

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 4 年 10 月 4 日(2022.10.4)

【公開番号】特開 2022-50592(P2022-50592A)

【公開日】令和 4 年 3 月 30 日(2022.3.30)

【年通号数】公開公報(特許)2022-056

【出願番号】特願 2022-3037(P2022-3037)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

10

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z Z N A

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 9 月 26 日(2022.9.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

予め定義された配列を有する標的核酸を製造する方法であって、

( a ) 以下を含む二本鎖オリゴヌクレオチド、の第一のプールを提供すること：

( i ) 第一の標的核酸の配列の異なる部分と同一の配列を含む内部配列、ここで内部配列は第一のプール中の他の二本鎖オリゴヌクレオチドと重複する領域を含む；および

( i i ) フランキング配列、ここで、各々のフランキング配列は I I S 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、I I S 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位は、I I S 型制限酵素消化がフランキング配列を除去し、内部配列を露出させるように配置される、および

( b ) 二本鎖オリゴヌクレオチドの第一のプールを、同時の制限酵素消化およびライゲーションを促進するのに適した条件下でリガーゼおよび I I S 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を認識する I I S 型制限酵素に曝して、それにより第一の標的核酸を生成すること、ここで、第一の標的核酸は、以下を含む：

30

( i ) 最終標的核酸の一部と同一の配列；および

( i i ) 最終標的核酸の一部と同一の配列に隣接するフランキング配列、ここで、フランキング配列は制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む、

を含む方法。

【請求項 2】

第一の標的核酸が、( b ) の I I S 型制限酵素の基質を含まない、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 3】

第一のプールの二本鎖オリゴヌクレオチドが、複数の一本鎖オリゴヌクレオチドを増幅することによって生成され、各一本鎖オリゴヌクレオチドが、第一のプールの二本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖に対応する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

増幅されたオリゴヌクレオチドをミスマッチ結合またはエラー除去に供することをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

増幅されたオリゴヌクレオチドがミスマッチ結合剤と接触され、任意にミスマッチ結合剤が M u t S である、請求項 4 に記載の方法。

50

## 【請求項 6】

ステップ (b) の後に、第一の標的核酸を増幅することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

第一の標的核酸の配列の正確性を確認し、単離することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

さらに、

(c) 第一の標的核酸および第二の標的核酸を含む混合物を提供すること、ここで、第二の標的核酸は、以下を含む：

(i) 第一の標的核酸の内部配列と異なり、最終標的核酸の一部と同一である配列；および

(i i) 最終標的核酸の一部と同一の配列に隣接するフランキング配列、ここで、フランキング配列は制限酵素認識部位を含む、および

(d) 混合物を、リガーゼおよび制限エンドヌクレアーゼ認識部位を認識する制限酵素に曝して、それにより、第一の標的核酸の配列および第二の標的核酸の配列を含む標的核酸を生成すること、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

第一および第二の標的核酸が、(d) において、同時の消化およびライゲーションを促進するのに適した条件に供される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

標的核酸が、(d) の制限酵素の基質を含まない、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

ステップ (d) の前に、第一の標的核酸および第二の標的核酸を増幅することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記第二の標的核酸が、以下：

(a) 二本鎖オリゴヌクレオチドの第二のプールを提供すること、ここで、二本鎖オリゴヌクレオチドは、以下：

(i) 第二の標的核酸の異なる部分と同一の内部配列、ここで、内部配列は、第二のプール内の他のオリゴヌクレオチドと重複する領域を含む；および

(i i) フランキング配列、ここで、各々のフランキング配列は I I S 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、I I S 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位は、I I S 型制限酵素消化がフランキング配列を除去し、内部配列を露出させるように配置される、および

(b) 二本鎖オリゴヌクレオチドの第二のプールを、同時の制限酵素消化およびライゲーションを促進するのに適した条件下で、リガーゼおよび I I S 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を認識する I I S 型制限酵素に曝して、それにより第二の標的核酸を生成すること、

を含む方法によって生成される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 13】

第二のプールの二本鎖オリゴヌクレオチドが、複数の一本鎖オリゴヌクレオチドを増幅することによって生成され、各一本鎖オリゴヌクレオチドが第二のプールの二本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖に対応し、任意に、増幅されたオリゴヌクレオチドを Mut S などのミスマッチ結合剤と接触させることにより、増幅されたオリゴヌクレオチドをエラー除去に供することをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

ステップ (d) の後に、標的核酸を配列決定および / または単離することによって標的核酸の配列の正確性を確認することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 15】

10

20

30

40

50

増幅が、一本鎖オリゴヌクレオチドのフランキング配列のプライマー認識部位、任意に共通プライマー認識部位、を使用して実施される、請求項 3 または 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第一および / または第二の標的核酸が、最終標的核酸の一部と同一の配列に隣接するフランキング配列を含み、前記フランキング配列の各々が制限酵素認識部位を含む、請求項 1 または 8 に記載の方法。

【請求項 17】

第一および / または第二の標的核酸のフランキング配列に含まれる前記制限酵素認識部位が IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位である、請求項 1、8 または 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

予め定義された配列を有する標的核酸を製造する方法であって、

(a) 第一の標的核酸の 5' 末端と同一の配列を含む第一の複数の末端オリゴヌクレオチド、第一の標的核酸の 3' 末端と同一の配列を含む第二の複数の末端オリゴヌクレオチド、および各々が第一の標的核酸の異なる部分と同一の配列を含む第一の複数の内部オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第一のプールを提供すること、ここで、末端オリゴヌクレオチドおよび内部オリゴヌクレオチドの各々が、次のオリゴヌクレオチドとの重複領域を有し、第一のプールの末端オリゴヌクレオチドおよび内部オリゴヌクレオチドが、共に第一の標的核酸を含み、各々の末端オリゴヌクレオチドおよび内部オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドの 5' 末端および 3' 末端に隣接する、5' および 3' フラン20  
キング配列をさらに含み、フランキング配列の各々が、共通プライマー認識部位および制限酵素認識部位を含む；

(b) 共通プライマー認識部位を使用してオリゴヌクレオチドの第一のプールのオリゴヌクレオチドの少なくともサブセットを増幅し、それにより増幅されたオリゴヌクレオチドの第一のプールを生成すること；

(c) 以下を含む第一の混合物を提供すること；

(i) 増幅されたオリゴヌクレオチドの前記第一のプール；および

(ii) 制限エンドヌクレアーゼ認識部位を認識する制限酵素、ここで、制限酵素は IIS 型制限酵素である；および

(d) 第一の混合物をリガーゼに曝し、リガーゼを含む第一の混合物を同時の制限酵素消化およびライゲーションを促進するのに適した条件に供し、それにより、設計により制限酵素の基質ではない第一の標的核酸を生成すること、  
ここで、第一の標的核酸は；

30

(i) 標的核酸の一部と同一の内部配列、および

(ii) 内部配列の 5' 末端に隣接する 5' フランキング配列、および内部配列の 3' 末端に隣接する 3' フランキング配列であり、各々のフランキング配列がプライマー認識部位および制限酵素認識部位を含む、  
を含む方法。

【請求項 19】

増幅されたオリゴヌクレオチドをエラー除去に供することをさらに含み、任意に、増幅されたオリゴヌクレオチドがミスマッチ結合剤と接触され、ミスマッチ結合剤が、ミスマッチを含む二本鎖オリゴヌクレオチドに選択的に結合して切断する、請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 20】

制限酵素およびリガーゼが、同時の消化およびライゲーションを促進するのに適した条件下で、増幅されたオリゴヌクレオチドの単一のプールに存在し、それにより、予め定義された配列を有するアセンブリされた第一の標的核酸配列を含む混合物を生成する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

IIS 型制限酵素による消化が、互いに相補的な付着末端を有する複数の二本鎖オリゴヌ

50

クレオチドを生成し、前記複数の二本鎖オリゴヌクレオチドがユニークな直線配置でライゲーションされて、アセンブリされた標的核酸を生成する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ (d) の後に、第一の標的核酸の 5' 末端および 3' 末端のプライマー認識部位を認識することができるプライマー対を使用して、生成された第一の標的核酸を増幅することをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 1 つの生成された第一の標的核酸を配列決定してその配列精度を確認すること、および前記予め定められた配列を有する少なくとも 1 つの生成された第一の標的核酸を単離することをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 24】

さらに：

(e) 第二の標的核酸の 5' 末端と同一の配列を含む第三の複数の末端オリゴヌクレオチド、第二の標的核酸の 3' 末端と同一の配列を含む第四の複数の末端オリゴヌクレオチド、および各々が第二の標的核酸の異なる部分と同一の配列を含む第二の複数の内部オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの第二のプールを提供すること、ここで、第二のプールの末端オリゴヌクレオチドおよび内部オリゴヌクレオチドの各々が、第二のプールの次のオリゴヌクレオチドとの重複領域を有し、第二のプールの末端オリゴヌクレオチドおよび内部オリゴヌクレオチドが、共に第二の標的核酸を含み、各々の末端オリゴヌクレオチドおよび内部オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドの 5' 末端および 3' 末端に隣接する、5' および 3' フランキング配列をさらに含み、フランキング配列の各々が、共通プライマー認識部位および制限酵素認識部位を含む；

20

(f) 共通プライマー認識部位を使用してオリゴヌクレオチドの第二のプールのオリゴヌクレオチドの少なくともサブセットを増幅し、それにより増幅されたオリゴヌクレオチドの第二のプールを生成すること；および

(g) 以下を含む第二の混合物を提供すること；

(i) 増幅されたオリゴヌクレオチドの前記第二のプール；

(i i) 第二の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を認識する第二の制限酵素、ここで、制限酵素は I I S 型制限酵素である、；および

(h) 第二の混合物をリガーゼに曝し、リガーゼを含む第二の混合物を同時の制限酵素消化およびライゲーションを促進するのに適した条件に供し、それにより、設計により第二の制限酵素の基質ではない第二の標的核酸を生成すること、ここで、第二の標的核酸は；

30

(i) 標的核酸の一部と同一の内部配列、および

(i i) 内部配列の 5' 末端に隣接する 5' フランキング配列、および内部配列の 3' 末端に隣接する 3' フランキング配列であり、各々のフランキング配列がプライマー認識部位および制限酵素認識部位を含む、を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 25】

階層的アセンブリによって前記第一および第二の標的核酸をアセンブリすることをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 26】

第一および第二の標的核酸を同時の制限エンドヌクレアーゼ消化およびライゲーションに供し、それにより、第一および第二の標的核酸を含む標的核酸構築物を形成する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

標的核酸構築物が少なくとも約 10 キロベースの長さ、または少なくとも約 100 キロベースの長さである、請求項 26 に記載の方法。