

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4593785号
(P4593785)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 30/88 (2006.01)

B O 1 D 15/08 (2006.01)

B O 1 J 20/26 (2006.01)

G O 1 N 30/88 1 O 1 S

B O 1 D 15/08

B O 1 J 20/26 H

G O 1 N 30/88 2 O 1 G

G O 1 N 30/88 2 O 1 X

請求項の数 18 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-570305 (P2000-570305)
 (86) (22) 出願日 平成11年9月8日(1999.9.8)
 (65) 公表番号 特表2002-525558 (P2002-525558A)
 (43) 公表日 平成14年8月13日(2002.8.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/020596
 (87) 国際公開番号 W02000/015778
 (87) 国際公開日 平成12年3月23日(2000.3.23)
 審査請求日 平成18年8月30日(2006.8.30)
 (31) 優先権主張番号 09/154,529
 (32) 優先日 平成10年9月16日(1998.9.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 599060928
 バリアン・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州、パロ・
 アルト、ハンセン・ウェイ 3 1 2 0
 (74) 代理人 100087701
 弁理士 稲岡 耕作
 (74) 代理人 100101328
 弁理士 川崎 実夫
 (72) 発明者 ハッチ、リチャード
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4
 7 0 2、パークレー、バーネット ストリ
 ート 1 2 5 4 番地

審査官 河野 隆一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 逆相イオン対高速液体クロマトグラフィーにより核酸を分離するためのモノリシックマトリックス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含有する混合物を分離する方法であって、
 前記混合物を支持体によって固定された多孔性モノリシック重合体マトリックスに適用し、

前記モノリシック重合体マトリックスが(i) C₃ないし C₃₀アルキルメタクリレートから選択される、単量体、または単量体の組み合わせ、(ii) 架橋剤、および(iii) ポロゲン溶媒のみから実質的になる重合混合物から形成され、

前記ポロゲン溶媒が脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル、アルコール、ケトン、エーテル、およびそれらの混合物からなる群から選択され、

さらに、イオン対形成剤を含む溶出剤を前記モノリシック重合体マトリックスに流すことによるイオン対逆相クロマトグラフィーによって、前記混合物を分離することを含んでなる方法。

【請求項 2】

前記イオン対形成剤が少なくとも 1 種の前記ポリヌクレオチドの負に荷電したリン酸塩基および前記モノリシック重合体マトリックスとも相互作用し得る請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記イオン対形成剤がアルキルアンモニウム塩である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記混合物が約 2 0 6 8 5 k P a 未満の駆動力を受ける請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記支持体が円形の横断面を有するカラムチューブである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記支持体が多角形の横断面を有するカラムチューブである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記支持体がプレートである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記モノリシック重合体マトリックスが前記プレートに形成された溝の中に保持されている請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記モノリシック重合体マトリックスが前記プレート上で薄いフィルムの形態をとっている請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記支持体がチップであり、かつ、前記マトリックスが前記チップに形成された微細加工溝の中に保持されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記チップに複数の微細加工溝が形成されており、かつ、前記チップ上で実質的に同時に複数の分離が実施される請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

マクロ多孔性モノリシックメタクリレートをベースとする重合体マトリックスを保持する支持体を含んでなり、前記重合体マトリックスが (i) C_3 ないし C_{30} アルキルメタクリレートから選択される、単量体、または単量体の組み合わせ、(ii) 架橋剤、および (iii) ポロゲン溶媒のみから実質的になる重合混合物から形成され、

前記ポロゲン溶媒が脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル、アルコール、ケトン、エーテル、およびそれらの混合物からなる群から選択されるクロマトグラフィー装置。

【請求項 13】

重合体マトリックスが 0 . 6 より大きい気孔率を有する請求項 12 に記載のクロマトグラフィー装置。

【請求項 14】

逆相イオン対クロマトグラフィーによってポリヌクレオチドを分離するためのキットであって、

C_3 ないし C_{30} アルキルメタクリレートから選択される、単量体、または単量体の組み合わせ、架橋剤、およびポロゲン溶媒のみから実質的になる重合マトリックス、および

前記ポリヌクレオチドの負に荷電したリン酸塩基および前記単量体の疎水表面基とも相互作用し得るイオン対形成剤を含んでなり、

前記ポロゲン溶媒が脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル、アルコール、ケトン、エーテル、およびそれらの混合物からなる群から選択されるキット。

【請求項 15】

逆相イオン対クロマトグラフィーによってポリヌクレオチドを分離するためのキットであって、

(i) C_3 ないし C_{30} アルキルメタクリレートから選択される、単量体、または単量体の組み合わせ、(ii) 架橋剤、および (iii) ポロゲン溶媒のみから実質的になる重合混合物から形成されるモノリシック重合体マトリックス、および

前記ポリヌクレオチドの負に荷電したリン酸塩基および前記単量体の疎水表面基とも相互作用し得るイオン対形成剤を含み、

前記ポロゲン溶媒が脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル、アルコール、ケトン、エーテル、およびそれらの混合物からなる群から選択されるキット。

【請求項 16】

前記モノリシック重合体マトリックスは、直径の範囲が 1 0 n m ~ 5 0 0 0 n m である

10

20

30

40

50

孔を有する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記モノリシック重合体マトリックスは、直径が少なくとも 1 μm である孔を有する請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ポロゲン溶媒が、イソオクタンと、2 - オクタノン、トルエン、またはエチルプロプリオネートおよびイソオクタンの組み合わせとからなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【発明の属する技術分野】

本発明は生物有機分子の分離に関する。特に、本発明は逆相イオン対形成クロマトグラフィーによってポリヌクレオチドを分離するためのモノリシック重合体マトリックスを提供する。

【0002】

【従来の技術】

ポリヌクレオチド分離は近年ますます重要なものとなっている。サンプル中に含まれるポリヌクレオチド種を分離することは、例えば、増幅反応の産物である DNA の検出および / または定量において、および変異体 DNA (例えば、多形または変異) の検出において有用である。しかしながら、多分に、かかる分子の構造が複雑でサイズが大きいため、現在までに考案された分離技術のうち完全に申し分ないと証明されたものはない。

20

【0003】

従来は、ポリヌクレオチド分離はスラブゲル電気泳動、またはより最近ではキャピラリー電気泳動などの電気泳動法を用いて実施されてきた。一般に、これらの方法は注目される種を含有する混合物が注入されている媒質に電流を通すことを含んでいる。各種の分子は、その電荷および大きさによって異なる速度で媒質中を移動する。残念ながら、この電気泳動法はある不利な点と関連している。例えば、スラブゲル電気泳動は相対的に遅い速度、サンプルの検出が困難、定量性に乏しい、かつ、大きな労働力を要するという欠点がある。キャピラリー電気泳動はより迅速で、かつ、あまり労働力を要求しないものの、毛管性能の変化および相対的に乏しい定量性のために分離の再現性がないという欠点がある。

30

【0004】

液体クロマトグラフィーは電気泳動分離法の代替法を提供してきた。一般に、液体クロマトグラフィー法は、流動する移動相と固定相間の分配挙動における差異によって混合物中の成分を分離する。カラムチューブ、またはその他の支持体が固定相を保持し、移動相がそれを通してサンプルを運ぶ。固定相に強く分配するサンプル成分はカラム中でより長い時間を費やし、主として移動相にとどまり、カラムをより迅速に通る成分と分離される。成分がカラムから溶出するにつれて、検出器によって定量し、かつ / またはさらなる分析のために回収することができる。

【0005】

40

液体クロマトグラフィーにおいて用いられる、典型的な固定相および溶質とそれらの相互作用は以下のとおり。

【0006】

【表 1】

名前	固定相	相互作用
サイズ 排除	多孔性不活性粒子	サンプルを溶液中のそれらの大きさによって分離する；異なる大きさの分子はカラムを通る異なる総通過時間を有する。
イオン 交換	樹脂上のイオン基	サンプルイオンを充填物のイオノゲン基上にすでにあるイオンと交換する；保持はその部位の種々のイオンの親和性およびいくつかのその他の溶液パラメーター（pH、イオン強度、対イオンの種類など）に基づいている。
逆相	樹脂上の非極性基	サンプルを固定相との疎水性相互作用に基づいて分離する。

10

【 0 0 0 7 】

液体クロマトグラフィー法は電気泳動分離技術に関し、いくつかの利点を有するものの、欠点がないわけではない。サイズ排除クロマトグラフィーは分離能が低いという欠点があるので、典型的には、許容される分離能を得るにはDNA分子はサイズが50～100%違ったものでなければならない。イオン交換クロマトグラフィーは高い分離能を提供するが、DNA配列組成に基づく変則的な溶出順序に影響され得る。イオン交換クロマトグラフィーに関してはまた、溶出されたDNAが不揮発性バッファーで著しく汚染されていることも多く、これによりサンプル回収はさらに複雑なものとなり得る。逆相クロマトグラフィーは相対的に高い分離能を持ち得るが、固定相として特に小さな直径の粒子を用いないと超高速では実施できない。逆相クロマトグラフィーに用いられるシリカをベースとする粒子は、高pH条件では低速および不安定という欠点があった。重合粒子はサンプル成分の高回収率または高い分離速度を提供することができなかった。

20

【 0 0 0 8 】

特にDNA分離に関しては、逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー（RP-IP HPLC）として知られている技術が上記で論じられたいくつかの問題から、限られた量ではあるが軽減をもたらしてきた。例えば、RP-IP HPLCは強力な陰イオン交換体を含む充填層で起こることが多い変則的な溶出順序という問題を防止する。RP-IP HPLCでは、典型的には固定相はカラムに充填された疎水性表面基を有する個々の粒子からなる。溶出剤はDNA上の負に荷電したリン酸塩基ともカラム中の粒子の疎水性表面とも相互作用し得るトリエチルアンモニウムイオン（0.1M）などの陽イオン種を含んでいる。従って、陽イオン種はDNAとカラムの間を結合する分子と考えられる。移動相が、例えばアセトニトリルの濃度を高めることで、徐々に有機性になるにつれ、DNA断片は大きさの順に溶出される。

30

【 0 0 0 9 】

DNA分離に関するRP-IP HPLCの利点にもかかわらず、この技術にもやはり、カラムチューブ中に小粒子（例えば、ビーズ）を充填して層を形成する、すべての液体クロマトグラフィー技術に共通の問題を抱えている。例えば、粒子分離媒質の製造は複雑で、かつ、時間のかかるものであり得る。ひと度製造してしまうと、再現性があり、かつ、効率よく、カラムに粒子を充填することは困難である。特に、直径1mm未満のカラムなどの小径のカラムを効率よく充填することは困難であった。多角形の横断面（例えば、薄層または長方形）などの、非円形の横断面を有するカラムは粒状充填物質から製造するのは極めて困難であろう。また、充填ビーズを基にしたカラムは充填物質の移動および溝または気孔の発達によって失敗することもあり得る。さらなる不利な点として、小粒子の使用は高いカラム作業圧力をもたらすことも多く、これにより、20685 kPaまたはそれより大きい流動圧を許容し得るカラムチューブ、ポンプ、インジェクターおよびその

40

50

他の構成要素が必要となる。

【 0 0 1 0 】

現行のクロマトグラフィー理論は、充填粒子からなる層に関し、分離効率はサンプル分子の固定相への集団移動のための拡散距離によって決定されると予測している。この作用はかかる層に用いられる粒子の既知の形状寸法に基づいて容易にモデル化される。かかる理論によれば、最大分離能は、固定相が分離される分子のストークス径の少なくとも3倍の孔径を有する場合に生じる。この理論は、分子は拡散プロセスによって固定相に運ばれ、かつ、より小さな孔は拡散障害を引き起こすという仮定に基づいている。DNA分離に関しては、このことは1,000塩基対の大きさのサンプルのためには、少なくとも1マイクロメートルの孔径が必要となることを意味する。かかる大きな孔を必要とすることがDNAの分離のために支持体に充填された多孔性粒状物質の使用を事実上排除するが、これはかかるマトリックスが高速液体クロマトグラフィーにおいて生じる作業圧力で使用されるために求められる物理的強度を欠くからである。

10

【 0 0 1 1 】

多孔性充填物と比較した拡散距離の減少のため、DNA分離には無孔粒状物質が好まれる。無孔充填物に関しては、孔径は充填層の隙間寸法によって求められる。隙間寸法は球形充填粒子の直径の約1/3である。孔径の下限は大きなDNA分子をトラップすることや剪断することを避ける必要によって課され得る。上限は大きな粒子を用いる場合に生じる効率の損失によって課されるであろう。大きな粒子を用いる分離は、伴われる低い作業圧力のために有利であろうが、分離効率の損失はあまりにも大きい。

20

【 0 0 1 2 】

さらなる不利な点として、球形充填物は約0.4の隙間気孔率に近い密度でのみ安定層に充填され得る。幾分、より変動しやすいものの、非球形充填物も約0.4の気孔率で最適に充填される。さらに、充填された粒子層は充填物物質の粒子径により決定される、固定表面積、固定隙間距離、および固定圧力低下を有する。DNAは0.34ミクロン/1,000塩基対の長さに近い物理的大きさを有し、かつ、効率は隙間距離が分離されている分子のストークス径の3~10倍である場合に最高となるので、1,000塩基対のDNA用に設計されるカラムは1~3ミクロンの隙間距離を必要とする。直径が3~10マイクロメートルの充填物を含むカラムがかかる距離を提供する。3マイクロメートルの充填物で充填されたカラムは使用時に高い作業圧力を有し、一方、10マイクロメートルの充填物で充填されたカラムはより長い拡散路および表面積の減少による低い結合能のために限定された効率しか示さないであろう。直径1マイクロメートルなどの極めて小さい粒子で充填されたカラムは300塩基対の長さまでのサンプルには有用であり得るが、カラム作業圧力は極めて高く、300塩基対よりも大きいDNAは剪断またはトラップされ得る。充填ビーズからなる典型的なカラムは直径が2.1マイクロメートルの粒子を用い、典型的な使用下で高い作業圧力を有する。

30

【 0 0 1 3 】

充填粒子層に関する上記の理論は、集団移動が拡散と対流プロセスの組み合わせであり得る、連続モノリシック層における高分子の挙動を予測するには特に有用ではない。本発明はポリヌクレオチドを含有する混合物を分離するためのモノリシック層を教示するが、これは、モノリスは小さな球形粒子で充填されたカラムの分離能を維持しながら、大粒子固定相の使用に対応して圧力低下の減少を提供するという発見に幾分基づいている。さらに詳しくは、逆相モノリシックマトリックスはDNA分子の高速分離のための改良法を提供し得、かかる分離はこれまでに利用できた方法と比較して大きく減少した作業圧力で高分離能で実施され得るということが発見されている。この驚くべき発見により、今や既存の技術ではあり得ない条件下でのポリヌクレオチドの高分離能分離が可能となっている。さらに、本発明のモノリシックカラムは充填層を用いて利用できるものとはかなり異なる固定相形状寸法で構築できる。高分子の分離に対するかかる新規形状寸法の作用は、現行のクロマトグラフィー理論では今のところ予測されていない。

40

【 0 0 1 4 】

50

本発明のモノリシックカラムは、長時間をかけてビーズを製造し、それを効率のよいカラムに充填する必要なく、ポリヌクレオチド分離のためのこれまでの最良の技術（すなわち、アルキル化無孔重合体ビーズからなる充填層）の利点のすべてを提供する。本発明によって提供されるカラムは単純なプロセスを用いて容易に製造され、ひと度製造すれば、位置を移動する個々のビーズはないので、充填層内の移動によって失敗することはあり得ない。

【0015】

新規カラム製造の改良された容易さおよびビーズ移動がないことに加え、本明細書に記載されたモノリシックカラムは、作業圧力を標準化した場合に充填球からなるカラムに関して予測されるものよりも、少なくとも58%よりよい分離能を提供し得るという点で既存の技術を超える驚くべき利点を提供する。

【0016】

【発明の概要】

本発明の1つの態様は、少なくとも1種のポリヌクレオチド（例えば、DNAおよび/またはRNA）を含有する混合物を分離する方法を提供する。本方法によれば、混合物は支持体によって固定されたモノリシック重合体マトリックスを通される。この混合物はイオン対逆相クロマトグラフィーによって分離される。

1つの具体例では、モノリシック重合体マトリックスは疎水性表面基を有する。モノリシック重合体マトリックスは、少なくとも一部分はポリメタクリレートおよびポリスチレンからなる群から選択される重合体からなり得る。1つの具体例では、重合体はポリメタクリレートである。

【0017】

1つの具体例によれば、モノリシック重合体マトリックスは疎水性単量体、架橋剤およびポロゲン(porogen)を含む重合混合物から形成される。ポロゲンは(i)ポロゲン溶媒、(ii)ポロゲン溶媒の混合物、または(iii)孔形成に寄与する、少なくとも1種の重合添加物を含有する1種以上のポロゲン溶媒であってよい。疎水性単量体はアルキルメタクリレートであり得る。

1つの具体例では、本方法はイオン対形成剤を含有する溶出剤をモノリシックマトリックスに通す工程をさらに含む。分離は適正圧力（例えば、約34475kPa未満）の駆動力下で実施される。

【0018】

支持体に関しては、1つの具体例では円形の横断面を有するカラムチューブの使用が考慮されている。もう1つの具体例では非円形、例えば、多角形の横断面を有するカラムチューブの使用が考慮されている。

さらなる具体例では、支持体としてプレートの使用が考慮されている。モノリシック重合体マトリックスはプレートに形成された溝を満たしてもよいし、またはプレート上の薄いフィルムの形態をとってもよい。

【0019】

なお、さらなる具体例では、支持体としてチップ（例えば、半導体技術において用いられる技術によって加工されたような）の使用が考慮されている。この具体例では、マトリックスはチップに形成された微細加工溝の中に保持されている。関連する具体例では、チップに複数の微細加工溝が形成されており、かつ、チップ上で実質的に同時に複数の分離が実施される。

本発明のもう1つの態様は、マクロ多孔性モノリシックメタクリレートをベースとした重合体マトリックスを保持する支持体を含んでなるクロマトグラフィー装置を提供する。1つの具体例では、重合体マトリックスは逆相イオン対クロマトグラフィーによってポリヌクレオチドを分離するためにイオン対形成剤の疎水基と相互作用し得る疎水面を有する。この重合体マトリックスは相対的に高い気孔率（例えば、約0.6より大きい）を有し得る。

【0020】

本発明のさらなる態様は、逆相イオン対クロマトグラフィーによってポリヌクレオチドを分離するためのキットを提供する。

1つの具体例では、キットは(i)疎水性表面基を有する単量体、架橋剤およびポロゲンを含む重合混合物、ならびに(ii)ポリヌクレオチドの負に荷電したリン酸塩基および単量体の疎水性表面基とも相互作用し得るイオン対形成剤を含む。

【0021】

もう1つの具体例では、キットは(i)支持体によって固定された、疎水性表面基を有するモノリシック重合体マトリックス、ならびに(ii)ポリヌクレオチドの負に荷電したリン酸塩基および単量体の疎水性表面基とも相互作用し得るイオン対形成剤を含む。

本発明のこれらおよびその他の特性ならびに利点は、以下の記載から明らかとなる。

【0022】

【定義】

本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)の重合体を指し、これは一本鎖または二本鎖であってよく、所望により、DNAまたはRNA重合体に組み込むことができる合成、非天然、または変更ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を組み込んでいてよい。ポリヌクレオチドはいずれの三次元構造を有していてもよく、かつ、所望により部分的にまたは完全に変性していてもよい。限定されるものではないが、以下はポリヌクレオチドの例である。遺伝子または遺伝子断片(例えば、制限断片)、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いずれかの配列の単離DNA、いずれかの配列の単離RNA、核酸プローブおよびプライマー。

【0023】

本明細書において「カラム」とは、物理的横断面または層の寸法にかかわらず、流動移動相が固定層を通して移動される装置を含むよう意図される。

カラム層の「浸透性」とは大径の孔の存在量の尺度である。

【0024】

【発明の実施の形態】

本発明の好ましい具体例に関する以下の考察は、本質的に単に例示的なものである。従って、この考察は本発明の範囲、本発明の適用または本発明の使用を何ら限定するものではない。

本発明は生物有機分子を分離するための、モノリシック層、その製造および使用方法を提供する。

【0025】

本発明のカラムは重合混合物から製造され、これは1つの具体例では(1)単量体、(2)架橋剤、および(3)ポロゲン(例えば、ポロゲン溶媒またはポロゲン成分の混合物)を含む。この具体例では、混合物は好適に成形された型に入れられ、重合開始剤の影響を受けて重合プロセスを開始し、最後には適正な圧力(例えば、約34475kPa未満)の駆動力下で、液体がマトリックスに通され得るような多孔性を含む、マクロ多孔性重合体マトリックスを生じる。

【0026】

単量体、または単量体の組み合わせは、重合されたマトリックスがポリヌクレオチドと相互作用し得る表面基を含み、イオン対クロマトグラフィーに基づいた分離を提供するように選択される。1つの好ましい具体例では、疎水性表面基を有する種類を単量体として用いている。所望により、単量体を所望の疎水度を示すよう改変してもよい。例えば、当技術分野で公知の方法によって適当なりガンドを単量体に共有結合させて、その逆相クロマトグラフィーの媒質としての有効性を向上させる。あるいは、またはさらに、重合されたマトリックス自身を処理してリガンドを結合させて、それに所望の疎水度を付与してもよい。重合混合物に用いるために選択された、単量体、または単量体の組み合わせが、別途、所望の疎水特性を示さない場合には、適当なりガンド(例えば、脂肪族表面基)を付加

10

20

30

40

50

する処理がカラムを逆相分離にとって有用にするために必要となり得る。

【0027】

1つの具体例では、重合混合物に用いられる単量体は逆相クロマトグラフィーの疎水基として利用できる少なくとも1種のアルキル基を有している。好ましいアルキル基は約3～30個の炭素を有するものであり、最も好ましくは約4ないし18個の炭素の範囲内である。本発明を実施するのに有用な例示的な単量体としては、ヘキシルメタクリレート、オクチルメタクリレート、およびドデシルメタクリレートが挙げられる。また、本発明ではスチレン単量体の使用も考慮している。

【0028】

本発明のモノリシックマトリックスの形成には、当業者に公知の好適な架橋剤のいずれを用いてもよい。好ましい架橋単量体は、開始剤の存在下で重合し得る少なくとも2個の炭素-炭素二重結合を含む。例示的な架橋単量体としては、ジビニルベンゼン、ブタジエン、トリメチロールプロパントリメタクリレート(T R I M)などが挙げられる。

単一種が単量体および架橋剤の双方を含んでなってもよいということが理解されるはずである。例えば、疎水性架橋剤はこれらの両役割を果たすことができる。この点に関して、本発明の1つの具体例では重合混合物における唯一の単量体、ならびに唯一の架橋剤としてT R I Mの使用が考慮されている。

【0029】

単量体、または単量体の組み合わせは、一般に重合混合物中に約20ないし80容量%の量、より好ましくは約35ないし50容量%の量で存在する。

通常のフリーラジカル生成重合開始剤を使用して重合を開始してもよい。好適な開始剤の例としては、O O - t - アミル - O - (2エチルヘキシル)モノペルオキシカーボネート、ジプロピルペルオキシジカーボネート、およびベンゾイルペルオキシドなどのペルオキシドならびにアゾビスイソブチロニトリル、2, 2' - アゾビス(2 - アミジノプロパン)ジヒドロクロリド、および2, 2' - アゾビス(イソブチルアミド)ジヒドレートなどのアゾ化合物が挙げられる。開始剤は一般に重合混合物中に単量体の約0.1ないし2重量%の量で存在する。

【0030】

用いるポロゲンは種々の異なる種類の物質から選択してよい。ポロゲンは(i)単一のポロゲン溶媒、(ii)ポロゲン溶媒の混合物、または(iii)孔形成に寄与する、少なくとも1種の重合添加物を含有する1種以上の溶媒であり得る。好適な液体ポロゲンとしては脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル、アルコール、ケトン、エーテル、可溶性重合体溶液、およびそれらの混合物が挙げられる。例えばポロゲン溶媒としては、イソオクタンおよび異なるパーセンテージの2 - オクタノン、トルエン、またはエチルプロプリオネートを含むイソオクタンが挙げられる。例えば孔形成に寄与する重合添加物としては、ポリメチルメタクリレートおよびポリスチレンが挙げられる。ポロゲンは一般に重合混合物中に約20ないし80容量%、より好ましくは約50ないし65容量%の量で存在する。

【0031】

T R I Mをベースとした重合混合物に関しては、例えば、ポロゲン溶媒として純イソオクタンを使用した結果高浸透性モノリスが得られる。低浸透性は、例えば、2 - オクタノン、トルエン、および/またはエチルプロプリオネートなどの5ないし20%の、その他の溶媒のイソオクタンへの添加の結果得られる。浸透性は架橋剤に対する疎水性単量体の割合を高めることによって、混合物中のポロゲン溶媒の割合を低めることによって低下し得る。さらに、開始剤の選択を孔分布を制御する手段として用いることもできる。

【0032】

例示的な具体例では、モノリシックマトリックスはアルキルメタクリレート、アルカンポロゲン溶媒またはポロゲン成分の混合物、およびフリーラジカル開始剤を含む重合混合物から製造される。例えば、重合混合物をトリメチロールプロパントリメタクリレート、アルキルメタクリレート、イソオクタンおよびアゾビスイソブチロニトリルを用いて調製し

10

20

30

40

50

た。混合物を空のHPLCカラムチューブに注ぎ入れ、キャップをし、65～70℃で8～24時間重合した。次いで、重合したマトリックスにエンドフィッティングを取り付け、溶媒で洗い流して未反応成分を除去した。

【0033】

本発明に従って構築された、典型的なモノリシックカラムは5,000nm未満の範囲ないし約10nmまでの孔を有する。大きな孔サイズは極めて大きなDNAおよび/または顕微鏡試験を用いて決定される。例えば、本発明のカラムは2,072、2,647および3,147塩基対の長さのDNA産物を分離するために用いられている。これらのうち最大のもは、少なくとも1ミクロンの分子の大きさに相当するであろう。従って、このDNAを分離するために用いられるモノリシックカラムは、少なくとも1ミクロンの直径を有する孔を含むと予想される。このことは直径6ミクロンの見かけの粒子、または約2ミクロンの孔サイズを示す浸透性計算値と一致する。顕微鏡試験は、本発明の典型的なマトリックスは、1～5ミクロンのサイズ範囲の孔を有する連続構造物中に融合された直径が約1～2ミクロンの小球を含むということを示した。このことは浸透性およびDNA断片クロマトグラフィーを基に予想された孔サイズと一致する。

10

【0034】

本発明のカラムはDNAを約17塩基対まで分離するためにも使用されている。相対的に小さい100塩基対の長さのDNAは34nmの大きさしかない。従って、本発明によって可能となった高分離能は、分離されるDNA分子の長さの少なくとも約170倍までの孔を有するカラムに保持されている。いずれの特定の理論に拘束されるものでもないが、本発明のカラムを用いて可能な低い作業圧力の原因となる顕著な特性であり得る。

20

【0035】

ひと度製造すれば、本発明のモノリシックマトリックスは、例えば、勾配または定組成液体クロマトグラフィーによって生物有機分子を分離するのに有用である。例示的な使用では、上記のように製造した本発明のカラムを用いてサンプルに含まれるポリヌクレオチドの分離を実施している。1つの具体例では、双方ともイオン対形成剤を含有する水およびアセトニトリルを、勾配液体クロマトグラフィーに用いてカラムに注入されたポリヌクレオチドを溶出す。

【0036】

核酸を有するイオン対を形成し得る従来のイオン対形成剤を本発明に用いてもよい。本発明を実施するのに好適なイオン対形成剤としては、有機または無機酸のアルキルアンモニウム塩などの陽イオン疎水性種、例えば、テトラメチル、テトラエチル、テトラプロピルおよびテトラブチルアンモニウムアセテート、ハロゲン化物などが挙げられる。中でも、ジメチルブチルアンモニウム、ジメチルヘキシルアンモニウム、ジメチルシクロヘキシルアンモニウムおよびジイソプロピルアンモニウムアセテートが有効なイオン対形成剤である。TEAA(トリエチルアンモニウムアセテート)はメタクリレートおよびスチレンをベースとしたカラムの双方において有効なイオン対形成剤であると分かった。テトラブチルアンモニウムブロミドは、少なくとも1,000塩基対までの長さのDNA断片の分離に有効なイオン対形成剤であると分かった。

30

【0037】

種々の指示体構造を本発明のモノリシックマトリックスとともに用いてもよい。例えば、1つの具体例では延長カラムチューブの使用が考慮されている。もう1つの具体例では、モノリシックマトリックスはキャピラリーチューブの管腔中に保持されている。これらの具体例では、マトリックスはチューブの横断面面積全体にわたって広がっている。チューブはいずれの所望の横断面、例えば円形、多角形またはその他の形であってもよい。モノリシックマトリックスはチューブ内で現場重合させてもよいし、またはチューブの外で形成し、次いでいずれかの好適な手段によって挿入してもよい。

40

【0038】

別の具体例では、モノリシックマトリックスは(i)プレート上の溝(channel)または溝(groove)の中に保持されているか、または(ii)プレートを渡る薄いフィルムとして塗布

50

されている。本発明のモノリスは実質上いずれの大きさのおよびいずれの好適な物質からなる、支持体または支持プレート上にも提供され得るが、本発明の1つの具体例では、従来の物質および手段を用いて構築され得る、標準サイズの支持プレートを使用することが考慮されている。従って、この具体例では、その長さおよび幅が通常用いられる $5.030'' \times 3.365''$ (127.76 mm および 85.47 mm) という標準に一致する、注入成形長方形プラスチックプレートが好ましい。同様に、単一プレートは適正であればいずれの数の部位でも支持できるが、通常使用される「96ウェル」マイクロタイタープレート形式に対応する構築物が好ましい。従って、1つの好ましい構築物は、標準サイズの支持プレートに配置された 8×12 配列の部位を含んでいる。各部位は1種以上の分離モノリスを支持し得る。支持プレート上の部位の位置および間隔も同様に標準でよい（例えば、中心と中心が約 9 mm 間隔）。プレート枠の標準外部寸法、ならびにプレート上の部位の標準間隔を利用することで、所望により自動ディスペンサーまたは光学リーダーなどの既存の装置をつけたプレートの使用が促進される。かかる装置は複数の同時および並行分離を処理し得るということが理解されるはずである。

【0039】

さらなる具体例では、モノリシックマトリックスはマイクロチップ上に形成された1個以上の溝を満たしている。例えば、標準的な微細加工技術、例えば、写真平版術の手順および化学湿式エッチングを用いてガラス製マイクロチップ支持体上に複数の溝を形成し得る。所望により、カバープレートは溝を覆って支持体に直接接着させてもよい。複数のサンプルでの複数の分離を、単一の支持体チップ上で実質的に平行して実施することができる。

【0040】

有利なことに、本発明のカラムは充填層の固定表面積、圧力低下および隙間拡散距離によって限定されない。気孔率は本明細書において教示されるモノリシックカラムにおいてはかなり高くなり得るので、これらの因子すべてを所与の適用の性能を向上させるために操作できる。例えば、同一の気孔率および大きく異なる圧力低下を有するカラムを製造でき、または同一の圧力低下を有するが異なる隙間距離を有するカラムを製造できる。特定の実施例では、本発明において製造された、DNA分離を十分に実施するいくつかのカラムが約 0.7 の気孔率を有している。 0.7 という気孔率は個々の粒子を充填することによる無孔充填物では示し得ない。

【0041】

【実施例】

以下の実施例は例示を意図するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1：

一本鎖オリゴヌクレオチドの分離

1. 0 ml のトリメチロールプロパントリメタクリレート、 0.32 ml のヘキシルメタクリレート、 2.4 ml のイソオクタンおよび約 20 mg のアゾビスイソブチロニトリルを含有する混合物を調製し、一方の端をエンドフィッティングおよびプラグで閉じた空の $4.6\text{ mm ID} \times 5\text{ cm}$ 長の HPLC カラムチューブに注入した。満たしたチューブのもう一方の端をエンドフィッティングおよびプラグで閉じ、次いで、 65°C の水浴に一晚浸漬した。反応後、プラグおよびエンドフィッティングを除去し、付属のポリエチレンフリットでエンドフィッティングした。完成したカラムをテトラヒドロフランで洗い流した。

【0042】

図 1 は、上記の方法で構築された C6 モノリシックカラムでの、一本鎖オリゴチミジル酸の分離を示すクロマトグラムである。詳しくは、サンプルは 10 ml の 12 ないし 18 ユニットの間の長さのオリゴチミジル酸であった。 2 ml/分 の流速で、 100 mM の水性トリエチルアンモニウムアセテート、 10 mM の EDTA ニナトリウム、 $\text{pH } 7.0$ 中の $0 \sim 12\%$ アセトニトリルの勾配を用いて、オリゴヌクレオチドを溶出した。検出は、 254 nm での UV 吸光度を用いて実施した。分離の間、わずかに 1034 kPa という極めて低い HPLC 系圧力が認められた。

実施例 2 :

二本鎖 DNA の分離

1. 25 ml のトリメチロールプロパントリメタクリレート、0.30 ml のラウリルメタクリレート、2.6 ml の 95 % イソオクタンと 5 % トルエンの混合物および 17 mg のアゾビスイソブチロニトリルを含有する混合物を調整し、一方の端をエンドフィッティングおよびプラグで閉じた空の 4.6 mm ID × 5 cm 長の HPLC カラムチューブに注入した。満たしたチューブのもう一方の端をエンドフィッティングおよびプラグで閉じ、次いで、65 °C の水浴に一晩浸漬した。反応後、プラグおよびエンドフィッティングを除去し、付属のポリエチレフリットでエンドフィッティングした。完成したカラムはテトラヒドロフランで洗い流した。

10

【0043】

図 2 は、上記の方法で構築されたモノリシック C12 カラムでの、二本鎖 DNA 断片の分離を示すクロマトグラムである。詳しくは、サンプルは 3 マイクロリットルの MSP I 制限酵素で消化された pUC18 DNA であった。1.0 ml / 分の流速で、20 mM の水性テトラプロピルアンモニウムブロミド、2 mM の EDTA ナトリウム、pH 7.0 中の 20 mM のテトラプロピルアンモニウムブロミドを含有する 35 ~ 60 % アセトニトリルの 10 分の勾配を用いて、DNA 断片を溶出した。検出は 254 nm での UV 吸光度を用いて実施した。0.5 ml / 分で 345 kPa という HPLC 系圧力が認められた。分離能は、図 2 A において矢印で示されたピークに関して算出した。

【0044】

20

比較目的のために、無孔重合体球で充填されたカラムを用いて同様の分離を実施した。これに関しては、図 2 B は 2.1 μm 径の無孔ビーズで充填されたカラムでの、二本鎖 DNA 断片の分離を示すクロマトグラムである。この比較実験では、サンプルは 3 マイクロリットルの MSP I 制限酵素で消化された pUC18 DNA であった。0.5 ml / 分の流速で、100 mM の水性トリエチルアンモニウムアセテート、10 mM の EDTA ナトリウム、pH 7.0 中の 8.75 ~ 15 % のアセトニトリルの 10 分の勾配を用いて DNA 断片を溶出した。検出は 254 nm での UV 吸光度を用いて実施した。0.5 ml / 分で 923.9 kPa という HPLC 系圧力が認められた。分離能は、図 2 B において矢印で示されたピークに関して算出した。

【0045】

30

上記の実験からのクロマトグラフィーのデータが表 1 に要約されている。印をつけたピークの分離能は、図 2 A のモノリシックカラムに関しては 4.04、図 2 B における無孔球で充填されたカラムに関しては 5.83 であると分かった。標準浸透度計算値 (Introduction to Modern Liquid Chromatography, 第2版, L.R. Snyder and J.J. Kirkland, John Wiley and Sons, New York, 1979, 37頁) を用いることにより、図 2 A のカラムは 6.22 ミクロン径の球で充填されたカラムのものと同等の作業圧力を有し、他方、図 2 B においては 1.20 ミクロンと同様と評価されると算出できる。これらの異なる有効粒子サイズを基にすると、図 2 A のカラムは予想されるよりも 58 % 高い分離能を有している。クロマトグラフィー分離の卓越性を表す決定的な値は、単位圧力あたりの効率または分離能である。<表 1> のデータから、モノリシックカラムは無孔球で充填されたカラムと比較

40

【0046】

【表 2】

<表 1>

	無孔球充填物を含む カラム	C 1 2 モノリシック 重合体を含むカラム
ピーク 1 保持時間 (分)	6. 8 0	9. 3 6
ピーク 1 面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{秒}$)	8 0 6 7 8. 0 0	8 4 5 9 2. 0 0
ピーク 1 高さ (μV)	1 1 3 7 0. 0 0	7 4 3 8. 0 0
ピーク 2 保持時間 (分)	7. 5 2	1 0. 1 0
ピーク 2 面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{秒}$)	1 0 3 1 1 5. 0 0	1 0 3 6 4 4. 0 0
ピーク 2 高さ (μV)	1 3 3 4 8. 0 0	9 7 7 9. 0 0
分離能	5. 8 3	4. 0 4
カラム圧力 (kPa)	9 2 3 9. 3 0	6 8 9. 5 0
見かけの粒子サイズ (μm)	1. 2 0	6. 2 0
予測分離能	5. 8 3	2. 5 7
超過分離能%	0. 0 0	5 8. 0 0
分離能 / 1, 0 0 0 kPa	0. 6 3	5. 8 6

【 0 0 4 7 】

実施例 3 :

部分的に変性した二本鎖ポリヌクレオチドの分離

本発明はまた、部分的に変性した二本鎖ポリヌクレオチドの分離を可能にする。図 3 A および 3 B に示されるように、多孔性モノリシックカラムを用いて 3 0 4 塩基対の長さの DNA 断片を分離した。図 3 A では、サンプルは単一種の DNA を含み、他方、図 3 B では、サンプルは図 3 A において見られた種類と単一塩基対置換を含む変異体配列の混合物を含んでいた。選択された温度で、図 3 B のサンプルは単一塩基対置換を含む部分的に変性した DNA を表す第 2 のピークを示す。

【 0 0 4 8 】

詳しくは、図 3 A に関しては、上記のように製造したモノリシック C 1 2 カラムで 3 0 4 塩基対の長さの配列を有するホモ二重らせん DNA を分離した。分離の実施の際、以下の < 表 2 > に示されるような条件が認められた。

【 0 0 4 9 】

【 表 3 】

<表 2>

移動相:	A : 水中の 2 0 mM のテトラプロピルアンモニウムブロミド + 2 mM の EDTA ニナトリウム、pH 7. 0 B : アセトニトリル中の 2 0 mM テトラプロピルアンモニウムブロミド
勾配:	7 分にわたる A 中の 5 0 ~ 6 5 % B
流速:	0. 7 5 m l / 分
分離温度:	4 3 °C
検出:	UV、2 5 4 n m

【 0 0 5 0 】

図3Bのデータを得る際にも、サンプルが図3Aの304塩基対のホモ二重らせんDNAの他にも、単一塩基対置換を有する変異体ヘテロ二重らせんDNA種を含むという点を除いては、同様の条件が認められた。図3B中の矢印で印をつけたピークは、この変異体DNAの存在を示している。

比較実験A

Frechetらの米国特許第5,334,310号によると、充填された粒状物質からなるカラム層に関連するいくつかの上記の問題に対する1つの解決方法は、大きな分子の分離のための連続層の使用であろうと示唆している。しかしながら、'310特許は最も有利な方法、RP-IP HPLCによるDNAの分離に好適なマトリックスの選択を可能にする詳細または手引きを全く提供していない。

10

【0051】

比較目的のために、'310特許の実施例IIIおよびVIに従ってカラムを構築した。簡潔に述べれば、これらの実施例は本質的に疎水性であるモノリシックカラムを記載している。'310特許に記載のように、これらの組成物の重合後、エンドフィッティングを取り付け、カラムをメタノールで洗い流した。'310特許の実施例IIIによって製造された組成物は、外観上は半透明で極めて高い作業圧力（メタノールを用いる0.25ml/分で13790kPaより高い）を有しており、DNAに関する実用的なHPLCにおけるその使用を不可能にした。'310特許の実施例VIによって製造された組成物は、白色で相対的に低い作業圧力を有していた。しかしながら、この後者のカラムは、逆相イオン対形成条件下ではDNA制限断片の有用な分離を提供しなかった。本発明のマトリックスを用いれば有用な分離を提供するであろう条件下で分離を試みた場合には、典型的なピークパターンは認められなかった。これらの発見は、非改変ポリスチレン/ジビニルベンゼン構造物を含むカラムはDNA分離に望ましくないという文献中のこれまでの示唆と一致する。

20

【0052】

当業者ならば、前記の記載から、本発明の広範な教示は種々の形態で実行され得るということを理解できるであろう。特定の具体例および実施例を挙げて本発明を説明したが、本発明の真の範囲は、かかるものに限定されるべきではない。添付の請求の範囲によって規定される本発明の範囲から逸脱することなく、種々の変更および改変がなされ得る。

【図面の簡単な説明】

30

本発明の構造および操作法は、そのさらなる目的および利点とともに、添付の図面に関連して記載された以下の記載を参照して理解するのが最良である。

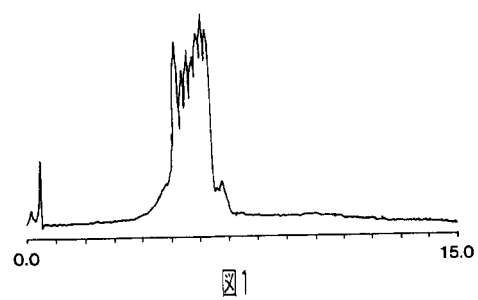
【図1】 本発明の具体例に従って構築されたC6モノリシックカラムでの、12ないし18ユニットの間の長さのオリゴチミジル酸の分離を示すクロマトグラムである。

【図2】 図2Aは、本発明の具体例に従って構築されたC12モノリシックカラムでの、二本鎖DNA断片の分離を示すクロマトグラムである。図2Bは、比較目的のための、2.1マイクロメートル無孔ビーズで充填されたカラムで実施された、図2Aのものに類似の二本鎖DNA断片の分離結果を示すクロマトグラムである。

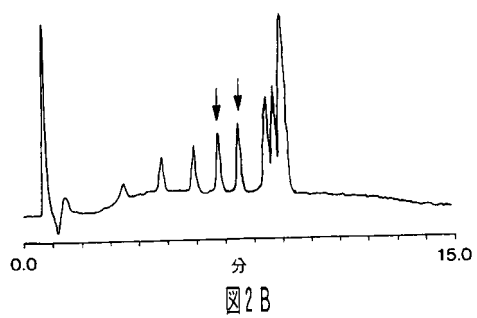
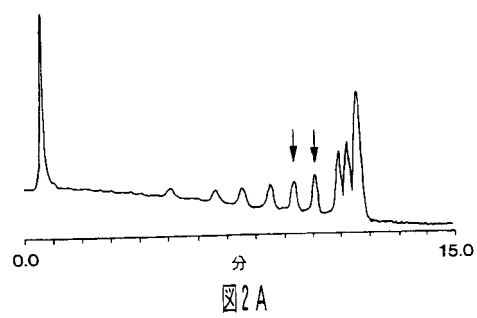
【図3】 図3Aは、本発明の具体例に従って構築された多孔性モノリシックC12カラムでの、304塩基対の長さのホモ二重らせんDNA断片の分離を示すクロマトグラムである。図3Bは、本発明の具体例に従って構築された多孔性モノリシックC12カラムでの、図3Aと同種のホモ二重らせんDNA断片ならびに単一塩基対置換を含む変異体配列を含有する混合物の分離を示すクロマトグラムである。

40

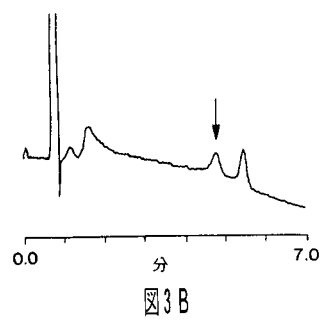
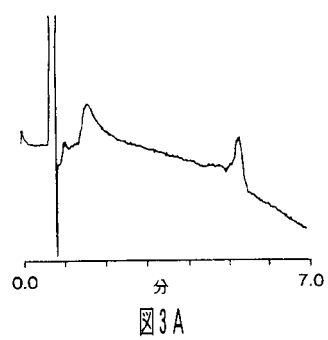
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 30/88 D

(56)参考文献 特表平 0 7 - 5 0 1 1 4 0 (J P , A)
国際公開第 9 7 / 0 1 9 3 4 7 (WO , A 1)
特表平 0 8 - 5 0 5 7 0 0 (J P , A)
特表平 0 8 - 5 0 4 0 8 2 (J P , A)
国際公開第 9 8 / 0 5 6 7 9 7 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 30/88

B01D 15/08

B01J 20/26

JSTPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)