

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年12月27日(27.12.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/235904 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 30/88 (2006.01) G01N 30/34 (2006.01)
B01D 15/32 (2006.01) G01N 30/50 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)
B01J 20/285 (2006.01) G01N 30/74 (2006.01)
G01N 30/26 (2006.01)

Hirobumi); 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目 1 3 番 9 号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP). 小木戸 謙(KOKIDO Yuzuru); 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目 1 3 番 9 号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/023650

(22) 国際出願日: 2018年6月21日(21.06.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-122345 2017年6月22日(22.06.2017) JP

(71) 出願人: 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K. K.) [JP/JP]; 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目 1 3 番 9 号 Tokyo (JP).

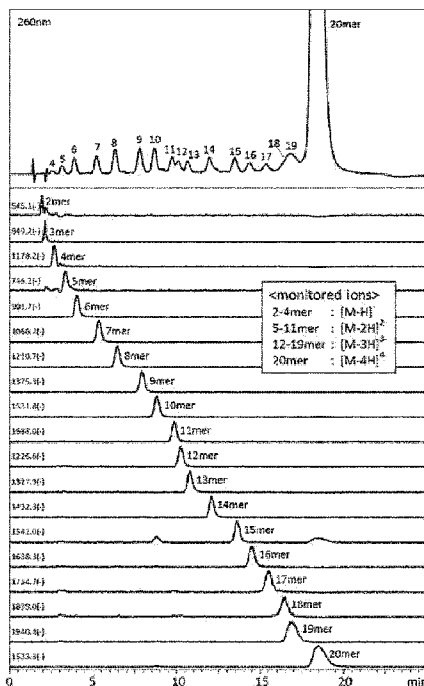
(72) 発明者: 貴家 潤治 (SASUGA Junji); 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目 1 3 番 9 号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP). 青木 裕史 (AOKI

(74) 代理人: 大家 邦久, 外 (OHIE Kunihiisa et al.); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町二丁目 1 4 番 6 号 セルバ人形町 6 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: SEPARATION/ANALYSIS METHOD FOR MIXTURE OF OLIGONUCLEOTIDES

(54) 発明の名称: オリゴヌクレオチドの混合物の分離分析方法



(57) Abstract: The present invention relates to a method for separating and analyzing a mixture of oligonucleotides by liquid chromatography which uses a column packed with a filler of porous particles constituted of a crosslinking organic polymer having diol immobilized on the surface thereof. According to this method, the separation/analysis can be performed at a higher sensitivity compared to cases where columns having silica gel as a base material are used, and the column can be washed with an alkaline solution.

(57) 要約: 本発明は、架橋有機高分子からなる多孔質粒子の表面にジオールが固定されてなる充てん剤を充てんしたカラムを用いた液体クロマトグラフィーによりオリゴヌクレオチドの混合物を分離分析する方法に関する。この方法によれば、シリカゲルを基材とするカラムよりも高感度で分離分析が行え、かつカラムをアルカリ性溶液による洗浄を行うことができる。

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：オリゴヌクレオチドの混合物の分離分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、オリゴヌクレオチドの混合物を液体クロマトグラフィーにより分離し分析する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、合成オリゴヌクレオチドの医療分野への応用に関心が高まっている。例えば、リボザイム、アプタマー、アンチセンス、及びRNA干渉（RNAi）などが挙げられ、これらはヌクレオチド医薬品と呼ばれている。

[0003] このようなオリゴヌクレオチドは、通常、ホスホロアミダイト法により合成される。この方法での生成物は、目的のオリゴヌクレオチドの他に、様々な鎖長を有するオリゴヌクレオチドや副反応に起因する不純物を含む。このため、合成オリゴヌクレオチドの分離・分析法についても種々検討されている。

[0004] 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）による方法は、低濃度の揮発性の塩を含む溶離液で実施できる。このため、質量分析計を検出器として使用でき、高感度の分析が可能になる。また、オリゴヌクレオチドの分取目的で分離を実施した場合も、溶離液からのオリゴヌクレオチドの分離における脱塩等の工程が容易になる点で優れている。

[0005] 非特許文献1にはシグマアルドリッチ社のAscentis Silicaカラムを用いた方法が記載されている。このカラムは直径3 μ mの多孔性未修飾シリカ基材（孔径12 nm）を充てん剤とする。溶離液として、ギ酸アンモニウム緩衝液／アセトニトリル混合溶液を用い、アセトニトリル濃度を下げるグラジエント法により、2量体から10量体の合成オリゴヌクレオチドを高度に分離したと報告されている。

[0006] また、非特許文献2には東ソー社のAmide-80カラムを用いた方法が記載されている。このカラムは直径3 μ mの多孔性シリカ基材（孔径8 n

m) にアミド基含有構造が結合された充てん剤を有する。溶離液はギ酸アンモニウム水溶液／アセトニトリル混合で、アセトニトリル濃度を下げるグラジエントを適用することにより、ホスホロチオネート化された15量体から20量体の合成オリゴヌクレオチドを高度に分離したと報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Journal of Chromatography A, 1255 (2012) 237-243

非特許文献2: Journal of Chromatography B, 1040 (2017) 282-288

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 従来のシリカ基材を利用する充てん剤を充てんしたカラムでは、シリカ基材が溶解するため、アルカリ性溶液の通液ができない。そのため、タンパク質やオリゴヌクレオチド、副反応物等の吸着によりカラムの分離性能が低下した時のそれらの除去による性能回復や、連続使用時の溶出画分へのキャリーオーバーの低減、カラムと装置の殺菌等に有効な、強アルカリ、特に水酸化ナトリウム水溶液による洗浄ができなかった。

加えて、オリゴヌクレオチドの医療分野等へのさらなる利用を考慮すれば、オリゴヌクレオチドのより優れた分離分析方法が望まれている。

したがって、本発明の課題は、アルカリ性溶液による洗浄を行うことができ、またオリゴヌクレオチドの分離分析が高感度で行える方法を提供することにある。

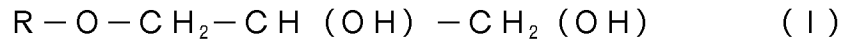
課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の分離分析方法を提供する。

[1] 架橋有機高分子からなる多孔質粒子の表面にジオールが固定されてなる充てん剤を充てんしたカラムを用いた液体クロマトグラフィーによりオリ

ゴヌクレオチドの混合物を分離分析する方法。

[2] 前記ジオールの構造が、式(1)



(式中、Rは多孔質粒子の部分構造を表す。)

で示される構造を含む前記1に記載の方法。

[3] 架橋有機高分子が架橋ポリビニルアルコールである前記1または2に記載の方法。

[4] 液体クロマトグラフィーの移動相(溶離液)が揮発性塩水溶液と水性有機溶媒の混合液である前記1から3のいずれか1項に記載の方法。

[5] カラムで分離されて溶出した成分を紫外可視光検出器及び／または質量分析計により検出する前記1から4のいずれか1項に記載の方法。

[6] 液体クロマトグラフィーを移動相のグラジエント溶出にて行う前記1から5のいずれか1項に記載の方法。

[7] 液体クロマトグラフィーの実施前または実施後に、カラムにpH10.0からpH13.0のアルカリ性溶液を通液してカラムを洗浄する工程を有する前記1から6のいずれか1項に記載の方法。

[8] オリゴヌクレオチドが合成オリゴヌクレオチドである前記1から7のいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、シリカ基材を利用する充てん剤を利用するカラムを用いた方法よりも高感度のオリゴヌクレオチドの分離分析を行うことができる。

また、カラムの洗浄にアルカリ性溶液を用いることができることから、カラムの洗浄及び殺菌を簡便に行うことができ、さらに、医薬品目的のオリゴヌクレオチドの分取がより容易になる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例1で得られた紫外検出法(波長260nm)クロマトグラム、及び質量分析法マスキロマトグラム。

[図2]比較例1で得られた紫外検出法(波長260nm)クロマトグラム、及

び質量分析法マスキロマトグラム。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明の一実施態様におけるオリゴヌクレオチドの混合物の分離分析方法は、オリゴヌクレオチドの混合物を液体クロマトグラフィーにより分離し分析する方法であり、その液体クロマトグラフィー用のカラムの充てん剤として架橋有機高分子からなる多孔質粒子の表面にジオール構造が固定されてなるものを用いる。
- [0013] オリゴヌクレオチドの混合物とは、典型的には、オリゴヌクレオチドの合成により得られた反応混合物である。例えば、固相担体上でヌクレオチドモノマーを連続的に反応させて合成したものであり、ホスホロアミダイト法により合成されたヌクレオチドオリゴマーが挙げられる。合成オリゴヌクレオチドの目的の鎖長は10から110量体である。本発明による方法では、試料としては、10から70量体が好ましく分離され、19から62量体がさらに好ましく分離される。
- [0014] カラムの充てん剤の基材として用いる架橋有機高分子としては、架橋（メタ）アクリル系樹脂や、架橋ポリビニルアルコール（PVA）などが好ましい。架橋（メタ）アクリル系樹脂を用いる場合は、モノマー単位に水酸基、あるいは水酸基に変換可能な官能基を持つモノマー単位を含む必要がある。強アルカリ性条件でも使用可能であるという面で、架橋ポリビニルアルコールがより好ましい。
- [0015] 架橋ポリビニルアルコールは、酢酸ビニルと、トリアリルイソシアヌレート等の不飽和二重結合を複数有する架橋性モノマーを共重合させた後に、けん化させて得られる。共重合体のモノマー組成の質量比に関して特に制限はないが、その後のジオール基を導入する反応処理により十分な親水性を発現させるためには、全モノマー中、架橋性モノマーの比率を90質量%以下にすることが好ましく、80質量%以下にすることがより好ましく、70質量%以下にすることがさらに好ましい。また多孔質粒子を液体クロマトグラフィー用充てん剤として利用する場合の実用上の機械的強度を確保するために

は、全モノマー中、架橋性モノマーの比率を10質量%以上にすることが好ましく、20質量%以上にすることがより好ましく、30質量%以上にすることがさらに好ましい。機械的強度が不足すると、移動相を送液した際に発生する圧力により充てん剤が変形しカラムを閉塞することにより装置が使用可能な圧力範囲を超えてしまう場合がある。

- [0016] けん化によって得られた架橋ポリビニルアルコールの水酸基の密度は1.2 mmol/gから10.5 mmol/gの範囲であることが好ましく、1.6 mmol/gから9.3 mmol/gの範囲であることがより好ましく、2.0 mmol/gから8.0 mmol/gの範囲であることがさらに好ましい。この範囲にすることで、粒子表面にジオールを導入するためのグリシドールが十分付加することができ、充てん剤に適正な親水性を付与できる。

水酸基の密度は、水酸基に反応する試薬を反応させた後に生じる、多孔質粒子の増加質量から計算で求めることができる。例えば、実施例に示した方法などが好ましく用いることができる。

- [0017] 前記架橋性有機高分子を多孔質の粒子として得る方法としては、モノマー、モノマーと相溶する非重合性の有機溶剤及び重合開始剤を混合して得た油相を水相に懸濁させ所望の大きさの油滴とし、続いて加熱攪拌することによって粒子を得る懸濁重合法が一般的である。そのほか、油相をSPG（シラスポーラスガラス）膜に代表される多孔質膜、あるいは石英基板に形成されたマイクロ流路を通じて水相中に滴下させて所望の大きさの粒子を形成する方法が用いられる。いずれの粒子形成方法とも、油相に混合した非重合性の有機溶剤が占める容積が細孔を形成する。このようにして造粒された油相は、引き続き水相中で加熱攪拌することにより重合反応を進行させ、架橋性重合体として強度が付与される。重合反応後、有機溶剤を用いた洗浄により非重合性有機溶剤等を除去し多孔質体として得る。

- [0018] 前記粒子は、球状であることが好ましい。

粒子の粒径としては、十分な分離性能及び高感度を得るために体積平均粒

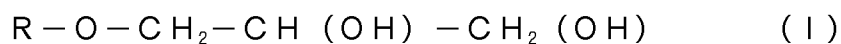
径として1から30 μm が好ましい。過剰な圧力上昇を招きにくい点を考慮すれば、体積平均粒径として3から10 μm がさらに好ましく、3から5 μm が特に好ましい。

体積平均粒径の測定は、コールターカウンターあるいは画像解析式粒度分布測定器で行うことができる。所望の粒径を得るために、メッシュを用いた篩分級や、風力分級機を用いた粒径制御を行うこともできる。

[0019] 多孔質を形成する細孔の大きさとしては、分離性能と機械的強度とを両立するために平均細孔径として3から30 nmが好ましく、10から25 nmが十分な分離性能を得る点においてさらに好ましい。細孔径が小さすぎると、比表面積が小さくなり親水性相互作用を発現する能力が十分に得られない場合がある。細孔径が大きすぎると機械的強度が保てず、カラム内に発生する圧力により粒子がつぶれてしまう場合がある。

平均細孔径の測定は、ガス吸着式比表面積測定器を用いて行うことができる。

[0020] 本発明の一実施態様におけるカラム用充てん剤は前記の架橋有機高分子からなる多孔質粒子の表面にジオールが固定されてなる構造を有するものである。好ましいジオールの構造としては、隣り合った炭素原子に1つずつの水酸基が結合している構造である。より好ましくは、粒子の表面に、式(1)



(式中、Rは多孔質粒子の部分構造を表す。)

で示される構造を有するものである。

粒子表面に固定されたジオール構造の量は、多孔質粒子の質量に対して0.2 mmol/gから8 mmol/gが好ましく、さらに好ましくは0.5から4 mmol/gである。

[0021] この構造は、表面に水酸基を有する架橋有機高分子からなる多孔質粒子に、グリシドールのような水酸基とエポキシ基を有する化合物を反応させることにより、製造することができる。グリシドールの反応は、アルカリ性条件でも、酸性条件でも実施することができる。

[0022] 液体クロマトグラフィーに使用する移動相（溶離液）としては、揮発性塩水溶液と水溶性有機溶媒の混合液が好適に用いられる。揮発性塩としてはギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウムなどが挙げられる。水溶性有機溶媒としては炭素数 1 から 3 のアルコール化合物やニトリル化合物が好ましい。好ましい混合液は、ギ酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルの組み合わせである。

揮発性塩水溶液の濃度は特に制限はないが、1 から 100 mM が好ましく、5 から 70 mM がさらに好ましく、20 から 50 mM が特に好ましい。揮発性塩水溶液の pH はオリゴヌクレオチドが溶出される範囲であれば制限はなく、5.0 から 9.0 が好ましく、6.5 から 7.5 がさらに好ましい。

揮発性塩水溶液と水溶性有機溶媒の混合比率は、特に制限はない。混合比率は混合前の体積を用いて表される。水溶性有機溶媒の比率は、塩の析出やオリゴヌクレオチドの溶解性の問題が生じない程度まで、高めることができる。また、水溶性有機溶媒の比率は、親水性相互作用が、十分に働く程度にまで低くすることができる。通常は、水溶性有機溶媒の比率は、30% から 90% が好ましい。

[0023] 本発明の典型的な分離分析方法は、以下の通りである。

上記の充てん剤を充てんしたカラムを液体クロマトグラフに取り付け、あらかじめ適切な溶離液（移動相）を通過してカラムを平衡化する。次いで、試料であるオリゴヌクレオチドの混合物を同溶離液に溶解した溶液を注入して液体クロマトグラフィーを行う。

通過する溶離液中の水溶性有機溶媒濃度を順次減少させる、いわゆるグラジエント溶出法を採用することもできる。グラジエント溶出することにより、オリゴヌクレオチドの合成過程に含まれる不純物と目的のオリゴヌクレオチドとの分離を一層容易にすることができる。その後は、再度平衡化時に通過した溶離液を通過し、カラムを平衡化させる。

[0024] 測定時のカラム温度は 25 から 80℃ が好ましく、30 から 60℃ がさらに好ましく、40 から 50℃ が最も好ましい。

[0025] 液体クロマトグラフィーの装置としては、市販のものが使用できる。例えば、株式会社島津製作所製 N e x e r a（登録商標）やウォーターズ社製 A c q u i t y（登録商標）等の装置が挙げられる。

[0026] カラムについても、上記で規定する範囲ものであれば市販のものを使用することができる。例えば、昭和電工株式会社製 S h o d e x（登録商標） H I L I C p a k（登録商標） V N - 5 0 2 D（内径 2.0 mm×長さ 150 mm、粒子径 5 μ m）等が使用できる。

[0027] 液体クロマトグラフィーの検出は、例えば、紫外／可視光検出器（U V／V i s 検出器）、質量スペクトルを利用する質量分析計（M S）などが挙げられる。紫外／可視光検出器の場合、検出波長は、例えば、260 nm が挙げられる。

紫外／可視光検出器は主として定量分析、質量分析計は主として定性分析に使用することができ、これらは組み合わせて使用することもできる。

[0028] 本発明の一実施態様で使用する充てん剤は、アルカリ性条件下で安定であるという性質を有する。そのため、液体クロマトグラフィーによる分離分析を実施した後、アルカリ性溶液を通液することによりカラムを洗浄することができる。これにより、カラムに混入し充てん剤に吸着したタンパク質やオリゴヌクレオチド、副反応物等を分解除去したり、カラム内部を殺菌することができるので、オリゴヌクレオチドの分取目的で液体クロマトグラフィーを実施する場合に好都合である。

アルカリ性溶液の通液は、必要に応じて、液体クロマトグラフィーの実施前あるいは実施後のいずれも行うことができる。

[0029] シリカゲルを基材として用いた充てん剤は、シリカゲルが溶解してしまうために、通常 p H 8 以上の条件では使用できない。このことからアルカリ性溶液は使用できない。本発明の一実施態様で使用する充てん剤は、基材が架橋有機高分子からなるため、使用する架橋有機高分子の性質に応じた p H のアルカリ性溶液を使用できる。特に、架橋ポリビニルアルコールを基材とする充てん剤は、通常使用するアルカリ性溶液で劣化しないため、アルカリ性

溶液をカラム洗浄等に使用することができる。

[0030] 洗浄に使用するアルカリ性溶液は、 pH 10.0から13.0のアルカリ性を示すものであれば特に限定されない。洗浄の効果や経済性を考慮すると、0.01 Mから0.1 Mの水酸化ナトリウム水溶液が好適である。

[0031] 架橋有機高分子からなる多孔質粒子の表面にジオール構造が固定された充てん剤を用いた場合に、シリカゲルを用いた充てん剤を用いるよりも高度な分離が得られる理由は不明であるが、シリカゲルを用いたカラムでは、シラノールに由来する弱いイオン相互作用が同時に働くなどの影響が考えられ、これが親水性の差を利用する親水性相互作用クロマトグラフィーにおいて、分離の悪化を起こしている可能性が考えられる。

実施例

[0032] 以下に実施例及び比較例を挙げて本発明を具体的に説明する。

[0033] カラムの作製

実施例で使用したカラムは以下の通り作製した。

(1) 基材の製造

酢酸ビニル 100 g、トリアリルイソシアヌレート 150 g、酢酸ブチル 100 g、 n -デカン 25 g 及び 2, 2-アゾビスイソブチロニトリル 5 g よりなる均一混合液と、ポリビニルアルコール（株式会社クラレ製 PVA 224）12 g 及びリン酸水素二ナトリウム 18 g を水 1200 mL に溶解した水溶液を還流冷却器を備えた 5 L の三口フラスコに入れ 10 分撹拌した。次いで、窒素ガス気流下で撹拌しつつ、60℃で16時間重合を行い、粒状共重合体を得た。この共重合体をろ過、50℃の温水で洗浄し、アセトンにて洗浄した後乾燥した。次いでこの共重合体を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 3 L とともに還流冷却器、窒素ガス導入管及び撹拌器を備えた 5 L の三口フラスコに入れ、窒素気流下で 15℃、20 時間撹拌してこの共重合体のけん化を行い、ろ過、水洗、乾燥及び風力分級処理をし、架橋ポリビニルアルコール共重合体からなる多孔質粒子を得た。けん化によって得られたポリビニルアルコール共重合体の水酸基の密度は 2.1 mmol/g であった。画像

解析式粒度分布測定装置（シスメックス株式会社製 F P I A 3 0 0 0）により粒径測定を行った結果、体積平均粒径は $4.8 \mu\text{m}$ であった。またガス吸着式比表面積測定装置（日本ベル株式会社製 B E L S O R P（登録商標）— m i n i）により測定した平均細孔径は 13 nm であった。

なお、水酸基密度の測定は以下の手順で行った。

約 2 g の試料（ポリビニルアルコール共重合体）を 60°C で 6 時間真空乾燥し、その後、精密天秤にて正確に質量を測定する。 50 mL 三角フラスコに秤量した試料全量と、無水酢酸 17 mL とピリジン 33 mL の混合液を手早く投入し、次いで三角フラスコの上部に玉入冷却管を設置し、さらに冷却管上部から窒素ガスを静かに通気しフラスコ内の空気を追い出す。そのままマグネティックスターラーで攪拌しながら、オイルバスで 90°C 16 時間加熱する。加熱終了後、メタノールを少量ずつ計 15 mL 加え、グラスフィルターで試料をろ過する。さらにメタノール 90 mL で洗浄した後、 60°C で 6 時間真空乾燥する。乾燥後の試料を精密天秤にて正確に質量測定し、無水酢酸を反応させる前との質量差を計算する。基材の水酸基にエステル付加した酢酸フラグメント ($\text{CH}_3\text{CO}-$ ：分子量 43) が質量増に相当するので、これにより試料質量当たりの水酸基密度（単位： mmol/g ）が算出される。

[0034] (2) ジオールの導入

上記 (1) で得られた多孔質粒子 10 g 、グリシドール 10 g 、カリウム— t e r t —ブトキシド 1 g 及びジエチレングリコールジメチルエーテル 100 mL をセパラブルフラスコに入れ、 60°C で 20 時間攪拌し、多孔質粒子にグリシドールを付加した。得られた粒子を、水、メタノールで洗浄後、乾燥し、充てん剤 1 とした。グリシドール付加量を質量測定により算出したところ、多孔質粒子の質量当たり 2 mmol/g であった。

[0035] (3) カラムハウジングへの充填

得られた充てん剤 1 を水に分散させてスラリーとし、送液ポンプを用いて内径 2.0 mm 、長さ 150 mm の P E E K 製のカラムハウジング（株式会

社巴製作所製)に15MPaの一定圧力にて10分間送液加圧充填し、カラムを得た。

[0036] 実施例1

(1) カラムの平衡化工程

装置の液体クロマトグラフ／質量分析計は株式会社島津製作所製で、システムコントローラーCBM-20A、脱気装置DGU-20A5R、送液ユニットLC-30AD（高圧グラジエント対応のため2台）、オートサンプラーSIL-30AC、カラムオープンCTO-20AC、フォトダイオードアレイ検出器SPD-M20A、三連四重極型質量分析計LCMS-8030から構成されたものを用いた。カラム温度は40℃とし、溶離液として50mMギ酸アンモニウム水溶液／アセトニトリル=38／62（混合前の体積比）を、0.2mL／分で2mL以上通液して、カラムを平衡化した。

[0037] (2) 分析用サンプルの準備工程

ユーロフィンジェノミクス株式会社より購入した合成オリゴヌクレオチド20量体（商品名：スタンダードオリゴ50nmolスケール品salt-freeグレード；配列番号1（5'-ATACCGATTAAAGCGAAGTTT-3'）で表される塩基配列）を前記溶離液で溶解し、合成オリゴヌクレオチドの濃度が1mg／mLになるように分析用サンプルを調製した。

[0038] (3) 合成オリゴヌクレオチドの注入工程

調製した分析用サンプル1μLを(1)の工程で平衡化したカラムに注入した。

[0039] (4) 合成オリゴヌクレオチドと不完全長不純物の分離溶出工程

溶離液はリニアグラジエントで、初めの10分でアセトニトリル比率を56%（混合前の体積%。以下同様）まで減少させる勾配とし、次の20分までアセトニトリル比率を56%に維持することにより、合成オリゴヌクレオチドや不純物を分離して溶出させた。20.01分から25分は62%に戻し、カラムの平衡化を行い、次の分析に備えるようにした。

検出は、まずフォトダイオードアレイ検出器で190 nmから350 nmをモニターした。クロマトグラムは260 nmで表示した。さらにフォトダイオードアレイ検出器の直後に配置された質量分析計で合成オリゴヌクレオチドや不完全長不純物をSIM（選択イオンモニタリング）法でモニターした。

結果は図1に示すように、UVクロマトグラム、マスキロマトグラムとも保持時間18.5分に合成オリゴヌクレオチドの20量体のピークが観測され、その前の2分から17分には2量体から19量体の不完全長不純物のピークが分子量順に観測された。

分析後のカラムに、0.1 N水酸化ナトリウム水溶液を0.2 mL／分で2 mL通液して、カラムを洗浄した。この後、カラムの平衡化を行い、再度、合成オリゴヌクレオチドの分析を行ったところ、カラム圧、分析結果に変化はなかった。

[0040] 比較例1

カラムとして株式会社ワイエムシー製YMC pak Diol-120-NP（内径2.0 mm×長さ150 mm、粒子径5 μm）を用いた他は、実施例1と同様にして合成ヌクレオチドの分離を行った。このカラムの充てん剤は、基材としてのシリカゲルにジオールを結合させたものである。

結果は図2に示すように、UVクロマトグラム、マスキロマトグラムとも保持時間14分に合成オリゴヌクレオチドのピークが観測された。UVクロマトグラムでは、その前の2分から13.5分には2量体から19量体の不完全長不純物のピークが分子量順に観測された。実施例1に比べると、5量体から9量体のピーク形状が悪く、11量体から13量体の分離が悪かった。マスキロマトグラムでは、実施例1に比べるとすべてのピークでシグナル／ノイズ比が悪く、15量体から19量体は検出できなかった。

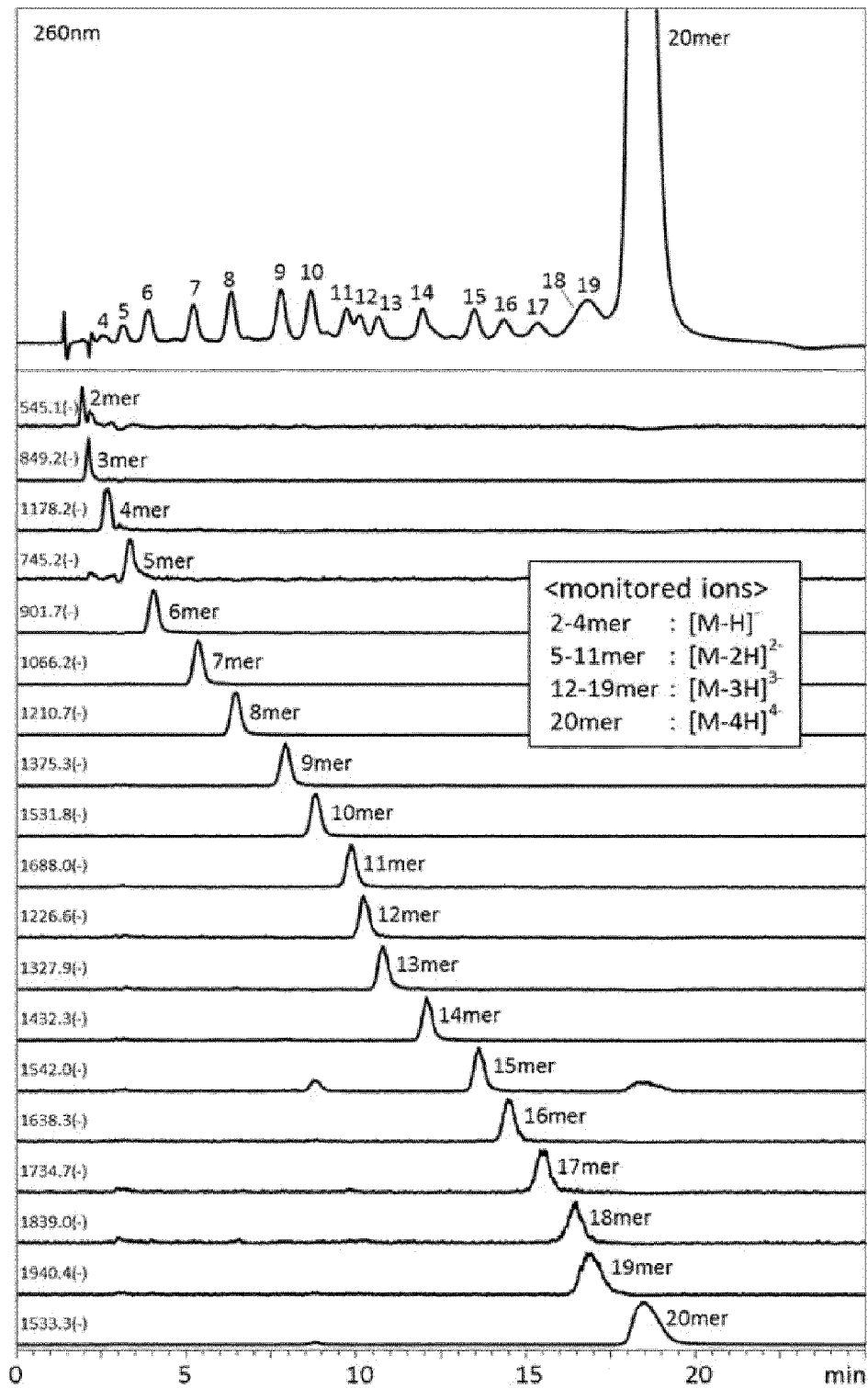
このカラムはシリカゲルを基材とするカラムであるため、アルカリ水溶液による洗浄は行わなかった。

請求の範囲

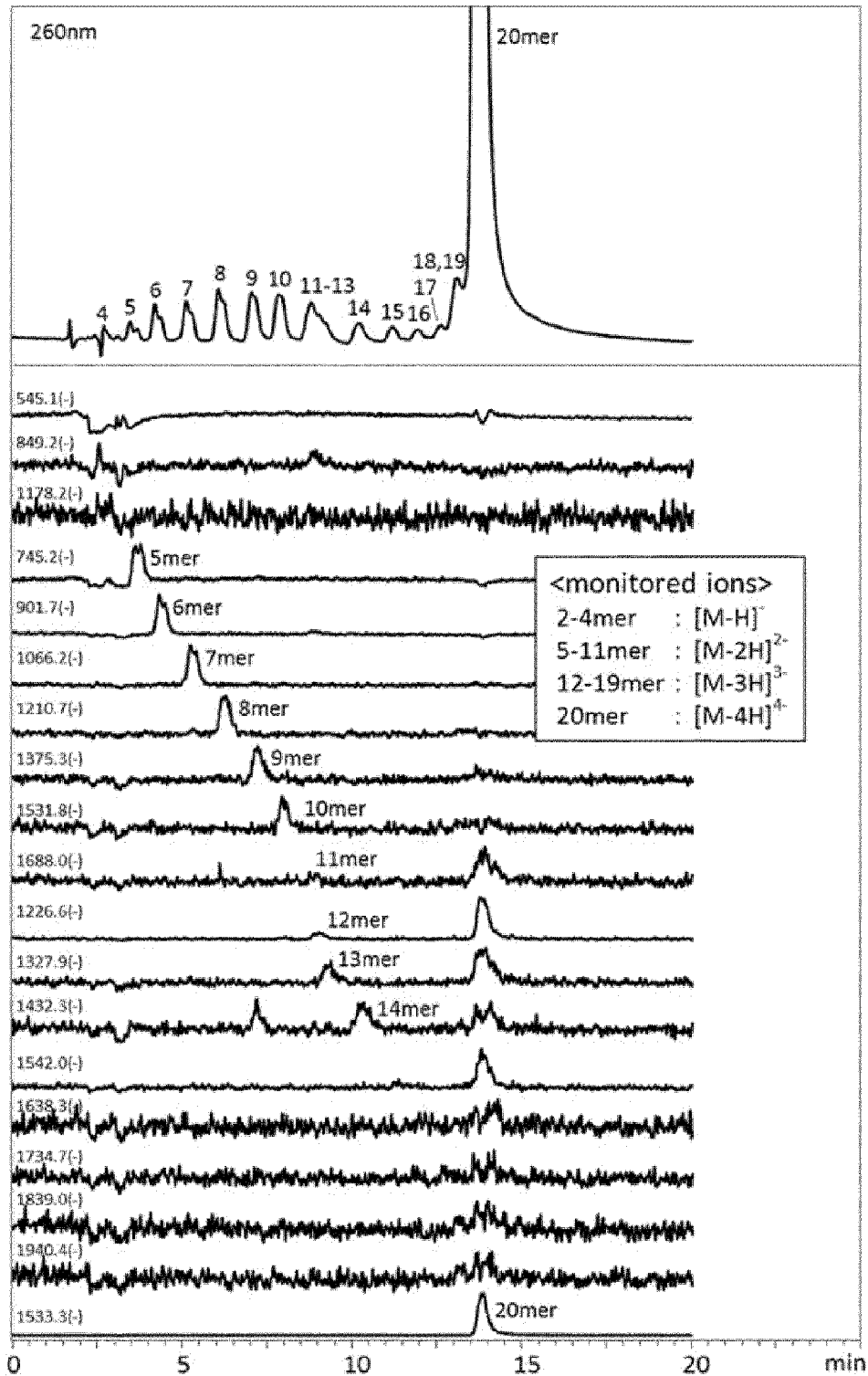
- [請求項1] 架橋有機高分子からなる多孔質粒子の表面にジオールが固定される充てん剤を充てんしたカラムを用いた液体クロマトグラフィーによりオリゴヌクレオチドの混合物を分離分析する方法。
- [請求項2] 前記ジオールの構造が、式（1）
$$R-O-CH_2-CH(OH)-CH_2(OH) \quad (1)$$

（式中、Rは多孔質粒子の部分構造を表す。）
で示される構造を含む請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 架橋有機高分子が架橋ポリビニルアルコールである請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 液体クロマトグラフィーの移動相が揮発性塩水溶液と水溶性有機溶媒の混合液である請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] カラムで分離されて溶出した成分を紫外可視光検出器及び／または質量分析計により検出する請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 液体クロマトグラフィーを移動相のグラジエント溶出にて行う請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 液体クロマトグラフィーの実施前または実施後に、カラムにpH10.0からpH13.0のアルカリ性溶液を通液してカラムを洗浄する工程を有する請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] オリゴヌクレオチドが合成オリゴヌクレオチドである請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/023650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, B01D15/32(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i,
B01J20/285(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/34(2006.01)i,
G01N30/50(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N30/74(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N30/88, B01D15/32, B01J20/281, B01J20/285, G01N30/26, G01N30/34,
G01N30/50, G01N30/72, G01N30/741

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-529431 A (DIONEX CORPORATION) 26 August 2010, claims	1
Y	1, 22, paragraphs [0003]-[0004], [0043] & US 2008/0293959	3-8
A	A1, claims 1, 22 & WO 2008/147717 A1, claims 1, 22 & EP 2150339 A1, claims 1, 22	2
Y	WO 2016/190043 A1 (SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA) 01 December 2016, claims 1, 6, paragraphs [0022]-[0027], [0032] (Family: none)	3-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 August 2018 (27.08.2018)

Date of mailing of the international search report
04 September 2018 (04.09.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/023650

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-524166 A (SCINOPHARM TAIWAN, LTD.) 12 August 2016, claims 1-8, paragraphs [0008], [0029] & WO 2015/005928 A1, claims 1-8 & EP 3019861 A1, claims 1-8 & CA 2917460 A1, claims 1-8	5-6, 8
A	WO 2016/009077 A1 (HEXAL AG) 21 January 2016, entire text & JP 2017-524128 A & US 2017/0205423 A1 & EP 2975401 A1	1-8
A	JP 58-20235 A (YOKOGAWA ELECTRIC WORKS LTD.) 05 February 1983, entire text & US 4447559 A & GB 2105213 A & DE 3226523 A1	1-8
A	ALPERT, J. Andrew, "HYDROPHILIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF PEPTIDES, NUCLEIC ACIDS AND OTHER POLAR COMPOUNDS", Journal of Chromatography, 1990, 499, pp. 177-196	1-8
A	JP 2007-522476 A (VARIAN, INC.) 09 August 2007, entire text & US 2005/0178730 A1 & WO 2005/079975 A1 & EP 1711258 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, B01D15/32(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i, B01J20/285(2006.01)i,
G01N30/26(2006.01)i, G01N30/34(2006.01)i, G01N30/50(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i,
G01N30/74(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/88, B01D15/32, B01J20/281, B01J20/285, G01N30/26, G01N30/34, G01N30/50, G01N30/72, G01N30/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2010-529431 A (ダイオネックス コーポレーション) 2010.08.26, 請	1
Y	求項 1, 22, [0003]-[0004], [0043] & US 2008/0293959 A1, Claims 1, 22 & WO	3-8
A	2008/147717 A1, Claims 1, 22 & EP 2150339 A1, Claims 1, 22	2
Y	WO 2016/190043 A1 (昭和電工株式会社) 2016.12.01, 請求項 1, 6, [0022]-[0027], [0032] (ファミリーなし)	3-8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.08.2018

国際調査報告の発送日

04.09.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高田 亜希

2 J

5705

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2016-524166 A (サイノファーム タイワン, リミティド) 2016.08.12, 請求項 1-8, [0008], [0029] & WO 2015/005928 A1, Claims1-8 & EP 3019861 A1, Claims1-8 & CA 2917460 A1, Claims1-8	5-6, 8
A	WO 2016/009077 A1 (HEXAL AG) 2016.01.21, 全文 & JP 2017-524128 A & US 2017/0205423 A1 & EP 2975401 A1	1-8
A	JP 58-20235 A (株式会社横河電機製作所) 1983.02.05, 全文 & US 4447559 A & GB 2105213 A & DE 3226523 A1	1-8
A	ALPERT J. ANDREW, HYDROPHILIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF PEPTIDES, NUCLEIC ACIDS AND OTHER POLAR COMPOUNDS, Journal of Chromatography, 1990, 499, P177-196	1-8
A	JP 2007-522476 A (バリアン・インコーポレイテッド) 2007.08.09, 全文 & US 2005/0178730 A1 & WO 2005/079975 A1 & EP 1711258 A1	1-8