

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-517998
(P2024-517998A)

(43)公表日 令和6年4月23日(2024.4.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	1 1 0 Z
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全42頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-508996(P2024-508996)
 (86)(22)出願日 令和4年4月26日(2022.4.26)
 (85)翻訳文提出日 令和5年12月11日(2023.12.11)
 (86)国際出願番号 PCT/US2022/026333
 (87)国際公開番号 WO2022/232134
 (87)国際公開日 令和4年11月3日(2022.11.3)
 (31)優先権主張番号 63/179,828
 (32)優先日 令和3年4月26日(2021.4.26)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
 ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(
 AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A
 T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR
 ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
 最終頁に続く

(71)出願人 523404033
 カメナ バイオサイエンス リミティド
 イギリス国, サフロン ワルデン エセッ
 クス シービー10 1エックスエル, リ
 トル チェスターフォード, ザ サイエ
 ス ピレッジ チェスターフォード リサ
 ーチ パーク
 (74)代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74)代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74)代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74)代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸のホスホラミダイトフリー酵素合成のための組成物及び方法

(57)【要約】

大規模なホスホラミダイト媒介化学合成を必要とすることなく完全に天然の核酸源を使用して任意の核酸(N A)配列を合成するための組成物及び方法が本明細書に記載される。

【選択図】図2

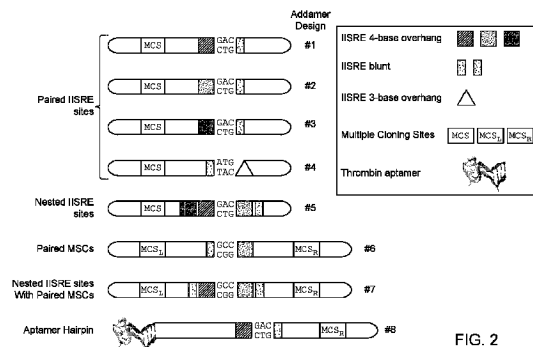


FIG. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

二本鎖アダマー(A d d a m e r)であって、

a) 第 1 の I I 型 S 制限エンドヌクレアーゼ (I I S R E) 配列と、

b) N - m e r 配列と、

c) 少なくとも第 2 の I I S R E 配列と、を含み、

前記アダマーの少なくとも一方の末端がヘアピン構造を含む、二本鎖アダマー。

【請求項 2】

前記アダマーが、前記アダマーの両末端にヘアピン構造を含む、請求項 1 に記載のアダマー。

10

【請求項 3】

前記アダマーが、

a) 第 1 の I I S R E 配列と、

b) 第 2 の I I S R E 配列と、

c) N - m e r 配列と、

d) 少なくとも第 3 の I I S R E 配列と、を含む、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載のアダマー。

【請求項 4】

前記アダマーが、

a) 第 1 の I I S R E 配列と、

b) 第 2 の I I S R E 配列と、

c) N - m e r 配列と、

d) 第 3 の I I S R E 配列と、

e) 少なくとも第 4 の I I S R E 配列と、を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のアダマー。

20

【請求項 5】

前記アダマーが多重クローニング部位 (M C S) 配列を更に含み、前記 M C S 配列が 1 つ以上の制限エンドヌクレアーゼ配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のアダマー。

【請求項 6】

前記 I I S R E 配列のうちの少なくとも 1 つが、M l y I 配列、N g o A V I I 配列、S s p D 5 I 配列、A l w I 配列、B c c I 配列、B c e f I 配列、P l e I 配列、B c e A I 配列、B c e S I V 配列、B s c A I 配列、B s p D 6 I 配列、F a u I 配列、E a r I 配列、B s p Q I 配列、B f u A I 配列、P a q C I 配列、E s p 3 I 配列、B b s I 配列、B b v I 配列、B t g Z I 配列、F o k I 配列、B s m F I 配列、B s a I 配列、B c o D I 配列、及び H g a I 配列から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のアダマー。

30

【請求項 7】

少なくとも 1 つのヘアピン構造がアダマー配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のアダマー。

40

【請求項 8】

前記アダマー配列が、p L 1 アダマー配列、トロンピン 2 9 - m e r アダマー配列、S 2 . 2 アダマー配列、A R T 1 1 7 2 アダマー配列、R 1 2 . 4 5 アダマー配列、R b 0 0 8 アダマー配列、及び 3 8 N T S E L E X アダマー配列から選択される、請求項 7 に記載のアダマー。

【請求項 9】

固体支持体に固定化された請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のアダマーを含む、組成物。

【請求項 10】

前記固体支持体がビーズである、請求項 9 に記載の組成物。

50

【請求項 1 1】

前記ビーズが、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、アガロース、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記固体支持体がウェル又はチャンバーの表面である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記ウェル又はチャンバーがマルチウェルプレートの一部である、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記アダマーが、少なくとも 1 つのアプタマー配列を含むヘアピン構造を含み、
前記固体表面が、前記アプタマー配列に結合する少なくとも 1 つのリガンドを含み、
前記アダマーが、前記少なくとも 1 つのアプタマー配列の前記少なくとも 1 つのリガンドへの結合を介して前記固体表面に固定化されている、請求項 9 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項 1 5】

前記アダマーが、少なくとも 1 つの 5' オーバーハング又は 3' オーバーハングを含み、
前記固体表面が、前記少なくとも 1 つの 5' オーバーハング又は 3' オーバーハングに相補的な一本鎖部分を有する少なくとも 1 つの一本鎖又は部分二本鎖核酸分子を含み、
前記アダマーが、前記少なくとも 1 つの 5' オーバーハング又は 3' オーバーハングを前記固体表面上の前記少なくとも 1 つの一本鎖又は部分二本鎖核酸にハイブリダイズすることによって、前記固体表面に固定化されている、請求項 9 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 1 6】

前記アダマーが、少なくとも 1 つの 5' オーバーハング又は 3' オーバーハングを含み、
前記固体表面が、前記少なくとも 1 つの 5' オーバーハング又は 3' オーバーハングに相補的な一本鎖部分を有する少なくとも 1 つの一本鎖又は部分二本鎖核酸分子を含み、
前記アダマーが、前記少なくとも 1 つの 5' オーバーハング又は 3' オーバーハングを前記固体表面上の前記少なくとも 1 つの一本鎖又は部分二本鎖核酸にハイブリダイズし、かつ前記アダマーと前記少なくとも 1 つの一本鎖又は部分二本鎖核酸をライゲートすることによって、前記固体表面に固定化されている、請求項 9 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のアダマーを生成する方法であって、
a) 第 1 の一本鎖核酸分子及び第 2 の一本鎖核酸分子を化学的に合成することであって、前記第 1 の一本鎖核酸分子の配列及び前記第 2 の一本鎖核酸分子の配列が、生成される前記アダマーの一部を含み、
前記第 1 の一本鎖核酸分子が、前記第 2 の一本鎖核酸分子上の第 2 の領域に相補的な第 1 の領域と、自己相補的な前記第 2 の領域とを含み、
前記第 2 の一本鎖核酸分子が、自己相補的な第 1 の領域と、前記第 1 の一本鎖核酸分子上の第 1 の領域に相補的な第 2 の領域とを含む、合成することと、
b) 前記第 1 の一本鎖核酸及び前記第 2 の一本鎖核酸をハイブリダイズして、部分二本鎖核酸分子を生成することと、
c) 前記部分二本鎖核酸分子をリガーゼ酵素と接触させて、ヘアピンにより両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を形成することと、を含む、方法。 40

【請求項 1 8】

ステップ (c) の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、適切にライゲートされたアダマーを精製することを更に含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ (b) の後であり、かつステップ (c) の前に、前記部分二本鎖核酸分子を MutS 酵素と接触させることを更に含む、請求項 1 7 又は請求項 1 8 に記載の方法。 50

【請求項 20】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のアダマーを生成する方法であって、

- a) 前記アダマー配列が選択的に活性化され得る 1 つ以上の DNA ザイムと両側で隣接するように、前記アダマー配列をファージミドにクローニングすることと、
- b) ヘルパーファージを使用して前記ファージミドをパッケージングされたバクテリオファージに変換することであって、前記パッケージングされたバクテリオファージが、1 つ以上の DNA ザイムと両側で隣接する前記アダマー配列を含む一本鎖 DNA を生成する、変換することと、
- c) 前記パッケージングされたバクテリオファージによって生成された前記一本鎖 DNA を精製することと、
- d) 前記精製された一本鎖 DNA の折り畳みを許可して、前記 1 つ以上の DNA ザイムの構造及び前記二本鎖アダマー配列の大部分を生成することと、
- e) 前記 1 つ以上の DNA ザイムを活性化し、それにより、前記パッケージングされたバクテリオファージによって生成された前記一本鎖 DNA から前記アダマー配列を切除することと、
- f) 前記切除されたアダマーをリガーゼ酵素と接触させることと、を含む、方法。

10

【請求項 21】

ステップ (f) の産物をエクソヌクLEASEで処理し、それにより、適切にライゲートされたアダマーを精製することを更に含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のアダマーを生成する方法であって、

- a) 前記アダマー配列をプラスミドにクローニングすることと、
- b) 好適な宿主生物中で前記プラスミドを増殖させることと、
- c) 前記宿主生物から前記プラスミドを精製することと、
- d) 前記精製されたプラスミドをニックーゼ酵素及び制限エンドヌクLEASE酵素のうちの 1 つ以上で処理して、前記プラスミドから前記アダマー配列を切除することと、
- e) 前記切除されたアダマー配列をリガーゼと接触させて、ヘアピン構造により両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を生成することと、を含む、方法。

20

【請求項 23】

標的核酸配列を含む核酸分子を合成する方法であって、

- a) 固体支持体に固定化された請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の第 1 のアダマーを提供することであって、前記第 1 のアダマーが、第 1 の I I S R E 配列、続いて第 1 の N - m e r 配列、続いて第 2 の I I S R E 配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、
- b) 固体支持体に固定化された請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の第 2 のアダマーを提供することであって、前記第 2 のアダマーが、第 3 の I I S R E 配列、続いて第 2 の N - m e r 配列、続いて第 4 の I I S R E 配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、
- c) 前記第 1 のアダマーを、前記第 1 のアダマー内に位置する前記第 2 の I I S R E 配列を切断する I I S R E と接触させ、それにより、前記固体支持体に固定化されており、かつ前記第 1 の I I S R E 配列と、前記第 1 の N - m e r 配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも 1 つとを含む第 1 の切断された産物を生成することと、
- d) 前記第 2 のアダマーを、前記第 2 のアダマー内に位置する前記第 3 の I I S R E 配列を切断する I I S R E と接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ前記第 2 の N - m e r 配列と、前記第 4 の I I S R E 配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも 1 つとを含む第 2 の切断された産物を生成することであって、前記第 2 の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、
- e) リガーゼ酵素を使用して前記第 1 の切断された産物と前記第 2 の切断された産物を

30

40

50

ライゲートして、第 1 のライゲーション産物を生成することと、

f) ステップ (e) の前記産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第 1 の切断された産物及び / 又は第 2 の切断された産物を除去することと、

g) 前記標的核酸配列を含む前記核酸分子が合成されるまで、ステップ (f) の前記産物及び / 又は請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の追加のアダマーを使用して、ステップ (a) ~ (f) の任意の組み合わせを繰り返すことと、を含む、方法。

【請求項 2 4】

前記リガーゼ酵素がヒト DNA リガーゼ III (h L i g 3) である、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 5】

前記リガーゼ酵素が T 4 DNA リガーゼである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記標的核酸配列が、少なくとも約 1 0 0、又は少なくとも約 5 0 0、又は少なくとも約 1 0 0 0、又は少なくとも約 2 0 0 0、又は少なくとも約 3 0 0 0、又は少なくとも約 4 0 0 0、少なくとも約 5 0 0 0 ヌクレオチド長である、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記標的核酸配列を含む前記合成された核酸分子が、少なくとも 8 0 % の純度を有する、請求項 2 3 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

前記標的核酸配列を含む前記合成された核酸分子が、少なくとも 9 0 % の純度を有する、請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、内容が全ての目的のために参照により全体が本明細書に組み込まれる、2 0 2 1 年 4 月 2 6 日に提出された米国仮特許出願第 6 3 / 1 7 9 , 8 2 8 号に対する優先権及びその利益を主張する。

30

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I 形式で提出されており、かつ参照により全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2 0 2 2 年 4 月 2 6 日に作成された当該 A S C I I コピーは、「D N W R - 0 0 9 _ _ 0 0 1 W O _ _ S e q L i s t . t x t」という名前であり、約 1 7 , 4 2 0 バイトのサイズである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

ホスホラミダイト媒介化学合成に関連するエラー率及び有機廃棄物の発生を著しく減少させる核酸の合成が当該技術分野で必要とされている。加えて、当該技術分野では、著しく削減されたコストでの核酸の合成が当該技術分野で必要とされている。大規模なホスホラミダイト媒介化学合成を必要とすることなく完全に天然の核酸源を使用して任意の核酸 (N A) 配列を合成するための組成物及び方法が本明細書に記載される。

40

【発明の概要】

【0 0 0 4】

本開示は、少なくとも 3 つの塩基対 (b p) のペイロードを各々有する 1 つ以上のアダマー (A d d a m e r s) を提供する。3 - m e r ドナー又はアクセプターアダマー設計の全セットは、ペイロードとして、6 4 個全ての 3 - m e r b p の可能性を含む。他の実施形態は、増加した長さのペイロードを有する類似のヘアピン設計を有する。ペイロードが 3 である場合、6 4 個の可能なアダマーが存在する。4 b p のペイロードでは、所与の

50

ライブラリ内に256個の可能なアダマーが存在する。同様に、5-merのペイロードの場合、1,024個の要素が存在し、6-merのペイロードの場合、4,096個の要素が存在する。アダマーが二本鎖であるため、様々な設計特徴の配置により、所与のライブラリに対して全ての可能なN-mer最大値よりも少ない数を使用し、依然として完全な配列カバレッジを達成することが可能である。

【0005】

アダマーは、いくつかの塩基のヘアピンターン及び短い配列のストレッチを含むことができ、これを使用して、エンドヌクレアーゼを有するヘアピン領域からのペイロードの切断をガイドすることができる。加えて、固体支持体への結合を容易にするために、ヘアピン領域は、親和性精製又は結合のためのアダマー配列、制御された自己切断のための酵素配列(DNAザイム)、固体支持体への粘着末端ライゲーションによる結合のための入れ子状エンドヌクレアーゼ認識部位、又は固体支持体結合アンカー配列へのハイブリダイゼーションによる結合のための不对合一本鎖領域などのいくつかの可能な特定の構造配列のうちの一つを含むことができる。

10

【0006】

アダマーは、様々なオーバーハング長さを可能にするか、又は所与の構築物全体が特定のより短い長さに切断されることを許可するために、様々なオフセット切断II型S制限エンドヌクレアーゼ部位を含むことができる。左側エンドヌクレアーゼ部位と右側エンドヌクレアーゼ部位の差異により、より長いNA配列が生成された際に、特定の「ドナー」対「アクセプター」アダマー中間体の生成が可能になる。当業者に理解されるであろうように、何百ものII型S制限エンドヌクレアーゼ(IISRE)が特定されている。それらは、二本鎖DNA認識部位が切断部位から分離されているという事実を特徴とする。アダマーからオリゴヌクレオチドを合成するための方法がライゲーションに依存するため、5'オーバーハングが好ましく、1、2、3、4、及び5塩基の5'オーバーハング並びに平滑末端をもたらす様々なIISREが存在する。

20

【0007】

一実施形態では、固有のアクセプター及びドナー開始ペイロードのアレイは、3-merアダマーの連続結合によって生成される。最初に、ローディング段階では、二本鎖多重クロニング部位(MCS)を有する「結合スタッド」をプリロードされた別個の固体表面を、BamHIなどの適切な制限エンドヌクレアーゼ(RE)で消化する。同様に、第1の3-merアダマーをRE消化し、「結合スタッド」にライゲートする。エクソヌクレアーゼで処理し、すすいだ後、結合したアダマー構築物を適切な平滑切断IISREで消化して、平滑末端の、露出した3-mer配列を末端に有する結合したアダマー(アクセプター)、又は露出した3-merを末端に有する遊離平滑末端アダマー(ドナー)のいずれかが得られる。ドナーアダマー含有溶液を所望のアクセプターアダマー含有ウェルに移し、これらの2つのアダマーを、平滑ライゲーションに対して60%超の高い効率を有するヒトDNAリガーゼIII(hLig3)を使用して一緒に平滑ライゲートする。ライゲートした後、エクソヌクレアーゼをウェルに適用して未反応部位を除去し、ウェルをすすぐ。この時点で、ウェルは、六量体ペイロードを有する固体支持体結合アダマーを含む(図8を参照されたい)。その後、六量体ペイロードを適切なIISREの適用により組み合わせて、アクセプターバージョン及びドナーバージョンを生成することができる。その後、ドナー溶液をアクセプターウェルに適用し、粘着末端を介してライゲートして、伸長したペイロードが得られ、その後、これをエクソヌクレアーゼで処理し、すすぎ、所望の中間ペイロードが得られる。この反応サイクルを繰り返し、所望のNA配列のペイロードが得られるまでペイロード長を増加させる(図8を参照されたい)。

30

40

【0008】

本開示は、以下の特徴：a) d二本鎖二重ヘアピン全体構造、及びb) 0、1、2、3、4、又は5bpのオーバーハングの生成を可能にする固有の左側及び右側II型S制限エンドヌクレアーゼ(RE)部位を有する、64個の可能な3-merペイロード、256個の可能な4-merペイロード、1,024個の可能な5-merペイロード、又は

50

4,096個の可能な6-merペイロードを含むアダマーライブラリを提供する。

【0009】

いくつかの態様では、ヘアピン領域は、アダマーなどの構造的特徴を含むことができ、これを使用して、いくつかの態様では、アダマーリガンドに対する分子親和性によりアダマーを固体支持体に固定することができ、ヘアピン領域は、制限エンドヌクレアーゼ切断のための制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、固体支持体に以前に固定された核酸へのアダマーライゲーションを可能にすることができる。いくつかの態様では、ヘアピン領域は、ラムダターミナーゼによって切断されて、固体支持体に以前に結合された核酸へのアダマーライゲーションを可能にするラムダファージcos部位を含むことができる。いくつかの態様では、ヘアピン領域は、固体支持体に以前に結合された核酸にハイブリダイズされ得る一本鎖領域を含むことができる。

10

【0010】

本開示は、制限エンドヌクレアーゼ切断及びその後のライゲーション後のアダマーの組み合わせに由来する核酸配列を提供する。

【0011】

本開示は、多重クローニング部位、ヘアピン構造、及び修飾されたエクソヌクレアーゼ耐性の3'末端を含む、固体支持体に結合するための5'末端修飾を有する二本鎖DNAアンカー配列を提供する。

【0012】

本開示は、適切なアダマー配列に相補的な配列及び修飾されたエクソヌクレアーゼ耐性の3'末端を含む、固体支持体に結合するための5'末端修飾を有する一本鎖DNAアンカー配列を提供する。

20

【0013】

本開示は、アダマーライブラリを生成するための方法であって、a)ヘアピンの配列及び配置、II型S制限エンドヌクレアーゼ部位、ペイロード、他の制限エンドヌクレアーゼ部位、並びに挿入切除のための標的部を含むライブラリ要素の設計、b)当該ライブラリの異なるアダマー要素の各々を単一コピーインサート又は複数コピーインサートのいずれかとして高コピー数プラスミドにクローニングすることと、c)各々のプラスミド又はバクテリオファージDNAを精製することと、d) i)ニックナーゼ、ii)適切なガイドRNAを有するCas9ニックナーゼ、及びiii)トランス作用性又はシス作用性DNAザイムのうちの少なくとも1つを使用して当該インサートを切除することと、e)当該インサートをライゲートして、アダマー構造を生成することと、f)任意選択で、当該アダマーを精製するための処理を行うことと、を含む、方法を提供する。

30

【0014】

本開示は、アダマーライブラリを生成するための方法であって、a)ヘアピンの配列及び配置、II型S制限エンドヌクレアーゼ部位、ペイロード、他の制限エンドヌクレアーゼ部位、並びに挿入除去のための標的部を含むライブラリ要素を設計することと、b)特定のアダマーの別個の上鎖及び下鎖のホスホラミダイト合成を行うことと、c)任意選択で、プレアダマー二本鎖をMutS又は類似のエラー補正酵素で処理することと、d)特定のアダマーの上鎖及び下鎖をリガーゼ酵素と接触させて、アダマー構造を生成することと、e)ステップ(d)の産物をエクソヌクレアーゼで処理して、機能的アダマーを精製することと、を含む、方法を提供する。

40

【0015】

本開示は、1つ以上のアダマーを固体支持体に結合させるための方法であって、a)5'修飾を含む二本鎖アンカー配列を固体表面上にロードすることと、b)アンカー配列のバクテリオファージラムダターミナーゼ消化を行うことと、c)1つ以上のアダマーのバクテリオファージラムダターミナーゼ消化を行うことと、d)消化された1つ以上のアダマーを消化されたアンカー配列とインキュベートすることと、e)消化された1つ以上のアダマーと消化されたアンカー配列をライゲートすることと、を含む、方法を提供する。

【0016】

50

本開示は、1つ以上のアダマーを固体支持体に結合させるための方法であって、a) 5'修飾を含む二本鎖アンカー配列を固体表面上にロードすることと、b) アンカー配列の制限エンドヌクレアーゼ消化を行うことと、c) 1つ以上のアダマーの制限エンドヌクレアーゼ消化を予形成することと、d) 消化された1つ以上のアダマー配列及び消化されたアンカー配列をインキュベートすることと、消化された1つ以上のアダマーと消化されたアンカー配列をライゲートすることと、を含む、方法を提供する。

【0017】

本開示は、アダマー配列を含む1つ以上のアダマーを固体支持体に結合させるための方法であって、a) 少なくとも1つの化学リガンドを固体支持体に結合させることであって、少なくとも1つの化学リガンドがアダマー配列に結合する、結合することと、b) 1つ以上のアダマー及び固体支持体をインキュベートし、それにより、1つ以上のアダマーを固体支持体に結合させることと、を含む、方法を提供する。

10

【0018】

本開示は、核酸を合成する方法であって、a) 1つ以上のアダマーを少なくとも1つの固体支持体に結合させることと、b) 適切なIISREによるアクセプターアダマー及びドナーアダマーの独立した制限酵素消化を行うことと、c) アクセプターアダマー反応体積を洗浄することと、d) ドナーアダマー溶液をアクセプターアダマー反応体積とインキュベートすることと、e) 消化されたドナーアダマーと消化されたアクセプターアダマーをライゲートすることと、f) エクソヌクレアーゼ消化を行うことと、g) 任意選択で、ステップ(f)の産物を洗浄することと、を含む、方法を提供する。所望の最終産物が生成されるまでa~gが繰り返されるように、結果として得られた産物を、その後のステップでアクセプターアダマー又はドナーアダマーのいずれかとして使用することができる。

20

【0019】

本開示は、二本鎖アダマーであって、当該アダマーが、a) 第1のIISRE制限エンドヌクレアーゼ(IISRE)配列、b) N-mer配列、c) 少なくとも第2のIISRE配列を含み、当該アダマーの少なくとも一方の末端がヘアピン構造を含む、二本鎖アダマーを提供する。いくつかの態様では、アダマーは、アダマーの両末端にヘアピン構造を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、a) 第1のIISRE配列、b) 第2のIISRE配列、c) N-mer配列、及びd) 少なくとも第3のIISRE配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、a) 第1のIISRE配列、b) 第2のIISRE配列、c) N-mer配列、d) 第3のIISRE配列、及びe) 少なくとも第4のIISRE配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、多重クロニング部位(MCS)配列を更に含むことができ、MCS配列は、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ配列を含む。

30

【0020】

いくつかの態様では、IISRE配列は、MlyI配列、NgoAVII配列、SspD5I配列、AlwI配列、BccI配列、BceFI配列、PleI配列、BceAI配列、BceSIV配列、BscAI配列、BspD6I配列、FauI配列、EarI配列、BspQI配列、BfuAI配列、PacCI配列、Esp3I配列、BbsI配列、BbvI配列、BtgZI配列、FokI配列、BsmFI配列、BsaI配列、BcoDI配列、及びHgaI配列から選択することができる。

40

【0021】

いくつかの態様では、ヘアピン構造は、アダマー配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマー配列は、pL1アダマー配列、トロンピン29-merアダマー配列、S2.2アダマー配列、ART1172アダマー配列、R12.45アダマー配列、Rb008アダマー配列、及び38NTSELEXアダマー配列から選択することができる。

【0022】

本開示は、固体支持体に固定化された本開示のアダマーを含む組成物を提供する。いくつかの態様では、固体支持体は、ビーズとすることができる。いくつかの態様では、ビ-

50

ズは、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、アガロース、又はそれらの任意の組み合わせを含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、ウェル又はチャンバーの表面とすることができる。いくつかの態様では、ウェル又はチャンバーは、マルチウェルプレートの一部とすることができる。

【0023】

アダマーが固体支持体に固定化されているいくつかの態様では、アダマーは、少なくとも1つのアダマー配列を含むヘアピン構造を含み、固体表面は、アダマー配列に結合する少なくとも1つのリガンドを含み、アダマーは、少なくとも1つのアダマー配列の少なくとも1つのリガンドへの結合を介して固体表面に固定化されている。

【0024】

アダマーが固体支持体に固定化されているいくつかの態様では、アダマーは、少なくとも1つの5'オーバーハング又は3'オーバーハングを含み、固体表面は、少なくとも1つの5'オーバーハング又は3'オーバーハングに相補的な一本鎖部分を有する少なくとも1つの一本鎖又は部分二本鎖核酸分子を含み、アダマーは、少なくとも1つの5'オーバーハング又は3'オーバーハングを、固体表面上の少なくとも1つの一本鎖又は部分二本鎖核酸にハイブリダイズすることによって、固体表面に固定化されている。

【0025】

アダマーが固体支持体に固定化されているいくつかの態様では、アダマーは、少なくとも1つの5'オーバーハング又は3'オーバーハングを含み、固体表面は、少なくとも1つの5'オーバーハング又は3'オーバーハングに相補的な一本鎖部分を有する少なくとも1つの一本鎖又は部分二本鎖核酸分子を含み、アダマーは、少なくとも1つの5'オーバーハング又は3'オーバーハングを、固体表面上の少なくとも1つの一本鎖又は部分二本鎖核酸にハイブリダイズし、かつアダマーと少なくとも1つの一本鎖又は部分二本鎖核酸をライゲートすることによって、固体表面に固定化されている。

【0026】

本開示は、本開示のアダマーを生成する方法であって、a)第1の一本鎖核酸分子及び第2の一本鎖核酸分子を化学的に合成することであって、第1の一本鎖核酸分子の配列及び第2の一本鎖核酸分子の配列が、生成されるアダマーの一部を含み、第1の一本鎖核酸分子が、第2の一本鎖核酸分子上の第2の領域に相補的な第1の領域と、自己相補的な第2の領域とを含み、第2の一本鎖核酸分子が、自己相補的な第1の領域と、第1の一本鎖核酸分子上の第1の領域に相補的な第2の領域とを含む、化学的に合成することと、b)第1の一本鎖核酸及び第2の一本鎖核酸をハイブリダイズして、二本鎖核酸分子を生成することと、c)二本鎖核酸分子をリガーゼ酵素と接触させて、ヘアピンにより両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を形成することと、を含む、方法を提供する。いくつかの態様では、前述の方法は、ステップ(c)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、適切にライゲートされたアダマーを精製することを更に含むことができる。いくつかの態様では、前述の方法は、ステップ(b)の後であり、かつステップ(c)の前に、部分二本鎖核酸分子をMutS酵素と接触させることを更に含むことができる。

【0027】

本開示は、本開示のアダマーを生成する方法であって、a)アダマー配列が選択的に活性化され得る1つ以上のDNAザイムと両側で隣接するように、アダマー配列をファージミドにクローニングすることと、b)ヘルパーファージを使用してファージミドをパッケージングされたバクテリオファージに変換することであって、パッケージングされたバクテリオファージが、1つ以上のDNAザイムと両側で隣接するアダマー配列を含む一本鎖DNAを生成する、変換することと、c)パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAを精製することと、d)精製された一本鎖DNAの折り畳みを許可して、1つ以上のDNAザイムの構造及び二本鎖アダマー配列の大部分を生成することと、e)1つ以上のDNAザイムを活性化し、それにより、パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAからアダマー配列を切除することと、f)切除されたアダマーをリガーゼ酵素と接触させることと、を含む、方法を提供する。

前述の方法は、ステップ (f) の産物をエクソヌクラーゼで処理し、それにより、適切にライゲートされたアダマーを精製することを更に含むことができる。

【 0 0 2 8 】

本開示は、本開示のアダマーを生成する方法であって、 a) アダマー配列をプラスミドにクローニングすることと、 b) 好適な宿主生物内でプラスミドを増殖させることと、 c) 宿主生物からプラスミドを精製することと、 d) 精製されたプラスミドを、ニックアーゼ酵素及び制限エンドヌクラーゼ酵素のうちの一つ以上、又は単に一つ以上のニックアーゼ酵素で処理して、プラスミドからアダマー配列を切除することと、 e) 切除されたアダマー配列をリガーゼと接触させて、ヘアピン構造により両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を生成することと、を含む、方法を提供する。

10

【 0 0 2 9 】

本開示は、標的核酸配列を含む核酸分子を合成する方法であって、 a) 固体支持体に固定化された本開示の第 1 のアダマーを提供することであって、第 1 のアダマーが、第 1 の I I S R E 配列、続いて第 1 の N - m e r 配列、続いて第 2 の I I S R E 配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、 b) 固体支持体に固定化された本開示のいずれか一つの第 2 のアダマーを提供することであって、第 2 のアダマーが、第 3 の I I S R E 配列、続いて第 2 の N - m e r 配列、続いて第 4 の I I S R E 配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、 c) 第 1 のアダマーを、第 1 のアダマー内に位置する第 2 の I I S R E 配列を切断する I I S R E と接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第 1 の I I S R E 配列、第 1 の N - m e r 配列、及び 3 ' オーバーハング、 5 ' オーバーハング、又は平滑末端を含む第 1 の切断された産物を生成することと、 d) 第 2 のアダマーを、第 2 のアダマー内に位置する第 3 の I I S R E 配列を切断する I I S R E と接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第 2 の N - m e r 配列、第 4 の I I S R E 配列、 3 ' オーバーハング、 5 ' オーバーハング、又は平滑末端を含む第 2 の切断された産物を生成することであって、第 2 の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、 e) リガーゼ酵素を使用して第 1 の切断された産物と第 2 の切断された産物をライゲートして、第 1 のライゲーション産物を生成することと、 f) ステップ (e) の産物をエクソヌクラーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第 1 の切断された産物及び / 又は第 2 の切断された産物を除去することと、 g) 標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ (a) ~ (f) を繰り返すことと、を含む、方法を提供する。

20

30

【 0 0 3 0 】

いくつかの態様では、リガーゼ酵素は、ヒト DNA リガーゼ I I I (h L i g 3) とすることができる。いくつかの態様では、リガーゼ酵素は、 T 4 DNA リガーゼとすることができる。

【 0 0 3 1 】

いくつかの態様では、標的核酸配列は、少なくとも約 1 0 0、又は少なくとも約 5 0 0、又は少なくとも約 1 0 0 0、又は少なくとも約 2 0 0 0、又は少なくとも約 3 0 0 0、又は少なくとも約 4 0 0 0、少なくとも約 5 0 0 0 ヌクレオチド長とすることができる。

【 0 0 3 2 】

いくつかの態様では、本開示の方法によって合成された標的核酸配列を含む核酸分子は、少なくとも 8 0 % 又は少なくとも 9 0 % の純度を有することができる。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

上記の特徴及び更なる特徴は、添付の図面と併せて以下の発明を実施するための形態からより明確に理解されるであろう。

【 0 0 3 4 】

【 図 1 】 両末端にヘアピンを含む二本鎖核酸分子である、アダマーの例示的な概略図である。

【 図 2 】 本開示の様々なアダマー設計の例示的な概略図を示す。エクソヌクラーゼ耐性

50

を促進するための固体支持体及び二重ヘアピンへの結合手段である、アダマー設計のいくつかの例が示されており、各々のアダマータイプが隣接する I I S R E 部位を有するペイロードを有する。凡例には、いくつかの可能な I I S R E 部位及び R E 部位、並びにトロンピンアダマーヘアピンが示されている。

【図 3】本開示のアダマーの 6 つの非限定的な例の配列を示す。アダマー設計は、単純なヘアピン、多重クロニング部位、及び対合 I I S R E 結合部位を含む。この事例では、各々が 1 つの平滑切断 I I S R E である M l y I を有し、これにより、3 - m e r ペイロードである N N N の末端が平滑ライゲーションのために露出したまま残される。各々の設計の左側には、下流ペイロード伸長反応のための 5 ' 4 塩基オーバーハング又は 3 塩基オーバーハング I I S R E 部位がある。図 3 に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 1 ~ 12 に記載のものに対応する。

10

【図 4】本開示のアダマーに使用するための例示的な入れ子状 I I 型 S 制限エンドヌクレアーゼ (I I S R E) 配列 (以下、「 I I S R E 配列」) を示す。図 4 に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 13 ~ 28 に記載のものに対応する。

【図 5】本開示のアダマーを生成する方法の例示的な概略図である。本方法では、2 つの別個のオリゴヌクレオチドを一緒に合成し、ハイブリダイズする。ミスマッチ塩基に結合し、かつ D N A をエクソヌクレアーゼ消化に曝露する M u t S での処理を、ライゲーションと組み合わせ、T7 エクソヌクレアーゼ消化が続く。このプロセスにより、実質的に純粋なアダマーが残る。これらのアダマーをオリゴヌクレオチド合成反応で評価し、その後、アダマーのクローン生成用の鋳型として機能することができる。図 5 に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 29 ~ 32 に記載のものに対応する。

20

【図 6】本開示のアダマーの生成に使用するためのファージミドの概略図である。このファージミド構築物は、二本鎖 D N A からバクテリオファージを生成するための情報、並びにクローン性起源の純粋なアダマーの効率的な切除のための D N A ザイムを含む。任意のペイロード長の化学的に合成されたアダマーから、F o r プライマー及び R e v プライマーを使用してインサートを生成し、ファージミドベクターにライゲートする。

【図 7 A】ファージミド及び D N A ザイムを使用して本開示のアダマーを生成する方法の例示的な概略図である。入れ子状 I I S R E (4 塩基オーバーハング部位が入れ子状になった平滑切断部位及び 4 塩基部位が入れ子状になった平滑部位) 及び対合 M C S (M S C 左及び M C S 右) を含むアダマー設計における特定のアダマー 3 - m e r ペイロード G C C の概略図を示す。この設計は、フォワード増幅プライマー部位及びリバース増幅プライマー部位 (F o r 及び R e v) 並びに D N A ザイム痕跡配列も含む。隣接する D N A ザイム対も示されている。E . c o l i 内でのバクテリオファージ増殖によって生成される一本鎖 D N A を精製し、折り畳みを許可して、D N A ザイム構造及び二本鎖アダマー配列の大部分を生成する。Z n + での処理による活性化、ライゲーション、及び T7 エクソヌクレアーゼ処理後、純粋なクローンアダマーが生成される。

30

【図 7 B】アダマー配列の二分子トランス切断除去を使用して本開示のアダマーを生成する方法の例示的な概略図である。

40

【図 8】本開示のアダマーの使用を含む、本開示の核酸を合成する方法の例示的な概略図である。最初に第 1 のアダマー及び第 2 のアダマーを、D N A ライゲーションを使用して、既に固体支持体にロードした M C S を有する結合スタッドに結合させる。ドナー構築物及びアクセプター構築物が別個の体積で生成される。ドナー構築物及びアクセプター構築物を別個の I I S R E で処理して、ライゲート可能な末端が生成される。この図では、アクセプターが R 1 I I S R E での消化によって生成され、放出された末端及び酵素がすぎによって廃棄される。ドナー構築物が紫色の L 2 酵素での消化によって生成される。ドナー構築物溶液 (L 2 酵素を有する) をアクセプターウェルに移し、2、3、又は 4 塩基粘着末端ライゲーションに対して 80 % 超の高い効率を有する T 4 D N A リガーゼを使用してライゲートする。ウェルをエクソヌクレアーゼで処理し、すすぐ。その後、結果

50

【図 9 H】27ヌクレオチド長の標的核酸分子を合成するために本開示のアダマーの使用を含む、本開示の核酸を合成する方法の例示的な概略図である。図 9 A に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 33 に記載のものに対応する。図 9 E に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 34 ~ 35 に記載のものに対応する。図 9 G に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 36 ~ 47 に記載のものに対応する。図 9 H に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 48 ~ 58 に記載のものに対応する。

【図 10】標的核酸を合成するために本開示のアダマーを使用して行われる制限酵素消化反応及びライゲーション反応のセットの概略図である。図 10 に提示される 10 個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号 59 ~ 67 に記載のものに対応する。

10

【図 11】図 10 に概説される、本開示のアダマーを使用して行われる酵素消化反応及びライゲーション反応のゲル電気泳動分析の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本開示は、特定の標的核酸配列を含む核酸分子を合成するための組成物及び方法を対象とする。本組成物は、本明細書により詳細に記載されるアダマーを含むことができる。本方法は、標的核酸配列を含む核酸分子を生成するための、連続制限酵素切断反応及びライゲーション反応におけるこれらのアダマーの使用を含むことができる。これらの方法は、本明細書により詳細に記載される。

【0036】

20

重要なことに、既存の核酸合成法とは異なり、本開示の組成物及び方法は、大規模なホスホラミダイト合成を必要としない。結果として、本開示の組成物及び方法は、既存の核酸合成法よりも安価かつ高速である。更に、本開示の組成物及び方法は、既存の核酸合成法よりも毒性の低い有機廃棄物を発生させ、それ故に、環境意識が高い。

【0037】

アダマー

本開示は、少なくとも 1 つのアダマーを含む組成物を提供する。本明細書で使用される場合、アダマーという用語は、両末端にヘアピン構造を含む二本鎖核酸分子を説明するために使用される。アダマーが固体表面に固定化されているいくつかの態様では、アダマーは、固体表面に結合していない分子の末端に位置する単一のヘアピンを含み得る。固体表面に固定化されたアダマー及び 2 つのアダマーの例示的な概略図が、図 1 に示される。アダマーは、本明細書に記載の 1 つ以上の特徴を含むことができる。

30

【0038】

いくつかの態様では、アダマーは、DNA を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなることができる。

【0039】

いくつかの態様では、アダマーは、1 つ以上の多重クローニング部位 (MCS) 配列を含むことができる。いくつかの態様では、MCS 配列は、対応する制限エンドヌクレアーゼで切断されて、3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端を生成することができる 1 つ以上の制限エンドヌクレアーゼ (RE) 配列を含むことができる。

40

【0040】

当業者に理解されるであろうように、「平滑末端」は、不対合ヌクレオチドが存在しない DNA 断片の末端を説明するために使用される。

【0041】

当業者に理解されるであろうように、5'オーバーハングという用語は、鎖の一方の 5'末端に位置する部分的二本鎖核酸分子の一本鎖部分を指すために使用される。

【0042】

当業者に理解されるであろうように、3'オーバーハングという用語は、鎖の一方の 3'末端に位置する部分的二本鎖核酸分子の一本鎖部分を指すために使用される。

【0043】

50

いくつかの態様では、アダマーは、対応する I I 型 S 制限エンドヌクレアーゼ（以下、I I S R E）で切断され得る少なくとも 1 つのオフセット切断 I I 型 S 制限エンドヌクレアーゼ（I I S R E）配列（以下、I I S R E 配列）を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、少なくとも 1 つの I I S R E 配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、少なくとも 3 つの I I S R E 配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、少なくとも 4 つの I I S R E 配列を含むことができる。

【 0 0 4 4 】

いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により「平滑末端」の作製がもたらされるような配列である。

【 0 0 4 5 】

いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により 1 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングの作製がもたらされるような配列である。いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により 2 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングの作製がもたらされるような配列である。いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により 3 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングの作製がもたらされるような配列である。いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により 4 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングの作製がもたらされるような配列である。いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により 5 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングの作製がもたらされるような配列である。いくつかの態様では、I I S R E 配列は、対応する I I S R E での切断により約 1 ヌクレオチド～約 5 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングの作製がもたらされるような配列である。

【 0 0 4 6 】

I I S R E 配列の非限定的な例に加えて、それらの対応する I I S R E、並びに I I S R E 配列及び対応する I I S R E の切断によって作製されるオーバーハング/平滑末端の説明が表 1 に示される。したがって、アダマーは、表 1 に記載の I I S R E 配列のうちの 1 つ以上を含むことができる。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. 例示的な I I S R E 配列及び対応する I I S R E

IISRE 名	IISRE 配列	オーバーハング/平滑末端の生成
MlyI	GAGTC(5/5)	平滑末端
NgoAVII	GCCGC(7/7)	平滑末端
SspD5I	GGTGA(8/8)	平滑末端
AlwI	GGATC(4/5)	1nt 5' オーバーハング
BccI	CCATC(4/5)	1nt 5' オーバーハング
BceII	ACGGC(12/13)	1nt 5' オーバーハング
PleI	GAGTC(4/5)	1nt 5' オーバーハング
BceAI	ACGGC(12/14)	2nt 5' オーバーハング
BceSIV	GCTGC(9/11)	2nt 5' オーバーハング
BscAI	GCATC(4/6)	2nt 5' オーバーハング
BspD6I	GAGTC(4/6)	2nt 5' オーバーハング
FauI	CCCGC(4/6)	2nt 5' オーバーハング
EarI	CTCTC(1/4)	3nt 5' オーバーハング
BspQI	GCTCTC(1/4)	3nt 5' オーバーハング
BfuAI	ACCTGC(4/8)	4nt 5' オーバーハング
PaqCI	CACCTGC(4/8)	4nt 5' オーバーハング
Esp3I	CGTCTC(1/5)	4nt 5' オーバーハング
BbsI	GAAGAC(2/6)	4nt 5' オーバーハング
BbvI	GCAGC(8/12)	4nt 5' オーバーハング
BtgZI	GCGATG(10/14)	4nt 5' オーバーハング
FokI	GGATG(9/13)	4nt 5' オーバーハング
BsmFI	GGGAC(10/14)	4nt 5' オーバーハング

10

20

30

40

【表 1 - 2】

BsaI	GGTCTC(1/5)	4nt 5' オーバーハング
BcoDI	GTCTC(1/5)	4nt 5' オーバーハング
HgaI	GACGC(5/10)	5nt 5' オーバーハング

50

【0047】

いくつかの態様では、アダマーの末端に位置するヘアピン構造又はヘアピン（互換的に使用される）は、少なくとも約1、又は少なくとも約2、又は少なくとも約3、又は少なくとも約4、又は少なくとも約5、又は少なくとも約6、又は少なくとも約7、又は少なくとも約8、又は少なくとも約9、又は少なくとも約10、又は少なくとも約11、又は少なくとも約12、又は少なくとも約13、又は少なくとも約14、又は少なくとも約15、又は少なくとも約16、又は少なくとも約17、又は少なくとも約18、又は少なくとも約19、又は少なくとも約20、又は少なくとも約21、又は少なくとも約22、又は少なくとも約23、又は少なくとも約24、又は少なくとも約25、又は少なくとも約26、又は少なくとも約27、又は少なくとも約28、又は少なくとも約29、又は少なくとも約30、又は少なくとも約31、又は少なくとも約32、又は少なくとも約33、又は少なくとも約34、又は少なくとも約35、又は少なくとも約36、又は少なくとも約37、又は少なくとも約38、又は少なくとも約39、又は少なくとも約40、又は少なくとも約41、又は少なくとも約42、又は少なくとも約43、又は少なくとも約44、又は少なくとも約45、又は少なくとも約46、又は少なくとも約47、又は少なくとも約48、又は少なくとも約49、又は少なくとも約50ヌクレオチドを含むことができる。

10

【0048】

上述のように、アダマーは、ヘアピン構造によりいずれかの末端がキャップされている。ヘアピン構造は、いくつかの役割を果たす。第一に、ヘアピンは、アダマーのエクソヌクレアーゼ消化に対する保護を提供する。これにより、本開示の方法における所与の反応からの未反応中間体の除去が可能になり、これにより、生成中のアダマー及びアダマー伸長後の産物の両方に純度が提供される。第二に、ヘアピン構造は、アダマーを固体支持体に結合させるための手段を提供する。これらの結合は、特定の固体支持結合リガンドに結合するアプタマーの結合によって、BamHIなどの従来のREでの消化後のMCSによるライゲーションによって、ラムダファージcos部位によるライゲーションによって、又は一本鎖固体支持体結合アンカーNAへのハイブリダイゼーションによって、直接生成される。最後に、本明細書に記載のヘアピンは、ピオチンなどの非天然修飾を必要とすることなく、アダマーの固体支持体（例えば、ビーズ）への結合を可能にする。したがって、本開示のアダマーは、完全に天然の手段を使用して合成することができ、小規模及び/又は大規模なホスホラミダイト合成の必要性を取り除く。したがって、本開示のアダマー及び方法は、核酸分子のより高速で安価な合成を可能にし、毒性の低い廃棄物を発生させることができる。

20

30

【0049】

いくつかの態様では、アダマーの末端に位置するヘアピンは、アダマーの親和性精製及び/又はアダマーの固体支持体（例えば、ビーズ）への結合を可能にする構造配列を含むことができる。

【0050】

いくつかの態様では、アダマーの末端に位置するヘアピンは、制御された自己切断を可能にする酵素配列（例えば、DNAザイム配列）を含むことができる。

40

【0051】

いくつかの態様では、アダマーの末端に位置するヘアピンは、1つ以上の制限酵素部位を含むことができる。理論に束縛されることを望むものではないが、ヘアピン内の1つ以上の制限酵素部位は、対応する制限酵素で切断されて、少なくとも1つの一本鎖オーバーハングを生成することができ、その後、これを使用して、切断されたアダマーを、少なくとも1つの一本鎖オーバーハングに相補的な核酸を含む固体支持体（例えば、ビーズ）にハイブリダイズ及び/又はライゲートすることができる。

【0052】

いくつかの態様では、アダマーの末端に位置するヘアピンは、アプタマー配列を含むことができる。理論に束縛されることを望むものではないが、アプタマー配列は、親和性精

50

製及び/又は固体支持体（例えば、ビーズ）への結合に使用することができる。アダマー配列の非限定的な例が表 2 に示される。

【表 2】

表 2. 例示的なアダマー

アダマー名	リガンド	配列
pL1	抗 PvLDH	TCGATTGGATTGTGCCGGAAGTGCTGGCTCGA(配列番号 68)
トロンビン 29-mer	抗トロンビン	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT(配列番号 69)
S2.2	抗 Muc1	CAGTTGATCCTTTGGATACCCTG(配列番号 70)
ART1172	抗 VWF	GGCGTGCAGTGCCTTCGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACG CCT(配列番号 71)
R12.45	抗アトラジン	ACCGTCTGAGCGATTCTGACTTTATTTCGGGAGGTATCAG CGGG(配列番号 72)
Rb008	抗 ATX	CCTGGACGGAACCAGAATACTTTTGGTCTCCAGG(配列番号 73)
38NT SELEX	抗 HIV_RT	AAATACCCCCCTTCGGTGCAAAGCACCGAAGGGGGGG TATTT(配列番号 74)

10

【0053】

いくつかの態様では、アダマーは、ラムダファージ c o s 部位を含むことができる。

【0054】

いくつかの態様では、アダマーは、本明細書に記載の方法のうちの 1 つを使用して合成される核酸の断片を含む「N - mer 配列」を含むことができる。「N - mer 配列」、「ペイロード」、及び「N - mer ペイロード」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

20

【0055】

いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 3 ヌクレオチド長とすることができる。いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 3 ヌクレオチド長である。3 ヌクレオチド長の N - mer 配列は、本明細書で 3 - mer と称される。

【0056】

いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 4 ヌクレオチド長とすることができる。いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 4 ヌクレオチド長である。4 ヌクレオチド長の N - mer 配列は、本明細書で 4 - mer と称される。

30

【0057】

いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 5 ヌクレオチド長とすることができる。いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 5 ヌクレオチド長である。5 ヌクレオチド長の N - mer 配列は、本明細書で 5 - mer と称される。

【0058】

いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 6 ヌクレオチド長とすることができる。いくつかの態様では、N - mer 配列は、約 6 ヌクレオチド長である。6 ヌクレオチド長の N - mer 配列は、本明細書で 6 - mer と称される。

40

【0059】

いくつかの態様では、アダマーは、MCS 配列、第 1 の I I S R E 配列、N - mer 配列、及び少なくとも第 2 の I I S R E 配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、MCS 配列、続いて第 1 の I I S R E 配列、続いて N - mer 配列、続いて少なくとも第 2 の I I S R E 配列を含むことができる。前述のアダマーの例示的な概略図が、アダマー設計番号 1 ~ 4 として図 2 に示される。図 2 に示されるアダマー設計番号 1 ~ 3 の非限定的な例では、第 1 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、N - mer 配列は、3 - mer 配列であり、少なくとも第 2 の I I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E 配列である。図 2 に示されるアダマー設計番号 4 の非限定的な例では、第 1 の I

50

I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E 配列であり、N - m e r 配列は、3 - m e r 配列であり、少なくとも第 2 の I I S R E 配列は、切断されたときに 3 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列である。

【 0 0 6 0 】

いくつかの態様では、アダマーは、M C S 配列、第 1 の I I S R E 配列、第 2 の I I S R E 配列、N - m e r 配列、第 3 の I I S R E 配列、及び少なくとも第 4 の I I S R E 配列を含むことができる。いくつかの態様では、M C S 配列、続いて第 1 の I I S R E 配列、続いて第 2 の I I S R E 配列、続いて N - m e r 配列、続いて第 3 の I I S R E 配列、続いて少なくとも第 4 の I I S R E 配列を含むことができる。前述のアダマーの例示的な概略図が、アダマー設計番号 5 として図 2 に示される。図 2 に示されるアダマー設計番号 5 の非限定的な例では、第 1 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、第 2 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、N - m e r 配列は、3 - m e r 配列であり、第 3 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、少なくとも第 4 の I I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E 配列である。

10

【 0 0 6 1 】

いくつかの態様では、アダマーは、第 1 の M C S 配列、第 1 の I I S R E 配列、N - m e r 配列、少なくとも第 2 の I I S R E 配列、及び少なくとも第 2 の M C S 配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、第 1 の M C S 配列、続いて第 1 の I I S R E 配列、続いて N - m e r 配列、続いて少なくとも第 2 の I I S R E 配列、続いて少なくとも第 2 の M C S 配列を含むことができる。前述のアダマーの例示的な概略図が、アダマー設計番号 6 として図 2 に示される。図 2 に示されるアダマー設計番号 6 の非限定的な例では、第 1 の I I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E 配列であり、N - m e r 配列は、3 - m e r 配列であり、少なくとも第 2 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列である。

20

【 0 0 6 2 】

いくつかの態様では、アダマーは、第 1 の M C S 配列、第 1 の I I S R E 配列、第 2 の I I S R E 配列、N - m e r 配列、第 3 の I I S R E 配列、少なくとも第 4 の I I S R E 配列、及び少なくとも第 2 の M C S 配列を含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、第 1 の M C S 配列、続いて第 1 の I I S R E 配列、続いて第 2 の I I S R E 配列、続いて N - m e r 配列、続いて第 3 の I I S R E 配列、続いて少なくとも第 4 の I I S R E 配列、続いて少なくとも第 2 の M C S 配列を含むことができる。前述のアダマーの例示的な概略図が、アダマー設計番号 7 として図 2 に示される。図 2 に示されるアダマー設計番号 7 の非限定的な例では、第 1 の I I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E 配列であり、第 2 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、N - m e r 配列は、3 - m e r 配列であり、第 3 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、少なくとも第 4 の I I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E 配列である。

30

40

【 0 0 6 3 】

いくつかの態様では、アダマーは、アダマー配列、第 1 の I I S R E 配列、N - m e r 配列、少なくとも第 2 の I I S R E 配列、及び M C S 配列を含むヘアピンを含むことができる。いくつかの態様では、アダマーは、アダマー配列、続いて第 1 の I I S R E 配列、続いて N - m e r 配列、続いて少なくとも第 2 の I I S R E 配列、続いて M C S 配列を含むヘアピンを含むことができる。前述のアダマーの例示的な概略図が、アダマー設計番号 7 として図 2 に示される。図 2 に示されるアダマー設計番号 7 の非限定的な例では、アダマー配列は、トロンピンアダマー配列であり、第 1 の I I S R E 配列は、切断されたときに 4 ヌクレオチド長の 5 ' オーバーハングを作製する I I S R E 配列であり、N

50

-mer 配列は、3-mer 配列であり、少なくとも第2の I I S R E 配列は、切断されたときに平滑末端を作製する I I S R E である。

【0064】

図3は、アダマーの6つの非限定的な例の配列を示す。図3に示されるアダマーは各々、単純なヘアピンターンでキャップされている。図3に示されるアダマーは各々、M C S 配列、第1の I I S R E 配列、N-mer 配列（「N」で示される）、及び第2の I I S R E 配列を含む。具体的には、図3のアダマーに示されるN-mer 配列は、3-mer 配列であり、I I S R E 配列は、B b s I、M l y I、B t g Z I、B f u A I、P a q C I、F o k I、及びE a r Iから選択される。

【0065】

2つの I I S R E 配列がアダマー内で互いに隣接して含まれている場合、これらの I I S R E 配列は、「入れ子状 I I S R E 配列」又は「入れ子状 I I S R E 部位」と呼ぶことができる。いくつかの態様では、入れ子状 I I S R E 配列は、互いに直接隣接する2つの I I S R E 配列を含むことができる。いくつかの態様では、入れ子状 I I S R E 配列は、互いに隣接しているが、約1~約10ヌクレオチド離れている2つの I I S R E 配列を含むことができる。

【0066】

理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの I I S R E 部位が第1の部位とペイロードとの間の他の I I S R E 部位に適合するようにそれらの認識部位から十分に離間された切断部位を有するため、I I S R E 部位を入れ子状にすることが可能である（図4を参照されたい）。したがって、いくつかの態様では、アダマーは、ペイロード（N-mer 配列）の両側に固有の平滑切断部位及び4塩基オーバーハング部位を含むことができる。理論に束縛されることを望むものではないが、これにより、日常的な核酸生成を行うのに必要とされるアダマー試薬の数が有意に減少する。

【0067】

理論に束縛されることを望むものではないが、入れ子状 I I S R E 配列をアダマーに含めることにより、本開示の方法において2つの別個の部位を有する同じ位置で切断するためのいくつかの選択肢が提供される。2つの別個の部位を有する同じ位置で切断する選択肢は、一般的な核酸合成のためにライブラリ（以下を参照されたい）で必要とされる別個のアダマーの数を減少させることができる。図4は、入れ子状 B b v I 部位及び B b s I 部位を含む、入れ子状 I I S R E 部位の非限定的な例を示す。図4は、本明細書に記載のアダマーのヘアピンに含めることができるアダマー配列の3つの非限定的な例も示す。

【0068】

いくつかの態様では、アダマーは、増幅プライマーの同族配列を含むが、これに限定されない、クローニングを容易にするために当該技術分野で既知の任意の要素を含むことができる。理論に束縛されることを望むものではないが、増幅プライマーの同族配列をアダマーに含めることにより、クローン増殖のための特定のアダマー設計の回復が可能になり得る。

【0069】

いくつかの態様では、アダマーは、プラスミド又はバクテリオファージ内での発酵によるアダマーの大規模な生成を容易にするために当該技術分野で既知の任意の要素を含むことができる。かかる要素には、DNAザイム痕跡に対応する配列、及び/又はある特定のDNAザイムを使用した切除後のアダマーの円滑な折り畳みを容易にする配列が含まれるが、これらに限定されない（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、P r a e t o r i u s e t a l . , N a t u r e , 2 0 1 7 , 5 5 2 , 8 4 - 8 7 を参照されたい）。

【0070】

アダマーライブラリ

本開示は、複数のアダマーを含むアダマーライブラリを提供し、これらの複数のアダマーは、1つ以上の異なるアダマー種（すなわち、固有の配列を有するアダマー）を含む。

10

20

30

40

50

【0071】

本開示は、複数のアダマーを含む3-merアダマーライブラリを提供し、これらの複数のアダマーは、少なくとも64個の異なるアダマー種を含み、これらのアダマー種は各々、アデニン、サイトシン、グアニン、及びチミン($4 \times 4 \times 4 = 64$)で作製され得る64個の可能な3-mer配列のうちの一つを含む。

【0072】

本開示は、複数のアダマーを含む4-merアダマーライブラリを提供し、これらの複数のアダマーは、少なくとも256個の異なるアダマー種を含み、これらのアダマー種は各々、アデニン、サイトシン、グアニン、及びチミン($4 \times 4 \times 4 \times 4 = 256$)で作製され得る256個の可能な4-mer配列のうちの一つを含む。

10

【0073】

本開示は、複数のアダマーを含む5-merアダマーライブラリを提供し、これらの複数のアダマーは、少なくとも1,024個の異なるアダマー種を含み、これらのアダマー種は各々、アデニン、サイトシン、グアニン、及びチミン($4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 1,024$)で作製され得る1,024個の可能な5-mer配列のうちの一つを含む。

【0074】

本開示は、複数のアダマーを含む6-merアダマーライブラリを提供し、これらの複数のアダマーは、少なくとも256個の異なるアダマー種を含み、これらのアダマー種は各々、アデニン、サイトシン、グアニン、及びチミン($4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 4,096$)で作製され得る256個の可能な6-mer配列のうちの一つを含む。

20

【0075】

アダマーを生成する方法

本明細書に記載のアダマーは、図5に概略的に示される方法において化学的に合成された核酸を使用して生成することができる。この方法では、第1の一本鎖核酸分子及び第2の一本鎖核酸分子は、(例えば、ホスホラミダイト合成を使用して)化学的に合成される。図5の上パネルに示されるように、第1の一本鎖核酸分子は、第2の一本鎖核酸分子上の第2の領域に相補的な第1の領域と、自己相補的な第2の領域とを含み、第2の一本鎖核酸分子は、自己相補的な第1の領域と、第1の一本鎖核酸分子上の第1の領域に相補的な第2の領域とを含む。その後、第1の一本鎖核酸分子及び第2の一本鎖核酸分子が一緒にハイブリダイズされて、部分二本鎖核酸分子が生成される。その後、部分二本鎖核酸分子が、任意選択で、ミスマッチ塩基に結合し、かつDNAをエクソヌクラーゼ消化に曝露する酵素MutSと接触することができる。その後、部分二本鎖核酸分子がリガーゼ酵素と接触して、ヘアピンにより両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を形成することができる。リガーゼ酵素との接触後、産物がT7エクソヌクラーゼと接触して、適切に形成されたアダマーを精製及び濃縮することができる。

30

【0076】

理論に束縛されることを望むものではないが、化学的に合成された一本鎖核酸分子を使用してアダマーを生成する前述の方法により、新たなアダマー設計を試験するための迅速な所要時間が可能になる。理論に束縛されることを望むものではないが、前述の方法を使用して生成されたアダマーは、プラスミド又はバクテリオファージを使用するアダマーのクローン生成を含むが、これに限定されない、ホスホラミダイト合成を必要としない方法を使用して、前述のアダマーの大規模な生成のための鋳型として使用することができる。

40

【0077】

したがって、本開示は、本明細書に記載のアダマーを生成する方法であって、a)第1の一本鎖核酸分子及び第2の一本鎖核酸分子を提供することであって、第1の一本鎖核酸分子の配列及び第2の一本鎖核酸分子の配列が、生成されるアダマーの一部を含み、第1の一本鎖核酸分子が、第2の一本鎖核酸分子上の第2の領域に相補的な第1の領域と、自己相補的な第2の領域とを含み、第2の一本鎖核酸分子が、自己相補的な第1の領域と、第1の一本鎖核酸分子上の第1の領域に相補的な第2の領域とを含む、提供することと、

50

b) 第1の一本鎖核酸及び第2の一本鎖核酸をハイブリダイズして、部分二本鎖核酸分子を生成することと、c) 部分二本鎖核酸分子をリガーゼ酵素と接触させて、ヘアピンにより両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を形成することと、を含む、方法を提供する。

【0078】

したがって、本開示は、本明細書に記載のアダマーを生成する方法であって、a) 第1の一本鎖核酸分子及び第2の一本鎖核酸分子を化学的に合成することであって、第1の一本鎖核酸分子の配列及び第2の一本鎖核酸分子の配列が、生成されるアダマーの一部を含み、第1の一本鎖核酸分子が、第2の一本鎖核酸分子上の第2の領域に相補的な第1の領域と、自己相補的な第2の領域とを含み、第2の一本鎖核酸分子が、自己相補的な第1の領域と、第1の一本鎖核酸分子上の第1の領域に相補的な第2の領域とを含む、化学的に合成することと、b) 第1の一本鎖核酸及び第2の一本鎖核酸をハイブリダイズして、部分二本鎖核酸分子を生成することと、c) 部分二本鎖核酸分子をリガーゼ酵素と接触させて、ヘアピンにより両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を形成することと、を含む、方法を提供する。

【0079】

いくつかの態様では、前述の方法は、ステップ(c)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、適切にライゲートされたアダマーを精製することを更に含むことができる。

【0080】

いくつかの態様では、前述の方法は、ステップ(b)の後であり、かつステップ(c)の前に、部分二本鎖核酸分子をMutS酵素と接触させることを更に含むことができる。

【0081】

本明細書に記載のアダマーは、図6及び図7Aに概略的に示されるファージミドベースの方法を使用して生成することができる(各々全ての目的のために参照により全体が本明細書に組み込まれる、Praetorius et al., Nature, 2017, 552, 84-87、及び米国特許出願公開第US20190203242A1号も参照されたい)。この方法では、アダマー配列は、図6に示されるように、ファージミド(例えば、pBluescript又は当該技術分野で既知の任意の他のファージミド)にクローニングされる。アダマー配列は、図6及び図7Aの上パネルに示されるように、(例えば、DNAザイムを Zn^{2+} と接触させることによって)選択的に活性化され得る1つ以上のDNAザイムと両側で隣接する。その後、ファージミドは、当業者に周知の方法によって、ヘルパーファージを使用してM13パッケージングバクテリオファージに変換される。M13パッケージングバクテリオファージは、図7Aの上パネルに示されるように、アダマー配列及び隣接するDNAザイムを含む一本鎖DNAを生成する。図7Aの上から2番目のパネルに示されるように、バクテリオファージによって生成される一本鎖DNAが精製され、折り畳みを許可して、DNAザイム構造及び二本鎖アダマー配列の大部分を生成する。その後、図7Aの下から2番目のパネルに示されるように、DNAザイムが(例えば、DNAザイムを Zn^{2+} と接触させることによって)活性化され、バクテリオファージによって生成された一本鎖DNAからアダマー配列を切除する。DNAザイム切断後、図7Aの下パネルに示されるように、アダマーの折り畳みが許可され、その後、リガーゼと接触して、アダマーを閉じる。任意選択で、ライゲーション反応の産物をT7エクソヌクレアーゼで処理することによって除去することができる。図7Aに示される例示的なアダマーは、第1のMCS配列、続いて第1のIISRE配列、続いて第2のIISRE配列、続いてN-mer配列、続いて第3のIISRE配列、続いて第4のIISRE配列、続いて第2のMCS配列を含む。図7A中のアポストロフィーは、アダマーが自己相補的であり、かつヘアピンドメインにより両末端がキャップされた二本鎖構造を形成するような逆相補配列を意味する。

【0082】

50

あるいは、類似のバクテリオファージDNA調製物が、 Zn^{2+} によって活性化されたM13 DNAにハイブリダイズされたトランス作用性DNAザイム要素で処理され、その後、非自己切断様式でアダマーを切除することができる。当業者に理解されるであろうように、DNAザイムは二分子試薬として作用することが示されている（内容が参照により全体が本明細書に組み込まれる、Gu, et al., Journal of the American Chemical Society, 2013, 135, 24, 9121-9129を参照されたい）。したがって、いくつかの態様では、アダマー切除は、トランスで提供され、バクテリオファージ調製物にハイブリダイズされ、かつ Zn^{2+} で活性化されるヘミ-DNAザイム配列を用いて達成することができる（図7Bを参照されたい）。

10

【0083】

本開示は、本明細書に記載のアダマーを生成する方法であって、a)アダマー配列が選択的に活性化され得る1つ以上のDNAザイムと両側で隣接するように、アダマー配列をファージミドにクローニングすることと、b)ヘルパーファージを使用してファージミドをパッケージングされたバクテリオファージに変換することと、c)パッケージングされたバクテリオファージが、1つ以上のDNAザイムと両側で隣接するアダマー配列を含む一本鎖DNAを生成する、変換することと、d)パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAを精製することと、e)精製された一本鎖DNAの折り畳みを許可して、1つ以上のDNAザイムの構造及び二本鎖アダマー配列の大部分を生成することと、f)1つ以上のDNAザイムを活性化し、それにより、パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAからアダマー配列を切除することと、g)切除されたアダマーをリガーゼ酵素と接触させることと、を含む、方法を提供する。

20

【0084】

本開示は、本明細書に記載のアダマーを生成する方法であって、a)アダマー配列が選択的に活性化され得るDNAザイムの1つ以上の第1の部分と両側で隣接するように、アダマー配列をファージミドにクローニングすることと、b)ヘルパーファージを使用してファージミドをパッケージングされたバクテリオファージに変換することと、c)パッケージングされたバクテリオファージが、1つ以上のDNAザイムと両側で隣接するアダマー配列を含む一本鎖DNAを生成する、変換することと、d)パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAを精製することと、e)精製された一本鎖DNAの折り畳みを許可して、1つ以上のDNAザイムの構造及び二本鎖アダマー配列の大部分を生成することと、f)精製された一本鎖DNAを、DNAザイムの第2の部分を含む1つ以上のオリゴヌクレオチドと接触させることと、g)1つ以上のオリゴヌクレオチドが精製された一本鎖DNAにハイブリダイズし、これにより、1つ以上の完全なDNAザイムが形成されるようになる、接触させることと、h)1つ以上のDNAザイムを活性化し、それにより、パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAからアダマー配列を切除することと、i)切除されたアダマーをリガーゼ酵素と接触させることと、を含む、方法を提供する。

30

【0085】

本開示は、本明細書に記載のアダマーを生成する方法であって、a)アダマー配列が選択的に活性化され得るDNAザイムの1つ以上の第1の部分と両側で隣接するように、アダマー配列をファージミドにクローニングすることと、b)ヘルパーファージを使用してファージミドをパッケージングされたバクテリオファージに変換することと、c)パッケージングされたバクテリオファージが、1つ以上のDNAザイムと両側で隣接するアダマー配列を含む一本鎖DNAを生成する、変換することと、d)パッケージングされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAを精製することと、e)精製された一本鎖DNAを、DNAザイムの第2の部分を含む1つ以上のオリゴヌクレオチドと接触させることと、f)1つ以上のオリゴヌクレオチドが精製された一本鎖DNAにハイブリダイズし、これにより、1つ以上の完全なDNAザイムが形成されるようになる、接触さ

40

50

せることと、e) ステップ(d)の産物の折り畳みを許可して、二本鎖アダマー配列の大部分を生成することと、f) 1つ以上のDNAザイムを活性化し、それにより、パッケージされたバクテリオファージによって生成された一本鎖DNAからアダマー配列を切除することと、g) 切除されたアダマーをリガーゼ酵素と接触させることと、を含む、方法を提供する。

【0086】

いくつかの態様では、前述の方法は、切除されたアダマーをリガーゼ酵素で処理した後、当該産物を少なくとも1つのエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、適切にライゲートされたアダマーを精製することを更に含むことができる。

【0087】

本明細書に記載のアダマーは、プラスミドベースの方法を使用して生成することができる。プラスミドベースの方法では、アダマーは、大規模で増殖及び精製され得るプラスミド(例えば、細菌及び/又は酵母)にクローニングされる。その後、アダマー配列を含む精製されたプラスミドが1つ以上のニカーゼ酵素(例えば、適切なガイドRNAを有するCas9ニカーゼ)及び/又は制限エンドヌクレアーゼ酵素で処理されて、プラスミドからアダマー配列を切除して、各々の末端にDNAフラップを有する二本鎖アダマーを得ることができる。その後、DNAフラップを有する二本鎖アダマーが1つ以上のリガーゼ酵素で処理されて、ヘアピン構造により両末端がキャップされた二本鎖アダマーを生成することができる。

【0088】

したがって、本開示は、本明細書に記載のアダマーを生成する方法であって、a) アダマー配列をプラスミドにクローニングすることと、b) 好適な宿主生物内でプラスミドを増殖させることと、c) 宿主生物からプラスミドを精製することと、d) 精製されたプラスミドをニカーゼ酵素及び制限エンドヌクレアーゼ酵素のうち1つ以上で処理して、プラスミドからアダマー配列を切除することと、e) 切除されたアダマー配列をリガーゼと接触させて、ヘアピン構造により両末端がキャップされた二本鎖アダマー構造を生成することと、を含む、方法を提供する。

【0089】

本明細書に記載のアダマーを生成するための方法を使用して、3-merアダマーライブラリ、4-merアダマーライブラリ、5-merアダマーライブラリ、及び6-merアダマーライブラリを含むが、これらに限定されない、アダマーライブラリを生成することができる。

【0090】

いくつかの態様では、6-merアダマーライブラリは、3-merアダマーライブラリから生成され得る。理論に束縛されることを望むものではないが、可能な六量体の総数は多いが、六量体ペイロードは、オリゴヌクレオチド合成に非常に有用なアダマータイプである。加えて、これにより、左側三量体要素でコードされたIISRE部位と右側三量体要素でコードされたIISRE部位との間の定期的な切り替えが可能になる。非限定的な例では、初期ライブラリは、最初に、従来ホスホラミダイト合成を使用して、64個の要素三量体アダマーのライブラリが個別に又はDNAマイクロプール中の完全なセットとして生成される。アダマー三量体ライブラリのプールは、まとめてバクテリオファージにクローニングされるか、又はインピボで増幅される。左側及び右側アダマー三量体ライブラリが調製され、消化されて、ペイロード部位に平滑末端が生成される。その後、右側ライブラリと左側ライブラリがライゲートされて、アダマーの大きいプールが形成される。ライゲートされていない物質は、エクソヌクレアーゼによって消化される。その後、残りのインタクトなアダマーが鋳型として使用されて、PCRによって特定の六量体アダマーが増幅される。その後、各々の独立した六量体PCR産物を適切な規模での生成のためにバクテリオファージにクローニングすることができ、将来使用するために保管することもできる。

【0091】

10

20

30

40

50

本開示のアダマーを使用した核酸合成法

本明細書に記載のアダマーは、本明細書に記載の方法で使用されて、任意の標的核酸配列を含む核酸分子を合成することができる。

【0092】

いくつかの態様では、標的核酸配列は、少なくとも約100、又は少なくとも約200、又は少なくとも約300、又は少なくとも約500、又は少なくとも約600、又は少なくとも約700、又は少なくとも約800、又は少なくとも約900、又は少なくとも約1000、又は少なくとも約1500、又は少なくとも約2000、又は少なくとも約2500、又は少なくとも約3000、又は少なくとも約3500、又は少なくとも約4000、又は少なくとも約4500、又は少なくとも約5000ヌクレオチド長とすることができる。いくつかの態様では、標的二本鎖核酸は、少なくとも1つのホモポリマー配列を含むことができる。

10

【0093】

いくつかの態様では、標的核酸配列は、少なくとも1つのホモポリマー配列を含むことができる。本明細書で使用される場合、ホモポリマー配列という用語は、一塩基の反復又は小さいモチーフの反復を含むが、これらに限定されない、任意のタイプの反復核酸配列を指すために使用される。いくつかの態様では、ホモポリマー配列は、少なくとも約10ヌクレオチド、又は少なくとも約20ヌクレオチド、又は少なくとも約30ヌクレオチド、又は少なくとも約40ヌクレオチド、又は少なくとも約50ヌクレオチド、又は少なくとも約60ヌクレオチド、又は少なくとも約70ヌクレオチド、又は少なくとも約80ヌクレオチド、又は少なくとも約90ヌクレオチド、又は少なくとも約100ヌクレオチド長とすることができる。

20

【0094】

いくつかの態様では、標的核酸配列は、少なくとも約10%、又は少なくとも約20%、又は少なくとも約50%、又は少なくとも約のGC含有量を有することができる。

【0095】

本開示の合成法の一部として、1つ以上のアダマーを固体支持体に固定化することができる。固体支持体は、少なくとも1つのビーズを含むが、これに限定されない、当該技術分野で既知の任意の固体支持体とすることができる。いくつかの態様では、少なくとも1つのビーズは、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、アガロース、又はそれらの任意の組み合わせを含むことができる。いくつかの態様では、少なくとも1つのビーズは、磁性とすることができる。いくつかの態様では、固体支持体は、ウェル又はチャンバーを含む。いくつかの態様では、固体支持体は、複数のウェル又はチャンバーを含むことができる。いくつかの態様では、複数のウェルは、マルチウェルプレートを含む。いくつかの態様では、固体支持体は、ガラスを含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、ガラススライドを含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、石英を含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、石英スライドを含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、ポリスチレンを含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、ポリスチレンスライドを含むことができる。いくつかの態様では、固体支持体は、コーティングを含むことができ、コーティングは、望ましくないタンパク質、望ましくない核酸、又は他の望ましくない生体分子の非特異的結合を防止する。いくつかの態様では、コーティングは、ポリエチレングリコール(PEG)を含むことができる。いくつかの態様では、コーティングは、トリエチレングリコール(TEG)を含むことができる。

30

40

【0096】

アダマーがアダマー配列を含むヘアピンを含むいくつかの態様では、アダマーは、アダマー配列への結合を介して固体支持体に固定化することができる。すなわち、固体支持体は、アダマー上のアダマー配列に結合する少なくとも1つの部分を含むことができる。したがって、アダマーが表2に記載のアダマー配列のうちの1つを含むヘアピンを含む非限定的な例では、固体支持体は、表2に列記される対応するリガンドを含むことが

50

できる。

【0097】

アダマーがMCS配列を含むいくつかの態様では、アダマーは、a) アダマーを少なくとも1つの対応する制限エンドヌクレアーゼと接触させてMCS配列を切断し、それにより、5'オーバーハング又は3'オーバーハングを生成することと、b) 5'オーバーハング又は3'オーバーハングを固体支持体上の相補的な一本鎖核酸分子にハイブリダイズし、それにより、アダマーを固体支持体に固定化することとを含む方法によって、固体支持体に固定化することができる。前述の方法は、固体支持体上の相補的な一本鎖核酸分子にハイブリダイズされたアダマーをリガーゼと接触させ、それにより、アダマーと固体支持体上の相補的な一本鎖核酸分子をライゲートすることを更に含むことができる。

10

【0098】

アダマーがMCS配列を含むいくつかの態様では、アダマーは、a) アダマーを少なくとも1つの対応する制限エンドヌクレアーゼと接触させてMCS配列を切断し、それにより、平滑末端を生成することと、b) アダマーの平滑末端を固体支持体上に位置する核酸分子にライゲートし、それにより、アダマーを固体支持体に固定化することとを含む方法によって、固体支持体に固定化することができる。

【0099】

いくつかの態様では、固体支持体に結合したアダマーは、本明細書で「結合スタッド」と称することができる。

【0100】

本開示の核酸合成法の概略図が図8に示される。

20

【0101】

本方法の第1のステップでは、固体支持体(図8ではビーズ又は表面として示されている)上に固定化されたアダマーが提供される。このアダマーは、本明細書で「結合スタッド」と称され、上述の方法のうちのいずれかを使用して一方の末端が固体支持体に接続されており、他方の末端がヘアピンでキャップされている。結合スタッドは、MCS配列も含む。本方法の次のステップでは、結合スタッドが、MCS配列を切断する制限エンドヌクレアーゼと接触し、それにより、3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端が生成される。本方法の次のステップでは、MCS配列、第1のIISRE配列(図8では「L1」として示されている)、第1のN-mer配列(図8では「ペイロード番号1」として示されている)、及び第2のIISRE配列(図8では「R1」として示されている)を含む第1のアダマーが、MCS配列を切断する制限エンドヌクレアーゼと接触し、それにより、3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端が生成される。

30

【0102】

本方法の次のステップでは、切断された第1のアダマーは、切断された結合スタッドと、切断されたアダマーと、リガーゼ酵素とを接触させることによって、切断された結合スタッドにライゲートされ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつMCS配列、第1のIISRE配列、ペイロード番号1配列、及び第2のIISRE配列を含む第1のライゲーション生成産物が生成される(図8の左側を参照されたい)。その後、第1のライゲーション産物がエクソヌクレアーゼで処理されて、あらゆるライゲートされていない結合スタッド及び/又は第1のアダマーが除去される。

40

【0103】

その後、上述のステップが、固体支持体上に固定化された別のアダマーと、MCS配列、第3のIISRE配列(図8では「R2」として示されている)、第2のN-mer配列(図8では「ペイロード番号2」として示されている)、及び第4のIISRE配列(図8では「L2」として示されている)を含む第2のアダマーとを用いて繰り返されて、固体支持体に固定化されており、かつMCS配列、第3のIISRE配列、ペイロード番号2配列、及び第4のIISRE配列を含む第2のライゲーション産物が生成される(図8の右側を参照されたい)。

【0104】

50

本方法の次のステップでは、第1のライゲーション産物が、第2のI I S R E配列(R 1)を切断するI I S R E(「図8ではR 1酵素」として示されている)と接触し、それにより、3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端が生成され、それにより、a)固体支持体に固定化されており、かつM C S配列、第1のI I S R E配列(R 1)、ペイロード番号1配列、及び3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端を含む第1の切断された産物と、b)第2のI I S R E配列(R 1)を含む第2の切断された産物とが作製される。その後、第2の切断された産物が洗浄によって廃棄される。

【0105】

本方法の次のステップでは、第2のライゲーション産物が、第4のI I S R E配列(L 2)を切断するI I S R E(図8では「L 2酵素」として示されている)と接触し、それにより、3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端が生成され、それにより、a)溶液中に放出され、かつ一方の末端にヘアピン、第3のI I S R E配列(R 2)、ペイロード番号2配列、及び3'オーバーハング、5'オーバーハング、又は平滑末端を含む第3の切断された産物と、b)固体支持体に固定化されており、かつM C S配列及び第4のI I S R E配列(L 2)を含む第4の切断された産物とが作製される。

【0106】

次のステップでは、第1の切断された産物と第3の切断された産物が、第1の切断された産物と、第3の切断された産物と、リガーゼ酵素とを接触させる(例えば、第3の切断された産物を含む溶液が固体表面に固定化された第1の切断された産物を含む溶液に移され、リガーゼ酵素が溶液に添加される)ことによって一緒にライゲートされ、それにより、固体表面に固定化されており、かつM C S配列、第1のI I S R E配列(L 1)、ペイロード番号1配列、ペイロード番号2配列、及び第3のI I S R E配列(R 2)を含む第3のライゲーション産物が生成される。その後、このライゲーション反応がエクソヌクレアーゼで処理されて、あらゆるライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第3の切断された産物が除去される。

【0107】

上述のステップは、標的核酸配列が合成されるまで繰り返すことができる。

【0108】

例示的な27ヌクレオチド長の標的核酸配列の合成の概略図が図9A~9Hに示される。合成される配列は、図9Aの上部に示されている。配列は、標的核酸配列を合成するために一緒にライゲートされるアダマーに組み込まれる3個のヌクレオチド又は4個のヌクレオチドのいずれかと重複する11個の6-mer断片に細分される。図9Bは、6-mer断片を含むアダマーがライゲートされて標的核酸配列を効率的に合成する順序をマッピングする例示的な標的核酸配列のアセンブリツリーを示す。アセンブリ及び奇数対偶数のオーバーハングの配置に矛盾するいくつかの異なる方法が存在するが、このアセンブリ順序は、I I S R E酵素部位と生成される配列の適合性によって決定されるべきである。図9Bでは、番号付けされた6-mer(1)~(11)は、図9C~9Hの番号付けされた6-merに対応する。ツリーの各々のノードにおける数は、アセンブリの各々のステップにおけるペイロード長に対応する。「4」及び「3」は、使用されるオーバーハングの長さを示す。結果として得られるペイロード配列の長さは、長さ = $a + b - n$ であり、式中、「a」及び「b」は入力ペイロードの長さであり、「n」はオーバーハングの長さである。

【0109】

標的核酸配列の合成の第1のステップが図9Cに示されており、G A Cの3-mer配列を含むアダマー及びA T Cの3-mer配列を含むアダマーのロードによりG A C A T G 6-merを含むアダマーが形成されることを示しており、これは、図9Bでは6-mer番号1である。G A C A T G六量体を生成するために、M C S配列を含む第1の結合スタッドと、M C S配列、第1のI I S R E配列(図9Cでは「L 1」として示されている)、配列G A Cを含む3-mer配列、及び第2のI I S R E配列(図9Cでは「R 1」として示されている)を含む第1のアダマーとが1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ

と接触してMCS配列を切断し、それにより、相補的なオーバーハングが生成される。その後、これらの相補的なオーバーハングがハイブリダイズされ、ハイブリダイズされた複合体をリガーゼ酵素と接触させることによってアダマーと結合スタッドと一緒にライゲートされて、固体表面に固定化されており、かつMCS配列、第1のIISRE配列(L1)、3-mer配列GAC及び第2のIISRE配列(R1)を含むライゲーション産物番号1が得られる。同じプロセスを、MCS配列を含む第2の結合スタッドと、MCS配列、第3のIISRE配列(図9Cでは「L2」として示されている)、配列ATGを含む3-mer配列決定、及び第4のIISRE配列(図9Cでは「R2」として示されている)を含む第2のアダマーを用いて繰り返して、固体表面に固定化されており、かつMCS配列、第3のIISRE配列(L2)、3-mer配列ATG、及び第4のIISRE配列(R2)を含むライゲーション産物番号2を得ることができる。次に、ライゲーション産物番号1が、第2のIISRE配列(R1)を切断するIISRE(図9Cでは「R1酵素」として示されている)と接触し、それにより、固体表面に固定化されており、かつMCS配列、第1のIISRE配列(L1)、及び3-mer配列GAC、続いて平滑末端を含む切断された産物番号1が生成される。同様に、ライゲーション産物番号2は、第3のIISRE配列(L2)を切断するIISRE(図9Cでは「L2酵素」として示されている)と接触し、それにより、溶液中に放出され、かつ平滑末端、3-mer配列ATG、及び第4のIISRE配列(R2)を含む切断された産物番号2が生成される。その後、切断された産物番号1と切断された産物番号2がリガーゼ酵素を使用して一緒にライゲートされて、固体支持体に固定化されており、かつMCS配列、第1のIISRE配列(L1)、6-mer配列GACATG、及び第4のIISRE配列(R2)を含むライゲーション産物番号3が得られる。これらの産物は、任意選択で、エクソヌクレアーゼで処理されて、あらゆるライゲートされていない切断された産物番号1及び/又は切断された産物番号2を除去することができる。本段落に記載のステップを、異なる3-mer配列を含む追加のアダマーを用いて繰り返して、図9Bに示される6-mer配列番号2~11を含むアダマーを生成することができる。

【0110】

本方法は図9Dに続き、6-mer配列番号1を含むアダマーと6-mer配列番号2を含むアダマーのライゲーションを示している(図9Bを参照されたい)。アダマー番号1は、固体表面に固定化されており、MCS配列、図9Cの第1のIISRE部位(L1)、6-mer配列GACATG(図9Bの6-mer配列番号1)、及び図9Cの第4のIISRE配列(R2)を含む。アダマー番号2は、固体表面に固定化されており、MCS配列、第5のIISRE部位(図9Dでは「L3」)、6-mer配列ATGAGG(図9Bの6-mer配列番号2)、及び第6のIISRE部位(図9Dでは「R3」として示されている)を含む。アダマー番号1が第4のIISRE部位(R2)を切断するIISREと接触して、N-mer配列に一本鎖オーバーハングが生成され、それにより、固体表面に固定化されており、かつMCS配列、第1のIISRE配列(L1)、及び一本鎖オーバーハングを有するN-mer配列を含む切断された産物番号3が生成される。アダマー番号2が第5のIISRE部位(L3)を切断するIISREと接触して、N-mer配列に一本鎖オーバーハングが生成され、それにより、溶液中に放出され、かつ一本鎖オーバーハングを有するN-mer配列及び第6のIISRE配列(R3)を含む切断された産物番号4が生成される。その後、切断された産物番号3と切断された産物番号4がリガーゼ酵素を使用して一緒にライゲートされて、固体表面に固定化されており、かつMCS配列、第1のIISRE配列(L1)、N-mer配列GACATGAGG(合成される標的核酸配列中の最初の9個のヌクレオチド)、及び第6のIISRE配列(R3)を含むライゲーション産物番号4が得られる。ライゲーション産物番号4は、任意選択で、エクソヌクレアーゼで処理されて、あらゆるライゲートされていない切断された産物番号1及び/又は切断された産物番号2を除去することができる。

【0111】

本方法は図9Eに続き、ここで、ライゲーション産物番号4及び6-mer配列番号3

(図9Bを参照されたい)を含むアダマーが対応するIISREで処理されて、切断された産物が生成され、その後、これらが一緒にライゲートされて、固体表面に固定化されており、かつ合成される標的核酸配列の最初の11個のヌクレオチドであるN-mer配列GACATGAGGGT(配列番号75)を含むアダマーが生成される。

【0112】

27ヌクレオチド長の標的核酸配列に対応するN-mer配列を含むアダマーが合成されるまで、連続IISRE消化及びライゲーションが図9Bに示されるアセンブリマップに従って図9F~9Hで繰り返される。最終ステップでは、最終合成アダマーを、27ヌクレオチド長の標的核酸配列に隣接するIISRE配列を切断するIISREで処理することによって、27ヌクレオチド長の標的核酸配列を最終合成アダマーから切除することができる。

10

【0113】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a)固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することであって、第1のアダマーが、第1のIISRE配列、続いて第1のN-mer配列、続いて第2のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b)固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することであって、第2のアダマーが、第3のIISRE配列、続いて第2のN-mer配列、続いて第4のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c)第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のIISRE配列と、第1のN-mer配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうち少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d)第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN-mer配列と、第4のIISRE配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうち少なくとも1つを含む第2の切断された産物を生成することであって、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e)リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f)ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g)標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ(a)~(f)を繰り返すことと。

20

30

【0114】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a)固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することであって、第1のアダマーが、第1のIISRE配列、続いて第1のN-mer配列、続いて第2のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b)固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することであって、第2のアダマーが、第3のIISRE配列、続いて第2のN-mer配列、続いて第4のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c)第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のIISRE配列と、第1のN-mer配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうち少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d)第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN-mer配列と、第4のIISRE配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうち少なくとも1つを含む第2の切断された産物を生成することであって、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e)リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f)ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し

40

50

、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g) 標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ(c) ~ (f)を繰り返すことと、を含む、方法、を含む、方法。

【0115】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a) 固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することであって、第1のアダマーが、第1のIISRE配列、続いて第1のN-mer配列、続いて第2のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b) 固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することであって、第2のアダマーが、第3のIISRE配列、続いて第2のN-mer配列、続いて第4のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c) 第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のIISRE配列と、第1のN-mer配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d) 第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN-mer配列と、第4のIISRE配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第2の切断された産物を生成することであって、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e) リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f) ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g) 標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、1つ以上の追加のアダマーを用いてステップ(a) ~ (f)を繰り返すことと。

【0116】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a) 固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することであって、第1のアダマーが、第1のIISRE配列、続いて第1のN-mer配列、続いて第2のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b) 固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することであって、第2のアダマーが、第3のIISRE配列、続いて第2のN-mer配列、続いて第4のIISRE配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c) 第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のIISRE配列と、第1のN-mer配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d) 第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のIISRE配列を切断するIISREと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN-mer配列と、第4のIISRE配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第2の切断された産物を生成することであって、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e) リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f) ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g) 標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、1つ以上の追加のアダマーを用いてステップ(c) ~ (f)を繰り返すことと、を含む、方法、を含む、方法。

【0117】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a) 固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することであって、第1のアダマーが、第1のIISRE配列、続いて第1のN-mer配列、続いて第2のIISRE配列、続いてヘアピン構造を

含む、提供することと、b) 固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することと、第2のアダマーが、第3のI I S R E配列、続いて第2のN - m e r配列、続いて第4のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c) 第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のI I S R E配列と、第1のN - m e r配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d) 第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN - m e r配列と、第4のI I S R E配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つ 10とを含む第2の切断された産物を生成することと、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e) リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f) ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g) 標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ(f)の産物及び1つ以上の追加のアダマーを使用してステップ(a)~(f)を繰り返すことと。

【0118】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a) 固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することと、第1のアダマーが、第1のI I S R E配列、続いて第1のN - m e r配列、続いて第2のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b) 固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することと、第2のアダマーが、第3のI I S R E配列、続いて第2のN - m e r配列、続いて第4のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c) 第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のI I S R E配列と、第1のN - m e r配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d) 第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触 30させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN - m e r配列と、第4のI I S R E配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つとを含む第2の切断された産物を生成することと、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e) リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f) ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g) 標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ(f)の産物及び1つ以上の追加のアダマーを使用してステップ(c)~(f)を繰り返すことと、を含む、方法、を含む、方法。 40

【0119】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a) 固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することと、第1のアダマーが、第1のI I S R E配列、続いて第1のN - m e r配列、続いて第2のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b) 固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することと、第2のアダマーが、第3のI I S R E配列、続いて第2のN - m e r配列、続いて第4のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c) 第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のI I S R E配列と、第1のN - m e r配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端の 50

うちの少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d)第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN - m e r配列と、第4のI I S R E配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第2の切断された産物を生成することと、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e)リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f)ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g)標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ(f)の産物及び/又は1つ以上の追加のアダマーを使用してステップ(a)~(f)の任意の組み合わせを繰り返すことと。

10

【0120】

前述の方法は、以下のように説明することができる：a)固体支持体に固定化された本開示の第1のアダマーを提供することと、第1のアダマーが、第1のI I S R E配列、続いて第1のN - m e r配列、続いて第2のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、b)固体支持体に固定化された本開示の第2のアダマーを提供することと、第2のアダマーが、第3のI I S R E配列、続いて第2のN - m e r配列、続いて第4のI I S R E配列、続いてヘアピン構造を含む、提供することと、c)第1のアダマーを、第1のアダマー内に位置する第2のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、固体支持体に固定化されており、かつ第1のI I S R E配列と、第1のN - m e r配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第1の切断された産物を生成することと、d)第2のアダマーを、第2のアダマー内に位置する第3のI I S R E配列を切断するI I S R Eと接触させ、それにより、溶液中に放出され、かつ第2のN - m e r配列と、第4のI I S R E配列と、3'オーバーハング、5'オーバーハング、及び平滑末端のうちの少なくとも1つを含む第2の切断された産物を生成することと、第2の切断された産物がヘアピン構造により一方の末端がキャップされている、生成することと、e)リガーゼ酵素を使用して第1の切断された産物と第2の切断された産物をライゲートして、第1のライゲーション産物を生成することと、f)ステップ(e)の産物をエクソヌクレアーゼで処理し、それにより、ライゲートされていない第1の切断された産物及び/又は第2の切断された産物を除去することと、g)標的核酸配列を含む核酸分子が合成されるまで、ステップ(f)の産物及び/又は1つ以上の追加のアダマーを使用してステップ(c)~(f)の任意の組み合わせを繰り返すことと、を含む、方法、を含む、方法。

20

30

【0121】

本開示の方法のいくつかの態様では、リガーゼ酵素は、ヒトDNAリガーゼI I I (h L i g 3) とすることができる。当業者に理解されるであろうように、h L i g 3 は、高い平滑末端ライゲーション効率(60%超)を呈する。本開示の方法のいくつかの態様では、リガーゼ酵素は、T4 DNAリガーゼとすることができる。当業者に理解されるであろうように、T4 DNAリガーゼは、2、3、又は4ヌクレオチド長の3'オーバーハング又は5'オーバーハングを含む核酸断片の高いライゲーション効率(80%超)を呈する。リガーゼ酵素は、当該技術分野で既知の任意のリガーゼ酵素とすることができる。

40

【0122】

本開示の方法のいくつかの態様では、エクソヌクレアーゼは、T7エクソヌクレアーゼとすることができる。

【0123】

本開示の方法のいくつかの態様では、合成された標的核酸配列は、少なくとも約80%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約99%の純度を有する。

50

【 0 1 2 4 】

いくつかの態様では、合成された標的核酸配列の純度は、正しい / 所望のライゲーション産物に対応する、単回のライゲーション反応又は複数回のライゲーション反応の一部として形成された総ライゲーション産物のパーセンテージを指す。理論に束縛されることを望むものではないが、核酸分子のライゲーションを含む本開示の方法は、複数のライゲーション産物を生成することができ、それらのうちのいくつかは正しい / 所望のライゲーション産物に対応し、それらのうちのいくつかは望ましくないもの（副反応、誤ったライゲーションなど）である。ライゲーション産物又は合成される標的分子の純度は、正しい / 所望のライゲーション産物に対応する、形成された総ライゲーション産物のパーセンテージに対応するパーセンテージとして表すことができる。

10

【 0 1 2 5 】

実施例 1 - アダマーベースの合成

以下は、標的核酸分子を合成するために使用される本開示のアダマーベースの合成法の非限定的な例である。この実施例では、一連の制限酵素消化及びその後のライゲーションを図 10 に概説するように行った。ライゲーション反応の各々の産物を、ゲル電気泳動を使用して分析した。この分析の結果を図 11 に示す。図 11 に示す結果は、本開示のアダマーを使用した反復制限酵素消化及びその後のライゲーション反応を含む本開示の方法が核酸分子を効率的に合成することができることを示す。

【 図面 】

【 図 1 】

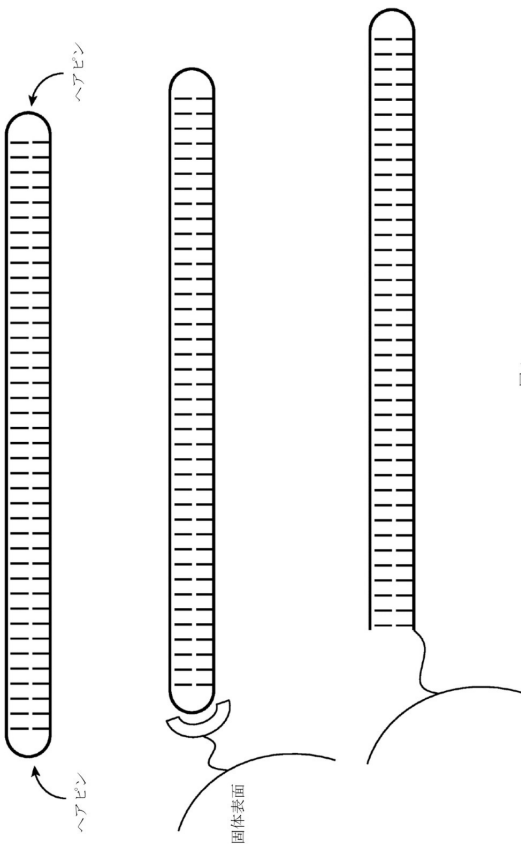


図 1

【 図 2 】

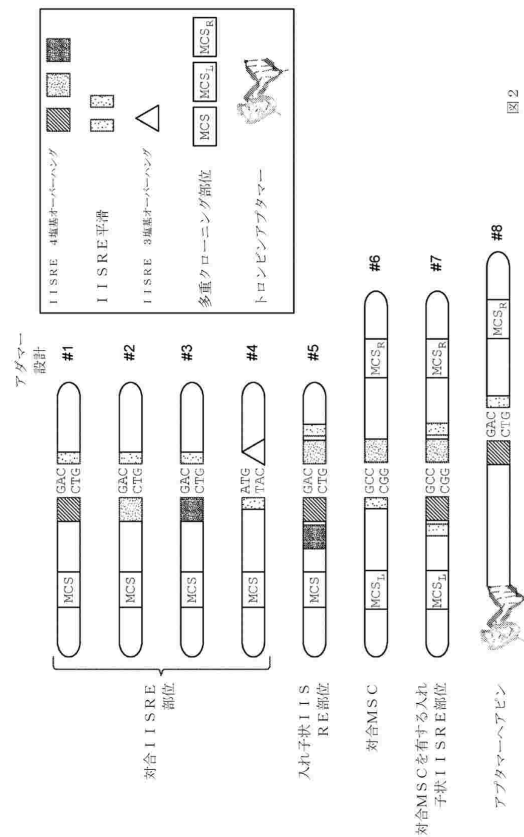


図 2

20

30

40

50

【 図 6 】

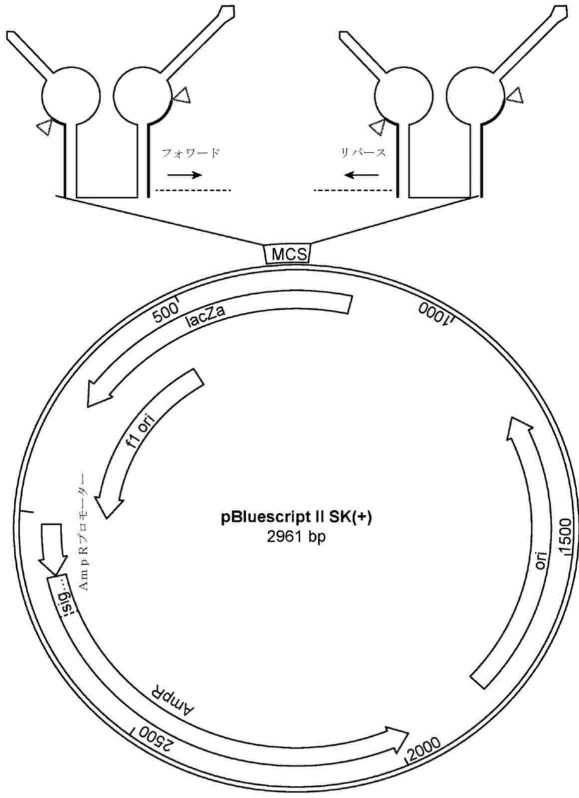


図 6

【 図 7 B 】

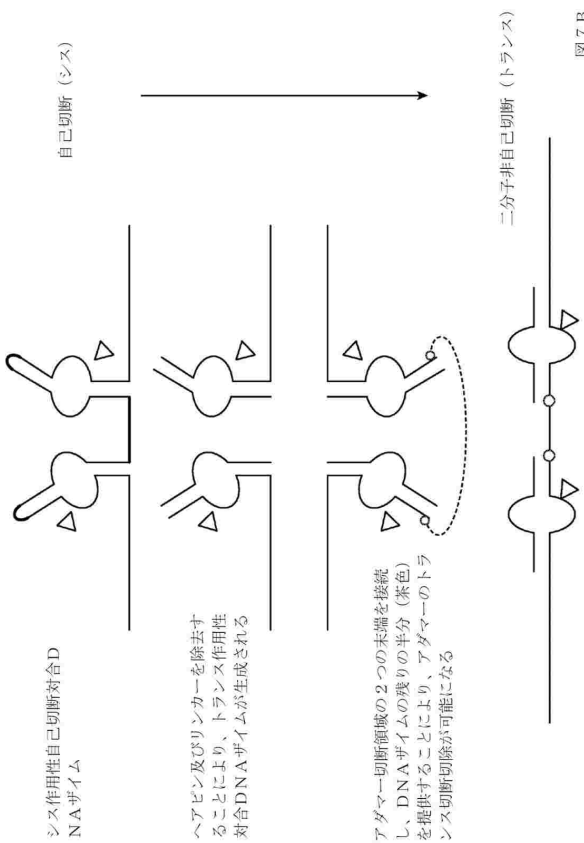


図 7 B

【 図 7 A 】

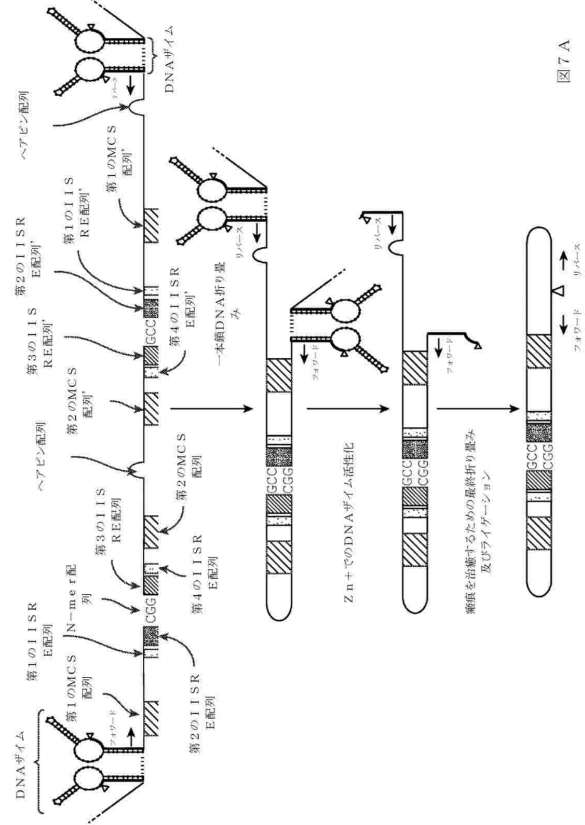


図 7 A

10

20

【 図 8 】

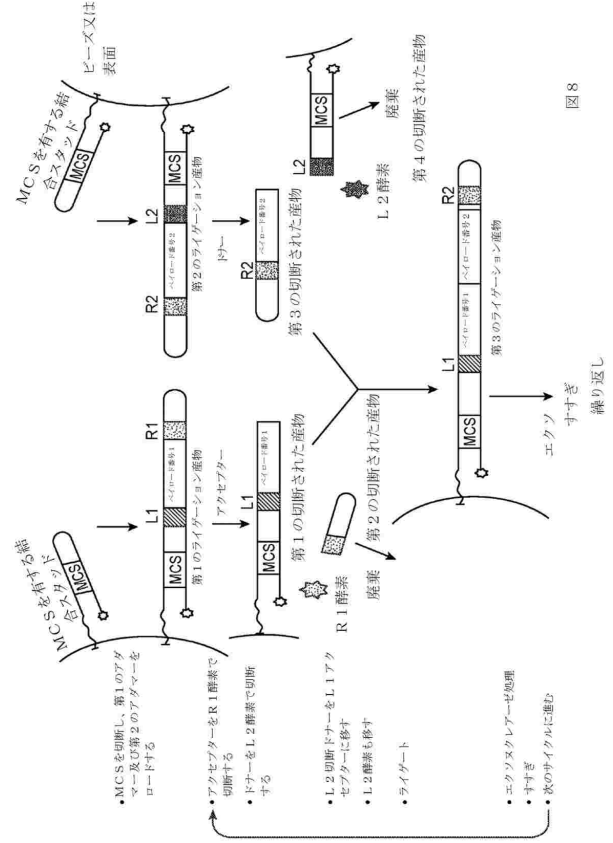


図 8

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/026333

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, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	BEUCAGE S I ET AL: "ADVANCES IN THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHORAMIDITE APPROACH", TETRAHEDRON, ELSEVIER SIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 48, no. 12, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 2223-2311, XP000915225, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(01)88752-4 the whole document <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-28		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> "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 </td> <td style="width: 50%;"> "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 </td> </tr> </table>			"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
"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		
1 July 2022		14/07/2022		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Young, Craig		

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2022/026333

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SEBASTIAN PALLUK ET AL: "De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 36, no. 7, 18 June 2018 (2018-06-18), pages 645-650, XP055529953, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.4173 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-28
A	<p>STEMMER W P C ET AL: "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides", GENE, ELSEVIER AMSTERDAM, NL, vol. 164, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 49-53, XP004041916, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(95)00511-4 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-28
A	<p>E. M. LEPROUST ET AL: "Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 38, no. 8, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 2522-2540, XP055085142, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq163 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-28
A	<p>PERKEL JEFFREY M: "The race for enzymatic DNA synthesis heats up", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 566, no. 7745, 25 February 2019 (2019-02-25), page 565, XP036713079, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/D41586-019-00682-0 [retrieved on 2019-02-25] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-28
T	<p>Bell Neil ET AL: "Synthesis and assembly of whole plasmids", , 1 February 2020 (2020-02-01), XP55937138, Retrieved from the Internet: URL:https://www.camenabio.com/assets/media/puc19-camena-application-note-final-ds-sh2.pdf [retrieved on 2022-06-30] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

10

20

30

40

1

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

page 2 of 3

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/026333

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>Bell Neil M ET AL: "Product Note gSynth(TM) A highly accurate, enzymatic, de novo synthesis and gene assembly technology",</p> <p>,</p> <p>17 November 2019 (2019-11-17), XP55937094,</p> <p>Retrieved from the Internet:</p> <p>URL:https://www.camenabio.com/assets/media/2019-11-17-application-note.pdf</p> <p>[retrieved on 2022-06-30]</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/026333

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N

9/16

Z

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ, TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 デレク ステンプル

イギリス国, サフロン ワルデン エセックス シービー 1 0 1 エックスエル, リトル チェスター
フォード, ザ サイエンス ビレッジ チェスターフォード リサーチ パーク

(72)発明者 シルビア マンコウスカ

イギリス国, サフロン ワルデン エセックス シービー 1 0 1 エックスエル, リトル チェスター
フォード, ザ サイエンス ビレッジ チェスターフォード リサーチ パーク

(72)発明者 ニール ベル

イギリス国, サフロン ワルデン エセックス シービー 1 0 1 エックスエル, リトル チェスター
フォード, ザ サイエンス ビレッジ チェスターフォード リサーチ パーク

F ターム (参考) 4B064 AF27 CB30 CC24