



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137570
(43) 공개일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/34 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/34 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7023624
(22) 출원일자(국제) 2022년12월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/081871
(87) 국제공개번호 WO 2023/115040
국제공개일자 2023년06월22일
(30) 우선권주장
63/290,320 2021년12월16일 미국(US)

(71) 출원인
안사 바이오테크놀로지스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 250,
1198 65썸 스트리트
(72) 발명자
에스트린, 에릭
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 250,
1198 65썸 스트리트, 안사 바이오테크놀로지스,
인코포레이티드 사내
팔루크, 세바스찬
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 250,
1198 65썸 스트리트, 안사 바이오테크놀로지스,
인코포레이티드 사내
아로우, 다니엘
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 250,
1198 65썸 스트리트, 안사 바이오테크놀로지스,
인코포레이티드 사내
(74) 대리인
김영철, 김민정, 김 순 영

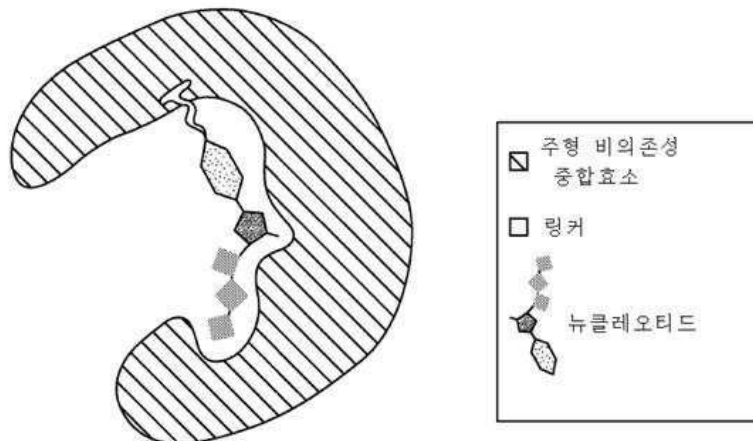
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 폴리뉴클레오티드 합성 방법

(57) 요약

효소에 의한 핵산 분자의 신생(*de novo*) 합성을 위한 조성물 및 방법이 본 명세서에 개시된다. 특히, 그리고 무엇보다도, 본 개시의 조성물 및 방법은 효소에 의한 신생(*de novo*) 합성에 의해 생성된 핵산 분자 생성물에서의 비종결 감소를 제공한다. 본 개시의 조성물 및 방법은 또한 비종결의 감소를 촉진하기 위한 인산분해효소의 사용을 포함한다.

대표도 - 도1d



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6806 (2018.05)

C12Q 2521/525 (2019.08)

C12Q 2525/101 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 합성 방법으로서,

(i) 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하는 단계로서, 상기 접합체는 각각 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 상기 단계; 및

(ii) 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체의 중합효소는 상기 폴리뉴클레오타이드의 3' 수산기에 상기 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드를 공유결합으로 추가하는 것을 촉매하는 것인, 상기 단계를 포함하며,

상기 접합체 시약은 인산분해효소와 배양되거나 배양되었고, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

방법으로서,

(i) 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하는 단계; 및

(ii) 상기 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계를 포함하며,

상기 접합체는 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 연결된 뉴클레오타이드를 포함하고,

상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 접합체를 추가한 후 상기 폴리뉴클레오타이드에 부착된 중합효소를 제거하기 위해 상기 링커를 절단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 접합체 시약을 상기 인산분해효소와 함께 배양하는 단계를 더 포함하며, 상기 배양은 적어도 하나의 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 5' 말단 인산기를 가수분해하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 접합체 시약과 상기 인산분해효소의 상기 배양은 상기 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계 이전에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인산분해효소는 상기 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계 이전에 상기 접합체 시약으로부터 제거되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 접합체 시약과 상기 인산분해효소의 상기 배양은 상기 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계 이후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 또는 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 각 단계를 한 번 이상 반복하여 신장된 폴리뉴클레오티드를 합성하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인산분해효소는 상기 접합체의 보호된 뉴클레오티드의 5' 말단 인산기를 제거하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드는 중합효소에 부착되지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드는 접합체의 일부이며,

상기 중합효소가 풀려 있거나 부적절하게 접혀 있거나,

상기 뉴클레오티드가 상기 인산분해효소로부터 보호되지 않도록 상기 중합효소에 부착되어 있거나, 또는 다수의 뉴클레오티드가 상기 중합효소에 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인산분해효소는 알칼리성 인산분해효소 또는 비알칼리성 인산분해효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 중합효소는 주형 비의존성 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 주형 비의존성 중합효소는 말단 테옥시뉴클레오티드 전이효소(TdT), 또는 이의 변형체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 중합효소는 주형 의존성 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 중합효소는 DNA 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 중합효소는 RNA 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제9항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 합성에서의 비종결 비율은 인산분해효소와 함께 배양되지 않은 다른 동일한 접합체 시약을 사용한 동일한 합성에 비해 감소하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 링커는 절단 가능한 링커인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인산분해효소는 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드의 5' 말단 인산기를 제거

하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

복수의 접합체를 포함하는 조성물로서, 각각의 접합체는 중합효소에 부착된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 조성물의 연결된 중합효소에 의해 보호된 뉴클레오타이드의 순도는 조성물 내의 뉴클레오타이드의 총량을 기준으로 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 99.5%, 또는 약 99.9%를 초과하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 복수의 접합체는 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 또는 약 0.01% 미만의 보호되지 않은 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 인산분해효소를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 접합체는 핵산 분자를 하나의 뉴클레오타이드만큼 신장시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 26

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 접합체는 핵산 분자를 하나 이하의 뉴클레오타이드만큼 신장시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 핵산 분자는 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 28

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 핵산은 이중 가닥인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 29

미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 합성 방법으로서, 핵산 분자를 제22항 내지 제26항 중 어느 한 항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 방법은 미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 생성물을 생성하는 것으로 하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 생성물은 생성물 내의 모든 폴리뉴클레오타이드를 기준으로, 미리 결정된 서열이 아닌 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 비율이 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 또는 약 0.01% 미만인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 핵산 분자는 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 핵산 분자는 이중 가닥인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 34

방법으로서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 조성물을 처리하는 단계로서 상기 조성물을 인산분해효소와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

핵산 분자 합성에 있어서 하나 이상의 비종결 반응을 감소시키는 방법으로서, 상기 합성은 하나 이상의 보호되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 환경에서 수행되고, 상기 감소는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계로서, 상기 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 링커에 의해 중합효소에 결합된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 상기 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 하나 이상의 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제36항에 있어서, 인산분해효소의 존재하에 수행된 합성 반응에서 발생하는 비종결의 개수는 동일한 조건에서 인산분해효소의 부재하에 수행된 합성에 비해 감소하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 개시는 핵산 합성 방법을 포함하는 기술에 관한 것이다.

[0002] 우선권 출원 정보

[0003] 본 출원은 2021년 12월 16일자로 출원된 미국 임시 출원 제63/290,320호에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 해당 기초 출원의 개시 내용은 그 전문이 모든 목적을 위해 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0004] 서열 목록에 대한 참조

[0005] 본 출원에는 전자적으로 제출되었으며 인용에 의해 본 명세서에 포함되는, 서열 목록(2022년 12월 13일에 생성된 ABB-006WO_SL.xml이라는 이름의 XML 파일로, 크기는 15,606바이트)이 포함되어 있다.

배경 기술

[0006] 효소에 의한 폴리뉴클레오타이드 합성은 DNA 기질에 대한 주형 비의존성 핵산 중합효소(예컨대, 말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소)의 결합, 추가될 뉴클레오타이드(예컨대, 보호된 뉴클레오타이드)의 결합, 이어서 다음 번 뉴클레오타이드 결합을 허용하는 탈보호 단계를 반복함으로써 이루어질 수 있다. 효소에 의한 핵산 합성은 뉴클레오타이드 추가 후 비종결로 인해 원치 않는 추가 삽입을 초래할 수 있다. 이로 인해 단일 신장(single extension) 단계에서 두 개 이상의 뉴클레오타이드가 추가될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 정확하게 합성하기 위해서는 각 단계에서 정확히 하나의 뉴클레오타이드를 추가하는 것이 필수적이며, 삽입 오류율이 낮더라도 긴 올리고뉴클레오타이드의 경우에는 부정확한 서열의 비율이 높아진다. 따라서, 단계당 두 개 이상의 뉴클레오타이드 추가가 발생하는 프로세스를 방지하기 위해 효소에 의한 핵산 합성의 개선된 방법 및/또는 기술을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0007] 본 개시는 특히 폴리뉴클레오타이드의 합성 방법을 제공한다. 예를 들어, 이러한 방법은 단일 뉴클레오타이드 추가의 정밀도를 향상시키는 것 등을 통해 올리고뉴클레오타이드 합성의 정확도 및 정밀도를 향상시키는 데 사용될 수 있다.

[0008] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오타이드 합성 반응에서 비종결을 감소시키는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0009] 일부 양태에서, 본 개시는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 예를

들어, 일부 구현예에서, 방법은 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체는 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 연결된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 하나 이상의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다.

[0010] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하는 단계로서, 상기 접합체는 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 연결된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 단계; 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체의 중합효소는 상기 폴리뉴클레오타이드의 3' 수산기에 상기 접합체의 뉴클레오타이드가 공유결합으로 추가되는 것을 촉매하는 것인, 단계를 포함하며, 상기 접합체 시약은 인산분해효소와 함께 배양되거나 배양되었고, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 공유결합으로 추가되는 뉴클레오타이드는 보호된 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 상기 5' 말단 인산기는 예컨대, 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 α -인산기, β -인산기, χ -인산기, δ -인산기, ε -인산기, ϕ -인산기, 또는 γ -인산기일 수 있다.

[0011] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 접합효소-뉴클레오타이드 접합체 조성물을 포함하는 상기 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체는 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 연결된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다.

[0012] 일부 구현예에서, 본 개시는 핵산 합성 방법을 제공하며, 상기 방법은 (i) 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하는 단계로서, 상기 접합체는 각각 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 부착된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 단계; 및 (ii) 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체의 중합효소는 상기 폴리뉴클레오타이드의 3' 수산기에 상기 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드가 공유결합으로 추가되는 것을 촉매하는 것인, 단계를 포함하며, 상기 접합체 시약은 인산분해효소와 함께 배양되거나 배양되었고, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 공유결합으로 추가되는 뉴클레오타이드는 보호된 뉴클레오타이드이다.

[0013] 일부 구현예에서, 본 개시에서 제공하는 방법은 (i) 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하는 단계; 및 (ii) 상기 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체는 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 부착된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다.

[0014] 일부 구현예에서, 상기 링커는 절단 가능 링커이다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 핵산 합성 방법을 제공하며, 상기 방법은 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하는 단계로서, 상기 접합체는 링커를 통해 중합효소에 공유결합으로 연결된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 단계; 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계로서, 상기 접합체의 중합효소는 상기 폴리뉴클레오타이드의 3' 수산기에 상기 접합체의 보호된 뉴클레오타이드가 공유결합으로 추가되는 것을 촉매하는 것인, 단계를 포함하며, 상기 접합체 시약은 인산분해효소와 함께 배양되거나 배양되었고, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오타이드로부터 하나 이상의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법은 상기 접합체를 추가한 후 상기 폴리뉴클레오타이드에 (예컨대, 뉴클레오타이드를 중합효소에 계속시키는 링커를 통해) 부착된 중합효소를 제거하기 위해 상기 링커를 절단하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법은 상기 방법의 각 단계를 한 번 이상 반복하여 폴리뉴클레오타이드를 합성하는 단계를 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법은 상기 접합체 시약을 상기 인산분해효소와 함께 배양하는 단계를 포함하며, 상기 배양은 적어도 하나의 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 5' 말단 인산기를 가수분해한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법은 상기 접합체 시약을 상기 인산분해효소와 함께 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 접합체 시약을 상기 인산분해효소와 함께 배양하는 단계는 상기 시료를 상기 접합체 시약과 함께 배양하는 단계 이전에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 상기 시료를 상기 접합체 시약과 함께 배양하는 단계 이전에 상기 접합체 시약으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 상기 접합체 시약을 상기 인산분해효소와 함께 배양하는 단계는 상기 시료를 상기 접합체 시약에 접촉시키는 단계 이후에 수행된다.

- [0017] 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드 합성에서의 비종결 비율은 인산분해효소와 접촉되지 않은 다른 동일한 접합체 시약을 사용한 동일한 합성에 비해 감소한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 상기 접합체의 보호된 뉴클레오티드의 5' 말단 인산기를 제거하지 않는다.
- [0019] 일부 구현예에서, 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드는 중합효소에 부착되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드는 접합체의 일부이며, 상기 중합효소가 풀려 있거나 부적절하게 접혀 있거나, 상기 뉴클레오티드가 상기 인산분해효소로부터 보호되지 않도록 상기 중합효소에 부착되어 있거나, 또는 다수의 뉴클레오티드가 상기 중합효소에 부착되어 있다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드의 5' 말단 인산기를 제거한다.
- [0020] 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 주형 비의존성 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 주형 비의존성 중합효소는 말단 테옥시뉴클레오티드 전이효소(TdT) 또는 이의 변형체이다.
- [0021] 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 알칼리성 인산분해효소 또는 비알칼리성 인산분해효소이다.
- [0022] 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 주형 의존성 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 RNA 중합효소를 포함한다.
- [0023] 본 개시는 복수의 접합체를 포함하는 조성물을 제공하며, 각각의 접합체는 중합효소에 부착된 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 상기 조성물의 연결된 중합효소에 의해 보호된 뉴클레오티드의 순도는 조성물 내의 (보호된 및 보호되지 않은) 뉴클레오티드의 총량을 기준으로 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 99.5%, 또는 약 99.9%를 초과한다.
- [0024] 일부 구현예에서, 상기 복수의 접합체는 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 또는 약 0.01% 미만의 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 적어도 하나의 인산분해효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 알칼리성 인산분해효소 또는 비알칼리성 인산분해효소이다.
- [0026] 일부 구현예에서, 상기 복수의 접합체는 핵산 분자를 하나의 뉴클레오티드만큼 신장시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 접합체는 핵산 분자를 하나 이하의 뉴클레오티드만큼 신장시킬 수 있다.
- [0027] 일부 구현예에서, 상기 핵산 분자는 단일 가닥이다. 일부 구현예에서, 상기 핵산은 이중 가닥이다.
- [0028] 일부 양태에서, 본 개시는 핵산 분자를 본 명세서에 제공된 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 합성 방법을 제공한다.
- [0029] 일부 구현예에서, 상기 방법은 미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 생성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드 생성물은 생성물 내의 모든 폴리뉴클레오티드를 기준으로, 미리 결정된 서열이 아닌 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 비율이 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 또는 약 0.01% 미만이다.
- [0030] 일부 구현예에서, 상기 핵산 분자는 단일 가닥이다. 일부 구현예에서, 상기 핵산 분자는 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법은 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 조성물을 처리하는 단계로서, 상기 조성물을 인산분해효소와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 보호되지 않은 뉴클레오티드의 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다.
- [0031] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 핵산 분자 합성에 있어서 하나 이상의 비종결 반응을 감소시키는 방법이며, 상기 합성은 하나 이상의 보호되지 않은 뉴클레오티드를 포함하는 환경에서 수행되고, 상기 감소는 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계로서, 상기 중합효소-뉴클레오티드 접합체는 링커에 의해 중합효소에 결속된 뉴클레오티드를 포함하고, 상기 각각의 뉴클레오티드는 하나 이상의 인산기를 포함하며, 상기 각각의 뉴클레오티드는 5' 말단 인산기를 포함하는 것인, 상기 단계를 포함하며, 상기 인산분해효소는 하나 이상의 보호되지 않은 뉴클레오티드로부터 5' 말단 인산기를 제거할 수 있다.
- [0032] 일부 구현예에서, 인산분해효소의 존재하에 수행된 합성 반응에서 발생하는 비종결의 개수는 동일한 조건에서 인산분해효소의 부재하에 수행된 합성에 비해 감소한다.

[0033] 일부 구현예에서, 상기 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 전술한 목적 및 기타 목적, 특징 및 이점이 첨부 도면에 도시된 본 개시의 특정 구현예에 대한 하기 설명으로부터 명백해질 것이며, 도면에서 같은 참조 문자는 다른 모든 도면에서 동일한 부분을 지칭한다. 도면은 반드시 비례에 맞게 도시된 것은 아니며, 대신 본 발명의 다양한 구현예의 원리를 보여주는 것에 중점을 둔다.

도 1a, 도 1b, 및 도 1c는 중합효소-뉴클레오티드 접합체 시약에 존재할 수 있는 보호되지 않은 뉴클레오티드의 예를 나타낸 도해이다. 도 1a는 예시적인 보호되지 않은 뉴클레오티드(예컨대, 데옥시뉴클레오시드 삼인산 또는 "dNTP")가 잘못된 위치에 결속된 주형 의존성 중합효소의 예를 나타낸 것이다.

도 1b는 예시적인 결속된 뉴클레오티드(예컨대, dNTP)를 가진 풀린 주형 비의존적 중합효소의 예를 나타낸 것이다.

도 1c는 예시적인 접합체 시약에 존재하는 "유리"(또는 결속되지 않은) 뉴클레오티드(예컨대, dNTP)의 예를 나타낸 것이다. 이러한 유리 dNTP는 예를 들어, 뉴클레오티드와 중합효소 사이의 링커가 (예컨대, 불안정성으로 인해) 절단되거나 예를 들어, 접합체 합성 후 접합체로부터 유리 뉴클레오티드가 불완전하게 제거됨으로써 이러한 중합효소-뉴클레오티드 접합체 시약에 존재할 수 있다. 도 1a, 도 1b 및 도 1c의 각각의 뉴클레오티드는 인산분해효소를 통한 촉매 제거가 가능한 5' 인산기를 가진다.

도 1d는 예시적인 보호된 뉴클레오티드(예컨대, dNTP)를 포함하는 중합효소-뉴클레오티드 접합체의 예를 나타낸 것이다. 이 도면에서, 상기 예시적인 뉴클레오티드는 접힌 중합효소의 촉매 부위에 결속되어 있으며, 5' 인산기가 인산분해효소에 의해 절단되지 않도록 결속된 중합효소에 의해 입체적으로 방해받는다.

도 2a는 인산분해효소의 존재(+Phos) 또는 부재(-Phos)하에서 A, C, T 또는 G 중합효소 접합체를 사용한, 예시적인 단일 가닥 DNA 기질에 대한 예시적인 단일 뉴클레오티드 추가 반응의 결과를 나타낸 것이다. 이렇게 합성된 올리고뉴클레오티드를 모세관 전기영동법으로 분석하였다. x축은 올리고뉴클레오티드의 대략적인 뉴클레오티드 길이를 나타내고 y축은 517 nm에서의 상대 형광을 나타낸다. 표시된 시점에서 반응이 종료되었다.

도 2b는 인산분해효소의 존재 또는 부재하에서 도 2a의 21분 41초 시점에서의 결과를 확대한 것이다. 구체적인 뉴클레오티드는 각 도면 세트에 표시되어 있다. 화살표는 +2 추가를 나타낸다.

도 3a는 *B. taurus*(Quick CIP, NEB), *P. borealis*(Shrimp Alkaline Phosphatase, NEB), *Antarctic* 세균 TAB5(Antarctic phosphatase, NEB), 또는 *E. coli* (Takara Bio) 인산분해효소로부터의 예시적인 인산분해효소 변형체의 존재하에서 T-중합효소 접합체를 사용한, 단일 가닥 DNA 기질에 대한 단일 뉴클레오티드 추가 반응의 모세관 전기영동 분석 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 합성 반응은 실온(24° C)에서 수행되었다. 대조군 합성 반응은 인산분해효소 없이 수행되었다. 표시된 시점에서 반응이 종료되었다. x축은 올리고뉴클레오티드의 상대적 전기영동 이동을 나타내고(대략적인 뉴클레오티드 길이를 통해), y축은 517 nm에서의 상대 형광을 나타낸다.

도 3b는 예시적인 인산분해효소 변형체(*B. taurus*(Quick CIP, NEB), *P. borealis*(Shrimp Alkaline Phosphatase, NEB), *Antarctic* 세균 TAB5(Antarctic phosphatase, NEB), 또는 *E. coli* (Takara Bio) 인산분해효소)의 존재하에서 T-중합효소 접합체를 사용한, 단일 가닥 DNA 기질에 대한 예시적인 단일 뉴클레오티드 추가 반응의 모세관 전기영동 분석 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 합성반응은 37°C(+ 또는 - 인산분해효소)에서 수행되었으며 30분 후에 종료되었다. 화살표는 +2 추가의 예상 크기를 나타낸다.

도 4는 인산분해효소의 존재 또는 부재하에 수행된, 예시적인 50량체 폴리뉴클레오티드의 예시적인 접합체 기반 폴리뉴클레오티드 합성 결과를 그래프로 나타낸 것으로, 이렇게 합성된 폴리뉴클레오티드를 SeqStudio 유전자 분석기를 사용하여 x축을 따라 크기별로 구별하였다. 스타터 올리고와 올바른 50량체 합성 생성물에 해당하는 피크가 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 개시의 다양한 구현예에 대한 구체적인 내용이 아래의 설명에 기재된다. 본 발명의 다른 특징, 목적, 및 장점은 본 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0036] 정의

- [0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 인산기를 포함하는 분자를 지칭한다. "뉴클레오타이드"는 핵염기(예컨대, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 또는 우라실) 및 오탄당(예컨대, 리보스 또는 2'-데옥시리보스)을 포함하는 분자를 지칭한다. 뉴클레오타이드의 예는 제한 없이, 뉴클레오타이드 일인산, 뉴클레오타이드 이인산, 뉴클레오타이드 삼인산, 뉴클레오타이드 사인산, 뉴클레오타이드 오인산, 또는 뉴클레오타이드 육인산거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 TdT 및 TdT 변형체는 핵염기에 대한 변형을 포함하는 뉴클레오타이드 유사체를 포함하여, 임의의 뉴클레오타이드 폴리인산을 포괄할 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 "비중결" 또는 "삽입"은 고리형 뉴클레오타이드 신장의 단일 단계 동안 두 개 이상의 뉴클레오타이드가 추가될 때 발생한다. 이는 절단되지 않은 5' 인산기가 있는 보호되지 않은 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드에 추가될 때 발생할 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인산분해효소"는 뉴클레오타이드, 특히 부적절하게 형성된 접합체의 일부로서 보호되지 않거나 중합효소에 결속되어 있지 않은 뉴클레오타이드의 5' 인산기를 제거할 수 있는 효소를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 특정 인산분해효소를 언급하는 것이 아닌 경우, 인산분해효소는 또한 뉴클레오타이드로부터 하나 이상의 인산기(들)를 제거할 수 있는 모든 인산분해효소, 인산분해 활성을 갖는 조작된 효소, 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 것을 의미한다. 인산분해효소는 또한 인산분해 활성을 갖는 조작된 효소 또는 이의 기능적 단편을 포함하여, 뉴클레오타이드로부터 하나 이상의 인산기(들)를 제거할 수 있는 임의의 생체 분자(예컨대, 폴리펩티드 또는 리보자임)를 지칭할 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 "보호된 뉴클레오타이드" 또는 "차폐된 뉴클레오타이드"는 인산분해효소가 이의 5' 인산기를 제거할 수 없도록 결속된 중합효소(또는 다른 개체 또는 성분, 예컨대 차단기(blocking group) 등)에 의해 입체적으로 방해를 받는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 이러한 뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드에 추가된 후 및 상기 결속된 중합효소 제거 전에 후속 뉴클레오타이드의 추가를 억제할 가능성이 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 "보호되지 않은 뉴클레오타이드" 또는 "차폐되지 않은 뉴클레오타이드"는 인산분해효소가 이의 5' 인산기를 제거할 수 없도록 결속된 중합효소(또는 다른 개체 또는 성분, 예컨대 차단기(blocking group) 등)에 의해 입체적으로 방해를 받지 않는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 잘못 접힌 중합효소에 결속되거나 중합효소의 잘못된 위치에 결속될 수 있다. 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 중합효소로부터 결속이 풀릴(또는 유리될) 수 있다. 인산분해효소에 노출되지 않은 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 보호된 뉴클레오타이드가 제대로 추가된 후 삽입으로 폴리뉴클레오타이드에 잘못 추가될 가능성이 더 높다.
- [0042] **중합효소-뉴클레오타이드 접합체 및 폴리뉴클레오타이드 합성**
- [0043] 본 개시는 특히 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 제공한다. 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 이해하는 바와 같이, 정밀하고 정확한 폴리뉴클레오타이드 합성과 관련된 다양한 과제가 있다. 예를 들어, 특히 중합효소-뉴클레오타이드의 공유결합 추가를 잘못 촉매할 수 있으며, 이로 인해 제어된 단계별 핵산 합성에서 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 사용할 때 단계당 두 개 이상의 뉴클레오타이드가 추가될 수 있다(예컨대, 삽입 또는 비중결). 이러한 접합체를 인산분해효소와 결합하는 단계(예컨대, 인산분해효소의 존재하에 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 제공하는 단계)를 포함하는, 본 명세서에 제공된 기술은 이러한 과제를 극복한다. 이들 기술은 종래 기재된 합성 방식(예컨대, 인산분해효소 없이 수행되는 방식)에 비해 오류를 줄여 보다 정확하고 정밀한 단계별 추가를 달성하는 데 도움이 된다.
- [0044] 일부 구현예에서, 상기 접합체는 인산분해효소의 존재하에 제공된다. 일부 구현예에서, 본 개시는 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 제공하며, 여기서 중합효소와 뉴클레오타이드는 링커를 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 절단 가능하다.
- [0045] 일부 구현예에서, 상기 접합체 시약은 인산분해효소의 존재하에 존재한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 상기 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 인산분해효소의 존재하에 주형(예컨대, 스타터 올리고 또는 초기 올리고뉴클레오타이드)과 결합된다.
- [0047] 폴리뉴클레오타이드의 단계적 합성을 위한 전형적인 방법은 순환 단계를 통해 개별 뉴클레오타이드를 스타터 올리고(즉, 초기 올리고뉴클레오타이드)에 단계적으로 추가하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 단계는 올리고뉴클레오타이드에 대한 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 추가, 중합효소에 의해 촉매되는 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 대한 뉴클레오타이드의 공유결합 추가, 및 추가된 뉴클레오타이드로부터 중합효소의 절단을 포

합한다. 이들 단계는 신장된 폴리뉴클레오티드가 상기 단계가 한 번 이상 반복되기 전의 폴리뉴클레오티드보다 하나 이상의 뉴클레오티드 길이를 더 가지도록, 원하는 신장된 폴리뉴클레오티드가 합성될 때까지 반복될 수 있다.

[0048] 특히, 핵산 합성 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 핵산 합성 방법은 하나 이상의 인산분해효소 존재하에서 중합효소-뉴클레오티드 접합체(예컨대, 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체)를 포함하는 접합체 시약을 접촉(예컨대, 배양)하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 뉴클레오티드는 동일한 뉴클레오티드(예컨대, A, G, T 또는 C 등)이다. 일부 구현예에서, 상기 뉴클레오티드는 상이한 뉴클레오티드(예컨대, A, G, T 및/또는 C 등)이다. 일부 이러한 구현예에서, 인산분해효소 존재하에서 수행되는 합성은 인산분해효소 부재하에서의 동일한 합성에 비해 하나 이상의 방식(예컨대, 더 정밀하고, 더 효율적이고, 더 정확한)으로 개선된다.

[0049] 일부 구현예에서, 인산분해효소 존재하에서 수행되는 합성은 보호되지 않은 뉴클레오티드가 핵산에 추가되는 것을 방지한다. 본 명세서에 제공된 방법은 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는(예컨대, 배양) 단계를 포함하며, 핵산 합성에서 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 사용할 때, 인산분해효소 없이 상기 또는 접합체 시약을 인산분해효소로 처리하지 않고 합성하는 것과 비교하여 단계당 두 개 이상의 뉴클레오티드의 추가로 이어지는 프로세스(예컨대, 추가 뉴클레오티드 삽입으로 이어지는 비종결)의 비율이 감소한다.

[0050] 비종결

[0051] 긴 올리고뉴클레오티드의 정확한 합성을 위해서는 단계별 핵산 합성의 각 단계에서 정확히 하나의 뉴클레오티드 추가를 달성하는 것이 필수적이다. 이러한 추가 작업을 정밀하고 정확하게 수행하는 것은 업계에서 여전히 어려운 과제로 남아 있다. 예를 들어, 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 사용하는 단계적 핵산 합성은 삽입 및/또는 비종결에 취약하여 고리형 뉴클레오티드 신장의 단일 단계에서 두 개 이상의 뉴클레오티드가 핵산에 추가될 수 있다.

[0052] 보호되지 않은 뉴클레오티드는 5' 인산기가 인산분해효소에 의해 절단되지 않도록 결속된 중합효소에 의해 입체적으로 방해를 받지 않거나 부분적으로만 방해를 받는다. 올리고뉴클레오티드 합성 중에 중합효소는 보호되지 않은 뉴클레오티드의 공유결합 추가를 잘못 촉매할 수 있으며, 이는 핵산 합성에서 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 사용할 때 단계당 두 개 이상의 뉴클레오티드의 추가(예컨대, 삽입 또는 비종결)를 초래할 수 있다. 본 명세서에 제공된 기술은 이러한 문제를 극복하여 종래 기재된 합성 방식에 비해 오류를 줄이면서 정확하고 정밀한 단계별 추가를 달성하는 데 도움이 된다.

[0053] 일부 구현예에서, 절단되지 않은 5' 인산기가 있는 보호되지 않은 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드에 추가될 때 비종결이 발생할 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 일부 구현예에서, 인산분해효소는 뉴클레오티드(예컨대, 뉴클레오티드 삼인산 등)의 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)를 가수분해한다. 일부 구현예에서, 상기 5' 말단 인산기는 뉴클레오티드의 α -인산기, β -인산기, χ -인산기, δ -인산기, ε -인산기, ϕ -인산기, 또는 γ -인산기상에 존재한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 인산분해효소는 중합효소-뉴클레오티드 접합체 내의 뉴클레오티드 또는 유리 뉴클레오티드의 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)를 가수분해한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 인산분해효소는 뉴클레오티드의 5' 인산기, 예컨대 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체에서 뉴클레오티드의 하나 이상의 5' 말단 인산기(들)를 가수분해하고, 올리고뉴클레오티드 합성 중에 가수분해된 뉴클레오티드가 핵산에 추가되는 것을 방지한다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 중합효소-뉴클레오티드 접합체의 보호되지 않은 뉴클레오티드의 5' 인산기를 가수분해한다. 일부 이러한 구현예에서, 상기 5' 인산기의 가수분해는 올리고뉴클레오티드 합성 중에 보호되지 않은 뉴클레오티드가 핵산에 추가되는 것을 방지한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 인산분해효소는 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체에서 보호되지 않은 뉴클레오티드의 하나 이상의 5' 인산기(들)를 가수분해하고, 올리고뉴클레오티드 합성 중에 상기 보호되지 않은 뉴클레오티드가 핵산에 추가되는 것을 방지한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 인산분해효소는 하나 이상의 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 조성물에서 하나 이상의 유리 뉴클레오티드의 하나 이상의 5' 인산기(들)를 가수분해하고, 올리고뉴클레오티드 합성 중에 유리 뉴클레오티드가 핵산에 추가되는 것을 방지한다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 하나 이상의 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 조성물에 존재하는 하나 이상의 유리 뉴클레오티드의 5' 인산기를 가수분해한다. 일부 이러한 구현예에서, 상기 5' 인산기의 가수분해는 올리고뉴클레오티드 합성 중에 하나 이상의 유리 뉴클레오티드가 핵산에 추가되는 것을 방지한다.

[0054] 보호되지 않은 뉴클레오타이드

[0055] 접합체 시약에 보호되지 않은 뉴클레오타이드가 존재하면 올리고뉴클레오타이드 합성에서 비종결(즉, 삽입)이 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 핵산 합성 중에 올리고뉴클레오타이드에 추가된 후 후속 뉴클레오타이드 추가를 억제할 가능성이 낮다.

[0056] 일부 구현예에서, 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 내 뉴클레오타이드의 일부는 중합효소에 의해 보호되지 않는다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 보호되지 않은 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 내의 중합효소 분자는 결속된 뉴클레오타이드의 5' 인산기에 대한 인산분해효소의 접근을 입체적으로 방해하지 않는다. 일부 구현예에서, 결속된 뉴클레오타이드는 보호되지 않은 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 인산분해효소가 이의 5' 인산기를 제거할 수 없도록 결속된 중합효소에 의해 입체적으로 방해를 받지 않는다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에서 뉴클레오타이드의 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)를 제거하면 핵산 합성 중에 뉴클레오타이드가 핵산에 추가되는 것을 방지할 수 있다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에서 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)를 가수분해한다. 이러한 일부 구현예에서, 두 개 이상의 5' 말단 인산기가 제거되며, 예를 들어 5' 말단 인산기가 연속적으로, 즉 첫 번째 뉴클레오타이드에서, 이어서 두 번째 뉴클레오타이드에서 등의 방식으로 제거된다. 따라서, 일부 이러한 구현예에서, 하나 이상의 5' 말단 인산기가 제거될 수 있지만, 주어진 뉴클레오타이드에서는 하나의 5' 말단 인산기가 존재하고 제거되며, 이 지점에서 다른 인산기가 적어도 하나의 5' 말단 인산기를 가진 뉴클레오타이드의 5' 말단 인산기가 된다.

[0057] 일부 구현예에서, 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 부적절하게 형성된 접합체의 일부이다. 일부 구현예에서, 부적절하게 형성된 접합체는 잘못 접힌 중합효소, 뉴클레오타이드가 잘못된 위치에 부착된 중합효소, 및/또는 다수의 뉴클레오타이드가 부착된 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드는 불안정성 또는 불완전한 정제로 인해 중합효소로부터 유리되거나 결속이 풀린다. 일부 구현예에서, 유리되거나 결속이 풀린 뉴클레오타이드는 보호되지 않은 뉴클레오타이드이다.

[0058] 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 예

[0059] 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드 보호 부족은 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 제조하는 중 또는 추가 반응 자체 동안의 여러 프로세스로 인해 발생할 수 있다. 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 조성물 내에서 중합효소에 부착되지 않은 뉴클레오타이드는 보호되지 않은 뉴클레오타이드로 간주된다. 보호되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 생성할 수 있는 프로세스의 비제한적인 예는 뉴클레오타이드와 중합효소 간 링커의 자발적인 절단(예컨대, 도 1a 내지 1d의 링커 참조), 중합효소의 풀림(예컨대, 도 1b 참조), 잘못된 위치에 부착된 뉴클레오타이드를 가지는 중합효소(예컨대, 도 1a 참조), 부착된 뉴클레오타이드를 여러 개 포함하는 중합효소(즉, 하나의 중합효소상에), 또는 결속이 풀린 유리 뉴클레오타이드(예컨대, 도 1c 참조)를 포함한다. 일부 구현예에서, 불안정성으로 인해 뉴클레오타이드와 중합효소 간 링커의 자발적인 절단이 발생하여 접합체 시약 내에 유리 뉴클레오타이드가 생길 수 있다.

[0060] 보호된 뉴클레오타이드

[0061] 일부 구현예에서, 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 내 뉴클레오타이드의 일부는 중합효소에 의해 보호된다. 보호된 뉴클레오타이드의 비제한적 예는 올바르게 접힌 중합효소의 촉매 부위에 결속된 뉴클레오타이드를 포함한다(예컨대, 도 1d의 예시적인 개략도 참조). 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 보호된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 내의 중합효소 분자는 결속된 뉴클레오타이드의 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)에 대한 인산분해효소의 접근을 입체적으로 방해한다. 일부 구현예에서, 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)는 예를 들어, α -인산기, β -인산기, χ -인산기, δ -인산기, ϵ -인산기, ϕ -인산기, 또는 γ -인산기일 수 있다. 일부 구현예에서, 결속된 뉴클레오타이드는 보호된 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 보호된 뉴클레오타이드는 인산분해효소가 이의 5' 인산기를 제거할 수 없도록 결속된 중합효소에 의해 입체적으로 방해를 받는다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에서 보호된 뉴클레오타이드의 5' 인산기(예컨대, 5' 말단 인산기)를 가수분해할 수 없다.

[0062] 인산분해효소

[0063] 인산분해효소는 일반적으로 물을 사용하여 인산 모노에스테르를 인산 이온과 알코올로 분해한다. 인산분해효소는 기질의 가수분해를 촉매한다.

- [0064] 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에서 뉴클레오타이드의 5' 인산기는 중합효소에 의해 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드에 추가하는 데 필요하다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에서 뉴클레오타이드의 5' 인산기를 제거하면 올리고뉴클레오타이드 합성 중에 뉴클레오타이드가 핵산에 추가되는 것을 방지할 수 있다.
- [0065] 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에서 뉴클레오타이드의 5' 인산기기를 가수분해하기 위해 접합체 시약에 인산분해효소를 첨가하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 개시된다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 보호되지 않은 뉴클레오타이드로부터 인산기 모이어티를 제거한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 보호되지 않은 뉴클레오타이드의 5' 인산기를 가수분해할 수 있는 인산분해효소를 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에 추가하는 단계를 포함한다.
- [0066] **인산분해효소의 종류**
- [0067] 본 명세서에 기재된 방법을 위한 임의의 적합한 인산분해효소, 인산분해 활성을 가진 조작된 효소, 또는 이의 기능적 단편이 본 개시에 의해 고려된다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 뉴클레오타이드분해효소이다. 인산분해 활성을 가진 효소는 효소 등급 E.C 3.1.3.-., 에스테르 결합에 작용하는 가수분해효소, *예컨대* 인산 모노에스테르 가수분해효소에 포함된다. 그러나 적합한 인산분해 활성을 가진 효소(*예컨대*, 아피라제)는 다른 효소 등급에서 발견될 수 있다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 선택적으로 무기 인산염 기질, *예컨대* 피로인산염을 가수분해할 수 있다.
- [0068] 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 고체 지지체에 고정화된다. 몇몇 구현예에서, 상기 인산분해효소는 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 재조합 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소는 야생형 인산분해효소이다. 일부 구현예에서, 상기 야생형 인산분해효소는 본래 발현되는 유기체로부터 분리된다.
- [0069] 알칼리성 인산분해효소(ALP, ALKP, ALPase, Alk Phos) 또는 염기성 인산분해효소는 인산 모노에스테르의 가수분해를 촉매하고 알칼리성 pH 환경에서 최적으로 활성화되는 원형질막 결합 당단백질이다. 알칼리성 인산분해효소는 86 킬로달톤의 동종이량체 단백질 효소이다. 각 단량체에는 촉매 기능에 중요한 다섯 개의 시스테인 잔기, 두 개의 아연 원자, 한 개의 마그네슘 원자가 포함되어 있다.
- [0070] 알칼리성 인산분해효소의 비제한적인 예는 *B. taurus*(Quick calf-intestinal alkaline phosphatase, 또는 CIP, NEB), *Pandalus borealis*(Shrimp Alkaline Phosphatase, NEB), *Antarctic* 세균 TAB5(Antarctic phosphatase, NEB) 및 *E. coli*(Takara Bio) 인산분해효소를 포함한다. 알칼리성 인산분해효소의 비제한적인 추가 예는 태반 알칼리성 인산분해효소(PLAP) 및 인간 장 알칼리성 인산분해효소를 포함한다.
- [0071] 비알칼리성 인산분해효소는 산성 인산분해효소일 수 있다. 비알칼리성 인산분해효소의 비제한적인 예는 주석산염 저항 산성 인산분해효소이다.
- [0072] 본 명세서에 기재된 방법에 사용하기 위한 인산분해효소를 부호화하는 예시적인 아미노산 서열이 제한 없이 표 1에 제시되어 있다.

표 1

[0073] **예시적인 알칼리성 인산분해효소 서열**

인산분해효소	아미노산 서열	서열 번호
알칼리성 인산분해효소(<i>E. coli</i>)	MKQSTIALALLPLLFPTVKARTPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNI ILLIGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKIDALPLTGQYTHYALNKKTGKPDYVTD SAA SATAWSTGVKTYNGALGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSRK CYGPSATSEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAQ ARGYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVRWLGPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRN DSVPTLAQM TDKAIELLSKNEKGFFLQVEGASIDKQDHAANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFA KKEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTKAPGLTQALNTKDGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLRI AAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMKAALGLK	2
알칼리성 인산분해효소 - 동종효소 1(<i>E. coli</i>)	RTPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNI ILLIGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKIDALPLTGQYTHYALNKKTGKPDYVTD SAA SATAWSTGVKTYNGALGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSRKCYGPSATSEKCPGNALEKGGK GSITEQLLNARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAQARGYQLVSDAASLNSVTEANQ KPLLGLFADGNMPVRWLGPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPTLAQM TDKAIELLSKNE KGFFLQVEGASIDKQDHAANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIV APDTKAPGLTQALNTKDGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLRI AAYGPHAANVVGLTDQTDLFY TMKAALGLK	3

알칼리성 인산분해효소 - 동종효소 2 (<i>E. coli</i>)	TPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNI ILLIGDGMGDSEITAARN YAEGAGGFFKIDALPLTGQYTHYALNKKTGKPDYVTDASAASATAWSTGVKTYNGALGVDIHE KDHPITILEMAKAAGLATGNVSTAELOQATPAALVAHVTSRKYGPSATSEKCPGNALEKGGKG SITEQLLNARADVTLLGGGAKTFAETATAGEWQGTLLREQAQARGYQLVSDAASLNSVTEANQQ KPLLGLFADGNMPVRLGPKATYHGNI DKPAVCTPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIELLSKNEK GFFLQVEGASIDKQDHAANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIVA PDTKAPGLTQALNTKDGAVMVMYSYGNSEEDSQEHTGSQLRIIAYGPHAANVGLTDQTDLFYT MKAALGLK	4
알칼리성 인산분해효소(<i>B. taurus</i>)	MQGACVLLLLLGLWLQSLAFIPVEEDPAFWNRQAQALDVAKKLQPIQKAAKNVILFLGDGM GVPTVTATRIILKGQMNKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGN RTIGVSAARYNQCNTRGNEVTSVMNRKAKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGAYAHVNRDWYS DADLPADAQTYGQDIATQLVNNMDIDVILGGGRKYMFPETPDPEYPHDSVNGVRKDKRNL VQEWQAKHQGAQYVWNRTELLQAANDSSVTHLMGLFEPADMKNVQDPTKDPTEEMTEAAL QVLSRNPGFYLFVEGGRIDHGHDSKAYMALTEAVMFDNAIAKANELTSELDTLILVTADHS HVFSGGYTLRGTSIFGLAPSKASDKSYTSILYGNPGYVLGGGSRPDVNDISIEDPSYRQ AAVPLSSETHGGEDVAVFARGPQAHVHGVQEETFVAHVMAFAGCPEPYTDCNLPAPSGLSDA AHLAASAPSLALLAGAMLLLPALY	5
알칼리성 인산분해효소(<i>P. borealis</i>)	KAYWNKDAQDALDKQLGKLEKQAKNVIFFLGDGMSLSTVTAARIYKGGLTGKFEREKISWE EFDFAALSKTYNTDKQVTDASAATAYLTGVKTNQGVIGLDANTVRTNCSYQLDESLFTYSIA HWFQEAGRSTGVVTSTRVTHATPAGTYAHVADRDWENDSDVHDREDEPEICDDIAEQLVFREP GKNFKVIMGGRRGFFPEEALDIEDGIPGEREDGKHLITDWLDDKASQGATASYVWNRDLLA VDIRNTDYLMLFSYTHLDTVLTRDAEMDPTLPMTKVAIEMLTKDENGFFLLVEGGRIDHMH HANQIRQSLAETLDMEEAVSMALSMTPDEETIILVTADHGHTLTITGYADRNTDILDFAGISD LDDRRYTILDYSGSPGYHITEDGKRYEPTEDLKDINFRYASAAPKHSVTHDGTVDGVIWVNGP FAHLFTGVYEENYIPHALAYAACVGTGRTEFCDEK	6
장형 알칼리성 인산분해효소 (<i>H. sapiens</i>)	VIPAEENPAFWNRQAALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRIILKGQKNGKL GPETPLAMDRFPYLALSKTYNVDRQVPDSAAATATAYLCGVKANFQTIGLSAAARFNQCNTTRG NEVISVMNRKAKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWSADAMPASARQEGCQDIATQ LISNMDIDVILGGGRKYMFMGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQGAWYVWNRTE LMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPSLMEMTEAALRLSRNPRGFYLFVEGGR IDHGHHEGVAYQALTEAVMFDNAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSHVFSFGGYTLRGSSIFGLA PSKAQDSKAYTSILYGNPGYVFNQSGVRPDVNESESGSPDYQQAAPVLSSETHGGEDVAVFA RGPQAHVHGVQEFSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPACTTD	7

[0074] **폴리뉴클레오티드 합성**

[0075] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 합성 방법은 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 핵산과 접촉시키는(예컨대, 배양) 단계를 포함하며, 상기 중합효소-뉴클레오티드 접합체의 중합효소는 결속된 뉴클레오티드를 사용하여 핵산을 신장시킨다.

[0076] 상기 기재된 바와 같이, 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는(예컨대, 배양) 단계를 포함하는 핵산 합성 방법이 본 명세서에 개시된다. 일부 구현예에서, 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계는 순환 신장 반응 전 또는 도중에 발생한다. 일부 구현예에서, 단계적 핵산 합성 방법에서 인산분해효소가 존재하면, 비중결 및 단계당 두 개 이상의 뉴클레오티드의 추가를 초래하는 프로세스가 감소한다. 일부 구현예에서, 인산분해효소로 처리된(예컨, 배양된) 접합체 시약을 사용하면, 상기 접합체 시약이 핵산 합성의 단계적 방법에 사용되는 경우 처리되지 않은 접합체 시약과 비교하여 비중결이 감소한다.

[0077] 인산분해효소의 추가 또는 제거 시기

[0078] 중합효소-뉴클레오티드 접합체는 인산분해효소와 함께 보관되어 시스템에 남아 있을 수 있으며(DNA 신장 반응 중에도), 또는 접합체가 DNA에 추가되기 전과 DNA 추가 반응이 개시될 때 특정 배양 기간 동안 인산분해효소가 제거될 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서 인산분해효소는 복수의 중합효소-뉴클레오티드 접합체를 포함하는 접합체 시약과 함께 배양된다. 일부 구현예에서, 접합체 시약과 인산분해효소의 배양은 시료를 상기 접합체 시약과 접촉시키는 단계 이전에 수행된다. 일부 구현예에서, 인산분해효소는 시료를 접합체 시약과 접촉시키는 단계 이전에 상기 접합체 시약으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 접합체 시약과 인산분해효소의 배양은 시료를 상기 접합체 시약에 접촉시키는 단계 이후에 수행된다.

[0080] 인산분해효소 농도

[0081] 중합효소-뉴클레오티드 접합체(예컨대, 접합체 시약)와 접촉하거나 함께 배양된 인산분해효소의 농도는 예를 들

어, 상기 접합체 농도 대비 접합체 배수 증가에 대한 인산분해효소의 화학량론적 비율, 인산분해효소 활성 단위, 물 농도, 또는 mg/mL으로 표현될 수 있다.

[0082] 인산분해효소에 대한 접합체의 임의의 적합한 화학량론적 비율이 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 인산분해효소에 대한 접합체의 화학량론적 비율은 약 1:1 내지 약 1:500이다. 일부 구현예에서, 인산분해효소에 대한 접합체의 화학량론적 비율은 약 1:1, 약 1:2, 약 1:3, 약 1:4, 약 1:5, 약 1:10, 약 1:15, 약 1:20, 약 1:25, 약 1:30, 약 1:35, 약 1:40, 약 1:45, 약 1:50, 약 1:55, 약 1:60, 약 1:65, 약 1:70, 약 1:75, 약 1:80, 약 1:85, 약 1:90, 약 1:95, 약 1:100, 약 1:105, 약 1:110, 약 1:115, 약 1:120, 약 1:125, 약 1:130, 약 1:135, 약 1:140, 약 1:145, 약 1:150, 약 1:155, 약 1:160, 약 1:165, 약 1:170, 약 1:175, 약 1:180, 약 1:185, 약 1:190, 약 1:195, 약 1:200, 약 1:225, 약 1:250, 약 1:275, 약 1:300, 약 1:325, 약 1:350, 약 1:375, 약 1:400, 약 1:425, 약 1:450, 약 1:475, 또는 약 1:500이다.

[0083] 접합체에 대한 인산분해효소의 임의의 적합한 화학량론적 비율이 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체에 대한 인산분해효소의 화학량론적 비율은 약 1:1 내지 약 1:500이다. 일부 구현예에서, 접합체에 대한 인산분해효소의 화학량론적 비율은 약 1:1, 약 1:2, 약 1:3, 약 1:4, 약 1:5, 약 1:10, 약 1:15, 약 1:20, 약 1:25, 약 1:30, 약 1:35, 약 1:40, 약 1:45, 약 1:50, 약 1:55, 약 1:60, 약 1:65, 약 1:70, 약 1:75, 약 1:80, 약 1:85, 약 1:90, 약 1:95, 약 1:100, 약 1:105, 약 1:110, 약 1:115, 약 1:120, 약 1:125, 약 1:130, 약 1:135, 약 1:140, 약 1:145, 약 1:150, 약 1:155, 약 1:160, 약 1:165, 약 1:170, 약 1:175, 약 1:180, 약 1:185, 약 1:190, 약 1:195, 약 1:200, 약 1:225, 약 1:250, 약 1:275, 약 1:300, 약 1:325, 약 1:350, 약 1:375, 약 1:400, 약 1:425, 약 1:450, 약 1:475, 또는 약 1:500이다.

[0084] 임의의 적합한 인산분해효소 농도가 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소 농도는 약 0.01 mg/mL 내지 약 10.5 mg/mL이다. 일부 구현예에서, 상기 인산분해효소 농도는 약 0.1 mg/mL, 약 0.15 mg/mL, 약 0.25 mg/mL, 약 0.5 mg/mL, 약 0.75 mg/mL, 약 1 mg/mL, 약 1.25 mg/mL, 약 1.5 mg/mL, 약 1.75 mg/mL, 약 2 mg/mL, 약 2.25 mg/mL, 약 2.5 mg/mL, 약 2.75 mg/mL, 약 3, 약 3.25 mg/mL, 약 3.5 mg/mL, 약 3.75 mg/mL, 약 4 mg/mL, 약 4.25 mg/mL, 약 4.5 mg/mL, 약 4.75 mg/mL, 약 5, 약 5.25 mg/mL, 약 5.5 mg/mL, 약 5.75 mg/mL, 약 6 mg/mL, 약 6.25 mg/mL, 약 6.5 mg/mL, 약 6.75 mg/mL, 약 7, 약 7.25 mg/mL, 약 7.5 mg/mL, 약 7.75 mg/mL, 약 8 mg/mL, 약 8.25 mg/mL, 약 8.5 mg/mL, 약 8.75 mg/mL, 약 9, 약 9.25 mg/mL, 또는 약 9.5 mg/mL, 약 9.75 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 10.25 mg/mL, 또는 약 10.5 mg/mL이다.

[0085] 접합체 대비 인산분해효소의 임의의 적합한 배수 증가가 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체 대비 인산분해효소의 배수 증가는 약 2배 내지 약 500배이다. 일부 구현예에서, 접합체 대비 인산분해효소의 배수 증가는 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 45배, 또는 약 50배, 약 55배, 약 60배, 약 65배, 약 70배, 약 75배, 약 80배, 약 85배, 약 90배, 약 95배, 약 100배, 약 105배, 약 110배, 약 115배, 약 120배, 약 125배, 약 130배, 약 135배, 약 140배, 약 145배, 또는 약 150배, 약 155배, 약 160배, 약 165배, 약 170배, 약 175배, 약 180배, 약 185배, 약 190배, 약 195배, 약 200배, 약 225배, 약 250배, 약 275배, 약 300배, 약 325배, 또는 약 350배, 약 375배, 약 400배, 약 425배, 약 450배, 약 475배, 또는 약 500배이다.

[0086] 인산분해효소 대비 접합체의 임의의 적합한 배수 증가가 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 인산분해효소 대비 접합체의 배수 증가는 약 2배 내지 약 500배이다. 일부 구현예에서, 인산분해효소 대비 접합체의 배수 증가는 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 45배, 또는 약 50배, 약 55배, 약 60배, 약 65배, 약 70배, 약 75배, 약 80배, 약 85배, 약 90배, 약 95배, 약 100배, 약 105배, 약 110배, 약 115배, 약 120배, 약 125배, 약 130배, 약 135배, 약 140배, 약 145배, 또는 약 150배, 약 155배, 약 160배, 약 165배, 약 170배, 약 175배, 약 180배, 약 185배, 약 190배, 약 195배, 약 200배, 약 225배, 약 250배, 약 275배, 약 300배, 약 325배, 또는 약 350배, 약 375배, 약 400배, 약 425배, 약 450배, 약 475배, 또는 약 500배이다.

[0087] 임의의 적합한 농도의 인산분해효소가 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 인산분해효소의 농도는 약 0.5 μ M 내지 약 500 μ M이다. 일부 구현예에서, 인산분해효소의 농도는 약 0.5 μ M, 약 1 μ M, 약 2 μ M, 약 5 μ M, 약 10 μ M, 약 15 μ M, 약 20 μ M, 약 25 μ M, 약 30 μ M, 약 35 μ M, 약 40 μ M, 약 45 μ M, 약 50 μ M, 약 55 μ M, 약 60 μ M, 약 65 μ M, 약 70 μ M, 약 80 μ M, 약 85 μ M, 약 90 μ M, 약 95 μ M, 약 100 μ M, 약 105 μ M, 약 110 μ M, 약 115 μ M, 약 120 μ M, 약 125 μ M, 약 130 μ M, 약 135 μ M, 약 140 μ M, 약 145 μ M, 약 150 μ M, 약 155 μ M, 약 160 μ M, 약 165 μ M, 약 170 μ M, 약 180 μ M, 약 185 μ

M, 약 190 μ M, 약 195 μ M, 약 200 μ M, 약 225 μ M, 약 250 μ M, 약 275 μ M, 약 300 μ M, 약 325 μ M, 약 350 μ M, 약 375 μ M, 약 400 μ M, 약 425 μ M, 약 450 μ M, 약 475 μ M, 또는 약 500 μ M이다.

[0088] 비종결 비율

[0089] 일부 구현예에서, 단계적 핵산 합성 방법에서 인산분해효소가 존재하면, 비종결 및 단계당 두 개 이상의 뉴클레오타이드의 추가를 초래하는 프로세스가 감소한다. 본 명세서에 기재된 방법에서 생성된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 비종결 이벤트가 발생하는 경우 삽입을 포함하는 것으로 알려져 있다. 일부 구현예에서, 인산분해효소 존재하에서의 핵산 합성은 인산분해효소 부재하에서의 핵산 합성에 비해 비종결 비율을 약 50% 내지 약 100% 감소시킨다. 일부 구현예에서, 비종결 비율은 인산분해효소의 부재하에서의 핵산 합성에 비해 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 감소한다. 일부 구현예에서, 인산분해효소의 존재하에서 생성된 삽입이 있는 핵산 합성 생성물의 총량은 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 또는 약 0.01% 미만이다. 일부 구현예에서, 인산분해효소의 존재하에서 생성된 핵산 합성 생성물에는 삽입이 있는 핵산 합성 생성물이 존재하지 않는다.

[0090] 최종 생성물

[0091] 일부 구현예에서, 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계를 포함하는, 미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 합성 방법이 본 명세서에 개시된다. 일부 구현예에서, 접촉시키는 단계는 상기 접합체 시약을 상기 인산분해효소와 함께 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 생성물의 이중 집단을 생성한다. 미리 결정된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 생성물의 이중 집단은 "최종 생성물"로 지칭될 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 복수의 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 접합체 시약을 인산분해효소와 접촉시키는 단계는 뉴클레오타이드의 삽입(즉, 비종결)을 방지하여 이들 삽입이 미리 결정된 서열에 존재하지 않게 한다. 일부 구현예에서, 최종 생성물은 핵산을 포함하며, 그 중 일부는 표적 서열을 포함하고 일부는 표적 서열을 포함하지 않는다. 최종 생성물은 미리 결정된("표적") 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 비교하여, 미리 결정된 서열이 아닌(즉, "표적" 서열이 아닌) 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 약 99% 미만, 약 95% 미만, 약 90% 미만, 약 85% 미만, 약 80% 미만, 약 75% 미만, 약 70% 미만, 약 65% 미만, 약 60% 미만, 약 55% 미만, 약 50% 미만, 약 45% 미만, 약 40% 미만, 약 35% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05%, 또는 약 0.01% 미만으로 포함한다. 일부 구현예에서, 최종 생성물에는 미리 결정된("표적") 서열이 아닌 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 실질적으로 존재하지 않는다.

[0093] 최종 생성물 분석

[0094] 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 최종 생성물 분석에 사용할 수 있다. 최종 생성물은 신장 반응 개시 후 언제든지(예컨대, 반응 시간 경로) 핵산 합성 생성물을 분석하여 평가될 수 있다. 분석은 예를 들어, 이전에 입증된 모세관 전기영동법(CE)에 의해 수행될 수 있다(Smith 및 Nelson. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. Chapter 10: Unit 10.9. 2003; Durney 등 *Anal Bioanal Chem*. 407:6923-6938. 2015). CE는 단일 뉴클레오타이드 분해능으로 폴리뉴클레오타이드 생성물을 분리하고 존재비를 보고할 수 있다. 본 명세서에 제공된 핵산 합성 방법에 의해 생성된 각 핵산 생성물의 상대 존재비는 CE에 의해 분석될 수 있다. 출발 물질(즉, 뉴클레오타이드가 결합되고 있는 초기 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드)과 신장 생성물의 존재비를 비교함으로써 신장 반응이 완료되는 정도를 결정하는 것이 가능하다. 출발 물질과 신장된 종의 시간 경과에 따른 변화는 본 명세서에 기재된 바와 같이 교체 속도를 나타낸다. 교체 속도를 결정하기 위한 이러한 접근 방법은 이전에 입증된 바 있다(Palluk 등 *Nat Biotech*. 36(7):645-650. 2018). 또는, 핵산 합성 생성물의 분석은 종래 기재된 바와 같이 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 수행될 수 있다(Jensen 및 Davis. *Biochemistry*. 57(12):1821-1832. 2018).

[0095] CE 및 RP-HPLC는 각각 CE 및 RP-HPLC에 대한 전기영동도 및 크로마토그램의 피크에 대한 곡선하 면적을 측정하여 핵산 합성 생성물에서 각 종의 순도를 결정하는 데에도 사용될 수 있다. 곡선을 전기영동도 및 크로마토그램에 피팅하고 곡선하 면적(AUC)을 계산하는 데 적합한 임의의 적합한 소프트웨어 패키지를 사용하여 복수의 뉴클레오타이드 생성물 중 각 폴리뉴클레오타이드 생성물의 존재비를 결정할 수 있다.

[0096] 임의의 적합한 폴리뉴클레오타이드 서열분석 방법이 분석(예컨대 폴리뉴클레오타이드 생성물, 예컨대 중간 생성물,

예컨대 최종 생성물 등의 서열 분석)을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 서열분석 방법은 롱 리드 서열분석(long-read sequencing), 차세대 서열분석, 쇼트 리드 서열분석(short-read sequencing), 샷건 서열분석(shotgun sequencing), 생어 서열분석(sanger sequencing), 고처리량 서열분석, 합성에 의한 서열분석, 부착(ligation)에 의한 서열분석, 혼성화에 의한 서열분석, 및/또는 질량분석법에 의한 서열분석일 수 있다. 서열분석은 최종 생성물에서 미리 정의된 서열을 식별하는 데 적합할 수 있다. 서열분석은 최종 생성물에서 사전 정의된 서열이 아닌 서열의 비율을 결정하는 데 적합할 수 있다.

[0097] 최종 생성물의 크기 분석을 위한 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 최종 생성물의 순도를 결정할 수 있다. 예를 들어, 겔 전기영동 및/또는 질량 분석법을 사용하여 최종 생성물의 순도를 결정할 수 있다.

[0098] 접합체

[0099] 중합효소에 부착된 뉴클레오타이드를 포함하는 접합체를 포함하는 조성물이 본 명세서에 개시되며, 상기 조성물의 연결된 중합효소에 의해 보호되는 뉴클레오타이드의 순도는 상기 조성물의 총 뉴클레오타이드 대비 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 99.5%, 또는 약 99.9% 초과인 보호된 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 연결된 중합효소에 의해 보호된 뉴클레오타이드의 순도는 실질적으로 불순물을 함유하지 않는다.

[0100] 접합체를 사용한 핵산 합성 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 접합체는 중합효소 및 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 중합효소와 뉴클레오타이드는 링커를 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 선택적으로 절단 가능한 연결을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드이다. 링커는 뉴클레오타이드(예를 들어, 야생형 뉴클레오타이드, 예컨대 야생형 뉴클레오타이드에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는 변형된 뉴클레오타이드 등)의 염기, 당 또는 인산기에 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체이다. 접합체의 중합효소 모이어티는 연결된 뉴클레오타이드를 추가하여 핵산을 신장시킬 수 있으며(즉, 상기 중합효소는 핵산의 3' 말단에 결합되는 뉴클레오타이드의 부착을 촉매할 수 있음), 링커가 절단될 때까지 링커를 통해 신장된 핵산에 부착된 상태로 유지된다.

[0101] 일부 구현예에서, 상기 중합효소와 뉴클레오타이드는 공유결합으로 연결되며, 상기 뉴클레오타이드의 연결된 원자와 이것이 부착된 중합효소 사이의 거리는 예를 들어, 약 4 내지 100 Å, 약 15 내지 40 Å 또는 약 20 내지 30 Å, 또는 상기 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체가 계속되는 TdT 변형체상의 위치로 적합한 거리일 수 있다.

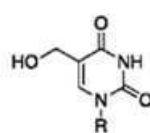
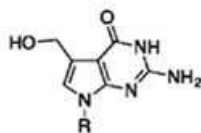
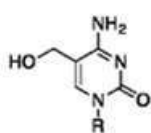
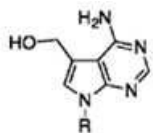
[0102] 중합효소 및 뉴클레오타이드를 포함하는 접합체를 핵산과 함께 배양하는 경우, 상기 접합체는 바람직하게는 (다른 접합체 분자의 뉴클레오타이드를 사용하지 않고) 그것에 계속된 뉴클레오타이드를 사용하여 핵산을 신장시킨다.

[0103] 링커-뉴클레오타이드 부착

[0104] 일부 구현예에서, 본 발명의 링커는 피리미딘의 "5" 위치 또는 7-테아자퓨린의 "7" 위치에 부착된다. 다른 구현예에서, 상기 링커는 예컨대, 후술하는 바와 같이 니트로벤질 모이어티로 시토신의 고리 외 아민을 N-알킬화함으로써 핵염기의 고리 외 아민에 부착될 수 있다. 상기 링커는 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 바와 같이, 뉴클레오타이드의 임의의 적합한 원자, 예컨대 뉴클레오타이드의 인산기, 당 또는 염기에 부착되어 접합체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 추가된 후에도 중합효소가 뉴클레오타이드에 부착된 상태로 유지되도록 뉴클레오타이드의 알파-인산기, 당 또는 염기에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 뉴클레오타이드의 β -인산기, χ -인산기, δ -인산기, ε -인산기, ϕ -인산기, 또는 γ -인산기에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 뉴클레오타이드의 말단 인산기에 부착된다.

[0105] 특정 중합효소는 뉴클레오타이드의 특정 부분의 변형에 대해 높은 내성을 가진다. 예를 들어, 일부 중합효소는 피리미딘의 5-위치 및 퓨린의 7-위치의 변형에 대해 내성이 양호하다(He 및 Seela, Nucleic Acids Research 30.24 (2002): 5485-5496.; 또는 Hottin 등, Chemistry. 2017 Feb 10;23(9):2109-2118). 일부 구현예에서, 상기 링커는 이들 위치에 부착된다.

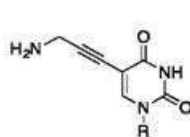
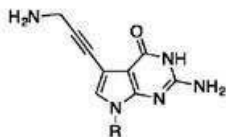
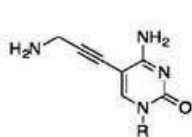
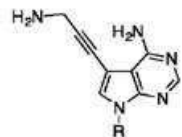
[0106] 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 먼저 링커와 뉴클레오타이드를 포함하는 중간체 화합물(본 명세서에서 "링커-뉴클레오타이드"로 지칭됨)을 합성함으로써 제조되며, 상기 중간체 화합물이 상기 중합효소에 부착된다. 비제한적인 예로서, 일부 구현예에서, 천연 뉴클레오타이드와 비교하여 치환된 뉴클레오타이드, 예컨대 5-히드록시메틸 또는 5-프로파르길아미노 치환기를 가진 피리미딘, 또는 7-히드록시메틸 또는 7-프로파르길아미노 치환기를 가진 7-테아자퓨린은 링커-뉴클레오타이드를 제조하기 위한 유용한 출발 물질일 수 있다. 링커-뉴클레오타이드의 제조에 유용할 수 있는 5- 및 7-히드록시메틸 치환기를 가진 예시적인 뉴클레오타이드의 세트는 아래와 같다.



[0107]

[0108]

링커-뉴클레오타이드의 제조에 유용할 수 있는 5- 및 7-데아자-7-프로파르길아미노 치환기를 가진 예시적인 뉴클레오타이드의 세트는 아래와 같다.



[0109]

[0110]

이들 뉴클레오타이드는 또한 데옥시리보뉴클레오타이드 삼인산으로 시판된다.

[0111]

일부 구현예에서, (예컨대, 중간체 화합물을 포함하는) 제조 방법에서, 상기 접합체는 링커-뉴클레오타이드를 포함한다. 임의의 적합한 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 다인산기 또는 변형된 뉴클레오타이드 다인산기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 삼인산기 또는 변형된 뉴클레오타이드 삼인산기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 사인산기 또는 변형된 뉴클레오타이드 사인산기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 오인산기 또는 변형된 뉴클레오타이드 오인산기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 육인산기 또는 변형된 뉴클레오타이드 육인산기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커-뉴클레오타이드는 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 변형된 핵염기는 O- 또는 N-결합 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형은 상기 링커-뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 부분이 폴리뉴클레오타이드에 결합된 후 제거 가능하다. 일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형은 광분해에 의한 방법에 의해 제거 가능하다. 일부 구현예에서, 상기 광분해에 의한 방법은 UV 광에 대한 노출을 포함하며, 상기 UV 광은 365 nm 및/또는 405 nm의 파장을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형은 화학적 방법에 의해 제거 가능하다. 일부 구현예에서, 상기 화학적 방법은 베타 제거 반응, Pd 촉매에 의한 탈알릴화, 및 환원 반응으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형은 효소에 의한 방법에 의해 제거 가능하다. 일부 구현예에서, 상기 효소에 의한 방법은 알킬전이효소 또는 메틸전이효소에 의한 제거를 포함한다.

[0112]

일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형은 상기 변형된 핵염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에서의 왓슨-크릭 염기쌍 형성을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형은 상기 변형된 핵염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 내의 이차 구조를 감소시키거나 제거한다. 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 O- 또는 N-결합 변형의 제거 후, 상기 변형된 핵염기는 천연 핵염기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 천연 핵염기는 구아닌, 시토신, 아데닌, 티민, 또는 우라실이다.

[0113]

링커-중합효소 부착

[0114]

본 명세서에 제공된 접합체는 링커를 통해 뉴클레오타이드에 결속된 중합효소를 포함한다.

[0115]

본 명세서에 기재된 방법에 사용하기 위한, 뉴클레오타이드를 중합효소에 결속시키기 위한 임의의 적합한 링커가 고려된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 술포하이드릴기 특이적 부착 화합물질을 사용하여 상기 중합효소의 시스테인 잔기에 특이적으로 부착된다. 예시적인 술포하이드릴기 특이적 부착 화합물질은 특정 아미노산 서열로 둘러싸인 술포하이드릴과 유리하게 반응할 수 있는, 오르토-피리딜 이황화물(OPSS), 말레이미드 작용기, 3-아릴프로피올로니트릴 작용기, 알렌아미드 작용기, 할로아세틸 작용기(예컨대, 요오도아세틸 또는 브로모아세틸), 알킬 할로겐화물 또는 퍼플루오아릴기를 포함하되, 이로 제한되지는 않는다(Zhang, Chi, 등 Nature chemistry 8, (2015) 120-128.). 시스테인 잔기의 특이적 표지를 위한 다른 부착 화합물질은 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이며, 관련 문헌 및 교재에 기재되어 있다(예컨대, Kim, Younggyu, 등 Bioconjugate chemistry 19.3 (2008): 786-791.).

[0116]

일부 구현예에서, 상기 링커는 아민 반응성 작용기를 통해 리신 잔기에 부착된다(예컨대, NHS 에스테르, 술포-NHS 에스테르, 테트라 또는 펜타플루오로페닐 에스테르, 이소티오시아네이트, 술폰일 클로라이드 등). 일부 구현예에서, 상기 링커는 유전적으로 삽입된 비천연 아미노산, 예컨대 아지드-알킨 Huisgen 부가환화를 거쳤을 수

있는 p-프로파르길옥시페닐알라닌 또는 p-아지도페닐알라닌에 부착됨으로써 중합효소에 부착되지만, 부위 특이적 표지에 적합한 많은 비천연 아미노산이 있으며 문헌에서 찾을 수 있다(예컨대, Lang 및 Chin., Chemical reviews 114.9 (2014): 4764-4806.에 기재된 바와 같음).

[0117] 일부 구현예에서, 상기 링커는 상기 중합효소 N-말단에 특이적으로 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 갖도록 돌연변이되며, 이는 특이적으로 산화되어 예컨대, 히드라지드에 대한 후속 결합을 위한 N-말단 알데히드를 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 티아졸리딘을 형성하기 위해 알데히드로 특이적으로 표지될 수 있는 N-말단 시스테인 잔기를 갖도록 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 상기 N-말단 시스테인 잔기는 Native Chemical Ligation을 통해 펩티드 링커로 표지될 수 있다.

[0118] 일부 구현예에서, 예컨대 비오틴 리가제, 트랜스글루타미나제, 리포산 리가제, 박테리아 소르타제 및 포스포판테테이닐 전이효소를 사용하여 문헌에서 입증된 바와 같이, 효소에 의해 합성기로 특이적으로 표지될 수 있는 펩티드 태그 서열이 상기 중합효소에 삽입될 수 있다(예컨대, Stephanopoulos 및 Francis Nat. Chem. Biol. 7, (2011) 876-884의 refs. 74-78에 기재된 바와 같음).

[0119] 일부 구현예에서, 상기 링커는 중합효소에 융합된 표지 도메인에 부착된다. 예를 들어, 상응하는 반응성 모이어티를 가진 링커를 사용하여 SNAP 태그, CLIP 태그, HaloTags 및 아실 운반 단백질 도메인을 공유결합으로 표지할 수 있다(예컨대, Stephanopoulos 및 Francis Nat. Chem. Biol. 7, (2011) 876-884의 refs. 79-82에 기재된 바와 같음).

[0120] 일부 구현예에서, 상기 링커는 Carrico 등(Nat. Chem. Biol. 3, (2007) 321 - 322)에 기재된 바와 같이, 중합효소 내에서 특이적으로 생성된 알데히드에 부착된다. 예를 들어, 포르밀글리신 생성 효소(FGE)라는 효소에 의해 인식되는 아미노산 서열을 상기 중합효소에 삽입하면 이는 FGE에 노출될 수 있으며, 인식 서열의 시스테인 잔기가 특이적으로 포르밀글리신으로 변환(즉, 알데히드 생성)된다. 그러면 이 알데히드는 예컨대, 링커의 히드라지드 또는 아미노옥시 모이어티로 특이적으로 표지될 수 있다.

[0121] 일부 구현예에서, 링커는 상기 중합효소에 융합된 모이어티와 링커 모이어티의 비공유 결합을 통해 상기 중합효소에 부착될 수 있다. 이러한 부착 전략의 예로는 링커의 비오틴 모이어티에 결합할 수 있는 스트렙타비딘에 중합효소를 융합시키는 것, 또는 링커의 디코시게닌 모이어티에 결합할 수 있는 항디코시게닌에 중합효소를 융합시키는 것 등이 있다. 부위 특이적 표지는 쉽게 되돌릴 수 있는 상기 중합효소에 대한 상기 링커의 부착으로 이어질 수 있으며(예를 들어, 환원제, 예컨대 TCEP를 사용하여 절단될 수 있는 시스테인과의 이황화 결합을 형성하는 오르토퍼리딜 디설파이드(OPSS)기), 다른 부착 화학물질은 영구적인 부착을 생성한다.

[0122] 일부 구현예에서, 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 바와 같이, 상기 중합효소는 결속된 뉴클레오티드가 상기 중합효소의 특정 위치에 특이적으로 부착되는 것을 보장하기 위해 돌연변이된다. 예를 들어, 말레이미드 또는 오르토퍼리딜 디설파이드와 같은 술포하이드릴 특이적 부착 화학물질을 사용하면 야생형 중합효소의 접근 가능한 시스테인 잔기가 비시스테인 잔기로 돌연변이되어 해당 위치에서 표지되는 것을 방지할 수 있다. 이러한 "반응성 시스테인이 없는" 환경에서, 시스테인 잔기가 원하는 부착 위치에 돌연변이에 의해 도입될 수 있다. 이들 돌연변이는 바람직하게는 상기 중합효소의 활성을 방해하지 않는다.

[0123] 단백질에 대한 합성기의 부위 특이적 부착을 위한 다른 전략은 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이며 문헌에서 검토된다(예컨대, Stephanopoulos & Francis Nat. Chem. Biol. 7, (2011) 876-884).

[0124] 보호

[0125] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서, 중합효소(예컨대, 주형 비의존성 중합효소)는 추가된 뉴클레오티드에 대한 연결의 절단을 유발하는 어떤 자극에 노출될 때까지 추가된 뉴클레오티드에 대한 결속을 통해 핵산에 부착된 상태로 유지된다. 이러한 상황에서, 중합효소-뉴클레오티드 접합체에 의한 추가 신장은 1) 부착된 중합효소 분자가 다른 접합체가 신장된 DNA 분자의 3' OH에 접근하는 것을 방해하는 경우, 및 2) 시스템의 다른 뉴클레오티드가 신장된 핵산의 3' 말단에 부착된 채로 남아 있는 중합효소의 촉매 부위에 접근하지 못하도록 방해 받는 경우에 방해를 받는다(즉, 뉴클레오티드가 "보호"된다). (보호의 정도는 이들 상호작용이 모두 방해를 받는 정도로 설명될 수 있다.) 후속 신장을 가능하게 하기 위해, 결합된 뉴클레오티드를 중합효소에 결속하는 링커를 절단하여 핵산에서 중합효소를 분리하고, 따라서 후속 신장을 위해 이의 3' OH 기를 다시 노출시킬 수 있다.

[0126] 보호를 사용하는 일부 구현예에서, 해당 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 바와 같이, 상기 링커

는 핵염기, 당 또는 α -인산기의 임의의 원자에 부착될 수 있다.

- [0127] 종결을 달성하기 위해 보호 효과를 사용하는 본 명세서에 제공된 핵산 합성 방법은 바람직하게는 유리(즉, 결속되지 않은) 뉴클레오시드 삼인산의 부재하에 핵산이 접합체에 노출되는 신장 단계를 포함하는데, 이는 보호의 종결 기전이 핵산에 대한 이들의 결합을 막지 않을 수 있기 때문이다.
- [0128] 일부 구현예에서, 추가 신장의 종결은 "완전"할 수 있으며, 이는 핵산 분자가 접합체에 의해 신장된 후, 상기 반응 중에는 추가적인 신장이 발생할 수 없음을 의미한다. 다른 구현예에서, 추가 신장의 종결은 "불완전"할 수 있으며, 이는 상기 반응 중에 추가 신장이 발생할 수 있지만 초기 신장에 비해 실질적으로 감소된 속도, *예컨대* 100배, 1000배, 10,000배, 또는 그보다 느린 속도로 발생할 수 있음을 의미한다. 불완전한 종결을 달성하는 접합체는 적절한 시간 후 반응이 중단된 경우, (*예컨대*, 핵산 합성 및 서열분석을 위한 방법에서) 핵산을 주로 단일 뉴클레오타이드만큼 신장시키는 데에 여전히 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체를 함유하는 시약은 결속된 뉴클레오타이드가 없는 중합효소를 추가로 함유할 수 있지만, 상기 혼합물에는 유리 dNTP가 없기 때문에 이들 중합효소는 상기 반응에 유의한 영향을 미치지 않을 것이다.
- [0129] 종결을 달성하기 위해 보호 효과를 사용하는 접합체 기반 시약은 바람직하게는 모든 중합효소가 활성 형태로 접힌 상태로 유지되는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체만 함유한다. 일부 경우에, 접합체의 중합효소 모이어티가 풀리면 이의 결속된 뉴클레오타이드가 다른 접합체 분자의 중합효소 모이어티에 더 쉽게 접근할 수 있게 될 수 있다. 이러한 경우, 보호되지 않은 뉴클레오타이드는 다른 접합체 분자에 의해 더 쉽게 결합되어 종결 기전을 회피할 수 있다.
- [0130] 종결을 달성하기 위해 차폐 효과를 사용하는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 바람직하게는 단일 뉴클레오타이드 부분으로만 표지된다. 촉매 부위에 접근할 수 있는 다수의 뉴클레오타이드로 표지된 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 경우에 따라 다수의 뉴클레오타이드를 동일한 핵산에 결합시킬 수 있다. 따라서 추가적으로 결속된 뉴클레오타이드는 반응 중에 원치 않는 뉴클레오타이드가 핵산에 추가로 결합되게 할 수 있다. 또한, 한 번에 하나의 결속된 뉴클레오타이드만이 중합효소의 (문혀 있는) 촉매 부위를 점유할 수 있으므로, 후술하는 바와 같이 다른 결속된 뉴클레오타이드(들)는 다른 접합체 분자의 중합효소 모이어티에 대한 접근성이 증가할 수 있다.
- [0131] 종결을 달성하기 위해 보호 효과를 사용하는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 바람직하게는 뉴클레오타이드의 핵산에 대한 빠른 결합을 가능하게 하기 위해 뉴클레오타이드가 생산적 입체 형태로 이의 결속된 중합효소 분자의 촉매 부위에 자주 접근할 수 있도록 하는 가능한 한 짧은 링커를 포함한다. 이러한 접합체는 또한 바람직하게는 중합효소에 대한 링커의 가능한 한 촉매 부위에 가까운 부착 위치를 사용하여 더 짧은 링커의 사용을 가능하게 할 수 있다. 상기 링커의 길이는 결속된 뉴클레오타이드 또는 결속된 핵산이 도달할 수 있는 부착 지점으로부터의 최대 거리를 결정한다. 후술하는 바와 같이 거리가 더 짧을수록 다른 중합효소-뉴클레오타이드 분자에 대한 결속된 모이어티의 접근성이 감소할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커의 길이는 대략 24 및 28 Å이다. *예를 들어*, 길이가 8 내지 15 Å인 짧은 링커는 보호를 증가시킬 수 있는 반면, 더 긴 링커(*예컨대*, 50 Å, 70 Å 또는 100 Å보다 긴 링커)는 보호를 감소시킬 수 있다. 상기 보호 효과는 상기 중합효소의 구조, 상기 링커의 길이, 상기 링커의 구조, 상기 중합효소에 대한 상기 링커의 부착 위치, 상기 중합효소의 촉매 부위에 대한 상기 뉴클레오타이드의 결합 친화성, 상기 중합효소에 대한 상기 핵산의 결합 친화성, 상기 중합효소의 바람직한 입체 형태, 및 상기 링커의 바람직한 입체 형태를 포함하되 이로 제한되지 않는 인자들의 조합에 의해 영향을 받을 수 있다.
- [0132] 보호에 대한 한 가지 기여는 접합체에 의해 신장된 핵산의 3' OH가 다른 접합체의 중합효소 모이어티의 촉매 부위에 도달하는 것을 차단하는 입체 효과일 수 있다. 입체 효과는 또한 이러한 접근 중에 발생할 수 있는 접합체 간의 충돌로 인해 결속된 뉴클레오타이드가 다른 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 분자의 촉매 부위에 도달하는 것을 방해할 수 있다. 이러한 입체 효과는 그것이 한 접합체 분자의 결속된 뉴클레오타이드(또는 신장된 핵산)와 다른 접합체 분자 사이의 생산적 상호작용을 완전히 차단하는 경우 완전한 종결을 달성할 수 있으며, 이러한 분자간 상호작용만을 방해하는 경우 불완전한 종결을 야기할 수 있다.
- [0133] 보호에 대한 또 다른 기여는 중합효소의 촉매 부위에 대한 결속된 뉴클레오타이드의 결합 친화성으로부터 발생한다. 접합체의 결속된 뉴클레오타이드는 결속된 중합효소의 촉매 부위에 대해 높은 유효 농도를 가지므로 대부분의 시간 동안 해당 부위에 결합된 상태로 유지될 수 있다. 상기 뉴클레오타이드가 이의 결속된 중합효소 분자의 촉매 부위에 결합되면 다른 중합효소 분자에 의한 결합에 사용될 수 없다. 따라서, 결속은 분자간 결합(즉, 뉴클레오타이드가 결속되지 않은 중합효소 분자에 의해 촉매되는 결합)에 사용 가능한 뉴클레오타이드의 유효 농도를 감소시킨다. 이러한 보호 효과는 한 접합체 분자의 뉴클레오타이드 모이어티를 사용하여 다른 접합체 분자의 중합효소

모이어티에 의해 핵산이 신장되는 속도를 감소시킴으로써 종결을 향상시킬 수 있다.

[0134] 보호에 대한 또 다른 기여는 중합효소 분자의 촉매 부위에 대한 핵산 분자의 3' 영역의 결합 친화성으로부터 발생한다. 접합체에 의한 신장 후, 상기 핵산은 3' 말단 뉴클레오타이드를 통해 접합체에 결속되고, 이의 결속된 중합효소의 촉매 부위에 대해 높은 유효 농도를 가지게 되므로 대부분의 시간 동안 해당 부위에 결합된 상태로 유지될 수 있다. 상기 핵산이 이의 결속된 중합효소 분자의 촉매 부위에 결합되면 다른 접합체 분자에 의한 신장에 사용될 수 없다. 이러한 효과는 한 접합체에 의해 신장된 핵산이 다른 접합체 분자에 의해 추가로 신장되는 속도를 감소시킴으로써 종결을 향상시킬 수 있다.

[0135] 일부 구현예에서, 상기 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 결속된 뉴클레오타이드(또는 신장 후 결속된 핵산)가 다른 접합체 분자의 촉매 부위에 접근하는 것을 입체적으로 방해하는 추가 모이어티를 포함한다. 이러한 모이어티에는 중합효소의 루프에 삽입될 수 있는 폴리펩티드 또는 단백질 도메인, 및 *예컨대*, 삽입된 비천연 아미노산 또는 특정 폴리펩티드 태그에 부위 특이적으로 접합될 수 있는 중합체와 같은 해당 및 기타 부피가 큰 분자가 포함된다.

[0136] 중합효소

[0137] 전술한 바와 같이, 중합효소(*예컨대*, 주형 비의존성 중합효소)와 뉴클레오타이드를 포함하는 접합체가 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드와 함께 배양되는 경우, 이는 바람직하게는 (다른 접합체 분자의 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 사용하지 않고) 결속된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드를 상기 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드에 결합함으로써 상기 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 신장(즉, 연장)시킨다. 일부 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 중합효소는 활성 입체 형태로 접혀 있다. 다른 구현예에서, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 중합효소는 풀려 있다.

[0138] 폴리뉴클레오타이드를 신장시키거나, 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드에 결합하거나, 뉴클레오타이드 유사체를 폴리뉴클레오타이드에 결합할 수 있는 임의의 중합효소가 본 명세서에 기재된 방법에 사용되기 위해 상정된다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥이다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체상에 고정화된다.

[0139] DNA 합성 용도의 경우, 특히 주형 비의존성 중합효소, *예컨대* 말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소(TdT) 또는 DNA 뉴클레오타이드 외부전이효소(이들 용어는 E.C. 등급 2.7.7.31에 대해 기재된 활성을 갖는 효소를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용됨)가 사용될 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 주형 비의존성 중합효소를 포함하는 접합체를 사용한다. 일부 구현예에서, 접합체는 Pol-X 계열 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 접합체는 중합효소 말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소(TdT), 또는 이의 변형체(*예컨대*, 비야생형 TdT, *예컨대* 변형된 TdT)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 주형 비의존성 중합효소는 TdT 또는 이의 변형체(즉, 변형된 TdT)이다. 일부 구현예에서, 상기 TdT 또는 이의 변형체는 서열 번호 1에 대하여 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 공유하는 서열을 포함한다. 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 TdT는 서열 번호 1과 동일한 서열 또는 이의 일부를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 TdT는 특정 TdT의 일부(*예컨대*, 서열 번호 1의 일부, *예컨대*, 서열 번호 1의 일부 등)와 동일한 서열을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 주어진 TdT는 서열 번호 1에 기재된 것과 같은 특정 TdT의 길이를 기준으로 절단될 수 있다. 일부 구현예에서, TdT는 서열 번호 1의 순열 변환 단백질(circular permutation)일 수 있다. 일부 구현예에서, TdT 변형체는 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 결실을 포함하고/하거나, 기준 TdT(*예컨대*, 야생형 TdT, 변형된 TdT 등)에 대한 이의 순열 변환 단백질이다.

[0141] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 중합효소는 융합 단백질이다. 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 융합 단백질은 말토스 결합 단백질(MBP)을 포함한다.

[0142] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 TdT 또는 그 변형체는 공유 또는 비공유 결합; 아미노산 태그(*예컨대*, 폴리 아미노산 태그, 폴리 His 태그, 6His 태그(서열 번호 8)); 화학 화합물(*예컨대*, 폴리에틸렌 글리콜); 단백질-단백질 결합 쌍(*예컨대*, 비오틴-아비딘); 친화성 결합; 캡처 프로브; 또는 이들의 조합을 포함하는 링커 모이어티에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 상기 링커 모이어티는 TdT 변형체로부터 분리되거나 그 일부일 수 있다.

[0143] >말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소(TdT)

[0144] MGGRDIVDGSEFSPSPVPGSQNPAPAVKKISQYACQRRTTLNNYNQLFTDALDILAENDELRENEGSALAFMRASSVLKSLFPFITSMKDTGIPSLGDKV

KSI IEG I IEDGESSEAKAVLNDERYKSFKLFTSVFGVGLKTAEKWFRMGFRTLSKIQSDKSLRFTQMQKAGFLYYEDLVSCVNRPEAEAVSMLVKEAVVTFL
PDALVTMTGGFRRGKMTGHDVDFLITSPEATEDEEQQLHKVTDWFQKQLLYADILESTFEKFKQPSRKVDALDHFQKCFLLKLDHGRVHSEKSGQQEG
KGWKAIRVDLVMSPYDRRAFALLGWTGSRQFERDLRRYATHERKMMLDNHALYDRTKRVFLEAESEEEIFAHGLGLDYIEPWERN(서열 번호 1)

[0145] 단일 가닥 핵산을 신장시킬 수 있는 능력이 있는 중합효소의 예시적인 예는 Polymerase Theta(Kent 등, eLife 5 (2016): e13740.), polymerase mu(Juarez 등, Nucleic acids research 34.16 (2006): 4572-4582.; 또는 McElhinny 등, Molecular cell 19.3 (2005): 357-366.), 또는 예컨대, 주형 비의존성 중합효소 요소의 삽입에 의해 주형 비의존성 활성이 유도되는 중합효소(Juarez 등, Nucleic acids research 34.16 (2006): 4572-4582)를 포함하되, 이로 제한되지 않는다. 다른 DNA 합성 응용에서, 상기 중합효소는 주형 의존성 중합효소, 즉 DNA 지시 DNA 중합효소(이 용어는 IUBMB 명명법을 사용하여 활성 2.7.7.7을 가진 효소를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용됨)일 수 있다.

[0146] RNA 합성 응용과 같은 일부 구현예에서, 결속된 리보뉴클레오티드가 사용될 수 있다. 이러한 일부 구현예에서, 특히 *E. coli* Poly(A) Polymerase(IUBMB EC 2.7.7.19) 또는 Poly(U) Polymerase와 같은 RNA 특이적 뉴클레오티드 전이효소가 사용될 수 있다. 상기 RNA 뉴클레오티드 전이효소는 특정 rNTP에 대한 기질 특이성에 영향을 미치는 변형, 예컨대 단일 점 돌연변이를 포함할 수 있다(Lunde 등, Nucleic acid Research 40.19 (2012): 9815-9824.). 일부 구현예에서, RNA 뉴클레오티드 전이효소와 리보뉴클레오티드 간의 매우 짧은 결속이 높은 유효 농도의 뉴클레오티드 전이효소를 유도하여 뉴클레오티드 전이효소의 천연 기질이 아닐 수 있는 rNTP의 결합을 강제하는 데 사용될 수 있다.

[0147] 링커

[0148] 일부 구현예에서, 링커를 포함하는 본 개시의 접합체에서, 상기 링커는 뉴클레오티드를 중합효소에 연결하는 원자를 포함한다. 상기 링커는 상기 중합효소에 대한 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드의 염기, 당, 또는 α -인산기에 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 중합효소와 뉴클레오티드는 공유결합으로 연결되며, 상기 뉴클레오티드의 연결된 원자와 이것이 부착된 중합효소 사이의 거리는 예를 들어, 약 4 내지 100 Å, 약 15 내지 40 Å 또는 약 20 내지 30 Å, 또는 상기 뉴클레오티드가 결속되는 중합효소상의 위치로 적합한 거리일 수 있다. 상기 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 중합효소에 결속하기 위한 임의의 적합한 링커가 본 명세서에 기재된 방법에서 고려된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 폴리에테르 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 하나 이상의 펩티드 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 하나 이상의 사르코신을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 하나 이상의 글리신을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 하나 이상의 프롤린을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 카르바메이트를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 염기쌍 형성에 관여하지 않는 핵염기의 원자에서 상기 뉴클레오티드에 결합된다. 이러한 구현예에서, 상기 링커는 적어도 상기 중합효소를 상기 당의 Γ 위치에 결합된 단환 고리 또는 다환 고리 시스템(예컨대, 피리미딘 또는 퓨린 또는 7-데아자퓨린 또는 8-아자-7-데아자퓨린)의 임의의 원자에 연결하는 원자인 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 염기쌍 형성에 관여하는 핵염기의 원자에서 상기 뉴클레오티드에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 상기 뉴클레오티드의 당 또는 α -인산기에 결합된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 상기 뉴클레오티드가 결속되는 중합효소의 활성 부위에 접근할 수 있을 정도로 충분히 길다. 본 명세서에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 접합체의 중합효소는 이것이 연결되는 뉴클레오티드가 핵산의 3' 말단에 추가되는 것을 촉매할 수 있다.

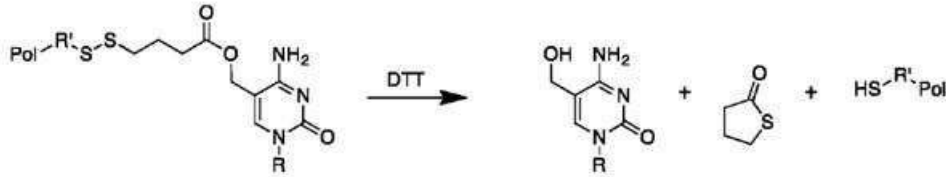
[0149] 링커의 절단

[0150] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 링커는 (예컨대, 본 개시의 접합체의) 뉴클레오티드상의 다양한 위치에 부착될 수 있으며, 다양한 절단 전략이 사용될 수 있다. 절단 전략은 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드와 중합효소를 연결하는 링커의 유형에 따라 결정되는 것으로 이해된다. 링커를 절단하기 위한 임의의 적합한 방법이 본 명세서에 기재된 방법에서 고려된다.

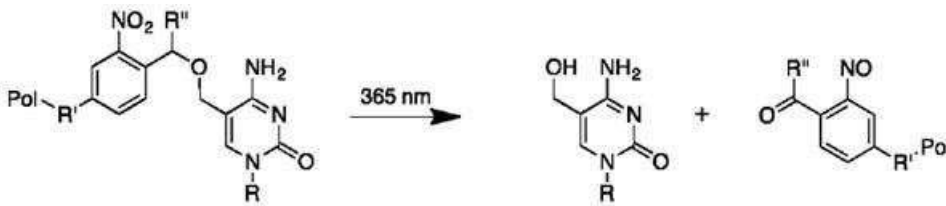
[0151] 일부 구현예에서, 상기 링커는 절단되며, 상기 링커의 절단 후 상기 링커의 잔류 부분의 화학기를 포함하는 뉴클레오티드(즉, 후터)가 형성된다. 예시적이고 비제한적인 링커 절단 후의 화학기(즉, 후터)가 아래에 나와 있다. 일부 실시예에서, 상기 화학기는 화학적 방법, 광분해에 의한 방법, 또는 효소에 의한 방법으로 제거된다.

[0152] 일부 구현예에서, 상기 링커는 임의의 적절한 환원제, 예컨대 디티오프레이톨(DTT), β -메르캅토에탄올, 또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)에 노출시킴으로써 절단될 수 있다. 예를 들어, 피리미딘의 5번 위치 또는 7-데아자퓨린의 7번 위치에 부착된 4-(디술폰닐)부타노일옥시-메틸기를 포함하는 링커는 환원제(예컨대, DTT)에

의해 절단되어 핵염기상에 4-메르캅토부타노일옥시메틸 흉터를 생성할 수 있다. 이 흉터는 2-옥소티올란을 제거하기 위해 분자 내 티오라톤화를 거쳐 핵염기에 더 작은 하이드록시메틸 흉터를 남길 수 있다. 시토신의 5번 위치에 부착된 이러한 링커의 예가 아래에 기재되어 있으나, 이 전략은 임의의 적합한 핵염기에 적용 가능하다.

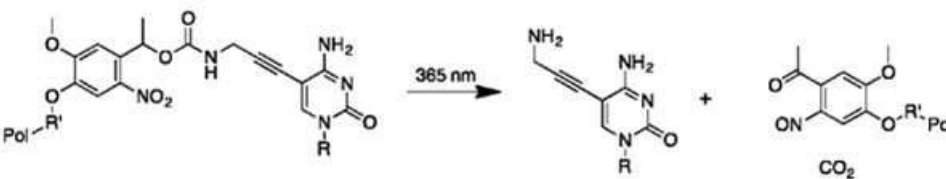


다른 구현예에서, 상기 링커는 광 노출에 의해 절단될 수 있다. 예를 들어, (2-니트로벤질)옥시메틸기를 포함하는 링커는 365 nm 광으로 절단되어 예컨대, 아래 시토신에 대해 도시된 바와 같이 하이드록시메틸 흉터를 남길 수 있으나, 이 전략은 임의의 적합한 핵염기에 적용 가능하다.

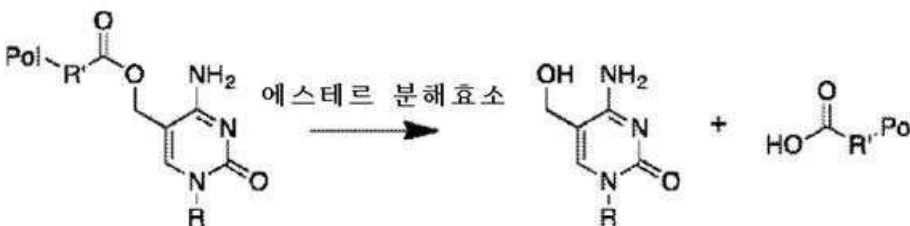


(여기서, 예컨대, R'' = H 또는 R'' = CH₃ 또는 R' = i-Bu이다.)

다른 구현예에서, 상기 링커는 365 nm 광으로 절단되어 프로파르길아미노 흉터가 있는 핵염기를 방출할 수 있는 3-(((2-니트로벤질)옥시)카르보닐)아미노프로피닐기를 포함할 수 있다. 이 전략은 임의의 적합한 핵염기에 적용 가능하다.



다른 구현예에서, 상기 링커는 예를 들어, 하기 시토신에 대해 도시된 바와 같이, 적합한 에스테르 분해효소로 절단되어 하이드록시메틸 흉터가 있는 핵염기를 방출할 수 있는 아실옥시메틸기를 포함할 수 있으나, 이 전략은 임의의 적합한 핵염기에 적용 가능하다.



이러한 구현예에서, 상기 링커는 에스테르 결합에 대한 에스테르 분해효소의 활성을 증가시키는, 에스테르에 인접한 추가 원자(상기 R'에 포함됨)를 포함할 수 있다.

다른 구현예에서, 상기 링커는 예를 들어, 하기 5-프로파르길아미노 시토신에 대해 도시된 바와 같이, 펩티드 분해효소로 절단되어 프로파르길아미노 흉터가 있는 핵염기를 방출할 수 있는 N-아실-아미노프로피닐기를 포함할 수 있으나, 이 전략은 임의의 적합한 핵염기에 적용 가능하다.



[0163]

[0164]

이러한 구현예에서, 상기 링커는 아미드 결합에 대한 펩티드 분해효소의 활성을 증가시키는, 아미드에 인접한 추가 원자(상기 R'에 포함됨)를 포함할 수 있다.

[0165]

균등물 및 범위

[0166]

당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상적인 실험만으로도 본 명세서에 제공된 기술에 따른 특정 구현예의 많은 균등물을 인식하거나 알아낼 수 있을 것이다. 본 개시의 범위는 본 명세서의 개시로 제한되는 것이 아니라, 첨부된 특허청구범위에 기재된 바와 같다.

[0167]

특허청구범위에서, 관사(예컨대 "a," "an," 및 "the")는 상반되게 지시되거나 문맥상 명백하게 다르지 않는 한, 하나 또는 둘 이상을 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성요소 간에 “또는”을 포함하는 청구항 또는 설명은 상반되게 지시되거나 문맥상 명백하게 다르지 않는 한, 하나, 둘 이상 또는 모든 군의 구성요소가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이에 이용되거나 또는 달리 이와 관련된다는 것을 만족시키는 것으로 간주된다. 본 개시는 상기 군의 정확히 하나의 구성요소가 소정의 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이에 사용되거나, 달리 이들과 관련되는 구현예를 포함한다. 본 개시는 상기 군의 둘 이상 또는 모든 구성요소가 소정의 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이에 사용되거나, 달리 이들과 관련되는 구현예를 포함한다.

[0168]

용어 "포함하는"은 개방형인 것으로 의도되고, 추가적인 구성요소 또는 단계의 포함을 허용하나, 이를 요하지 않는 것에 또한 유의한다. 용어 "포함하는"이 본 명세서에 사용되는 경우, 용어 "~로 구성되는" 또한 이에 따라 포함되고 개시된다.

[0169]

범위가 주어지는 경우, 끝점이 포함된다. 더욱이, 달리 표시되지 않는 한 또는 달리 문맥 및 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자의 이해로부터 명확하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은, 문맥상 달리 명확히 기재되지 않는 한, 범위의 하한의 단위의 1/10으로, 본 개시의 상이한 구현예에서의 언급된 범위 내의 임의의 특정한 값 또는 하위범위를 취할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0170]

본 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 주지된 각 값에 대한 정상적인 오차 범위를 가리킨다. 본 명세서에서 매개변수에 대한 용어 "약" 값 또는 기준은 값 또는 매개변수 자체에 대한 실행을 포함(및 기술)한다. 예를 들어, "약 X"에 대한 기재는 "X"에 대한 기재를 포함한다. 일부 구현예에서, "약"은 언급된 값의 최대 $\pm 10\%$ 의 값, 예컨대 $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 8\%$, $\pm 9\%$, 또는 $\pm 10\%$ 를 의미한다.

[0171]

모든 인용된 자료, 예컨대, 참조문헌, 출판물, 데이터베이스, 데이터베이스 항목, 및 본 명세서에 인용된 기술은 인용문에서 명확히 언급되지 않더라도, 인용에 의해 본 명세서에 포함된다. 인용된 자료와 본 출원의 서술이 상충하는 경우, 본 출원의 서술이 우선한다.

[0172]

섹션 및 표 제목은 제한을 위한 것이 아니다.

[0173]

실시예

[0174]

아래는 본 개시에 의해 제공되는 기술을 실시하기 위한 구체적인 구현예의 예시이다. 본 실시예는 단지 설명의 목적으로만 제공되며 어떤 방식으로든 본 개시의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 사용된 수치(예컨대, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만, 일부 실험 오류 및 편차는 물론 허용되어야 한다.

[0175]

본 명세서에 개시된 내용의 실시는 달리 명시하지 않는 한, 당해 기술 분야의 기술 범위 내에서 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약리학의 통상적인 방법을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 기재되어 있다. 예를 들어, T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties(W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry(Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(제2판, 1989); Methods In Enzymology(S. Colowick and N. Kaplan

eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 제18판(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 제3판.(Plenum Press) A권 및 B권(1992) 참조.

실시예 1: 중합효소-뉴클레오타이드 접합체의 제조

1. 중합효소(TdT) 생성

위치 182에 위치한 단일 시스테인을 가진 뮤린 TdT를 발현하는 유도성 플라스미드를 생성하였다(완전한 프로토콜은 Palluk 등, Nature Biotechnology, 2018 참조). 또한, 중합효소-뉴클레오타이드 접합체 제조의 보다 상세한 내용은 미국 특허 공개 제2019/0112627호, "Nucleic Acid Synthesis and Sequencing Using Tethered Nucleoside Triphosphates"를 참조하며, 이는 그 전문이 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

2. 중합효소의 단백질 발현 및 정제

TdT 발현은 플라스미드의 내성 마커를 위한 항생제를 함유한 TB 배지에서 BL21(DE3) Gold 세포(Agilent)를 사용하여 수행하였다. 밤새 배양한 50 mL의 배양물을 사용하여 400 mL 발현 배양물을 1/20 부피로 접종하였다. 세포를 37°C에서 OD 0.6에 도달할 때까지 200 rpm으로 진탕하면서 성장시켰다. IPTG를 추가하여 최종 농도 0.5 mM로 만들고 16°C에서 16 내지 20시간 동안 발현을 수행하였다. 세포를 8000 G에서 10분 동안 원심분리하여 회수하고 20 mL 완충액 A(20 mM 트리스-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8) + 5 mM 이미다졸에 재현탁시켰다. 초음파 처리 후 30,000 G에서 20분간 원심분리하여 세포 용해를 수행하였다. 상청액을 1 mL의 Ni-NTA 아가로스(Qiagen)를 함유하는 중력 컬럼에 적용하였다. 상기 컬럼을 20 부피의 완충액 A + 40 mM 이미다졸로 세척하고, 결합된 단백질을 4 mL 완충액 A + 500 mM 이미다졸을 사용하여 용출시켰다. 상기 단백질을 Vivaspin 20 컬럼(MWCO 10 kDa, Sartorius)을 사용하여 약 0.15 mL로 농축한 다음 Pur-A-Lyzer™ Dialysis Kit Mini 12000 튜브 (Sigma)를 사용하여 200 mL TdT 저장 완충액(100 mM NaCl, 200 mM K2HPO4, pH 6.5)에 대해 밤새 투석하였다.

Ni 정제 시료를 HiTrap Q HP 음이온 컬럼에 적용하였다. 100% Q 완충액 A(100 mM NaCl, 20 mM K2HPO4, pH 6.5)에서 100% Q 완충액 B(1M NaCl, 20mM K2HPO4, pH 6.5)까지의 선형 기울기로 단백질을 용출시켰다. SDS-PAGE 분석을 사용하여 TdT가 포함된 분획을 확인하였으며, 이들 시료를 모아서 농축하였다.

3. 중합효소에 결합된 뉴클레오타이드의 부착

TdT-뉴클레오타이드 접합체를 제조하기 위해, 시스테인에 부위 특이적으로 접합할 수 있는 모이어티(즉, 말레이미드)를 가진 절단 가능한 링커-뉴클레오타이드를 먼저 합성하였다. 예시적인 링커-뉴클레오타이드는 미국 특허 공개 제2019/0112627호, "Nucleic Acid Synthesis and Sequencing Using Tethered Nucleoside Triphosphates"에 기재되어 있다. 그런 다음, 동일한 물의 TdT와 링커-뉴클레오타이드를 500 mM NaCl, 20 mM K2HPO4, pH 6.5, 4°C에서 밤새 배양하였다. 20 mM 트리스 아세테이트, 50 mM 칼륨 아세테이트, pH 7.9에서 사전 평형화된 S200 크기 배제 컬럼(Cytiva)을 사용하여 TdT 접합체를 미반응 링커-뉴클레오타이드로부터 분리하였다. 생성된 접합체는 중합효소에 부착된(또는 결속된) 적어도 하나의 TdT-뉴클레오타이드를 포함하는 접합체를 포함한다.

실시예 2: 인산분해효소는 합성 동역학에 영향을 주지 않으면서 접합체 기반 폴리뉴클레오타이드 합성 중 원치 않는 삽입을 방지함

본 명세서에 기재된 바와 같이, 상기 중합효소-뉴클레오타이드 접합체는 주어진 접합체의 단일 뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드의 유리 3' 말단에 결합하는 데 사용될 수 있으며, 상기 중합효소는 제어된 방식으로 후속 뉴클레오타이드 추가를 방지하는 것을 포함하여 결합 후에도 부착된 상태로 남아 있을 수 있다. 그러나 폴리뉴클레오타이드 합성을 위해 접합체 용액을 사용할 때 두 개 이상의 뉴클레오타이드 삽입이 발생할 수 있으며, 이는 접합체 기반 폴리뉴클레오타이드 합성 정확도에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 인산분해효소가 접합체 기반 폴리뉴클레오타이드 합성 중 삽입을 방지하여 합성 정확도를 향상시킬 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 다음과 같이 인산분해효소가 있거나 없는 A, T, C 또는 G 뉴클레오타이드 중합효소 접합체를 사용하여 유리 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 대한 단일 뉴클레오타이드 결합 반응을 수행하였다.

실시예 1에서 제조된 A, T, C 또는 G 링커-뉴클레오타이드에 접합된 1 μM TdT 용액을 NEB에서 구입한 2 μM Calf Alkaline Intestinal Phosphatase의 존재 또는 부재하에서, 2가 금속(예컨대, 마그네슘 또는 코발트), 50 mM 염(예컨대, 아세트산 칼륨 또는 NaCl), 두 개의 스타터 DNA 올리고 중 하나(50 nM)와 함께 pH 8의 트리스 또는 HEPES 완충액에서 배양하였다(A의 경우 5'-6-FAM-T35-3'(서열 번호 9), T, C 및 G의 경우 5'-6-FAM-T41GCGGCGCGTTTCGCGCCGC-3'(서열 번호 10)을 사용함). 상기 인산분해효소를 미리 pH 8의 완충액(예컨대, 트리

스 또는 HEPES 완충액) 및 염(예컨대, 50 mM NaCl 또는 아세트산 칼륨)을 함유하는 용액으로 완충액 교환하였다. 40 mM EDTA를 첨가하여 6.6초, 11.6초, 19.2초, 65초, 3분 21초, 9분 52초, 21분 41초에서 반응이 멈출 때까지 상기 반응물을 24° C에서 배양하였다.

[0187] 반응이 완료된 후, 절단효소 또는 환원제 등의 시약을 이용하여 접합체 내 뉴클레오타이드와 TdT를 연결하는 링커를 절단하여 올리고뉴클레오타이드로부터 TdT를 제거하였다. 그런 다음 모세관 전기영동으로 올리고뉴클레오타이드를 분석하여 반응 생성물을 길이별로 구별하였다. 구체적으로, 스타터 올리고에 결합된 6-FAM 플루오레세인의 형광을 검출함으로써 생성된 올리고뉴클레오타이드 추가 반응 생성물의 크기를 결정하였다. 결과는 도 2a에 도시되어 있다. 이 결과는 첫 번째 피크(스타터 올리고), 두 번째 피크(하나의 뉴클레오타이드가 추가된 스타터 올리고, 즉, "+1 추가"), 및 나중 시점에 나타나는 세 번째 피크(두 개의 뉴클레오타이드가 추가된 스타터 올리고, 즉, "+2 추가")를 보여준다. 즉, 초기 시점에서, 신장된 +1 올리고(단일 뉴클레오타이드 결합, 오른쪽 피크)의 비율은 완료될 때까지 스타터 올리고(왼쪽 피크)에 비해 증가한다.

[0188] 나중 시점에서 볼 수 있듯이, 그림 2b에 다시 도시된 마지막 21분 41초 시점에서, 인산분해 효소의 부재하에서 스타터 올리고에 2개의 뉴클레오타이드가 추가됨으로써(+2) 또 다른 피크가 나타나기 시작한다. +2 추가 피크는 도 2b에 표시되어 있으며 원치 않는 삽입에 해당한다. 그러나 인산분해효소의 존재하에서 반응이 수행되는 경우 +2 추가의 출현은 크게 감소하는 반면, +1 추가의 속도는 큰 영향을 받지 않는다. 따라서, 인산분해효소로 처리된 접합체 시약을 사용한 합성(예컨대, 인산분해효소 존재하에서의 합성)은 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에 의한 기질에 대한 A, C, T 및 G 뉴클레오타이드의 단일 뉴클레오타이드 추가의 정확성을 향상시키고 원치 않는 삽입을 억제한다.

[0189] **실시예 3: 여러 인산분해효소 변형체는 합성 동역학에 영향을 주지 않으면서 접합체 기반 폴리뉴클레오타이드 합성 중 원치 않는 삽입을 방지함**

[0190] 실시예 1에서 제조된 T 링커-뉴클레오타이드에 접합된 2 μM TdT 용액을 24°C(도 3a) 또는 37°C(도 3b)에서 2가 금속(예컨대, 마그네슘 또는 코발트), 50 mM 염(예컨대, 아세트산 칼륨 또는 NaCl), 2 μM 인산분해효소(또는 대조군으로서 인산분해효소 없음), 및 50 nM DNA 올리고(5' -6-FAM-T32CCC-3')(서열 번호 11)과 함께 pH 8의 트리스 또는 HEPES 완충액에서 배양하였다. 40 mM EDTA를 추가하여 3.8초, 11.6초, 19.2초, 65초, 3분 21초, 9분 52초, 21분 41초, 및 30분에 반응물을 켄칭하였다. 인산분해효소를 미리 pH 8의 완충액(예컨대, 트리스 또는 HEPES) 및 염(예컨대, 50 mM NaCl 또는 아세트산 칼륨)을 함유하는 용액으로 완충액 교환하였다. *B. taurus*(Quick CIP, NEB), *P. borealis*(Shrimp Alkaline Phosphatase, NEB), *Antarctic* 세균 TAB5(Antarctic Phosphatase, NEB), 및 *E. coli*(Takara Bio) 인산분해효소와 같은 인산분해효소 변형체를 시험하였다.

[0191] 반응이 완료된 후, 절단효소 또는 환원제 등의 시약을 이용하여 접합체 내 뉴클레오타이드와 TdT를 연결하는 링커를 절단하여 올리고뉴클레오타이드로부터 TdT를 제거하였다. 3a에서 생성된 합성 올리고뉴클레오타이드를 모세관 전기영동으로 분석하여 올리고 집단을 길이별로 구별하였으며, 여기서 "0"은 스타터 올리고의 피크를 나타내고 "+1"은 3' 말단에 단일 결합된 T가 있는 스타터 올리고의 피크를 나타낸다. 3b의 결과는 '인산분해효소 없음' 대조군에서 2개의 결합된 뉴클레오타이드 "+2 추가"가 있는 올리고의 가시적인 피크를 보여준다.

[0192] 구체적으로, 모세관 전기영동과 시작 올리고에 결합된 6-FAM 플루오레세인의 형광 검출을 사용하여 반응 생성물을 길이별로 구별함으로써 올리고뉴클레오타이드를 분석하였다. 24°C에서 3.8초 내지 21분 41초 사이의 다양한 추가 시간 후 생성된 올리고뉴클레오타이드 추가 반응 생성물이 도 3a에 나와 있다. 37°C에서 30분의 추가 시간 후 생성된 올리고뉴클레오타이드 추가 반응 생성물이 도 3b에 나와 있으며, +2 추가의 예상 크기를 나타내는 화살표가 표시되어 있다.

[0193] 도시된 바와 같이, +2 추가의 출현은 '인산분해효소 없음'과 비교하여 시험의 모든 시점에서 유의하게 감소한 반면(도 3b), +1 추가는 모든 인산분해효소의 존재하에서 21분 41초 시점까지 완료되었다(도 3a). 또한, TAB5 인산분해효소 변형체를 제외하고는 모두 '인산분해효소 없음'과 비교하여 뉴클레오타이드 결합의 동역학에 가시적으로 영향을 미치지 않았다. 따라서, 시험된 모든 인산분해효소 변형체는 폴리뉴클레오타이드 합성 중 원치 않는 삽입을 억제하는 데 적합하며, 대부분의 변형체는 빠른 결합 동역학이 요구되는 경우에도 적합하다.

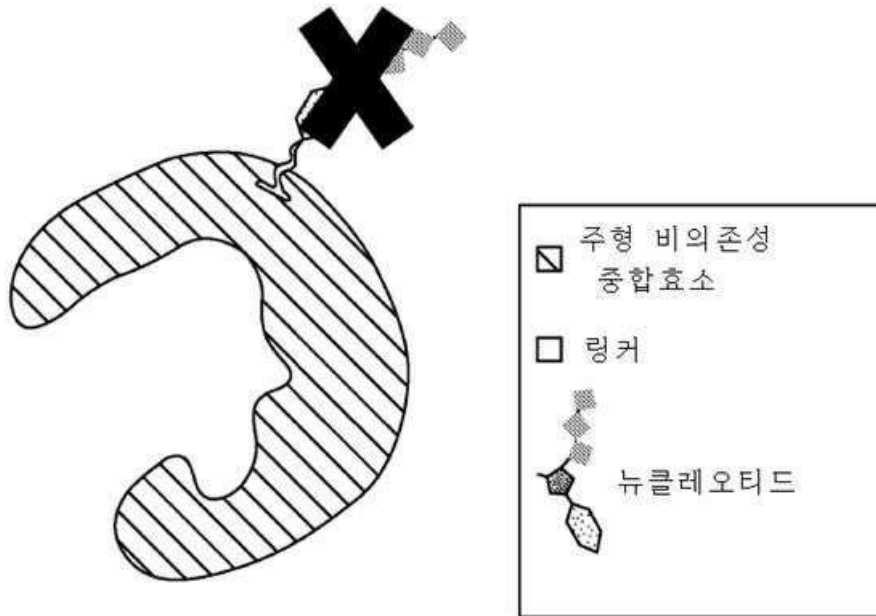
[0194] **실시예 4. 인산분해효소는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체를 사용하여 50량체 폴리뉴클레오타이드의 제어된 단계적 합성 중 원치 않는 삽입을 억제함**

[0195] 뉴클레오타이드-중합효소 접합체를 사용한 순환 폴리뉴클레오타이드 합성을 수행하여, 정의된 50량체 서열:

- [0196] 5' -AACCGACCAAGCTACGGTTCAGAAAATTCGCGATGCAATTCGCGATCAGC-3' (서열 번호 12)을 생성하였다.
- [0197] 합성은 표면에 부착된 DNA에 혼성화된 FAM 표지된 DNA 올리고(스타터 올리고):
- [0198] 5'-6-FAM-CTGACAGAGATGATGAAGTCACATGAGACATGAACTGAGTCTTTT-3' (서열 번호 13)의 3' 말단에서 시작하여 수행하였다.
- [0199] 두 개의 50량체 합성 반응을 수행하였는데, 하나는 인산분해효소 존재하에서, 다른 하나는 인산분해효소 부재하에서 수행하였다. TdT-뉴클레오타이드 접합체를 통한 뉴클레오타이드의 순환 추가에 의해 시작 분자에서 DNA 신장을 수행하였다. 표면에 결합된 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 하나의 뉴클레오타이드를 추가하기 위한 각 DNA 신장 사이클은 다음과 같이 수행하였다(24 내지 37° C의 온도에서).
- [0200] 1. 뉴클레오타이드 추가: 3 μ M *E. coli* 인산분해효소의 존재 또는 부재하에서, TdT-뉴클레오타이드 접합체(A, T, C 또는 G에 해당), 2가 금속(예컨대, 코발트 또는 마그네슘) 및 50 mM 염(예컨대, 아세트산 칼륨 또는 NaCl)을 pH 8의 트리스 또는 HEPES 완충액에 용해한 용액을 표면에 결합된 DNA(예컨대, 스타터 올리고)에 추가하였다.
- [0201] 2. 올리고 결합 TdT의 제거: 표면 결합 올리고에 TdT-뉴클레오타이드 접합체가 추가될 수 있도록 충분한 시간 동안 배양한 후, 40 mM EDTA를 첨가하여 TdT 신장 반응을 종결시키고, 접합체에서 뉴클레오타이드와 TdT를 연결하는 링커를 절단 효소 또는 환원제와 같은 시약을 사용하여 절단하였다.
- [0202] 3. 표면 재생: 그런 다음 0.5 M NaCl이 포함된 NaOH pH 11 용액을 사용하여 결합되지 않은 모든 반응 성분을 표면에서 씻어내었다.
- [0203] 원하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 생성하기 위해 단계 1 내지 3을 반복하였다.
- [0204] 그 결과 합성된 폴리뉴클레오타이드를 표면에서 제거하고, SeqStudio Genetic Analyser(ThermoFisher) DNA 분석기에서 FAM 형광 검출로 분석하여 폴리뉴클레오타이드 집단을 길이별로 구별하였다. 그 결과는 도 4에 나와 있다.
- [0205] 도 4에서 볼 수 있듯이, 인산분해효소를 사용하지 않은 합성에서는, 염기가 50개보다 많은 생성물(1개 이상의 비종결 이벤트 또는 삽입이 있는 생성물을 나타냄)이 전체 기질의 약 40% 정도인 것으로 나타난다. 그러나, 인산분해효소의 존재하에서는, 염기가 50개보다 많은 합성된 올리고뉴클레오타이드는 합성된 집단의 약 10%만을 차지하며, 이는 각 합성 단계에서의 삽입 비율이 유의하게 감소함을 나타낸다. 또한, 인산분해효소의 존재 또는 부재하에서 결실(추가가 발생하지 않은 사이클)에서는 검출 가능한 변화가 없다.
- [0206] 상기 결과는 접합체 기반 폴리뉴클레오타이드 합성 중 인산분해효소가 존재하는 경우, 다단계 합성 반응에서 결실 비율에 영향을 미치지 않으면서 인산분해효소 부재하의 반응과 비교하여 삽입이 실질적으로(적어도 4배) 감소한다는 것을 보여준다. 이는 중합효소-뉴클레오타이드 접합체에 의한 폴리뉴클레오타이드 합성의 품질이 유의하게 개선되었음을 나타낸다.
- [0207] 기타 구현예
- [0208] 지금까지 기재된 내용은 제한이 아닌 설명을 위한 것이며, 더 광범위한 양태에서 본 개시의 진정한 범위와 사상을 벗어나지 않고 첨부된 특허청구범위의 범위 내에서 변경이 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0209] 본 개시는 기재된 여러 구현예에 대해 어느 정도 길게 그리고 어느 정도 특정하게 기재되었지만, 그러한 특정 내용이나 구현예 또는 임의의 특정 구현예로 제한되어야 한다는 의도가 아니며, 이는 종래 기술의 관점에서 청구범위의 가능한 가장 넓은 해석을 제공하고 따라서 본 개시의 의도된 범위를 효과적으로 포괄하기 위해 첨부된 특허청구범위를 참조하여 해석되어야 한다.
- [0210] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참고문헌은 그 전문이 인용에 의해 포함된다. 상충되는 내용이 있는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선한다. 또한, 식별 항목, 재료, 방법, 및 실시예는 오직 예시일 뿐이며 제한하기 위한 것이 아니다.

도면

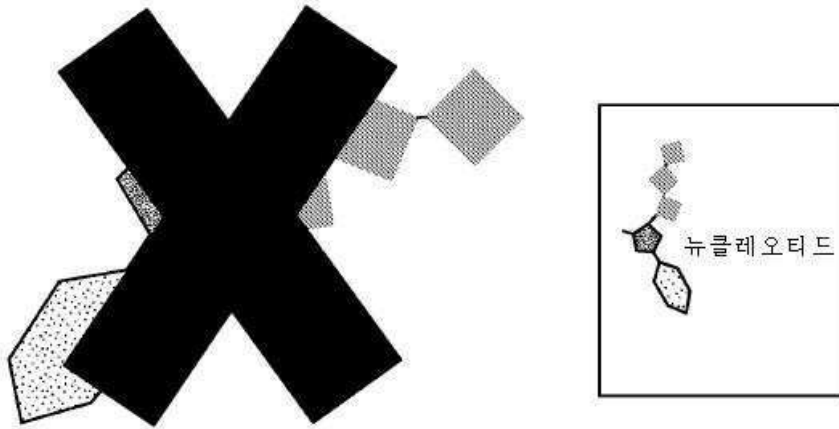
도면1a



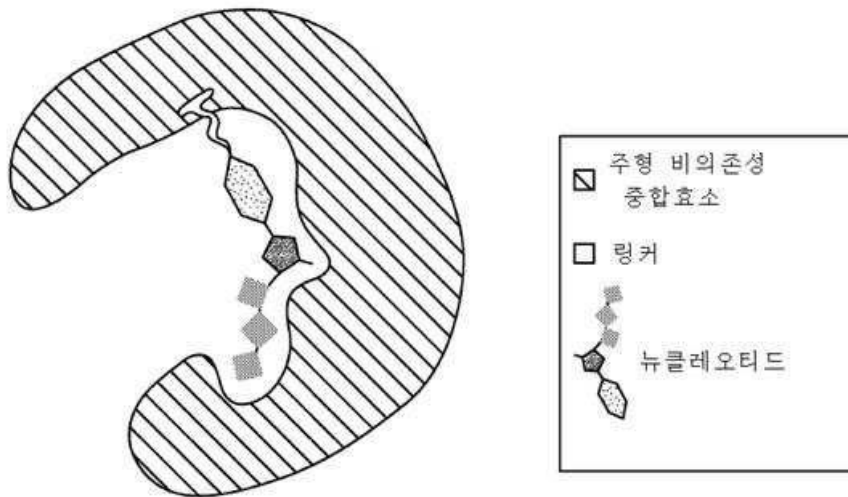
도면1b



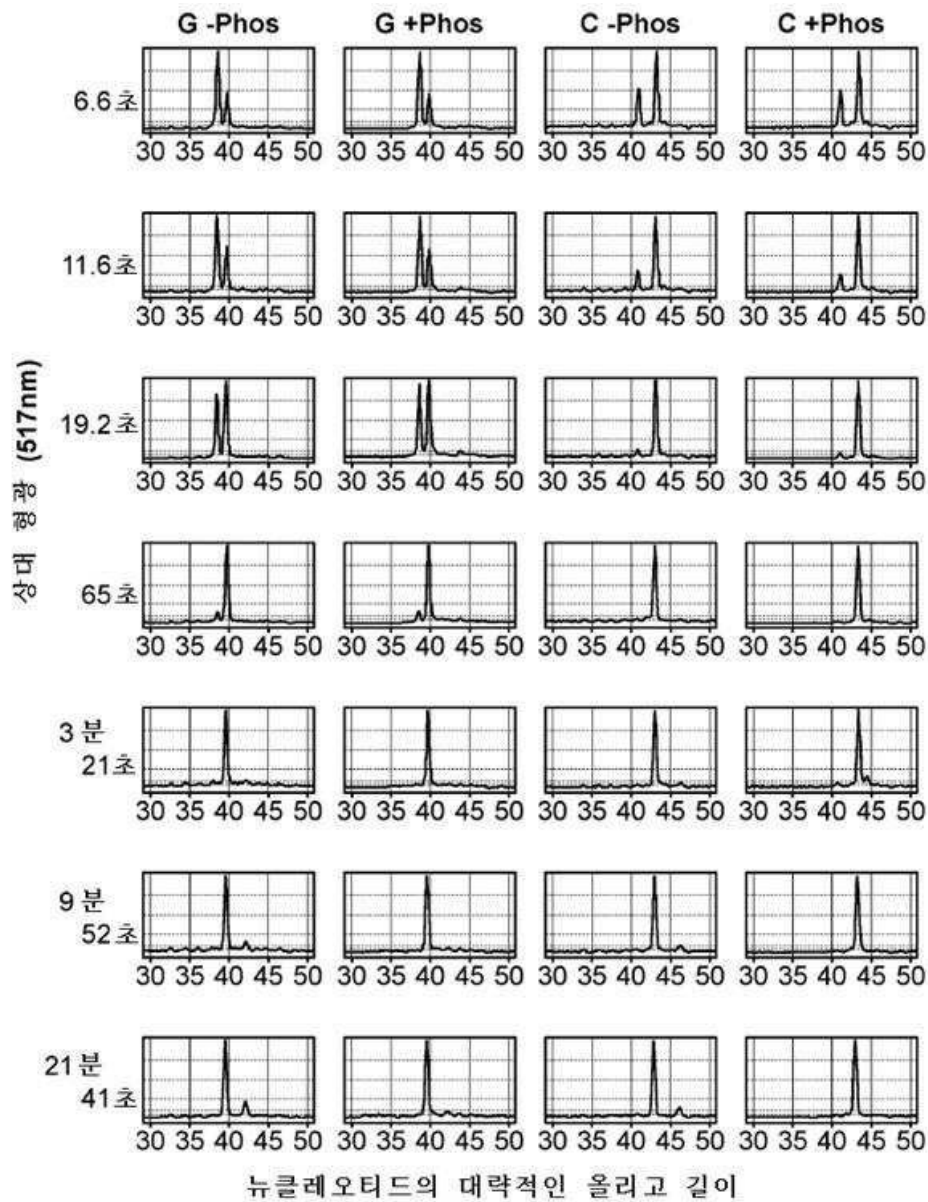
도면1c



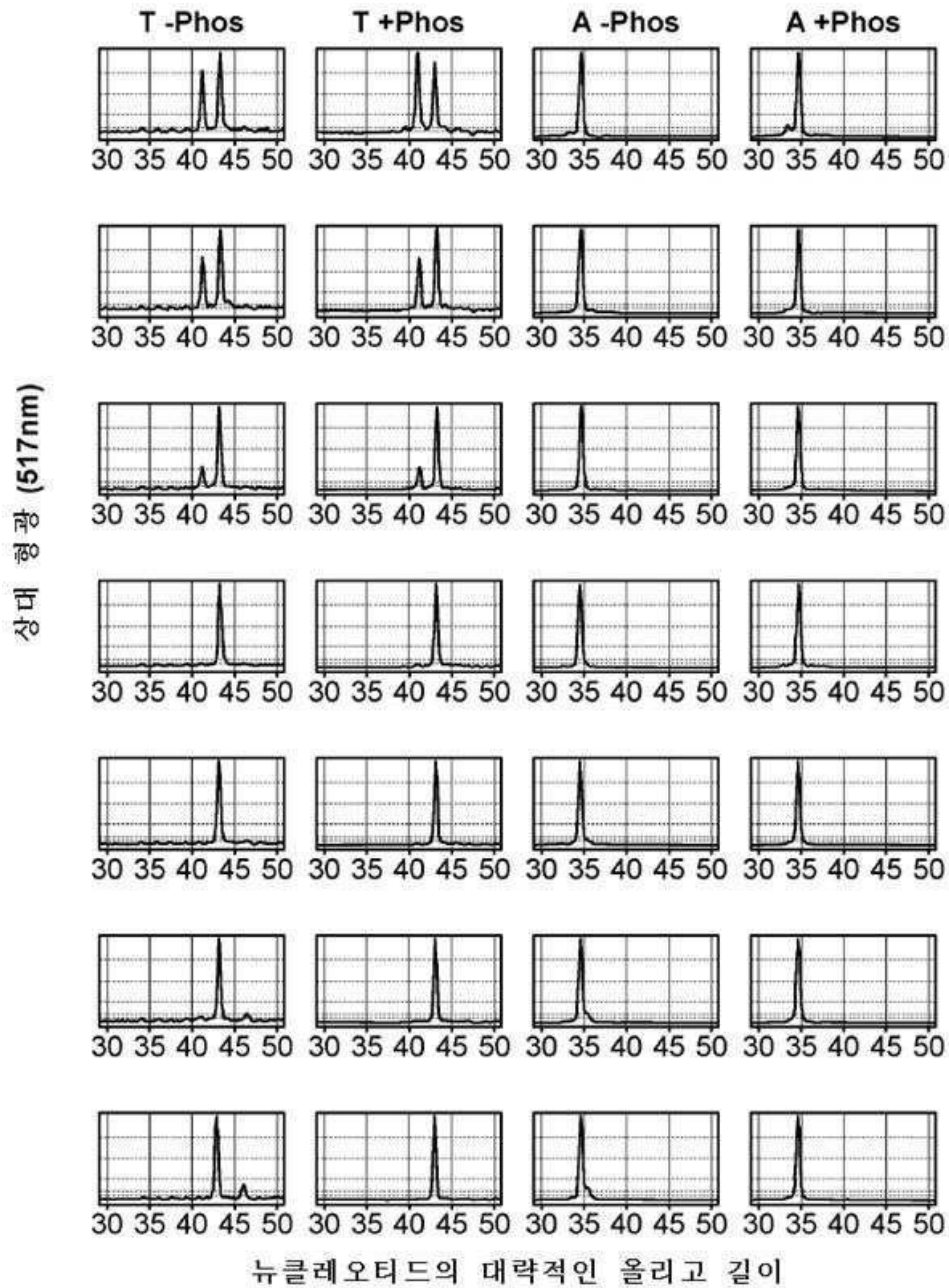
도면1d



도면2a

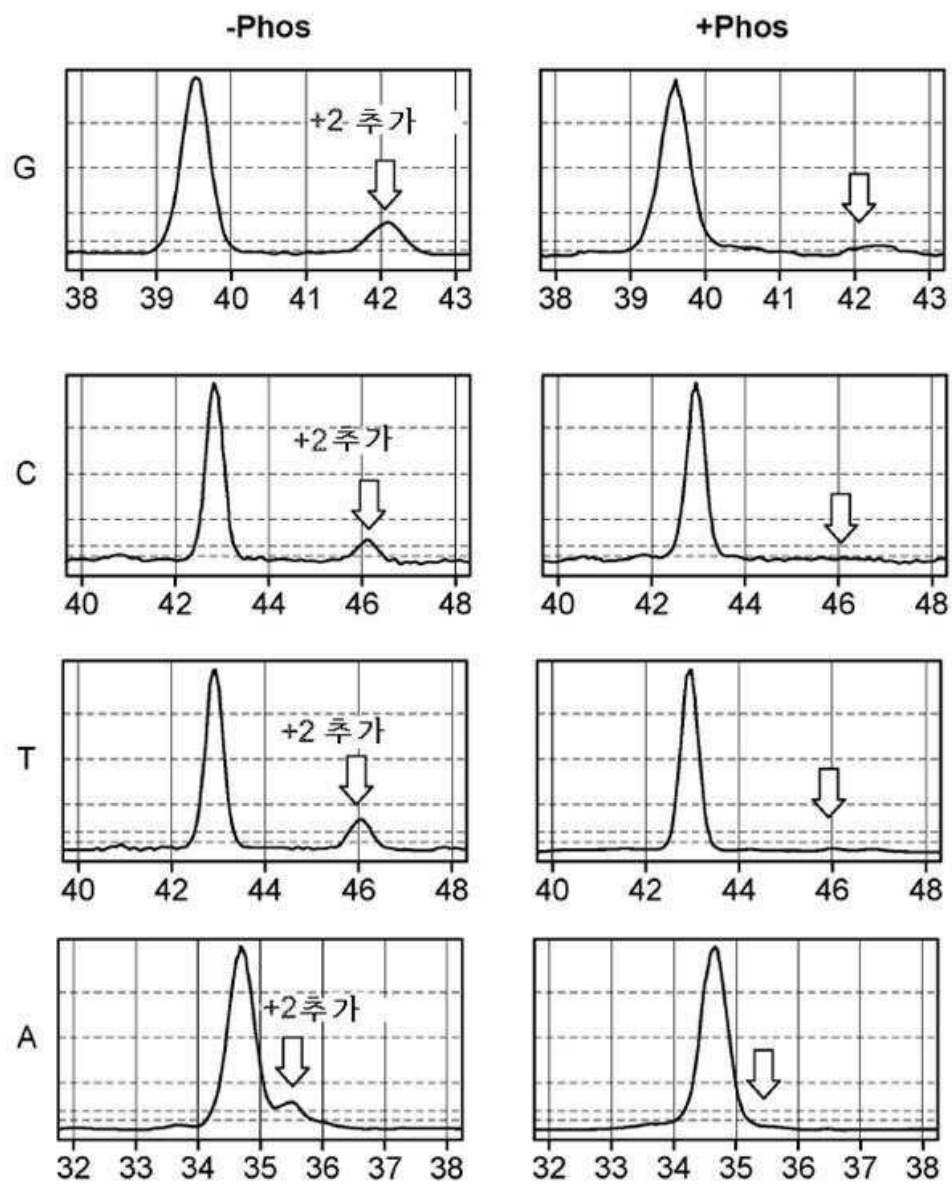


도면2aa

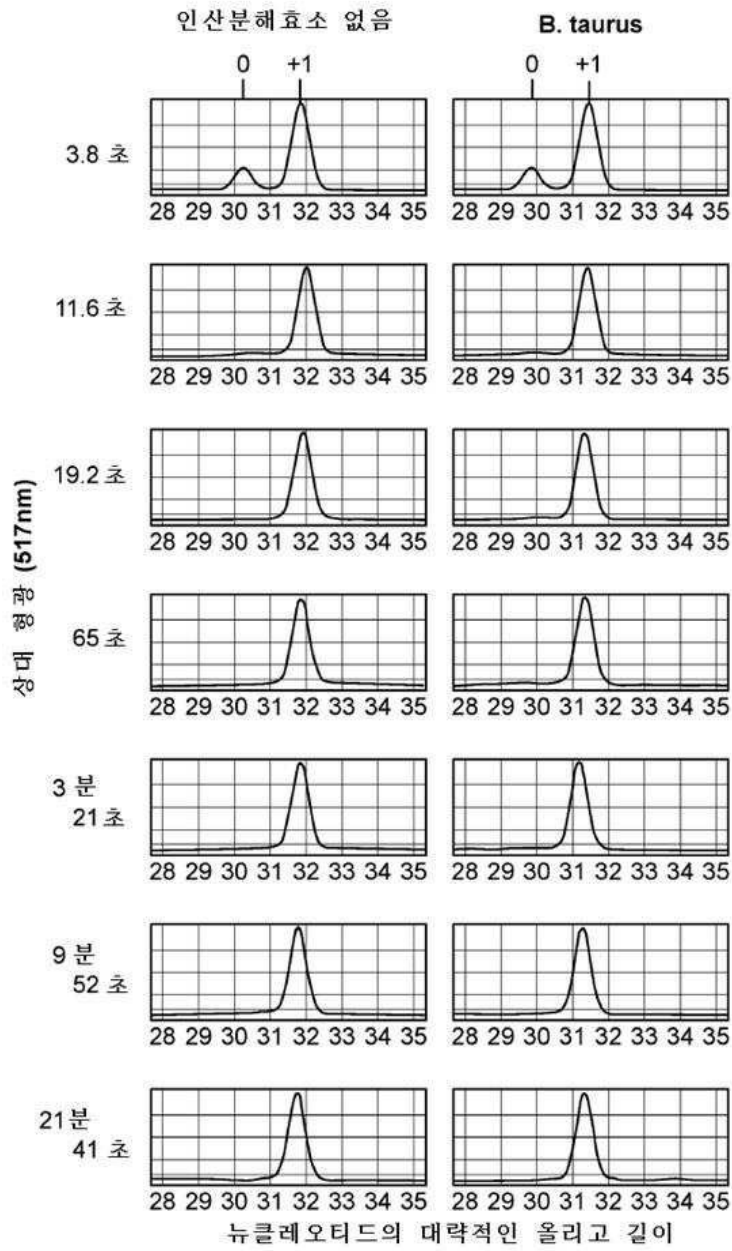


도면2b

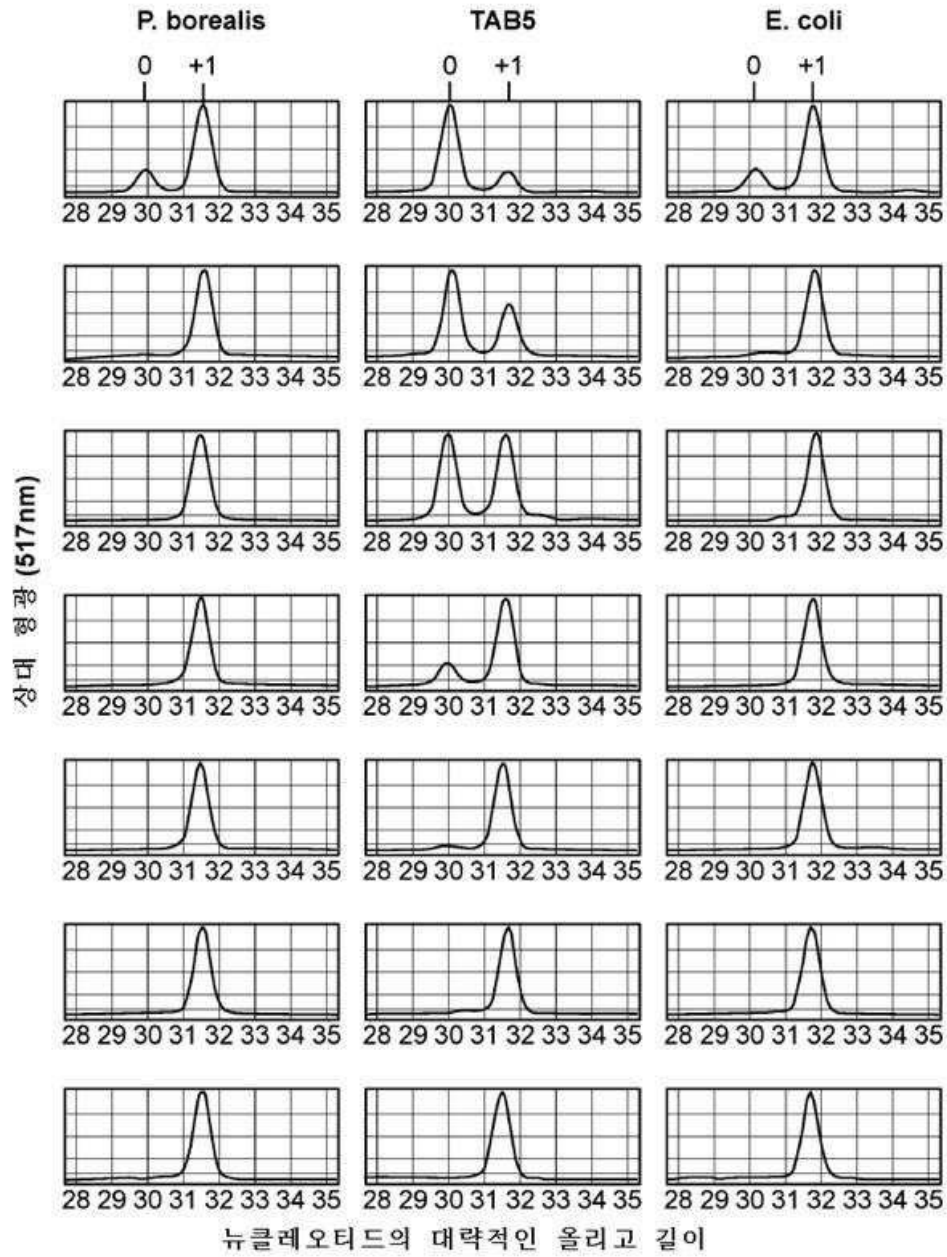
21분 41초 배양 확대



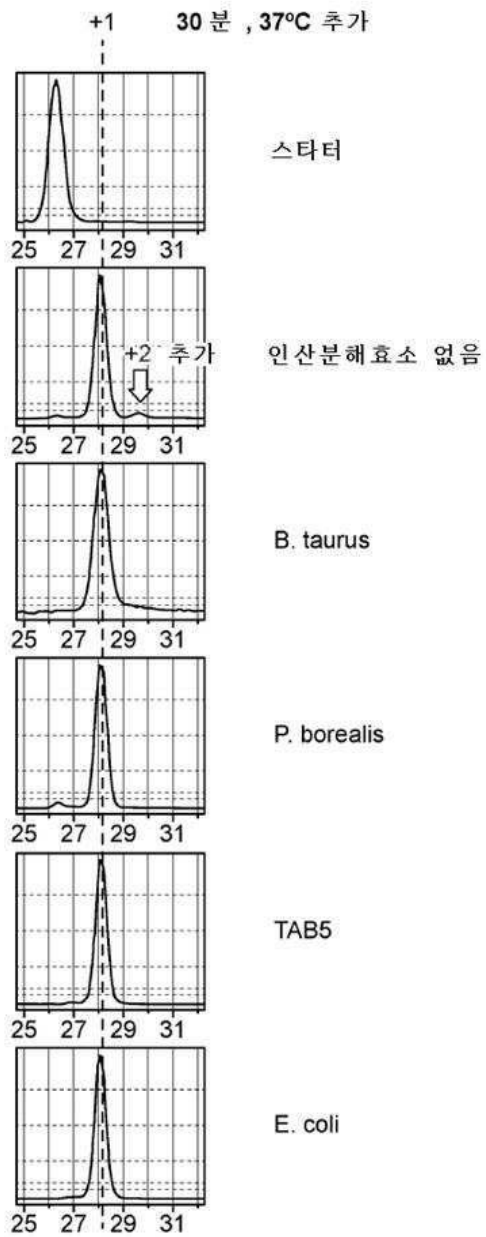
도면3a



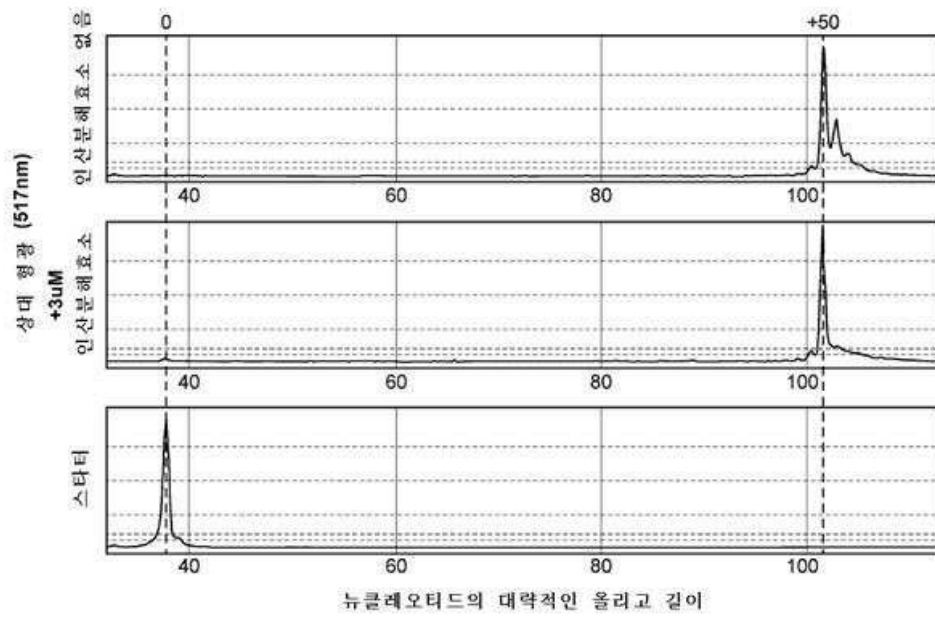
도면3aa



도면3b



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.