



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0004602
(43) 공개일자 2024년01월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1093 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7040428
- (22) 출원일자(국제) 2022년04월26일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년11월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/026333
- (87) 국제공개번호 WO 2022/232134
국제공개일자 2022년11월03일
- (30) 우선권주장
63/179,828 2021년04월26일 미국(US)

- (71) 출원인
카메나 바이오사이언스 리미티드
영국 새프린 왈든 에섹스 씨비10 1엑스엘 새프린
왈든 리틀 체스터포드 더 사이언스 빌리지 체스터
포드 리서치 파크
- (72) 발명자
스텝플 더렉
영국 새프린 왈든 에섹스 씨비10 1엑스엘 리틀 체
스터포드 더 사이언스 빌리지 체스터포드 리서치
파크
만코브스카 실비아
영국 새프린 왈든 에섹스 씨비10 1엑스엘 리틀 체
스터포드 더 사이언스 빌리지 체스터포드 리서치
파크
벨 네일
영국 새프린 왈든 에섹스 씨비10 1엑스엘 더 사이
언스 빌리지 체스터포드 리서치 파크
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

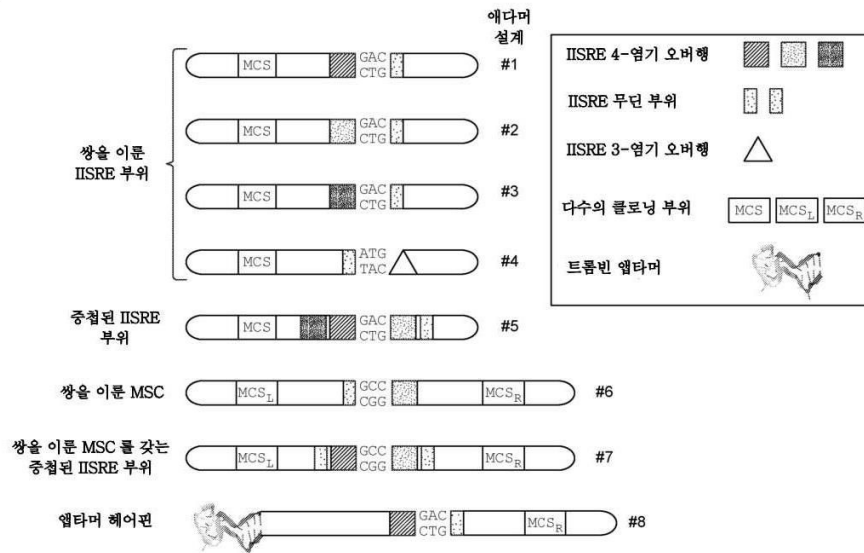
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 포스포라미다이트 없이 핵산을 효소 합성하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

물질 조성물 및 대규모 포스포라미다이트 매개 화학 합성 없이도 완전한 천연 핵산 공급원을 사용하여 임의의 핵산(NA) 서열을 합성하는 방법이 본원에 기술된다.

대표도



명세서

청구범위

청구항 1

이중 가닥 애다머로서, 상기 애다머는:

- a) 제1 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(IISRE) 서열;
- b) N-량체 서열;
- c) 적어도 제2 IISRE 서열을 포함하고;

상기 애다머의 적어도 일 단부는 헤어핀 구조를 포함하는, 애다머.

청구항 2

제1항에 있어서, 애다머는 애다머의 양 단부에 헤어핀 구조를 포함하는, 애다머.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 애다머는:

- a) 제1 IISRE 서열;
- b) 제2 IISRE 서열;
- c) N-량체 서열; 및
- d) 적어도 제3 IISRE 서열을 포함하는, 애다머.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 애다머는:

- a) 제1 IISRE 서열;
- b) 제2 IISRE 서열;
- c) N-량체 서열;
- d) 제3 IISRE 서열; 및
- e) 적어도 제4 IISRE 서열을 포함하는, 애다머.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 애다머는 다중 클로닝 부위(MCS) 서열을 추가로 포함하되, 상기 MCS 서열은 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제 서열을 포함하는, 애다머.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, IISRE 서열 중 적어도 하나는 MlyI 서열, NgoAVII 서열, SspD5I 서열, AlwI 서열, BccI 서열, BcefI 서열, PleI 서열, BceAI 서열, BceSIV 서열, BscAI 서열, BspD6I 서열, FauI 서열, EarI 서열, BspQI 서열, BfuAI 서열, PaqCI 서열, Esp3I 서열, BbsI 서열, BbvI 서열, BtgZI 서열, FokI 서열, BsmFI 서열, BsaI 서열, BcoDI 서열, 및 HgaI 서열로부터 선택되는, 애다머.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 헤어핀 구조는 앵타머 서열을 포함하는, 애다머.

청구항 8

제7항에 있어서, 앵타머 서열은 pL1 앵타머 서열, 트롬빈 29-량체 앵타머 서열, S2.2 앵타머 서열, ART1172 앵타머 서열, R12.45 앵타머 서열, Rb008 앵타머 서열, 및 38NT SELEX 앵타머 서열로부터 선택되는, 애다머.

청구항 9

고형 지지체에 고정된 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 애다머를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 고형 지지체는 비드인, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 비드는 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 아가로스 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 고형 지지체는 웰 또는 챔버의 표면인, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 웰 또는 챔버는 다중 웰 플레이트의 일부인, 조성물.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

애다머는 적어도 하나의 앵타머 서열을 포함하는 헤어핀 구조를 포함하고,

고체 표면은 상기 앵타머 서열에 결합하는 적어도 하나의 리간드를 포함하고,

애다머는 상기 적어도 하나의 앵타머 서열의 상기 적어도 하나의 리간드에 대한 결합을 통해 상기 고체 표면에 고정되는, 조성물.

청구항 15

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

애다머는 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행을 포함하고,

고체 표면은 상기 적어도 하나의 5' 행오버 또는 3' 행오버에 상보적인 단일 가닥 부분을 갖는 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산 분자를 포함하고,

상기 적어도 하나의 5' 행오버 또는 3' 행오버를 고체 표면 상의 상기 적어도 하나의 단일-가닥 또는 부분 이중-가닥 핵산에 혼성화함으로써, 애다머는 고체 표면에 고정되는, 조성물.

청구항 16

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

애다머는 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행을 포함하고,

고체 표면은 상기 적어도 하나의 5' 행오버 또는 3' 행오버에 상보적인 단일 가닥 부분을 갖는 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산 분자를 포함하고,

상기 적어도 하나의 5' 행오버 또는 3' 행오버를 고체 표면 상의 상기 적어도 하나의 단일-가닥 또는 부분 이중-가닥 핵산에 혼성화하고, 애다머 및 상기 적어도 하나의 단일-가닥 또는 부분 이중-가닥 핵산을 결합시킴으로써, 애다머는 고체 표면에 고정되는, 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 애다머를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은:

- a) 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자를 화학적으로 합성하는 단계로서, 상기 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 상기 제2 단일-가닥 핵산 분자의 서열은 생성될 애다머의 부분을 포함하되,
상기 제1 단일 가닥 핵산 분자는 상기 제2 단일 가닥 핵산 분자 상의 제2 영역 및 자가-상보성인 제2 영역에 상보성인 제1 영역을 포함하고,
상기 제2 단일-가닥 핵산 분자는 자가-상보성인 제1 영역 및 상기 제1 단일-가닥 핵산 분자 상의 제1 영역에 상보성인 제2 영역을 포함하는, 단계;
- b) 부분 이중 가닥 핵산 분자를 생성하기 위해 상기 제1 단일 가닥 핵산 및 상기 제2 단일 가닥 핵산을 혼성화하는 단계; 및
- c) 헤어핀에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 형성하기 위해 상기 부분 이중-가닥 핵산 분자를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 단계 (c)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써 적절하게 걸찰된 애다머를 정제하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 단계 (b) 이후 그리고 단계 (c) 이전에, 부분 이중-가닥 핵산 분자를 MutS 효소와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 애다머를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은:

- a) 선택적으로 활성화될 수 있는 하나 이상의 DNA효소의 양 측면 상에 애다머 서열이 위치하도록 애다머 서열을 파지미드로 클로닝하는 단계;
- b) 헬퍼 파지를 사용하여 상기 파지미드를 포장된 박테리오파지로 전환하는 단계로서, 상기 포장된 박테리오파지는 하나 이상의 DNA효소가 양쪽 측면에 위치하는 애다머 서열을 포함하는 단일-가닥 DNA를 생성하는, 단계;
- c) 상기 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA를 정제하는 단계;
- d) 상기 정제된 단일-가닥 DNA가 접혀서 하나 이상의 DNA효소 구조 및 이중-가닥 애다머 서열의 대부분을 생성하게 하는, 단계;
- e) 상기 하나 이상의 DNA효소를 활성화함으로써, 상기 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA로부터 애다머 서열을 절제하는 단계; 및
- f) 상기 절제된 애다머를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 단계 (f)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써 적절하게 걸찰된 애다머를 정제하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 애다머를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은:

- a) 애다머 서열을 플라스미드로 클로닝하는 단계;
- b) 적합한 숙주 유기체에서 상기 플라스미드를 증식시키는 단계;
- c) 상기 숙주 유기체로부터 상기 플라스미드를 정제하는 단계;
- d) 상기 플라스미드로부터 애다머 서열을 절제하기 위해, 상기 정제된 플라스미드를 니카아제 효소 및 제한 엔도뉴클레아제 효소 중 하나 이상으로 처리하는 단계; 및
- e) 헤어핀 구조에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 생성하기 위해, 상기 절제된 애다머 서열

을 리가아제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 합성하는 방법으로서, 상기 방법은:

- a) 고행 지지체에 고정되는 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 상기 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계;
- b) 고행 지지체에 고정되는 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 상기 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계;
- c) 상기 제1 애다머에 위치된 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 상기 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 상기 고행 지지체에 고정되고 상기 제1 IISRE 서열, 상기 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계;
- d) 상기 제2 애다머에 위치된 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 상기 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 상기 제2 N-량체 서열, 상기 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 상기 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계;
- e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 상기 제1 절단된 생성물 및 상기 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계;
- f) 상기 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 상기 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 상기 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및
- g) 상기 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 상기 단계 (f)의 생성물 및/또는 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (a) 내지 (f)의 임의의 조합을 반복하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 리가아제 효소는 인간 DNA 리가아제 III(hLig3)인, 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 리가아제 효소는 T4 DNA 리가아제인, 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 핵산 서열은 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 500개, 또는 적어도 약 1000개, 또는 적어도 약 2000개, 또는 적어도 약 3000개, 또는 적어도 약 4000개, 적어도 약 5000개 뉴클레오타이드 길이인, 방법.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 핵산 서열을 포함하는 합성된 핵산 분자는 적어도 80%의 순도를 갖는, 방법.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 핵산 서열을 포함하는 합성된 핵산 분자는 적어도 90%의 순도를 갖는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2021년 4월 26일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/179,828호에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 그 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다. 2022년 4월 26일에 생성된 상기 ASCII 사본의 명칭은 "DNWR-009_001WO_SeqList.txt"이며, 크기는 약 17,420 바이트이다.

배경 기술

[0005] 당업계는 포스포라미다이트 매개 화학 합성과 관련된 불량율 및 유기 폐기물 생성을 상당히 감소시키는 핵산 합성을 필요로 한다. 또한, 당업계는 비용이 상당히 감소된 핵산 합성을 필요로 한다. 물질 조성물 및 대규모 포스포라미다이트 매개 화학 합성 없이도 완전한 천연 핵산 공급원을 사용하여 임의의 핵산(NA) 서열을 합성하는 방법이 본원에 기술된다.

발명의 내용

[0006] 본 개시는 각각이 적어도 3개의 염기쌍(bp)으로 이루어진 페이로드를 갖는 하나 이상의 애다머(Addamer)를 제공한다. 3량체 공여자 또는 수용자 애다머의 완전한 세트 설계는 64개의 3량체 bp 모두를 페이로드로서 포함할 수 있다. 다른 구현에는 페이로드의 길이가 길어진 유사한 헤어핀 설계를 갖는다. 페이로드가 3인 경우, 64개의 애다머가 있을 수 있다. 페이로드가 4 bp인 경우, 주어진 라이브러리에 256개의 애다머가 있을 수 있다. 마찬가지로, 5량체 페이로드의 경우 1,024개의 요소가 있고, 6량체 페이로드의 경우 4,096개의 요소가 있다. 애다머는 이중 가닥이므로, 다양한 설계 특징을 배치함으로써 주어진 라이브러리에 대해 가능한 모든 N-량체 최대값보다 적은 수를 사용하고도 여전히 완전한 서열 커버리지를 달성하는 것이 가능하다.

[0007] 애다머는 여러 개의 염기로 이루어진 헤어핀 턴 및 짧은 서열의 신장을 포함할 수 있는데, 이들은 헤어핀 영역에서 엔도뉴클레아제로 페이로드를 절단할 때 이를 안내하는 데 사용될 수 있다. 또한, 고행 지지체에 대한 부착을 용이하게 하기 위해, 헤어핀 영역은 다음과 같은 여러가지 가능한 특이적 구조 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 친화도 정제 또는 부착을 위한 앵커 서열; 자가 절단을 조절하기 위한 효소 서열(DNAzyme); 점착성 단부 결합에 의해 고행 지지체에 대한 부착을 위한 중첩된 엔도뉴클레아제(nested endonuclease) 인식 부위; 또는 혼성화에 의해 고행 지지체 결합된 앵커 서열에 대한 부착을 위한 쌍을 이루지 않은 단일 가닥 영역.

[0008] 애다머는 다양한 오버행 길이를 가능하게 하거나 주어진 전체 작제물을 더 짧은 특정 길이로 절단하기 위한, 다양한 오프셋 절단 II형 S 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함할 수 있다. 상이한 좌측 대 우측 엔도뉴클레아제 부위는 더 긴 NA 서열이 생성됨에 따라 특정 '공여자' 대 '수용자' 애다머 중간체의 생성을 허용한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 수백 개의 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(IISRE)가 식별되었다. 이들은 이중 가닥 DNA 인식 부위가 절단 부위로부터 분리된다는 사실을 특징으로 한다. 애다머로부터의 올리고뉴클레오티드 합성 방법은 결합에 의존하기 때문에, 5' 오버행이 바람직하며, 1, 2, 3, 4 및 5개 염기의 5' 오버행뿐만 아니라 무딘 단부를 생성하는 다양한 IISRE가 있다.

[0009] 일 구현예에서, 페이로드를 시작하는 고유 수용자 및 공여자의 어레이는 3량체 애다머의 순차적 부착에 의해 생성된다. 초기에, 로딩 단계에서, '부착 스테드'를 갖는 이중-가닥 다중 클로닝 부위(MCS)가 미리 로딩된 별도의 고체 표면은, BamHI와 같은, 적절한 제한 엔도뉴클레아제(RE)로 분해된다. 유사하게, 처음의 3량체 애다머는 RE 분해되고 '부착 스테드'에 결합된다. 엑소뉴클레아제 처리 및 행균 후, 부착된 애다머 작제물을 적절한 무딘 절단 IISRE로 분해하여, 이의 단부에 노출된 3량체 서열을 갖는 부착된 애다머(수용자) 또는 이의 단부에 노출된 3량체를 갖는 유리 무딘 단부 애다머(공여자) 중 하나의 무딘 단부를 수득한다. 공여자 애다머 함유 용액은 원하는 수용자 애다머 함유 웰로 옮겨지고, 2개의 애다머는, 무딘 결합에 대해 > 60%의 높은 효율을 갖는 인간 DNA 리가아제 III(hLig3)을 사용하여 함께 무디게 결합된다. 결합 후, 엑소뉴클레아제를 웰에 도포하여 미반응 부위를 제거하고 웰을 행구었다. 이 시점에서, 웰은 6량체 페이로드를 운반하는 고행-지지체 결합 애다머를 함유한다(도 8 참조). 그런 다음, 적절한 IISRE의 도포를 통해 6량체 페이로드를 조합하여 수용자 및 공여자 버전을 생성할 수 있다. 그런 다음, 공여자 용액을 수용자 웰에 도포하고, 끈적한 단부를 통해 이를 결합시켜 세장형 페이로드를 생성하고, 이어서 엑소뉴클레아제를 처리하고 행구어 원하는 중간 페이로드를 남긴다. 이러한 반

응 사이클을 반복하고, 원하는 NA 서열의 페이로드가 생성될 때까지 페이로드 길이를 증가시킨다(도 8 참조).

- [0010] 본 개시는, 64개의 가능한 3량체, 256개의 가능한 4량체, 1,024개의 가능한 5량체 또는 4,096개의 가능한 6량체 페이로드를 다음과 같은 특징부와 함께 포함하는 애다머 라이브러리를 제공한다: a) d 이중 가닥 이중 헤어핀 전체 구조; 및 b) 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 bp 오버행을 생성할 수 있는 고유 좌측 및 우측 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(RE) 부위.
- [0011] 일부 양태에서, 헤어핀 영역은, 일부 양태에서 앵타머 리간드에 대한 분자 친화도를 통해 고행 지지체에 애다머를 부착하는 데 사용될 수 있는 앵타머와 같은 구조적 특징부를 포함할 수 있으며, 헤어핀 영역은 고행 지지체에 이전에 부착된 핵산에 대한 애다머의 결합을 허용하기 위해 엔도뉴클레아제 절단을 제한하기 위한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 헤어핀 영역은 고행 지지체에 이전에 부착된 핵산에 대한 애다머의 결합을 허용하기 위해, 람다 터미나아제에 의해 절단될 수 있는 람다 파지 cos 부위를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 헤어핀 영역은 고행 지지체에 이전에 부착된 핵산에 혼성화될 수 있는 단일 가닥 영역을 포함할 수 있다.
- [0012] 본 개시는 제한 엔도뉴클레아제 절단 및 후속적인 결합 후 애다머의 조합으로부터 유래된 핵산 서열을 제공한다.
- [0013] 본 개시는 다수의 클로닝 부위, 헤어핀 구조 및 변형된 엑소뉴클레아제-저항성 3' 단부를 함유하는, 고행 지지체에 부착하기 위한 5' 단부 변형을 갖는 이중 가닥 DNA 앵커 서열을 제공한다.
- [0014] 본 개시는 적절한 애다머 서열에 상보적인 서열 및 변형된 엑소뉴클레아제-내성 3' 단부를 함유하는 고행 지지체에 부착하기 위한 5' 단부 변형을 갖는 단일 가닥 DNA 앵커 서열을 제공한다.
- [0015] 본 개시는 애다머 라이브러리를 생성하기 위한 방법을 제공하며, 방법은: a) 헤어핀의 서열 및 배치, II형 S 제한 엔도뉴클레아제 부위, 페이로드, 삽입 절제를 위한 다른 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 표적 부위를 포함하는 라이브러리 요소를 설계하는 단계; b) 라이브러리의 상이한 애다머 요소 각각을 단일 카피 또는 다중 카피 인서트로서, 높은 카피 수 플라스미드로 클로닝하는 단계; c) 각각의 플라스미드 또는 박테리오파지 DNA를 정제하는 단계; d) i) 나카아제(Nickase); ii) 적절한 가이드 RNA를 갖는 Cas9 니카아제; 및 iii) 트랜스 또는 시스 작용 DNA효소 중 적어도 하나를 사용하여 인서트를 절제하는 단계; e) 애다머 구조를 생성하기 위해 인서트를 결합하는 단계; 및 f) 선택적으로, 애다머를 정제하기 위한 처리를 수행하는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 개시는 애다머 라이브러리를 생성하기 위한 방법을 제공하며, 방법은: a) 헤어핀의 서열 및 배치, II형 S 제한 엔도뉴클레아제 부위, 페이로드, 삽입 절제를 위한 다른 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 표적 부위를 포함하는 라이브러리 요소를 설계하는 단계; b) 특정 애다머의 별도의 상단 및 하단 가닥의 포스포라미다이트 합성을 수행하는 단계; c) MutS 또는 유사한 오류 보정 효소로 전-애다머 이중체를 선택적으로 처리하는 단계; d) 애다머 구조를 생성하기 위해 특정 애다머의 상단 및 하단 가닥을 리가아제 효소와 접촉시키는 단계; 및 기능성 애다머를 정제하기 위해 e) 단계 (d)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리하는 단계를 포함한다.
- [0017] 본 개시는 고행 지지체에 하나 이상의 애다머를 부착하기 위한 방법을 제공하며, 방법은: a) 5' 변형을 함유하는 이중 가닥 앵커 서열을 고체 표면 상에 로딩하는 단계; b) 앵커 서열의 박테리오파지 람다 터미나아제 분해를 수행하는 단계; c) 하나 이상의 애다머의 박테리오파지 람다 터미나아제 분해를 수행하는 단계; d) 분해된 앵커 서열과 함께 분해된 하나 이상의 애다머를 인큐베이션하는 단계; 및 e) 분해된 하나 이상의 애다머 및 분해된 앵커 서열을 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0018] 본 개시는 고행 지지체에 하나 이상의 애다머를 부착하기 위한 방법을 제공하며, 방법은: a) 5' 변형을 함유하는 이중 가닥 앵커 서열을 고체 표면 상에 로딩하는 단계; b) 앵커 서열의 제한 엔도뉴클레아제 분해를 수행하는 단계; c) 하나 이상의 애다머의 제한 엔도뉴클레아제 분해를 수행하는 단계; d) 분해된 하나 이상의 애다머 및 분해된 앵커 서열을 인큐베이션하는 단계; 분해된 하나 이상의 애다머 및 분해된 앵커 서열을 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0019] 본 개시는 고행 지지체에 앵타머 서열을 포함하는 하나 이상의 애다머를 부착하기 위한 방법을 제공하며, 방법은: a) 적어도 하나의 화학적 리간드를 고행 지지체에 부착하는 단계로서, 적어도 하나의 화학적 리간드는 앵타머 서열에 결합하는, 단계; 및 b) 하나 이상의 애다머 및 고행 지지체를 인큐베이션함으로써, 하나 이상의 애다머를 고행 지지체에 부착하는 단계를 포함한다.
- [0020] 본 개시는 핵산 합성 방법을 제공하며, 방법은: a) 하나 이상의 애다머를 적어도 하나의 고행 지지체에 부착하

는 단계; b) 적절한 IISRE에 의해 수용자 및 공여자 애다머의 독립적인 제한 효소 분해를 수행하는 단계; c) 수용자 애다머 반응 부피를 세척하는 단계; d) 공여자 애다머 용액을 수용자 애다머 반응 부피와 함께 인큐베이션하는 단계; e) 분해된 공여자 및 수용자 애다머를 걸찰시키는 단계; f) 엑소뉴클레아제 분해를 수행하는 단계; 및 g) 선택적으로 단계 (f)의 생성물을 세척하는 단계를 포함한다. 생성된 생성물은, 원하는 최종 생성물이 생성될 때까지 단계 a) 내지 단계 g)가 반복될 때 후속 단계에서 수용자 또는 공여자 애다머로서 사용될 수 있다.

[0021] 본 개시는 이중-가닥 애다머를 제공하며, 여기에서 애다머는, a) 제1 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(IISRE) 서열; b) N-량체 서열; c) 적어도 제2 IISRE 서열을 포함하되; 애다머의 적어도 하나의 단부는 헤어핀 구조를 포함한다. 일부 양태에서, 애다머는, 애다머의 양쪽 단부에 헤어핀 구조를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 a) 제1 IISRE 서열; b) 제2 IISRE 서열; c) N-량체 서열; 및 d) 적어도 제3 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 a) 제1 IISRE 서열; b) 제2 IISRE 서열; c) N-량체 서열; d) 제3 IISRE 서열; 및 e) 적어도 제4 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 다중 클로닝 부위(MCS) 서열을 추가로 포함할 수 있으며, 여기에서 MCS 서열은 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제 서열을 포함한다.

[0022] 일부 양태에서, IISRE 서열은, MlyI 서열, NgoAVII 서열, SspD5I 서열, AlwI 서열, BccI 서열, BceI 서열, PleI 서열, BceAI 서열, BceSIV 서열, BscAI 서열, BspD6I 서열, FauI 서열, EarI 서열, BspQI 서열, BfuAI 서열, PaqCI 서열, Esp3I 서열, BbsI 서열, BbvI 서열, BtgZI 서열, FokI 서열, BsmFI 서열, BsaI 서열, BcoDI 서열, 및 HgaI 서열로부터 선택될 수 있다.

[0023] 일부 양태에서, 헤어핀 구조는 앵타머 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 앵타머 서열은, pL1 앵타머 서열, 트롬빈 29-량체 앵타머 서열, S2.2 앵타머 서열, ART1172 앵타머 서열, R12.45 앵타머 서열, Rb008 앵타머 서열, 및 38NT SELEX 앵타머 서열로부터 선택될 수 있다.

[0024] 본 개시는 고�형 지지체에 고정된 본 개시의 애다머를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 고�형 지지체는 비드일 수 있다. 일부 양태에서, 비드는 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 아가로스 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 고�형 지지체는 웰 또는 챔버의 표면부일 수 있다. 일부 양태에서, 웰 또는 챔버는 다중 웰 플레이트의 부분일 수 있다.

[0025] 애다머가 고�형 지지체에 고정되는 일부 양태에서, 애다머는 적어도 하나의 앵타머 서열을 포함하는 헤어핀 구조를 포함하고, 고체 표면은 앵타머 서열에 결합하는 적어도 하나의 리간드를 포함하며, 애다머는 적어도 하나의 앵타머 서열이 적어도 하나의 리간드에 결합함으로써 고체 표면에 고정된다.

[0026] 애다머가 고�형 지지체에 고정되는 양태에서, 애다머는 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행을 포함하고, 고체 표면은 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행에 상보적인 단일 가닥 부분을 갖는 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산 분자를 포함하며, 애다머는 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행을 고체 표면 상의 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산에 혼성화함으로써, 고체 표면에 고정된다.

[0027] 애다머가 고�형 지지체에 고정되는 양태에서, 애다머는 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행을 포함하고, 고체 표면은 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행에 상보적인 단일 가닥 부분을 갖는 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산 분자를 포함하며, 애다머는 적어도 하나의 5' 오버행 또는 3' 오버행을 고체 표면 상의 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산에 혼성화하고 애다머 및 적어도 하나의 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산을 걸찰시킴으로써, 고체 표면에 고정된다.

[0028] 본 개시는, 본 개시의 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자를 화학적으로 합성하는 단계로서, 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자의 서열은 생성될 애다머의 부분을 포함하되, 제1 단일 가닥 핵산 분자는 제2 단일 가닥 핵산 분자 상의 제2 영역 및 자가-상보성인 제2 영역에 상보성인 제1 영역을 포함하고, 제2 단일-가닥 핵산 분자는 자가-상보성인 제1 영역 및 제1 단일-가닥 핵산 분자 상의 제1 영역에 상보성인 제2 영역을 포함하는, 단계; b) 이중 가닥 핵산 분자를 생성하기 위해 제1 단일 가닥 핵산 및 제2 단일 가닥 핵산을 혼성화하는 단계; c) 헤어핀에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 형성하기 위해 이중-가닥 핵산 분자를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 전술한 방법은 단계 (c)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써 적절하게 걸찰된 애다머를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 전술한 방법은 단계 (b) 이후 그리고 단계 (c) 이전에, 부분 이중-가닥 핵산 분자를 MutS 효소와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 개시는, 본 개시의 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 선택적으로 활성화될 수 있는 하나 이상의 DNA효소의 양 측면 상에 애다머 서열이 위치하도록 애다머 서열을 파지미드로 클로닝하는 단계; b) 헬퍼 파

지를 사용하여 파지미드를 포장된 박테리오파지로 전환하는 단계로서, 포장된 박테리오파지는 하나 이상의 DNA 효소가 양쪽 측면에 위치하는 애다머 서열을 포함하는 단일-가닥 DNA를 생성하는, 단계; c) 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA를 정제하는 단계; d) 정제된 단일-가닥 DNA가 접혀서 하나 이상의 DNA효소 구조 및 이중-가닥 애다머 서열의 대부분을 생성하게 하는, 단계; e) 하나 이상의 DNA효소를 활성화함으로써, 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA로부터 애다머 서열을 절제하는 단계; f) 절제된 애다머를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다. 전술한 방법은 단계 (f)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써 적절하게 절찰된 애다머를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 본 개시는, 본 개시의 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 애다머 서열을 플라스미드로 클로닝하는 단계; b) 적합한 숙주 유기체에서 플라스미드를 증식시키는 단계; c) 숙주 유기체로부터 플라스미드를 정제하는 단계; d) 플라스미드로부터 애다머 서열을 절제하기 위해, 정제된 플라스미드를 니카아제 효소 및 제한 엔도뉴클레아제 효소 중 하나 이상, 또는 단순히 하나 이상의 니카아제 효소로 처리하는 단계; 및 e) 헤어핀 구조에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 생성하기 위해, 절제된 애다머 서열을 리가아제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0031] 본 개시는 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 합성하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시 중 어느 하나의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열 및 3' 오버행, 5' 오버행 또는 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 3' 오버행, 5' 오버행 또는 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 절찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 절찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-절찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지 단계 (a) 내지 (f)를 반복하는 단계를 포함한다.

[0032] 일부 양태에서, 리가아제 효소는 인간 DNA 리가아제 III(hLig3)일 수 있다. 일부 양태에서, 리가아제 효소는 T4 DNA 리가아제일 수 있다.

[0033] 일부 양태에서, 표적 핵산 서열은 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 500개, 또는 적어도 약 1000개, 또는 적어도 약 2000개, 또는 적어도 약 3000개, 또는 적어도 약 4000개, 적어도 약 5000개 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0034] 일부 양태에서, 본 개시의 방법에 의해 합성된 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자는 적어도 80% 또는 적어도 90%의 순도를 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 전술한 특징부 및 추가 특징부는 첨부된 도면과 함께 취해질 때 다음의 상세한 설명으로부터 더욱 명확하게 이해될 것이다.

도 1은 양쪽 단부에 헤어핀을 포함하는 이중-가닥 핵산 분자인 애다머의 예시적인 개략도이다.

도 2는 본 개시의 다양한 애다머 설계의 예시적인 개략도를 도시한다. 각각의 애다머 유형이 측면 IISRE 부위를 갖는 페이로드, 고행 지지체에 대한 부착 수단, 및 엑소뉴클레아제 내성을 촉진하기 위한 이중 헤어핀을 갖는, 애다머 설계의 여러 예가 도시된다. 해당 키에는 일부 가능한 IISRE 및 RE 부위뿐만 아니라 트롬핀 앵커 헤어핀이 표시되어 있다.

도 3은 본 개시의 애다머의 6개의 비제한적인 실시예의 서열을 나타낸다. 애다머 설계는 단순한 헤어핀, 다중 클로닝 부위 및 쌍을 이룬 IISRE 결합 부위를 포함한다. 이 경우, 각각은 하나의 무딘 절단 IISRE, MlyI를 가지며, 이는 3량체 페이로드의 단부인 NNN을 무딘 절찰에 노출되도록 남겨둔다. 각 설계의 좌측에는 하류 페이로드 신장 반응을 위한 5' 4-염기 오버행 또는 3-염기 오버행 IISRE 부위가 있다. 도 3에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 내지 12에 제시된 서열에 해당한다.

도 4는 본 개시의 애다머에 사용하기 위한 예시적인 중첩된 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(IISRE) 서열(이하 "IISRE 서열")을 나타낸다. 도 4에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 13 내지 28에 제시된 서열에 해당한다.

도 5는 본 개시의 애다머를 제조하는 방법의 예시적인 개략도이다. 방법에서, 2개의 별도의 올리고뉴클레오티드를 합성하고 함께 혼성화한다. 불일치 염기에 결합하고 DNA를 엑소뉴클레아제 분해에 노출시키는 MutS를 사용하는 처리는, 결합과 조합된 다음, T7 엑소뉴클레아제 분해와 조합된다. 이러한 방법은 실질적으로 순수한 애다머를 생성한다. 이들 애다머는 올리고뉴클레오티드 합성 반응에서 평가될 수 있으며, 이어서 애다머의 클론 생성을 위한 템플릿으로서 기능할 수 있다. 도 5에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 29 내지 32에 제시된 서열에 해당한다.

도 6은 본 개시의 애다머의 제조에 사용하기 위한 파지미드의 개략도이다. 이러한 파지미드 작제물은 클론 기원의 순수한 애다머의 효율적인 절제를 위한, 이중-가닥 DNA뿐만 아니라 DNA효소로부터 박테리오파지를 생성하는 정보를 포함한다. 임의의 페이로드 길이의 화학적으로 합성된 애다머로부터, 순방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 인서트가 생성되고, 이는 파지미드 벡터 내로 결합된다.

도 7a는 파지미드 및 DNA효소를 사용하며 본 개시의 애다머를 제조하는 방법의 예시적인 개략도이다. 중첩된 IISRE(4-염기 오버행 부위와 중첩된 무딘 절단 부위 및 4-염기 부위와 중첩된 무딘 부위) 및 쌍을 이룬 MCS(MSC 좌측 및 MCS 우측)를 포함하는 애다머 설계의 특정 애다머 3량체 페이로드 GCC의 개략도가 도시되어 있다. 이러한 설계는 또한 순방향 및 역방향 증폭 프라이머 부위(For 및 Rev)뿐만 아니라 DNA효소 홈터 서열을 포함한다. 또한, 측면 DNA효소 쌍이 도시되어 있다. 대장균에서의 박테리오파지 증식에 의해 생성된 단일 가닥 DNA는 정제되고, 접혀서 DNA효소 구조 및 이중 가닥 애다머 서열의 대부분을 생성한다. Zn²⁺로 처리하여 활성화시킨 후, 결합 및 T7 엑소뉴클레아제 처리 순수 클론 첨가물을 생성한다.

도 7b는 애다머 서열의 이분자, 횡절단 절제를 사용하여 본 개시의 애다머를 생성하는 방법의 예시적인 개략도이다.

도 8은 본 개시의 애다머의 사용을 포함하는, 본 개시의 핵산 합성 방법의 예시적인 개략도이다. 초기에, 제1 및 제2 애다머는 DNA 결합을 사용하여 고품지체 상에 이미 로딩된 MCS 보유 부착 스티드에 부착된다. 공여자 및 수용자 작제물은 별도의 부피로 생성된다. 공여자 및 수용자 작제물을 별도의 IISRE로 처리하여 결합 가능한 단부를 생성한다. 이러한 개략도에서, 수용자는 R1 IISRE를 사용하는 분해에 의해 생성되고, 방출된 단부 및 효소는 행균에 의해 폐기된다. 공여자 작제물은 퍼플 L2 효소를 사용하는 분해에 의해 생성된다. 공여자 작제물 용액(L2 효소를 운반함)을 수용자 웰로 옮기고, 2, 3 또는 4-염기 접촉성 단부 결합에 대해 > 80%의 높은 효율을 갖는 T4 DNA 리가아제를 사용하여 결합시킨다. 웰을 엑소뉴클레아제로 처리하고 행구었다. 그런 다음, 생성된 부착된 애다머 작제물은 후속 신장 사이클을 위해 준비된다.

도 9a, 도 9b, 도 9c, 도 9d, 도 9e, 도 9f, 도 9f 및 도 9h는 27개 뉴클레오티드 길이의 표적 핵산 분자를 합성하기 위해 본 개시의 애다머를 사용하는 것을 포함하는, 본 개시의 핵산 합성 방법의 예시적인 개략도이다. 도 9a에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 33에 제시된 서열에 해당한다. 도 9e에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 34 및 35에 제시된 서열에 해당한다. 도 9g에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 36 내지 47에 제시된 서열에 해당한다. 도 9h에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 48 내지 58에 제시된 서열에 해당한다.

도 10은 표적 핵산을 합성하기 위해 본 개시의 애다머를 사용하여 수행된 제한 효소 분해 반응 및 결합 반응의 세트의 개략도이다. 도 10에 제시된 10개 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 59 내지 67에 제시된 서열에 해당한다.

도 11은 도 10에 개략적으로 설명된 바와 같은, 본 발명의 애다머를 사용하여 수행된 효소 분해 반응 및 결합 반응의 겔 전기영동 분석 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 개시는 특이적 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자의 합성을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 조성물은 애다머를 포함할 수 있으며, 이는 본원에서 보다 상세히 설명된다. 방법은 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 생성하기 위해 연속적인 제한 효소 절단 및 결합 반응에 이들 애다머를 사용하는 것을 포함할 수 있다.

[0036]

이러한 방법은 본원에서 보다 상세히 설명된다.

- [0037] 중요하게는, 기존의 핵산 합성 방법과 달리, 본 개시의 조성물 및 방법은 대규모 포스포라미다이트 합성을 필요로 하지 않는다. 결과적으로, 본 개시의 조성물 및 방법은 기존의 핵산 합성 방법보다 저렴하고 빠르다. 또한, 본 개시의 조성물 및 방법은 독성이 적은 유기 폐기물을 생성하므로, 기존의 핵산 합성 방법보다 더 환경친화적이다.
- [0038] 애다머
- [0039] 본 개시는 적어도 하나의 애다머를 포함하는 조성물을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어, 애다머는 양쪽 단부에서 헤어핀 구조를 포함하는 이중-가닥 핵산 분자를 설명하는 데 사용된다. 애다머가 고체 표면에 고정되는 일부 양태에서, 애다머는 고체 표면에 부착되지 않은 분자의 단부에 위치한 단일 헤어핀을 포함할 수 있다. 고체 표면에 고정된 하나의 애다머 및 2개의 애다머의 예시적인 개략도가 도 1에 도시된다. 애다머는 본원에 기술된 하나 이상의 특징부를 포함할 수 있다.
- [0040] 일부 양태에서, 애다머는 DNA를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.
- [0041] 일부 양태에서, 애다머는 하나 이상의 다중 클로닝 부위(MCS) 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, MCS 서열은, 3' 행오버, 5' 행오버, 또는 무딘 단부를 생성하기 위해 상응하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단될 수 있는 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제(RE) 서열을 포함할 수 있다.
- [0042] 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, "무딘 단부"는 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드가 없는 DNA 단편의 단부를 설명하는 데 사용된다.
- [0043] 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 용어 5' 행오버는 가닥 중 하나의 5' 단부에 위치되는 부분 이중-가닥 핵산 분자의 단일-가닥 부분을 지칭하는 데 사용된다.
- [0044] 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 용어 3' 행오버는 가닥 중 하나의 3' 단부에 위치되는 부분 이중-가닥 핵산 분자의 단일-가닥 부분을 지칭하는 데 사용된다.
- [0045] 일부 양태에서, 애다머는 상응하는 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(이하 "IISRE 서열")로 절단될 수 있는 적어도 하나의 오프셋 절단 II형 S 제한 엔도뉴클레아제(IISRE) 서열(이하 "IISRE 서열")을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 적어도 하나의 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 적어도 3개의 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 적어도 4개의 IISRE 서열을 포함할 수 있다.
- [0046] 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 "무딘 단부"를 생성하게 하는 서열이다.
- [0047] 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 1개 뉴클레오티드 길이인 5' 오버행을 생성하게 하는 서열이다. 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 2개 뉴클레오티드 길이인 5' 오버행을 생성하게 하는 서열이다. 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 3개 뉴클레오티드 길이인 5' 오버행을 생성하게 하는 서열이다. 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 4개 뉴클레오티드 길이인 5' 오버행을 생성하게 하는 서열이다. 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 5개 뉴클레오티드 길이인 5' 오버행을 생성하게 하는 서열이다. 일부 양태에서, IISRE 서열은, 상응하는 IISRE와의 절단이 약 1개 뉴클레오티드 내지 약 5개 뉴클레오티드 길이인 5' 오버행을 생성하게 하는 서열이다.
- [0048] 표 1은, IISRE 서열 및 이의 상응하는 IISRE의 비제한적인 예, 그리고 IISRE 서열 및 상응하는 IISRE의 절단에 의해 생성된 오버행/무딘 단부에 대한 설명을 제시한다. 따라서, 애다머는 표 1에 제시된 IISRE 서열 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[표 1]

예시적인 IISRE 서열 및 상응하는 IISRE

IISRE 명칭	IISRE 서열	생성된 오버행/무딘 단부
MlyI	GAGTC (5/5)	무딘 단부
NgoAVII	GCCGC (7/7)	무딘 단부
SspD5I	GGTGA (8/8)	무딘 단부
AlwI	GGATC (4/5)	1 nt 5' 오버행
BccI	CCATC (4/5)	1 nt 5' 오버행
Bcefl	ACGGC (12/13)	1 nt 5' 오버행
PleI	GAGTC (4/5)	1 nt 5' 오버행
BceAI	ACGGC (12/14)	2 nt 5' 오버행
BceSIV	GCTGC (9/11)	2 nt 5' 오버행
BscAI	GCATC (4/6)	2 nt 5' 오버행
BspD6I	GAGTC (4/6)	2 nt 5' 오버행
FauI	CCCGC (4/6)	2 nt 5' 오버행
EarI	CTCTTC (1/4)	3 nt 5' 오버행
BspQI	GCTCTTC (1/4)	3 nt 5' 오버행
BfuAI	ACCTGC (4/8)	4 nt 5' 오버행
PaqCI	CACCTGC (4/8)	4 nt 5' 오버행
Esp3I	CGTCTC (1/5)	4 nt 5' 오버행
BbsI	GAAGAC (2/6)	4 nt 5' 오버행
BbvI	GCAGC (8/12)	4 nt 5' 오버행
BtgZI	GCGATG (10/14)	4 nt 5' 오버행
FokI	GGATG (9/13)	4 nt 5' 오버행
BsmFI	GGGAC (10/14)	4 nt 5' 오버행
BsaI	GGTCTC (1/5)	4 nt 5' 오버행
BcoDI	GTCTC (1/5)	4 nt 5' 오버행
HgaI	GACGC (5/10)	5 nt 5' 오버행

[0049]

[0050]

일부 양태에서, 애다머의 단부에 위치한 헤어핀 구조, 또는 헤어핀(상호 교환적으로 사용됨)은, 적어도 약 1개, 또는 적어도 약 2개, 또는 적어도 약 3개, 또는 적어도 약 4개, 또는 적어도 약 5개, 또는 적어도 약 6개, 또는 적어도 약 7개, 또는 적어도 약 8개, 또는 적어도 약 9개, 또는 적어도 약 10개, 또는 적어도 약 11, 또는 적어도 약 12개, 또는 적어도 약 13개, 또는 적어도 약 14개, 또는 적어도 약 15개, 또는 적어도 약 16개, 또는 적어도 약 17개, 또는 적어도 약 18개, 또는 적어도 약 19개, 또는 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 21개, 또는 적어도 약 22개, 또는 적어도 약 23개, 또는 적어도 약 24개, 또는 적어도 약 25개, 또는 적어도 약 26개, 또는 적어도 약 27개, 또는 적어도 약 28개, 또는 적어도 약 29개, 또는 적어도 약 30개, 또는 적어도 약 31개, 또는 적어도 약 32개, 또는 적어도 약 33개, 또는 적어도 약 34개, 또는 적어도 약 35개, 또는 적어도 약 36개, 또는 적어도 약 37개, 또는 적어도 약 38개, 또는 적어도 약 39개, 또는 적어도 약 40개, 또는 적어도 약 41개, 또는 적어도 약 42개, 또는 적어도 약 43개, 또는 적어도 약 44개, 또는 적어도 약 45개, 또는 적어도 약 46개, 또는 적어도 약 47개, 또는 적어도 약 48개, 또는 적어도 약 49개, 또는 적어도 약 50개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0051]

전술한 바와 같이, 애다머는 헤어핀 구조에 의해 양 단부에서 캡핑된다. 헤어핀 구조는 다양한 역할을 한다. 먼저, 헤어핀은 애다머에 대한 엑소뉴클레아제 분해에 대한 보호를 제공한다. 이는 본 개시의 방법에서 주어진 반응으로부터 미반응 중간체를 제거할 수 있게 하며, 이는 생성 동안의 애다머 및 애다머 신장 후의 순도 둘 모두

를 제공한다. 둘째, 헤어핀 구조는 고행 지지체에 애다머를 부착하기 위한 수단을 제공한다. 이러한 부착은 특이적 고행 지지체 결합 리간드에 결합하는 앵타머의 결합에 의해; BamHI와 같은 종래의 RE를 사용하는 분해 후 MCS를 통한 결찰에 의해; 람다 파지 *cos* 부위를 통한 결찰에 의해; 또는 단일 가닥 고행 지지체 결합 앵커 NA로의 혼성화에 의해, 직접적으로 생성된다. 마지막으로, 본원에 기술된 헤어핀은 비오틴과 같은 비-천연 변형을 필요로 하지 않고 애다머가 고행 지지체(예를 들어, 비드)에 부착될 수 있게 한다. 따라서, 본 개시의 애다머는, 소규모 및/또는 대규모 포스포라미다이트 합성에 대한 필요 없이, 완전한 천연 수단을 사용하여 합성될 수 있다. 따라서, 본 개시의 애다머 및 방법은 핵산 분자의 더 빠르고 더 저렴한 합성을 가능하게 하며 독성 폐기물을 보다 적게 생성할 수 있다.

- [0052] 일부 양태에서, 애다머의 단부에 위치한 헤어핀은 애다머의 친화도 정제 및/또는 애다머의 고행 지지체(예: 비드)에 대한 부착을 가능하게 하는 구조적 서열을 포함할 수 있다.
- [0053] 일부 양태에서, 애다머의 단부에 위치한 헤어핀은 조절된 자가 절단을 허용하는 효소 서열(예를 들어, DNA효소 서열)을 포함할 수 있다.
- [0054] 일부 양태에서, 애다머의 단부에 위치한 헤어핀은 하나 이상의 제한 효소 부위를 포함할 수 있다. 이론에 구속됨 없이, 헤어핀의 하나 이상의 제한 효소 부위는 상응하는 제한 효소(들)로 절단되어 적어도 하나의 단일-가닥 행오버를 생성할 수 있으며, 이는 후속하여 절단된 애다머를 적어도 하나의 단일-가닥 행오버에 상보적인 핵산을 포함하는 고행 지지체(예를 들어, 비드)에 혼성화 및/또는 결찰시키는 데 사용될 수 있다.
- [0055] 일부 양태에서, 애다머의 단부에 위치한 헤어핀은 앵타머 서열을 포함할 수 있다. 이론에 구속됨 없이, 앵타머 서열은 친화도 정제 및/또는 고행 지지체(예를 들어, 비드)에 대한 부착에 사용될 수 있다. 표 2는 앵타머 서열의 비제한적인 예를 제시한다.

[표 2]

예시적인 앵타머

앵타머 명칭	리간드	서열
pL1	항- <i>Pv</i> LDH	TCGATTGGATTGTGCCGGAAGTGCTGGCTCGA (서열번호 68)
트롬빈 29 량체	항-트롬빈	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT (서열번호 69)
S2.2	항-Muc1	CAGTTGATCCTTTGGATACCCTG (서열번호 70)
ART1172	항-VWF	GGCGTGCAGTGCCTTCGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCCT (서열번호 71)
R12.45	항-아트라진	ACCGTCTGAGCGATTCGTACTTTATTCGGGAGGTATCAGCGGG (서열번호 72)
Rb008	항-ATX	CCTGGACGGAACCAGAATACTTTTGGTCTCCAGG (서열번호 73)
38NT SELEX	항-HIV_RT	AAATACCCCCCTTCGGTGCAAAGCACCGAAGGGGGGTATTT (서열번호 74)

- [0056]
- [0057] 일부 양태에서, 애다머는 람다 파지 *cos* 부위를 포함할 수 있다.
- [0058] 일부 양태에서, 애다머는 본원에 기술된 방법 중 하나를 사용하여 합성될 핵산의 단편을 포함하는 "N-량체 서열"을 포함할 수 있다. 용어 "N-량체 서열", "페이로드" 및 "N-량체 페이로드"는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0059] 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 3개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 3개 뉴클레오티드 길이이다. 3개 뉴클레오티드 길이인 N-량체 서열은 본원에서 3량체로서 지칭된다.
- [0060] 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 4개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 4개 뉴클레오티드 길이이다. 4개 뉴클레오티드 길이인 N-량체 서열은 본원에서 4량체로서 지칭된다.
- [0061] 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 5개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 5개 뉴

클레오티드 길이이다. 5개 뉴클레오티드 길이인 N-량체 서열은 본원에서 5량체로서 지칭된다.

- [0062] 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 6개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 양태에서, N-량체 서열은 약 6개 뉴클레오티드 길이이다. 6개 뉴클레오티드 길이인 N-량체 서열은 본원에서 6량체로서 지칭된다.
- [0063] 일부 양태에서, 애다머는 MCS 서열, 제1 IISRE 서열, N-량체 서열, 및 적어도 제2 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 MCS 서열, 이어서 제1 IISRE 서열, 이어서 N-량체 서열, 이어서 적어도 제2 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 전술한 애다머의 예시적인 개략도는 애다머 설계 #1 내지 #4로서 도 2에 도시되어 있다. 도 2에 도시된 애다머 설계 #1 내지 #3의 비제한적인 예에서, 제1 IISRE 서열은, 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 오버행을 생성하는 IISRE 서열이고, N-량체 서열은 3량체 서열이고, 적어도 제2 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE 서열이다. 도 2에 도시된 애다머 설계 #4의 비제한적인 예에서, 제1 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE 서열이고, N-량체 서열은 3량체 서열이고, 적어도 제2 IISRE 서열은 절단될 때 3개 뉴클레오티드 길이의 5' 오버행을 생성하는 IISRE 서열이다.
- [0064] 일부 양태에서, 애다머는 MCS 서열, 제1 IISRE 서열, 제2 IISRE 서열, N-량체 서열, 제3 IISRE 서열 및 적어도 제4 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 이는 MCS 서열, 이어서 제1 IISRE 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 N-량체 서열, 이어서 제3 IISRE 서열, 이어서 적어도 제4 IISRE 서열을 포함할 수 있다. 전술한 애다머의 예시적인 개략도는 애다머 설계 #5로서 도 2에 도시되어 있다. 도 2에 도시된 애다머 설계 #5의 비제한적인 실시예에서, 제1 IISRE 서열은 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 행오버를 생성하는 IISRE 서열이고, 제2 IISRE 서열은 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 행오버를 생성하는 IISRE 서열이고, N-량체 서열은 3량체 서열이고, 제3 IISRE 서열은 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 행오버를 생성하는 IISRE 서열이고, 적어도 제4 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE 서열이다.
- [0065] 일부 양태에서, 애다머는 제1 MCS 서열, 제1 IISRE 서열, N-량체 서열, 적어도 제2 IISRE 서열 및 적어도 제2 MCS 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 제1 MCS 서열, 이어서 제1 IISRE 서열, 이어서 N-량체 서열, 이어서 적어도 제2 IISRE 서열, 이어서 적어도 제2 MCS 서열을 포함할 수 있다. 전술한 애다머의 예시적인 개략도는 애다머 설계 #6으로서 도 2에 도시되어 있다. 도 2에 도시된 애다머 설계 #6의 비제한적인 예에서, 제1 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE 서열이고, N-량체 서열은 3량체 서열이고, 적어도 제2 IISRE 서열은 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 오버행을 생성하는 IISRE 서열이다.
- [0066] 일부 양태에서, 애다머는 제1 MCS 서열, 제1 IISRE 서열, 제2 IISRE 서열, N-량체 서열, 제3 IISRE 서열, 적어도 제4 IISRE 서열 및 적어도 제2 MCS 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 제1 MCS 서열, 이어서 제1 IISRE 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 N-량체 서열, 이어서 제3 IISRE 서열, 이어서 적어도 제4 IISRE 서열, 이어서 적어도 제2 MCS 서열을 포함할 수 있다. 전술한 애다머의 예시적인 개략도는 애다머 설계 #7로서 도 2에 도시되어 있다. 도 2에 도시된 애다머 설계 #7의 비제한적인 실시예에서, 제1 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE 서열이고, 제2 IISRE 서열은 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 행오버를 생성하는 IISRE 서열이고, N-량체 서열은 3량체 서열이고, 제3 IISRE 서열은 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 행오버를 생성하는 IISRE 서열이고, 적어도 제4 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE 서열이다.
- [0067] 일부 양태에서, 애다머는 앵타머 서열, 제1 IISRE 서열, N-량체 서열, 적어도 제2 IISRE 서열 및 MCS 서열을 포함하는 헤어핀을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 애다머는 앵타머 서열, 이어서 제1 IISRE 서열, 이어서 N-량체 서열, 이어서 적어도 제2 IISRE 서열, 이어서 MCS 서열을 포함하는 헤어핀을 포함할 수 있다. 전술한 애다머의 예시적인 개략도는 애다머 설계 #7로서 도 2에 도시되어 있다. 도 2에 도시된 애다머 설계 #7의 비제한적인 예에서, 앵타머 서열은 트롬빈 앵타머 서열이고, 제1 IISRE 서열은, 절단될 때 4개 뉴클레오티드 길이의 5' 오버행을 생성하는 IISRE 서열이고, N-량체 서열은 3량체 서열이고, 적어도 제2 IISRE 서열은 절단될 때 무딘 단부를 생성하는 IISRE이다.
- [0068] 도 3은 애다머의 6개의 비제한적인 실시예의 서열을 도시한다. 도 3에 도시된 각각의 애다머는 간단한 헤어핀 회전부로 캡핑된다. 도 3에 도시된 각각의 애다머는 MCS 서열, 제1 IISRE 서열, N-량체 서열("N"으로 표시됨) 및 제2 IISRE 서열을 포함한다. 구체적으로, 도 3의 애다머에 도시된 N-량체 서열은 3량체 서열이고, IISRE 서열은 BbsI, MlyI, BtgZI, BfuAI, PaqCI, FokI 및 EarI로부터 선택된다.
- [0069] 2개의 IISRE 서열이 애다머에서 서로 인접하여 포함되는 경우, 이들 IISRE 서열은 "중첩된 IISRE 서열" 또는 "중첩된 IISRE 부위"로 불릴 수 있다. 일부 양태에서, 중첩된 IISRE 서열은 서로 직접적으로 인접한 2개의 IISRE

서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 증첩된 IISRE 서열은 서로 인접하지만 약 1 내지 약 10개 뉴클레오티드 만큼 분리된 2개의 IISRE 서열을 포함할 수 있다.

[0070] 이론에 구속됨 없이, 일부 부위는 제1 부위와 페이로드 사이의 다른 IISRE 부위에 피팅되도록 이들의 인식 부위로부터 충분히 이격된 절단 부위를 갖기 때문에 IISRE 부위를 증첩시키는 것이 가능하다(도 4 참조). 따라서, 일부 양태에서, 애다머는 페이로드(N-량체 서열)의 양측 상에 고유한 무딘 절단 부위 및 4-염기 오버행 부위를 포함할 수 있다. 이론에 구속됨 없이, 이는 통상적인 핵산 생성을 수행하는 데 필요한 애다머 시약의 수를 상당히 감소시킨다.

[0071] 이론에 구속됨 없이, 애다머 중 증첩된 IISRE 서열을 포함시키는 것은 본 개시의 방법에서 2개의 구별되는 부위를 갖는 동일한 위치에서의 절단을 위한 여러 가지 옵션을 제공한다. 2개의 구별되는 부위를 갖는 동일한 위치에서의 절단에 대한 옵션은 일반적인 핵산 합성을 위해 라이브러리(아래 참조)에 필요한 구별되는 애다머의 수를 감소시킬 수 있다. 도 4는 증첩된 BbvI 및 BbsI 부위를 포함하는, 증첩된 IISRE 부위의 비제한적인 실시예를 도시한다. 도 4는 또한 본원에 기술된 애다머의 헤어핀에 포함될 수 있는 앵타머 서열의 3개의 비제한적인 실시예를 도시한다.

[0072] 일부 양태에서, 애다머는 증폭 프라이머에 대한 동족 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 클로닝을 용이하게 하기 위해 당업계에서 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다. 이론에 구속됨 없이, 애다머에 증폭 프라이머를 위한 동족 서열을 포함시키면 클론 증식을 위한 특정 애다머 설계를 회수할 수 있다.

[0073] 일부 양태에서, 애다머는 플라스미드 또는 박테리오파지에서의 발효에 의한 애다머의 대규모 생산을 용이하게 하는 당업계에서 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다. 이러한 요소는 DNA효소 흉터에 상응하는 서열 및/또는 특정 DNA효소를 사용한 절체 후 애다머의 매끄러운 접합을 용이하게 하는 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로서 통합되는, Praetorius 등, *Nature*, 2017, 552, 84-87 참조)

[0074] *애다머 라이브러리*

[0075] 본 개시는 복수의 애다머를 포함하는 애다머 라이브러리를 제공하며, 여기에서 복수의 애다머는 하나 이상의 상이한 애다머 종(즉, 고유 서열을 갖는 애다머)을 포함한다.

[0076] 본 개시는 복수의 애다머를 포함하는 3량체 애다머 라이브러리를 제공하며, 여기에서 복수의 애다머는 적어도 64개의 상이한 애다머 종을 포함하되, 애다머 종 각각은 아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민으로 생성될 수 있는 64개($4 \times 4 \times 4 = 64$)의 가능한 3량체 서열 중 하나를 포함한다.

[0077] 본 개시는 복수의 애다머를 포함하는 4량체 애다머 라이브러리를 제공하며, 여기에서 복수의 애다머는 적어도 256개의 상이한 애다머 종을 포함하되, 애다머 종 각각은 아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민으로 생성될 수 있는 256개($4 \times 4 \times 4 \times 4 = 256$)의 가능한 4량체 서열 중 하나를 포함한다.

[0078] 본 개시는 복수의 애다머를 포함하는 5량체 애다머 라이브러리를 제공하며, 여기에서 복수의 애다머는 적어도 1,024개의 상이한 애다머 종을 포함하되, 애다머 종 각각은 아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민으로 생성될 수 있는 1,024개($4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 1,024$)의 가능한 5량체 서열 중 하나를 포함한다.

[0079] 본 개시는 복수의 애다머를 포함하는 6량체 애다머 라이브러리를 제공하며, 여기에서 복수의 애다머는 적어도 256개의 상이한 애다머 종을 포함하되, 애다머 종 각각은 아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민으로 생성될 수 있는 256개($4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 4,096$)의 가능한 6량체 서열 중 하나를 포함한다.

[0080] *애다머를 생성하는 방법*

[0081] 본원에 기술된 애다머는 도 5에 개략적으로 도시된 방법으로 화학적으로 합성된 핵산을 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 방법에서, 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자는 (예를 들어, 포스포라미다이트 합성을 사용하여) 화학적으로 합성된다. 도 5의 상단 패널에 도시된 바와 같이, 제1 단일 가닥 핵산 분자는 제2 단일 가닥 핵산 분자 상의 제2 영역에 상보적인 제1 영역 및 자기 상보성인 제2 영역을 포함하고, 제2 단일 가닥 핵산 분자는 자기 상보성인 제1 영역 및 제1 단일 가닥 핵산 분자의 제1 영역에 상보적인 제2 영역을 포함한다. 이어서, 제1 단일 가닥 핵산 및 제2 단일 가닥 핵산은 혼성화되어, 부분 이중 가닥 핵산 분자를 생성한다. 그런 다음, 부분 이중 가닥인 핵산 분자는, 불일치 염기에 결합하고 DNA를 엑소뉴클레아제 분해에 노출시키는 효소 MutS와 선택적으로 접촉될 수 있다. 이어서, 헤어핀에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 형성하기 위해, 부분 이중 가닥 핵산 분자는 리가아제 효소와 접촉될 수 있다. 리가아제 효소와 접촉한 후, 생

성물은 T7 엑소뉴클레아제와 접촉되어 적절하게 형성된 애다머를 정제하고 농축시킬 수 있다.

- [0082] 이론에 구속됨 없이, 화학적으로 합성된 단일 가닥 핵산 분자를 사용하여 애다머를 생산하는 전술한 방법은 새로운 애다머 설계를 신속한 처리 시간으로 시험할 수 있게 한다. 이론에 구속됨 없이, 전술한 방법을 사용하여 생산된 애다머는 이이 이어서, 플라스미드 또는 박테리오파지를 사용하는 애다머의 클론 생산을 포함하나 이에 한정되지 않는, 포스포라미다이트 합성을 필요로 하지 않는 방법을 사용하는 상기 애다머의 대규모 생산을 위한 템플릿으로서 사용될 수 있다.
- [0083] 따라서, 본 개시는, 본원에 기술된 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자를 제공하는 단계로서, 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자의 서열은 생성될 애다머의 부분을 포함하되, 제1 단일 가닥 핵산 분자는 제2 단일 가닥 핵산 분자 상의 제2 영역 및 자가-상보성인 제2 영역에 상보성인 제1 영역을 포함하고, 제2 단일-가닥 핵산 분자는 자가-상보성인 제1 영역 및 제1 단일-가닥 핵산 분자 상의 제1 영역에 상보성인 제2 영역을 포함하는, 단계; b) 부분 이중 가닥 핵산 분자를 생성하기 위해 제1 단일 가닥 핵산 및 제2 단일 가닥 핵산을 혼성화하는 단계; 및 c) 헤어핀에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 형성하기 위해 부분 이중-가닥 핵산 분자를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0084] 따라서, 본 개시는, 본원에 기술된 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자를 화학적으로 합성하는 단계로서, 제1 단일-가닥 핵산 분자 및 제2 단일-가닥 핵산 분자의 서열은 생성될 애다머의 부분을 포함하되, 제1 단일 가닥 핵산 분자는 제2 단일 가닥 핵산 분자 상의 제2 영역 및 자가-상보성인 제2 영역에 상보성인 제1 영역을 포함하고, 제2 단일-가닥 핵산 분자는 자가-상보성인 제1 영역 및 제1 단일-가닥 핵산 분자 상의 제1 영역에 상보성인 제2 영역을 포함하는, 단계; b) 부분 이중 가닥 핵산 분자를 생성하기 위해 제1 단일 가닥 핵산 및 제2 단일 가닥 핵산을 혼성화하는 단계; 및 c) 헤어핀에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 형성하기 위해 부분 이중-가닥 핵산 분자를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0085] 일부 양태에서, 전술한 방법은 단계 (c)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써 적절하게 걸찰된 애다머를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0086] 일부 양태에서, 전술한 방법은 단계 (b) 이후 그리고 단계 (c) 이전에, 부분 이중-가닥 핵산 분자를 MutS 효소와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0087] 본원에 기술된 애다머는 도 6 및 도 7a에 개략적으로 도시된 파지미드 기반 방법을 사용하여 생성될 수 있다(또한, 그 각각의 전체가 모든 목적에 대해 본원에 참조로서 통합되는, Praetorius 등, *Nature*, 2017, 552, 84-87 및 미국 특허 가출원 제US20190203242A1호 참조). 이러한 방법에서, 애다머 서열은 도 6에 도시된 바와 같이 파지미드(예를 들어 pBluescript 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 파지미드)로 클로닝된다. 애다머 서열은 도 6 및 도 7a의 상단 패널에 도시된 바와 같이 (예를 들어, DNA효소를 Zn^{2+} 와 접촉시킴으로써) 선택적으로 활성화될 수 있는 하나 이상의 DNA효소가 양 측면 상에 위치한다. 그런 다음, 당업자에게 공지된 방법에 의해 헬퍼 파지를 사용하여 파지미드를 M13 포장된 박테리오파지로 전환한다. M13 포장된 박테리오파지는 도 7a의 상단 패널에 도시된 바와 같이 애다머 서열 및 측면 DNA효소를 포함하는 단일 가닥 DNA를 생성한다. 도 7a의 상단에서 두 번째 패널에 도시된 바와 같이, 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA는 정제되고 접혀서 DNA효소 구조 및 이중 가닥 애다머 서열의 대부분을 생성한다. 이어서, 도 7a의 하단에서 두 번째 패널에 도시된 바와 같이, DNA효소는 (예를 들어, DNA효소를 Zn^{2+} 와 접촉시킴으로써) 활성화되어, 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA로부터 애다머 서열을 절제한다. 도 7a의 하단 패널에 도시된 바와 같이, DNA효소 절단 후, 애다머를 접은 다음 리가제와 접촉시켜 애다머를 폐쇄한다. 선택적으로, 걸찰되지 않거나 부적절하게 형성된 애다머는 T7 엑소뉴클레아제로 걸찰 반응의 생성물을 처리함으로써 제거될 수 있다. 도 7a에 도시된 예시적인 애다머는 제1 MCS 서열, 이어서 제1 IISRE 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 N-량체 서열, 이어서 제3 IISRE 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 제2 MCS 서열을 포함한다. 도 7a의 아포스트로피는 애다머가 자기 상보성이며 양쪽 단부가 헤어핀 도메인으로 캡핑된 이중 가닥 구조를 형성하게 하는 역방향 상보적 서열을 나타낸다.
- [0088] 대안적으로, 유사한 박테리오파지 DNA 제제는, Zn^{2+} 에 의해 활성화된 M13 DNA에 혼성화된 트랜스-작용 DNA효소 요소로 처리될 수 있으며, 이는 이어서 비-자기 절단 방식으로 애다머를 절제한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, DNA효소는 이분자 시약으로서 작용하는 것으로 나타났다(그 전체가 본원에 참조로서 통합되는. Gu 등, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135, 24, 9121-9129 참조). 따라서, 일부 양태에서, 트랜스

로 제공되고, 박테리오파지 제제에 혼성화되고, Zn^{2+} 로 활성화되는 반-DNA효소 서열을 사용하여 애다머 절제가 달성될 수 있다(도 7b 참조).

[0089] 따라서, 본 개시는, 본원에 기술된 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 선택적으로 활성화될 수 있는 하나 이상의 DNA효소의 양 측면 상에 애다머 서열이 위치하도록 애다머 서열을 파지미드로 클로닝하는 단계; b) 헬퍼 파지를 사용하여 파지미드를 포장된 박테리오파지로 전환하는 단계로서, 포장된 박테리오파지는 하나 이상의 DNA효소가 양쪽 측면에 위치하는 애다머 서열을 포함하는 단일-가닥 DNA를 생성하는, 단계; c) 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA를 정제하는 단계; d) 정제된 단일-가닥 DNA가 접혀서 하나 이상의 DNA효소 구조 및 이중-가닥 애다머 서열의 대부분을 생성하게 하는, 단계; e) 하나 이상의 DNA효소를 활성화함으로써, 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA로부터 애다머 서열을 절제하는 단계; f) 절제된 애다머를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0090] 따라서, 본 개시는, 본원에 기술된 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 선택적으로 활성화될 수 있는 하나 이상의 DNA효소의 제1 부분의 양 측면 상에 애다머 서열이 위치하도록 애다머 서열을 파지미드로 클로닝하는 단계; b) 헬퍼 파지를 사용하여 파지미드를 포장된 박테리오파지로 전환하는 단계로서, 포장된 박테리오파지는 하나 이상의 DNA효소가 양쪽 측면에 위치하는 애다머 서열을 포함하는 단일-가닥 DNA를 생성하는, 단계; c) 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA를 정제하는 단계; d) 정제된 단일-가닥 DNA가 접혀서 이중-가닥 애다머 서열의 대부분을 생성하게 하는, 단계; e) 정제된 단일 가닥 DNA를 DNA효소의 제2 부분을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 단계로서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 완전한 DNA효소를 형성하도록, 정제된 단일 가닥 DNA에 혼성화되는, 단계; f) 하나 이상의 DNA효소를 활성화함으로써, 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA로부터 애다머 서열을 절제하는 단계; 및 g) 절제된 애다머를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0091] 따라서, 본 개시는, 본원에 기술된 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 선택적으로 활성화될 수 있는 하나 이상의 DNA효소의 제1 부분의 양 측면 상에 애다머 서열이 위치하도록 애다머 서열을 파지미드로 클로닝하는 단계; b) 헬퍼 파지를 사용하여 파지미드를 포장된 박테리오파지로 전환하는 단계로서, 포장된 박테리오파지는 하나 이상의 DNA효소가 양쪽 측면에 위치하는 애다머 서열을 포함하는 단일-가닥 DNA를 생성하는, 단계; c) 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA를 정제하는 단계; d) 정제된 단일 가닥 DNA를 DNA효소의 제2 부분을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 단계로서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 완전한 DNA효소를 형성하도록, 정제된 단일 가닥 DNA에 혼성화되는, 단계; e) 단계 d)의 생성물이 접혀서 이중-가닥 애다머 서열의 대부분을 생성하게 하는 단계; f) 하나 이상의 DNA효소를 활성화함으로써, 포장된 박테리오파지에 의해 생성된 단일 가닥 DNA로부터 애다머 서열을 절제하는 단계; 및 g) 절제된 애다머를 리가아제 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0092] 일부 양태에서, 전술한 방법은, 절제된 애다머를 리가아제 효소로 처리한 후, 상기 생성물을 적어도 하나의 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 적절하게 결합된 애다머를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0093] 본원에 기술된 애다머는 플라스미드 기반 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 플라스미드-기반 방법에서, 애다머는 대규모로 (예를 들어, 박테리아 및/또는 효모에서) 증식되고 정제될 수 있는 플라스미드 내로 클로닝된다. 그런 다음, 애다머 서열을 포함하는 정제된 플라스미드를 하나 이상의 니카아제 효소(예를 들어, 적절한 가이드 RNA를 갖는 Cas9 니카아제) 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 효소로 처리하여, 플라스미드로부터 애다머 서열을 절제하여 각각의 단부에 DNA 플랩을 갖는 이중-가닥 애다머를 수득할 수 있다. 그런 다음, DNA 플랩을 갖는 이중-가닥 애다머를 하나 이상의 리가아제 효소로 처리하여 헤어핀 구조에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머를 생성할 수 있다.

[0094] 따라서, 본 개시는, 본원에 기술된 애다머를 제조하는 방법을 제공하며, 방법은: a) 애다머 서열을 플라스미드로 클로닝하는 단계; b) 적합한 숙주 유기체에서 플라스미드를 증식시키는 단계; c) 숙주 유기체로부터 플라스미드를 정제하는 단계; d) 플라스미드로부터 애다머 서열을 절제하기 위해, 정제된 플라스미드를 니카아제 효소 및 제한 엔도뉴클레아제 효소 중 하나 이상으로 처리하는 단계; 및 e) 헤어핀 구조에 의해 양쪽 단부가 캡핑된 이중-가닥 애다머 구조를 생성하기 위해, 절제된 애다머 서열을 리가아제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0095] 본원에 기술된 애다머를 생성하는 방법은 3량체 애다머 라이브러리, 4량체 애다머 라이브러리, 5량체 애다머 라이브러리 및 6량체 애다머 라이브러리를 포함하나 이에 한정되지 않는 애다머 라이브러리를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0096] 일부 양태에서, 6량체 애다머 라이브러리는 3량체 애다머 라이브러리로부터 생성될 수 있다. 이론에 구속됨 없이, 가능한 6량체의 총 수는 많을지라도, 6량체 페이로드를 올리고뉴클레오티드 합성에 매우 유용한 애다머 유형이다. 또한, 이는 좌측 대 우측 3량체 요소에 암호화된 IISRE 부위 간의 통상적인 스위칭을 허용할 것이다. 비제한적인 예에서, 초기 라이브러린, 64개 요소 3량체 애다머의 라이브러리는, 초기에, 개별적으로 또는 DNA 마이크로어레이 풀에서 완전한 세트로서, 종래의 포스포라미다이트 합성을 사용하여 생성된다. 애다머 3량체 라이브러리의 풀은 박테리오파지 내로 한꺼번에 클로닝되거나 생체내에서 증폭된다. 좌측 및 우측 애다머 3량체 라이브러리를 제조하고 이를 분해하여 페이로드 부위에서 무딘 단부를 생성한다. 그런 다음, 우측 및 좌측 라이브러리를 결합시켜 큰 애다머 풀을 형성한다. 결합되지 않은 물질은 엑소뉴클레아제에 의해 분해된다. 그런 다음, 나머지 온전한 애다머는 PCR을 사용하여 특이적 6량체 애다머를 증폭시키기 위한 템플릿으로서 사용한다. 그런 다음, 각각의 독립적인 6량체 PCR 생성물은 적절한 규모의 생산을 위해 박테리오파지 내로 클로닝될 수 있고, 또한 향후 사용을 위해 보관될 수 있다.

[0097] 본 개시의 애다머를 사용하는 핵산 합성 방법

[0098] 본원에 기술된 애다머는 임의의 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 합성하기 위해 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있다.

[0099] 일부 양태에서, 표적 핵산 서열은 적어도 약 100개, 또는 적어도 약 200개, 또는 적어도 약 300개, 또는 적어도 약 500개, 또는 적어도 약 600개, 또는 적어도 약 700개, 또는 적어도 약 800개, 또는 적어도 약 900개, 또는 적어도 약 1000개, 또는 적어도 약 1500개, 또는 적어도 약 2000개, 또는 적어도 약 2500개, 또는 적어도 약 3000개, 또는 적어도 약 3500개, 또는 적어도 약 4000개, 또는 적어도 약 4500개, 또는 적어도 약 5000개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 양태에서, 표적 이중-가닥 핵산은 적어도 하나의 동종중합체 서열을 포함할 수 있다.

[0100] 일부 양태에서, 표적 핵산 서열은 적어도 하나의 동종중합체 서열을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어, 동종중합체 서열은 단일 뉴클레오티드의 반복 또는 작은 모티프의 반복을 포함하나 이에 한정되지 않는, 임의의 유형의 반복 핵산 서열을 지칭하는 데 사용된다. 일부 양태에서, 동종중합체 서열은 적어도 약 10개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 20개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 30개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 40개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 50개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 60개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 70개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 80개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 90개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 100개 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0101] 일부 양태에서, 표적 핵산 서열은 적어도 약 10%, 또는 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 50%의 GC 함량을 가질 수 있다.

[0102] 본 개시의 합성 방법의 일부로서, 하나 이상의 애다머는 고형 지지체에 고정될 수 있다. 고형 지지체는 적어도 하나의 비드를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 임의의 고형 지지체일 수 있다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 비드는 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 아가로스 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 비드는 자성일 수 있다. 일부 양태에서, 고형 지지체는 웰 또는 챔버를 포함한다. 일부 양태에서, 고형 지지체는 복수의 웰 또는 챔버를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 복수의 웰은 다중 웰 플레이트를 포함한다. 일부 양태에서, 고형 지지체는 유리를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 고형 지지체는 유리 슬라이드를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 고형 지지체는 석영 슬라이드를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 고형 지지체는 폴리스티렌을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 고형 지지체는 폴리스티렌 슬라이드를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 고형 지지체는 코팅을 포함할 수 있으며, 코팅은 원하지 않는 단백질, 원하지 않는 핵산 또는 다른 원하지 않는 생체분자의 비특이적 결합을 방지한다. 일부 양태에서, 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 코팅은 트리에틸렌 글리콜(TEG)을 포함할 수 있다.

[0103] 애다머가 앵타머 서열을 포함하는 헤어핀을 포함하는 일부 양태에서, 애다머는 앵타머 서열에 대한 결합을 통해 고형 지지체에 고정될 수 있다. 즉, 고형 지지체는 애다머 상의 앵타머 서열에 결합하는 적어도 하나의 모이어티를 포함할 수 있다. 따라서, 애다머가 표 2에 제시된 앵타머 서열 중 하나를 포함하는 헤어핀을 포함하는 비제한적인 실시예에서, 고형 지지체는 표 2에 열거된 상응하는 리간드를 포함할 수 있다.

[0104] 애다머가 MCS 서열을 포함하는 일부 양태에서, 애다머는: a) 애다머를 적어도 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제와 접촉시켜 MCS 서열을 절단함으로써, 5' 행오버 또는 3' 행오버를 생성하는 단계; 및 b) 5' 행오버 또는

3' 행오버를 고행 지지체 상의 상보적 단일-가닥 핵산 분자에 혼성화함으로써, 애다머를 고행 지지체에 고정시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 고행 지지체에 고정될 수 있다. 전술한 방법은 고행 지지체 상의 상보적 단일-가닥 핵산 분자에 혼성화된 애다머를 리가아제와 접촉시킴으로써, 고행 지지체 상에서 애다머 및 상보적 단일-가닥 핵산 분자를 결합시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0105] 애다머가 MCS 서열을 포함하는 일부 양태에서, 애다머는, a) 애다머를 적어도 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제와 접촉시켜 MCS 서열을 절단함으로써, 무딘 단부를 생성하는 단계; 및 b) 애다머의 무딘 단부를 고행 지지체 상에 위치한 핵산 분자에 결합시킴으로써, 애다머를 고행 지지체에 고정시키는 단계를 포함하는 방법에 의해, 고행 지지체에 고정될 수 있다.

[0106] 일부 양태에서, 고행 지지체에 부착된 애다머는 본원에서 "부착 스테드"로서 지칭될 수 있다.

[0107] 도 8은 본 개시의 핵산 합성 방법의 개략적인 개요를 도시한다.

[0108] 방법의 제1 단계에서, 고행 지지체(도 8에서 비드 또는 표면으로 표시됨) 상에 고정된 애다머가 제공된다. 이러한 애다머는 본원에서 부착 스테드로서 지칭되고, 일 단부에서 전술한 방법 중 어느 하나를 사용하여 고행 지지체에 연결되며, 다른 단부에서 헤어핀으로 캠퍼된다. 부착 스테드는 또한 MCS 서열을 포함한다. 방법의 다음 단계에서, 부착 스테드는 MCS 서열을 절단하는 제한 엔도뉴클레아제와 접촉됨으로써, 3' 행오버, 5' 행오버 또는 무딘 단부를 생성한다. 방법의 다음 단계에서, MCS 서열, 제1 IISRE 서열(도 8에서 "L1"로 표시됨), 제1 N-량체 서열(도 8에서 "페이로드 #1"로 지칭됨), 및 제2 IISRE 서열(도 8에서 "R1"로 표시됨)을 포함하는 제1 애다머는, MCS 서열을 절단하여 3' 행오버, 5' 행오버 또는 무딘 단부를 생성하는 제한 엔도뉴클레아제와 접촉된다.

[0109] 방법의 다음 단계에서, 절단된 제1 애다머는 절단된 부착 스테드, 절단된 애다머 및 리가아제 효소와의 접촉에 의해 절단된 부착 스테드에 결합됨으로써, 고행 지지체에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열, 페이로드 #1 서열 및 제2 IISRE 서열을 포함하는 제1 결합 생성물을 생성한다(도 8의 좌측 참조). 그런 다음, 제1 결합 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리하여 임의의 결합되지 않은 부착 스테드 및/또는 제1 애다머를 제거한다.

[0110] 이어서, 단계는 고행 지지체 상에 고정된 다른 애다머, 및 MCS 서열, 제3 IISRE 서열(도 8에서 "R2"로 표시됨), 제2 N-량체 서열(도 8에서 "페이로드 #2"로 지칭됨) 및 제4 IISRE 서열(도 8에서 "L2"로 표시됨)을 포함하는 제2 애다머를 사용하여 반복되어, 고행 지지체에 고정되고 MCS 서열, 제3 IISRE 서열, 페이로드 #2 서열, 및 제4 IISRE 서열을 포함하는 제2 결합 생성물을 생성한다(도 8의 우측 참조).

[0111] 방법의 다음 단계에서, 제1 결합 생성물은 제2 IISRE 서열(R1)을 절단하는 IISRE(도 8에서 "R1 효소"로 표시됨)와 접촉됨으로써, 3' 오버행, 5' 오버행 또는 무딘 단부를 생성하며, 이에 의해: a) 고행 지지체에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(R1), 페이로드 #1 서열, 및 3' 오버행, 5' 오버행 또는 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물; 및 b) 제2 IISRE 서열(R1)을 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성한다. 그런 다음, 제2 절단된 생성물을 세척하여 폐기한다.

[0112] 방법의 다음 단계에서, 제2 결합 생성물은 제4 IISRE 서열(L2)을 절단하는 IISRE(도 8에서 "L2 효소"로 표시됨)와 접촉됨으로써, 3' 오버행, 5' 오버행 또는 무딘 단부를 생성하며, 이에 의해: a) 용액 내로 방출되고, 일 단부에서의 헤어핀, 제3 IISRE 서열(R2), 페이로드 #2 서열, 및 3' 오버행, 5' 오버행 또는 무딘 단부를 포함하는 제3 절단된 생성물; 및 b) 고행 지지체에 고정되고 MCS 서열 및 제4 IISRE 서열(L2)을 포함하는 제4 절단된 생성물을 생성한다.

[0113] 다음 단계에서, 제1 절단된 생성물 및 제3 절단된 생성물은 제1 절단된 생성물, 제3 절단된 생성물 및 리가아제 효소와 접촉됨으로써(예를 들어, 제3 절단된 생성물을 포함하는 용액은 고체 표면에 고정된 제1 절단된 생성물을 포함하는 용액으로 전달되고, 리가아제 효소가 해당 용액에 첨가됨으로써) 결합되며, 이에 의해: 고체 표면에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(L1), 페이로드 #1 서열, 페이로드 #2 서열 및 제3 IISRE 서열(R2)을 포함하는 제3 결합 생성물을 생성한다. 그런 다음, 이러한 결합 반응을 엑소뉴클레아제로 처리하여 임의의 결합되지 않은 제1 절단된 생성물 및/또는 제3 절단된 생성물을 제거한다.

[0114] 전술한 단계는 표적 핵산 서열이 합성될 때까지 반복될 수 있다.

[0115] 예시적인 27개 뉴클레오타이드 길이의 표적 핵산 서열의 합성의 개략도가 도 9a 내지 9h에 도시되어 있다. 합성될 서열은 도 9a의 상단에 도시되어 있다. 서열은 표적 핵산 서열을 합성하기 위해 함께 결합될 애다머 내로 혼입될 3개의 뉴클레오타이드 또는 4개의 뉴클레오타이드에 의해 중첩되는 11개의 6량체 단편으로 세분화된다. 도 9b는

6량체 단편을 포함하는 애다머가 결합되어 표적 핵산 서열을 효율적으로 합성하는 순서를 맵핑하는 예시적인 표적 핵산 서열에 대한 어셈블리 트리를 도시한다. 홀수 오버행과 짝수 오버행의 어셈블리 및 배치를 탐색하는 방법에는 여러 가지가 있지만, 어셈블리 순서는 IISRE 효소 부위와 생성될 서열의 호환성에 의해 결정되어야 한다. 도 9b에서, 번호가 매겨진 6량체 (1) 내지 (11)은 도 9c 내지 9h에서 번호가 매겨진 6량체에 상응한다. 트리의 각 노드에서의 수는 어셈블리의 각 단계에서의 페이로드 길이에 상응한다. '4' 및 '3'은 사용된 오버행의 길이를 나타낸다. 생성된 페이로드 시퀀스의 길이는, 길이 = a + b - n이고, 여기에서 'a' 및 'b'는 입력 페이로드의 길이이고 'n'은 오버행의 길이이다.

[0116] 표적 핵산 서열 합성의 제1 단계는 도 9c에 도시되어 있으며, 이는, 도 9b의 6량체 #1인 GACATG 6량체를 포함하는 애다머를 형성하기 위한, GAC의 3량체 서열을 포함하는 애다머 및 ATC의 3량체 서열을 포함하는 애다머의 로딩을 도시한다. GACATG 6량체를 생성하기 위해, MCS 서열을 포함하는 제1 부착 스테드, 및 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(도 9c에서 "L1"으로 표시됨), 서열 GAC를 포함하는 3량체 서열, 및 제2 IISRE 서열(도 9c에서 "R1"으로 표시됨)을 포함하는 제1 애다머를 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제와 접촉시켜 MCS 서열을 절단함으로써, 상보적 행오버를 생성한다. 그런 다음, 이들 상보적 행오버를 혼성화하고, 혼성화된 복합체를 리가아제 효소와 접촉시킴으로써 애다머 및 부착 스테드를 함께 결합시켜, 고체 표면에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(L1), 3량체 서열 GAC, 및 제2 IISRE 서열(R1)을 포함하는 결합 생성물 #1을 수득한다. 고체 표면에 고정되고 MCS 서열, 제3 IISRE 서열(L2), 3량체 서열 ATG 및 제4 IISRE 서열(R2)을 포함하는 결합 생성물 #2를 수득하기 위해, MCS 서열을 포함하는 제2 부착 스테드, 및 MCS 서열, 제3 IISRE 서열(도 9c에서 "L2"로 표시됨), 서열 ATG를 포함하는 3량체 서열, 및 제4 IISRE 서열(도 9c에서 "R2"로 표시됨)을 포함하는 제2 애다머를 사용하여, 동일한 방법이 반복될 수 있다. 다음으로, 결합 생성물 #1은 제2 IISRE 서열(R1)을 절단하는 IISRE(도 9c에서 "R1 효소"로 표시됨)와 접촉됨으로써, 고체 표면에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(L1) 및 3량체 서열 GAC에 이어서 무딘 단부를 포함하는 절단된 생성물 #1을 생성한다. 유사하게, 결합 생성물 #2는 제3 IISRE 서열(L2)을 절단하는 IISRE(도 9c에서 "L2 효소"로 표시됨)와 접촉됨으로써, 용액 내로 방출되고 무딘 단부, 3량체 서열 ATG, 및 제4 IISRE 서열(R2)을 포함하는 절단된 생성물 #2를 생성한다. 그런 다음, 절단된 생성물 #1 및 절단된 생성물 #2를 리가아제 효소를 사용하여 함께 결합시켜, 고형 지지체에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(L1), 6량체 서열 GACATG 및 제4 IISRE 서열(R2)을 포함하는 결합 생성물 #3을 수득한다. 이들 생성물은 선택적으로 엑소뉴클레아제로 처리되어 임의의 결합되지 않은 절단된 생성물 #1 및/또는 절단된 생성물 #2를 제거할 수 있다. 본 단락에 기술된 단계는, 도 9b에 도시된 6량체 서열 #2 내지 #11을 포함하는 애다머를 생성하기 위해, 상이한 3량체 서열을 포함하는 추가 애다머를 사용하여 반복될 수 있다.

[0117] 방법은 도 9d에서 계속 진행되며, 이는 6량체 서열 #1 및 6량체 서열 #2를 포함하는 애다머의 결합을 도시한다 (도 9b 참조). 애다머 #1은 고체 표면에 고정되며, MCS 서열, 도 9c로부터의 제1 IISRE 부위(L1), 6량체 서열 GACATG(도 9b로부터의 6량체 서열 #1), 및 도 9c의 제4 IISRE 서열(R2)를 포함한다. 애다머 #2는 고체 표면에 고정되며, MCS 서열, 제5 IISRE 부위(도 9d에서 "L3"으로 표시됨), 6량체 서열 ATGAGG(도 9b로부터의 6량체 서열 #2), 및 제6 IISRE 부위(도 9d에서 "R3"으로 표시됨)를 포함한다. 애다머 #1은 제4 IISRE 부위(R2)를 절단하는 IISRE와 접촉되어 N-량체 서열에서 단일-가닥 행오버를 생성함으로써, 고체 표면에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(L1), 및 단일-가닥 행오버를 갖는 N-량체 서열을 포함하는 절단된 생성물 #3을 생성한다. 애다머 #2는 제5 IISRE 부위(L3)를 절단하는 IISRE와 접촉되어 N-량체 서열에서 단일-가닥 행오버를 생성함으로써, 용액 내로 방출되고 단일-가닥 행오버를 갖는 N-량체 서열 및 제6 IISRE 서열(R3)을 포함하는 절단된 생성물 #4를 생성한다. 그런 다음, 절단된 생성물 #3 및 절단된 생성물 #4를 리가아제 효소를 사용하여 함께 결합시켜, 고형 지지체에 고정되고 MCS 서열, 제1 IISRE 서열(L1), N-량체 서열 GACATGAGG(합성될 표적 핵산 서열에서의 최초의 9개 뉴클레오티드) 및 제6 IISRE 서열(R3)을 포함하는 결합 생성물 #4를 수득한다. 결합 생성물 #4는 선택적으로 엑소뉴클레아제로 처리되어 임의의 결합되지 않은 절단된 생성물 #1 및/또는 절단된 생성물 #2를 제거할 수 있다.

[0118] 방법은 도 9에서 계속 진행되며, 여기에서 결합 생성물 #4 및 6량체 서열 #3을 포함하는 애다머(도 9b 참조)를 상응하는 IISRE로 처리하여, 이에 이어서 함께 결합되는 절단된 생성물을 생성하여, 고체 표면에 고정되고 합성될 표적 핵산 서열에서의 최초 11개 뉴클레오티드인, N-량체 서열 GACATGAGGGT(서열번호 75)를 포함하는 애다머를 생성한다.

[0119] 순차적인 IISRE 분해 및 결합은, 27개 뉴클레오티드 길이의 표적 핵산 서열에 상응하는 N-량체 서열을 포함하는 애다머가 합성될 때까지, 도 9b에 도시된 어셈블리 맵에 따라 도 9f 내지 도 9h에서 반복된다. 최종 단계에서, 27개 뉴클레오티드 길이의 표적 핵산 서열은, 27개 뉴클레오티드 길이의 표적 핵산 서열의 측면에 위치하는

IISRE 서열을 절단하는 IISRE로 애다머를 처리함으로써 최종 합성된 애다머로부터 절제될 수 있다.

[0120] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지 단계 (a) 내지 (f)를 반복하는 단계.

[0121] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지 단계 (c) 내지 (f)를 반복하는 단계를 포함하는, 방법.

[0122] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (a) 내지 (f)를 반복하는 단계.

[0123] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에

서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (c) 내지 (f)를 반복하는 단계를 포함하는, 방법.

[0124] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 단계 (f)의 생성물 및 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (a) 내지 (f)를 반복하는 단계.

[0125] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 단계 (f)의 생성물 및 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (c) 내지 (f)를 반복하는 단계를 포함하는, 방법.

[0126] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1 애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고행 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 단계 (f)의 생성물 및/또는 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (a) 내지 (f)의 임의의 조합을 반복하는 단계.

[0127] 전술한 방법은 다음과 같이 기술될 수 있다: a) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제1 애다머를 제공하는 단계로서, 제1 애다머는 제1 IISRE 서열, 이어서 제1 N-량체 서열, 이어서 제2 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; b) 고행 지지체에 고정되는 본 개시의 제2 애다머를 제공하는 단계로서, 제2 애다머는 제3 IISRE 서열, 이어서 제2 N-량체 서열, 이어서 제4 IISRE 서열, 이어서 헤어핀 구조를 포함하는, 단계; c) 제1

애다머에 위치한 제2 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제1 애다머를 접촉시킴으로써, 고품 지지체에 고정되고 제1 IISRE 서열, 제1 N-량체 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제1 절단된 생성물을 생성하는 단계; d) 제2 애다머에 위치한 제3 IISRE 서열을 절단하는 IISRE와 제2 애다머를 접촉시킴으로써, 용액으로 방출되고 제2 N-량체 서열, 제4 IISRE 서열, 및 적어도 하나의 3' 오버행, 5' 오버행 및 무딘 단부를 포함하는 제2 절단된 생성물을 생성하는 단계로서, 제2 절단된 생성물은 헤어핀 구조에 의해 일 단부에서 캡핑되는, 단계; e) 제1 결찰 생성물을 생성하기 위해, 리가아제 효소를 사용하여 제1 절단된 생성물 및 제2 절단된 생성물을 결찰시키는 단계; f) 단계 (e)의 생성물을 엑소뉴클레아제로 처리함으로써, 비-결찰된 제1 절단된 생성물 및/또는 제2 절단된 생성물을 제거하는 단계; 및 g) 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 합성될 때까지, 단계 (f)의 생성물 및/또는 하나 이상의 추가 애다머를 사용하여 단계 (c) 내지 (f)의 임의의 조합을 반복하는 단계를 포함하는, 방법.

[0128] 본 개시의 방법의 일부 양태에서, 리가아제 효소는 인간 DNA 리가아제 III(hLig3)일 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, hLig3은 높은 무딘 단부 결찰 효율(> 60%)을 나타낸다. 본 개시의 방법의 일부 양태에서, 리가아제 효소는 T4 DNA 리가아제일 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, T4 DNA 리가아제는 2, 3 또는 4-뉴클레오타이드 길이의 3' 또는 5' 행오버를 포함하는 핵산 단편의 높은 결찰 효율을 나타낸다(> 80%). 리가아제 효소는 당업계에 공지된 임의의 리가아제 효소일 수 있다.

[0129] 본 개시의 방법의 일부 양태에서, 엑소뉴클레아제는 T7 엑소뉴클레아제일 수 있다.

[0130] 본 개시의 방법의 일부 양태에서, 합성된 표적 핵산 서열은 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%의 순도를 갖는다.

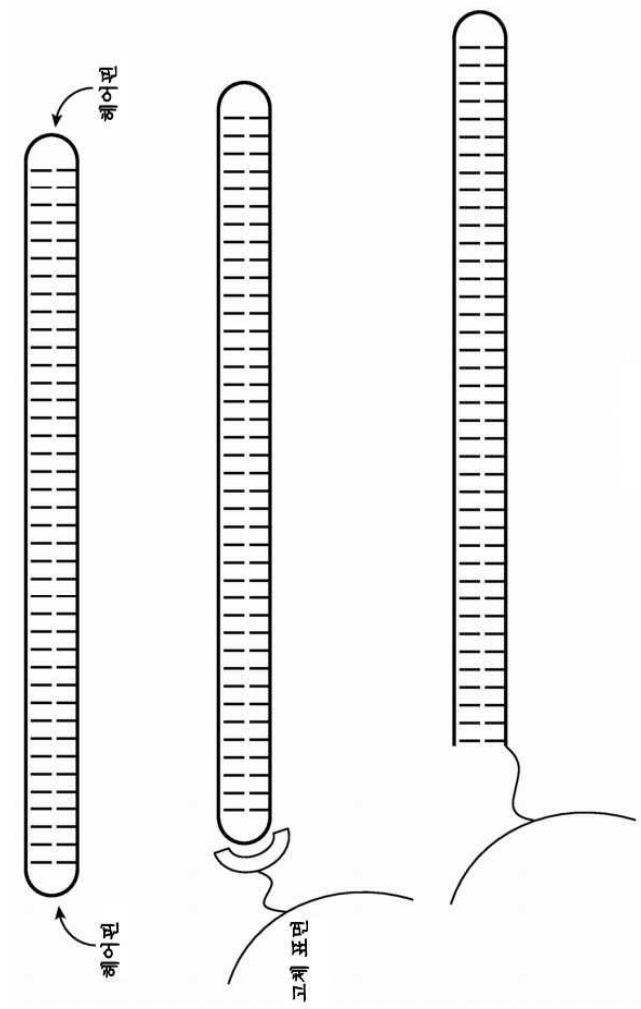
[0131] 일부 양태에서, 합성된 표적 핵산 서열의 순도는 정확한/원하는 결찰 생성물에 상응하는 단일 결찰 반응, 또는 다수의 연결 반응의 일부로서 형성된 총 결찰 생성물의 백분율을 지칭한다. 이론에 구속됨 없이, 핵산 분자 생성물의 결찰을 포함하는 본 개시의 방법은 복수의 결찰 생성물을 생성할 수 있으며, 이들 중 일부는 정확한/원하는 결찰 생성물에 상응하고, 일부는 원하지 않는(측부 반응, 부정확한 결찰 등) 것이다. 합성되는 결찰 생성물 또는 표적 분자의 순도는 백분율로서 표현될 수 있으며, 이는 정확한/원하는 결찰 생성물에 상응하는 형성된 총 결찰 생성물의 백분율에 상응한다.

[0132] 실시예 1 - 애다머 기반 합성

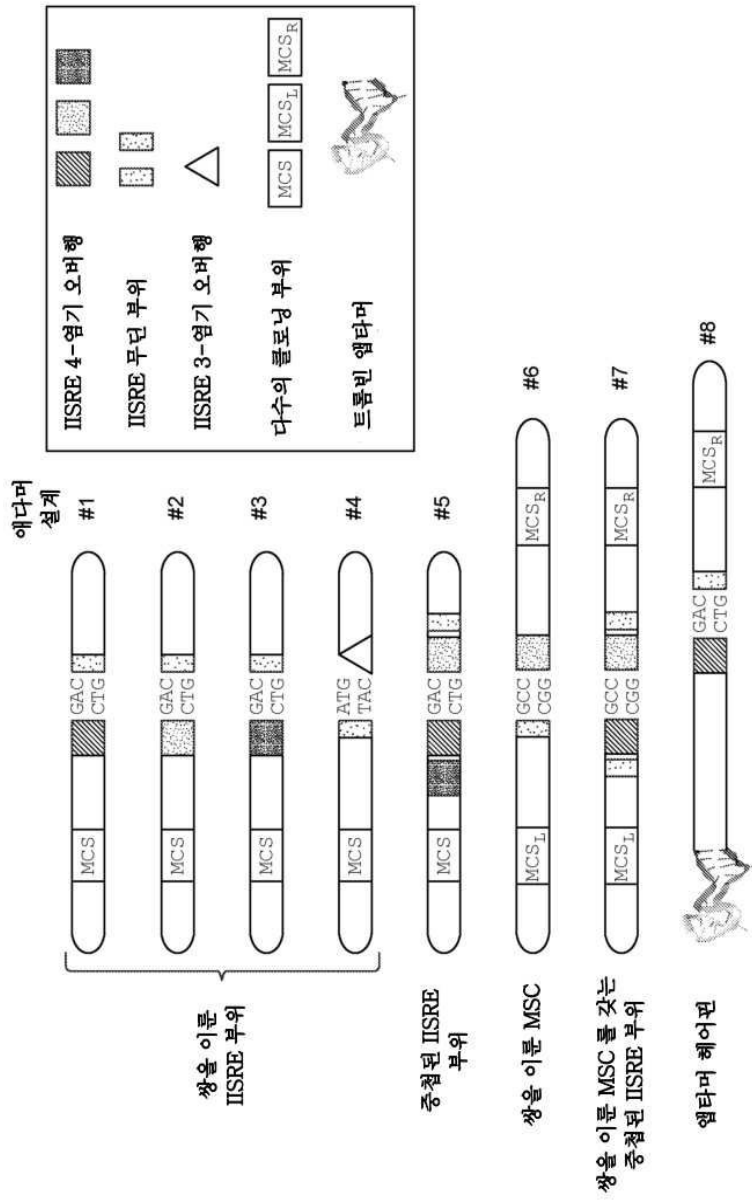
[0133] 다음은 표적 핵산 분자를 합성하는 데 사용된 본 개시의 애다머 기반 합성 방법의 비제한적인 예이다. 본 실시예에서, 일련의 제한 효소 분해 및 후속 결찰은 도 10에 요약된 바와 같이 수행되었다. 각각의 결찰 반응의 생성물을 겔 전기영동을 사용하여 분석하였다. 도 11은 해당 분석의 결과를 도시한다. 도 11에 도시된 결과는, 본 개시의 애다머 효소를 사용하는 반복 제한 효소 분해 및 후속 결찰 반응을 포함하는 본 개시의 방법이 핵산 분자를 효율적으로 합성할 수 있음을 입증한다.

도면

도면1



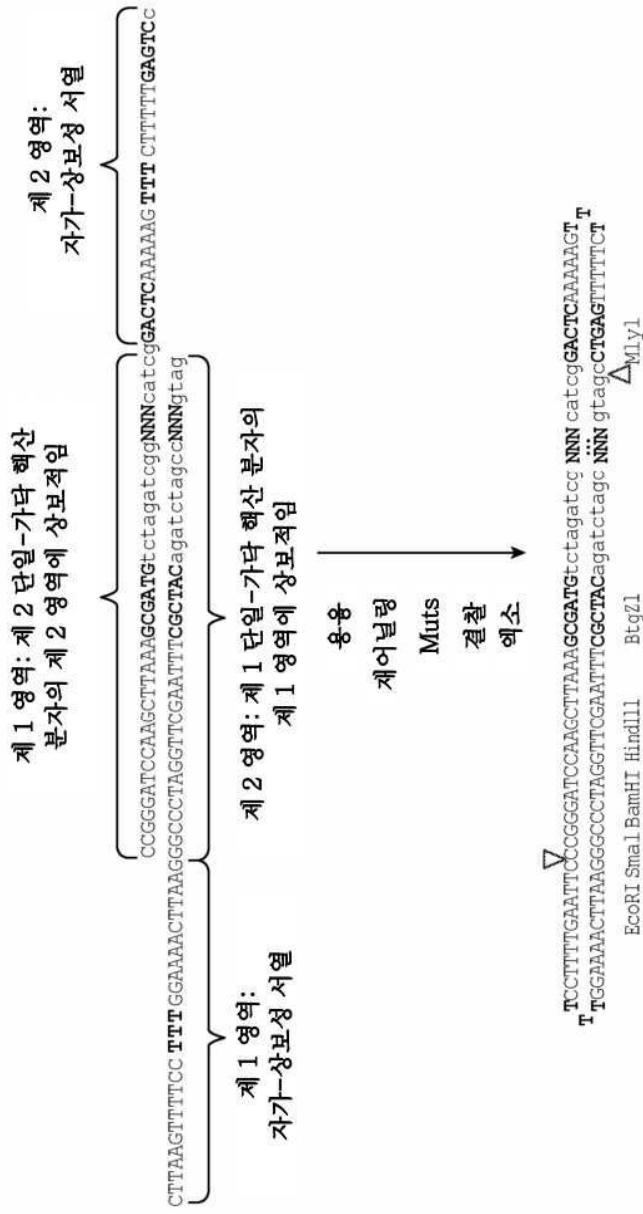
도면2



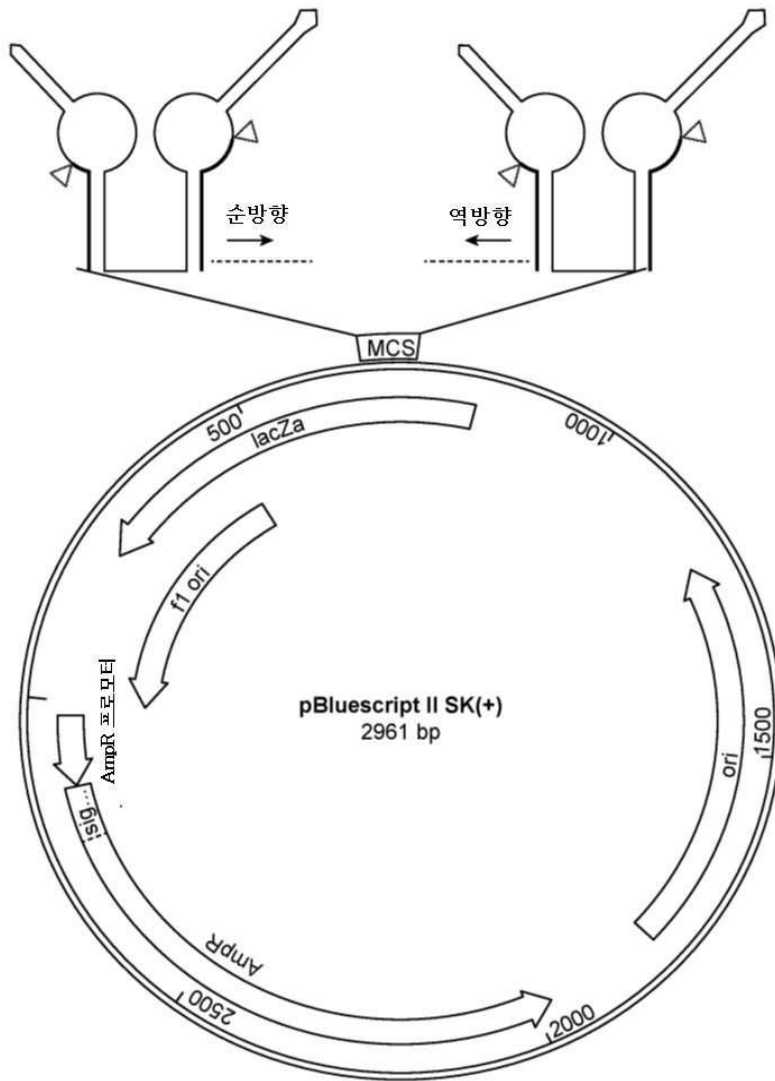
도면3

TCCTTTGAAITCCCGGGATCCAAGCTT AAA GAAGAC cccNNN catcg GACTCAAAAAGT T	
T TGGAAAACTTAAGGGCCCTAGGTTCGAA TTT CTCTG gNNN gtagc CTGAG TTTTCT T	MCS Bbs I MlyI
TCCTTTGAAITCCCGGGATCCAAGCTT AAA GCGATG tctagatcggNNN catcg GACTCAAAAAGT T	
T TGGAAAACTTAAGGGCCCTAGGTTCGAA TTT CGCTACagatctagccNNN gtagc CTGAG TTTTCT T	MCS BtgZI MlyI
TCCTTTGAAITCCCGGGATCCAAGCTT AAAACCTGC tctgNNN catcg GACTCAAAAAGT T	
T TGGAAAACTTAAGGGCCCTAGGTTCGAA TTT TGGACGagacNNN gtagc CTGAG TTTTCT T	MCS BfuAI MlyI
TCCTTTGAAITCCCGGGATCCAAGCTT AAA CACCTGC tctgNNN catcg GACTCAAAAAGT T	
T TGGAAAACTTAAGGGCCCTAGGTTCGAA TTT GTGGACGagacNNN gtagc CTGAG TTTTCT T	MCS PaqCI MlyI
TCCTTTGAAITCCCGGGATCCAAGCTT AAA GCGATG tctagatcggNNN catcg GACTCAAAAAGT T	
T TGGAAAACTTAAGGGCCCTAGGTTCGAA TTT CCTACagatctagcNNN gtagc CTGAG TTTTCT T	MCS FokI MlyI
TCCTTTGAAITCCCGGGATCCAAGCTT AAA CTCTTCgNNN catcg GACTCAAAAAGT T	
T TGGAAAACTTAAGGGCCCTAGGTTCGAA TTT GAGAAGcNNN gtagc CTGAG TTTTCT T	MCS EarI MlyI

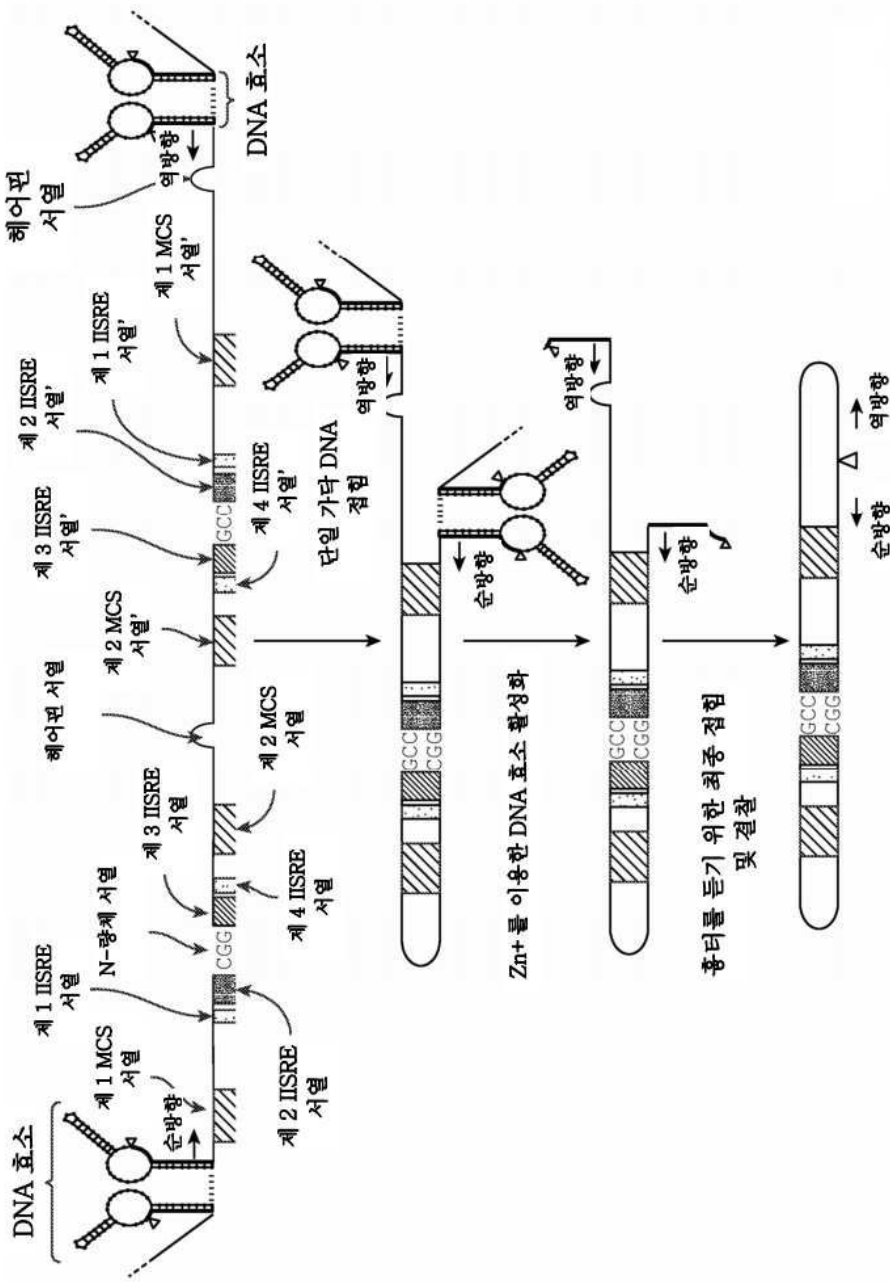
도면5



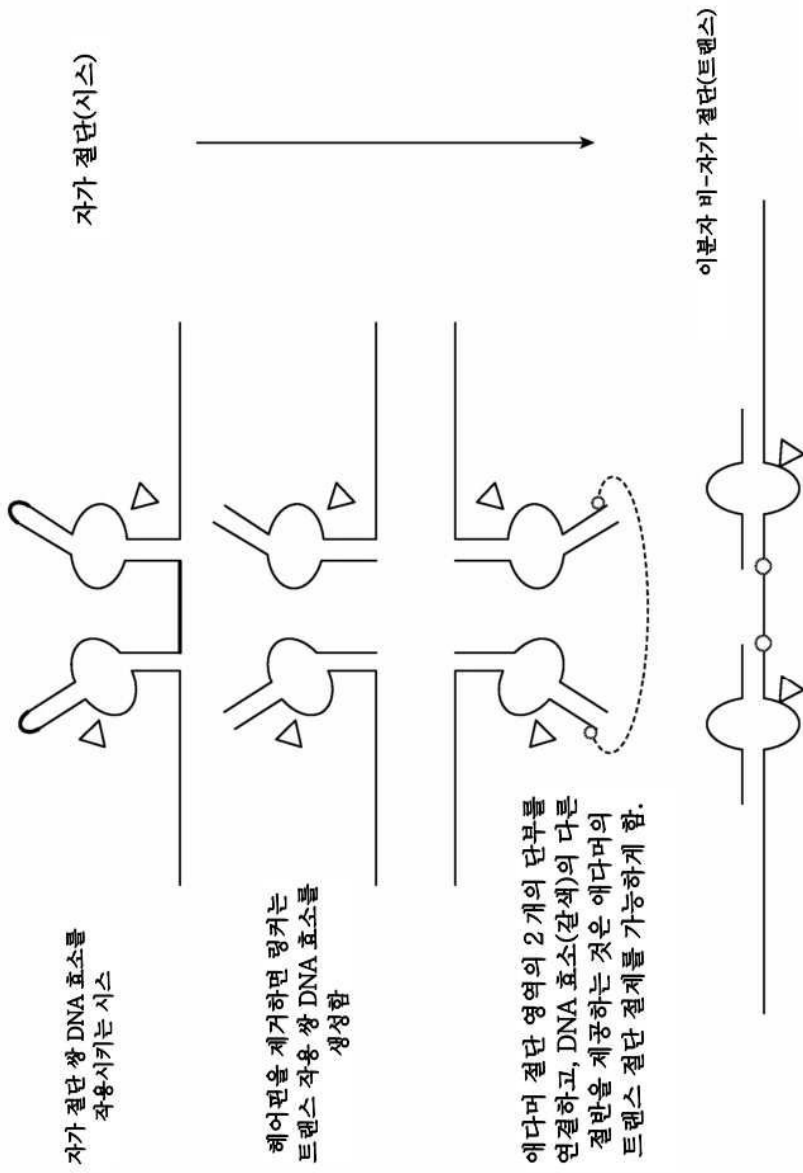
도면6



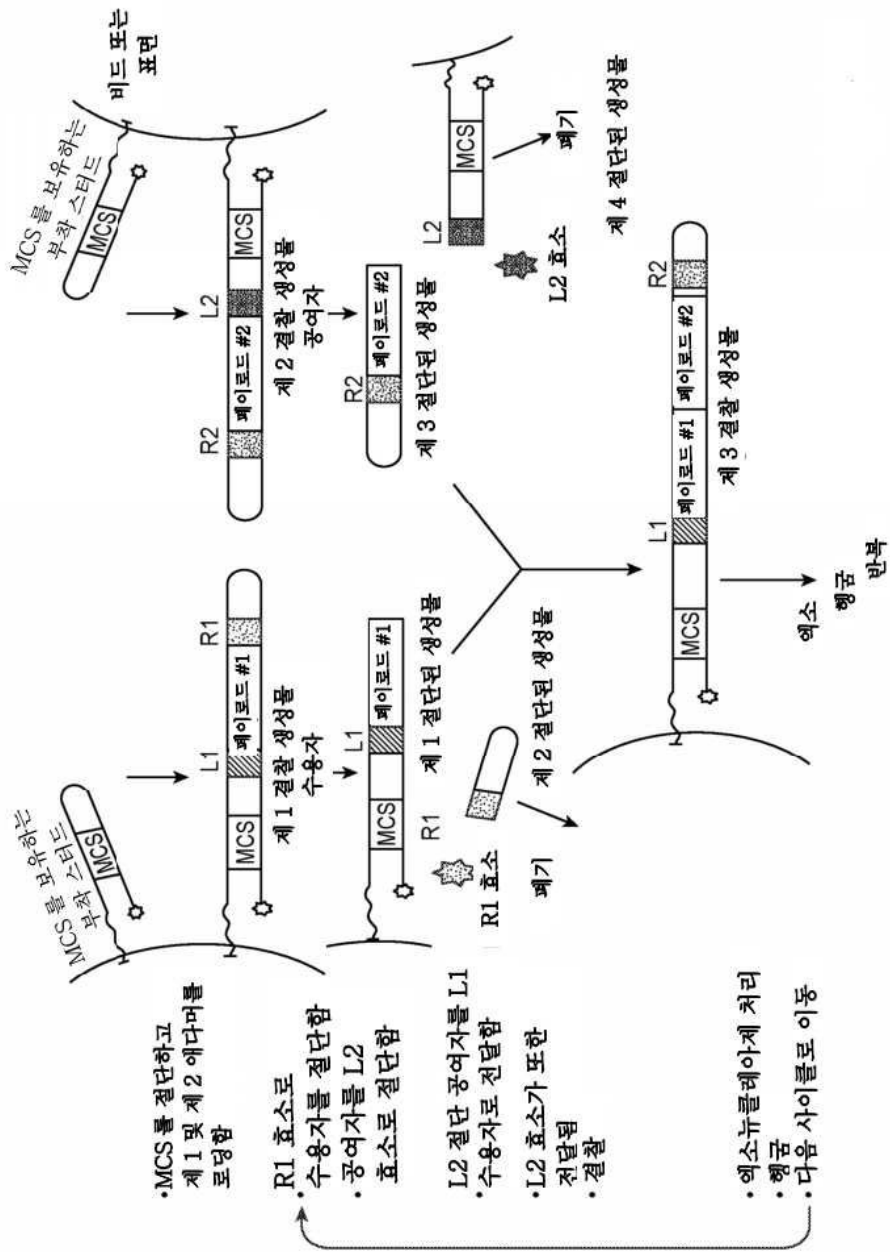
도면7a



도면7b



도면8



도면9a

${}^4\text{GACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTG}{}^4$

${}^4\text{GACATG}{}^3$

${}^3\text{ATGAGG}{}^4$

${}^4\text{GAGGGT}{}^4$

${}^4\text{GGGTGC}{}^4$

${}^4\text{GTGCCC}{}^4$

${}^4\text{GCCCGC}{}^4$

${}^4\text{CCGCTC}{}^4$

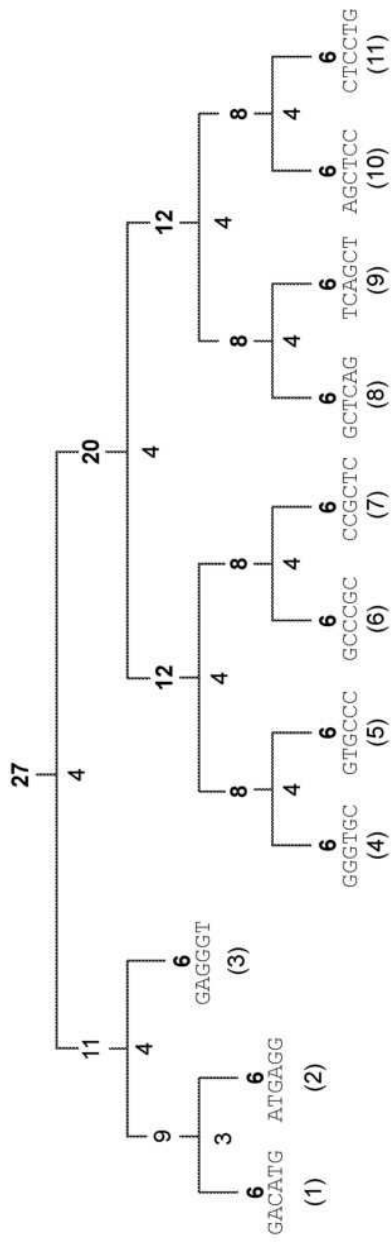
${}^4\text{GCTCAG}{}^4$

${}^4\text{TCAGCT}{}^4$

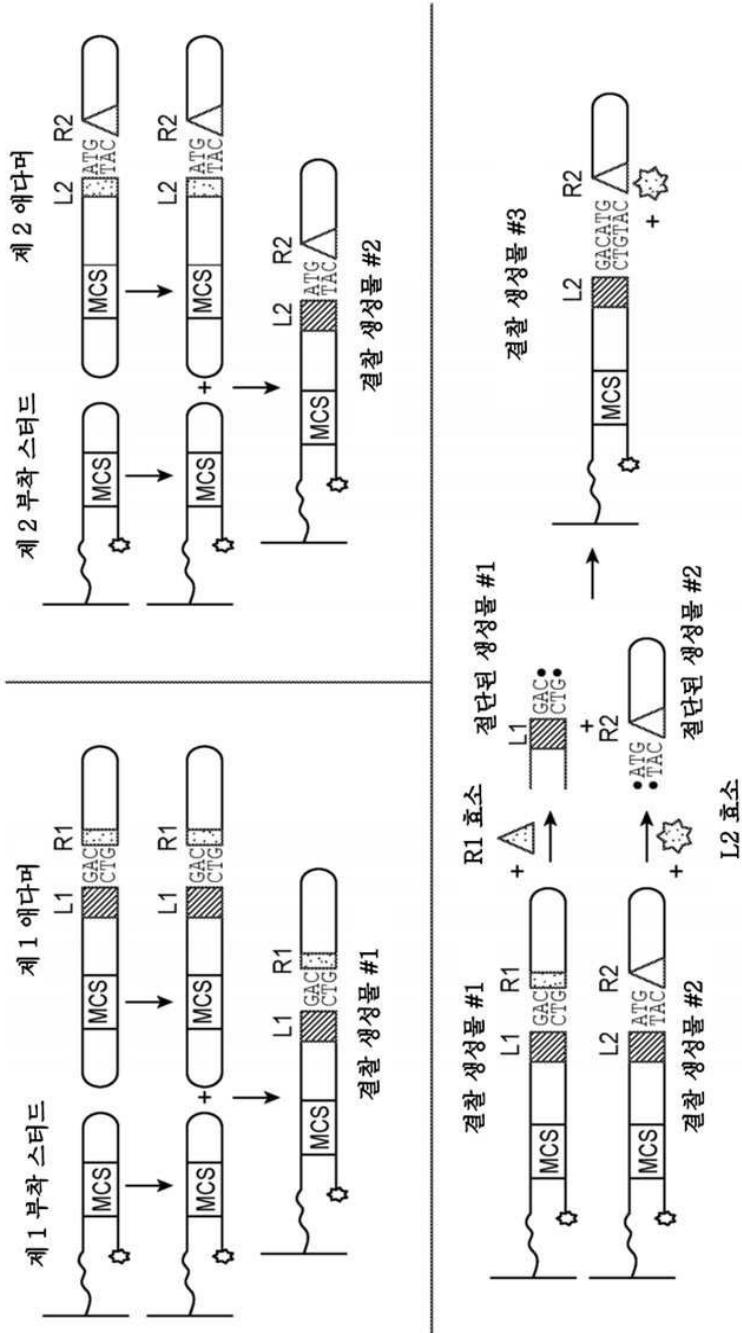
${}^4\text{AGCTCC}{}^4$

${}^4\text{CTCCTG}{}^4$

도면9b

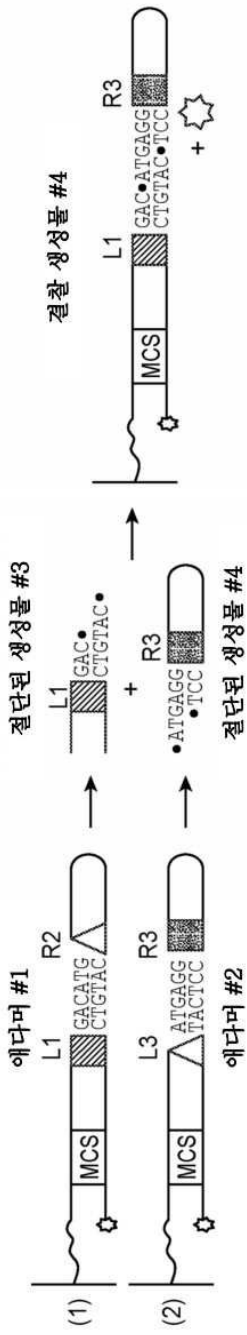


도면9c



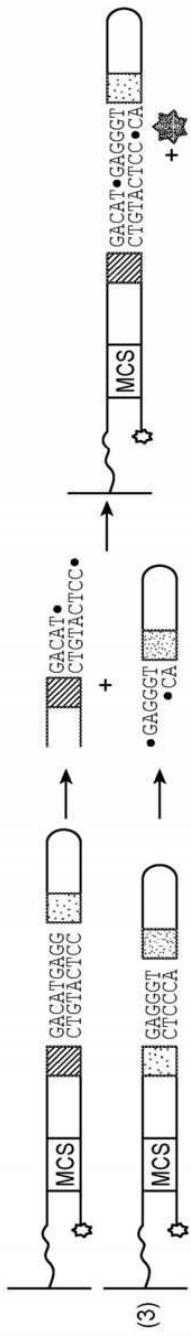
도면9d

6 램체 페이로드(도 9b 에 따름)



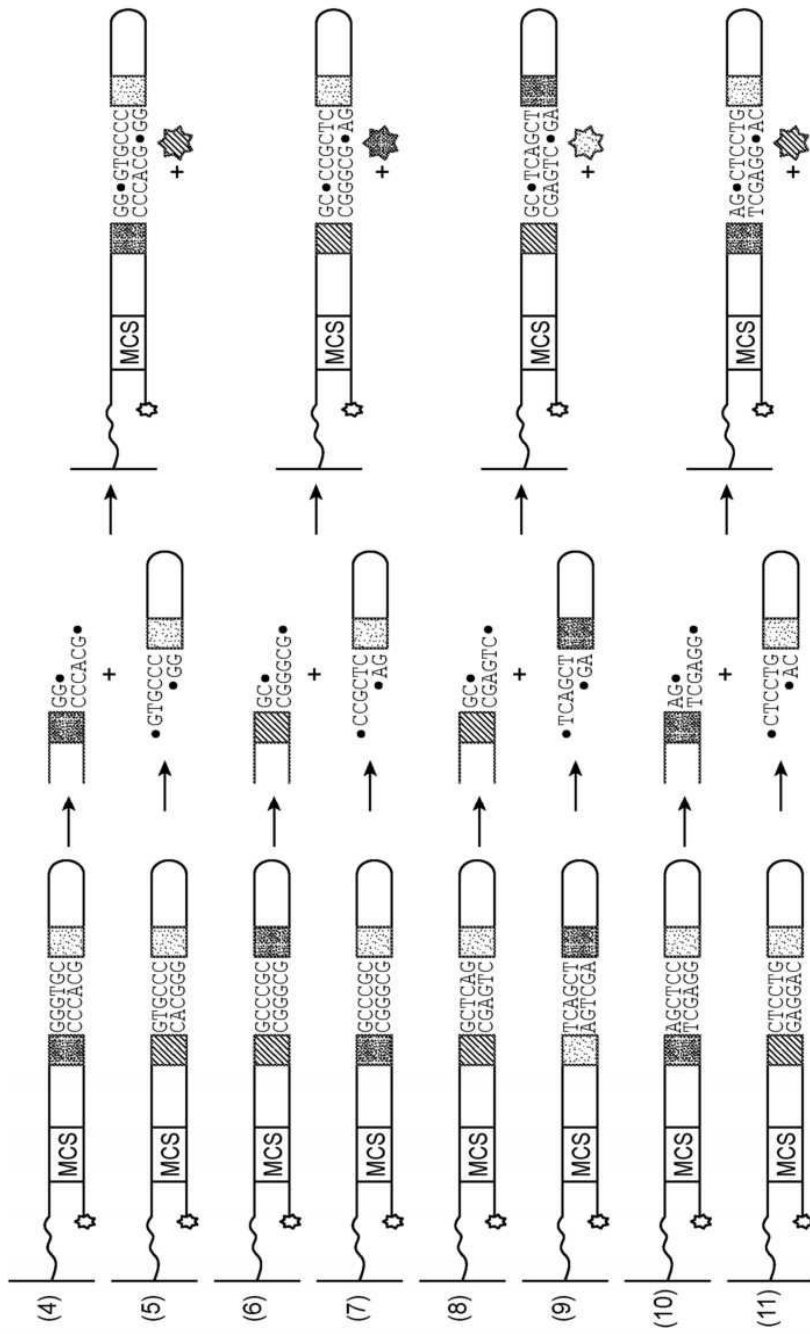
도면9e

6 량체 페이로드(도 9b 에 따름)

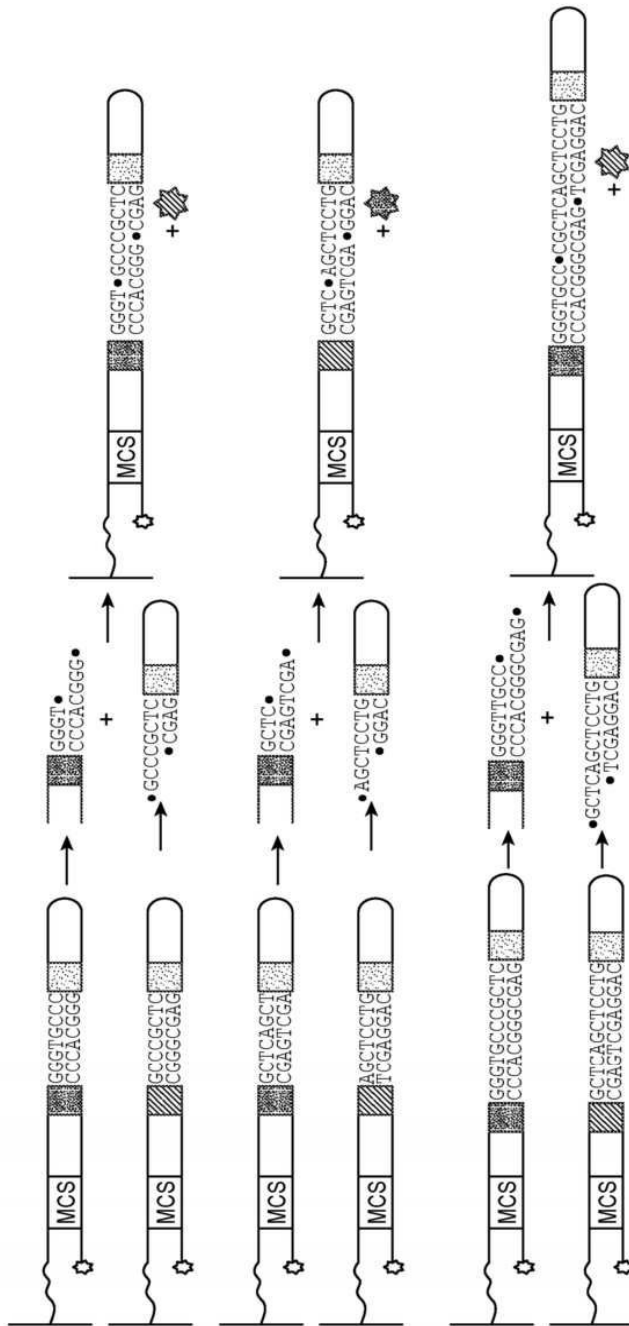


도면9f

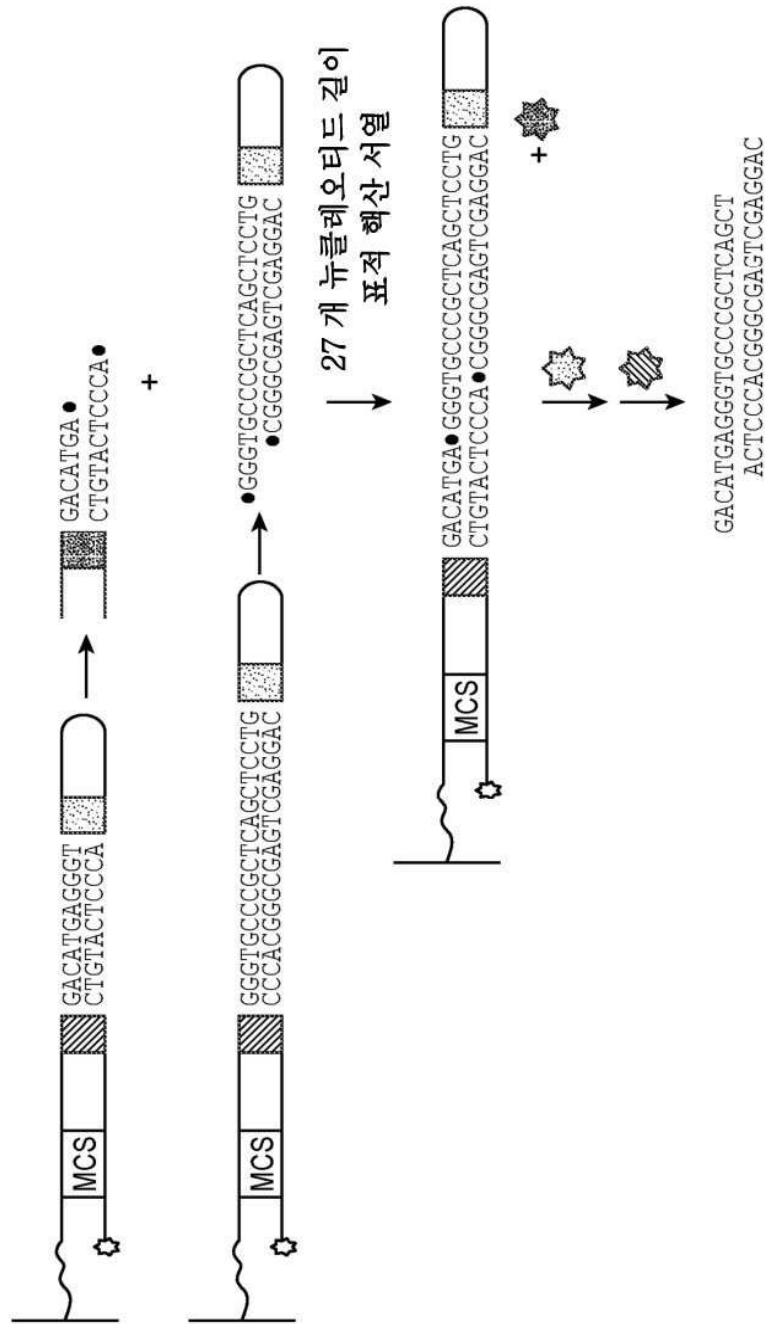
6 램체 페이로드(도 9b 에 따름)



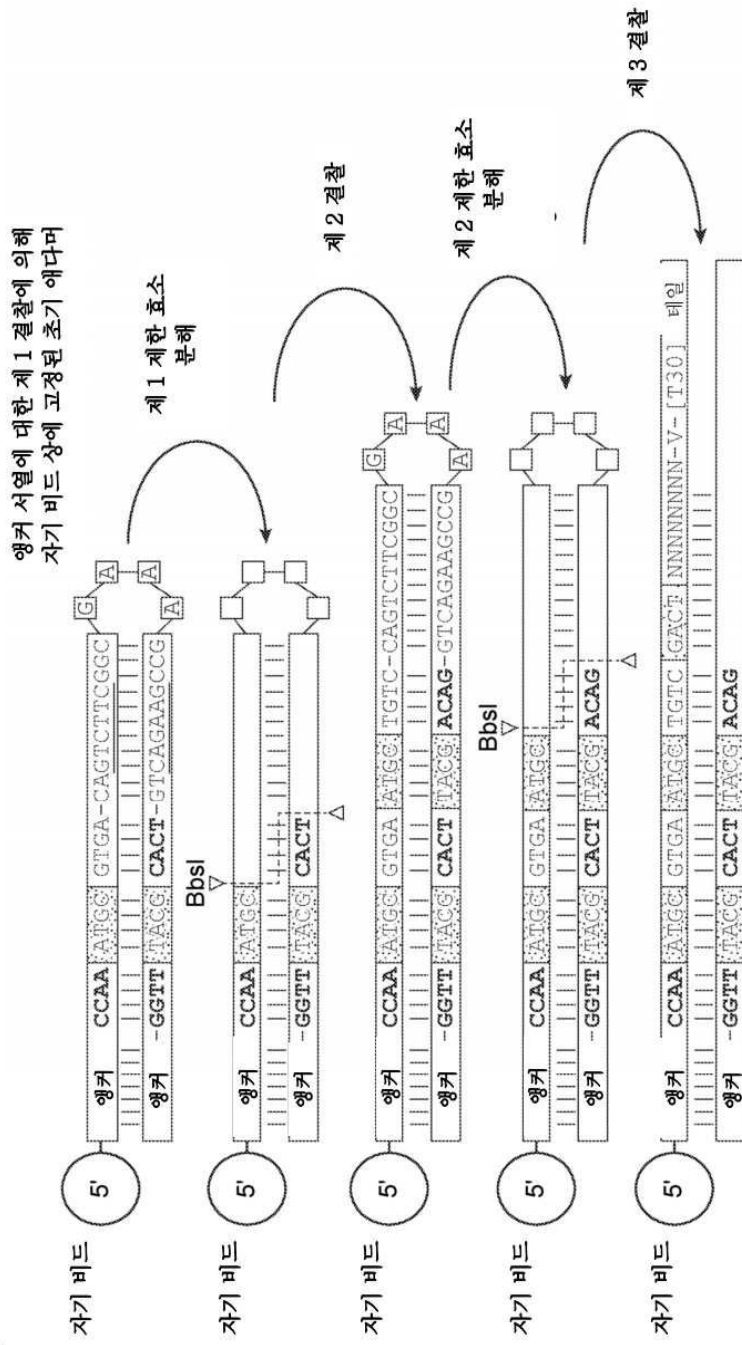
도면9g



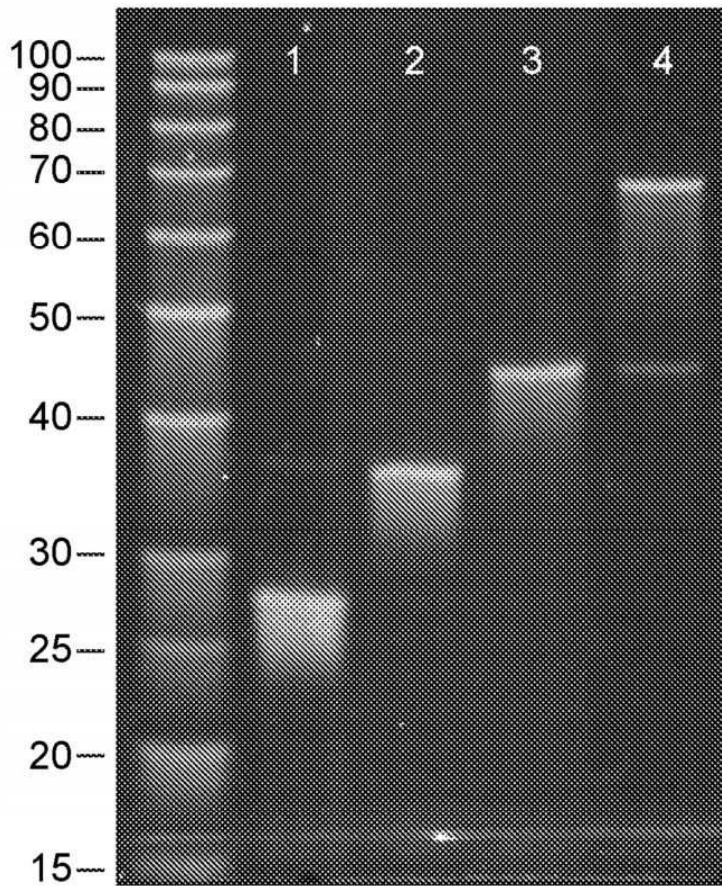
도면9h



도면10



도면11



겔 레이아웃:

1. 518/609(비드 상의 앵커)
2. 결찰 1 + 세척 + 절단
3. 결찰 2 + 세척 + 절단
4. 결찰 3

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Camena Bioscience Limited

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR PHOSPHORAMIDITE-FREE ENZYMATIC
SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS

<130> DNWR-009/001WO 327431-2035

<150> US 63/179,828

<151> 2021-04-26

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (41)..(43)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 1
 ttccttttga attcccggga tccaagctta aagaagaccc nncatcgga ctcaaaaagt 60

 t 61
 <210> 2
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (39)..(41)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 2
 tggaaaactt aaggcccta ggttcgaatt cttctgggmn ngtagcctga gtttttct 58
 <210> 3
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (49)..(51)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400>
 > 3
 ttccttttga attcccggga tccaagctta aagc gatgtc tagatcggnn ncatcggact 60
 caaaaagt 69
 <210> 4

<211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (48)..(50)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 4
 tggaaaactt aagggcccta ggttcgaatt tcgctacaga tctagccnmm gtagcctgag 60
 tttttct 67
 <210> 5
 <211>
 > 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (43)..(45)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 5
 ttccttttga attcccggga tccaagctta aaacctgctc tgnnncatcg gactcaaaaa 60
 gtt 63
 <210> 6
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (42)..(44)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 6
 tggaaaactt aagggcccta ggttcgaatt ttggacgaga cmmngtagcc tgagtttttc 60
 t 61
 <210> 7

<211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (43)..(45)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 7
 ttcccttgaa ttcccgggat ccaagcttaa acacctgctc tgnnncatcg gactcaaaaa 60
 gtt 63
 <210> 8
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (43)..(45)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 8
 tggaaaactt aagggccta gggtcgaatt tgtggacgag acnnngtagc ctgagttttt 60
 ct 62
 <210> 9
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (47)..(49)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 9
 ttccctttga attcccggga tccaagctta aaggatgtct agatcgnnnc atcggactca 60
 aaaagtt 67
 <210> 10

<211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (46)..(48)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 10
 tggaaaactt aaggcccta ggttcgaatt tcctacagat ctagnnngt agcctgagtt 60
 tttct 65
 <210> 11
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(42)
 <223> n is a, c, g, or t
 <
 <400> 11
 ttccttttga attcccggga tccaagctta aactcttcgn nncatcggac tcaaaaagtt 60
 <210> 12
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (39)..(41)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 12
 tggaaaactt aaggcccta ggttcgaatt tgagaagcnn ngtagcctga gtttttct 58
 <210> 13
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence
 <400> 13
 aaagcagcga agactg 16

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 14
 ttctcgtcgt tctgacagt 20

<210> 15
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 15
 gggacgagtc 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 16
 gcgatggagt c 11

<210> 17
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 17
 ggtgagaaga c 11

<210> 18
 <211> 11

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 18
 gccgccgtct c 11
 <210> 19
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 19
 gccgcggtct c 11

 <210> 20
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 20
 gccgcngtct c 11
 <210> 21
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 21
 acggcgccgc 10
 <210> 22
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 22
 acggcnngag tc 12
 <210> 23
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 23
 ggtganctct tc 12
 <210> 24
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 24
 ggtgagctct tc 12
 <210> 25
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 25
 gggacnngaa gac 13
 <210> 26

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(9)

 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 26
 gcgatgmnnc gtctc 15
 <210> 27
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 27
 ggatgnggt ctc 13
 <210> 28
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)

 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 28
 gcagcnngtc tc 12
 <210> 29
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(37)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 29
 ccgggatcca agcttaaagc gatgtctaga tcggnnncat cggactcaaa aagtttcttt 60
 ttgagtcc 68
 <210> 30
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (62)..(64)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 30
 cttaagtttt cctttggaaa acttaagggc cctaggttcg aatttcgcta cagatctagc 60
 cnnngtag 68
 <210> 31
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (48)..(50)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 31
 ttcttttga attcccggga tccaagctta aagcgatgtc tagatcgmn catcggactc 60

 aaaaagtt 68
 <210> 32
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (47)..(49)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 32
 tggaaaactt aaggcccta ggttcgaatt tcgctacaga tctagcnng tagcctgagt 60
 ttttct 66
 <210> 33
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence

 <400> 33
 gacatgaggg tgcccctca gctcctg 27
 <210> 34
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 34
 gacatgaggg t 11
 <210> 35
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 35
 ctgtactccc a 11
 <210> 36
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Sythetic Sequence

<400> 36
 gggtgcccgc tc 12
 <210> 37
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 37
 cccacgggcg ag 12
 <210> 38
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 38
 gctcagctcc tg 12
 <210> 39
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 39
 cgagtcgagg ac 12
 <210> 40
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 40
 gggtgcccgc tc 12
 <210> 41
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence
 <400> 41
 cccacgggcg ag 12

<210> 42
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 42
 cccacgggcg ag 12

<210> 43
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 43
 gctcagctcc tg 12

<210> 44
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 44
 cgagtcgagg ac 12

<210> 45
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 45
 gctcagctcc tg 12

<210> 46
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 46
 gggtgcccg tcagctcctg 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 47
 cccacggcg agtcgaggac 20

 <210> 48
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 48
 gacatgaggg t 11
 <210> 49
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 49
 ctgtactccc a 11
 <210> 50
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 50
 ctgtactccc a 11

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 51
 gggtgcccgc tcagctcctg 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 52
 cccacgggcg agtcgaggac 20
 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 53
 gggtgcccgc tcagctcctg 20

 <210> 54
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 54
 cgggcgagtc gaggac 16
 <210> 55
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 55

gacatgaggg tgcccgtca gctcctg 27

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence

<400> 56

ctgtactccc acgggcgagt cgaggac 27

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence

<400> 57

gacatgaggg tgcccgtca gct 23

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence

<400> 58

actcccacgg gcgagtcgag gac 23

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence

<400> 59

ccaaatgcgt gacagtcttc ggcga 25

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence
 <400> 60
 ggtttacgca ctgtcagaag ccgaa 25
 <210> 61
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 61
 ggtttacgca ct 12
 <210> 62
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 62
 ccaaatgcgt gaatgctgtc cagtcttcgg cga 33
 <210> 63
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 63
 ggtttacgca cttacgacag gtcagaagcc gaa 33
 <210> 64
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 64
 ccaaatgcgt gaatgc 16
 <210> 65
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 65
 ggtttagca cttacgacag 20

<210> 66
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(32)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 66
 ccaaatgcgt gaatgctgct gactnnnnnn nn 32

<210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 67
 ggtttagca cttacgacag 20

<210> 68
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence
 <400> 68
 tcgattggat tgtgccgaa gtgctggctc ga 32

<210> 69
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence

<400> 69
 agtccgtggt agggcaggtt ggggtgact 29

<210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence

<400> 70
 cagttgatcc tttgatacc ctg 23

<210> 71
 <211> 42

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence

<400> 71
 ggcggtcagt gccttcggcc gtgcggtgcc tccgtcacgc ct 42

<210> 72
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence

<400> 72
 accgtctgag cgattcgtac tttattcggg aggtatcagc ggg 43

<210> 73
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sythetic Sequence

<400> 73
 cctggacgga accagaatac ttttgtctc cagg 34

<210> 74
 <211> 43
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence

<400> 74

aaataccccc ccttcggtgc aaagcaccga agggggggta ttt 43

<210> 75

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Sequence

<400> 75

gacatgaggg t 11