

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6118725号  
(P6118725)

(45) 発行日 平成29年4月19日 (2017. 4. 19)

(24) 登録日 平成29年3月31日 (2017. 3. 31)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 37/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 F

G O 1 N 37/00 1 O 2

請求項の数 29 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2013-538904 (P2013-538904)  
 (86) (22) 出願日 平成23年11月10日 (2011. 11. 10)  
 (65) 公表番号 特表2014-504153 (P2014-504153A)  
 (43) 公表日 平成26年2月20日 (2014. 2. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/060243  
 (87) 国際公開番号 W02012/078312  
 (87) 国際公開日 平成24年6月14日 (2012. 6. 14)  
 審査請求日 平成26年11月7日 (2014. 11. 7)  
 (31) 優先権主張番号 61/418, 095  
 (32) 優先日 平成22年11月30日 (2010. 11. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/466, 814  
 (32) 優先日 平成23年3月23日 (2011. 3. 23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513117136  
 ジェン9・インコーポレイテッド  
 Gen 9, INC.  
 アメリカ合衆国02139マサチューセッ  
 ツ州ケンブリッジ、メモリアル・ドライブ  
 840番、フィフス・フロア  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (74) 代理人 100157956  
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸合成のための方法およびデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

予め定義された配列を有する少なくとも1種のポリヌクレオチドを製造する方法であって、

a. 少なくとも第1および第2の複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドを提供すること、ここで、第1および第2の複数のオリゴヌクレオチドの各々が、予め定義された配列を有し、1つ以上の支持体の別個の機構と結合しており、第1の複数のオリゴヌクレオチドの各々が、その末端に、第2の複数のオリゴヌクレオチドの末端の配列領域と相補的である配列領域を含む；

b. 鎖伸長反応において、第1および第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドと相補的である少なくとも第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを作製すること；

c. アンカー支持体上の選択された機構で、複数の支持体結合アンカー一本鎖オリゴヌクレオチドを提供すること、ここで、複数のアンカーオリゴヌクレオチドの遊離末端が、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの末端の配列領域と同一である；

d. 1つ以上の支持体をアンカー支持体とアラインすること；

e. 第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを、複数のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすること；

f. 任意に、少なくとも第3の複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドを使用して、ステップbからeをさらに逐次反復し、複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドの

10

20

各々が、その末端に、次の複数のオリゴヌクレオチドの末端の配列領域と相補的である配列領域を含み、それによって、少なくとも1種のポリヌクレオチドを製造すること、を含む、方法。

【請求項2】

少なくとも第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを、少なくとも第1および第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドから鎖伸長反応後に解離すること、および

第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第1の機構から選択された機構へ移すこと、および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第2の機構から選択された機構へ移すことをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

さらに、

第3の複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドを提供すること、ここで、第3の複数のオリゴヌクレオチドの各々が、予め定義された配列を有し、1つ以上の支持体の第3の別個の機構と結合しており、第3の複数のオリゴヌクレオチドの各々が、その末端に、第2の複数のオリゴヌクレオチドの末端の配列領域と相補的である配列領域を含む；

鎖伸長反応において、第3の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドと相補的である第3の複数の構築オリゴヌクレオチドを作製すること；

選択された機構で、少なくとも第1、第2および第3の複数の構築オリゴヌクレオチドを、複数のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすること；および

少なくとも第1、および第3の複数の構築オリゴヌクレオチドをライゲーションし、それによって、少なくとも1種のポリヌクレオチドを製造すること、を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの各々が、その3'末端にプライマー結合部位を有し、

前記方法が、プライマーの伸長を促進する条件下で、プライマーを、少なくとも第1および第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングし、それによって伸長生成物二本鎖を形成することをさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの各々が、1つ以上の支持体上で合成されるか、またはスポットされ、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの各々が、その3'末端によって1つ以上の支持体上に固定化される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの各々が、その3'末端によって1つ以上の支持体上に固定化される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

1つ以上の支持体が、マイクロアレイデバイスである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

N種類の複数の予め定義された支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドを提供すること、ここで、第N番目の複数のオリゴヌクレオチドが、その末端に、第(N-1)番目の複数のオリゴヌクレオチドの末端の配列領域と相補的である配列領域を含む、を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

鎖伸長反応において、N種類の複数の予め定義された支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドと相補的であるN種類の複数の構築オリゴヌクレオチドを作製することをさらに含む、ここで、N種類の複数の構築オリゴヌクレオチドが、1つもギャップを含まずにポリヌクレオチドの全配列にまたがる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの3'末端配列領域が、アンカーオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドの 5' 末端領域と同一である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

鎖伸長反応生成物を解離し、それによって、N 種類の複数の構築オリゴヌクレオチドを放出することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 2】

プライマーが、少なくとも 1 個のウラシルを含み、前記方法が、ウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) および DNA グリコシラーゼ - リアーゼエンドヌクレアーゼ V I I I の混合物を使用して、プライマーを除去することをさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 1 3】

予め定義された配列を有するポリヌクレオチドを合成する方法であって、

a. (i) 第 1 の複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド、ここで、第 1 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドの末端が第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドの末端と相補的である、を有し、かつ任意に (ii) 第 2 の複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド、ここで、第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドの末端が第 N 番目の複数の構築オリゴヌクレオチドと相補的である、を有する、アンカー支持体を提供すること；

b. 鎖伸長反応においてテンプレートとしての N 種類の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを使用する、N 種類の複数の構築オリゴヌクレオチドを 1 つ以上の支持体上で合成すること、ここで、N 種類の複数の構築オリゴヌクレオチドが共に 2 つの一本鎖オーバーハングを含む複数の二本鎖ポリヌクレオチドを形成し、ここで、第 1 の一本鎖オーバーハングが第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドの末端配列を含み、さらに第 2 の一本鎖オーバーハングが、第 N 番目の複数の構築オリゴヌクレオチドの配列を含む；

c. 一つ以上の支持体をアンカー支持体とアラインすること；

d. 第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第 1 のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、第 N 番目の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第 (N - 1) 番目の複数の構築オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすること；および

e. 任意に、ポリヌクレオチドの第 2 の一本鎖オーバーハングと第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドをハイブリダイズし、それによって、予め定義された配列を有するポリヌクレオチドを選択すること、

を含む、方法。

【請求項 1 4】

遊離 3' または 5' 末端を有するポリヌクレオチドをさらに分解すること；

アンカー支持体から予め定義された配列を有するポリヌクレオチドをさらに放出すること；

I I 型エンドヌクレアーゼ、またはウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) および DNA グリコシラーゼ - リアーゼエンドヌクレアーゼ V I I I の混合物を使用すること、の一つ以上をさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

第 1 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドが、第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドから、予め定義されたポリヌクレオチドの長さに対応する距離だけ離れている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

アンカー支持体が、第 1 および第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチド間の距離を設定する支持体結合スパーサー一本鎖オリゴヌクレオチドをさらに含み、第 1 および第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチド間の距離が、第 1 および第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドの濃度およびスパーサーオリゴヌクレオチドの濃度の関数である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

a. 1 つ以上の固体支持体；

b. 1 つ以上の固体支持体と関連している複数の別個の機構、ここで、各機構が、予め定義された配列を有する複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを含み、第 1 の複数のオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドが、その末端に、第2のオリゴヌクレオチドの末端の配列領域と相補的である配列領域を含み、第N番目の複数のオリゴヌクレオチドが、その末端に、第(N-1)番目の複数のオリゴヌクレオチドの末端配列領域と相補的である配列を含む；および

c. 各々が、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの配列領域と同一である配列を末端に含む、少なくとも第1の複数のアンカーオリゴヌクレオチドを有する、1つ以上の支持体とアラインされたアンカー支持体、を含む、核酸アレイ。

【請求項18】

第2の複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチドをさらに含み、第2のアンカーオリゴヌクレオチドの遊離末端が、第N番目の複数のオリゴヌクレオチドの末端領域と同一である、請求項17に記載の核酸アレイ。

【請求項19】

予め定義された配列を有する複数のポリヌクレオチドを製造する方法であって、

a. 複数の機構を有する第1および第2の支持体を提供すること、ここで、各機構は、異なる予め定義された配列を有する複数の異なる支持体結合オリゴヌクレオチドを含む；

b. 複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを鎖伸長反応の鋳型として使用して、第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを作製すること、ここで、第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドは、それらの末端に互いの末端と相補的な配列を有する；

c. 複数の機構を含むアンカー支持体を提供すること、ここで、各機構が、複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチドを含み、複数のアンカーオリゴヌクレオチド各々の5'末端が、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である；

d. 第1の支持体とアンカー支持体をアラインし、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを、アンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすること；

e. 第2の支持体とアンカー支持体をアラインし、第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすること；

f. 任意に、第3の複数の構築オリゴヌクレオチドを、第2の複数の構築オリゴヌクレオチドと逐次ハイブリダイズすること；および

g. 任意に、第1および第3の複数の構築オリゴヌクレオチドをライゲーションすること、

を含む、方法。

【請求項20】

複数の構築オリゴヌクレオチドの各々が異なる支持体上で合成されること；

複数の異なるポリヌクレオチドが、アンカー支持体の異なる機構でアセンブルされること；

オリゴヌクレオチドを作製するステップが、鎖伸長反応を促進する条件下で、少なくとも1個のウラシルを有するプライマー配列を、各々の支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングすること、およびウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物を使用して、プライマーを除去することを含むこと、

のいずれか1つ以上が適用される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

予め定義された配列を有する複数の標的ポリヌクレオチドを合成する方法であって、

a. 複数の機構を含む第1の支持体を提供すること、ここで、各機構は、複数の一本鎖支持体結合アンカーオリゴヌクレオチドを含み、複数のアンカーオリゴヌクレオチド各々の5'末端が、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である；

b. 複数の機構を有する第2の支持体を提供すること、ここで、各機構は、異なる予め定義された配列を有する複数の一本鎖支持体結合オリゴヌクレオチドを含む；

c. 第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを鋳型として使用するポリメラーゼ鎖伸長によって、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを作製すること；

d. 第2の支持体の各機構が、第1の支持体の対応する機構に対してアラインされるよ

10

20

30

40

50

うに、第 1 および第 2 の支持体を配置すること；

e . 第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドと複数のアンカーオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを促進する条件下で、第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドを溶液中に放出して、複数の標的ポリヌクレオチドを形成すること；および

f . 任意に、第 2 の複数の構築オリゴヌクレオチドを含む第 3 の支持体を用いてステップ b ~ e を反復すること、ここで、第 2 および第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドは、それらの 3 ' 末端に互いの末端と相補的な配列を有する、  
を含む方法。

#### 【請求項 2 2】

オリゴヌクレオチドを作製するステップが、プライマーの鎖伸長を促進する条件下で、  
少なくとも 1 個のウラシルを有するプライマー配列を、第 1 の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングすること、およびウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) および DNA グリコシラーゼ - リアーゼエンドヌクレアーゼ V I I I の混合物を使用してプライマーを除去すること；

第 2 の支持体が、第 1 の支持体の上部に向かい合って配置されること；

放出するステップによって、アンカーオリゴヌクレオチドに向けた第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドの拡散が可能になること；および / または

第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドの化学量論が、アンカーオリゴヌクレオチドの化学量論よりも高い、

のいずれか 1 つ以上が適用される、請求項 2 1 に記載の方法。

#### 【請求項 2 3】

アンカーオリゴヌクレオチドおよび第 2 の複数の構築オリゴヌクレオチドをライゲーションすること、および / または複数の標的ポリヌクレオチドを、ミスマッチヌクレオチドを含有する二本鎖ポリヌクレオチドの切断に適した条件下で、ミスマッチを認識し、切断する成分に曝露すること、をさらに含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

#### 【請求項 2 4】

放出するステップが、アンカーオリゴヌクレオチドに向けた構築オリゴヌクレオチドの実質的な垂直拡散を可能にする多孔性膜の存在下にあり、多孔性膜が、構築オリゴヌクレオチドの側方拡散を低減する、請求項 2 1 に記載の方法。

#### 【請求項 2 5】

第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドと第 2 の複数の構築オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションをさらに含む、請求項 2 1 に記載の方法。

#### 【請求項 2 6】

溶液が、リガーゼを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

#### 【請求項 2 7】

複数の標的ポリヌクレオチドが、第 1 の支持体上に固定化されているか、または溶液中にある、請求項 2 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 2 8】

ミスマッチを認識し、切断する成分が、ミスマッチエンドヌクレアーゼを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

#### 【請求項 2 9】

ミスマッチエンドヌクレアーゼが、C E L I 酵素である、請求項 2 8 に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 関連出願

本願は、2010年11月12日に出願された米国仮出願第61/412,937号、2010年11月30日に出願された米国仮出願第61/418,095号、2011年3月23日に出願された米国仮出願第61/466,814号、および2011年7月1日に出願された米国仮出願第61/503,722号の優先権およびそれらからの利益を

10

20

30

40

50

主張し、それらの各々は出典明示によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 0 2 】

技術分野

本明細書において提供される方法および装置は、予め定義された配列を有する核酸および核酸ライブラリーの合成およびアセンブリーに関する。より詳しくは、固体支持体上での標的ポリヌクレオチドの合成のため、および標的ポリヌクレオチドの選択のための方法および装置が提供される。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

背景

自然界から複製および増幅され、次いで、成分部分に分解されるDNA配列に、組換えDNA化学の技術を使用することは、今では一般的なことである。次いで、配列は、成分部分として、新規DNA配列に組み換えられるか、または再アセンブルされる。しかし、天然に入手可能な配列に対する確実性のために、研究者によって探索され得る可能性は大きく制限される。今では、短いDNA配列が、個々のヌクレオチドから直接合成されることは可能であるが、一般には、大きなセグメントまたはポリヌクレオチドのアセンブリー、すなわち、約400塩基対より長いポリヌクレオチド配列を直接構築することは非実用的なことであった。

【 0 0 0 4 】

オリゴヌクレオチド合成は、マイクロチップでの超並列カスタム合成によって実施できる(Zhou et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32:5409; Fodor et al. (1991) Science 251:767)。しかし、現行のマイクロチップは、極めて小さい表面積しかなく、したがって、少量のオリゴヌクレオチドしか製造できない。オリゴヌクレオチドは、溶液中に放出されると、配列あたりピコモル以下の濃度、二分子のプライミング反応を効率的に駆動するのに十分に高くはない濃度で存在する。核酸をアセンブルするための現行法では、アセンブリーの前に、マイクロチップから得られたオリゴヌクレオチドが増幅される必要がある。そのようなものとして、高忠実度の遺伝子アセンブリーおよび多数のポリヌクレオチド配列の製造のための、改善された、費用効率が低い方法およびデバイスが依然として必要である。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 5 】

概要

本発明の態様は、高忠実度ポリマーを調製および/またはアセンブルするための方法および装置に関する。また、核酸アセンブリー反応を処理し、核酸をアセンブルするためのデバイスおよび方法も本明細書において提供される。カスタム核酸を合成する実用的な、経済的な方法を提供することが本発明の目的である。

【 0 0 0 6 】

本発明の態様は、固体支持体上で所定の配列を有するポリヌクレオチドを製造するための方法およびデバイスに関する。いくつかの実施形態では、複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドが、固体支持体の異なる機構(feature)にて提供され、複数のオリゴヌクレオチドの各々が、予め定義された配列を有し、複数のものは各々、支持体の異なる別個の機構と結合している。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドの各々が、その3'末端に、別のオリゴヌクレオチドの3'末端の配列領域と相補的である配列領域を含み、ここで、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、第1のアンカー一本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である5'末端を有する。いくつかの実施形態では、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドが、支持体上に固定化されている。いくつかの実施形態では、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドは、固体支持体上で合成される。その他の実施形態では、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドは、固体支持体上にスポットさ

れる。いくつかの実施形態では、支持体は、マイクロアレイデバイスである。

【0007】

いくつかの実施形態によれば、少なくとも第1および第2の複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドが提供され、ここで、第1および第2の複数のオリゴヌクレオチドは各々、予め定義された配列を有し、支持体の別個の機構と結合している。いくつかの実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは各々、その3'末端に、第2の複数のオリゴヌクレオチドの3'末端の配列領域と相補的である配列領域を含む。いくつかの実施形態では、複数の支持体結合アンカー一本鎖オリゴヌクレオチドが提供され、ここで、複数の第1のアンカーオリゴヌクレオチドの5'末端は、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの配列領域と同一である。第1および第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドと相補的である少なくとも第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドが、鎖伸長反応において作製される。構築オリゴヌクレオチドは、複数のアンカーオリゴヌクレオチドと、選択された機構でハイブリダイズし得る。少なくとも第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドがライゲーションされ、それによって、予め定義された配列を有する少なくとも1種のポリヌクレオチドが作製される。いくつかの実施形態では、少なくとも第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドは、少なくとも第1および第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドから解離される。いくつかの実施形態では、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドは、第1の機構から選択された機構に移され、第2の複数の構築オリゴヌクレオチドは、第2の機構から選択された機構に移され、ここで、選択された機構は、複数の支持体結合アンカー一本鎖オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、選択された機構は、第1および第2の機構と同一の支持体上にある。さらにその他の実施形態では、選択された機構は、第1および第2の機構とは異なる支持体上にある。いくつかの実施形態では、第3の複数の予め定義された支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドが提供され、ここで、第3の複数のオリゴヌクレオチドは各々、予め定義された配列を有し、支持体の第3の別個の機構と結合しており、第3の複数のオリゴヌクレオチドは各々、その3'末端に、第2の複数のオリゴヌクレオチドの3'末端の配列領域と相補的である配列領域を含む。第3の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドと相補的である第3の複数の構築オリゴヌクレオチドが、鋳型として一本鎖オリゴヌクレオチドを使用する鎖伸長反応において作製される。第1、第2および第3の複数の構築オリゴヌクレオチドは、選択された機構で、複数のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、ライゲーションされて、より長いポリヌクレオチドが生じる。いくつかの実施形態では、複数の構築オリゴヌクレオチドは各々、異なる支持体上で作製される。いくつかの実施形態では、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドは各々、その3'末端にプライマー結合部位を有する。プライマー結合部位は、ユニバーサルプライマー結合部位であり得る。いくつかの実施形態では、方法は、プライマー伸長を促進する条件下で、プライマーを、少なくとも第1および第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングし、それによって、伸長生成物二本鎖を形成することを含む。いくつかの実施形態では、プライマー配列は、少なくとも1個のウラシルを含む。いくつかの実施形態では、ウラシルを含有するプライマーは、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物を使用して除去される。

【0008】

いくつかの実施形態では、方法は、N個の複数の予め定義された支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドを提供することであって、第1の複数のオリゴヌクレオチドが、その3'末端に、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端の配列領域と相補的である配列領域を含み、N個の複数のオリゴヌクレオチドが、その3'末端に、(N-1)個のオリゴヌクレオチドの配列領域と相補的である配列領域を含むこと、およびその5'末端に、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの配列領域と同一である配列を含む、第1の複数のアンカーオリゴヌクレオチドを提供すること、を含む。いくつかの実施形態では、支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドと相補的であるN個の複数の構築オリゴヌクレオチドが作製され、複数の構築オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの全配列にまたがり、ギャップ

10

20

30

40

50

を含まない。いくつかの実施形態では、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの3'末端配列領域は、アンカーオリゴヌクレオチドの5'末端領域と同一である。いくつかの実施形態では、伸長生成物は解離され、それによって、少なくとも第1および第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを放出する。

【0009】

本発明の態様は、予め定義された配列を有するポリヌクレオチドを合成し、選択する方法に関する。方法は、遊離一本鎖オーバーハングを含む、複数の支持体結合二本鎖ポリヌクレオチドを合成することを含み、複数のポリヌクレオチド配列は、予め定義されたポリヌクレオチド配列を含み、ここで、一本鎖オーバーハングは、末端構築オリゴヌクレオチドNの配列を含む。いくつかの実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドが提供され、ここで、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、一本鎖オーバーハングを含み、ここで、一本鎖オーバーハングは、末端構築オリゴヌクレオチド配列Nと相補的である。ステム-ループオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズし、予め定義された配列を有するポリヌクレオチドの遊離オーバーハングとライゲーションされ、それによって、末端オリゴヌクレオチドNを含むオーバーハングを保護する。いくつかの実施形態では、末端構築オリゴヌクレオチド配列Nを含まないポリヌクレオチド配列は、一本鎖特異的3'エキソヌクレアーゼ、一本鎖特異的エンドヌクレアーゼおよび一本鎖特異的5'エキソヌクレアーゼなどの一本鎖エキソヌクレアーゼを使用して分解される。いくつかの実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドのプールを、アンカー支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることを含み、オリゴヌクレオチドプールは、N個の複数のオリゴヌクレオチドを含み、ここで、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、その5'末端に、アンカーオリゴヌクレオチドの5'末端の配列領域と相補的である配列領域を含み、ここで、N個の複数のオリゴヌクレオチドは、その3'末端に、(N-1)個のオリゴヌクレオチドの配列領域と相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、II型制限部位を含み、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、II型制限エンドヌクレアーゼを使用して除去される。いくつかの実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のウラシルヌクレオチドを含み、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物を使用して除去される。いくつかの実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物を使用して支持体から放出される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、II型制限酵素を使用して支持体から放出される。いくつかの実施形態では、予め定義されたポリヌクレオチド配列が増幅される。

【0010】

本発明のいくつかの態様では、予め定義された配列を有するポリヌクレオチドを合成し、その配列およびその長さに従って予め定義されたポリヌクレオチド配列を選択する方法が提供される。いくつかの実施形態では、(i)5'末端が第1の複数のオリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である、第1の複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド、および(ii)5'末端が末端構築オリゴヌクレオチドNと相補的である、第2の複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチドを含む支持体が提供される。いくつかの実施形態では、5'一本鎖オーバーハングを含む、複数の支持体結合二本鎖ポリヌクレオチドが合成される。複数のポリヌクレオチド配列は、予め定義されたポリヌクレオチド配列を含み、ここで、予め定義されたポリヌクレオチド配列の一本鎖5'オーバーハングは、末端構築オリゴヌクレオチドN配列を含み、ポリヌクレオチド配列の一本鎖3'末端は、第1のオリゴヌクレオチド配列を含む。複数の合成されたポリヌクレオチドは、ハイブリダイズ条件下で、第1の複数のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、合成されたポリヌクレオチドは、末端オリゴヌクレオチドNが、第2の複数のアンカーオリゴヌクレオチドの5'末端とハイブリダイズし、それによって、第2のアンカーオリゴヌクレオチドを使用して予め定義された配列を有するポリヌクレオチドを

10

20

30

40

50



選択するなどといったハイブリダイゼーション条件に付される。いくつかの実施形態では、一本鎖特異的エキソヌクレアーゼを使用して、遊離 3' または 5' 末端を有するポリヌクレオチド配列が分解される。いくつかの実施形態では、予め定義された配列を有するポリヌクレオチドが、例えば、II 型エンドヌクレアーゼを使用して、またはウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) および DNA グリコシラーゼ - リアーゼエンドヌクレアーゼ V III の混合物を使用して、支持体からさらに放出される。好ましい実施形態では、第 1 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドは、第 2 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドから、予め定義されたポリヌクレオチドの長さに対応する距離だけ離れている。支持体は、第 1 および第 2 のアンカーオリゴヌクレオチド間の距離を設定する支持体結合スパー一本鎖オリゴヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 のアンカーオリゴヌクレオチド間の距離は、第 1 および第 2 のアンカーオリゴヌクレオチドの濃度およびスパーオリゴヌクレオチドの濃度の関数である。

#### 【0011】

本発明のいくつかの態様は、(a) 固体支持体と、(b) 固体支持体と関連している複数の別個の機構であって、各機構が、予め定義された配列を有する複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを含み、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドが、その 5' 末端に、第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端の配列領域と相補的である配列領域を含み、複数のオリゴヌクレオチド N が、その 5' 末端に、複数のオリゴヌクレオチド (N - 1) の 5' 末端配列領域と相補的である配列を含む機構と、(c) その 5' 末端に、第 1 の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの配列領域と同一である配列を含む、少なくとも第 1 の複数のアンカーオリゴヌクレオチドとを含む核酸アレイに関する。いくつかの実施形態では、核酸アレイは、第 2 の複数の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチドをさらに含み、ここで、第 2 のアンカーオリゴヌクレオチドの 5' 末端は、複数のオリゴヌクレオチド N の 5' 末端と同一である。いくつかの実施形態では、核酸は、複数の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドと同一ではない配列を有する、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドをさらに含む。

#### 【0012】

本発明の態様は、支持体上で、予め定義された配列を有する複数のポリヌクレオチドを製造するための並列および逐次プロセスに関する。いくつかの実施形態では、複数の機構を有する第 1 および第 2 の支持体が提供され、ここで、各支持体上の各機構は、異なる予め定義された配列を有する、複数の異なる支持体結合オリゴヌクレオチドを含む。異なる予め定義された配列を有する第 1 および第 2 の複数の異なる構築オリゴヌクレオチドは、鋳型として複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを使用して作製され、第 1 および第 2 の複数の構築オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端に相補配列を有する。いくつかの実施形態では、各機構が、複数の支持体結合アンカー一本鎖オリゴヌクレオチドを含む、複数の機構を含む支持体が提供される。いくつかの実施形態では、複数のアンカーオリゴヌクレオチド各々の 5' 末端は、第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドの 5' 末端と相補的である。第 1 の複数の構築オリゴヌクレオチドは、アンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、3' オーバーハングを有する第 1 の複数の二本鎖を形成し得る。次いで、第 2 の複数の構築オリゴヌクレオチドは、3' オーバーハングによって、第 1 の複数の二本鎖とハイブリダイズし、それによって、5' オーバーハングを有する複数の二本鎖を形成し得る。場合により、合成されるポリヌクレオチド (単数または複数) の長さに応じて、第 3 の複数の構築オリゴヌクレオチドは、5' オーバーハングによって第 2 の複数の構築オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。複数の構築オリゴヌクレオチドは、ライゲーションされて、二本鎖ポリヌクレオチドを形成し得る。いくつかの実施形態では、複数の第 1 の構築オリゴヌクレオチドを作製するステップは、少なくとも 1 個のウラシルを有するプライマー配列を、プライマーの伸長を促進する条件下で、第 1 の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングすることと、ウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) および DNA グリコシラーゼ - リアーゼエンドヌクレアーゼ V III の混合物を使用してプライマーを除去することとを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド各々を定義する複数の構築オリゴヌクレオチドは、異なる支持体上で合成される。複数の異なるポリ

ヌクレオチドは、支持体結合アンカーオリゴヌクレオチドを含む支持体の異なる機構でアセンブルされ得る。

【0013】

本発明の態様は、予め定義された配列を有する複数のポリヌクレオチドを合成するための方法およびデバイスに関する。いくつかの実施形態では、方法は、(a) 複数の機構を含む第1の支持体を提供するステップを含み、ここで、各機構は、複数の支持体結合アンカー一本鎖オリゴヌクレオチドを含み、複数のアンカーオリゴヌクレオチド各々の5'末端は、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドの5'末端と相補的であり、(b) 複数の機構を有する第2の支持体を提供するステップを含み、ここで、各機構は、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを含み、複数の支持体結合オリゴヌクレオチド各々が、異なる予め定義された配列を有し、(c) 鋳型として複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを使用して、異なる予め定義された配列を有する第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを作製するステップと、(d) 第2の支持体の各機構が、第1の支持体の対応する機構に対してアラインされるなどのように、第1および第2の支持体を配置するステップと、(e) 第1の複数のオリゴヌクレオチドの、複数のアンカーオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを促進する条件下で、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを溶液中に放出するステップと、(f) 場合により、第2の複数の構築オリゴヌクレオチドを含む第3の支持体を用いて、ステップb~eを反復し、第2および第3の複数の構築オリゴヌクレオチドが3'末端相補配列を有するステップとを含む。いくつかの実施形態では、第2の支持体は、第1の支持体の上部に、向かい合って配置される。いくつかの実施形態では、第3の支持体は、複数のアンカーオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって固定された複数のポリヌクレオチドを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、複数の第1の構築オリゴヌクレオチドを作製するステップは、プライマーの伸長を促進する条件下で、少なくとも1個のウラシルを有するプライマー配列を、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングすることと、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物を使用してプライマーを除去することを含む。第2の支持体は、第1の支持体の上部に、向かい合って配置され得る。いくつかの実施形態では、溶液は、第2および第3の複数の構築オリゴヌクレオチドのライゲーションを可能にするリガーゼを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを溶液中に放出するステップによって、第1の複数のオリゴヌクレオチドのアンカーオリゴヌクレオチドに向けた拡散が可能となる。

【0016】

いくつかの実施形態では、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドを溶液中に放出するステップは、アンカーオリゴヌクレオチドに向けた構築オリゴヌクレオチドの実質的な垂直拡散を可能にする透過性膜の存在下にある。いくつかの実施形態では、透過性膜は、構築オリゴヌクレオチドの側方拡散を低減する。

【0017】

いくつかの実施形態では、第2の支持体の各機構は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、異なる予め定義された配列を有する、オリゴヌクレオチドの少なくとも2つの集団を含み、オリゴヌクレオチドの少なくとも2つの集団は、相補配列を有する。例えば、オリゴヌクレオチドの2つの集団は、3'末端相補配列を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの2つの集団は、溶液中に放出され、それによって、構築オリゴヌクレオチドの第1の集団の、構築オリゴヌクレオチドの第2の集団とのハイブリダイゼーションおよびオリゴヌクレオチドの第1の集団の、アンカーオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが可能となる。いくつかの実施形態では、溶液は、リガーゼを含む。いくつかの実施形態では、第1の複数の構築オリゴヌ

レオチドの化学量論は、アンカーオリゴヌクレオチドの化学量論よりも高い。

【0018】

いくつかの実施形態では、予め定義された配列を有する複数のポリヌクレオチドを合成する方法は、複数のポリヌクレオチドを、ミスマッチを含有する二本鎖ポリヌクレオチドの切断に適した条件下で、ミスマッチを認識し、切断する成分に曝露することをさらに含む。複数のポリヌクレオチドは、支持体と結合している場合も、溶液中にある場合もある。ミスマッチを認識し、切断する成分は、CEL I 酵素などのミスマッチエンドヌクレアーゼを含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、第1のオリゴヌクレオチドを生成する表面および第2のアンカーオリゴヌクレオチド表面を使用する、表面に結合された核酸合成の限定されない例示的方法を示す。

【0020】

【図2】図2は、配列およびアンカー配列を生成するオリゴヌクレオチドを含む単一の表面を使用する、表面に結合された核酸合成の限定されない例示的方法を示す。

【0021】

【図3】図3は、一本鎖特異的エキソヌクレアーゼを使用する、表面に結合された核酸合成および全長のアセンブルされたポリヌクレオチドのスクリーニングの限定されない例示的方法を示す。

【0022】

【図4】図4は、分子定規を使用する、表面に結合された核酸合成および全長のアセンブルされたポリヌクレオチドのスクリーニングの限定されない例示的方法を示す。

【0023】

【図5】図5は、限定されない例示的構築アレイおよび支持体結合オリゴヌクレオチドを含むアンカーアレイを示す。

【0024】

【図6】図6は、構築アレイ上に固定化されている支持体結合オリゴヌクレオチドからの構築オリゴヌクレオチドの合成のための限定されない方法を示す。

【0025】

【図7】図7は、高度に並列的な逐次の表面に結合されたポリヌクレオチド合成の限定されない方法を示す。

【0026】

【図8】図8は、構築アレイおよびアンカーアレイの集合体を示す。

【0027】

【図9】図9a～dは、液状媒体中で、構築アレイからアンカーアレイへ、構築オリゴヌクレオチドの第1のセットおよび第2のセットを移すための限定されない方法を示す。

【0028】

【図10】図10は、多孔性膜の存在下、液状媒体中で、構築アレイからアンカーアレイへ、構築オリゴヌクレオチドを移すための限定されない方法を示す。

【0029】

【図11】図11は、リガーゼの存在下、液状媒体中で、構築アレイからアンカーアレイへ、2種の異なる構築オリゴヌクレオチドを移すための限定されない方法を示す。

【0030】

【図12】図12は、構築オリゴヌクレオチドの数が、対応するアンカーオリゴヌクレオチド各々に対して化学量論的に (stochiometric) 過剰である、液状媒体中で、構築アレイからアンカーアレイへ、2種の異なる構築オリゴヌクレオチドを移すための限定されない方法を示す。

【0031】

【図13】図13は、各アンカーアレイ上でアセンブルされたポリヌクレオチド間の重複

10

20

30

40

50

する接合の使用によって、1つのアンカーアレイから別のアンカーアレイ上のものへ、アセンブルされたポリヌクレオチドを移すための限定されない方法を示す。

【0032】

【図14】図14は、ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼを使用して二本鎖核酸配列からミスマッチエラーを除去するための限定されない方法を示す。ミスマッチヌクレオチドは、×印で示されている。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本明細書において提供された技術の態様は、核酸合成およびアセンブリー反応の正確度、収率、処理能力および/または費用効率の増大のために有用である。本明細書において、用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」は、同義的に使用され、ヌクレオチドの天然に存在するか、または合成ポリマーの形態を指す。本発明のオリゴヌクレオチドおよび核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドから形成され得、例えば、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)分子を形成する。あるいは、天然に存在するオリゴヌクレオチドは、例えば、ペプチド核酸(PNA)において、またはロックス核酸(LNA)において、その特性を変更するために構造修飾を含み得る。天然に存在する塩基か、または人工塩基を用いるオリゴヌクレオチドおよび核酸分子の固相合成は、当技術分野で周知である。この用語は、ヌクレオチド類似体から製造されたRNAまたはDNAのいずれかの等価物、類似体を含み、記載されている実施形態、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドに適応できると理解されなくてはならない。本発明において有用なヌクレオチドとして、例えば、天然に存在するヌクレオチド(例えば、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド)またはヌクレオチドの天然もしくは合成修飾または人工塩基が挙げられる。本明細書において、用語モノマーとは、接続され、接続され得、一緒にオリゴマーを形成する一連の小分子のメンバーを指し、ポリマーまたは化合物は、2以上のメンバーからなる。ポリマー内のモノマーの特定の順序付けは、本明細書において、ポリマーの「配列」と呼ばれる。モノマーのセットとして、それだけには限らないが、例えば、一般的なL-アミノ酸のセット、D-アミノ酸のセット、合成および/または天然アミノ酸のセット、ヌクレオチドのセットならびにペントースおよびヘキソースのセットが挙げられる。本発明の態様は、主に、オリゴヌクレオチドの調製に関して本明細書に記載されているが、ペプチドまたはポリペプチド、多糖、リン脂質、ヘテロポリマー、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリ尿素、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテートまたは任意のその他のポリマーなどのその他のポリマーの調製において容易に適用され得る。

【0034】

本明細書において、用語「所定の配列」または「予め定義された配列」は、同義的に使用され、ポリマーの配列は公知であり、ポリマーの合成またはアセンブリーの前に選択されることを意味する。特に、本発明の態様は、主に核酸分子の調製に関して本明細書に記載されており、核酸の配列は、公知であり、核酸分子の合成またはアセンブリーの前に選択される。本明細書において提供された技術のいくつかの実施形態では、固定されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、材料の供給源として使用される。種々の実施形態では、本明細書に記載された方法は、オリゴヌクレオチドを使用し、その配列は、合成される最終ポリヌクレオチドコンストラクトの配列に基づいて決定される。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、短い核酸分子である。例えば、オリゴヌクレオチドは、10~約300ヌクレオチド、20~約400ヌクレオチド、30~約500ヌクレオチド、40~約600ヌクレオチド、または約600超のヌクレオチド長であり得る。しかし、より短いか、またはより長いオリゴヌクレオチドも使用してよい。オリゴヌクレオチドは、種々の長さを有するよう設計され得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドコンストラクトの配列は、複数のより短い配列に分割でき、本明細書に記載された方法を使用して、これらを並列して合成し、単一または複数の所望のポリヌクレオチドコンストラクトにアセンブルできる。いくつかの実施形態では、アセンブリー手順は、いくつかの

並列および/または逐次反応ステップを含む場合もあり、これでは、複数の異なる核酸またはオリゴヌクレオチドが合成または固定化され、プライマー伸長され、組み合わされてアセンブルされ（例えば、本明細書に記載された伸長またはライゲーションによって）、さらなるアセンブリー、クローニングまたはその他の適用のために使用されるより長い核酸生成物を作製する。

#### 【0035】

いくつかの実施形態では、所定の配列変動を有する核酸を含有するライブラリーをアセンブルする方法が、本明細書において提供される。本明細書において提供されたアセンブリー戦略を使用して、多数の異なる対象とする核酸配列を代表する極めて大きなライブラリーを作製できる。いくつかの実施形態では、核酸のライブラリーは、配列変異体のライブラリーである。配列変異体は、単一の天然に存在するタンパク質をコードする配列の変異体であり得る。しかし、いくつかの実施形態では、配列変異体は、複数の異なるタンパク質をコードする配列の変異体であり得る。したがって、本明細書において提供された技術の一態様は、正確な高密度核酸ライブラリーのアセンブリーに関する。本明細書において提供された技術の態様はまた、正確な高密度核酸ライブラリーを提供する。高密度核酸ライブラリーは、100種を超える種々の配列変異体（例えば、約 $10^2 \sim 10^3$ 、約 $10^3 \sim 10^4$ 、約 $10^4 \sim 10^5$ 、約 $10^5 \sim 10^6$ 、約 $10^6 \sim 10^7$ 、約 $10^7 \sim 10^8$ 、約 $10^8 \sim 10^9$ 、約 $10^9 \sim 10^{10}$ 、約 $10^{10} \sim 10^{11}$ 、約 $10^{11} \sim 10^{12}$ 、約 $10^{12} \sim 10^{13}$ 、約 $10^{13} \sim 10^{14}$ 、約 $10^{14} \sim 10^{15}$ 種またはより多くの種々の配列）を含むことができ、これでは、ランダム配列とは対照的に、種々の配列のうちの高いパーセンテージが特定の配列である（例えば、配列の約50%超、約60%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上が、対象の所定の配列である）。

#### 【0036】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供された方法およびデバイスは、表面または基板上に固定化されているオリゴヌクレオチド（例えば、支持体結合オリゴヌクレオチド）を使用する。支持体結合オリゴヌクレオチドは、例えば、構築オリゴヌクレオチド、アンカーオリゴヌクレオチドおよび/またはスペーサーオリゴヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチドを含む。本明細書において、用語「支持体」、「基板」および「表面」は、同義的に使用され、核酸などのポリマーがその上で合成または固定化される多孔性または非多孔性の溶媒不溶性材料を指す。本明細書において「多孔性」とは、材料が、実質的に均一な直径（例えば、nm範囲の）を有する孔を含有することを意味する。多孔性材料として、紙、合成フィルターなどが挙げられる。このような多孔性材料では、反応は、孔内で起こり得る。支持体は、ピン、ストリップ、プレート、ディスク、ロッド、ベンド、円柱状構造、ビーズ、ナノ粒子などを含めた粒子などのいくつかの形のいずれか1種を有し得る。支持体は、可変幅を有し得る。支持体は、親水性であり得るか、または親水性にされ得、これとして、それ自体によってか、またはその他の材料とともに使用される、シリカ、硫酸マグネシウムおよびアルミナなどの無機粉末；天然ポリマー材料、特に、セルロース材料および繊維を含有する紙、例えば、ろ紙、クロマトグラフィー用紙などといったセルロースに由来する材料；ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリ（塩化ビニル）、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（4-メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、ナイロン、ポリ（酪酸ビニル）、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）メンブレン、ガラス、多孔性ガラス（controlled pore glass）、磁性多孔性ガラス、セラミックス、金属などといった合成または修飾された天然に存在するポリマーが挙げられる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アレイ形式で合成される。例えば、一本鎖オリゴヌクレオチドは、一般的な支持体上でその場で合成され、これでは、各オリゴヌクレオチドは、基板上の分離した、または別個の機構（またはスポット）で合成される。好ましい実施形態では、一本

鎖オリゴヌクレオチドは、支持体または機構の表面に結合される。本明細書において、用語「アレイ」とは、オリゴヌクレオチドまたはさらなる反応のための相補的オリゴヌクレオチドを保存、増幅および放出するための別個の機構の配置を指す。好ましい実施形態では、支持体またはアレイは、アドレス可能であり、支持体は、支持体上の特定の所定の位置（すなわち、「アドレス」）に、2以上の別個のアドレス可能な機構を含む。したがって、アレイ上の各オリゴヌクレオチド分子は、支持体上の公知の、定義された位置に位置づけられる。各オリゴヌクレオチドの配列は、支持体上のその位置から決定できる。アレイは、機構間領域を含み得る。機構間は、その表面上にいかなるオリゴヌクレオチドも保持できず、不活性空間に相当し得る。

【0037】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、表面またはアレイの別個の機構上に、結合され、スポットされ、固定化され、表面に結合され、支持されるか、または合成される。オリゴヌクレオチドは、共有結合によって表面と結合されるか、または表面に沈着され得る。アレイは、構築され、特別注文されるか、または市販の販売会社（例えば、Agilent、Affymetrix、Nimblegen）から購入され得る。例えば、マスクレス（maskless）アレイシンセサイザー、マスクを利用する光依存性（light directed）法、フローチャネル法、スポッティング法など、種々の構築方法が、当技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、構築および/または選択オリゴヌクレオチドは、マスクレスアレイシンセサイザー（MAS）を使用して固体支持体上で合成され得る。マスクレスアレイシンセサイザーは、例えば、PCT出願番号WO 99/42813に、および対応する米国特許第6,375,903号に記載されている。アレイ中の機構の各々が、所望の配列の一本鎖DNA分子を有する特別注文のDNAマイクロアレイを作り上げることができるマスクレス機器のその他の例が公知である。オリゴヌクレオチドを合成するためのその他の方法として、例えば、マスクを利用する光依存性法、フローチャネル法、スポッティング法、ピンベースの（pin-based）方法および複数の支持体を利用する方法が挙げられる。オリゴヌクレオチドの合成のための、マスクを利用する光依存性法（例えば、VLSIPS（商標）法）が、例えば、米国特許第5,143,854号、同5,510,270号および同5,527,681号に記載されている。これらの方法は、固体支持体の予め定義された領域を活性化すること、次いで、支持体を予め選択したモノマー溶液と接触させることを含む。選択された領域は、集積回路製作において使用されるフォトリソグラフィー技術の方法において多い、マスクを通した光供給源を用いる照射によって活性化され得る。支持体のその他の領域は、照明がマスクによって遮断され、それらは化学的に保護されたままであるので、不活性のままである。したがって、光パターンが、支持体のどの領域が、所与のモノマーと反応するかを定義する。異なるセットの予め定義された領域を反復して活性化し、異なるモノマー溶液を支持体と接触させることによって、支持体上でポリマーの多様なアレイが製造される。場合により、反応していないモノマー溶液を支持体から洗浄するなどのその他のステップを使用してもよい。その他の適用可能な方法として、米国特許第5,384,261号に記載されるものなどの機械的技術が挙げられる。単一の支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成に適用可能なさらなる方法は、例えば、米国特許第5,384,261号に記載されている。例えば、試薬は、（1）予め定義された領域上の定義されたチャネル内を流れることまたは（2）予め定義された領域上に「スポットすること」のいずれかによって支持体に送達され得る。その他のアプローチならびにスポットすることおよび流れることの組合せも同様に使用してよい。各場合において、モノマー溶液が種々の反応部位に送達される場合には、支持体の特定の活性化された領域がその他の領域から機械的に分離される。フローチャネル法は、例えば、固体支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成を制御するためのマイクロ流体システムを含む。例えば、支持体の表面上に、それによって適当な試薬が流れるか、その中に適当な試薬が入れられるフローチャネルを形成することによって、固体支持体の選択された領域で多様なポリマー配列を合成できる。固体支持体でオリゴヌクレオチドを調製するためのスポッティング法は、選択された領域において反応物を

10

20

30

40

50

直接沈着させることによってそれらを比較的少量で送達することを含む。いくつかのステップでは、そうすることがより効率的である場合には、全支持体表面に溶液を噴霧するか、そうでなければそれをコーティングすることもできる。モノマー溶液の正確に測定されたアリコート、領域から領域へ移動するディスペンサーによって液滴を沈着させてもよい。固体支持体上でオリゴヌクレオチドを合成するためのピンベースの方法は、例えば、米国特許第5,288,514号に記載されている。ピンベースの方法は、複数のピンまたはその他の拡張を有する支持体を利用する。ピンは各々、トレイ中の個々の試薬容器中に同時に挿入される。96ウェルマイクロタイターディッシュなどの96容器トレイを用いる96ピンのアレイがよく使用される。各トレイは、個々のピンでの特定の化学反応におけるカップリングのための特定の試薬を充填される。したがって、トレイは、異なる試薬を含有することが多い。化学反応は、反応の各々が、比較的同様の反応条件のセット下で実施され得るよう最適化されているので、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となる。

#### 【0038】

別の実施形態では、複数の支持体上に、複数のオリゴヌクレオチドを合成または固定化してもよい。一例として、例えば、米国特許第5,770,358号、同5,639,603号および同5,541,061号に記載されているビーズベースの合成法がある。ビーズ上でのオリゴヌクレオチドなどの分子の合成のために、多量 (a large plurality) のビーズを、容器中で適した担体 (水など) に懸濁する。ビーズは、場合により、保護基と複合体形成される活性部位を有する任意選択のSpacer分子とともに提供される。合成の各ステップで、カップリングのためにビーズを複数の容器中にわけ、新生オリゴヌクレオチド鎖を脱保護した後、各容器に種々のモノマー溶液を加え、その結果、所与の容器中のすべてのビーズで、同一のヌクレオチド付加反応が生じる。次いで、ビーズを過剰の試薬の洗浄を行い、単一容器中でプールし、合成の次のラウンドに備えて、混合し、別の複数の容器の中に再分配する。最初に使用される多数のビーズのおかげで、同様に、容器中に無作為に分散され、各々、塩基の無作為化付加の多数のラウンド後にその表面上で合成される独特のオリゴヌクレオチド配列を有する多数のビーズがあるということは留意されなければならない。個々のビーズに、その上の二本鎖オリゴヌクレオチドに対して独特である配列を用いてタグをつけ、使用の際に同定を可能にすることもできる。

#### 【0039】

その開示内容が、すべての目的のためにその全文が出典明示により本明細書に組み込まれる以下の参考文献: McGall et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:13555; Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering, Vol. 20:111, Plenum Press (1998); Duggan et al. (1999) Nat. Genet. 21:10; Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, 2003; 米国特許出願公開第2003/0068633号および同2002/0081582号; 米国特許第6,833,450号、同6,830,890号、同6,824,866号、同6,800,439号、同6,375,903号および同5,700,637号; ならびにPCT公開番号WO04/031399、WO04/031351、WO04/029586、WO03/100012、WO03/066212、WO03/065038、WO03/064699、WO03/064027、WO03/064026、WO03/046223、WO03/040410およびWO02/24597に示される、光依存性法、フローチャネルおよびスポッティング法、インクジェット法、ピンをベースとする方法およびビーズをベースとする方法を使用して、予め合成されたオリゴヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチド配列を、支持体と結合させるか、またはその場で合成してもよい。いくつかの実施形態では、予め合成されたオリゴヌ

クレオチドは、スポッティング法を使用して、支持体と結合されるか、または合成され、これでは、モノマー溶液が、領域から領域へ移動するディスペンサー（例えば、インクジェット）によって液滴が沈着される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、力学的な波によって作動されるディスペンサーを使用して支持体上にスポッティングされる。

#### 【0040】

一態様では、本発明は、固体支持体で予め定義された配列を有する標的ポリヌクレオチドを製造する方法に関する。合成ポリヌクレオチドは、少なくとも約1、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、40、50、75または100キロベース（kb）または1メガベース（mb）であるか、またはそれより長い。いくつかの態様では、本発明は、高忠実度ポリヌクレオチドを製造する方法に関する。例示的实施形態では、合成ポリヌクレオチドの組成物は、エラーのない、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上のコピーを含有する（例えば、所定の配列から逸脱しない配列を有する）。エラーのないコピーのパーセントは、正しい、例えば、予め定義されたか、または所定の配列を有するよう意図された組成物中のポリヌクレオチドのコピーの総数と比較した、組成物中のエラーのないコピーの数に基づく。

#### 【0041】

いくつかの実施形態では、予め定義された配列を有するポリヌクレオチドコンストラクトを形成するのに必要な、すべてのオーバーラップするオリゴヌクレオチドと一緒に混合することによって、核酸標的配列を単一ステップで得ることができる。あるいは、一連のアセンブリー反応は、並列して、または逐次実施でき、その結果、より大きなポリヌクレオチドコンストラクトが、一連の分離したアセンブリー反応からアセンブルされ得る。

#### 【0042】

本発明のいくつかの態様は、高忠実度ポリヌクレオチドアセンブリーのためのオリゴヌクレオチドの設計に関する。本発明の態様は、核酸アセンブリー手順の処理能力速度を高める、および/または正しくアセンブルされた核酸配列を作製するために使用されるステップ数または試薬の量を低減するために有用であり得る。特定の実施形態では、本発明の態様は、自動化された核酸アセンブリーとの関連で、正しい核酸配列のアセンブリー各々に必要なステップの時間、数、試薬の量およびその他の因子を低減するために有用であり得る。したがって、これらおよびその他の本発明の態様は、1つまたは複数の核酸アセンブリー手順の費用および時間を低減するために有用であり得る。

#### 【0043】

本発明のいくつかの態様は、合成オリゴヌクレオチドが、プライマー伸長反応、相補的オリゴヌクレオチドの合成の鋳型として、また、ポリヌクレオチドをより長いポリヌクレオチドコンストラクトにアセンブルするために設計され、使用される、ポリヌクレオチドアセンブリープロセスに関する。いくつかの実施形態では、方法は、第1の複数の一本鎖オリゴヌクレオチドを鋳型として使用して、鎖伸長反応において複数のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを合成することを含む。上記のように、オリゴヌクレオチドは、表面の複数の別個の機構上で最初に合成されてもよく、または支持体の複数の機構の上に沈着されてもよい。支持体は、少なくとも100、少なくとも1,000、少なくとも $10^4$ 、少なくとも $10^5$ 、少なくとも $10^6$ 、少なくとも $10^7$ 、少なくとも $10^8$ の機構を含み得る。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、共有結合によって支持体と結合される。好ましい実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、固体表面に固定化される。好ましい実施形態では、固体表面の各機構は、種々の所定の配列を有する高密度のオリゴヌクレオチド（例えば、機構あたりおよそ $10^6 \sim 10^8$ 個の分子）を含む。

#### 【0044】

いくつかの実施形態では、複数の異なる一本鎖オリゴヌクレオチドが、固体支持体の異なる機構で固定化される。いくつかの実施形態では、支持体結合オリゴヌクレオチドは、その5'末端によって結合され得る。好ましい実施形態では、支持体結合オリゴヌクレオ



チドは、その3'末端によって結合される。いくつかの実施形態では、支持体結合オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列（例えば、縮重結合配列）、リンカーまたはスペーサー（例えば、光切断可能なリンカーまたは化学リンカー）を介して支持体上に固定化され得る。当然のことではあるが、3'末端によって、5'末端の下流の配列を意味し、5'末端によって、3'末端の上流の配列を意味する。例えば、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションに関与していないヌクレオチド配列、リンカーまたはスペーサーを介して支持体上に固定化され得る。そこで、支持体結合オリゴヌクレオチドの3'末端配列は、リンカーまたはスペーサーの上流の配列と呼ばれる。

#### 【0045】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アセンブルされる所定の標的ポリヌクレオチドの配列の異なる部分と同一であるか、または相補的である配列を有するよう設計され得る。したがって、いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドは、二本鎖標的核酸の2つの鎖のうち一方の一部と同一であるか、または相補的である配列を有し得る。本明細書において、用語「相補的」とは、2種のヌクレオチド間の正確な対形成のための能力を指す。例えば、核酸の所与の位置のヌクレオチドが、別の核酸のヌクレオチドと水素結合できる場合には、2種の核酸は、その位置で互いに相補的であると考えられる。2種の一本鎖核酸分子間の相補性は、ヌクレオチドの一部のみが結合する「部分的」であり得、または一本鎖分子間に全相補性が存在する場合には完全であり得る。

#### 【0046】

いくつかの実施形態では、その5'末端に別の構築オリゴヌクレオチドの5'末端の配列領域と相補的である配列領域と、その3'末端に異なる構築オリゴヌクレオチドの3'末端の配列領域と相補的である配列領域とを含む、各々の複数の構築オリゴヌクレオチドなどの、複数の構築オリゴヌクレオチドが設計される。本明細書において、「構築」オリゴヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドアセンブリーに使用される複数または集団の一本鎖オリゴヌクレオチドの1種を指す。複数の構築オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドのセンスおよびアンチセンス鎖両方のオリゴヌクレオチドを含む。構築オリゴヌクレオチドは、任意の長さを有し得、長さは、オーバーラップまたは相補性配列を収容するよう設計される。構築オリゴヌクレオチドは、同一の大きさである場合も、異なる大きさである場合もある。好ましい実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの全配列にまたがり、ギャップを全く含まない。さらにその他の実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、部分的に重複しており、互いにハイブリダイズした場合に構築オリゴヌクレオチド間にギャップをもたらす。好ましくは、構築オリゴヌクレオチドのプールまたは集団は、重複する配列を有する構築オリゴヌクレオチドを含み、その結果、構築オリゴヌクレオチドが、適当なハイブリダイゼーション条件下で互いにハイブリダイズし得る。内部構築オリゴヌクレオチドは各々、2種の異なる構築オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするが、構築オリゴヌクレオチドは、5'および/または3'末端で、異なる（または同一の）内部オリゴヌクレオチド（単数または複数）と各々ハイブリダイズするということは理解されよう。したがって、重複する構築オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびライゲーションの結果、3'および/または5'オーバーハングを有する標的ポリヌクレオチドが得られる。さらにいくつかの実施形態では、得られた標的ポリヌクレオチドは、その5'または/および3'末端に平滑末端を含み得る。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドが、N個の構築オリゴヌクレオチドからアセンブルされる場合には、第1の複数の構築オリゴヌクレオチドが、その5'末端に、アンカーオリゴヌクレオチドの5'末端の配列領域と相補的である配列領域を含むなどの、1～N個の複数の異なる支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドが設計され、ここで、N個の複数の構築オリゴヌクレオチドは、その3'末端に、(N-1)個の構築オリゴヌクレオチドの3'末端配列領域と相補的である配列領域を含む。いくつかの実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、支持体結合アンカー一本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である5'末端を有する。本明細書において、アンカーオリゴヌクレオチドとは、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部と相補的であり、支持体上に固定化され得るよう

10

20

30

40

50

設計されたオリゴヌクレオチドを指す。例示的一実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの5'末端と相補的であり、支持体上に固定化され得る配列を有する。

#### 【0047】

当然のことではあるが、異なるオリゴヌクレオチドを、重複する配列領域で異なる長さを有するよう設計できる。重複する配列領域は、同一である（すなわち、核酸断片の同一鎖に対応する）場合も、相補的である（すなわち、核酸断片の相補鎖に対応する）場合もある。重複する配列は、任意の適切な長さのものであり得る。重複する配列は、約5から約500ヌクレオチド長の間（例えば、約10から100の間、約10から75の間、約10から50の間、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50などのヌクレオチド長）であり得る。しかし、より短い、より長いまたは中間の重複する長さも使用してよい。当然のことではあるが、アセンブリー反応において使用される異なるインプット核酸間の重複（5'または3'領域）は、異なる長さを有し得る。いくつかの実施形態では、アンカー支持体結合（または固定化）オリゴヌクレオチドは、所定の核酸配列のアセンブリーを補助するための重複する領域を有する配列領域を含む。好ましい実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドは、異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド（例えば、サブアセンブリー生成物など）とのハイブリダイゼーションのための相補的領域を有する配列領域を含む。相補的領域とは、固定化された鋳型オリゴヌクレオチド（例えば、鋳型オリゴヌクレオチド）の3'末端または5'末端のいずれかの配列領域を指す。好ましい実施形態では、相補的領域は、アンカーオリゴヌクレオチドの5'末端に位置する。相補的領域とは、第2のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの5'末端または3'末端とハイブリダイズできる第1のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの3'末端または5'領域を指す。

#### 【0048】

いくつかの実施形態では、核酸は、リガーゼベースのアセンブリー技術を使用してアセンブルされ、ここでは、オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドコンストラクトの全長センス（またはプラス鎖）およびアンチセンス（またはマイナス鎖）鎖を提供するよう設計されている。センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション後、各鎖上のオリゴヌクレオチドを、ライゲーションに付して、標的ポリヌクレオチドコンストラクトまたはサブアセンブリー生成物を形成する。本明細書にその全文が組み込まれる米国特許第5,942,609号が参照される。リガーゼベースのアセンブリー技術は、隣接する3'および5'核酸末端（例えば、3'末端が、5'末端と直接隣接するよう、相補的鋳型核酸上でアニーリングされた核酸（単数または複数）の5'リン酸および3'ヒドロキシル）の共有結合を触媒できる1種または複数の適したリガーゼ酵素を含み得る。したがって、リガーゼは、第1および第2の核酸が鋳型核酸上で隣同士がアニーリングされる場合に、第1の核酸の5'リン酸と第2の核酸の3'ヒドロキシル間のライゲーション反応を触媒し得る。リガーゼは、組換えまたは天然供給源から得ることができる。リガーゼは、熱安定性リガーゼであり得る。いくつかの実施形態では、好熱性生物から得られた熱安定性リガーゼを使用してもよい。熱安定性DNAリガーゼの例として、それだけには限らないが：Tth DNAリガーゼ（例えば、EurogentecおよびGeneCRAFTから入手可能であるサーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）由来の）；Pfu DNAリガーゼ（パイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）由来の超好熱性リガーゼ；Taqリガーゼ（サーマス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）由来の）、Ampliリガーゼ（登録商標）（Epicenter Biotechnologiesから入手可能）任意のその他の適した熱安定性リガーゼまたはそれらの任意の組合せが挙げられる。いくつかの実施形態では、1種または複数のより低温リガーゼも使用してよい（例えば、T4 DNAリガーゼ）。より低温リガーゼは、より高温では安定でない可能性がある、より短いオーバーハング（例えば、約3、約4、約5または約6塩基のオーバーハング）にとって有用であり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 9 】

非酵素技術を使用して、核酸をライゲーションすることもできる。例えば、酵素を使用することなく（例えば、リガーゼを使用せず）、1種または複数の核酸の5'末端（例えば、5'リン酸基）および3'末端（例えば、3'ヒドロキシル）を一緒に共有結合してもよい。いくつかの実施形態では、非酵素技術は、酵素ベースのライゲーションを上回る特定の利点を提供し得る。例えば、非酵素技術は、核酸基質中の非天然ヌクレオチド類似体の高い耐性を有し得、短い核酸基質をライゲーションするのに使用でき、RNA基質をライゲーションするのに使用でき、および/またはより安価なおよび/または特定の自動化（例えば、ハイスループット）適用により適したものであり得る。

## 【 0 0 5 0 】

非酵素ライゲーションは、化学的ライゲーションを含み得る。いくつかの実施形態では、2種以上の異なる核酸の核酸末端を化学的にライゲーションしてもよい。いくつかの実施形態では、単一核酸の核酸末端を、化学的にライゲーションしてもよい（例えば、核酸を環状化させるために）。当然のことではあるが、第1の二本鎖核酸末端の両鎖を、第2の二本鎖核酸末端の両鎖と化学的にライゲーションしてもよい。しかし、いくつかの実施形態では、第1の核酸末端の一方の鎖のみが、第2の核酸末端の単一の鎖と化学的にライゲーションされ得る。例えば、第1の核酸末端の一方の鎖の5'末端を、第2の核酸末端の一方の鎖の3'末端とライゲーションし、相補鎖の末端は化学的にライゲーションされなくてもよい。

## 【 0 0 5 1 】

したがって、化学的ライゲーションを使用して、第1の核酸末端の5'末端と第2の核酸末端の3'末端間の共有結合を形成してもよく、ここで、第1および第2の核酸末端は、単一の核酸の末端または別々の核酸の末端であり得る。一態様では、化学的ライゲーションは、連結形成を容易にするか、または促進する1種または複数の化学的反応部分を含む、修飾された末端（例えば、修飾された5'および/または3'末端）を有する少なくとも1種の核酸基質を含み得る。いくつかの実施形態では、化学的ライゲーションは、1種または複数の核酸末端が密接して一緒になる場合に（例えば、末端が、相補的核酸配列間のアニーリングのために一緒になる場合に）起こる。したがって、相補的3'または5'オーバーハング（例えば、二本鎖核酸の制限酵素切断によって生じたオーバーハング）間または3'末端が5'末端と密接に接近される相補的核酸の任意の組合せ間のアニーリング（例えば、核酸が相補的鋳型核酸とアニーリングされると、3'および5'末端が互いに隣接する）は、鋳型による（*template-directed*）化学的ライゲーションを促進し得る。化学反応の例として、それだけには限らないが、縮合、還元および/または光化学的ライゲーション反応を挙げることができる。当然のことではあるが、いくつかの実施形態では、化学的ライゲーションを使用して、天然に存在するホスホジエステルヌクレオチド間連結、天然に存在しないホスファミドピロホスフェートヌクレオチド間連結および/またはその他の天然に存在しないヌクレオチド間連結を製造することができる。

## 【 0 0 5 2 】

本発明のいくつかの態様では、オリゴヌクレオチドをポリメラーゼ鎖伸長によってアセンブリーする。いくつかの実施形態では、伸長反応の第1のステップは、プライマーを使用する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは5'末端または3'末端のいずれか、または両末端上に、ユニバーサル（すべてのオリゴヌクレオチドに共通する）、セミユニバーサル（オリゴヌクレオチドの少なくとも部分に共通する）または個々のもしくは独特のプライマー（各オリゴヌクレオチドに対して特異的）結合部位を含み得る。本明細書において、用語「ユニバーサル」プライマーまたはプライマー結合部位とは、オリゴヌクレオチドを増幅するために使用される配列が、すべてのオリゴヌクレオチドに共通し、その結果、すべてのこのようなオリゴヌクレオチドが、単一セットのユニバーサルプライマーを使用して増幅され得ることを意味する。その他の状況では、オリゴヌクレオチドは、独特のプライマー結合部位を含有する。本明細書において、用語「独特のプライマー

10

20

30

40

50

結合部位」とは、オリゴヌクレオチドのサブセットを選択的に増幅するプライマー認識配列のセットを指す。さらにその他の状況では、オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルおよび独特の増幅配列の両方を含有し、場合により、これらを逐次使用することができる。第1のステップでは、プライマーを加え、固定化または支持体結合オリゴヌクレオチドとアニーリングさせる。例えば、プライマーは、固定化されたアンカーオリゴヌクレオチドとアニーリングできる。いくつかの実施形態では、プライマーを、プライマー結合部位と呼ばれる、支持体結合または固定化オリゴヌクレオチドの配列と相補的であるよう設計する。第1のステップでは、ポリメラーゼ、少なくとも1種のプライマーおよびdNTPを含む溶液を、プライマー伸長を促進する条件下で、固体支持体の機構で加える。例えば、図1を参照すると、オリゴヌクレオチド(1'、2'、3'および4')を含む機構でプライマー(50)を加える。プライマーは、支持体結合オリゴヌクレオチドのプライマー結合部位とハイブリダイズし、プライマー伸長を促進する条件下で、プライマーが、鋳型として支持体結合配列(1'、2'、3'または4')を使用して相補的オリゴヌクレオチド(1、2、3または4)に伸長される。

#### 【0053】

いくつかの実施形態では、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)を使用して、核酸中のウラシル-グリコシド結合とハイブリダイズし、それによって、ウラシルを除去し、DNA中にアルカリ感受性塩基性部位を作製でき、これは、その後、エンドヌクレアーゼ、熱またはアルカリ処理によってハイブリダイズし得る。結果として、二本鎖核酸の一方の鎖の一部が除去され得、それによって、相補配列を一本鎖オーバーハングの形態で露出する。このアプローチには、二本鎖核酸断片の一方の鎖への1個または複数のウラシル塩基の計画的な組み込みが必要である。これは、例えば、3'末端ウラシルを含有する増幅プライマーを使用して、核酸断片を増幅することによって達成され得る。いくつかの実施形態では、プライマーは、複数のウラシル(U)を含有するプライマーである。プライマーは、支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドとまずアニーリングされ、適当な条件および温度下でのdNTPおよび適当なポリメラーゼが付加されると伸長される。その後のステップにおいて、プライマーを除去できる。UDGを用いて処理した後、ウラシルの5'のプライマーの領域が放出され得(例えば、希釈、インキュベーション、軽度変性条件への曝露などの際)、それによって、相補配列を一本鎖オーバーハングとして露出する。当然のことではあるが、オーバーハングの長さは、増幅プライマー上のウラシルの位置によって、また、増幅プライマーの長さによって決定され得る。いくつかの実施形態では、USER(商標)(ウラシル特異的切除試薬、New England Biolabs)などの、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物が使用される。UDGは、ウラシル塩基の切除を触媒し、脱塩基部位を形成し、一方でホスホジエステル骨格は無傷で残す。エンドヌクレアーゼVIIのリアーゼ活性は、脱塩基部位の3'および5'部位でホスホジエステル骨格を分解し、その結果、塩基を含まないデオキシリボースが放出される。その後のステップにおいて、プライマーが除去され得る。

#### 【0054】

伸長反応は、支持体結合オリゴヌクレオチド(1'、2'、3'および4')を含む、利用される機構のすべてを包含する単一容量において起こり得るか、または各ステップは、特異的伸長ステップを受けるための対象とする領域(単数または複数)のみを含有する局在する個々の微小容積において起こり得るということは理解されよう。いくつかの実施形態では、伸長および/またはアセンブリー反応は、微小液滴(各々が、出典明示によりその全文が本明細書に組み込まれるPCT出願PCT/US2009/55267およびPCT出願PCT/US2010/055298を参照のこと)内で実施される。

#### 【0055】

プライマー伸長は、適したヌクレオチドおよびアニーリングされる鋳型の存在下で、5'から3'方向での核酸の鋳型に基づく伸長を触媒できる1種または複数の適したポリメラーゼ酵素を含み得る。ポリメラーゼは、熱安定性であり得る。ポリメラーゼは、組換え

10

20

30

40

50

または天然供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、好熱性生物から得られた熱安定性ポリメラーゼを使用してもよい。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、3' 5' エキソヌクレアーゼ/ブルーフリーディング活性を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、ブルーフリーディング活性を全く有さないか、またはわずかしかなる場合もある（例えば、ポリメラーゼは、そのブルーフリーディング活性を低下するように修飾されている天然ポリメラーゼの組換え変異体であり得る）。熱安定性DNAポリメラーゼの例として、それだけには限らないが：Taq（細菌サーマス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）に由来する熱安定性DNAポリメラーゼ）；Pfu（パイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）に由来する3' 5' エキソヌクレアーゼ/ブルーフリーディング活性を有する好熱性DNAポリメラーゼ、例えば、Promegaから入手可能）；VentR（登録商標）DNAポリメラーゼおよびVentRO（exo-）DNAポリメラーゼ（サーモコッカス・リトラリス（*Thermococcus litoralis*）由来の3' 5' エキソヌクレアーゼ/ブルーフリーディング活性を有するか、有さない好熱性DNAポリメラーゼ；Thポリメラーゼとしても知られる）；Deep VentR（登録商標）DNAポリメラーゼおよびDeep VentR（登録商標）（exo-）DNAポリメラーゼ（パイロコッカス（*Pyrococcus*）種GB-D由来の、3' 5' エキソヌクレアーゼ/ブルーフリーディング活性を有するか、または有さない好熱性DNAポリメラーゼ；New England Biolabsから入手可能）；KOD HiFi（3' 5' エキソヌクレアーゼ/ブルーフリーディング活性を有する、組換えサーモコッカス・コダカラエンシス（*Thermococcus kodakaraensis*）KODI DNAポリメラーゼ、Novagenから入手可能）；BIO-X-ACT（5' - 3' DNAポリメラーゼ活性および3' 5' ブルーフリーディング活性を有するポリメラーゼの混合物）；クレノウ断片（ポリメラーゼ活性を保持するが、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性は失っている大腸菌（*E. coli*）DNAポリメラーゼIのN末端切断、例えば、PromegaおよびNEBから入手可能）；Sequenase（商標）（T-5' エキソヌクレアーゼ活性が欠損したT7 DNAポリメラーゼ）；Phi29（バクテリオファージ29 DNAポリメラーゼ、例えば、TempliPhi（商標）DNA配列決定鋳型増幅キットにおけるローリングサークル型増幅のために使用できる、Amersham Biosciencesから入手可能）；TopoTaq（超安定DNA結合ドメインとメタノピラス（*Methanopyrus*）トボイソメラーゼのDNA非連結活性を組み合わせ、エキソヌクレアーゼ活性を有さないハイブリッドポリメラーゼ、忠実度Systemsから入手可能）；エキソヌクレアーゼ活性を有するブルーフリーディングドメインを組み込むTopoTaq HiFi；Phusion（商標）（処理能力増強ドメインを有するパイロコッカス（*Pyrococcus*）様酵素、New England Biolabsから入手可能）；任意のその他の適したDNAポリメラーゼまたはそれらの2種以上の任意の組合せが挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、SDP（鎖置換ポリメラーゼ；例えば、エキソヌクレアーゼ活性を有さないSDPであるSDPe）であり得る。これによって、均一温度での等温PCR（等温伸長、等温増幅）が可能となる。ポリメラーゼ（例えば、Phi29、Bst）は、鋳型に沿って移動するので、（例えば、先の伸長反応において作製された）相補鎖を置換する。置換されたDNAは、一本鎖であるので、プライマーは、一定温度で結合し、増幅の間のあらゆる熱循環の必要性を除去できる。

#### 【0056】

いくつかの実施形態では、伸長または増幅後に、ポリメラーゼを非活性化してその後のステップを干渉するのを防ぐことができる。加熱ステップ（例えば、高温）は、熱安定性ではないほとんどの酵素を変性させ、非活性化できる。酵素は、液体の存在下で非活性化されても、不在下で非活性化されてもよい。乾燥支持体での熱不活化は、オリゴヌクレオチドに対して有害な効果を全く有せずに酵素を非活性化するための利点を有し得る。いくつかの実施形態では、熱安定性PCR DNAポリメラーゼの非熱安定性型を使用しても

10

20

30

40

50

よいが、この酵素は、エラー率および速度についてあまり最適化されていない。あるいは、E p o x y d A T Pを使用して、酵素を不活化してもよい。

【 0 0 5 7 】

一実施形態では、複数の表面に結合された一本鎖オリゴヌクレオチドを有する少なくとも1種の機構を含む支持体が提供される。複数のオリゴヌクレオチド各々は、支持体の別個の機構と結合しており、機構と結合している複数のオリゴヌクレオチド各々の予め定義された配列は、異なる機構と結合しているオリゴヌクレオチドの予め定義された配列とは異なっている。少なくとも1種の複数のオリゴヌクレオチドは、鋳型依存性合成によって、支持体の第1の機構での鎖伸長反応において合成される。いくつかの実施形態では、別個の機構を含有する全支持体またはアレイを、熱循環、アニーリング温度条件、ストリン  
10 ジェントな融解温度条件または変性温度条件に付す。支持体を加熱および冷却することは、任意の熱サイクル機器で実施できる。その他の実施形態では、1つまたは複数の別個の機構を、特定の温度条件（アニーリング、伸長、洗浄または融解）に付す。選択された独立した機構（互いに分離している）の熱循環は、少なくとも1種の別個の機構を局所的に加熱することによって実施できる。別個の機構は、当技術分野で公知の任意の手段によって局所的に加熱できる。例えば、正確なx-y次元で制御でき、それによって、液滴の温度を個々に調節できるエネルギーのレーザー供給源を使用して、別個の機構を局所的に加熱してもよい。別の例では、より広いビームレーザーのマスクとの組合せを使用して、特定の機構に照射することができる。いくつかの実施形態では、酵素反応（PCR、ライゲ  
20 ーションまたは任意のその他の温度感受性反応）が支持体上で起こり得るよう支持体上の温度を制御する方法が提供される。いくつかの実施形態では、走査レーザーを使用して、固体支持体上の個別の機構上の熱循環を制御する。使用される波長は、広範囲（100 nm ~ 100,000 nm、すなわち、紫外線から赤外線）から選択できる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドを含む機構は、光吸収体または指標を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体は、空気または流体の循環によって冷却される。沈着されるエネルギーは、吸光度挙動に基づいて算出することができる。いくつかの実施形態では、液滴の温度は、熱力学を使用してモデル化することができる。温度は、LCDのような材料または任意のその他のその場技術によって測定できる。さらに別の実施形態では、全支持体を加熱し、冷却して、酵素反応またはその他の温度感受性反応が起こることを可能にすることが  
30 できる。いくつかの実施形態では、エネルギー供給源を、走査設定によって、支持体結合分子を含む固体支持体の表面上の種々の位置にエネルギーを沈着するよう向けることができる。光吸収性材料を固体支持体の表面上に付加してもよい。高輝度ランプ、レーザーまたはその他の電磁エネルギー供給源（マイクロ波を含む）などの光エネルギー供給源を使用してよい。機構の各々で沈着されるエネルギーを制御することによって、異なる反応部位の温度を独立に制御できる。

【 0 0 5 8 】

例えば、温度制御のためにデジタルマイクロミラーデバイス（Digital Micromirror Device（DMD））を使用してよい。DMDは、微細加工された空間光変調器である。例えば、米国特許第7,498,176号を参照のこと。いくつかの実施形態では、DMDを使用して、固体支持体上の選択されたスポットまたは液滴  
40 を正確に加熱することができる。DMDは、その表面上に、加熱されるべきスポットまたは液滴に対応する、アレイ中に配置された、例えば、数十万から数百万個の微視的ミラーを有するチップであり得る。ミラーは、オンまたはオフ状態に個々に回転できる（例えば、 $\pm 10 \sim 12^\circ$ ）。オン状態では、光供給源（例えば、電球）からの光が固体支持体上で反射され、選択されたスポットまたは液滴を加熱する。オフ状態では、光は他の場所に向けられる（例えば、ヒートシンク上に）。いくつかの実施形態では、アレイは、矩形アレイであり得る。一例では、DMDは、16  $\mu\text{m}$ 幅のマイクロミラーの1024 x 768のアレイからなり得る。別の例では、DMDは、10  $\mu\text{m}$ 幅のマイクロミラーの1920 x 1080のアレイからなり得る。アレイサイズおよびマイクロミラー幅のその他の配置  
50 もあり得る。これらのミラーは個々にアドレス可能であり得、固体支持体上の異なるスポ

ットの加熱において任意の所与のパターンまたは配置を作製するために使用できる。スポットはまた、例えば、個々のスポットに対して異なる波長を提供することおよび/または照射時間を制御することによって異なる温度に加熱することもできる。特定の実施形態では、DMDは、光を選択されたスポットに向けることができ、また、選択された任意のオリゴヌクレオチドを同定、選択、融解および/または切断するために使用することができる。

#### 【0059】

図1は、基板または固体支持体上で所定の配列を有するポリヌクレオチドを製造するための例示的方法を示す。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドをアセンブルして、最終核酸配列（例えば、標的核酸）を合成できる。図1(a)を参照すると、核酸アレイ10は機構20の配置を有すると示され、これでは、各機構は、複数の支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチド30を含む。支持体結合オリゴヌクレオチドは、その3'末端によって結合されることが好ましい。いくつかの実施形態では、支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドは、約20ヌクレオチド長、約40ヌクレオチド長、約50ヌクレオチド長、約60ヌクレオチド長、約70ヌクレオチド長、約80ヌクレオチド長、約100ヌクレオチド長またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド30は、3'末端にユニバーサルプライミング部位（例えば、3'末端の15塩基プライマー結合部位）および構築オリゴヌクレオチドと相補的である配列（ビルディングブロックとも呼ばれ、1'、2'、3'などと名づけられる）をさらに含む。いくつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、別のものと連続するものであり、一緒になって、標的ポリヌクレオチドの配列を構成し、またはそれにまたがる。好ましい実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの全配列にまたがり、ギャップを全く含まない。さらにその他の実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、部分的に重複しており、互いにハイブリダイズした場合に構築オリゴヌクレオチド間にギャップをもたらす。図1を参照すると、標的ポリヌクレオチドは、構築オリゴヌクレオチドの集団、二本鎖標的ポリヌクレオチドの一方の鎖（例えば、プラス鎖）に相当する偶数の構築オリゴヌクレオチドおよび二本鎖標的ポリヌクレオチドの相補鎖（例えば、マイナス鎖）に相当する奇数からアセンブリーされる。構築オリゴヌクレオチドのプールは、重複する配列を有する構築オリゴヌクレオチドを含み、その結果、構築オリゴヌクレオチドが適当なハイブリダイゼーション条件下で互いにハイブリダイズすることが好ましい。内部構築オリゴヌクレオチドは各々、2種の異なる構築オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするが、5'および/または3'末端の構築オリゴヌクレオチドは、異なる（または同一の）内部オリゴヌクレオチド（単数または複数）と各々ハイブリダイズするということは理解されよう。したがって、重複する構築オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの結果、3'および/または5'オーバーハングを有する標的ポリヌクレオチドが得られる。さらにいくつかの実施形態では、得られた標的ポリヌクレオチドは、その5'または/および3'末端に平滑末端を含み得る。構築オリゴヌクレオチドを、その後、当技術分野で公知のライゲーションアセンブリー技術を使用して、ライゲーションして、共有結合によって結合された二本鎖核酸コンストラクトを形成してもよい（図1(d)）。

#### 【0060】

図1(b)を参照すると、支持体結合オリゴヌクレオチドを含む支持体10上の少なくとも1つの機構が、プライマー50とともにインキュベートされる。第1のステップでは、プライマーが、固定化された一本鎖オリゴヌクレオチドとまずアニーリングされ、適当な伸長条件下、適当なポリメラーゼおよびdNTPの存在下で伸長されて、構築オリゴヌクレオチド60（1、2、3、4と名づけられている）を形成し、これは、支持体結合オリゴヌクレオチド（1'、2'3'、4'）に対して相補的である。いくつかの実施形態では、プライマーは、複数のウラシル（U）を含有するプライマーである。その後のステップでは、プライマーが除去される。好ましくは、USER（商標）エンドヌクレアーゼがプライマーを消化するために付加される。プライマーの消化は、伸長ステップに続いて起こる場合もあり、それによって、支持体結合オリゴヌクレオチド（例えば、1-1'、

10

20

30

40

50

2 - 2' など)とハイブリダイズする構築オリゴヌクレオチドを含む二本鎖を作製する。さらにその他の実施形態では、プライマーの消化は、構築オリゴヌクレオチドの溶液への放出後に溶液中で起こる(図1c)。

#### 【0061】

第2のステップでは(図1c)、新規に合成された伸長生成物(構築オリゴヌクレオチド65:1、2、3、および/または4)が融解され、支持体10から放出される。解離は、並列して、または逐次実施できる。構築オリゴヌクレオチドは、溶液中に放出され得る。一実施形態では、溶液は、10mM Tris、50mM塩化ナトリウムおよび1mM EDTAを含むバッファーである。二本鎖の融解は、例えば、アレイ上の特定の位置で、温度を融解温度(例えば、95)に高めることによって実施できる。あるいは、二本鎖核酸を分離できる酵素を添加することによって、二本鎖を解離させてもよい。ヘリカーゼ酵素をアレイ上の特定の位置に添加してもよい。ヘリカーゼ酵素は、当技術分野で公知であり、DNAを二本鎖構造から一本鎖構造にほどくとわかっている。一本鎖伸長生成物を、第1の複数のアンカー支持体結合オリゴヌクレオチド、第1の伸長生成物(例えば、構築オリゴヌクレオチド1)と部分的に相補的である配列を含む第1の複数のアンカーオリゴヌクレオチド配列を含む第2の支持体15に移すことができる。第1の伸長生成物を、適当な条件下で第1の複数のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。同じ反応の間に、またはその後、その他の伸長生成物(または重複する構築オリゴヌクレオチド)を、適当な条件下で、その相補配列とハイブリダイズし、それによって、より長いポリヌクレオチド配列を形成する。

#### 【0062】

図1(d)を参照すると、構築オリゴヌクレオチド65、第1の構築オリゴヌクレオチド(構築オリゴヌクレオチド1)と相補的である配列を有するアンカー支持体結合オリゴヌクレオチド40を含む新規表面15に移すことができる。さらなる構築オリゴヌクレオチド(構築オリゴヌクレオチド2、3、4など)は、示されるように、その重複する領域によって互いにハイブリダイズするよう設計され、より長い核酸コンストラクト70を形成する。いくつかの実施形態では、アンカー支持体結合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、一本鎖である。いくつかの実施形態では、アンカー支持体結合オリゴヌクレオチドは、第1の複数のオリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である5'末端を含む。一緒に、ポリヌクレオチド配列を形成するさらなる構築オリゴヌクレオチドは、相補的3'末端を含み、互いにハイブリダイズする。挿入図、図1(d)は、互いにハイブリダイズして、アンカーオリゴヌクレオチド40上で構築される、より長いポリヌクレオチドコンストラクトにアセンブルするよう設計されているオリゴヌクレオチドの例を示す。各接合部をライゲーションし、ひいては、図1(e)に示されるように、共有結合によって接続されたより長いポリヌクレオチドコンストラクト90を形成するために、リガーゼ80を溶液中に導入する。必要に応じて、アセンブリーにおいて、最終オリゴヌクレオチド(例えば、構築オリゴヌクレオチド4)は、全長構築が起こったことを示すために蛍光標識で標識され得る。

#### 【0063】

特定の例示的实施形態では、検出可能な標識を使用して、本明細書に記載された1種または複数のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを検出できる。検出可能なマーカの例として、種々の放射性部分、酵素、補欠分子族、蛍光マーカ、発光マーカ、生物発光マーカ、金属粒子、タンパク質間結合対、タンパク質抗体結合対などが挙げられる。蛍光タンパク質の例として、それだけには限らないが、黄色蛍光タンパク質(YFP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青緑色蛍光タンパク質(CFP)、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、フィコエリトリンなどが挙げられる。生物発光マーカの例として、それだけには限らないが、ルシフェラーゼ(例えば、細菌の、ホタルの、コメツキムシなど)、ルシフェリン、エクオリンなどが挙げられる。可視的に検出可能なシグナルを有する酵素系の例として、それだけには限らないが、ガラクト



シダーゼ、グルコリミダーゼ (glucorimidases)、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、コリンエステラーゼなどが挙げられる。同定可能なマーカーとしてまた、125I、35S、14Cまたは3Hなどの放射性化合物が挙げられる。同定可能なマーカーは、種々の供給源から市販されている。

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、支持体は、構築オリゴヌクレオチドと相補的である支持体結合オリゴヌクレオチドを含む機構のセットと、アンカー支持体結合オリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つの機構とを含む。アンカーオリゴヌクレオチドは、好ましくは、一本鎖であり、標的ポリヌクレオチドの末端配列と相補的である配列を含む。図2(a)を参照すると、支持体が同一表面上に、支持体結合オリゴヌクレオチド130と、支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド140とを含む点を除いて、図1に記載されたものと同様である、オリゴヌクレオチドアレイ110が示されている。

#### 【0065】

図2(b)を参照すると、プライマー150は、ハイブリダイズ条件下で、支持体結合オリゴヌクレオチド130とハイブリダイズする。第1のステップでは、プライマーが支持体結合一本鎖オリゴヌクレオチドとアニーリングされ、適当な条件および温度下でdNTPおよび適当なポリメラーゼが添加されると伸長され、構築オリゴヌクレオチド160(構築オリゴヌクレオチド1、2、3、4)を形成し、これは、支持体結合オリゴヌクレオチド(1'、2'3'、4')と相補的である。いくつかの実施形態では、プライマーは、複数のウラシル(U)を含有するプライマーである。その後のステップでは、プライマーが除去される。好ましくは、USER(商標)エンドヌクレアーゼがプライマーを消化するために付加される。プライマーの消化は、伸長ステップに続いて起こる場合もあり、それによって、支持体結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする構築オリゴヌクレオチドを含む二本鎖を作製する。さらにその他の実施形態では、プライマーの消化は、構築オリゴヌクレオチドの溶液への放出後に溶液中で起こる(165、図2c)。

#### 【0066】

第2のステップでは(図2c)、新規に合成された伸長生成物(構築オリゴヌクレオチド1、2、3、および/または4)が融解され、機構(構築オリゴヌクレオチド165)から放出される。構築オリゴヌクレオチドの解離は、並列して、または逐次実施できる。構築オリゴヌクレオチド165は、溶液中に放出され得る。二本鎖の融解は、温度を融解温度(例えば、95)に高めることによって実施できる。あるいは、ヘリカーゼなどの二本鎖核酸を解離できる酵素を使用して二本鎖を解離させてもよい。第1の伸長生成物を、適当な条件下で第1の複数のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、その他の伸長生成物(または重複するオリゴヌクレオチド)を、適当な条件下で、その相補配列とハイブリダイズする。

#### 【0067】

図2(d)を参照すると、構築オリゴヌクレオチド(65)は、第1の構築オリゴヌクレオチド(構築オリゴヌクレオチド1)と相補的である配列を有するアンカー支持体結合オリゴヌクレオチド140とハイブリダイズする。さらなる構築オリゴヌクレオチド(2、3、4など)は、図2dに示されるように、その重複する領域によって互いにハイブリダイズするよう設計され、より長い核酸コンストラクト170を形成する。好ましい実施形態では、アンカー支持体結合オリゴヌクレオチドは、一本鎖である。いくつかの実施形態では、アンカー支持体結合オリゴヌクレオチドは、第1の複数のオリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である5'末端を含む。ポリヌクレオチド配列を一緒に形成するさらなる構築オリゴヌクレオチドは、相補的3'末端を含み、互いにハイブリダイズする。図2(d)は、互いにハイブリダイズして、アンカーオリゴヌクレオチド140上で構築される、より長いポリヌクレオチドコンストラクトにアSEMBLするよう設計されているオリゴヌクレオチドの例を示す。各接合部を共有結合によってライゲーションし、ひいては、図2(e)に示されるように、共有結合によって接続されたより長いポリヌクレオチドコンストラクト190を形成するために、溶液にリガーゼ180を導入する。必要に応じて

、アセンブリーにおける最終オリゴヌクレオチド（構築オリゴヌクレオチド4）は、全長構築が起こったことを示すために蛍光標識で標識され得る。

【0068】

本発明の態様は、予め定義された配列を有する標的ポリヌクレオチドの選択および／または望ましくないアセンブリー生成物の除去に関する。オリゴヌクレオチドからのポリヌクレオチドアセンブリーの際に、部分的な長さのポリヌクレオチド、切断型コンストラクトなどの望ましくない生成物がアセンブルされ得る。正しい配列および／または長さを有さない望ましくない生成物またはポリヌクレオチドを除去することは有用であり得る。いくつかの実施形態では、1種または複数のアセンブルされたポリヌクレオチドが、それらが所定の配列を含有するか否かを調べるために配列決定され得る。この手順によって、正しい配列を有する断片が同定されることが可能となる。その他の実施形態では、当技術分野で公知のその他の技術を使用して、エラーを含有する核酸断片を除去することもできる。

【0069】

本発明のいくつかの態様では、標的ポリヌクレオチド配列をエキソヌクレアーゼ消化から選択的に保護し、それによって、望ましくないコンストラクトの排除を容易にするための方法が提供される。好ましくは、一本鎖核酸を消化する種々のヌクレアーゼのいずれかも、使用できる。適したヌクレアーゼとして、例えば、一本鎖特異的3'エキソヌクレアーゼ、一本鎖特異的エンドヌクレアーゼ、一本鎖特異的5'エキソヌクレアーゼなどが挙げられる。特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、大腸菌（*E. coli*）エキソヌクレアーゼIを含む。いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ消化は、すべての非二本鎖配列を消化するために実施される。選択方法は、図3に示されている。一実施形態では、選択方法は、完全にアセンブルされた生成物の末端3'または5'オーバーハングを利用する。完全にアセンブルされた生成物の一本鎖オーバーハング配列（5'または3'）は、末端オリゴヌクレオチド（例えば、図3に表される、構築オリゴヌクレオチド4）の配列に対応することは理解されよう。望ましくない生成物では、一本鎖3'または5'オーバーハング配列は、予め定義された末端オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する。例えば、図3に表されるように、望ましくない生成物は、末端構築オリゴヌクレオチド4の代わりに構築オリゴヌクレオチド2または3を有する遊離オーバーハングを有する。本明細書において、用語「末端オリゴヌクレオチド」または「末端構築オリゴヌクレオチド」とは、標的ポリヌクレオチド末端配列または末端オーバーハングでのオリゴヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、末端オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの3'または5'一本鎖オーバーハングに対応する。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、少なくとも第1のオリゴヌクレオチドと、末端構築オリゴヌクレオチドとを含み、ここで、末端オリゴヌクレオチドは、第1のオリゴヌクレオチドの下流である。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、第1のオリゴヌクレオチド、末端オリゴヌクレオチドおよび少なくとも1種の内部オリゴヌクレオチドを含む。

【0070】

図3a～cは、切断型または望ましくないアセンブル（72および74、図3b）が作製される場合ならびに全長アセンブル（70、図3b）を示す。望ましくないアセンブルを濾過して取り除くために、核酸ヘアピン構造またはステム-ループオリゴヌクレオチド200を、アセンブリー生成物に加えてもよい。ステム-ループオリゴヌクレオチドは、5'または3'オーバーハングとハイブリダイズし、全長アセンブリー生成物70中に存在する2つの末端オリゴヌクレオチドとライゲーションするよう設計される。さらに、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、切断型生成物72および74とハイブリダイズまたはライゲーションしないよう設計される。

【0071】

ステム-ループ構造は、オリゴヌクレオチドをその一本鎖配列内に相補配列を有するよう設計し、それによって、一本鎖が折り重なって、二本鎖ステムおよび一本鎖ループを形成することによって形成され得る。好ましくは、二本鎖ステムドメインは、少なくとも約

2塩基対を有し、一本鎖ループは、少なくとも3ヌクレオチドを有する。好ましくは、ステムは、オーバーハング一本鎖領域(3'または5')を含む、すなわち、ステムは部分的に二本鎖である。例えば、オーバーハングの長さは、約3~約10、~約20、~約50などのヌクレオチドであり得る。例示的一実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドのオーバーハングの長さは、完全にアセンブルされたポリヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドの5'または3'-一本鎖オーバーハングと相補的である。

【0072】

図3dを参照すると、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、ライゲーションされて、予め定義された配列を有する全長ポリヌクレオチドとなる。図3eを参照すると、支持体表面は、3'ヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼに曝露される。好ましい実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、全長ポリヌクレオチドコンストラクト70のオーバーハング(3'または5'オーバーハング)を保護するよう働く。ステム-ループオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする/ライゲーションしなかった望ましくないコンストラクト(例えば、切断型コンストラクト)は、消化の影響を受けやすい。消化ステップ(図3e)の後、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、全長コンストラクトから切断除去され得る。例えば、いくつかの実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、ステム-ループオリゴヌクレオチドのステム構造中にII型制限部位を含むよう設計され、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、核酸コンストラクト制限酵素から(例えば、II型制限酵素)によって切断除去される。その他の実施形態では、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のウラシルを含むよう設計され、ステム-ループオリゴヌクレオチドは、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物またはUSER(商標)酵素を使用して、核酸コンストラクトから切断除去される。いくつかの実施形態では、全長ポリヌクレオチドは、表面から切断除去され得る。いくつかの実施形態では、必要な制限部位が、第1の複数のオリゴヌクレオチドの設計に、および/またはアンカーオリゴヌクレオチドの設計に具体的に含まれ得る。いくつかの実施形態では、制限部位は、II型制限部位である。いくつかの実施形態では、全長コンストラクトは、その後増幅され得る。

【0073】

いくつかの実施形態では、アンカーオリゴヌクレオチドの3'領域は、制限酵素部位を含む。いくつかの実施形態では、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含むよう設計され得る。例示的一実施形態では、プライマー/プライマー結合部位は、II型制限エンドヌクレアーゼの結合および/または切断部位を含有する。特異的結合および/または切断部位を有するさまざまな制限エンドヌクレアーゼは、例えば、New England Biolabs(Beverly, Mass.)から市販されている。種々の実施形態では、3'オーバーハング、5'オーバーハングまたは平滑末端を生成する制限エンドヌクレアーゼを使用してもよい。オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼを使用する場合には、エキソヌクレアーゼ(例えば、RecJf、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼT、S<sub>1</sub>ヌクレアーゼ、P<sub>1</sub>ヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、CEL Iヌクレアーゼなど)を使用して、平滑末端を生成することができる。あるいは、特異的制限エンドヌクレアーゼによって形成される付着末端を使用して、サブアセンブルの、所望の配置でのアセンブリーを容易にすることができる。例示的一実施形態では、II型制限エンドヌクレアーゼの結合および/または切断部位を含有するプライマー/プライマー結合部位を使用して、一時的プライマーを除去できる。用語「II型制限エンドヌクレアーゼ」とは、非パリンドローム認識配列および認識部位の外側(例えば、認識部位から0~約20ヌクレオチド遠位)に生じる切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼを指す。II型制限エンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸分子中にニックを作製し得るか、または二本鎖の破損を作製し得、これらが平滑末端または付着末端のいずれかをもたらす(例えば、5'または3'オーバーハングのいずれか)。II型エンドヌクレアーゼの例として、例えば、3'オーバーハングをもたらす酵素、例えば、Bsr I、Bsm I、BstF5 I、BsrD

10

20

30

40

50

I、Bts I、Mnl I、BciV I、Hph I、Mbo II、Eci I、  
 Acu I、Bpm I、Mme I、BsaX I、Bcg I、Bae I、Bfi I、  
 TspDT I、TspGW I、Taq II、Eco57 I、Eco57 M I、  
 Gsu I、Ppi I、およびPsr Iなど；5'オーバーハングをもた  
 らす酵素、例えば、BsmA I、Ple I、Fau I、Sap I、BspM I、  
 SfaN I、Hga I、Bvb I、Fok I、BceA I、BsmF I、K  
 sp632 I、Eco31 I、Esp3 I、Aar Iなど；ならびに平滑末端を  
 もたらず酵素、例えば、Mly I およびBtr Iなどが挙げられる。II型エンド  
 スクレアーゼは、市販されており、当技術分野で周知である（New England  
 Biolabs、Beverly、Mass.）。

10

#### 【0074】

その他の実施形態では、プライマーおよび/またはプライマー結合部位は、少なくとも  
 1個の（on）ウラシルを含み、プライマーは、ウラシルDNAグリコシラーゼ（UDG）  
 およびDNAグリコシラーゼ-リナーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物または提  
 供されるような（as provided to）USER（商標）酵素を使用して切断除  
 去される。

#### 【0075】

いくつかのその他の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの選択は、所望の標的ポリヌ  
 クレオチドの大きさまたは長さを利用する。図4は、アレイの表面上のポリヌクレオチド  
 コンストラクト（単数または複数）の長さを測定する方法および全長ポリヌクレオチド  
 コンストラクト（単数または複数）を選択する方法を示す。好ましくは、方法によって、種  
 々のポリヌクレオチドコンストラクトの長さの分布の中から正しい長さの標的ポリヌクレ  
 オチドコンストラクトを選択することが可能となる。当業者ならば、核酸のガラス表面と  
 の結合化学が、通常、核酸分子を1～15nm、好ましくは、2～8nm、好ましくは、  
 5～7nmの範囲の分子間隔（d）にすることは理解されよう。いくつかの実施形態では  
 、距離dは、約6nmである。図4bを参照すると、支持体上に固定化されている、第1  
 の複数のアンカーオリゴヌクレオチド240および第2の複数のアンカーオリゴヌクレ  
 オチド242を有する表面215を調製でき、ここで、第1および第2の複数のアンカー  
 オリゴヌクレオチドは、異なる予め定義された配列を有する。いくつかの実施形態では、  
 第1および第2の複数のアンカーオリゴヌクレオチドは、所定の距離Xだけ離れている。  
 いくつかの実施形態では、距離Xは、等数の第1および第2のアンカー分子を、スパー  
 サーオリゴヌクレオチド配列245と呼ばれる第3の支持体結合オリゴヌクレオチド配列と  
 混合することによって設定および制御できる。いくつかの実施形態では、スパーサーオリ  
 ゴヌクレオチド配列は、構築オリゴヌクレオチドとの相補配列を有さないよう設計される  
 。いくつかの実施形態では、スパーサーオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。さらに、  
 その他の実施形態では、スパーサーオリゴヌクレオチドは、二本鎖である。いくつかの実  
 施形態では、距離Xは、以下の方程式：

20

30

$$X \sim d \times (C[\text{スパーサー}] / C[\text{アンカー1} + \text{アンカー2}])$$

〔式中、dは、2種の核酸分子間の距離であり、C〔スパーサー〕は、スパーサーオリ  
 ゴヌクレオチドの濃度であり、C〔アンカー1+アンカー2〕は、アンカーオリゴヌクレ  
 オチド1およびアンカーオリゴヌクレオチド2の混合物の濃度である〕  
 を使用して設定される。

40

#### 【0076】

図4を参照すると、構築オリゴヌクレオチド265が、支持体結合オリゴヌクレオチド  
 230を鋳型として使用してプライマー伸長によって合成される。いくつかの実施形態で  
 は、第1の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド240は、第1の複数の構築オリゴヌ  
 クレオチドと相補的である配列を有するよう設計される。構築オリゴヌクレオチド265  
 は、互いにハイブリダイズし、アンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、それ  
 によって、支持体結合ポリヌクレオチドコンストラクト（270、272、273、274  
 、図4b）を作製し得る。アセンブリー反応後、これらのポリヌクレオチドコンストラク

50

ト(270)の一部は、予め定義された配列を有する全長ポリヌクレオチドであり得るが、その他のポリヌクレオチドコンストラクト(272、273、274)は、全長ポリヌクレオチドコンストラクトよりも短いものであり得る。核酸コンストラクト中のヌクレオチドは、約0.33nmまたは0.34nm離れた間隔であることを考慮すると、1000ヌクレオチド塩基を含む(通常の遺伝子の長さのように)核酸コンストラクトは、約340nmの長さとなる。いくつかの実施形態では、第2の支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド242は、全長DNAコンストラクト270の末端または5'オーバーハングをつなぐことができるよう設計され得る。さらに、距離Xが、全長コンストラクトの予測されるおよその長さであるよう設定される場合には、全長コンストラクトの末端または5'オーバーハングは、a)全長コンストラクトが、末端で正しい配列を有する場合およびb)全長コンストラクトが正しい長さを有する場合に、第2のアンカーオリゴヌクレオチドとのみ結合するはずである(図4cに示される、290)。いくつかの実施形態では、第1のアンカー240は、II型エンドヌクレアーゼ部位を含み得る。全長生成物は、II型制限エンドヌクレアーゼを使用して切断され得、その結果、第2のアンカー242の遠位末端で固定された生成物が得られる。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、少なくとも1個のウラシルを含み、全長生成物は、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)およびDNAグリコシラーゼ-リアーゼエンドヌクレアーゼVIIの混合物またはUSER(商標)酵素を使用して切断される。

#### 【0077】

本発明のいくつかの態様は、高度に並列した支持体結合オリゴヌクレオチドアセンブリを可能にするデバイスおよび方法に関する。いくつかの実施形態では、複数のアンカーオリゴヌクレオチドに、相補的な重複するオリゴヌクレオチドを逐次添加することによって、表面上でポリヌクレオチドのアレイをアセンブルできる。好ましい実施形態では、アレイの異なる機構で、異なる所定の配列を有する複数のポリヌクレオチドが合成される。図5を参照すると、上記のように、アレイの各機構が、支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド(340: A<sub>0</sub>、B<sub>0</sub>、C<sub>0</sub>、D<sub>0</sub>)を含むアンカーアレイ310が提供される。各アンカーオリゴヌクレオチドは、一本鎖であり得、その5'末端に、第1の複数のオリゴヌクレオチドの5'末端と相補的である配列を含み得る。種々のポリヌクレオチドの高度に並列した合成のためには、各機構での複数のアンカーオリゴヌクレオチドは各々、合成される所定のポリヌクレオチド配列の5'末端と相補的である配列を有する必要があるということは理解されよう。したがって、いくつかの実施形態では、アンカーアレイは、アレイの異なる機構で、アンカーオリゴヌクレオチドの異なる集団を含み、アンカーオリゴヌクレオチドの各集団または複数のものは、異なる5'末端配列を有する。したがって、構築アレイが、複数の機構を含み、各機構が、予め定義された配列を有する支持体結合オリゴヌクレオチド(A<sub>n</sub>、B<sub>n</sub>、C<sub>n</sub>、D<sub>n</sub>)の異なる集団を含み、2種以上の構築アレイ(311、312および315)が提供され得る。当然のことではあるが、いくつかの実施形態では、各機構は、同一表面上の別の機構からの複数の支持体結合オリゴヌクレオチドの配列とは異なる所定の配列を有する、複数の支持体結合オリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチド配列は、1個または複数の塩基で異なり得る。図5を参照すると、第1のアレイ311は、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチド331(A<sub>1</sub>'、B<sub>1</sub>'、C<sub>1</sub>'、D<sub>1</sub>')を含み、ここで、第1の複数のオリゴヌクレオチド各々の配列の一部は、アンカーアレイの機構と結合しているアンカーオリゴヌクレオチド314の5'末端と同一である。第2のアレイ312は、第2の複数の支持体結合オリゴヌクレオチド332(A<sub>2</sub>'、B<sub>2</sub>'、C<sub>2</sub>'、D<sub>2</sub>')を含み、ここで、第2の複数のオリゴヌクレオチド各々の5'末端は、第1の複数のオリゴヌクレオチド331の5'末端と相補的である。アセンブルされるポリヌクレオチドの配列および長さに応じて、1個または複数の(例えば、m個の)さらなるアレイが提供され得、各アレイは、別の複数の支持体結合オリゴヌクレオチド335(A'<sub>m</sub>、B'<sub>m</sub>、C'<sub>m</sub>、D'<sub>m</sub>)の5'末端と相補的である遊離5'末端を有する複数の支持体結合オリゴヌクレオチド(A'<sub>m-1</sub>、B'<sub>m-1</sub>、C'<sub>m-1</sub>、D'<sub>m-1</sub>)を含むということは理解されよう。いくつかの実施形態では、相

10

20

30

40

50

補オリゴヌクレオチドの多くのものは各々、異なる支持体上に提供される。

【0078】

図6を参照すると、第1の複数の相補オリゴヌクレオチド（構築オリゴヌクレオチド $A_1$ 、 $B_1$ 、 $C_1$ 、 $D_1$ ）が、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチド331（ $A_1'$ 、 $B_1'$ 、 $C_1'$ 、 $D_1'$ ）を鋳型として使用して作製される。いくつかの実施形態では、1種または複数の支持体結合オリゴヌクレオチドが、プライマー伸長を促進する条件下、ポリメラーゼの存在下でプライマーとともにインキュベートされる。いくつかの実施形態では、第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチド331（ $A_1'$ 、 $B_1'$ 、 $C_1'$ 、 $D_1'$ ）は、その3'末端に、プライマー配列と相補的であるよう設計された配列（例えば、プライマー結合部位）を有する。いくつかの実施形態では、プライマーは、複数のウ  
 ラシルを含有するプライマーであり、伸長後、プライマーは、本明細書に記載されるU  
 S  
 E  
 R（商標）エンドヌクレアーゼを使用して除去される。同様に、構築オリゴヌクレオチ  
 ド $A_2$ 、 $B_2$ 、 $C_2$ 、 $D_2$ および $A_m$ 、 $B_m$ 、 $C_m$ 、 $D_m$ は、並列様式または逐次様式で  
 合成され、それによって、支持体結合二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、361： $A_1$   
 $A_1'$ など）を作製できる。

【0079】

図7に示されるように、構築オリゴヌクレオチドは、構築アレイから放出され得る。い  
 くつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、二本鎖の解離を促進する条件下（例  
 えば、融解温度下または本明細書において提供されるヘリカーゼの存在下でなど）で放出  
 される。図7は、相補的な重複する構築オリゴヌクレオチドの逐次付加による、異なる所  
 定の配列を有する複数のポリヌクレオチドの並列合成を示す。図7aを参照すると、異なる  
 構築オリゴヌクレオチドの第1のセット371（ $A_1$ 、 $B_1$ 、 $C_1$ 、 $D_1$ ）が、構築ア  
 レイ311から放出される。いくつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチドは、移さ  
 れ、その5'末端に、構築オリゴヌクレオチドの第1のセット371の5'末端の配列と  
 相補的である配列を有するアンカーオリゴヌクレオチド（ $A_0$ 、 $B_0$ 、 $C_0$ 、 $D_0$ ）を含  
 むアンカーアレイ310とアニーリングされ、それによって、二本鎖381（例えば、 $A_0$   
 $A_1$ 、 $B_0$  $B_1$ 、 $C_0$  $C_1$ 、 $D_0$  $D_1$ ）を形成する。好ましい実施形態では、第1の複  
 数の二本鎖は、3'遊離オーバーハングを含む。図7bに示されるように、一方の末端に  
 、第1の複数の二本鎖オーバーハングと相補的である配列を有する、異なる構築オリゴヌ  
 クレオチドの第2の集団372（ $A_2$ 、 $B_2$ 、 $C_2$ 、 $D_2$ ）が、構築アレイ312から放  
 出される。第2の集団は、アンカーアレイ310に結合された、アンカー - 第1の構築オリ  
 ゴヌクレオチド二本鎖381の遊離3'オーバーハングとアニーリングされて、二本鎖  
 382（ $A_0$  $A_1$  $A_2$ 、 $B_0$  $B_1$  $B_2$ 、 $C_0$  $C_1$  $C_2$ 、 $D_0$  $D_1$  $D_2$ ）を形成する。いく  
 つかの実施形態では、第2の複数の二本鎖は、5'遊離オーバーハングを含む。いくつか  
 の実施形態では、5'オーバーハングと相補的である配列を有するよう設計された構築オリ  
 ゴヌクレオチドの第3の集団が、第2の複数の二本鎖の5'遊離オーバーハングとアニ  
 ーリングされる。このようなプロセスを、各ポリヌクレオチドの所望の長さおよび配列が  
 合成されるまで、構築アレイから作製され、放出されたさらなる構築オリゴヌクレオチド  
 を用いて反復できる。いくつかの実施形態では、内部構築オリゴヌクレオチドは、その3  
 '末端に、次の内部構築オリゴヌクレオチドの3'末端の配列領域と相補的である配列領  
 域を有するよう設計される。いくつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチドの集団各  
 々は、異なる構築アレイから合成され、互いにハイブリダイズして、予め定義された配列  
 を有するより長いポリヌクレオチドにアセンブルするよう設計される。いくつかの実施形  
 態では、所望のポリヌクレオチドの5'末端に対応する構築オリゴヌクレオチドは、支持  
 体結合アンカーオリゴヌクレオチドと相補的である配列を有する。いくつかの実施形態で  
 は、構築オリゴヌクレオチドは、リガーゼを使用して接続される。いくつかの実施形態で  
 は、各構築オリゴヌクレオチドは、オーバーハングとアニーリングされ、二本鎖標的ポリ  
 ヌクレオチドの一方の鎖を定義する構築オリゴヌクレオチドがライゲーションされ得る。  
 構築オリゴヌクレオチドは、構築オリゴヌクレオチドの各逐次付加後にライゲーションさ  
 れてもよく、または構築オリゴヌクレオチドが互いにアニーリングされて、全長ポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドを形成した時点でライゲーションされてもよい。

#### 【0080】

本発明のいくつかの態様では、構築オリゴヌクレオチドは、高度に並列した様式で、構築アレイからアンカーアレイに逐次移される。いくつかの実施形態では、複数のポリヌクレオチドが、逐次アラインメント、移動および複数のアンカーオリゴヌクレオチドへの相補的な重複するオリゴヌクレオチドの付加によって、アンカーアレイ上でアセンブルされる。いくつかの実施形態では、構築アレイおよびアンカーアレイは、構築アレイからアンカーアレイへの構築オリゴヌクレオチドの移動を可能にするよう密接に接近させる。構築アレイは、2セットのオリゴヌクレオチド ( $A_1$ 、 $B_1$  など) 間の距離に実質的に匹敵する距離か、またはそれよりも小さい距離にされることが好ましい。いくつかの実施形態では、構築アレイとアンカーアレイ間の距離は、約  $10\ \mu\text{m}$  ~ 約  $1000\ \mu\text{m}$  である。いくつかの実施形態では、圧縮下で2つのアレイを離して維持する、単分子層へのスパーサー球 (例えば、Cospheric Microspheres から入手可能) の希釈物の使用によって、この範囲内の所望の距離が達成される。その他の実施形態では、シリコン膜、例えば、ポリジメチルシロキサン (PDMS) が、薄いチャンバー中にアレイの1つを包含するよう製作され、第2のアレイを膜の高さにするとこれが密閉する。その他の実施形態では、液体媒体自体をスパーサーとして使用して、1つのアレイをもう一方の頂部上に浮かべることができる。例えば、 $100\ \mu\text{リットル}$  の液状媒体または溶液は、使用され得る標準的な顕微鏡スライド上に均一に広がると、およそ  $50\ \mu\text{m}$  の厚さを有する。

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、複数の構築オリゴヌクレオチドは、上記のように少なくとも1つのアレイ上で合成される。図8を参照すると、少なくとも1つの構築アレイ (例えば、表面411) の選択された機構で、複数の構築オリゴヌクレオチドが合成され、複数のオリゴヌクレオチド各々 (例えば、 $A_1$ 、 $B_1$ 、 $C_1$ 、 $D_1$ ) は、異なる予め定義された配列を有する。いくつかの実施形態では、複数の構築支持体 (例えば、表面411、412、415) の選択された機構で、複数の構築オリゴヌクレオチドが合成され、複数のオリゴヌクレオチド各々が、異なる予め定義された配列を有する。いくつかの実施形態によれば、構築オリゴヌクレオチドは、支持体結合オリゴヌクレオチドを鋳型として使用してプライマー伸長によって合成される。いくつかの実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチド (例えば、支持体411上のオリゴヌクレオチド461) が、プライマー伸長を促進する条件下、ポリメラーゼの存在下でプライマーとともにインキュベートされる。第1の複数の支持体結合オリゴヌクレオチドは、その3'末端に、プライマー配列と相補的であるよう設計された配列 (例えば、プライマー結合部位) を有し得る。いくつかの実施形態では、プライマーは、複数のウラシルを含有するプライマー (例えば、USER (商標) 切断可能なプライマー) であり、プライマー伸長後、プライマーは、本明細書に記載されたUSER (商標) エンドヌクレアーゼを使用して除去される。同様に、予め定義された配列を有する構築オリゴヌクレオチド  $A_2$ 、 $B_2$ 、 $C_2$ 、 $D_2$ 、...  $A_m$ 、 $B_m$ 、 $C_m$ 、 $D_m$  が、プライマー伸長によって並列様式または逐次様式で合成され、それによって、二本鎖を形成し得る。図8に示されるように、この結果、その表面 (411、12、415) 上に、構築オリゴヌクレオチドおよび鋳型オリゴヌクレオチドを含む複数の二本鎖を有する複数のアレイが得られる (オリゴヌクレオチド461: 表面411上の  $A_1$ 、 $B_1$ 、 $C_1$ 、 $D_1$ ; 表面412上のオリゴヌクレオチド462  $A_2$ 、 $B_2$ 、 $C_2$ 、 $D_2$ ; 表面415上のオリゴヌクレオチド465  $A_m$ 、 $B_m$ 、 $C_m$ 、 $D_m$ )。

#### 【0082】

複数の構築アレイの各々は、同じ配置を有するよう設計され得、各機構は、次の機構から同じ距離だけ離れており、各機構は、アレイ上で同様に配置される。例えば、第1の支持体411は、それぞれ、オリゴヌクレオチドの第1、第2および第n番目の集団を含むn個の機構を有し、各オリゴヌクレオチドは、予め定義された配列を有する。複数のオリゴヌクレオチドの各々は、その他の複数のオリゴヌクレオチドと、1個または複数の塩基

で異なり得るということは理解されよう。同様に、支持体 4 1 2 は、オリゴヌクレオチドの第 1、第 2 および第  $n$  番目の集団を有し、ここで、第 1 の支持体のオリゴヌクレオチドの第 1 の集団は、第 2 の支持体のオリゴヌクレオチドの第 1 の集団と相補的である配列を有する（図 9 c に示されるように）。例示的一実施形態では、第 1 の支持体のオリゴヌクレオチドの第 1 の集団は、第 2 の支持体のオリゴヌクレオチドの第 1 の集団と相補的である 3' 末端配列を有する。同様に、第  $m$  番目の支持体のオリゴヌクレオチドの第  $m$  番目の集団は、 $(m - 1)$  番目の支持体のオリゴヌクレオチドの  $(m - 1)$  番目の集団と相補的である配列領域を有する。

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、第 1 の構築アレイは、アンカーアレイ 4 1 0 に対してアラインされ、ここで、各機構は、支持体結合アンカーオリゴヌクレオチド ( $A_0$ 、 $B_0$ 、 $C_0$ 、 $D_0$ ) を含む。アンカーオリゴヌクレオチド各々は、一本鎖であり得、その 5' 末端に、第 1 の構築アレイの複数のオリゴヌクレオチドの 5' 末端と相補的である配列を含み得る。異なる予め定義された配列を有する複数のポリヌクレオチドの高度に並列した合成のためには、複数の各アンカーオリゴヌクレオチドは、異なる 5' 末端配列を有し得るということは理解されよう。いくつかの実施形態では、異なる 5' 末端配列は、1 個または複数の塩基だけ異なり得る。いくつかの実施形態では、構築アレイおよびアンカーアレイは、垂直にアラインされ、構築アレイは、頂部のアレイを定義し、アンカーアレイは、底部アレイを定義する。好ましい実施形態では、アンカーアレイおよび構築アレイは、同じ配置を有するよう設計され、各機構は、次の機構から同じ距離だけ離れており、各機構は、アレイ上に同様に配置される。構築およびアンカーアレイの設計によって、アンカーおよび構築オリゴヌクレオチドのアラインメントが可能となり、アンカーオリゴヌクレオチドは、構築オリゴヌクレオチドと相補的である配列を有するということは理解されよう。構築およびアンカーアレイのアラインメント後、構築オリゴヌクレオチドは、溶液中に放出され得、その結果、構築オリゴヌクレオチドがアンカーオリゴヌクレオチドに対して捕獲およびハイブリダイゼーションされる。次いで、異なる支持体上に固定化されている構築オリゴヌクレオチドの第 2 の集団は、アンカーアレイと密接に接近させ、アンカーオリゴヌクレオチドおよび構築オリゴヌクレオチドの第 1 の集団を含む二本鎖に逐次付加し得る。

#### 【0084】

第 1 の構築アレイは、アンカーアレイに対してアラインし、接近させることができる。一部では、構築アレイおよびアンカーアレイのアラインメントおよび接近は、頂部構築アレイから底部アンカーアレイへの構築オリゴヌクレオチドのその後の近接拡散および移動（図 9 において垂直方向に示される）を可能にする液状媒体または溶液の存在下で行う。構築オリゴヌクレオチドは、例えば、二本鎖の解離を促進する条件下、液状媒体中で、構築アレイから放出され得る。例えば、二本鎖は、構築オリゴヌクレオチド二本鎖の融解温度を上回る温度で、選択された機構またはアレイ全体を加熱することによって解離され得る。図 9 a ~ b を参照すると、異なる予め定義された配列を有する構築オリゴヌクレオチドの第 1 のセット ( $A_1$ 、 $B_1$ 、 $C_1$ 、 $D_1$ ) が、液状媒体 4 8 5 中で第 1 の構築アレイから放出され、アンカーアレイ上に捕獲され、複数の二本鎖を形成する（例えば、二本鎖 4 4 1、 $A_0 A_1$ 、 $B_0 B_1$ 、 $C_0 C_1$ 、 $D_0 D_1$ ）。図 9 c ~ d を参照すると、第 2 の構築アレイは、アンカー - 第 1 の集団構築オリゴヌクレオチド二本鎖を含むアンカーアレイに対してアラインし、密接に接近させる。液状媒体の存在下での、第 2 の構築アレイおよびアンカーアレイのアラインメントおよび接近は、第 2 の構築アレイからの構築オリゴヌクレオチドの第 2 のセットのアンカーアレイへのその後の近接移動を可能にする。図 9 d を参照すると、構築オリゴヌクレオチドの第 2 のセット  $A_2$ 、 $B_2$ 、 $C_2$ 、 $D_2$ 、4 6 2 は、マイクロアレイ 4 1 2 から放出され、アンカーマイクロアレイ 4 1 0 とアニーリングされて、ポリヌクレオチド 4 4 2  $A_0 A_1 A_2$ 、 $B_0 B_1 B_2$ 、 $C_0 C_1 C_2$ 、 $D_0 D_1 D_2$  を形成する。次いで、液状媒体中に、リガーゼ、例えば、Taq DNA リガーゼおよびその必要な反応成分を含めることによって、得られたアセンブルされたポリヌクレオチドが



ライゲーションされて、単一の共有結合によって連結している分子を形成し得る。いくつかの実施形態では、リガーゼは、ギャップを埋め、ライゲーションの効率を高めるために、非鎖置換DNAポリメラーゼで補完され得る。このようなプロセスを、アンカーオリゴヌクレオチドアレイ上で所望の長さのポリヌクレオチドが合成されるまで、構築マイクロアレイ集合体のさらなるメンバーを用いて反復してもよい。

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、所望の配列からの逸脱を含まない合成されたポリヌクレオチドの相対的な集団を高めるために、各プロセス反復の間および/またはアセンブリープロセスの最後に、エラー修正が含まれ得る。このようなエラー修正は、直接配列決定および/またはエラー修正ヌクレアーゼ（例えば、CEL I）などのエラー修正酵素、MutSまたはMutS相同体結合性もしくはその他のミスマッチ結合性タンパク質に基づくエラー修正、当技術分野で公知のエラー修正のその他の手段もしくはそれらの任意の組合せの適用を含み得る。例示的一実施形態では、CEL Iが、液状媒体中でオリゴヌクレオチド二本鎖に添加され得る。CEL Iは、単一ヌクレオチド多型、小さい挿入または欠失などのすべての種類のミスマッチを切断するミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼである。CEL Iエンドヌクレアーゼの付加は、ミスマッチの部位または領域での二本鎖オリゴヌクレオチドの切断をもたらす。図9eは、その表面上に、図9a~dに記載されたプロセスによってアセンブルされている複数のポリヌクレオチド452を有するアンカーアレイ410を表す。アセンブルされたポリヌクレオチドは、1つまたは複数の配列エラー500（×印によって示されている）を含み得る。CEL Iなどのエラー修正ヌクレアーゼを使用して、このようなエラー部位で二本鎖ポリヌクレオチドを切断してもよく、その結果、図9fに示されるように、切断されたポリヌクレオチド453が得られる。

#### 【0086】

いくつかの実施形態では、第1の構築アレイのアンカーアレイとのアラインメントおよび接近は、液状媒体および多孔性膜の存在下にある。いくつかの実施形態によれば、多孔性膜は、構築アレイおよびアンカーアレイの間に置かれ、アンカーアレイの選択されていない機構への、液状媒体中での構築オリゴヌクレオチドの側方拡散を制限する（図10）。透過性膜は、構築オリゴヌクレオチドの拡散を、主に垂直方向に制約し、したがって、対応していないアンカーオリゴヌクレオチドに向けた構築オリゴヌクレオチドの側方拡散を低減し得るということは理解されよう。例えば、メンブレンは、均一の大きさの孔を有する多孔性ポリマーメンブレンであり得る。いくつかの実施形態では、メンブレンは、核酸の比較的自由的な通過にとって十分な孔の大きさを有する。いくつかの実施形態では、孔の大きさは、約10nm~約100nmの範囲またはそれ以上であり得る。孔の大きさは、異なるオリゴヌクレオチドA<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>などの間のおよその距離よりも大きくないことが好ましい。好ましい実施形態では、孔充填係数（pore fill factor）または開口率（aperture ratio）は、可能な限り大きい。適したメンブレンとして、Polymer Membranes with Two-Dimensionally Arranged Pores Derived from Monolayers of Silica Particles, Feng Yan and Werner A. Goedel Chem. Mater., 2004, 16(9), pp 1622-1626に記載されたものが挙げられる。

#### 【0087】

特定の状況のためには、構築アレイによる構築オリゴヌクレオチドの再捕獲によって充填されないまま残るのではなく、アンカーアレイ上の利用可能な部位の高いパーセンテージが、構築オリゴヌクレオチドを捕獲することを確実にすることが有益であるということは理解されよう。アンカーアレイによる捕獲の可能性を高めるために、構築オリゴヌクレオチドの少なくとも一部の、アンカーアレイとの共有結合を行うことができる。図11を参照すると、図9に詳述されたプロセスの修飾が表されている。図11は、リガーゼおよび必要な反応成分を含む液状媒体または溶液中での、少なくとも2種の異なる重複する構築オリゴヌクレオチドを含む第1の構築アレイの、アンカーアレイに対するアラインメン

10

20

30

40

50

トおよび接近ならびに構築アレイからアンカーアレイへの構築オリゴヌクレオチドのその後の近接移動を示す。いくつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチドアレイ上の各機構は、2種以上の重複するオリゴヌクレオチドがアンカーアレイの選択された機構上のアンカーオリゴヌクレオチドの集団によって捕獲されるのに寄与するように設計される。図11aを参照すると、構築オリゴヌクレオチドアレイ420の各機構は、アンカーオリゴヌクレオチド（例えば、 $A_0$ ）あたり、2種の構築オリゴヌクレオチド481（例えば、 $A_1$  および  $A_2$ ）を保持する。構築オリゴヌクレオチド $A_1$  および  $A_2$  は、構築アレイ420およびアンカーアレイ410の間にある液状媒体または溶液485中に放出され得る。いくつかの実施形態では、溶液は、リガーゼ180をさらに含み、その結果、構築オリゴヌクレオチド $A_1$  および  $A_2$  が、アンカー $A_0$  上にアセンブルする場合に（図11b）、オリゴヌクレオチド $A_2$  が、アンカー $A_0$  に共有結合によってライゲーションされる。この配置およびリガーゼの存在は、アンカーアレイ上でのアンカーオリゴヌクレオチドによる構築オリゴヌクレオチドの好ましい捕獲を提供する。

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチドアレイ（単数または複数）およびアンカーオリゴヌクレオチドアレイは、アンカーアレイに移される構築オリゴヌクレオチドの数が、対応するアンカーオリゴヌクレオチド各々に対して化学量論的に（*stoichiometric*）過剰であるように設計される。この設計によって、アンカーオリゴヌクレオチドの各々によって構築オリゴヌクレオチドが捕獲される実質的により高い可能性が可能になり、それによって、予め定義されたポリヌクレオチドの合成における段階的収率を高める。

#### 【0089】

図12は、液状媒体における、第1の構築アレイの、アンカーアレイに対するアラインメントおよび接近ならびに構築アレイからアンカーアレイへの構築オリゴヌクレオチドのその後の近接移動を表し、これでは、構築オリゴヌクレオチドの数は、対応するアンカーオリゴヌクレオチド各々に対して化学量論的に（*stoichiometric*）過剰である。図12を参照すると、アンカーアレイ430は、対応するアンカーオリゴヌクレオチド各々に対して構築アレイ411によって提供された構築オリゴヌクレオチドの数と比較して、化学量論的に少ないアンカーオリゴヌクレオチド（ $A_0$ 、 $B_0$ 、 $C_0$ 、 $D_0$ ）を含むよう設計される。この設計は、アンカーアレイ上での、構築オリゴヌクレオチドの、アンカーオリゴヌクレオチド各々との結合が、化学量論的に支持されることを確実にする。図12aを参照すると、また例示的目的上、アンカーアレイ430上の各アンカーオリゴヌクレオチドに対して、構築アレイ411の各機構で、3つの構築オリゴヌクレオチドが表されている。構築オリゴヌクレオチドアレイ411は、アンカーオリゴヌクレオチドアレイ430に関してアラインされる。アンカーオリゴヌクレオチド $A_0$  を用いる構築オリゴヌクレオチド $A_1$  のアラインメントに焦点を合わせると、構築オリゴヌクレオチド $A_1$  を、その対応する鋳型オリゴヌクレオチドから解離した後、 $A_1$  の3つのコピーの各々は、4つの可能性ある結合部位を有し、 $A_1$  の各コピーは、戻って結合するか、または構築アレイ411（3つの可能性ある部位）によって再捕獲されるか、またはアンカーオリゴヌクレオチド $A_0$  と結合し得る。捕獲後、4つの可能性ある結合部位の1つは、空のままとなる。結合部位の各々について、空のままである可能性は等しいので、 $A_0$  が空のままである可能性は25%であり、 $A_0$  が占有される可能性は、75%である。構築オリゴヌクレオチドが、アンカーオリゴヌクレオチドと結合する可能性をさらに高めるために、構築オリゴヌクレオチド対アンカーオリゴヌクレオチドの比をさらに歪めることができる。いくつかの実施形態では、構築オリゴヌクレオチド対アンカーオリゴヌクレオチドの比は、少なくとも10:1、少なくとも100:1、少なくとも1000:1、少なくとも10<sup>4</sup>:1、少なくとも10<sup>5</sup>:1、少なくとも10<sup>6</sup>:1である。

#### 【0090】

所望のポリヌクレオチドの構築の効率を高めるための方法は、構築プロセスにおけるステップ数を低減することであるということとは理解されよう。いくつかの実施形態では、ポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドは、階層的構築法を使用して合成され、これでは、複数のアンカーアレイが、構築アレイからの数ラウンドの移動後に、それ自体が、以後のステップにおいて構築アレイとして使用され得る。階層的プロセスは、同数の移動を実行する時間ならびに各アンカーアレイで行われる移動数を幾何級数的に低減し、したがって、段階的喪失の影響を低減する。図13aは、構築アレイからのいくつかの移動を受け、その結果、それぞれ、合成されたポリヌクレオチド472および473が表面に結合している、2つのアンカーアレイ470および471を示す。表されるように、合成されたポリヌクレオチドの一方の鎖は、前記アンカーアレイからの元のアンカーにライゲーションされており、その結果、例えば、合成されたポリヌクレオチドの長さが、 $A_0$ のものよりも長い(元のアンカーアレイは、それぞれ、図11または図12からの410または430と同様である場合)。アンカーアレイにライゲーションされていないポリヌクレオチド鎖の放出は、図13bに示されるアレイ間のポリヌクレオチドの移動をもたらす。リガーゼおよび必要なライゲーション反応成分の存在は、ポリヌクレオチドと一緒にする共有結合をもたらす。例示目的で、アンカーアレイ471からアンカーアレイ470へのポリヌクレオチドの移動が示されているが、移動は、両アレイ間で分配されるということは留意しなければならない。全エラー率を低下させるために、表面に固定された合成されたポリヌクレオチド472および473を、まず、図9e~fの説明において記載されるエラー修正ヌクレアーゼに曝露してもよい。一部のエラー修正ヌクレアーゼは、二本鎖と一本鎖核酸の接合部で切断するので、ポリヌクレオチド472および473は、完全に二本鎖であるよう設計されてもよく、またはポリヌクレオチド472および473に、さらなるギャップを埋めるオリゴヌクレオチドを付加することによって二本鎖に変換され、その後ライゲーションされてもよい。

#### 【0091】

当然のことではあるが、オリゴヌクレオチドとの関連でのアセンブリー反応の説明は、制限であるよう意図されるものではない。例えば、対象とするポリヌクレオチドを作製するために1種または複数のオリゴヌクレオチドとともに、その他のポリヌクレオチド(例えば、一本鎖、二本鎖ポリヌクレオチド、制限断片、増幅生成物、天然に存在するポリヌクレオチドなど)がアセンブリー反応に含まれ得る。

#### 【0092】

本発明の態様は、合成核酸の製造および/または使用を含むさまざまな適用にとって有用であり得る。本明細書に記載されたように、本発明は、忠実度がより高い合成核酸を製造するための方法ならびに/または合成アセンブリー反応の費用および/もしくは時間を低減するための方法を提供する。得られたアセンブルされた核酸は、インビトロ(in vitro)で(例えば、PCR、LCRまたは任意の適した増幅技術を使用して)増幅され、インビボ(in vivo)で増幅され(例えば、適したベクターへのクローニングによって)、単離および/または精製され得る。

#### 【0093】

本明細書に記載された方法およびデバイスの態様は、本明細書に記載されるようなエラーを含有する核酸配列の除去を含み得る。エラーを含有する配列またはエラーを含有するヌクレオチド(単数または複数)を除去することによって、エラーを含まない核酸配列を濃縮できる。核酸配列は、構築オリゴヌクレオチドまたはサブアセンブリーなどのアセンブルされた生成物または最終の所望のポリヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、核酸配列は、例えば、酵素的切断または増幅などの当技術分野で公知の方法を使用して、支持体から溶液中に放出され得る。このステップは、対象の領域(単数または複数)または機構(単数または複数)のみを含有する局在する個々の微小容積(単数または複数)において、または単一容積において起こり得る。いくつかの実施形態では、エラーを含有する核酸配列の除去は、微小滴内で実施される。核酸配列は、予め定義された配列を有する任意の二本鎖ポリヌクレオチドであり得る。増幅は、アセンブリープロセスの間の1つまたは複数の段階で実施され得、その結果、二本鎖オリゴヌクレオチドまたはアセンブルされた生成物のプールが得られる。このようなプールは、ヘテロ二本鎖(1つまたは

複数の配列エラーを有する二本鎖核酸配列)およびホモ二本鎖(エラーを含まない二本鎖核酸配列または相補配列エラーを有する二本鎖核酸配列)を含み得ることは理解されよう。図14に示されるように、二本鎖核酸は、1つまたは複数の配列エラー(×印によって示されるヘテロ二本鎖)を含有し得る。CELヌクレアーゼ(CEL IまたはCEL II)は、二本鎖核酸を、単一塩基置換、小さい欠失または小さい挿入の部位で、両鎖において切断すると知られている mismatches 特異的エンドヌクレアーゼである。CEL Iは、mismatches 部位の3'側で核酸を切断し、1つまたは複数のヌクレオチドの一本鎖3'オーバーハングが生じた。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼCEL I(Surveyor(商標))を使用して、このようなエラー部位で二本鎖核酸を切断でき、その結果、図14cに示されるように、3'オーバーハングを有する切断されたエラーを含有する核酸と、エラーを含まないホモ二本鎖とを含む核酸配列のプールが得られる。 mismatches ヌクレオチド(単数または複数)は、T4ポリメラーゼおよび/または3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有するクレノウポリメラーゼを使用して除去され得、それによって、実質的にエラーを含まない二本鎖核酸プール(図14dに示されるようなホモ二本鎖)が生じる。いくつかの実施形態では、次いで、核酸配列のプールを、末端プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応、PCR)などによって増幅することができる(図14e)。プライマーは、ユニバーサルプライマー、セミユニバーサルプライマーまたは核酸分子の末端配列に特異的なプライマーであり得る。いくつかの実施形態では、二本鎖をまず解離させ、再アニーリングさせ、その後、核酸のプールを増幅に付す。このプロセスによって、 mismatches 特異的エンドヌクレアーゼによって検出されないままであり得る相補的エラーの検出および除去が可能となる。

10

20

#### 【0094】

アセンブルされた核酸(単独またはベクター中にクローニングされた)で、宿主細胞(例えば、原核生物の、真核生物の、昆虫の、哺乳動物の細胞またはその他の宿主細胞)を形質転換してもよい。いくつかの実施形態では、宿主細胞を使用して、核酸を増殖できる。特定の実施形態では、核酸を、宿主細胞のゲノムに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、核酸は、細胞のゲノム上の対応する核酸領域を置換し得る(例えば、相同組換えによって)。したがって、核酸を使用して、組換え生物を製造できる。いくつかの実施形態では、標的核酸は、宿主生物のゲノムのすべてまたは一部を置換するために使用される、全ゲノムまたはゲノムの大きな断片であり得る。組換え生物はまた、種々の研究、工業的、農業的および/または医薬的適用のために使用できる。

30

#### 【0095】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された方法が、大きな核酸分子(例えば、5,000ヌクレオチドの長さより長い、例えば、約10,000より長い、約25,000より長い、約50,000より長い、約75,000より長い、約100,000ヌクレオチドより長いなど)のアセンブリーの際に使用され得る。例示的一実施形態では、本明細書に記載された方法は、場合により、1つまたは複数の所望の位置で配列中に特異的修飾を組み込む、生物の(例えば、ウイルス、細菌、酵母またはその他の原核生物または真核生物の)全ゲノム(またはその大きな断片、例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上)のアセンブリーの際に使用され得る。

40

#### 【0096】

本明細書において提供された方法およびデバイスの態様は、本明細書に記載された1つまたは複数の動きを自動化することを含み得る。いくつかの実施形態では、増幅および/またはアセンブリー反応の1つまたは複数のステップが、1種または複数の自動化サンプル取り扱いデバイス(例えば、1種または複数の自動化液体または流体取り扱いデバイス)を使用して自動化され得る。自動化デバイスおよび手順を使用して、以下のうち1種または複数を含めた反応試薬を送達してもよい:出発核酸、バッファー、酵素(例えば、1種または複数のリガーゼおよび/またはポリメラーゼ)、ヌクレオチド、塩および分解防止剤などの任意のその他の適した薬剤。自動化デバイスおよび手順はまた、反応条件を制

50

御するために使用してもよい。例えば、反応温度および使用され得る任意の温度周期を制御するために自動化サーマルサイクラーを使用してもよい。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の反応温度またはポリヌクレオチドをインキュベートするのに適した温度周期を提供するよう、走査レーザーが自動化され得る。同様に、アセンブルされたポリヌクレオチド生成物のその後の分析も自動化され得る。例えば、配列決定は、配列決定デバイスおよび自動化配列決定プロトコルを使用して自動化され得る。さらなるステップ（例えば、増幅、クローニングなど）も、1種または複数の適当なデバイスおよび関連プロトコルを使用して自動化され得る。当然のことではあるが、本明細書に記載された1種または複数のデバイスまたはデバイス構成成分を、系（例えば、ロボットシステム）において、または微小環境（例えば、微小流体反応チャンバー）において組み合わせてもよい。自動化デバイスおよび手順（例えば、自動化ピペット操作デバイス、マイクロシステムなどを含めた、サンプルおよび/またはサンプル容器のロボット操作および/または移動）を使用して、アセンブリー反応混合物（例えば、液体反応サンプル）を、系のある構成成分から別のものに移してもよい。システムおよびその任意の構成成分は、対照系によって制御できる。

#### 【0097】

したがって、本明細書において提供されたデバイスの方法ステップおよび/または態様は、例えば、コンピュータシステム（例えば、コンピュータ制御システム）を使用して自動化され得る。本明細書において提供された技術の態様が実施され得るコンピュータシステムは、任意の種類の処理（例えば、本明細書に記載されたような配列分析および/または自動化デバイス制御）のためのコンピュータを含み得る。しかし、当然のことではあるが、特定の処理ステップは、アセンブリーシステムの一部である1種または複数の自動化デバイスによって提供され得る。いくつかの実施形態では、コンピュータシステムは、2種以上のコンピュータを含み得る。例えば、1種のコンピュータを、ネットワークによって第2のコンピュータとつなぐことができる。1種のコンピュータは、配列分析を実施できる。第2のコンピュータは、系において、1種または複数の自動化合成およびアセンブリーデバイスを制御できる。その他の態様では、1種または複数の分析または処理動作を制御するために、さらなるコンピュータがネットワーク中に含まれ得る。各コンピュータは、メモリおよび処理装置を含み得る。本明細書において提供された技術の態様は、任意の特定のコンピュータプラットフォームで実施されているよう制限されないので、コンピュータは任意の形態をとり得る。同様に、ネットワークは、プライベートネットワークまたはパブリックネットワーク（例えば、インターネット）を含めた任意の形態をとり得る。ディスプレイデバイスが、1種または複数のデバイスおよびコンピュータと関連していてもよい。あるいは、またはさらに、ディスプレイデバイスは、本明細書において提供された技術に従って、分析のアウトプットをディスプレイするために、遠隔部位に配置され、接続される場合もある。システムの異なる構成成分間の接続は、ワイヤ、光ファイバー、ワイヤレス伝送、衛星伝送、任意のその他の適した伝送または上記のうち2種以上の任意の組合せによってであり得る。

#### 【0098】

本明細書において提供された技術の異なる態様、実施形態または動作の各々は、多数の方法のいずれかで、独立に自動化され、実施され得る。例えば、各態様、実施形態または動作は、ハードウェア、ソフトウェアまたはそれらの組合せを使用して、独立に実施され得る。ソフトウェアで実施される場合には、ソフトウェアコードは、単一コンピュータにおいて提供されようと、複数のコンピュータ間に分配されようと、任意の適した処理装置または処理装置の収集物で実行され得る。当然のことではあるが、上記の機能を実施する、任意の構成成分または構成成分の収集物は、一般に、上記で論じられた機能を制御する1種または複数の制御装置と考えられ得る。1種または複数の制御装置は、専用のハードウェアを用いて、またはマイクロコードを使用してプログラムされている汎用ハードウェア（例えば、1種または複数の処理装置）または上記で列挙された機能を実施するためのソフトウェアを用いてなど、多数の方法で実施され得る。

## 【 0 0 9 9 】

この点において、当然のことではあるが、本明細書において提供された技術の実施形態の一実施は、コンピュータプログラム（すなわち、複数の指示）で符号化された、少なくとも1種のコンピュータによって読み取り可能な媒体（例えば、コンピュータメモリ、フロッピーディスク、コンパクトディスク、テープなど）を含み、これは、処理装置で実行されると、本明細書において提供された技術の1種または複数の上記で論じられた機能を実施する。コンピュータによって読み取り可能な媒体は、輸送可能であり得、その結果、それに保存されたプログラムは、本明細書において提供された技術の1種または複数の機能を実施するために任意のコンピュータシステムリソースに読み込まれ得る。さらに、当然のことではあるが、実行されると、上記で論じられた機能を実施するコンピュータプログラムへの言及は、ホストコンピュータ上で動くアプリケーションプログラムに制限されない。むしろ、用語コンピュータプログラムは、本明細書において、一般的な意味で、本明細書において提供された技術の上記で論じられた態様を実施するよう処理装置をプログラムするために使用され得る、任意の種類のコンピュータコードに言及するよう使用される（例えば、ソフトウェアまたはマイクロコード）。

10

## 【 0 1 0 0 】

当然のことではあるが、プロセスが、コンピュータによって読み取り可能な媒体に保存される本明細書において提供された技術のいくつかの実施形態に従って、コンピュータによって実施されるプロセスは、その実行の過程の間、手作業でインプットを受け取ることができる（例えば、ユーザーから）。

20

## 【 0 1 0 1 】

したがって、本明細書に記載されたアセンブリーデバイスまたは構成成分のシステム全体レベルの制御は、関連する核酸シンセサイザー、液体取り扱いデバイス、サーマルサイクラー、配列決定デバイス、関連するロボット構成成分ならびに所望のインプット/アウトプットもしくはその他の制御機能を実施するためのその他の適したシステムに制御信号を提供し得るシステム制御装置によって実施され得る。したがって、システム制御装置は、任意のデバイス制御装置と一緒に核酸アセンブリーシステムの運転を制御する制御装置を形成する。制御装置は、汎用コンピュータまたは汎用コンピュータのネットワークおよびコミュニケーションデバイス、モデムおよび/または所望のインプット/アウトプットもしくはその他の機能を実施するためのその他の電気回路もしくは構成成分を含めたその他の関連デバイスであり得る、汎用データ処理システムを含み得る。制御装置はまた、少なくとも幾分かは、各々、全体的なシステムレベルの制御のための基本処理装置または中央処理装置セクションと、中央処理装置セクションの制御下で、種々の異なる特定の計算、機能およびその他のプロセスを実施するための専用の別のセクションを有する、単一の特別な目的の集積回路（例えば、ASIC）またはASICのアレイとして実施され得る。制御装置はまた、複数の別の専用のプログラム可能な集積回路またはその他の電子回路またはデバイス、例えば、別個の素子回路またはプログラム可能な論理デバイスなどの、配線で接続された電子回路または論理回路を使用して実施され得る。制御装置はまた、任意のその他の構成成分またはデバイス、例えば、ユーザーインプット/アウトプットデバイス（モニター、ディスプレイ、プリンター、キーボード、ユーザーポインティングデバイス、タッチスクリーンまたはその他のユーザーインターフェースなど）、データ保存デバイス、駆動モーター、リンケージ、パルス制御装置、ロボットデバイス、真空およびその他のポンプ、圧力センサー、検出器、電力供給装置、パルス供給装置、コミュニケーションデバイスまたはその他の電子回路または構成成分などを含み得る。制御装置はまた、当技術分野で公知であるが、本明細書において詳細には記載されていないその他の適した機能を実施するために、自動化されたクライアントオーダー処理、品質管理、パッケージング、輸送、請求書作成などといったシステムのその他の部分の運転を制御し得る。

30

40

## 【 0 1 0 2 】

種々の本発明の態様は、単独で使用されても、組み合わせて使用されても、前記で記載された実施形態では具体的に論じられていないさまざまな配置で使用されてもよく、した

50

がって、前記の説明において示されたか、または図面において例示された構成成分のその詳細な適用および配置に制限されない。例えば、一実施形態において記載された態様を、任意の方法で、その他の実施形態において記載された態様と組み合わせてもよい。

#### 【0103】

特許請求の範囲の要素を修飾するための、特許請求の範囲における「第1の」、「第2の」、「第3の」などといった順序を示す用語の使用は、それ自体で、ある特許請求の範囲の要素の、別のものを上回る、任意の優先度、先行もしくは順序または方法の動きが実施される一時的な順序を含意するものではなく、特定の名称を有するある特許請求の範囲の要素を、同一の名称を有する（しかし、順序を示す用語の使用のために）別の要素と区別するための標識として単に使用されて、特許請求の範囲の要素を区別する。

10

#### 【0104】

また、本明細書において使用された表現および技術用語は、記載の目的のためのものであって、制限と見なされてはならない。「含む(including)」、「含む(comprising)または「有する(having)」、「含有する(containing)」、「包含する(involving)」および本明細書におけるその変形の使用は、以下に列挙された項目およびその等価物ならびにさらなる項目を包含するものとする。

#### 【0105】

等価物

本発明は、中でも、高忠実度遺伝子アセンブリーのための新規方法およびデバイスを提供する。対象発明の特定の実施形態が論じられているが、上記の明細書は例示であって、制限ではない。本発明の多数の等価物は、本明細書を再検討すると当業者には明らかとなる。本発明の全範囲は、特許請求の範囲を等価物のその全範囲とともに、本明細書をこのような変法と一緒に参照することによって決定されなければならない。

20

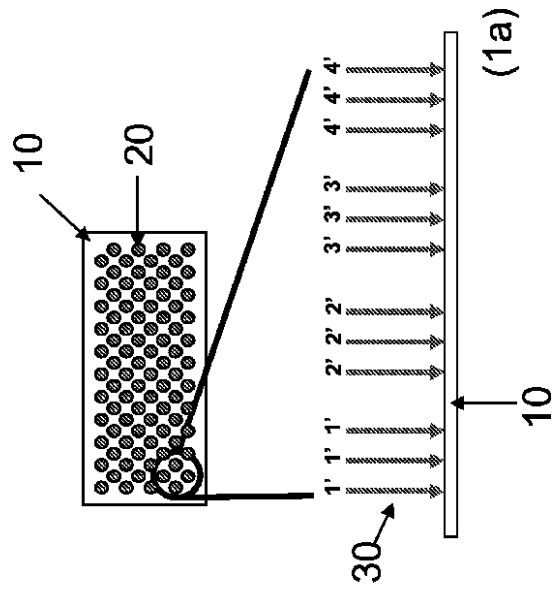
#### 【0106】

出典明示による組み込み

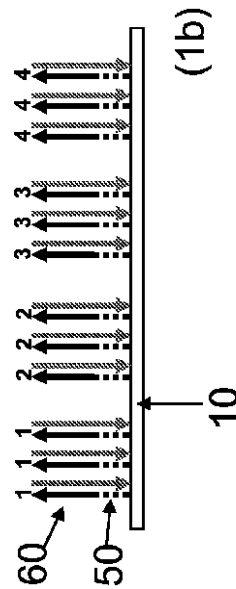
「Methods and Devices for Nucleic Acids Synthesis」と題された、2010年11月12日に出願された、米国仮出願第61/412,937号、「Methods and Devices for Nucleic Acids Synthesis」と題された、2010年11月30日に出願された米国仮出願第61/418,095号および「Methods and Devices for Nucleic Acids Synthesis」と題された、2011年3月23日に出願された米国仮出願第61/466,814号、2009年8月27日に出願されたPCT出願PCT/US2009/55267、2010年11月3日に出願されたPCT出願PCT/US2010/055298 および2010年11月19日に出願されたPCT出願PCT/US2010/057405が参照される。本明細書において言及されたすべての刊行物、特許および配列データベースの項目は、個々の刊行物または特許が各々、具体的に、また参照により組み込まれるよう個々に指示されるように、出典明示によりその全文が本明細書に組み込まれる。

30

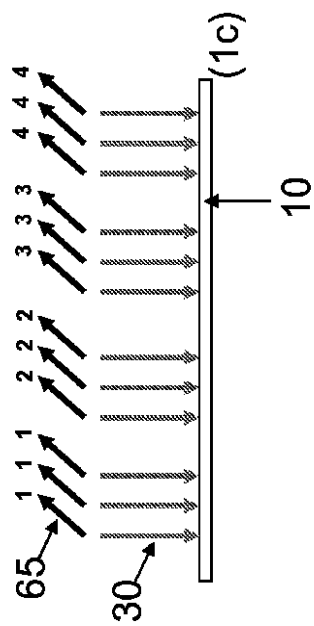
【図 1 a】



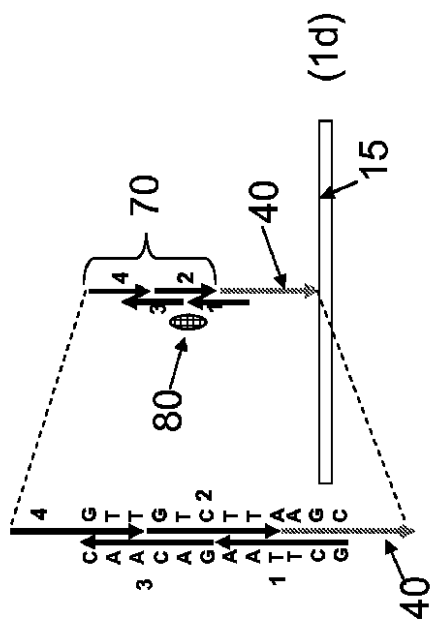
【図 1 b】



【図 1 c】



【図 1 d】

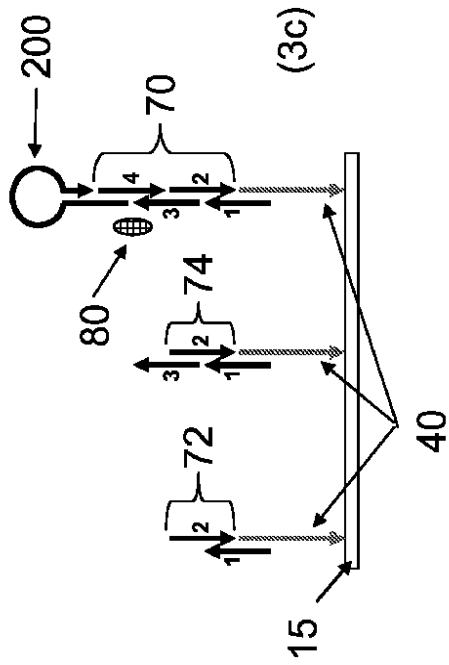




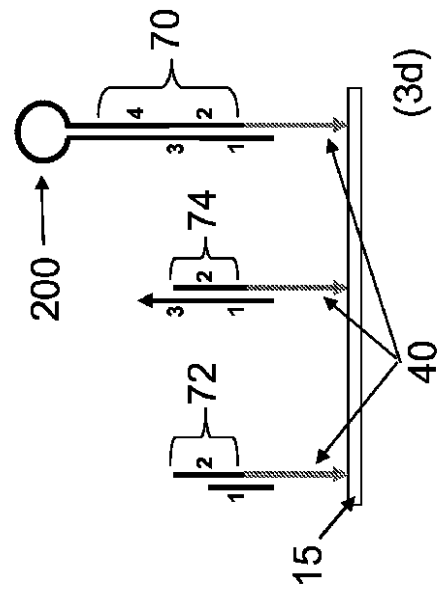




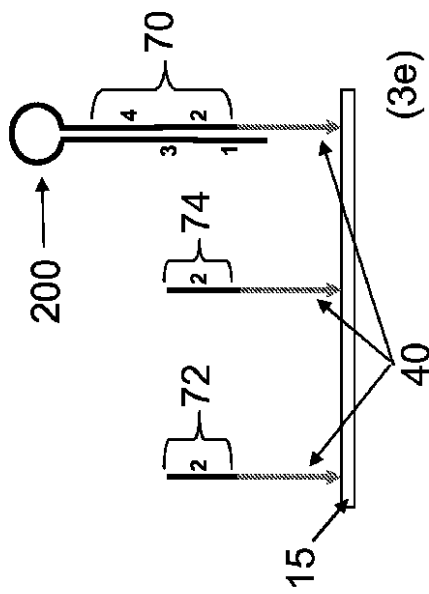
【図 3 c】



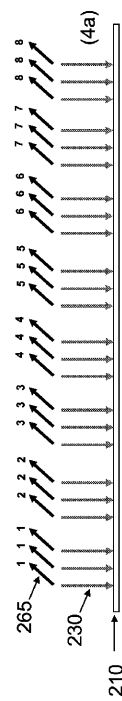
【図 3 d】



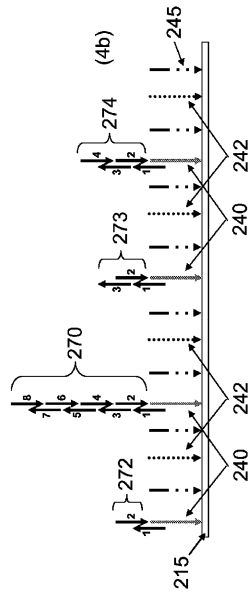
【図 3 e】



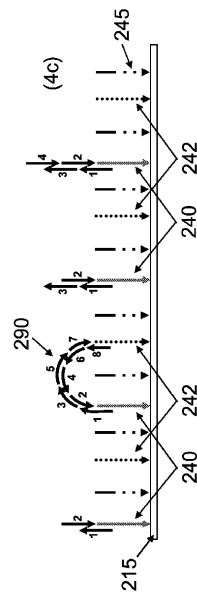
【図 4 a】



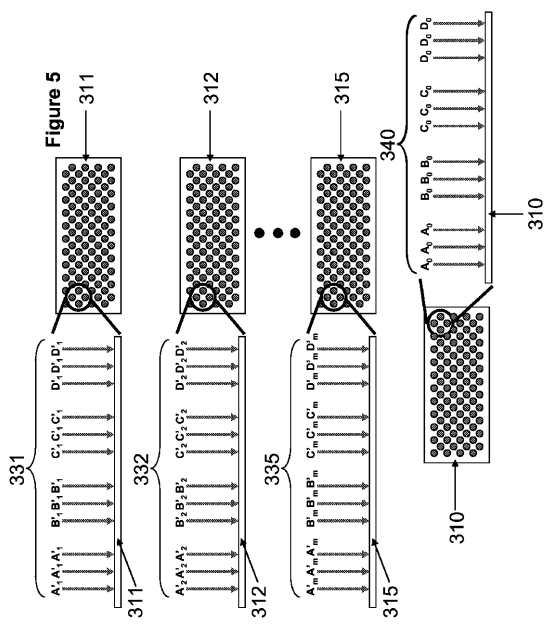
【 図 4 b 】



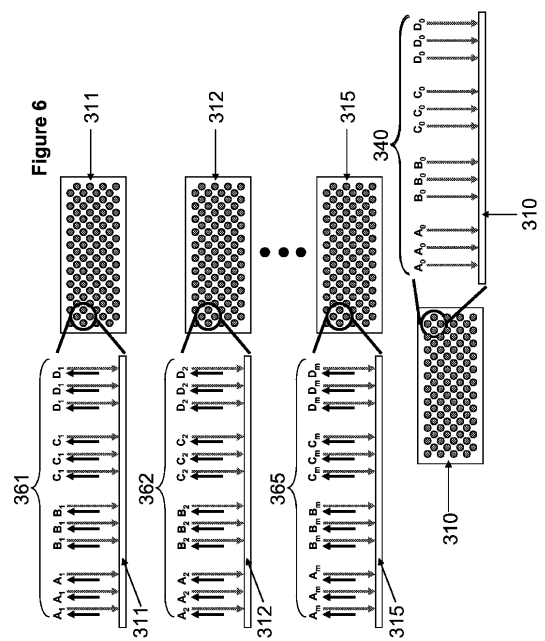
【 図 4 c 】



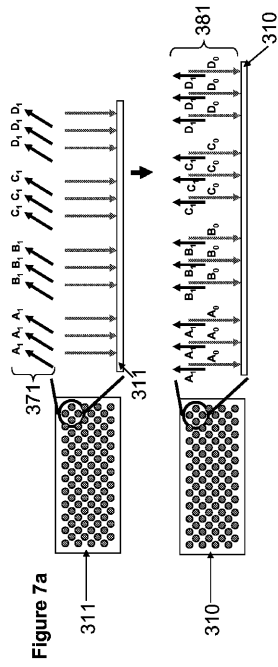
【圖 5】



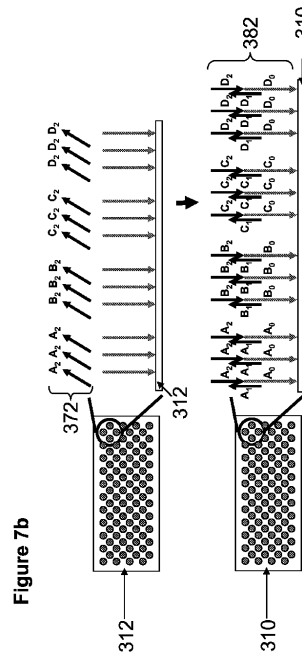
【 図 6 】



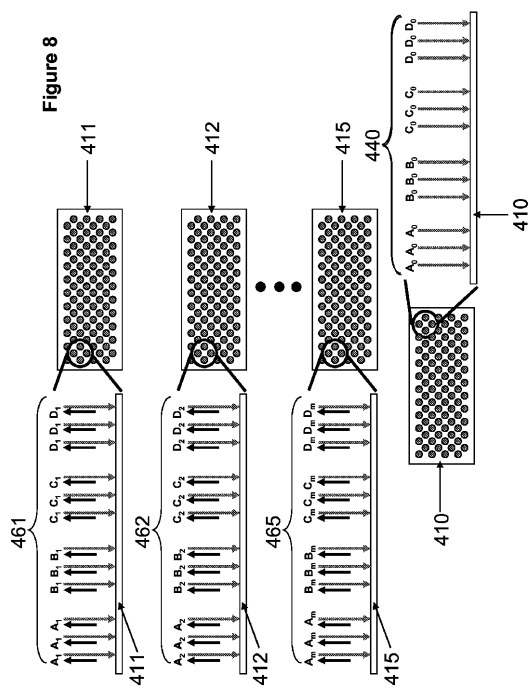
【図 7 a】



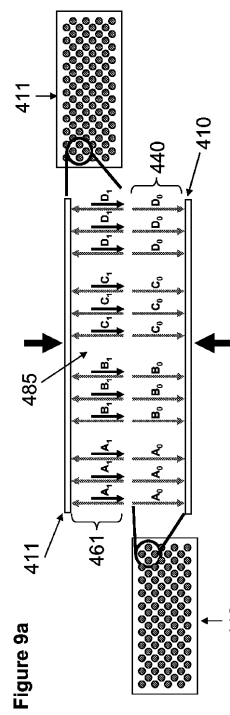
【図 7 b】



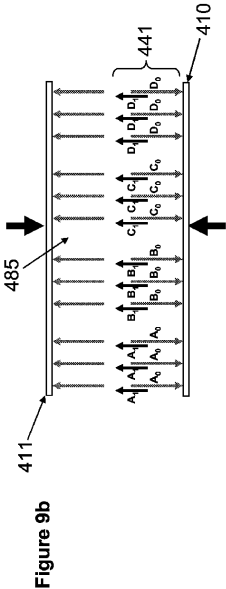
【図 8】



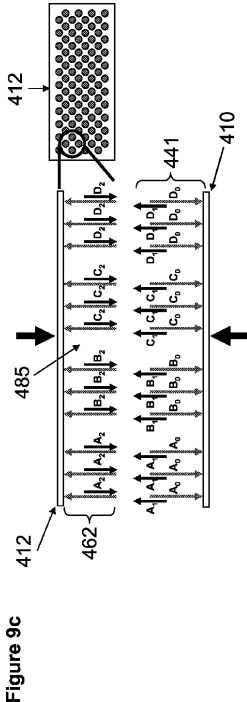
【図 9 a】



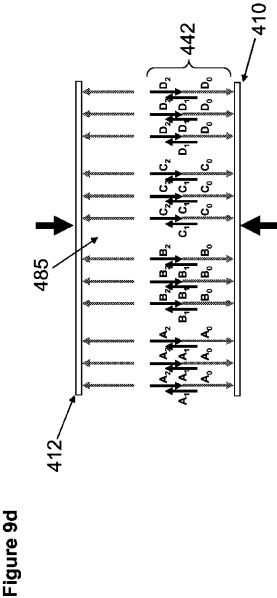
【 図 9 b 】



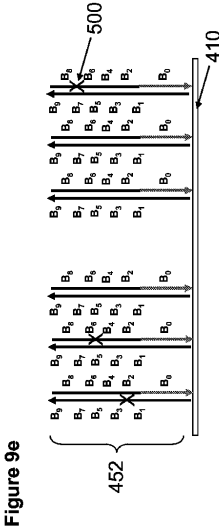
【 図 9 c 】



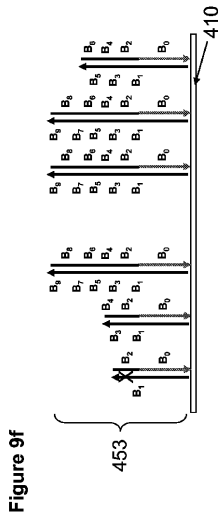
【 図 9 d 】



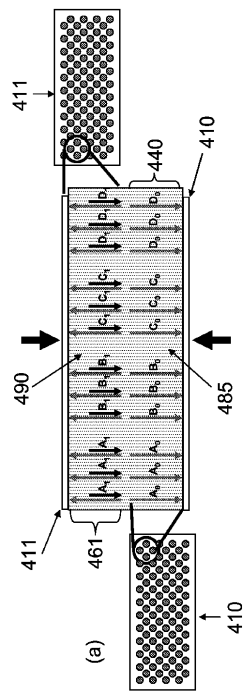
【 図 9 e 】



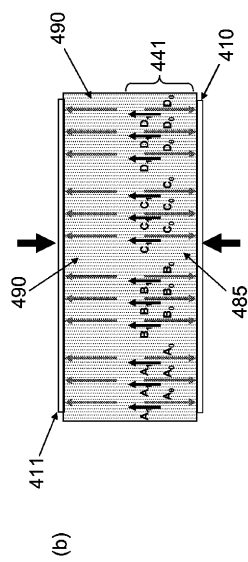
【図 9 f】



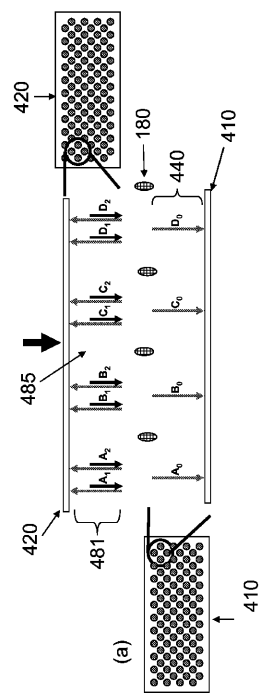
【図 10 ( a )】



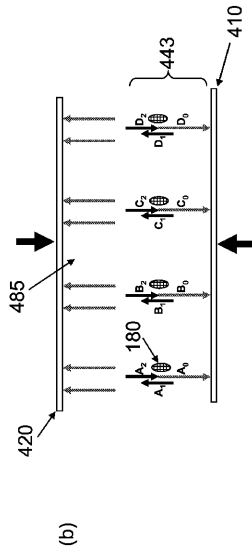
【図 10 ( b )】



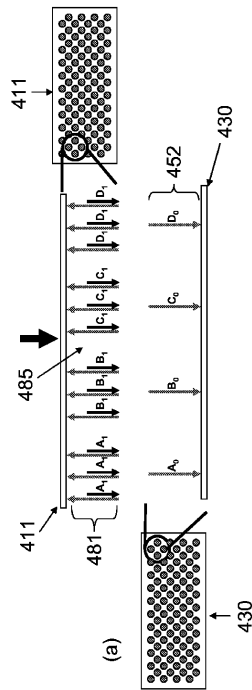
【図 11 ( a )】



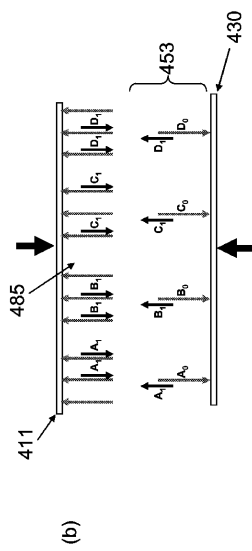
【図 1 1 ( b )】



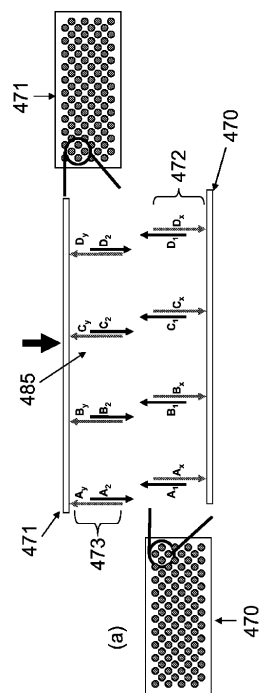
【図 1 2 ( a )】



【図 1 2 ( b )】

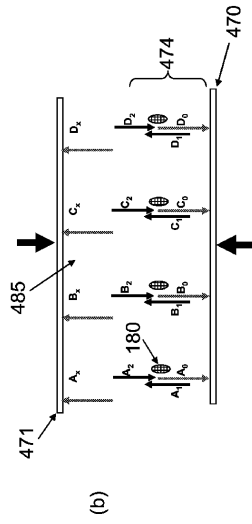


【図 1 3 ( a )】





【図 13 (b)】



【図 14】

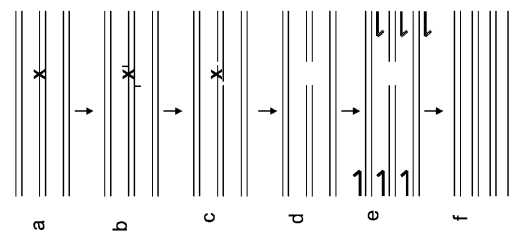


Figure 14

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/503,722

(32)優先日 平成23年7月1日(2011.7.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/412,937

(32)優先日 平成22年11月12日(2010.11.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ジョセフ・ジェイコブソン

アメリカ合衆国02459マサチューセッツ州ニュートン、グラント・アベニュー223番

(72)発明者 リ・ユン・エイ・クン

アメリカ合衆国02474マサチューセッツ州アーリントン、ノウルズ・ファーム・ロード4番

(72)発明者 アンドリュー・カーク・ウィルソン

アメリカ合衆国02474マサチューセッツ州アーリントン、ゲイ・ストリート4番

(72)発明者 センティル・ラム

アメリカ合衆国02114マサチューセッツ州ボストン、ホイッティアー・プレイス6番・ナンバー5ジェイ

(72)発明者 ダニエル・シンドラー

アメリカ合衆国02464マサチューセッツ州ニュートン、ウィリアムズ・ストリート31番

(72)発明者 マイク・ハドソン

アメリカ合衆国01701マサチューセッツ州フラミンガム、クレストウッド・ドライブ21番

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特表2008-523786(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00-15/90

C12M 1/00-3/10

G01N 35/00-37/00

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)