'-OHブロッキング基を有するリボースまたはデオキシリボース糖部分とを含む修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシド分子を含み、その結果、3'炭素原子は、以下の構造の基と結合している：

20



(式中、-Zは、 $-C(R')_2-O-R''$ 、 $-C(R'_2)N(R''_2)$ 、 $-C(R')_2-N(H)R''$ 、 $-C(R'_2)S-R''$ および $-C(R'_2)F$ のいずれかであり、各R''は、除去可能な保護基であるか、または除去可能な保護基の一部であり；各R'は、独立して、水素原子、アルキル、置換アルキル、アリールアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、複素環式、アシル、シアノ、アルコキシ、アリーロキシ、ヘテロアリーロキシもしくはアミド基、または結合基を介して結合した検出可能な標識であり；ただし、いくつかの実施形態では、そのような置換基は、最大10個の炭素原子および/または最大5個の酸素または窒素ヘテロ原子を有し；または $(R')_2$ は、式 $=C(R''_2)$ の基を表し(式中、各R''は、同じであっても異なってもよく、水素およびハロゲン原子ならびにアルキル基を含む群から選択され、ただし、いくつかの実施形態では、各R''のアルキルは、1~3個の炭素原子を有する)；ならびにここで、該分子を反応させて、各R''がHと交換されているか、またはZが $-(R'_2)-F$ である場合、該FがOH、SHもしくはNH₂、好ましくはOHと交換されている中間体を得てもよく、該中間体は水性条件下で解離して、遊離3'-OHを有する分子をもたらす；ただし、Zが $-C(R')_2-S-R''$ である場合、R'基は両方ともHではない)。ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシドのR'はアルキルまたは置換アルキルであり、ただし、そのようなアルキルまたは置換アルキルは1~10個の炭素原子および0~4個の酸素または窒素ヘテロ原子を有する。ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシドの-Zは式 $-C(R')_2-N_3$ のものである。ある特定の実施形態では、Zは、アジドメチル基である。

40

【0047】

いくつかの実施形態では、Zは、200以下の分子量を有する、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい切断可能な有機部分である。他の実施形態では、Zは、100以下の分子量を有する、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい切断可能な有機部分である。他の実施形態では、Zは、50以下の分子量を有する、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい切断可能な有機部分である。いくつかの実施形態では、Zは、200以下の分子量を有する、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい酵素的に切断可能な有機部分である。他の実施形態では、Zは、100以下の分子量を有する、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい酵素的に切断可能な有機部分である。他の実施形態では、Zは、50以下の分子量を

50

有する、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい酵素的に切断可能な有機部分である。他の実施形態では、Zは、200以下の分子量を有する、酵素的に切断可能なエステル基である。他の実施形態では、Zは、3'-ホスファターゼによって除去可能なリン酸基である。いくつかの実施形態では、以下の3'-ホスファターゼの1または複数を製造業者の推奨プロトコールと共に使用することができる：T4ポリヌクレオチドキナーゼ、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ、組換えシュリンブアルカリホスファターゼ（例えば、New England Biolabs、Beverly、MAから入手可能）

【0048】

さらなる実施形態では、3'-ブロックヌクレオチド三リン酸は、3'-O-アジドメチル、3'-O-NH₂または3'-O-アシル基のいずれかによってブロックされる。他の実施形態では、本発明の3'-O-ブロック基は、3'-O-メチル、3'-O-(2-ニトロベンジル)、3'-O-アシル、3'-O-アミン、3'-O-アジドメチル、3'-O-tert-ブトキシエトキシ、3'-O-(2-シアノエチル)、3'-O-ニトロ、および3'-O-プロパルギルを含む。他の実施形態では、3'-ブロックヌクレオチド三リン酸は、3'-O-アジドメチルまたは3'-O-NH₂のいずれかによってブロックされる。そのような3'-ブロックヌクレオチド三リン酸の合成および使用は、以下の参考文献に開示されている：米国特許第9410197号；同第8808988号；同第6664097号；同第5744595号；同第7544794号；同第8034923号；同第8212020号；同第10472383号；Guo et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 105(27):9145-9150(2008)；および同様の参考文献。

【0049】

いくつかの実施形態では、3'-O-保護基は電気化学的に不安定な基である。すなわち、保護基の脱保護または切断は、切断をもたらす保護基の近傍の電気化学的条件を変化させることによって達成される。そのような電気化学的条件の変化は、電圧差または光などの物理量を変化または印加して補助種を活性化することによってもたらすことができ、これにより、pHの上昇または低下などの保護基の部位における電気化学的条件の変化が引き起こされる。いくつかの実施形態では、電気化学的に不安定な基としては、例えば、pHが所定の値に変化するたびに切断されるpH感受性保護基が挙げられる。他の実施形態では、電気化学的に不安定な基としては、例えば保護基の部位での電圧差を増加または減少させることによって、還元または酸化条件が変更されるたびに直接切断される保護基が挙げられる。

【0050】

変異体TdTの作製

本発明の変異体は、公知の参照TdTコードポリヌクレオチドまたは野生型TdTコードポリヌクレオチドを突然変異させ、次いで従来分子生物学技術を用いてそれを発現させることによって作製することができる。例えば、所望の配列のポリペプチドをコードする所望の遺伝子またはDNA断片は、従来分子生物学技術を使用して、例えば、Stemmer et al, Gene, 164:49-53(1995)；Kodumal et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 101:15573-15578(2004)；などによって記載されたプロトコールを使用して組立てることができる。またはそのような遺伝子もしくはDNA断片は、Boule et al, Mol. Biotechnology, 10:199-208(1998)、もしくはBentolila et al, EMBO J., 14:4221-4229(1995)；などによって記載された従来分子生物学技術を使用して、選択された種の細胞から直接クローニングすることができる。

【0051】

所望のTdT変異体をコードする単離された遺伝子を、pET32(Novagen)などの発現ベクターに挿入して発現ベクターを得て、次いでこれを使用して、従来分子生物学技術を使用して変異体TdTタンパク質を作製および発現させることができる。正し

い配列を有するベクターにより産生株の大腸菌 (E. coli) を形質転換させることができる。

【0052】

形質転換株を従来の技術を用いて培養して、ペレット化し、それからTdTタンパク質を抽出する。例えば、予め調製したペレットを30~37の水浴中で解凍する。完全に解凍したら、ペレットを、50mMのトリス-HCL (Sigma) pH 7.5、150mMのNaCl (Sigma)、0.5mMのメルカプトエタノール (Sigma)、5%のグリセロール (Sigma)、20mMのイミダゾール (Sigma) および100mLに対して1錠のプロテアーゼカクテル阻害剤 (ThermoFisher) で構成される溶解バッファーに再懸濁する。未成熟溶菌および凝集物の残存を回避するために、慎重な再懸濁が行われる。再懸濁した細胞を、フルカラー均一性が得られるまで、数サイクルのフレンチプレスを通して溶解する。使用される通常の圧力は14,000psiである。次いで、溶解物を10,000rpmで1時間~1時間30分遠心分離する。カラム精製の前に、遠心分離物を0.2μmフィルターに通してあらゆるデブリを除去する。

10

【0053】

TdTタンパク質は、一工程のアフィニティー手順で遠心分離物から精製することができる。例えば、Ni-NTAアフィニティーカラム (GE Healthcare) を使用して、TdTポリメラーゼを結合することができる。最初に、カラムを洗浄し、15カラム容積の50mMトリス-HCL (Sigma) pH 7.5、150mMのNaCl (Sigma) および20mMのイミダゾール (Sigma) で平衡化する。TdTポリメラーゼを、平衡化後にカラムに結合させ、次いで、例えば、50mMのトリス-HCL (Sigma) pH 7.5、500mMのNaCl (Sigma) および20mMのイミダゾール (Sigma) で構成される洗浄バッファーを15カラム容積でカラムに適用することができる。そのような洗浄後、TdTポリメラーゼを50mMのトリス-HCL (Sigma) pH 7.5、500mMのNaCl (Sigma) および0.5Mのイミダゾール (Sigma) で溶出する。目的のTdTポリメラーゼの最高濃度に対応する画分を回収し、単一試料にプールする。プールした画分を透析バッファー (20mMのトリス-HCL、pH 6.8、200mMのNaCl、50mMのMgOAc、100mMの[NH₄]₂SO₄) に対して透析する。その後、透析液を濃縮フィルター (Amicon Ultra-30、Merk Millipore) を用いて濃縮する。濃縮された酵素を少量のアリコートに分配し、最終濃度50%のグリセロールを添加し、次いで、それらのアリコートを-20で凍結し、長期間保存する。精製酵素の5μLの様々な画分をSDSPAGEゲルで分析する。

20

30

【0054】

いくつかの実施形態では、TdT変異体は、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)；化合物 (例えば、ポリエチレングリコール)；タンパク質-タンパク質結合ペア (例えば、ビオチン-アビジン)；アフィニティーカップリング；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動作可能に連結され得る。リンカー部分は、TdT変異体とは別個であってもよく、TdT変異体の一部であってもよい。本発明のTdT変異体に使用するための例示的なHisタグは、MASSH H H H H S S G S E N L Y F Q T G S S G - (配列番号54) である。タグ-リンカー部分は、TdT変異体のヌクレオチド結合活性または触媒活性に干渉しない。

40

【0055】

上記の方法または同等の方法は、活性および/または保存に必要なまたは有用な塩、pHバッファー、担体化合物などの様々な試薬と混合することができる単離されたTdT変異体をもたらす。

【0056】

本発明の方法を実施するためのキット

本発明は、本発明の方法を実施するための様々なキットを含む。一態様では、本発明の

50

キットは、本明細書に記載のテンプレートフリー酵素的ポリヌクレオチド合成を実施するのに適した製剤中に本発明のTdT変異体を含む。そのようなキットはまた、成長鎖への3'-O-保護dNTPのテンプレートフリー付加または組み込みを最適化するための反応条件を提供する合成バッファーを含み得る。いくつかの実施形態では、本発明のキットは、3'-O-可逆的保護dNTPをさらに含む。そのような実施形態では、3'-O-可逆的保護dNTPは、3'-O-アミノ-dNTPまたは3'-O-アジドメチル-dNTPを含み得る。さらなる実施形態では、キットは、以下の品目1または複数を、個別または上述の品目と一緒にいずれかで含み得る：(i)本明細書に記載の脱保護工程を実施するための脱保護試薬、(ii)イニシエーターが結合した固体支持体、(iii)完了したポリヌクレオチドを固体支持体から放出するための切断試薬、(iv)酵素的付加またはカップリング工程の終了時に未反応の3'-O-保護dNTPを除去するための洗浄試薬またはバッファー、および(v)合成後処理試薬、例えば精製カラム、脱塩試薬、溶出試薬など。いくつかの実施形態では、本発明のキットは、単一操作で複数の合成反応を実施するための反応ウェルのアレイを含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなアレイは、24、48、96、384または1536ウェルを含む従来のフィルタープレートであり得る。

10

【0057】

上記品目(ii)および(iii)に関して、特定のイニシエーターおよび切断試薬は相伴う。例えば、イノシン切断可能ヌクレオチドを含むイニシエーターは、エンドヌクレアーゼV切断試薬を伴うことができ；ニトロベンジル光開裂性リンカーを含むイニシエーターは、光開裂性リンカーを切断するための適切な光源を伴うことができ；ウラシルを含むイニシエーターはウラシルDNAグリコシラーゼ切断試薬を伴うことができる；などである。

20

【0058】

実施例1

TdT変異体の組み込み活性の試験

表5に列挙したTdT変異体を従来の技術を用いて調製し、精製し、3'-O-アミノ-2'-デオキシヌクレオシド三リン酸モノマーを使用して上記の2つの別個のヘアピンアッセイで試験した。アッセイにおけるそれらの性能を、高い組み込み率を有することが公知のマウス-ウシキメラTdT(M57と呼ばれる、配列番号55)の性能と比較した

30

表5

40

50

名称	配列番号	mg/ml 発現	ヘアピン+G (%M57)	ヘアピン+C (%M57)	3'-OH (付加なし) (%M57)
B10	4	2.3	34	36	25
B19	7	1.0	83	107	42
B57	10	0.8	34	91	62
B59	13	2.8	9	-73	-1
B63	16	2.8	21	162	41
F15	19	7.3	54	625	85
F24	22	5.0	25	324	85
F32	25	5.8	35	536	91
F57	28	0.4	15	172	24
N100	31	8.1	31	90	10
N100or	34	6.2	53	362	28
N14	37	2.8	69	510	96
N27	40	4.3	111	363	85
N35	43	2.8	70	480	101
N72	46	1.2	70	222	87
N93or	49	0.4	37	267	61
M57	55	8.9	100	100	100

10

20

データから分かるように、TdT変異体の多くは、標準のM57よりもはるかに高いカップリング効率を有する。低濃度の3'末端dNTP(20 μM)の存在下で反応を行ったので、その増加は主に、特定のdNTPに対するより良好な親和性に起因する。発現レベルは、Ni-NTA(合計300 μL、培養物50 mlに由来する)からの溶出後のタンパク質濃度に対応する。

【0059】

定義

アミノ酸は、以下の命名法に従ってそれらの1文字または3文字コードのいずれかによって表される：A：アラニン(Ala)；C：システイン(Cys)；D：アスパラギン酸(Asp)；E：グルタミン酸(Glu)；F：フェニルアラニン(Phe)；G：グリシン(Gly)；H：ヒスチジン(His)；I：イソロイシン(Ile)；K：リジン(Lys)；L：ロイシン(Leu)；M：メチオニン(Met)；N：アスパラギン(Asn)；P：プロリン(Pro)；Q：グルタミン(Gln)；R：アルギニン(Arg)；S：セリン(Ser)；T：スレオニン(Thr)；V：バリン(Val)；W：トリプトファン(Trp)およびY：チロシン(Tyr)。

30

【0060】

置換残基に関して「機能的に等価」とは、変異体TdTの置換残基が、配列番号1と相同な配列を有する別のTdTの配列中の残基と同一の機能的役割を有することを意味する。機能的に等価な残基は、配列アラインメントを使用することによって、例えば、Multalinライナーアラインメントソフトウェア(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>; 1988, Nucl. Acids Res., 16(22), 2510881-10890)を使用することによって同定することができる。アラインメント後、機能的に等価な残基は、考慮される異なる配列上の相同位置にある。配列アラインメントおよび機能的に等価な残基の同定は、任意のTdTと、種間を含むそれらの天然変異体との間で決定することができる。

40

【0061】

タンパク質に関して「単離された」とは、その天然環境の成分または不均一な反応混合物から同定および分離および/または回収されたような化合物を意味する。天然環境また

50

は反応混合物の夾雑物成分は、タンパク質の機能に干渉する材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、本発明のタンパク質は、(1)ローリー法によって決定される場合、95重量%超、最も好ましくは99重量%超まで精製され、(2)スピニングカップシークエネーターの使用によってN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで精製され、または(3)クーマシーブルーもしくは、好ましくは銀染色を使用して還元もしくは非還元条件下でSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。組換え方法論によって製造される場合、本発明の単離されたタンパク質は、タンパク質の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、組換え細胞内に*in situ*で本発明のタンパク質を含み得る。通常、本発明の単離されたタンパク質は、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

10

【0062】

「キット」は、本発明の方法を実施するための材料または試薬を送達するための任意の送達系を指す。反応アッセイの文脈において、そのような送達系は、ある場所から別の場所への反応試薬(例えば、適切な容器中の1または複数のTdT変異体、反応バッファー、3'-O-保護dNTP、脱保護試薬、イニシエーターが結合した固体支持体など)の貯蔵、輸送または送達を可能にする系および/もしくは化合物(例えば、希釈剤、界面活性剤、担体など)、ならびに/または補助材料(例えば、バッファー、アッセイを実施するための書面の説明書など)を含む。例えば、キットは、関連する反応試薬および/または支持材料を含む1または複数のエンクロージャ(例えば、ボックス)を含む。そのような内容物は、目的のレシピエントと一緒にまたは別々に送達することができる。例えば、第1の容器は、合成方法で使用するための1または複数のTdT変異体を含んでもよく、第2の容器または追加の容器は、脱保護剤、イニシエーターを有する固体支持体、3'-O-保護dNTPなどを含んでもよい。

20

【0063】

互換的に使用される「突然変異体」または「変異体」は、本明細書に記載の天然または参照のTdTポリペプチドに由来し、1または複数の位置に変更または改変、すなわち置換、挿入および/または欠失を含むポリペプチドを指す。変異体は、当該技術分野で周知の様々な技術によって得ることができる。特に、野生型タンパク質をコードするDNA配列を改変するための技術の例としては、限定するものではないが、部位特異的突然変異誘発、ランダム突然変異誘発、配列シャッフリングおよび合成オリゴヌクレオチド構築が挙げられる。突然変異誘発活性は、タンパク質の配列中の、または本発明の場合はポリメラーゼの配列中の1個または数個のアミノ酸の欠失、挿入または置換からなる。置換を指定するために以下の用語が使用される：L238Aは、参照または野生型配列の238位のアミノ酸残基(ロイシン、L)がアラニン(A)に変更されることを示す。A132V/I/Mは、親配列の132位のアミノ酸残基(アラニン、A)が、以下のアミノ酸：バリン(V)、イソロイシン(I)またはメチオニン(M)のいずれかによって置換されていることを示す。置換は、保存的置換であっても、または非保存的置換であってもよい。保存的置換の例は、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジンおよびヒスチジン)、酸性アミノ酸(グルタミン酸およびアスパラギン酸)、極性アミノ酸(グルタミン、アスパラギンおよびスレオニン)、疎水性アミノ酸(メチオニン、ロイシン、イソロイシン、システインおよびバリン)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン)および小アミノ酸(グリシン、アラニンおよびセリン)の群の内である。

30

40

【0064】

「配列同一性」は、2つのポリペプチド配列または2つのポリヌクレオチド配列などの2つの配列間の一致(例えば、同一のアミノ酸残基)の数(または画分、通常パーセントとして表される)を指す。配列同一性は、配列ギャップを最小化しながら重複および同一性を最大化するように整列されたときの配列を比較することによって決定される。特に、配列同一性は、2つの配列の長さに応じて、いくつかの数学的にグローバルまたはローカルなアライメントアルゴリズムのいずれかを使用して決定することができる。類似の

50

長さの配列は、好ましくは、配列を全長にわたって最適にアラインメントするグローバルアライメントアルゴリズム（例えば、Needleman and Wunschアルゴリズム；Needleman and Wunsch, 1970）を使用してアラインメントされ、一方、実質的に異なる長さの配列は、好ましくは、ローカルアライメントアルゴリズム（例えば、Smith and Watermanアルゴリズム（Smith and Waterman, 1981）またはAltschulアルゴリズム（Altschul et al., 1997；Altschul et al., 2005））を使用してアラインメントされる。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のアラインメントは、例えば、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>または<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>などのインターネットウェブサイトを利用して、当該技術分野の技能の範囲内である様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。本明細書の目的のために、アミノ酸配列同一性%値とは、Needleman-Wunschアルゴリズムを使用して2つの配列の最適なグローバルアラインメントを作成するペアワイズ配列アラインメントプログラムEMBOSS Needleを使用して生成された値を指し、すべての検索パラメータはデフォルト値、すなわちScoring行列 = BLOSUM 62、Gap open = 10、Gap extend = 0.5、End gap penalty = false、End gap open = 10およびEnd gap extend = 0.5に設定される。

【0065】

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は互換的に使用され、それぞれヌクレオチドモノマーまたはそのアナログの直鎖ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを構成するモノマーは、ワトソン-クリック型の塩基ペアリング、塩基スタッキング、Hoogsteenまたは逆Hoogsteen型の塩基ペアリングなど、モノマーとモノマーとの相互作用の規則的なパターンによって天然のポリヌクレオチドに特異的に結合することができる。そのようなモノマーおよびそれらのヌクレオシド間結合は、天然に存在してもよく、またはそのアナログ、例えば天然に存在するアナログまたは天然に存在しないアナログであってもよい。天然に存在しないアナログとしては、PNA、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、フルオロフォアまたはハプテンなどの標識の結合を可能にする結合基を含む塩基などを挙げることができる。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの使用が、ポリメラーゼによる延長、リガーゼによるライゲーションなどの酵素的処理を必要とするときはいつでも、当業者は、それらの事例においてオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、任意の位置またはいくつかの位置にヌクレオシド間結合、糖部分または塩基の特定のアナログを含有しないことを理解するであろう。ポリヌクレオチドは、典型的には、それらが通常「オリゴヌクレオチド」と呼ばれる場合数個のモノマー単位、例えば5～40個から、数千個のモノマー単位のサイズの範囲である。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが「ATGCCCTG、」などの文字の配列（大文字または小文字）によって表されるときはいつでも、別途指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、ヌクレオチドは左から右に向かって5'→3'の順序であり、「A」はデオキシアデノシンを表し、「C」はデオキシシチジンを表し、「G」はデオキシグアノシンを表し、「T」はチミジンを表し、「I」はデオキシイノシンを表し、「U」はウリジンを表すことが理解されよう。特に明記しない限り、用語および原子番号付けの慣習は、Strachan and Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, New York, 1999)に開示されているものに従う。通常、ポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって連結された4つの天然ヌクレオシド（例えば、DNAについてはデオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、デオキシチミジンまたはRNAについてはそれらのリボース対応物）を含む。しかしながら、それらは、例えば修飾塩基、糖類またはヌク

レオシド間結合を含む非天然ヌクレオチドアナログも含み得る。酵素が、活性のための特異的なオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質の要件、例えば、一本鎖DNA、RNA/DNA二重鎖などを有する場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質に対する適切な組成物の選択が、特に、Sambrook et al, Molecular Cloning, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) および同様の参考文献などの論文からの指針により、十分に当業者の知識の範囲内であることは当業者には明らかである。同様に、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、一本鎖形態または二本鎖形態（すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとそのそれぞれの相補体との二重鎖）のいずれかを指し得る。どの形態または両方の形態が用語の使用の文脈から意図されているかは、当業者には明らかであろう。

10

【0066】

「プライマー」は、天然または合成のいずれかのオリゴヌクレオチドであって、ポリヌクレオチドテンプレートと二重鎖を形成する際に核酸合成の開始点として作用し、その3'末端からテンプレートに沿って延長され、延長された二重鎖を形成することができるオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの延長は、通常、DNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼなどの核酸ポリメラーゼを用いて行われる。延長過程で付加されるヌクレオチドの配列は、テンプレートポリヌクレオチドの配列によって決定される。通常、プライマーはDNAポリメラーゼによって延長される。プライマーは、通常、14~40ヌクレオチドの範囲、または18~36ヌクレオチドの範囲の長さを有する。プライマーは、様々な核酸増幅反応、例えば、単一のプライマーを使用する線形増幅反応、または2つ以上のプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応で使用される。特定の用途のためのプライマーの長さおよび配列を選択するための指針は、参照により組み込まれる以下の参考文献によって証明されるように、当業者に周知である：Dieffenbach, editor, PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd Edition (Cold Spring Harbor Press, New York, 2003)。

20

【0067】

「置換」とは、あるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置き換えられることを意味する。好ましくは、「置換」という用語は、天然に存在する標準的な20アミノ酸残基、希少な天然に存在するアミノ酸残基（例えば、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、アロヒドロキシリジン、6-N-メチルリジン、N-エチルグリシン、N-メチルグリシン、N-エチルアスパラギン、アロ-イソロイシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルバリン、ピログルタミン、アミノ酪酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン）、およびしばしば合成的に作製される天然に存在しないアミノ酸残基（例えばシクロヘキシル-アラニン）から選択される別のものによるアミノ酸残基の置き換えを指す。好ましくは、「置換」という用語は、天然に存在する標準的な20アミノ酸残基から選択される別のものによるアミノ酸残基の置き換えを指す。記号「+」は、置換の組み合わせを示す。

30

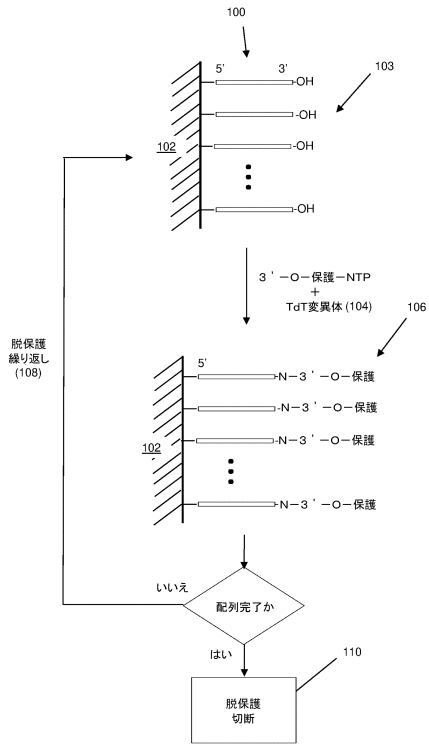
【0068】

本開示は、記載された特定の形態の範囲に限定されることを意図するものではなく、本明細書に記載の変形形態の代替形態、修正形態、および等価物を包含することを意図している。さらに、本開示の範囲は、本開示を考慮して当業者に明らかになり得る他の変形を完全に包含する。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

40

【 図 面 】

【 図 1 】



10

20

【 配 列 表 】

2023522234000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/059861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/12 C12P19/34 ADD.		
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) C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2020/099451 A1 (DNA SCRIPT [FR]) 22 May 2020 (2020-05-22)	1-5
A, P	paragraphs [0008], [0033] claim 6 sequences 29,30	6-12
A	----- US 2019/264248 A1 (YBERT THOMAS [FR] ET AL) 29 August 2019 (2019-08-29) cited in the application paragraphs [0014], [0031], [0056] - [0064], [0159] claims 18-26,27,33,34,37 ----- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 *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 30 June 2021		Date of mailing of the international search report 15/07/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tudor, Mark

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/059861

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MICHAEL A. JENSEN ET AL: "Template-Independent Enzymatic Oligonucleotide Synthesis (TiEOS): Its History, Prospects, and Challenges", BIOCHEMISTRY, vol. 57, no. 12, 13 March 2018 (2018-03-13), pages 1821-1832, XP055729259, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00937 abstract page 1823, right-hand column, paragraph 5 - page 1824, left-hand column, paragraph 3 page 1828, right-hand column, paragraph 2 page 1829, left-hand column, line 11, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 1	1-12
A	----- US 5 763 594 A (HIATT ANDREW C [US] ET AL) 9 June 1998 (1998-06-09) cited in the application column 4, lines 55-67 column 9, lines 25-58 examples 3-5 claims 1-6 -----	1-12

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/059861

Box No. I 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:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/059861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020099451 A1	22-05-2020	AU 2019379287 A1 CA 3119845 A1 WO 2020099451 A1	03-06-2021 22-05-2020 22-05-2020

US 2019264248 A1	29-08-2019	AU 2015248673 A1 CA 2945898 A1 EP 3132048 A1 EP 3620526 A1 FR 3020071 A1 IL 248234 A JP 6783145 B2 JP 2017514465 A KR 20160138581 A US 2019264248 A1 US 2019300923 A1 US 2021130863 A1 WO 2015159023 A1	03-11-2016 22-10-2015 22-02-2017 11-03-2020 23-10-2015 30-06-2020 11-11-2020 08-06-2017 05-12-2016 29-08-2019 03-10-2019 06-05-2021 22-10-2015

US 5763594 A	09-06-1998	NONE	

10

20

30

40

50

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,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,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

F ターム (参考)

QR35 QR62 QS24

4B064 AF27 CA21 CC24 DA20