

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-523786

(P2008-523786A)

(43) 公表日 平成20年7月10日 (2008.7.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 6 3
	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁)

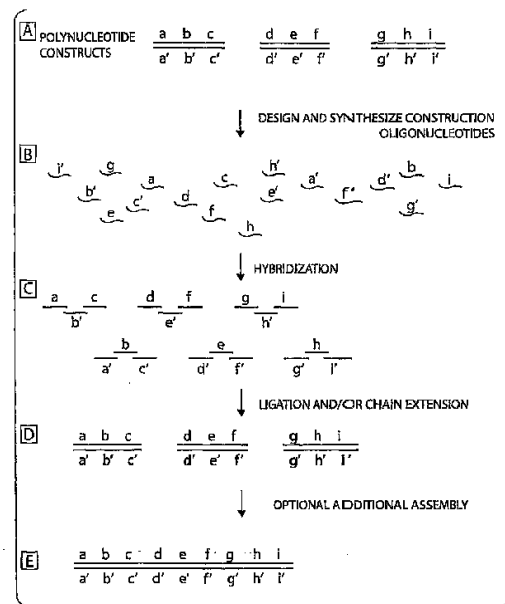
(21) 出願番号	特願2007-537994 (P2007-537994)	(71) 出願人	507128768
(86) (22) 出願日	平成17年10月18日 (2005.10.18)		コドン デバイス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月18日 (2007.6.18)		アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ、ケンブリッジ、ワン ケンドールスクエア、ビルディング 300、サード フロアー
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/037571	(74) 代理人	110000523
(87) 国際公開番号	W02006/044956		アクシス国際特許業務法人
(87) 国際公開日	平成18年4月27日 (2006.4.27)	(72) 発明者	ヌーバー アフェヤン
(31) 優先権主張番号	60/619,650		アメリカ合衆国 02321 マサチューセッツ、レキシントン、サンセット リッジ 1
(32) 優先日	平成16年10月18日 (2004.10.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/643,813		
(32) 優先日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11/067,812		
(32) 優先日	平成17年2月28日 (2005.2.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高忠実度合成ポリヌクレオチドのアセンブリ方法

(57) 【要約】

DNAが核酸ポリマーの化学的合成により非常に多くの部分を製造されるDNA製造合成方法が開示された。合成オリゴヌクレオチドの複合アセンブリによる、同一のプール内の複数のDNAのアセンブル方法も提供された。本発明の方法は、例えば、1以上のオリゴヌクレオチドを「ユニバーサル」プライマーを使用して予備増幅し、オリゴヌクレオチド及び／又は核酸産物中のエラー割合を減少させ、及び配列を最適化し、オリゴヌクレオチド設計を行う。又本発明は、核酸の低純度アレイ及び低純度アレイから得られたオリゴヌクレオチドを使用した核酸アセンブル方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

予め特定された配列を有する長いポリヌクレオチド構造物(construct)のアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

- (a) 構造体(construction)オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；
- (b) 下記(i)、(ii)、又は(i)及び(ii)を順番に又は同時に行うステップ：
 - (i) 構造体オリゴヌクレオチドを増幅する；
 - (ii) 構造体オリゴヌクレオチドをエラー減少プロセスで処理する；並びに
- (c) 構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件並びに 1 以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、上記構造体オリゴヌクレオチドよりも長い少なくとも 1 の二本鎖サブアセンブリ構造物の複数のコピーを形成するステップ；
- (d) 下記(i)、(ii)、又は(i)及び(ii)を順番に又は同時に行うステップ：
 - (i) 上記サブアセンブリ構造物を増幅する；
 - (ii) そのサブアセンブリ構造物をエラー減少プロセスにかける；並びに
- (e) 2 以上のサブアセンブリ構造物をハイブリダイゼーション条件及び 1 以上の下記条件下でインキュベートし：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピーを形成するステップ。

10

【請求項 2】

20

構造体オリゴヌクレオチドはエラーフィルトレーション捕集プロセスを含むエラー減少プロセスで処理される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記エラーフィルトレーション捕集プロセスは下記ステップを含む請求項 2 に記載の方法：

- (a) 構造体オリゴヌクレオチドのプールを選択オリゴヌクレオチドのプールとハイブリダイゼーション条件下で接触させデュプレックス（二本鎖）を形成するステップ、但し、選択オリゴヌクレオチドは構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも複数の部分に相補的な複数の配列を有し；デュプレックスの少なくとも一部分は構造体オリゴヌクレオチドのコピー及び選択オリゴヌクレオチドのコピーを含有し、相補的領域内にミスマッチを含まない安定なデュプレックスであり；デュプレックスの一部分は不構造体オリゴヌクレオチドのコピー及び選択オリゴヌクレオチドのコピーを含有し、相補的領域内に 1 以上のミスマッチを含む安定なデュプレックスである；
- (b) 不安定なデュプレックスを形成した構造体オリゴヌクレオチドのコピーを除去するステップ；並びに
- (c) 残存デュプレックスを変性して精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールを形成するステップ。

30

【請求項 4】

選択オリゴヌクレオチドは固体サポート上に固定化される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

40

選択オリゴヌクレオチドは 1 の末端にビオチン基を含有する請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

不安定なデュプレックスを形成した構造体オリゴヌクレオチドのコピーは、ハイブリダイゼーション若しくは洗浄条件、又は両方の緊縮度を制御することによりプールから除去される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

固体サポートはカラム又はビーズである請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

更に、サブアセンブリ構造物の形成前に構造体オリゴヌクレオチドを増幅するステップ

50

を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

更に、サブアセンブリ構造物の形成前に (a) ~ (c) ステップを少なくとも 1 回繰り返すことを含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物はエラーフィルトレーション捕集プロセスで処理される請求項 1 の方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物を DNA ミスマッチへ結合する少なくとも 1 の薬剤とインキュベートするステップ；及び

(b) 薬剤へ結合した、構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のコピーを除去するステップ。

10

【請求項 11】

薬剤はミスマッチ結合蛋白質である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ミスマッチ結合蛋白質は 1 以上の下記蛋白質である請求項 11 に記載の方法： F o k I、T 7 エンドヌクレアーゼ、m u t H、m u t L、m u t M、m u t S、m u t Y、d a m、チミジン DNA グリコシラーゼ (T D G)、ウラシル DNA グリコシラーゼ、A l k A、M L H 1、M S H 2、M S H 3、M S H 6、エキソヌクレアーゼ I、T 4 エンドヌクレアーゼ V、エキソヌクレアーゼ V、R e c J エキソヌクレアーゼ、F E N 1 (R A D 2 7)、d n a Q (m u t D)、又は p o l C (d n a E)。

20

【請求項 13】

ミスマッチ結合蛋白質は m u t S である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物は、A T P の存在下で m u t S とインキュベートされる請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

A T P は、約 10 ナノモル未満のミスマッチを含有するデュプレックスへの m u t S の親和性を増加させるのに十分な量で存在する請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

ミスマッチ結合蛋白質は DNA グリコシラーゼである請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 17】

ミスマッチ結合蛋白質は T D G である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

更に、薬剤へ結合しなかった構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のコピーを増幅するステップを含む請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

更に、(a) 又は (b) ステップを少なくとも 1 回繰り返すことを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

薬剤へ結合した構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のコピーはゲルフィルトレーションにより除去される請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 21】

薬剤は基質上に固定化される請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

基質はカラム又はビーズである請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

更に、薬剤を構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物へ架橋させるステップを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

エラーフィルトレーション捕集プロセスは下記ステップを含む請求項 2 に記載の方法：

50

(a) 構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物を、少なくとも1のミスマッチを有するオリゴヌクレオチド又はサブアセンブリのヌクレアーゼによる切断を可能とする条件下で、一本鎖ヌクレアーゼと接触させるステップ
；及び

(b) 完全長オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリを切断されたオリゴヌクレオチド又はサブアセンブリから分離するステップ。

【請求項25】

更に、オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリを一本鎖ヌクレアーゼへ接触させる前の、一連の変性及び再生ステップを有する請求項24に記載の方法。

【請求項26】

更に、一本鎖ヌクレアーゼによる消化後に残存するオリゴヌクレオチド又はサブアセンブリの完全長コピーを増幅するステップを含む請求項24に記載の方法。

【請求項27】

完全長オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリは、サイズ分離により切断されたオリゴヌクレオチド又はサブアセンブリから分離される請求項24に記載の方法。

【請求項28】

サイズ分離ゲル電気泳動である請求項27に記載の方法。

【請求項29】

サイズ分離はカラムクロマトグラフィーである請求項27に記載の方法。

【請求項30】

構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物は、エラーニュートラル化プロセスを含むエラー減少プロセスで処理される請求項1の方法であり、上記エラーニュートラル化プロセスは下記ステップを含有する方法：

(a) 構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物を、ミスマッチへ結合する薬剤とインキュベートするステップ；

(b) 薬剤を、ミスマッチを含有する、構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のコピーへ架橋させるステップ；及び

(c) 構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物を増幅するステップ、但し、薬剤へ架橋される、構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のコピーは指数的に増幅されず、稀釈される。

【請求項31】

構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物はエラーニュートラル化プロセスを含むエラー減少プロセスで処理される請求項1の方法であり、エラーニュートラル化プロセスは下記ステップを含有する方法：

(a) 構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物を少なくとも1のミスマッチを有する、構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のヌクレアーゼによる切断を可能とする条件下で、一本鎖ヌクレアーゼと接触させるステップ；

(b) 消化された構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物へ一連の変性及び再生処理を行うステップ；及び

(c) 消化された構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物を鎖伸長条件又は鎖伸長及びライゲーション条件下でインキュベートし、する完全長構造体オリゴヌクレオチド又は完全長サブアセンブリ構造物を再生するステップ。

【請求項32】

更に(b)及び(c)を少なくとも2回繰り返すステップを含む請求項31に記載の方法。

【請求項33】

更にプライマーを消化された構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物のプールへ鎖伸長条件又は鎖伸長及びライゲーション条件下で添加するステップを含む請求項31又は32に記載の方法。

【請求項34】

サブアセンブリ構造物はエラー減少プロセスを含むエラー減少プロセスで処理される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

エラー修復プロセスは下記ステップを含む請求項 34 に記載の方法：

- (a) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをサブアセンブリ構造物を切断する薬剤とインキュベートし、二本鎖破断を形成してミスマッチを除去するステップ；
- (b) サブアセンブリ構造物の複数のコピーを融解しリアニールするステップ；及び
- (c) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをハイブリダイゼーション条件及び鎖伸長条件下でインキュベートするステップ、但し薬剤により切断されたサブアセンブリ構造物のストランドは、ハイブリダイズして相補鎖をオーバーラップし鎖伸長用プライマーとして機能することができる。

10

【請求項 36】

薬剤は、ミスマッチ結合蛋白質又はその機能的フラグメント、及びヌクレアーゼ又はその機能的フラグメントを含有する融合蛋白質である請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

薬剤は F o k I、T 7 エンドヌクレアーゼ I 又は T 4 エンドヌクレアーゼである請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

エラー修復プロセスは下記ステップを含む請求項 34 に記載の方法：

- (a) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをメチル化薬剤と接触させるステップ；
- (b) サブアセンブリ構造物の複数のコピーを部位特異的脱メチル化薬剤と接触させるステップ；
- (c) サブアセンブリ構造物の複数のコピーを変性するステップ；
- (d) サブアセンブリ構造物の複数のコピーを再生して、その少なくとも一部分は少なくとも 1 の半メチル化領域を含有する二本鎖サブアセンブリ構造物の複数のコピーを形成するステップ；及び
- (e) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをミスマッチ修復システムと接触させるステップ。

20

【請求項 39】

部位特異的脱メチル化薬剤は、ミスマッチ結合蛋白質又はその機能的フラグメント、及びデメチラーゼ又はその機能的フラグメントを含有する融合蛋白質である請求項 38 に記載の方法。

30

【請求項 40】

エラー修復プロセスは下記ステップを含む請求項 34 に記載の方法：

- (a) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをサブアセンブリ構造物を切断する薬剤とインキュベートして二本鎖破断を形成してミスマッチを除去するステップ；
- (b) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをホリデイ接合部の形成を促進する薬剤と接触させるステップ；
- (c) サブアセンブリ構造物の複数のコピーを鎖伸長を促進する条件下でインキュベートするステップ；及び
- (d) サブアセンブリ構造物の複数のコピーをホリデイ接合部の分解(resolution)を促進する薬剤と接触させるステップ。

40

【請求項 41】

更に、長いポリヌクレオチド構造物をエラー減少プロセスで処理するステップを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 42】

エラー減少プロセスは長いポリヌクレオチド構造物に対して行われ、下記ステップを含む請求項 41 に記載の方法：

- (a) 長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピーを、部位特異的二本鎖破断及び相補末端を生じる薬剤と接触させフラグメントを製造するステップ；

50

- (b) フラグメントをミスマッチへ結合する薬剤と接触させるステップ；
- (c) 薬剤へ結合したフラグメントを除去するステップ；及び
- (d) フラグメントをハイブリダイゼーション及び相補末端のライゲーションを促進する条件下でインキュベートし、長いポリヌクレオチド構造物を再生するステップ。

【請求項 4 3】

部位特異的二本鎖破断を生じる薬剤は F o k I、T 7 エンドヌクレアーゼ I 又は T 4 エンドヌクレアーゼである請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

エラー減少プロセスは下記ステップを含む請求項 4 1 に記載の方法：

- (a) 長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピーを非特異的一本鎖破断を生じる薬剤と接触させるステップ；
- (b) 長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピーをホリデイ接合部の形成を促進する薬剤と接触させるステップ；
- (c) 長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピー鎖を伸長を促進する条件下でインキュベートするステップ；並びに
- (d) 長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピーをホリデイ接合部の分解を促進する薬剤と接触させるステップ。

【請求項 4 5】

エラー減少プロセスは下記ステップを含む請求項 4 1 に記載の方法：

- (a) 長いポリヌクレオチド構造物の複数のコピーを非特異的二本鎖破断を生じる薬剤と接触させ、二本鎖フラグメントを形成する；
- (b) フラグメントを変性し、一本鎖フラグメントを形成するステップ；
- (c) フラグメントを、相補的にオーバーラップする一本鎖フラグメント間のハイブリダイゼーションを促進する条件下でインキュベートするステップ；
- (d) フラグメントをミスマッチへ結合する薬剤と接触させるステップ；
- (e) 薬剤へ結合したフラグメントを除去するステップ；並びに
- (f) フラグメントをハイブリダイゼーション条件並びに少なくとも 1 の下記(i)～(iii)条件下でインキュベートし：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、長いポリヌクレオチド構造物を再アセンブルするステップ。

【請求項 4 6】

上記プールは複数の二本鎖サブアセンブリ構造物を形成する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

2 以上のサブアセンブリ構造物が別反応でアセンブルされる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 8】

2 以上のサブアセンブリ構造物が同一の反応でアセンブルされる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

複数のサブアセンブリ構造物がハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも 1 の下記(i)～(iii)条件下でインキュベートされ：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、複数の長いポリヌクレオチド構造物を形成する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 0】

更にエラー減少プロセス実施前の、一連の変性及び再生ステップを含む請求項 1 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

構造体オリゴヌクレオチドは約 2 0 ～約 1 5 0 ヌクレオチド長である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 2】

サブアセンブリ構造物は少なくとも約 2 0 0 ～約 7 5 0 ヌクレオチド長である請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

サブアセンブリ構造物は構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも約 5 倍である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ポリヌクレオチド構造物はサブアセンブリ構造物の少なくとも約 5 倍である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも約 1 キロベース長である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも約 10 キロベース長である請求項 5 5 に記載の方法。 10

【請求項 5 7】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも約 100 キロベース長である請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

約 99 %未満のサブアセンブリ又はポリヌクレオチド構造物のコピーが配列エラーを有する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 9】

約 95 %未満のサブアセンブリ又はポリヌクレオチド構造物のコピーが配列エラーを有する請求項 5 8 に記載の方法。 20

【請求項 6 0】

約 90 %未満のサブアセンブリ又はポリヌクレオチド構造物のコピーが配列エラーを有する請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

約 50 %未満のサブアセンブリ又はポリヌクレオチド構造物のコピーが配列エラーを有する請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

オリゴヌクレオチド固体サポート上で合成される請求項 1 又は 3 に記載の方法。

【請求項 6 3】

オリゴヌクレオチドは切断可能なリンカーにより固体サポートへ付着している請求項 6 2 に記載の方法。 30

【請求項 6 4】

リンカーは化学的に切断可能なリンカー、熱的に切断可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、又は光切断可能なリンカーである請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

合成は上記サポート上の分離された位置での光開始反応を使用する請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

光はマスクを使用して分離された位置へ放射される請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

光は光指向マスクレス光学レンズを使用して分離された位置へ放射される請求項 6 6 に記載の方法。 40

【請求項 6 8】

オリゴヌクレオチドは、増幅前に固体サポートから切り離される請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 9】

オリゴヌクレオチドは、上記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分へフランキングし、少なくとも 1 のサブセットの上記オリゴヌクレオチドに共通する少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 1 又は 3 に記載の方法。

【請求項 7 0】

全てのオリゴヌクレオチドは、共通する少なくとも1対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項69に記載の方法。

【請求項71】

オリゴヌクレオチドは、プライマーハイブリダイゼーション部位の少なくとも一部分及びオリゴヌクレオチド間の切断部位を有する請求項69に記載の方法。

【請求項72】

切断部位は制限エンドヌクレアーゼ部位である請求項71に記載の方法。

【請求項73】

制限エンドヌクレアーゼはタイプIISエンドヌクレアーゼである請求項72に記載の方法。

【請求項74】

サブアセンブリ構造物は、上記サブアセンブリ構造物の少なくとも一部分へフランキングし、上記サブアセンブリ構造物の少なくとも1のサブセットに共通する少なくとも1対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項1又は46に記載の方法。

【請求項75】

サブアセンブリ構造物は、プライマーハイブリダイゼーション部位の少なくとも1及びサブアセンブリ構造物間の切断部位を有する請求項74に記載の方法。

【請求項76】

構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物の増幅は、少なくとも1のプライマーを含有する少なくとも1のウラシル残基を使用する請求項1に記載の方法。

【請求項77】

ウラシル残基は、プライマーハイブリダイゼーション部位及び構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ構造物間の接合部に位置する請求項76に記載の方法。

【請求項78】

プライマーハイブリダイゼーション部位は、ウラシルDNAグリコシラーゼ及びAPエンドヌクレアーゼを使用して除去される請求項76に記載の方法。

【請求項79】

少なくとも2個のサブアセンブリ構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項1に記載の方法。

【請求項80】

少なくとも4個のサブアセンブリ構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項79に記載の方法。

【請求項81】

少なくとも10個のサブアセンブリ構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項80に記載の方法。

【請求項82】

少なくとも2個のポリヌクレオチド構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項1に記載の方法。

【請求項83】

少なくとも4個のポリヌクレオチド構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項82に記載の方法。

【請求項84】

少なくとも10個のポリヌクレオチド構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項83に記載の方法。

【請求項85】

予め特定された配列を有する長いポリヌクレオチド構造物の製造であり、下記ステップを含む方法

(a) ハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも1の下記(i)～(iii)条件下で：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップであり、上記プールは複数のオーバー

10

20

30

40

50

ラップ配列を有し、上記プールは上記構造体オリゴヌクレオチドよりも長い少なくとも1のポリヌクレオチド構造物を形成するステップ；

(b) 下記(i)及び(ii)を順番に又は同時に行うステップ；

(i) ポリヌクレオチド構造物を増幅する；

(ii) ポリヌクレオチド構造物をエラー減少プロセスで処理する；並びに

(c) (a) 及び (b) を少なくとも2回繰り返すステップ、但しポリヌクレオチド構造物はその次のサイクルで構造体オリゴヌクレオチドを構成する。

【請求項86】

構造体オリゴヌクレオチドのプールはオーバーラップする領域内で相補的な正鎖及び負鎖を有する請求項85に記載の方法。

【請求項87】

構造体オリゴヌクレオチドのプールはポリヌクレオチド構造物形成前に増幅される請求項85に記載の方法。

【請求項88】

構造体オリゴヌクレオチドのプールはポリヌクレオチド構造物形成前にエラー減少プロセスで処理される請求項85又は87に記載の方法。

【請求項89】

エラー減少プロセスは選択オリゴヌクレオチドのプールを使用したエラーフィルトレーション捕集である請求項88に記載の方法。

【請求項90】

1のプール中に、異なる複数の予め特定された配列及び少なくとも1の内部相同性(internal homology)の領域を有する複数のポリヌクレオチド構造物の製造方法であり、下記ステップを含む方法；

(a) それぞれの複数のポリヌクレオチド構造物の配列を特定する、部分的オーバーラップ配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；

(b) その構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも1の下記(i)～(iii)条件下で：(i)ライゲーション条件、(2)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、インキュベートするステップ；並びに

(c) 予め特定された配列を有さない構造物から予め特定された配列を有する構造物を分離し、予め特定された配列を有する複数のポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項91】

ポリヌクレオチド構造物は、少なくとも1の内部相同性領域を有する複数のポリペプチドをエンコードする請求項90に記載の方法。

【請求項92】

1以上のポリヌクレオチド構造物の配列の少なくとも一部分は、少なくとも1の他のポリヌクレオチド構造物との相同性が減少するようにコドン再配置される請求項91に記載の方法。

【請求項93】

少なくとも10ポリヌクレオチド構造物が1のプール中に製造される請求項91に記載の方法。

【請求項94】

少なくとも100ポリヌクレオチド構造物が1のプール中に製造される請求項93に記載の方法。

【請求項95】

少なくとも1000ポリヌクレオチド構造物が1のプール中に製造される請求項94に記載の方法。

【請求項96】

ポリヌクレオチド構造物は複数のRNA分子をエンコードする請求項90に記載の方法。

【請求項97】

更にポリヌクレオチド構造物を更にアセンブリ処理して、少なくとも1のより長いポリヌクレオチド構造物を形成するステップを含む請求項90に記載の方法。

【請求項98】

構造体オリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド構造物、又は両方を、少なくとも1の一連の(i)増幅、(ii)エラー減少、又は(iii)増幅及びエラー減少をいずれかの順で処理するステップを含む請求項90又は97に記載の方法。

【請求項99】

更にポリヌクレオチド構造物をベクターへ導入するステップを含む請求項90に記載の方法。

【請求項100】

更にポリヌクレオチド構造物を宿主細胞へ導入するステップを含む請求項90又は99に記載の方法。

【請求項101】

更にポリヌクレオチド構造物からポリペプチド又はリボ核酸を発現するステップを含む請求項90、99又は100のいずれか1項に記載の方法。

【請求項102】

更にポリペプチド又はリボ核酸の物理的又は機能的特徴をアッセイするステップを含む請求項101に記載の方法。

【請求項103】

少なくとも1の内部相同性領域を有する少なくとも2個のポリヌクレオチド構造物の単一の反応混合物中でのアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 下記(i)及び(ii)を含む構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ：

(i) ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する、部分的オーバーラップ配列；及び

(ii) 1以上の構造体オリゴヌクレオチド上の配列タグ、但し目的の配列を有するポリヌクレオチド構造物を特定する一組の構造体オリゴヌクレオチドは、不適当なクロスオーバー産物を特定する一組の構造体オリゴヌクレオチドと比較して配列タグの識別可能な相補物(complement)を有する；

(b) その構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも1の下記(i)～(iii)条件に曝すステップ：(i)ライゲーション条件、(2)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件；並びに

(c) 不適当なクロスオーバー産物から、サイズ又は電気泳動移動性に基づいて目的の配列を有するポリヌクレオチド構造物を分離し、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項104】

サイズ分離はカラムクロマトグラフィーにより行われる請求項103に記載の方法。

【請求項105】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも2個の相同性の内部領域を有する請求項103に記載の方法。

【請求項106】

少なくとも1の内部相同性領域を有する少なくとも2個のポリヌクレオチド構造物の、単一の反応混合物中でのアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 部分的オーバーラップする、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し第1のポリヌクレオチド構造物の末端を特定する構造体オリゴヌクレオチドは相補的領域を有し、第2のポリヌクレオチド構造物の末端を特定する構造体オリゴヌクレオチドは異なる相補的領域を有する；及び

(b) その構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びに少なくとも1の下記(i)～(iii)条件に曝すステップ：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件；並びに

(c) 直鎖状産物から環状産物を分離し、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造

10

20

30

40

50

物を形成するステップ。

【請求項 107】

直鎖状産物をエキソヌクレアーゼで消化することにより、環状産物を直鎖状産物から分離する請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

ゲル電気泳動を使用して、環状産物を直鎖状産物から分離する請求項 106 に記載の方法。

【請求項 109】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 2 個のポリヌクレオチド構造物の、単一の反応混合物中でのアSEMBル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 部分的オーバーラップする、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；

(b) 架橋オリゴヌクレオチドを構造体オリゴヌクレオチドのプールへ提供するステップ、但し架橋オリゴヌクレオチドは正しいポリヌクレオチド構造物の末端に相補的であるが、不適当なクロスオーバー産物の両末端には非相補的である；

(c) その構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件及びライゲーション条件におき、直鎖状及び環状産物の混合物を形成するステップ；

(d) 混合物を変性して一本鎖環状及び直鎖状産物の混合物を形成するステップ；

(e) 混合物を一本鎖エキソヌクレアーゼと接触させ、直鎖状フラグメントを除去するステップ；

(f) 一本鎖環状産物をプライマー対と鎖伸長条件下で接触させるステップ、但しプライマー対は、目的のポリヌクレオチド構造物の配列へフランキングし、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物の複数のコピーを形成する。

【請求項 110】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 3 個のポリヌクレオチド構造物が単一の反応混合物中でアSEMBルされる請求項 103～109 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 111】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 5 個のポリヌクレオチド構造物が単一の反応混合物中でアSEMBルされる請求項 100 に記載の方法。

【請求項 112】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 10 個のポリヌクレオチド構造物が単一の反応混合物中でアSEMBルされる請求項 110 に記載の方法。

【請求項 113】

少なくとも 1 の内部相同性領域を有する少なくとも 100 個のポリヌクレオチド構造物が単一の反応混合物中でアSEMBルされる請求項 110 に記載の方法。

【請求項 114】

構造体オリゴヌクレオチドのプールはオーバーラップする領域内で相補的な正鎖及び負鎖を有する請求項 103～113 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 115】

構造体オリゴヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチド構造物形成前に増幅される請求項 103～114 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 116】

ポリヌクレオチド構造物は更に、より長いポリヌクレオチド構造物中にアSEMBルされる請求項 103～115 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 117】

ポリヌクレオチド構造物は、更なるアSEMBリ前に(i)増幅、(ii)エラー減少プロセス、又は(i)及び(ii)いずれかの順で処理される請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

更にアSEMBリは下記ステップを含む請求項 116 に記載の方法：

(a) ポリヌクレオチド構造物を融解するステップ；及び
(b) ポリヌクレオチド構造物をハイブリダイゼーション条件並びに1以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、より長いポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項119】

更にアセンブリは下記ステップを含む請求項116に記載の方法：

(a) ポリヌクレオチド構造物を制限酵素と接触させるステップ；及び
(b) ポリヌクレオチド構造物をハイブリダイゼーション条件並びに1以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、より長いポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

10

【請求項120】

少なくとも1の内部相同性領域を有する少なくとも2個のポリヌクレオチド構造物単一の反応混合物中でのアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 部分的オーバーラップする、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し構造体オリゴヌクレオチドの配列は内部相同性領域内で終了しない；及び

(b) 構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件並びに1以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

20

【請求項121】

それぞれのポリヌクレオチド構造物のアセンブリのための少なくとも2個の構造体オリゴヌクレオチドは、内部相同性領域へ広がり内部相同性領域にフランキングする配列内で終了する配列を有する請求項120に記載の方法。

【請求項122】

オリゴヌクレオチドの1の末端は約5塩基対をフランキング配列中で終了する請求項121に記載の方法。

【請求項123】

少なくとも1のポリヌクレオチド構造物は更に、自己相補的領域を有する請求項120の方法であり、構造体オリゴヌクレオチドは単一の構造体オリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間のデュプレックスの融点は、オーバーラップ配列を有する2個の構造体オリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックスの融点よりも低くなるように設計される方法。

30

【請求項124】

更にその構造体オリゴヌクレオチドのプールを、単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間のデュプレックス形成よりも、オーバーラップ配列を有する2個の構造体オリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックス形成が優勢に生じるハイブリダイゼーション条件に曝すステップを含む請求項123に記載の方法。

【請求項125】

自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

40

(a) 部分的オーバーラップする、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し単一の構造体オリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間のデュプレックスの融点は、オーバーラップ配列を有する2個の構造体オリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックスの融点よりも低い；

(b) 構造体オリゴヌクレオチドのプールを、単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間のデュプレックス形成よりも、オーバーラップ配列を有する2個の構造体オリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックス形成が優勢に生じるハイブリダイゼーション条件に曝すステップ；及び

(c) 構造体オリゴヌクレオチドのプールを1以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、少な

50

くとも 2 個の自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項 1 2 6】

ループ領域が加わったセンス領域及びアンチセンス領域を有するヘアピン構造を有する複数の干渉 RNA (RNAi) 分子をエンコードする複数のポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 部分的オーバーラップする、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し構造体オリゴヌクレオチドの配列はループ領域内で終了せず、単一の構造体オリゴヌクレオチド内のセンス及びアンチセンス領域間のデュプレックスの融点は、オーバーラップ配列を有する 2 個の構造体オリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックスの融点よりも低い；

(b) 構造体オリゴヌクレオチドのプールを、単一のオリゴヌクレオチド内のセンス及びアンチセンス領域間のデュプレックス形成よりも、オーバーラップ配列を有する 2 個の構造体オリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックス形成が優勢に生じるハイブリダイゼーション条件に曝すステップ；及び

(c) 構造体オリゴヌクレオチドのプールを 1 以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i) ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、RNAi 分子をエンコードする複数のポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項 1 2 7】

オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド長さ及び／又は GC 含量の選択により上記融点を有するように設計される請求項 1 2 3、1 2 5 又は 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

それぞれのポリヌクレオチド構造物のアセンブリのための少なくとも 2 個の構造体オリゴヌクレオチドは、内部相同性領域へ広がり内部相同性領域にフランキングする配列内で終了する配列を有する請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

第 1 の構造体オリゴヌクレオチドはセンス領域、ループ領域及び一部のアンチセンス領域まで広がり、第 2 の、オーバーラップする、構造体オリゴヌクレオチドはアンチセンス領域、ループ領域及び一部のセンス領域まで広がる請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

構造体オリゴヌクレオチドにより広がったセンス及びアンチセンス領域の部分は、約 5 塩基対長である請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

ポリヌクレオチド構造物は更に、個々のポリヌクレオチド構造物の同定を可能とする複数のユニークバーコード配列を有する請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

ポリヌクレオチド構造物は更に、バーコード配列の上流にプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

プライマーハイブリダイゼーション部位は複数のポリヌクレオチド構造物に共通する請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

ポリヌクレオチド構造物は更に、ポリヌクレオチド構造物の末端近くに少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

プライマーハイブリダイゼーション部位は複数のポリヌクレオチド構造物に共通する請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

プライマーハイブリダイゼーション部位は化学的又は酵素的処理で除去可能である請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

プライマーハイブリダイゼーション部位は制限酵素で除去可能である請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

制限酵素はタイプ I I S エンドヌクレアーゼである請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

ポリヌクレオチド構造物は、プライマーハイブリダイゼーション部位及びポリヌクレオチド構造物間の接合部に少なくとも 1 のウラシル残基を有する請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

プライマーハイブリダイゼーション部位はウラシル D N A グリコシラーゼ及び A P エンドヌクレアーゼで除去可能である請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

複数の R N A i 分子は、複数のほ乳類遺伝子のアテニュエーション用配列を有する請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

アセンブルされたポリヌクレオチド構造物は、望ましくないクロスオーバー産物を含まない又は実質的にフリーである請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5 又は 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

アセンブルされたポリヌクレオチド構造物は、望ましくない重複配列を有する産物を含まない又は実質的にフリーである請求項 1 2 0、1 2 5、1 2 6 又は 1 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

構造体オリゴヌクレオチドは、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分へフランキングし、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットに共通する少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5 又は 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

全ての構造体オリゴヌクレオチドは、共通する少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

プライマーハイブリダイゼーション部位は化学的又は酵素的処理で除去可能である請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

プライマーハイブリダイゼーション部位は制限酵素で除去可能である請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

制限酵素はタイプ I I S エンドヌクレアーゼである請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

ポリヌクレオチド構造物は、プライマーハイブリダイゼーション部位及び構造体オリゴヌクレオチド間の接合部で少なくとも 1 のウラシル残基を有する請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

プライマーハイブリダイゼーション部位は、ウラシル D N A グリコシラーゼ及び A P エンドヌクレアーゼで除去可能である請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

更に構造体オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構造物、又は両方を、少なくとも 1 の一連の(i)増幅、(ii)エラー減少、又は(iii)増幅及びエラー減少をいずれかの順で処理するステップを含む請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5 又は 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 5 2】

構造体オリゴヌクレオチドのプールはポリヌクレオチド構造物のアセンブル前に増幅される請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

インプットオリゴヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチド構造物のアセンブル前にエラー減少プロセスで処理される請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

エラー減少プロセスは選択オリゴヌクレオチドのプールを使用したエラーフィルトレーション捕集である請求項 1 5 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

更にエラー減少プロセス実施前の、一連の変性及び再生ステップを含む請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

構造体オリゴヌクレオチドのプールは、オーバーラップする領域内で相補的な正鎖及び負鎖を有する請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5 又は 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

相補的にオーバーラップする領域は、約 1 0 ～約 3 0 塩基を有する請求項 1 5 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

相補的にオーバーラップする領域は、約 1 4 ～約 2 0 塩基を有する請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

更にポリヌクレオチド構造物をベクターへ導入するステップを含む請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5 又は 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

更にポリヌクレオチド構造物を宿主細胞へ導入するステップを含む請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5、1 2 6 又は 1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

更にポリヌクレオチド構造物からポリペプチド又はリボ核酸を発現するステップを含む請求項 9 0、1 0 3、1 0 6、1 0 9、1 2 0、1 2 5、1 2 6、1 5 9 又は 1 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

更にポリペプチド又はリボ核酸の物理的又は機能的特徴をアッセイするステップを含む請求項 1 6 1 に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

少なくとも 1 0 ポリヌクレオチド構造物が単一のプール中でアセンブルされる請求項 1 2 0 又は 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

少なくとも 1 0 0 ポリヌクレオチド構造物が単一のプール中でアセンブルされる請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

少なくとも 1 0 0 0 ポリヌクレオチド構造物が単一のプール中でアセンブルされる請求項 1 6 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

複数のオリゴヌクレオチドを含有する組成物であり、上記オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 の内部相同性領域を有する複数のポリヌクレオチド構造物の配列を特定するオーバーラップ配列を有し、上記オリゴヌクレオチドの配列は内部相同性領域内で終了しない組成物。

【請求項 1 6 7】

10

20

30

40

50

それぞれのポリヌクレオチド構造物の配列を特定する少なくとも2個のオリゴヌクレオチドは、内部相同性領域へ広がり、内部相同性領域にフランキングする配列内で終了する配列を有する請求項166に記載の組成物。

【請求項168】

オリゴヌクレオチドの1の末端は約5塩基対をフランキング配列中で終了する請求項167に記載の組成物。

【請求項169】

少なくとも1のポリヌクレオチド構造物は更に、自己相補的領域を有する請求項166の組成物であり、オリゴヌクレオチドは単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間のデュプレックスの融点は、オーバーラップ配列を有する2個のオリゴヌクレオチドの相補鎖間のデュプレックスの融点よりも低くなるように設計される組成物。

10

【請求項170】

オリゴヌクレオチドは、上記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部へフランキングし、少なくとも1のサブセットの上記オリゴヌクレオチドに共通する少なくとも1対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項166又は169に記載の組成物。

【請求項171】

全てのオリゴヌクレオチドは、共通する少なくとも1対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項170に記載の組成物。

【請求項172】

プライマーハイブリダイゼーション部位は化学的又は酵素的処理で除去可能である請求項170に記載の組成物。

20

【請求項173】

プライマーハイブリダイゼーション部位は制限酵素で除去可能である請求項172に記載の組成物。

【請求項174】

制限酵素はタイプIISエンドヌクレアーゼである請求項173に記載の組成物。

【請求項175】

ポリヌクレオチド構造物は、プライマーハイブリダイゼーション部位及び構造体オリゴヌクレオチド間の接合部に少なくとも1のウラシル残基を有する請求項172に記載の組成物。

30

【請求項176】

プライマーハイブリダイゼーション部位はウラシルDNAグリコシラーゼ及びAPエンドヌクレアーゼで除去可能である請求項175に記載の組成物。

【請求項177】

オリゴヌクレオチドは二本鎖である請求項166に記載の組成物。

【請求項178】

組成物はオーバーラップする領域内で相補的な正鎖及び負鎖を有するオリゴヌクレオチドを含有する請求項166に記載の組成物。

【請求項179】

相補的にオーバーラップする領域は約10～約30塩基を有する請求項178に記載の組成物。

40

【請求項180】

相補的にオーバーラップする領域は約14～約20塩基を有する請求項179に記載の組成物。

【請求項181】

ポリヌクレオチド構造物は、ループ領域が加わったセンス領域及びアンチセンス領域を有するヘアピン構造を有する複数の干渉RNA(RNAi)分子をエンコードする請求項166又は169に記載の組成物。

【請求項182】

それぞれのポリヌクレオチド構造物の配列を特定する少なくとも2個のオリゴヌクレオ

50

チドは、内部相同性領域へ広がり、内部相同性領域にフランキングする配列内で終了する配列を有する請求項 181 に記載の組成物。

【請求項 183】

第 1 のオリゴヌクレオチドはセンス領域、ループ領域及び一部のアンチセンス領域まで広がり、第 2 の、オーバーラップする、オリゴヌクレオチドはアンチセンス領域、ループ領域及び一部のセンス領域まで広がる請求項 182 に記載の組成物。

【請求項 184】

オリゴヌクレオチドにより広がったセンス及びアンチセンス領域の部分は約 5 塩基対長である請求項 183 に記載の組成物。

【請求項 185】

ポリヌクレオチド構造物は更に、個々のポリヌクレオチド構造物の同定を可能とする複数のユニークバーコード配列を有する請求項 181 に記載の組成物。

【請求項 186】

ポリヌクレオチド構造物は更に、バーコード配列の上流にプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 185 に記載の組成物。

【請求項 187】

オリゴヌクレオチドは基質上に固定化される請求項 166 又は 169 に記載の組成物。

【請求項 188】

自己相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 部分的オーバーラップする、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し構造体オリゴヌクレオチドの配列は自己相同性領域内で終了しない；及び

(b) 構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件並びに 1 以上の下記(i)～(iii)条件下に曝し：(i)ライゲーション条件、(ii)鎖伸長条件、又は(iii)鎖伸長及びライゲーション条件、自己相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。

【請求項 189】

自己相同性領域は重複配列である請求項 188 に記載の方法。

【請求項 190】

セルフホロジー領域は自己相補性の領域である請求項 188 に記載の方法。

【請求項 191】

ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用の少なくとも 2 個の構造体オリゴヌクレオチドは、自己相同性領域へ広がり自己相同性領域にフランキングする配列内で終了する配列を有する請求項 188 に記載の方法。

【請求項 192】

オリゴヌクレオチドの 1 の末端は約 5 塩基対をフランキング配列中で終了する請求項 191 に記載の方法。

【請求項 193】

自己相同性領域を有する 2 以上のポリヌクレオチド構造物が単一の反応混合物中でアセンブルされる請求項 188 に記載の方法。

【請求項 194】

自己相同性領域がポリヌクレオチド構造物の少なくとも 1 の末端及び更に自己相同性領域と非相同であるフランキング配列を有する少なくとも 1 の構造体オリゴヌクレオチドを包含(encompass)し、構造体オリゴヌクレオチドが自己相同性領域内で終了しない請求項 188 に記載の方法。

【請求項 195】

更にポリヌクレオチド構造物のアセンブリ後フランキング配列を除去するステップを含む請求項 194 に記載の方法。

【請求項 196】

より大きな二本鎖ポリヌクレオチド構造物となるようにアセンブリするための複数の構造体オリゴヌクレオチドを含む組成物であり、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は構造体オリゴヌクレオチドに 5' 末端、3' 末端、又は両端でフランキングする *mutH* 切断部位を有する組成物。

【請求項 197】

構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は更に、構造体オリゴヌクレオチドにフランキングし、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットに共通する、少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 196 に記載の組成物。

【請求項 198】

構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は更に、構造体オリゴヌクレオチド及びいずれかのフランキング配列間にあり、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットに共通する切断部位を有する請求項 196 に記載の組成物。

【請求項 199】

切断部位は制限エンドヌクレアーゼ切断部位である請求項 198 に記載の組成物。

【請求項 200】

切断部位はタイプ I I S エンドヌクレアーゼ切断部位である請求項 199 に記載の組成物。

【請求項 201】

切断部位はウラシル残基である請求項 198 に記載の組成物。

【請求項 202】

構造体オリゴヌクレオチド及びいずれかの 5' フランキング配列間の切断部位は、構造体オリゴヌクレオチド及びいずれかの 3' フランキング配列間の切断部位と同じである請求項 198 に記載の組成物。

【請求項 203】

構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は更に、検出、単離又は固定化用薬剤を含有し、それは構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットに共通する請求項 196 に記載の組成物。

【請求項 204】

薬剤はビオチン、フルオレセイン、又はアプタマーである請求項 203 に記載の組成物。

【請求項 205】

複数の構造体オリゴヌクレオチドより大きな二本鎖ポリヌクレオチド構造物となるようにアセンブリするための組成物であり、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は下記を有する組成物：

- (i) 構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 の末端にフランキングする *mutH* 切断部位、
- (ii) 構造体オリゴヌクレオチドにフランキングし、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットに共通する少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位、及び
- (iii) 構造体オリゴヌクレオチド及びいずれかのフランキング配列間にあり、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットに共通する切断部位。

【請求項 206】

精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールの製造方法であり、下記ステップを含む方法：

- (a) 二本鎖構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ、但し構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、検出、単離又は固定化用薬剤及び構造体オリゴヌクレオチドに 5' 末端又は 3' 末端でフランキングする *mutH* 切断部位を有する；
- (b) 構造体オリゴヌクレオチドのプールを *mutHLS* と接触させるステップ、但し *mutHLS* は 1 以上のミスマッチを有する構造体オリゴヌクレオチドのコピーに結合し、

10

20

30

40

50

1 以上のミスマッチを有するコピーをmutH切断部位で切断する；及び
(c) mutH切断部位で切断された構造体オリゴヌクレオチドのコピーを除去し、精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールを形成するステップ。

【請求項 207】

薬剤はビオチンである請求項 206 に記載の方法。

【請求項 208】

更にmutHLS添加前に構造体オリゴヌクレオチドを増幅するステップを含む請求項 206 に記載の方法。

【請求項 209】

更にmutHLS添加前に構造体オリゴヌクレオチドのプールを変性しリアニールする
ステップを含む請求項 206 又は 208 に記載の方法。 10

【請求項 210】

特定された配列を有するポリヌクレオチド構造物を求める需要者の注文を満足させるための製造者用自動化プロセスであり、下記ステップを含むプロセス：

(a) 目的の配列を需要者から入手するステップ；

(b) 目的の配列を特定する一組の構造体オリゴヌクレオチドをコンピュータ上で設計するステップ

；及び

(c) 構造体オリゴヌクレオチドのセットを合成するステップ。 20

【請求項 211】

目的の配列は1のポリペプチド配列をエンコードする請求項 210 に記載のプロセス。

【請求項 212】

更にポリペプチド配列をエンコードする1以上のポリヌクレオチド構造物をコンピュータを使用して決定するステップを含む請求項 211 に記載のプロセス。

【請求項 213】

更に選択オリゴヌクレオチドのセットをコンピュータ上で設計するステップを含む請求項 210 に記載のプロセス。

【請求項 214】

更に選択オリゴヌクレオチドのセットを合成するステップを含む請求項 213 に記載のプロセス。 30

【請求項 215】

更にポリヌクレオチド構造物の製造のためのアセンブリ手順を設計するステップを含む請求項 210 に記載のプロセス。

【請求項 216】

更にアセンブリ手順を使用してポリヌクレオチド構造物をアセンブルするステップを含む請求項 215 に記載のプロセス。

【請求項 217】

アセンブリ手順はコンピュータ的に設計される請求項 215 に記載のプロセス。

【請求項 218】

更に1以上の下記を需要者へ輸送するステップを含む請求項 210、214 又は 215
のいずれか1項に記載のプロセス：構造体オリゴヌクレオチドのセット、選択オリゴヌクレオチドのセット、ポリヌクレオチド構造物をアセンブルするステップの指令。 40

【請求項 219】

更にポリヌクレオチド構造物をアセンブルするステップのための1以上の薬剤を需要者へ輸送するステップを含む請求項 218 に記載のプロセス。

【請求項 220】

薬剤緩衝剤又は酵素である請求項 219 に記載のプロセス。

【請求項 221】

更にポリヌクレオチド構造物を需要者へ輸送するステップを含む請求項 216 に記載のプロセス。 50

【請求項 2 2 2】

更に 1 以上のユニバーサルタグを、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 のサブセットの 5' フランキンク領域、3' フランキンク領域又はそれらの両方へコンピュータ的に添加するステップを含む請求項 2 1 0 に記載のプロセス。

【請求項 2 2 3】

複数の目的の配列が需要者から得られる請求項 2 1 0 に記載のプロセス。

【請求項 2 2 4】

更に 1 のプール中でポリヌクレオチド構造物を製造するためのアセンブリ手順設計するステップを含む請求項 2 2 3 に記載のプロセス。

【請求項 2 2 5】

更にポリヌクレオチド構造物の製造のための階層化されたアセンブリ手順を設計するステップを含む請求項 2 2 3 に記載のプロセス。

【請求項 2 2 6】

アセンブリ手順は 1 以上のエラー減少プロセスを含む請求項 2 1 5 又は 2 2 3 に記載のプロセス。

【請求項 2 2 7】

アセンブリ手順は 1 以上の増幅ステップを含む請求項 2 1 5 又は 2 2 3 に記載のプロセス。

【請求項 2 2 8】

更に下記ステップを含む請求項 2 1 0、2 1 3、2 1 5 又は 2 2 3 のいずれか 1 項に記載のプロセス：

- (a) 特別の宿主細胞中の発現のためのコドン使用を最適化するステップ、
- (b) ハイブリダイゼーション条件を一組の構造体オリゴヌクレオチドのためにノーマライズするステップ、
- (c) 一組の構造体及び選択オリゴヌクレオチドのためにハイブリダイゼーション条件をノーマライズするステップ、及び
- (d) コドン再配置により 2 以上の目的の配列間の相同性を減少させるステップ。

【請求項 2 2 9】

目的の配列はデータベースから得られる請求項 2 1 0 に記載のプロセス。

【請求項 2 3 0】

需要者からの通信は、製造者の記憶装置内に保持される請求項 2 1 0 に記載のプロセス。

【請求項 2 3 1】

1 以上の、構造体オリゴヌクレオチドの配列、選択オリゴヌクレオチドの配列、又はアセンブリ手順、が製造者の記憶装置内に保持される請求項 2 1 0、2 1 3 又は 2 1 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 2 3 2】

注文設計されたポリヌクレオチド構造物のための需要者からの注文を得るための製造者用システムであり、下記ステップを含むシステム：

- (a) 製造者需要者から目的の配列を受領するためのネットワーク化された受け入れセッション；
- (b) 一組の構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチドのセット、又はアセンブリ手順を設計するためのソフトウェア手段；及び
- (c) 構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチド又はそれらの両方を合成するための製造システム。

【請求項 2 3 3】

更にポリヌクレオチド構造物の自動化アセンブリ用製造システムを含む請求項 2 3 2 に記載のシステム。

【請求項 2 3 4】

予め特定された配列を有する合成核酸の複数のコピーを含む組成物であり、上記核酸の

10

20

30

40

50

長さは少なくとも約 5 キロベースであり、上記コピーの少なくとも約 1 % は予め特定された配列中にエラーを有さない組成物。

【請求項 2 3 5】

核酸の長さは少なくとも約 1 0 キロベースである請求項 2 3 4 に記載の組成物。

【請求項 2 3 6】

核酸の長さは少なくとも約 1 0 0 キロベースである請求項 2 3 5 に記載の組成物。

【請求項 2 3 7】

少なくとも約 5 % の上記エラーを有さないコピーが上記予め特定された配列である請求項 2 3 4 に記載の組成物。

【請求項 2 3 8】

少なくとも約 1 0 % の上記エラーを有さないコピーが上記予め特定された配列である請求項 2 3 7 に記載の組成物。

【請求項 2 3 9】

少なくとも約 2 0 % の上記エラーを有さないコピーが上記予め特定された配列である請求項 2 3 8 に記載の組成物。

【請求項 2 4 0】

少なくとも約 5 0 % の上記エラーを有さないコピーが上記予め特定された配列である請求項 2 3 8 に記載の組成物。

【請求項 2 4 1】

組成物は少なくとも約 1 m g の上記合成核酸を含む請求項 2 3 4 に記載の組成物。

【請求項 2 4 2】

組成物は少なくとも約 1 g の上記合成核酸を含む請求項 2 4 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4 3】

組成物は少なくとも約 1 k g の上記合成核酸を含む請求項 2 4 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4 4】

組成物は、上記不純物を除去するための精製ステップを使用せずに、少なくとも 1 の細胞質不純物を本質的に有さない請求項 2 3 4 に記載の組成物。

【請求項 2 4 5】

組成物は、少なくとも 1 の下記細胞質不純物を本質的に有さない請求項 2 4 4 に記載の組成物：脂質；リポ多糖類（L P S）；炭水化物；発熱物質；1 以上の下記以外の蛋白質：ポリメラーゼ、リガーゼ、ミスマッチ結合蛋白質、ミスマッチ修復蛋白質、メチラーゼ、デメチラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、若しくはエキソヌクレアーゼ；又は 1 以上の下記以外の小分子：d N T P、ビオチン、若しくは化学的クロスリンカー。

【請求項 2 4 6】

組成物は少なくとも 1 種の核酸修飾を本質的に有さない請求項 2 3 4 に記載の組成物。

【請求項 2 4 7】

修飾はメチル化である請求項 2 4 5 に記載の組成物。

【請求項 2 4 8】

核酸のプール中のエラー割合の減少方法であり、下記ステップを含む方法：

（a）核酸のプールを一本鎖ヌクレアーゼへ、ヌクレアーゼによる少なくとも 1 のミスマッチを有する核酸の切断を可能とする条件下で接触させ、消化された核酸のプールを形成するステップ；及び

（b）消化された核酸のプール中の切断された核酸から完全長核酸を分離し、エラーを有する核酸のコピーをプールから除去し、減少されたエラー割合を有するプールとするステップ。

【請求項 2 4 9】

更に核酸のプールを一本鎖ヌクレアーゼへ接触させる前の、一連の変性及び再生ステップを有する請求項 2 4 8 に記載の方法。

【請求項 2 5 0】

更に消化された核酸のプール中に残存する完全長核酸の増幅ステップを含む請求項 2 4

10

20

30

40

50

8に記載の方法。

【請求項 2 5 1】

完全長核酸は、サイズ分離により切断された核酸から分離される請求項 2 4 8に記載の方法。

【請求項 2 5 2】

サイズ分離はゲル電気泳動である請求項 2 5 1に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

サイズ分離はカラムクロマトグラフィーである請求項 2 5 1に記載の方法。

【請求項 2 5 4】

更に (a) 及び (b) を少なくとも 2 回繰り返すステップを含む請求項 2 4 8に記載の方法。 10

【請求項 2 5 5】

核酸のプール中のエラー割合を減少させる方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 核酸のプールを一本鎖ヌクレアーゼへ、ヌクレアーゼによる少なくとも 1 のミスマッチを有する核酸の切断を可能とする条件下で接触させ、消化された核酸のプールを形成するステップ；

(b) 消化された核酸のプールへ一連の変性及び再生処理を行うステップ；及び

(c) 消化された核酸のプールを鎖伸長条件又は鎖伸長及びライゲーション条件下でインキュベートし、減少されたエラー割合を有する完全長核酸のプールを再生するステップ。

【請求項 2 5 6】

更に (b) 及び (c) を少なくとも 2 回繰り返すステップを含む請求項 2 5 5に記載の方法。 20

【請求項 2 5 7】

更に (a)、(b) 及び (c) を少なくとも 2 回繰り返すステップを含む請求項 2 5 5に記載の方法。

【請求項 2 5 8】

更にプライマーを鎖伸長条件又は鎖伸長及びライゲーション条件下で消化された核酸のプールへ添加するステップを含む請求項 2 5 5又は 2 5 6に記載の方法。

【請求項 2 5 9】

一本鎖ヌクレアーゼは大豆ヌクレアーゼである請求項 2 4 8又は 2 5 5に記載の方法。 30

【請求項 2 6 0】

一本鎖ヌクレアーゼは S 1 ヌクレアーゼである請求項 2 4 8又は 2 5 5に記載の方法。

【請求項 2 6 1】

エラー割合は少なくとも 5 0 % 減少する請求項 2 4 8又は 2 5 5に記載の方法。

【請求項 2 6 2】

エラー割合は少なくとも 7 5 % 減少する請求項 2 6 1に記載の方法。

【請求項 2 6 3】

エラー割合は少なくとも 9 0 % 減少する請求項 2 6 2に記載の方法。

【請求項 2 6 4】

更に核酸をベクターへ導入するステップを含む請求項 2 4 8又は 2 5 5に記載の方法。 40

【請求項 2 6 5】

更に核酸を宿主細胞へ導入するステップを含む請求項 2 4 8、2 5 5又は 2 6 4のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6 6】

更に核酸からのポリペプチド又はリボ核酸を発現するステップを含む請求項 2 4 8、2 5 5、2 6 4又は 2 6 5のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6 7】

更に物理的又は機能的特徴のためのポリペプチド又はリボ核酸をアッセイするステップを含む請求項 2 6 6に記載の方法。

【請求項 2 6 8】

少なくとも一部の核酸は環状である請求項 2 4 8 又は 2 5 5 に記載の方法。

【請求項 2 6 9】

少なくとも一部の核酸は直鎖状である請求項 2 4 8 又は 2 5 5 に記載の方法。

【請求項 2 7 0】

直鎖状核酸は、核酸のプールの一本鎖ヌクレアーゼへの接触前に、一本鎖ヌクレアーゼによる末端の切断を阻止する薬剤で一端又は両端がブロックされる請求項 2 6 9 に記載の方法。

【請求項 2 7 1】

直鎖状核酸は、ブロックされたビオチンで一端又は両端がブロックされる請求項 2 7 0 に記載の方法。

【請求項 2 7 2】

固体サポート及び固体サポートに結合された複数の別個のフィーチャ(features)を有する核酸アレイであり、それぞれのフィーチャは独立して特定されたコンセンサス配列を共同して(collectively)有する核酸の母集団を含み、上記フィーチャの核酸の 1 0 パーセント以下が同一の配列を有する核酸アレイ。

【請求項 2 7 3】

1 のフィーチャの上記核酸の 5 パーセント以下は同一の配列を有する請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 7 4】

1 のフィーチャの上記核酸の 2 パーセント以下は同一の配列を有する請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 7 5】

核酸は少なくとも 5 0 ヌクレオチド長である請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 7 6】

核酸は少なくとも 1 0 0 ヌクレオチド長である請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 7 7】

核酸は少なくとも 2 0 0 ヌクレオチド長である請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 7 8】

核酸は固体サポートから放出可能である請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 7 9】

フィーチャは、固体サポートから核酸を選択的に放出する手段を含む請求項 2 7 8 に記載のアレイ。

【請求項 2 8 0】

固体サポートから核酸を選択的に放出する手段は、静電的又は制御されたフィールド手段による核酸放出手段を含むことである請求項 2 7 9 に記載のアレイ。

【請求項 2 8 1】

固体サポートから核酸を選択的に放出する手段は、光不安定なリンカーを含む請求項 2 7 9 に記載のアレイ。

【請求項 2 8 2】

フィーチャは核酸と可逆的非共有の相互結合を形成するための化学薬剤を有し、その相互結合は選択的に解離されて、上記フィーチャの予め決定されたサブセットから核酸を放出する請求項 2 7 8 に記載のアレイ。

【請求項 2 8 3】

フィーチャは核酸と共有結合を形成するための化学薬剤を含み、その結合は選択的に切断されて、上記フィーチャの予め決定されたサブセットから核酸を放出する請求項 2 7 8 に記載のアレイ。

【請求項 2 8 4】

平方センチ当たり少なくとも 1 0 0 個の異なるフィーチャを有する請求項 2 7 2 に記載のアレイ。

【請求項 2 8 5】

10

20

30

40

50

平方センチ当たり少なくとも500個の異なるフィーチャを有する請求項272に記載のアレイ。

【請求項286】

平方センチ当たり少なくとも1000個の異なるフィーチャを有する請求項272に記載のアレイ。

【請求項287】

フィーチャは500ミクロン未満のフィーチャサイズを有する請求項272に記載のアレイ。

【請求項288】

フィーチャは100ミクロン未満のフィーチャサイズを有する請求項272に記載のアレイ。

【請求項289】

固体サポートはガラス、シリコン、セラミック及びナイロンの群から選ばれる請求項272に記載のアレイ。

【請求項290】

フィーチャは、ポリテトラフルオロエチレン、二フッ化ポリビニリデン、ポリスチレン、ポリカーボネート、及びそれらの組み合わせの群から選ばれるポリマーからなる上記固体サポートの表面上に提供される請求項272に記載のアレイ。

【請求項291】

フィーチャは、その1個と他のものが流体的に結合している請求項272に記載のアレイ。

【請求項292】

予め特定された配列を有する少なくとも1のポリヌクレオチド構造物のアSEMBル方法であり、下記ステップを含む方法：

(a) 固体サポート及び固体サポートに結合された複数の別個のフィーチャを有する1以上の核酸アレイを用意するステップ、但しそれぞれのフィーチャは独立して特定されたコンセンサス配列を共同して有する構造体オリゴヌクレオチドの母集団を含み、上記フィーチャの上記構造体オリゴヌクレオチドの10パーセント以下が同一の配列を有する

(b) 同時に又は連続的に構造体オリゴヌクレオチドを1以上の上記フィーチャから放出し、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する部分的オーバーラップ配列を含む構造体オリゴヌクレオチドのプールを形成するステップ；及び

(c) 下記を促進する条件を提供するステップ：

(i) 構造体オリゴヌクレオチドの、相補的オーバーラップ配列のハイブリダイゼーション；

(ii) ポリヌクレオチド構造物を形成する、ハイブリダイズした構造体オリゴヌクレオチドのライゲーション、鎖伸長又は鎖伸長及びライゲーション、
；並びに

(iii) 上記予め決定された配列を有するポリヌクレオチド構造物を提供するエラー減少プロセス。

【請求項293】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも1000塩基長である請求項292に記載の方法。

【請求項294】

ポリヌクレオチド構造物は少なくとも5000塩基長である請求項292に記載の方法。

【請求項295】

構造体オリゴヌクレオチドのプールは、オーバーラップする領域内で相補的であるその正鎖及び負鎖を有する請求項292に記載の方法。

【請求項296】

ポリヌクレオチド構造物の形成前に、構造体オリゴヌクレオチドのプールを増幅するス

10

20

30

40

50

テップを含む請求項 292 に記載の方法。

【請求項 297】

更に構造体オリゴヌクレオチドのプールを、ポリヌクレオチド構造物の形成前にエラー減少プロセスで処理するステップを含む請求項 292 に記載の方法。

【請求項 298】

エラー減少プロセスはエラーフィルトレーション捕集プロセスである請求項 292 に記載の方法。

【請求項 299】

エラー減少プロセスはエラーニュートラル化プロセスである請求項 292 に記載の方法。

10

【請求項 300】

エラー減少プロセスはエラー修復プロセスである請求項 292 に記載の方法。

【請求項 301】

構造体オリゴヌクレオチドは、上記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分へフランキングし、少なくとも 1 のサブセットの上記オリゴヌクレオチドに共通する少なくとも 1 対のプライマーハイブリダイゼーション部位を有する請求項 292 に記載の方法。

【請求項 302】

プライマーハイブリダイゼーション部位は除去可能である請求項 301 に記載の方法。

【請求項 303】

少なくとも 2 個のポリヌクレオチド構造物は同一の反応混合物中で形成される請求項 292 に記載の方法。

20

【請求項 304】

更にポリヌクレオチド構造物を増幅するステップを含む請求項 292 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願：

本出願は米国出願番号 11/067812 及び 11/068321（いずれも 2005 年 2 月 28 日出願）の部分継続であり、本出願は又米国予備特許出願番号 60/619650、（2004 年 10 月 18 日出願）、60/657014（2005 年 2 月 28 日出願）、60/698560（2005 年 7 月 12 日出願）、及び代理人整理番号 SYNBP62-004（2005 年 10 月 14 日出願）の予備出願、発明の名称：高忠実度合成ポリヌクレオチドのアセンブリ方法（出願番号は未だ付与されていない）の優先権を主張し；その出願書類を全てここで資料として使用する。

30

【背景技術】

【0002】

組み換え型 DNA 化学技術を使用して、DNA 配列が天然物から複製され、増幅され、次に逆アセンブルされて構成部分となることは今や普通である。構成部分として、配列は次に再結合され又は再アセンブルされて新しい DNA 配列となる。しかし、入手可能な天然の配列への依存は、非常に研究者により達成される可能性を限定する。現在、短い DNA 配列を個々のヌクレオチドから直接合成することは可能であるが、約 400 塩基対より大きな DNA 配列の大きなセグメント又はアセンブリを直接に構築することは一般的に不可能である。その結果、DNA のより大きなセグメントは、一般的に個々に購入し、クローンし又は合成できる構成部分及びセグメントから構築され、次にアセンブルされて目的の DNA 分子が得られている。

40

【0003】

現在、基本的オリゴヌクレオチドでさえその製造方法は高価であり（例えば、1 ヌクレオチド当たり 0.11 米ドル）、非常に高レベルのエラーを有する（欠失は 100 塩基中 1 の割合、ミスマッチ及び挿入は 400 塩基中約 1）。その結果、オリゴヌクレオチドからの遺伝子又はゲノム合成は、高価であり、かつエラーを起こしやすい。クローン塩基配

50

列決定及び突然変異誘発法によるエラー修復は、労働量及び総費用を更に増加させる（塩基対当たり少なくとも2米ドルまで）。原則的に、オリゴヌクレオチド合成費用は、マイクロチップ上に大規模にパラレルカスタム合成を実施することにより低減できる（非特許文献1、2）。これは現在、標準的薬剤を使用してのインクジェットプリント等の種々の方法を使用して達成できる（Agilent法；参照、例えば特許文献1）「光不安定な5'保護基」（Nimblegen/Affymetrix法；参照、例えば特許文献2～6）、光生成酸脱保護（Attactic/Xeotron法；参照、例えば非特許文献3～5及び特許文献7）、電解酸／塩基アレイ（Oxamer／コンビマトリックス法；参照例えば特許文献8～11）。しかし、現在のマイクロチップは非常に低い表面積を有するため、少量のオリゴヌクレオチドのみが製造できる。溶液中に放出される場合、オリゴヌクレオチドは配列当たりピコモル又は低濃度で存在し、その濃度は2分子プライミング反応を有効に起こすために不十分なものである。

【0004】

正確なDNA構造物の製造は、化学的合成技術に必ず伴われるエラー割合により非常に影響を受ける。例えば、図1の表はエラー割合のポリヌクレオチド忠実度に対する効果を示す。例えば、オープンリーディングフレーム3000塩基対を有するDNAを、1000中1塩基のエラー割合で生じる方法を使用して合成すると、正確な配列を有する合成DNAの5%未満のコピーしか生じない。

【0005】

ホスホロアミダイト化学によるオリゴヌクレオチド合成技術では現在、200中約1塩基の割合でエラーが生じる。光分解性合成技術を使用してチップ上に合成されたDNAは、伝えられるところによると約1/50のエラー割合を有し、約1/100まで改善できる可能性がある。高忠実度PCRはエラー割合が約1/10⁵である。このような高忠実度複製でさえ遺伝子3000bp長の遺伝子にとっては、ex vivoで操作されたポリメラーゼは現在でもエラー約3%を有するコピーを製造する。現在の最良の市販DNA合成プロトコルはここ数十年の発展の頂点を表すために、ポリヌクレオチドの化学的合成の桁数を上げる追加的改良が、近い将来起こるとは考えられなかった。

【特許文献1】米国特許第6323043号明細書

【特許文献2】米国特許第5405783号明細書

【特許文献3】国際公開WO03/065038号パンフレット

【特許文献4】国際公開WO03/064699号パンフレット

【特許文献5】国際公開WO03/064026号パンフレット

【特許文献6】国際公開WO02/04597号パンフレット

【特許文献7】米国特許第6426184号明細書

【特許文献8】米国特許出願公開第2003/0054344号明細書

【特許文献9】米国特許第6093302号明細書

【特許文献10】米国特許第6444111号明細書

【特許文献11】米国特許第6280595号明細書

【非特許文献1】Zhouら(2004) Nucleic Acids Res.32:5409

【非特許文献2】Fodorら(1991)Science251:767

【非特許文献3】X.Gaoら、Nucleic Acids Res.29:4744-50(2001)

【非特許文献4】X.Gaoら、J.Am.Chem.Soc.120:12698-12699(1998)

【非特許文献5】O.Srivannavitら、Sensors and Actuators A.116:150-160(2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

遺伝子及びゲノム合成技術の広範な適用は、高額な費用及び高いエラー割合、及び自動化の欠如等の制限によりはばまれている。従って本発明の目的は、ポリヌクレオチド及び大きな遺伝系の実際的、経済的な注文合成方法にある。本発明は、更に公知方法により製造される合成ポリヌクレオチドよりもより低いエラー割合を有する合成ポリヌクレオチド

の製造方法を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

まとめ

本発明は、個々に又は一緒に使用できるMullis(Mullisら(1986)Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51Pt1:263)及びStemmer(Stemmerら(1995) Gene 164:49)のDNAアセンブリ方法を様々に改良をすることにより有用な、高忠実度合成DNA構造物の費用効果のある製造を可能とする方法を提供する。本発明の改良は、下記技術の進歩を含む：アセンブリ用のオリゴヌクレオチドのコンピュータ的設計、即ち「構造体オリゴヌクレオチド」の設計、及び精製、即ち「選択オリゴヌクレオチド」；構造体オリゴヌクレオチドアセンブリの複合化、即ち、同一のプール中での複数の異なるアセンブリの製造；構造体オリゴヌクレオチド増幅技術；並びに構造体オリゴヌクレオチドエラー減少技術。

10

【0008】

本発明は、様々な段階でのオリゴヌクレオチドの増幅を含む、予め特定された配列を有するポリヌクレオチド構造物製造方法に関する。本発明の方法は、ポリヌクレオチド構造物の配列を特定する部分的オーバーラップ配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを提供するステップを含む。構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも1のサブセットに共通する少なくとも1対のプライマーハイブリダイゼーション部位は、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分にフランキングする。切断部位は、プライマーハイブリダイゼーション部位及び構造体オリゴヌクレオチドを分離する。構造体オリゴヌクレオチドのプールは次に、プライマーハイブリダイゼーション部位へ結合する少なくとも1のプライマーを使用して増幅される。任意で、プライマーハイブリダイゼーション部位は次に、構造体オリゴヌクレオチドから切断部位で（例えば、制限エンドヌクレアーゼ、化学的切断等を使用して）除去される。増幅後に構造体オリゴヌクレオチドは、例えばオリゴヌクレオチドを変性して相補鎖を分離し、次に構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件並びにライゲーション及び／又は鎖伸長条件下に曝すことにより、アセンブリ処理される。

20

【0009】

又、本発明は、精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールの製造方法に関する。本発明の方法は、構造体オリゴヌクレオチドのプールを選択オリゴヌクレオチドのプールとハイブリダイゼーション条件下で接触させ、デュプレックスを形成するステップを含む。この反応は、安定なデュプレックス（例えば、別の異なる相補的領域中にミスマッチを含まない、構造体オリゴヌクレオチドのコピー及び選択オリゴヌクレオチドのコピーのデュプレックス）並びに不安定なデュプレックス（例えば、相補的領域内に1以上のミスマッチ、例えば、塩基ミスマッチ、挿入、又は欠失を含む、構造体オリゴヌクレオチドのコピー及び選択オリゴヌクレオチドのコピーのデュプレックス）の両方を形成する。不安定なデュプレックスを形成した構造体オリゴヌクレオチドのコピーは、次に（例えばカラム等の分離技術を使用して）プールから除去され、精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールを形成する。任意で、（例えば、構造体及び選択オリゴヌクレオチドの混合物の）精製プロセスが構造体オリゴヌクレオチドの使用前に少なくとも1回繰り返される。更に、構造体オリゴヌクレオチドのプールは、様々な精製ステップの前及び／又は後に、選択ステップにより増幅されてもよい。精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールの形成後、プールは、アセンブリ条件に曝されてもよい。例えば、構造体オリゴヌクレオチドのプールは、ハイブリダイゼーション条件並びにライゲーション及び／又は鎖伸長条件下に曝されてもよい。本発明の精製方法の1種では、構造体及び選択オリゴヌクレオチドを含むデュプレックスは、ミスマッチ結合薬剤と接触され、結合されたデュプレックス（例えば、1以上のミスマッチを含むデュプレックス）は（例えば、カラム又はゲルを使用して）プールから除去される。

30

40

【0010】

又、本発明は、1のプール中に異なる複数の予め特定された配列を有する、複数のポリ

50

ヌクレオチド構造物の製造方法に関する。本発明の方法は、下記ステップを含む；

(i) 一緒にそれぞれの複数のポリヌクレオチド構造物の配列を特定する、部分的オーバーラップ配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；及び
(ii) その構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下及びライゲーション条件及び／又は鎖伸長条件下でインキュベートするステップ。任意で、上記オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチド構造物は、目的とする1以上の一連の増幅及び／又はエラー減少の処理がされる。更に、ポリヌクレオチド構造物は更に一連のアセンブリ処理されて、より一層長いポリヌクレオチド構造物を製造できる。少なくとも約2、4、5、10、50、100、500、1000以上のポリヌクレオチド構造物が、1のプール中でアSEMBルできる。

10

【0011】

同様に、本発明は、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの設計方法並びに、1以上のポリヌクレオチド構造物を製造するためのアSEMBリ手順に関する。本発明の方法は、下記ステップを含むことができる；例えば、(i)それぞれのポリヌクレオチド構造物の配列を部分的オーバーラップ配列セグメントへコンピュータ的に分割するステップ；
(ii)部分的オーバーラップ配列セグメントのセットに対応する配列を有する構造体オリゴヌクレオチドを合成するステップ；及び(iii)構造体オリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーション条件下並びにライゲーション及び／又は鎖伸長条件下でインキュベートするステップ。任意で、本発明の方法は更に下記ステップを含む；(i)構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分の末端へ、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも1のサブセットに共通する1以上の対のプライマーハイブリダイゼーション部位をコンピュータ的に添加し、プライマーハイブリダイゼーション部位及び構造体オリゴヌクレオチド間の切断部位を決定するステップ；(ii)その構造体オリゴヌクレオチドを、上記プライマーハイブリダイゼーション部位へ結合する少なくとも1のプライマーを使用して増幅するステップ；及び(iii)上記プライマーハイブリダイゼーション部位を構造体オリゴヌクレオチドから上記切断部位で除去するステップ。好ましくはこれらプライマー部位は、プール中の構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分で共通する。本発明の方法は更に、下記ステップを含む；少なくとも一部の上記構造体オリゴヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも1の選択オリゴヌクレオチドのプールをコンピュータ上で設計するステップ、上記選択オリゴヌクレオチドを合成するステップ、並びに構造体オリゴヌクレオチドのプールを選択オリゴヌクレオチドのプールへハイブリダイゼーションすることによるエラーフィルトレーション捕集プロセスを実施(conduction)するステップ。

20

30

【0012】

例えば、本発明は、予め特定された配列を有する合成核酸の複数のコピーを含む組成物であり、上記核酸の長さは少なくとも約500塩基、又は1、5、10、又は100キロボース以上であり、少なくとも約1%、5%、10%、20%、50%以上の上記コピーは予め特定された配列中にエラーを有さない組成物を提供する。本発明の例示では、組成物は、不純物を除去するための精製ステップ（例えば、核酸は細胞フリー法で合成される）を使用せずに、1以上の細胞質不純物から本質的にフリーである。細胞質不純物として、細胞又は細胞溶解産物サンプル、例えば、様々な蛋白質、脂質、リボ多糖類、炭水化物、発熱物質、小分子等から単離されたDNA又はRNA製剤を一般的に汚染するものが挙げられる。

40

【0013】

又、本発明は、複数の一連の増幅、エラー減少、及び／又はアSEMBリスステップを含むポリヌクレオチド構造物の合成方法を提供する。例えば本発明の方法は下記ステップを含む；(i)構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；(ii)構造体オリゴヌクレオチドを増幅するステップ及び／又は構造体オリゴヌクレオチドを1以上のエラー減少プロセス処理するステップ；(iii)構造体オリゴヌクレオチドをアSEMBルして(例えば、それらをハイブリダイゼーション及び鎖伸長及び／又はライゲーション条件に曝して)サブアSEMBリを形成するステップ；(iv)サブアSEMBリを増幅する及び／又はサブアSEMB

50

ブリを1以上のエラー減少プロセスで処理するステップ；及び(v)サブアセンブリをアセンブルして(例えば、サブアセンブリをハイブリダイゼーション条件下並びに鎖伸長及び／又はライゲーション条件下に曝すことにより)ポリヌクレオチド構造物を形成するステップ。ポリヌクレオチド構造物は、任意で1以上の一連の増幅及び／又はエラー減少処理されてもよい。様々な態様において、オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び／又はポリヌクレオチド構造物は、それぞれのアセンブリの段階で複数の一連の増幅及び／又はエラー修復処理されてもよい。アセンブリの段階でのエラー減少プロセスとして、例えば、エラーフィルトレーション捕集プロセス、エラーニュートラル化プロセス、及び／又はエラー修復プロセスが挙げられる。本発明の例示では、短オリゴヌクレオチドは選択オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを使用したエラーフィルトレーション捕集プロセスで処理され、中間の長さサブアセンブリ及び／又はポリヌクレオチド構造物はエラーフィルトレーション捕集プロセス(例えば、ミスマッチ結合薬剤への結合により)又はエラーニュートラル化プロセスで処理され、長いポリヌクレオチド構造物はエラーフィルトレーション捕集プロセス又はエラー修復プロセスで処理される。

【0014】

又、本発明は、長いポリヌクレオチド構造物の合成のための反復方法を提供する。例えば、本発明の方法は、下記ステップを含む：(i)インプットオリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びにライゲーション及び／又は鎖伸長条件下に曝し、オリゴヌクレオチドよりも長い、少なくとも1の核酸産物を形成するステップ；(ii)その核酸産物を増幅する及び／又はその核酸産物をエラー減少プロセスで処理するステップ；並びに(iii)上記(i)及び(ii)ステップを少なくとも2回繰り返すステップ、但し核酸産物はその次のサイクルでインプットオリゴヌクレオチドを構成する。

【0015】

又、本発明は、1のプール中での、異なる複数の予め特定された配列及び少なくとも1の内部相同性領域を有する複数のポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリ方法を提供する。例えば、本発明の方法は下記ステップを含む；(i)それぞれの複数のポリヌクレオチド構造物の配列を特定する部分的オーバーラップ配列を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを用意するステップ；及び(ii)構造体オリゴヌクレオチドのプールをハイブリダイゼーション条件下並びにライゲーション条件下及び／又は鎖伸長条件下へ曝すステップ。例えば、オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチド構造物は、1以上の一連の増幅及び／又はエラー減少で処理される。本発明の例示では、異なる複数の予め特定された配列及び少なくとも1の内部相同性領域を有する少なくとも約2、5、10、100、500、1000、10000以上のポリヌクレオチド構造物が1のプール中で合成される。例えば、これら方法は、複数のRNA又はポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド構造物のライブラリーの製造に有用である。例えば、ポリヌクレオチド構造物を宿主細胞へ導入し、発現産物の構造的及び／又は機能的フィーチャをアッセイすることが好ましい。

【0016】

又、本発明は、不適当なクロスオーバー産物と比較して正確なアセンブリ産物間の区別を可能とする方法に基づき、1のプール中での2以上の少なくとも1の内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法を提供する。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、正確にアセンブルされた産物が不適当なアセンブリ産物からサイズに基づき(例えばカラム又はゲルを使用して)識別できるように、識別可能な配列タグの相補物を含むものとして設計される。あるいは、末端を形成する構造体オリゴヌクレオチド(例えば、二本鎖構造物の一本鎖に関しては5'及び3'最末端構造体オリゴヌクレオチド)は、正確な環状産物の環化を可能とする相補的配列を有するように設計され、一方、不適当なクロスオーバー産物は直鎖状で残る。環状産物は次に、サイズに基づき又はエキソヌクレアーゼを使用して直鎖状産物から分離され、直鎖状産物を破壊する。例えば架橋オリゴヌクレオチドは、正確にアセンブルされた産物の環化を促進するために使用される。

【0017】

更に又、本発明は、複数の構造体オリゴヌクレオチドを含有する組成物を提供し、その

構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、5'末端、3'末端又は両端で構造体オリゴヌクレオチドにフランキングするmutH切断部位を有する。例えば、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、更に下記を少なくとも1以上含む：(i)構造体オリゴヌクレオチドにフランキングし、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも1のサブセットに共通する少なくとも1対のプライマーハイブリダイゼーション部位、(ii)構造体オリゴヌクレオチド及びいずれかのフランキング配列間であり、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも1のサブセットに共通する少なくとも1の切断部位、及び／又は(iii)検出、単離及び／又は固定化を促進し、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも1のサブセットに共通する薬剤(例えば、ビオチン、フルオレセイン、又はアプタマー等)。

【0018】

又、本発明は、自動化プロセスで注文設計されたポリヌクレオチド構造物のための需要者からの注文を得るための製造者用プロセスを提供する。その方法は例えば、下記ステップを含む；

(i)需要者から目的の配列を得るステップ；(ii)目的の配列を特定する一組の構造体オリゴヌクレオチドをコンピュータ上で設計するステップ；及び(iii)構造体オリゴヌクレオチドのセットを合成するステップ。例えば、上記方法は更に、選択オリゴヌクレオチドのセットを設計及び合成するステップを含む。上記構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、目的地でのアセンブリ用に需要者へ輸送されることもある。あるいは、製造者が、最終産物が需要者へ輸送される前に更にアセンブリプロセスを実施することもある。

【0019】

本発明の例示では、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは固体サポート上に合成される。オリゴヌクレオチドは、サポートに結合している間に増幅されてもよい(例えば、サポートは、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドのコピーの製造用の、再利用可能なテンプレートとして機能する)。あるいは、オリゴヌクレオチドは固体サポートから切り離され、任意で増幅されてもよい。

【0020】

様々な態様において、本発明の方法を使用してアセンブルされるポリヌクレオチド構造物は、少なくとも約1キロベース、10キロベース、100キロベース、1メガベース、又は1ギガベース長であり、又はそれより長い。例えば、ポリヌクレオチド構造物をベクター及び／又は宿主細胞中に挿入することが望ましい。更に、ポリヌクレオチド構造物から1以上のポリペプチドを発現することが望ましい(例えば、宿主細胞中、溶解産物、in vitro転写/翻訳システム等)。

【0021】

例えば、本発明の方法により製造されたポリヌクレオチド構造物は、500塩基中約1エラー未満、1000塩基中1エラー未満、10000塩基中1エラー未満、又はそれよりも良い塩基エラー割合を有する。

【0022】

又、本発明は：固体サポート；及び固体サポートに結合された複数の別個のフィーチャを有する核酸アレイを提供し；それぞれのフィーチャは独立して特定されたコンセンサス配列を共同して有する核酸の母集団を含むが、その中のフィーチャの核酸の10パーセント以下は同一の配列を有する。

【0023】

又、本発明は低純度アレイから得られたオリゴヌクレオチドを使用してポリヌクレオチド構造物をアセンブルする方法を提供する。例えば、本発明の方法は下記ステップを含む：

(a)固体サポート及び固体サポートに結合された複数の別個のフィーチャを有する核酸アレイを用意するステップ、但しそれぞれのフィーチャは独立して特定されたコンセンサス配列を共同して有する核酸の母集団を含み、上記フィーチャの核酸の10パーセント以下が同一の配列であり、アレイはオーバーラップする相補的配列を有する核酸を含む；(b)同時に又は連続的にフィーチャの1のサブセットから核酸を放出し、予め決定された配列

10

20

30

40

50

に対応するオーバーラップする相補的配列を有する複数の核酸を提供するステップ；並びに(c)下記を促進する条件を提供するステップ：(i)相補的配列のハイブリダイゼーション；(ii)長い二本鎖核酸を合成するためのハイブリダイズされた核酸のライゲーション及び／又は増幅；及び(iii)予め決定された配列を有する長い核酸の母集団を提供するためのミスマッチした塩基対の修復。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

図面の簡単な説明

本発明の上記及び他の特徴及び利点を、下記図面を参照しながら具体的例示により更に説明する。

10

図1は、核酸忠実度に対するエラー割合の効果を示す表1である。

図2は、オリゴヌクレオチドの設計から予め決定された配列を有する複数のポリヌクレオチド構造物の製造までの、複数のポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリ方法の一例の概略図を示す。

図3は、構造体オリゴヌクレオチドのサブアセンブリ及び／又はポリヌクレオチド構造物へのアセンブリ方法の3個の例を示し、(A)ライゲーション、(B)鎖伸長、及び(C)鎖伸長及びライゲーションを含む。点線は、ポリメラーゼにより伸長されたストランドを表す。

図4は、複数の一連のアセンブリを含むポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の概略図を示す。

20

図5は、ユニバーサルプライマーを使用してオリゴヌクレオチドプールを増幅する、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の概略図を示す。

【0025】

図6は、構造体オリゴヌクレオチドのプールを増幅するユニバーサルプライマーの1セット及び、サブアセンブリを増幅するユニバーサルプライマーの1セット(例えばabc)を使用する、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を表す概略図である。

図7は、反復的一連のエラー減少及び／又は増幅及びアセンブリを含む、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を示す概略図である。

図8は、オリゴヌクレオチドプールをエラー減少プロセス前に一連の変性/再生処理をすることによる、エラー減少プロセスの効率の1の増加方法を示す概略図である。図中、Xは配列エラー(例えば、挿入、欠失、又は不適當な塩基の形での目的の配列からの逸脱)を表す。

30

図9は、結合されたオリゴヌクレオチドを有する固体サポート上の様々な位置を示す；拡大部分は位置の中心はより高い忠実度オリゴヌクレオチドを含むことを示す。

図10は、ウラシル-DNAグリコシラーゼを使用して一時的プライマーを除去する方法の一例を示す概略図である。

図11は、内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバー産物を示す。

【0026】

図12は、内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバーポリマー化を示す。

40

図13は、相同性領域を含有する環形選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を示す。

図14は、相同性領域を含有する環形選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の別の例を示す。

図15は、相同性領域を含有するサイズ選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を示す。

図16は、相同性領域を含有するサイズ選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の別の例を示す。

図17は、内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施す

50

る場合又は、自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバーを示す。

図18は、内部相同性及び／又は自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用の、例示的構造体オリゴヌクレオチドのセットを示す。

図19は、「ハイブリダイゼーション選択」と言われるエラーフィルトレーション捕集方法の概略図を示す。90マーオリゴヌクレオチド(上部ストランド黒色、より低いストランド灰色)はタイプIIS制限酵素で切断され、50マーのハイブリッド及び相補的44マーを放出し、それらのいくつかは不適当な配列を有する(第2の90マーオリゴヌクレオチドの上部ストランド中の1個の突出部分により示される)。正確な上部50マーストランドのみが、左(L)次に右の(R)選択オリゴヌクレオチド(灰色のビーズ上に固定化されている)と良くハイブリダイズする。

10

【0027】

図20は、ミスマッチ結合蛋白質を使用するエラー配列の除去方法を示す。

図21は、ミスマッチ修復酵素用切断部位を含有する、ミスマッチ結合蛋白質及びユニバーサルタグを使用する別のエラー配列の除去方法を示す。

図22は、ミスマッチ認識蛋白質でのエラー配列のニュートラル化を示す。

図23は、一本鎖ヌクレアーゼを使用するエラー減少方法を示す。図中、Xは、配列エラーを表す(例えば、挿入、欠失、又は不適当な塩基の形での目的の配列からの逸脱)。

図24は、ストランド特異的エラー減少方法の一例を示す。

図25は、両ストランド上のミスマッチ部位でのDNAの局部的除去方法の一例を示す。

20

図26は、両ストランド上のミスマッチ部位でのDNAの局部的除去方法の別の一例を示す。

。

【0028】

図27は、塩基エラー(ミスマッチ)を有するオリゴヌクレオチドを切断するために使用される例示的ミスマッチ結合薬剤を示す。(A)はMMBP-N(ミスマッチ結合蛋白質-ヌクレアーゼ融合蛋白質)の一種を示し、例えば、FokI-mutS融合が挙げられ、本発明のエラー減少方法で利用できる。(B)は反応混合物からのエラー配列の例示的除去を示す。この反応は、切除されたDNA小片のみがフィルターを通過するようなサイズバリアを有する膜により分離されたチャンバー中で実施される。このフィルターは、好ましくは膜を通過するDNA片に対する親和性を有し、小片を貯留してそれらを反応混合物から除去する。

30

図28は、それぞれ単一の塩基(ミスマッチ)エラーを有する2個のDNAデュプレックスへ適用される図20の方法の効果をまとめる。

図29は、ミスマッチ含有セグメントの半選択的除去の一例を示す。

図30は、合成されたDNA中の関連付けられたエラーを減少する手順を示す。

図31は、低純度アレイからの、オリゴヌクレオチドを使用したポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法を示す。

図32は、一組の構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチド、及び／又はアセンブリ法を設計するのに有用なソフトウェアの概略を示す。

【0029】

詳細な説明

40

1. 定義：

ここで使用される下記用語及び文言は、下記記載の意味を有する。特記しない限り、ここで使用される全ての技術的及び科学的用語は、当分野で共通に理解されるものと同一の意味を有する。

【0030】

単数形「1の」、「1個の」は、特記されない限り複数も表す。

用語「AlkA」は、5-ホルミルウラシル(fU)/G誤対合を修復する、3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼIIを言う。例示的なAlkA蛋白質として、例えばGenBank寄託番号：D14465(枯草菌)及びK02498(大腸菌)を有する核酸並びにそのホモログ、オルソログ(定向進化遺伝子)、パラログ(偽遺伝子)、変異体、又はフラグメントによりエンコードされたポリ

50

ペプチドが挙げられる。

【0031】

用語「増幅」は核酸フラグメントのコピーが増加することを意味する。

用語「APエンドヌクレアーゼ」は、エンドヌクレアーゼを言う。DNAデュプレックス中の無塩基 (abasic) (例えば、アプリン又はアピリミジン) 部位を認識し、リボース-ホスファート成分を主鎖一本鎖破断を形成する主鎖から除去する。無塩基部位は、例えばUra-DNA-グリコシラーゼ(ウラシル塩基を認識する)、チミン-DNAグリコシラーゼ(G/Tミスマッチを認識する)、及びmutY(G/Aミスマッチを認識する)等のDNAグリコシラーゼにより形成される。例示的なAPエンドヌクレアーゼとして、例えばAPE1(又はHAP1又はRef-1)、エンドヌクレアーゼIII、エンドヌクレアーゼIV、エンドヌクレアーゼVIII、Fpg、又はHoggl

10

が挙げられ、上記全ては市販されており、例えばニューイングランドバイオラボ社(ベバリー、MA)から入手できる。

【0032】

ここで使用される文言「弱毒化ウイルス」は、そのウイルスによる罹患可能性のあるホストの感染を意味し、それは、当分野の標準的専門用語において、そのホストの発病可能性を減少させる(病原性欠如)。参照、例えばB.Davis、R.Dulbecco、H.Eisen、及びH.Ginsberg著「マイクロ生物学」132(第3版、1980)。

【0033】

ヘアピンRNA構造物に関する用語「バーコード」は、ヘアピンRNAと関連付けられたているがヘアピンRNA自体の一部ではない核酸配列を言う。バーコード配列は、例えばDNA構造物中に存在するが転写におけるヘアピン産物中には含まれない。例えば、バーコード配列は、個々のバーコードの配列の同定が、所定の構造物からエンコードされたヘアピンRNAの特性(例えば、配列)を提供するように、予め決定され、個々のヘアピンRNAとマッチされる。複数のヘアピンRNA構造物のためのバーコード配列は、(例えば、塩基配列決定又はハイブリダイゼーションを目的として)共通のプライマー配列を使用して増幅される。所定のヘアピンRNA用のバーコードの同定は、塩基配列決定又は核酸プローブへのハイブリダイゼーション、例えばマイクロアレイへのハイブリダイゼーションにより行われる。バーコード配列は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、40、50ヌクレオチド長、又は約5-50、5-40、5-30、5-25、5-20、5-15、又は5-10ヌクレオチド長である。本発明の例示では、ヘアピンRNAのライブラリーはバーコードのライブラリーと関連し、ヘアピンRNAライブラリーのそれぞれのメンバーは本質的に、異なるユニークバーコードと関連する。

20

30

【0034】

用語「塩基対合」は、二本鎖核酸中のプリン又はプリンアナログ、及びピリミジン又はピリミジンアナログ間の特異的水素結合を言い、例えば、アデニン(A)及びチミン(T)、グアニン(G)及びシトシン(C)、(A)及びウラシル(U)、及びグアニン(G)及びシトシン(C)、及びそれらの相補物 (complement) が挙げられる。塩基対合は、2本の相補的一本鎖から核酸二重らせんの形成を導く。

【0035】

用語「含有する」、「含む」及び「有する」は、包含的にオープンな意味で使用され、追加的要素が含まれてもよいことを意味する。

40

用語「保存された残基」は、所定の共通する特性を有するアミノ酸グループのメンバーであるアミノ酸を言う。用語「保存的アミノ酸置換」は、1のグループからのアミノ酸を同一のグループからの異なるアミノ酸で(概念的に又はそれ以外で)置換することを言う。個々のアミノ酸間の共通の特性を特定するための機能的方法は、相同な有機体の複数の対応する蛋白質間のアミノ酸変化の正規化された(normalized)頻度を分析することである(Schulz、G.E.及びR.H.Schirmer著「蛋白質構造の原則」Springer-Verlag)。これら分析により、アミノ酸グループは、どこで1のグループ内のアミノ酸がそれぞれ好ましく交換され、その結果全体的な蛋白質構造への影響に関して互いに最も類似するかが特定される(Schulz、G.E.及びR.H.Schirmer著「蛋白質構造の原則」Springer-Verlag)。この方法で特定された一組のアミノ酸グループの例として、下記が挙げられる：(i)Glu及びAsp、Lys

50

、Arg及びHisからなる帯電群、(ii)Lys、Arg及びHisからなる正の帯電群、(iii)Glu及びAspからなる負の帯電群、(iv)Phe、Tyr及びTrpからなる芳香族群、(v)His及びTrpからなる窒素環群、(vi)Val、Leu及びIleからなる大きな脂肪族非極性群、(vii)Met及びCysからなる僅かな極性群、(viii)Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln及びProからなる小さな残基群、(ix)Val、Leu、Ile、Met及びCysからなる脂肪族群、並びに(x)Ser及びThrからなる小さな水酸基群。

【0036】

用語「構造体オリゴヌクレオチド」は、構造体オリゴヌクレオチド自身より長い核酸分子をアセンブルするために使用される一本鎖オリゴヌクレオチドを言う。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、構造体オリゴヌクレオチドより約3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上長い核酸分子をアセンブルするために使用される。一般的に、予め決定された配列を有する一組の異なる構造体オリゴヌクレオチドは、目的の配列を有する、より大きな核酸分子へアセンブリするために使用される。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、約25～約200、約50～約150、約50～約100、又は約50～約75ヌクレオチド長である。構造体オリゴヌクレオチドのアセンブリは種々の方法により実施され、例えば、PAM、PCRアセンブリ、ライゲーション連鎖反応、ライゲーション/融合PCR、デュアル非対称PCR、オーバーラップ伸長PCR、及びそれらの組み合わせが挙げられる。構造体オリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチド又は二本鎖オリゴヌクレオチドである。本発明の例示では、構造体オリゴヌクレオチドは、基質上で並行して合成された合成オリゴヌクレオチドである。構造体オリゴヌクレオチドの配列設計は、コンピュータプログラム、例えば商品名DNAワークス(Hoover及びLubkowski、Nucleic Acids Res.30:e43(2002)、商品名ジェン2オリゴ(Rouillardら、Nucleic Acids Res.32:W176-180(2004)及びwwwアドレスberry.engin.umich.edu/gene2oligo)等、又は更に下記に記載された実施システム及び方法等の助けにより容易化される。

【0037】

用語「dam」は、DNA複製開始、DNAミスマッチ修復及びいくつかの遺伝子の発現のレギュレーションにおいて調節する役割を果たすアデニンメチルトランスフェラーゼを言う。この用語は、原核性dam蛋白質並びにそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントを含むものとする。例示的には、dam蛋白質として、例えば下記Gen Bank寄託番号AF091142(髄膜炎菌株BF13)、AF006263(梅毒菌)、U76993(ネズミチフス菌)及びM22342バクテリオファージT2)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチドが挙げられる。

【0038】

ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用の一組のオリゴヌクレオチドに関する用語「配列特定」は、オリゴヌクレオチドからアセンブルされるポリヌクレオチド構造物の完全配列と一緒に少なくともカバーするか、又は全体にまたがるオリゴヌクレオチド配列を意味する。多くの場合、一組のオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチド構造物の配列の少なくとも一部を1回を超えてカバーする配列を含む。例えば、構造体オリゴヌクレオチドのオーバーラップする相補的領域は、ポリヌクレオチド構造物配列の部分を(例えば、オーバーラップする領域内で)2回カバーする。他の場合、一組のオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチド構造物配列の部分を1回のみカバーする配列を含む(即ち、センス又はアンチセンス配列のみが非オーバーラップする領域中に表れる。)

【0039】

用語「変性」又は「融解する」は、それによりデュプレックス核酸分子のストランドが一本鎖分子へ分離されるプロセスを言う。変性方法として、例えば、熱的変性及びアルカリ変性が挙げられる。

【0040】

用語「検出用マーカー」は、その核酸配列を含む細胞の同定を促進する核酸配列を言う。例えば検出用マーカーは、化学発光又は蛍光発光蛋白質をエンコードし、蛋白質の例として、例えば下記緑蛍光発光蛋白質(GFP)、蛍光強度の強い緑蛍光発光蛋白質(EGFP)、ウ

ミシイタケ緑蛍光発光蛋白質、GFPmut2、GFPuv4、蛍光強度の強い黄色蛍光発光蛋白質(EYFP)、蛍光強度の強いシアン蛍光発光蛋白質(ECFP)、蛍光強度の強い青色蛍光発光蛋白質(EBFP)、discosoma由来のレモン色及び赤色蛍光発光蛋白質(dsRED)。他の例として、検出用マーカーは、抗原性又は、親和性ペプチドでもよく、例えばポリHis、myc、HA、GST、蛋白質A、蛋白質G、カルモデュリン結合ペプチド、チオレドキシン、マルトース結合蛋白質、ポリアルギニン、ポリHis-Asp、FLAG等が挙げられる。

【0041】

用語「DNA修復」は、核酸(DNA：DNAデュプレックス、DNA：RNAデュプレックス及び、本発明の目的の範囲内でRNA：RNAデュプレックス)中の配列エラーが、ヌクレアーゼにより認識され、損傷した又は突然変異した領域が核酸から切除され；更に酵素又は酵素的活性によりストランドの置換部分が合成され正確な配列が製造されるプロセスを言う。

10

【0042】

用語「DNA修復酵素」は、核酸構造及び配列中のエラーを認識し、結合し、及び／又は修復する、即ち核酸デュプレックス中の異常な塩基対合を認識し、結合し及び／又は修復する1以上の酵素を言う。これら異常な塩基対合として、例えばミスマッチ塩基、挿入及び欠失が挙げられる。DNA修復酵素の例として、例えばmutH、mutL、mutM、mutS、mutY、dam、チミジンDNAグリコシラーゼ(TDG)、ウラシルDNAグリコシラーゼ、AlkA、MLH1、MSH2、MSH3、MSH6、エキソヌクレアーゼI、T4エンドヌクレアーゼV、エキソヌクレアーゼV、RecJエキソヌクレアーゼ、FEN1(RAD27)、dnaQ(mutD)、polC(dnaE)、又はそれらの組み合わせ、並びに上記のホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。DNAらせん中の塩基対エラーを認識及び修復可能な酵素的システムが、細菌、菌類及びほ乳類細胞中で示された。

20

【0043】

用語「デュプレックス」は、少なくとも部分的に二本鎖である核酸分子を言う。「安定なデュプレックス」は、所定の一組のハイブリダイゼーション条件下で相補的配列へハイブリダイズされた状態を比較的保持しやすいデュプレックスを言う。本発明の例示では、安定なデュプレックスは、塩基対ミスマッチ、挿入、又は欠失を有さないデュプレックスを言う。「不安定なデュプレックス」は、所定の一組のハイブリダイゼーション条件下で相補的配列へハイブリダイズされた状態を比較的保持しにくいデュプレックスを言う。本発明の例示では、不安定なデュプレックスは、少なくとも1の塩基対ミスマッチ、挿入、又は欠失を有するデュプレックスを言う。

30

【0044】

用語「エラー減少」は、核酸分子中、又は核酸のプール分子中の配列エラーの数を減少させて、核酸分子の組成物中でエラーフリーコピーの数を増加させるために使用されるプロセスを言う。エラー減少には、エラーフィルトレーション、エラーニュートラル化、及びエラー修復プロセスが含まれる。「エラーフィルトレーション」は、それにより配列エラーを含む核酸分子が核酸のプール分子から除去されるプロセスである。エラーフィルトレーション捕集を実施する方法として、例えば選択オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーション、ミスマッチ結合薬剤への結合、又はミスマッチ部位での切断と、その次の分離が挙げられる。「エラーニュートラル化」は、それにより配列エラーを含む核酸又はその一部が、増幅及び／又はアセンブルから制限されるが核酸のプールから除去されないプロセスである。エラーニュートラル化方法として、例えばミスマッチ結合薬剤への結合、任意でミスマッチ結合薬剤のDNAデュプレックスへの共有結合、又はミスマッチ部位で切断する薬剤を使用した配列の一部の除去と、その次のアセンブリが挙げられる。「エラー修復」は、それにより核酸分子中の配列エラーが修復されるプロセスである(例えば、特別の位置にある不適当なヌクレオチドは、予め決定された配列に基づき存在すべき核酸へ変更される)。エラー修復方法として、例えばDNA修復蛋白質を使用した、相同な再結合又は配列修復が挙げられる。

40

【0045】

用語「遺伝子」は、エキソン配列及び任意でイントロン配列を有するポリペプチドをエ

50

ンコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を言う。用語「イントロン」は、蛋白質へ翻訳されず、一般的にエキソン間に発見される所定の遺伝子中に存在するDNA配列を言う。

【0046】

用語「ハイブリダイズ」又は「ハイブリダイゼーション」は、2個の相補的核酸ストランド間の特異的結合を言う。様々な態様において、ハイブリダイゼーションは、2個の完全にマッチした核酸ストランドの相補的領域間の結合 (association)、並びに相補的領域内に1以上のミスマッチ(ミスマッチ、挿入、又は欠失等)を含む2個の核酸ストランド間の結合を言う。ハイブリダイゼーションは、例えば1、2、3、4、5以上ミスマッチを有する2個の相補的核酸ストランド間でも発生する。様々な態様において、ハイブリダイゼーションは、例えば部分的にオーバーラップして相補的な構造体オリゴヌクレオチド間、部分的にオーバーラップして相補的な構造体及び選択オリゴヌクレオチド間、プライマー及びプライマー結合部位間等で発生する。2個の核酸ストランド間のハイブリダイゼーションの安定性は、例えば温度及び/又は塩濃度等のハイブリダイゼーション条件及び/又は洗浄条件を変化させることにより制御される。例えばハイブリダイゼーション条件の緊縮性は、より選択的ハイブリダイゼーションを達成するために増加されてもよく、例えば、ハイブリダイゼーション条件の緊縮性が増加すると、2個の核酸ストランド、特にミスマッチ含有ストランド間の結合の安定性は減少する。

【0047】

用語「含む」は、「含むが下記に限定されない」を意味するために使用される。「含む」及び「含むが下記に限定されない」は、区別なく使用される。

【0048】

用語「リガーゼ」は、近接したオリゴヌクレオチド中にホスホジエステル結合を形成する機能を有する酵素の一種を言う。これらオリゴヌクレオチドは、同一のオリゴヌクレオチドヘアニールされ、又は付着又は相補末端を使用して互いにアニールされる。又別の例では、これらオリゴヌクレオチドは平滑末端化されるが近接した位置にある。1のオリゴヌクレオチドの末端ホスファート及び近接した第2のオリゴヌクレオチドの末端水酸基が、二重らせん内でそれらの相補的配列を横切って一緒にアニールされる場合、即ちライゲーションプロセスがライゲート可能なニック部位で「ニック」をライゲートし、相補的デュプレックスを形成する場合に、特に有効なライゲーションが起きる(Blackburn、M.及び Gait、M.(1996)「化学及び生物学における核酸」オックスフォード大学出版、オックスフォード、pp.132-33、481-2)。近接したオリゴヌクレオチド間の部位は、「ライゲート可能なニック部位」、「ニック部位」、又は「ニック」と称し、それによりホスホジエステル結合は存在せず、又は切断される。

【0049】

用語「ライゲート」は、ヌクレオチド間結合の形成を通して近接したオリゴヌクレオチドを共有的に結合する反応を言う。

【0050】

用語「ミスマッチ結合薬剤」又は「MMBA」は、ミスマッチを含む二本鎖核酸分子へ結合する薬剤を言う。薬剤は、化学的に合成されても蛋白質性でもよい。本発明の例示では、MMBAはミスマッチ結合蛋白質(MMBP)であり、例えばFokI、mutS、T7エンドヌクレアーゼ、本明細書記載のDNA修復酵素、米国特許出願公開2004/0014083記載の突然変異体DNA修復酵素、又はそれらのフラグメント若しくは融合体が挙げられる。MMBAにより認識されるミスマッチとして、例えば1以上のヌクレオチド挿入若しくは欠失、又はA:A、A:C、A:G、C:C、C:T、G:G、G:T、T:T、C:U、G:U、T:U、U:U、5-ホルミルウラシル(fU):G、7、8-ジヒドロ-8-オキソ-グアニン(8-オキソG):C、8-オキソG:A等の不適当な塩基対、又はそれらの相補物(complement)が挙げられる。

【0051】

用語「MLH1」及び「PMS1」(ヒト中のPMS2)は、真核mutL-関連蛋白質複合体、例えばMLH1-PMS1等の成分を言い、誤対合した塩基へ結合されたMSH2含有複合体と相互作用する。例

示的なMLH1蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号AI389544(キイロショウジョウバエ)、AI387992(キイロショウジョウバエ)、AF068257(キイロショウジョウバエ)、U80054(ドブネズミ)及びU07187(出芽酵母)を有する核酸でエンコードされたポリペプチド、並びにそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。

【0052】

用語「MSH2」は、12塩基までの塩基ミスマッチ及び挿入又は欠失を認識する真核DNA修復複合体の成分を言う。MSH2は、MSH3又はMSH6とのヘテロ二量体を形成する。例示的なMSH2蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号：AF109243(シロイヌナズナ)、AF030634(アカパンカビ)、AF002706(シロイヌナズナ)、AF026549(シロイヌナズナ)、L47582(ホモ・サピエンス)、L47583(ホモ・サピエンス)、L47581(ホモ・サピエンス)及びM84170(出芽酵母)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチド、及びそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。例示的なMSH3蛋白質として、例えばGenBank寄託番号：J04810(ヒト)及びM96250(出芽酵母)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチド、及びそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。例示的なMSH6蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号：U54777(ホモ・サピエンス)及びAF031087(ハツカネズミ)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチド、及びそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。

【0053】

用語「mutH」は、半メチル化DNAの非メチル化ストランドを切り取るか、非メチル化DNA上の二本鎖切断の5'をd(GATC)配列のGとする、潜在エンドヌクレアーゼを言う。この用語は、原核mutH(例えば、Welshら、262, J. Biol. Chem. 15624(1987))並びにそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントを含むことを意図する。

【0054】

用語「mutHLS」は、mutH、mutL、及びmutS蛋白質(又はそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメント)間の複合体を言う。

【0055】

用語「mutL」は、ATPに依存して、mutSによる異常な塩基対合認識を5'-GATC-3'配列でのmutH切断と関連づける蛋白質を言う。この用語は、原核mutL蛋白質及びそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントを含むことを意図する。例示的なmutL蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号AF170912(カウロバクター・クレセンタス)、AI518690(キイロショウジョウバエ)、AI456947(キイロショウジョウバエ)、AI389544(キイロショウジョウバエ)、AI387992(キイロショウジョウバエ)、AI292490(キイロショウジョウバエ)、AF068271(キイロショウジョウバエ)、AF068257(キイロショウジョウバエ)、U50453(好熱菌)、U27343(枯草菌)、U71053(U71053(好熱性真正細菌)、U71052(Aquifex pyrophilus)、U13696(ヒト)、U13695(ヒト)、M29687(ネズミチフス菌)、M63655(大腸菌)及びL19346(大腸菌)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチドが挙げられる。例示的なmutLホモログとして、例えば真核MLH1、MLH2、PMS1、及びPMS2蛋白質(参照、例えば米国特許第5858754及び6333153)が挙げられる。

【0056】

用語「mutM」は、DNAからの7、8-ジヒドロ-8-オキソグアニン(8-オキソG)及びホルムアミドピリミジン(Fapy)損傷を除去する8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼを言う。例示的なmutM蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号AF148219(Nostoc PCC8009)、AF026468(ストレプトコッカス ミュータンス)、AF093820(藍藻)、AB010690(シロイヌナズナ)、U40620(ストレプトコッカス ミュータンス)、AB008520(Thermus thermophilus)及びAF026691(ホモ・サピエンス)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチド、及びそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。

【0057】

用語「mutS」は、種々の誤対合した塩基及び小さな(1-5塩基)一本鎖ループを認識し、結合するDNA-ミスマッチ結合蛋白質を言う。この用語は、原核mutS蛋白質及びそれらのホ

10

20

30

40

50

モログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントを含むことを意図する。この用語は又、様々なmutS蛋白質のホモ-及びヘテロ-ダイマー及びマルチマーを含む。例示的なmutS蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号AF146227(ハツカネズミ)、AF193018(シロイズナズナ)、AF144608(腸炎ビブリオ)、AF034759(ホモ・サピエンス)、AF104243(ホモ・サピエンス)、AF007553(好熱菌caldophilus)、AF109905(ハツカネズミ)、AF070079(ホモ・サピエンス)、AF070071(ホモ・サピエンス)、AH006902(ホモ・サピエンス)、AF048991(ホモ・サピエンス)、AF048986(ホモ・サピエンス)、U33117(好熱菌)、U16152(腸炎エルシニア)、AF000945(*Vibrio cholerae*)、U698873(大腸菌)、AF003252(インフルエンザ菌株b(Eagan)、AF003005(シロイズナズナ)、AF002706(シロイズナズナ)、L10319(マウス)、D63810(*Thermus thermophilus*)、U27343(枯草菌)、U71155(好熱性真正細菌)、U71154(*Aquifex pyrophilus*)、U16303(ネズミチフス菌)、U21011(ハツカネズミ)、M84170(出芽酵母)、M84169(出芽酵母)、M18965(ネズミチフス菌)及びM63007(*Azotobacter vinelandii*)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチドが挙げられる。例示的なmutSホモログとして、例えば真核MSH2、MSH3、MSH4、MSH5、及びMSH6蛋白質が挙げられる(参照：例えば米国特許第5858754及び6333153)が挙げられる。

【0058】

用語「mutY」は、DNA中の7、8-ジヒドロ-8-オキソ-2'-デオキシグアノシン(OG)：A及びG：A誤対合の修復に含まれるアデニングリコシラーゼを言う。例示的なmutY蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号AF121797(ストレプトミセス)、U63329(ヒト)、AA409965(ハツカネズミ)及びAF056199(ストレプトミセス)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチド、及びそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。

【0059】

用語「核酸」は、ヌクレオチド、リボヌクレオチド及び／若しくはデオキシリボヌクレオチドのいずれかのポリマー性形状、又はいずれかの種のヌクレオチドの修飾型を言う。この用語は又、等価物、ヌクレオチドアナログから形成されたRNA又はDNAのいずれかのアナログを含み、記載された一本鎖(センス又はアンチセンス等)及び二本鎖核酸の例に適用可能である。

【0060】

用語「オリゴヌクレオチド」は、短い核酸分子、例えば約10～約200ヌクレオチドを有する核酸分子を言う。オリゴヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖である。

【0061】

2個の核酸領域間の関係の記載における用語「動作可能に結合された」とは、その領域が目的とする様式でそれらを機能させる状態にある近位であることを言う。例えばコード配列へ「動作可能に結合された」コントロール配列は、適切な分子(例えば、誘発因子及びポリメラーゼ)がコントロール配列又は調節塩基配列へ結合された場合等に、コード配列の発現は、コントロール配列と調和する条件下で、達成されるようにライゲートされる。

【0062】

用語「同一性割合」は、2個のアミノ酸配列間又は2個のヌクレオチド配列間の配列同一性のパーセントを言う。同一性はそれぞれ、比較用に並べられたそれぞれの配列における位置を比較することにより決定できる。比較配列中の等価位置が同一塩基又はアミノ酸で占められた場合、その分子はその位置で同一であり；等価部位が同一又は類似のアミノ酸残基(例えば、立体性及び／又は電子特性で類似)で占められた場合、その分子はその位置で相同(類似)である。相同性、類似性又は同一性割合の表示は、比較配列と共有する位置での同一又は類似のアミノ酸の数の関数を言う。相同性、類似性又は同一性割合の表示は、比較配列と共有する位置での同一又は類似のアミノ酸の数の関数を言う。様々なアラインメントアルゴリズム及び／又はプログラムが使用でき、例えばFASTA、BLAST、又はENTREZが挙げられる。FASTA及びBLASTは、GCG配列分析パッケージ(ウィスコンシン大学、マジソン、Wis.)に一部として入手可能であり、例えばデフォルト設定をして使用できる。E

NTREZは、米国国立バイオテクノロジーセンター、国立医療ライブラリー、国立衛生研究所、ベセズダ、MDから入手可能である。例えば、2個の配列の同一性割合は、GCGプログラムにより1のギャップウェイトで決定でき、例えばそれぞれのアミノ酸ギャップはそれが2個の配列間の1のアミノ酸又はヌクレオチドミスマッチであるとウェイトされる。

【0063】

他のアラインメント技術は、Methods in Enzymology、vol.266：「高分子配列分析用コンピュータ方法」(1996)Doolittle編、Academic Press、Inc.、a division of Harcourt Brace & Co.、サンディエゴ、California、USAに記載されている。例えば、配列中のギャップを可能とするアラインメントプログラムは、配列を整列させるために使用される。商品名Smith-Watermanは、配列アラインメント中のギャップを可能とするアルゴリズムの一種である。参照Meth.Mol.Biol.70：173-187(1997)。同様に、Needleman及びWunschアラインメント方法を使用するギャッププログラムは、配列整列のために使用できる。別の研究手法は、MASPARコンピュータで計算するMPSRCHソフトウェアを使用する。商品名MPSRCHは、Smith-Watermanアルゴリズムを使用し、大規模並列コンピュータ上で配列を評価する。この手法は遠位で関連するマッチを選び出す能力を改良し、特に、小さなギャップ及びヌクレオチド配列エラーでも検出できる。核酸エンコードされたアミノ酸配列は蛋白質及びDNA両方のデータベース分析に使用できる。

【0064】

用語「ポリヌクレオチド構造物」は、予め決定された配列を有する長い核酸分子を言う。ポリヌクレオチド構造物は、一組の構造物オリゴヌクレオチド及び／又は一組のサブアセンブリからアセンブリできる。

【0065】

「領域の内部相同性」は、別の配列の内部の部分と実質的な同一性を有する配列の内部の部分、例えば、2個のサブアセンブリの配列の部分、2個のポリヌクレオチド構造物の配列の部分等を言う。内部の部分は、を意味する。相同な配列部分は、核酸の両末端のいずれか(例えば、一本鎖構造物に関する5'及び3'末端-最大配列又は1のストランドに関する二本鎖構造物の両末端)を含まない。内部の配列部分間の相同性の程度は、十分に高くないと、ここで記載する配列部分の相補鎖間のハイブリダイゼーションを核酸アセンブリに適した条件下で可能とならない。例えば、内部相同性領域は、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、96%、98%、99%又は100%配列同一性を有する。内部相同性領域は、少なくとも約10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100以上の連続的核酸残基にまたがる。本発明の例示では、内部相同性領域は、少なくとも構造物オリゴヌクレオチドの長さにもたがる。

【0066】

用語「制限エンドヌクレアーゼ認識部位」は、1以上の制限エンドヌクレアーゼを結合可能な核酸配列を言う。用語「制限エンドヌクレアーゼ切断部位」は、1以上の制限エンドヌクレアーゼにより切断される核酸配列を言う。所定の酵素に対して、制限エンドヌクレアーゼ認識部位及び切断部位は同一又は異なる。制限酵素として下記が挙げられるがこれらに限定されるものではない；タイプI酵素、タイプII酵素、タイプIIS酵素、タイプIII酵素及びタイプIV酵素。REBASEデータベースは、制限酵素、DNAメチルトランスフェラーゼ及び制限修飾に関する関連蛋白質の総合的情報データベースを提供する。このデータベースは、制限エンドヌクレアーゼ認識部位及び制限エンドヌクレアーゼ切断部位、イソシゾマー、市販品入手性、結晶及び配列データに関する公開又は未公開の研究結果を含む(参照RobertsRJら(2005)「REBASE-制限酵素及びDNAメチルトランスフェラーゼ」Nucleic Acids Res.33 Database Issue：D230-2)。

【0067】

用語「選択用マーカー」は、選択用マーカーを有さない類似の細胞に比べて、所定の増殖環境下でのその核酸配列を含む細胞の増殖又は生存の可能性を変更する遺伝子産物をエンコードする核酸配列を言う。これらマーカーは、ポジティブ又はネガティブいずれかの選択用マーカーである。例えばポジティブな選択用マーカー(例えば、耐抗生物質性又は

栄養素要求性の増殖遺伝子)は、(例えば、抗生物質を含有する又は必須栄養素を欠く)選択的媒体中での増殖又は生存能力を与える産物をエンコードする。ネガティブな選択用マーカーは、反対にネガティブな選択媒体中でそのマーカーを含まない細胞と比較してそのマーカーを含む細胞の増殖を抑制する。選択用マーカーは、細胞増殖に使用される媒体に応じて、ポジティブ及びネガティブのいずれかの選択可能性を与える。原核及び真核細胞内の選択用マーカーの使用は、当業者に公知である。適切なポジティブな選択マーカーとして、例えばネオマイシン、カナマイシン、hyg、hisD、gpt、ブレオマイシン、テトラサイクリン、hpptSacB、 β -ラクタマーゼ、ura3、アンピシリン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン(ストレプトアミジン)、ゲンタマイシン、フレオマイシン、及びナリジキシン酸が挙げられる。適切なネガティブな選択マーカーとして、

10

【0068】

用語「選択オリゴヌクレオチド」は、構造体オリゴヌクレオチド(又は構造体オリゴヌクレオチドの相補物)の少なくとも一部分に相補的な一本鎖オリゴヌクレオチドを言う。選択オリゴヌクレオチドは、塩基配列決定エラー(例えば、目的の配列からの逸脱)を含む構造体オリゴヌクレオチドのコピーを、構造体オリゴヌクレオチドのプールから除去するために使用される。本発明の例示では、選択オリゴヌクレオチドは基質上に末端固定化される。例えば、選択オリゴヌクレオチドは、基質上で並行して合成された合成オリゴヌクレオチドである。好ましくは、選択オリゴヌクレオチドは、少なくとも約20%、25%、30%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%の構造体オリゴヌクレオチド(又は構造体オリゴヌクレオチドの相補物)長さ

20

【0069】

用語「自己相補的領域」は、核酸分子の同一のストランド上の、少なくとも2つの領域を言い、その1の領域は逆転された時に他の領域に相補的である(例えば1の領域が5'から3'へ向かい、第2の領域は3'から5'へ向かう)。自己相補的領域は核酸分子中で、例えば、ステムループ構造(又はヘアピン)、プソイドノット、又は十字型構造等の二次及び/又は三次構造を取り、自己相補的領域は構造体オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び/又はポリヌクレオチド構造物中に見られる。例えば自己相補的領域は、約5-25、5-15、又は5-10の相補的ヌクレオチド、又は少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25以上の相補的ヌクレオチドを含む(例えば、1の領域の少なくとも約5の連続的ヌクレオチドは、第2の領域の少なくとも約5連続的ヌクレオチドに相補的である等)。例えば、自己相補的領域は、標準的ワトソン-クリック塩基対(例えば、A/T及びG/C)、ウォッブル塩基対(例えば、A/U、G/U、I/U、I/A、及びI/C)、又はそれらの組み合わせにより塩基対を形成する。本発明の例示では、自己相補的領域は逆転された繰り返しである。

40

【0070】

用語「自己相同な領域」又は「自己相同性領域」は、同一の、又は高度に類似の配列を有する核酸分子上の少なくとも2つの領域を言う。自己相同性領域は、フォワード相同性及びリバース相同性領域を含む。例えば、フォワード相同性領域は、重複配列、例えば、同一又は高度に類似の配列を同一方向の核酸分子の同一のストランド上に有する2つの領

50

域を含む。リバーズ相同性領域は、逆転された繰り返し領域、例えば、同一又は高度に類似の配列を同一方向の核酸分子の反対側のストランド上に有する2個の領域を含む。用語「自己相同性領域」は、同一のストランド上の逆転された繰り返し間の自己相補的領域を含み、例えば逆転された繰り返しの繰り返し及び相補物も相補的である。

【0071】

用語「配列相同性」は、2個の核酸配列間の塩基マッチの割合又は2個のアミノ酸配列間のアミノ酸マッチの割合を言う。配列相同性が50%等のパーセントで表される場合、そのパーセントは、別の配列と比較した目的の配列の長さにおけるマッチの割合を表す。(2個の配列のいずれかにおける)ギャップはマッチングを最大化するように設定される；15塩基以下のギャップ長さが通常、6塩基以下はよりしばしば、2塩基以下は更にしばしば使用される。用語「配列同一性」は、その配列は比較のウィンドウ全体で(即ち、核酸の場合ヌクレオチド-ヌクレオチドベースで、ポリペプチドの場合アミノ酸-アミノ酸ベースで)同一であることを意味する。用語「配列同一性のパーセント」は、比較ウィンドウ全体で2個の最適に並べられた配列を比較し、両配列中で同一のアミノ酸が生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で割り、その結果数に100を掛けて配列同一性のパーセントを得ることにより計算される。配列同一性のパーセントを計算する方法は、当業者に公知であり、下記に更に詳細に記載する。

【0072】

用語「ストリンジェント条件」又は「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、2個の相補的核酸ストランド間での特異的ハイブリダイゼーションを促進し、デュプレックスを形成する条件を言う。緊縮条件は、特定されたイオン強度及びpHで、所定の核酸デュプレックスの熱的融点(T_m)よりも約5°C低いように選択される。相補的核酸ストランドの長さ及びそれらのGC含量によりデュプレックスの T_m が決定され、そのためハイブリダイゼーションの目的の特異性を生じるために必要なハイブリダイゼーション条件も決定される。 T_m は、50%の核酸配列が完全にマッチした相補鎖へハイブリダイズする温度である(特定されたイオン強度及びpH下で)。場合により、ハイブリダイゼーション条件の緊縮性を増加させ、特別のデュプレックスの T_m とほとんど同じにすることが望ましい。

【0073】

T_m を推定する種々の技術が使用できる。一般的にデュプレックス中のG-C塩基対は、 T_m 約3°Cの寄与が推定され、A-T塩基対は約2°Cの寄与が推定され、その理論的最大値は約80~100°Cである。しかし T_m のより洗練されたモデルが入手可能であり、それはG-Cスタッキング相互作用、溶媒効果、目的のアッセイ温度等が考慮される。例えば、プローブは、次式を使用して解離温度(T_d)約60°Cを有するように設計される：

$$T_d = (((((3 \times \#GC) + (2 \times \#AT)) \times 37) - 562) / \#bp) - 5;$$

ここで、 $\#GC$ 、 $\#AT$ 、及び $\#bp$ は、それぞれデュプレックスの形成中に含まれる、グアニン-シトシン塩基対の数、アデニン-チミン塩基対の数、及び総塩基対の数を表す。他の T_m 計算方法は、Santa Lucia及びHicks、Annu.Rev.Biomol.Struct.33:415-40(2004)に記載されており、次式を使用する：

$$T_m = \Delta H^\circ \times 1000 / (\Delta S^\circ + R \times \ln(C_T / x)) - 273.15$$

但し、 C_T は合計ストランドモル濃度、 R は気体定数1.9872cal/K-molであり、非自己相補的デュプレックスでは x は4であり、自己相補的デュプレックスでは1である。

【0074】

ハイブリダイゼーションは、5×SSC、4×SSC、3×SSC、2×SSC、1×SSC又は0.2×SSCで少なくとも約1時間、2時間、5時間、12時間、又は24時間実施される。ハイブリダイゼーション温度を、例えば、約25°C(室温)から、約45°C、50°C、55°C、60°C、又は65°Cまで上昇することにより反応の緊縮性を調整できる。ハイブリダイゼーション反応は、緊縮度に影響する別の薬剤を含んでもよく、例えば50%ホルムアミドの存在下で実施されるハイブリダイゼーションは、特定温度でハイブリダイゼーションの緊縮性を増加させる。本発明の例示では、ベタイン、例えば、約5Mベタインがハイブリダイゼーション反応へ添加され

10

20

30

40

50

、DNA熱融解トランジション（塩基転位）の塩基対組成物依存性を最小化又は抹消する（参照：例えばReesら、*Biochemistry* 32：137-144(1993)）。又別の例では、低分子量アミド又は低分子量スルホン（例えばDMSO、テトラメチレンスルホキシド、メチルsec-ブチルスルホキシド等）がハイブリダイゼーション反応へ添加され、GC含量リッチ配列の融点を減少させる（参照：例えばChakarbarti及びSchutt、*Biotechnology*32：866-874(2002)）。

【0075】

ハイブリダイゼーション反応の次に、単一の洗浄ステップ、又は、同一又は異なる塩度及び温度での2以上の洗浄ステップが実施される。例えば、洗浄温度を約25°C（室温）から約45°C、50°C、55°C、60°C、65°C以上まで上昇させて緊縮性を調整できる。洗浄ステップは、0.1又は0.2%SDS等の洗剤の存在下で実施できる。例えば、ハイブリダイゼーションの次に、2回の洗浄ステップをそれぞれ65°Cで約20分、2×SSC、0.1%SDS中で行い、更に任意で2回の追加的洗浄ステップをそれぞれ65°Cで約20分、0.2×SSC、0.1%SDS中に行っても良い。

10

【0076】

例示的な緊縮ハイブリダイゼーション条件として、一晚65°Cで、50%ホルムアミド、10×デンハート（商品名、0.2%フィコール、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%ウシ血清アルブミン）及び断片化（sheared）サケ精子DNA等の変性されたキャリアDNA200 µg/mlを含有、又はこれら成分から構成される溶液中でハイブリダイゼーションを行い、次に2回の洗浄ステップをそれぞれ65°Cで約20分、2×SSC、0.1%SDS中に行い、更に2回の洗浄ステップをそれぞれ65°Cで約20分、0.2×SSC、0.1%SDS中で行う。

20

【0077】

ハイブリダイゼーションは、溶液中の2個の核酸又は溶液中の1個の核酸を、フィルター等の固体サポートへ結合された1の核酸へハイブリダイズしてもよい。1の核酸が固体サポート上にある場合、予備ハイブリダイゼーションステップが、ハイブリダイゼーション前に実施されてもよい。予備ハイブリダイゼーションは、少なくとも約1時間、3時間又は10時間、ハイブリダイゼーション溶液と同一の溶液中及び同一の温度で（相補的核酸ストランド無しのハイブリダイゼーション溶液で）行うことが出来る。

【0078】

適切な緊縮性条件は当業者に公知であり、当業者により実験により決定できる。参照、例えば、「分子生物学の現在のプロトコル」John Wiley & Sons、N.Y.(1989)、6.3.1-12.3.6；Sambrookら、1989、「分子クローニング、実験マニュアル」Cold Spring Harbor Press、N.Y；S.Agrawal編「分子生物学の方法」第20巻；Tijssen(1993)生化学及び分子生物学の実験技術-核酸プローブでのハイブリダイゼーション、例えば、第I部第2章「ハイブリダイゼーションの原理の概略及び核酸プローブアッセイ計画」、Elsevier、ニューヨーク；Tibanyenda、N.ら、*Eur.J.Biochem.*139：19(1984)及びEbel、S.ら、*Biochem.*31：12083(1992)；Reesら、*Biochemistry* 32：137-144(1993)；Chakarbarti及びSchutt、*Biotechnology* 32：866-874(2002)；及びSantaLucia及びHicks、*Annu.Rev.Biomol.Struct.*33：415-40(2004)。

30

【0079】

蛋白質へ使用される場合、用語「実質的な同一性」は、最適に整列された場合に、デフォルトギャップウェイトを使用したプログラムGAP又はBESTFIT等により、一般的に少なくとも約70パーセント配列同一性、あるいは少なくとも約80、85、90、95パーセント以上の配列同一性を有する2個の配列を意味する。アミノ酸配列の場合、同一でないアミノ酸残基は、上記記載の保存的アミノ酸置換により異なっている。

40

【0080】

用語「サブアセンブリ」は、2以上の構造体オリゴヌクレオチドからアセンブルされる核酸分子を言う。好ましくは、サブアセンブリは、例えば約300-600塩基長の構造体オリゴヌクレオチドより、少なくとも約3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上長い。

【0081】

核酸分子に関してここで使用される用語「合成」は、少なくとも一部がin vitro化学的

50

及び／又は酵素的合成による製造を言う。

【0082】

用語「TDG」は、G/Tミスマッチを認識するチミン-DNAグリコシラーゼを言う。例示的なTDG蛋白質として、例えばGenBank寄託番号AF117602(クロクモザルchamek)を有する核酸によりエンコードされたポリペプチド、並びにそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。

【0083】

「転写調節塩基配列」は、それらが動作可能に結合された蛋白質コード配列の転写を誘発又は制御する開始シグナル、エンハンサー、及び誘発因子等のDNA配列を言うためにここで使用される総称名である。好ましい例では、組み換え型遺伝子の1の転写は、その発現が目的とされている細胞種中の組み換え型遺伝子の発現を制御する誘発因子配列(又は他の転写調節塩基配列)の制御下にある。組み換え型遺伝子は、ここで記載の遺伝子の天然型の転写を制御するその配列と同一又は異なる転写調節塩基配列のの制御下にあってもよい。

【0084】

ここで使用される用語「トランスフェクション」は、発現ベクター等の核酸のレシピエント細胞中への導入を意味し、ウィルス又はウィルス性ベクターに関する「感染」等の一般的に使用される用語を含むことを目的としている。用語「形質導入(変換)」は、核酸によるトランスフェクションが核酸のウィルス性投与による場合に一般的にここで使用される。用語「形質転換」は、DNA等の異分子を細胞中へ導入するいずれの方法をも言う。リポフェクション、DEAE-デキストラン媒体トランスフェクション、マイクロインジェクション、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿、レトロウィルス投与、電気穿孔法、天然形質転換、及びパーティクルガン形質転換は、当業者に公知であり使用できる方法のほんの数例である。

【0085】

用語「タイプII制限エンドヌクレアーゼ」は、非パリンδροーム認識配列及び認識部位の外側(例えば認識部位から0~約20ヌクレオチド遠位)で発生する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼを言う。タイプII制限エンドヌクレアーゼは、1の二本鎖核酸分子中に1のニックを生じるか、平滑又は付着末端のいずれかを生じる1の二本鎖破断を生じる(例えば5'又は3'オーバーハングのいずれか)。タイプIIエンドヌクレアーゼの例として、3'オーバーハングを生じる酵素、例えばBsrI、BsmI、BstF5I、BsrDI、BtsI、MnlI、BciVI、HphI、MboII、EciI、AclI、BpmI、MmeI、BsaXI、BcgI、BaeI、BfiI、TspDTI、TspGWI、TaqII、Eco57I、Eco57MI、GsuI、PpiI及びPsrI等；5'オーバーハングを生じる酵素、例えばBsmAI、PleI、FauI、SapI、BspMI、SfaNI、HgaI、BvbI、FokI、BceAI、BsmFI、Ksp632I、Eco31I、Esp3I、AarI等；及び平滑末端を生じる酵素、例えばMlyI及びBtrIが挙げられる。タイプIIエンドヌクレアーゼは、市販品を入手可能であり公知である(ニューイングランドBiolabs社、ベバリー、MA)。認識部位、切断部位及びタイプIIエンドヌクレアーゼを使用して消化する条件に関する情報は、例えばwwwアドレスneb.com/nebecomm/enzymefindersearchbytypeIIs.aspに記載されている。

【0086】

用語「ユニバーサルタグ」は、5'及び／又は3'末端上の多数の核酸配列へフランキングするヌクレオチド配列を言い、例えばユニバーサルタグは更に1以上の核酸配列に共通する。ユニバーサルタグには1以上の下記が含まれる：プライマーハイブリダイゼーション配列、ミスマッチ修復酵素切断部位、制限酵素認識部位、制限酵素切断部位(又は半分部位、例えば、部位の半分はユニバーサルタグ中に含まれ部位の半分は核酸配列中に含まれる)、アプタマー、1以上のウラシル残基、1以上の修飾された核酸残基、又は検出及び／又は固定化を促進する薬剤(例えば、ビオチン、フルオレセイン、検出用マーカー等)。本発明の例示では、ユニバーサルタグは、例えばmutHエンドヌクレアーゼ又はmutHLS複合体により切断される配列GATC等のミスマッチ修復酵素切断部位を含有する。例えば、ユニバーサルタグは、ユニバーサルプライマー用結合部位を含有する。

【0087】

用語「ユニバーサルプライマー」は、多数の核酸配列の鎖伸長/増幅に使用される一組のプライマー(例えば、フォワード及びリバースプライマー)、例えば多数の核酸配列に共通する部位へハイブリダイズするプライマーを言う。例えば、ユニバーサルプライマーは、1のプール中の全ての、又は本質的に全ての核酸の増幅に使用され、プールとして例えば構造体オリゴヌクレオチドのプール、選択オリゴヌクレオチドのプール、サブアセンブリのプール、及び/又はポリヌクレオチド構造物のプール等が挙げられる。例えば、単一のプライマーが、1のプール中の多数の核酸のフォワード及びリバースストランド両方を増幅するために使用されてもよい。例えばユニバーサルプライマーは、増幅後に酵素的又は化学的切断により除去される一時的プライマーでもよい。他の例として、ユニバーサルプライマーは、鎖伸長において核酸分子へ組み込まれる修飾(modification)を含んでいても良い。例示的な修飾として、例えば3'又は5'末端キャップ、又は核酸の検出、固定化又は単離を促進する薬剤(例えば、フルオレセイン又はビオチン等)が挙げられる。

【0088】

用語「UDG」は、ウラシルを含有する一本鎖又は二本鎖DNAからフリーウラシルを除去するウラシル-DNAグリコシラーゼを言う。例示的なUDG蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号: AF174292(分裂酵母)、AF108378(オナガザルヘルペスウィルス)、AF125182(ホモ・サピエンス)、AF125181(アフリカツメガエル)、U55041(ホモ・サピエンス)、U55041(ハツカネズミ)、AF084182(モルモットサイトメガロウィルス)、U31857(ウシヘルペスウィルス)、AF022391(ネコヘルペスウィルス)、M87499(ヒト)、J04434(バクテリオファージPBS2)、U13194(ヒトヘルペスウィルス6)、L34064(トリ伝染性喉頭気管炎ウィルス)、U04994(Gallidヘルペスウィルス2)、L01417(ウサギ線維腫ウィルス)、M25410(ヘルペスシンプレックスウィルスタイプ2)、J04470(出芽酵母)、J03725(大腸菌)、U02513(ブタヘルペスウィルス)、U02512(ブタヘルペスウィルス)及びL13855(プソイド狂犬病ウィルス)を有する核酸でエンコードされたポリペプチド、並びにそれらのホモログ、オルソログ、パラログ、変異体、又はフラグメントが挙げられる。

【0089】

「ベクター」は、挿入された核酸分子を宿主細胞内及び/又は宿主細胞間へ移動させる自己複製核酸分子を言う。この用語には、主に核酸分子の細胞内への挿入のために機能するベクター、主に核酸の複製のために機能する複製ベクター、及びDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳のために機能する発現ベクターが含まれる。同様に、上記機能の1以上を提供するベクターも含まれる。ここで使用される「発現ベクター」は、適切な宿主細胞中に導入された場合に転写されてポリペプチドへ翻訳される核酸として定義される。「発現システム」は、通常目的の発現産物を生成する機能を有する発現ベクターを含む適切な宿主細胞を言う。

【0090】

2. 高忠実度の長い核酸分子のアセンブリ:

例えば、本発明は高忠実度を有する合成核酸を提供する。合成核酸は、少なくとも約500塩基;又は少なくとも約1、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、40、50、75、又は100キロベース(kb);又は少なくとも約1メガベース(mb);又はそれ以上である。例えば合成核酸組成物は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、50%、60%、70%、80%、90%以上のエラーフリーなコピーを有する(例えば予め決定された配列からの逸脱のない配列を有する。)。エラーフリーコピーの割合は、正しい、例えば予め特定された配列を有することを目的とされた組成物中の核酸のコピー数全てと比較された、その組成物中のエラーフリーコピー数に基づく。例えば合成核酸の組成物は、組成物中に少なくとも約10フェムトモル、100フェムトモル、1ナノモル、10ナノモル、100ナノモル、1マイクロモル、10マイクロモル以上の核酸を含む。他の例として、組成物は1以上の大量の核酸、例えば、少なくとも約1ミリグラム、1グラム、10グラム、100グラム、1キログラム以上を有する。これら大スケール製剤も有用であり、例えばワクチン、遺伝子治療法構造物、他の市販用途品の製造のために使用できる。例えば、合成核酸は、細

胞フリー環境中で構築され、そのためin vivoで製造される核酸には必ず含まれる1以上の細胞質不純物及び／又は修飾を含まない。例えば、合成核酸は、1以上の下記からフリー又は本質的にフリーである：膜成分(例えば、脂質)、リポ多糖類(LPS)、炭水化物、発熱物質、蛋白質(例えばDNA結合蛋白質、DNase、RNase等)、又はDNA結合分子、及び／又はメチル化等の修飾。本発明の例示では、合成核酸の組成物は、核酸製造プロセスの間に組成物へ意図して添加される蛋白質、例えばポリメラーゼ、ミスマッチ結合蛋白質、制限エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、及び／若しくは抗体等以外の蛋白質を含まない。又別の例では、合成核酸の組成物は、核酸製造プロセスの間に組成物へ意図して添加される小分子、例えばdNTP、ビオチン、及び／又化学的架橋薬剤等以外の小分子を含まない。本発明の例示では、合成核酸は、2以上の構造体オリゴヌクレオチド及び／又はサブアセンブリからアセンブルされたポリヌクレオチド構造物である。

10

【0091】

又、本発明、ポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリ方法、例えば異なる予め決定された配列を有する2以上のポリヌクレオチド構造物のアセンブリを提供する。図2に、本発明の複合アセンブリ方法の一例を示す。予め決定された配列を有する2以上のポリヌクレオチド構造物を製造するために、一組の構造体オリゴヌクレオチドが、それぞれのポリヌクレオチド構造物の完全配列と一緒にカバーするように設計された。構造体オリゴヌクレオチドは、オーバーラップする相補的領域を有するように設計され、その領域は相補的領域間のハイブリダイゼーションを可能として、ハイブリダイゼーション条件下で一緒に混合された場合に構造体オリゴヌクレオチドの正確に配列された鎖を生じる(例えば図2C中のabc、def、及びghi)。アセンブリ混合物は次に、ライゲーション又は重合及びライゲーションされてサブアセンブリ又はポリヌクレオチド構造物を形成する(図2D)。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチド構造物の完全長さをカバーするために、一緒に混合された場合にはオリゴは単純に一緒にライゲートされてサブアセンブリ/ポリヌクレオチド構造物を形成する(例えば、図3A)。あるいは、構造体オリゴヌクレオチドは完全にオーバーラップせず、その代わりオリゴヌクレオチドセグメントのライゲーション前にポリメラーゼにより補完された一本鎖領域のギャップを残し、サブアセンブリ/ポリヌクレオチド構造物となる(図3C)。又、オーバーラップするフラグメントは連続的に、複数の一連の変性/ハイブリダイゼーション及び鎖伸長を通して、完全長産物が形成されるまで伸長される(参照、例えば、図3B)。例えば、種々の構造体オリゴヌクレオチドのサブアセンブリは、更にアセンブルされてより一層長いポリヌクレオチド構造物となる。例えば、二本鎖サブアセンブリは融解され、リアニールされて、2以上のサブアセンブリの相補的領域間のハイブリダイゼーションが可能となる。サブアセンブリは、次にライゲーション又は鎖伸長され、更に次にライゲーションされて一組のサブアセンブリからなるポリヌクレオチド構造物を形成する。又、サブアセンブリは、目的の配列で種々のサブアセンブリの結合を可能とする配列特異的付着末端を含んでもよい(例えば、3'又は5'オーバーハング)。付着末端は構造体オリゴヌクレオチドの設計(例えば、5'及び／又は3'最末端構造体オリゴヌクレオチドは、一本鎖オーバーハングを有するように設計できる)により形成されてもよく、サブアセンブリが1以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され付着末端を形成することもできる。付着末端を通したサブアセンブリの結合後に、ポリヌクレオチド構造物は、ライゲーション及び／又は鎖伸長により形成できる。一組のサブアセンブリから形成されるポリヌクレオチド構造物は、任意で更に一連のアセンブリが行われ、より一層長いポリヌクレオチド構造物が製造される(参照、例えば、図4)。

20

30

40

【0092】

同様に、本発明は、ユニバーサルプライマーを使用する1以上のステップで核酸を増幅することを含むポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法を提供する。例えば図5に示されるように、構造体オリゴヌクレオチド(例えば、a、b、c、d、e、及びf)は、ユニバーサルプライマーのための結合部位(例えば、白及び黒の四角で表される)を囲むように設計されてもよい。基質からの構造体オリゴヌクレオチドの除去の前後で、完全プールはただ一組のユニバーサルプライマーを使用して増幅される。本発明の例示では、ユニバーサルプ

50

ライマーは、増幅後に酵素的又は化学的切断により除去される。増幅された構造体オリゴヌクレオチドのプールは、次に融解され、アニールされ、ライゲーション及び／又は鎖伸長されてサブアセンブリを形成する(例えば図5中のabc又はdef)。例えばサブアセンブリ自体が、第2のユニバーサルプライマーセット(図示せず)を使用して増幅されてもよい。例えば5'及び3'最末端構造体オリゴヌクレオチド(例えばそれぞれ図5中のa及びd及びc及びf)は、第2のユニバーサルプライマーセット結合部位を囲むように設計されてもよい(参照図6)。第2のユニバーサルプライマーセットのサブアセンブリプールへの添加において、複数のサブアセンブリが増幅される。本発明の例示では、第2のユニバーサルプライマーセットは、次に化学的又は酵素的切断により除去される。サブアセンブリは、次に、相補鎖のハイブリダイゼーション又は付着末端による結合(上記記載の通り)それに続くライゲーション及び／又は鎖伸長によりアセンブルされて更により長いポリヌクレオチド構造物となる。このプロセスは、複数回、例えばユニバーサルプライマーを使用した増幅(例えば、第3のセット、第4のセット、第5のセット等を使用して)、プライマーの切断、及びアセンブリを、目的のポリヌクレオチド構造物が形成されるまで連続的に繰り返してもよい。例えば複数のアセンブリは、混合物中で単一の反応を実施してもよい。しかし、例えば非常に大きな数のポリヌクレオチド構造物をアセンブルする場合、一組の高度に相同なポリヌクレオチド構造物をアセンブルする場合、又は1以上の領域の内部の相同性を含むポリヌクレオチド構造物をアセンブルする場合、階層化されたアセンブリ方法を使用することが望ましい。様々な階層化されたアセンブリ方法を下記に記載する。

【0093】

又、本発明は、1以上のエラー減少プロセスを含むポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法を提供する。図7は、エラー減少及び／又は増幅とそれに続くアセンブリを含む反復的プロセスを示すフローチャートを提示する。例えば、構造体オリゴヌクレオチドが合成され、次に1以上の一連のエラー減少及び／又は増幅処理される。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、エラー減少処理及び次の増幅処理、又は増幅処理され及び次のエラー減少処理される。連続的一連の増幅及びエラー減少は、目的の構造体オリゴヌクレオチドのプールが得られるまで繰り返される。構造体オリゴヌクレオチドのプールは、次にアセンブリ処理される。サブアセンブリ産物は、次にエラー減少処理及び次の増幅処理、又は増幅処理及び次のエラー減少処理される。連続的一連の増幅及びエラー減少処理は、サブアセンブリの目的のプールが得られるまで繰り返される。サブアセンブリプールは、目的とされる最終ポリヌクレオチド構造物を表す。しかし、例えば、サブアセンブリは、より一層長いポリヌクレオチド構造物となるための更なる連続的一連のアセンブリ用の構成単位でもよい。それぞれの段階で、1以上の一連のエラー減少処理及び次の増幅処理、又は増幅処理及び次のエラー減少処理は、目的レベルの忠実度を有する最終目的産物が得られるまで実施される。例えば、エラー減少プロセス実施前に一連の変性/アニール処理中に追加することが望ましい。増幅がエラー減少プロセス前に実施される場合が特に最適である。図8中に示されるように、変性/再生プロセスは、エラー保有コピーの割合を増加させるが、それ(例えばプロセス初期に導入され、増幅中に永存している可能性のあるエラー)は同一の位置にエラーを有さないだろう相補鎖とランダムに再結合することにより除去できる。更に詳細に下記に記載されるように、使用されるエラー減少のタイプは、実施されるアセンブリの段階に従って変化する。例えば、本発明の例示では、選択オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによるエラーフィルトレーション捕集は、アセンブリされていない構造体オリゴヌクレオチドのプールで行われ；ミスマッチ結合薬剤を使用したエラーフィルトレーション捕集は、中間の長さを有するサブアセンブリ又は最終ポリヌクレオチド構造物のプールで行われ(例えば約1kb～約10kb、又は約1kb～約5kb)；エラー修復は、より長い長さを有するサブアセンブリ又は最終ポリヌクレオチド構造物のプールで行われる(例えば約5kb、10kb、25kb、50kb、100kb又は1メガベース以上)。本発明の開示に基づき、当業者は増幅、エラー減少及びアセンブリの適切な配列を実施して目的産物を製造することができる。

【0094】

3. オリゴヌクレオチド設計及び合成：

様々な態様において、本発明の方法は構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドを使用する。構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの配列は、合成目的とする最終ポリヌクレオチド構造物の配列に基づいて決定される。本質的に、ポリヌクレオチド構造物の配列は、本発明の方法を使用して分割され多数のオーバーラップする又は非オーバーラップするより短い配列となって、更に次に並列合成され、アセンブルされて最終目的のポリヌクレオチド構造物となる。構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの設計は、コンピュータプログラム、例えば商品名DNAワークス(Hoover及びLubkowski、Nucleic Acids Res.30 : e43(2002)、商品名ジーン2オリゴ(Rouillardら、Nucleic Acids Res.32 : W176-180(2004)及びwwwアドレスberry.engin.umich.edu/gene2oligo)等、又は更に下記に記載された実施システム及び方法等の助けにより容易化される。例えば1のプール中の多数のオリゴヌクレオチドの操作を促進するために、多数の構造体オリゴヌクレオチド/選択オリゴヌクレオチド対が実質的に類似の融点を有するように設計することが望ましい。このプロセスは、上記のコンピュータプログラムにより容易化できる。種々のオリゴヌクレオチド配列間の融点のノーマライズは、オリゴヌクレオチド長の変更により、及び／又はコドン再配置配列により達成される(例えば、最終的にはそれによりエンコードされるポリペプチド配列を変更せずに1以上のオリゴヌクレオチド中のA/T対G/C含量を変化させる)(参照：例えば国際公開W099/58721)。

【0095】

例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、目的のポリヌクレオチド構造物のセンス及びアンチセンスストランドの本質的に完全な相補物を提供するように設計される。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、完全なポリヌクレオチド構造物を形成するためには、単に一緒にハイブリダイズされ、ライゲーションされるだけでよい。他の例として、構造体オリゴヌクレオチドの相補物は、完全配列をカバーするが、ライゲーション前の鎖伸長により埋め込まれる一本鎖ギャップを保存するように設計される。この場合、それがより少ない及び／又はより短い構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチドの合成を必要とするために、ポリヌクレオチド構造物の製造が促進される。

【0096】

例えば、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルタグを含む。ユニバーサルタグは、5'末端若しくは3'末端のいずれか又は両方上の構造体オリゴヌクレオチドにフランキングし、かつプール中の少なくとも一部分の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドと共通する配列である。例示的なユニバーサルタグは例えば1以上の下記を含む：ユニバーサルプライマー結合部位、ミスマッチ修復酵素切断部位、オリゴヌクレオチドの検出/単離/固定化を促進する薬剤、及び接合部ユニバーサルタグ及び構造体オリゴヌクレオチド間の制限エンドヌクレアーゼ切断部位。

【0097】

本発明の例示では、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、1セットの又は数セットのプライマーを使用する核酸のプールの増殖に使用されるユニバーサルプライマーのための1以上のセットの結合部位を含む。ユニバーサルプライマー結合部位の配列は、有効なプライマーハイブリダイゼーション及び鎖伸長を効率的に行うことを可能とする適切な長さ及び配列を有するように選択される。更に、ユニバーサルプライマー結合部位の配列は、核酸プール中の目的とされない領域への非特異的結合を最小化するために最適化される。ユニバーサルプライマー及びユニバーサルプライマーへの結合部位の設計は、例えば商品名DNAワークス(supra)、商品名ジーン2オリゴ(supra)、又は更に下記記載の実施システム及び方法等のコンピュータプログラムを使用して容易化される。例えば、ポリヌクレオチド構造体の異なる段階での核酸の増幅を可能とする、幾つかのユニバーサルプライマー/プライマー結合部位セットを設計することが望ましい(図6)。例えば、一組のユニバーサルプライマーが、一組の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドを増幅するために使用される。一組の構造体オリゴヌクレオチドをサブアセンブリへアセンブリした後、サブアセンブリは同一又は異なるセットのユニバーサルプライマーを使用して増幅されても

よい。例えば、サブアセンブリへ組み込まれた3'及び5'最末端構造体オリゴヌクレオチド(一本鎖に関して)は、2以上の入れ子状態のユニバーサルプライマー結合部位セット、構造体オリゴの最初の増幅に使用される最も外側のセット、及びサブアセンブリの増幅に使用される第2のセットを含む。アセンブリのそれぞれの段階での増幅用のユニバーサルプライマー(例えば、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び／又はポリヌクレオチド構造物)の複数のセットを、組み込むこともできる。

【0098】

例えば、化学的又は酵素的切断により核酸分子から除去されるプライマー等のユニバーサルプライマーは、一時的プライマーとして設計されてもよい。核酸の化学的、熱的、光による、又は酵素的な切断方法は、下記に詳細に記載される。本発明の例示では、ユニバーサルプライマーは、タイプIIS制限エンドヌクレアーゼ又はDNAグリコシラーゼを使用して除去される。

【0099】

構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、目的の配列を有するオリゴヌクレオチドの製剤用の公知の方法により調製できる。例えば、オリゴヌクレオチドは、天然源から単離され、市販品を購入し、又は最初の主要素材(first principals)により設計されてもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、高処理量、並列合成を可能にする方法を使用して合成でき、費用及び製造時間を減少し、適用性を増加することが可能となる。本発明の例示では、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、1の整列形式で固体サポート上に合成できる、例えば一本鎖DNAセグメントのマイクロアレイは、共通の基質上にin situで合成され、それぞれのオリゴヌクレオチドはその基質上の離れたフィーチャ又は位置上に合成される。アレイは構築され、個別注文され、又は市販品販売者から購入されてもよい。様々なアレイ構築方法が公知である。例えば、固体サポート上で例えば1の整列形式での構造体の合成及び／又は選択オリゴヌクレオチド合成に適用できる方法及び技術として、記載されており、例えば国際公開W000/58516、米国特許第5143854、5242974、5252743、5324633、5384261、5405783、5424186、5451683、5482867、5491074、5527681、5550215、5571639、5578832、5593839、5599695、5624711、5631734、5795716、5831070、5837832、5856101、5858659、5936324、5968740、5974164、5981185、5981956、6025601、6033860、6040193、6090555、6136269、6269846及び6428752及びZhouら、Nucleic Acids Res. 32: 5409-5417(2004)。

【0100】

本発明の例示では、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、マスクレスアレイ合成機(MAS)を使用して固体サポート上で合成されてもよい。マスクレスアレイ合成機は、例えば国際出願番号W099/42813及び対応する米国特許第6375903に記載されている。他の例として、アレイ中のフィーチャがそれぞれ目的の配列の一本鎖DNA分子を有するカスタムDNAマイクロアレイを製造できるマスクレス装置が公知である。装置の好ましいタイプは、米国特許第6375903に記載されている図5の、反射光学系の使用型であるタイプである。この種のマスクレスアレイ合成機はソフトウェア制御下にあることが望ましい。マイクロアレイ合成の完全プロセスはたった数時間で達成され、かつ適切なソフトウェアは目的のDNA配列を任意に変更させることが可能なので、この種の機器は、異なる配列のDNAセグメントを含むマイクロアレイを1の装置で毎日又は1日複数回でさえ製造することが可能である。マイクロアレイ中のDNAセグメントのDNA中の配列の相違は僅かにも著しくもなるが、それはプロセスを変化させない。MAS装置は、それが通常通りにハイブリダイゼーション実験用マイクロアレイを製造するために使用できる形態で使用できるが、本発明の組成物、方法、及びシステムに特に適用される形態を含む。例えば、上記米国特許第6375903の図5に記載の光源をコヒーレント光源、即ちレーザーへ交換することが望ましい。レーザーが光源として使用される場合、拡張されたビーム及び分散板がレーザー光源の後に使用され、狭い光ビームをレーザーからより広い光源へ変更して、マスクレスアレイ合成機中で使用されるマイクロミラーアレイを照明する。本発明は、その中でマイクロアレイが合成されるフローセルを変更してもよい。特に、フローセルは共通の流体チャネルにより

互いに伝達される流体中に存在するアレイ要素の直線列に分画化されることができ、それぞれのチャンネルはアレイ要素の隣接した列と関連する近接したチャンネルからは分離されている。マイクロアレイ合成中、チャンネルは全て同一の流体を同時に受け入れる。DNAセグメントが基質から分離された後、チャンネルはアレイ要素列からのDNAセグメントが互いに集合して、ハイブリダイゼーションにより自己アセンブルの開始が可能にするように作用する。

【0101】

他の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの合成方法として、例えばマスク使用光照射法、フローチャンネル法、スポッティング法、ピン (pin-based) 法、及び複数のサポートを使用する方法が挙げられる。

10

【0102】

オリゴヌクレオチドの合成用マスク使用光照射法(例えば、商品名VLSIPS法)は、例えば米国特許第5143854、5510270及び5527681に記載されている。これらの方法には、固体サポートの予め特定された領域を活性化し、次にサポートに予め選択されたモノマー溶液を接触させるステップが含まれる。選択された領域は、照射光源からマスクを通して、集積回路製造で多く使用される光リソグラフィ技術手法で照射することにより活性化できる。サポートの他の領域は、照明がマスクによりブロックされ、化学的に保護されて保存されるために不活性のまま残る。従って、光パターンは、所定のモノマーと反応するサポートの領域がどこかを特定する。異なるセットの予め特定された領域の活性化及び、異なるモノマー溶液をサポートとの接触を繰り返すことにより、ポリマーの多様なアレイがサポート上に製造される。未反応モノマー溶液のサポートからの洗浄等の他のステップも、必要に応じて使用できる。他の適用可能な方法として、米国特許第5384261に記載されているもの等の機械的技術もある。

20

【0103】

構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの単一のサポート上での合成へ適用可能な追加的方法は、例えば米国特許第5384261に記載されている。例えば薬剤は、(1)予め特定された領域上に特定されたチャンネル内のフロー又は(2)予め特定された領域上での「スポッティング」のいずれかによりサポートへ運ばれる。他の手法、並びにスポッティング及びフローの組み合わせも同様に使用できる。それぞれの例では、サポートの所定の活性化される領域は、モノマー溶液が様々な反応部位へ運ばれる時に機械的に他の領域から分離される。

30

【0104】

フローチャンネル方法として、例えばコントロール固体サポート上のオリゴヌクレオチドの合成を制御するマイクロ流体系が挙げられる。例えば、多様なポリマー配列は、サポートの表面上に、それを通して適切な薬剤が流れるかその中に適切な薬剤が配置されるフローチャンネルを形成することにより、固体サポートの選択された領域で合成される。別のチャンネル形成方法やサポートの表面の一部分を保護する方法があることは、当業者には理解できる。例えば(溶媒の性質に応じて)親水性又は疎水性コーティング等の保護的コーティングが、時には他の領域中の反応物溶液により濡れるのを促進する材料と組み合わせて、保護しようとするサポートの一部に使用される。この方法で、フローする溶液が設計されたフロー経路の外側を通過することは、更に防止される。

40

【0105】

固体サポート上のオリゴヌクレオチド製剤のスポッティング方法には、選択された領域にそれらを直接配置することにより比較的少量で反応物を運ぶことが挙げられる。幾つかのステップでは、完全サポート表面は、溶液をスプレーされるか、その方がより効果的であれば、溶液を塗布される。厳密に測定されたモノマー溶液のアリコートが、領域から領域へ移動するディスペンサーにより滴下され配置される。一般的ディスペンサーとして、モノマー溶液をサポートへ供給するマイクロピペット、及びマイクロピペットの位置をサポートに対して制御するロボットシステム、又はインクジェットプリンターが挙げられる。他の例として、ディスペンサーには、様々な薬剤を反応領域へ同時に配置できるような

50

一連のチューブ（試験管）、マニフォールド、ピペットのアレイ等も含まれる。

【0106】

固体サポート上のオリゴヌクレオチドのピン（pin-based）合成方法は、例えば米国特許第5288514に記載されている。ピン法は、複数のピン又は他の延長手段を有するサポートを使用する。ピンは、1のトレイ中の個々の複数の薬剤容器中へそれぞれ同時に挿入される。96ピンのアレイは通常、96-ウェルマイクロタイター皿等の96-容器トレイと一緒に使用される。それぞれのトレイは、1の個々のピン上で1の特別の化学反応でカップリングするための1の特別な薬剤で充填される。従って、トレイはしばしば異なる薬剤を有する。化学反応はそれぞれの反応が比較的類似の一組の反応条件下で行われるように最適化されるために、複数の化学的カップリングステップを同時に実施することが可能になる。

10

【0107】

本発明の別の例では、複数の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、複数のサポート上で合成される。1の例はビーズベース型合成方法であり、例えば米国特許第5770358、5639603及び5541061に記載されている。ビーズ上のオリゴヌクレオチド等の分子を合成するために、大量のビーズが容器内の適切なキャリア（水等）中で懸濁される。ビーズには、任意で保護基が結合される活性部位を有する任意のスペーサ分子が提供される。合成のそれぞれのステップで、ビーズはカップリングのために複数の容器中へ分配される。初期のオリゴヌクレオチド鎖が脱保護された後、異なるモノマー溶液がそれぞれの容器へ添加され、対象となる容器中の全てのビーズ上で、同一のヌクレオチド添加反応が発生する。ビーズは次に過剰の薬剤で洗浄され、単一の容器中に保留（プール）され、混合されて次の一連の合成の用意のため別の複数の容器中へ再分配される。最初に多数のビーズが使用できるおかげで、同様に多数のビーズがランダムに容器中に分散され、それぞれのビーズは数多くの一連の塩基のランダム化された添加の後にその表面上に合成されたユニークオリゴヌクレオチド配列を有する。個々のビーズは、二本鎖オリゴヌクレオチドヘユニークな配列で標識化され、使用中の同定が可能となる。

20

【0108】

固体サポート上のオリゴヌクレオチドの合成に有用な様々な例示的保護基は、例えばAthertonら、1989「固体相ペプチド合成」IRL Pressに記載されている。

【0109】

様々な態様において、本発明の方法は、核酸の固定化用に固体サポートを使用する。例えば、オリゴヌクレオチドは1以上の固体サポート上に合成される。更に、選択オリゴヌクレオチドは、配列エラーを有する構造体オリゴヌクレオチドの除去を促進するために固体サポート上に固定化される。例示的な固体サポートとして、例えば、スライド、ビーズ、チップ、粒子、ストランド、ゲル、シート、チューブ（管）、球体、容器、キャピラリー、パッド、スライス、フィルム、又はプレートが挙げられる。様々な態様において、固体サポートは、生物学的、非生物学的、有機的、無機的、又はそれらの組み合わせの性質を有する。実質的に平面のサポートを使用する場合、サポートは物理的に領域ごとに、例えば溝（トレンチ、グループ）、ウェル又は化学的バリア（例えば、疎水性コーティング等）で分離される。光透過性のサポートはアッセイが光学的検出を含む場合に有用である（参照：例えば米国特許第5545531）。固体サポートの表面は、一般的に、カルボキシル、アミノ、及びヒドロキシル等の反応性基を含むか、機能性化シリコン化合物でコートされる（参照：例えば米国特許第5919523）。

30

40

【0110】

例えば、固体サポート上で合成されたオリゴヌクレオチドは、より長いポリヌクレオチド構造物へとアセンブリされる構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチドの製造用テンプレートとして使用できる。例えばサポートと結合しているオリゴヌクレオチドは、プライマーの鎖伸長を可能とする条件下でオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするプライマーと接触する。サポートと結合しているデュプレックスは、次に変性され、更に一連の増幅処理にかけられる。

【0111】

50

又別の例では、サポートと結合しているオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチド構造物へのアセンブリ前に固体サポートから除去される。オリゴヌクレオチドは、例えば酸、塩基、酸化、還元、熱、光、金属イオン触媒作用、置換若しくは除去化学等の条件下に曝すことにより、又は酵素的切断により固体サポートから除去される。あるいは、オリゴヌクレオチドは、サポート(例えば構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドのコピー製造用に再利用可能なテンプレートとして機能するサポート)へ結合されている間増幅されてもよい。

【0112】

例えばオリゴヌクレオチドは、切断可能な結合成分を通して固体サポートへ結合されてもよい。例えば固体サポートは、オリゴヌクレオチドへの共有結合のための切断可能なリンカーを提供するために官能基化されてもよい。リンカー成分は6原子以上の長さでもよい。あるいは、切断可能な成分は、オリゴヌクレオチド内にもよく、in situ合成中に導入されてもよい。広範な様々の切断可能な成分が、固体相及びマイクロアレイオリゴヌクレオチド合成分野で入手可能である(参照：例えばPon, R., *Methods Mol. Biol.* 20: 465-496(1993); Vermaら, *Annu. Rev. Biochem.* 67: 99-134(1998); 米国特許第5739386、5700642及び5830655; 及び米国特許出願公開2003/0186226及び2004/0106728)。適切な切断可能な成分は、ヌクレオシド塩基の保護基の性質、固体サポートの選択、及び／又は薬剤投与モード、その他と調和するように選択される。本発明の例示では、固体サポートから切断されたオリゴヌクレオチドは、遊離3'-OH末端を含む。遊離3'-OH末端は又、化学的又は酵素的処理に続くオリゴヌクレオチドの切断により得られる。切断可能な成分は、オリゴヌクレオチドを劣化させない条件下で除去される。好ましくはリンカーは、(a)脱保護ステップと同一の条件下で同時に、又は(b)脱保護完了ステップ後に続いてリンカー切断用の異なる条件又は薬剤を使用するかいずれかの2個の手法を使用して切断される。

【0113】

共有固定化部位は、オリゴヌクレオチドの5'末端又はオリゴヌクレオチドの3'末端のいずれかにある。例えば、固定化部位はオリゴヌクレオチド内に含まれる(即ち5'以外の部位に又はオリゴヌクレオチドの3'末端に)。切断可能な部位は、オリゴヌクレオチド主鎖に沿って位置し、例えばリボース、ジアルコキシシラン、ホスホロチオアート、及びホスホロアミダート(phosphoramidate)ヌクレオチド間結合等の、ホスホジエステル基の1種の場所にある修飾された3'-5'ヌクレオチド間結合が挙げられる。切断可能なオリゴヌクレオチドアナログには又、7-デアザ(deaza)グアノシン、5-メチルシトシン、イノシン、ウリジン等の塩基又は糖類の1種上の置換基の存在又はその置き換えが含まれる。

【0114】

例えば、修飾されたオリゴヌクレオチド内に含まれる切断可能な部位として、ジアルコキシシラン、3'-(S)-ホスホロチオアート、5'-(S)-ホスホロチオアート、3'-(N)-ホスホロアミダート、5'-(N)ホスホロアミダート、及びリボース等の化学的切断可能な基が挙げられる。化学的切断可能なオリゴヌクレオチドの合成及び切断条件は、米国特許第5700642及び5830655に記載されている。例えば導入される切断可能な部位の選択に応じて、機能性化ヌクレオシド又は修飾されたヌクレオシド二量体のいずれかが最初に調製され、次に選択的に増殖しているオリゴヌクレオチドフラグメント中へオリゴヌクレオチド合成の過程の間に導入される。ジアルコキシシランの選択的切断は、弗素イオンで処理すると効果的である。ホスホロチオアートヌクレオチド間結合は、穏やかな酸化的条件下で選択的に切断される。ホスホロアミダート結合の選択的切断は、80%酢酸等の弱酸性条件下で行われる。リボースの選択的切断は、稀アンモニア水で処理することにより行われる。

【0115】

又別の例では、非切断可能な水酸基リンカーは、ホスホロアミダイト又はH-ホスホネートオリゴヌクレオチド合成前に、特別なホスホロアミダイトを水酸基ヘカップリングすることにより切断可能なリンカーへ変換でき、これは米国特許出願公開2003/0186226に記載されている。化学的燐酸化剤の、オリゴヌクレオチド合成完了点での切断は、3'末端にホスファート基を有するオリゴヌクレオチドを生じる。3'-ホスファート末端は、化学薬品

又は当業者が通常使用するアルカリホスファターゼ等の酵素での処理により3'水酸基末端へ変換される。

【0116】

又別の例では、切断可能な結合成分はTOPS(合成当たり2個のオリゴヌクレオチド)リンカー(参照：例えば国際公開WO93/20092)である。例えばTOPSホスホロアミダイトは、固体サポート上の上の非切断可能な水酸基を切断可能なリンカーへ変換するために使用される。TOPS薬剤の好ましい例は、ユニバーサルTOPSホスホロアミダイトである。ユニバーサルTOPS(商標)ホスホロアミダイト製剤のカップリング及び切断条件の詳細は、例えばHardyら、Nucleic Acids Research 22(15):2998-3004(1994)に記載されている。ユニバーサルTOPS(商標)ホスホロアミダイトは、環状3'ホスファートを生じ、それは長期のアンモニア及び／又はアンモニア/メチルアミン処理等の塩基性条件下で除去されると天然3'ヒドロキシオリゴヌクレオチドが得られる。

10

【0117】

又別の例では、切断可能な結合成分はアミノリンカーである。ホスホロアミダイト結合を通してリンカーへ結合して得られたオリゴヌクレオチドは、80%酢酸で切断されて3'-燐酸化オリゴヌクレオチドを生じる。

【0118】

又別の例では、切断可能な結合成分は、オルト-ニトロベンジル光切断可能なリンカー等の光切断可能なリンカーである。固体サポート上の光不安定なオリゴヌクレオチドの合成及び切断条件は、例えば下記に記載されている：VenkatesanらJ.Org.Chem.61:525-529(1996)、Kahlら、J.Org.Chem.64:507-510(1999)、Kahlら、J.Org.Chem.63:4870-4871(1998)、Greenbergら、J.Org.Chem.59:746-753(1994)、Holmesら、J.Org.Chem.62:2370-2380(1997)、及び米国特許第5739386。ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、及びFmoc-アミノエチルカルボン酸リンカー等のオルト-ニトロベンジル型リンカーは、市販品を入手できる。

20

【0119】

固体サポート上でオリゴヌクレオチドを合成する場合、サポート上の特定位置(スポット)の端にあるオリゴヌクレオチドは、その位置の中心付近に配置されたオリゴヌクレオチドより高いエラー割合を生じやすい。例えば図9は、位置11~22にそれぞれ、異なる位置に合成された異なるオリゴヌクレオチド配列(例えば31~42)を有する固体サポートを図示する。位置19の詳細図中に示されるように、中央の点線で囲まれた灰色領域は、その位置の端で合成されたオリゴヌクレオチドと比べて、比較的より高い忠実度(例えば配列エラーが少ない)を有するオリゴヌクレオチドを製造する位置の部分を表す。構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの出発プールの忠実度を上げるために、その位置の中心に配置されたオリゴヌクレオチドを選択的に放出し、位置の端近辺から放出されるオリゴヌクレオチドを最小化することが好ましい。これは、オリゴヌクレオチドの固体サポートへの結合用に光不安定な結合成分を使用して達成される。位置の中心付近のオリゴヌクレオチドは、次に選択的に位置の中心へ光照射することにより除去される。固体サポート上の1の位置中心への高度に正確な照射は、例えばマスクレスアレイ合成機又はMAS(参照：例えば国際公開WO99/42813及び米国特許第6375903)を使用して達成される。MAS装置は、ハイブリダイゼーション実験用マイクロアレイを製造する為に通常使用される形式で使用できるが、本発明に特別に適用された態様を含んでも良い。例えばコヒーレント光源、即ち狭い光ビームを提供し、そのためオリゴヌクレオチドの切断位置のより正確な制御ができるレーザー、を使用することが望ましい。

30

40

【0120】

又別の例では、短オリゴヌクレオチドは長いオリゴヌクレオチドより純粋で、より少ない配列エラーを有するために、より短い構造体オリゴヌクレオチドも構造体のために合成され使用される。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、約30~約100ヌクレオチド、約30~約75ヌクレオチド、又は約30~約50オリゴヌクレオチドでもよい。他の例として、構造体オリゴヌクレオチドは、完全ポリヌクレオチド構造物の配列を実質的にカバーする

50

のに十分な長さである(例えばポリメラーゼにより埋め込まれる必要のあるオリゴヌクレオチド間にギャップが全く無い)。オリゴヌクレオチド自身は、ミスマッチしたオリゴヌクレオチドは完全にマッチしたオリゴヌクレオチドよりもアニールされにくいため、エラー含有配列はハイブリダイゼーション条件注意深く制御することにより減少することから、検査機構として機能する。

【0121】

又別の例では、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ及び／又はグリコシラーゼ等の酵素により固体サポートから除去される。広い範囲のオリゴヌクレオチド塩基、例えばウラシルは、塩基及びデオキシリボース間のN-グリコシル結合を切断して無塩基部位を残すDNAグリコシラーゼにより除去される(Krokanら、Biochem.J.325:1-16(1997))。オリゴヌクレオチド中の無塩基部位は次に、エンドヌクレアーゼIV等のAPエンドヌクレアーゼにより切断されて遊離3'-OH末端が残る。又別の例では、オリゴヌクレオチドは、例えばクラスI制限酵素等の1以上の制限エンドヌクレアーゼへ接触させて固体サポートから除去される。例えば制限エンドヌクレアーゼ認識配列は、固定化したオリゴヌクレオチド中に組み込まれ、オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドをサポートから除去するための1以上の制限エンドヌクレアーゼと接触する。様々な態様において、オリゴヌクレオチドをサポートから除去するために酵素的切断を使用した場合、一本鎖固定化したオリゴヌクレオチドをプライマー、ポリメラーゼ及びdNTPと接触させ、固定化したデュプレックスを形成することが望ましい。デュプレックスは次に、酵素(例えば、制限エンドヌクレアーゼ、DNAグリコシラーゼ等)と接触して、サポートの表面からデュプレックスが除去される。サポートと結合しているオリゴヌクレオチド上の第2鎖の合成方法、及びサポートと結合しているデュプレックスの酵素的除去方法は、例えば米国特許第6326489中に記載されている。あるいは制限エンドヌクレアーゼ認識及び／又は切断部位に相補的な短オリゴヌクレオチド(例えばサポートと結合しているオリゴヌクレオチド全体に相補的ではない)も、オリゴヌクレオチドと結合しているサポートへハイブリダイゼーション条件下で添加して、制限エンドヌクレアーゼによる切断を促進してもよい(参照:例えば国際公開W004/024886)。

【0122】

4. 核酸の増幅:

様々な態様において、本発明の方法は、構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ及び／又はポリヌクレオチド構造物等の核酸の増幅ステップを含む。増幅は、アセンブリ法中1以上の段階で実施されても、及び／又はアセンブリ中の所定の段階で1回以上実施されてもよい。増幅方法は、核酸と、ハイブリダイゼーション及び鎖伸長を促進する条件下で核酸と特異的にハイブリダイズする1以上のプライマーとを接触させるステップを含む。例示的な核酸増幅方法として、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(参照、例えばMullisら(1986)Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51Pt1:263及びClearyら(2004)Nature Methods 1:241;及び米国特許第4683195及び4683202)、アンカーPCR、RACEPCR、ライゲーション連鎖反応(LCR)(参照、例えば、Landegranら(1988)Science241:1077-1080;及びNakazawaら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:360-364)、自己持続配列複製(Guatelliら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1874)、転写的増幅システム(Kwohら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:1173)、Q-Beta Replicase(Lizardiら(1988)Biotechnology 6:1197)、反復的PCR(Jaffeら(2000)J. Biol. Chem. 275:2619;及びWilliamsら(2002)J. Biol. Chem. 277:7790)、米国特許第6391544、6365375、6294323、6261797、6124090及び5612199に記載されている増幅方法、又は当業者に公知である技術を使用した他の核酸増幅方法が挙げられる。例えば本発明の方法はPCR増幅法を使用する。

【0123】

例えば核酸配列に特異的なプライマーセットが、単離される特定の核酸配列を増幅するため、又は核酸配列のプールの一部である特定の核酸配列を増幅するために使用される。又別の例では、複数のプライマーセットが単一の反応混合物中に一緒に任意でプールされてもよい多数の特定の核酸配列を増幅するために使用される。本発明の例示では、一組の

ユニバーサルプライマーは、1のプール中にあるか又は複数のプールへ分離されている多数の核酸配列を増幅するために使用できる(図5)。アセンブリ中の異なる段階で核酸を増幅する場合、増幅を目的とするそれぞれの段階用に異なるセットのユニバーサルプライマーを使用することが望ましい(図6)。例えば第1のセットのユニバーサルプライマーは構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドを増幅するために使用され、第2のユニバーサルプライマーセットは、サブアセンブリ又はポリヌクレオチド構造物を増幅するために使用される(図6)。上記記載の通り、構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、1以上のユニバーサルプライマーセット用のプライマー結合部位を有するように設計されてもよい。あるいは、プライマー結合部位は、合成後に、目標核酸に相補的な領域及び非相補的領域を含むキメラ性プライマーを使用して、増幅プロセス中に組み込まれて、核酸に追加されてもよい(参照：例えば国際公開W099/58721)。

10

【0124】

例えば、プライマー/プライマー結合部位は、一時的な、例えばプライマー/プライマー結合部位の除去をアセンブリ中の目的の段階で可能とするものとして設計される。一時的プライマーは、化学薬品、熱的、光ベースの、又は酵素的切断により除去可能なように設計される。切断は、外部因子(例えば酵素、化学薬品、熱、光等)の添加により発生しても、所定の時間後(例えばn回の増幅後)自動的に発生してもよい。例えば、一時的プライマーは化学的切断により除去される例えば酸反応性又は塩基反応性部位を有するプライマーが増幅に使用される。増幅されたプールは次に酸又は塩基に曝され、目的の位置にあるプライマー/プライマー結合部位が除去される。あるいは一時的プライマーは熱及び／又は光へ曝されて除去されてもよい。例えば熱反応性又は光不安定な部位を有するプライマーが増幅に使用される。増幅されたプールは次に、熱及び／又は光へ曝され、目的の位置にあるプライマー/プライマー結合部位が除去される。又別の例では、RNAプライマーが増幅に使用され、核酸の分子末端にあるRNA/DNAハイブリッドの短いストレッチを形成する。プライマー部位次にRNase(例えばRNaseH)へ曝されて除去される。様々な態様において、プライマー除去方法は増幅されたデュプレックスの一本鎖のみを切断するので3'又は5'オーバーハングを残す。これらオーバーハングはエキソヌクレアーゼを使用して除去され、平滑末端化された二本鎖デュプレックスが生成する。例えば、RecJ_fが一本鎖5'オーバーハングを除去するために使用され、エキソヌクレアーゼI又はエキソヌクレアーゼTが一本鎖3'オーバーハングを除去するために使用される。更に、S₁ヌクレアーゼ、P₁ヌクレアーゼ、大豆ヌクレアーゼ及びCELIヌクレアーゼが、核酸分子から一本鎖領域を除去するために使用される。RecJ_f、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼT、及び大豆ヌクレアーゼは、市販品を例えばニューイングランドバイオラボ社(ベバリー、MA)から入手可能である。S₁ヌクレアーゼ、P₁ヌクレアーゼ及びCELIヌクレアーゼは、例えばVogt、V.M.、Eur.J.biochem.、33:192-200(1973)；Fujimotoら、Agric.Biol.Chem.38:777-783(1974)；Vogt、V.M.、Methods Enzymol.65:248-255(1980)；及びYangら、Biochemistry 39:3533-3541(2000)に記載されている。

20

30

【0125】

例えば一時的プライマーは、化学薬品、熱的又は光型切断により核酸から除去される。本発明の方法に使用できる例示的な化学的切断可能なヌクレオチド間結合として、例えば、β-シアノエーテル、5'-デオキシ-5'-アミノカルバメート、3'-デオキシ-3'-アミノカルバメート、ウレア、2'-シアノ-3'、5'-ホスホジエステル、3'-(S)-ホスホロチオアート、5'-(S)-ホスホロチオアート、3'-(N)-ホスホロアミダート、5'-(N)-ホスホロアミダート、α-アミノアミド、ビシナルジオール、リボヌクレオシド挿入物、2'-アミノ-3'、5'-ホスホジエステル、アリルスルホキシド、エステル、シリルエーテル、ジチオアセタール、5'-チオ-フルマル(furmal)、α-ヒドロキシ-メチル-ホスホン酸ビスアミド、アセタール、3'-チオ-フルマル、メチルホスホネート及び三リン酸エステルが挙げられる。トリアルキルシリルエーテル及びジアルコキシシラン等のヌクレオシド間シリルグループは、弗素イオン処理で切断される。塩基切断可能な部位として、β-シアノエーテル、5'-デオキシ-5'-アミノカルバメート、3'-デオキシ-3'-アミノカルバメート、ウレア、2'-シアノ-3'、

40

50

5'-ホスホジエステル、2'-アミノ-3'、5'-ホスホジエステル、エステル及びリボースが挙げられる。3'-(S)-ホスホロチオアート及び5'-(S)-ホスホロチオアート等のチオ含有ヌクレオチド間結合は、硝酸銀又は塩化水銀処理により切断される。酸切断可能な部位として、3'-(N)-ホスホロアミダート、5'-(N)-ホスホロアミダート、ジチオアセタール、アセタール及びホスホン酸ビスアミドが挙げられる。 α -アミノアミドヌクレオシド間結合は、イソチオシアナート処理により切断可能であり、チタンも2'-アミノ-3'、5'-ホスホジエステル-0-オルト-ベンジルヌクレオシド間結合の切断に使用される。ビシナルジオール結合は、過沃素酸塩処理により切断可能である。熱的切断可能な基としてアリルスルホキシド及びシクロヘキセンが含まれ、光反応性結合としてはニトロベンジルエーテル及びチミジン二量体が含まれる。化学的切断可能な、熱的切断可能な、及び光反応性基を含有する核酸を合成及び切断する方法は、例えば米国特許第5700642に記載されている。

10

【0126】

他の例として、一時的プライマー/プライマー結合部位は酵素的切断を使用して除去される。例えば、プライマー/プライマー結合部位は制限エンドヌクレアーゼ切断部位を有するように設計される。増幅後、核酸のプールは1以上のエンドヌクレアーゼと接触して二本鎖破断を生じ、プライマー/プライマー結合部位が除去される。例えばフォワード及びリバースプライマーは、同一又は異なる制限エンドヌクレアーゼにより除去される。いずれの種類の制限エンドヌクレアーゼも核酸配列からプライマー/プライマー結合部位を除去するために使用できる。特異的結合及び/又は切断部位を有する様々な種類の制限エンドヌクレアーゼが市販品として、例えばニューイングランドバイオラボ社(ベバリー、MA)から入手できる。様々な態様において、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制限エンドヌクレアーゼが使用される。オーバーハングを生じる制限エンドヌクレアーゼを使用する場合、エキソヌクレアーゼ(例えばRecJ_f、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼT、S₁ヌクレアーゼ、P₁ヌクレアーゼ、大豆ヌクレアーゼ、T4DNAポリメラーゼ、CELIヌクレアーゼ等)が平滑末端を生成するために使用される。あるいは、特異的制限エンドヌクレアーゼにより形成された付着末端が、目的の配置中のサブアセンブリのアセンブリを促進するために使用される(参照、例えば、図4A)。本発明の例示では、タイプIIS制限エンドヌクレアーゼ用の結合及び/又は切断部位を含有するプライマー/プライマー結合部位が、一時的プライマーを除去するために使用される。

20

【0127】

本発明の例示では、一時的プライマーはウラシルDNAグリコシラーゼ及びAPエンドヌクレアーゼ(例えばユーザー酵素)を使用して除去されるように設計される。例えば、プライマーは切断の目的部位で1以上のウラシル残基を有するように設計される。増幅中に、それぞれの増幅されたストランドは、目的の位置でウラシル残基を組み込む。増幅されたプールは次に、ウラシルDNAグリコシラーゼ(主鎖からウラシル塩基を除去する)及びAPエンドヌクレアーゼ(主鎖を無塩基部位で切断して一本鎖破断を生じる)と接触して、それぞれの末端に3'オーバーハングを有するデュプレックスを生じる。オーバーハングは、例えばエキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼT、S₁ヌクレアーゼ、T4DNAポリメラーゼ、又は大豆ヌクレアーゼ等のエキソヌクレアーゼを使用して除去され、平滑末端化された二本鎖デュプレックスを形成する。これは図10に図示されている。様々な他の例として、塩基及びDNAグリコシラーゼの別の組み合わせも、プライマー/プライマー結合部位を除去する手段として使用でき、例えばHmu-DNAグリコシラーゼ(ヒドロキシメチルウラシルを認識する)、5-mC-DNAグリコシラーゼ(5-メチルシトシンを認識する)、Hx-DNAグリコシラーゼ(ヒポキサンチンを認識する)、3-mA-DNA-グリコシラーゼI(3-メチルアデニンを認識する)、3-mA-DNA-グリコシラーゼII(3-メチルアデニン、7-メチルグアニン及び3-メチルグアニンを認識する)、FaPy-DNAグリコシラーゼ(ホルムアミドピリミジン及び8ヒドロキシグアニンを認識する)、及び5、6-HT-DNA-グリコシラーゼ(5、6水和化チミンを認識する)が挙げられる。

40

【0128】

本発明の増幅方法へ使用できる適切なプライマーはコンピュータプログラム、例えば商

50

品名DNAワークス(supra)、商品名ジーン2オリゴ(supra)、又は更に下記に記載された実施システム及び方法等の助けにより設計される。一般的にプライマーは、約5～約500、約10～約100、約10～約50、又は約10～約30ヌクレオチド長。例えば、一組のプライマー又は複数のプライマーセットは、複合体反応混合物の操作を容易化するために実質的に類似の融点を有するように設計される。融点は、例えばプライマー長さ及びヌクレオチド組成物により影響される。

【0129】

例えば、キャップ(例えばエキソヌクレアーゼ切断を防止するため)、結合成分(オリゴヌクレオチドの基質上への固定化を促進するための上記記載のもの等)の1以上の修飾を含むプライマー、又は核酸構造物の検出、単離及び／若しくは固定化を容易化する薬剤等を使用することが望ましい。適切な修飾として、例えば様々な酵素、発光性マーカー、生物発光性マーカー、蛍光発光マーカー(例えば、フルオレセイン)、放射性標識(例えば、³²P、³⁵S等)、ビオチン、ポリペプチドエピトープ等が挙げられる。本明細書の記載に基づき、当業者は所定の用途に適したプライマー修飾を選択できる。

【0130】

例えば、フランキング配列の除去後(例えばユニバーサルプライマー等)それらをアセンブリプロセスにかける前に、構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリを精製することが望ましい。例えば、精製は、サイズ分離法(例えば、ゲル、カラム、又はフィルター型サイズ分離)を使用して、目的産物から、未切断オリゴヌクレオチド、部分切断オリゴヌクレオチド、及び切断されたフランキング配列フラグメント(例えば、フランキング配列が両端から除去された構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ)を除去することができる。又別の例では、精製は親和性分離を使用して分離できる。例えば、構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリの増幅は、親和性薬剤を使用した(例えばビオチン)プライマー機能性化により実施できる。フランキング配列除去処理後、反応物は親和性精製処理され(例えばストレプトアビジンビーズを使用した精製)、反応混合物から切断フランキング配列フラグメント、未切断オリゴヌクレオチド及び／又は部分切断オリゴヌクレオチドが除去される。他の例では、親和性薬剤は、増幅後の構造体オリゴヌクレオチド又はサブアセンブリ末端へ添加される。

【0131】

5. アセンブリ方法：

様々な態様において、本発明の方法は、短オリゴヌクレオチドから長いポリヌクレオチド構造物へのアセンブル方法を使用し、例えば、PCR型アセンブリ方法(PAM又はポリメラーゼアセンブリ複合化を含む)及びライゲーション型アセンブリ方法(例えば、相補的又は平滑末端を有する核酸セグメントの結合)が挙げられる。本発明の例示では、複数のポリヌクレオチド構造物は、単一の反応混合物中でアセンブルされる。他の例として、例えば大きな数のポリヌクレオチド構造物、内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物を合成する際、又は高度に相同であるか、相同性領域を含む2以上のポリヌクレオチド構造物を合成する際には、階層化型アセンブリ方法も使用できる。本発明の核酸プールを含む組成物及び方法では、サポートへ結合された及び結合されていない核酸両方、並びにそれらの組み合わせを含むものである。

【0132】

例えば、ポリヌクレオチド構造物は、形成を目的とするポリヌクレオチド構造物の配列を部分的に又は完全に有する相補的にオーバーラップする領域を有する複数の短オリゴヌクレオチドと共に混合することによりアセンブルされる。例えば図3B及び3Cに図示されるように、短オリゴヌクレオチドは部分的に二本鎖になった核酸を形成し、鎖伸長又は鎖伸長及びライゲーションの組み合わせを使用して短オリゴヌクレオチド間に残されたギャップを埋め込み、アセンブルされてポリヌクレオチド構造物となる。あるいは図3Aに図示されたように、短オリゴヌクレオチドは、それらはアセンブリにおいて、産物を形成するために短オリゴヌクレオチド間のライゲーションのみを必要として(例えば、ギャップは、アセンブリプロセス中に短オリゴヌクレオチド間に埋め込まれる必要がない)互いに接触

してポリヌクレオチド構造物を形成するように設計される。例えば図3Aに図示されるように、ポリヌクレオチド構造物の形成は、より効率的にエラー減少を行うことにより、特異性を制御し、忠実度を増加することを助ける。例えば、短オリゴヌクレオチドの合成中に生じる短オリゴヌクレオチド中でのエラーが、相補鎖間のハイブリダイゼーションが相補的オリゴヌクレオチド中の対応するエラー間の正確な塩基対を生じるように同一の位置に発生する確率は非常に低い。従って、短オリゴヌクレオチドの配列中のエラーは、多くの場合ミスマッチとして認識される塩基対を生じる。しかし、アセンブリ中にポリメラーゼにより埋め込まれるギャップを形成する位置の短オリゴヌクレオチド中にエラーが生じた場合、得られる産物はポリヌクレオチド構造物中のミスマッチとして認識されないエラーを有する。従って、更に記載するように、ポリメラーゼ利用アセンブリを使用する場合、エラー減少手順実施前に一連の変性及びリアニールを行うことが望ましい。

10

【0133】

例えば、アセンブリPCRは、本発明の方法で利用できる。アセンブリPCRは、少なくとも1の核酸ストランドがポリメラーゼ(例えば、熱安定なポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ、VENT(商標)ポリメラーゼ(ニューイングランドBiolabs社)、TthIポリメラーゼ(Perkin-Elmer社)等)により鎖伸長可能な遊離3'-ヒドロキシルを有するように、アニール可能な相補的末端を有する少なくとも2個の核酸ストランドと組み合わせて、ポリメラーゼ-媒体鎖伸長を行う。オーバーラップするオリゴヌクレオチドは、dNTP、ポリメラーゼ及び緩衝剤を使用する標準的PCR反応中で混合される。オリゴヌクレオチドのオーバーラップする末端は、アニールにおいて、PCR反応中のポリメラーゼによる伸長用プライマーとして機能する二本鎖核酸配列の領域を形成する。より長い二本鎖核酸配列の形成用土台として機能する伸長反応の産物は、最終的に完全長目標配列の合成を生じる(参照、例えば、図3B)。PCR条件は、目標とする長いDNA配列の収率上昇のために最適化できる。

20

【0134】

例えば目標配列は、目的のポリヌクレオチド構造物を形成するために必要な全てのオーバーラップするオリゴヌクレオチドと共に混合されることにより単一のステップで得られる。あるいは、一連のPCR反応は、並列又は連続して実施されてもよく、その場合より大きなポリヌクレオチド構造物が、その産物は混合され、第2の一連のPCRへかけられる一連の分離されたPCR反応からアセンブルされる。更に、自己プライミングPCRで完全サイズ産物を単一の反応から生じることができない場合にアセンブリは、オーバーラップするオリゴヌクレオチド対若しくは目標核酸配列のより小さな部位の分離PCR-増幅により、又は従来の埋め込み(filling-in)及びライゲーション法により修正される。

30

【0135】

アセンブリPCRの実施方法は、例えばKodumalら(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:15573; Stemmerら(1995)Gene164:49; Dillonら(1990)Biotechnology 9:298; Hayashiら(1994)Biotechnology 17:310; Chenら(1994)J.Am.Chem.Soc.116:8799; Prodromouら(1992)ProteinEng.5:827; 米国特許第5928905及び5834252; 及び米国特許出願公開2003/0068643及び2003/0186226に記載されている。

【0136】

本発明の例示では、ポリメラーゼアセンブリ複合化(PAM)が、本発明の方法でポリヌクレオチド構造物のアセンブルに使用できる(参照:例えばTianら(2004)Nature432:1050; Zhouら(2004)Nucleic Acids Res.32:5409; 及びRichmondら(2004)Nucleic Acids Res.32:5011)。ポリメラーゼアセンブリ複合化は、オーバーラップするオリゴヌクレオチド及び/又は増幅プライマーのセットを、ハイブリダイズストランドテンプレートとして使用して、ポリメラーゼによる配列特異的ハイブリダイゼーション及び鎖伸長を行うために適している条件下で混合するステップを含む。二本鎖伸長産物は、任意で変性され、更に一連のアセンブリに使用されて目的のポリヌクレオチド構造物が合成される。

40

【0137】

様々な態様において、本発明の方法におけるポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法は、例えば生成したデュプレックスのライゲーション(参照:例えばScarpullaら、Anal.B

50

iochem.121:356-365(1982); Guptaら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA60:1338-1344(1968))、FokI法(参照:例えばMandecki及びBolling、Gene68:101-107(1988))、デュアル非対称PCR法(DA-PCR)(参照:例えばStemmerら、Gene164:49-53(1995); Sandhuら、Biotechnology 12:14-16(1992); Smithら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA100:15440-15445(2003))、オーバーラップ伸長PCR(OE-PCR)法(参照:例えばMehta及びSingh、Biotechnology 26:1082-1086(1999))、DA-PCR/OE-PCRコンビネーション(参照:例えばYoung及びDong、Nucleic Acids Res.32:e59(2004))を含む。

【0138】

又別の例では、コンビナトリアルアセンブリ法がポリヌクレオチド構造物のアセンブリに使用される(参照:例えば米国特許第6670127、6521427及び6521427)。簡単に言うと、オリゴヌクレオチドは温度依存スローアニリングにより一緒に共アニールされ、それぞれのステップで新しいオリゴヌクレオチドを添加するライゲーション連鎖反応の複数のステップがそれに続く。鎖中の第1のオリゴヌクレオチドは、サポートへ結合される。反対側のストランドからの第2のオーバーラップするオリゴヌクレオチドが添加され、アニールされ、ライゲートされる。第3のオーバーラップするオリゴヌクレオチドが添加され、アニールされてライゲートされ、これが次々と続く。この手順は、目的の全てのオリゴヌクレオチドがアニールされ、ライゲートされるまで繰り返される(replicated)。この手順は、自動化機器を使用して長い配列を得るために行われてもよい。二本鎖核酸配列は次に、固体サポートから除去される。

【0139】

例えば、アセンブリは細胞中のアセンブルされた産物の機能的選択により促進される。例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、1以上の上記PCR型アセンブリ方法を使用してサブアセンブリへアセンブルされる。サブアセンブリは次に、更に選択によるライゲーション(LBS)を使用して更にアセンブリを促進するベクターへとクローンされる(参照:例えばKodumalら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA101:15573-15578(2004))。サブアセンブリは、標準的組み換え型技術を使用して(例えば、制限酵素消化それに続きライゲーション)又はウラシルDNAグルコシダーゼ/ライゲーション独立クローニングを使用して(UDG/LICクローニング)(参照:例えばRashtchian、ら、Anal.Biochem.206:91-97(1992); Chambersら、Nat.Biotechnol.21:1088-1092(2003); Smithら「PCR法の応用」2:328-332(1993); 及びKodumalら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA101:15573-15578(2004))一組のユニーク選択的マーカーを有するベクターへとクローンされる。ユニークな選択マーカーセットを有する異なるベクター中の2個のサブアセンブリは、次に一組の制限酵素で切断され、一緒に混合され、ライゲートされる。サブアセンブリの目的産物への適切な結合は、産物を細胞へ形質転換し、目的産物と結合しているマーカーの特異的な組み合わせを選択することにより、選択される。これらの産物は、次に任意でLBSにより更に一連のアセンブリ処理される。これらLBS技術は、高い処理量で、並列的に行われ、長い核酸の有効なアセンブリを可能とする。更に、LBSのサブアセンブリ又は産物は、制限エンドヌクレアーゼ切断、ライゲーション、細胞への形質転換及び増殖選択ステップを含む従来の組み換え型クローニング技術を使用して更にアセンブルされる(参照:例えばKodumalら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA101:15573-15578(2004))。

【0140】

他の例として、長いポリヌクレオチド構造物の合成は、相同な再結合、部位特異的再結合(例えばウィルス性インテグラーゼを使用する)、又は転位を使用して実施される。例えば、2以上の核酸配列の末端は、核酸の結合を促進するように特異的に設計された配列を含むように設計される。これら再結合プロセスは、in vitro又はin vivoで実施できる(例えば宿主細胞中)。

【0141】

例えば、階層化されたアセンブリ法が本発明の方法で使用できる。階層化されたアセンブリ法として、段階的又はステップワイズ様式でアセンブリを制御するための、反応混合物の様々な成分を制御しながら混合する様々な方法が挙げられる(参照:例えば米国特許

第6586211；米国特許出願公開2004/0166567；国際公開W002/095073；Zhouら(2004)Nucleic Acids Res.32：5409)。例えば、複数のアセンブリ反応が、分離されたプール中で実施される。これらアセンブリからの産物は、次に一緒に混合されてより大きなアセンブルされた産物等を形成する。あるいは、階層化されたアセンブリ法は、混合物中の反応性物質を変化させることにより外部からの制御が可能とするような単一の反応混合物を含む。例えば光不安定なリンカーを通して固体サポートへ結合されたオリゴヌクレオチドは、高度に特異的で制御された様式でサポートから放出されるため、アセンブリの配列を促進するために使用できる(例えば、オリゴヌクレオチドは、制御された様式で固体サポート上の特定される単一の位置から除去される)。第1の構造体オリゴヌクレオチドのセットは、サポートから放出されアセンブリされる。次に第2の構造体オリゴヌクレオチドのセットがサポートから放出されアセンブルされ、以下同様である。例えば、構造体オリゴヌクレオチドの正鎖及び負鎖は、異なる位置上又は異なるサポート上に合成される。正鎖及び負鎖は次に、チップから分離されたプールへ放出され、制御された様式で混合される。又別の例では、階層化されたアセンブリは、固体サポート上の構造体オリゴヌクレオチドの近接により制御される。例えば、相補的領域を有する2個の構造体オリゴヌクレオチドが互いに非常に近接して合成されてもよい。固体サポートからの放出に際して、互いに非常に近接して位置したオリゴヌクレオチドは、好ましくはオリゴヌクレオチドのより高い局部的濃度のせいで相互作用する。本発明の例示では、2以上の構造体オリゴヌクレオチドは固体サポート上の同一の位置で合成され、そのためそれらの相互作用は促進される(参照：例えば米国特許出願公開2004/0101894)。本発明の別の例では、マイクロ流体系が反応混合物を制御し、アセンブリプロセスを促進するために使用される。例えば、オリゴヌクレオチドはフローセル含有チャンネル中で合成され、そのチャンネルではアレイのフィーチャ(ユニット)は互いに物理的に分離された直線列に並べられ、その結果、流体が流れる直線状チャンネルを分離する。所定のチャンネル中のオリゴヌクレオチドは、同一のチャンネル中の他のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズ又は相互作用するが、他のチャンネルからのオリゴヌクレオチドへ曝されない。隣接するオリゴヌクレオチド配列が同一チャンネル内で合成された場合、それらはアレイからの切断後に互いにハイブリダイズして「サブアセンブリ」を形成できる。様々なサブアセンブリは次に他のサブアセンブリと接触してより大きな核酸配列へハイブリダイズする。リガーゼ及び／又はポリメラーゼが、核酸配列中のギャップ埋め込み及び／又はギャップ結合の必要に応じて添加される。

【0142】

本発明の別の例では、階層化されたアセンブリが制限エンドヌクレアーゼを使用して実施され、目的の順序で一緒に結合される相補末端を形成する。構造体オリゴヌクレオチドは、特定の順序での結合を促進する部位に、1以上の制限エンドヌクレアーゼが認識及び切断部位を有するように設計され合成される。DNAデュプレックス形成後、オリゴヌクレオチドのプールは1以上の制限エンドヌクレアーゼと接触し、相補末端を形成する。プールは次にハイブリダイゼーション条件及びライゲーション条件へ曝されて、デュプレックスと一緒に結合する。結合の順番は、相補的相補末端のハイブリダイゼーションにより決定される。制限エンドヌクレアーゼは、一度に1のみのサブセットの相補末端が形成するように時差を設けて添加される。次にこれら末端は互いに結合され、続いて別の一連のエンドヌクレアーゼ消化、ハイブリダイゼーション、ライゲーションが次々と続く。本発明の例示では、タイプIISエンドヌクレアーゼ認識部位が構造体オリゴヌクレオチドの末端へ組み込まれ、タイプIIS制限エンドヌクレアーゼによる切断を可能とする。

【0143】

6. 相同な配列の複合アセンブリ及び自己相同性領域を有する配列のアセンブリ：

ポリメラーゼアセンブリ複合化(PAM)を実施する場合、相同なオリゴヌクレオチドは完全長産物混合物へ導くクロスオーバー点として作用する可能性がある(図11及び12)。用途に応じて、これは目的産物のみを得るための追加的分離ステップを必要とする多様性又は複雑性の有用な源となり得る。本発明者らは、クロスオーバー産物の混合物からの目的の配列の選択的分離を達成する2種の方法を見いだした：(1)中間体環化物による選択及び(

2) サイズによる選択。両者は、1以上の内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物のPAMへ適用できる。

【0144】

PAM(Tianら、Nature432:1050-1054(2004))中では、オリゴヌクレオチド出発材料がアセンブルされてポリヌクレオチド構造物を形成する順番は、オリゴヌクレオチド相互の5'及び3'相補性により特定される(Mullisら、Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.51pt1:263-273)。それぞれのオリゴの末端は、他の1のオリゴ(フリー末端を有する最終遺伝子の末端にあるオリゴヌクレオチドを除く)と厳密にアニールできる。このアニール特異性は、目的の完全長遺伝子配列のみがアセンブルされることを保証する。

【0145】

遺伝子中の高い相同性の十分に長い領域が複合された形式で合成される場合はしかし、この特異性は失われる場合がある。例えば高度に相同な(orevenidentical)領域Xを1のプール中に含む2以上のポリヌクレオチド構造物を合成しようとする場合、共通の相同な領域は、目的のポリヌクレオチド構造物に加えて様々なアセンブルされた産物を生じる(参照図11)。この状態は、相同な領域Xが構造体オリゴヌクレオチドと少なくとも同じ長さの場合に生じる。これは例えば、非常に類似する蛋白質変異体をエンコードするポリヌクレオチド構造物又は共通のドメインを有する蛋白質を合成する際に生じる。例えば、図11中に示されるように、A、B、C、D、E、F、G、H及びXは非相同な構造体オリゴヌクレオチドを表す。設計により、Xの5'末端はC及びGの両方とハイブリダイズでき、Xの3'末端はD及びHの両方とハイブリダイズできる。これは2種のオリゴヌクレオチドセットは互いに接

10

20

【0146】

内部の相同な領域(例えば、同じ配列中に含まれる高度に相同な又は同一の2つの領域)は、それらがPAM中で重合を起こす可能性があるために特別なケースである。図12中に示されるように、AXBXC核酸のアセンブリ(上部ストランドのみで表される)は、AX(BX)_nC(nは負ではない整数)で表される産物のファミリーを生じる。このアセンブリにより生成できる産物の数は理論的に無限である。

30

【0147】

例えば、この種のコンビナトリアル複雑性(complexity)を生じることが好ましい。例えばPAMのこのクロスオーバー形態は、直ちに消費されて容易に大きなコンビナトリアルライブラリーを生じ、それは蛋白質設計のためのドメイン再編成、RNAi分子ライブラリーの形成、アプタマーライブラリーの形成、Fabポリペプチドライブラリーの形成等の用途へ使用できる。

【0148】

他の例として、コンビナトリアル複雑性を最小化又は除去して、特定された一組の相同な配列のみを合成することが望ましい。これは相同な領域を有する遺伝子を分離的に(クロスオーバーを防止する)合成することにより達成され、例えば分離されたプールを使用して、順番に一緒に混合してクロスオーバー産物を防止する。あるいは、相同な領域を有する種々の遺伝子は1のプール中に合成され、目的とされない産物は下記記載の分離技術を使用して除去される。

40

【0149】

例えば、目的とされないクロスオーバー産物は合成遺伝子の混合物から環形選択方法を使用して除去される。環形選択方法の一例は図13中に図示される。環形選択方法は、環状一本鎖DNA又は二本鎖DNAはエキソヌクレアーゼ耐性である事実を利用する。図13Aは、1のプール中に構築されることを目的とする2つのポリヌクレオチド構造物(図中の目的一本鎖として表される)を示す。図13B中に示されるように、末端構造体オリゴヌクレオチド

50

は、一本鎖オーバーハングを形成するように設計され(構造体オリゴヌクレオチドが適切なリンカー配列を含む様に設計することにより任意で形成される)、正確なポリヌクレオチド構造物産物を環化することが可能になる。例えば、相補的A/Cオリゴヌクレオチドは、相補的オリゴヌクレオチドB/D(波線で表される)により形成された一本鎖オーバーハングに相補的であるが、F/Hオリゴ対(点線で表される)により形成された一本鎖オーバーハングに相補的でない、一本鎖オーバーハングを形成し、その他も同様である。従って正確な産物のみが環化する一方、不適当なクロスオーバー産物(例えば、B-AXF-E及びF-EXB-A)は直鎖状のまま残り、エキソヌクレアーゼにより劣化するが環状産物は保存される(図13D-F)。フランキング領域及び環化セグメントはアセンブルされ、次に相同なリンカーXが混合物へ添加される。目的の配列は次に環を形成する(図13D及び13E)、一方クロスオーバー産物は直鎖状配列を形成する(図13F)。これらクロスオーバー産物は、エキソヌクレアーゼを使用して選択的に劣化させられる。次に適切な酵素(例えば、制限酵素又はウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG))が環を直鎖状にするため及び／又は環状セグメント(リンカー)を除去するために添加され、例えばAXB及びEXF(上部ストランドのみで表される)等の目的産物のみを残す。図13D及び13E中に示されるように、環状産物は部分的に二本鎖であるか(図13D)、完全に二本鎖である(図13E)。ポリメラーゼ及びdNTPを使用して、部分的に二本鎖の環を完全二本鎖環へ変換することも可能である。

10

【0150】

環形選択方法の別の例は図14中に図示される。図14Aは、1のプール中に合成されることを目的とされるポリヌクレオチド構造物を示す。図14Bは、ポリヌクレオチド構造物を特定する構造体オリゴヌクレオチドを示す。同一のストランド上の5'及び3'最末端構造体オリゴヌクレオチドは、適切な順序でアセンブルされるたポリヌクレオチド構造物(例えば、波線で表されるオリゴヌクレオチドA及びB、及び点線で表されるオリゴヌクレオチドE及びF)の環化を可能とするフランキング配列を含む。ポリヌクレオチド構造物のプールをハイブリダイゼーション条件へ曝した後、末端構造体オリゴヌクレオチドのフランキング配列に相補的な直鎖状配列が添加される。例えば、図14C及び14D中に示されるように、アダプターYYは(例えば、相補的Y'領域へ結合することにより)AXB構造物の環化を可能とし、ZZアダプターは(例えば、相補的Z'領域へ結合することにより)EXF構造物の環化を可能とする。しかし、不適当なクロスオーバー産物(例えば、B-AXF-E及びF-EXB-A)はY'及びZ'相補的領域の組み合わせを有するために、YY又はZZアダプターオリゴヌクレオチドへ曝されても環化しない。アセンブルされた構造物は、次にライゲートされて共有的に閉環した、部分的に一本鎖環及び不適当な直鎖状クロスオーバー産物を形成する(図14E)。構造物は次に変性され、直鎖状核酸ストランドから環を分離するプロセスで処理される(図14E-14F)。これは、例えばサイズ分離方法(例えば、環は直鎖状産物よりも速くPAGEゲルを通過する)を使用して又は、環は保存しつつ直鎖状ストランドを消化する一本鎖エキソヌクレアーゼを使用して達成される。正確なアセンブリ産物は次に、AXB及びEXF産物へフランキングする領域へ結合するプライマーを使用して環状産物の適切な領域を増幅することにより生成される(図14G)。アダプターオリゴヌクレオチドは、単に表示する目的でYY及びZZで表されている。アダプターオリゴヌクレオチドは、適切な対の構造体オリゴヌクレオチドに相補的ないずれの組み合わせ配列でもよい(例えば、5'構造体オリゴヌクレオチド領域に相補的な配列は、3'構造体オリゴヌクレオチド領域に相補的な配列と同じ必要はない)。

20

30

40

【0151】

又別の例では、目的とされないクロスオーバー産物は、図15及び16中に図示されるサイズ選択方法を使用して合成ポリヌクレオチド構造物の混合物から除去されてもよい。サイズ選択方法は、二本鎖DNAの移動性はそのサイズの機能である事実を利用し、その結果異なる長さのDNAは、例えばゲル又はカラムクロマトグラフィーを通して分離される。この例では、最初のポリヌクレオチド構造物は、目的産物が全てのクロスオーバー産物とは異なる長さを有するように設計される(参照、例えば図15A及び16A)。又、例えばオリゴヌクレオチドは、全ての目的産物はほとんど同一のサイズであり、いずれのクロスオーバー産

50

物も非常に異なるサイズを有するように設計される。これは、構造体オリゴヌクレオチドをクロスオーバー点がそれぞれの目標配列内の異なる位置にあるように設計することにより達成される。例えば図15中に図示されるように、目的の配列がAXB、CXD、及びEXFであり、A、B、C、C、E、F、及びXは全てほとんど同一の長さである場合、配列は「パッド」されて(例えば、破線で表される過剰の塩基又は一連の塩基の添加)(図15B)、同一の長さを有する目的産物、例えば--AXB、-CXD-、及びEXF--、及び、異なる長さを有する目的とされないクロスオーバー産物、例えば--AXF--、--AXD-、-CXF--、-CXB、EXD-、又はEXBを生じもよい(図15C)。ポリヌクレオチド構造物が複雑な様式でアセンブルされ、目的産物がサイズ選択によりクロスオーバー産物から分離されてもよい。パディングユニットは、次に制限酵素又はUDGを使用して除去できる。例えばサイズ選択技術は、単に構造体オリゴヌクレオチドを注意深く設計するだけで、オリゴヌクレオチドをパディングすることなしに達成でき、例えばA、B、C、D、E、F、及びXは本来異なるサイズであるから、正確な産物と不適当な産物間の差異の認識を可能とする。

【0152】

産物を識別するために必要な長さの相違の程度は、使用される分離方法に基づき決定できる。例えばサイズ分離がゲル電気泳動により行われる場合であれば、完全な核酸配列の約+/-5-10%の分離性能及びサイズ差異(differential)が通常である。

【0153】

又別の例では、公知のマーカーを有するDNAの内部領域が選択的に切除された場合、単一のサイズ選択が1以上の相同性領域を有する配列に対して使用できる。この例は図16中に図示され、産物AXBYC及びDXEYFは、例えば図16Bに示される構造体オリゴヌクレオチドを使用して-AXBYC-及びDXE--YF(図16A)として、1のプール中に合成される。8個の可能な産物のものとして(図16C)、2個の目的産物はそれぞれ2ユニットのパディング(“ ”)を含む一方、X又はY位の6クロスオーバー産物は0、1、3、又は4個のパディングユニットいずれかを含む(図16C)。領域の内部のパディングは次に、例えば制限エンドヌクレアーゼ(例えばタイプIIS制限エンドヌクレアーゼ)を使用して切除される。フラグメントは次にハイブリダイゼーション条件及びライゲーション条件へ曝されて、修復され、パッドされていない構造物を形成する。

【0154】

又別の例では、複数の内部の相同な領域が存在する場合、分離されたアセンブリ及び分離ステップがそれぞれの相同な領域のために実施される。得られる遺伝子フラグメントはユニークであり、PAMを経由してアセンブルされる。これは相同な領域の数に応じて複雑性を減じることができる「リニア」法である。分子長さが増加すると、従来のエラー減少方法は非常に面倒で高価になる。下記に大スケール遺伝子合成でのエラーを劇的に減少させるための手段を記載する。

【0155】

他の例として、相同な領域を有する配列の複合された合成は、構造体オリゴヌクレオチドの注意深い設計により達成される。例えば、構造体オリゴヌクレオチドはコドン再配置されて相同性レベルは減少するが、核酸によりエンコードされたポリペプチド配列は保持されるか最小限で変化する。更に2以上の構造体オリゴヌクレオチド間の相補性範囲は、注意深く選択されてハイブリダイゼーションの目的とされない領域中での相同性レベルが減少する(参照：例えば国際公開W000/43942)。オリゴヌクレオチド設計及びコドン再配置方法は、は、例えば商品名DNAワークス(supra)、商品名ジーン2オリゴ(supra)、又は更に下記記載の実施システム及び方法等のコンピュータ設計の助けを借りて容易化される。

【0156】

又別の例では、2以上の自己相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法が提供される。この方法は、自己相同性領域内で終了しない、例えば1以上の構造体オリゴヌクレオチドが1以上の自己相同性領域にまたがる構造体オリゴヌクレオチドを使用する。ポリヌクレオチド構造物が大きな(例えば、約100、200、500以上の塩基対を有する自己相同性領域)自己相同性領域を有する場合には、アセンブリ手順は分離されたプー

10

20

30

40

50

ル内でのポリヌクレオチド構造物の異なる部分のアセンブリを含む。例えば、第1の自己相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物の第1の部分はプールA中でアセンブルされ、第2の自己相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物の第2の部分はプールB中でアセンブルされる。第1及び第2の自己相同性領域は、互いに相同性を有するが、同一のプール内でアセンブルされるポリヌクレオチド構造物の他の部分との実質的な相同性は有さない。分離されたプール中でのポリヌクレオチド構造物の第1及び第2の部分のアセンブル後、プールは混合されて、例えばライゲーション、鎖伸長又はその組み合わせにより完全長産物を形成する。ポリヌクレオチド構造物がそのポリヌクレオチド構造物の一端又は両端に自己相同性領域を含む場合、非相同なフランキンク配列が配列末端へ追加され、構造体オリゴヌクレオチドが自己相同性領域内で終了しないように設計される。フランキンク配列は、構造体オリゴヌクレオチドの設計前にポリヌクレオチド構造物の一端又は両端上へ仮定的に追加されるか、ポリヌクレオチド構造物の末端に対応する1以上の構造体オリゴヌクレオチドの末端へ適切に追加される。本発明のプログラムを使用したコンピュータ補助設計は、所定のポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用のフランキンク配列の配列及び／又は位置を設計するために使用できる。例えばフランキンク配列は、例えば制限エンドヌクレアーゼを使用して、又は目的とする切断位置にあるウラシル残基を組み込み、ユーザー処理することにより、アセンブリ反応後に除去されてもよい。フランキンク配列は、例えば少なくとも約5、10、15、20、25、30、40、50ヌクレオチド長以上でもよい。

【0157】

又別の例では、2以上の自己相補的領域及び／又は1以上の内部相同性領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法が提供される(参照、例えば、図17及び18)。2以上の自己相補的領域を含む核酸配列は、二次及び／又は三次構造を有する構造へ折りたたまれる。自己相補的領域から生じる二次元及び／又は三次元構造は、一本鎖DNA配列、二本鎖DNA配列、部分的に二本鎖DNA配列、及び／又はそれによりエンコードされたRNA配列中に存在する。例示的な、二次及び／又は三次構造を有するDNA配列、又は二次及び／又は三次構造を有するRNAをエンコードするDNA配列であり、本発明の方法を使用してアセンブルされるものとして、例えば干渉ヘアピンRNA(hRNAi)をエンコードするDNA、リボザイムをエンコードするDNA配列、アプタマー(例えば、DNAアプタマー又はDNA配列によりエンコードされたRNAアプタマー)、リボレギュレータをエンコードするDNA配列(参照：例えばBayer及びSmolke, Nature Biotechnology 23:337-343(2005))、tRNAをエンコードするDNA配列、リボソームRNAをエンコードするDNA配列等が挙げられる。様々な公然と入手可能であるデータベースがDNA及びRNA配列の二次構造を予測及び／又は分析するために使用できる(参照：例えばwwwアドレスbioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi又はgenebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)。これらデータベースは、核酸的構造物が自己相補的領域を有するか否かを決定するために及び配列中の自己相補的領域を特定するために使用できる。

【0158】

自己相補的領域及び／又は領域の内部相同性を有する核酸のアセンブリに伴う問題は、ヘアピンRNA構造物に関して図17中に図示される。ヘアピンRNA構造物は、二次構造及び内部相同性の両方を有する核酸の便利な例として使用される。しかし、ヘアピンRNAをアセンブルするために記載された方法は、自己相補的領域及び／又は領域の内部相同性を有する他の核酸構造物へも同様に適用可能である。

【0159】

ヘアピンRNAをエンコードするDNA構造物のアセンブリに伴う様々な問題は、図17中に図示され、内部相同性領域を有する2以上の構造物への複合アセンブリ(図17D-17G)及び自己相補的領域を有するDNA構造物のアセンブリ(図17H-17K)に関係する問題を含む。生成されるべきヘアピンRNA構造物は図17に示される。図17Bは、図17Aに示されるRNA構造物をエンコードするDNA構造物の概略を示す。DNA構造物は、ヘアピン構造を形成するループ領域により分離されたセンス及びアンチセンス領域を含む。プライマー結合部位を有するバーコード領域は、アンチセンス領域の下流に位置する。制限酵素切断部位は、例えばセンス

-ループ-アンチセンス領域にフランキングする位置やバーコード領域の末端位置に存在する。プライマー結合部位は、バーコード領域の上流や、バーコード増幅用完全構造物又は完全ポリヌクレオチド構造物のそれぞれのの末端に位置する。ヘアピンRNAのライブラリーを構築する際に、1のプール中でヘアピンRNAをエンコードする2以上のDNA構造物を複合アセンブリするために考慮しなくてはならない種々の相同性の内部領域がある。例えば、ループ領域、バーコードの上流に位置するプライマー結合部位、及びアンチセンス領域及びバーコードプライマー結合部位間にある領域は、多くの又は全てのヘアピンRNAのライブラリーをエンコードするDNA構造物内で同一又は高度に類似である。図17Bでは一本鎖として表されているが、アセンブルされるDNA構造物が二本鎖であることは当然である。図17Cは、この領域中のDNAの両ストランドを示すセンス-ループ-アンチセンス領域の増大を示す。

10

【0160】

図17D-17Gは、ヘアピンRNAをエンコードする2以上のDNA構造物を1のプール中でアセンブルする場合の、不適切なクロスオーバー問題を示す(図11中に図示されるものと類似する)。図17Dは、1のプール中でアセンブルされる2個の異なるDNA構造物を示す。図17Eは、DNA構造物の複合アセンブリ用構造体オリゴヌクレオチドを示す(S及びASはそれぞれ上部ストランドのセンス及びアンチセンス領域を示し、S'及びAS'はそれぞれ下部ストランドのセンス及びアンチセンス領域を示す)。図17Fは、オリゴヌクレオチド混合物をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートして得られる、可能なデュプレックスを示す。この例ではループ領域は両方の構造物に共通するために、不適切なクロスオーバー産物が、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション中に生成する。鎖伸長及び／又はライゲーションにおいて、正確な及び不正確なクロスオーバー産物の混合物が生成する(図17G)。センス-ループ-アンチセンス領域が表示のために使用されているが、図17B中に図示される2以上の完全DNA構造物をアセンブルする場合には、更に複雑性が増すことが理解される。例えば、追加的クロスオーバー産物が、バーコードプライマー結合部位又はアンチセンス領域及びバーコードプライマー結合部位間の領域等の、他の共通領域中で終了するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションから生じる。

20

【0161】

図17H~17Kは、自己相補的領域を有するDNA構造物をアセンブルする際に生じる問題を示す。図17Hは、完全DNA構造物の一部分を形成するセンス-ループ-アンチセンス領域を示す。図17Iは、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用の構造体オリゴヌクレオチドを示す。図17Jは、ハイブリダイゼーション条件下でのオリゴヌクレオチドプールのインキュベーションにおいて形成される可能なデュプレックスを示す。パネルJの左に、目的のデュプレックスが形成される。中央の産物及び右の産物は、自己相補的領域(例えば、センス及びアンチセンス領域)間のハイブリダイゼーションによる単一のオリゴヌクレオチド内のヘアピン形成問題を示す。ヘアピン産物は、構造体オリゴヌクレオチドをくくりつけ、目的のアセンブリ反応に参加してそれらを阻害することによりポリメラーゼアセンブリを妨害する。

30

【0162】

図18は、内部相同性領域及び／又は自己相補的領域を有するDNA構造物のアセンブル方法を示す。上記のように、図18Aは二次構造及び内部相同性の両方を有する核酸の便利な例としてヘアピンRNA構造物を示す。図18Bは、ヘアピンRNAをエンコードする二本鎖DNA構造物の概略図である。簡便性を目的として、図18B中のDNA構造物は、一本鎖のみで表されるが、構築される産物は二本鎖であることは当然である。図18Bも又、DNA構造物をアセンブルするために使用される構造体オリゴヌクレオチドの概略図を示す(1~5のラベル付けされている)。DNA構造物を約50塩基対長のオーバーラップするオリゴヌクレオチドへ単純に分割するよりも、オリゴヌクレオチドは内部相同性領域及び自己相補的領域に関係する問題を避けるために設計される。

40

【0163】

第一に、オリゴヌクレオチドはいずれのオリゴヌクレオチドも相同性領域中で終了しな

50

いように設計される。これは、図18B中のオリゴヌクレオチド1〜3により示される。例えば、オリゴヌクレオチド1及び2は、それぞれのオリゴヌクレオチドがループ領域にまたがり、アセンブルされる構造物のユニークセンス又はアンチセンス部分中で終了するように設計される。同様に、オリゴヌクレオチド3は、それがアンチセンス領域及びバーコード領域間の共通領域に完全にまたがるように設計される。これは、図17F〜17G中に示されるように、不適切なクロスオーバー産物の形成を防止する。簡便性を目的として、図18B中に示されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチドとして表されるが、オリゴヌクレオチドは一本鎖又は二本鎖であることは当然である。例えば、オリゴヌクレオチドは一本鎖リバース相補物として合成され、アセンブリ反応中で直接使用される。あるいは、オリゴヌクレオチドはアセンブリ反応中での使用前に増幅され、二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する。例えば、図18B中のオリゴヌクレオチド1〜5は、化学的又は酵素的切断により除去可能ないずれかの末端のプライマー結合部位を有するように合成される(例えば、更に本明細書に記載されるように、タイプIISエンドヌクレアーゼ、又はユーザー等の処理で除去可能である)。使用前にオリゴヌクレオチドを増幅する場合、オーバーラップするオリゴヌクレオチドのリバース相補物を合成することは、それらが増幅プロセス中に形成されるために必要ではない。本発明の例示では、それぞれのオリゴヌクレオチドは同一のプライマー結合部位又はユニバーサルプライマーにより、完全プールがただ一組のプライマーで増幅されるようにフランキングされる。

【0164】

第二に、オリゴヌクレオチドは、単一のオリゴヌクレオチド中の自己相補的領域(例えば、オリゴヌクレオチド1及び2内のセンス及びアンチセンス領域)が、ポリヌクレオチド構造物を形成するアセンブリ用の2個の相補的オリゴヌクレオチド間に形成されるデュプレックスの融点より低い融点を有するように設計される。例えば、オリゴヌクレオチド1中に含まれるセンス領域に相補的な、オリゴヌクレオチド1中に含まれるアンチセンス領域の部分は、オリゴヌクレオチド1及び2間に形成されるデュプレックスの融点よりも低い融点を有する。融点は、単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域のGC含量及び／又は長さを、アセンブリ反応内の2個のオリゴヌクレオチド間の相補的にオーバーラップする領域と比較して、変化させることにより調整される。本発明の例示では、単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域には、約10、9、8、7、6、5、4、又は3未満の相補的塩基対が含まれる。例えば図18B中のオリゴヌクレオチド1に関して、オリゴヌクレオチド1中に含まれるアンチセンスストランドの部分は、センスストランドに相補的な約3〜10塩基対又は約5未満の塩基対を含む。更に2個の構造体オリゴヌクレオチド間の相補的にオーバーラップする領域は、少なくとも約12〜30塩基対、少なくとも約12〜25塩基対、少なくとも約15〜20塩基対、又は少なくとも約15塩基対である。例えば、図18B中のオリゴヌクレオチド1及び2に関して、オリゴヌクレオチド間でオーバーラップする相補的領域は少なくとも約12〜30塩基対、又は少なくとも約15塩基対を含む。アセンブリ反応は次に、単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間のデュプレックス形成よりも、2個の構造体オリゴヌクレオチド間の相補的でオーバーラップする領域間でのデュプレックス形成が生じやすい温度で行われる。例えば、図18Bに関して、アセンブリ反応は、それぞれのオリゴヌクレオチド1及び2個々内でのセンス及びアンチセンス領域間のデュプレックス形成よりも、オリゴヌクレオチド1及び2のオーバーラップする領域間でのデュプレックス形成が生じやすい温度で行われる。これは、アセンブリ反応の塩濃度及び／又は温度を目的のデュプレックス形成が起こるように変化させることにより達成される。例えば、アセンブリ反応は自己相補的デュプレックスの融点又はその近傍である(例えば T_m で、又は $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ 、 $T_m \pm 3^\circ\text{C}$ 、 $T_m \pm 2^\circ\text{C}$ 若しくは $T_m \pm 1^\circ\text{C}$ で)が、2個の構造体オリゴヌクレオチド間のデュプレックスの融点よりは低い(例えば $T_m - 10^\circ\text{C}$ 、 $T_m - 8^\circ\text{C}$ 、 $T_m - 5^\circ\text{C}$ 、 $T_m - 3^\circ\text{C}$ 、又は $T_m - 2^\circ\text{C}$)温度で行われる。本発明の例示では、アセンブリ反応は、自己相補的デュプレックスの融点の約 5°C 上で、2個の構造体オリゴヌクレオチド間のデュプレックスの融点の少なくとも約 5°C 下の温度で行われる。複合アセンブリを実施する場合、又は複数の自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物をアセンブルする場合、同一のプール内で混合される

それぞれのオリゴヌクレオチドは、所定の一組の条件下で適切なアセンブリを行うのに好ましいように最適化された配列である(例えば、オリゴヌクレオチドの長さ及び／又はGC含量を変化させることにより)。

【0165】

例えば、融点の最適化は、1のプール中で一緒に使用される構造体オリゴヌクレオチドの融点を計算することにより達成される。好ましくは、最も低い正確な融点(例えば、2個の構造体オリゴヌクレオチド間のデュプレックスの融点)は、最も高い不適当な融点(例えば、自己相補的デュプレックスの融点)よりも高い。融点ギャップの大きさ(例えば、最も低い正確な融点及び最も高い不適当な融点間)は、ハイブリダイゼーション条件に関係し、より狭いギャップは、目的のレベルの忠実度を提供する再アセンブリステップ中のより緊縮なハイブリダイゼーション条件を必要とする。従って、温度ギャップは最小値を持たない。又別の例では、融点の最適化は、ハイブリダイゼーション傾向に関する他のパラメーター又は測定値を使用して実施され、これらは例えば自由エネルギー、ギブスの自由エネルギー、エンタルピー、エントロピー又はこれらパラメーターの他の演算的若しくは代数的組み合わせ又は測定値であり、融点と同一の効果を達成するものである。実際、融点自身も、これらパラメーター又は測定値の演算的又は代数的組み合わせの一つである。従って、ある場合には、融点の最適化は、ポリヌクレオチド構造物のハイブリダイゼーション傾向、例えば、自由エネルギー、ギブス自由エネルギー、エンタルピー、エントロピー、及び演算的又は代数的それらの組み合わせに関するパラメーターの計算により達成される。

【0166】

本発明の例示では、本発明はヘアピンRNAのライブラリーをエンコードする多数のポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法を提供する。ヘアピンRNAをエンコードするDNA構造物は、上記記載の通り図18B中に図示される。それぞれの構造物は、DNA構造物の配列を共に特定する少なくとも5個のオリゴヌクレオチドを使用してアセンブルされる。オリゴヌクレオチドには内部相同性領域(例えば、1のプール中でアセンブルされる2以上の構造物に共通する領域)中で終了するものではなく、オリゴヌクレオチドは、単一のオリゴヌクレオチド内の自己相補的領域間で形成されるデュプレックスの融点が、2個の相補的、オーバーラップする、構造体オリゴヌクレオチド間に形成されるデュプレックスの融点より低くなるように、最適化される。例えば、アセンブリ反応は(1)センス領域にフランキン
グする領域、センス領域、ループ領域、及び約5塩基のアンチセンス領域にまたがるオリ
ゴヌクレオチド1、(2)約5塩基のセンス領域、ループ領域、及びアンチセンス領域にまた
がるオリゴヌクレオチド2、(3)約5塩基のアンチセンス領域、アンチセンス領域及びバー
コード領域間の領域、及び約5塩基のバーコード領域にまたがるオリゴヌクレオチド3(4)
バーコード領域にまたがるオリゴヌクレオチド4、及び(5)約5塩基のバーコード領域及び
バーコード領域にフランキン
グする領域にまたがるオリゴヌクレオチド5を含む(例えば、オリゴヌクレオチド1~5を示す概略図である図18B参照)。例えば、オリゴヌクレオチド1~5は、一組の除去可能な、ユニバーサルプライマーで合成され、アセンブリ前にオリゴ
ヌクレオチドのプールの増幅及びプライマー結合部位の除去(例えば、ユーザーで)が可能
となる。本発明の例示では、ヘアピンRNAをエンコードするDNA構造物は、アセンブルされ
た構造物の増幅を可能とする、それぞれの末端にある一対のプライマー結合部位で合成さ
れる。このようなプライマー結合部位は1のプール中でアセンブルされる多数の構造物し
(例えば、ユニバーサルプライマー)に共通し、ただ一組のプライマーでの完全プールの増
幅を可能とする。これらプライマーは、高い融点を有するため構造物の増幅を可能とし、
かつ増幅プロセス中で自己相補的領域間のデュプレックス形成からの妨害を最小化するよ
うに設計される。例えば、プライマー結合領域は、高いGC含量及び／又は少なくとも約30
~50ヌクレオチド長を有するように設計されて、より高い温度での構造物の増幅を可能と
する。

【0167】

本発明の例示では、少なくとも約10、50、100、200、500、1,000以上の、ヘアピンRNA

をエンコードするDNA構造物が1のプール中でアセンブルされる。例えば、ヘアピンRNAをエンコードするDNA構造物は、例えば制限エンドヌクレアーゼによる消化とそれに続く発現ベクターへのライゲーションによるアセンブリで発現ベクター中へ導入される。発現ベクターのライブラリーは、更に宿主細胞中に導入されてヘアピンRNA構造物の発現を可能とする条件下で任意でインキュベートされる。あるいは、ヘアピンRNA構造物は、*in vitro*転写システムを使用して発現され、任意で単離されて宿主細胞中へ導入される。

【0168】

本発明の例示では、それぞれのDNA構造物は、所定のバーコード配列を有するDNA構造物によりエンコードされるヘアピンRNAの同定を可能とするユニークバーコード配列を含む。複数の構造物用のバーコード配列は、共通のプライマー配列を使用して増幅される(例えば、塩基配列又はハイブリダイゼーション目的のため)。バーコード配列はDNA構造物中に存在するが、転写ではヘアピン産物中に含まれない。バーコード配列は、予め決定されて個々のヘアピンRNAと、個々のバーコード配列の配列の同定は、所定の構造物からエンコードされるヘアピンRNAの同一性(例えば、配列)を提供するようにマッチされる。

【0169】

7. エラー減少：

エラー認識用に対する相補的DNAストランドを使用する場合、対中のそれぞれのストランドは、一定の頻度でエラーを有するが、ストランドと一緒にアニールされる場合には、両ストランド上の関連する位置に生じるエラー可能性は非常に小さく、相関関係が正確にマッチしたワトソン-クリック塩基対(例えばA-T、G-C)を生じる確率は更に小さい。例えば、50マーオリゴヌクレオチドのプール中で、1塩基当たりのエラー割合1%であると、約60%のプール(0.9950)は正確な配列を有し、残りの40%は1以上のエラーを(主にオリゴヌクレオチド当たり1エラー)ランダム位置に有する。同一のことが相補的50マーから構成されるプールにも言える。2個のプールのアニール後、約36%(0.62)のDNAデュプレックスは両ストランド上に正確な配列を有し、48%($2 \times 0.4 \times 0.6$)は1のストランド上で1のエラーを有し、16%(0.42)は両ストランド上で複数のエラーを有する。この後者のカテゴリーで、同一の位置にエラーがある確率はたったの2%(1/50)であり、これらエラーがワトソン-クリック塩基対を形成する確率は更に低い($1/3 \times 1/50$)。これら関連付けられたミスマッチは、検出されずに、DNAデュプレックスの合計プールの0.11%含まれる($16 \times 1/3 \times 1/50$)。全ての検出可能なミスマッチ含有配列の除去は、従ってエラーフリー配列用プールを約200倍(処理前の一本鎖の0.6/0.4対ミスマッチ検出及び除去後の0.36/0.0011)で富化する(即ち、エラー含有配列割合の減少)。更に、残存オリゴヌクレオチドは次に解離され、再アニールされ、エラー含有ストランドをプール中の異なる相補鎖の相手方とし、異なるミスマッチデュプレックスを生じる。これらは又、上記のように検出され、除去され、エラーフリーデュプレックスを更に富化できる。このプロセスの複数のサイクルは、原則的にエラーを検出不能なレベルまで減少させることができる。エラーコントロールのそれぞれのサイクルは又、エラーフリー配列の幾つかを除去する(それと同時にエラーフリー配列のプールを富化する)ので、エラー制御及びDNA増幅のサイクルの変更は分子の大きなプールを維持するために使用できる。

【0170】

例えば、検出された及び修復されたエラー数は、エラー減少プロセス前にDNAデュプレックスのプールを融解、リアニールすることにより増加する。例えば、目的のDNAデュプレックスがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の技術により増幅される場合、新しい(完全な)相補鎖の合成は、これらエラーがDNAミスマッチとして直ぐに検出できないことを意味する。しかし、これらデュプレックスを融解し、ストランドを新しく(ランダムな)相補的相手方と再結合させることは、ほとんどのエラーがミスマッチとして明らかなデュプレックスを生じる(図8)。

【0171】

多くのエラー減少方法は、アセンブリプロセス中で多くの点において一緒に使用できる。例えば、エラー減少は、構造体オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び/又は最終

ポリヌクレオチド構造物へ適用できる。本発明の例示では、選択的ハイブリダイゼーションによるエラーフィルトレーション捕集は、構造物オリゴヌクレオチドに適用され、1以上のエラーフィルトレーション、エラーニュートラル化、及び／又はエラー修復プロセスはサイズが約500～約10000塩基のサブアセンブリ/ポリヌクレオチド構造物に適用され、及びエラー修復プロセスは約10000塩基以上サブアセンブリ/ポリヌクレオチド構造物に適用される。

【0172】

例えば、本発明は、1以上の選択オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを経由してエラーを含む核酸コピーを除去することにより核酸プールの忠実度を増加する方法を提供する。この種のエラーフィルトレーション捕集プロセスは、例えば構造物オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び場合により更に大きなポリヌクレオチド構造物等のどのアセンブリの段階のオリゴヌクレオチドに対しても行われる。更に、選択オリゴヌクレオチドを使用するエラーフィルトレーション捕集は、核酸のプールの増幅前及び／又は後で実施される。本発明の例示では、選択的オリゴヌクレオチドを使用するエラーフィルトレーション捕集は、増幅前及び／又は後の構造物オリゴヌクレオチドのプールの忠実度を増加するために使用される。選択オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを経由するエラーフィルトレーション捕集の具体例は図19に示される。構造物オリゴヌクレオチドのプールは、ユニバーサルプライマーを使用して増幅される。いくつかの構造物オリゴヌクレオチドは、ストランド中の1個の突出部分により示されるエラーを含む。これらエラーは構造物オリゴヌクレオチドの最初の合成から生じるか、増幅プロセス中に導入される。構造物オリゴヌクレオチドのプールは次に変性されて一本鎖を形成し、ハイブリダイゼーション条件下で少なくとも1の選択オリゴヌクレオチドのプールを接触する。選択オリゴヌクレオチドのプールは、プール中のそれぞれの構造物オリゴヌクレオチドに相補的な1以上の選択オリゴヌクレオチドを有する(例えば、選択オリゴヌクレオチドのプールは、構造物オリゴヌクレオチドのプールの大きさ以上であり、例えば場合により構造物オリゴヌクレオチドのプールと比較して2倍の数の異なるオリゴヌクレオチドを有する)。選択オリゴヌクレオチドと完全に対を作らない構造物オリゴヌクレオチドのコピー(例えば、ミスマッチがある場合)は、完全にマッチしたコピーと同様に緊密にはハイブリダイズせず、ハイブリダイゼーション条件の緊縮性を制御することによりプールから除去できる。ミスマッチを含むオリゴヌクレオチドの除去後に、完全にマッチした構造物オリゴヌクレオチドのコピーが緊縮性条件を上昇させてそれらを選択オリゴヌクレオチドから溶出させることにより除去される。本発明の例示では、選択オリゴヌクレオチドは、(例えば化学的結合、ビオチン/ストレプトアビジン等を通して)末端固定化されてエラーを有するオリゴヌクレオチドコピーの除去を促進する。例えば、選択オリゴヌクレオチドは、構造物オリゴヌクレオチドのプールへのハイブリダイゼーション前又は後に、ビーズ上に固定化される。ビーズは次にペレット化され、又はカラムへかけられ、次に異なる緊縮性条件へ曝されて、選択オリゴヌクレオチドによりミスマッチ含有構造物オリゴヌクレオチドのコピーを除去される。例えば、オリゴヌクレオチドを、反復的な一連の増幅ステップ及び選択オリゴヌクレオチドのプールへのハイブリダイゼーションによるエラーフィルトレーション捕集ステップにかけることにより、プール中のオリゴヌクレオチドのコピーの数を増加させ、その間にプールの忠実度は維持又は好ましくは増加することが望ましい(例えば、プール中のエラーフリーコピー数の増加)。

【0173】

例えば、構造物及び選択オリゴヌクレオチド間のミスマッチは選択オリゴヌクレオチド内の配列エラーから生じ、プールからエラーフリー構造物オリゴヌクレオチドを除去することに注目すべきである。しかし、最終的な効果ではやはり構造物オリゴヌクレオチドプールの忠実度が増加する。例えば、選択オリゴヌクレオチドプールの忠実度は、構造物オリゴヌクレオチドプールの忠実度における増加と同時に増加する。例えば、構造物のプール及び選択オリゴヌクレオチドプールのハイブリダイゼーション条件下での混合後、混合物はミスマッチした塩基対又はミスマッチした塩基対を含む核酸へのクロスリンクを有す

る核酸を切断する1以上の薬剤へ曝される(参照、例えば下記図20、22~25及び27)。このプロセスは、一緒にハイブリダイズされた場合に、1のミスマッチを有する混合物中の選択及び構造体オリゴヌクレオチドの両方のコピーを効果的に除去する。同一の選択オリゴヌクレオチドプールを使用して次に続く一連のフィルトレーション捕集において、このプールの忠実度は増加して、選択オリゴヌクレオチド中のエラーのおかげでプールから除去されるフリー構造体オリゴヌクレオチドのエラー数を減少させる。更に、ミスマッチした塩基対を含む核酸を切断する又は核酸ヘクロスリンクする薬剤の使用は、オリゴヌクレオチドのプールからのミスマッチしたコピーの除去を促進する(参照、例えば下記記載図24~29)。

【0174】

図20は、ミスマッチ結合薬剤を使用する配列エラーの例示的除去方法を示す。DNA一本鎖中の1のエラーは、DNAデュプレックス中の1のミスマッチを生じる。mutSの二量体等のミスマッチ結合蛋白質(MMBP)は、DNA上のこの部位へ結合する。図20A中に示されるように、DNAデュプレックスのプールはいくつかのミスマッチのデュプレックス(左)及びいくつかのエラーフリー(右)を含む。それぞれのDNAストランドの3'末端は、矢の先端により表される。1のミスマッチを生じる1のエラーは、上部左ストランド上の三角の出っ張りで見られる。図20B中に示されるように、ミスマッチ部位へ選択的に結合するMMBPが添加される。MMBPが結合したDNAデュプレックスは次に除去され、エラーフリーデュプレックスが劇的に富化したプールを残す(図20C)。例えば、DNAが結合した蛋白質は、エラーフリーコピーからのエラー含有DNAを分離する手段を提供する(図20D)。蛋白質-DNA複合体は、機能性化固体サポートに対する蛋白質の親和性により捕捉できる。上記機能性化として、例えば特異的抗体、固定化されたニッケルイオン(蛋白質はhis-tag融合として製造される)、ストレプトアビジン(蛋白質はビオチンの共有的添加により修飾される)又は蛋白質精製の分野に共通する他のこれら手段が挙げられる。あるいは、蛋白質-DNA複合体は、例えばサイズ排除カラムクロマトグラフィーを使用して移動性の相違により又は電気泳動により、エラー遊離DNA配列のプールから分離される(図20E)。この例では、ゲル中の電気泳動移動性は、MMBP結合で変更され：MMBP無しでは全デュプレックスと一緒に移動するが、MMBPの存在下でミスマッチデュプレックスは遅くなる(上部バンド)。ミスマッチフリーバンド(下部)は次に切除されて抽出される。本発明の例示では、mutS結合二本鎖DNAは非結合のもの(例えば、エラーフリー二本鎖DNA)から、反応混合物からmutS結合DNAセグメントを結合して除去するニトロセルロースフィルターを使用して分離される。

【0175】

本発明の例示では、本発明の方法はamutSポリペプチドとATPの存在下で核酸デュプレックスのプールと接触するステップを含むエラーフィルトレーション捕集を使用する(参照：例えばJunopら、Mol.Cell7:1-12(2001)；Schofieldら、J.Biol.Chem.276:28291-28299(2001)；及びLamersら、J.Biol.Chem.279:43879-43885(2004))。ATPはmutSのミスマッチしたDNAストランドに対する親和性を増加させ、混合物からのミスマッチデュプレックスの除去を促進する。例えば、ATPはmutSと比較して約1~100倍、1~10倍、又は2~5モル過剰で反応へ添加される。本発明の例示では、反応中に含まれるATPの量は、ミスマッチを含むデュプレックスのためのmutS蛋白質への親和性及び／又は選択性を増加させるために十分なものである。ATPは、例えば約50nm未満、20nm、10nm、5nm、1nm以下までの低いナノモル範囲のミスマッチを含むデュプレックスのためのmutS蛋白質への親和性を増加させる。例えば、エラー修復プロセスの実施に必要なmutSの量は、ATPを反応へ添加することにより非常に減少する。例えば、ATPの存在下で、エラー修復プロセスの実施に必要なmutSの量は、少なくとも2倍、5倍、10倍、100倍以上減少する。ミスマッチデュプレックスは、上記方法(例えば、ゲル電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等)を使用してオリゴヌクレオチドのプールから除去される。

【0176】

別の例示的な例では、DNAグリコシラーゼがエラーフィルトレーション捕集プロセス中のミスマッチ結合薬剤として使用される。例示的なDNAグリコシラーゼとして、例えば、T

10

20

30

40

50

/Gミスマッチを認識するチミンDNAグリコシラーゼ(例えば、GenBank寄託番号AF117602)、ミスマッチを認識するが低い触媒活性を有する突然変異体チミンDNAグリコシラーゼ(参照：例えば米国特許出願公開2004/0014083及びHsuら、Carcinogenesis15：1657-62(1994))、G/Aミスマッチを認識するmutY(例えば、GenBank寄託番号AF121797(ストレプトミセス)、U63329(ヒト)、AA409965(ハツカネズミ)及びAF056199(ストレプトミセス))、及びミスマッチ(A/G及びA/Cミスマッチを含む)を認識するが低い触媒活性を有する突然変異体mutY(参照：例えば米国特許出願公開2004/0014083、及びMichaelsら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、89(15)：7022-5(1992))。例えば、ミスマッチ結合薬剤は、E37S、V45N、G116D、D138N又はK142A突然変異を有する突然変異体大腸菌mutYポリペプチド(Luら、J.Biol.Chem.、271(39)：24138-43(1996)；Guanら、Nat.Struct.Biol.、5(12)：1058-64(1998)；及びWrightら、J.Biol.Chem.、274(41)：29011-18(1999))でもよい。

【0177】

又別の例では、ミスマッチ結合薬剤は、ミスマッチした塩基及び小さな(1~5塩基)一本鎖ループを認識するmutSポリペプチドである。例示的なmutSポリペプチドとして、例えば下記GenBank寄託番号を有する核酸でエンコードされたポリペプチドが挙げられる：AF146227(ハツカネズミ)、AF193018(シロイヌナズナ)、AF144608(腸炎ビブリオ)、AF034759(ホモ・サピエンス)、AF104243(ホモ・サピエンス)、AF007553(好熱菌caldophilus)、AF109905(ハツカネズミ)、AF070079(ホモ・サピエンス)、AF070071(ホモ・サピエンス)、AH006902(ホモ・サピエンス)、AF048991(ホモ・サピエンス)、AF048986(ホモ・サピエンス)、U33117(好熱菌)、U16152(腸炎エルシニア)、AF000945(Vibrio cholerae)、U698873(大腸菌)、AF003252(インフルエンザ菌株b(Egan))、AF003005(シロイヌナズナ)、AF002706(シロイヌナズナ)、L10319(マウス)、D63810(Thermus thermophilus)、U27343(枯草菌)、U71155(好熱性真正細菌)、U71154(Aquifex pyrophilus)、U16303(ネズミチフス菌)、U21011(ハツカネズミ)、M84170(出芽酵母)、M84169(出芽酵母)、M18965(ネズミチフス菌)及びM63007(Azotobacter vinelandii)。ミスマッチ結合薬剤は又、ミスマッチを認識するが低い触媒活性を有する突然変異体mutS蛋白質でもよい(参照、例えば、米国特許出願公開2004/0014083及びWuら、J.Biol.Chem.、274(9)：5948-52(1999))。又別の例では、ミスマッチ結合薬剤は、MSH2蛋白質、例えばmutSの真核ホモログでもよい。例示的なMSH2蛋白質として、例えば下記GenBank寄託番号を有する核酸によりエンコードされたポリペプチドが挙げられる：AF109243(シロイヌナズナ)、AF030634(アカパンカビ)、AF002706(シロイヌナズナ)、AF026549(シロイヌナズナ)、L47582(ホモ・サピエンス)、L47583(ホモ・サピエンス)、L47581(ホモ・サピエンス)及びM84170(出芽酵母)。ミスマッチ結合薬剤は又、ミスマッチを認識するが低い触媒活性を有する突然変異体MSH2蛋白質でもよく(参照：例えば米国特許出願公開2004/0014083)、例えば、G693D又はaG855D突然変異を有する出芽酵母突然変異体MSH2(Alaniら、Mol.細胞.Biol.、17(5)：2436-47(1997))、又はhMSH-2のC末端ドメイン内の195アミノ酸をエンコードするフラグメントを有するかK675R突然変異を有するヒト突然変異体MSH2(Whitehouseら、Biochem.Biophys.Res.Commun.、232(1)：10-3(1997)；及びlaccarinoら、EMBOJ.、17(9)：2677-86(1998))。

【0178】

又別の例では、ミスマッチ結合薬剤は、2以上のミスマッチする結合薬剤の混合物を含むものでもよい。例えば、異なる塩基対ミスマッチ、挿入、又は欠失に対する異なる特異性又は、親和性を有する2以上のミスマッチ結合薬剤の混合物が、可能な塩基エラーを有効に認識するために使用できる。

【0179】

図21は、ミスマッチ結合薬剤を使用して配列エラーを除去する別の方法を示す。このエラーフィルトレーション方法は、構造体オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び／又はポリヌクレオチド構造物からエラーを除去するために使用される。図21Aは、本発明の方法を使用して調製されるポリヌクレオチド構造物を示す。ポリヌクレオチド構造物を特定するオーバーラップする構造体オリゴヌクレオチドが、設計され合成される。構造体オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマー結合部位、ミスマッチ修復酵素切断部位、

オリゴヌクレオチドの単離用薬剤(例えば、ビオチン等)、及び接合部ユニバーサルタグ及び構造体オリゴヌクレオチド間にある制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含むユニバーサルタグを有する(図21B)。様々な態様において、5'及び3'フランキンク配列の1又は両方にあるユニバーサルタグは、ミスマッチ修復酵素切断部位を有する。構造体オリゴヌクレオチドは次に増幅され(図21C)、それに続いて任意の一連の変性及び再生により、いくつかのコピーはミスマッチ、挿入、又は欠失を含む二本鎖構造体オリゴヌクレオチドのプールが形成される(図21D)。構造体オリゴヌクレオチドのプールは次に、1以上のユニバーサルタグ内に位置するミスマッチ修復酵素切断部位で切断するミスマッチ修復酵素と接触する(図21E)。この切断は、構造体オリゴヌクレオチド分子から単離するための薬剤を除去し、その結果ミスマッチ含有デュプレックスはもはや単離用薬剤を含まず、一方エラーフリーデュプレックスは単離用薬剤を含んだままの構造体オリゴヌクレオチドのプールが生成する。切断されたユニバーサルタグを有する短いフラグメントは、(例えば、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を使用したサイズ分離により)任意で分離前に除去されるか、後の段階で除去される。構造体オリゴヌクレオチドのプールは次に単離薬剤の結合パートナーでの機能性化カラムを通過させる等の分離プロセスにかけられる(例えば、ビオチン機能性化分子単離用のストレプトアバジンカラムを使用して)。ミスマッチ修復酵素により切断されたミスマッチ含有配列は、単離薬剤を含まずカラムへ結合しない(例えば、それらはカラムから流出する)(図21F)。ミスマッチ修復酵素により切断されていないエラーフリー配列は、カラムへ結合し、任意で洗浄してカラムへ非特異的に結合している切断された構造体オリゴヌクレオチドのコピーを除去後に溶出されてもよい(図21G)。溶出した構造体オリゴヌクレオチドは、次に任意で別の一連のエラーフィルトレーション捕集及び/又は増幅にかけられてもよい。精製された構造体オリゴヌクレオチドのプールは次に、(例えば、タイプIIS制限エンドヌクレアーゼを使用して)切断されてユニバーサルタグを除去し、本発明の方法を使用してサブアセンブリ及び/又はポリヌクレオチド構造物へアセンブルされる。本発明の例示では、図21中に図示される方法は、ミスマッチ修復酵素としてmutHLS複合体を使用する。mutHLS複合体は、d(GATC)部位での二本鎖切断を行う(参照:例えばSmith及びModrich、Proc.Natl.Acad.Sci.USA94:6847-6850(1997))。

【0180】

図22は、ミスマッチ結合薬剤を使用して配列エラーをニュートラル化する例示的方法を示す。この例では、エラー含有DNA配列はDNA産物のプールから除去されない。むしろ、それは化学的架橋薬剤(例えば、ジメチルスベリミデート、DMS)又は別の蛋白質(mutL等)の作用によりミスマッチ認識蛋白質と不可逆的に複合体化される。DNA配列のプールは次に増幅されるが(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、PCRにより)、エラーを有するものは増幅されずに、直ぐに増加するエラーフリー配列により数量的に凌駕される。図22Aは、ミスマッチを有するいくつかのデュプレックス(左)及びエラーフリーであるいくつかのデュプレックス(右)を含む例示的DNAデュプレックスのプールを示す。MMBPは、ミスマッチ含有DNAデュプレックスへ選択的に結合するために使用される(図22B)。MMBPは、架橋薬剤を使用した場合、ミスマッチの部位に不可逆的に結合される(図22C)。共有的に結合されたMMBPの存在下で、DNAデュプレックスのプールの増幅はエラーフリーデュプレックスの更なるコピーを生じる(図22D)。MMBPミスマッチDNA複合体は、結合した蛋白質がデュプレックスの2個のストランドの解離を妨げるために増幅に参加できない。長いDNAデュプレックスでは、MMBP結合部位の外側の領域は部分的に解離することができ、これら(エラーフリー)領域の部分的増幅に参加する。

【0181】

図23は、一本鎖ヌクレアーゼを使用するエラーフィルトレーション捕集及びエラーニュートラル化の例示的方法を示す。核酸デュプレックスは必然的に、例えば1以上の塩基対の小さな一本鎖ループであるバブルを形成する。バブルは、挿入、欠失、又は不適当な塩基対から生じるミスマッチ部位で、より発生しやすい。図23Aは、いくつかのエラーを含む出発オリゴヌクレオチドのプールを示す(例えば、目的の核酸配列からの逸脱)。例えば

、一連のPCR増幅後、エラーはデュプレックスの両ストランド中の同一の位置で発見される(例えば、相補的エラー)。このような例では、最初の一連の変性及び再生により、デュプレックスの反対側のストランドでは異なる位置でエラーを有し、エラー検出を強化するヘテロデュプレックスの形成が可能となる(参照図23B)。オリゴヌクレオチドのプールは次に、デュプレックスを好ましくは、デュプレックス中に含まれるミスマッチのおかげでバブルの部位等の一本鎖位置で切断する一本鎖ヌクレアーゼで処理される(図23C左)。一本鎖ヌクレアーゼは不適当な塩基を含むストランド、不適当な塩基とは反対側のストランド、又はそれらの両方を切断する(例えば、一本鎖ヌクレアーゼは、反対側のストランド上の、ミスマッチ部位で又はその近傍で、同一又は異なった位置で両ストランドを切断する)。ミスマッチ部位で又はその近傍で切断後、一本鎖ヌクレアーゼは次に同一のストランド上の切断の周囲にある部位の少なくとも幾つかの塩基対も切断して、一本鎖ギャップを形成する(図23C中央)。この一本鎖ギャップは次に、一本鎖領域中のデュプレックスの他のストランドも切断する一本鎖ヌクレアーゼの基質となる(図23C右)。従って、ミスマッチ部位で又はその周りで切断される二本鎖破断は、一本鎖ヌクレアーゼでの処理の結果発生する(図23D)。例えば、バブルの形成は、一本鎖ヌクレアーゼでの処理中の温度を室温を超え、例えば25℃を超え、30℃、35℃、37℃、40℃、42℃、45℃、50℃以上等の温度へ上昇させることにより促進される。

【0182】

例えば、ヌクレアーゼ処理されたオリゴヌクレオチドは、サイズ分離にかけられ、完全長産物(例えば未切断のオリゴヌクレオチド)が単離される(図23E)。単離された完全長産物は、出発プールと比較してエラー割合が減少している。これらオリゴヌクレオチドは次に増幅処理され、更にエラー減少手順、及び／又は、より大きなポリヌクレオチド構造物へアセンブリ処理される。この例で共に使用できるサイズ分離技術として、例えばゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、サイズフィルトレーション等が挙げられる。

【0183】

又別の例では、ヌクレアーゼ処理されたオリゴヌクレオチドのプールは、一連の変性及び再生処理にかけられ、続いて鎖伸長及び／又はライゲーション条件へ曝される(図23F)。一本鎖ヌクレアーゼとの処理により形成されたフラグメントは、オーバーラップする相補的領域に基づきデュプレックスを形成する。デュプレックスの一本鎖部分は次にポリメラーゼを使用して埋め込まれ(図23F)、完全長デュプレックスオリゴヌクレオチドを再生する。幾つかの一連の変性、再生及び鎖伸長及び／又はライゲーションは完全長産物の再生に使用される。再生された産物は次に増幅にかけられ、更にエラー減少手順、及び／又は、より大きなポリヌクレオチド構造物へアセンブリ処理される。この例では、ヌクレアーゼ処理されたオリゴヌクレオチドのプールは、完全長産物への再アセンブリ前に精製プロセス処理される必要はない。例えば、末端プライマーは、完全長産物の再アセンブリを促進するためにアセンブリ反応へ添加される。この例では、図23Eに示される例よりも積極的な一本鎖ヌクレアーゼによる消化がより望ましい。上記記載の通り、図23Eに示される例は未切断の完全長産物の少なくとも1の分子の回復を必要とするが、図23Fに示される例ではプール中の完全長産物が全く残らなかったとしても実施できる。図23Fの例示の過消化は、エラー割合の減少が大きい間は役に立つ。

【0184】

図23に記載された方法に関して使用される例示的な一本鎖ヌクレアーゼとして、例えば大豆ヌクレアーゼ(ニューイングランドBiolabs社、ベバリー、MA)、S1ヌクレアーゼ(Worthington Biochemical社、レイクウッド、NJ; Fermentas社、ハノーバ、MD; Invitrogen社、カールスバッド、CA)、及び大腸菌エキソヌクレアーゼIが挙げられ、これら全ては市販品を種々の供給源から入手できる。又別の例では次に続く重合中に使用されるブルーフリーディングポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性も、本発明において利用できる。図23中に図示されるエラー減少方法は、構造体オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び／又はポリヌクレオチド構造物中のエラーを減少させるのに有用である。例えば、配列エラーとは関係ないデュプレックス末端での非特異的切断を防止するために、一本鎖ヌ

クレアーゼでの処理前にオリゴヌクレオチド末端をブロック保護することが望ましい。例示的な保護剤として、例えばビオチン又はビオチン/ストレプトアビジン複合体が挙げられる。例えば、一本鎖ヌクレアーゼ処理それに続く(1)精製及び任意で増幅又は(2)再アセンブリの複数の一連の操作が実施されて、オリゴヌクレオチドプール中のエラー割合は更に減少する。

【0185】

より長いDNA配列がどんどん生成するにつれ、完全にエラーフリーな配列のフラクションは消滅する。ある長さにおいて、完全に正確な配列を含む完全プール中に分子は存在しなくなる。従って非常に長いDNAセグメントの生成のために、最初に上記エラーコントロール手法にかけられる小さなユニットを作成することが有用である。次にこれらセグメントを組み合わせて、より大きな完全長産物を得る。しかし、これら非常に長い配列中のエラーが、完全長DNAデュプレックスの除去又はニュートラル化無しに局部的に修復される場合には、より多くの複合体階段状アセンブリプロセスは回避できる。

【0186】

多くの生物学的DNA修復機構は、突然変異(エラー)の部位を認識し、次にテンプレートストランド(エラーフリーの場合が多い)を使用して不適当な配列を置換するシステムに基づく。DNA配列のde novo製造では、このプロセスは、どのストランドがエラーを含み、どれをテンプレートとして使用すべきかを決定するのが困難であるために複雑となる。この問題への1の解法は、混合物中の他の配列のプールを使用して、修復用テンプレートを提供することにある。これら方法は非常に強力である：DNAの全てのストランドが1以上のエラーを含むとしても、ストランドの大部分がそれぞれの位置では正確な配列を有する限り(エラーの位置は一般的にストランド間の関係を持たないからだと考えられる)、所定のエラーが正確な配列で置換されると高く予測される。図24~25及び27~30は、この種の局部的エラー修復の実施のための例示的手順を示す。

【0187】

図24は、ストランド特異的エラー修復を実施する例示的方法を示す。有機体の複製において、酵素媒体DNAメチル化がテンプレート(親)DNAストランドを特定するためにしばしば使用される。新たに合成された(娘)ストランドは最初に非メチル化される。ミスマッチが検出された場合、デュプレックスDNAが、娘ストランドのみを修復するためのミスマッチ修復システムを働かせるために使用される。しかし、一对の相補的DNAストランドのde novo合成においては、両ストランドは非メチル化され、修復システムはどのストランドを修復すべきかを選択するための本質的な基礎を持たない。メチル化及び部位特異的脱メチル化が使用されて、選択的に半メチル化されたDNAストランドが生成する。大腸菌のDamメチラーゼ等のメチラーゼが、それぞれのストランド上の全ての可能な目標部位を同様にメチル化するために使用される。DNAストランドは次に解離され、新しい相手方ストランドを再アニールされる。ミスマッチ結合蛋白質(MMBP)とデメチラーゼとの融合体である、新しい蛋白質が適用される。この融合蛋白質は、ミスマッチのみと結合し、デメチラーゼの近接性は、いずれかのストランドであるがミスマッチ部位の近位のみからメチル基を除去する。次に続く解離及びアニールサイクルは、(脱メチル化された)エラー含有ストランドが、その配列のこの領域中でエラーフリーである(メチル化された)ストランドと結合することを可能とする(これは相補鎖上のエラーの位置は互いに関連がないためにストランドの大部分で本当である)。半メチル化DNAデュプレックスは、大腸菌のそれ等の、この目的のためにmutS、mutL、mutH、及びDNAポリメラーゼ蛋白質を使用するDNAミスマッチ修復システムの成分を使用するために、今やエラーの修復をするために必要な全ての情報を含むことになる。このプロセスは、全てのエラーが修復されるために複数回繰り返される。

【0188】

図24Aは、上部左ストランド中の、ミスマッチを生じる単一の塩基エラー以外は同一である2個のDNAデュプレックスを示す。右側のデュプレックスのストランドは厚い線で示す。メチラーゼ(M)は次に、それぞれのDNAストランド上の全ての可能部位の均一なメチル化に使用される(図24B)。次にメチラーゼが除去され、ミスマッチ結合蛋白質(MMBP)及び

デメチラーゼ(D)を有する蛋白質融合体が適用される(図24C)。融合蛋白質のMMBP部分はミスマッチ部位へ結合し、その結果、融合蛋白質をミスマッチ部位へ局在化する。融合蛋白質のデメチラーゼ部分は、次にミスマッチの近辺のメチル基を両ストランドから特異的に除去するために作用する(図24D)。MMBP-D蛋白質融合体は次に除去され、DNAデュプレックスは解離されて新しい相手方ストランドと再結合させられる(図24E)。エラー含有ストランドは、a)その部位に相補的エラーを含まず；及びb)ミスマッチ部位近くでメチル化される相補鎖と最も再結合しやすい。この新しいデュプレックスは今や、DNAミスマッチ修復システム用の天然基質として作用する。ミスマッチ修復システムの成分(大腸菌mutS、mutL、mutH、及びDNAポリメラーゼ等)は、次にエラー含有ストランド(エラーを含む)中の塩基を除去するために使用され、反対側の(エラーフリー)ストランドは置換体を合成して修復されたストランドを残すためのテンプレートとして使用される(図24F)。

【0189】

図25は、両ストランド上のミスマッチ部位でのDNAの局部的除去の例示的方法を示す。様々な蛋白質は、エラー近くの両方のDNAストランド中の破断を生じるために使用できる。例えば、非特異的ヌクレアーゼ(DNaseI等)へのMMBP融合は、ヌクレアーゼ(N)のミスマッチ部位への作用を生じ、両ストランドを切断する。あるいは、一本鎖ヌクレアーゼ(大豆ヌクレアーゼ又はS1ヌクレアーゼ等)は、ミスマッチ部位で及びその近辺で図23記載の通り二本鎖破断を生じるために使用される。一旦破断が生じた場合、相同な再結合が他のストランド(その大部分はこの部位でエラーフリーである)を切除されたDNAを置換するためのテンプレートとして使用するために採用できる。例えば、RecA蛋白質は、一本鎖侵入及び相同な再結合中の初期ステップを促進するために使用できる。あるいは、ポリメラーゼは、壊れたストランドを新しい完全長相手方ストランドと再結合してエラーを置換するための新しいDNAを合成することを可能とするために使用される。例えば、図25Aは、その中の1は図のように単一の塩基エラーを含む以外は同一である2個のDNAデュプレックスを示す。例えば、MMBPのヌクレアーゼ(N)との融合等の蛋白質が添加され、ミスマッチ部位で結合する(図25B)。一方、一本鎖DNAへの特異性を有するヌクレアーゼも、好ましいミスマッチ部位でのDNAデュプレックスの局部的融解に好ましい温度へ上昇させて使用できる(ミスマッチの不存在下で、完全なDNAデュプレックスはより融解しにくい)。MMBP-N融合体のそれ等のエンドヌクレアーゼが、ミスマッチ部位近くの二本鎖破断を形成するのに使用できる(図25C)。MMBP-N複合体は次に、ミスマッチ周囲のDNAデュプレックスの結合された短い領域と共に除去される(図25D)。相手方ストランドの融解及び再アニールは、一本鎖ギャップを有する幾つかのデュプレックスを生成する。DNAポリメラーゼは次にギャップを埋め込むのに使用され、最初のエラーを持たないDNAデュプレックスが生成される(図25E)。

【0190】

本発明の例示では、図25中に概説されるエラー修復プロセスは、ヘテロデュプレックスDNA中のミスマッチ部位に二本鎖破断を導入するレソルバーゼ蛋白質を使用して行われる。例示的なレソルバーゼ蛋白質として、例えばT7エンドヌクレアーゼI及びT4エンドヌクレアーゼVII(参照：例えばYoung及びDong、Nucleic Acids Res.32：e59(2004)；Qiuら、Appl.Environ.Microbiol.67：880-887(2001)；Picksleyら、J.Mol.Biol.212：723-735(1990)；Mashalら、NatureGenet.9：177-183(1995)；B.Kemper(1997)「DNA中の損傷及び修復」.J.Nickoloff及びM.Hoekstra編(Humana Press、Totow, NJ)、1、pp.179-204)が挙げられる。T7エンドヌクレアーゼIは、例えばニューイングランドバイオラボ社(ベバリー、MA)からの市販品を購入でき、t4エンドヌクレアーゼVIIは、例えばUSB(Cleveland、OH)からの市販品を購入できる。

【0191】

図26は、図25のそれと類似のプロセスを示すが、この例では、DNAデュプレックス中の二本鎖ギャップは再結合修復経路の蛋白質成分を使用して修復される(この場合、DNAストランドの全体的な融解及び再アニールは特に必要ないが、ゲノムDNA等の特に大きなDNA分子を処理するときには好ましい)。例えば、図26Aは、単一の塩基ミスマッチを含む以外は

同一の2個のDNAデュプレックスを示す(図25A)。図25B中で、MMBPのヌクレアーゼ(N)との融合体等の蛋白質が添加され、ミスマッチ部位で結合する(図25B)。図25C中で、MMBP-N融合体のそれ等のエンドヌクレアーゼは、ミスマッチ部位の周辺で二本鎖破断を生じるために使用される(図26C)。例示的なMMBP-N融合蛋白質が図27中に図示される。あるいは、一本鎖ヌクレアーゼ(大豆ヌクレアーゼ又はS1ヌクレアーゼ等)は、図23中での上記記載の通りミスマッチ部位で及びその周辺で二本鎖破断を生じるために使用される。RecBCD複合体等のDNA修復経路の蛋白質成分が次に、二本鎖破断の露出された末端を更に消化して3'オーバーラップを残すために使用される(図26D)。次に、RecA蛋白質等のDNA修復経路の蛋白質成分が、未反応DNAデュプレックスの一本鎖侵入を促進し、ホリデイ接合部を形成するために使用される(図26E)。DNAポリメラーゼは次に、新しいDNAを合成し、一本鎖ギャップを埋め込むために使用される(図26F)。最後に、RuvC蛋白質等のDNA修復経路の蛋白質成分がホリデイ接合部を分解するために使用される(図26G)。2個の生成したDNAデュプレックスは、最初のエラーを含まない。分枝点の移動に応じて、これら接合部を分解する1以上の方法がある。

【0192】

本発明の方法は、最初のDNA産物がエラーフリーでなくても、大きなエラー遊離DNA配列を生成できることを明らかにすることは重要である。図28は、それぞれ単一の塩基(ミスマッチ)エラーを含む2個のDNAデュプレックスへ適用される図25(又は図26も同じ)の方法の効果をまとめる。例えば、図28Aは、DNA配列内の異なる位置にあるそれぞれの単一の塩基ミスマッチ以外は同一である2個のDNAデュプレックスを示す。ミスマッチ結合及び局部的ヌクレアーゼ活性が次に、エラーを切断する二本鎖破断を生じるために使用される(図28B)。再結合修復(図26に例示する)又は融解及び再アセンブリ(図25に例示する)が、DNAデュプレックスを生成するために使用され、それぞれの切除されたエラー配列は、それぞれ他のDNAデュプレックスをテンプレートとして使用して新たに合成された配列で置換される(その同一位置にあるエラーを有しやすい)(図28C)。DNAデュプレックスの完全解離及び再アニールは、(図26に示される方法が使用された場合)エラーフリー産物を生成するために必要ではない。

【0193】

長いDNA分子中のエラーを減少させる簡単な方法は、DNA主鎖の両ストランドを、短い一本鎖オーバーハングを切断部位に生成する部位特異的エンドヌクレアーゼ等により、複数の部位で切断することである。得られるセグメントでは、ミスマッチをいくらか含むことが予測される。これらは、ミスマッチ結合蛋白質の作用及びその次のミスマッチ結合蛋白質の除去により、図20に記載されたように除去できる。セグメントの残存プールは、完全長配列へ再ライゲートできる。図26の手法に関して、この手法は下記幾つかの利点を有する：1)完全完全長DNAデュプレックスの除去は、エラーを除去するために必要ではない；2)DNAデュプレックスの全体的解離及び再アニールは、必要ではない；3)エラー遊離DNA分子がどの成分もエラー遊離DNA分子ではない出発プールから構築できる。

【0194】

制限エンドヌクレアーゼの最も共通するタイプがこの手法に使用される場合、全てのDNA切断部位は同一のオーバーハングを生じる。従って、セグメントは、ランダムな順序で結合及びライゲートする。しかし部位特異的「外側カッター」エンドヌクレアーゼ(HgaI、FokI、又はBspMI等)の使用は、(非オーバーラップする)DNA認識部位へ近接した切断部位を生じる。従って、それぞれのオーバーハングは他の部位のそれから識別できるDNA部分に特異的な配列を有する。これら特異的に相補的な相補末端の再結合は、次にセグメントを適切な順序で組み合わせる。生成した相補末端は、5個までの塩基長となり、 $4^5=1024$ 種までの異なる組み合わせを可能とする。たぶん、この多くの識別性のある制限部位が、相補末端間でのニアマッチを避ける必要性からこの数字は少なくなるにしても使用できる。

【0195】

必要な制限部位は、配列設計に特異的な形で含めることができ、又は目的の配列内に制

限部位をランダムに分布させてもよい(それぞれのエンドヌクレアーゼの認識配列は、生成されたフラグメントの代表的分布の予測を可能とする)。又、エンドヌクレアーゼの選択が最も理想的な一組のフラグメントを生じるための目標配列が分析できる。

【0196】

図29は、ミスマッチ含有セグメントの半選択的除去の例を示す。例えば、図29Aは、それぞれミスマッチを導く1のエラーを含む3個のDNAデュプレックスを示す。DNAは、部位特異的エンドヌクレアーゼで切断され、近接したセグメントに相補的な相補末端を有する二本鎖フラグメントを生じる(図29B)。次にMMBPが適用され、それぞれのミスマッチを含むフラグメントへ結合する(図29C)。MMBPへ結合したフラグメントは、図20に記載されたようにプールから除去される(図29D)。それぞれのフラグメントの相補末端は、それぞれのDNAデュプレックスが正確な、配列特異的隣接フラグメントと結合することを可能とする(図29E)。リガーゼ(T4DNAリガーゼ等)が相補末端を結合するために使用され、完全長DNA配列を生じる(図29F)。これらDNA配列は、元のDNAデュプレックスがいずれもエラーフリーでなかった事実にも拘わらずエラーフリーとなる。不完全ライゲーションは、完全長未満であるいくつかの配列を残し、それはサイズに基づき除去精製される。

【0197】

上記手法は、従来のエラー除去方法の一つである最初にエラーを発見する塩基配列決定を使用し、次に特別なエラーフリーサブ配列を選択し、エンドヌクレアーゼ及びリガーゼで「カットアンドペースト」する方法に対して主要な利点を提供する。本発明の例では、塩基配列決定や又は使用者による選択はエラー除去に必要ではない。

【0198】

相補的DNAストランドが合成され、アニールされる場合、両ストランドはエラーを含むが、両方の配列中の同一の塩基位置で発生するエラーの確率は、上記記載のように非常に小さい。上記方法は、DNAミスマッチとして検出できる関連付けられないエラーの大部分の場合の除去に有用である。両ストランド上の同一の位置での相補的エラー(ミスマッチ結合蛋白質により検出不可)は稀であるが、次に続くデュプレックス解離及び異なる相補鎖とのランダム再アニールサイクル(エラー位置の異なる分布を有する)によりこの問題は解決できる。ゲノム長さDNAストランドの場合等のいくつかの用途では、DNAデュプレックスを融解・再アニールしないことが望ましい。このような例では、関連付けられたエラーは、異なる方法を使用して除去される。例えば、最初の関連付けられたエラーの母集団は低いと考えられるが、プール中のDNA配列の増幅又は他の複製ではそれぞれのエラーがコピーされ完全に相補的エラーを含む相補鎖を生じることが確実である。本発明の手法は、DNAストランドの全体的解離及び再アニールを必要としない。本質的に、DNA損傷及び再結合の様々な形が使用され、長いDNAデュプレックスの一本鎖部分が再び組み合わされて異なるデュプレックスとなる。

【0199】

図30は、合成されたDNA中の関連付けられたエラー減少手順を示す。図30Aは、1のストランド中の単一のエラー以外は同一である2個のDNAデュプレックスを示す。非特異的ヌクレアーゼは、プール中のDNAデュプレックスのランダム位置に短い一本鎖ギャップを生じるために使用される(図30B)。ここで示されるのは、関連付けられた位置の1箇所の部位で発生したこれらギャップの1個の結果である。RecA及びRuvB等の再結合特異的蛋白質が、四本鎖ホリデイ接合部の形成を媒介するために使用される(図30C)。DNAポリメラーゼが、複合体のより下部で示されるギャップを埋め込むために使用される(図30D)。RuvC等の他の再結合及び/又は修復蛋白質の機能が、ホリデイ接合部を切断するために使用され、それらの原要素のハイブリッドであるいくつかの配列を含む、2個の新しいDNAデュプレックスを生じる(図30E)。例示によると、エラー含有領域の1つは除去される。しかし、本発明の方法で使用されるストランドの切断、再配置、及び置換はランダムであることを目的とするために、配列中のエラーの全数は実際には変化せず、エラーは単純に異なるストランドへ再組み合わせされると考えられる。従って、1のデュプレックス中の関連付けられた対のエラーは、それぞれ単一のエラーを有する分離されたデュプレックスへ再編

成される。このストランドのランダム再組み合わせは、ミスマッチを含む新しいデュプレックスを生じ、それは上記ミスマッチ修復蛋白質を使用して修復できる。この例の特徴的部分は、再結合を使用して、関連付けられたエラーを異なるDNAデュプレックスへ分離することである。

【0200】

8. 低純度アレイ：

例えば、本発明は低純度核酸アレイを提供する。本発明のアレイは、固体サポート及び、固体サポートと結合した複数の別個のフィーチャを含む(例えば、固体サポート表面上の予め特定された領域又は局部的範囲)。それぞれのフィーチャは一括して、独立して特定されたコンセンサス配列を有する核酸の母集団を有するが、中でも同一の配列を有する上記フィーチャの上記核酸は10パーセント以下、更に好ましくは5パーセント以下、2パーセント又は1パーセントのフィーチャの核酸のみが同一の配列を有する。ここで使用される「特定されたコンセンサス配列」は、目的の位置にある塩基の予定頻度の基準を使用して計算された場合、個体数の5パーセントを超える非縮重配列を共同して有する個体数を意味する。即ち、個体数の少なくとも5%が同一の塩基をいずれかの位置に有するが、個体数の10%未満は同一の塩基を全ての位置で有する。アレイは、一連の核酸ストランドを合成し、次にそれらをアレイへ付着させて形成でき、核酸ストランドはアレイ上にin situで合成される。アレイ構築方法は、上記第3部で更に記載されている。

【0201】

例えば、アレイへ結合された核酸は、少なくとも50ヌクレオチド長、少なくとも100ヌクレオチド長、及び少なくとも200ヌクレオチド長である。アレイへ結合された核酸は、放出され、1以上のポリヌクレオチド構造物の本発明の方法によるアセンブリ用の構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチドとして使用される。

【0202】

例えば、核酸は固体サポートから放出可能である。例えば、それぞれのフィーチャは、下記記載の静電的に又は制御されたフィールド手段又は光不安定なリンカーによる核酸放出手段等の、固体サポートから核酸を選択的に放出するための手段を含む。例えば、1以上のフィーチャには、核酸との可逆的非共有の相互結合を形成する化学薬剤であり、その相互結合は選択的に解離されて上記フィーチャの予め決定されたサブセットから核酸を放出する薬剤が含まれる。例えば、1以上のフィーチャには、核酸と共有結合を形成するための化学薬剤であり、その結合は選択的に切断されて上記フィーチャの予め決定されたサブセットから核酸を放出する薬剤が含まれる。オリゴヌクレオチドを固体サポートから放出するための様々な結合化学及び方法は、更に上記3に記載されている。

【0203】

例えば、アレイは、平方センチ当たり少なくとも100個の異なるフィーチャ、更に好ましくは平方センチ当たり少なくとも500、1000又は10000個の異なるフィーチャを有する。例えば、フィーチャはフィーチャサイズ500ミクロン未満、更に好ましくは100ミクロン未満、10ミクロン未満又は1ミクロン未満である。

【0204】

例えば、固体サポートは、ガラス、シリコン、セラミック及びナイロンの群から選ばれる例えば、フィーチャはポリテトラフルオロエチレン、二フッ化ポリビニリデン、ポリスチレン、ポリカーボネート、及びそれらの組み合わせの群から選ばれるポリマーからなる上記固体サポートの表面に設けられる。低純度アレイと共に使用できる適切な固体サポートに関する追加的情報は、上記3に記載されている。

【0205】

例えば、フィーチャは互いに流体で接触している。フローチャネルを使用するアレイの合成方法は、例えば、米国特許第5384261及び上記3に記載されている。

【0206】

又、本発明は、1以上の低純度アレイからのオリゴヌクレオチドを使用するポリヌクレオチド構造物のアセンブル方法を提供する。これら方法を図31を参照して記載する。図31

Aは、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリに有用である構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチド等の核酸を含む低純度アレイの一部分を示す。図中、アレイは4個のフィーチャ(a、b、c及びd)を示し、それぞれのフィーチャは共通して特定されたコンセンサス配列を有する構造体オリゴヌクレオチドの母集団を含むが、上記構造体オリゴヌクレオチドの上記フィーチャの10パーセント以下しか同一の配列を有さない。構造体オリゴヌクレオチドは、次に固体サポートから放出されて1以上のプールを形成する(図31B)。様々な態様において、個々のフィーチャへ結合された構造体オリゴヌクレオチドの母集団は、分割して放出され(例えば、後に他の構造体オリゴヌクレオチドと混合される)又は2以上のフィーチャへ結合された構造体オリゴヌクレオチドの個体数は、同時に放出されて構造体オリゴヌクレオチドの混合物を形成する。ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用の一組の構造体オリゴヌクレオチドが次に形成されて、目的のポリヌクレオチド構造物がライゲーショニング及び／又は鎖伸長を使用して形成される(図31C及び31D)。ポリヌクレオチド構造物の構造体オリゴヌクレオチドからのライゲーショニング及び／又は鎖伸長を使用した形成は、図3中に図示される。ポリヌクレオチド構造物は次に、1以上の一連のエラー減少及び／又は増幅及び／又は更にアセンブリ処理をされて、目的の配列を有するポリヌクレオチド構造物のプールが形成される(図31E)。

10

【0207】

例えば、構造体オリゴヌクレオチドは、構造体オリゴヌクレオチド又は構造体オリゴヌクレオチドと組み合わせられたポリヌクレオチド構造物の増幅、単離、又は検出を可能とするユニバーサルタグ及び／又はユニバーサルプライマー結合部位を有する。本発明の例示では、構造体オリゴヌクレオチドは固体サポートからの除去後にユニバーサルプライマーを使用して増幅され、プライマーは次にポリヌクレオチド構造物のアセンブリ前に除去される(参照、例えば図5、6、10及び21並びにこれら図に関する本明細書の記載)。例えば、構造体オリゴヌクレオチドには、増幅前及び／若しくは後に、又は増幅せずに、図19に関して記載されたように選択オリゴヌクレオチドを使用してエラーフィルトレーション捕集操作を行う。

20

【0208】

1以上のポリヌクレオチド構造物のアセンブリ後、構造物は1以上の一連のエラー減少及び／又は増幅及び／又は更なるアセンブリ処理されて、予め決定された配列を有する最終産物を生成する。この例で有用であるエラー減少プロセスとして、例えば図19～26及び28～30及びこれら図に関しての記載にあるエラーフィルトレーション、エラーニュートラル化及び／又はエラー修復プロセスが挙げられる。

30

【0209】

例えば図8中に示されるように、エラー減少プロセス実施前に、構造体オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ及び／又はポリヌクレオチド構造物を一連の変性及び再生処理することが望ましい。例えば、これは、目的の配列中のエラーがミスマッチとしてより認識されにくいようなオリゴヌクレオチドのプールについて、鎖伸長又は増幅がいつ使用されても有用である。

【0210】

9. 塩基配列決定/In vivo選択:

例えば、制限消化、選択マーカーアッセイ、機能的in vivo選択、又は他の適切な方法等のDNA塩基配列決定、ハイブリダイゼーション型診断方法、分子生物学技術による、サブアセンブリ及び／又は合成ポリヌクレオチド構造物のアセンブリの達成度を評価することが望ましい。例えば、機能的選択は、ポリヌクレオチド構造物の細胞中への導入により、又は構造物上の1又は複数の配列の発現のアッセイにより行われる。達成されたアセンブリは、検出用マーカー、選択用マーカー、所定のサイズのポリペプチド(例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動等により)をアッセイすることにより、又はポリヌクレオチド構造物によりエンコードされた1以上のポリペプチドの酵素的機能をアッセイすることにより測定される。DNA操作及び酵素処理は、当分野で確立されたプロトコル及び製造者に推薦された手順に従い行われる。適切な技術は、Sambrookら(2nd ed.)、C

40

50

old Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor(1982、1989) ; Methods in Enzymol .(Vols.68、100、101、118、及び152-155)(1979、1983、1986及び1987) ; 及び「DNAクローニング」D.M.Clover編、IRL Press、Oxford(1985)に記載されている。

【0211】

例えば、ポリヌクレオチド構造物は発現ベクター中に導入され、宿主細胞中にトランスフェクトされる。宿主細胞は、いずれの原核又は真核細胞でもよい。例えば、本発明のポリペプチドは、大腸菌、昆虫細胞(バキュロウィルス)、酵母、植物、又はほ乳類細胞等の細菌細胞中で発現される。宿主細胞はホスト中には一般的に見られないtRNA分子を補充され、ポリペプチド発現に最適化されてもよい。ポリヌクレオチド構造物を発現ベクター中へライゲートし、形質転換又は、真核細胞(酵母、鳥類、昆虫又はほ乳類)又は原核細胞(細菌細胞)のいずれかのホスト中へトランスフェクトすることは、標準的手順である。大腸菌等の原核細胞中の発現に適切な発現ベクターの例として、例えば下記タイプのプラスミドが挙げられ：pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド及びpUC由来プラスミド；酵母中の発現に適切な発現ベクターの例として、例えば下記が挙げられYEP24、YIP5、YEP51、YEP52、pYES2、及びYRP17；ほ乳類細胞中の発現に適切な発現ベクターの例として、例えば下記が挙げられる、pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及びpHyg由来ベクター。

【0212】

10. 例示的使用：

本発明の組成物及び方法により合成できるポリヌクレオチド構造物は、本質的にその多様性に限定はない。本発明の方法は、必然的に生成する配列、部位指向性突然変異誘発、又はランダム突然変異誘発技術の制限を伴わない最初の素材(principles)から核酸(及び対応するポリペプチド)配列を得ることを可能とする。更に、本発明の方法は、非常に大きく、ゲノムサイズでさえある高忠実度を有する核酸構造物の構造体を可能とする。

【0213】

例えば、本発明の方法は、コドン再配置されたヌクレオチド配列の製造を可能とする。用語「コドン再配置」とは、核酸配列のコドン含量の改変を言う。多くの例では、コドン再配置は、核酸によりエンコードされたポリペプチド配列の変更無しに核酸配列の含量の改変を生じる。例えば、この用語は、コドン核酸配列の含量は特別のセルタイプ中の発現を強化するために改変される「コドン最適化」も含むことを意図する。他の例として、この用語は、配列間のコドン用途の違いにより生じる蛋白質発現の全ての可能性のある相違を最小化するために、2以上の核酸配列のコドン含量が改変される「コドン正常化」も含むことを意図する。又他の例では、この用語は、蛋白質の発現レベルを制御する(例えば、発現レベルの増加又は減少)手段として核酸配列のコドン含量を改変することを含むことを意図する。コドン再配置は、「野生型配列」中の少なくとも1のコドンを、所定の細胞タイプ中でより高い又は低い頻度で使用される同一のアミノ酸をエンコードする異なるコドンで置換することにより達成される。他の例として、この用語は、細胞は修飾されたtRNA及び／又はtRNAシンテターゼを含み、野生型細胞により挿入されたアミノ酸とは異なるコドンに応答して、細胞がアミノ酸を挿入する「コドン再割り当て」を含むことを意図する。更に、細胞中のヌクレオチド配列は、修飾されたtRNA及び／又はtRNAシンテターゼを含む細胞によりエンコードされたポリペプチド配列は、野生型細胞により産生されたポリペプチドと同一であるように、対応して修飾される。

【0214】

ポリペプチド鎖のアミノ酸をエンコードするコドンを含むヌクレオチド配列中の異常は、遺伝子をコードする配列の変異を可能とする。それぞれのコドンは3個のヌクレオチドからなり、DNAを含むヌクレオチドは2個の特異的塩基へ制限されるために、64個の可能なヌクレオチドの組み合わせがあり、その内61個はアミノ酸をエンコードする(残存する3個のコドンは信号末端翻訳をエンコードする)。その結果、多くのアミノ酸が1以上のコドンにより表される。例えば、アミノ酸アラニン及びプロリンは4個のトリプレットによ

りコードされ、セリン及びアルギニンは6個によりコードされ、一方トリプトファン及びメチオニンはたった1個のトリプレットによりコードされる。この縮重は、DNAによりエンコードされた蛋白質のアミノ酸配列を変更せずに、DNA塩基組成物の広い範囲に渡る変更を可能とする。

【0215】

多くの生命有機体は、増殖するペプチド鎖中の特別のアミノ酸の挿入をコードするために特別のコドンを使用する傾向を示す。コドン優先性又はコドンバイアスは有機体におけるコドン使用の相違であり、遺伝暗号の縮重により生成でき、多くの有機体について報告されている。コドンバイアスはしばしばメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳効率と関連し、それは今度は特に翻訳されたコドンの特性及び特別のトランスファーRNA(tRNA)分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞中の選択されたtRNAの優勢は一般的に、ペプチド合成中に最もしばしば使用されるコドンの反映である。従って、核酸配列はコドン最適化に基づく所定の有機体中での最適の発現用に適合できる。

【0216】

様々な種類の動物、植物及び微生物種のために入手可能である大量の遺伝子配列を入手するために、コドン使用の相対頻度を計算することが可能である。コドン使用(頻度)表は例えば<http://www.kazusa.or.jp/codon/>で入手可能である「コドン使用データベース」で容易に入手可能であり、これら表は多くの方法で適用できる。参照Nakamura、Y.、ら「国際DNA配列データベースからまとめられたコドン使用頻度」：2000年度版、Nucl.Acids Res. 28: 292(2000)。これら表はmRNA用語法を使用し、DNA中のチミン(T)の代わりに、表中ではRNA中ではウラシル(U)を使用する。表は、頻度が全ての64コドンよりもむしろ、それぞれのアミノ酸について計算されるように適用される。

【0217】

これら又は類似の表を使用して、当業者は頻度をいずれの所定のポリペプチド配列へも適用して、同一のポリペプチドをエンコードするが、所定の種により最適又は最適でないコドンを使用する、コドン再配置されたコード領域の、核酸フラグメントを生成できる。

【0218】

コドン再配置されたコード領域は、様々な異なる方法で設計できる。例えば、コドン最適化は、「ユニフォーム最適化」と名付けられた方法を使用して行われ、その方法ではコドン使用表は所定のアミノ酸のために使用される単一の最も頻繁なコドンを見出すために使用され、そのコドンは、特別のアミノ酸はポリペプチド配列中に現れるそれぞれの場合に使用される。例えば、ヒト中で最も頻繁なロイシンコドンはCUGであり、それは通常41%使用される。従って、コドン最適化は、所定のアミノ酸中の全てのロイシン残基用にコドンCUGを割り当てて行われる。

【0219】

別の方法である「完全最適化」では、コドンの実際の頻度はコード領域を通してランダムに分布される。従って、最適化方法を使用して、ポリペプチド配列が100ロイシン残基を有し、ヒト細胞内発現に最適化される場合、約7又は7%のロイシンコドンはUUAであり、約13又は13%のロイシンコドンはUUGであり、約13又は13%のロイシンコドンはCUUであり、約20又は20%のロイシンコドンはCUCであり、約7又は7%のロイシンコドンはCUAであり、約41又は41%のロイシンコドンはCUGである。これら頻度は、仮定的ポリペプチドをエンコードするコード領域中のロイシンコドン全体にランダムに分布される。当業者に理解されたとおり、配列中のコドンの分布はこの方法を使用すると非常に変化できるが、配列は常に同一のポリペプチドをエンコードする。これら方法は、コドン正常化等の他のコドン再配置技術へ適用されるのと同様に適用できる。

【0220】

所定のポリペプチド配列をエンコードするために最適化された頻度でコドンをランダムに指定することは、それぞれのアミノ酸に対するコドン頻度を計算し、次にコドンをポリペプチド配列へランダムに指定することにより手動で行える。更に、様々なアルゴリズム及びコンピュータソフトウェアプログラムも、容易に当業者に入手可能である。例えばDN

A star社（マジソン、Wis.）販売の商品名レーザージーンパッケージ中の「EditSeq」機能、Infor Max社（ベセズダ、Md.）販売の商品名ベクターNTIスイート中の逆翻訳機能、及びAccelrys社（サンディエゴ、Calif.）販売の商品名GCGウィスコンシンパッケージ中の「逆翻訳」機能が挙げられる。更に、例えば<http://www.entelechon.com/eng/backtranslation.html>での「逆翻訳」機能、<http://bioinfo.pbi.nrc.ca:-8090/EMBOSS/index.html>で利用できる「backtranseq」機能等の様々なリソースがコドン最適化コード領域配列へ一般に適用できる。コドンを指定するために所定の頻度に基づき基礎的アルゴリズムを構築することも又、基本的数学的能力を有する当業者により容易に達成できる。

【0221】

又別の例では、本発明の方法は、ウィルス性ワクチン、遺伝子治療用ウィルス性ベクター等種々の用途のウィルス性ゲノム合成に使用できる。ウィルス性配列は、ワクチン用弱毒化ウィルス、遺伝子治療用のより低い抗原性又は感染性を有するウィルス等の目的の特性を提供するために設計できる。例えば、弱毒化ウィルスは、広い範囲のウィルス及び／又は抗原に対するワクチンとして使用でき、抗原として、変異株、異なるウィルス若しくは他の感染性病原体（例えば、細菌、寄生虫、菌類）の抗原、又は腫瘍特異的抗原が挙げられるがこれらに限定されるものではない。又別の例では、ウィルス性複製及び腫瘍形成を阻害する弱毒化ウィルスが、感染若しくは腫瘍形成の予防若しくは治療（ウィルス性又は非ウィルス性病原体）又はIFNが治療効果を示す病気の治療に使用できる。多くの方法が、弱毒化生ウィルス配合物をヒト又は動物被検体へ注入して免疫の又は適切なサイトカイン反応を誘発するために使用される。これらとして、鼻腔内、経気管、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下経路が挙げられるがこれらに限定されるものではない。好ましくは、本発明の弱毒化ウィルスは、鼻腔内投与用に配合される。いずれの種類のウィルス性ゲノムも本発明の方法により合成でき、例えばDNAウィルスである、ワクシニア、アデノウィルス、ヘパドナウィルス、ヘルペスウィルス、ポックスウィルス、及びパルボウィルス；及びRNAウィルスである肝炎C3ウィルス、レトロウィルス、及びセグメント及び非セグメントRNAウィルス等の変異体が挙げられる。

【0222】

又別の例では、本発明の方法は、遺伝子治療に適したウィルス性ベクターの製造に使用できる。遺伝子治療は、多くの病気及び障害治療の魅力的な手法を提供する分野である。多くの病気は、遺伝子の突然変異又は欠失等の遺伝子的異常性の結果であるため、損傷した又は失われた遺伝子を完全に機能する遺伝子で交換する試みは魅力的である。ここ10年間での発癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子の研究は、癌は複数の遺伝子変化により発生する病気である証拠を次々に明らかにした（Chiaoら、1990；Levine、1990；Weinberg、1991；Sugimaraら、1992）。この発癌現象の概念に基づき、新しい治療方法が、化学的及び放射線治療法等の従来の治療法の代わりに急速に発展した（Renan、1990；Lotzeら、1992；Pardoll、1992）。これら方法の1種は、腫瘍抑制遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及び他の関係する遺伝子が悪性細胞の増殖防止に使用される遺伝子治療法である。

【0223】

遺伝子治療法は、治療的に重要な他の遺伝子を遺伝子的欠陥を修復するために細胞中へトランスファーすることを意図する。これら遺伝子的欠陥として、重度の複合型免疫不全を生じるアデノシンデアミナーゼ欠損症、B型血友病のヒト血液凝固因子IX欠損症、デュシェンヌ型筋ジストロフィのジストロフィン遺伝子欠損症、及び嚢胞性線維症の嚢胞性線維症膜貫通型受容体欠損症が挙げられる。これら病状での遺伝子トランスファーは、トランスジーンの長期間発現、及び約14kBサイズであるジストロフィンcDNA等の巨大DNAフラグメントのトランスファー能力を必要とする。

【0224】

細胞の高い効率形質導入（変換）及び治療用遺伝子の多数回投与能力が、遺伝子治療法において特に重要な点である。遺伝子を細胞中にトランスファーする作用には、細胞の原形質膜を貫通して新しい遺伝子材料をトランスファーし、次に遺伝子産物を発現させて細胞

胞へ効果を与える方法が必要である。遺伝子材料を細胞中へトランスファーする幾つかの手段があり、例えば直接注入、リポフェクション、プラスミドのトランスフェクション、又はウィルス性ベクターによる形質導入（変換）が挙げられる。細胞に感染し、遺伝子発現を生じるウィルス本来の能力により、ウィルス性ベクターは遺伝子トランスファーベクターとして魅力的である。遺伝子トランスファーベクターの他の好ましい要素として、高い形質導入（変換）効率、遺伝子材料用に対する容量の大きさ、目標遺伝子の供給性、組織特異的な遺伝子発現、及びベクターに対する宿主免疫反応の最小化能力が挙げられる。

【0225】

in vivoで製造されなかった多くのウィルス性ベクターでは、多く求められている発現レベル及び発現持続性が2個の問題として現れる。これら問題の原因の一つは、ウィルスの毒性及び免疫原性、及び特に高い投与量であると考えられる。この目標を達成する1の方法は、宿主中のウィルス性蛋白質の発現を減少又は除去することである。ウィルス遺伝子発現及びウィルス性複製の減少が、遺伝子治療法に使用される、弱毒化ウィルス性生ワクチン用、及び蛋白質製造のための細胞のin vitro形質転換用ウィルス性ベクターの開発に望ましい。アデノウィルス系におけるこの努力のための共通の手法は、ある種のウィルス性遺伝子の削除である。

【0226】

本発明の別の例では、本発明の方法は、予め決定された特異的位置での様々な修飾(modification)を有するポリヌクレオチド構造物を製造するために使用される。ポリヌクレオチド構造物内に導入される修飾として、例えば修飾された塩基(例えばメチル化された塩基等)、修飾されたリボース環、修飾された核酸塩基、修飾されたホスファート基、修飾された主鎖残基(例えば、ホスホルチオアート等)、及びペプチド核酸分子(PNAs)製品が挙げられる。これら修飾されたポリヌクレオチド構造物は、DNA診断、アンチセンス及び抗原での治療、及び分子生物学及びバイオ技術の基本的研究分野の種々の用途に有用である(U.Englisch及びD.H.Gauss、Angew.Chem.Int.Ed.Engl.1991、30、613-629；A.D.MesmaekerらCurr.OpinionStruct.Biol.1995、5、343-355；P.E.Nielsen、Curr.Opin.Biotech.、2001、12、16-20.)。PNAは、N-(2-アミノエチル)グリシンポリアミドがホスファートリボース環主鎖と置換され、メチレン-カルボニルリンカーが天然並びに非天然核酸塩基とN-(2-アミノエチル)グリシンの中央アミンとを結合しているDNAアナログである。天然構造とはかなり変化しているにも拘わらず、PNAはワトソン-クリック塩基対側に従いDNA並びにRNAへ特異的に結合できる配列である。PNAは、それらの自然な相手方よりも高い親和性で、相補的核酸へ結合するが、その理由の一部は主鎖上の負電荷の欠如、結果的に減少した電荷-電荷反発作用、及び好ましい幾何学的因子にある(S.K.Kimら、J.Am.Chem.Soc.、1993、115、6477-6481；B.Hyrupら、J.Am.Chem.Soc.、1994、116、7964-7970；M.Egholmら、Nature、1993、365、566-568；K.L.Dueholmら、新しいJ.Chem.、1997、21、19-31；P.Wittungら、J.Am.Chem.Soc.、1996、118、7049-7054；M.Leijonら、Biochemistry、1994、9820-9825.)。得られるPNA/DNAデュプレックスの熱的安定性は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度には影響されない(H.Orumら、Biotechnology、1995、19、472-480；S.Tomacら、J.Am.Chem.Soc.、1996、118、5544-5552)。更に、PNA平行又は逆平行様式のいずれでも結合でき、逆平行様式が好ましい(E.Uhlmanら、Angew.Chem.Int.Ed.Engl.、1996、35、2632-2635)。

【0227】

本発明の別の例では、本発明の方法は後成学の研究に有用なポリヌクレオチド構造物の製造に使用できる。後成学は、DNA又はRNAを含むヌクレオチドの修飾を含まない、DNA構造、クロマチン又はRNAのいずれかの変化に関係する。これら変化は、DNA又はクロマチン構造中の三次元的修飾を生じる。これら変化の例には、DNAを構成するプリン又はピリミジンの化学的修飾が含まれる。真核生物における公知の後成学レギュレーションモチーフは5'CpG'ジヌクレオチドであり、それはメチル化又は非メチル化されてもよく、それらの結果遺伝子転写をレギュレートする。原核生物における公知の後成学レギュレーションモ

チーフには配列5'GATC3'が含まれる。

【0228】

5-メチルシトシンは、最も頻繁な真核細胞のDNA中の共有塩基修飾である。それは、例えば転写のレギュレーション中、遺伝子的インプリント中、及び腫瘍形成中での役割を果たす。例えば、CpG島内のDNA異常メチル化は、広い範囲の遺伝子廃棄又は過発現を導くヒト悪性疾患に共通する(Jones、P.A.「DNAメチル化エラー及び癌」CancerRes.65:2463-2467、1996)。異常メチル化は又、特定の腫瘍において遺伝子のイントロン性及びコーディング部分のCpGリッチ調節因子内で発生することが示された(Chan、M.F.ら、「転写及びDNAメチル化間の関係」Curr.Top.Microbiol.Immunol.249:75-86、2000)。二次元電気泳動法(Restriction Landmark Genomic Scanning)を使用して、Costelloらはメチル化パターンは腫瘍種特異的であることを示すことができた(Costello、J.F.ら「異常なCpG-島メチル化は非ランダムかつ腫瘍種特異的パターンを有する。」Nature Genetics24:132-138、2000)。高度に特徴的なDNAメチル化パターンも又乳癌セルラインで示される(Huang、T.H.-M.ら、Hum.Mol.Genet.8:459-470、1999)。DNAメチル化は、例えば誘発因子への結合から転写因子を阻止することにより、遺伝子発現を直接的に阻止する。更に、メチル化DNAは、更にヒストンデアセチラーゼ(HDAC)と言われる酵素と再結合するメチル結合ドメイン(MBD)蛋白質を引きつける。HDACは、ヒストンを化学的に修飾し、クロマチン構造を変化させる作用する。クロマチン含有アセチル化ヒストンは、オープンで転写因子へアクセス可能であり、この遺伝子は潜在的に活性である。ヒストンデアセチル化はクロマチン濃縮を生じ、それを転写因子へのアクセス不能とし、従ってこの遺伝子は活性を有さない。後成学的修飾は癌等の様々な病気で重要な役割を果たすために、本発明の方法は、治療用スクリーニング、又は、例えばDNAメチル化の逆転又はヒストンデアシル化の阻害等の後成学レギュレーションの制御のための新規な治療方法の開発に有用であるポリヌクレオチド構造物の合成を可能とする。特に、本発明の方法は、メチル化残基を目的の位置に含む大きなポリヌクレオチド構造物の合成を可能とし、上記メチル化残基は、例えば様々なスクリーニング条件下でのクロマチン濃縮等の研究のために使用できる。

【0229】

11.実施システム及び方法：

本発明で開示された方法及びシステムには、構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチドの1以上のセットを設計するための、及び／又は、1又は複数の本発明のポリヌクレオチド構造物を製造するためのアセンブリ手順を設計するための方法及びシステムが含まれる。図32は、本発明の方法及びシステムの一例を説明するブロック図を示す。図32に示されるように、ユーザーインプット機器10又は別の手段を使用して、使用者は構築を目的とするポリヌクレオチド構造物の配列及び任意で他のパラメーターインプットできる。ユーザーインプット機器は、ここに記載のプロセッサ制御機器でもよく、又はユーザー又は他の人に、開示された方法及びシステムにより使用されることのできる情報及び／又はデータのインプットを可能とするユーザーインターフェースでもよい。様々な態様において、インプット配列及び／又はパラメーターはユーザーにより入力されても、ユーザーにより提供され、インターネットから入手可能であり、又はソフトウェアプログラムの一部として入手可能であるデータベースから得られてもよい。データベースから得られる配列及び／又はパラメーターは、配列及び／又はパラメーター自身のインプットではなく、ユニーク識別子を参照して提供されてもよい。ユーザーは、一本鎖又は二本鎖核酸配列(例えばDNA又はRNA配列)をインプットするか、ポリペプチド配列をインプットする。ポリペプチド配列がインプットされる場合、コンピュータは配列をリバーズ翻訳してポリペプチド配列をエンコードできる1以上の核酸配列を生成する。ユーザーは又、種々のパラメーターをインプット又は参照し、パラメータとして例えば下記が挙げられる：(i)ポリヌクレオチド構造物を発現するために使用される発現システムのアイデンティティ(例えば、宿主細胞、発現ベクター、調節塩基配列等)、(ii)ユーザーが選択オリゴヌクレオチドを使用するエラーフィルトレーション捕集プロセスを実施することを望むか否か、(iii)ユーザーが複数のポリヌクレオチド構造物を1のプール中に又は複数のプール中に構築す

ることを望むか、(iii)ユーザーが構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチド、サブアセンブリ、及び／又はポリヌクレオチド構造物を増幅することを望むか、及び／又は(iv)調節塩基配列、蛋白質コード配列、RNA-コード配列、及び／又は遺伝子間領域等の、インプット核酸配列のセクションをクラス分けする情報。説明用例に関して述べることを目的として、単一のインプット配列が参照されているが、本発明の方法及びシステムは1以上のインプット配列に適用でき、それら配列は単一の及び／又は複数のデータベース中にあるから、本明細書の記載は単に簡便性のためであり複数のインプット配列に関しても拡張できそれらを含むことは当然である。

【0230】

情報を入力するユーザーは1以上のサーバを使用し、これらサーバ本明細書に記載されている1以上のプロセッサ制御機器を共にあることは当然である。これらサーバは、ユーザー提供情報の受領用、並びに本明細書に記載の構造体オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチド、及び／又は1以上のポリヌクレオチド構造物製造用アセンブリ手順を提供及び／又は設計するためのプロセッサ実施用指令へのアクセス用指令を含む。サーバは、様々な種類の情報又は分析的方法を含む1以上のデータベースへのアクセスを有し、上記方法として例えば下記が挙げられる：様々な宿主細胞中でのコドン使用の最適化方法、融点計算方法、2以上の配列間の配列相同性計算方法、核酸配列の二次構造決定方法、制限エンドヌクレアーゼ結合及び／又は切断部位の特定方法、ミスマッチ結合蛋白質又はミスマッチ修復蛋白質等の他の蛋白質の結合及び／又は酵素的部位の特定方法、及び／又はコドン再配置配列方法。例えばユーザーは、ユーザー機器に上記ユーザー仕様の情報を提供することにより構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドを設計する場合に、1以上のこれら分析方法の使用を要求でき、上記情報は有線又は無線接続を経由して1以上のイントラネット及び／又はインターネットを使用して、サーバへ送信され、サーバはその後データベースへアクセスすることによりその要求を処理できる。これらデータベースアクセスは、ユーザー情報に基づきデータベースを尋ねることも含む。要求された質問及び／又は分析を達成するために、サーバはユーザー機器へアウトプット及び／又は結果を提供し、それらはメモリ、ディスプレイ機器、又は他の位置へ提供される。

【0231】

当業者にとっては、本明細書で説明されるシステムはクライアント-サーバパラダイムの代表例であり、ユーザー機器上のユーザー情報を得て比較を求める指令はクライアントでもよく、サーバはクライアント-サーバパラダイム内のサーバでもよいことは当然である。

【0232】

従って、ユーザー機器指令及びサーバ上の指令は、単一の機器内に含まれてもよいことは当然であり、これら例は又クライアント-サーバパラダイム内でもよいと考えられる。ユーザー機器は、有線又は無線通信を経由して1以上のイントラネット及び／又はインターネットを使用して、質問、分析、及び／又は配列修飾するためのデータベースへアクセスできる。更に、この例は、クライアント-サーバパラダイムを含まない例をも代表できる。

【0233】

図32に関して、遺伝子最適化モジュール12はユーザーによりインプットされた配列及び他のパラメーターを受領し、最適化された核酸配列を決定する。遺伝子最適化モジュールは、所定の宿主細胞中の最適化された又は正規化された発現のため及び／又は、生じる二次構造を減少させるため、インプット配列に基づきコドン再配置配列する。好ましくは、遺伝子最適化モジュールは、核酸配列を修飾するが、それによりエンコードされたポリペプチド配列を修飾しない。あるいは、遺伝子最適化モジュールは、例えば修飾の位置及び／又は特性を制御して修飾を最適化することにより(例えば、保存された残基への修飾のみをすることにより)ポリペプチド配列への修飾の効果を最小化する。コドン再配置用の様々なデータベース及びアルゴリズムは、市場入手可能であり、更に本明細書に記載される。遺伝子最適化モジュールは、最適化された配列20を生じる。

【0234】

最適化された配列20は次に、最適化された配列をフラグメントへ分割する制限モジュール22へかけられる。制限モジュールは、最適化された配列中の天然制限部位の頻度及び／又は位置に基づき、配列をフラグメントへ分割する。天然制限エンドヌクレアーゼ部位の位置が構造体オリゴヌクレオチドの設計に最適でない場合には(例えば、フラグメントは類似の長さではなく、及び／又は類似のGC含量を有する)、制限モジュールはコドン再配置配列を行い、1以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を添加又は配列から除去する。好ましくはコドン再配置は、核酸配列によりエンコードされたポリペプチドの配列に影響しないか最小限のみで影響する。あるいは、ランキング配列中に位置するタイプIIS制限エンドヌクレアーゼ結合部位を使用する場合、制限モジュールは、配列の目的とされない切断を防止するために、タイプIISエンドヌクレアーゼ用のいずれの天然結合部位をも配列から除去するコドン再配置配列を行う。又別の例では、制限モジュールは配列をほとんど同一のサイズのフラグメントへ分割する。制限モジュールは一組の配列フラグメントを製造し、それら全体でインプット配列30を特定する。

【0235】

配列フラグメント30は次にフラグメント最適化モジュール32にかけられる。フラグメント最適化モジュールは、合成された及びポリヌクレオチド構造物へアセンブルされる構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの配列を設計する。フラグメント最適化モジュールは、本発明の方法によるアセンブリを可能とするのに十分なオーバーラップ配列を有する構造体オリゴヌクレオチドの配列を設計する。フラグメント最適化モジュールは更に設計配列され(例えば、長さ選択、GC含量、又はコドン再配置により)、所定の一組のハイブリダイゼーション条件下で正規化された融点を有する構造体オリゴヌクレオチドのプールを製造する(ユーザーによりインプットされても、パラメーターファイルから選択されても、又は構造体オリゴヌクレオチド配列の設計に基づきソフトウェアにより決定されてもよい)。ユーザーが選択的ハイブリダイゼーションを使用するエラーフィルトレーション捕集を採用すると示した場合、フラグメント最適化モジュールは更に下記記載のように、構造体オリゴヌクレオチドを精製するために使用される選択オリゴヌクレオチドの1以上のセットを設計する。選択オリゴヌクレオチド配列は、構造体オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的であり、所定の構造体オリゴヌクレオチドのセットの最適な精製用セットとして設計される。好ましくは選択オリゴヌクレオチドのセットは、一組の構造体オリゴヌクレオチドとの単一の反応混合物中でのハイブリダイゼーション用に最適化される(例えば、構造体及び選択オリゴヌクレオチドのプールの融点は正規化される)。ユーザーがオリゴヌクレオチド、サブアセンブリ及び／又はポリヌクレオチド構造物のいずれかが増幅されると示した場合、フラグメント最適化モジュールは、1以上のプライマーハイブリダイゼーション部位を構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチド配列のランキング領域を追加する。これらハイブリダイゼーション部位は、インプットとして特定されるか、又はインプット配列に基づくアルゴリズムにより自動的に決定される。更に、フラグメント最適化モジュールは、制限エンドヌクレアーゼ部位をランキング領域へ追加する、例えばタイプIIS制限エンドヌクレアーゼ用認識配列(タイプIISはランキング配列を構造体オリゴヌクレオチド配列から除去する)等。好ましくは、フラグメント最適化モジュールは、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分で共通するプライマーハイブリダイゼーション部位及び／又は制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含むように、一組の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドを設計する。使用されるプライマー及び／又は制限エンドヌクレアーゼの配列は、ユーザーによりインプットされるか、フラグメント最適化モジュールにより設計される。更に、フラグメント最適化モジュールは、フラグメント間の相同性を減少させるコドン再配置も採用する。フラグメント最適化モジュール32は、合成され、インプット配列の構築に使用される構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの配列を含む配列リスト40を製造する。フラグメント最適化モジュールは又、アセンブリプロトコル50を特定する。アセンブリプロトコルは、費用、合成複雑性、又は産物純度等のプロセス検討材料に関して最適であるように設計される。アセンブリプロト

コルは、その他のものから分離的にアセンブルされるべき配列リストのサブセット、及び／又は配列リストのサブセットがアセンブルされるべき順序を特定する。配列リスト40は次に、ユーザーへ示され、コンピュータ処理可能な媒体(データベースを含む)中に保存され、及び／又は印刷されるファイルとしてアウトプット60、70される。配列リストは又、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの製造用オリゴヌクレオチド合成機へ直接アウトプットされてもよい。配列リスト及びアセンブリプロトコルは又、完全な最終配列構造物製造用遺伝子合成機へ直接アウトプットされてもよい。

【0236】

様々な態様において、ソフトウェア、又はその部分は、一般的RAM又は特別目的のコンピュータ内で実施されてもよく、用途特異的な集積回路、デジタルシグナルプロセッサ、又は他の集積回路内で実施されてもよい。

10

【0237】

本発明の方法及びシステムは、特別のハードウェア又はソフトウェア構成に限定されず、多くのコンピュータ又はプロセッシング環境内でも適用できる。本発明の方法及びシステムは、ハードウェア若しくはソフトウェア、又はハードウェア及びソフトウェアの組み合わせ内で実施できる。本発明の方法及びシステムは、コンピュータプログラムは1以上のプロセッサ実施用指令を含む1以上のコンピュータプログラム内で実施できる。コンピュータプログラムは、1以上のプログラム可能なプロセッサ上で実施でき、プロセッサ(揮発性及び不揮発性メモリ及び／又は記憶用部材等)、1以上のインプット機器、及び／又は1以上のアウトプット機器により処理可能な1以上の記憶媒体上に保存できる。プロセッサは従って、1以上のインプット機器へアクセスしてインプットデータを得ることができ、1以上のアウトプット機器へアクセスしてアウトプットデータを通信することもできる。インプット及び／又はアウトプット機器として1以上の下記が挙げられる：ランダムアクセスメモリ(RAM)、レイド(RAID)、フロッピー(登録商標)ドライブ、CD、DVD、上記ディスク、内蔵ハードドライブ、外付けハードドライブ、メモリスティック、又はここに記載のプロセッサによりアクセス可能な他の記憶装置、但し上記例は網羅的ではなく例示のためであり限定するものではない。

20

【0238】

コンピュータプログラムは、コンピュータシステムと通信するための1以上の高レベル手順又はオブジェクト指向プログラム言語を使用して実施できるが；プログラムは必要ならばアセンブリ又は機械言語でも実施できる。言語はコンパイルされても解釈されてもよい。

30

【0239】

本発明では、プロセッサは従って、独立して又はネットワーク環境内で一緒に操作できる1以上の機器内に組み込まれてもよく、ネットワークとしては、例えばローカルエリアネットワーク(LAN)、ワイドエリアネットワーク(WAN)、及び／又はイントラネット及び／又はインターネット及び／又は別のネットワークが挙げられる。ネットワークは有線又は無線でもそれらの組み合わせでもよく、1以上の通信プロトコルを使用して異なるプロセッサ間の通信を促進できる。

【0240】

プロセッサは分散処理用に構成してもよく、例えば求められるクライアントサーバモデルを使用できる。従って、本発明の方法及びシステムは複数のプロセッサ及び／又はプロセッサ機器を使用でき、プロセッサ指令はこれら単一の又は複数のプロセッサ/機器間で分割されてもよい。

40

【0241】

プロセッサと組み合わせる機器又はコンピュータシステムとして、例えば下記が挙げられるパーソナルコンピュータ、ワークステーション(作業端末)(例えばSun社、HP社製)、携帯情報端末(PDA)、携帯電話、ラップトップ、ハンドヘルド(コンピュータ)等の携帯用機器、又は本明細書記載の操作ができるプロセッサと組み合わせることのできる別の機器。但し、上記機器は網羅的ではなく例示のためであり限定するものではない。

50

【0242】

「マイクロプロセッサ」及び「プロセッサ」は、スタンドアロン及び／又は分散された状態で通信でき、従って他のプロセッサと有線又は無線を経由して通信するように構成できる1以上のマイクロプロセッサを含むことは当然であり、上記1以上のプロセッサは類似の又は異なる機器でもよい1以上のプロセッサ制御された機器上で操作するように構成できる。従ってこれら専門用語「マイクロプロセッサ」又は「プロセッサ」の使用には当然、中央演算処理装置、演算論理装置、特定用途向け集積回路(IC)、及び／又はタスクエンジンが含まれるが、上記例は例示のためであり限定するものではない。

【0243】

更に、メモリについては、特記しない限り、1以上のプロセッサ処理可能な及びアクセス可能なメモリ要素及び／又は部材を含み、それらはプロセッサ制御機器に内蔵されても、プロセッサ制御機器に外付けされてもよく、及び／又は有線又は無線ネットワーク経由で種々の通信プロトコルを使用してアクセスされてもよく、特記しない限り、外部及び内部メモリ機器の組み合わせを含むように設置でき、これらメモリは用途に応じて隣接しても及び／又は仕切られてもよい。従って、「データベース」には1以上のメモリ連合体が含まれ、これらには市販で入手可能であるデータベース産物(例えば、SQL、Informix、Oracle)及び独占排他的データベースが含まれ、又リンク、待ち行列、グラフ、ツリー等のメモリ連合用の他の構造も含むが、上記構造は例示のためであり限定するものではない。

【0244】

「ネットワーク」は、特記しない限り、1以上のイントラネット及び／又はインターネットを含む。本明細書のマイクロプロセッサ指令又はマイクロプロセッサ実施用指令には、プログラム可能なハードウェアが含まれる。

【0245】

特記しない限り、用語「実質的に」の使用は、精密な関係、条件、配置、指向、及び／又は他の特徴、並びに、当業者に理解されるようにその逸脱が開示された方法及びシステムへ本質的に影響しない範囲でのそれらの逸脱を含む。

【0246】

記載された及び／又は別に図面で表わされた、何かと通信する、関連する及び／又は基づくための要素、部材、モジュール、及び／又はそれらの部品は、特記しない限り、直接及び／又は間接に通信する、関連する及び／又は基づくものである。

【0247】

本発明のアセンブリ方法実施のためのシステム及び方法の例示的一种は、上記に記載されている。本発明のシステム及び方法は、他の適切な用途のシステム及び方法を提供するために適用され改変でき、他の追加及び改変は本発明のシステム及び方法の範囲から逸脱しない限り行うことができる。

【0248】

特記しない限り、例示された例はある例の変化する詳細の例示的特徴を提供してるので、特記しない限り、特徴、成分、モジュール及び／又は図の形状は又、本発明のシステム又は方法の範囲内で、組み合わせられ、分離された、交換され及び／又は再配置されてもよい。更に、部材の形状及びサイズも又例示的であり、特記しない限り本明細書に開示された例示的なシステム又は方法の範囲に影響しない限り変更できる。

【0249】

12. 注文設計された合成核酸の自動化システム及びプロセス：

例えば、本発明はコンピュータ技術を生物学的及び化学的处理及び合成装置と連動される方法を提供する。好ましい例では、本発明はコンピュータを、生物学的及び化学的处理及び合成に有用である装置と遠隔操作様式で連動させる方法を示す。好ましくは、本発明の方法は、1のネットワーク又は、インターネット、会社の社内ネットワーク等の内部ネットワーク等のネットワークの組み合わせ上で実施できるように連合して、その結果ユーザーが装置を遠隔操作で、表示画面は同時に又はほとんどリアルタイムでアップデートされながら制御することが可能となる。好ましくは、本発明の方法は固体相アレイと組み合

わせて使用され、化学的又は生物学的材料合成用フォトリソグラフィック又は電子化学法を使用する。

【0250】

第二の例として、本発明は生物学的又は化学的材料を離れた位置から合成又は処理するための制御用及び／又はモニター用装置のためのシステムを示す。このシステムには、装置自身から離れたコンピュータ末端、その装置をモニター又は制御するよう設計されたソフトウェア、及びその装置及びコンピュータ末端の活動部分間の通信手段が含まれる。このシステムは、好ましくはコンピュータ末端及び対象とする装置間をインターネット又は内部イントラネットを経由して通信する。当業者は、このシステム内で有用なソフトウェアは、装置自身、並びに目的の処理又は合成へ影響するように制御され又はモニターされることが必要なパラメーター及び条件に高度特異的に依存することを容易に理解する。ここで使用される用語「離れた」は、近接していないことを意味する。実際、この用語は、装置に影響しモニターするコンピュータ末端はその装置と同様の近辺でもよく、その装置から完全に異なる位置に配置されてもよいことを表す。本発明は、当業者が効果的に、装置自身から移された位置にある適切な装置を使用して生物学的又は化学的材料を処理又は合成することを可能とする。更に、本発明は、当業者が離れた位置から1以上または多数の装置の部分の制御又はモニターすることを可能とする。

【0251】

本発明は、長い合成ポリヌクレオチドの製造等の化学的又は生物学的合成分野に適用されるが、そのみには限定されない。本発明の方法は、特にDNA合成機、サーモサイクラー、サンプル供給制御用ロボット装置等の装置へ適用可能である。これら装置は本発明の方法で遠隔操作で制御されて実行中及び現在の状態のグラフィック読み出しを提供することができ、ネットワーク経由で制御可能である。

【0252】

本発明は、注文設計された合成核酸を求める需要者からの注文を自動化様式で得る製造者用プロセスであり、需要者から1以上の目的の配列を得るステップを含むプロセスであり、上記配列は一本鎖又は二本鎖核酸配列(例えば、DNA又はRNA)又はポリペプチド配列であり；合成核酸の製造用の一組の構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチドを設計するステップ；例えば一連の増幅、エラー減少、階層化アセンブリ等を含む核酸のアセンブリ方法を設計するステップ；一組の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの合成ステップ；並びに、構造体オリゴヌクレオチドをポリヌクレオチド構造物へアセンブリ手順を使用してアセンブルするステップを含むプロセスを提供する。

【0253】

好ましくは、一組の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの設計ステップは、一致する(矛盾しない)反応条件に従い相補的オリゴヌクレオチド間の結合領域を発展させることを含み、反応条件には温度、緩衝条件(例えばpH及び塩濃度等)等が含まれる。

【0254】

好ましくは、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドは、種々のアレイ合成方法のいずれかを使用して固体サポート上に合成され、アレイ合成方法として下記が挙げられる；スポットティング(例えばインクジェット方法)によるin situオリゴヌクレオチドの合成、光リソグラフィー方法によるin situオリゴヌクレオチドの合成、電子化学ベースでpH変化するin situオリゴヌクレオチドの合成、光化学ベースでpH変化によるin situオリゴヌクレオチドの合成、マスクレスアレイ合成方法、及びそれらの組み合わせ。

【0255】

本発明は更に、注文設計された合成核酸及び／又はポリペプチド配列のための需要者からの注文を得るための製造者用システムであり、下記を含むシステムを提供する：製造者が需要者から目的の合成核酸及び／又はポリペプチド配列を受領するためのネットワーク化された受け入れステーション；一組の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドを設計する及び／又はアセンブリ手順を設計するためのソフトウェア手段；並びに構造体オリゴヌクレオチドを合成し、ポリヌクレオチド構造物をアセンブルするステップを含む製造シ

システム。好ましくは、ソフトウェア手段は、実質的に均一な融点、G/Cvs.AT含量、pH、環境、緊縮性条件、又はオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション配列に一致するための他の条件を提供するための、構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチドを設計する。ソフトウェア手段は更に、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に共通するユニバーサルタグ(ユニバーサルプライマーを含む)を設計する。例えば、ソフトウェアは、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドのフランキング領域へ追加されるプライマー結合部位及び／又は制限エンドヌクレアーゼ結合及び切断部位を設計する。ソフトウェアは又、プライマー配列を設計し、制限エンドヌクレアーゼを選択し、PCR及び／又は酵素消化等に適切な反応条件を決定する。複数の構造物、好ましくは内部相同性領域を有する構造物をアセンブルする場合、ソフトウェアは更に、1のプール中で複数の構造物のアセンブリが可能なアセンブリ手順を設計する。あるいは、ソフトウェアは、ポリヌクレオチド構造物の製造用の階層化アセンブリ手順を設計する。例えば、一組の構造体及び／若しくは選択オリゴヌクレオチドの配列、並びに／又はアセンブリ手順用指令は、製造者の記憶装置中に保存される。例えば、需要者は合成用に自分の配列を提供する。あるいは、需要者は、合成用に合成核酸配列を合成核酸及び／又はポリペプチド配列のデータベースから選択できる。

10

【0256】

好ましくは、構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの設計は、一致する反応条件に従って様々な構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチド間の相補的結合領域を発達させることを含み、反応条件としては、温度、pH、緊縮度、イオン強度、親水性又は疎水性環境、ヌクレオチド含量、オリゴヌクレオチド長さ、及びそれらの組み合わせが挙げられ、融点、緊縮度及びプロトン(pH)化学アルゴリズムを有するソフトウェアプログラムが使用される。本発明の例示では、ソフトウェアプログラムは又、2以上の配列間の相同性領域を減少させるため、1以上の制限エンドヌクレアーゼ認識及び／若しくは切断部位を除去及び／若しくは追加するため、特別の発現システム中の発現を最適化若しくは正常化するため、並びに／又は二次構造の領域を減少させるために、コドン再配置により配列を最適化する。

20

【0257】

例えば、システムを使用して、研究者/需要者が離れた(需要者/研究者)位置にあるコンピュータを使用して合成核酸配列を設計できる。需要者注文は、少なくとも1のデータベースへアクセスする別のコンピュータへ送信され、構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチド及び／又はアセンブリ手順が完全設計される。あるいは、需要者の離れたコンピュータは、設計段階中に少なくとも1のデータベースへアクセスし、構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチド及び／又はアセンブリ手順の完全設計をローカルサーバへ送信する。ローカルコンピュータは、構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチド及び／又はアセンブリ手順の完全設計を自動化アレイ製作ユニットへ送信し、このユニットはアレイを一組の構造体及び／又は選択オリゴヌクレオチドの設計に従い構築する。オリゴヌクレオチドは次に、アセンブリ手順に従いポリヌクレオチド構造物へアセンブルされる。好ましくは、アセンブリはサーモサイ클ラー及び／又はサンプル混合用ロボットシステム等のコンピュータ管理装置を使用して、高処理量及び／又は自動化様式で行われる。

30

40

【0258】

本発明は更に、ユーザーはアレイ製造の場所から異なっても離れていてもよい場所で使用できるユーザーインターフェースを提供する。このインターフェースは、ユーザーへ合成される核酸配列を特定する方法、目的の用途のために認容できるエラー程度、必要とされる核酸量等を提供できる。インターフェースは、ユーザー位置からコンピュータ上で実行されるカスタムアプリケーション、商品名ジ インターネット等の(Java(登録商標)又はActiveX等を使用して)ネットワーク経由で実施されるアプレット、ダウンロード可能なアプリケーション、HTML型、DHTMLページ、XML型、又は他の技術として配布され、ユーザーとの相互作用及びデータ通信を提供する。

50

【0259】

好ましくは、ポリヌクレオチド構造物の合成は自動化されている。機器(同様に、ユーザーから離れた位置にあってもよい)は合成される核酸配列の仕様規格を受け付けてもよく、その仕様規格からポリヌクレオチド構造物を製造する。

【0260】

ユーザーの観点からは、ユーザーは第一にどの核酸配列を合成したいかと特定する。第二に、1又は複数のサーバ(ヒトが介入又は補助してもよい)は仕様を受け付け、一組の構造体オリゴヌクレオチド及び／又は選択オリゴヌクレオチド及び／又はアセンブリ手順を設計する。第三に、サーバは送信オリゴヌクレオチドセット設計及びアセンブリ手順を、オリゴヌクレオチドを合成するDNA-アレイ合成機へ送信する。第四に、オリゴヌクレオチドは、アレイから切り取られ、自動化又は半自動化様式でアセンブリにかけられる。アセンブリ手順は、複数の一連の増幅、エラー減少及び／又はアセンブリを含む。第五に、ポリヌクレオチド構造物が製造されて品質制御検査を通過した後、ポリヌクレオチド構造物はユーザーへ輸送される。

【0261】

本発明の方法の実施には、特記しない限り、細胞生物学、細胞培養学、分子生物学、トランスジェニック生物学、マイクロ生物学、組み換え型DNA技術、及び免疫学に関して当業者の技術範囲である従来技術を使用できる。これら技術は、下記刊行物に完全に説明されている、例えば、「分子クローニング実験室マニュアル」第2版、Sambrook、Fritsch及びManiatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989)；「DNAクローニング」第I及びII巻(D.N.Glover編、1985)；「オリゴヌクレオチド合成」(M.J.Gait編、1984)；Mullisら米国特許第4683195；「核酸ハイブリダイゼーション」(B.D.Hames&S.J.Higgins編、1984)；「転写及び翻訳」(B.D.Hames&S.J.Higgins編、1984)；「動物細胞の培養」(R.I.Freshney、Alan R.Liss、Inc.、1987)；「固定化細胞及び酵素」(IRL Press、1986)；B.Perbal「分子クローニングの実際的ガイド」(1984)；論文、Methods In Enzymology(Academic Press、Inc.、N.Y.)；「ほ乳類細胞用遺伝子トランスファーベクター」(J.H.Miller及びM.P.Calos編、1987、Cold Spring Harbor Laboratory)；Methods In Enzymology、Vols.154及び155(Wuら編)、「細胞及び分子生物学における免疫化学的方法」(Mayer及びWalker編、Academic Press、London、1987)；「実験的免疫学のハンドブック」第I-IV巻(D.M.Weir及びC.C.Blackwell編、1986)；「マウス胚の操作」(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1986)。

【実施例】

【0262】

本発明は上記で一般的に記載したが、下記実施例を参照して更に容易に理解される。下記実施例は本発明の特定の例を示すために記載するものであり、本発明の限定を目的とするものではない。

【0263】

実施例1：制限消化物の精製方法：

構造体オリゴヌクレオチドから制限酵素を使用してユニバーサルプライマーを除去するために、その認識部位が切断部位から、好ましくは6～8塩基以上離れているタイプII制限酵素を使用することが望ましい。これは、同一の構造体オリゴヌクレオチドプール内の、全ての同一の使用される制限部位を有するユニバーサルプライマーのかなり大きな配列多様性を可能とする。しかし、その認識部位から離れて切断する少なくともいくつかのタイプII制限酵素は、構造体オリゴヌクレオチドを有効に切断しない(しかしそれらはゲノムDNA上では有効性を示す)。発明者らは末端カッターであるBseRI及びAclI等の酵素の通常の収率は70%以下の切断であることを観察した。不完全制限消化の産物は、鎖ターミネーターであり、PAM中で切断された部分により増幅され、アセンブリを阻害する。従って、ユニバーサルプライマーを完全に除去しない制限酵素を使用する場合、構造体オリゴヌクレオチド(～50bp)を精製し、アセンブリ効率を増加させるために更に分離ステップが実施される。

【0264】

発明者らは、ビオチニル化ユニバーサルプライマー及びストレプトアビジン除去を使用して、不完全消化物を混合物からアセンブリ前に除去する新しい方法を開発した。この手順は、ビオチニル化ユニバーサルプライマーにより構造体オリゴヌクレオチドを増幅するステップ、アンプリコンプールの制限酵素で消化するステップ及びビオチニル化フラグメントをストレプトアビジンで除去するステップを含む。この方法は素早く、自動化に適している。

【0265】

この手順は、完全に切断されたDNAから、DNA制限消化から生じるDNA末端-フラグメント、及び未切断又は部分的に消化されたDNA分子を除去する。末端フラグメント、未切断及び部分的に消化された断片は全て、アセンブリ反応を妨害できる。消化され及び精製されるDNAは、ビオチン残基でそれぞれの5'末端を修飾される。これは、HPLCにより高度に精製されたビオチニル化プライマーを使用して、DNA(アセンブリ用構造体オリゴヌクレオチドのプール)を増幅することにより達成される。ビオチニル化消化産物は、下記記載のよう

10

【0266】

商品名DynaMyOneストレプトアビジンビーズ(製造番号650.02、結合能：3000pmolフリービオチン/mg(10mg/ml懸濁液))を、ビオチニル化DNA末端に対し、フリービオチン結合部位75倍モル過剰で使用した。例えば、50 μ l ビーズ懸濁液(1500pmolフリービオチン部位)を10pmol増幅されたDNA(20pmolビオチニル化末端)と結合するために使用する。ビーズは3回、同量の1×SA緩衝剤で洗浄される(0.5MNaCl、10mMトリスClpH7.5、0.5mMEDTA)。洗浄されたビーズは次にDNAサンプルへ添加され、混合され、室温で15分間インキュベートされる。反応混合物を納めた試験管は、磁気チューブホルダー(例えば商品名DynaMPC-S)へ移され、ビーズは試験管の側面へ取り除かれる(～1分)。混合物は新しい管へ移動され、この手順は残存ビーズが全て除去されるまで繰り返される。ビオチン消費したDNAサンプルは次に精製され、濃縮される。約50bp長であるDNAフラグメントを回収するために商品名QIAGEN QIA XIIキットが使用され、100bpを超えるフラグメントを精製するために商品名QIAGEN PCRスピンカラム精製キット又は類似のものが使用される。消化反応から回収された消化されたDNAの収率は、サンプルを10%TBEゲルにかけることにより、又Pico緑定量蛍光計を使用することにより決定できる。ネガティブ標準用に、非ビオチニル化DNAを使用

20

30

【0267】

ストレプトアビジンビーズ除去プロトコルは、PAM前にBseRI消化物及びIDT構造体オリゴヌクレオチドプールをクリーンアップするために使用された。実施例1～5において、「IDTレポータープール」又は「IDTオリゴヌクレオチド」は、一緒にlacZ α 及びEGFPの配列を含む52オリゴヌクレオチドのプールを言う。いずれの遺伝子も適切なプライマーを使用してプールからアセンブルできる。簡単に言うと、30pmolのIDTレポータープール構造体オリゴヌクレオチド(60pmol末端)が150 μ l 容量のBseRIで消化された。1×SA緩衝剤の添加後、これは150 μ l 商品名DynaMyOneストレプトアビジンビーズ(4500pmolビオチン結合部位フリー)を使用してクリアーにされた。ゲル定量法は、ビオチニル化BseRI消化産物のほとんど完全な除去(>95%)を示した。予想されるように、これらフラグメントのストレプトアビジン除去は406bpLacZアセンブリのPAMを可能とする。

40

【0268】

実施例2：ユニバーサルプライマーの除去方法：

制限酵素は、ステップユニバーサルプライマーを構造体オリゴヌクレオチドから除去する手段として有用である。しかし、制限配列は構造体オリゴヌクレオチド本体に現れないために、それらは構造体オリゴヌクレオチド自身の含量に制限を課す。6nt制限部位へ出会うランダム確率は、 $(1/4)^6$ 又は4096に対し1である(両ストランドでは2048に対し1)。従って制限酵素の使用は、目的の多くの遺伝子のアセンブリに対する制限となる。発明者らは、ウラシルDNAグリコシラーゼ、APエンドヌクレアーゼ及び一本鎖ヌクレアーゼを

50

使用する代わりの方法を開発した。本発明の方法は、ユニバーサルプライマー中の構造体片に直近のヌクレオチドはT又はデオキシウラシル(dU)である構造体オリゴヌクレオチドの設計を含む。構造体オリゴヌクレオチドは次に、ユニバーサルプライマーで増幅され、そのプライマーはユニバーサル片及び構造体片間の境界のユニバーサル側上の位置にdUを有する。アンプリコンプールは次にdU残基を切除するUSER(UDG及びAPエンドヌクレアーゼ)で消化された。最後に、プールは更にT4DNAポリメラーゼ等の3'→5'エキソヌクレアーゼ、又はS1又は大豆ヌクレアーゼ等の一本鎖ヌクレアーゼで消化される。

【0269】

増幅タグはmutSセグメントへ完全消化(digest off)され、完全長産物へアセンブルされた。実施例1〜5で使用されたように、mutSセグメントは〜400bp中間体構造物であり、例えば下記実施例3で記載されるように、より長いDNA構造物へアセンブリされ、mutSを使用したフィルトレーション捕集へかけられエラーを除去する。mutSセグメントは、その中の全てのTがDuで置換されているプライマーを使用して増幅される。PCR増幅産物のアリコート(5 µl)は1:10希釈されて最終容積50 µlとされる。USER酵素(5 µl)が添加され、反応物は30分間37℃で、次に15分間20℃でインキュベートされる。この混合物は次に、下記記載のように100 µl容量中の一本鎖エキソヌクレアーゼ(S1又はT4のいずれか)で消化にかけられる。

【0270】

S1ヌクレアーゼでの消化は、25 µlのUSER消化(上記)、0.3 µlのS1酵素(100ユニット/µl)、20 µlの5×緩衝剤、及び55 µlのddH₂Oを含む反応物中で行われる。消化は20分間37℃で実施される。反応物は次に再集中され、酵素は50 µlで溶出された商品名Qiexヌクレオチド除去キット(非ビーズカラム)で除去される。反応産物はアガロースゲル上で視覚化される。それぞれのmutSセグメントのために、Qiexキットからの1 µlの溶出液が1:50希釈され、25 µlのPAM反応に使用される。

【0271】

T4ヌクレアーゼでの消化は、25 µlのUSER消化、10 µlのNEバッファ2、1 µlのBSA100×、1 µlの10mM dNTP、10 µlのT4酵素(3ユニット/µl)、及び53 µlのddH₂Oを含む反応物中で行われる。消化は20分間12℃で実施され、次に20分間75℃で熱不活性化される。反応物はアガロースゲル上で、元のmutSアセンブリよりも僅かに短いバンド及びたぶん何かの塗抹を示しながら視覚化される。それぞれのmutSセグメントのために、Qiexキットからの1 µlの溶出液が1:50希釈され、25 µlのPAM反応に使用される。

【0272】

ネガティブ標準として、消化は標準(即ち非dU)プライマーで増幅されたmutSセグメントに対して実施される。この消化はmutSセグメントに対して効果がほとんど無い又は無い(S1はそれらを僅かに分解する)。

【0273】

類似の手順を使用して、増幅タグは増幅された構造体オリゴヌクレオチドへ、PAMでの使用用に完全消化された。構造体オリゴヌクレオチドは、その中の全てのTがdUで置換されているプライマーを使用して増幅された。5 µlのPCR増幅産物アリコートが次に1:10希釈され、50 µl最終容量にされる。5 µlのユーザー酵素が添加され、反応物は30分間37℃、次に15分間20℃インキュベートされる。50 µlのこの反応物は次に、一本鎖ヌクレアーゼを使用して200 µl容量中、下記記載のように消化にかけられる。

【0274】

S1ヌクレアーゼでの消化は、50 µlのUSER消化、0.3 µlのS1酵素(100ユニット/µl)、40 µlの5×緩衝剤、及び110 µlのddH₂Oを含む反応物中で行われる。消化は20分間37℃で実施される。反応物は次に再集中され、酵素は50 µlで溶出された商品名Qiexヌクレオチド除去キット(非ビーズカラム)で除去される。消化産物はアガロースゲル上へアリコートを通して評価される。

【0275】

T4ヌクレアーゼでの消化は、50 µlのUSER消化、20 µlのNEバッファ2、2 µlのBSA100

10

20

30

40

50

×、2 μ l の10mM dNTP、20 μ l のT4酵素(3ユニット/μ l)、及び106 μ l のddH₂Oを含む反応物中で行われる。消化は20分間12℃で実施され、次に20分間75℃で熱不活性化される。得られた産物はアガロースゲル上で、50bpバンド及びたぶん何かの塗抹を90bpレベルに示しながら視覚化される。

【0276】

200 μ l 消化は蛍光計を使用して測定される。PAMアセンブリはオリゴヌクレオチド当たり約30pmを使用して(蛍光計により測定される)完全に達成される。ネガティブ標準として、消化は標準(即ち非dU)プライマーで増幅されたオリゴヌクレオチドに対して実施される。この消化はオリゴヌクレオチドに対して効果がほとんど無い又は無い(S1はそれらを僅かに分解する)。

10

【0277】

実施例3: mutS-DNAを遊離DNAから分離する高処理量方法:

ゲルからバンドを切り取る代わりに、mutSへ結合しているDNAを遊離DNAから分離するためにニトロセルロース膜が使用される。ニトロセルロースは、DNAの存在下で選択的に蛋白質へ結合する。塩基配列決定は、ニトロセルロースmutS方法からのエラー比改良は、ゲル切断mutS法と同じ程度であることを示した。

【0278】

非結合DNAホモデュプレックスからのmutS/DNAヘテロデュプレックスの急速分離がニトロセルロースを使用して達成された。ニトロセルロースは、高い蛋白質結合活性を有するが、結合する二本鎖DNAへ高い、親和性では結合しない。そのためこの手順は蛋白質をDNAから急速分離する必要があるいずれの場合にも適用できる(即ち、ストレプトアビジンでの部分的消化物の精製等)。

20

【0279】

96ウェルプレート(レシーバープレート)がプレートされ、ミリポア社(商標) マルチスクリーンHTSフィルタープレート(カタログ番号MSHAN4B10)下に配置された。このフィルターを緩衝剤でプレウェットし、下記記載のように過剰の緩衝剤を回転除去した。mutS結合反応物をウェルへ添加し、カバーし、バックマン遠心分離機(ローターコード: 55700)内でS5700ローターのプレートラックを使用して2500×gで1分間回転させた。ろ液を次にレシーバープレートから回収した(例えば二本鎖DNA)。

【0280】

インプットサンプル及びろ液のアリコートのアガロースゲル(DNA回収を視覚化するため)及びSDS-PAGEゲルにかけ、インプット及びろ液サンプル中の蛋白質含量を視覚化した。アガロースゲル上の視覚化では、フィルトレーション捕集手順中にDNAはほとんど失われなかった。SDS-PAGEゲル上の視覚化では、50ng/μ l、100ng/μ l 又は200ng/μ l のmutSで実施した反応物中に蛋白質は観察されなかった。これら結果に基づくと、フィルターの結合能力は蛋白質5 μ gを超えると推定される(例えば、200ng/μ l mutS×25 μ l =5 μ g)。

30

【0281】

実施例4: ポリメラーゼアセンブリ複合化(PAM)用サーモサイクル条件の最適化:

従来のポリメラーゼアセンブリ複合化(PAM)は、(1)94℃での変性ステップ、(2)オリゴヌクレオチド設計に適切なアニール温度(55~65℃)1分間でのアニールステップ、及び(3)ポリメラーゼ供給元に推薦された温度及び時間の長さでの伸長ステップからなる~40サイクルの熱的プログラムを使用して行われる。発明者らは、上記手順への2個の改良は目的のアセンブリ産物の収率をしばしば非常に改善できることを実験的に決定した。第一に、アニール時間を1:00から3:00へ、更には10:00まで延長すると非常に収率が增加する。第二に、サーモサイクルの数を40から80まで、更には120まで増加させると非常に収率が增加する。発明者らは又、上記観察を機構的に支持する熱力学的及び反応速度論の原則に基づきPAMシミュレータを開発した。

40

【0282】

構造体オリゴヌクレオチドは、商品名Advantage 2PCR酵素、高忠実度酵素を使用して400bpセグメントへアセンブルされた。PCR反応は、テンプレートオリゴヌクレオチド、1 μ

50

1の5'プライマー(10 μ M溶液)、1 μ lの3'プライマー(10 μ M溶液)、0.5 μ lの10mM dNTPミックス、2.5 μ lの10 $\times$ PCR緩衝剤(Advantage 2キット中の「SA」緩衝剤)、0.5 μ lのAdvantage 2Eミックス及びddH₂Oで合計容量25 μ lとしたものを使用した。テンプレート濃度は、精製された二本鎖オリゴヌクレオチドを長い外側プライマーと使用した場合500pMの低さで良く、mutSプライマーをIDT-bareオリゴヌクレオチドと使用した場合1nM(オリゴヌクレオチド当たり2.5nMが最適の低濃度)の低さで良く、長いプライマーを長いプライマーを有するIDTオリゴヌクレオチドと使用したとき2.5nMの低さでよい。PCR反応は、下記の通り実施された：95 $^{\circ}$ C3分間；35サイクルの：変性95 $^{\circ}$ C30秒、アニール60 $^{\circ}$ C1分間、及び伸長68 $^{\circ}$ C1分間；68 $^{\circ}$ C10分；及び4 $^{\circ}$ C持続。コントロールは、下記の通り行われた：(1)プライマー/他の汚染物の試験のためのテンプレート無しPAM、(2)テンプレート挙動試験のためのプライマー無しPAM、及び(3)ポジティブなコントロール：少なくとも2.5nM濃度のmutSプライマーを使用したIDTBareプールテンプレート。発明者らは、アニール時間がper-オリゴヌクレオチド濃度と反比例することを観察した。非常に低濃度では、10分の長いアニールはアセンブリ達成を生じる一方、1分の短いアニールではそうならない。3分のアニール時間はPAM結果を2分の場合よりも改良し、2分の場合は結果を1分の場合よりも改良する。

10

【0283】

実施例5：mutSでのDNA合成方法及びmutHLSエラーフィルトレーション：

合成構造物は、塩基配列決定前に、クローナル精製のためにベクター中へクローンされて細胞へ形質転換される。合成構造物のベクター中への挿入後、mutHLSミスマッチ修復システムが、更に合成構造物中のエラー割合を減少させるために使用される。mutHLSはミスマッチを含むベクターを選択的に切断する。その切断されたベクターは、環状ベクターほど有効には細胞へ形質転換せず、切断されたベクターをネガティブに選択する手段を提供する。この更なるエラー減少方法は、IDTオリゴヌクレオチドからのレポーター遺伝子(lacZ)のアセンブル及び構造物のmutSフィルタリングにより行われる。遺伝子は次にベクターへクローンされ、そのクローンは2個のプールへ分割された。1のプールはmutHLSでインキュベートされ、エラーを有する全てのクローンが切断された。両方のプール(例えば、 $\pm$ mutHLS)は細胞へ(独立して)形質転換された。それぞれのセットの形質転換物からのコロニーが選択され配列された。mutHLSで切断操作されるプールは、標準よりも約2倍低いエラー割合を有していた。

20

30

【0284】

mutHLS切断反応は、下記の通り行われる。クローニングベクターへのライゲーション/再結合前に、ヘテロデュプレックスがPCR産物の変性及びリアニールにより形成される。クローンされた産物は次に、mutHLS(参照SmithJ及びModrichPPNASVol94, pp.6847-6850, June1997)を使用して、5 μ lのクローンされた産物を20 μ lのプレインキュベーション緩衝剤(125mM HEPES pH8、50mM KCl、2.5mM DTT、125 μ g/mL BSA、5mM ATP、10mM MgCl₂)と混合し、混合物を37 $^{\circ}$ Cで8分間インキュベートすることにより消化された。30 μ lのmutSLHミックス(0.166667 μ g/ μ l mutS、0.4 μ g/ μ l mutL、0.6ng/ μ l mutH、20mM カリウムホスファート、50mM KCl、0.1mMEDTA、1mM DTT、1mg/mL BSA；mutS、mutH及びmutLをUSB社から購入した)を次にクローンされた産物へ添加し、混合物は45分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートされた。第二の一連のmutHLS消化が、追加的30 μ l mutSLHミックス及び3 μ lの補助的緩衝剤(500mM HEPES pH8、200mM KCl、10mM DTT、20mM ATP、40mM MgCl₂)を添加して開始され、反応物は45分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートされた。mutHLS消化は次にQiagenQiaexIIキットを使用して酵素を除去して精製され、5 μ lのEB緩衝剤中で再懸濁された。5 μ lのmutHLS消化されたDNAが40 μ lの商品名OmniMax2コンピテント細胞へ形質転換された(20分氷上でのインキュベーションとそれに続く熱ショック)。200uLSOCブイオンを添加し、反応物を37 $^{\circ}$ C1時間でトランスファーした。次に細胞をLB/Kanプレート上にプレートした(～125 μ l)。

40

【0285】

2個の一連のmutSフィルトレーション後に測定されるmutSLH消化がエラー割合を更に減

50

少させるかを決定するために、発明者らは最初の消化を、アセンブルされ、2個の一連のmutS(6μg)フィルトレーション処理されたlacZPCR産物(IDTオリゴヌクレオチド由来)に対して実施した。この産物のエラー割合測定値は～1/1000であった。lacZアセンブリは、上記プロトコルで処理された。更に、mock消化物(mutSLHミックスの代わりにddH₂O)を標準として使用した。DNA塩基配列決定により測定された最初のエラー割合を下記に示す。

【0286】

【表1】

名称	クローン	エラー	塩基	BP/エラー
(+)mutHLS	34	5	10626	2125.2
(-)mutHLS	36	8	11212	1401.5

10

【0287】

実施例6：一本鎖ヌクレアーゼを使用するエラー減少方法：

ヘテロデュプレックスを、アセンブルされたlacZ産物(DTオリゴヌクレオチドからアセンブルされた)を変性及びリアニールして形成した。アセンブルされたlacZ産物の一部分は、ヘテロデュプレックス形成にかけられない(例えばホモデュプレックス個体数)。大豆ヌクレアーゼでの消化は、XμgのDNA(ホモデュプレックス又はヘテロデュプレックスのいずれか)、2U/μlの大豆ヌクレアーゼ、及びX緩衝剤を含む反応物中で行われた。消化は、30分間37℃で行われた。反応混合物は次にアガロースゲル上で処理され、完全長lacZ産物がゲルから単離された。ゲル精製されたlacZ産物は次にクローニングベクター中にライゲーション/再結合により導入された。ヌクレアーゼ処理されたlacZ反応産物用のエラー割合が、塩基配列決定により決定され、ホモデュプレックス混合物のエラー割合が、ヘテロデュプレックス混合物と比較により決定された。ヌクレアーゼ処理されたホモデュプレックスプール(例えば、ヌクレアーゼでの消化前に一連の変性/リアニール処理されなかったlacZ産物)のエラー割合はXであり、ヘテロデュプレックスプールのエラー割合(例えば、ヌクレアーゼでの消化前に一連の変性/リアニール処理されたlacZ産物)はXであった。従って、エラーの50%改良が一本鎖ヌクレアーゼでの処理により確認された。

20

【0288】

本発明の等価の範囲：

本発明は、中でも合成ポリヌクレオチド構造物及び合成ポリヌクレオチド構造物の製造方法を提供する。本発明の特別な例が述べられているが、上記特別な例示は説明のためのものであり本発明を限定するものではない。上記特別例に基づいて、本発明の多くの改変が当業者に明らかである。本発明の範囲及び等価の範囲はクレームに基づいて判断され、明細書も考慮されるべきである。

30

【0289】

資料としての利用：

ここで挙げられた全ての刊行物及び特許及び下記列挙されたこれら項目は、ここで資料として使用する。それら全部は、それぞれ個々に記載されているのと同様にこれら刊行物又は特許は本明細書で個々に資料として使用される。なにか矛盾が生じる場合には、本明細書の定義を含む記載が優先される。

40

同様に、下記公共データベースの見出しとなる寄託番号で記載されている核酸及びポリペプチド配列もそれら全部で資料として使用する：米国ゲノム研究機関(TIGR)(www.tigr.org)及び／又は米国国立バイオテクノロジーセンター(NCBI)(www.ncbi.nlm.nih.gov)により維持されるもの等。

【0290】

同様に下記も資料として使用する：Prodromou及びPearl(1992)ProteinEng.5：827；Dillon, P.J.及びRosen, C.A.(1993)White, B.A.(編)「PCRプロトコル：現在の方法及び用途」Humana Press, Totowa, NJ, Vol.15, pp.263267；Sardanaら(1996)PlantCellRep.15：677；Stemmer(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91：10747；Hoら(1989)Gene77：51；国際

50

公開W099/42813；W099/41007；W096/33207；W004/039953；W004/031399；W004/031351；W004/029586；W003/100012；W003/085094；W003/072832；W003/066212；W003/065038；W003/064699；W003/064027；W003/064026；W003/054、232；W003/046223；W003/040410；W002/44425；W002/095073；W002/095073；W002/081490；W002/072791；W002/04680；W002/04597；W002/02227；W001/34847；W001/34847；米国特許出願公開2004/0132029；2004/0101444；2003/0118486；2003/0068643；2004/0132029；2004/0132029；2004/0126757；2004/0110212；2004/0110211；2004/0101949；2004/0101894；2004/0014083；2004/0009520；2003/0186226；2003/0087298；2003/0068633；2002/0081582；米国特許第6670127；6664112；6650822；6600031；6586211；6566495；6521427；6489146；6480324；6444175；6426184；6406847；6375903；6372434；6365355；6346413；6346399；6315958；6291242；6287861；6287825；6284463；6271957；6165793；6150102；6054270；6027877；5953469；5928905；5922539；5916794；5861482；5858754；5834252；5750335；5744305；5702894；5700637；5679522；5605793；5556750；5459039；5445934；5436327；5436150；5424186；5405783；5356802；4999294；4965188；4800159；4683202；及び4683195。

【図面の簡単な説明】

【0291】

【図1】核酸忠実度に対するエラー割合の効果を示す表1である。

【図2】オリゴヌクレオチドの設計から予め決定された配列を有する複数のポリヌクレオチド構造物の製造までの、複数のポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリ方法の一例の概略図を示す。

【図3】構造体オリゴヌクレオチドのサブアセンブリ及び／又はポリヌクレオチド構造物へのアセンブリ方法の3個の例を示す。

【図4】複数の一連のアセンブリを含むポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の概略図を示す。

【図5】ユニバーサルプライマーを使用してオリゴヌクレオチドプールを増幅する、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の概略図を示す。

【図6】構造体オリゴヌクレオチドのプールを増幅するユニバーサルプライマーの1セット及び、サブアセンブリを増幅するユニバーサルプライマーの1セットを使用する、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を表す概略図である。

【図7】反復的一連のエラー減少及び／又は増幅及びアセンブリを含む、ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を示す概略図である。

【図8】オリゴヌクレオチドプールをエラー減少プロセス前に一連の変性/再生処理をすることによる、エラー減少プロセスの効率の1の増加方法を示す概略図である。

【図9】結合されたオリゴヌクレオチドを有する固体サポート上の様々な位置を示す。

【図10】ウラシル-DNAグリコシラーゼを使用して一時的プライマーを除去する方法の一例を示す概略図である。

【図11】内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバー産物を示す。

【図12】内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバーポリマー化を示す。

【図13】相同性領域を含有する環形選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を示す。

【図14-1】相同性領域を含有する環形選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の別の例の手順A-Eを示す。

【図14-2】相同性領域を含有する環形選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の別の例の手順F-Gを示す。

【図15】相同性領域を含有するサイズ選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の一例を示す。

【図16】相同性領域を含有するサイズ選択複合ポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法の別の例を示す。

10

20

30

40

50

【図17-1】内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施する場合又は、自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバーを手順A-Gについて示す。

【図17-2】内部の相同な領域を有するポリヌクレオチド構造物の複合アセンブリを実施する場合又は、自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブリを実施する場合に生じる可能性のあるクロスオーバーを手順H-Kについて示す。

【図18】内部相同性及び／又は自己相補的領域を有するポリヌクレオチド構造物のアセンブリ用の、例示的構造物オリゴヌクレオチドのセットを示す。

【図19】「ハイブリダイゼーション選択」と言われるエラーフィルトレーション捕集方法の概略図を示す。

【図20】ミスマッチ結合蛋白質を使用するエラー配列の除去方法を示す。

【図21】ミスマッチ修復酵素用切断部位を含有する、ミスマッチ結合蛋白質及びユニバーサルタグを使用する別のエラー配列の除去方法を示す。

【図22】ミスマッチ認識蛋白質でのエラー配列のニュートラル化を示す。

【図23】一本鎖ヌクレアーゼを使用するエラー減少方法を示す。図中、Xは、配列エラーを表す。

【図24】ストランド特異的エラー減少方法の一例を示す。

【図25】両ストランド上のミスマッチ部位でのDNAの局部的除去方法の一例を示す。

【図26-1】両ストランド上のミスマッチ部位でのDNAの局部的除去方法の別の一例の手順A-Dを示す。

【図26-2】両ストランド上のミスマッチ部位でのDNAの局部的除去方法の別の一例の手順E-Gを示す。

【図27】塩基エラー(ミスマッチ)を有するオリゴヌクレオチドを切断するために使用される例示的ミスマッチ結合薬剤を示す。

【図28】それぞれ単一の塩基(ミスマッチ)エラーを有する2個のDNAデュプレックスへ適用される図20の方法の効果のまとめである。

【図29-1】ミスマッチ含有セグメントの半選択的除去の一例の手順A-Cを示す。

【図29-2】ミスマッチ含有セグメントの半選択的除去の一例の手順D-Fを示す。

【図30】合成されたDNA中の関連付けられたエラーを減少する手順を示す。

【図31】低純度アレイからの、オリゴヌクレオチドを使用したポリヌクレオチド構造物のアセンブリ方法を示す。

【図32】一組の構造物オリゴヌクレオチド、選択オリゴヌクレオチド、及び／又はアセンブリ法を設計するのに有用なソフトウェアの概略を示す。

10

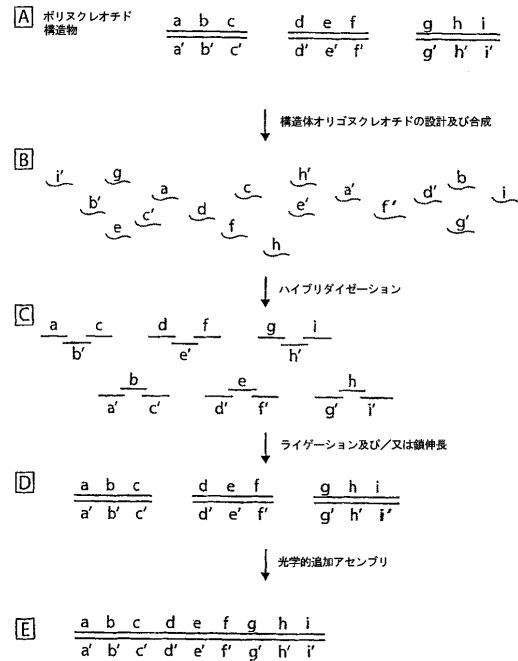
20

30

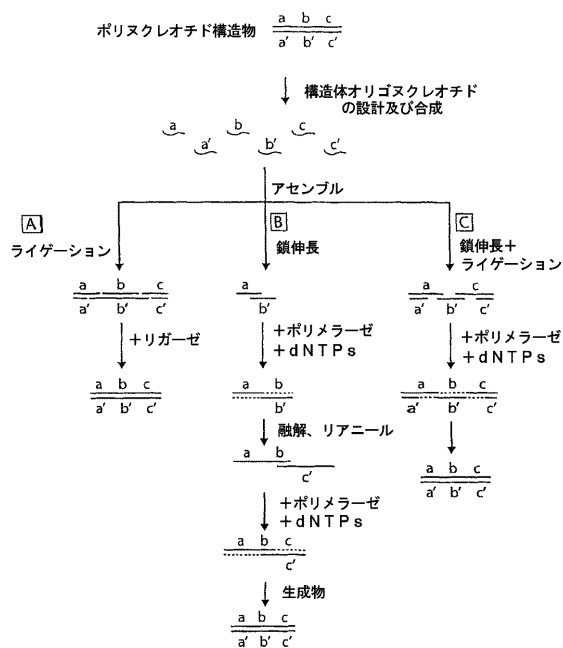
【図 1】

ポリヌクレオチド長	塩基エラー割合の逆数	正確なコピーのフラクション
1000	20	5.2918E-23
	50	1.683E-09
	100	4.3171E-05
	200	0.00665397
	1000	0.36769542
	10,000	0.90483289
2000	100,000	0.99004978
	200	4.4275E-05
	1000	0.13519993
	10,000	0.81872257
3000	100,000	0.98019858
	200	2.9461E-07
	1000	0.04971239
	10,000	0.74080711
10,000	100,000	0.97044539
	1000	4.5173E-05
	10,000	0.36786105
	100,000	0.90483697

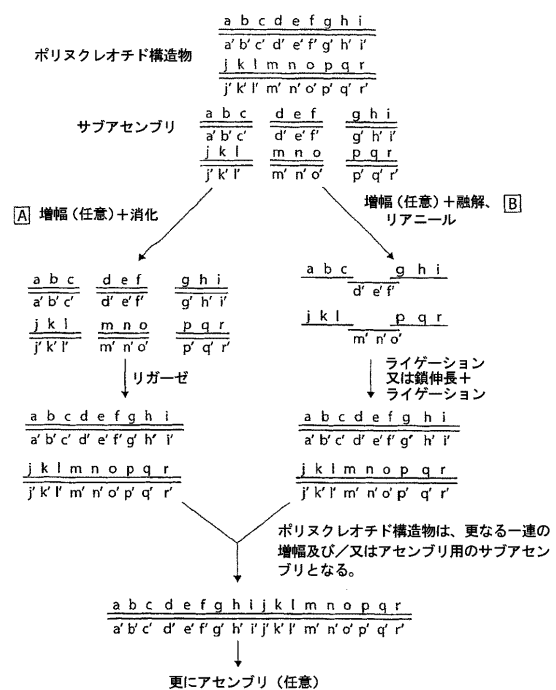
【図 2】



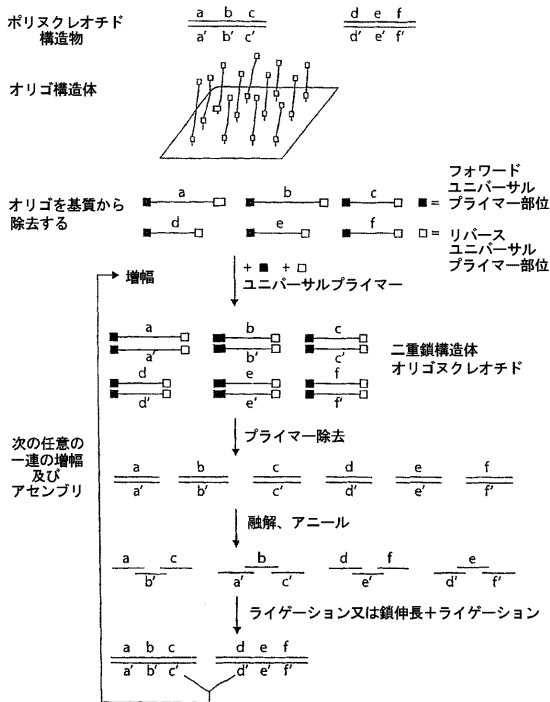
【図 3】



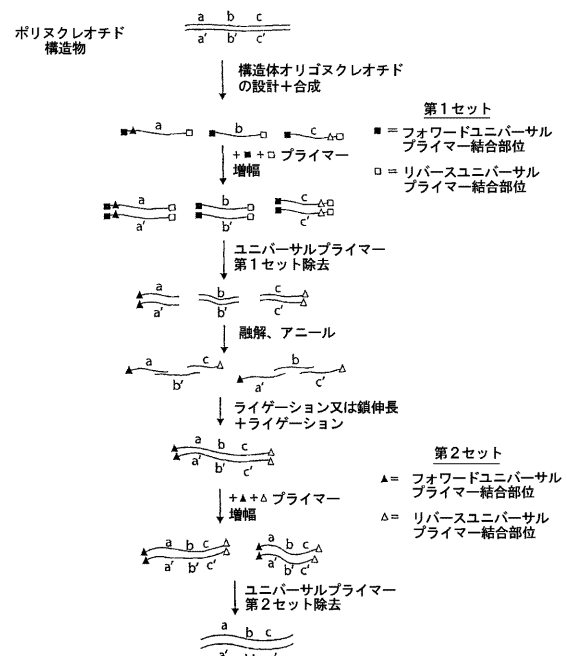
【図 4】



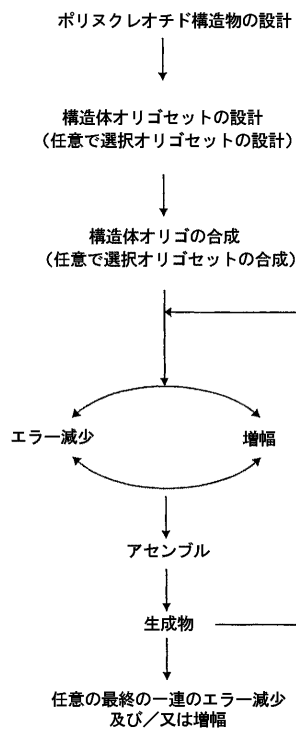
【図 5】



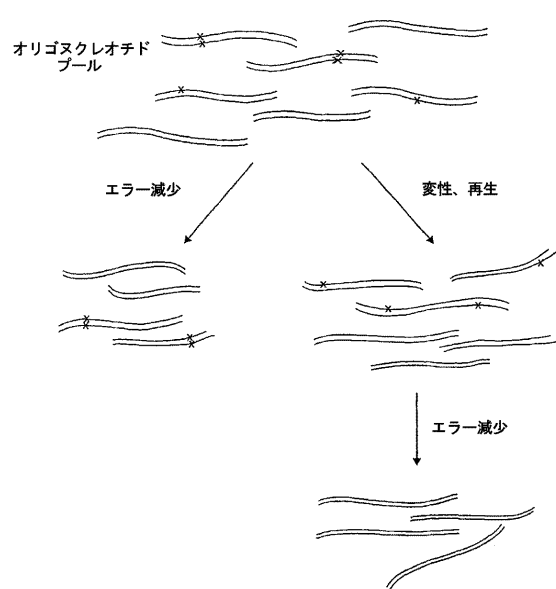
【図 6】



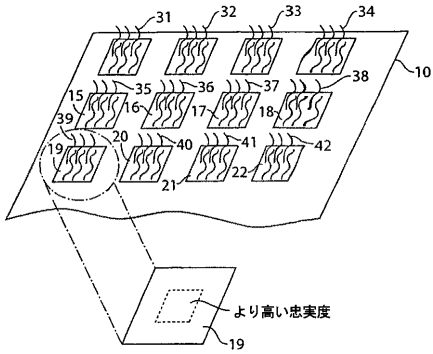
【図 7】



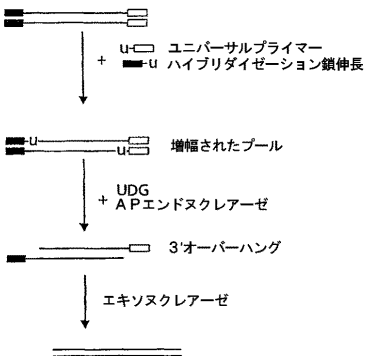
【図 8】



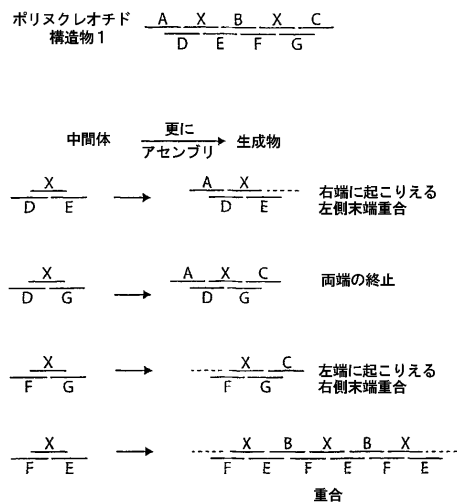
【図 9】



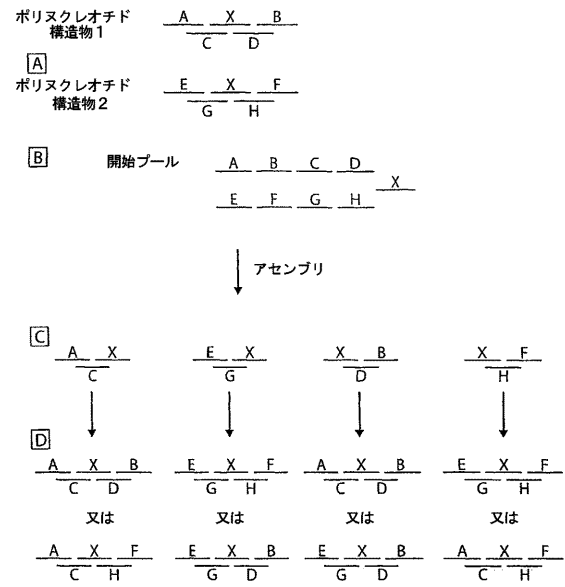
【図 10】



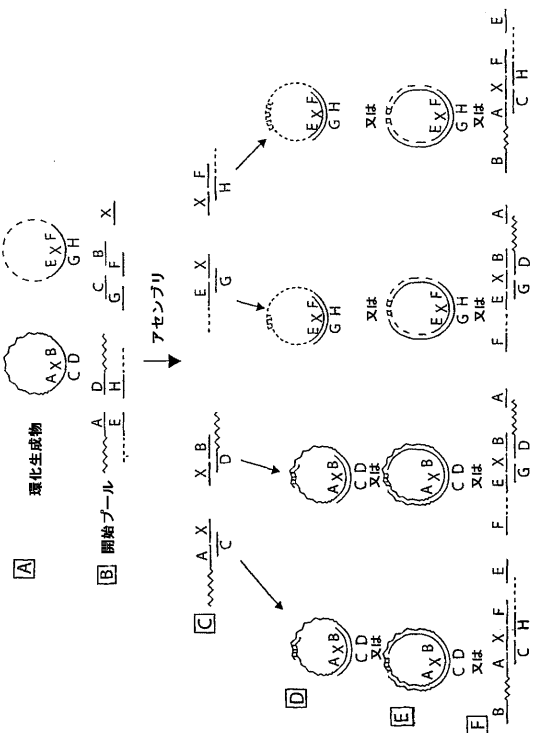
【図 12】



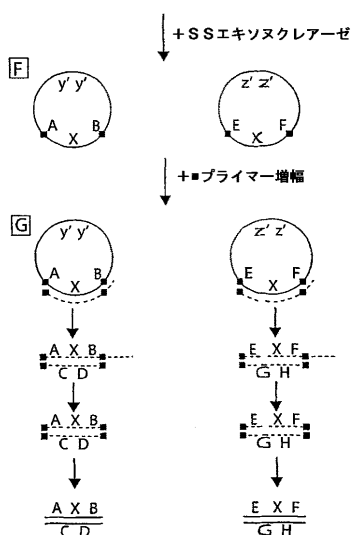
【図 11】



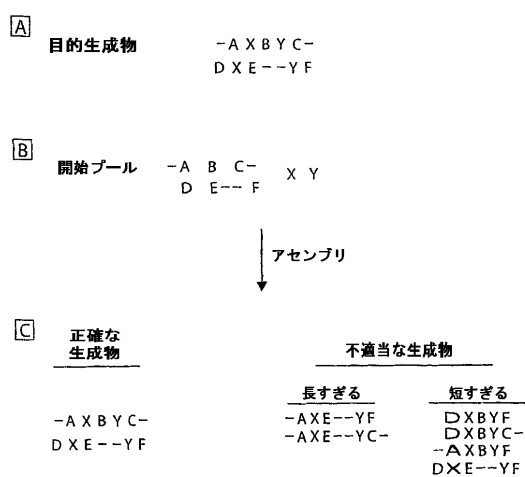
【図 13】



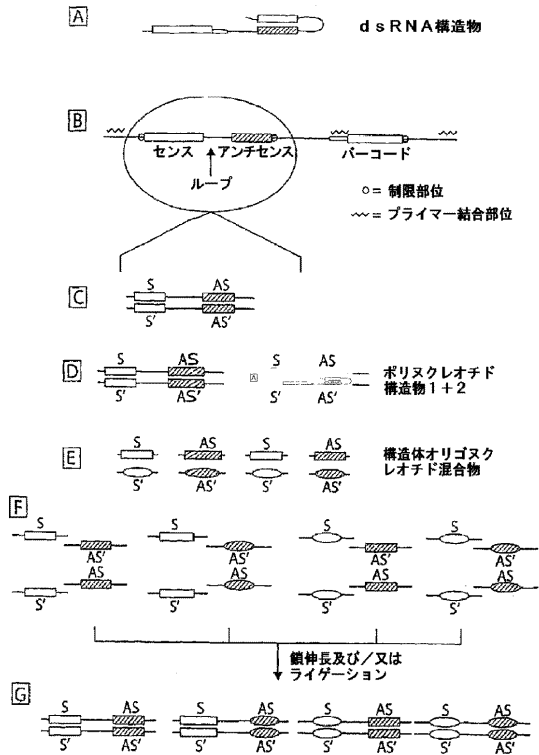
【图 14-2】



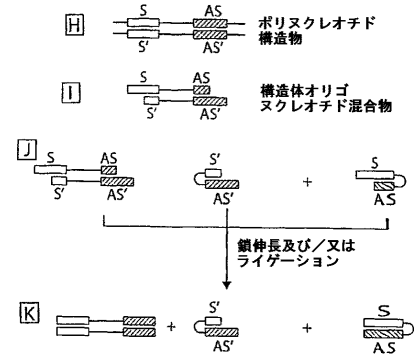
【图 16】



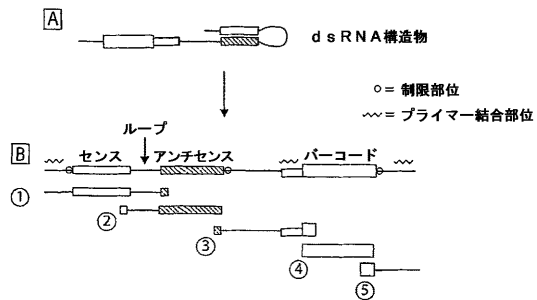
【図 17-1】



【図 17-2】



【図 18】



【図 19】

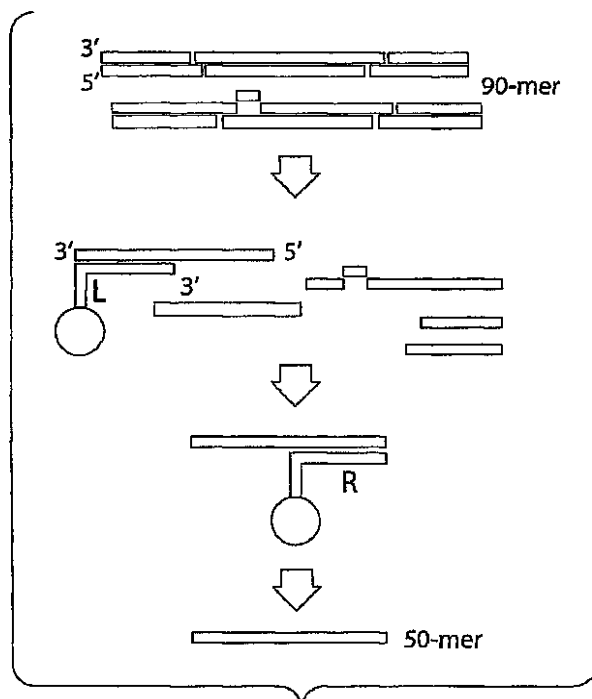
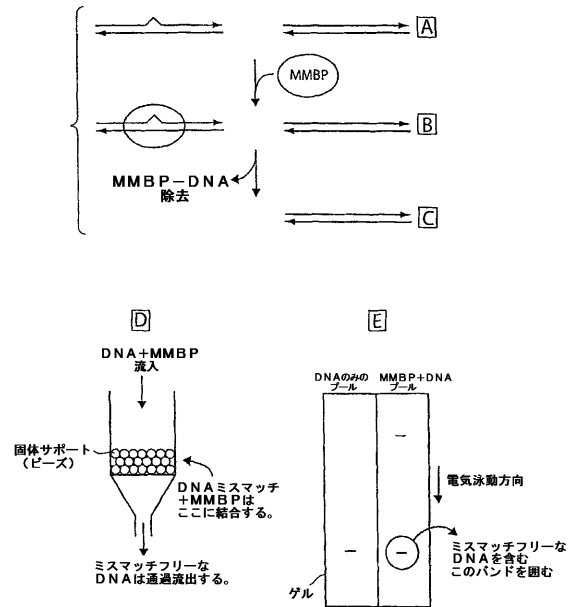
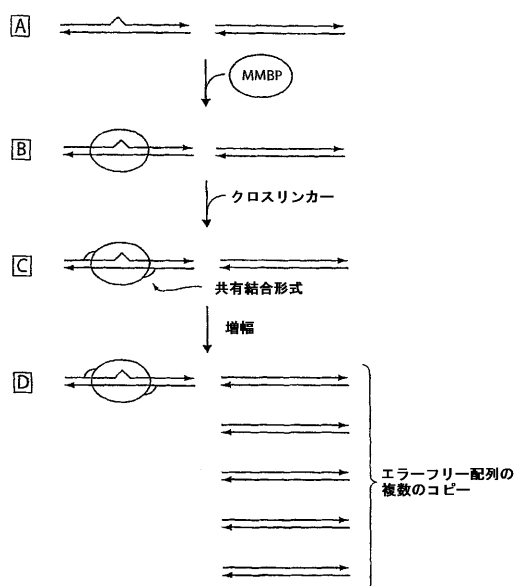


Fig. 19

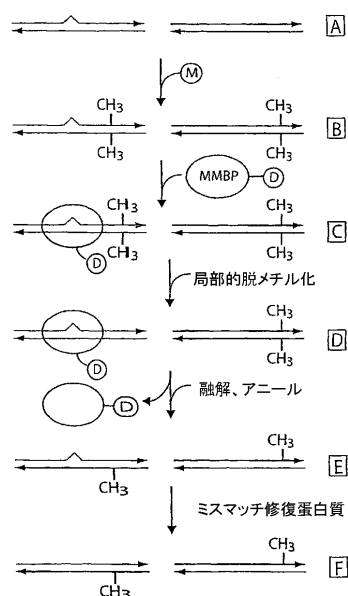
【図 20】



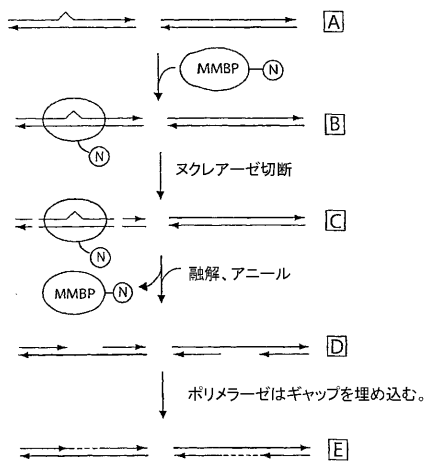
【图 2 2】



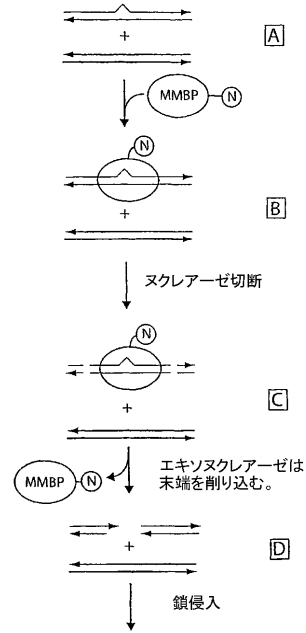
【图 2 4】



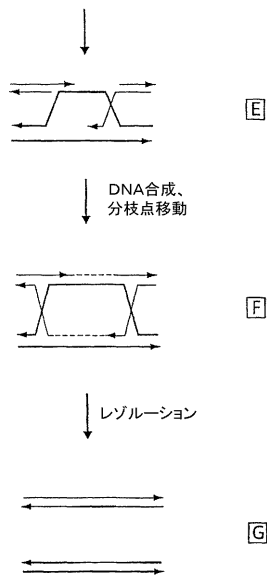
【図 25】



【図 26-1】



【図 26-2】



【図 27】

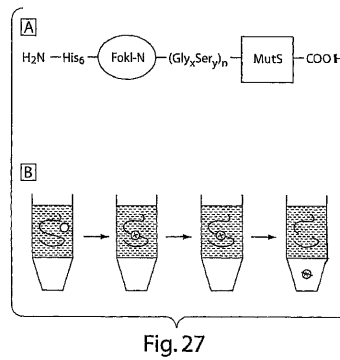
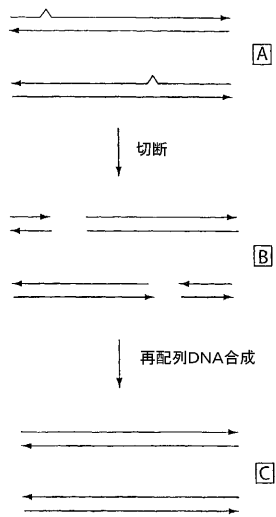
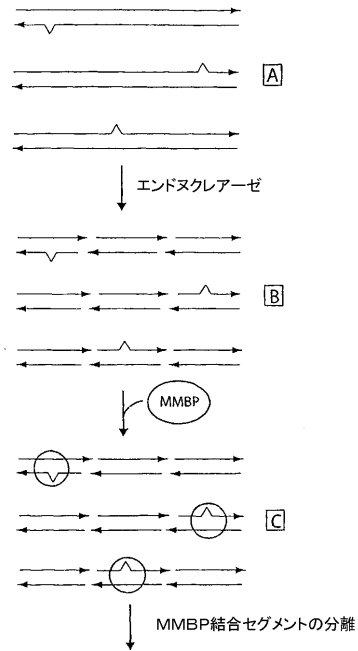


Fig. 27

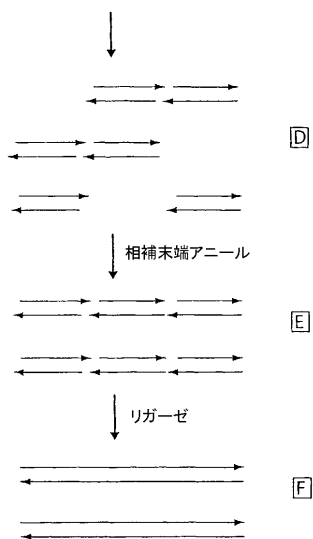
【図 28】



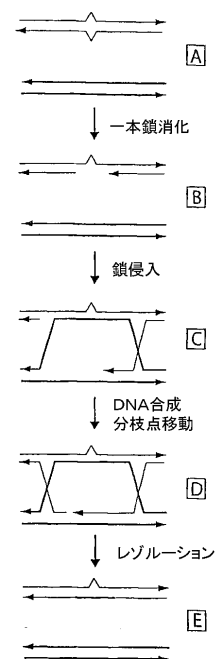
【図 29 - 1】



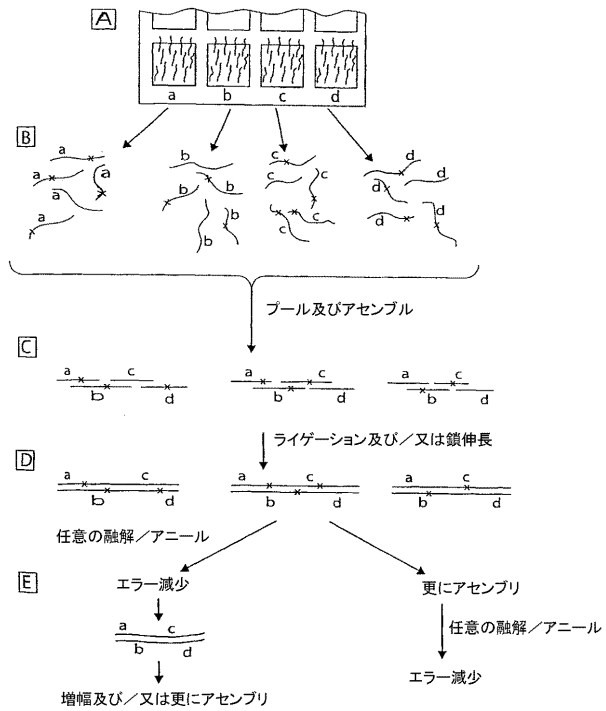
【図 29 - 2】



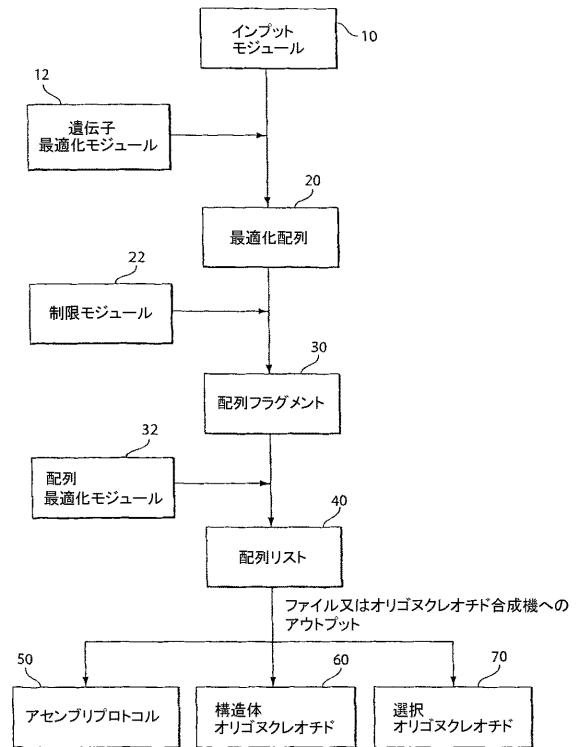
【図 30】



【図 3 1】



【図 3 2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/037571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68		
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) C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90/00626 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 25 January 1990 (1990-01-25) the whole document	
A	WO 00/29616 A (THE PERKIN-ELMER CORPORATION) 25 May 2000 (2000-05-25) the whole document	
A	WO 03/033718 A (GLOBAL GENOMICS AB; LINNARSSON, STEN) 24 April 2003 (2003-04-24) the whole document	
A	US 6 670 127 B2 (EVANS GLEN A) 30 December 2003 (2003-12-30) the whole document	
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 document 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 8 March 2006		Date of mailing of the international search report 20/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aguilera, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/037571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE IRRELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAI-BAO CHEN ET AL: "A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF A STRUCTURAL GENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 18, no. 4, 25 February 1990 (1990-02-25), pages 871-878, XP000099685 ISSN: 0305-1048 the whole document	
A	BOOTH P M ET AL: "ASSEMBLY AND CLONING OF CODING SEQUENCES FOR NEUROTROPHIC FACTORS DIRECTLY FROM GENOMIC DNA USING POLYMERASE CHAIN REACTION AND URACIL DNA GLYCOSYLASE" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 146, no. 2, 1994, pages 303-308, XP002071998 ISSN: 0378-1119 the whole document	
A	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, 1995, pages 49-53, XP004041916 ISSN: 0378-1119 the whole document	
A	RICHMOND K E ET AL: "Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, IRL PRESS LTD., OXFORD, GB, vol. 32, no. 17, 2004, pages 5011-5018, XP002344586 ISSN: 0305-1048 the whole document	
A	TIAN JINGDONG ET AL: "Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips" NATURE (LONDON), vol. 432, no. 7020, 23 December 2004 (2004-12-23), pages 1050-1054, XP002371017 ISSN: 0028-0836 the whole document	

International Application No. PCT/US2005 /037571

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-304

The present application contains 304 claims, of which 15 are different independent method claims, and 6 are different independent product claims. This large number, the claim structure and also the wording of the claims render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought. Hence, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of PCT Article 6 (see also PCT Rule 6.1(a)) to such an extent that a meaningful search on the basis of the claims is impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely the methods described in Examples 1-5 and, based on those methods, a generalisation of their technical features to encompass a method for assembling a polynucleotide construct having a predefined sequence comprising:

- a) providing a pool of construction oligonucleotides having partially overlapping sequences that define the sequence of the polynucleotide construct and flanked by primer hybridization sites;
- b) amplifying said construction oligonucleotides using said primers;
- c) removing mismatched duplex products from the mixture; and
- d) assembling the amplified oligonucleotides by means of ligation or chain extension.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/037571

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-304
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International application No

PCT/US2005/037571

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9000626	A	25-01-1990	AU 3869289 A EP 0427745 A1 JP 3505966 T	05-02-1990 22-05-1991 26-12-1991
WO 0029616	A	25-05-2000	AT 265545 T AU 770217 B2 AU 5783899 A CA 2353076 A1 DE 69916877 D1 DE 69916877 T2 EP 1129215 A1 JP 3544945 B2 JP 2002531071 T US 5942609 A	15-05-2004 19-02-2004 05-06-2000 25-05-2000 03-06-2004 24-03-2005 05-09-2001 21-07-2004 24-09-2002 24-08-1999
WO 03033718	A	24-04-2003	NONE	
US 6670127	B2	30-12-2003	US 2003165946 A1 US 6521427 B1 US 2003087238 A1	04-09-2003 18-02-2003 08-05-2003

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 11/068,321
 (32)優先日 平成17年2月28日(2005.2.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/657,014
 (32)優先日 平成17年2月28日(2005.2.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/698,560
 (32)優先日 平成17年7月12日(2005.7.12)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/727,205
 (32)優先日 平成17年10月14日(2005.10.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジョージ チャーチ
 アメリカ合衆国 02446 マサチューセッツ、ブルックリン、セント ストリート 218
 (72)発明者 ジョセフ ジェイコブソン
 アメリカ合衆国 02459 マサチューセッツ、ニュートン、グラント アベニュー 223
 (72)発明者 ブライアン エム. ベインズ
 アメリカ合衆国 02138 マサチューセッツ、ケンブリッジ、オアリン ストリート 19
 (72)発明者 ケネス ガブリエル ネスミス
 アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ、ケンブリッジ、ハンプシャー ストリート 125、アパートメント 5
 (72)発明者 ブラッド アラン チャップマン
 アメリカ合衆国 02144 マサチューセッツ、サマヴィル、スペンサー アベニュー 40
 (72)発明者 ベティーナ ストラッカーローグ
 アメリカ合衆国 02144 マサチューセッツ、サマヴィル、エンディコット アベニュー 26

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA20 HA20
 4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15
 4B063 QA13 QQ42 QR55 QR82