

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第2部門第1区分

【発行日】平成18年8月3日(2006.8.3)

【公表番号】特表2002-543979(P2002-543979A)

【公表日】平成14年12月24日(2002.12.24)

【出願番号】特願2000-618288(P2000-618288)

【国際特許分類】

B 01 J	43/00	(2006.01)
B 01 D	15/04	(2006.01)
B 01 D	15/08	(2006.01)
B 01 J	20/10	(2006.01)
B 01 J	20/22	(2006.01)
C 07 H	21/00	(2006.01)
G 01 N	30/00	(2006.01)
B 01 J	20/286	(2006.01)
G 01 N	30/88	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)

【F I】

B 01 J	43/00	
B 01 D	15/04	
B 01 D	15/08	
B 01 J	20/10	D
B 01 J	20/22	B
C 07 H	21/00	
G 01 N	30/00	E
G 01 N	30/48	L
G 01 N	30/88	E
C 12 N	15/00	Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成18年6月6日(2006.6.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記を含む、pH依存型イオン交換マトリックス：  
 固形基体、並びに

複数の第一のイオン交換リガンドであり、各々の第一のイオン交換リガンドは以下を含む  
：

pKが約9未満であるアミンを含むキャップ；

該キャップに共有結合したスペーサーであり、このスペーサーは、アミン末端を伴うスペーサーアルキル鎖、及び該スペーサーアルキル鎖に共有結合した酸性部分を含み；及び  
 リンカーアルキル鎖の第一端で該固形基体に共有結合し、かつリンカーアルキル鎖の第二端で該スペーサーのアミン末端に共有結合したリンカーアルキル鎖を含むリンカー；

ここでこのマトリックスは、第一のpHで標的核酸を吸着し、かつ第一のpHよりも高い脱着pHで標的核酸を放出する能力を有することを特徴とする、マトリックス。

【請求項2】 キャップが更に、芳香族炭化水素環を含む、請求項1記載のマトリッ

クス。

【請求項 3】 芳香族炭化水素環の少なくとも1個のメンバーがpK約9未満のアミンである、請求項2記載のマトリックス。

【請求項 4】 芳香族炭化水素環が、ピリジン、及びイミダゾールからなる群より選択される、請求項3記載のマトリックス。

【請求項 5】 pK約9未満のアミンが、少なくとも約4～最大約6までのpKを有する、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 6】 酸性部分が、ヒドロキシル、カルボキシル、及びカルボニルからなる群より選択される、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 7】 スペーサーアルキル鎖が、2～5個の炭素原子を含む、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 8】 スペーサーがシステイン及びアラニンからなる群より選択される、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 9】 スペーサーに共有結合により連結された芳香族炭化水素が、ヒスチジン及びヒスタミンからなる群より選択される塩基性アミノ酸部分を限定する、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 10】 リンカーアルキル鎖が3～8個の炭素原子を含む、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 11】 リンカーアルキル鎖が、酸素及びアミンからなる群より選択される少なくとも1個のメンバーを含む、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 12】 リンカーがグリシン及び尿素からなる群より選択される、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 13】 マトリックスが、第一のpHで標的核酸との交換が可能なアニオン交換体であり、かつ該マトリックスは脱着pHで中性又は負の実効電荷を有する、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 14】 脱着pHが少なくとも約4.0～最大約pH10.0までである、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 15】 マトリックスが、第一のpHでの標的核酸のマトリックスへの吸着、及び脱着pHでのマトリックスからの放出の少なくともふたつのサイクルを通して再使用することができる、請求項1記載のマトリックス。

【請求項 16】 下記を含む、標的核酸の単離のためのpH依存型イオン交換マトリックス：

シリカ磁気粒子；並びに

複数の第一のイオン交換リガンドであり、各第一のイオン交換リガンドは以下を含む：

芳香族炭化水素環であり、ここで環の少なくとも1個のメンバーはpK約9未満のアミンであり；

芳香族炭化水素環に共有結合したスペーサーであり、このスペーサーは、アミン末端を伴うスペーサーアルキル鎖、及び該スペーサーアルキル鎖に共有結合した酸性部分を含み；及び

シリカ磁気粒子にリンカーアルキル鎖の第一端でシリカ残基を介して共有結合し、かつスペーサーのアミン末端にリンカーアルキル鎖の第二端で共有結合した、リンカーアルキル鎖を含むリンカー；

ここで該マトリックスは、第一のpHで標的核酸を吸着し、かつ第一のpHよりも高い脱着pHで標的核酸を放出する能力を有するような、マトリックス。

【請求項 17】 キャップが更に、芳香族炭化水素環を含む、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 18】 芳香族炭化水素環の少なくとも1個のメンバーが、pK約9未満のアミンである、請求項17記載のマトリックス。

【請求項 19】 芳香族炭化水素環がピリジン、及びイミダゾールからなる群より選択される、請求項18記載のマトリックス。

【請求項 2\_0】 pK約9未満のアミンが、少なくとも約4~最大約6までのpKを有する、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_1】 酸性部分が、ヒドロキシル、カルボキシル、及びカルボニルからなる群より選択される、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_2】 スペーサーアルキル鎖が、2~5個の炭素原子を含む、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_3】 スペーサーがシステイン及びアラニンからなる群より選択される、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_4】 スペーサーに共有結合により連結された芳香族炭化水素が、ヒスチジン及びヒスタミンからなる群より選択される塩基性アミノ酸部分を限定する、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_5】 リンカーアルキル鎖が3~8個の炭素原子を含む、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_6】 リンカーアルキル鎖が、酸素及びアミンからなる群より選択される少なくとも1個のメンバーを含む、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_7】 リンカーがグリシン及び尿素からなる群より選択される、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_8】 マトリックスが、第一のpHで標的核酸との交換が可能なアニオン交換体であり、かつ該マトリックスは脱着pHで中性又は負の実効電荷を有する、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 2\_9】 マトリックスが、第一のpHでの標的核酸のマトリックスへの付着、及び脱着pHでのマトリックスからの放出の少なくともふたつのサイクルを通して再使用することができる、請求項16記載のマトリックス。

【請求項 3\_0】 下記を含む、多元pH依存型イオン交換マトリックス：

固体基体；

複数の第一のイオン交換リガンドであり、各第一のイオン交換リガンドは以下を含む：

pKが約9未満であるアミンを含むキャップ；

該キャップに共有結合されているスペーサーであり、このスペーサーは、アミン末端を伴うスペーサーアルキル鎖を含み；及び

リンカーアルキル鎖の第一端で固体基体に共有結合し、かつリンカーアルキル鎖の第二端でスペーサーのアミン末端に共有結合しているリンカーアルキル鎖を含む、リンカー；複数の第二のイオン交換リガンドであり、各第二イオン交換リガンドは以下を含む：

第二のアルキル鎖；及び

第二のアルキル鎖に共有結合した第二の酸性部分、

ここで該マトリックスは、第一のpHで標的核酸に吸着し、かつ第一のpHよりも高い脱着pHで標的核酸を放出する能力を有するような、マトリックス。

【請求項 3\_1】 キャップが更に、芳香族炭化水素環を含む、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 3\_2】 芳香族炭化水素環の少なくとも1個のメンバーがpK約9未満のアミンである、請求項31記載のマトリックス。

【請求項 3\_3】 芳香族炭化水素環が、ピリジン及びアニリンからなる群より選択される、請求項31記載のマトリックス。

【請求項 3\_4】 第二の酸性部分が、カルボン酸残基である、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 3\_5】 スペーサーアルキル鎖が、2~5個の炭素原子を含む、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 3\_6】 スペーサーに共有結合により連結された芳香族炭化水素が、ヒスチジン及びヒスタミンからなる群より選択される塩基性アミノ酸部分を限定する、請求項31記載のマトリックス。

【請求項 3\_7】 リンカーアルキル鎖が3~8個の炭素原子を含む、請求項30記載のマ

トリックス。

【請求項 3\_8】 リンカーアルキル鎖が、酸素及びアミンからなる群より選択される少なくとも1個のメンバーを含む、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 3\_9】 リンカーが尿素である、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 4\_0】 マトリックスが、第一のpHで標的核酸との交換が可能なアニオン交換体であり、第一のpHよりも高い第二のpHで中性であり、並びに第二のpHよりも高い第三のpHでカチオン交換体である、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 4\_1】 第二のpHが少なくとも約4.0～最大約pH10.0までである、請求項34記載のマトリックス。

【請求項 4\_2】 固相に共有結合した複数の第一のイオン交換リガンド及び複数の第二のイオン交換リガンドの割合が、マトリックスが第一のpHで標的核酸を含有する溶液に接触した場合に、マトリックスが優先的に標的核酸に結合することを確実にするようにデザインされている、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 4\_3】 マトリックスが、第一のpHでの標的核酸のマトリックスへの付着、及び脱着pHでのマトリックスからの放出の少なくともふたつのサイクルを通して再使用することができる、請求項30記載のマトリックス。

【請求項 4\_4】 下記の工程を含む、pH依存型イオン交換マトリックスを用いて標的核酸を単離する方法：

(a)下記を含む、pH依存型イオン交換マトリックスを提供する工程：

　固形基体；及び

　複数の第一のイオン交換リガンドであり、各々の第一のイオン交換リガンドは以下を含む：

　pKが約9未満であるアミンを含むキャップ、ここでアミンは、第1級、第2級、又は第3級アミンからなる群より選択される；

　該キャップに共有結合されているスペーサーであり、このスペーサーは、アミン末端を伴うスペーサーアルキル鎖、及びスペーサーアルキル鎖に共有結合された酸性部分を含み；並びに

　リンカーアルキル鎖の第一端で固形基体に共有結合し、かつリンカーアルキル鎖の第二端でスペーサーのアミン末端に共有結合しているリンカーアルキル鎖を含む、リンカー；

　ここで該マトリックスは、第一のpHで標的核酸を吸着し、かつ第一のpHよりも高い脱着pHで標的核酸を放出する能力を有する；

(b)標的核酸を含む混合物を提供する工程；

(c)該混合物及びマトリックスを混ぜ、かつ第一のpHで標的核酸がマトリックスに吸着するまでインキュベーションし、複合体を形成する工程；

(d)混合物から該複合体を分離する工程；並びに

(e)該複合体を脱着pHで溶離液と混ぜる工程。

【請求項 4\_5】 キャップが更に、芳香族炭化水素環を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 4\_6】 pK約9未満のアミンが、芳香族炭化水素環のメンバーである、請求項45記載の方法。

【請求項 4\_7】 工程(a)で提供されたマトリックスのスペーサーアルキル鎖が、2～5個の炭素原子を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 4\_8】 工程(a)で提供されたマトリックスのスペーサーがシステイン及びアラニンからなる群より選択される、請求項44記載の方法。

【請求項 4\_9】 工程(a)で提供されたマトリックスのスペーサーに共有結合により連結された芳香族炭化水素が、ヒスチジン及びヒスタミンからなる群より選択される塩基性アミノ酸部分を限定する、請求項44記載の方法。

【請求項 5\_0】 工程(a)で提供されたマトリックスのリンカーアルキル鎖が3～8個の炭素原子を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 5\_1】 工程(a)で提供されたマトリックスのリンカーアルキル鎖が、酸素

、アミン及びイオウからなる群より選択される少なくとも1個のメンバーを含む、請求項4記載の方法。

【請求項5\_2】 工程(a)で提供されたマトリックスのリンカーが、グリシン及び尿素からなる群より選択される、請求項44記載の方法。

【請求項5\_3】 工程(a)で提供されたマトリックスが更に、固相に共有結合した複数の第二のイオン交換リガンドを含む、請求項44記載の方法。

【請求項5\_4】 複数の第二のイオン交換リガンドの少なくともひとつが、プロピオニ酸残基である、請求項44記載の方法。

【請求項5\_5】 標的核酸物質を含有する混合物が、標的核酸を含む生物学的物質を破壊することにより得られる、請求項44記載の方法。

【請求項5\_6】 標的核酸物質がRNAである、請求項44記載の方法。

【請求項5\_7】 標的核酸がDNAである、請求項44記載の方法。

【請求項5\_8】 工程(a)で提供されたマトリックスの複数のリガンドが、エポキシドを介したヒスタミン、エポキシドを介したヒスタミン、尿素を介したヒスチジン、スルフヒドリルを介したヒスチジン、ピリジルアラニン、ピリジルシステインからなる群より選択される、請求項44記載の方法。

【請求項5\_9】 標的核酸がプラスミドDNAである、請求項57記載の方法。

【請求項6\_0】 標的核酸がゲノムDNAである、請求項57記載の方法。

【請求項6\_1】 下記の工程を含む、pH依存型イオン交換マトリックスを製造する方法：

(a) 固相を提供する工程；

(b) 第一端及び第二端を有するアルキル鎖を含むリンカーを提供する工程；

(c) 共有結合が固相とリンカーアルキル鎖の第一端の間で形成されるような条件下で、固相及びリンカーを混ぜ、これによりリンカー-修飾された固相を形成する工程；

(d) 以下を含む酸性芳香族アミンを提供する工程：芳香族炭化水素環、ここで該環の少なくとも1個のメンバーはアミンであり；該芳香族炭化水素に共有結合したスペーサー、ここで該スペーサーは、アミノ末端を伴うスペーサーアルキル鎖を含み；及び、該スペーサーアルキル鎖に共有結合している酸性置換基；並びに

(e) 酸性芳香族アミンのスペーサーアルキル鎖のアミノ末端とリンカーの第二端の間に共有結合が形成されるような条件下で、リンカー-修飾された固相を、該酸性芳香族アミンと混ぜる工程。

【請求項6\_2】 工程(a)において提供された固相が、シリカベースの物質であり、

リンカーが、工程(c)において固相に、シリカ残基を介して共有結合し、ここでシリカ残基は、第一のサブユニット及び第二のサブユニットに共有結合し、ここで第一のサブユニットは、-OH、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>からなる群より選択され、かつ第二のサブユニットは、式-(OSiR<sup>1</sup><sub>2</sub>)<sub>x</sub>-R<sup>1</sup>により定義される(式中、R<sup>1</sup>は、第一のサブユニットと同じ基であり、かつxは少なくとも0である。)、請求項61記載の方法。

【請求項6\_3】 スペーサーが、システイン及びアラニンからなる群より選択される、請求項61記載の方法。

【請求項6\_4】 芳香族炭化水素環が、少なくとも5個のメンバーを有する、請求項61記載の方法。

【請求項6\_5】 酸性芳香族アミンが、ヒスタミン及びヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項61記載の方法。

【請求項6\_6】 下記の工程を含む、pH依存型イオン交換マトリックスを製造する方法：

(a) 固形基体を提供する工程；

(b) 下記を含む第一のイオン交換リガンドを提供する工程：

pKが約9未満であるアミンを含むキャップであり、ここでアミンは、第1級、第2級、又は第3級アミンからなる群より選択される；

該キャップに共有結合しているスペーサーであり、このスペーサーは、アミン末端を

伴うスペーサーアルキル鎖、スペーサーアルキル鎖に共有結合した酸性置換基を含む；並びに

第一端及び第二端を有するリンカーアルキル鎖を含むリンカーであり、ここで第二端がスペーサーのアミン末端に共有結合されている；

(c)共有結合が固相とリンカーアルキル鎖の第一端の間に形成されるような条件下で、固相及び第一のイオン交換リガンドを混ぜる工程。

【請求項 6\_7】 第一のイオン交換リガンドが、イミダゾールシリル尿素である、請求項66記載の方法。

【請求項 6\_8】 第一のイオン交換リガンドの酸性置換基が、メチル基により保護されたカルボキシル残基であり、ここでメチル基は工程(c)の後にカルボキシル基から除去される、請求項67記載の方法。

【請求項 6\_9】 前述の方法が更に、第二のイオン交換リガンド前駆体を固体基体に共有結合する工程を含み、ここで第二のイオン交換前駆体は、保護基でブロックされたイオン交換末端を含む、請求項66記載の方法。

【請求項 7\_0】 前述の方法が更に、第二のイオン交換前駆体から保護基を除去し、第二のイオン交換リガンドを形成する工程を含む、請求項69記載の方法。

【請求項 7\_1】 第二のイオン交換リガンドが、酸性pHでカチオン交換体である、請求項70記載の方法。

【請求項 7\_2】 第二のイオン交換リガンドが、酸性pHで負帯電している、請求項70記載の方法。

【請求項 7\_3】 固相に共有結合した複数の第一のイオン交換残基及び複数の第二のイオン交換残基の相対比が、固体基体表面上の電荷比を制御するようにデザインされ、これにより標的核酸物質に結合するための固体基体の結合親和性(更に利用可能な粒子表面の特性を保持する能力)を制御している、請求項70記載の方法。

【請求項 7\_4】 スペーサーが、システイン及びアラニンからなる群より選択される、請求項66記載の方法。

【請求項 7\_5】 キャップが更に、少なくとも5個のメンバーを有する芳香族炭化水素環を含む、請求項66記載の方法。

【請求項 7\_6】 酸性キャップ及びスペーサーが、ヒスタミン及びヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸を含む、請求項66記載の方法。

【請求項 7\_7】 下記の工程を含む、二元pH依存型イオン交換マトリックスの製造法：

(a)固体基体を提供する工程；

(b)下記を含む、第一のイオン交換リガンドを提供する工程：

pKが約9未満であるアミンを含むキャップであり、ここでアミンは、第1級、第2級、又は第3級アミンからなる群より選択される；

該キャップに共有結合されているスペーサーであり、このスペーサーは、アミン末端を伴うスペーサーアルキル鎖を含む；並びに

第一端及び第二端を有するリンカーアルキル鎖を含むリンカーであり、ここで第二端がスペーサーのアミン末端に共有結合されている；

(c)共有結合が固相とリンカーアルキル鎖の第一端の間に形成されるような条件下で、固相及び第一のイオン交換リガンドを混ぜる工程；

(d)第二のアルキル鎖及びそれに共有結合された酸性残基を含み、ここで酸性残基はそれに共有結合した保護基を有するような、第二のイオン交換リガンドを提供する工程；

(e)保護された第二のイオン交換リガンドと固相の間の共有結合の形成を促進する条件下で、固相に結合した第一のイオン交換リガンドを伴う固相を、第二のリガンドと混ぜる工程；並びに

(f)第二のアニオニン交換リガンドの酸性残基を、それから保護基を除去することにより脱保護する工程。

【請求項 7\_8】 第二のイオン交換リガンドがプロピオン酸残基である、請求項77記

載の方法。