(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-511938
(P2025-511938A)
(43)公表日　令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ	*19/34*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	19/34	Ａ	４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*9/00*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/00	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ	*15/11*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*9/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/10		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全137頁）

(21)出願番号　特願2024-559576(P2024-559576)
(86)(22)出願日　令和5年4月6日(2023.4.6)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月4日(2024.12.4)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/059142
(87)国際公開番号　WO2023/194537
(87)国際公開日　令和5年10月12日(2023.10.12)
(31)優先権主張番号　63/328,912
(32)優先日　令和4年4月8日(2022.4.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/432,466
(32)優先日　令和4年12月14日(2022.12.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　513032275
グラクソスミスクライン、インテレクチュアル、プロパティー、ディベロップメント、リミテッド
ＧＬＡＸＯＳＭＩＴＨＫＬＩＮＥ ＩＮＴＥＬＬＥＣＴＵＡＬ ＰＲＯＰＥＲＴＹ ＤＥＶＥＬＯＰＭＥＮＴ ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス国スティーブニッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、ジーエスケー、メディスンズ、リサーチ、センター
(74)代理人　100120031
弁理士　宮嶋 学
(74)代理人　100120617
弁理士　浅野 真理
(74)代理人　100172557
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチドを含む）の作製のための新規方法

(57)【要約】
本発明は、酵素を使用した、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの作製のための新規方法であって、療法における使用のためのものなどの修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの作製における使用に好適である、方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成されるステップ、
ｂ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドを生成するステップ、
ｃ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドおよび／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、ならびに、
ｄ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含む、方法。
【請求項２】
ステップｄ）が、条件を変更して、不純物ポリヌクレオチドと鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させること、および、条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させる前に、１つまたは２つ以上の任意の不純物ポリヌクレオチドを分離することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップをさらに含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドが、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドが、５’リン酸、５’チオリン酸、５’ジチオリン酸、または５’メチルリン酸を含み、任意選択で、配列ギャップの３’末端におけるセグメントポリヌクレオチドが、５’リン酸、５’ホスホロチオエート、５’ホスホロジチオエート、または５’メチルリン酸を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
ヌクレオシド三リン酸のプールが、（ｉ）天然に存在するヌクレオシド三リン酸、（ｉｉ）修飾ヌクレオシド三リン酸、または（ｉｉｉ）天然に存在するヌクレオシド三リン酸および修飾ヌクレオシド三リン酸からなる、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、糖部分の修飾、核酸塩基の修飾、および／または骨格の修飾を含み、任意選択で、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、Ｎ１－メチル－シュードウリジンである、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
リガーゼが、セグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドの３’末端および／または５’末端を、隣接するセグメントポリヌクレオチドまたは隣接する伸長したセグメントポリヌクレオチドにライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成する、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】
ステップ（ｃ）におけるリガーゼが、２つのオリゴヌクレオチドを一緒にライゲーションすることができ、結合される連結ヌクレオチドの一方または両方が修飾ヌクレオチドである、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
鋳型が、それが一本鎖ポリヌクレオチド産物から分離されることを可能にする特性を有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
鋳型ポリヌクレオチドを再利用するステップをさらに含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
鋳型ポリヌクレオチドが、再利用された鋳型ポリヌクレオチドである、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
方法が半連続的または連続的である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物をアニーリングするステップを含む、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物のうち少なくとも一方が、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法によって作製されたものであり、任意選択で、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物の両方が、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法によって作製されたものである、方法。
【請求項１５】
少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成されるステップ、
ｂ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドを生成するステップ、
ｃ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドおよび／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｄ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ、ならびに、
ｅ）一本鎖ポリヌクレオチド産物をステップａ）における鋳型ポリヌクレオチドとして使用し、ステップａ）～ｃ）を繰り返して、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ポリメラーゼおよびリガーゼを使用した、ポリヌクレオチド（オリゴヌクレ

オチドを含む）の作製のための新規方法であって、療法における使用のためのものなどの、修飾ポリヌクレオチド（修飾オリゴヌクレオチドを含む）の作製における使用に好適である、方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

ポリヌクレオチドおよび修飾ポリヌクレオチド、特にオリゴヌクレオチドおよび修飾オリゴヌクレオチドの、例えばホスホロアミダイト化学を介した化学合成は、十分に確立されており、数十年にわたって、これらの、規定の配列のバイオポリマー（defined sequence biopolymer）を合成するための最適な方法となっている。この合成プロセスは、通常、固体支持合成（一般的に固相合成と称される）として行われ、それによって単一ヌクレオチドが逐次に付加されるが、各々のヌクレオチドの付加は、成長オリゴヌクレオチド（「オリゴ」）をその後のステップに備えて付加および脱保護するために、いくつかの化学ステップのサイクルを必要とする。ヌクレオチドの逐次付加の終了時に、オリゴは固相支持体から放出され、さらなる脱保護が行われ、次いで粗オリゴヌクレオチドがカラムクロマトグラフィーによってさらに精製される。

【０００３】

この方法は、慣例的であると考えられる場合があり、自動化することができるが、特に、目標がオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを、ギャップマー、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよびアプタマーを含むアンチセンス分子などのオリゴヌクレオチド治療薬、ならびに治療用ｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド治療薬の場合に必要であり得るように、大規模に調製することである場合、この方法論にはいくつかの欠点がある。これらの欠点としては、バッチサイズを制限する固体支持化学のスケールアップに関する制限、および大量のオリゴヌクレオチドを精製するためのクロマトグラフィーの使用における実用的な制限が挙げられる。これらの制限は、スケールアップを費用および時間がかかるものにし、複数ラウンドの合成を必要とする。加えて、合成されるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの長さと共にエラーが蓄積され、このことは、より長いオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド産物のスケールアップに対してさらなる実用的な制限を課す。

【０００４】

したがって、配列におけるエラーを最小限に抑えながらオリゴヌクレオチドおよびより長いポリヌクレオチドを作製するために、化学合成と固体支持合成の両方を減少させるかまたは理想的には排除することと、効率的に、費用対効果の高い方法で、かつより大規模に運用することができる合成を実施することの両方が必要とされている。

【０００５】

ＷＯ２０１８／０１１０６７は、相補的な鋳型およびライゲーション方法を使用して、オリゴヌクレオチドのプールが、指示された様式で一緒にライゲーションされる、新規ライゲーション方法を開示している。ＷＯ２０１９／１２１５００は、ライゲーション方法において使用することができる、修飾オリゴヌクレオチドの作製において酵素、特に一本鎖リガーゼおよびトランスフェラーゼを使用する新規方法を開示している。

【０００６】

一本鎖リガーゼおよびトランスフェラーゼを使用して鎖に各々のヌクレオチドを付加するための方法は、複雑であり、一度に付加される１ヌクレオチドと逐次に実施しなければならず、付加を促進するために各々のラウンドにおいて脱保護ステップが必要とされ、時間がかかる。次いで、プールにおける個々のオリゴヌクレオチドは、各々、最終オリゴヌクレオチド産物を作製するために、鋳型を使用して正しい配向で互いにライゲーションされなければならない。この方法のより大きなポリヌクレオチドへのスケールアップは、最終産物を作製するためにその後正しい配向でライゲーションされなければならない複数の短いオリゴヌクレオチドを、一度に１ヌクレオチドを付加することによって作出することが必要であることを意味する。本質的に、最終産物を作出するためにライゲーションされるより小さなオリゴヌクレオチドの作出において、最終産物のどの単一ヌクレオチドも、一度に１つ付加されなければならず、これは、効率を低下させ、長い作製プロセスを必要

とする。したがって、エラー導入のリスクがより高くなる。したがって、産物配列におけるエラーを最小限に抑えながらオリゴヌクレオチドおよびより大きなポリヌクレオチドの作製の効率を高めるために、複雑性を減少させる代替的なおよび／または改善された方法を提供することが必要とされている。

【発明の概要】

【０００７】

本発明に関する第１の態様において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成されるステップ、

ｂ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドを生成するステップ、

ｃ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチド（ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））および／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメントポリヌクレオチド（ｅｘｔｅｎｄｅｄ　ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））を、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、ならびに、

ｄ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ

を含む、方法が提供される。

【０００８】

本発明の第２の態様において、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物をアニーリングするステップを含む、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物のうちの少なくとも一方が、本明細書に開示される一本鎖ポリヌクレオチドを作製するための方法によって作製されたものであり、任意選択で、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物の両方が、本明細書に開示される一本鎖ポリヌクレオチドを作製するための方法によって作製されたものである、方法が提供される。

【０００９】

本発明の第３の態様において、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｂ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドを生成するステップ、

ｃ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチド（ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））および／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメントポリヌクレオチド（ｅｘｔｅｎｄｅｄ　ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（

ｓ））を、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｄ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ、ならびに、
ｅ）一本鎖ポリヌクレオチド産物をステップａ）における鋳型ポリヌクレオチドとして使用し、ステップａ）～ｃ）を繰り返して、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含む、方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】図１は、セグメントオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをライゲーションして産物を形成するステップと、条件を変更して不純物を除去するステップとを含む、ポリメラーゼを使用したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド産物の作製を示す概略的な例である。

【図２】図２は、複数の鋳型構成の概略的な例である。

【図３ａ】図３ａは、ギャップ充填反応出発物質、すなわち、１つの鋳型と２つのセグメントオリゴヌクレオチド（ポリメラーゼのプライマーとして作用するプライマーＮおよびストッパーとして作用する３’ブロック１）とを示すＨＰＬＣトレースを示す図である。

【図３ｂ】図３ｂは、ギャップ充填反応後の産物形成を示すＨＰＬＣトレースを示す図である。プライマーＮ＋５は、５ｂｐのギャップを埋める、ポリメラーゼおよびヌクレオシド三リン酸を使用したプライマーＮの伸長の成功を示す。

【図４】図４は、アニーリングした５’プライマーを有する鋳型と、５’プライマーとして作用するヘアピンループを有する鋳型とを別個に示す概略的な例である。

【発明を実施するための形態】

【００１１】

定義

本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチド」とは、共有結合を介して互いに接続された２つ以上のヌクレオチドモノマー、すなわちヌクレオチド残基のポリマーを意味する。単一のポリヌクレオチド分子は、例えば、鎖構造に１４以上のヌクレオチドのモノマーを含むことができる。ＤＮＡおよびＲＮＡはポリヌクレオチドの例である。ポリヌクレオチドにはオリゴヌクレオチドが含まれる。ポリヌクレオチドは、無数のヌクレオチドを含有することができる。ポリヌクレオチドは、治療において、例えば、治療用ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡワクチンとして使用することができる）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アプタマー、ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ、ならびにＤＮＡおよびＲＮＡ編集酵素を動員および誘導するオリゴヌクレオチド、例えばＡ－ｔｏ－ＩＲＮＡ塩基編集オリゴヌクレオチド（ＡＩＭｅｒ）の作製において有用である。

【００１２】

本明細書において使用される場合、「治療用ポリヌクレオチド」という用語は、例えばヒトまたは動物の状態または疾患の予防または処置における治療用途を有するポリヌクレオチドを意味する。そのようなポリヌクレオチドは、典型的には、１つまたは２つ以上の修飾ヌクレオチド残基または連結を含有する。治療用ポリヌクレオチドは、アンチセンス、スプライススイッチングまたはエクソンスキッピング、免疫賦活、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）および低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）などを介したＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）、ならびにＤＮＡおよびＲＮＡ編集酵素の動員および誘導を含むがこれらに限定されない、いくつかの異なる機構のうちの１つを介して作用する。治療用ポリヌクレオチドは、アプタマーであってもよい。治療用ポリヌクレオチドは、常にではないが、通常、規定の配列を有する。治療用ポリヌクレオチドには治療用オリゴヌクレオチドが含まれる。

【００１３】

「ポリヌクレオチド」および「治療用ポリヌクレオチド」という用語は、それぞれ、「

オリゴヌクレオチド」および「治療用オリゴヌクレオチド」を包含する。

【００１４】

本明細書において使用される場合、「オリゴヌクレオチド」、または略して「オリゴ」という用語は、ヌクレオチド残基のポリマーを意味する。「オリゴヌクレオチド」という用語は、通常、「ポリヌクレオチド」という用語よりも短い、一般に３～３０ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチド配列に対して使用される。これらは、デオキシリボヌクレオチド（結果として得られるオリゴヌクレオチドはＤＮＡである）、リボヌクレオチド（結果として得られるオリゴヌクレオチドはＲＮＡである）、修飾ヌクレオチド、またはそれらの混合物であり得る。

【００１５】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、全体が自然界に見出されるヌクレオチド残基（すなわち「天然ヌクレオチド」または「天然に存在するヌクレオチド」）から構成されても、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド間の修飾されている少なくとも１つの連結を含有してもよい。天然に存在するヌクレオチドの例としては、デオキシアデノシン一リン酸、デオキシシチジン一リン酸、デオキシグアノシン一リン酸、デオキシチミジン一リン酸、デオキシウリジン一リン酸、アデノシン一リン酸、シチジン一リン酸、グアノシン一リン酸、チミジン一リン酸、およびウリジン一リン酸が挙げられる。修飾ヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチドではない（すなわち、それは非天然ヌクレオチドである）。修飾ヌクレオチドは、修飾された、例えば化学修飾された、天然に存在するヌクレオチドであってもよい。修飾ヌクレオチドは、修飾された骨格、糖、および／または核酸塩基を含んでもよい。２’ＯＭｅまたはＣ５ピリミジン修飾などのある特定の修飾が、自然界、すなわち天然に存在するヌクレオチドに散発的に生じることは認められるが、本開示において、これらは修飾ヌクレオチドと考えられる。ポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチドを含む）は、一本鎖または二本鎖であり得る。本開示のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）またはその複数体（ＧａｌＮＡｃクラスター）にコンジュゲートしてもよい。

【００１６】

本明細書において使用される場合、「治療用オリゴヌクレオチド」という用語は、例えばヒトまたは動物の状態または疾患の予防または処置における治療用途を有するオリゴヌクレオチドを意味する。そのようなオリゴヌクレオチドは、典型的には、１つまたは２つ以上の修飾ヌクレオチド残基または連結を含有する。治療用オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、スプライススイッチングまたはエクソンスキッピング、免疫賦活、ならびにマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）および低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）などを介したＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を含むがこれらに限定されない、いくつかの異なる機構のうちの１つを介して作用する。治療用オリゴヌクレオチドは、アプタマーであってもよい。治療用オリゴヌクレオチドは、常にではないが、通常、規定の配列を有する。治療用オリゴヌクレオチドは治療用ポリヌクレオチドの一例である。

【００１７】

本明細書において使用される場合、「鋳型」という用語は、一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物に相補的な配列を含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを意味する。鋳型は、標的（または産物）ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの配列に１００％相補的である配列を含み得る。鋳型は、標的（または産物）ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの配列に１００％相補的である配列からなり得る。鋳型は、産物配列と比較してより長い配列であり得る。鋳型は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物を作製するために使用されない配列を含み得る。鋳型が、配列に関して、産物配列と比較してより長い場合、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の作製および／または長さを制御するためにストッパーが使用され得る。鋳型が、配列に関して、産物配列と比較してより長い場合、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の作製および／または長さを制御するためにプライマーが使用され得る。鋳型が

、配列に関して、産物配列と比較してより長い場合、それはヘアピンループを含んでいてもよい。ヘアピンループはプライマーとして作用してもよい。鋳型は、セグメントのうちの１つをヘアピンループに含んでもよい。そのような事例において、産物は、ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ＤＮＡ酵素、または化学的方法を用いる切断を介して鋳型から放出され得る。鋳型は、産物配列と比較してより短い配列であり得る。鋳型が、産物配列と比較してより短い配列である場合、少なくとも１つのセグメントは、セグメントが鋳型にアニーリングされるときに鋳型から突出することになる。鋳型は、１００％未満で相補的である配列を含み得るかまたはそれからなり得る。鋳型配列は、それぞれの相補的なヌクレオチドが標的配列における修飾ヌクレオチドの未修飾形態に相補的となるようなものであり得る。別段の指定がない限り、本明細書において使用される場合、「相補的」という用語は、１００％相補的であることを意味する。

【００１８】

本明細書において使用される場合、「産物」という用語は、本明細書において「標的ポリヌクレオチド」または「標的オリゴヌクレオチド」とも称される、特定の配列および修飾のセットを有する所望のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを意味する。「産物配列」とは、「標的ポリヌクレオチド配列」および「標的オリゴヌクレオチド配列」と交換可能に使用され、産物の塩基配列を指す。

【００１９】

本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプール」という用語は、それぞれ、配列が様々であってもよく、標的配列より短くてもよく、標的配列と同じ配列を有しなくてもよい、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの群を指す。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド合成の産物であり得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含み得る。少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ランダムでなくてもよい（すなわち、ランダムに選択されたセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの群ではなく、本発明の方法に従って最終ポリヌクレオチド産物を形成することを目的として明確に設計および選択されている）。少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物のセグメントであり得る。少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、配列が異なっていてもよい。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、産物配列のセグメントを含み得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、産物配列のセグメントからなり得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物のセグメントを明確に含むように操作されてもよい。産物配列の少なくとも１つのセグメントは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含有することができる。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、ポリメラーゼ、例えばＤＮＡポリメラーゼまたはＲＮＡポリメラーゼを使用したポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド合成の産物であり得る。１つもしくは２つ以上の、または全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホロアミダイト化学などを介した化学合成、例えば固体支持または液相合成を使用して作ることも、酵素合成、またはそれらの組合せを使用して作ることもできる。酵素合成は、ポリメラーゼ、一本鎖リガーゼおよび／もしくはトランスフェラーゼ、またはそれらの組合せの使用を伴い得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、ホスホロアミダイト化学などを介した化学合成、例えば固体支持もしくは液相合成を使用したか、または酵素合成もしくはそれらの組合せを使用したポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド合成の産物であり得る。酵素合成は、ポリメラーゼ、一本鎖リガーゼおよび／もしくはトランスフェラーゼ、またはそれらの組合せの使用を伴い得る。

【００２０】

本明細書において使用される場合、「アニーリング」という用語は、二本鎖ポリヌクレ

オチドまたはオリゴヌクレオチド（「二重鎖」）を形成するための、ワトソンおよびクリック塩基対形成の水素結合を介した配列特異的な様式での相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、例えば、２つの一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの対形成を意味する。「アニーリングを可能にする条件」は、ハイブリダイズされる相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのＴ$_m$に依存し、当業者に容易に明らかとなるだろう。例えば、アニーリングのための温度は、ハイブリダイズされるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのＴ$_m$未満であり得る。あるいは、アニーリングのための温度は、ハイブリダイズされるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのＴ$_m$付近、例えば＋／－１、２または３℃であり得る。アニーリングのための温度は、一般に、ハイブリダイズされるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのＴ$_m$よりも１０℃超高いことはない。

【００２１】

本明細書において使用される場合、二本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドとの関連における「変性させること」という用語は、相補鎖がもはやアニーリングされていないこと、すなわち、ワトソンおよびクリック塩基対形成が破壊され、鎖が解離したことを意味するために使用される。変性させることは、例えば、温度を上昇させるか、ｐＨを変更するか、または緩衝溶液の塩濃度を変更することによって条件を変更した結果として行われる。変性させるための条件は当業者に周知である。本明細書に記載されるように二本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを変性させること（すなわち、二重鎖を変性させること）は、一本鎖産物、または不純物ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドと、一本鎖鋳型ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドとをもたらす。

【００２２】

本明細書において使用される場合、「不純物（impurity）」または「不純物（impurities）」という用語は、所望の産物配列を有しないポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを意味する。これらのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、産物よりも短い（例えば、１、２、３、４、または５ヌクレオチド残基以上短い）かまたは産物よりも長い（例えば、１、２、３、４、または５ヌクレオチド残基以上長い）ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含み得る。作製方法が、セグメント間において連結が形成されるステップを含む場合、不純物としては、１つまたは２つ以上の連結が形成できない場合に残存しているポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが挙げられる。不純物としてはまた、鋳型と比較した場合にミスマッチをもたらす、誤ったヌクレオチドが組み込まれているポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドも挙げられる。不純物は、上に記載した特徴のうちの１つまたは２つ以上を有してもよい。「不純物」および「不純物ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。

【００２３】

本明細書において使用される場合、「セグメント」という用語は、より長いポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのより小さな部分、特に、産物または標的ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのより小さな部分である。所与の産物について、そのセグメントの全てがその鋳型にアニーリングされ、ギャップがポリメラーゼ伸長によって充填され、一緒にライゲーションされる場合、産物が形成される。セグメントは、ポリメラーゼのプライマーとして作用してもよい。セグメントは、ポリメラーゼのストッパーとして作用してもよい。セグメントは、後にポリメラーゼ伸長後に鋳型から切断され、産物の一部となる、鋳型におけるヘアピンループの一部であってもよい。

【００２４】

本明細書において使用される場合、「酵素ライゲーション」という用語は、２つの隣接するヌクレオチド間の連結が酵素的に、すなわち酵素によって形成されることを意味する。この連結は、天然に存在するホスホジエステル結合（ＰＯ）であっても、ホスホロチオエート（ＰＳ）、ホスホロアミデート（ＰＡ）、またはホスホロジチオエート（ＰＳ２）を含むがこれらに限定されない修飾連結であってもよい。

【００２５】

本明細書において使用される場合、「酵素合成」という用語は、酵素、例えば、ポリメラーゼ、リガーゼ、トランスフェラーゼ、ホスファターゼ、およびヌクレアーゼ、例えばエンドヌクレアーゼを使用した、セグメントおよび最終産物を含むポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドの作製を意味する。これらの酵素は、野生型酵素または変異型酵素または操作された酵素であり得る。修飾ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド基質に対して作用することができる変異型酵素または操作された酵素は、本開示の範囲内である。

【００２６】

本明細書において使用される場合、「ポリメラーゼ」という用語は、例えばあるヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの３’末端と別のヌクレオチドの５’末端との間でのホスホジエステル結合の形成によって、ヌクレオチドと別のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの３’－ＯＨとの結合、すなわち共有結合を触媒する酵素を意味する。したがって、ポリメラーゼ活性は５’→３’である。ポリメラーゼとしては、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼを挙げることができる。ポリメラーゼは、野生型酵素、変異型酵素、または操作された酵素であり得る。

【００２７】

当業者は、本開示において使用される「ヌクレオチドのプール」がポリメラーゼの基質であることを理解する。したがって、この文脈における「ヌクレオチドのプール」は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物に組み込まれた場合にヌクレオチドとなるヌクレオシド三リン酸（ＮＴＰ）またはその類似体のプールを意味する。したがって、「ヌクレオチドのプール」および「ヌクレオシド三リン酸のプール」は本明細書において交換可能に使用される。ヌクレオシド三リン酸は、ＤＮＡとＲＮＡの両方の分子前駆体であると考えることができる。ヌクレオシド三リン酸のプールは、デオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸、デオキシウリジン三リン酸、アデノシン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸、チミジン三リン酸、およびウリジン三リン酸のうちの１つまたは２つ以上を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、修飾デオキシアデノシン三リン酸、修飾デオキシシチジン三リン酸、修飾デオキシグアノシン三リン酸、修飾デオキシチミジン三リン酸、修飾デオキシウリジン三リン酸、修飾アデノシン三リン酸、修飾シチジン三リン酸、修飾グアノシン三リン酸、修飾チミジン三リン酸、および修飾ウリジン三リン酸のうちの１つまたは２つ以上を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、ヌクレオシド三リン酸類似体を含み得る。ヌクレオシドアルファチオ三リン酸の例としては、２’－デオキシアデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシシチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシグアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシチミジン－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシウリジン－（α－チオ）－三リン酸、２’－アデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－シチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－グアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－チミジン－（α－チオ）－三リン酸、２’－ウリジン－（α－チオ）－三リン酸、およびそれらの修飾塩基バリアントが挙げられる。ヌクレオシド三リン酸のプールは、デオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸、デオキシウリジン三リン酸、アデノシン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸、チミジン三リン酸、ウリジン三リン酸、修飾デオキシアデノシン三リン酸、修飾デオキシシチジン三リン酸、修飾デオキシグアノシン三リン酸、修飾デオキシチミジン三リン酸、修飾デオキシウリジン三リン酸、修飾アデノシン三リン酸、修飾シチジン三リン酸、修飾グアノシン三リン酸、修飾チミジン三リン酸、修飾ウリジン三リン酸、２’－デオキシアデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシシチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシグアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシチミジン－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシウリジン－（α－チオ）－三リン酸、２’－アデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－シチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－グアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－チミジン－（α－チオ）－三リン酸、および２’－ウリジン－（α－チオ）－三リン酸のうちの１

つまたは２つ以上を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、アデノシン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、修飾アデノシン三リン酸、修飾シチジン三リン酸、修飾グアノシン三リン酸、修飾ウリジン三リン酸、２’－アデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－シチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－グアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、および２’－ウリジン－（α－チオ）－三リン酸のうちの１つまたは２つ以上を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、デオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸、修飾デオキシシチジン三リン酸、修飾デオキシグアノシン三リン酸、修飾デオキシチミジン三リン酸、２’－デオキシアデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシシチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－デオキシグアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、および２’－デオキシチミジン－（α－チオ）－三リン酸のうちの１つまたは２つ以上を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、アデノシン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸、および修飾ウリジン三リン酸を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、アデノシン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸、およびＮ１－メチル－シュードウリジン三リン酸を含み得る。ヌクレオシド三リン酸のプールは、２’－アデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－シチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸、２’－グアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸、および２’－修飾ウリジン－（α－チオ）－三リン酸を含み得る。

【００２８】

未修飾ヌクレオチドを別の未修飾ヌクレオチドに結合することができるポリメラーゼ、未修飾ヌクレオチドを修飾ヌクレオチドに（すなわち、修飾５’ヌクレオチドを未修飾３’ヌクレオチドに、および／または未修飾５’ヌクレオチドを修飾３’ヌクレオチドに）結合することができるポリメラーゼ、および修飾ヌクレオチドを別の修飾ヌクレオチドに結合することができるポリメラーゼは、本開示の範囲内である。任意選択で、ポリメラーゼは、未修飾ヌクレオチドを別の未修飾ヌクレオチドに結合することができる。未修飾ヌクレオチドは、その後、修飾させることができる。ヌクレオチドの修飾の例は、本明細書に開示され、糖部分の修飾、核酸塩基の修飾、および骨格の修飾を含む群から選択される修飾が挙げられる。

【００２９】

修飾は、任意選択で２’－Ｆ、２’－ＯＭｅ、２’－ＭＯＥ、および２’－アミノからなる群から選択される、糖部分の２’位におけるものであり得る。オリゴヌクレオチドは、ＰＭＯ、ＬＮＡ、ｃ－Ｅｔ、ＰＮＡ、ＢＮＡ、またはＬ－リボ核酸を含み得る。修飾は、核酸塩基におけるものであってもよく、任意選択で、５－メチルピリミジン、７－デアザグアノシン、および脱塩基ヌクレオチドからなる群から選択され得る。修飾は、骨格におけるものであってもよく、任意選択で、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート、およびホスホロジアミデートからなる群から選択され得る。

【００３０】

加えて、修飾ヌクレオチドを組み込むことができる、例示的な操作されたＤＮＡおよびＲＮＡポリメラーゼとしては、「Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅｓ ｆｏｒ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｇｅｎｅｔｉｃｓ」、Ｈｏｕｌｉｈａｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１７、４８；１６８～１７９に開示されているものが挙げられる。例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡポリメラーゼは、任意選択でＥ６６４ＫおよびＹ４０９Ｇの変異を含む、Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｇｏｇｏｎａｒｉｕｓ（Ｔｇｏ）複製型ＤＮＡポリメラーゼのポリメラーゼサムサブドメインに変異を有するポリメラーゼを含め、２’糖修飾を受容するように操作することができる。そのようなポリメラーゼは、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ロックド核酸、もしくは２’－ＯＭｅ ＲＮＡ修飾ヌクレオチドからプライミングされた、シュードウリジン、５－メチル－Ｃ、２’－フルオロ、もしくは２－アジド修飾ＮＴＰ、またはそれらの組合せの包含を実現する。

【００３１】

２’糖修飾を受容するように操作されたさらなる例示的なＲＮＡポリメラーゼとしては、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼが挙げられる。例えば、Ｙ６３９Ｆの変異を含むＴ７　ＲＮＡポリメラーゼは、例えば、２’フルオロピリミジンおよび２’アミノピリミジンの包含を実現することができる。

【００３２】

ＴａｑポリメラーゼのＳｔｏｆｆｅｌ断片のバリアント（ＳＭ１９）は、２’糖修飾を受容するように操作することができる。例えば、６１４位の負に帯電したアミノ酸およびＥ６１５Ｇの変異の導入は、２’糖修飾の包含を実現する。ＳＭ１９は、ポリメラーゼＳＦＭ４－３およびＳＦＭ４－９にさらに進化させることができる。例えば、ＳＦＭ４－３は、完全修飾２’ＯＭｅ　６０ヌクレオチド配列を転写することができる。

【００３３】

海洋シアノファージＳｙｎ５由来の好熱性ＲＮＡポリメラーゼは、２’糖修飾を受容するように操作することができる。

【００３４】

Ｙ４０９Ｇ、Ｉ５２１Ｌ、Ｆ５４５Ｌ、およびＥ６６４Ｋの変異を含むＴｇｏポリメラーゼは、３’デオキシまたは３’ＯＭｅヌクレオチドの組込みによって、位置異性体的な２’－５’連結を有するＤＮＡおよびＲＮＡを合成することができる。

【００３５】

本明細書において使用される場合、「リガーゼ」という用語は、例えばあるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド（またはセグメント）の３’末端と、同じかまたは別のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド（またはセグメント）の５’末端との間でのホスホジエステル結合の形成によって、２つのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド分子の結合、すなわち共有結合を触媒する酵素を意味する。これらの酵素は、多くの場合、ＤＮＡリガーゼまたはＲＮＡリガーゼと称され、補因子：ＡＴＰ（真核生物、ウイルスおよび古細菌ＤＮＡリガーゼ）またはＮＡＤ（原核生物ＤＮＡリガーゼ）を利用する。全ての生物における出現にもかかわらず、ＤＮＡリガーゼは、多種多様なアミノ酸配列、分子サイズおよび特性を示す（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２０００、第２８巻、第２１号、４０５１～４０５８）。それらは、通常、国際生化学・分子生物学連合によって定義される酵素クラスＥＣ６．５のメンバー、すなわち、リン酸エステル結合を形成するために使用されるリガーゼである。未修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを別の未修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合することができるリガーゼ、未修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに（すなわち、修飾５’ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを未修飾３’ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドに、および／または未修飾５’ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを修飾３’ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドに）結合することができるリガーゼ、および修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを別の修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合することができるリガーゼは、本開示の範囲内である。

【００３６】

本明細書において使用される場合、「一本鎖リガーゼ」または「ｓｓリガーゼ」という用語は、（ｉ）５’リン酸化一本鎖ＲＮＡの、一本鎖アクセプターＲＮＡ鎖の３’－ＯＨへの、および（ｉｉ）単一の残基（修飾残基を含む）、例えば、ヌクレオチド－３’，５’－ビスリン酸、３’，５’－ビスチオリン酸、または３’－リン酸－５’チオリン酸の、ＲＮＡまたは修飾ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドの３’末端へのライゲーションのＡＴＰ依存性ライゲーションを触媒することができる酵素、例えばＲＮＡリガーゼを意味する（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｏｌｉｇｏｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ：１７（１１）、２０７７～２０８１、１９７８）。ｓｓリガーゼの一例は、ある特定の条件下でＤＮＡ基質に対して機能することも示されているＴ４　ＲＮＡリガーゼである（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　ｒｅｓｅａｒｃｈ　７（２）、４５３～４６４、１９７９）。Ｔ４バクテリオファージを感染させた大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）におけるＴ４　Ｒ

ＮＡリガーゼの天然の機能は、ウイルスによる攻撃に対する細菌防御機構によって引き起こされる、細菌ｔＲＮＡの一本鎖切断を修復することである。未修飾ヌクレオチドを未修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合することができるｓｓリガーゼ、未修飾ヌクレオチドを修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合することができるｓｓリガーゼ、修飾ヌクレオチドを未修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合することができるｓｓリガーゼ、および修飾ヌクレオチドを修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合することができるｓｓリガーゼは、本開示の範囲内である。本開示によるｓｓリガーゼは、ライゲーションが行われるために鋳型ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを必要としないリガーゼである、すなわち、リガーゼのライゲーション活性は鋳型非依存性である。

【００３７】

本明細書において使用される場合、「連結ヌクレオチド（ｊｕｎｃｔｉｏｎ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」とは、別のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに結合される、あるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの末端に存在するヌクレオチドである。例えば、２つのセグメント、すなわち５’セグメントおよび３’セグメントが一緒にライゲーションされる場合、２つの連結ヌクレオチドは、１）５’セグメントの３’末端におけるヌクレオチドと、２）３’セグメントの５’末端におけるヌクレオチドである。

【００３８】

本明細書において使用される場合、「トランスフェラーゼ」とは、あるヌクレオチドの別のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドへの鋳型非依存性結合を触媒する酵素を意味する。本明細書に記載されるトランスフェラーゼとしては、ＤＮＡヌクレオチジルエキソトランスフェラーゼ（ＤＮＴＴ）またはターミナルトランスフェラーゼとしても公知のターミナルヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）が挙げられる。ＴｄＴとは、Ｖ－Ｄ－Ｊ抗体遺伝子結合部多様性（Ｖ－Ｄ－Ｊ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｇｅｎｅ ｊｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ）を可能にする、未熟、プレＢ、プレＴリンパ球様細胞において発現される特化型ＤＮＡポリメラーゼである。ＴｄＴは、ヌクレオチドの、ＤＮＡ分子の３’末端への付加を触媒する。本明細書に記載されるトランスフェラーゼとしては、天然に存在しないＴｄＴまたは変異型ＴｄＴが挙げられる。未修飾ヌクレオチドを未修飾オリゴヌクレオチドに結合することができるトランスフェラーゼ、未修飾ヌクレオチドを修飾オリゴヌクレオチドに結合することができるトランスフェラーゼ、修飾ヌクレオチドを未修飾オリゴヌクレオチドに結合することができるトランスフェラーゼ、および修飾ヌクレオチドを修飾オリゴヌクレオチドに結合することができるトランスフェラーゼは、本開示の範囲内である。

【００３９】

本明細書において使用される場合、「熱安定性リガーゼ」、「熱安定性ポリメラーゼ」、または「熱安定性トランスフェラーゼ」とは、それぞれ、昇温において、すなわちヒトの体温を超えて、すなわち３７℃を超えて活性であるリガーゼ、ポリメラーゼ、またはトランスフェラーゼである。熱安定性リガーゼ、熱安定性ポリメラーゼ、または熱安定性トランスフェラーゼは、例えば、４０℃～６５℃、または４０℃～９０℃などにおいて活性であり得る。

【００４０】

本明細書において使用される場合、「プライマー」という用語は、本開示のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを合成するための出発点として使用されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列を意味する。ポリメラーゼはプライマーを必要とする場合がある、例えば、ＤＮＡポリメラーゼはプライマーを必要とする場合がある。プライマーは少なくとも３ヌクレオチドを含み得る。セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することは本開示の範囲内である。少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、プライマーとして作用してもよい。プライマーは、ポリメラーゼがヌクレオチドの結合を触媒する前に鋳型に結合することができる。プライマーは除去されなくてもよい。プライマーは、ポリヌ

クレオチドまたはオリゴヌクレオチド鋳型の一部を形成することができる。例えば、鋳型は、プライマーを含むヘアピンループを含んでもよい。プライマーは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の一部を形成することができる。

【００４１】

本明細書において使用される場合、「ブロック（ｂｌｏｃｋ）」または「３’隣接オリゴヌクレオチド（３’－ｆｌａｎｋｉｎｇ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」としても公知の「ストッパー（ｓｔｏｐｐｅｒ）」という用語は、ポリメラーゼがさらなるヌクレオチドを結合することを停止させるかまたは防止するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列を意味する。ストッパーは、ポリメラーゼ伸長を終結させてもよい。ストッパー、例えば少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのうちの１つは、５’リン酸、５’チオリン酸（ホスホロチオエート結合を生じ得る）、５’アミドリン酸（ホスホロアミデート結合を生じ得る）、５’ジアミドリン酸（ホスホロジアミデート結合を生じ得る）、５’アミドチオリン酸、５’アミドジチオリン酸、５’ジアミドチオリン酸、または５’ジチオリン酸（ホスホロジチオエート結合を生じ得る）を含み得る。５’リン酸、５’チオリン酸、５’アミドリン酸、５’ジアミドリン酸、５’ジチオリン酸、５’アミドチオリン酸、５’アミドジチオリン酸、または５’ジアミドチオリン酸は、リガーゼを伴うライゲーションに必要とされる場合がある。少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのうちの１つまたは２つ以上は、ストッパーとして作用してもよい。

【００４２】

本開示の方法は、非複製型ｍＲＮＡ、およびウイルスに由来する自己増幅型ＲＮＡを含むＲＮＡおよび／またはＤＮＡ（そこに修飾を含む）を作出するために使用することができる。そのようなＲＮＡは、例えばワクチン製造における有用性を有する。

【００４３】

「ＲＮＡ」という用語は、リボ核酸の通常の略記である。それは、核酸分子、すなわち、ヌクレオチドモノマーからなるポリマーである。これらのヌクレオチドは、通常、いわゆる骨格に沿って互いに接続される、アデノシン一リン酸、ウリジン一リン酸、グアノシン一リン酸およびシチジン一リン酸モノマーまたはそれらの類似体である。骨格は、第１の隣接するモノマーの糖、すなわちリボースと第２の隣接するモノマーのリン酸部分との間でのホスホジエステル結合によって形成される。モノマーの特定の順序、すなわち、糖／リン酸骨格に連結されている塩基の順序は、ＲＮＡ配列と呼ばれる。「ＲＮＡ」という用語は、概して、長鎖ＲＮＡ、コードＲＮＡ、非コードＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、直鎖状ＲＮＡ（ｌｉｎＲＮＡ）、環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＲＮＡオリゴヌクレオチド、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、小ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ガイドＲＮＡ、リボスイッチ、免疫賦活ＲＮＡ（ｉｓＲＮＡ）、リボザイム、アプタマー、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）、レトロウイルスＲＮＡまたはレプリコンＲＮＡ、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、およびＰｉｗｉ相互作用ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）からなる群から選択される分子または分子種を指す。任意選択で、いかなる種類の治療用ＲＮＡも本開示の文脈内である。「治療用ＲＮＡ」とは、ヒトまたは動物の身体における医療目的での使用に好適なＲＮＡに関するものとして理解されるべきであり、例えばそれは、特に、純度、完全性などのパラメータに関して、および現在の適正製造基準（ｃＧＭＰ）の条件を遵守しなければならない基礎的な作製方法に関して、臨床グレードを有する。治療用ＲＮＡは、例えば状態または疾患の予防または処置における治療用途を有し得る。

【００４４】

「メッセンジャーＲＮＡ」（ｍＲＮＡ）という用語は、ＲＮＡ分子の一種を指す。ＤＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ転写は、通常、いわゆる未成熟ＲＮＡを生じ、これは、通常ｍＲＮＡと略記される、いわゆるメッセンジャーＲＮＡにプロセシングされなければならない。例

えば真核生物における未成熟ＲＮＡのプロセシングは、様々な異なる転写後修飾、例えば、スプライシング、５’キャッピング、ポリアデニル化、核またはミトコンドリアからの輸送などを含む。これらのプロセスの全体は、ｍＲＮＡの成熟化とも呼ばれる。成熟ｍＲＮＡは、通常、特定のペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列に翻訳され得るヌクレオチド配列を提供する。典型的には、成熟ｍＲＮＡは、５’キャップ、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、オープンリーディングフレーム、３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）、およびホモポリマー尾部、例えばポリＡまたはポリＣ配列を含む。本開示の文脈において、ｍＲＮＡは、人工分子、すなわち自然界に存在しない分子であり得る。このことは、本開示の文脈におけるｍＲＮＡが、その組合せでは自然界に存在しない、５’ＵＴＲと、オープンリーディングフレームと、３’ＵＴＲと、ポリＡ配列との組合せを含み得ることを意味する。

【００４５】

治療用ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質の所期の治療上の使用に応じて、治療用ｍＲＮＡの投薬量および処置期間は数桁異なる場合がある。ワクチンの場合、必要とされる免疫応答を誘発するためには、ナノグラムまたはマイクログラム範囲の抗原の発現が十分であり得る。しかしながら、成長因子、ホルモン、または抗体の場合、治療用量は、マイクログラムからミリグラム、または潜在的には最大でグラム量のタンパク質の範囲となり得る。ｍＲＮＡの用量依存性の毒性は、そのような大きなタンパク質量を達成するためのスケールアップに対する制限因子となる可能性が高く、したがって、修飾特異的毒性を伴わずにｍＲＮＡ安定性の増加をもたらす修飾は有益である（Ａｄｉｔｈａｍら、ＡＣＳ　Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．、２０２１年１２月、ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓｃｈｅｍｂｉｏ．１ｃ００５６９）。

【００４６】

治療状況におけるｍＲＮＡのあらゆる用途について、信頼性の高い様式で再現することができる、規定の配列および構造を有するｍＲＮＡを使用することが所望される。例えば、ｍＲＮＡの５’ＵＴＲ（例えばキャップ構造を含有する）および３’ＵＴＲ（例えばポリＡ尾部などのホモポリマー尾部を含有する）は、ｍＲＮＡ安定性および翻訳効率の調節に関与することが公知である。したがって、５’キャップ構造および３’尾部は、真核細胞におけるｍＲＮＡの効率的な翻訳およびタンパク質合成に重要な特徴である。したがって、ｍＲＮＡ作製方法は、そのような重要な機能的特徴について制御することができる。３’末端ＰＳ連結をポリＡ尾部に含めることは、主にｍＲＮＡを安定化させることによって、ヒトＨｅＬａ細胞株におけるタンパク質産生を２～４倍増加させることが示されている（Ａｄｉｔｈａｍら、ＡＣＳ　Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．、２０２１年１２月）。

【００４７】

ｍＲＮＡは修飾キャップを有してもよい。ｍＲＮＡは、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ，ｐＮ２ｐ（キャップ０）、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）ＮＩｍｐＮｐ（キャップ１）、７ｍＧ（５’）－ｐｐｐ（５’）ＮＩｍｐＮ２ｍｐ（キャップ２）、またはｍ（７）Ｇｐｐｐｍ（３）（６，６，２’）Ａｐｍ（２’）Ａｐｍ（２’）Ｃｐｍ（２）（３，２’）Ｕｐ（キャップ４）を有してもよい。

【００４８】

加えて、非キャップＲＮＡは、典型的には、自然免疫系を賦活することが公知である５’末端三リン酸基を含有する。したがって、非キャップＲＮＡは、対象において望ましくない免疫応答を生成するおそれがある。したがって、医薬としてのｍＲＮＡ産物は、非キャップ５’三リン酸ＲＮＡの存在について制御されなければならない。

【００４９】

従来のｍＲＮＡ型ワクチンは、目的の抗原をコードし、５’および３’ＵＴＲを含有するが、自己増幅型ＲＮＡは、抗原だけでなく、細胞内ＲＮＡ増幅および豊富なタンパク質発現を可能にするウイルス複製機構もコードする。メッセンジャーＲＮＡ分子は、典型的には、好適なＤＮＡ鋳型のＲＮＡ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって産生される。５’キャップ構造および３’ホモポリマー尾部（例えばポリＡ尾部）は、典型的には、ＲＮＡ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写中に導入され、例えば、ＤＮＡ鋳型内にコードされ得るか、またはＲＮＡ

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写後に酵素的方法を介してコードされ得る。
【００５０】
本開示の方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって自己複製型ＲＮＡを調製するために使用することができる。例えば、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（例えばバクテリオファージＴ７、Ｔ３またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ）は、ＤＮＡ鋳型から自己複製型ＲＮＡを転写するために使用することができる。
【００５１】
酵素的方法を介した適切なキャッピングおよびポリＡ尾部付加反応は、本開示の方法を使用したＲＮＡ作製後、必要に応じて使用され得るか、またはＤＮＡ鋳型内にコードされ得る。
【００５２】
ポリメラーゼは、それらが組み込むヌクレオチド（すなわち、それらのヌクレオシド三リン酸基質）に関して厳密な要件を有し得る。それらの要件は、転写されたＲＮＡがその自己コード化レプリカーゼの基質として機能することを保証するために、コードされているレプリカーゼの要件と一致し得る。
【００５３】
本開示の方法は、非複製型ｍＲＮＡを調製するために使用することができる。例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡまたはＲＮＡ鋳型から非複製型ｍＲＮＡを転写するために使用することができる。利用され得るポリメラーゼは本明細書に記載される。例示的なポリメラーゼとしては、本明細書に記載されるようにさらに変異させることができる、ＤＮＡポリメラーゼＩまたはＴ７　ＲＮＡポリメラーゼが挙げられる。
【００５４】
本開示の方法において、ＲＮＡは、修飾および／または安定化ＲＮＡであり得る。
【００５５】
「安定化ＲＮＡ」とは、ｉｎ　ｖｉｖｏ分解に対する耐性の向上を示すＲＮＡおよび／もしくはｉｎ　ｖｉｖｏにおける安定性の向上を示すＲＮＡ、ならびに／またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける翻訳可能性の向上を示すＲＮＡとして定義される。
【００５６】
安定化は、例えば、作製されたＲＮＡの修飾リン酸骨格によって達成され得る。骨格修飾とは、ＲＮＡに含有されるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学修飾される修飾である。これに関連して使用され得るヌクレオチドは、例えばホスホロチオエート修飾リン酸骨格を含有し、任意選択で、リン酸骨格に含有されるリン酸酸素のうちの少なくとも１個が硫黄原子と置き換えられている。
【００５７】
安定化ＲＮＡは、例えばリン酸アナログ、例えば、アルキルおよびアリールホスホネート、またはアルキルホスホトリエステルなどをさらに含んでもよい。そのような骨格修飾としては、典型的には、いかなる限定も意味しないが、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、およびホスホロチオエートからなる群からの修飾が挙げられる。
【００５８】
「修飾ＲＮＡ」は、１つまたは２つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。
【００５９】
本明細書において使用される場合、「修飾ヌクレオチド残基」または「修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド残基またはポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドの化学的性質の、天然に存在するヌクレオチド残基またはポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドとは異なる側面を少なくとも１つ含有する、ヌクレオチド残基またはポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを意味する。そのような修飾、例えば、糖部分の修飾、核酸塩基の修飾、および／または骨格の修飾は、ヌクレオチド残基の任意の部分において行うことができる。修飾ヌクレオチド残基は、修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの一部を形成することができる。修飾ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。

【００６０】
当業者は、ヌクレオチドの多くの合成誘導体が存在することを理解するだろう。
【００６１】
加えて、Ｇ、Ｃ、Ｕ、Ｔ、Ａとは異なる任意のヌクレオチドが、「修飾ヌクレオチド」と考えられてもよい。ヌクレオチドの修飾の例は、本明細書に開示される。
【００６２】
ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ＰＭＯ、ＬＮＡ、ｃ－Ｅｔ、ＰＮＡ、ＢＮＡ、またはＬ－リボ核酸を含み得る。
【００６３】
本開示に関連する骨格修飾は、核酸に含有されるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学修飾される修飾である。本開示に関連する糖修飾は、１つまたは２つ以上のヌクレオチド（ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））の糖の化学修飾である。本開示に関連する塩基修飾は、１つまたは２つ以上のヌクレオチド（ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））の塩基部分の化学修飾である。この文脈において、ヌクレオチド修飾は、転写および／または翻訳に適用可能であるヌクレオチドアナログから選択される。
【００６４】
当技術分野で公知の修飾ヌクレオシド三リン酸は、２－アミノ－６－クロロプリンリボシド－５’－三リン酸、２－アミノプリン－リボシド－５’－三リン酸；２－アミノアデノシン－５’－三リン酸、２’－アミノ－２’－デオキシシチジン－三リン酸、２－チオシチジン－５’－三リン酸、２－チオウリジン－５’－三リン酸、２’－フルオロチミジン－５’－三リン酸、２’－Ｏ－メチル－イノシン－５’－三リン酸、４－チオウリジン－５’－三リン酸、５－アミノアリルシチジン－５’－三リン酸、５－アミノアリルウリジン－５’－三リン酸、５－ブロモシチジン－５’－三リン酸、５－ブロモウリジン－５’－三リン酸、５－ブロモ－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－ブロモ－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸、５－ヨードシチジン－５’－三リン酸、５－ヨード－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－ヨードウリジン－５’－三リン酸、５－ヨード－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸、５－メチルシチジン－５’－三リン酸、５－メチルウリジン－５’－三リン酸、５－プロピニル－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－プロピニル－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸、６－アザシチジン－５’－三リン酸、６－アザウリジン－５’－三リン酸、６－クロロプリンリボシド－５’－三リン酸、７－デアザアデノシン－５’－三リン酸、７－デアザグアノシン－５’－三リン酸、８－アザアデノシン－５’－三リン酸、８－アジドアデノシン－５’－三リン酸、ベンゾイミダゾール－リボシド－５’－三リン酸、Ｎ１－メチルアデノシン－５’－三リン酸、Ｎ１－メチルグアノシン－５’－三リン酸、Ｎ６－メチルアデノシン－５’－三リン酸、０６－メチルグアノシン－５’－三リン酸、シュードウリジン－５’－三リン酸、またはピューロマイシン－５’－三リン酸、キサントシン－５’－三リン酸を含む。
【００６５】
当技術分野で公知の塩基修飾ヌクレオチドとしては、５－メチルシチジン－５’－三リン酸、７－デアザグアノシン－５’－三リン酸、５－ブロモシチジン－５’－三リン酸、およびシュードウリジン－５’－三リン酸、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、５－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオウリジン、４－チオ－シュードウリジン、２－チオ－シュードウリジン、５－ヒドロキシウリジン、３－メチルウリジン、５－カルボキシメチル－ウリジン、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、５－タウリノメチルウリジン、１－タウリノメチル－シュードウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－ウリジン、５－メチル－ウリジン、１－メチル－シュードウリジン、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシウリジン、２－

メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、５－アザ－シチジン、シュードイソシチジン、３－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチルシチジン、５－ホルミルシチジン、Ｎ４－メチルシチジン、５－ヒドロキシメチルシチジン、１－メチル－シュードイソシチジン、ピロロ－シチジン、ピロロ－シュードイソシチジン、２－チオ－シチジン、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－チオ－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、ゼブラリン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、２－チオ－ゼブラリン、２－メトキシ－シチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－シュードイソシチジン、および４－メトキシ－１－メチル－シュードイソシチジン、２－アミノプリン、２、６－ジアミノプリン、７－デアザ－アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノプリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、１－メチルアデノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、７－メチルアデニン、２－メチルチオ－アデニン、および２－メトキシ－アデニン、イノシン、１－メチル－イノシン、ワイオシン、ワイブトシン、７－デアザ－グアノシン、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－グアノシン、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－メチルイノシン、６－メトキシ－グアノシン、１－メチルグアノシン、Ｎ２－メチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン、およびＮ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシン、５’－Ｏ－（１－チオリン酸）－アデノシン、５’－Ｏ－（１－チオリン酸）－シチジン、５’－Ｏ－（１－チオリン酸）－グアノシン、５’－Ｏ－（１－チオリン酸）－ウリジン、５’－Ｏ－（１－チオリン酸）－シュードウリジン、６－アザ－シチジン、２－チオ－シチジン、アルファ－チオ－シチジン、シュード－イソ－シチジン、５－アミノアリル－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、アルファ－チオ－ウリジン、４－チオウリジン、６－アザ－ウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン、デオキシ－チミジン、５－メチル－ウリジン、ピロロ－シチジン、イノシン、アルファ－チオ－グアノシン、６－メチル－グアノシン、５－メチル－シチジン、８－オキソ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、Ｎ１－メチル－アデノシン、２－アミノ－６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－２－アミノ－プリン、シュード－イソ－シチジン、６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－アデノシン、アルファ－チオ－アデノシン、８－アジド－アデノシン、７－デアザ－アデノシン、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、Ｎ１－エチルシュードウリジン、２－チオウリジン、４’－チオウリジン、５－メチルウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、４－チオ－シュードウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、シュードウリジン（ｙ）、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－メチルシトシン、および５－メトキシウリジンが挙げられる。

【００６６】

当業者は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）ｍＲＮＡは、トランスフェクションされると強力な免疫応答を惹起し、タンパク質産生を抑制することを理解するだろう。したがっ

て、ウリジンのシュードウリジンまたはＮ１－メチルシュードウリジンへの１００％の置換えは、Ｔｏｌｌ様受容体認識をブロックすることにより免疫毒性を低減し、それにより翻訳効率を高めるために、治療用ｍＲＮＡにおいて広く使用されている。

【００６７】

本開示のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのコード配列を含むことができ、ここで、少なくとも１つのコード配列はシュードウリジン修飾コード配列である、すなわち、コード配列において、全てのウリジンはシュードウリジンで置き換えられている。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つもしくは２つ以上、または全てのウリジンがシュードウリジンと置き換えられている核酸配列を含むことができる。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのコード配列を含むことができ、ここで、少なくとも１つのコード配列はＮ１－メチルシュードウリジン修飾コード配列である、すなわち、コード配列において、全てのウリジンはＮ１－メチルシュードウリジンで置き換えられている。Ｎ１－メチルシュードウリジンおよび１－メチルシュードウリジンは、交換可能に使用され得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つもしくは２つ以上、または全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンと置き換えられている核酸配列を含むことができる。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのコード配列を含むことができ、ここで、少なくとも１つのコード配列はコドン修飾コード配列である。少なくとも１つのコード配列は、コドン修飾コード配列であってもよく、ここで、少なくとも１つのコドン修飾コード配列によってコードされるアミノ酸配列は、対応する野生型コード配列によってコードされるアミノ酸配列と比較して修飾されていない、すなわちそれらのアミノ酸配列は同一である。

【００６８】

「コドン修飾コード配列」という用語は、対応する野生型コード配列と比較して少なくとも１つのコドン（１つのアミノ酸をコードするヌクレオチドのトリプレット）が異なるコード配列に関する。好適には、コドン修飾コード配列は。ｉｎ　ｖｉｖｏ分解に対する耐性の向上および／もしくはｉｎ　ｖｉｖｏにおける安定性の向上、ならびに／またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける翻訳可能性の向上を示し得る。コドン修飾は、複数のコドンが同じアミノ酸をコードすることができ、コード配列をｉｎ　ｖｉｖｏ適用に対して最適化するために交換可能に使用することができる、遺伝暗号の縮重を利用することができる。

【００６９】

糖部分における修飾としては、糖部分の２’位における修飾、二環式糖または４’－ＣＨ（CH_3）－Ｏ－２’基、およびそれらの組合せを挙げることができる。例えば、糖部分の２’位における修飾は、２’－Ｆ、２’－ＯＭｅ、２’－ＭＯＥ、および／または２’－アミノを含むことができる。

【００７０】

修飾核酸塩基の例としては、シトシン、例えば５－メチルシトシン、５－メチルピリミジン、７－デアザグアノシン、および脱塩基ヌクレオチドが挙げられる。修飾核酸塩基のさらなる例としては、ｍ５Ｃ（５－メチルシチジン）、ｍ５Ｕ（５－メチルウリジン）、ｍ６Ａ（Ｎ６－メチルアデノシン）、ｓ２Ｕ（２－チオウリジン）、Ｕｍ（２’－Ｏ－メチルウリジン）、ｍｌＡ（１－メチルアデノシン）；ｍ２Ａ（２－メチルアデノシン）；Ａｍ（２’－Ｏ－メチルアデノシン）；ｍｓ２ｍ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６－メチルアデノシン）；ｉ６Ａ（Ｎ６－イソペンテニルアデノシン）；ｍｓ２ｉ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６イソペンテニルアデノシン）；ｉｏ６Ａ（Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；ｍｓ２ｉｏ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；ｇ６Ａ（Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン）；ｔ６Ａ（Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン）；ｍｓ２ｔ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン）；ｍ６ｔ６Ａ（Ｎ６－メチル－Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン）；ｈｎ６Ａ（Ｎ６．－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；ｍｓ２ｈｎ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６－ヒドロキシノルバリルカルバモ

イルアデノシン）；Ａｒ（ｐ）（２’－Ｏ－リボシルアデノシン（リン酸））；Ｉ（イノシン）；ｍｉｌ（１－メチルイノシン）；ｍ’ｌｍ（ｌ，２’－Ｏ－ジメチルイノシン）；ｍ３Ｃ（３－メチルシチジン）；Ｃｍ（２Ｔ－０－メチルシチジン）；ｓ２Ｃ（２－チオシチジン）；ａｃ４Ｃ（Ｎ４－アセチルシチジン）；ｆ５Ｃ（５－フォニルシチジン（５－ｆｏｎｎｙｌｃｙｔｉｄｉｎｅ））；ｍ５Ｃｍ（５，２－０－ジメチルシチジン）；ａｃ４Ｃｍ（Ｎ４アセチル２ＴＯメチルシチジン）；ｋ２Ｃ（リシジン）；ｍｌＧ（１－メチルグアノシン）；ｍ２Ｇ（Ｎ２－メチルグアノシン）；ｍ７Ｇ（７－メチルグアノシン）；Ｇｍ（２’－Ｏ－メチルグアノシン）；ｍ２２Ｇ（Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン）；ｍ２Ｇｍ（Ｎ２，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン）；ｍ２２Ｇｍ（Ｎ２，Ｎ２，２’－Ｏ－トリメチルグアノシン）；Ｇｒ（ｐ）（２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸））；ｙＷ（ワイブトシン）；ｏ２ｙＷ（ペルオキシワイブトシン）；ＯＨｙＷ（ヒドロキシワイブトシン）；ＯＨｙＷ＊（修飾中間体（ｕｎｄｅｒｍｏｄｉｆｉｅｄ）ヒドロキシワイブトシン）；ｉｍＧ（ワイオシン）；ｍｉｍＧ（メチルグアノシン）；Ｑ（キューオシン）；ｏＱ（エポキシキューオシン）；ｇａｌＱ（ガラクトシル－キューオシン）；ｍａｎＱ（マンノシル－キューオシン）；ｐｒｅＱｏ（７－シアノ－７－デアザグアノシン）；ｐｒｅＱｉ（７－アミノメチル－７－デアザグアノシン）；Ｇ（アーケオシン）；Ｄ（ジヒドロウリジン）；ｍ５Ｕｍ（５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン）；ｓ４Ｕ（４－チオウリジン）；ｍ５ｓ２Ｕ（５－メチル－２－チオウリジン）；ｓ２Ｕｍ（２－チオ－２’－Ｏ－メチルウリジン）；ａｃｐ３Ｕ（３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン）；ｈｏ５Ｕ（５－ヒドロキシウリジン）；ｍｏ５Ｕ（５－メトキシウリジン）；ｃｍｏ５Ｕ（ウリジン５－オキシ酢酸）；ｍｃｍｏ５Ｕ（ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル）；ｃｈｍ５Ｕ（５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン））；ｍｃｈｍ５Ｕ（５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジンメチルエステル）；ｍｃｍ５Ｕ（５－メトキシカルボニルメチルウリジン）；ｍｃｍ５Ｕｍ（Ｓ－メトキシカルボニルメチル－２－Ｏ－メチルウリジン）；ｍｃｍ５ｓ２Ｕ（５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン）；ｎｍ５ｓ２Ｕ（５－アミノメチル－２－チオウリジン）；ｍｎｍ５Ｕ（５－メチルアミノメチルウリジン）；ｍｎｍ５ｓ２Ｕ（５－メチルアミノメチル－２－チオウリジン）；ｍｎｍ５ｓｅ２Ｕ（５－メチルアミノメチル－２－セレノウリジン）；ｎｃｍ５Ｕ（５－カルバモイルメチルウリジン）；ｎｃｍ５Ｕｍ（５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン）；ｃｍｎｍ５Ｕ（５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン）；ｃｎｍｍ５Ｕｍ（５－カルボキシメチルアミノメチル－２－Ｌ－Ｏメチルウリジン）；ｃｍｎｍ５ｓ２Ｕ（５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン）；ｍ６２Ａ（Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン）；Ｔｍ（２’－Ｏ－メチルイノシン）；ｍ４Ｃ（Ｎ４－メチルシチジン）；ｍ４Ｃｍ（Ｎ４，２－０－ジメチルシチジン）；ｈｍ５Ｃ（５－ヒドロキシメチルシチジン）；ｍ３Ｕ（３－メチルウリジン）；ｃｍ５Ｕ（５－カルボキシメチルウリジン）；ｍ６Ａｍ（Ｎ６，Ｔ－０－ジメチルアデノシン）；ｒｎ６２Ａｍ（Ｎ６，Ｎ６，０－２－トリメチルアデノシン）；ｍ２’７Ｇ（Ｎ２，７－ジメチルグアノシン）；ｍ２’２’７Ｇ（Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシン）；ｍ３Ｕｍ（３，２Ｔ－０－ジメチルウリジン）；ｍ５Ｄ（５－メチルジヒドロウリジン）；£５Ｃｍ（５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン）；ｍｌＧｍ（ｌ，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン）；ｍ’Ａｍ（１，２－Ｏ－ジメチルアデノシン）イリノメチルウリジン）；ｔｍ５ｓ２Ｕ（Ｓ－タウリノメチル－２－チオウリジン））；ｉｍＧ－１４（４－デメチルグアノシン）；ｉｍＧ２（イソグアノシン）；およびａｃ６Ａ（Ｎ６－アセチルアデノシン）、ヒポキサンチン、イノシン、８－オキソ－アデニン、その７－置換誘導体、ジヒドロウラシル、シュードウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－アミノウラシル、５－（Ｃｌ－Ｃ６）－アルキルウラシル、５－メチルウラシル、５－（Ｃ２－Ｃ６）－アルケニルウラシル、５－（Ｃ２－Ｃ６）－アルキニルウラシル、５－（ヒドロキシメチル）ウラシル、５－クロロウラシル、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－ヒドロキシシトシン、５－（Ｃｌ－Ｃ６）－アルキルシトシン、５－メチルシトシン、５－（Ｃ２－Ｃ６）－アルケニルシトシン、５－（Ｃ２－Ｃ６）－アルキニルシトシン、５－クロロシトシ

ン、５－フルオロシトシン、５－ブロモシトシン、Ｎ２－ジメチルグアニン、７－デアザグアニン、８－アザグアニン、７－デアザ－７－置換グアニン、７－デアザ－７－（Ｃ２－Ｃ６）アルキニルグアニン、７－デアザ－８－置換グアニン、８－ヒドロキシグアニン、６－チオグアニン、８－オキソグアニン、２－アミノプリン、２－アミノ－６－クロロプリン、２，４－ジアミノプリン、２，６－ジアミノプリン、８－アザプリン、置換７－デアザプリン、７－デアザ－７－置換プリン、および７－デアザ－８－置換プリンが挙げられる。例えば、ポリヌクレオチドは、１つまたは２つ以上の修飾ピリミジン核酸塩基、例えばシュードウリジンおよび／または５－メチルシトシン残基を含み得る。

【００７１】

骨格における修飾は、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、およびホスホロジチオエートを含み得る。少なくとも１つのまたは各々のヌクレオシド間連結は、修飾ヌクレオシド間連結であり得る。

【００７２】

本開示のポリヌクレオチドは、ヌクレオシド間にホスホジエステル連結のみを含み得るが、他の例においては、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジアミデート、およびホスホロジチオエート、ならびに／またはメチルホスホネート連結を含有し得る。

【００７３】

修飾はＮ１－メチルシュードウリジンを含み得る。

【００７４】

シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－メチルシトシン、および５－メトキシウリジンは、ヌクレオシド三リン酸プールにおいて、ウリジンの代わりに、ポリメラーゼを使用した組込みのために使用することができる。

【００７５】

本明細書において使用される場合、「ギャップマー」という用語は、内側の「中央領域」が外側の２つの「ウイング領域」（５’ウイングおよび３’ウイング）によって挟まれているオリゴヌクレオチドを意味し、ここで、中央領域は、ＲＮａｓｅ　Ｈ切断を支持する複数のヌクレオチドを含み、各々のウイング領域は、中央領域内のヌクレオチドと化学的に明確に異なる１つまたは２つ以上のヌクレオチドを含む。ギャップマーはアンチセンスポリヌクレオチドである。ギャップマーは、中央領域と、中央領域の５’末端に位置する５’ウイング領域と、中央領域の３’末端に位置する３’ウイング領域とを含む。

【００７６】

本明細書において使用される場合、「支持材料」という用語は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの分子量を増加させる高分子量の化合物または材料であって、それによって、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを、例えば不純物および／または産物が反応混合物から分離される場合に保持することを可能にする、化合物または材料、例えば鋳型またはプライマーを意味する。

【００７７】

本明細書において使用される場合、クエリ核酸配列とサブジェクト核酸配列との「同一性パーセント」とは、ペアワイズＢＬＡＳＴＮアラインメントが実施された後にサブジェクト核酸配列がクエリ核酸配列に対して１００％のクエリ包括度を有する場合にＢＬＡＳＴＮアルゴリズムによって算出される、百分率として表される「同一性」の値である。クエリ核酸配列とサブジェクト核酸配列との間のそのようなペアワイズＢＬＡＳＴＮアラインメントは、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅのウェブサイトにおいて利用可能なＢＬＡＳＴＮアルゴリズムの初期設定を、低複雑性領域に関するフィルターをオフにして使用することによって実施される。重要なことに、クエリ核酸配列は、本出願における１つまたは２つ以上の請求項において同定される核酸配列によって記載されてもよい。クエリ配列は、サブジェクト配列に対して１００％同一であっても、同一性％が１００％未満となるように、サブジェクト配列と比較して一定の整数個までのヌクレオチド変更を含んでもよい。例えば、クエリ配列は

、サブジェクト配列に対して少なくとも８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、または９９％同一である。

【００７８】

本明細書において使用される場合、測定可能な値、例えば、量、時間的持続などに言及する場合における「約」という用語は、本明細書に開示される実施形態を実施するのに適切であるような変動として、明記された値からの、±５％、±１％、および±０．１％を含む、±２０％または±１０％の変動を包含することを意味する。

【００７９】

実施形態

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｂ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドを生成するステップ、ならびに、

ｃ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチド（ｓｅｇｍｅｎｔ ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））および／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメントポリヌクレオチド（ｅｘｔｅｎｄｅｄ ｓｅｇｍｅｎｔ ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））を、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、ならびに、

ｄ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製し、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ

を含む、方法を提供する。

【００８０】

ステップ（ｂ）および（ｃ）は同時に行われてもよい。ある特定の状況において、ステップ（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は同時に行われてもよい。ある実施形態において、ステップｂ）に記載されるポリメラーゼまたはヌクレオシド三リン酸のプールはステップ（ａ）中に存在する。ある実施形態において、ステップｂ）に記載されるポリメラーゼはステップ（ａ）中に存在し、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドにアニーリングしたら、ヌクレオシド三リン酸のプールが添加され、ポリメラーゼがアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めることを可能にする。代替的な実施形態において、ステップｂ）に記載されるヌクレオシド三リン酸のプールはステップ（ａ）中に存在し、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドにアニーリングしたら、ポリメラーゼが添加され、アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋める。

【００８１】

ステップｄ）は、条件を変更して、不純物ポリヌクレオチドと鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させること、および、条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させる前に、１つまたは２つ以上の任意の不純物ポリヌクレオチド（ａｎｙ ｉｍｐｕｒｉｔｙ ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））を分離することをさらに含んでもよい。

【００８２】

ある実施形態において、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む。ある実施形態において、ヌクレオシド三リン酸のプールは、（ｉ）天然に存在するヌクレオシド三リン酸、（ｉｉ）修飾ヌクレオシド三リン酸、または（ｉｉｉ）天然に存在するヌクレオシド三リン酸および修飾ヌクレオシド三リン酸からなる。

【００８３】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、

ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、

ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、

ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、

ｆ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ

を含む、方法を提供する。

【００８４】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、

ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、

ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、

ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、

ｆ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ

を含み、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む、および／またはヌクレオシド三リン酸のプールが少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む、方法を提供する。

【００８５】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ
を含む、方法を提供する。

【００８６】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ
を含み、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む、および／またはヌクレオシド三リン酸のプールが少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む、方法を提供する。

【００８７】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、

ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ
を含む、方法を提供する。

【００８８】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ
を含み、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む、および／またはヌクレオシド三リン酸のプールが少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む、方法を提供する。

【００８９】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ
を含む、方法を提供する。

【００９０】

ヌクレオシド三リン酸のプールは、少なくとも１つの修飾ヌクレオシド三リン酸を含み得る。

【００９１】

ステップｄ）は、３つの別個のステップ、すなわち、ｄ１）ヌクレオシド三リン酸のプールを用意するステップ、ｄ２）ポリメラーゼを用意するステップ、およびｄ３）少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップにさらに分けられてもよい。

【００９２】

本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールを用意するステップ、
ｅ）ポリメラーゼを用意するステップ、
ｆ）少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｇ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｈ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、
ｉ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ
を含む、方法を提供する。

【００９３】

ステップａ）～ｉ）のうちの２つ以上は同時に行われてもよく、任意選択で、ステップｆ）およびｇ）は同時に行われてもよい。ステップａ）～ｉ）のうちの２つ以上は逐次に行われてもよく、任意選択で、ステップｆ）およびｇ）は逐次に行われてもよい。

【００９４】

上に記載した方法のいずれかにおいて、方法は、鋳型を再利用するさらなるステップ（ステップｊ）をさらに含んでもよい。方法は、再利用された鋳型を用いて先のステップ（ステップａ）～ｉ）またはステップａ）～ｊ））を繰り返す別のステップ（ステップｋ）をさらに含んでもよい。

【００９５】

本開示はまた、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列と、

ｉ）ポリメラーゼのプライマーとして作用するヘアピンループ、

ｉｉ）ポリメラーゼのストッパーとして作用するヘアピンループ、または

ｉｉｉ）鋳型ポリヌクレオチドの両端におけるヘアピンループであって、一方のヘアピンループがポリメラーゼのプライマーとして作用し、他方のヘアピンループがポリメラーゼのストッパーとして活性である、ヘアピンループ

とを含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、

ｂ）鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドとヘアピンループの末端との間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｃ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドまたはヘアピンループの末端を、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したヘアピンポリヌクレオチドを生成するステップ、

ｄ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチド（ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））および／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメント／ヘアピンポリヌクレオチド（ｅｘｔｅｎｄｅｄ　ｓｅｇｍｅｎｔ／ｈａｉｒｐｉｎ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））を、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、

ｅ）鋳型ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチド産物を切断するステップ、ならびに、

ｆ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップを含む、方法を提供する。切断ステップは、ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ＤＮＡ酵素、または化学的方法によって実行され得る。

【００９６】

本開示はまた、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物をアニーリングするステップを含む、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物のうちの少なくとも一方が、本開示の方法によって作製されたものであり、任意選択で、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチド産物の両方が、本開示の方法によって作製されたものである、方法を提供する。

【００９７】

本開示はまた、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドと、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させて、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドがアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドを生成するステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌ

クレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｂ）アニーリングしたセグメントポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させ、少なくとも１つの配列ギャップを埋めて、少なくとも１つの伸長したセグメントポリヌクレオチドを生成するステップ、
ｃ）１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチド（ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））および／または１つまたは２つ以上の伸長したセグメントポリヌクレオチド（ｅｘｔｅｎｄｅｄ　ｓｅｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））を、リガーゼを使用してライゲーションして、鋳型ポリヌクレオチドと二重鎖の形で結合している一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｄ）任意選択で、条件を変更して、一本鎖鋳型ポリヌクレオチドと不純物ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、鋳型ポリヌクレオチドから１つまたは２つ以上の任意の不純物ポリヌクレオチド（ａｎｙ　ｉｍｐｕｒｉｔｙ　ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ｓ））を分離するステップ、
ｅ）条件を変更して、一本鎖ポリヌクレオチド産物と鋳型ポリヌクレオチドとを含む二重鎖を変性させ、それによって一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ、ならびに、
ｆ）一本鎖ポリヌクレオチド産物をステップａ）における鋳型ポリヌクレオチドとして使用し、ステップａ）～ｃ）またはステップａ）～ｄ）を繰り返して、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含む、方法を提供する。

【００９８】

理論に拘束されるものではないが、これらの方法は、セグメントポリヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド作製のステップとライゲーション方法ステップとが同じ鋳型を使用することを可能にすることによって、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の作製の複雑性を減少させることが見出された。同時のセグメントポリヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド伸長およびライゲーションは、ポリヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド産物の作製においてさらに行われ得る。これらの方法は、最終産物のキラリティーの制御を促進し、ライゲーションステップの数を減少させ、全体の反応時間を減少させることができる。

【００９９】

本開示はまた、二本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物を作製するための方法であって、本開示の方法によって作製された２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、アニーリングを可能にする条件下で混合される、方法を提供する。

【０１００】

あるいは、本開示はまた、二本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物を作製するための方法であって、一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物が鋳型として作用する、および／または使用される、方法を提供する。

【０１０１】

例えば、本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成さ

れる、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ、ならびに、
ｈ）一本鎖ポリヌクレオチド産物をステップａ）における鋳型として使用し、ステップａ）～ｅ）またはステップａ）～ｆ）を繰り返して、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含む、方法を提供する。
【０１０２】
任意選択で、二本鎖ポリヌクレオチド産物は精製される。
【０１０３】
例えば、本開示は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのアニーリングしたセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、
ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ、ならびに、
ｈ）一本鎖ポリヌクレオチド産物をステップａ）における鋳型として使用し、ステップａ）～ｅ）またはステップａ）～ｆ）を繰り返して、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含み、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドが少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む、および／またはヌクレオシド三リン酸のプールが少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む、方法を提供する。
【０１０４】
任意選択で、二本鎖ポリヌクレオチド産物は精製される。
【０１０５】
いくつかの実施形態において、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも２

つのセグメントポリヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む。いくつかの実施形態において、全てのセグメントポリヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む。

【０１０６】

ある特定の実施形態において、ステップ（ｄ）のヌクレオシド三リン酸のプールにおける少なくとも１つのヌクレオシド三リン酸は修飾されている。ある特定の実施形態において、ステップ（ｄ）のヌクレオシド三リン酸のプールにおけるＡ、Ｔ、Ｃ、Ｇおよび／またはＵは修飾されている。ある特定の実施形態において、ステップ（ｄ）のヌクレオシド三リン酸のプールにおける全てのヌクレオシド三リン酸は修飾されている。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、ステップＩにおいて使用されるリガーゼは、各々のセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドの３’および／または５’末端を、各々の隣接するセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドにライゲーションして、産物ポリヌクレオチド鎖を形成するために使用される。ステップ（ｅ）において使用されるリガーゼは、ＲＮＡおよび／またはＤＮＡリガーゼであり得る。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドのプールは、酵素合成、化学合成、任意選択で固体支持合成もしくは液相合成、またはそれらの組合せによって作製される。ポリヌクレオチドのプールは、一本鎖リガーゼ、トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ、またはそれらの組合せを使用する酵素合成によって作製することができる。

【０１０９】

いくつかの実施形態において、修飾は、修飾糖部分、核酸塩基の修飾、および骨格の修飾からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドは、糖部分の修飾、核酸塩基の修飾、および／または骨格の修飾を含む。換言すれば、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドは、修飾糖部分、修飾核酸塩基、および／または修飾骨格を含む。

【０１１０】

本発明の方法において使用されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、糖修飾、すなわちリボシル部分の修飾型、例えば、２’－Ｏ－修飾ＲＮＡ、例えば２’－Ｏ－アルキルまたは２’－Ｏ－（置換）アルキル、例えば、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－（２－シアノエチル）、２’－Ｏ－（２－メトキシ）エチル（２’－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－（２－チオメチル）エチル、２’－Ｏ－ブチリル、２’－Ｏ－プロパルギル、２’－Ｏ－アリル、２’－Ｏ－（３－アミノ）プロピル、２’－Ｏ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）、２’－Ｏ－（２－アミノ）エチル、２’－Ｏ－（２－（ジメチルアミノ）エチル）；２’－デオキシ（ＤＮＡ）；２’－Ｏ－（ハロアルコキシ）メチル（Ａｒａｉ　Ｋ．ら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０１１、２１、６２８５）、例えば、２’－Ｏ－（２－クロロエトキシ）メチル（ＭＣＥＭ）、２’－Ｏ－（２，２－ジクロロエトキシ）メチル（ＤＣＥＭ）；２’－Ｏ－アルコキシカルボニル、例えば、２’－Ｏ－［２－（メトキシカルボニル）エチル］（ＭＯＣＥ）、２’－Ｏ－［２－（Ｎ－メチルカルバモイル）エチル］（ＭＣＥ）、２’－Ｏ－［２－（Ｎ，Ｎ－ジメチルカルバモイル）エチル］（ＤＣＭＥ）；２’－ハロ、例えば、２’－Ｆ、ＦＡＮＡ（２’－Ｆアラビノシル核酸）；カルバ糖およびアザ糖修飾；３’－Ｏ－アルキル、例えば、３’－Ｏ－メチル、３’－Ｏ－ブチリル、３’－Ｏ－プロパルギル；ならびにそれらの誘導体を含み得る。

【０１１１】

本発明のある実施形態において、糖修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－ＭＯＥ）、および２’－アミノからなる群から選択される。さらなる実施形態において、修飾は２’－ＭＯＥである。

【０１１２】

他の糖修飾としては、「架橋型」または「二環式」核酸（ＢＮＡ）、例えば、ロックド

核酸（ＬＮＡ）、キシロ－ＬＮＡ、α－Ｌ－ＬＮＡ、β－Ｄ－ＬＮＡ、ｃＥｔ（２’－Ｏ，４’－Ｃ拘束エチル）ＬＮＡ、ｃＭＯＥｔ（２’－Ｏ，４’－Ｃ拘束メトキシエチル）ＬＮＡ、エチレン架橋型核酸（ＥＮＡ）、トリシクロＤＮＡ；アンロックド核酸（ＵＮＡ）；シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）、アルトリオール核酸（ＡＮＡ）、ヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、フッ化ＨＮＡ（Ｆ－ＨＮＡ）、ピラノシル－ＲＮＡ（ｐ－ＲＮＡ）、３’－デオキシピラノシル－ＤＮＡ（ｐ－ＤＮＡ）；モルフォリノ（例えば、ＰＭＯ、ＰＰＭＯ、ＰＭＯＰｌｕｓ、ＰＭＯ－Ｘにおけるような）；およびそれらの誘導体が挙げられる。

【０１１３】

本開示の方法において使用されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、他の修飾、例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホウ素修飾ＰＮＡ、ピロリジンに基づくオキシペプチド核酸（ＰＯＰＮＡ）、グリコールまたはグリセロールに基づく核酸（ＧＮＡ）、トレオースに基づく核酸（ＴＮＡ）、非環状トレオニノールに基づく核酸（ａＴＮＡ）、組み入れられた塩基および骨格を有するオリゴヌクレオチド（ＯＮＩＢ）、ピロリジンアミドオリゴヌクレオチド（ＰＯＭ）；ならびにそれらの誘導体を含んでもよい。

【０１１４】

本発明のある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、架橋型核酸（ＢＮＡ）、例えば（Ｓ）－ｃＥｔ－ＢＮＡ、またはＳＰＩＥＧＥＬＭＥＲとしても公知のＬ－リボ核酸を含む。

【０１１５】

さらなる実施形態において、修飾は核酸塩基におけるものである。塩基修飾としては、天然プリンおよびピリミジン塩基（例えば、アデニン、ウラシル、グアニン、シトシン、およびチミン）の修飾型、例えば、イノシン、ヒポキサンチン、オロト酸、アグマチジン、リシジン、２－チオピリミジン（例えば、２－チオウラシル、２－チオチミン）、Ｇ－ｃｌａｍｐおよびその誘導体、５－置換ピリミジン（例えば、５－メチルシトシン、５－メチルウラシル、５－ハロウラシル、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、５－アミノメチルウラシル、５－ヒドロキシメチルウラシル、５－アミノメチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、Ｓｕｐｅｒ　Ｔ）、２，６－ジアミノプリン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、７－アザ－２，６－ジアミノプリン、８－アザ－７－デアザグアニン、８－アザ－７－デアザアデニン、８－アザ－７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、Ｓｕｐｅｒ　Ｇ、Ｓｕｐｅｒ　Ａ、およびＮ４－エチルシトシン、またはそれらの誘導体；Ｎ２－シクロペンチルグアニン（ｃＰｅｎｔ－Ｇ）、Ｎ２－シクロペンチル－２－アミノプリン（ｃＰｅｎｔ－ＡＰ）、およびＮ２－プロピル－２－アミノプリン（Ｐｒ－ＡＰ）、またはそれらの誘導体；ならびに２，６－ジフルオロトルエンなどの縮重もしくはユニバーサル塩基、または脱塩基部位などの欠けている塩基（例えば、１－デオキシリボース、１，２－ジデオキシリボース、１－デオキシ－２－Ｏ－メチルリボース；または環状酸素が窒素で置き換えられているピロリジン誘導体（アザリボース））が挙げられる。Ｓｕｐｅｒ　Ａ、Ｓｕｐｅｒ　Ｇ、およびＳｕｐｅｒ　Ｔの誘導体の例はＵＳ６６８３１７３に見出すことができる。ｃＰｅｎｔ－Ｇ、ｃＰｅｎｔ－ＡＰ、およびＰｒ－ＡＰは、ｓｉＲＮＡに組み込まれた場合に免疫賦活作用を抑制することが示された（Ｐｅａｃｏｃｋ　Ｈ．ら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２０１１）、１３３、９２００）。

【０１１６】

本発明のある実施形態において、核酸塩基修飾は、５－メチルピリミジン、７－デアザグアノシン、および脱塩基ヌクレオチドからなる群から選択される。ある実施形態において、修飾は５－メチルシトシンである。

【０１１７】

本開示の方法において使用されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、骨格修飾、例えばＲＮＡに存在するホスホジエステルの修飾型、例えば、ホスホロチオエート

（ＰＳ）、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）、ホスホノアセテート（ＰＡＣＥ）、ホスホノアセトアミド（ＰＡＣＡ）、チオホスホノアセテート、チオホスホノアセトアミド、ホスホロチオエートプロドラッグ、Ｈ－ホスホネート、メチルホスホネート、メチルホスホノチオエート、メチルホスフェート、メチルホスホロチオエート、エチルホスフェート、エチルホスホロチオエート、ボラノホスフェート、ボラノホスホロチオエート、メチルボラノホスフェート、メチルボラノホスホロチオエート、メチルボラノホスホネート、メチルボラノホスホノチオエート、およびそれらの誘導体を含み得る。他の修飾としては、ホスホロアミダイト、ホスホロアミデート、’３’→Ｐ５’ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオジアミデート、スルファメート、ジメチレンスルホキシド、スルホネート、トリアゾール、オキサリル、カルバメート、メチレンイミノ（ＭＭＩ）、およびチオアセトアミド核酸（ＴＡＮＡ）、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。

【０１１８】

さらなる実施形態において、修飾は、骨格におけるものであり、ホスホロチオエート（ＰＳ）、ホスホロアミデート（ＰＡ）、ホスホロジアミデート、およびホスホロジチオエート（ＰＳ２）からなる群から選択される。本発明のある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドはホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（ＰＭＯ）である。ＰＭＯは、ホスホロジアミデート連結を有するメチレンモルホリン環の骨格を有する。本発明のある実施形態において、産物は、ホスホロチオエート（ＰＳ）骨格を有する。本発明のある実施形態において、産物は、骨格に少なくとも１つのホスホロチオエート（ＰＳ）結合を有する。

【０１１９】

本発明のある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示される２つ以上の修飾の組合せを含む。当業者は、オリゴヌクレオチドおよびそれらの構成ヌクレオチドの多くの合成誘導体が存在することを理解するだろう。

【０１２０】

修飾は、糖部分の２’位における修飾、二環式糖または４’－ＣＨ（ＣＨ３）－Ｏ－２’基、およびそれらの組合せを含むことができる。糖部分の２’位における修飾は、２’－ＭＯＥを含むことができる。修飾核酸塩基は、シトシン、任意選択で５－メチルシトシンを含むことができる。核酸塩基における修飾は、５－メチルピリミジン、７－デアザグアノシン、および脱塩基ヌクレオチドを含む群から選択することができる。骨格における修飾は、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、およびホスホジチオエートを含む群から選択することができる。

【０１２１】

複数の実施形態において、各々のポリヌクレオチドセグメントは、連結された２’－デオキシヌクレオチドまたはデオキシヌクレオシドで構成され得る。複数の実施形態において、少なくとも１つのまたは各々のヌクレオシド間連結は、修飾ヌクレオシド間連結であり得る。

【０１２２】

複数の実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、ＤＮＡポリヌクレオチド産物、ＲＮＡポリヌクレオチド産物、またはそれらの組合せであり得る。ＲＮＡポリヌクレオチド産物はｍＲＮＡであり得る。複数の実施形態において、ヌクレオチド修飾は、１つまたは２つ以上のウラシル残基の置換を含み得る。少なくとも１つの修飾ヌクレオチドは、１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシ－ウラシル、１－エチル－シュードウラシル、シュードウラシル、１－メチルシュードウラシル、５－メチル－シチジン、５－メチル－シトシン、Ｎ６－メチルアデノシン、もしくは７－メチルグアノシン、またはそれらの組合せを含んでもよい。ある実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、各々のＵ残基がＮ１－メチル－シュードウリジンであるｍＲＮＡである。ある実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、各々のＵ残基がＮ１－メチル－シュードウリジンであり、骨格がホスホロチオエート骨格であるｍＲＮＡである。

【０１２３】

いくつかの実施形態において、ステップ（ｄ）において使用されるポリメラーゼは、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態において、ステップ（ｄ）において使用されるポリメラーゼは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態において、ステップ（ｄ）において使用されるポリメラーゼは、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠いており、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。

【０１２４】

複数の実施形態において、ステップ（ｄ）において使用されるポリメラーゼは、ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、またはそれらの組合せであり得る。

【０１２５】

方法のステップは、順次に実施することができる。方法のステップは、特許請求の範囲を実行不可能にしない限り、順序を入れ替えることができる。ヌクレオシド三リン酸のプールを用意するステップ、ポリメラーゼを用意するステップ、ならびに少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップが別個のステップとして行われる場合、ヌクレオシド三リン酸のプールは、セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが鋳型にアニーリングした後にポリメラーゼが添加される限り、任意の先行するステップにおいて用意することができる。あるいは、ポリメラーゼは、セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが鋳型にアニーリングした後にヌクレオシド三リン酸のプールが添加される限り、任意の先行するステップにおいて用意することができる。いくつかの実施形態において、２つ以上のステップは同時に行われる。いくつかの実施形態において、ステップａ）～ｇ）のうちの２つ以上は同時に行われる。いくつかの実施形態において、２つ以上のステップは逐次に行われる。いくつかの実施形態において、ステップａ）～ｇ）のうちの２つ以上は逐次に行われる。いくつかの実施形態において、方法のステップ（ｄ）および（ｅ）は同時に行われる。他の実施形態において、方法のステップ（ｄ）および（ｅ）は逐次に行われる。

【０１２６】

複数の実施形態において、鋳型ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の配列に相補的な配列からなり得る。

【０１２７】

複数の実施形態において、鋳型ポリヌクレオチドはヘアピンループの一部である。ヘアピンループおよびステムループという用語は交換可能に使用され得る。ヘアピンループは非対称であってもよい。ヘアピンループはＤＮＡヘアピンループであってもよい。ヘアピンループはＲＮＡヘアピンループであってもよい。鋳型ポリヌクレオチドがヘアピンループを含む場合、ポリメラーゼは、重合を開始するためにプライマーを必要としなくてもよい。一本鎖ポリヌクレオチド産物は、ヘアピンループと産物ポリヌクレオチド鎖との間に一本鎖切断を導入する酵素を使用して（例えばニッカーゼを使用して）、鋳型およびヘアピンループから放出され、続いてアニーリングした鋳型ポリヌクレオチドおよび産物ポリヌクレオチド鎖の変性が行われてもよい。

【０１２８】

複数の実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、３～４０ヌクレオチド長、３～３５ヌクレオチド長、または３～３０ヌクレオチド長、任意選択で、１０～３５ヌクレオチド長、１０～３０ヌクレオチド長、３～１５ヌクレオチド長、１３～３５ヌクレオチド長、１５～３５ヌクレオチド長、１３～３０ヌクレオチド長、１５～３０ヌクレオチド長、１３～２５ヌクレオチド長、１５～２５ヌクレオチド長、１３～２０ヌクレオチド長、１５～２０ヌクレオチド長、１７～２５ヌクレオチド長、２０～２５ヌクレオチド長、または２０～３０ヌクレオチド長であり得る。ある実施形態において、産物は、２０ヌクレオチド長であり、

（ｉ）７ヌクレオチド長である５’セグメントと、６ヌクレオチド長である中心セグメントと、７ヌクレオチド長である３’セグメント、

（ｉｉ）６ヌクレオチド長である５’セグメントと、８ヌクレオチド長である中心セグメントと、６ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｉｉ）５ヌクレオチド長である５’セグメントと、１０ヌクレオチド長である中心セグメントと、５ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｖ）４ヌクレオチド長である５’セグメントと、１２ヌクレオチド長である中心セグメントと、４ヌクレオチド長である３’セグメント、または
（ｖ）３ヌクレオチド長である５’セグメントと、１４ヌクレオチド長である中心セグメントと、３ヌクレオチド長である３’セグメントを含む３つのセグメントポリヌクレオチドを含む。一本鎖ポリヌクレオチド産物は、中央領域と、中央領域の５’末端に位置する５’ウイング領域と、中央領域の３’末端に位置する３’ウイング領域とを含むギャップマーアンチセンスポリヌクレオチドであり得る。これは、高度に配列特異的なオリゴヌクレオチド産物を作製することが重要である治療用オリゴヌクレオチド作製において特に有用である。

【０１２９】

複数の実施形態において、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドは、
（ｉ）７ヌクレオチド長である５’セグメントと７ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｉ）６ヌクレオチド長である５’セグメントと６ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｉｉ）５ヌクレオチド長である５’セグメントと５ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｖ）４ヌクレオチド長である５’セグメントと４ヌクレオチド長である３’セグメント、または
（ｖ）３ヌクレオチド長である５’セグメントと３ヌクレオチド長である３’セグメント
を含む。

【０１３０】

複数の実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、３０～２０，０００ヌクレオチド長、任意選択で、３０～１０，０００ヌクレオチド長、３０～５，０００ヌクレオチド長、３０～４，０００ヌクレオチド長、３０～３，０００ヌクレオチド長、３０～２，０００ヌクレオチド長、３０～１，０００ヌクレオチド長、３０～５００ヌクレオチド長、３０～４００ヌクレオチド長、３０～３００ヌクレオチド長、３０～２００ヌクレオチド長、３０～１００ヌクレオチド長、３０～５０ヌクレオチド長、または３０～４０ヌクレオチド長であり得る。これらの産物は、例えば、高度に配列特異的なポリヌクレオチド産物を作製することが重要である治療用ｍＲＮＡ作製において有用である。

【０１３１】

さらなる実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、３０ヌクレオチドを超える長さである。別の実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、３５ヌクレオチドを超える長さである。別の実施形態において、長さは少なくとも４０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも４５ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも５５ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも６０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも６０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも８０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも９０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１２０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１４０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１６０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１８０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも２００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも２５０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも３００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも３５０ヌクレオチドである。別の実施

形態において、長さは少なくとも４００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも４５０ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも５００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも６００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも７００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも８００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも９００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１０００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１１００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１２００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１３００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１４００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１５００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１６００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも１８００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも２０００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも２５００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも３０００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも４０００ヌクレオチドである。別の実施形態において、長さは少なくとも５０００ヌクレオチド、または５０００ヌクレオチド超である。

【０１３２】

複数の実施形態において、鋳型は、それが産物から分離され、その後の反応のために再利用されることを可能にする特性を有する。方法は、鋳型を再利用する最終ステップを含むことができる。方法は、鋳型を再利用するステップｊ）を含むことができる。方法は、その後の反応における使用のために鋳型を再利用する最終ステップを含むことができる。方法は、その後の反応における使用のために鋳型を再利用するステップｊ）を含むことができる。方法は、鋳型を再利用し、方法を繰り返す最終ステップを含むことができる。方法は、鋳型を再利用し、方法の１つまたは２つ以上のステップを繰り返す最終ステップを含むことができる。方法は、鋳型を再利用するステップｊ）およびステップａ）～ｉ）を繰り返すステップｋ）を含むことができる。方法は、鋳型を再利用するステップｊ）およびステップａ）～ｋ）を繰り返すステップｋ）を含むことができる。

【０１３３】

本明細書に記載される方法は、半連続的または連続的であり得る。

【０１３４】

産物が、グラム規模もしくはキログラム規模、またはそれよりも大きな規模で作製される方法が提供される、および／あるいは少なくとも１Ｌの反応容量において実行される方法が提供される。産物が、グラム規模、キログラム規模、またはそれよりも大きな規模で作製される方法が提供される。少なくとも２００ｍＬの反応容量において実行される方法が提供される。少なくとも５００ｍＬの反応容量において実行される方法が提供される。少なくとも１Ｌの反応容量において実行される方法が提供される。少なくとも２Ｌの反応容量において実行される方法が提供される。少なくとも５Ｌの反応容量において実行される方法が提供される。

【０１３５】

結果として得られる一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物は、少なくとも９０％純粋、少なくとも９５％純粋、または少なくとも９８％純粋であり得る。

【０１３６】

方法は、治療用ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製するために使用することができる。複数の実施形態において、方法は、一本鎖治療用ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製するための方法である。複数の実施形態において、方法は、二本鎖治療用ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製するための方法である。これらの方法は、例えば、高度に配列特異的なオリゴヌクレオチド産物を作製することが重要である治療用オリゴヌクレオチド作製において有用である。産物はまた、例えば、高度に配列特異的なポリヌクレオチド産物を作製することが重要である治療用ｍＲＮＡ作製に

おいても有用である。

【０１３７】

鋳型と不純物との二重鎖の変性および／または鋳型と産物との二重鎖の変性が温度上昇に起因する方法が提供される。複数の実施形態において、変性は、ｐＨを変更した結果として行われ得る。複数の実施形態において、変性は、緩衝溶液における塩濃度を変更することによって行われ得る。

【０１３８】

セグメントオリゴヌクレオチドが３～１５ヌクレオチド長である方法が提供される。複数の実施形態において、セグメントは５～１０ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、セグメントは５～８ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、セグメントは４、５、６、７または８ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、一緒にライゲーションされた場合に２０ヌクレオチド長（「２０マー」）であるオリゴヌクレオチドを形成する３つのセグメントオリゴヌクレオチド、すなわち、７ヌクレオチド長である５’セグメントと、６ヌクレオチド長である中心セグメントと、７ヌクレオチド長である３’セグメントとが存在する。複数の実施形態において、一緒にライゲーションされた場合に２０ヌクレオチド長（「２０マー」）であるオリゴヌクレオチドを形成する３つのセグメントオリゴヌクレオチド、すなわち、６ヌクレオチド長である５’セグメントと、８ヌクレオチド長である中心セグメントと、６ヌクレオチド長である３’セグメントとが存在する。複数の実施形態において、一緒にライゲーションされた場合に２０ヌクレオチド長（「２０マー」）であるオリゴヌクレオチドを形成する３つのセグメントオリゴヌクレオチド、すなわち、５ヌクレオチド長である５’セグメントと、１０ヌクレオチド長である中心セグメントと、５ヌクレオチド長である３’セグメントとが存在する。複数の実施形態において、一緒にライゲーションされた場合に２０ヌクレオチド長（「２０マー」）であるオリゴヌクレオチドを形成する３つのセグメントオリゴヌクレオチド、すなわち、４ヌクレオチド長である５’セグメントと、１２ヌクレオチド長である中心セグメントと、４ヌクレオチド長である３’セグメントとが存在する。複数の実施形態において、一緒にライゲーションされた場合に２０ヌクレオチド長（「２０マー」）であるオリゴヌクレオチドを形成する４つのセグメントオリゴヌクレオチド、すなわち、５ヌクレオチド長である５’セグメントと、５ヌクレオチド長である５’中央セグメントと、５ヌクレオチド長である中央３’セグメントと、５ヌクレオチド長である３’セグメントとが存在する。

【０１３９】

産物が３～４０ヌクレオチド長である方法が提供される。複数の実施形態において、産物は１３～４０ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、産物は１５～４０ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、産物は１３～３５ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、産物は１５～３５ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、産物は１５～３０ヌクレオチド長であり得る。複数の実施形態において、産物は１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０ヌクレオチド長であり得る。本発明のある実施形態において、産物は２０ヌクレオチド長、すなわち「２０マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２１ヌクレオチド長、すなわち「２１マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２２ヌクレオチド長、すなわち「２２マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２３ヌクレオチド長、すなわち「２３マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２４ヌクレオチド長、すなわち「２４マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２５ヌクレオチド長、すなわち「２５マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２６ヌクレオチド長、すなわち「２６マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２７ヌクレオチド長、すなわち「２７マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２８ヌクレオチド長、すなわち「２８マー」である。本発明のある実施形態において、産物は２９ヌクレオチド長、すなわち「２９マー

」である。本発明のある実施形態において、産物は３０ヌクレオチド長、すなわち「３０マー」である。そのような産物は、例えば、ギャップマー作製において有用性を有する。ある実施形態において、そのような３～４０ヌクレオチド長の一本鎖産物は治療用アンチセンスギャップマーである。ある実施形態において、そのような３～４０ヌクレオチド長の産物は治療用二本鎖産物、例えばｓｉＲＮＡおよびｍｉＲＮＡである。ある実施形態において、そのような３～４０ヌクレオチド長の産物は、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡ編集酵素を動員および誘導するオリゴヌクレオチド、例えばＲＮＡ塩基修飾オリゴヌクレオチド、例えばＡＩｍｅｒである。

【０１４０】

産物が最大１０，０００ヌクレオチド長である方法が提供される。複数の実施形態において、一本鎖ポリヌクレオチド産物は、１０～１０，０００ヌクレオチド長、任意選択で、１０～５，０００ヌクレオチド長、１０～１，０００ヌクレオチド長、１０～５００ヌクレオチド長、１０～４００ヌクレオチド長、１０～３００ヌクレオチド長、１０～２００ヌクレオチド長、１０～１００ヌクレオチド長、１０～５０ヌクレオチド長、または１０～４０ヌクレオチド長であり得る。そのような産物は、例えば、治療用ｍＲＮＡポリヌクレオチドとしての有用性を有する。

【０１４１】

鋳型が産物から分離されることを可能にする特性が、鋳型が支持材料に付着することである方法が提供される。複数の実施形態において、支持材料は可溶性支持材料である。複数の実施形態において、可溶性支持材料は、ポリエチレングリコール、可溶性有機ポリマー、ＤＮＡ、タンパク質、デンドリマー、多糖、オリゴ糖、および炭水化物からなる群から選択される。複数の実施形態において、支持材料はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である。複数の実施形態において、支持材料は不溶性支持材料である。複数の実施形態において、支持材料は固体支持材料である。複数の実施形態において、固体支持材料は、ガラスビーズ、ポリマービーズ、線維性支持体、膜、ストレプトアビジンコーティングビーズ、およびセルロースからなる群から選択される。複数の実施形態において、固体支持材料はストレプトアビジンコーティングビーズである。複数の実施形態において、固体支持材料は、それ自体が反応容器の一部、例えば反応壁である。

【０１４２】

鋳型の反復コピーが、単一の付着点を介して支持材料に連続的な様式で付着する方法が提供される。鋳型の反復コピーは、例えば図２に示されるように、リンカーによって分離されていてもよい。鋳型の反復コピーはダイレクトリピートであってもよい、すなわち、それらはリンカーによって分離されていない。

【０１４３】

複数の実施形態において、鋳型は、複数の付着点において支持材料に付着する。

【０１４４】

鋳型が産物から分離されることを可能にする特性が鋳型の分子量である方法が提供される。例えば、鋳型配列の反復コピーは、単一のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに、リンカー配列を伴ってまたは伴わずに存在し得る。

【０１４５】

鋳型、または鋳型と支持材料とが、例えば以下に詳述されるように、その後の反応における使用のために再利用される方法が提供される。反応が連続または半連続フロー法を使用して実行される方法が提供される。

【０１４６】

複数の実施形態において、方法は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、任意選択で、治療用ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの大規模製造のためのものである。本開示の文脈において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの大規模製造とは、１リットル以上の規模での製造を意味し、例えば、方法は１Ｌ以上のリアクターにおいて実行される。あるいは、または加えて、本開示の文脈において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの大規模製造とは、グラム規模での産物の製造、特に１０グラ

ム以上の産物の作製を意味する。複数の実施形態において、産物はグラム規模もしくはキログラム規模で作製される、および／または方法は少なくとも１Ｌのリアクターにおいて実行される。複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の量はグラム規模である。本開示のある実施形態において、作製される産物の量は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０または１００グラム以上である。複数の実施形態において、作製されるオリゴヌクレオチド産物の量は、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０グラム以上である。複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の量は、５００グラム以上である。複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物はキログラム規模である。複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の量は、１ｋｇ以上である。複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の量は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０ｋｇ以上である。複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物の量は、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００ｋｇ以上である。

【０１４７】

複数の実施形態において、作製される産物の量は、１０グラム～１００ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、１０グラム～５０ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、１００グラム～１００ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、１００グラム～５０ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、５００グラム～１００ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、５００グラム～５０ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、１ｋｇ～５０ｋｇである。複数の実施形態において、作製される産物の量は、１０ｋｇ～５０ｋｇである。

【０１４８】

複数の実施形態において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド製造は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０リットル以上の規模で、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９または１０Ｌのリアクターにおいて行われる。複数の実施形態において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド製造は、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００リットル以上の規模で、例えば、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００Ｌのリアクターにおいて行われる。複数の実施形態において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド製造は、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００リットル以上の規模で、例えば、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００Ｌのリアクターにおいて行われる。

【０１４９】

複数の実施形態において、リアクター容量は、約１０，０００Ｌ、約５０００Ｌ、約２０００Ｌ、約１０００Ｌ、約５００Ｌ、約１２５Ｌ、約５０Ｌ、約２０Ｌ、約１０Ｌ、または約５Ｌである。

【０１５０】

複数の実施形態において、リアクター容量は、５～１０，０００Ｌ、１０～５０００Ｌ、２０～２０００Ｌ、または５０～１０００Ｌである。

【０１５１】

ポリメラーゼおよびリガーゼを使用してポリヌクレオチドを作製するための方法が提供される。２つ以上の相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列、例えばセ

グメントが結合する鋳型ポリヌクレオチドが使用される。ポリメラーゼは、相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列間の各々のギャップを埋めるために使用される。隣接する配列は、リガーゼを使用して一緒に融合される。有利には、方法全体は完全に酵素的であり、複雑性を減少させ、方法の効率を高めることができる。２つ以上の相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列は、修飾ヌクレオチドを含み得る。あるいは、または加えて、ポリメラーゼによって導入されたヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含み得る。このことは、短いオリゴヌクレオチド（例えば１０～３０ヌクレオチドの長さ）とすることも長いポリヌクレオチド（例えば３０～１０，０００ヌクレオチドの長さ）とすることもできる治療用ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドの作製を可能にする。２つ以上の相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列は、鋳型ポリヌクレオチドに結合することができ、ポリメラーゼは各々の相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列間の各々のギャップを埋めることができる。次いで、リガーゼは、各々の隣接する配列を一緒にライゲーションするために使用することができる。

【０１５２】

最終一本鎖産物は、本明細書に記載される方法を使用して鋳型から分離することができる。任意選択で、鋳型は、鋳型がその後の反応のために再利用されることを可能にする、本明細書に記載される特性を有することができる。

【０１５３】

一例において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含有する、通常１０～３０ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであるギャップマーを作製するための方法が提供される。一般に、ギャップマーは、修飾されていないヌクレオチド残基を含有する中央領域と、中央領域の両側の２つのウイング領域（５’および３’ウイング）とを含有し、ウイング領域は、各々、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含有する。ある実施形態において、ポリメラーゼは、ギャップマーの中央領域を作製するために使用される。一例において、５’セグメントは、ギャップマーの中央領域を作製するためのポリメラーゼのプライマーとして使用することができ、３’セグメントは、ポリメラーゼのストッパーとして使用することができる。次いで、リガーゼは、中央セグメントを３’セグメントと融合させて、ギャップマー産物を作出するために使用することができる。ある実施形態において、ポリメラーゼは、ギャップマーの中央領域の一部を作製するために使用される。一実施形態において、５’セグメントは、ギャップマーのセグメントを作製するためのポリメラーゼのプライマーとして使用することができ、３’セグメントは、ポリメラーゼのストッパー配列として使用することができる。５’セグメントは、ウイング領域を含んでも、それからなってもよい。５’セグメントは、ウイング領域の一部を含んでもよい。３’セグメントは、ウイング領域を含んでも、それからなってもよい。３’セグメントは、ウイング領域の一部を含んでもよい。この点において、方法の複雑性は、作製のラウンドの数を減少させることによって有意に減少する。ある実施形態において、中央領域は、ホスホロチオエート連結によって結合されたデオキシヌクレオチドを含むかまたはそれからなる、すなわち、中央領域に糖修飾は存在しないが、骨格は完全ホスホロチオエート骨格であり、ポリメラーゼは、ギャップマーの中央領域を作製するために使用される。ある実施形態において、５’セグメントはプライマーであり、３’セグメントはストッパーであり、各々のセグメントはホスホロチオエート連結によって結合された２’－ＭＯＥ糖修飾ヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。ある実施形態において、ギャップマーの中央領域は、ホスホロチオエート連結によって結合されたデオキシヌクレオチドを含むかまたはそれからなり、ポリメラーゼは、ギャップマーの中央領域を作製するために使用され、５’セグメントはプライマーであり、３’セグメントはストッパーであり、各々のセグメントはホスホロチオエート連結によって結合された２’－ＭＯＥ糖修飾ヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。ある実施形態において、ギャップマーは、完全ホスホロチオエート骨格、完全に２’ＭＯＥ糖修飾されている５’ウイング、完全に２’ＭＯＥ糖修飾されている３’ウイング、完全にデオキシリボースである中央領域を有し、前記ギャップマーは、プライ

マーとしての５’ウイングに対応する５’セグメント、ストッパーとしての３’ウイングに対応する３’セグメント、ならびに中央領域を作製するためのポリメラーゼおよびデオキシヌクレオシドアルファ－チオ三リン酸のプールを使用して作製される。ある実施形態において、ギャップマーは５－１０－５ギャップマーである。

【０１５４】

伝統的なポリヌクレオチド製造方法、例えば固相合成において、単一ヌクレオチドは、鋳型非依存的な様式で一本鎖オリゴヌクレオチドに付加され、規定の配列を有するオリゴヌクレオチドの合成を可能にする。そのような手法は、単一塩基を反復して付加することによって、完全なオリゴヌクレオチド産物を作製するために使用され得る。しかしながら、各々の合成サイクルが１００％の収率で行われない限り、列欠失エラーが最終産物に組み込まれることになる。例えば、オリゴヌクレオチドが合成サイクルにおいて９９％の収率で１ヌクレオチド伸長させる場合、残りの１％はその後の合成サイクルにおいて反応させるために利用可能であるが、形成される産物は、所望の産物よりも１ヌクレオチド短くなってしまう。サイクルの数が増加するにつれてエラー率は累積的に増加するため、この例において、９９％のサイクル収率は、２０マーの作製の場合、２０％の１塩基短くなった配列の形成をもたらし得る。

【０１５５】

単一ヌクレオチドを一本鎖オリゴヌクレオチドに付加することができるリガーゼまたはトランスフェラーゼを使用した単一ヌクレオチドの付加によって合成される短い、典型的には５～８ヌクレオチド長の配列のみを使用してこのことを克服しようとする試みは、長い配列よりも高い純度を有する短い配列をもたらしたが、これは、短い配列がより少ないサイクルのエラー蓄積に曝露されるためである。これらの短い配列は、相補的なＤＮＡ鋳型上に構築され、次いで一緒に結合される。相補的な鋳型とリガーゼとの併用は、正しい長さと正しい配列の両方を有する短いオリゴヌクレオチドのみが構築されることを保証する。しかしながら、そのような方法は、各々のヌクレオチドを別のヌクレオチドに付加して各々の短い配列を作出し、次いでそれらを組み合わせるために、依然として複数ラウンドの合成を必要とする。このことは、時間がかかる上に複雑である。

【０１５６】

したがって、本開示の方法は、全体の収率が高く、配列全体の正確性が高い一本鎖オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド産物を作製するためのより効率的な方法をもたらす。

【０１５７】

本開示によれば、ポリメラーゼをリガーゼと組み合わせて使用することによって、一本鎖オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド産物は、効率的な方法において、化学合成のラウンドの繰り返しを伴わずに作製することができる。

【０１５８】

エラーの逐次蓄積もまた回避される。第１に、産物配列の少なくとも２つのセグメントを使用し、ポリメラーゼを使用してギャップを埋めることによって、これは、複数のより短い配列が最終産物を構成することを可能にし、例えばエラーが導入され得る固相合成と比較してより少ない合成のラウンドをもたらす。ポリメラーゼもまた高い配列の正確性を有し、エラー組込みの可能性を減少させる。このことは、商業的なオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド作製のための方法のスケールアップに対する制限をさらに軽減する。

【０１５９】

第２に、その後のライゲーションを伴う、相補的なポリヌクレオチド鋳型上での最終産物の構築は、最終産物に必要とされる正しい長さと配列とを有するセグメントが正しい順序およびキラリティーにおいて構築されることを保証する。このことは、高度に正確な、個別化された最終産物が作出されることを可能にする。

【０１６０】

例示的な実施形態において、方法は完全に酵素的であり、合成のラウンドの減少および

効率の向上を可能にする。実際、ポリメラーゼおよびリガーゼステップは同時に行うことができ、したがって、最終産物は方法の１回のラウンドにおいて作製することができる。ポリメラーゼおよびリガーゼステップが同時に行われる場合、これは「ワンポット」として公知のものであってもよい。

【０１６１】

別の例示的な実施形態において、方法は、鋳型の３’末端に相補的であるポリメラーゼのための短いプライマー配列を（本明細書に記載される鋳型ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドと組み合わせて）使用することによって、さらに簡略化され、さらなる効率をもたらす。次いで、ポリメラーゼは、鋳型に沿ってプライマー配列を伸長する。鋳型の５’末端に相補的なストッパーは、ポリメラーゼを停止するために使用することができる。停止配列は、正しい量のヌクレオシド三リン酸が反応に添加される場合、不要とすることができる。このことは、必要とされるヌクレオチド付加のラウンドの数および必要とされるライゲーションの数を減少させ、全体の収率が高く、配列全体の正確性が高い、より効率的な方法をもたらす。

【０１６２】

複数の実施形態において、セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列の破壊を抑制または予防するために、ポリメラーゼは、本明細書に記載されるように、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性と５’→３’エキソヌクレアーゼ活性の両方を除去するように修飾される。

【０１６３】

ある実施形態において、ポリヌクレオチド産物はｍＲＮＡであり、コード領域は、ウリジン残基のシュードウリジンまたはＮ１－メチル－シュードウリジンでの置換えを除いては修飾されていないヌクレオチドを含む。ある実施形態において、ポリメラーゼは、ｍＲＮＡのコード領域の一部または全部を作製するために使用される。ある実施形態において、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、または５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの両方は、１つまたは２つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。ある実施形態において、シチジンまたはシチジンとウリジンの両方、のいずれかにおけるホスホロチオエート連結が５’ＵＴＲに含まれる。ある実施形態において、ポリＡ尾部は、３’－５’エキソヌクレアーゼの影響を受けない１つまたは２つ以上の修飾を含む。ある実施形態において、ポリＡ尾部は、１つまたは２つ以上のホスホロチオエート連結を含む。ある実施形態において、ポリＡ尾部は、その３’末端にホスホロチオエート連結を含む。ある実施形態において、ポリＡ尾部は、その３’末端に少なくとも６つのホスホロチオエート連結を含む。

【０１６４】

本開示によるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物は、本明細書に記載される、少なくとも１つの修飾糖部分、核酸塩基の修飾、および／または骨格の修飾を有し得る。

【０１６５】

複数の実施形態において、１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有することができる。複数の実施形態において、全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する。他の実施形態において、１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド残基を有しなくてもよい。複数の実施形態において、ポリメラーゼは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を、伸長した配列に組み込むことができる。他の実施形態において、ポリメラーゼは、修飾されていないヌクレオチド残基を、伸長した配列に組み込むことができる。

【０１６６】

いくつかの実施形態において、１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有することができ、ポリメラーゼは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を、伸長した配列に組み込むこ

とができる。いくつかの実施形態において、１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有することができ、ポリメラーゼは、修飾されていないヌクレオチド残基を、伸長した配列に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド残基を有しなくてもよく、ポリメラーゼは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を、伸長した配列に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、１つまたは２つ以上のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド残基を有しなくてもよく、ポリメラーゼは、修飾されていないヌクレオチド残基を、伸長した配列に組み込むことができる。

【０１６７】

複数の実施形態において、産物はギャップマーであり得る。複数の実施形態において、ウイング領域（任意選択で、５’および／または３’セグメントオリゴヌクレオチド）は骨格および糖修飾を含むことができ、中心領域は、骨格修飾を含むことができるが、糖修飾を含まない。複数の実施形態において、ウイング領域は、少なくとも１つの糖修飾を含むことができるか、または全体が修飾糖からなることができる。複数の実施形態において、ギャップマーの５’および３’ウイングは、２’－ＭＯＥ修飾ヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。複数の実施形態において、ギャップマーの中央領域は、糖部分の２’位に水素を含有するヌクレオチドを含むかまたはそれからなる、すなわちＤＮＡ様である。複数の実施形態において、ギャップマーの５’および３’ウイングは、２’ＭＯＥ修飾ヌクレオチドからなり、ギャップマーの中央領域は、糖部分の２’位に水素を含有するヌクレオチド（すなわち、デオキシヌクレオチド）からなる。複数の実施形態において、ギャップマーの５’および３’ウイングは、２’ＭＯＥ修飾ヌクレオチドからなり、ギャップマーの中央領域は、糖部分の２’位に水素を含有するヌクレオチド（すなわち、デオキシヌクレオチド）からなり、全てのヌクレオチド間の連結はホスホロチオエート連結である。ある実施形態において、ギャップマーは、バリフォルセン、ベピロビルセン、クスチルセン、ダプルシラン、ドニダロルセン、エプロンテルセン、フレンロシルセン、イノテルセン、ラデミルセン、ミポメルセン、オレザルセン、トミネルセン、ウレフネルセン、ボラネソルセン、およびジルガネルセンからなる群から選択される。ある実施形態において、ギャップマーは５－１０－５ギャップマーである。ある実施形態において、ギャップマーは６－８－６ギャップマーである。ある実施形態において、ギャップマーは４－１２－４ギャップマーである。ある実施形態において、ギャップマーは７－６－７ギャップマーである。

【０１６８】

結果として得られる産物が９０％超純粋である方法が提供される。複数の実施形態において、産物は９５％超純粋であり得る。複数の実施形態において、産物は９６％超純粋であり得る。複数の実施形態において、産物は９７％超純粋であり得る。複数の実施形態において、産物は９８％超純粋であり得る。複数の実施形態において、産物は９９％超純粋であり得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの純度は、任意の好適な方法、例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）または質量分析（ＭＳ）、特に、液体クロマトグラフィー－ＭＳ（ＬＣ－ＭＳ）、ＨＰＬＣ－ＭＳ、またはキャピラリー電気泳動質量分析（ＣＥＭＳ）を使用して決定することができる。

【０１６９】

ある実施形態において、作製される一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、アリカフォルセン、Ａｐｃ００１ＰＥ、ＡＳ１４１１、バリフォルセン、ベピロビルセン、ＢＩＩＢ０８０、ＢＩＩＢ０９４、ＢＩＩＢ１０１、ＢＩＩＢ１０５、ＢＩＩＢ１１５、ＢＩＩＢ１２１、ＢＩＩＢ１３２、カシメルセン、シムデリルセン、ＣｐＧ１０１８、ＣｐＧ７９０９、クスチルセン、ダプルシラン、ドニダロルセン、ドリサペルセン、エプロンテルセン、エテプリルセン、フェソメルセン、ホミベルセン、フレンロシルセン、ゴロディルセン、イメテルスタット、イノテルセン、ＩＯＮ２２４、ＩＯＮ２６０、Ｉ

ＯＮ３０６、ＩＯＮ３６３、ＩＯＮ４５５、ＩＯＮ４６４、ＩＯＮ５３２、ＩＯＮ５４１、ＩＯＮ５８２、ＩＯＮ８３９、ＩＯＮ８５９、ＩＯＮ９０４、ＩＯＮＩＳ－ＡＧＴ－L_{Rx}、ＩＯＮＩＳ－ＦＢ－L_{Rx}、ＩＯＮＩＳ－ＭＡＰT_{Rx}、ラデミルセン、レクサネルセン、ミポメルセン、モンゲルセン、ヌシネルセン、ＮＯＸ－Ｅ３６、オレザルセン、ペガプタニブ、ペラカルセン、プレキシゲベルセン、レナジルセン、ＲＧ６０４８、ルゴネルセン、サパブルルセン、セポファルセン、スボディルセン、トフェルセンナトリウム、トミネルセン、ウレフネルセン、ウルテブルセン、ベスレテプリルセン、ビルトラルセン、ボラネソルセン、ＷＶＥ－００３、ＷＶＥ－００４、ＷＶＥ－００６、ＷＶＥ－Ｎ５３１、およびジルガネルセンからなる群から選択される。

【０１７０】

複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、アンチセンスポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アリカフォルセン、バリフォルセン、ベピロビルセン、ＢＩＩＢ０８０、ＢＩＩＢ０９４、ＢＩＩＢ１０１、ＢＩＩＢ１０５、ＢＩＩＢ１１５、ＢＩＩＢ１２１、ＢＩＩＢ１３２、シムデリルセン、カシメルセン、クスチルセン、ダプルシラン、ドニダロルセン、ドリサペルセン、エプロンテルセン、エテプリルセン、フェソメルセン、ホミベルセン、フレンロシルセン、ゴロディルセン、イメテルスタット、イノテルセン、ＩＯＮ２２４、ＩＯＮ２６０、ＩＯＮ３０６、ＩＯＮ３６３、ＩＯＮ４５５、ＩＯＮ４６４、ＩＯＮ５３２、ＩＯＮ５４１、ＩＯＮ５８２、ＩＯＮ８３９、ＩＯＮ８５９、ＩＯＮ９０４、ＩＯＮＩＳ－ＡＧＴ－L_{Rx}、ＩＯＮＩＳ－ＦＢ－L_{Rx}、ＩＯＮＩＳ－ＭＡＰT_{Rx}、ラデミルセン、レクサネルセン、ミポメルセン、モンゲルセン、ヌシネルセン、オレザルセン、ペラカルセン、プレキシゲベルセン、レナジルセン、ＲＧ６０４８、ルゴネルセン、サパブルルセン、セポファルセン、スボディルセン、トフェルセンナトリウム、トミネルセン、ウレフネルセン、ウルテブルセン、ベスレテプリルセン、ビルトラルセン、ボラネソルセン、ＷＶＥ－００３、ＷＶＥ－００４、ＷＶＥ－Ｎ５３１、およびジルガネルセンからなる群から選択される。

【０１７１】

複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドはアプタマーである。ある実施形態において、アプタマーは、ペガプタニブ、Ａｐｃ００１ＰＥ、ＡＳ１４１１、またはＮＯＸ－Ｅ３６である。

【０１７２】

複数の実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、Ｃａｓ９などのｍＲＮＡである。一実施形態において、作製されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドはｍＲＮＡワクチンである。ある実施形態において、ｍＲＮＡは１つまたは２つ以上の免疫原をコードする。さらなる実施形態において、これらの免疫原は、呼吸器多核体ウイルス（ＲＳＶ）免疫原、エプスタイン－バーウイルス糖タンパク質免疫原、サイトメガロウイルス糖タンパク質免疫原、コロナウイルススパイクポリペプチド免疫原、インフルエンザウイルス免疫原、水痘帯状疱疹ウイルス糖タンパク質免疫原、ヒトパピローマウイルス１６（ＨＰＶ１６）Ｅ６免疫原、ＨＰＶ１６Ｅ７免疫原、またはフラビウイルス免疫原から選択され得る。さらなる実施形態において、それらの免疫原は、コロナウイルススパイクタンパク質、インフルエンザ抗原、およびｆタンパク質またはｇタンパク質などのＲＳＶ抗原から選択され得る。

【０１７３】

ある実施形態において、ｍＲＮＡは、ＡＺＤ８６０１、ＢＮＴ１１１、ＢＮＴ１１２、ＢＮＴ１１３、ＢＮＴ１１５、ＢＮＴ１１６、ＢＮＴ１２２、ＢＮＴ１３１、ＢＮＴ１４１、ＢＮＴ１４２、ＢＮＴ１５１、ＢＮＴ１５２、ＢＮＴ１５３、ＢＮＴ１６１、ＢＮＴ１６２ｂ２、ＢＮＴ１６３　ＢＮＴ１６４、ＢＮＴ１６５、ＬＵＮＡＲ－ＣＦ、ＬＵＮＡＲ－ＣＯＶ１９、ＬＵＮＡＲ－ＦＬＵ、ＬＵＮＡＲ－ＧＳＤＩＩＩ、ＬＵＮＡＲ－ＯＴＣ、ＭＥＤＩ１１９１、ｍＲＮＡ－１２７３、ｍＲＮＡ－０１８４、ｍＲＮＡ－１０１０、ｍＲＮＡ－１０２０、ｍＲＮＡ－１０３０、ｍＲＮＡ－１０１１、ｍＲＮＡ－１０１２、

ｍＲＮＡ－１０４５、ｍＲＮＡ－１０７３、ｍＲＮＡ－１１８９、ｍＲＮＡ－１１９５、ｍＲＮＡ－１２１５、ｍＲＮＡ－１２３０、ｍＲＮＡ－１２７３、ｍＲＮＡ－１２７３．２１１、ｍＲＮＡ－１２７３．２１３、ｍＲＮＡ－１２７３．２１４、ｍＲＮＡ－１２７３．２２２、ｍＲＮＡ－１２７３．３５１、ｍＲＮＡ－１２７３．５２９、ｍＲＮＡ－１２７３．６１７、ｍＲＮＡ－１２８３、ｍＲＮＡ－１２８７、ｍＲＮＡ－１３４５、ｍＲＮＡ－１３６５、ｍＲＮＡ－１４６８、ｍＲＮＡ－１５７４、ｍＲＮＡ－１６０８、ｍＲＮＡ－１６４４、ｍＲＮＡ－１６４７、ｍＲＮＡ－１６５３、ｍＲＮＡ－１８９３、ｍＲＮＡ２７５２、ｍＲＮＡ－３１３９、ｍＲＮＡ－３２８３、ｍＲＮＡ－３３５１、ｍＲＮＡ－３７０５、ｍＲＮＡ－３７４５、ｍＲＮＡ－３９２７、ｍＲＮＡ－４１５７、ｍＲＮＡ－４３５９、ｍＲＮＡ－５６７１、ｍＲＮＡ－６９８１、およびＶＸ－５２２からなる群から選択される。さらなる実施形態において、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ－１０４５、ｍＲＮＡ－１２３０、ｍＲＮＡ－１３４５、ｍＲＮＡ－１３６５、ＥＢＶ　ｍＲＮＡ－１１８９、ｍＲＮＡ－１１９５、ｍＲＮＡ－１６４７、ＢＮＴ１６２ｂ２、ＬＵＮＡＲ－ＣＯＶ１９、ｍＲＮＡ－１０７３、ｍＲＮＡ－１２７３．２１３、ｍＲＮＡ－１２７３．２１４、ｍＲＮＡ－１２７３．２２２、ｍＲＮＡ－１２７３．３５１、ｍＲＮＡ－１２７３．５２９、ｍＲＮＡ－１２７３．６１７、ｍＲＮＡ－１２８３、ｍＲＮＡ－１２８７、ｍＲＮＡ－１３４５、ＢＮＴ１６１、ｍＲＮＡ－１４６８、ＢＮＴ１１３、およびｍＲＮＡ－１８９３からなる群から選択される。さらなる実施形態において、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ－１０４５、ｍＲＮＡ－１２３０、ｍＲＮＡ－１３４５、ｍＲＮＡ－１３６５、ＢＮＴ１６２ｂ２、ＬＵＮＡＲ－ＣＯＶ１９、ｍＲＮＡ－１０７３、ｍＲＮＡ－１２７３．２１３、ｍＲＮＡ－１２７３．２１４、ｍＲＮＡ－１２７３．２２２、ｍＲＮＡ－１２７３．３５１、ｍＲＮＡ－１２７３．５２９、ｍＲＮＡ－１２７３．６１７、ｍＲＮＡ－１２８３、ｍＲＮＡ－１２８７、ｍＲＮＡ－１３４５、ＢＮＴ１６１、およびＬＵＮＡＲ－ＦＬＵからなる群から選択される。

【０１７４】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物はアジュバントである。ある実施形態において、アジュバントはＣｐＧオリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、アジュバントはＣｐＧ１０１８またはＣｐＧ７９０９である。

【０１７５】

複数の実施形態において、産物は治療用ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである。

【０１７６】

複数の実施形態において、方法は、二本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製することができ、ここで、２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される方法によって作製され、次いで、アニーリングを可能にする条件下で混合され、そのような条件は、当業者に容易に明らかとなる。ある実施形態において、産物はｓｉＲＮＡである。ある実施形態において、ｓｉＲＮＡは、ＡＬＮ－ＡＡＴ０２、ＡＬＮ－ＡＰＰ、ＡＬＮ－ＴＴＲｓｃ０４、ＡＬＮ－ＨＢＶ０２、ＡＬＮ－ＨＳＤ、ＡＬＮ－ＫＨＫ、ＡＬＮ－ＰＮＰ、ＡＲＯ－ＡＡＴ、ＡＲＯ－ＡＮＧ３、ＡＯＣ　１００１、ＡＯＣ　１０２０、ＡＯＣ　１０４４、ＡＲＯ－ＡＰＯＣ３、ＡＲＯ－Ｃ３、ＡＲＯ－ＣＯＶ、ＡＲＯ－ＤＵＸ４、ＡＲＯ－ＥＮａＣ２、ＡＲＯ－ＭＵＣ５ＡＣ、ＡＲＯ－ＭＭＰ７、ＡＲＯ－ＰＮＰＬＡ３、ＡＲＯ－ＲＡＧＥ、ベルセシラン、セムジシラン、コスドシラン、ダプルシラン、ＤＣＲ－ＡＵＤ、ＤＣＲ－ＣＭ３、ＤＣＲ－ＣＭ４、ＤＣＲ－ＣＯＭＰ１、ＤＣＲ－ＣＯＭＰ２、ＤＣＲ－ＬＩＶ２、ＤＣＲ－ＬＬＹ１１、ＤＣＲ－ＬＬＹ１２、ＤＣＲ－ＮＯＶＯ１、ＤＣＲ－ＮＯＶＯ２、エレブシラン、ファジルシラン、フィツシラン、ギボシラン、ＨＺＮ－４５７、インクリシラン、ＪＮＪ－３９８９、ルマシラン、ＬＹ３５６１７７４、ＬＹ３８１９４６９、ネドシラン、オルパシラン、パチシラン、レブシラン、ＲＧ６３４６、ＲＩＭ７３０、ＳＬＮ１２４、ＳＬＮ５０１、ＳＬＮ－ＨＡＮ－１、ＳＬＮ－ＭＮＫ－２、ＳＬＮ－ＭＮＫ－３、ＳＬＮ－ＡＺ－１、ＳＬＮ－ＡＺ－２、ＳＴＰ１２２Ｇ、ＳＴＰ１２５Ｇ、ＳＴＰ１３５Ｇ、ＳＴＰ１３６

Ｇ、ＳＴＰ１４４Ｇ、ＳＴＰ１４５Ｇ、ＳＴＰ１４６Ｇ、ＳＴＰ１５２Ｇ、ＳＴＰ１５５Ｇ、ＳＴＰ２３７Ｇ、ＳＴＰ２４７Ｇ、ＳＴＰ２５１Ｇ、ＳＴＰ３５５、ＳＴＰ３６９、ＳＴＰ７０２、ＳＴＰ７７９、ＳＴＰ７０５、ＳＴＰ７０７、テプラシラン、チバニシラン、ブトリシラン、ゼルラシラン、ジレベシラン、およびジフカシランからなる群から選択される。ある実施形態において、産物はｍｉＲＮＡまたはｍｉＲＮＡ模倣体である。ある実施形態において、ｍｉＲＮＡ模倣体はレムラルセンである。

【０１７７】

本明細書に開示される発明は、オリゴヌクレオチド結合の特性を利用して、それらの作製のための改善された方法を提供する。標的配列に対して１００％の相補性を有する鋳型オリゴヌクレオチドを用意し、反応条件を、産物が特定の条件下で放出および分離され得るように制御することによって、高度の純度を有する産物が取得され得る。

【０１７８】

産物（または不純物）：鋳型二重鎖の変性および産物（または不純物）の鋳型からの分離

鋳型から産物（または任意の不純物）を放出することは、鋳型ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド鎖と産物（または不純物）との間のワトソン・クリック塩基対形成が壊されること（すなわち、二重鎖を変性させること）を必要とする。次いで、産物（または不純物）は、鋳型から分離することができ、これは、２つの別個のステップとして、または１つの組み合わされたステップとして行うことができる。

【０１７９】

方法がカラムリアクターにおいて実行される場合、産物（または不純物）を放出および分離することは１つのステップとして行うことができる。ｐＨもしくは塩濃度を変えるか、または塩基対形成を破壊する化学物質（例えば、ホルムアミドまたは尿素）を含有する緩衝液において行うことは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド鎖の変性を引き起こし、産物（または不純物）は緩衝液中に溶出する。

【０１８０】

方法が他の反応容器において実行される場合、産物（または不純物）の放出および分離は、２ステップのプロセスとして行うことができる。初めに、ワトソン・クリック塩基対が、鎖を変性させるために破壊され、次いで産物（または不純物）が鋳型から分離、例えば反応容器から除去される。産物を放出および分離することが２ステップのプロセスとして実行される場合、ワトソン・クリック塩基対の切断は、緩衝液条件（ｐＨ、塩）を変えること、または化学的破壊剤（ホルムアミド、尿素）を導入することによって達成することができる。あるいは、温度を上昇させることもまた、２本の鎖の解離、すなわち変性を引き起こすことができる。次いで、産物（または不純物）は、分子量に基づく分離、電荷に基づく分離、疎水性に基づく分離、特定の配列に基づく分離、またはこれらの方法の組合せを含む方法を介して分離（さらには、所望される場合、反応容器から除去）することができる。

【０１８１】

方法が連続または半連続フローリアクターにおいて実行される場合、産物（または不純物）の放出および分離は、１つのステップまたは２つのステップのいずれで行うこともできる。例えば、１つのステップにおいて産物（または不純物）を放出および分離することは、温度を上げて２本の鎖の解離を引き起こすことと、温度を上昇させるために使用したリアクターの同じ部分において、放出された鎖を分子量に基づいて分離することとの影響を受け得る。２つのステップにおいて産物（または不純物）を放出および分離することは、リアクターのある部分において温度を上げて２本の鎖の解離を引き起こすことと、リアクターの異なる部分において、放出された鎖を分子量に基づいて分離することとの影響を受け得る。

【０１８２】

不純物の鋳型からの特異的放出および分離ならびに産物の鋳型への保持

不純物は、鎖伸長中に誤ったヌクレオチドがオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる場合、または鎖伸長反応が早期に終了する場合に生じる。不純物はまた、反応がセグメントポ

リヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをライゲーションするステップを含み、かつライゲーションステップのうちの１つまたは２つ以上が起こらない場合にも生じる。

【０１８３】

ワトソン・クリック塩基対形成の特性は、産物の放出前に鋳型に結合している任意の不純物を特異的に放出するために活用することができる。各々の二本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、特定の条件下で解離し、１００％の相補性を有しない配列の条件は、１００％の相補性を有する配列と比較した場合、異なっている。そのような条件を決定することは、当業者の範囲内である。

【０１８４】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを変性させる一般的な手段は、温度を上昇させることである。半分の塩基対が解離する、すなわち、５０％の二重鎖が一本鎖状態となる温度は、融解温度T_mと呼ばれる。融解温度を決定する最も信頼性の高い、かつ正確な手段は、経験によるものである。しかしながら、これは煩雑であり、通常は必要ではない。いくつかの式がT_m値を算出するために使用することができ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １９８７、１５（１３）：５０６９～５０８３；ＰＮＡＳ １９８６、８３（１１）：３７４６～３７５０；Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ １９９７、４４（３）：２１７～２３９）、多数の融解温度計算機が、試薬供給業者および大学によって管理されており、オンラインで見出すことができる。所与のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド配列について、全てがホスホロチオエート連結であるバリアントは、全てがホスホジエステル連結であるバリアントよりも低い温度で融解することが公知である。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドにおいてホスホロチオエート連結の数を増加させることは、その所期の標的としてのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのT_mを低下させる傾向がある。

【０１８５】

反応混合物から不純物を特異的に分離するために、初めに、産物：鋳型二重鎖の融解温度が算出される。次いで、反応容器が第１の温度、例えば産物：鋳型二重鎖の融解温度未満の温度、例えば融解温度を摂氏１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０度下回る温度まで加熱される。この加熱ステップは、鋳型由来の産物ではない、すなわち鋳型に対して１００％相補的ではないポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの変性を引き起こす。次いで、これらの変性されたポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、上に開示した方法のうちの１つ、例えば、分子量に基づく分離、電荷に基づく分離、疎水性に基づく分離、特定の配列に基づく分離、またはこれらの方法の組合せを使用して反応容器から除去することができる。次いで、反応容器は、鋳型由来の産物の変性を引き起こすために、第２のより高い温度、例えば算出された融解温度を超える、例えば融解温度よりも摂氏１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０度上回る温度まで上昇される。次いで、産物は、上に開示した方法のうちの１つ、例えば、分子量に基づく分離、電荷に基づく分離、疎水性に基づく分離、特定の配列に基づく分離、またはこれらの方法の組合せを使用して分離（および反応容器から除去）することができる。

【０１８６】

同様の方法は、破壊剤がｐＨもしくは塩濃度の変更を引き起こす薬剤であるかまたは化学的破壊剤である場合、使用可能である。破壊剤は、濃度に関して、産物が解離し得る濃度の直前まで増加されて、鋳型由来の産物ではないポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの変性を引き起こす。次いで、これらの不純物は、上に開示した方法のうちの１つを使用して反応容器から除去することができる。次いで、破壊剤は、濃度に関して、産物が鋳型から解離される濃度を超えるまで増加される。次いで、産物は、上に開示した方法のうちの１つを使用して反応容器から除去することができる。

【０１８７】

上に開示したような方法から取得された産物は、さらなる精製ステップを必要とせずに高度の純度を有する。例えば、取得された産物は９５％超純粋である。

【０１８８】

鋳型の特性

いくつかの実施形態において、鋳型は、それが産物中の不純物になることを防止するために、産物が除去されるときに反応容器に保持されることを可能にする特性を有し得る。本発明の一実施形態において、この保持は、鋳型を支持性材料にカップリングすることによって達成される。このカップリングは、高分子量を有し、したがって不純物および産物が例えば濾過によって除去されるときに反応容器に保持され得る鋳型－支持体複合体をもたらす。鋳型は、ポリマービーズ、線維性支持体、膜、ストレプトアビジンコーティングビーズ、およびセルロースなどの固体支持材料にカップリングすることができる。鋳型はまた、ポリエチレングリコール、可溶性有機ポリマー、ＤＮＡ、タンパク質、デンドリマー、多糖、オリゴ糖、および炭水化物などの可溶性支持材料にカップリングすることもできる。

【０１８９】

各々の支持材料は、鋳型が付着することができる複数の点を有することができ、各々の付着点は、複数の鋳型が付着することができる。

【０１９０】

鋳型は、支持材料に付着せずに、それ自体が高分子量を有してもよく、例えば、それは、図２に示される様式で、例えばリンカーによって分離されている複数コピーの鋳型を有する分子であってもよい。

【０１９１】

鋳型を反応容器に保持できることはまた、鋳型が、回収されることによって、または連続もしくは半連続フロー法における使用によって、その後の反応のために再利用されることも可能にする。このことは、例えば、ギャップマー作製などのオリゴヌクレオチド作製、および治療用ｍＲＮＡ作製において有用である。

【０１９２】

鋳型の特性は、鋳型と産物との分離、または鋳型結合産物と不純物との分離を可能にし得る。分子量に基づく分離、電荷に基づく分離、疎水性に基づく分離、特定の配列に基づく分離、またはこれらの方法の組合せが使用可能である。

【０１９３】

鋳型が固体支持体に付着する場合、鋳型の産物からの分離、または不純物の鋳型に結合した産物からの分離は、固体支持体を、当業者に容易に明らかとなり得る適切な条件下で洗浄することによって達成される。鋳型が可溶性支持体にカップリングされるかまたは鋳型それ自体が反復鋳型配列から構成される場合、鋳型の産物からの分離または鋳型結合産物の不純物からの分離は、分子量に基づく分離によって、例えば、より大きな分子がフィルターによって保持され、より小さな分子が通過するようにフィルター材料が選択される限外濾過またはナノ濾過などの技法を使用することによって達成することができる。不純物の鋳型産物複合体からの単一の分離ステップ、または産物の鋳型からの分離が十分に効率的ではない場合は、複数の逐次濾過ステップが、分離効率を高め、したがって所望の純度を満たす産物を生成するために用いられ得る。

【０１９４】

効率的かつ工業生産規模に適用可能である、そのようなポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの分離のための方法を提供することが望ましい。「Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ：Ｔｈｅ ｓｔａｔｅ ｏｆ ｔｈｅ ａｒｔ ｉｎ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ」Ｓａｎｇｈｖｉら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（２００４）第７巻第８号は、オリゴヌクレオチド精製のために使用される方法を概観している。

【０１９５】

ＷＯ０１／５５１６０Ａ１は、夾雑物とイミン連結を形成し、次いでイミン連結不純物を、クロマトグラフィーまたは他の技法を用いて除去することによるオリゴヌクレオチドの精製を開示している。「Ｓｉｚｅ Ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｉｏｎ ｏｆ ＤＮＡ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｒａｎｇｉｎｇ ｆｒｏｍ ２０ ｔｏ ３０００００ Ｂａｓｅ Ｐａｉ

ｒｓ ｂｙ Ｌｉｑｕｉｄ／Ｌｉｑｕｉｄ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ」Ｍｕｌｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ（１９８２）１２８～２３８は、ヌクレオチド配列の分離のためにＰＥＧ／デキストラン相が上に堆積している微結晶セルロースの固体カラムの使用を開示している。「Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｂｙ ｈｙｄｒｏｐｈｉｌｉｃ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ．」Ｅａｓｔｅｒら、Ｔｈｅ Ａｎａｌｙｓｔ（２０１０）；１３５（１０）は、固体シリカ支持体相を用いるＨＰＬＣの変法を使用したオリゴヌクレオチドの分離を開示している。「Ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｏｆ ｙｅａｓｔ ｓｏｌｕｂｌｅ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ ｂｙ ｃｏｕｎｔｅｒｃｕｒｒｅｎｔ ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ」Ｄｏｃｔｏｒら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９６５）４（１）４９～５４は、乾燥ＤＥＡＥ－セルロースを充填した乾燥固体カラムの使用を開示している。「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｙｅａｓｔ ｌｙｓｉｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ」Ｍａｄｉｓｏｎら；Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１９７４、１３（３）は、ヌクレオチド配列の分離のための固相クロマトグラフィーの使用を開示している。

【０１９６】

液－液クロマトグラフィーは公知の分離法である。「Ｃｏｕｎｔｅｒｃｕｒｒｅｎｔ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ｔｈｅ Ｓｕｐｐｏｒｔ－Ｆｒｅｅ Ｌｉｑｕｉｄ Ｓｔａｔｉｏｎａｒｙ Ｐｈａｓｅ」Ｂｉｌｌａｒｄｅｌｌｏ，Ｂ．；Ｂｅｒｔｈｏｄ，Ａ；Ｗｉｌｓｏｎ&Ｗｉｌｓｏｎ’ｓ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３８；Ｂｅｒｔｈｏｄ，Ａ．編．；Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｂ．Ｖ．：Ａｍｓｔｅｒｄａｍ（２００２）１７７～２００ページは、液－液クロマトグラフィーの有用な概略的説明を提供している。様々な液－液クロマトグラフィー技法が公知である。そのような技法の１つは、液－液向流クロマトグラフィー（本明細書では「ＣＣＣ」と称される）である。別の公知の技法は、遠心分配クロマトグラフィー（本明細書では「ＣＰＣ」と称される）である。

【０１９７】

上に開示した方法およびＷＯ２０１３／０３０２６３に記載されている方法は、例えば鋳型および／または不純物から産物ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを分離するために使用され得る。

【０１９８】

ポリメラーゼ

複数の実施形態において、使用されるポリメラーゼは、ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、またはそれらの組合せであり得る。ポリメラーゼは変異型ポリメラーゼであり得る。ポリメラーゼは操作されたポリメラーゼであり得る。ポリメラーゼは、デオキシリボヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドへの、デオキシリボヌクレオチドのリボヌクレオチドへの、リボヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドへの、および／またはリボヌクレオチドのリボヌクレオチドへの結合を触媒することができる。ポリメラーゼは、鎖置換活性を欠いている可能性がある。ポリメラーゼは、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている可能性がある。５’→３’エキソヌクレアーゼ活性の欠如は、ストッパーの破壊を防止することができる。ポリメラーゼは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有する可能性がある。３’→５’エキソヌクレアーゼ活性は、典型的には、ポリメラーゼが誤って組み込まれたヌクレオチドを除去することを可能にし、それによって正確性の高い合成を保証する。３’→５’エキソヌクレアーゼ活性は、校正能として公知であり得る。ポリメラーゼは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いていてもよい。異なるポリメラーゼ特性は必要に応じて組み合わされてもよい、例えば、ポリメラーゼは、鎖置換活性を欠いていてもよい、および／または５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠いていてもよい、および／または３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有してもよい。例えば、ポリメラーゼは、鎖置換活性を欠いていてもよい、および／または５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠い

ていてもよい、および／または３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いていてもよい。ポリメラーゼとしては、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼを挙げることができる。ポリメラーゼは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ（すなわち、ＤＮＡ鋳型を使用してＤＮＡを合成するポリメラーゼ）であり得る。ポリメラーゼは、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（すなわち、ＤＮＡ鋳型を使用してＲＮＡを合成するポリメラーゼ）であり得る。ＤＮＡポリメラーゼは、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドを結合することができる。ＲＮＡポリメラーゼは、リボヌクレオチドおよび／またはデオキシリボヌクレオチドを結合することができる。ポリメラーゼは、プライマー伸長ポリメラーゼであり得る。ＤＮＡポリメラーゼは、プライマー伸長ポリメラーゼであり得る。ＲＮＡポリメラーゼは、プライマー伸長ポリメラーゼであり得る。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼは、野生型ポリメラーゼであり得る。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼは、変異型ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼであり得る。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼは、操作されたＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼであり得る。ポリメラーゼは、修飾ヌクレオチドを結合することができる可能性がある。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼは、修飾ヌクレオチドを結合することができる可能性がある。ポリメラーゼは、鋳型鎖に沿って少なくとも１つの配列ギャップを埋めることができる。ポリメラーゼは、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオシド三リン酸のプールを使用して伸長することができる。ＤＮＡポリメラーゼは、典型的には、プライマーおよび鋳型を必要とする。例示的なポリメラーゼとしては、野生型ＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａファージＴ７ポリメラーゼ、野生型Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓポリメラーゼ、変異型Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ種（９ｏＮ－７株）ポリメラーゼ、野生型ＥｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａファージＴ４ポリメラーゼ、野生型Ｔｈｅｒｍｕｓ ａｑｕａｔｉｃｕｓポリメラーゼ、および野生型Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｋｏｄａｋａｒｅｎｓポリメラーゼが挙げられる。

【０１９９】

未修飾ヌクレオチドを別の未修飾ヌクレオチドに結合することができるポリメラーゼ、未修飾ヌクレオチドを修飾ヌクレオチドに（すなわち、修飾５’ヌクレオチドを未修飾３’ヌクレオチドに、および／または未修飾５’ヌクレオチドを修飾３’ヌクレオチドに）結合することができるポリメラーゼ、および修飾ヌクレオチドを別の修飾ヌクレオチドに結合することができるポリメラーゼは、本開示の範囲内である。ポリメラーゼは、未修飾ヌクレオチドを別の未修飾ヌクレオチドに結合することができる。各々の未修飾ヌクレオチドは、その後、修飾させることができる。ヌクレオチドの修飾の例は、本明細書に開示され、修飾糖部分、核酸塩基の修飾、骨格の修飾、１つまたは２つ以上のウラシル残基の置換、およびそれらの組合せを含む群から選択される修飾が挙げられる。

【０２００】

加えて、修飾ヌクレオチドを組み込むことができる例示的な操作されたＤＮＡおよびＲＮＡポリメラーゼとしては、「Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅｓ ｆｏｒ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｇｅｎｅｔｉｃｓ」、Ｈｏｕｌｉｈａｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１７、４８；１６８～１７９に開示されているものが挙げられる。

【０２０１】

複数の実施形態において、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリメラーゼは、任意選択でＥ６６４ＫおよびＹ４０９Ｇの変異を含む、Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｇｏｇｏｎａｒｉｕｓ複製型ＤＮＡポリメラーゼのポリメラーゼサムサブドメインに変異を有するポリメラーゼを含め、２’糖修飾を受容するように操作することができる。そのようなポリメラーゼは、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ロックド核酸、もしくは２’－ＯＭｅ ＲＮＡ修飾ヌクレオチドからプライミングされた、シュードウリジン、５－メチル－Ｃ、２’－フルオロ、もしくは２－アジド修飾ＮＴＰ、またはそれらの組合せの包含を実現する。

【０２０２】

複数の実施形態において、２’糖修飾を受容するように操作されたＲＮＡポリメラーゼ

としては、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼが挙げられる。例えば、Ｙ６３９Ｆの変異を含むＴ７　ＲＮＡポリメラーゼは、例えば、２’フルオロピリミジンおよび２’アミノピリミジンの包含を実現することができる。

【０２０３】

複数の実施形態において、２’糖修飾を受容するように操作されているＴａｑポリメラーゼのＳｔｏｆｆｅｌ断片のバリアント（ＳＭ１９）が使用される。例えば、６１４における負に帯電したアミノ酸およびＥ６１５Ｇの変異の導入は、２’糖修飾の包含を実現する。ＳＭ１９は、ポリメラーゼＳＦＭ４－３およびＳＦＭ４－９にさらに進化させることができる。例えば、ＳＦＭ４－３は、完全修飾２’－ＯＭｅ　６０ヌクレオチド配列を転写することができる。

【０２０４】

複数の実施形態において、２’糖修飾を受容するように操作されている海洋シアノファージＳｙｎ５由来の好熱性ＲＮＡポリメラーゼが使用される。

【０２０５】

複数の実施形態において、３’デオキシまたは３’－ＯＭｅヌクレオチドの組込みによって、位置異性体的な２’－５’連結を有するＤＮＡおよびＲＮＡを合成することができる、Ｙ４０９Ｇ、Ｉ５２１Ｌ、Ｆ５４５Ｌ、およびＥ６６４Ｋの変異を含むＴｇｏポリメラーゼが使用される。

【０２０６】

区画化自己複製法は、修飾ヌクレオチドを組み込むようにポリメラーゼを進化させるのに有用である。「Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ｏｆ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｂｙ　ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔａｌｉｚｅｄ　ｓｅｌｆ－ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ」、Ｇｈａｄｅｓｓｙら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．２００１、９８：４５５２～４５５７は、例示的な区画化自己複製法を記載している。

【０２０７】

リガーゼ

複数の実施形態において、リガーゼはＡＴＰ依存性リガーゼであり得る。ＡＴＰ依存性リガーゼは、サイズが３０～１００ｋＤａ未満の範囲である。複数の実施形態において、リガーゼはＮＡＤ依存性リガーゼであり得る。ＮＡＤ依存性酵素は、高度に相同であり、６０～９０ｋＤａ、任意選択で７０～８０ｋＤａの単量体タンパク質である。複数の実施形態において、リガーゼは熱安定性リガーゼであり得る。熱安定性リガーゼは、好熱性細菌に由来し得る。

【０２０８】

複数の実施形態において、リガーゼは鋳型依存性リガーゼであり得る。複数の実施形態において、ライゲーションは鋳型において行われる。複数の実施形態において、セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドをライゲーションすることは、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するために、鋳型においてリガーゼを使用して行われる。複数の実施形態において、リガーゼは二重鎖作用性リガーゼであり得る。二重鎖は、二重鎖ＤＮＡであり得る。二重鎖は、ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド二重鎖であり得る。二重鎖は、二重鎖ＲＮＡであり得る。リガーゼはＤＮＡリガーゼであり得る。リガーゼはＲＮＡリガーゼであり得る。

【０２０９】

複数の実施形態において、リガーゼは、２つのセグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドの結合を触媒することができる。複数の実施形態において、リガーゼは、２つのセグメントオリゴヌクレオチドの結合を触媒することができる。リガーゼは、天然に存在するヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドと、天然に存在するヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドとの結合を触媒することができる。リガーゼは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むあるセグメ

ントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドと、天然に存在するヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドとの結合を触媒することができる。少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドは、結合部の３’末端に位置してもよい。天然に存在するヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドは、結合部の５’末端に位置してもよい。修飾ヌクレオチドは、結合部に位置していても位置していなくてもよい、すなわち、連結ヌクレオチドの一方もしくは両方が修飾ヌクレオチドであるか、またはいずれも修飾ヌクレオチドではない。リガーゼは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドと、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むあるセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドとの結合を触媒することができる。当業者であれば、セグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチド内における少なくとも１つの修飾ヌクレオチドの配置は、ライゲーション効率を高めるように構成することができることを理解するだろう。

【０２１０】

リガーゼは野生型リガーゼであり得る。リガーゼは変異型リガーゼであり得る。リガーゼは操作されたリガーゼであり得る。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡリガーゼは野生型ＤＮＡおよび／またはＲＮＡリガーゼであり得る。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡリガーゼは変異型ＤＮＡおよび／またはＲＮＡリガーゼであり得る。ＤＮＡおよび／またはＲＮＡリガーゼは操作されたＤＮＡおよび／またはＲＮＡリガーゼであり得る。当業者であれば、適切なリガーゼは、ライゲーションを必要とするセグメントポリヌクレオチドおよび／もしくは伸長したセグメントポリヌクレオチド、ならびに／または前記セグメントポリヌクレオチドおよび／もしくは伸長したセグメントポリヌクレオチドにおける修飾の数および／もしくは種類および／もしくは位置に基づいて選択することができることを理解するだろう。

【０２１１】

例示的なリガーゼとしては、野生型ＥｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａファージＴ３リガーゼおよび野生型バクテリオファージＴ４　ＤＮＡリガーゼが挙げられる。

【０２１２】

複数の実施形態において、リガーゼは、例えばビーズに固定することができる。

【０２１３】

ポリヌクレオチドのプールまたはポリヌクレオチド

本開示の方法の「ポリヌクレオチドのプール」を作出するために使用されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、産物配列の少なくとも２つのセグメントを含み得る。本開示の方法のプールを作出するために使用されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、産物配列の少なくとも２つの異なるセグメントを含み得る。産物配列の少なくとも２つのセグメントは、配列が異なっていてもよい。少なくとも２つのセグメントは各々、産物配列の異なる領域に対応する。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含み得る。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールは、各々のセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含み得る。

【０２１４】

したがって、プールは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの不均一なセットである。少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、配列が様々であり、標的配列より短くてもよく、標的配列と同じ配列を有しなくてもよい。

【０２１５】

少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、酵素合成

、化学合成、任意選択で固体支持合成もしくは液相合成、またはそれらの組合せによって作製することができる。酵素合成は、一本鎖リガーゼ、トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ、またはそれらの組合せを使用して実施することができる。

【０２１６】

他の例において、１つもしくは２つ以上または全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、化学合成を使用して作製することができる。他の例において、１つもしくは２つ以上または全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、化学合成を、酵素合成、例えば、ポリメラーゼ、一本鎖リガーゼもしくはトランスフェラーゼ、またはそれらの組合せの使用と組み合わせて使用して作製することができる。他の例において、１つもしくは２つ以上または全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、化学合成、一本鎖リガーゼおよび／またはトランスフェラーゼを、１つまたは２つ以上のセグメントオリゴヌクレオチドを作製するポリメラーゼの使用と組み合わせて使用して作製することができる。他の例において、１つもしくは２つ以上または全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、一本鎖リガーゼ、トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ、またはそれらの組合せを、完全に酵素的な合成法において使用して作製することができる。簡略化された方法において、一本鎖リガーゼおよびポリメラーゼは、２つ以上または全てのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのプールの作製のための完全に酵素的な方法において使用することができる。

【０２１７】

オリゴヌクレオチド作製の一例において、オリゴヌクレオチドのプールは、化学合成および／または酵素合成（例えば、一本鎖リガーゼ、トランスフェラーゼ、および／またはポリメラーゼを使用する）を使用して作製された、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドと、化学合成および／または酵素合成（例えば、一本鎖リガーゼ、トランスフェラーゼ、および／またはポリメラーゼを使用する）を使用して作製された、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む異なる３’セグメントオリゴヌクレオチドとを含むことができる。

【０２１８】

セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、プライマーとして作用してもよい。セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ストッパーとして作用してもよい。セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、プライマーおよびストッパーとして作用してもよい。セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの両側に配列ギャップが存在する場合、プライマーおよびストッパーとして作用してもよい。

【０２１９】

一実施形態において、本開示の方法のいずれかにおいて、少なくとも３ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～５０ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～４０ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～３０ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～２５ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～２０ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。いくつかの実施形態において、５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドは、少なくとも５ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０ヌクレオチドを含み、任意選択で、ヌクレオチドのうちの１つまたは２つ以上は修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、５’プライマーセグメントオ

リゴヌクレオチドにおける修飾ヌクレオチドは、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－Ｍｅ、２’－Ｆ、２’ＯＭｅ、または２’ＭＯＥである。

【０２２０】

一実施形態において、少なくとも３ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～５０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～４０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～３０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、５～３０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。一実施形態において、３～２０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが提供され得る。いくつかの実施形態において、３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドは、少なくとも５ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０ヌクレオチドを含み、任意選択で、ヌクレオチドのうちの１つまたは２つ以上は修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドにおける修飾ヌクレオチドは、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－Ｍｅ、２’－Ｆ、２’ＯＭｅ、または２’ＭＯＥである。

【０２２１】

一実施形態において、３～５０ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが、３～５０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドと一緒に提供され得る。一実施形態において、３～２５ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが、３～３０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドと一緒に提供され得る。一実施形態において、５～２５ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが、５～３０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドと一緒に提供され得る。一実施形態において、５～２０ヌクレオチドを含む５’プライマーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドが、５～３０ヌクレオチドを含む３’ストッパーセグメントオリゴヌクレオチドであるセグメントオリゴヌクレオチドと一緒に提供され得る。

【０２２２】

セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの酵素的作製

１）ポリメラーゼ

ポリメラーゼは、短いオリゴヌクレオチド（プライマー）の末端ヌクレオチドの３’水酸基の、鋳型依存的な様式で付加されるヌクレオチドの５’リン酸への連結を触媒することができる。付加されるヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチド三リン酸のプールにおけるヌクレオシド三リン酸）は、修飾されていなくても、すなわち天然に存在しても、本明細書に記載されるように修飾されていてもよい。別個の鋳型およびプライマーが使用されても、自己プライミング鋳型が使用されてもよい。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、後に修飾されても、さらに修飾されてもよい。

【０２２３】

２）一本鎖リガーゼ、例えばＲＮＡリガーゼ

一本鎖リガーゼは、例えば、３’，５’ヌクレオチドビスリン酸、３’，５’ヌクレオチドチオリン酸（例えば、３’，５’ビスチオリン酸または３’－リン酸－５’－チオリン酸また

は３’－チオリン酸－５’－リン酸）、または３’，５’ヌクレオチドジチオリン酸（例えば、３’，５’ビスジチオリン酸または３’－リン酸－５’－ジチオリン酸または３’－ジチオリン酸－５’－リン酸）の、短いオリゴヌクレオチド（プライマー）の３’－ＯＨへの鋳型非依存的な様式でのＡＴＰ駆動付加を触媒する。当業者であれば、追加のリン酸（またはチオリン酸）部分が必要とされないにもかかわらず、糖部分の３’位における二リン酸（またはジチオリン酸）または三リン酸（または１個もしくは２個以上の酸素原子が硫黄に置換されている他のオリゴリン酸）もまた使用されてもよいことを理解するだろう。上述の個々のヌクレオチドの代わりに、等しく修飾されたジヌクレオチド、トリヌクレオチド、またはテトラヌクレオチドが使用されてもよい。オリゴヌクレオチドプライマーは、通常、最小限の３ヌクレオチド長である。この付加反応の結果として得られるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、開始ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドよりも１ヌクレオチド長い（か、またはジヌクレオチド、トリヌクレオチド、もしくはテトラヌクレオチドが使用される場合は、それぞれ、開始ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドよりも２、３、もしくは４ヌクレオチド長い）。導入されるヌクレオチドは、修飾されていなくても、すなわち天然に存在しても、本明細書に記載されるように修飾されていてもよい。ここで、新たな３’位はリン酸化されている。その後のヌクレオチドを付加するために、成長ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの３’リン酸は、加水分解によって除去されて３’ＯＨを生成する。この加水分解は、典型的には、ホスファターゼ酵素を使用して行われる。

【０２２４】

例えば、一本鎖リガーゼは、セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製する方法において使用することができ、ここで、一本鎖リガーゼを使用する方法は、２ステップ反応、すなわち付加および脱保護を含むセグメント合成のための３’伸長を含む。例示的な付加ステップは、ヌクレオチド－３’，５’－ビス（チオ）リン酸の、一本鎖核酸プライマーの３’ＯＨへのＡＴＰ依存性ライゲーションと、その後の、ホスファターゼによる一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドにおける３’リン酸の脱保護とを伴う。別の例において、一本鎖リガーゼは、セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製する方法において使用することができ、ここで、方法は、セグメント配列を作製するための例示的な３’伸長（付加および脱保護）と、それに続く、セグメントを放出するための部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、イノシンの１つ後ろの塩基、すなわちイノシンの３’側の第２のホスホジエステル結合を切断するエンドヌクレアーゼＶ）を使用した鎖切断とを含む。

【０２２５】

３）トランスフェラーゼ

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）酵素は、例えば３’－Ｏ－アジドメチル、３’－アミノキシまたは３’－Ｏ－アリル基によって保護されている３’保護ヌクレオチド三リン酸の、短いオリゴヌクレオチド（プライマー）の３’ＯＨへの鋳型非依存的な様式での付加を触媒する。このオリゴヌクレオチドプライマーは、通常、最小限の３ヌクレオチド長である。導入されるヌクレオチドは、修飾されていなくても、すなわち天然に存在しても、本明細書に記載されるように修飾されていてもよい。

【０２２６】

好適な方法は、例えば、ＥＰ２７９６５５２、ＵＳ８８０８９８９、ＷＯ１６１２８７３１Ａ１、およびＷＯ１６１３９４７７Ａ１に記載されている。

【０２２７】

セグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを作製するための上に記載した方法において使用されるプライマーオリゴヌクレオチドは、

（１）所望される場合、セグメントポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドの一部として保持することができるか、または

（２）産物ポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドから切断されて、所望の産物の分離を可能にし、さらなるセグメントポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを

作るための再利用の可能性を与えることができる。プライマーのセグメントポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドからの切断は、切断が効果的かつ正確となるように、配列特異的ヌクレアーゼならびにプライマーおよびセグメントの適切な設計を使用して実施することができる。

【０２２８】

本発明は以下の条項によって例示される：

１．少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する一本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、

ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、

ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、

ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、

ｄ）ヌクレオチドのプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオチドのプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、

ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するステップ、

ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、ならびに、

ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ

を含む、方法。

【０２２９】

２．少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドが、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を含む、条項１に記載の方法。

【０２３０】

３．少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドが、５’リン酸、５’ホスホロチオエート、５’ホスホロジチオエート、または５’メチルホスホネートを含む、条項１または２に記載の方法。

【０２３１】

４．ステップ（ｄ）におけるヌクレオチドのプールが、（ｉ）天然ヌクレオチド、（ｉｉ）少なくとも１つの修飾ヌクレオチド、または（ｉｉｉ）複数の修飾ヌクレオチドを含む、条項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【０２３２】

５．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、糖部分の修飾、核酸塩基の修飾、および／または骨格の修飾を含む、条項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【０２３３】

６．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、糖部分の２’位における修飾、二環式糖もしくは４’－ＣＨ（ＣＨ３）－Ｏ－２’基、またはそれらの組合せを含む、条項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【０２３４】

７．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、２’－Ｆ、２’－ＯＭｅ、２’－ＭＯＥ、または２’－アミノを含む、条項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【０２３５】

８．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、修飾シトシン、５－メチルシトシン、５－

メチルピリミジン、７－デアザグアノシン、または脱塩基ヌクレオチドを含む、条項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【０２３６】

９．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、またはホスホロジチオエートを含む、条項１～８のいずれか一項に記載の方法。

【０２３７】

１０．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシ－ウラシル、１－エチル－シュードウラシル、シュードウラシル、１－メチルシュードウラシル、５－メチル－シチジン、５－メチル－シトシン、Ｎ６－メチルアデノシン、または７－メチルグアノシンを含む、条項１～９のいずれか一項に記載の方法。

【０２３８】

１１．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが１－メチル－シュードウリジンを含む、条項１～１０のいずれか一項に記載の方法。

【０２３９】

１２．少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、ＰＭＯ、ＬＮＡ、ｃ－Ｅｔ、ＰＮＡ、ＢＮＡ、またはＬ－リボ核酸を含む、条項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【０２４０】

１３．ステップ（ｅ）におけるリガーゼが、各々のセグメントポリヌクレオチドまたは伸長したセグメントポリヌクレオチドの３’および／または５’末端を、各々の隣接するセグメントポリヌクレオチドまたは隣接する伸長したセグメントポリヌクレオチドにライゲーションして、産物ポリヌクレオチド鎖を形成する、条項１～１２のいずれか一項に記載の方法。

【０２４１】

１４．ステップ（ｅ）におけるリガーゼが、ＲＮＡをＲＮＡに、ＤＮＡをＤＮＡに、ＲＮＡをＤＮＡに、および／またはＤＮＡをＲＮＡにライゲーションすることができる、条項１～１３のいずれか一項に記載の方法。

【０２４２】

１５．ステップ（ｅ）におけるリガーゼがＲＮＡおよび／またはＤＮＡリガーゼである、条項１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【０２４３】

１６．ステップ（ｄ）におけるポリメラーゼが、鎖置換活性を欠いている、条項１～１５のいずれか一項に記載の方法。

【０２４４】

１７．ステップ（ｄ）におけるポリメラーゼが、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている、条項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

【０２４５】

１８．ステップ（ｄ）におけるポリメラーゼが、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有するかまたは３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いている、条項１～１７のいずれか一項に記載の方法。

【０２４６】

１９．ポリメラーゼがＤＮＡポリメラーゼまたはＲＮＡポリメラーゼである、条項１～１８のいずれか一項に記載の方法。

【０２４７】

２０．ＤＮＡポリメラーゼまたはＲＮＡポリメラーゼが、操作されたまたは変異型ＤＮＡポリメラーゼまたはＲＮＡポリメラーゼである、条項１～１９のいずれか一項に記載の方法。

【０２４８】

２１．ステップａ）～ｇ）のうちの２つ以上が同時に行われ、任意選択で、ステップｄ）およびｅ）が同時に行われる、条項１～２０のいずれか一項に記載の方法。

【０２４９】
２２．ステップａ）～ｇ）のうちの２つ以上が逐次に行われ、任意選択で、ステップｄ）およびｅ）が逐次に行われる、条項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【０２５０】
２３．鋳型が、それが一本鎖ポリヌクレオチド産物から分離されることを可能にする特性を有する、条項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【０２５１】
２４．鋳型が一本鎖ポリヌクレオチド産物から分離されることを可能にする特性が、鋳型が支持材料に付着することである、条項２３に記載の方法。
【０２５２】
２５．支持材料が可溶性支持材料であり、任意選択で、支持材料が、ポリエチレングリコール、可溶性有機ポリマー、ＤＮＡ、タンパク質、デンドリマー、多糖、オリゴ糖、および炭水化物からなる群から選択される、条項２４に記載の方法。
【０２５３】
２６．支持材料が不溶性支持材料であり、任意選択で、支持材料が、ガラスビーズ、ポリマービーズ、線維性支持体、膜、ストレプトアビジンコーティングビーズ、セルロース、および反応壁からなる群から選択され、任意選択で、反応壁が反応容器の一部である、条項２４に記載の方法。
【０２５４】
２７．鋳型の複数の反復コピーが、単一の付着点を介して支持材料に連続的に付着する、条項２４～２６のいずれか一項に記載の方法。
【０２５５】
２８．鋳型が産物から分離されることを可能にする特性が鋳型の分子量である、条項２３～２７のいずれか一項に記載の方法。
【０２５６】
２９．方法が、鋳型を再利用するステップｈ）をさらに含む、条項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【０２５７】
３０．方法が、再利用された鋳型を用いてステップａ）～ｇ）またはステップａ）～ｈ）を繰り返すステップｉ）をさらに含む、条項２９に記載の方法。
【０２５８】
３１．方法が半連続的または連続的である、条項１～３０のいずれか一項に記載の方法。
【０２５９】
３２．鋳型ポリヌクレオチドが、一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列からなる、条項１～３１のいずれか一項に記載の方法。
【０２６０】
３３．一本鎖ポリヌクレオチド産物が、３～３０ヌクレオチド長、任意選択で、１０～３０ヌクレオチド長、３～１５ヌクレオチド長、１５～２０ヌクレオチド長、２０～２５ヌクレオチド長、または２０～３０ヌクレオチド長である、条項１～３２のいずれか一項に記載の方法。
【０２６１】
３４．一本鎖ポリヌクレオチド産物が２０ヌクレオチド長であり、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドが、
（ｉ）７ヌクレオチド長である５’セグメントと７ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｉ）６ヌクレオチド長である５’セグメントと６ヌクレオチド長である３’セグメント、
（ｉｉｉ）５ヌクレオチド長である５’セグメントと５ヌクレオチド長である３’セグメント、

（ｉｖ）４ヌクレオチド長である５’セグメントと４ヌクレオチド長である３’セグメント、または
（ｖ）３ヌクレオチド長である５’セグメントと３ヌクレオチド長である３’セグメント
を含む、条項１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【０２６２】
３５．一本鎖ポリヌクレオチド産物がギャップマーである、条項１～３４のいずれか一項に記載の方法。
【０２６３】
３６．一本鎖ポリヌクレオチド産物が、３０～２０，０００ヌクレオチド長、任意選択で、３０～１０，０００ヌクレオチド長、３０～５，０００ヌクレオチド長、３０～１，０００ヌクレオチド長、３０～５００ヌクレオチド長、３０～４００ヌクレオチド長、３０～３００ヌクレオチド長、３０～２００ヌクレオチド長、３０～１００ヌクレオチド長、３０～５０ヌクレオチド長、または３０～４０ヌクレオチド長である、条項１～３２のいずれか一項に記載の方法。
【０２６４】
３７．一本鎖ポリヌクレオチド産物が、ＤＮＡポリヌクレオチド産物、ＲＮＡポリヌクレオチド産物、またはＤＮＡおよびＲＮＡハイブリッドポリヌクレオチド産物である、条項１～３６のいずれか一項に記載の方法。
【０２６５】
３８．ＲＮＡポリヌクレオチド産物がｍＲＮＡである、条項３７に記載の方法。
【０２６６】
３９．産物が、グラム、キログラム、もしくはそれよりも大きな規模で作製される、および／または方法が少なくとも１Ｌの反応容量において実行される、条項１～３８のいずれか一項に記載の方法。
【０２６７】
４０．結果として得られる一本鎖ポリヌクレオチド産物が少なくとも８０％純粋であり、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物が少なくとも９０％純粋であり、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物が少なくとも９５％純粋であり、任意選択で、一本鎖ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド産物が少なくとも９８％純粋である、条項１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【０２６８】
４１．二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、条項１～４０のいずれか一項に記載の方法によって作製された２つの相補的な一本鎖ポリヌクレオチドが、アニーリングを可能にする条件下で混合される、方法。
【０２６９】
４２．少なくとも１つの修飾ヌクレオチド残基を有する二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するための方法であって、
ａ）一本鎖ポリヌクレオチド産物に相補的な配列を含む鋳型ポリヌクレオチドを用意するステップ、
ｂ）少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールを用意するステップ、
ｃ）ステップ（ａ）の鋳型ポリヌクレオチドと、ステップ（ｂ）のポリヌクレオチドのプールとを、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドへのアニーリングを可能にする条件下で接触させるステップであって、少なくとも２つのセグメントポリヌクレオチドの間に少なくとも１つの配列ギャップが形成される、ステップ、
ｄ）ヌクレオチドのプールおよびポリメラーゼを用意し、少なくとも１つのセグメントポリヌクレオチドを、ヌクレオチドのプールおよびポリメラーゼを使用して伸長させて、少なくとも１つの配列ギャップを埋めるステップ、
ｅ）セグメントポリヌクレオチドおよび／または伸長したセグメントポリヌクレオチドを、リガーゼを使用してライゲーションして、一本鎖ポリヌクレオチド産物を形成するス

テップ、
ｆ）任意選択で、条件を変更して、アニーリングした鋳型および任意の不純物を変性させ、不純物を分離するステップ、
ｇ）条件を変更して、アニーリングした鋳型および一本鎖ポリヌクレオチド産物を変性させ、一本鎖ポリヌクレオチド産物を分離するステップ、ならびに、
ｈ）一本鎖ポリヌクレオチド産物をステップａ）における鋳型として使用し、ステップａ）～ｅ）を繰り返して、二本鎖ポリヌクレオチド産物を作製するステップ
を含む、方法。
【０２７０】
４３．二本鎖ポリヌクレオチド産物が精製される、条項４２に記載の方法。
【０２７１】
４４．二本鎖ポリヌクレオチド産物がｓｉＲＮＡである、条項４１～４３のいずれか一項に記載の方法。
【０２７２】
４５．ポリヌクレオチド産物が治療用ポリヌクレオチド産物である、条項１～４４のいずれか一項に記載の方法。
【０２７３】
４６．ＲＮＡポリヌクレオチド産物が、１つまたは２つ以上の免疫原をコードする配列を含む、条項３７または３８に記載の方法。
【０２７４】
４７．免疫原が、呼吸器多核体ウイルス（ＲＳＶ）免疫原、エプスタイン－バーウイルス糖タンパク質免疫原、サイトメガロウイルス糖タンパク質免疫原、コロナウイルススパイクポリペプチド免疫原、インフルエンザウイルス免疫原、水痘帯状疱疹ウイルス糖タンパク質免疫原、ヒトパピローマウイルス１６（ＨＰＶ１６）Ｅ６免疫原、ＨＰＶ１６Ｅ７免疫原、またはフラビウイルス免疫原から選択される、条項４６に記載の方法。
【０２７５】
４８．免疫原が、コロナウイルススパイクタンパク質、インフルエンザ抗原、およびｆタンパク質またはｇタンパク質などのＲＳＶ抗原から選択される、条項４６または４７に記載の方法。
【実施例】
【０２７６】
略記
ＨＰＬＣ　高速液体クロマトグラフィー
ＬＣＭＳ　液体クロマトグラフィー質量分析
ＳＥＣ　サイズ排除クロマトグラフィー
ＴＥＡＡ　酢酸トリエチルアンモニウム
ＰＯ　ホスホジエステル
ＰＳ　ホスホロチオエート
＊　ホスホロチオエート
／３Ｐｈｏｓ／　３’リン酸基
／５Ｐｈｏｓ／　５’リン酸基
／Ｍｅ－ｄＣ／　５－メチルシトシン
／５Ｂｉｏｓｇ／　５’ビオチン
ＥＤＴＡ　エチレンジアミン四酢酸
ｄＡＴＰ　デオキシアデノシン三リン酸
ｄＣＴＰ　デオキシシチジン三リン酸
ｄＧＴＰ　デオキシグアノシン三リン酸
ｄＴＴＰ　デオキシチミジン三リン酸
ｄＡＴＰαＳ　２’－デオキシアデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸
ｄＣＴＰαＳ　２’－デオキシシチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸

ｄＧＴＰαＳ　２’－デオキシグアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸
ｄＴＴＰαＳ　２’－デオキシチミジン－５’－（α－チオ）－三リン酸
ＡＴＰ　アデノシン三リン酸
$MgCl_2$　塩化マグネシウム
Ｔｒｉｓ　２－アミノ－２－（ヒドロキシメチル）プロパン－１，３－ジオール
ＴＢｕＡＡ　酢酸トリブチルアンモニウム
２’ＭＯＥ　２’－Ｏ－メトキシ－エチル
２’ＯＭｅ　２’－Ｏ－メチル
２’Ｆ　２’フルオロ
ＬＮＡ　ロックド核酸
ＣＴＰ　シチジン三リン酸
ＧＴＰ　グアノシン三リン酸
ＵＴＰ　ウリジン三リン酸
ｍＡ　２’－Ｏ－メチルアデノシン
ｍＣ　２’－Ｏ－メチルシチジン
ｍＧ　２’－Ｏ－メチルグアノシン
ｍＵ　２’－Ｏ－メチルウリジン
ｒＡ　２’－ヒドロキシルアデノシン
ｒＣ　２’－ヒドロキシルシチジン
ｒＧ　２’－ヒドロキシルグアノシン
ｒＵ　２’－ヒドロキシルアデノシン
ｆＡ　２’フルオロアデノシン
ｆＣ　２’フルオロシチジン
ｆＧ　２’フルオログアノシン
ｆＵ　２’フルオロウリジン
ｅＡ　２’－Ｏ－メトキシ－エチルアデノシン
ｅＣ　２’－Ｏ－メトキシ－エチル５－メチルシトシン
ｅＧ　２’－Ｏ－メトキシ－エチルグアノシン
ｅＴ　２’－Ｏ－メトキシ－エチルチミジン
ΨＴＰ　シュードウリジン－５’－三リン酸
ｍ１ΨＴＰ　Ｎ１－メチルシュードウリジン－５’－三リン酸
Ψ　シュードウリジン
ｍ１Ψ　Ｎ１－メチルシュードウリジン
ＡＴＰαＳ　アデノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸
ＣＴＰαＳ　シチジン－５’－（α－チオ）－三リン酸
ＧＴＰαＳ　グアノシン－５’－（α－チオ）－三リン酸
ＵＴＰαＳ　ウリジン－（α－チオ）－三リン酸

【０２７７】

実施例１：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２７ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド合成

目的：未修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を使用した、未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の一般的適用性を示すこと。

【０２７８】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号３９～４３）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０２７９】

反応を表１に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで

、５０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して１０ｍＭ　ＥＤＴＡに交換した。次いで、反応を、配列番号１１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。図３ａは、反応出発物質のクロマトグラムを示す。図３ｂは、産物形成反応のクロマトグラムを示す。

【０２８０】

【表１】

表 1.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 39～44**		1.0
鋳型: (2'H)– **配列番号 1**	0.04	12.5
5'プライマー (2'H) – **配列番号 2**	0.04	2.0
3'ブロック 1 (2'H) – **配列番号 3**	0.04	1.5
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTP	0.5	2.5
dTTP	0.5	2.5
Tris (pH 7.5)	50	2.5
$MgCl_2$	10	0.5
水		20.0
最終反応容量（μL）		50

【０２８１】

反応の結果：

【０２８２】

【表２】

表 2.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Escherichia ファージ T7 ポリメラーゼ – 'Pol1'	39	17.01
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ – 'Pol2'	40	54.42
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ – 'Pol3'	41	67.75
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	81.21
野生型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'Pol5'	43	56.57

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、5'プライマー**配列番号 2** + **配列番号 7～38** のピークの、**配列番号 11** のピークに対する面積%

【０２８３】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、ＷａｔｅｒｓＸＢｒｉｄｇｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　ＢＥＨ　Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０２８４】

緩衝液Ａ：１００ｍＭ　ＴＥＡＡ、ｐＨ７
緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％$Ｈ_{2}Ｏ$中１００ｍＭ　ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０２８５】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼの遺伝子的に多様なセットは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施することが示される。高い産物形成（面積で８０％超）および低い（面積で２０％未満）不完全な反応または副産物形成を伴う上の例。

【０２８６】

実施例２：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２７ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドのワンポット合成および合成４２ｂｐ産物に対するライゲーション

目的：未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメントおよび未修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を用いたギャップ充填およびライゲーションを実証して、本技術の一般的適用性を示すこと。

【０２８７】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号３９～４３）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０２８８】

反応を表３に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、５０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して１０ｍＭ　ＥＤＴＡに交換した。次いで、反応を、配列番号３８の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０２８９】

【表３】

表 3.

	反応における最終濃度 (mM)	1 反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 39～44**		1.0
リガーゼ – **配列番号 45**		2.5
鋳型: (2'H)– **配列番号 1**	0.04	12.5
5'プライマー (2'H) – **配列番号 2**	0.04	2.0
3'ブロック 1 (2'H) – **配列番号 3**	0.04	1.5
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTP	0.5	2.5
dTTP	0.5	2.5
ATP	1	5
Tris (pH 7.5)	50	2.5
$MgCl_2$	10	0.5
水		12.5
最終反応容量（μL）		50

【０２９０】

反応の結果：

【０２９１】

【表４】

表 4.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Escherichia ファージ T7 ポリメラーゼ －'Pol1'	39	5.18
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ －'Pol2'	40	81.22
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ －'Pol3'	41	88.71
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ －'Pol4'	42	95.16
野生型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －'Pol5'	43	41.19

*産物への変換率（%）－ 波長 260nm における、**配列番号 2 + 配列番号 7～38** のピークの、**配列番号 38** のピークに対する面積%

【０２９２】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、ＷａｔｅｒｓＸＢｒｉｄｇｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　ＢＥＨ　Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０２９３】

緩衝液Ａ：１００ｍＭ　ＴＥＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％H_2O中１００ｍＭ　ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０２９４】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼの遺伝子的に多様なセットは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施することが示され、リガーゼは、全長オリゴヌクレオチドをもたらすタンデム反応を実施することができる。高い産物形成（面積で９５％超）および低い（面積で５％未満）不完全な反応または副産物形成を伴う上の例。

【０２９５】

実施例３：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド合成

目的：未修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）と未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ストッパー／ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる糖基（２’ＯＨ）への適用を示すこと。

【０２９６】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０、４１および４２）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０２９７】

反応を表５に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、２５μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して１０ｍＭ　ＥＤＴＡに交換した。次いで、反応を、配列番号１２の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０２９８】

【表５】

表 5.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ － 配列番号 40、41 及び 42		1.3
鋳型: (2'H)- 配列番号 1	0.04	6.3
5'プライマー (2'OH) - 配列番号 2	0.04	1.0
3'ブロック 2 (2'H) - 配列番号 4	0.04	1.0
dATP	0.5	1.3
dCTP	0.5	1.3
dGTP	0.5	1.3
dTTP	0.5	1.3
Tris (pH 7.5)	50	1.3
$MgCl_2$	10	0.2
水		9.0
最終反応容量(μL)		25

【０２９９】

反応の結果：

【０３００】

【表６】

表 6.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ － 'Pol2'	40	24.44
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ － 'Pol4'	41	8.20
野生型 Thermococcus kodakarens ポリメラーゼ － 'Pol6'	42	11.34

*産物への変換率（%）－ 波長 260nm における、配列番号 2 + 配列番号 7～38 のピークの、配列番号 12 のピークに対する面積%

【０３０１】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０３０２】

緩衝液Ａ：１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％H_2O中１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０３０３】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２’－ＯＨ糖修飾５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。面積で２４％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０３０４】

実施例４：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌク

レオチドプライマーの１７ｂｐの２’Ｈ５－メチルシトシン塩基オリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による１５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド合成

目的：未修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を使用した、１つの修飾オリゴヌクレオチドセグメントと１つの未修飾オリゴヌクレオチドセグメントとの間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる塩基修飾への適用を示すこと。

【０３０５】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０、４２および４４）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３０６】

反応を表７に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、２５μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して１０ｍＭ　ＥＤＴＡに交換した。次いで、反応を、配列番号２１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３０７】

【表７】

表 7.

	反応における最終濃度 (mM)	1 反応当たりの容量 (μL)
ポリメラーゼ – 配列番号 40、42 及び 44		1.3
鋳型: (2'H)– 配列番号 1	0.04	6.3
5'プライマー (2'H) – 配列番号 2	0.04	1.0
3'ブロック 3 (2'H) – 配列番号 5	0.04	1.0
dATP	0.5	1.3
dCTP	0.5	1.3
dGTP	0.5	1.3
dTTP	0.5	1.3
Tris (pH 7.5)	50	1.3
$MgCl_2$	10	0.2
水		9.0
最終反応容量 (μL)		25

【０３０８】

反応の結果：

【０３０９】

【表８】

表 8.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ －'Pol2'	40	59.60
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ －'Pol4'	42	76.61
野生型 Thermococcus kodakarens ポリメラーゼ －'Pol6'	44	79.10

*産物への変換率（%）－ 波長 260nm における、配列番号 2 + 配列番号 7～38 のピークの、配列番号 21 のピークに対する面積%

【０３１０】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０３１１】

緩衝液Ａ：１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％H_2O中１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０３１２】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、少なくとも塩基修飾が隣接オリゴヌクレオチドに含有されている２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。面積で７９％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０３１３】

実施例５：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｈ完全ＰＳ修飾オリゴヌクレオチド合成

目的：修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を用いた、未修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる骨格修飾への適用を示すこと。

【０３１４】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０、４１および４２）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３１５】

反応を表９に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、５μＬの５００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号１２の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３１６】

【表９】

表 9.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – 配列番号 40、41 及び 42		1.0
鋳型: (2'H)– 配列番号 1	0.04	12.5
5'プライマー (2'H) – 配列番号 2	0.04	1.8
3'ブロック 2 (2'H) – 配列番号 4	0.04	1.9
dATPαS	0.5	2.5
dCTPαS	0.5	2.5
dGTPαS	0.5	2.5
dTTPαS	0.5	2.5
Tris (pH 7.5)	50	2.5
$MgCl_2$	10	0.5
水		19.8
最終反応容量(μL)		50

【０３１７】

反応の結果：

【０３１８】

【表１０】

表 10.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ – 'Pol2'	40	8.25
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ – 'Pol3'	41	30.54
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	33.58

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、配列番号 2 + 配列番号 7～38 のピークの、配列番号 12 のピークに対する面積%

【０３１９】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０３２０】

緩衝液Ａ：１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％Ｈ２Ｏ中１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０３２１】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の骨格修飾塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。完全にホスホロチオエート修飾された骨格を合成することによるギャップの充填。面積で３３％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０３２２】

実施例６：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’ＨデオキシグアノシンＰＳ修飾オリゴヌクレオチド合成

目的：修飾デオキシグアノシン三リン酸を使用するが、未修飾デオキシアデノシン三リン酸、未修飾デオキシシチジン三リン酸、および未修飾デオキシチミジン三リン酸を使用しない、未修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られるモジュール式骨格修飾への適用を示すこと。

【０３２３】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０、４１および４２）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３２４】

反応を表１１に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、５μＬの５００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号１２の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３２５】

【表１１】

表 11.

	反応における最終濃度（mM）	1 反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – 配列番号 40、41 及び 42		1.0
鋳型: (2'H)– 配列番号 1	0.04	12.5
5'プライマー (2'H) – 配列番号 2	0.04	1.8
3'ブロック 2 (2'H) – 配列番号 4	0.04	1.9
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTPαS	0.5	2.5
dTTP	0.5	2.5
Tris (pH 7.5)	50	2.5
$MgCl_2$	10	0.5
水		19.8
最終反応容量(μL)		50

【０３２６】

反応の結果：

【０３２７】

【表１２】

表 12.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率 (%)＊
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ – 'Pol2'	40	59.39
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ – 'Pol3'	41	43.07
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	89.77

*産物への変換率 (%) – 波長 260nm における、配列番号 2 + 配列番号 7～38 のピークの、配列番号 12 のピークに対する面積%

【０３２８】
ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０３２９】
緩衝液Ａ：１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７
緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％Ｈ２Ｏ中１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０３３０】
結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の特定の骨格修飾塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。所望の塩基間のホスホロチオエート修飾骨格連結を合成することによるギャップの充填。面積で８９％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０３３１】
実施例７：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｈデオキシチミジン ＰＳ 修飾オリゴヌクレオチド合成
目的：修飾デオキシチミジン三リン酸を使用するが、未修飾デオキシアデノシン三リン酸、未修飾デオキシシチジン三リン酸、および未修飾デオキシグアノシン三リン酸を使用しない、未修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られるモジュール式骨格修飾への適用を示すこと。

【０３３２】
オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０、４１および４２）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３３３】
反応を表１３に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、５μＬの５００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号１２の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３３４】

【表１３】

表 13.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – 配列番号 40、41 及び 42		1.0
鋳型: (2'H)– 配列番号 1	0.04	12.5
5'プライマー (2'H) – 配列番号 2	0.04	1.8
3'ブロック 2 (2'H) – 配列番号 4	0.04	1.9
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTP	0.5	2.5
dTTPαS	0.5	2.5
Tris (pH 7.5)	50	2.5
$MgCl_2$	10	0.5
水		19.8
最終反応容量(μL)		50

【０３３５】

反応の結果：

【０３３６】

【表１４】

表 14.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ – 'Pol2'	40	53.39
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ – 'Pol3'	41	29.36
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	78.44

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、配列番号 2 + 配列番号 7～38 のピークの、配列番号 12 のピークに対する面積%

【０３３７】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、ＷａｔｅｒｓＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。

【０３３８】

緩衝液Ａ：１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２５％アセトニトリル／７５％Ｈ２Ｏ中１００ｍＭ ＴＥＡＡ、ｐＨ７

【０３３９】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の特定の骨格修飾塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。所望の塩基間のホスホロチオエート修飾骨格連結を合成することによるギャップの充填。面積で８９％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０３４０】

実施例８：４２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型オリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの１７ｂｐの２’Ｈ５－メチルシトシン塩基オリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による１５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドのワンポット合成および合成４２ｂｐ産物に対するライゲーション

目的：１つの修飾オリゴヌクレオチドセグメントおよび１つの未修飾オリゴヌクレオチドセグメントおよび未修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を用いたギャップ充填およびライゲーションを実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる塩基修飾への適用を示すこと。

【０３４１】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０、４２および４４）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３４２】

反応を表１５に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で２時間インキュベートした。次いで、２５μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して１０ｍＭ　ＥＤＴＡに交換した。次いで、反応を、配列番号３８の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３４３】

【表１５】

表 15.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – 配列番号 40、42 及び 44		1.3
リガーゼ – 配列番号 45		0.5
鋳型: (2'H)– 配列番号 1	0.04	6.3
5'プライマー (2'H) – 配列番号 2	0.04	1.0
3'ブロック 3 (2'H) – 配列番号 5	0.04	1.0
dATP	0.5	1.3
dCTP	0.5	1.3
dGTP	0.5	1.3
dTTP	0.5	1.3
ATP	1	2.5
Tris (pH 7.5)	50	1.3
$MgCl_2$	10	0.2
水		6.0
最終反応容量(μL)		25

【０３４４】

反応の結果：

【０３４５】

【表１６】

表 16.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率 (%)＊
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ – 'Pol2'	40	60.77
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	81.33
野生型 Thermococcus kodakarens ポリメラーゼ – 'Pol6'	44	79.90

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、配列番号 2 + 配列番号 5 + 配列番号 7～38 のピークの、配列番号 38 のピークに対する面積%

【０３４６】
ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、３５～７１％の緩衝液Ｂの勾配を１８分にわたってかけた後、７分かけて９５％の緩衝液Ｂまで増加させた。
【０３４７】
結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、少なくとも１つの塩基修飾が隣接オリゴヌクレオチドのうちの一方に含有されている２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。また、リガーゼは、合成された断片から全長オリゴヌクレオチドをもたらすタンデムライゲーション反応を実施することができるという概念実証。面積で８１％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼおよびリガーゼ。
【０３４８】
実施例９：４５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロック２’Ｈとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｆ修飾オリゴヌクレオチドのワンポット合成および合成４２ｂｐ産物に対するライゲーション
目的：未修飾デオキシチミジン三リン酸を使用するが、修飾デオキシアデノシン三リン酸、修飾デオキシシチジン三リン酸、および修飾デオキシグアノシン三リン酸を使用しない、未修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる糖修飾への適用を示すこと。
【０３４９】
オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号６７、６９、７３、７７および８７）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。
【０３５０】
反応を表１７に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で４時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号３８の存在についてＨＰＬＣによって分析した。
【０３５１】

【表１７】

表 17.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 67、69、73、77 及び 87**		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
リガーゼ – **配列番号 45**		4.0
鋳型 XXL: (2'H) – **配列番号 46**	0.04	0.8
5'プライマー (2'H) – **配列番号 2**	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – **配列番号 4**	0.04	0.8
2'-F-dATP	0.5	1.0
2'-F-dGTP	0.5	1.0
2'-F-dCTP	0.5	1.0
dTTP	0.5	1.0
ATP	1	2.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		3.9
最終反応容量(μL)		20

【０３５２】

反応の結果：

【０３５３】

【表１８】

表 18.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus kodakarensis ポリメラーゼ – 'Kod-V2'	67	72.16
変異型 Thermococcus litoralis ポリメラーゼ – 'Vent-V1'	69	90.10
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo-V5'	73	75.43
変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ – '9n-V4'	77	77.19
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo-V12'	87	71.60

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、**配列番号 2 + 配列番号 4 + 配列番号 7～38** のピークの、**配列番号 38** のピークに対する面積%

【０３５４】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０３５５】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ　ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７
緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ　ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０３５６】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の特定の糖修飾塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。所望の塩基において２’－フルオロ修飾を組み込むことによるギャップの充填。また、リガーゼは、合成された断片から全長オリゴヌクレオチドをもたらすタンデムライゲーション反応を実施することができるという概念実証。面積で９０．１％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼおよびリガーゼ。

【０３５７】

実施例１０：４５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロック２’Ｈとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’ＨデオキシシチジンＭｅ－ｄＣ修飾オリゴヌクレオチドのワンポット合成および合成４２ｂｐ産物に対するライゲーション

目的：修飾デオキシシチジン三リン酸を使用するが、未修飾デオキシアデノシン三リン酸、未修飾デオキシグアノシン三リン酸、および未修飾デオキシチミジン三リン酸を使用しない、未修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られるモジュール式塩基修飾への適用を示すこと。

【０３５８】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４２、４４および８６）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３５９】

反応を表１９に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で４時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号３８の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３６０】

【表１９】

表 19.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 42、44 及び 86**		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
リガーゼ – **配列番号 45**		1.0
鋳型 XXL: (2'H) – **配列番号 46**	0.04	0.8
5'プライマー (2'H) – **配列番号 2**	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – **配列番号 4**	0.04	0.8
dATP	0.5	1.0
dGTP	0.5	1.0
5-me-dCTP	0.5	1.0
dTTP	0.5	1.0
ATP	1	2.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		6.9
最終反応容量(μL)		20

【０３６１】

反応の結果：

【０３６２】

【表２０】

表 20.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Thermococcus kodakarens ポリメラーゼ – 'Pol6'	44	98.48
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	91.26
野生型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo'	86	94.55

*産物への変換率（%）– 波長260nmにおける、**配列番号2 + 配列番号4 + 配列番号7～38**のピークの、**配列番号38**のピークに対する面積%

【０３６３】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０３６４】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０３６５】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の特定の修飾塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。所望の塩基において５－メチルシトシン修飾を組み込むことによるギャップの充填。また、リガーゼは、合成された断片から全長オリゴヌクレオチドをもたらすタンデムライゲーション反応を実施することができるという概念実証。面積で９８％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼおよびリガーゼ。

【０３６６】

実施例１１：４５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１０ｂｐの２’Ｆ修飾オリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｆ完全修飾オリゴヌクレオチド合成

目的：修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を用いた、修飾および未修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる糖修飾への適用を示すこと。

【０３６７】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号８０、８４および８９）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３６８】

反応を表２１に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で４時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号１２の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３６９】

【表２１】

表 21.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 80、84 及び 89**		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
鋳型 XXL: (2'H) – **配列番号 46**	0.04	0.8
5'プライマー (2'F) – **配列番号 49**	0.04	0.8
3'ブロック 5 (2'H) – **配列番号 54**	0.04	0.8
2'-F-dATP	0.5	1.0
2'-F-dGTP	0.5	1.0
2'-F-dCTP	0.5	1.0
2'-F-dUTP	0.5	1.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		9.9
最終反応容量(μL)		20

【０３７０】

反応の結果：

【０３７１】
【表２２】

表 22.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率 (%)＊
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'KT-V4'	80	10.59
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'KT-V5'	84	14.83
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'KT-V6'	89	12.68

*産物への変換率 (%) – 波長 260nm における、**配列番号 49** + **配列番号 7～38** のピークの、**配列番号 12** のピークに対する面積%

【０３７２】
ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。
【０３７３】
緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７
緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７
【０３７４】
結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２’－フルオロ修飾オリゴヌクレオチドプライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。所望の塩基位置において２’－フルオロ糖修飾を組み込むことによるギャップの充填。面積で１４％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。
【０３７５】
実施例１２：５３ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成
目的：ヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）と未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる糖基（２’ＯＨ）への適用を示すこと。
【０３７６】
オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。
【０３７７】
反応を表２３に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を５５℃で２０時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号２０の存在についてＨＰＬＣによって分析した。
【０３７８】

【表２３】

表 23.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
鋳型 NoRXL: (2'H) – **配列番号 47**	0.04	0.8
5'プライマー N+6 (2'OH) – **配列番号 51**	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – **配列番号 4**	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		9.9
最終反応容量(μL)		20

【０３７９】

反応の結果：

【０３８０】

【表２４】

表 24.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo-V8'	95	27.10

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、**配列番号 51** + **配列番号 11～38** のピークの、**配列番号 20** のピークに対する面積%

【０３８１】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、ＷａｔｅｒｓＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０３８２】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０３８３】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、ＲＮＡ ５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のギャップ充填を実施するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼは、面積で２７％の産物形成を生じた。

【０３８４】

実施例１３：５３ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＭｅ修飾

オリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成

目的：ヌクレオシド三リン酸を使用した、修飾オリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）と未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる糖基（２’ＯＭｅ）への適用を示すこと。

【０３８５】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号６０）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３８６】

反応を表２５に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を５５℃で２０時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号２０の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３８７】

【表２５】

表 25.

	反応における最終濃度（mM）	1 反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 60**		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
鋳型 NoRXL: (2'H) – **配列番号 47**	0.04	0.8
5'プライマー N+6 (2'OMe+r) – **配列番号 53**	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – **配列番号 4**	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		9.9
最終反応容量(μL)		20

【０３８８】

反応の結果：

【０３８９】

【表２６】

表 26.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率 (%)＊
変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －'9n-V5'	60	32.75

*産物への変換率 (%) – 波長 260nm における、配列番号 53 + 配列番号 11～38 のピークの、配列番号 20 のピークに対する面積%

【０３９０】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０３９１】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０３９２】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、糖修飾５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のギャップ充填を実施するために使用することができるという概念実証。面積で３２％の産物形成を伴うポリメラーゼ。

【０３９３】

実施例１４：１００ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による５４ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成

目的：１００ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型およびヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）と未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のより長いギャップ充填を実証して、本技術の一般的適用性を示すこと。

【０３９４】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号５６、６０、８４、８９および９３）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０３９５】

反応を表２７に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を５５℃で２０時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号５５の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０３９６】

【表２７】

表 27.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – 配列番号 56、60、84、89 及び 93		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
鋳型 100mer: (2'H) – 配列番号 48	0.04	0.8
5'プライマー N+6 (2'OH) – 配列番号 51	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – 配列番号 4	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		9.9
最終反応容量(μL)		20

【０３９７】

反応の結果：

【０３９８】

【表２８】

表 28.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
野生型 Thermococcus 種ポリメラーゼ – '9n'	56	41.07
変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ – '9n-V5'	60	39.81
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'KT-V5'	84	57.59
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'KT-V6'	89	57.58
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ – 'KT-V1'	93	43.54

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、配列番号 51 + 配列番号 11～38 のピークの、配列番号 55 のピークに対する面積%

【０３９９】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、６０～８５％の緩衝液Ｂの勾配を１５分にわたってかけた後、５分かけて６０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４００】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４０１】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、ＲＮＡ　５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のより長い塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。面積で５７％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０４０２】

実施例１５：１００ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＭｅオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による５４ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成

目的：１００ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型およびヌクレオシド三リン酸を使用した、修飾オリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）と未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のより長いギャップ充填を実証して、本技術の一般的適用性を示すこと。

【０４０３】

オリゴヌクレオチド（配列番号１～３８および４６～５４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号６０、８３、８４および８９）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４０４】

反応を表１２に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を５５℃で２０時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号５５の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４０５】

【表２９】

表 29.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – 配列番号 60、83、84 及び 89		1.0
RNAse 阻害剤		1.0
鋳型 100mer: (2'H) – 配列番号 48	0.04	0.8
5'プライマー N+6 (2'OMe+r) – 配列番号 53	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – 配列番号 4	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		9.9
最終反応容量(μL)		20

【０４０６】

反応の結果：

【０４０７】

【表３０】

表 30.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率 (%)＊
変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －'9n-V5'	60	26.80
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －'Tgo-V9'	83	20.20
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －'KT-V5'	84	27.18
変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －'KT-V6'	89	33.12

*産物への変換率 (%)－ 波長 260nm における、配列番号 53 + 配列番号 11～38 のピークの、配列番号 55 のピークに対する面積%

【０４０８】
ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、６０～８５％の緩衝液Ｂの勾配を１５分にわたってかけた後、５分かけて６０％の緩衝液Ｂまで減少させた。
【０４０９】
緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７
緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７
【０４１０】
結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、糖修飾５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のより長い塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。面積で３３％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。
【０４１１】
実施例１６：２２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、９ｂｐの２’ＭＯＥオリゴヌクレオチドプライマーの７ｂｐの２’ＭＯＥオリゴヌクレオチド３’ブロック２との間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｈ完全ＰＳ修飾オリゴヌクレオチドのワンポット合成および合成２２ｂｐ産物に対するライゲーション
目的：ＰＳ修飾デオキシリボヌクレオチドを用いた、２’ＭＯＥ修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、ギャップマーオリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる骨格修飾および糖修飾への適用を示すこと。
【０４１２】
オリゴヌクレオチド（配列番号９６～９８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４１）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。
【０４１３】
反応を表３１に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で４時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号９９の存在についてＨＰＬＣによって分析した。
【０４１４】

【表３１】

表 31.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 41**		1.0
リガーゼ – **配列番号 45**		1.0
鋳型 H: (2'H) – **配列番号 96**	0.04	0.8
Shortmer 1 (2'MOE) – **配列番号 97**	0.04	0.8
Shortmer 3 (2'MOE) – **配列番号 98**	0.04	0.8
dATPαS	0.5	1.0
dCTPαS	0.5	1.0
dGTPαS	0.5	1.0
dTTPαS	0.5	1.0
ATP	1	2.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
水		8.4
最終反応容量(μL)		20

【０４１５】

反応の結果：

【０４１６】

【表３２】

表 32.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ – 'Pol3'	41	13.2

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、**配列番号 97 + 配列番号 98 + 配列番号 100** のピークの、**配列番号 99** のピークに対する面積%

【０４１７】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４１８】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４１９】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接２’ＭＯＥオリゴヌクレオチドの間の特定の骨格修飾塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。所望の塩基間にＰＳ修飾を組み込むことによるギャップの充填。また、リガーゼは、合成された断片から全長オリゴヌクレオチドをもたらすタンデムライゲーション反応を実施するこ

とができるという概念実証。面積で１３．２％超の産物形成を伴う例示的なポリメラーゼおよびリガーゼ。

【０４２０】

実施例１７：２２ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、９ｂｐの２’ＭＯＥオリゴヌクレオチドプライマーの７ｂｐの２’ＭＯＥオリゴヌクレオチド３’ブロック２’Ｈとの間のギャップ充填による６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチドのワンポット合成および合成２２ｂｐ産物に対するライゲーション

目的：デオキシリボヌクレオシド三リン酸を用いた、２’ＭＯＥ修飾オリゴヌクレオチドセグメント間のギャップ充填を実証して、本技術の、ギャップマーオリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる糖修飾への適用を示すこと。

【０４２１】

オリゴヌクレオチド（配列番号９６～９８）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号４０～４２）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４２２】

反応を表３３に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で４時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号９９の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４２３】

【表３３】

表 33.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 40～42**		1.0
リガーゼ – **配列番号 45**		1.0
鋳型 H: (2'H) – **配列番号 96**	0.04	0.8
Shortmer 1 (2'MOE) – **配列番号 97**	0.04	0.8
Shortmer 3 (2'MOE) – **配列番号 98**	0.04	0.8
dATP	0.5	1.0
dCTP	0.5	1.0
dGTP	0.5	1.0
dTTP	0.5	1.0
ATP	1	2.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
水		8.4
最終反応容量(μL)		20

【０４２４】

反応の結果：

【０４２５】

【表３４】

表 34.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率 (%)＊
野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ – 'Pol2'	40	30.1
変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ – 'Pol3'	41	64.0
野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ – 'Pol4'	42	52.2

*産物への変換率 (%) – 波長 260nm における、**配列番号 97 + 配列番号 98 + 配列番号 100** のピークの、**配列番号 99** のピークに対する面積%

【０４２６】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４２７】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４２８】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２つの隣接２’ＭＯＥオリゴヌクレオチドの間の特定の塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。また、リガーゼは、合成された断片から全長オリゴヌクレオチドをもたらすタンデムライゲーション反応を実施することができるという概念実証。面積で６４％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼおよびリガーゼ。

【０４２９】

実施例１８：５３ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＭｅオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８ｂｐの２’ＯＭｅオリゴヌクレオチド合成

目的：５３ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型を使用した、２’ＯＭｅ修飾オリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）と未修飾ＤＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間の、２’ＯＭｅ糖修飾ヌクレオシド三リン酸を用いたギャップ充填を実証して、本技術の一般的適用性を示すこと。

【０４３０】

オリゴヌクレオチド（配列番号４、４７および５２）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号６２および８７）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４３１】

反応を表３５に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ポリメラーゼを添加して反応を開始した。反応を５５℃で２０時間インキュベートした。次いで、６０μＬの１００ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応の緩衝液を、ＳＥＣを使用して水に交換した。次いで、反応を、配列番号２０の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４３２】

【表３５】

表 35.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 62 及び 87**		1.0
鋳型 NoRXL: (2'H) – **配列番号 47**	0.04	0.8
5'プライマー N+6 (2'OMe) – **配列番号 52**	0.04	0.8
3'ブロック 2 (2'H) – **配列番号 4**	0.04	0.8
2'OMe ATP	0.5	1.0
2'OMe CTP	0.5	1.0
2'OMe GTP	0.5	1.0
2'OMe UTP	0.5	1.0
Tris (pH 7.5)	50	1.0
$MgCl_2$	10	0.2
KCl	50	0.5
水		10.9
最終反応容量(μL)		20

【０４３３】

反応の結果：

【０４３４】

【表３６】

表 36.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus kodakarensis ポリメラーゼ – 'Kod-V1'	62	12.0
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo-V12'	87	15.8

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、**配列番号 52** + **配列番号 11～38** のピークの、**配列番号 20** のピークに対する面積%

【０４３５】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、６０～８５％の緩衝液Ｂの勾配を１５分にわたってかけた後、５分かけて６０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４３６】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４３７】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２’ＯＭｅ糖修飾ヌクレオシド三リン酸を用いて、２’ＯＭｅ糖修飾５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間の塩基充填を実施するために使用することができるという概念実証。面積で１５％超の産物形成を伴う上の例示的なポリメラーゼ。

【０４３８】
実施例１９：８９５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８５０ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成および８９２ｂｐ産物を作製するライゲーション
目的：ヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）とＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、より長いオリゴヌクレオチドの治療薬において一般的に見られる糖基（２’ＯＨ）への適用を示すこと。
【０４３９】
オリゴヌクレオチド（配列番号５１、７６および１０１）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。
【０４４０】
反応を表３７に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ＲＮＡｓｅ阻害剤を添加した。続いて、次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で１６時間インキュベートした。その後、１ｕＬのＤＮａｓｅ１を添加し、反応を２５℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、４μＬの１０ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応を、配列番号１０２の存在についてゲル電気泳動によって分析した。次いで、反応を、配列番号１０１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。
【０４４１】
【表３７】
表 37.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		0.25
リガーゼ – **配列番号 45**		0.12
RNAse 阻害剤		0.12
鋳型-900mer: (2'H) – **配列番号 76**	0.001	1.25
5'プライマー N+6 (2'OH) – **配列番号 51**	0.001	0.05
3'ブロック 6 (2'OH) – **配列番号 101**	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
UTP	0.2	0.0125
Tris (pH 7.5)	50	0.12
$MgCl_2$	10	0.25
KCl	50	0.06
水		0.16
最終反応容量(μL)		2.5

【０４４２】
反応の結果：
【０４４３】

【表３８】

表 38.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －'Tgo-V8'	95	18.61

*産物への変換率（%）－ 波長 260nm における、反応の**配列番号 101** のピークの、陰性対照の**配列番号 101** のピークに対する面積%

【０４４４】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４４５】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴｂｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴｂｕＡＡ、ｐＨ７

【０４４６】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、ＲＮＡ ５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のギャップ充填を実施するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼおよびタンデムライゲーションは、面積で１８．６％の産物形成を生じた。

【０４４７】

実施例２０：８９５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’Ｏｍｅオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８５０ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成および８９２ｂｐ産物を作製するライゲーション

目的：ヌクレオシド三リン酸を使用した、２’Ｏｍｅ含有オリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）とＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、より長いオリゴヌクレオチドの治療薬において一般的に見られる糖基（２’ＯＨ）への適用を示すこと。

【０４４８】

オリゴヌクレオチド（配列番号５３、７６および１０１）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４４９】

反応を表３９に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ＲＮＡｓｅ阻害剤を添加した。続いて、次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で１６時間インキュベートした。その後、１ｕＬのＤｎａｓｅ１を添加し、反応を２５℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、４μＬの１０ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応を、配列番号１０３の存在についてゲル電気泳動によって分析した。次いで、反応を、配列番号１０１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４５０】

【表３９】

表 39.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		0.25
リガーゼ – **配列番号 45**		0.12
RNAse 阻害剤		0.12
鋳型–900mer: (2'H) – **配列番号 76**	0.001	1.25
5'プライマー N+6 (2'Ome+r) – **配列番号 53**	0.001	0.05
3'ブロック 6 (2'OH) – **配列番号 101**	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
UTP	0.2	0.0125
Tris (pH 7.5)	50	0.12
$MgCl_2$	10	0.25
KCl	50	0.06
水		0.16
最終反応容量(μL)		2.5

【０４５１】

反応の結果：

【０４５２】

【表４０】

表 40.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo–V8'	95	36.52

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、反応の**配列番号 101** のピークの、陰性対照の**配列番号 101** のピークに対する面積%

【０４５３】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ Ｘｂｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４５４】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴｂｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴｂｕＡＡ、ｐＨ７

【０４５５】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２’Ｏｍｅ含有５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のギャップ充填を実施するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼおよびタンデムライゲーションは、面積で３６．５２％の産

物形成を生じた。

【０４５６】

実施例２１：８９５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨ　ＰＳオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８５０ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成および８９２ｂｐ産物を作製するライゲーション

目的：ヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡホスホロチオエート含有オリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）とＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、より長いオリゴヌクレオチドの治療薬において一般的に見られる糖基（２’ＯＨ）への適用を示すこと。

【０４５７】

オリゴヌクレオチド（配列番号７６、１０１および１０４）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４５８】

反応を表４１に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ＲＮＡｓｅ阻害剤を添加した。続いて、次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で１６時間インキュベートした。その後、１ｕＬのＤｎａｓｅ１を添加し、反応を２５℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、４μＬの１０ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応を、配列番号１０５の存在についてゲル電気泳動によって分析した。次いで、反応を、配列番号１０１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４５９】

【表４１】

表 41.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		0.25
リガーゼ – **配列番号 45**		0.12
RNAse 阻害剤		0.12
鋳型–900mer: (2'H) – **配列番号 76**	0.001	1.25
5'プライマー N+6_2'OH_PS (2'OH)– **配列番号 104**	0.001	0.05
3'ブロック 6 (2'OH) – **配列番号 101**	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
UTP	0.2	0.0125
Tris (pH 7.5)	50	0.12
$MgCl_2$	10	0.25
KCl	50	0.06
水		0.16
最終反応容量(μL)		2.5

【０４６０】

反応の結果：

【０４６１】

【表４２】

表 42

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －'Tgo-V8'	95	10.78

*産物への変換率（%）－ 波長 260nm における、反応の**配列番号 101** のピークの、陰性対照の**配列番号 101** のピークに対する面積%

【０４６２】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４６３】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴｂｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴｂｕＡＡ、ｐＨ７

【０４６４】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、２’ＯＨホスホロチオエート含有５’プライマーから伸長する２つの隣接オリゴヌクレオチドの間のギャップ充填を実施するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼおよびタンデムライゲーションは、面積で１０．７８％の産物形成を生じた。

【０４６５】

実施例２２：８９５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による、シュードウリジンを含有する８５０ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成、および８９２ｂｐ産物を作製するライゲーション

目的：シュードウリジンヌクレオシド三リン酸およびヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）とＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる塩基修飾（Ψ）への適用を示すこと。

【０４６６】

オリゴヌクレオチド（配列番号５１、７６および１０１）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４６７】

反応を表４３に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ＲＮＡｓｅ阻害剤を添加した。続いて、次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で１６時間インキュベートした。その後、１ｕＬのＤｎａｓｅ１を添加し、反応を２５℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、４μＬの１０ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応を、配列番号１０６の存在についてゲル電気泳動によって分析した。次いで、反応を、配列番号１０１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４６８】

【表４３】

表 43.

	反応における最終濃度（mM）	1反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		0.25
リガーゼ – **配列番号 45**		0.12
RNAse 阻害剤		0.12
鋳型–900mer: (2'H) – **配列番号 76**	0.001	1.25
5'プライマー N+6 (2'OH) – **配列番号 51**	0.001	0.05
3'ブロック 6 (2'OH) – **配列番号 101**	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
ΨTP	0.2	0.0125
Tris (pH 7.5)	50	0.12
$MgCl_2$	10	0.25
KCl	50	0.06
水		0.16
最終反応容量(μL)		2.5

【０４６９】

反応の結果：

【０４７０】

【表４４】

表 44.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo–V8'	95	24.4

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、反応の**配列番号 101** のピークの、陰性対照の**配列番号 101** のピークに対する面積%

【０４７１】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、ＷａｔｅｒｓＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４７２】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４７３】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、ギャップ充填を実施して、シュードウリジン含有配列を形成するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼおよびタンデムライゲーションは、面積で２４．４％の産物形成を生じた。

【０４７４】

実施例２３：８９５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含有する８５０ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド合成、および８９２ｂｐ産物を作製するライゲーション

目的：Ｎ１－メチルシュードウリジンヌクレオシド三リン酸およびヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）とＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる塩基修飾（ｍ１Ψ）への適用を示すこと。

【０４７５】

オリゴヌクレオチド（配列番号５１、７６および１０１）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４７６】

反応を表４５に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ＲＮＡｓｅ阻害剤を添加した。続いて、次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で１６時間インキュベートした。その後、１ｕＬのＤＮａｓｅ１を添加し、反応を２５℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、４μＬの１０ｍＭ　ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応を、配列番号１０７の存在についてゲル電気泳動によって分析した。次いで、反応を、配列番号１０１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４７７】

【表４５】

表 45.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		0.25
リガーゼ – **配列番号 45**		0.12
RNAse 阻害剤		0.12
鋳型–900mer: (2'H) – **配列番号 76**	0.001	1.25
5'プライマー N+6 (2'OH) – **配列番号 51**	0.001	0.05
3'ブロック 6 (2'OH) – **配列番号 101**	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
m1ΨTP	0.2	0.0125
Tris (pH 7.5)	50	0.12
$MgCl_2$	10	0.25
KCl	50	0.06
水		0.16
最終反応容量(μL)		2.5

【０４７８】

反応の結果：

【０４７９】

【表４６】

表 46.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －'Tgo-V8'	95	21.64

*産物への変換率（%）－ 波長 260nm における、反応の**配列番号 101** のピークの、陰性対照の**配列番号 101** のピークに対する面積%

【０４８０】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４８１】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４８２】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、ギャップ充填を実施して、Ｎ１－メチルシュードウリジン含有配列を形成するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼおよびタンデムライゲーションは、面積で２１．６４％の産物形成を生じた。

【０４８３】

実施例２４：８９５ｂｐの２’Ｈオリゴヌクレオチド鋳型上での、１６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチドプライマーの２６ｂｐの２’ＯＨオリゴヌクレオチド３’ブロックとの間のギャップ充填による８５０ｂｐの２’ＯＨ ＰＳ修飾オリゴヌクレオチド合成および８９２ｂｐ産物を作製するライゲーション

目的：修飾ヌクレオシド三リン酸を使用した、ＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（プライマー）とＲＮＡオリゴヌクレオチドセグメント（ブロック）との間のギャップ充填を実証して、本技術の、オリゴヌクレオチド治療薬において一般的に見られる骨格修飾への適用を示すこと。

【０４８４】

オリゴヌクレオチド（配列番号５１、７６および１０１）は、市販の供給元から入手した。プライマー伸長ポリメラーゼ（配列番号９５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。二本鎖リガーゼ（配列番号４５）は、市販の供給元から入手し、直接使用した。

【０４８５】

反応を表４５に従って設定した。反応に含有したオリゴヌクレオチドを、０．１℃／秒で９５℃まで加熱および１５℃まで冷却することによってアニーリングした。次いで、ＲＮＡｓｅ阻害剤を添加した。続いて、次いで、ポリメラーゼおよびリガーゼを添加して反応を開始した。反応を２５℃で１６時間インキュベートした。その後、１ｕＬのＤＮａｓｅ１を添加し、反応を２５℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、４μＬの１０ｍＭ ＥＤＴＡの添加によって反応をクエンチし、次いで、反応を、配列番号１０８の存在についてゲル電気泳動によって分析した。次いで、反応を、配列番号１０１の存在についてＨＰＬＣによって分析した。

【０４８６】

【表４７】

表 47.

	反応における最終濃度（mM）	１反応当たりの容量（μL）
ポリメラーゼ – **配列番号 95**		0.25
リガーゼ – **配列番号 45**		0.12
RNAse 阻害剤		0.12
鋳型–900mer: (2'H) – **配列番号 76**	0.001	1.25
5'プライマー N+6 (2'OH) – **配列番号 51**	0.001	0.05
3'ブロック 6 (2'OH) – **配列番号 101**	0.001	0.05
ATPαS	0.2	0.0125
CTPαS	0.2	0.0125
GTPαS	0.2	0.0125
UTPαS	0.2	0.0125
Tris (pH 7.5)	50	0.12
$MgCl_2$	10	0.25
KCl	50	0.06
水		0.16
最終反応容量(μL)		2.5

【０４８７】

反応の結果：

【０４８８】

【表４８】

表 48.

遺伝子名	配列番号	産物への変換率（%）*
変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ – 'Tgo–V8'	95	4.95

*産物への変換率（%）– 波長 260nm における、反応の**配列番号 101** のピークの、陰性対照の**配列番号 101** のピークに対する面積%

【０４８９】

ＨＰＬＣ分析は、吸光度を２６０ｎｍにおいてモニタリングしながら、ＷａｔｅｒｓＸＢｒｉｄｇｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ ＢＥＨ Ｃ１８カラム（３００Å、３．５μｍ、２．１ｍｍ×１５０ｍｍ）を使用し、０．５ｍｌ／分で送液して実行した。カラムは５０℃に維持した。５μｌの試料を注入し、４０～９５％の緩衝液Ｂの勾配を２５分にわたってかけた後、４分かけて４０％の緩衝液Ｂまで減少させた。

【０４９０】

緩衝液Ａ：９０％H_2O／１０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

緩衝液Ｂ：２０％H_2O／８０％アセトニトリル中５ｍＭ ＴＢｕＡＡ、ｐＨ７

【０４９１】

結論：プライマー伸長ポリメラーゼは、ギャップ充填を実施して、ホスホロチオエート修飾配列を形成するために使用することができるという概念実証。ポリメラーゼおよびタンデムライゲーションは、面積で２１．６４％の産物形成を生じた。

【０４９２】
全体の結論
本発明者らは、拡張可能かつ治療用ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドの大規模製造に好適な効率的な方法において、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドセグメントを相補的な鋳型上に構築し、セグメントを、ポリメラーゼを使用して伸長させてギャップを埋め、セグメントを一緒にライゲーションし、産物ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを、不純物とその相補的な鋳型の両方から分離することによって、治療に関連のある様々な修飾を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチドを含む）またはオリゴヌクレオチドを合成することが可能であることを示した。
【０４９３】
相補的な配列を特異的に認識し、相補的な配列を、相補的な配列に対する正確性と相補的な配列の長さの両方を反映する親和性で結合するために、核酸、例えばＤＮＡまたはＲＮＡの固有の特性を使用する場合、本発明者らは、クロマトグラフィーを必要とせずに高純度のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを作製することができ、このことは、作製方法の効率と方法の拡張性の両方を改善する。分離プロセス中に不変状態の鋳型を回収することによって、本発明者らは、鋳型を、さらなる合成のラウンドに再び使用することができ、したがって、形成される産物オリゴヌクレオチドの等価物ごとに鋳型の等価物を１つ作製しなければならないという経済的帰結を回避している。また、いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドを溶液中で合成することも可能であり、このことは、固相方法によって課されるスケールアップに関する制約を回避する。
【０４９４】
最後に、野生型ポリメラーゼは効果的であるが、ポリメラーゼの修飾（変異型または操作されたポリメラーゼをもたらす）が、効率、鋳型回収率を高めるため、または修飾ヌクレオチドを組み込むために利用されてもよい。同様に、野生型リガーゼは効果的であるが、リガーゼの適切な変異および進化により、ライゲーション効率は高めることができ、適切に修飾されたリガーゼは、複数の修飾を含有するオリゴヌクレオチドを合成するのに効果的な触媒である。
【０４９５】
配列表
【０４９６】

【表４９】

配列番号	配列識別子
1	/5Biosg/GCTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGCACCGAGGAGT－‘鋳型’
2	ACTCCTCGGT－‘5’プライマー N’
3	/5phos/AGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC－‘3’ブロック 1’
4	/5phos/GTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC－‘3’ブロック 2’
5	/5Phos/GCACCAAAGC/Me-dC/ATTAGC－‘3’ブロック 3’
6	/5Phos/GC/Me-dC/ATTAGC－‘3’ブロック 4’
7	ACTCCTCGGTG－‘プライマー N+1’
8	ACTCCTCGGTGC－‘プライマー N+2’
9	ACTCCTCGGTGCC－‘プライマー N+3’
10	ACTCCTCGGTGCCT－‘プライマー N+4’
11	ACTCCTCGGTGCCTC－‘プライマー N+5’
12	ACTCCTCGGTGCCTCA－‘プライマー N+6’
13	ACTCCTCGGTGCCTCAG－‘プライマー N+7’
14	ACTCCTCGGTGCCTCAGT－‘プライマー N+8’
15	ACTCCTCGGTGCCTCAGTC－‘プライマー N+9’
16	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCT－‘プライマー N+10’
17	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTG－‘プライマー N+11’
18	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGC－‘プライマー N+12’
19	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCT－‘プライマー N+13’
20	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTT－‘プライマー N+14’
21	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTC－‘プライマー N+15’
22	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCG－‘プライマー N+16’
23	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGC－‘プライマー N+17’
24	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCA－‘プライマー N+18’
25	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCAC－‘プライマー N+19’
26	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACC－‘プライマー N+20’
27	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCA－‘プライマー N+21’
28	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAA－‘プライマー N+22’
29	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAA－‘プライマー N+23’
30	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAG－‘プライマー N+24’
31	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGC－‘プライマー N+25’
32	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCC－‘プライマー N+26’
33	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCA－‘プライマー N+27’
34	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCAT－‘プライマー N+28’
35	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATT－‘プライマー N+29’
36	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTA－‘プライマー N+30’
37	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAG－‘プライマー N+31’

38	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC－‘プライマー N+32’
39	野生型 Escherichia ファージ T7 ポリメラーゼ －‘Pol1’
40	野生型 Sulfolobus solfataricus ポリメラーゼ －‘Pol2’
41	変異型 Thermococcus 種(9oN-7 株)ポリメラーゼ －‘Pol3’
42	野生型 Enterobacteria ファージ T4 ポリメラーゼ －‘Pol4’
43	野生型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －‘Pol5’
44	野生型 Thermococcus kodakarens ポリメラーゼ －‘Pol6’
45	野生型 *Enterobacteria ファージ T3 リガーゼ －‘Lig1’*
46	/5Biosg/GCTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGCACCGAGGAGT*T*T*T－‘鋳型 XXL’
47	CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACCTGATGACTGAGGCACCGAGGAGT*T*T*T*T－‘鋳型 NoRXL’
48	C*T*A*A*T*GGCTTTGGTGCGAAGCAGACCTCTTCACCTTTGCTCACCATTTGTAGTCCATCGGATATATCTCCTTCGGATCCTGAGGCACCGAGGAG*T*T*T*T*T－‘鋳型-100mer’
49	ACTCCfUfCfGfGfU－‘5’プライマー N_2’F’
50	ACTCCTCGGTGCCTCA－‘5’プライマー N+6_2’H’
51	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrA－‘5’プライマー N+6_2’OH’
52	mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCmUmCmA－‘5’プライマー N+6_2’OMe’
53	mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrA－‘5’プライマー N+6_2’OMe+r’
54	GTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC－‘3’ブロック 5’
55	ACTCCTCGGTGCCTCAGGATCCGAAGGAGATATATCCGATGGACTACAAATGGTGAGCAAAGGTGAAGAG－‘プライマー N+60’
56	野生型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －‘9n’
57	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －‘Tgo-V2’
58	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －‘Tgo-V16’
59	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －‘KT-V9’
60	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －‘9n-V5’
61	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －‘9n-V1’
62	変異型 Thermococcus kodakarensis ポリメラーゼ －‘Kod-V1’
63	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －‘Tgo-V3’
64	野生型 Thermococcus litoralis ポリメラーゼ －‘Vent’
65	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －‘KT-V2’
66	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －‘9n-V2’
67	変異型 Thermococcus kodakarensis ポリメラーゼ －‘Kod-V2’
68	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －‘Tgo-V4’
69	変異型 Thermococcus litoralis ポリメラーゼ －‘Vent-V1’
70	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ －‘KT-V10’
71	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ －‘9n-V3’
72	変異型 Thermococcus kodakarensis ポリメラーゼ －‘Kod-V3’
73	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ －‘Tgo-V5’

74	変異型 Thermococcus litoralis ポリメラーゼ - 'Vent-V2'
75	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V3'
76	CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAG CTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCTCGAGTTACTTATACAGTTCATCCA TACCACCGGTACTATGGCGACCTTCTGCACGTTCATACTGTTCAACAATGGTATAAT CCTCGTTGTGGCTGGTGATATCCAGTTTGATATTAACATTATATGCACCAGGCAGCTG AACCGGCTTTTTGGCTTTGTAGGTGGTTTTAACTTCTGCATCATAATGACCGCCATCT TTCAGCTTCAGACGCTGTTTAATTTCACCTTTCAGTGCGCCATCTTCCGGATACATAC GTTCGCTGCTTGCTTCCCAACCCATGGTCTTTTTCTGCATAACCGGACCATCACTCG GAAAATTCGTGCCACGCAGTTTAACTTTATAGATAAATTCACCATCCTGCAGGCTGCT ATCCTGTGTAACGGTAACAACACCACCATCTTCAAAATTCATCACACGTTCCCATTTA AAACCTTCCGGAAAGCTCAGTTTCAGATAATCCGGGATATCTGCCGGATGTTTAACA TAGGCTTTGCTACCATACATAAACTGCGGACTCAGAATATCCCATGCAAACGGCAGC GGACCACCTTTGGTAACTTTCAGTTTTGCGGTCTGGGTGCCTTCATACGGACGACCT TCGCCTTCACCTTCAATTTCAAATTCGTGGCCATTAACGCTACCTTCCATATGAACTT TGAAGCGCATGAATTCTTTGATGATGGCCATATTATCCTCTTCACCTTTGCTCACCAT GCTAGCCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGAT GGCTGCTGCCCATTGAGGCACCGAGGAGTTTTT - '鋳型-900mer'
77	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ - '9n-V4'
78	変異型 Thermococcus kodakarensis ポリメラーゼ - 'Kod-V5'
79	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo-V6'
80	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V4'
81	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ - '9n-V7'
82	野生型 Pyrococcus furiosus ポリメラーゼ - Pfu
83	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo-V9'
84	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V5'
85	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ - '9n-V8'
86	野生型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo'
87	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo-V12'
88	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V8'
89	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V6'
90	変異型 Thermococcus 種ポリメラーゼ - '9n-V9'
91	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo-V1'
92	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo-V14'
93	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V1'
94	変異型 Thermus aquaticus ポリメラーゼ - 'KT-V7'
95	変異型 Thermococcus gorgonarius ポリメラーゼ - 'Tgo-V8'
96	/5Biosg/GCA CTT CGC TTC ACC TCT CTG C*T*T* T - '鋳型 H'
97	eGeCeAeGeAeGeAGG - 'Shortmer 1 (2'MOE)'
98	/5phos/GAeAeGeTeGeC - 'Shortmer 3 (2'MOE)'
99	eGeCeAeGeAeGeAGGTGAAGCGAeAeGeTeGeC - 'Product (2'MOE)'
100	eGeCeAeGeAeGeAGGTGAAGC - 'Shortmer 1+2 (2'MOE)'

101	/5Phos/rGrU rCrUrG rCrUrU rCrGrC rArCrC rArArA rGrCrC mA*mU*mU* mA*mG*mC - '3'ブロック 6'
102	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArArUrGrGrGrCrArGrCrArGrCrCrArUrCrArUrCrAr UrCrArUrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGrCrGrGrCrArGr CrCrArUrArUrGrGrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGrUrGrArArGrArGrGrAr UrArArUrArUrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCrUrUrCrArArA rGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUrGrGrCrCrArCrGrArArUrUrUr GrArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrGrCrGrArArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUrArUrGrArAr GrGrCrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCrUrGrArArArGrUrUrArCrCrArArArGrGrUr GrGrUrCrCrGrCrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGrUrCrCrGr CrArGrUrUrUrArUrGrUrArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUrArArArCrArUrC rCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrCrGrGrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUrUrUrCr CrGrGrArArGrGrUrUrUrUrArArArUrGrGrGrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrUrUrUrGrA rArGrArUrGrGrUrGrGrUrGrUrUrGrUrUrArCrCrGrUrUrArCrArCrArGrGrArUrArGrCrArGr CrCrUrGrCrArGrGrArUrGrGrUrGrArArUrUrUrArUrCrUrArUrArArArGrUrUrArArArCrUrG rCrGrUrGrGrCrArCrGrArArUrUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUrCrCrGrGrUrUrArUrGr CrArGrArArArArArGrArCrCrArUrGrGrGrUrUrGrGrGrArArGrCrArArGrCrArGrCrGrArArAr CrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrGrArArArGrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArArGrGrUrGrArAr ArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCrUrGrArArArGrArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrU rArUrGrArUrGrCrArGrArArGrUrUrArArArArCrCrArCrCrUrArCrArArArGrCrCrArArArAr ArGrCrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUrArArArUrGrUrUrArArUrArU rCrArArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGrArUrUrArUrArCr CrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArArGrGrUrCrGrCrCrAr UrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGrArUrGrArArCrUrGrUrArUrArArGrUrArArCrUrC rGrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArCrArArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArArGrCr UrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrArGrCrArArUrArArGrUrCrUrGr CrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC - 'Product-892mer 1'
103	mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrArArUrGrGrGrCrArGrCrArGrCrCrArUr CrArUrCrArUrCrArUrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGrCrGrCr GrGrCrArGrCrCrArUrArUrGrGrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGrUrGrArAr GrArGrGrArUrArArUrArUrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCrU rUrCrArArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUrGrGrCrCrArCrGr ArArUrUrUrGrArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrGrCrGrArArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUr ArUrGrArArGrGrCrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCrUrGrArArArGrUrUrArCrCrArA rArGrGrUrGrGrUrCrCrGrCrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGr UrCrCrGrCrArGrUrUrUrArUrGrUrArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUrArArA rCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrCrGrGrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCr UrUrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUrUrUrArArArUrGrGrGrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrU rUrUrGrArArGrArUrGrGrUrGrUrGrUrGrUrUrGrUrUrArCrCrGrUrUrArCrArCrArGrGrArUrAr GrCrArGrCrCrUrGrCrArGrGrArUrGrGrUrGrArArUrUrUrArUrCrUrArUrArArArGrUrUrArA rArCrUrGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArArUrUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUrCrCrGrGrUr UrArUrGrCrArGrArArArArArGrArCrCrArUrGrGrGrUrUrGrGrGrArArGrCrArArGrCrArGr	

	CrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrGrArArGrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArArGrGr UrGrArArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCrUrGrArArArGrArUrGrGrCrGrGrU rCrArUrUrArUrGrArUrGrCrArGrArArGrUrUrArArArArCrCrArCrCrUrArCrArArArGrCrCr ArArArArArGrCrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUrArArUrGrUrUrA rArUrArUrCrArArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGrArUrUr ArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArArGrGrUrCrG rCrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGrArUrGrArArCrUrGrUrArUrArArGrUrAr ArCrUrCrGrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArCrArArArGrCrCrCrGrArArArGrGr ArArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrArGrCrArArUrArArGr UrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC – ‘Product-892mer 2’
104	rA*rC*rU*rC*rC*rU*rC*rG*rG*rU*rG*rC*rC*rU*rC*rA – ‘5’プライマー N+6_2’OH_PS’
105	rA*rC*rU*rC*rC*rU*rC*rG*rG*rU*rG*rC*rC*rU*rC*rArArUrGrGrCrArGrCrArGrCr CrArUrCrArUrCrArUrCrArUrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGr CrGrCrGrGrCrArGrCrCrArUrArUrGrGrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGrUr GrArArGrArGrGrArUrArArUrArUrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrC rGrCrUrUrCrArArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUrGrGrCrCr ArCrGrArArUrUrUrGrArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrGrCrGrArArGrGrUrCrGrUrCr CrGrUrArUrGrArArGrGrCrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCrUrGrArArArGrUrUrArC rCrArArArGrGrUrGrGrUrCrCrGrCrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUr GrArGrUrCrCrGrCrArGrUrUrUrArUrGrUrArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUr UrArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrCrGrGrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrG rArGrCrUrUrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUrUrUrArArArUrGrGrGrArArCrGrUrGrUrGrArUrGr ArArUrUrUrUrGrArArGrArUrGrGrUrGrGrUrGrUrUrGrUrUrUrArCrCrGrUrUrArCrArCrArGr GrArUrArGrCrArGrCrCrUrGrCrArGrGrArUrGrGrUrGrArArUrUrUrArUrCrUrArUrArArArG rUrUrArArArCrUrGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArArUrUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUrCr CrGrGrUrUrArUrGrCrArGrArArArArArGrArCrCrArUrGrGrGrUrUrGrGrGrArArGrCrArArAr GrCrArGrCrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrGrArArGrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrAr ArArGrGrUrGrArArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCrUrGrArArArGrArUrGrG rCrGrGrUrCrArUrUrArUrGrArUrGrCrArGrArArGrUrUrArArArArCrCrArCrCrUrArCrArAr ArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUrArAr UrGrUrUrArArUrArUrCrArArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArG rGrArUrUrArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArAr GrGrUrCrGrCrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGrArUrGrArCrUrGrUrArUr ArArGrUrArArCrUrCrGrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArCrArArArGrCrCrCrGr ArArArGrGrArArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrArGrCrAr ArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC – ‘Product-892mer 3’
106	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArA Ψ rGrGrGrCrArGrCrArGrCrCrA Ψ rCrA Ψ rCrA Ψ rCrA Ψ rCrA Ψ rCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrC Ψ rGrG Ψ rGrCrCrGrCrGrCrGrGrCrArGr CrCrA Ψ rA Ψ rGrGrC Ψ rArGrCrA Ψ rGrG Ψ rGrArGrCrArArArGrG Ψ rGrArArGrArGrGrA Ψ rArA Ψ rA Ψ rGrGrCrCrA Ψ rCrA Ψ rCrArArArGrArA Ψ Ψ rCrA Ψ rGrCrGrC Ψ Ψ rCrArAr

	ArGΨΨrCrAΨrAΨrGrGrArArGrGΨrArGrCrGΨΨrArAΨrGrGrCrCrArCrGrArAΨΨΨ rGrArArAΨΨrGrArArGrGΨrGrArArGrGrCrGrArArGrGΨrCrGΨrCrCrGΨrAΨrGrArAr GrGrCrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCΨrGrArArArGΨΨrArCrCrArArArGrGΨr GrGΨrCrCrGrCΨrGrCrCrGΨΨΨrGrCrAΨrGrGrGrAΨrAΨΨrCΨrGrArGΨrCrCrGr CrArGΨΨΨrAΨrGΨrAΨrGrGΨrArGrCrArArArGrCrCΨrAΨrGΨΨrArArArCrAΨrC rCrGrGrCrArGrAΨrAΨrCrCrCrGrGrAΨΨrAΨrCΨrGrArArArCΨrGrArGrCΨΨΨrCr CrGrGrArArGrGΨΨΨΨrArArAΨrGrGrGrArArCrGΨrGΨrGrAΨrGrArAΨΨΨΨrGrA rArGrAΨrGrGΨrGrGΨrGΨΨrGΨΨrArCrCrGΨΨrArCrArCrArGrGrAΨrArGrCrArGr CrCΨrGrCrArGrGrAΨrGrGΨrGrArAΨΨΨrAΨrCΨrAΨrArArArGΨΨrArArArCΨrG rCrGΨrGrGrCrArCrGrArAΨΨΨΨrCrCrGrArGΨrGrAΨrGrGΨrCrCrGrGΨΨrAΨrGr CrArGrArArArArArGrArCrCrAΨrGrGrGΨΨrGrGrGrArArGrCrArArGrCrArGrCrGrArAr CrGΨrAΨrGΨrAΨrCrCrGrGrArArGrAΨrGrGrCrGrCrArCΨrGrArArArGrGΨrGrArAr AΨΨrArArArCrArGrCrGΨrCΨrGrArArArGrCΨrGrArArArGrAΨrGrGrCrGrGΨrCrAΨΨ rAΨrGrAΨrGrCrArGrArArArGΨΨrArArArArCrCrArCrCΨrArCrArArArGrCrCrArArArAr ArGrCrCrGrGΨΨrCrArGrCΨrGrCrCΨrGrGΨrGrCrAΨrAΨrArAΨrGΨΨrArAΨrAΨ rCrArArArCΨrGrGrAΨrAΨrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGrAΨΨrAΨrArCr CrAΨΨrGΨΨrGrArArCrArGΨrAΨrGrArArCrGΨrGrCrArGrArArGrGΨrCrGrCrCrAΨ rArGΨrArCrCrGrGΨrGrGΨrAΨrGrGrAΨrGrArArCΨrGΨrAΨrArArGΨrArArCΨrCr GrArGrArGrAΨrCrCrGrGrCΨrGrCΨrArArCrArArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArGrC ΨrGrArGΨΨrGrGrCΨrGrCΨrGrCrCrArCrCrGrCΨrGrArArGrCrArAΨrArArGrUrCrUrGr CrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC – 'Product-892mer 4'
107	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArAm1ΨrGrGrGrCrArGrCrArGrCrCrAm1ΨrCrAm 1ΨrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCm1ΨrGrGm1ΨrGrCr CrGrCrGrCrGrGrCrArGrCrCrAm1ΨrAm1ΨrGrGrCm1ΨrArGrCrAm1ΨrGrGm1ΨrGrAr GrCrArArArGrGm1ΨrGrArArGrArGrGrAm1ΨrArAm1ΨrAm1ΨrGrGrCrCrAm1ΨrCrAm 1ΨrCrArArArGrArAm1Ψm1ΨrCrAm1ΨrGrCrGrCm1Ψm1ΨrCrArArArGm1Ψm1ΨrCr Am1ΨrAm1ΨrGrGrArArGrGm1ΨrArGrCrGm1Ψm1ΨrArAm1ΨrGrGrCrCrArCrGrArA m1Ψm1Ψm1ΨrGrArArAm1Ψm1ΨrGrArArGrGm1ΨrGrArArGrGrCrGrArArGrGm1ΨrC rGm1ΨrCrCrGm1ΨrAm1ΨrGrArArGrGrCrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCm1Ψr GrArArArGm1Ψm1ΨrArCrCrArArArGrGm1ΨrGrGm1ΨrCrCrGrCm1ΨrGrCrCrGm1Ψ m1Ψm1ΨrGrCrAm1ΨrGrGrGrAm1ΨrAm1Ψm1ΨrCm1ΨrGrArGm1ΨrCrCrGrCrArGm 1Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrGrGm1ΨrArGrCrArArArGrCrCm1ΨrAm1ΨrGm1 Ψm1ΨrArArArCrAm1ΨrCrCrGrGrCrArGrAm1ΨrAm1ΨrCrCrCrGrGrAm1Ψm1ΨrAm1 ΨrCm1ΨrGrArArArCm1ΨrGrArGrCm1Ψm1Ψm1ΨrCrCrGrGrArArGrGm1Ψm1Ψm1 Ψm1ΨrArArAm1ΨrGrGrGrArArCrGm1ΨrGm1ΨrGrAm1ΨrGrArAm1Ψm1Ψm1Ψm1 ΨrGrArArGrAm1ΨrGrGm1ΨrGrGm1ΨrGm1Ψm1ΨrGm1Ψm1ΨrArCrCrGm1Ψm1ΨrA rCrArCrCrArGrGrAm1ΨrArGrCrArGrCrCm1ΨrGrCrArGrGrAm1ΨrGrGm1ΨrGrArAm1 Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrCm1ΨrAm1ΨrArArArGm1Ψm1ΨrArArArCm1ΨrGrCrGm1ΨrGr GrCrArCrGrArAm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrCrCrGrArGm1ΨrGrAm1ΨrGrGm1ΨrCrCrGrGm1 Ψm1ΨrAm1ΨrGrCrArGrArArArArArGrArCrCrAm1ΨrGrGrGm1Ψm1ΨrGrGrGrArArGr CrArArGrCrArGrCrGrArArCrGm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrCrCrGrGrArArGrAm1ΨrGr GrCrGrCrArCm1ΨrGrArArArGrGm1ΨrGrArArAm1Ψm1ΨrArArArCrArGrCrGm1ΨrCm

	1ΨrGrArArGrCm1ΨrGrArArArGrAm1ΨrGrGrCrGrGm1ΨrCrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrAm1ΨrGrCrArGrArArGm1Ψm1ΨrArArArArCrCrArCrCm1ΨrArCrArArArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGm1Ψm1ΨrCrArGrCm1ΨrGrCrCm1ΨrGrGm1ΨrGrCrAm1ΨrAm1ΨrArAm1ΨrGm1Ψm1ΨrArAm1ΨrAm1ΨrCrArArArCm1ΨrGrGrAm1ΨrAm1ΨrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrArCrCrAm1Ψm1ΨrGm1Ψm1ΨrGrArArCrArGm1ΨrAm1ΨrGrArArCrGm1ΨrGrCrArGrArArGrGm1ΨrCrGrCrCrAm1ΨrArGm1ΨrArCrCrGrGm1ΨrGrGm1ΨrAm1ΨrGrGrAm1ΨrGrArArCm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrArArGm1ΨrArArCm1ΨrCrGrArGrArGrAm1ΨrCrCrGrGrCm1ΨrGrCm1ΨrArArCrArArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArGrCm1ΨrGrArGm1Ψm1ΨrGrGrCm1ΨrGrCm1ΨrGrCrCrArCrCrGrCm1ΨrGrArGrCrArAm1ΨrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC – 'Product-892mer 5'
108	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArA*rU*rG*rG*rG*rC*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rC*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rG*rG*rC*rC*rU*rG*rG*rU*rG*rC*rC*rG*rC*rG*rC*rG*rG*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rU*rA*rU*rG*rG*rC*rU*rA*rG*rC*rA*rU*rG*rG*rU*rG*rA*rG*rC*rA*rA*rA*rG*rG*rU*rG*rA*rA*rG*rA*rG*rG*rA*rU*rA*rA*rU*rA*rU*rG*rG*rC*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rA*rA*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rU*rC*rA*rU*rG*rG*rC*rG*rU*rA*rG*rC*rC*rG*rU*rU*rA*rA*rU*rG*rU*rG*rA*rA*rA*rG*rG*rC*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rC*rG*rU*rC*rC*rG*rU*rA*rU*rG*rA*rA*rA*rG*rG*rC*rA*rC*rC*rC*rC*rA*rG*rA*rA*rA*rA*rC*rU*rG*rA*rA*rA*rG*rC*rC*rU*rA*rU*rG*rU*rU*rA*rA*rA*rA*rG*rG*rU*rG*rG*rU*rC*rC*rG*rG*rC*rU*rU*rG*rC*rC*rG*rU*rU*rU*rA*rU*rG*rU*rA*rU*rG*rG*rU*rA*rG*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rC*rU*rA*rU*rG*rU*rU*rA*rA*rA*rC*rA*rU*rC*rC*rG*rG*rC*rA*rG*rA*rU*rA*rU*rC*rC*rG*rA*rA*rA*rG*rC*rU*rG*rA*rG*rC*rU*rU*rU*rC*rC*rG*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rU*rU*rA*rU*rG*rG*rG*rA*rA*rC*rG*rU*rG*rU*rG*rA*rU*rG*rA*rA*rU*rU*rG*rA*rA*rA*rU*rG*rG*rA*rU*rU*rA*rC*rC*rG*rU*rU*rA*rC*rA*rC*rA*rG*rG*rA*rU*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rC*rU*rG*rC*rA*rG*rA*rU*rG*rG*rU*rA*rG*rC*rA*rG*rA*rA*rA*rA*rA*rG*rA*rC*rC*rA*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rA*rG*rC*rA*rA*rG*rA*rU*rG*rG*rC*rG*rG*rU*rC*rU*rG*rA*rG*rC*rA*rA*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rC*rC*rG*rA*rA*rA*rG*rG*rA*rA*rG*rC*rU*rG*rA*rG*rU*rU*rG*rG*rC*rU*rG*rC*rU*rG*rC*rC*rA*rC*rC*rG*rC*rU*rG*rA*rG*rC*rA*rA*rU*rA*rArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC – 'Product-892mer 6'

【0497】

配列番号１
／５Ｂｉｏｓｇ／ＧＣＴＡＡＴＧＧＣＴＴＴＧＧＴＧＣＧＡＡＧＣＡＧＡＣＴＧＡＧＧＣＡＣＣＧＡＧＧＡＧＴ
配列番号２
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴ
配列番号３
／５ｐｈｏｓ／ＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴＡＧＣ
配列番号４
／５ｐｈｏｓ／ＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴＡＧＣ
配列番号５
／５Ｐｈｏｓ／ＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣ／Ｍｅ－ｄＣ／ＡＴＴＡＧＣ
配列番号６
／５Ｐｈｏｓ／ＧＣ／Ｍｅ－ｄＣ／ＡＴＴＡＧＣ
配列番号７
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧ
配列番号８
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣ
配列番号９
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣ
配列番号１０
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴ
配列番号１１
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣ
配列番号１２
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡ
配列番号１３
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧ
配列番号１４
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴ
配列番号１５
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣ
配列番号１６
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴ
配列番号１７
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧ
配列番号１８
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣ
配列番号１９
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴ
配列番号２０
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴ
配列番号２１
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣ
配列番号２２
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧ
配列番号２３
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣ
配列番号２４
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡ
配列番号２５

ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣ
配列番号２６
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣ
配列番号２７
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡ
配列番号２８
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡ
配列番号２９
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡ
配列番号３０
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧ
配列番号３１
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣ
配列番号３２
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣ
配列番号３３
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡ
配列番号３４
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴ
配列番号３５
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴ
配列番号３６
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴ
Ａ
配列番号３７
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴ
ＡＧ
配列番号３８
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴ
ＡＧＣ
配列番号３９
ＭＩＶＳＤＩＥＡＮＡＬＬＥＳＶＴＫＦＨＣＧＶＩＹＤＹＳＴＡＥＹＶＳＹＲＰＳＤＦ
ＧＡＹＬＤＡＬＥＡＥＶＡＲＧＧＬＩＶＦＨＮＧＨＫＹＤＶＰＡＬＴＫＬＡＫＬＱＬＮＲ
ＥＦＨＬＰＲＥＮＣＩＤＴＬＶＬＳＲＬＩＨＳＮＬＫＤＴＤＭＧＬＬＲＳＧＫＬＰＧＫＲ
ＦＧＳＨＡＬＥＡＷＧＹＲＬＧＥＭＫＧＥＹＫＤＤＦＫＲＭＬＥＥＱＧＥＥＹＶＤＧＭＥ
ＷＷＮＦＮＥＥＭＭＤＹＮＶＱＤＶＶＶＴＫＡＬＬＥＫＬＬＳＤＫＨＹＦＰＰＥＩＤＦＴ
ＤＶＧＹＴＴＦＷＳＥＳＬＥＡＶＤＩＥＨＲＡＡＷＬＬＡＫＱＥＲＮＧＦＰＦＤＴＫＡＩ
ＥＥＬＹＶＥＬＡＡＲＲＳＥＬＬＲＫＬＴＥＴＦＧＳＷＹＱＰＫＧＧＴＥＭＦＣＨＰＲＴ
ＧＫＰＬＰＫＹＰＲＩＫＴＰＫＶＧＧＩＦＫＫＰＫＮＫＡＱＲＥＧＲＥＰＣＥＬＤＴＲＥ
ＹＶＡＧＡＰＹＴＰＶＥＨＶＶＦＮＰＳＳＲＤＨＩＱＫＫＬＱＥＡＧＷＶＰＴＫＹＴＤＫ
ＧＡＰＶＶＤＤＥＶＬＥＧＶＲＶＤＤＰＥＫＱＡＡＩＤＬＩＫＥＹＬＭＩＱＫＲＩＧＱＳ
ＡＥＧＤＫＡＷＬＲＹＶＡＥＤＧＫＩＨＧＳＶＮＰＮＧＡＶＴＧＲＡＴＨＡＦＰＮＬＡＱ
ＩＰＧＶＲＳＰＹＧＥＱＣＲＡＡＦＧＡＥＨＨＬＤＧＩＴＧＫＰＷＶＱＡＧＩＤＡＳＧＬ
ＥＬＲＣＬＡＨＦＭＡＲＦＤＮＧＥＹＡＨＥＩＬＮＧＤＩＨＴＫＮＱＩＡＡＥＬＰＴＲＤ
ＮＡＫＴＦＩＹＧＦＬＹＧＡＧＤＥＫＩＧＱＩＶＧＡＧＫＥＲＧＫＥＬＫＫＫＦＬＥＮＴ
ＰＡＩＡＡＬＲＥＳＩＱＱＴＬＶＥＳＳＱＷＶＡＧＥＱＱＶＫＷＫＲＲＷＩＫＧＬＤＧＲ
ＫＶＨＶＲＳＰＨＡＡＬＮＴＬＬＱＳＡＧＡＬＩＣＫＬＷＩＩＫＴＥＥＭＬＶＥＫＧＬＫ
ＨＧＷＤＧＤＦＡＹＭＡＷＶＨＤＥＩＱＶＧＣＲＴＥＥＩＡＱＶＶＩＥＴＡＱＥＡＭＲＷ
ＶＧＤＨＷＮＦＲＣＬＬＤＴＥＧＫＭＧＰＮＷＡＩＣＨ
配列番号４０

MIVLFVDFDYFYAQVEEVLNPSLKGKPVVVCVFSGRFED
SGAVATANYEARKFGVKAGIPIVEAKKILPNAVYLPMRKE
VYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYR
EAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVGISKNKVFAKIAADMAK
PNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLKKLGI
NKLVDTLSIEFDKLKGMIGEAKAKYLISLARDEYNEPIRT
RVRKSIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKR
IPKAIHVVAVTEDLDIVSRGRTFPHGISKETAYSESVKLL
QKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT

配列番号４１

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAIATLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号４２

MKEFYISIETVGNNIVERYIDENGKERTREVEYLPTMFR
HCKEESKYKDIYGKNCAPQKFPSMKDARDWMKRMEDIGLE
ALGMNDFKLAYISDTYGSEIVYDRKFVRVANCDIEVTGDK
FPDPMKAEYEIDAITHYDSIDDRFYVFDLLNSMYGSVSKW
DAKLAAKLDCEGGDEVPQEILDRVIYMPFDNERDMLMEYI
NLWEQKRPAIFTGWNIEGFDVPYIMNRVKMILGERSMKRF
SPIGRVKSKLIQNMYGSKEIYSIDGVSILDYLDLYKKFAF
TNLPSFSLESVAQHETKKGKLPYDGPINKLRETNHQRYIS
YNIIDVESVQAIDKIRGFIDLVLSMSYYAKMPFSGVMSPI
KTWDAIIFNSLKGEHKVIPQQGSHVKQSFPGAFVFEPKPI
ARRYIMSFDLTSLYPSIIRQVNISPETIRGQFKVHPIHEY
IAGTAPKPSDEYSCSPNGWMYDKHQEGIIPKEIAKVFFQR
KDWKKKMFAEEMNAEAIKKIIMKGAGSCSTKPEVERYVKF
SDDFLNELSNYTESVLNSLIEECEKAATLANTNQLNRKIL
INSLYGALGNIHFRYYDLRNATAITIFGQVGIQWIARKIN
EYLNKVCGTNDEDFIAAGDTDSVYVCVDKVIEKVGLDRFK
EQNDLVEFMNQFGKKKMEPMIDVAYRELCDYMNNREHLMH
MDREAISCPPLGSKGVGGFWKAKKRYALNVYDMEDKRFAE
PHLKIMGMETQQSSTPKAVQEALEESIRRILQEGEESVQE

YYKNFEKEYRQLDYKVIAEVKTANDIAKYDDKGWPGFKCP
FHIRGVLTYRRAVSGLGVAPILDGNKVMVLPLREGNPFGD
KCIAWPSGTELPKEIRSDVLSWIDHSTLFQKSFVKPLAGM
CESAGMDYEEKASLDFLFG

配列番号４３

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQIELRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号４４

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRP
VEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTERDMIKRFLRVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGH
RFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLL
DYRQRAIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGRE
YITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKK
AMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLSAWLKPKGT

配列番号４５

MNIFNTNPFKAVSFVESAVKKALETSGYLIADCKYDGVR
GNIVVDNVAEAAWLSRVSKFIPALEHLNGFDKRWQQLLND
DRCIFPDGFMLDGELMVKGVDFNTGSGLLRTKWVKRDNMG
FHLTNVPTKLTPKGREVIDGKFEFHLDPKRLSVRLYAVMP
IHIAESGEDYDVQNLLMPYHVEAMRSLLVEYFPEIEWLIA
ETYEVYDMDSLTELYEEKRAEGHEGLIVKDPQGIYKRGKK
SGWWKLKPECEADGIIQGVNWGTEGLANEGKVIGFSVLLE
TGRLVDANNISRALMDEFTSNVKAHGEDFYNGWACQVNYM
EATPDGSLRHPSFEKFRGTEDNPQEKM

配列番号４６
／５Ｂｉｏｓｇ／ＧＣＴＡＡＴＧＧＣＴＴＴＧＧＴＧＣＧＡＡＧＣＡＧＡＣＴＧＡＧＧ
ＣＡＣＣＧＡＧＧＡＧＴＴＴＴ
配列番号４７
ＣＴＡＡＴＧＧＣＴＴＴＧＧＴＧＣＧＡＡＧＣＡＧＡＣＣＴＧＡＴＧＡＣＴＧＡＧＧＣ
ＡＣＣＧＡＧＧＡＧＴＴＴＴＴ
配列番号４８
ＣＴＡＡＴＧＧＣＴＴＴＧＧＴＧＣＧＡＡＧＣＡＧＡＣＣＴＣＴＴＣＡＣＣＴＴＴＧＣ
ＴＣＡＣＣＡＴＴＴＧＴＡＧＴＣＣＡＴＣＧＧＡＴＡＴＡＴＣＴＣＣＴＴＣＧＧＡＴＣＣ
ＴＧＡＧＧＣＡＣＣＧＡＧＧＡＧＴＴＴＴＴ
配列番号４９
ＡＣＴＣＣｆＵｆＣｆＧｆＧｆＵ
配列番号５０
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡ
配列番号５１
ｒＡｒＣｒＵｒＣｒＣｒＵｒＣｒＧｒＧｒＵｒＧｒＣｒＣｒＵｒＣｒＡ
配列番号５２
ｍＡｍＣｍＵｍＣｍＣｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＣｍＵｍＣｍＡ
配列番号５３
ｍＡｍＣｍＵｍＣｍＣｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＣｒＵｒＣｒＡ
配列番号５４
ＧＴＣＴＧＣＴＴＣＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＣＡＴＴＡＧＣ
配列番号５５
ＡＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＧＡＴＣＣＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＴＣＣＧＡ
ＴＧＧＡＣＴＡＣＡＡＡＴＧＧＴＧＡＧＣＡＡＡＧＧＴＧＡＡＧＡＧ
配列番号５６
ＭＩＬＤＴＤＹＩＴＥＮＧＫＰＶＩＲＶＦＫＫＥＮＧＥＦＫＩＥＹＤＲＴＦＥＰＹＦＹ
ＡＬＬＫＤＤＳＡＩＥＤＶＫＫＶＴＡＫＲＨＧＴＶＶＫＶＫＲＡＥＫＶＱＫＫＦＬＧＲＰ
ＩＥＶＷＫＬＹＦＮＨＰＱＤＶＰＡＩＲＤＲＩＲＡＨＰＡＶＶＤＩＹＥＹＤＩＰＦＡＫＲ
ＹＬＩＤＫＧＬＩＰＭＥＧＤＥＥＬＴＭＬＡＦＤＩＥＴＬＹＨＥＧＥＥＦＧＴＧＰＩＬＭ
ＩＳＹＡＤＧＳＥＡＲＶＩＴＷＫＫＩＤＬＰＹＶＤＶＶＳＴＥＫＥＭＩＫＲＦＬＲＶＶＲ
ＥＫＤＰＤＶＬＩＴＹＮＧＤＮＦＤＦＡＹＬＫＫＲＣＥＥＬＧＩＫＦＴＬＧＲＤＧＳＥＰ
ＫＩＱＲＭＧＤＲＦＡＶＥＶＫＧＲＩＨＦＤＬＹＰＶＩＲＲＴＩＮＬＰＴＹＴＬＥＡＶＹ
ＥＡＶＦＧＫＰＫＥＫＶＹＡＥＥＩＡＱＡＷＥＳＧＥＧＬＥＲＶＡＲＹＳＭＥＤＡＫＶＴ
ＹＥＬＧＲＥＦＦＰＭＥＡＱＬＳＲＬＩＧＱＳＬＷＤＶＳＲＳＳＴＧＮＬＶＥＷＦＬＬＲ
ＫＡＹＫＲＮＥＬＡＰＮＫＰＤＥＲＥＬＡＲＲＲＧＧＹＡＧＧＹＶＫＥＰＥＲＧＬＷＤＮ
ＩＶＹＬＤＦＲＳＬＹＰＳＩＩＩＴＨＮＶＳＰＤＴＬＮＲＥＧＣＫＥＹＤＶＡＰＥＶＧＨ
ＫＦＣＫＤＦＰＧＦＩＰＳＬＬＧＤＬＬＥＥＲＱＫＩＫＲＫＭＫＡＴＶＤＰＬＥＫＫＬＬ
ＤＹＲＱＲＡＩＫＩＬＡＮＳＦＹＧＹＹＧＹＡＫＡＲＷＹＣＫＥＣＡＥＳＶＴＡＷＧＲＥ
ＹＩＥＭＶＩＲＥＬＥＥＫＦＧＦＫＶＬＹＡＤＴＤＧＬＨＡＴＩＰＧＡＤＡＥＴＶＫＫＫ
ＡＫＥＦＬＫＹＩＮＰＫＬＰＧＬＬＥＬＥＹＥＧＦＹＶＲＧＦＦＶＴＫＫＫＹＡＶＩＤＥ
ＥＧＫＩＴＴＲＧＬＥＩＶＲＲＤＷＳＥＩＡＫＥＴＱＡＲＶＬＥＡＩＬＫＨＧＤＶＥＥＡ
ＶＲＩＶＫＥＶＴＥＫＬＳＫＹＥＶＰＰＥＫＬＶＩＨＥＱＩＴＲＤＬＲＤＹＫＡＴＧＰＨ
ＶＡＶＡＫＲＬＡＡＲＧＶＫＩＲＰＧＴＶＩＳＹＩＶＬＫＧＳＧＲＩＧＤＲＡＩＰＡＤＥ
ＦＤＰＴＫＨＲＹＤＡＥＹＹＩＥＮＱＶＬＰＡＶＥＲＩＬＫＡＦＧＹＲＫＥＤＬＲＹＱＫ
ＴＫＱＶＧＬＧＡＷＬＫＶＫＧＫＫ
配列番号５７
ＭＩＬＤＴＤＹＩＴＥＤＧＫＰＶＩＲＩＦＫＫＥＮＧＥＦＫＩＤＹＤＲＮＦＥＰＹＩＹ
ＡＬＬＫＤＤＳＡＩＥＤＶＫＫＩＴＡＥＲＨＧＴＴＶＲＶＶＲＡＥＫＶＫＫＫＦＬＧＲＰ
ＩＥＶＷＫＬＹＦＴＨＰＱＤＱＰＡＩＲＤＫＩＫＥＨＰＡＶＶＤＩＹＥＹＤＩＰＦＡＫＲ

YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCGEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIGILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YLETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTVGLEIVRVDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIYEQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHRYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号５８

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFATKKKYAVIDE
EDKITTRGLKMVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEQLVIYQPITKQLHDYRARGPH
VSVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVPKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAGYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号５９

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFAYLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAALEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVNPMMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQVLAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV

PDLEARVKSVRNAAERRAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号６０

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDQPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAIATLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHKQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号６１

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAIATLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLRATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号６２

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRP
VEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILM

ISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTEREMIKRFLRVVK
EKDPDVLITYDGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGH
RFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLL
DYRQRLIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGRE
YITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKK
AMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRNWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHKQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLSAWLKPKGT

配列番号６３

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCGEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGPLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIGILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YLETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTVGLEIVRVDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIYEQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHRYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号６４

MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGEFKIELDPHFQPYIY
ALLKDDSAIEEIKAIKGERHGKTVRVLDAVKVRKKFLGRE
VEVWKLIFEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKLLAFDIETFYHEGDEFGKGEIIM
ISYADEEEARVITWKNIDLPYVDVVSNEREMIKRFVQVVK
EKDPDVIITYNGDNFDLPYLIKRAEKLGVRLVLGRDKEHP
EPKIQRMGDSFAVEIKGRIHFDLFPVVRRTINLPTYTLEA
VYEAVLGKTKSKLGAEEIAAIWETEESMKKLAQYSMEDAR
ATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSSTGNLVEWYL
LRVAYARNELAPNKPDEEEYKRRLRTTYLGGYVKEPEKGL
WENIIYLDFRSLYPSIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYDVAPI
VGYRFCKDFPGFIPSILGDLIAMRQDIKKKMKSTIDPIEK

KMLDYRQRAIKLLANSYYGYMGYPKARWYSKECAESVTAW
GRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYADTDGFYATIPGEKPELI
KKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYEGFYLRGFFVTKKRYAV
IDEEGRITTRGLEVVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKEGSV
EKAVEVVRDVVEKIAKYRVPLEKLVIHEQITRDLKDYKAI
GPHVAIAKRLAARGIKVKPGTIISYIVLKGSGKISDRVIL
LTEYDPRKHKYDPDYYIENQVLPAVLRILEAFGYRKEDLR
YQSSKQTGLDAWLKR

配列番号６５

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVRKRAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号６６

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAIATLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号６７

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRP
VEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLVPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTEREMIKRFLRVVK

EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGH
RFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLL
DYRQRRIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGRE
YITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKK
AMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHIQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLSAWLKPKGT

配列番号６８

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIYEQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号６９

MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGEFKIELDPHFQPYIY
ALLKDDSAIEEIKAIKGERHGKTVRVLDAVKVRKKFLGRE
VEVWKLIFEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKLLAFAIATFYHEGDEFGKGEIIM
ISYADEEEARVITWKNIDLPYVDVVSNERFMIKRFVQVVK
EKDPDVIITYNGDNFDLPYLIKRAEKLGVRLVLGRDKEHP
EPKIQRMGDSFAVEIKGRIHFDLFPVVRRTINLPTYTLEA
VYEAVLGKTKSKLGAEEIAAIWETEESMKKLAQYSMEDAR
ATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSSTGNLVEWYL
LRVAYARNELAPNKPDEEEYKRRLRTTYLGGYVKEPEKGL
WENIIYLDFRSLVPSIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYDVAPI
VGYRFCKDFPGFIPSILGDLIAMRQDIKKKMKSTIDPIEK
KMLDYRQRLIKLLANSYYGYMGYPKARWYSKECAESVTAW

GRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYADTDGFYATIPGEKPELI
KKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYEGFYLRGFFVTKKRYAV
IDEEGRITTRGLEVVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKEGSV
EKAVEVVRDVVEKIAKYRVPLEKLVIHEQITRDLKDYKAI
GPHVAIAKRLAARGIKVKPGTIISYIVLKGSGKISDRVIL
LTEYDPRKHKYDPDYYIENQVLPAVLRILEAFGYRKEDLR
YQSSKQTGLDAWLKR

配列番号７０

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHVEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHAIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPELIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQIELRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKV

配列番号７１

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAIATLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRRIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号７２

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRP
VEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLVPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTERFMIKRFLRVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEP

KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGH
RFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLL
DYRQRLIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGRE
YITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKK
AMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHKQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLSAWLKPKGT

配列番号７３

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFATKKKYAVIDE
EDKITTRGLKMVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEQLVIYQPITKQLHDYRARGPH
VSVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVPKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAGYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号７４

MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGEFKIELDPHFQPYIY
ALLKDDSAIEEIKAIKGERHGKTVRVLDAVKVRKKFLGRE
VEVWKLIFEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKLLAFAIATFYHEGDEFGKGEIIM
ISYADEEEEARVITWKNIDLPYYVDVVSNERERMIKRFVQVVK
EKDPDVIITYNGDNFDLPYLIKRAEKLGVRLVLGRDKEHP
EPKIQRMGDSFAVEIKGRIHFDLFPVVRRTINLPTYTLEA
VYEAVLGKTKSKLGAEEIAAIWETEESMKKLAQYSMEDAR
ATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSSTGNLVEWYL
LRVAYARNELAPNKPDEEEYKRRLRTTYLGGYVKEPEKGL
WENIIYLDFRSLVPSIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYDVAPI
VGYRFCKDFPGFIPSILGDLIAMRQDIKKKMKSTIDPIEK
KMLDYRQRAIKLLANSYYGYMGYPKARWYSKECAESVTAW
GRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYADTDGFYATIPGEKPELI

KKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYEGFYLRGFFVTKKRYAV
IDEEGRITTRGLEVVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKEGSV
EKAVEVVRDVVEKIAKYRVPLEKLVIHEQITRDLKDYKAI
GPHVAIAKRLAARGIKVKPGTIISYIVLKGSGKISDRVIL
LTEYDPRKHKYDPDYYIENQVLPAVLRILEAFGYRKEDLR
YQSSKQTGLDAWLKR

配列番号７５

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEVGWLLVVLD
YSQMGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号７６

CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTTATTGCTCAGCGG
TGGCAGCAGCCAACTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGC
AGCCGGATCTCTCGAGTTACTTATACAGTTCATCCATACC
ACCGGTACTATGGCGACCTTCTGCACGTTCATACTGTTCA
ACAATGGTATAATCCTCGTTGTGGCTGGTGATATCCAGTT
TGATATTAACATTATATGCACCAGGCAGCTGAACCGGCTT
TTTGGCTTTGTAGGTGGTTTTAACTTCTGCATCATAATGA
CCGCCATCTTTCAGCTTCAGACGCTGTTTAATTTCACCTT
TCAGTGCGCCATCTTCCGGATACATACGTTCGCTGCTTGC
TTCCCAACCCATGGTCTTTTTCTGCATAACCGGACCATCA
CTCGGAAAATTCGTGCCACGCAGTTTAACTTTATAGATAA
ATTCACCATCCTGCAGGCTGCTATCCTGTGTAACGGTAAC
AACACCACCATCTTCAAAATTCATCACACGTTCCCATTTA
AAACCTTCCGGAAAGCTCAGTTTCAGATAATCCGGGATAT
CTGCCGGATGTTTAACATAGGCTTTGCTACCATACATAAA
CTGCGGACTCAGAATATCCCATGCAAACGGCAGCGGACCA
CCTTTGGTAACTTTCAGTTTTGCGGTCTGGGTGCCTTCAT
ACGGACGACCTTCGCCTTCACCTTCAATTTCAAATTCGTG
GCCATTAACGCTACCTTCCATATGAACTTTGAAGCGCATG
AATTCTTTGATGATGGCCATATTATCCTCTTCACCTTTGC
TCACCATGCTAGCCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCC
GCTGCTGTGATGATGATGATGGCTGCTGCCCATTGAG
GCACCGAGGAGTTTTT

配列番号７７

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAIATLYHEGEEFGTGPILM

ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRRIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHIQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号７８

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVEKVQKKFLGRP
VEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVVSTEREMIKRFLRVVK
EKDPDVLITYDGDNFDFAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGQPKEKVYAEEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPQVGH
RFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLL
DYRQRLIKILANSYYGYYGYARARWYCKECAESVTAWGRE
YITMTIKEIEEKYGFKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKK
AMEFLKYINAKLPGALELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHKQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPTKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLSAWLKPKGT

配列番号７９

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL

DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYQVPPQQLAIYQPITRALQDYKAKGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGKIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号８０

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRTFIAEEGRQLVALD
YSQTGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号８１

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDIETLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSQYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRAIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号８２

MILDVDYITEEGKPVIRLFKKENGKFKIEHDRTFRPYIY
ALLRDDSKIEEVKKITGERHGKIVRIVDVEKVEKKFLGKP
ITVWKLYLEHPQDVPTIREKVREHPAVVDIFEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGEEEELKILAFDIETLYHEGEEFGKGPIIM
ISYADENEAKVITWKNIDLPYVEVVSSEREMIKRFLRIIR

EKDPDIIVTYNGDSFDFPYLAKRAEKLGIKLTIGRDGSEP
KMQRIGDMTAVEVKGRIHFDLYHVITRTINLPTYTLEAVY
EAIFGKPKEKVYADEIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKAT
YELGKEFLPMEIQLSRLVGQPLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNEVAPNKPSEEEYQRRLRESYTGGFVKEPEKGLWE
NIVYLDFRALYPSIIITHNVSPDTLNLEGCKNYDIAPQVG
HKFCKDIPGFIPSLLGHLLEERQKIKTKMKETQDPIEKIL
LDYRQKAIKLLANSFYGYYYGYAKARWYCKECAESVTAWGR
KYIELVWKELEEKFGFKVLYIDTDGLYATIPGGESEEIKK
KALEFVKYINSKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKRYAVID 10
EEGKVITRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLETILKHGDVEE
AVRIVKEVIQKLANYEIPPEKLAIYEQITRPLHEYKAIGP
HVAVAKKLAAKGVKIKPGMVIGYIVLRGDGPISNRAILAE
EYDPKKHKYDAEYYIENQVLPAVLRILEGFGYRKEDLRYQ
KTRQVGLTSWLNIKKS

配列番号８３

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM 20
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK 30
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPTQHLVIHQQITRALNDYKAIGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号８４

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE 40
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV 50

YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号８５

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLSRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDIETLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLDAVY
EVVFGKPKEKVYAEEIAQAWKSGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLL
DYRQRAIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYIKPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKCEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号８６

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRAIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIYEQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号８７

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP

KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRRIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIYIQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号８８

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVNPMMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQKLAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVRNAAERRAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号８９

MALGEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQVLAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号９０

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGEFKIEYDRTFEPYFY
ALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRAEKVQKKFLGRP
IEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDIETLYHEGEEFGTGPILM
ISYADGSEARVVTWKKIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLRVVR

EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAVFGKPKEKVYAEEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYKRNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWDN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEEKLL
DYRQRAIKFLANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRE
YIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKK
AKEFLKYINPKLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDE
EGKITTRGLEIVRRDWSEFAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIHEQITRDLRDYKATGPH
VAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADE
FDPTKHRYDAEYYIENQVLPAVERILKAFGYRKEDLRYQK
TKQVGLGAWLKVKGKK

配列番号９１

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRREYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCGEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ
YLETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYEVPPEKLVIYEQITRDLKDYKATGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPFDE
FDPAKHRYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号９２

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDVPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDIETLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL
DYRQRLIKILANSFYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQ

YIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKK
AKEFLDYINAKLPGLLELEYEGFYKRGFFVTKKKYAVIDE
EDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEA
VRIVKEVTEKLSKYQVPPQQLAIYQPITRALQDYKAKGPH
VAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGKIGDRAIPFDE
FDPAKHKYDAEYYIENQVLPAVERILRAFGYRKEDLRYQK
TRQVGLGAWLKPKT

配列番号９３

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQNIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVRRRAERMAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号９４

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGG
RVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPG
DDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSE
RLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQL
ERVLFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAALEALREAHPIVE
KILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQTATA
TGRLSSSDPNLQSIPVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALD
YSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVP
REAVNPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQKLAIPYEEAQ
AFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYV
PDLEARVKSVRQAAERRAFNMPVQGTAADLMKLAMVKLFP
RLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEAVARLAKEVMEGV
YPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

配列番号９５

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGEFKIDYDRNFEPYIY
ALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRAEKVKKKFLGRP
IEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKR
YLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAIATLYHEGEEFAEGPILM
ISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVVSTEKEMIKRFLKVVK
EKDPDVLITYNGDNFDFAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEP
KIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVY
EAIFGQPKEKVYAEEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVT
YELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSTGNLVEWFLLR
KAYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWEN
IVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDVAPQVGH
KFCKDFPGFIPSLLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLL

D Y R Q R L I K I L A N S F Y G Y Y G Y A K A R W Y C K E C A E S V T A W G R Q
Y I E T T I R E I E E K F G F K V L Y A D T D G F F A T I P G A D A E T V K K K
A K E F L D Y I N A K L P G L L E L E Y E G F Y K R G F F V T K K K Y A V I D E
E D K I T T R G L E I V R R D W S E I A K E T Q A R V L E A I L K H G D V E E A
V R I V K E V T E K L S K Y E V P P E K L V I Y K Q I T R D L K D Y K A T G P H
V A V A K R L A A R G I K I R P G T V I S Y I V L K G S G R I G D R A I P F D E
F D P A K H K Y D A E Y Y I E N Q V L P A V E R I L R A F G Y R K E D L R Y Q K
T R Q V G L G A W L K P K T

配列番号９６

／５Ｂｉｏｓｇ／ＧＣＡＣＴＴＣＧＣＴＴＣＡＣＣＴＣＴＣＴＧＣＴＴＴ

配列番号９７

ｅＧｅＣｅＡｅＧｅＡｅＧｅＡＧＧ

配列番号９８

／５ｐｈｏｓ／ＧＡｅＡｅＧｅＴｅＧｅＣ

配列番号９９

ｅＧｅＣｅＡｅＧｅＡｅＧｅＡＧＧＴＧＡＡＧＣＧＡｅＡｅＧｅＴｅＧｅＣ

配列番号１００

ｅＧｅＣｅＡｅＧｅＡｅＧｅＡＧＧＴＧＡＡＧＣ

配列番号１０１

／５Ｐｈｏｓ／ｒＧｒＵｒＣｒＵｒＧｒＣｒＵｒＵｒＣｒＧｒＣｒＡｒＣｒＣｒＡｒＡ
ｒＡｒＧｒＣｒＣｍＡｍＵｍＵｍＡｍＧｍＣ

配列番号１０２

ｒＡｒＣｒＵｒＣｒＣｒＵｒＣｒＧｒＧｒＵｒＧｒＣｒＣｒＵｒＣｒＡｒＡｒＵｒＧｒ
Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ
Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ
Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ
Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ
Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ
Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ
Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｃｒ
Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ
Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ
Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ
Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｃｒ
Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ

GrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArArGrGrUrGrAr
ArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCr
UrGrArArArGrArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrUrArUr
GrArUrGrCrArGrArArGrUrUrArArArArCrCrArCr
CrUrArCrArArArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGr
UrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUr
ArArUrGrUrUrArArUrArUrCrArArArCrUrGrGrAr
UrArUrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGr
ArUrUrArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGr
UrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArArGrGrUrCrGr
CrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGr
ArUrGrArArCrUrGrUrArUrArArGrUrArArCrUrCr
GrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArCrAr
ArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArGrCrUrGrArGr
UrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrAr
GrCrArArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCr
CrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

配列番号１０３

mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrArArUrGr
GrGrCrArGrCrArGrCrCrArUrCrArUrCrArUrCrAr
UrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCrUrGrGr
UrGrCrCrGrCrGrCrGrGrCrArGrCrCrArUrArUrGr
GrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGr
UrGrArArGrArGrGrArUrArArUrArUrGrGrCrCrAr
UrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCr
UrUrCrArArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGr
UrArGrCrGrUrUrArArUrGrGrCrCrArCrGrArArUr
UrUrGrArArArUrUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrCr
GrArArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUrArUrGrArArGrGr
CrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCrUrGrAr
ArArGrUrUrArCrCrArArArGrGrUrGrGrUrCrCrGr
CrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUr
UrCrUrGrArGrUrCrCrCrGrCrArGrUrUrUrArUrGrUr
ArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUr
ArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrCr
GrGrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUr
UrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUrUrUrArArArUrGrGr
GrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrUrUrUrGrAr
ArGrArUrGrGrUrGrGrUrGrUrUrGrUrUrArCrCrGr
UrUrArCrArCrArGrGrArUrArGrCrArGrCrCrUrGr
CrArGrGrArUrGrGrUrGrArArUrUrUrArUrCrUrAr
UrArArArGrUrUrArArArCrUrGrCrGrUrGrGrCrAr
CrGrArArUrUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUr
CrCrGrGrUrUrArUrGrCrArGrArArArArArGrArCr
CrArUrGrGrGrUrUrGrGrGrArArGrCrArArGrCrAr
GrCrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrGrArAr
GrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArArGrGrUrGrAr
ArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCr
UrGrArArArGrArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrUrArUr
GrArUrGrCrArGrArArGrUrUrArArCrCrArCrCrAr

CrUrArCrArArArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGr
UrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUr
ArArUrGrUrUrArArUrArUrCrArArArCrUrGrGrAr
UrArUrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGr
ArUrUrArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGr
UrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArArGrGrUrCrGr
CrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGr
ArUrGrArArCrUrGrUrArUrArArGrUrArArCrUrCr
GrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArCrAr
ArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArGrCrUrGrArGr 10
UrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrAr
GrCrArArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCr
CrArArArGrCrCmAmUmUmUmAmGmC
配列番号１０４
rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrA
配列番号１０５
rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArArUrGr
GrGrCrArGrCrArGrCrCrArUrCrArUrCrArUrCrAr
UrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCrUrGrGr
UrGrCrCrGrCrGrCrGrGrCrArGrCrCrArUrArUrGr 20
GrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGr
UrGrArArGrArGrGrArUrArArUrArUrGrGrCrCrAr
UrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCr
UrUrCrArArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGr
UrArGrCrGrUrUrArArArUrGrGrCrCrArCrGrArArUr
UrUrGrArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrGrCr
GrArArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUrArUrGrArArGrGr
CrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArArCrUrGrAr
ArArGrUrUrArCrCrCrArArArGrGrUrGrGrUrCrCrGr
CrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUr 30
UrCrUrGrArGrUrCrCrGrCrArGrUrUrUrArUrGrUr
ArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUr
ArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrCr
GrGrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUr
UrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUrUrUrArArArUrGrGr
GrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrUrUrUrGrAr
ArGrArUrGrGrUrGrGrUrGrUrUrGrUrUrArCrCrGr
UrUrArCrArCrArGrGrArUrArGrCrArGrCrCrUrGr
CrArGrGrArUrGrGrUrGrArArUrUrUrArUrCrUrAr
UrArArArGrUrUrArArArCrUrGrCrGrUrGrGrCrAr 40
CrGrArArUrUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUr
CrCrGrGrUrUrArUrGrCrArGrArArArArArGrArCr
CrArUrGrGrGrGrUrUrUrGrGrGrArArGrCrArArGrCrAr
GrCrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrGrArAr
GrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArArGrGrUrGrAr
ArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCr
UrGrArArArGrArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrUrArUr
GrArUrGrCrArGrArArGrUrUrArArArArCrCrArCr
CrUrArCrArArArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGr
UrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUr 50

ArArUrGrUrUrArArUrArUrCrArArArCrUrGrGrAr
UrArUrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGr
ArUrUrArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGr
UrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArArGrGrUrCrGr
CrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGr
ArUrGrArArCrUrGrUrArUrArArGrUrArArCrUrCr
GrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArCrAr
ArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArGrCrUrGrArGr
UrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrAr
GrCrArArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCr
CrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

配列番号１０６

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArAΨrGrG
rGrCrArGrCrArGrCrCrAΨrCrAΨrCrAΨrCrAΨrCrA
ΨrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCΨrGrGΨrGrCrCr
GrCrGrCrGrGrCrArGrCrCrAΨrAΨrGrGrCΨrArGrC
rAΨrGrGΨrGrArGrCrArArArGrGΨrGrArArGrArGr
GrAΨrArAΨrAΨrGrGrCrCrAΨrCrAΨrCrArArArGrA
rAΨΨrCrAΨrGrCrGrCΨΨrCrArArArGΨΨrCrAΨrAΨr
GrGrArArGrGΨrArGrCrGΨΨrArAΨrGrGrCrCrArCr
GrArAΨΨΨrGrArArAΨΨrGrArArGrGΨrGrArArGrGr
CrGrArArGrGΨrCrGΨrCrCrGΨrAΨrGrArArGrGrCr
ArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCΨrGrArArA
rGΨΨrArCrCrArArArGrGΨrGrGΨrCrCrGrCΨrGrCr
CrGΨΨΨrGrCrAΨrGrGrGrAΨrAΨΨrCΨrGrArGΨrCrC
rGrCrArGΨΨΨrAΨrGΨrAΨrGrGΨrArGrCrArArArGr
CrCΨrAΨrGΨΨrArArArCrAΨrCrCrGrGrCrArGrAΨr
AΨrCrCrCrGrGrAΨΨrAΨrCΨrGrArArArCΨrGrArGr
CΨΨΨrCrCrGrGrArArGrGΨΨΨΨrArArAΨrGrGrGrAr
ArCrGΨrGΨrGrAΨrGrArAΨΨΨΨrGrArArGrAΨrGrGΨ
rGrGΨrGΨΨrGΨΨrArCrCrGΨΨrArCrArCrArGrGrAΨ
rArGrCrArGrCrCΨrGrCrArGrGrAΨrGrGΨrGrArAΨ
ΨΨrAΨrCΨrAΨrArArArGΨΨrArArArCΨrGrCrGΨrGr
GrCrArCrGrArAΨΨΨΨrCrCrGrArGΨrGrAΨrGrGΨrC
rCrGrGΨΨrAΨrGrCrArGrArArArArArGrArCrCrAΨ
rGrGrGΨΨrGrGrGrArArGrCrArArGrCrArGrCrGrA
rArCrGΨrAΨrGΨrAΨrCrCrGrGrArArGrAΨrGrGrCr
GrCrArCΨrGrArArArGrGΨrGrArArAΨΨrArArArCr
ArGrCrGΨrCΨrGrArArGrCΨrGrArArArGrAΨrGrGr
CrGrGΨrCrAΨΨrAΨrGrAΨrGrCrArGrArArGΨΨrArA
rArArCrCrArCrCΨrArCrArArArGrCrCrArArArAr
ArGrCrCrGrGΨΨrCrArGrCΨrGrCrCΨrGrGΨrGrCrA
ΨrAΨrArAΨrGΨΨrArAΨrAΨrCrArArArCΨrGrGrAΨr
AΨrCrArCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArGrGrAΨΨ
rAΨrArCrCrAΨΨrGΨΨrGrArArCrArGΨrAΨrGrArAr
CrGΨrGrCrArGrArArGrGΨrCrGrCrCrAΨrArGΨrAr
CrCrGrGΨrGrGΨrAΨrGrGrAΨrGrArArCΨrGΨrAΨrA
rArGΨrArArCΨrCrGrArGrArGrAΨrCrCrGrGrCΨrG
rCΨrArArCrArArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArAr
GrCΨrGrArGΨΨrGrGrCΨrGrCΨrGrCrCrArCrCrGrC

ΨrGrArGrCrArAΨrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrC
rArCrCrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

配列番号１０７

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArAm1ΨrG
rGrGrCrArGrCrArGrCrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrAm1Ψr
CrAm1ΨrCrAm1ΨrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCm
1ΨrGrGm1ΨrGrCrCrGrCrGrCrGrGrCrArGrCrCrAm
1ΨrAm1ΨrGrGrCm1ΨrArGrCrAm1ΨrGrGm1ΨrGrArG
rCrArArArGrGm1ΨrGrArArGrArGrGrAm1ΨrArAm1
ΨrAm1ΨrGrGrCrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrArArArGrArA
m1Ψm1ΨrCrAm1ΨrGrCrGrCm1Ψm1ΨrCrArArArGm1Ψ
m1ΨrCrAm1ΨrAm1ΨrGrGrArArGrGm1ΨrArGrCrGm1
Ψm1ΨrArAm1ΨrGrGrCrCrArCrGrArAm1Ψm1Ψm1ΨrG
rArArAm1Ψm1ΨrGrArArGrGm1ΨrGrArArGrGrCrGr
ArArGrGm1ΨrCrGm1ΨrCrCrGm1ΨrAm1ΨrGrArArGr
GrCrArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCm1ΨrG
rArArArGm1Ψm1ΨrArCrCrArArArGrGm1ΨrGrGm1Ψ
rCrCrGrCm1ΨrGrCrCrGm1Ψm1Ψm1ΨrGrCrAm1ΨrGr
GrGrAm1ΨrAm1Ψm1ΨrCm1ΨrGrArGm1ΨrCrCrGrCrA
rGm1Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrGrGm1ΨrArGrCr
ArArArGrCrCm1ΨrAm1ΨrGm1Ψm1ΨrArArArCrAm1Ψ
rCrCrGrGrCrArGrAm1ΨrAm1ΨrCrCrCrGrGrAm1Ψm
1ΨrAm1ΨrCm1ΨrGrArArArCm1ΨrGrArGrCm1Ψm1Ψm
1ΨrCrCrGrGrArArGrGm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrArArAm1Ψr
GrGrGrArArCrGm1ΨrGm1ΨrGrAm1ΨrGrArArAm1Ψm1Ψ
m1Ψm1ΨrGrArArGrAm1ΨrGrGm1ΨrGrGm1ΨrGm1Ψm1
ΨrGm1Ψm1ΨrArCrCrGm1Ψm1ΨrArCrArCrArGrGrAm
1ΨrArGrCrArGrCrCm1ΨrGrCrArGrGrAm1ΨrGrGm1
ΨrGrArAm1Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrCm1ΨrAm1ΨrArArArGm
1Ψm1ΨrArArArCm1ΨrGrCrGm1ΨrGrGrCrArCrGrAr
Am1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrCrCrGrArGm1ΨrGrAm1ΨrGrGm1Ψ
rCrCrGrGm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrCrArGrArArArArArGr
ArCrCrAm1ΨrGrGrGrGm1Ψm1ΨrGrGrGrArArGrCrArA
rGrCrArGrCrGrArArCrGm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrC
rCrGrGrArArGrAm1ΨrGrGrCrGrCrArCm1ΨrGrArA
rArGrGm1ΨrGrArArArAm1Ψm1ΨrArArArCrArGrCrGm
1ΨrCm1ΨrGrArArGrCm1ΨrGrArArArGrAm1ΨrGrGr
CrGrGm1ΨrCrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrAm1ΨrGrCrArGrA
rArGm1Ψm1ΨrArArArArCrCrArCrCm1ΨrArCrArAr
ArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGm1Ψm1ΨrCrArGr
Cm1ΨrGrCrCrCm1ΨrGrGm1ΨrGrCrAm1ΨrAm1ΨrArAm1
ΨrGm1Ψm1ΨrArAm1ΨrAm1ΨrCrArArArCm1ΨrGrGrA
m1ΨrAm1ΨrCrArCrCrCrArGrCrCrArCrArArCrGrArG
rGrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrArCrCrAm1Ψm1ΨrGm1Ψm1ΨrGr
ArArCrArGm1ΨrAm1ΨrGrArArCrGm1ΨrGrCrArGrA
rArGrGm1ΨrCrGrCrCrCrAm1ΨrArGm1ΨrArCrCrGrGm
1ΨrGrGm1ΨrAm1ΨrGrGrAm1ΨrGrArArCm1ΨrGm1Ψr
Am1ΨrArArGm1ΨrArArCm1ΨrCrGrArGrArGrAm1Ψr
CrCrGrGrCm1ΨrGrCm1ΨrArArCrArArArGrCrCrCr
GrArArArGrGrArArGrCm1ΨrGrArGm1Ψm1ΨrGrGrC

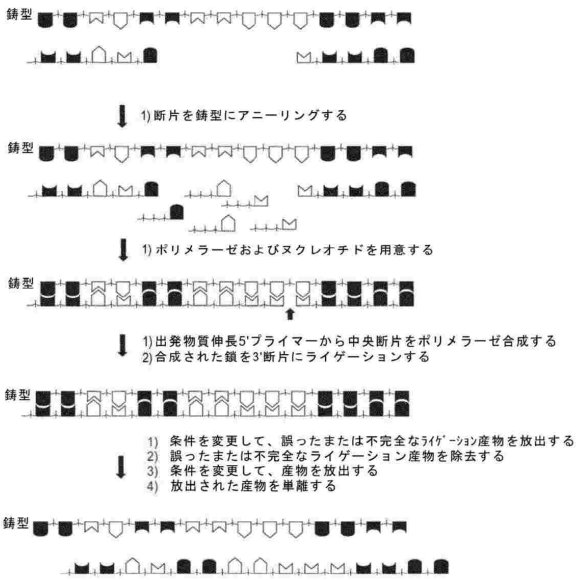
ｍ１Ψｒ Ｇｒ Ｃｍ１Ψｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｍ１Ψｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ
Ａｍ１Ψｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ａ
ｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ ＣｍＡｍＵｍＵｍＡｍＧｍＣ

配列番号１０８

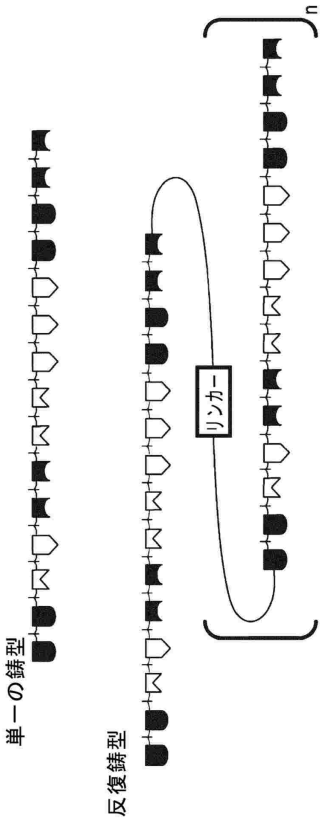
ｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ
Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ
Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ
Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ
Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ
Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ
Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ
Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｃｒ
Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ
Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ
Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ
Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｃｒ
Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ
Ｇｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ
Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｇｒ
Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ
Ａｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｃｒ
Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ Ａｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｃｒ Ａｒ
Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｇｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ Ｇｒ
Ｕｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ａｒ
Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ｕｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｇｒ Ｃｒ Ｕｒ Ｕｒ Ｃｒ Ｇｒ Ｃｒ Ａｒ Ｃｒ
Ｃｒ Ａｒ Ａｒ Ａｒ Ｇｒ Ｃｒ ＣｍＡｍＵｍＵｍＡｍＧｍＣ

【図面】

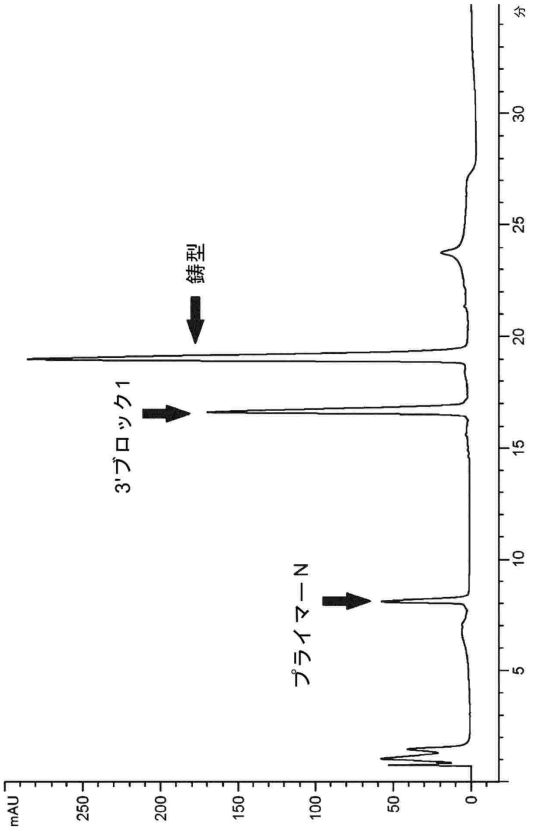
【図１】


鋳型
1)断片を鋳型にアニーリングする
鋳型
1)ポリメラーゼおよびヌクレオチドを用意する
鋳型
1)出発物質伸長5'プライマーから中央断片をポリメラーゼ合成する
2)合成された鎖を3'断片にライゲーションする
鋳型
1) 条件を変更して、誤ったまたは不完全なﾗｲｹﾞｰｼｮﾝ産物を放出する
2) 誤ったまたは不完全なライゲーション産物を除去する
3) 条件を変更して、産物を放出する
4) 放出された産物を単離する
鋳型

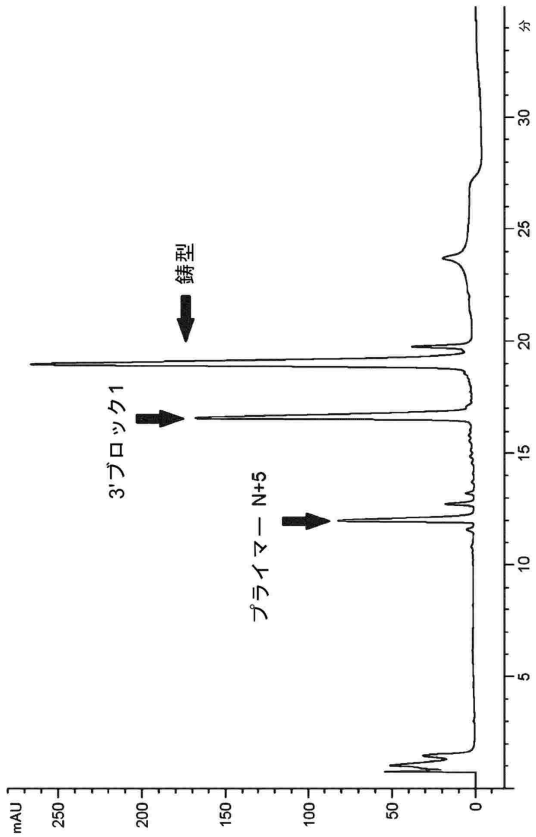
【図２】


n
リンカー
単一の鋳型
反復鋳型

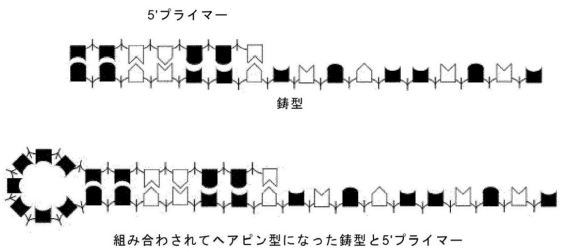
【図３ａ】



【図３ｂ】



【図４】



【配列表】

2025511938000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10
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

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, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/121500 A1 (GLAXOSMITHKLINE IP DEV LTD [GB]) 27 June 2019 (2019-06-27) the whole document, in particular the claims	1-15
Y	US 2006/068406 A1 (AFFHOLTER JOSEPH A [US] ET AL) 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document, in particular Fig. 2 and claims	1-15
Y	US 2018/318409 A1 (VALIANTE NICHOLAS [US] ET AL) 8 November 2018 (2018-11-08) the whole document, in particular [0250]	1-15
Y	US 2021/371856 A1 (CHAIKIND BRIAN [US] ET AL) 2 December 2021 (2021-12-02) the whole document, in particular [0203]	1-15

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
21 June 2023	30/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bassias, Ioannis

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059142

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2019/010530 A1 (SAAEM ISHTIAQ [US]) 10 January 2019 (2019-01-10) the whole document, in particular [0106] -----	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/059142

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. [X] forming part of the international application as filed.

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/059142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019121500 A1	27-06-2019	BR 112020012252 A2	24-11-2020
		CA 3085237 A1	27-06-2019
		CN 111479923 A	31-07-2020
		DK 3728585 T3	23-05-2022
		EP 3728585 A1	28-10-2020
		EP 4015631 A1	22-06-2022
		ES 2914591 T3	14-06-2022
		JP 7065970 B2	12-05-2022
		JP 2021507699 A	25-02-2021
		JP 2022109986 A	28-07-2022
		KR 20200099564 A	24-08-2020
		KR 20220094219 A	05-07-2022
		WO 2019121500 A1	27-06-2019
US 2006068406 A1	30-03-2006	AU 4193901 A	12-09-2001
		US 2006068406 A1	30-03-2006
		WO 0164864 A2	07-09-2001
US 2018318409 A1	08-11-2018	AU 2016341309 A1	07-06-2018
		CA 3003090 A1	27-04-2017
		CN 108430456 A	21-08-2018
		CN 114404581 A	29-04-2022
		EP 3364949 A1	29-08-2018
		JP 2018532777 A	08-11-2018
		JP 2023024669 A	16-02-2023
		MA 46255 A	31-07-2019
		US 2018318409 A1	08-11-2018
		WO 2017070618 A1	27-04-2017
US 2021371856 A1	02-12-2021	CA 3049989 A1	16-08-2018
		CN 110312797 A	08-10-2019
		EP 3580337 A1	18-12-2019
		JP 2020507312 A	12-03-2020
		KR 20190116282 A	14-10-2019
		US 2020123540 A1	23-04-2020
		US 2021371856 A1	02-12-2021
		WO 2018148511 A1	16-08-2018
US 2019010530 A1	10-01-2019	CA 3048182 A1	29-06-2017
		CN 109069667 A	21-12-2018
		EP 3393525 A1	31-10-2018
		IL 260122 A	31-07-2018
		JP 2019503712 A	14-02-2019
		US 2019010530 A1	10-01-2019
		WO 2017112731 A1	29-06-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,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,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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

弁理士　鈴木 啓靖

(72)発明者　アンドレアス、クラメリ
イギリス国ハートフォードシャー、スティーブニッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、ケアオブ、グラクソスミスクライン

(72)発明者　ダグラス、フュアースト
アメリカ合衆国ペンシルベニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、１２５０、グラクソスミスクライン

(72)発明者　ジョセフ、ハスフォード
イギリス国ハートフォードシャー、スティーブニッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミスクライン

(72)発明者　デイビッド、テュー
イギリス国ハートフォードシャー、スティーブニッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミスクライン

Ｆターム（参考）　4B064　AF27 CA21 CB30 CC24 DA20