(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-525501
(P2024-525501A)
(43)公表日　令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類　FI
C12N 15/10 (2006.01)　C12N 15/10 112Z
B01J 20/281 (2006.01)　B01J 20/281 R
G01N 30/26 (2006.01)　B01J 20/281 X
B01J 20/281 G
G01N 30/26 A
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全49頁）

(21)出願番号　特願2023-580874(P2023-580874)
(86)(22)出願日　令和4年7月11日(2022.7.11)
(85)翻訳文提出日　令和6年1月17日(2024.1.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/036740
(87)国際公開番号　WO2023/287733
(87)国際公開日　令和5年1月19日(2023.1.19)
(31)優先権主張番号　63/203,198
(32)優先日　令和3年7月12日(2021.7.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　591163214
ドナルドソン カンパニー，インコーポレイティド
アメリカ合衆国 ミネソタ ５５４３１，ブルーミントン， ウエスト ナインティフォース ストリート １４００
(74)代理人　110003281
弁理士法人大塚国際特許事務所
(72)発明者　チョウ， ジンシャン
アメリカ合衆国 ミネソタ ５５４３１，ブルーミントン， ウエスト ナインティフォース ストリート １４００
(72)発明者　テンプルズ， グラハム
アメリカ合衆国 ミネソタ ５５４３１，ブルーミントン， ウエスト ナインティ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　分離媒体及びそれを用いたヌクレオチド及びヌクレオチド成分の精製方法

(57)【要約】
分離媒体は、膜と、膜上に固定化された複数のリガンドとを含み、複数のリガンドには、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、疎水性相互作用リガンド、又はそれらの組み合わせが含まれる。分離媒体はマルチモーダルであってよい。分離媒体は、反応混合物から、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、又はその類似体若しくは誘導体を含む標的分子を分離するように構成することができる。分離媒体は、有機溶媒と共に使用するように構成することができる。分離装置は分離媒体を含む。核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、又はその類似体若しくは誘導体を含む材料は、分離装置を使用して高速で精製することができる。

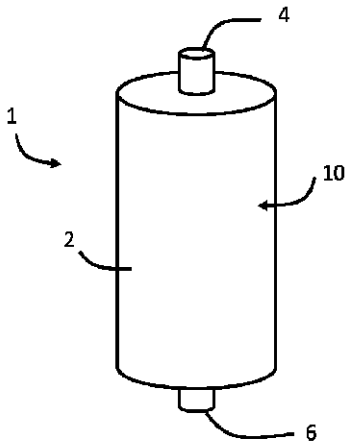


FIG. 1B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
膜と；
前記膜上に固定化された複数のリガンドであって、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせを含む複数のリガンドと；
を含む分離媒体。
【請求項２】
ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組み合わせを含む標的分子を反応混合物から分離するように構成されている、請求項１に記載の分離媒体。
【請求項３】
有機溶媒と共に使用するように構成されている、請求項１又は２に記載の分離媒体。
【請求項４】
前記複数のリガンドが、隣接するアミン間に１～１８個の炭素を含む脂肪族ジアミン又はトリアミンを含むアニオン交換リガンドを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の分離媒体。
【請求項５】
前記アニオン交換リガンドが、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルプロピレンジアミン、又はそれらの組み合わせを含む、請求項４に記載の分離媒体。
【請求項６】
前記複数のリガンドが、アミノカルボン酸、アミノスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含むカチオン交換リガンドを含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の分離媒体。
【請求項７】
前記カチオン交換リガンドが、アミノ基と酸又はスルホネート基との間に１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さのスペーサーを含むアミノ安息香酸、アミノ二酢酸、アミノプロパン酸、３－アミノ－１－プロパンスルホン酸、３－アミノ－１－エチルスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含む、請求項６に記載の分離媒体。
【請求項８】
前記複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、及び疎水性相互作用リガンドのうちの２つ以上を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の分離媒体。
【請求項９】
前記複数のリガンドが、カチオン交換性官能基と親硫黄性官能基とを有するリガンドを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の分離媒体。
【請求項１０】
前記複数のリガンドが、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせを含み、好ましくは前記複数のリガンドが、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含む、請求項９に記載の分離媒体。
【請求項１１】
ハウジングと；
前記ハウジング内に配置された分離媒体と；
を含む分離装置であって、前記分離媒体が、
膜と；
前記膜上に固定化された複数のリガンドと；
を含み、前記複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、疎水性相互作用リガンド、又はそれらの組み合わせを含む、分離装置。

【請求項１２】
前記ハウジングがカセット又はカラムを含む、請求項１０に記載の分離装置。
【請求項１３】
反応混合物から核酸塩基を含む標的分子を分離するように前記分離媒体が構成されている、請求項１１又は１２に記載の分離装置。
【請求項１４】
前記分離媒体が有機溶媒と共に使用するように構成されている、請求項１１～１３のいずれか一項に記載の分離装置。
【請求項１５】
前記複数のリガンドが、隣接するアミン間に１～１８個の炭素を含む脂肪族ジアミン又はトリアミンを含むアニオン交換リガンドを含む、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の分離装置。
【請求項１６】
前記アニオン交換リガンドが、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルプロピレンジアミン、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１５に記載の分離装置。
【請求項１７】
前記複数のリガンドが、アミノカルボン酸、アミノスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含むカチオン交換リガンドを含む、請求項１１～１６のいずれか一項に記載の分離装置。
【請求項１８】
前記カチオン交換リガンドが、アミノ基と酸又はスルホネート基との間に１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さのスペーサーを含むアミノ安息香酸、アミノ二酢酸、アミノプロパン酸、３－アミノ－１－プロパンスルホン酸、３－アミノ－１－エチルスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１７に記載の分離装置。
【請求項１９】
前記複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、及び疎水性相互作用リガンドのうちの２つ以上を含む、請求項１１～１８のいずれか一項に記載の分離装置。
【請求項２０】
前記複数のリガンドが、カチオン交換性官能基と親硫黄性官能基とを有するリガンドを含む、請求項１１～１９のいずれか一項に記載の分離装置。
【請求項２１】
前記複数のリガンドが、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせを含み、好ましくは前記複数のリガンドが、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含む、請求項２０に記載の分離装置。
【請求項２２】
標的分子を含む溶液を膜クロマトグラフィー装置に通すことを含む、標的分子の精製方法であって、
前記標的分子が、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、又はその類似体若しくは誘導体を含み、
前記膜クロマトグラフィー装置が、
ハウジングと；
前記ハウジング内に配置された分離媒体と
を含み、
前記分離媒体が、
膜と；
前記膜上に固定化された複数のリガンドと
を含み、前記複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄

性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせを含む、方法。
【請求項２３】
前記標的分子の合成後に反応混合物を含む溶液から前記標的分子が精製される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記分離媒体がアニオン交換膜を含む、請求項２２又は２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記膜クロマトグラフィー装置内の前記溶液の滞留時間が６０秒以下である、請求項２２～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記標的分子がヌクレオチド又は核酸である、請求項２２～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記分離媒体が親硫黄性カチオン交換膜を含む、請求項２２～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記標的分子がヌクレオシド又は核酸塩基である、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記親硫黄性カチオン交換膜が、親硫黄性官能基を有するカチオン交換リガンドを含む、請求項２２～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記溶液が有機溶媒を含む、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記複数のリガンドが、カチオン交換性官能基と親硫黄性官能基とを有するリガンドを含む、請求項２２～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記複数のリガンドが、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせを含み、好ましくは前記複数のリガンドが、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含む、請求項２２～３１のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、溶液、懸濁液、又は分散液からヌクレオチド、ヌクレオシド、又は核酸塩基などの生体分子及びイオンを分離するために有用な分離媒体に関する。本開示の分離媒体は、膜クロマトグラフィーにおける分離に使用することができる。本開示は、さらに、分離媒体の製造方法及び使用方法にも関する。
【０００２】
優先出願
本出願は、２０２１年７月１２日に出願された米国仮特許出願第６３／２０３，１９８号に基づく利益を主張するものであり、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
治療におけるヌクレオチド、ヌクレオシド、及びそれらの類似体の使用は、急速に成長している業界分野である。核酸治療薬が開発され、その生産が拡大するのに伴い、分離及び精製方法の改良が求められている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】

溶液、懸濁液、又は分散液から標的分子を分離するために有用な分離媒体が開示される。標的分子は、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含む生体分子又はイオンであってよい。本開示の分離媒体は、膜クロマトグラフィーにおける分離に使用することができる。本開示は、さらに、分離媒体の製造方法及び使用方法にも関する。

【０００５】

一実施形態によれば、分離媒体は、膜と、膜上に固定化された複数のリガンドとを含む。複数のリガンドには、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせが含まれ得る。分離媒体は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組み合わせを含む標的分子を反応混合物から分離するように構成することができる。分離媒体は、有機溶媒と共に使用するように構成することができる。

【０００６】

複数のリガンドには、隣接するアミン間に１～１８個の炭素を含む脂肪族ジアミン又はトリアミンを含むアニオン交換リガンドが含まれ得る。アニオン交換リガンドには、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルプロピレンジアミン、又はそれらの組み合わせが含まれ得る。

【０００７】

複数のリガンドには、アミノカルボン酸、アミノスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含むカチオン交換リガンドが含まれ得る。カチオン交換リガンドとしては、アミノ安息香酸、アミノ二酢酸、アミノプロパン酸、３－アミノ－１－プロパンスルホン酸、３－アミノ－１－エチルスルホン酸、又はそれらの組み合わせを挙げることができる。

【０００８】

複数のリガンドには、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、及び疎水性相互作用リガンドのうちの２つ以上が含まれ得る。複数のリガンドには、カチオン交換性官能基及び親硫黄性官能基を有するリガンドが含まれ得る。複数のリガンドには、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせが含まれ得る。好ましくは、複数のリガンドには、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムが含まれ得る。

【０００９】

分離装置は、ハウジングと、ハウジング内に配置された分離媒体とを含み得る。分離媒体は、膜と、膜上に固定化された複数のリガンドとを含むことができ、複数のリガンドには、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせが含まれ得る。ハウジングは、カセット又はカラムを含み得る。分離媒体は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせを含む標的分子を反応混合物から分離するように構成することができる。分離媒体は、有機溶媒と共に使用するように構成することができる。

【００１０】

標的分子を精製する方法は、標的分子を含む溶液を膜クロマトグラフィー装置に通すことを含み得る。標的分子としては、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせが含まれ得る。膜クロマトグラフィー装置は、ハウジングと、ハウジング内に配置された分離媒体とを含み得る。分離媒体は、膜と、膜上に固定化された複数のリガンドとを含むことができ、複数のリガンドには、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせが含まれ得る。ハウジングは、カセット又はカラムを含み得る。分離媒体は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせを含む標的分子を反応混合物から分離するように構成することができる。分離媒体は、有機溶媒と共に使用するように構成することができる。

【００１１】
標的分子は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせの合成後の反応混合物を含む溶液から精製することができる。溶液は有機溶媒を含み得る。膜クロマトグラフィー装置内での溶液の滞留時間は６０秒以下であってよい。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１Ａ】一実施形態による分離媒体の概略図である。
【図１Ｂ】図１Ａの分離媒体を含む分離装置の概略斜視図である。
【図２】実施例３からの動的結合容量データのグラフ表示である。
【図３Ａ】実施例４からのデータのグラフ表示である。
【図３Ｂ】実施例４からのデータのグラフ表示である。
【図３Ｃ】実施例４からのデータのグラフ表示である。
【図４】実施例４からの動的結合容量及び圧力データのグラフ表示である。
【図５Ａ】実施例５からの結合－溶出データのグラフ表示である。
【図５Ｂ】実施例５からの結合－溶出データのグラフ表示である。
【図６Ａ】実施例６からのクロマトグラムである。
【図６Ｂ】実施例６からのＤＢＣ１０％及び回収データのグラフ表示である。
【図７Ａ】実施例７からの動的結合容量データのグラフ表示である。
【図７Ｂ】実施例７からのクロマトグラムである。
【図８Ａ】実施例８からの重ね合わせられたクロマトグラムである。
【図８Ｂ】実施例８からのサンプルのＴＬＣプレートである。
【図９Ａ】実施例９からの結合－溶出データのグラフ表示である。
【図９Ｂ】実施例９からの結合－溶出データのグラフ表示である。
【図９Ｃ】実施例９からの結合－溶出データのグラフ表示である。
【図９Ｄ】実施例９からのクロマトグラムの比較である。
【図１０】実施例１０からのデータのグラフ表示である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
定義
本明細書で使用される全ての科学用語及び技術用語は、別段の規定がない限り、当該技術分野で一般的に使用される意味を有する。本明細書で示される定義は、本明細書で頻繁に使用される特定の用語を理解し易くするためのものであり、本開示の範囲を限定することを意図するものではない。
【００１４】
別段の指示がない限り、用語「ポリマー」及び「ポリマー系材料」には、有機ホモポリマー、コポリマー、例えばブロック、グラフト、ランダム、及び交互のコポリマー、ターポリマー、並びにそれらのブレンド及び変性物が含まれる。さらに、特に限定されない限り、「ポリマー」という用語には、材料の全ての可能な幾何学的配置が含まれるものとする。これらの配置には、アイソタクチック、シンジオタクチック、及びアタクチック対称性が含まれる。
【００１５】
「芳香環」という用語は、本開示では有機化合物の共役環系を指すために使用される。芳香環には炭素原子のみが含まれていてもよく、或いは酸素、窒素、又は硫黄などの１つ以上のヘテロ原子が含まれていてもよい。
【００１６】
「アルキル化」という用語は、本開示では、反応して化合物の水素原子又は負電荷がアルキル基で置換され、その結果アルキル基が化合物に共有結合した化合物を表すために使用される。
【００１７】

「アルキル」という用語は、本開示では、アルカンのラジカルである一価の基を表すために使用され、直鎖、分岐、環式、及び二環式のアルキル基、並びにそれらの組み合わせが含まれ、無置換と置換のアルキル基の両方が含まれる。別段の指示がない限り、アルキル基は、典型的には１～３０個の炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～２０個の炭素原子、１～１０個の炭素原子、１～６個の炭素原子、１～４個の炭素原子、又は１～３個の炭素原子を含む。アルキル基の例としては、メチル、エチル、ｎ－プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソブチル、ｔ－ブチル、イソプロピル、ｎ－オクチル、ｎ－ヘプチル、エチルヘキシル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなどが挙げられる。

【００１８】

本明細書で使用される「核酸」及び／又は「オリゴヌクレオチド」という用語は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態の少なくとも２つのヌクレオチド（例えばデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド）を含むポリマーを指し、ＤＮＡ及びＲＮＡが含まれる。「ヌクレオチド」は、糖、塩基（核酸塩基と呼ばれることもある）、及び連結基を含む。いくつかの実施形態では、糖は天然デオキシリボース又は天然リボース（例えばそれぞれＤＮＡ及びＲＮＡ）であってよい。ヌクレオチドは連結基を介して一体に連結され、オリゴヌクレオチドを形成する。いくつかの実施形態では、連結基はリン酸基であってよい。共有結合した連結基のポリマーは、骨格と呼ばれることがある。「ヌクレオシド」は、ヌクレオシドがリン酸基などの連結基を含まないことを除いてヌクレオチドと同様である。「塩基」又は「核酸塩基」には、プリン及びピリミジンが含まれ、これらにはさらに天然化合物であるアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、及び天然の類似体、並びにプリン及びピリミジンの合成誘導体が含まれ、これらにはアミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、及びハロゲン化アルキルなどの新しい反応性基を配置する修飾が含まれる。ヌクレオチドには、修飾された又は類似した核酸塩基、修飾された若しくは類似した糖、及び／又は修飾された又は類似した連結基が含まれる。修飾された核酸塩基、修飾された糖、及び／又は修飾された連結基は、合成、天然、及び／又は非天然であってよい非標準的な／化学的に修飾された核酸塩基、糖、及び／又は連結基であってよく、それらは標準の核酸と同様の結合特性を有する。そのような類似した及び／又は修飾された塩基、糖、及び／又は連結基の例としては、限定するものではないが、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラル－メチルホスホネート、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ロック核酸（ＬＮＡ）、及びペプチド核酸（ＰＮＡ）が挙げられる。

【００１９】

デオキシリボオリゴヌクレオチドは、糖の５’及び３’の炭素でリン酸に共有結合して交互の非分岐ポリマーを形成しているデオキシリボースと呼ばれる五炭糖からなる。ＤＮＡは、例えばアンチセンス分子、プラスミドＤＮＡ、予め縮合されたＤＮＡ、ＰＣＲ産物、ベクター、発現カセット、キメラ配列、染色体ＤＮＡ、又はこれらの群の誘導体及び組み合わせの形態であってよい。リボオリゴヌクレオチドは、五炭糖がリボースである同様の繰り返し構造からなる。したがって、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在する塩基、糖、及び糖間（骨格）結合からなるヌクレオチド又はヌクレオシドモノマーのポリマー又はオリゴマーを指す場合がある。

【００２０】

「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語には、同様に機能する非天然モノマー又はその一部を含むポリマー又はオリゴマーも含まれ得る。そのような修飾又は置換されたオリゴヌクレオチドは、例えば細胞取り込みの向上、免疫原性の低下、及びヌクレアーゼ存在下での安定性の向上などの特性のため、天然型よりも好まれることが多い。「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語には、デオキシ及びリボヌクレオチドの両方の組み合わせ、又は本明細書に記載のものなどの骨格修飾と組み合わされたそれらのバリアントを含むポリマー及びオリゴマーも含まれ得ることが理解されるべきである。

【００２１】
本明細書に記載のポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドには、非標準ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、及び／又は修飾ヌクレオチドを含む、１種以上のヌクレオチドバリアントが含まれ得る。修飾されたヌクレオチドの例としては、ジアミノプリン、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルクエオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルクエオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、２，６－ジアミノプリンなどが挙げられる。場合によっては、ヌクレオチドは、リン酸部位に三リン酸部位への修飾などの修飾が含まれることがある。そのような修飾の非限定的な例としては、より長いリン酸鎖（例えば４、５、６、７、８、９、１０個、又はそれ以上のリン酸部位を有するリン酸鎖）及びチオール部位による修飾（例えばα－チオトリホスフェート及びβ－チオトリホスフェート）が挙げられる。

【００２２】
本明細書に記載のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、塩基部位（例えば相補的ヌクレオチドとの水素結合を形成するために典型的に利用可能な１つ以上の原子、及び／又は相補的なヌクレオチドと水素結合を典型的には形成することができない１つ以上の原子）、糖部位、又は連結基（例えば骨格）で修飾され得る。骨格修飾としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデート、及びホスホロジアミデート結合を挙げることができる。ホスホロチオエート結合は、リン酸骨格の非架橋酸素を硫黄原子で置換し、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ分解を遅らせる。ホスホロジアミデート結合（Ｎ３’→Ｐ５’）は、ヌクレアーゼの認識及び分解を防止する。骨格の修飾には、骨格構造内のリンの代わりにペプチド結合（例えばペプチド核酸内のペプチド結合によって連結されたＮ－（２－アミノエチル）－グリシン単位）、又はカルバメート、アミド、並びに直鎖状及び環状の炭化水素基を含む連結基も含まれ得る。修飾された骨格を持つオリゴヌクレオチドは、Ｍｉｃｋｌｅｆｉｅｌｄ，Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，８（１０）：１１５７－７９，２００１及びＬｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１（３）：３４４－３５８，１９９９の中で概説されている。本明細書に記載の核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドに存在するリボース若しくはデオキシリボースを含む糖部位、又は修飾された糖部位若しくは糖類似体を含み得る。修飾された糖部位としては、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチル、２’－Ｏ－アミノエチル、２’－フルオロ、Ｎ３’→Ｐ５’ホスホルアミデート、２’ジメチルアミノオキシエトキシ、２’２’ジメチルアミノエトキシエトキシ、２’－グアニジニジウム、２’－Ｏ－グアニジニウムエチル、カルバメート修飾糖、及び二環式の修飾された糖が挙げられる。２’－Ｏ－メチル又は２’－Ｏ－メトキシエチル修飾は、オリゴヌクレオチドにおけるＡ型又はＲＮＡ様のコンホメーションを促進し、ＲＮＡへの結合親和性を高め、ヌクレアーゼ耐性を強化する。修飾された糖部位には、余分な架橋結合（例えばロック核酸中のリボースの２’－Ｏ原子と４’－Ｃ原子を連結するメチレン架橋）又はモルホリン環などの糖類似体を有すること（例えばホスホロジアミデートモルホリノ中のように）も含ま

れ得る。

【００２３】

別段の指示がない限り、特定の核酸配列は、明示的に示されている配列のみならず、保存的に修飾されたそのバリアント（例えば縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、ＳＮＰ、及び相補配列も黙示的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、１つ以上の選択された（又は全ての）コドンの３番目の位置が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成され得る（Ｂａｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．，１９：５０８１（１９９１）；Ｏｈｔｓｕｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６０：２６０５－２６０８（１９８５）；Ｒｏｓｓｏｌｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ，８：９１－９８（１９９４））。

【００２４】

本開示の方法は、単離された又は実質的に精製されたヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸分子、及びそれらの分子を含む組成物の分離及び／又は精製を包含する。本明細書において、「単離された」又は「実質的に精製された」ＤＮＡ分子又はＲＮＡ分子は、そのネイティブな環境から離れて存在するＤＮＡ分子又はＲＮＡ分子である。単離されたＤＮＡ分子又はＲＮＡ分子は、精製された形態で存在する場合があり、或いは例えばトランスジェニック宿主細胞などの非ネイティブ環境で存在する場合がある。例えば、「単離された」又は「精製された」核酸分子又はその生物学的に活性な部分は、組換え技術によって生成される場合には他の細胞材料又は培地を実質的に含まず、或いは化学的に合成される場合には化学前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。一実施形態では、「単離された」核酸は、その核酸が由来する生物のゲノムＤＮＡにおいて、天然に核酸に隣接する配列（すなわち核酸の５’末端及び３’末端に位置する配列）を含まない。

【００２５】

本明細書で使用される「医薬組成物」という用語及びその文法的に等価な用語は、治療有効量の有効医薬成分を、１種以上の薬学的に許容される賦形剤、担体、及び／又は治療剤と共に含む混合物又は溶液であって、対象、例えばそれを必要とするヒトに投与するための混合物又は溶液を意味し得る。

【００２６】

「コスモトロープ」という用語は、一般的に水－水相互作用を安定化させることによって水の秩序性の程度を高める溶質を表すために使用される。コスモトロープは、イオン性であっても又は非イオン性であってもよい。対照的に、「カオトロープ」という用語は、一般に、水－水の相互作用を不安定にすることによって水の秩序性の程度を低下させる溶質を表すために使用される。カオトロープは、イオン性であっても又は非イオン性であってもよい。

【００２７】

本明細書で使用される「実質的に」という用語は、「有意に」と同じ意味を有し、その後に続く用語を少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、又は少なくとも約９８％修飾すると理解することができる。特定の化合物を「実質的に含まない」という用語は、本発明の組成物が、言及された化合物を１，０００パーツ・パー・ミリオン（ｐｐｍ）未満しか含まないことを意味する。特定の化合物を「本質的に含まない」という用語は、本発明の組成物が、言及された化合物を１００パーツ・パー・ミリオン（ｐｐｍ）未満しか含まないことを意味する。特定の化合物を「完全に含まない」という用語は、本発明の組成物が、言及された化合物を２０パーツ・パー・ビリオン（ｐｐｂ）未満しか含まないことを意味する。前述した語句との関係において、本発明の組成物は、化合物自体が未反応形態で存在するか、又は１つ以上の他の材料と反応したかにかかわらず、前述した量未満の化合物を含む。

【００２８】

本明細書で使用される「実質的ではない」という用語は、「有意ではない」と同じ意味を有し、「実質的に」の逆の意味を有する、すなわちその後に続く用語を２５％以下、１

０％以下、５％以下、又は２％以下修飾すると理解することができる。
【００２９】
「約」という用語は、本明細書では、当業者が予期する測定値の通常の変動を含むように数値と併せて使用され、「およそ」と同じ意味を有し、記載されている値の±５％のような典型的な誤差範囲を網羅すると理解される。
【００３０】
「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」などの用語は、単一のもののみを指すことを意図しておらず、説明のために特定の例が使用され得る一般的な分類を含む。
【００３１】
「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」という用語は、「少なくとも１つ」という用語と同じ意味で使用される。「～のうちの少なくとも１つの」及び「～のうちの少なくとも１つを含む」という語句に続く列挙は、列挙されている項目のいずれか１つ、及び列挙されている項目の２つ以上の任意の組み合わせを指す。
【００３２】
本明細書において使用される「又は」という用語は、内容が明確に別の指示をしていない限り、通常「及び／又は」を含む一般的な意味で使用される。「及び／又は」という用語は、列挙された要素の１つ又は全て、或いは列挙された要素の任意の２つ以上の組み合わせを意味する。
【００３３】
端点よる数値範囲の列挙には、その範囲内に含まれる全ての数値が含まれる（例えば１～５には１、１．５、２、２．７５、３、３．８０、４、５などが含まれ、或いは１０以下には１０、９．４、７．６、５、４．３、２．９、１．６２、０．３などが含まれる）。値の範囲が「最大」又は「少なくとも」特定の値である場合、その値は範囲内に含まれる。
【００３４】
本明細書で使用される「～を有する（ｈａｖｅ）」、「～を有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「～を含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「～を含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、又は「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などは、オープンエンドの意味で使用され、一般に「～を含むがこれらに限定されない」を意味する。「～から本質的になる」、「～からなる」などは、「～を含む」などに包含されることが理解されるであろう。本明細書において、組成物、製品、又は方法などに関する「～から本質的になる」とは、組成物、製品、又は方法などの成分が、列挙された成分と、組成物、製品、又は方法などの基本的且つ新規な特徴に重大な影響を及ぼさない任意の他の成分とに限定されることを意味する。
【００３５】
「好ましい」及び「好ましくは」という言葉は、特定の状況下で特定の利益をもたらし得る実施形態を指す。しかしながら、同じ又は別の状況下では、他の実施形態も好ましい場合がある。さらに、１つ以上の好ましい実施形態の列挙は、他の実施形態が有用ではないことを意味するものではなく、また特許請求の範囲を含む本開示の範囲から他の実施形態を除外することを意図するものではない。
【００３６】
「上」、「下」、「左」、「右」、「上方の」、「下方の」など、本明細書で言及される任意の方向及び他の方向並びに配向は、図面を参照して明確にするために本明細書で説明されるものであり、実際の装置若しくはシステム又は装置若しくはシステムの使用を限定するものではない。本明細書に記載の装置又はシステムは、多くの方向及び配向で使用することができる。
【００３７】
詳細な説明
本開示は、溶液、懸濁液、又は分散液から標的分子を分離するために有用な分離媒体に

関する。標的分子は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせを含む生体分子又はイオンであってよい。本開示の分離媒体は、膜クロマトグラフィーにおける分離に使用することができる。本開示は、さらに、分離媒体の製造方法及び使用方法に関する。

【００３８】

遺伝子及び細胞治療産業は、様々な壊滅的疾患を治療する有望な可能性のため、商業的プロセスへと急速にシフトしている。プラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）は、遺伝子治療や細胞治療で広く使用されているウイルスベクター、タンパク質、ｍＲＮＡの製造における重要な構成要素である。大容量で高品質のｐＤＮＡの製造が緊急に必要とされている。しかしながら、ｐＤＮＡ製造のスケールアップは簡単ではないため、ｐＤＮＡ製造は業界のボトルネックになっている。現在、適格な契約製造業者は、高い需要に対応するために、長い待機リストと大量の残務を抱えている。他の多くの生物製剤の製造スキームと同様に、ｐＤＮＡの製造には複数の工程と単位操作が含まれる。

【００３９】

医薬組成物を調製するために、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせがますます利用されてきている。誘導体化には、例えば、フッ素化、糖の置換、様々な官能基部位の付加、又は他の多くの既知の又は新規の修飾が含まれ得る。このような誘導体化は、薬物動態の改善、輸送、プロドラッグへの状態の変化、又は疾患組織に固有の酵素経路のアップレギュレーションの利用によって、ヌクレオシド、ヌクレオチド、又は核酸塩基を、核酸治療のための主要なビルディングブロックへと、或いはより忍容性の高い又はより効果的な薬剤へと変換又は修飾するように設計することができる。このような医薬組成物は、ＨＩＶ／ＡＩＤＳ治療及び癌治療を含む様々な状況で利用することができる。そのような類似体は、ＨＩＶ又は癌産生細胞によってアップレギュレーションされる経路を利用するか、又はミスマッチ若しくは他の複製／翻訳エラーの誘発、分裂の停止、及び／若しくは細胞死の誘発を生じる類似体を含むことが多い。

【００４０】

さらに、核酸治療の増加に伴い、安定性を改善したり、又は免疫原性の低下又はアップレギュレーションしたりすることによって治療薬の忍容性を改善するために、さらなる置換及び修飾が追求されている。例えば、シチジン及びウリジン塩基への修飾には、５－ヨードシチジン－５’－三リン酸、５－メチルシチジン－５’－三リン酸、２－チオシチジン－５’－三リン酸、６－アザシチジン－５’－三リン酸、５－ブロモシチジン－５’－三リン酸、５－アミノアリルシチジン－５’－三リン酸、シュードイソシチジン－５’－三リン酸、N^4－メチルシチジン－５’－三リン酸、５－カルボキシシチジン－５’－三リン酸、５－ホルミルシチジン－５’－三リン酸、５－ヒドロキシメチルシチジン－５’－三リン酸、５－ヒドロキシシチジン－５’－三リン酸、５－メトキシシチジン－５’－三リン酸、チエノシチジン－５’－三リン酸、５－ブロモ－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－プロピニル－２’デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－ヨード－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－メチル－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、２’－デオキシ－Ｐ－ヌクレオシド－５’－三リン酸、５－ヒドロキシ－２’デオキシシチジン－５’－三リン酸、２－チオ－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、シュードウリジン－５’－三リン酸、２’－Ｏ－メチルシュードウリジン－５’－三リン酸、N^1－メチルシュードウリジン－５’－三リン酸、N^1－エチルシュードウリジン－５’－三リン酸、N^1－メチル－２’－Ｏ－メチルシュードウリジン－５’－三リン酸、N^1－メトキシメチルシュードウリジン－５’－三リン酸、N^1－プロピルシュードウリジン－５’－三リン酸、又はそれらの非リン酸化塩基が含まれ得る。チミジン及びグアニジン塩基についても同様の修飾を行うことが可能である。

【００４１】

従来、下流の精製は高価で時間がかかり、スケールアップが困難であった。典型的なヌ

クレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせの精製トレインには、濾過、限外濾過、及び１つ以上のタイプのクロマトグラフィーカラムを利用する様々なクロマトグラフィー分離などの様々なステップが含まれる。ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、又は核酸の精製に使用される典型的なクロマトグラフィーカラムとしては、例えばサイズ排除クロマトグラフィー又は逆相クロマトグラフィー用に構成された樹脂を備えた充填床カラムを挙げることができる。樹脂ベースのクロマトグラフィーカラムは、何十年にもわたり生物製剤の精製に採用されてきた代表的な存在である。しかしながら、大量のカラムクロマトグラフィーは非常に時間がかかることがある。樹脂カラムが十分に機能するためには長い滞留時間が必要であることが知られている。

【００４２】

一実施形態によれば、分離媒体は官能化された基材を含む。官能化された基材は官能化された膜であってよい。樹脂カラムとは対照的に、膜吸着剤は短いカラム滞留時間でもよく機能し、生物製剤を迅速に分離する可能性がある。本開示は、様々なヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせの分離及び精製に適した膜を提供する。本開示の膜を使用して分離され得る目的化合物は、荷電（イオン化）状態であるか又は非荷電状態であるかにかかわらず、本明細書ではまとめて標的分子と呼ばれる。標的分子は、溶液、懸濁液、又は分散液中に存在することができる。簡潔にするために、本明細書では標的分子を含む液体を溶液と呼ぶ。液体は反応混合物であってよい。例えば、液体は、標的分子（例えばヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体又は類似体、及びそれらの組み合わせ）を調製又は合成するために使用される反応混合物であってもよい。分離媒体は、反応混合物から標的分子を精製するように構成することができる。分離媒体は、出発物質、中間体、及び他の反応生成物から標的分子を分離するように構成することができる。反応混合物は、水、有機溶媒、又はそれらの組み合わせなどの溶媒、及び溶媒に溶解した可溶性成分も含んでいてもよい。分離媒体は、有機溶媒と共に使用されるように構成されていてもよい。分離媒体は、有機溶媒を含む溶液から標的分子を分離又は精製するように構成することができる。

【００４３】

本開示の官能化基材は、標的分子と相互作用する１つ以上の官能基を含む。いくつかの実施形態では、官能基は、標的分子に対する親和性を有し、標的分子に結合するか、又は膜を通って若しくは膜に沿って移動するのを遅らせることができる。

【００４４】

一実施形態によれば、標的分子には、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体若しくは類似体、又はそれらの組み合わせが含まれる。ヌクレオチド及びヌクレオシドは、それらのビルディングブロックとして核酸塩基を含む。概して、本開示は、天然の核酸塩基／ヌクレオシド／ヌクレオチド、修飾された核酸塩基／ヌクレオシド／ヌクレオチド、核酸塩基／ヌクレオシド／ヌクレオチド類似体などを含む、核酸塩基／ヌクレオシド／ヌクレオチドを精製するための膜及び方法を提供する。

【００４５】

ＤＮＡ内の４つの核酸塩基（アデニン（Ａ）、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、チミン（Ｔ））と追加の塩基（ウラシル（Ｕ））は、疎水性成分、芳香族成分、水素結合供与体及び受容体、並びに／又は電荷を誘導することができる基を含む、精製トレインを強化するために利用することができるユニークな特性を有する。しかし、核酸塩基／ヌクレオシド／ヌクレオチドを修飾すると、これらの特性の一部が変化する可能性がある。例えば、分離では、アミン基を有する化合物は、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル保護基（ＢＯＣ）などの薬剤によって意図的に又は意図しないで保護される場合がある。保護基は、別の反応を妨げることから、官能基の特徴的な化学的性質を一時的にマスクするために合成で使用される。保護されたアミンは立体障害を持ち、水素結合供与部位が１つ少なくなるため、標準的なハイブリダイゼーションの規則が妨げられる。ただし、保護されたアミン基の影響を受ける場合と受けない場合がある、別のペアリング構成が存在し得ることに

留意される。多くの場合、保護基を有するこのような塩基は、シリカゲルクロマトグラフィー、液－液抽出、液体／固体抽出、蒸留（一般的な保護基の吸入の危険性のために安全でないことが多い）などの医薬品製造現場でそのような核酸塩基類似体の精製のために採用される従来の化学分離技術では分離することが困難である。

【００４６】

一実施形態によれば、本開示は、ヌクレオシド／ヌクレオチド並びにそれらの類似体及び誘導体を精製するためのハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションに基づく精製方法を利用する官能化基材（例えば官能化膜）を提供する。例えば、単一のヌクレオシド、ヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチドは、ワトソンクリック塩基対形成などのハイブリダイゼーションを利用する方法に基づいて効果的に精製することができる。

【００４７】

いくつかの実施形態では、ワトソンクリック塩基対形成の利用は、標的分子を高度に特異的に精製する。一実施形態では、ヌクレオチド、ヌクレオシド、又はオリゴヌクレオチドを基材上に固定してリガンドを提供し、その後、その相補的塩基を捕捉するために利用することができる。例えば、官能化された基材を製造するために、アデニン（Ａ）又はその誘導体を基材上に固定化することができる。アデニンで官能化された基材は、チミン（Ｔ）、ウラシル（Ｕ）、及びそれらの誘導体を捕捉するために使用することができる。チミン（Ｔ）、ウラシル（Ｕ）、又はそれらの誘導体が、アデニン（Ａ）及びその誘導体を捕捉するために支持体に固定化されてもよい。シトシン（Ｃ）を固定化してグアニン（Ｇ）及びその誘導体を捕捉してもよく、その逆も同様である。

【００４８】

分離媒体のベース材料として使用される基材は、任意の適切な材料であってよい。いくつかの実施形態では、基材は、膜、樹脂、モノリス、ヒドロゲル、織布繊維質基材、不織布繊維質基材、又はそれらの組み合わせであるか、又はそれらを含む。一実施形態では、官能化基材は、膜であるか、又は膜を含む。一実施形態では、官能化基材は、織布若しくは不織布繊維質基材であるか、又はそれらを含む。基材は、リガンドと反応する前に反応性化学部位を含むように改質されていてもよい。これは、ｅＰＴＦＥなどの非反応性基材の場合に特に有用な場合がある。改質には、例えばプラズマ処理、ポリ（ビニルアルコール）による浸漬コーティング、コロナ処理などが含まれ得る。

【００４９】

不織布基材（例えばウェブ）は、典型的には、メルトブロー、ウェットレイ、溶融紡糸、溶液紡糸、エアレイ、又はエレクトロスピニングによって形成される。不織ウェブは、さらに、カレンダー加工、エンボス加工、ニードルパンチ加工、又は水流交絡などの後処理工程を経て処理されてもよい。不織布基材は、生体分子に対する結合親和性が低い構造樹脂も含んでいてもよい。そのような樹脂は、典型的には不織ウェブの強度を高めるために使用される。多くの不織布基材は、繊維サイズと繊維材料の混合を含む。不織布基材及び織布基材を製造するために使用される繊維としては、ガラス、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、セルロース系材料など、及びそれらの組み合わせを挙げることができる。繊維は、０．１μｍ以上、１μｍ以上、２μｍ以上、又は３μｍ以上の平均繊維サイズを有し得る。繊維は、１００μｍ以下、５０μｍ以下、２５μｍ以下、１０μｍ以下、又は８μｍ以下の平均繊維サイズを有し得る。平均繊維サイズは、０．１μｍ～５０μｍ、又は１μｍ～２５μｍの範囲であってよい。キャピラリーフローポロメーターによって測定される平均細孔径は、１μｍ以上、２μｍ以上、又は３μｍ以上であってよい。平均細孔径は、１００μｍ以下、５０μｍ以下、２５μｍ以下、１０μｍ以下、又は８μｍ以下であってよい。適切な不織布基材の平均細孔径は、０．１μｍ～５０μｍ、１μｍ～１０μｍ、又は３μｍ～８μｍの範囲であってよい。織布基材の平均細孔径は、不織布基材よりもわずかに大きくてよく、１μｍ～１００μｍの範囲であってよい。繊維質基材の目付は、１ｇｓｍ（グラム／平方メートル）以上、１０ｇｓｍ以上、又は２０ｇｓｍ以上であってよい。繊維質基材の目付は、２００ｇｓｍ以下、又は８０ｇｓｍ以下であってよい。繊維質基材の目付は、１ｇｓｍ～２００ｇｓｍ、又は２０ｇｓｍ～８０ｇｓｍの範囲

であってよい。

【００５０】

一実施形態によれば、基材は膜であるか、又は膜を含む。膜は、全ての寸法方向にポリマー系材料の連続的な経路を有する材料のシートとして理解される。膜材料の例としては、ポリオレフィン、ポリエーテルスルホン、ポリ（テトラフルオロエチレン）、ナイロン、ガラス繊維、ヒドロゲル、ポリビニルアルコール、天然ポリマー、例えばセルロース、セルロースエステル、酢酸セルロース、再生セルロース、セルロースナノファイバー、セルロース誘導体、アガロース、キトサン、ポリエチレン、ポリエステル、ポリスルホン、延伸ポリテトラフルオロエチレン（ｅＰＴＦＥ）、ポリフッ化ビニリデン、ポリアミド（ナイロン）、ポリアクリロニトリル、ポリカーボネート、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【００５１】

一実施形態によれば、有用な膜は、１０μｍ以下、５μｍ以下、２μｍ以下、１μｍ以下、０．４５μｍ以下、又は０．２μｍ以下の、キャピラリーフローポロメーターによって測定される平均細孔径を有する。膜は、０．１μｍ以上、０．２μｍ以上、０．４５μｍ以上、０．７μｍ以上、又は１μｍ以上の平均細孔径を有し得る。膜は、約０．１μｍ～１０．０μｍ、０．１μｍ～０．２μｍ、０．１μｍ～０．４５μｍ、０．１μｍ～１μｍ、０．１μｍ～２μｍ、０．２μｍ～０．４５μｍ、０．２μｍ～１μｍ、０．２μｍ～２μｍ、０．２μｍ～１０μｍ、０．４５μｍ～１μｍ、０．４５μｍ～２μｍ、０．４５μｍ～１０μｍ、１μｍ～２μｍ、又は１μｍ～５μｍの範囲の平均細孔径を有し得る。膜は、５００μｍ以上、２５０μｍ以上、１００μｍ以上、８０μｍ以上、５０μｍ以上、又は３０μｍ以上の厚さを有し得る。膜は、２５００μｍ以下、１０００μｍ以下、５００μｍ以下、２５０μｍ以下、又は１００μｍ以下の厚さを有し得る。膜の厚さは、３０μｍ～５００μｍ、５０μｍ～５００μｍ、８０μｍ～５００μｍ、１００μｍ～５００μｍ、２５０μｍ～５００μｍ、３０μｍ～２５０μｍ、５０μｍ～２５０μｍ、８０μｍ～２５０μｍ、１００μｍ～２５００μｍ、３０μｍ～１００μｍ、５０μｍ～１００μｍ、又は８０μｍ～１００μｍの範囲であってよい。

【００５２】

膜は、所定の用途の容量を増加させるために、多層構成に積層することができる。一実施形態では、膜の積層構成は、７０μｍ以上、２５０μｍ以上、又は５００μｍ以上の厚さを有する。膜の積層構成は、１０，０００μｍ以下、７，５００μｍ以下、５，０００μｍ以下、４，０００μｍ以下、３，０００μｍ以下、２，５００μｍ以下、２，０００μｍ以下、１，０００μｍ以下、７５０μｍ以下、５００μｍ以下、４００μｍ以下、又は３００μｍ以下の厚さを有し得る。膜の積層構成は、厚さ７０μｍ～１０，０００μｍ、７０μｍ～１００μｍ、７０μｍ～２００μｍ、７０μｍ～３００μｍ、７０μｍ～４００μｍ、７０μｍ～５００μｍ、７０μｍ～７５０μｍ、７０μｍ～１，０００μｍ、７０μｍ～２，０００μｍ、７０μｍ～３，０００μｍ、７０μｍ～４，０００μｍ、７０μｍ～５，０００μｍ、２５０μｍ～３００μｍ、２５０μｍ～４００μｍ、２５０μｍ～５００μｍ、２５０μｍ～７５０μｍ、２５０μｍ～１，０００μｍ、２５０～２，０００μｍ、２５０～３，０００μｍ、２５０～４，０００μｍ、２５０～５，０００μｍ、５００μｍ～１，０００μｍ、５００μｍ～２，０００μｍ、５００μｍ～３，０００μｍ、５００μｍ～４０００μｍ、又は５００μｍ～５０００μｍの範囲の厚さを有し得る。

【００５３】

好ましい一実施形態では、膜は、厚さ約７０μｍ～１０，０００μｍの積層構成で０．２μｍ～５．０μｍの細孔径、７０μｍ～２，０００μｍの厚さを有する再生セルロース膜である。

【００５４】

基材は精密濾過膜であってもよい。精密濾過膜は、典型的には相転換プロセス又は膨張プロセスによって形成される。膜の作製に使用される典型的な材料としては、ＰＥＳ、ナ

イロン、ＰＶＤＦ、酢酸セルロース、再生セルロース、ポリプロピレン、及び延伸ＰＴＦＥが挙げられる。

【００５５】

場合によっては、膜は多様な有機溶媒に耐えることができない。膜及びリガンドは、分離又は精製プロセスで使用される溶媒に膜が溶解しないように選択することができる。

【００５６】

標的分子がヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドである実施形態では、精製プロセス中に標的分子を含む溶液に溶媒、塩、又は他の添加剤を添加して、ハイブリダイゼーションの発生を可能にするのに十分な関連するリン酸基の反発をスクリーニングすることができる。標的とリガンドとの間の電荷反発によって固定化塩基から標的分子を溶出させるために、異なる溶媒又は低導電率の緩衝液を使用することができる。適切な溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ＤＭＳＯ、及びＤＭＦなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルが溶液に添加される。適切な溶媒は、溶液の重量に対して５重量％以上、１０重量％以上、２０重量％以上、３０重量％以上、４０重量％以上、５０重量％以上、６０重量％以上、７０重量％以上、８０重量％以上、又は９０重量％以上の量で精製プロセス中に使用することができる。適切な溶媒は、溶液の重量の９０重量％以下、８０重量％以下、７０重量％以下、６０重量％以下、５０重量％以下、４０重量％以下、３０重量％以下、又は２０重量％以下の量で使用することができる。溶媒は、溶液の重量の１０重量％～９０重量％、２０重量％～８０重量％、３０重量％～７０重量％、又は１０重量％～５０重量％の溶液の範囲の量で使用することができる。

【００５７】

溶液中に含まれ得る適切な塩としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム、塩化ルビジウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化セシウム、トリス塩基、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、及び硫酸アンモニウムなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、又は塩化マグネシウムが溶液に添加される。適切な塩は、溶液の重量の２重量％以上、５重量％以上、１０重量％以上、１５重量％以上、又は２０重量％以上の量で添加することができる。適切な塩は、溶液の重量の２０重量％以下、２５重量％以下、又は３０重量％以下の量で添加することができる。塩は、溶液の重量の２重量％～３０重量％、又は５重量％～２５重量％、又は５重量％～２０重量％の範囲の量で添加することができる。

【００５８】

標的分子がヌクレオシド／核酸塩基又は修飾ヌクレオシド／核酸塩基（ヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドとは対照的）であるいくつかの実施形態では、ヌクレオシドがリン酸基を含まないため、静電反発はより小さな要因になり、そのためリン酸－リン酸反発を緩和する技術はあまり関係しなくなる。

【００５９】

標的分子が水素結合に関与する基又は立体障害となる位置に修飾を含んでいる場合、修飾された基は修飾された分子を捕捉して修飾されていない分子を通過させるか、又は修飾されていない分子を捕捉して修飾された分子を通過させるかのいずれかに利用できる形で結合において異なる挙動を示すため、官能化基材（例えば官能化膜）を使用して修飾されていない基と修飾された基を分離することが可能である。溶出の際に水素結合と競合する添加剤又は溶媒が使用されてもよい。水素結合と競合する添加剤及び溶媒の例としては、アセトニトリル、アルコール、水、糖、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【００６０】

多くの実施形態では、標的分子は水溶液中に存在する。しかしながら、いくつかの実施形態では、Ａ／Ｔ、Ａ／Ｕ、及びＣ／Ｇ間の水素結合は、様々な溶媒の非水性環境においても有効なままである。そのような溶媒の例としては、アルコール、アセトニトリル、及びそれらの組み合わせが挙げられる。したがって、いくつかの実施形態では、標的分子は

、１種以上のアルコール又はアセトニトリルなどの有機溶媒を含む溶液中に存在する。いくつかのそのような実施形態では、溶液は水と有機溶媒とを含む。溶液の大部分は水であってよい。或いは、溶液の大部分が有機溶媒から構成されていてもよい。いくつかの実施形態では、溶液は非水性であり、例えば有機溶媒からなる。

【００６１】

いくつかの実施形態では、標的分子は、標的分子（例えばヌクレオシド又はヌクレオチド）の水溶性を低下させる修飾を含む。そのような実施形態では、標的分子を溶液中に維持するのを助けて（特に疎水性修飾の場合）プロセスの生産性を高めるために、水性緩衝液－有機溶媒混合物を使用することができる。

【００６２】

一実施形態によれば、分離媒体（官能化基材）は、速い流速で標的分子を精製するために使用することができる。例えば、分離媒体は、２分以下、１分（６０秒）以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間で標的分子を精製するために使用することができる。滞留時間に望ましい下限はないが、実際には滞留時間は１秒以上である。分離媒体は、膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置として配置することができる。分離媒体のシート１０が図１Ａに概略的に示されている。分離媒体であるシート１０は、図１Ｂに示される分離装置１（例えばクロマトグラフィーカラム）内に設けられてもよい。分離装置１は、装置内を通る流れを促進するための入口４と出口６とを備えたハウジング２を含む。分離装置（例えば膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置）は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間を提供することができる。一実施形態によれば、膜に基づく精製装置を使用することにより、生産性を大幅に向上させることができる。

【００６３】

プロセスの生産性は、以下の式を使用して定義することができる。分母のV_{tot}は、ロード、リンス、溶出、及び再生ステップを含むプロセス全体の間に分離媒体（例えばカラム又はカセット）を通過する溶液の総体積である。ＢＶはクロマトグラフィー媒体床の体積（分離媒体基材の体積に相当）、τは滞留時間である。ローディング量は、クロマトグラフィーカラム媒体の動的結合容量に比例する。したがって、結合容量が増加し、滞留時間が減少すると、プロセスの生産性が向上する。

【数１】

$$\text{生産性} = \frac{\text{捕捉された薬物}}{\text{時間のコスト}} = \frac{\text{ローディング量} \times \text{薬物濃度} \times \text{収率}}{\left(\frac{V_{tot}}{BV}\right) \times \tau}$$

【００６４】

別の実施形態によれば、分離媒体はカチオン交換基材を含む。そのような基材は、標的分子（例えばヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基、又はそれらの類似体若しくは誘導体）を精製するためのカチオン交換に基づくクロマトグラフィーで使用することができる。カチオン交換は、正に帯電した標的分子を標的とする負に帯電した官能基を利用する。

【００６５】

カチオン交換リガンドは、官能基ハンドルを介して基材にコンジュゲートすることができる。官能基ハンドルは基材と共有結合することができる。いくつかの実施形態では、カチオン交換リガンドは二官能性分子から調製される。官能基の１つが官能基ハンドルとして機能することができる。通常、カチオン交換リガンドを含むリガンドは、以下の一般式（Ｉ）を有することができる。

Ｆｈ－Ｓｐ－Ｓｇ　（Ｉ）

（式中、Ｆｈは官能基ハンドルであり、Ｓｐはスペーサーであり、Ｓｇは官能性分離基（例えばカチオン交換分離基）である）。官能基ハンドルにより、リガンド（例えばカチオ

ン交換リガンド）を基材にコンジュゲートさせることができる。

【００６６】

カチオン交換分離基は、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオチドの１つ以上の成分、それらの類似体、又はそれらの誘導体の分離を可能にする官能基である。複数の実施形態では、カチオン交換分離基は、１つのカチオン交換分離部位又は２つのカチオン交換分離部位を含み得る。

【００６７】

スペーサーは、官能基ハンドルをカチオン交換分離基から分離する。スペーサーは、官能基ハンドル及び／又はカチオン交換分離基が意図した通りに機能できるようにする長さ及び／又は組成であってよい。

【００６８】

官能基ハンドルは、基材上にある化学部位と反応して共有結合を形成することができる任意の反応性官能基を含むことができる。官能基ハンドルと基材上の反応性部位である基材反応性部位との反応により、カチオン交換リガンドが基材に共有結合し、これはコンジュゲートしたカチオン交換リガンドとも呼ばれる。コンジュゲートしたカチオン交換リガンドは、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオチドの１つ以上の成分、それらの類似体、又はそれらの誘導体の分離を可能にするために基材上に配置され得る。

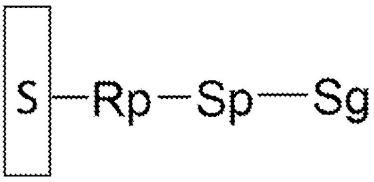
【００６９】

官能基ハンドルの反応性官能基が何であるかは、基材反応性部位が何であるかによって理解される。すなわち、反応性官能基ハンドルと基材反応性部位は、反応して共有結合を形成するように適合性を有していなければならない。例示的な基材反応性部位及び／又は例示的な反応性官能基としては、アミン；アルコール；トシル保護アルコール（例えば塩化トシル）などの活性化アルコール；エポキシド；イソシアネート；アルケン；アルキン；シクロアルケン；シクロオクチン；チオール；ジスルフィド；アジド；チオイソシアネート；Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド；マレイミド；並びにカルボジイミド化合物（Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、及び１－シクロヘキシル－（２－モルホリノエチル）カルボジイミド、メト－ｐ－トルエンスルホネート）を使用して活性化されたエステル又はカルボン酸などの活性化エステル及び／又はカルボン酸が挙げられる。当業者であれば、どの反応性官能基ハンドルと基材の反応性部位とが適合性を有するかを理解するであろう。

【００７０】

基材にコンジュゲートすると、コンジュゲートしたカチオン交換リガンドは一般式（ＩＩ）を有することができる：

【化１】



(II)

（式中、Ｓは基材であり、Ｒｐは官能基ハンドルと基材の反応性部位との間の反応生成物であり、Ｓｐはスペーサーであり、Ｓｇは分離基である）。いくつかの実施形態では、Ｒｐは、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオチドの１つ以上の成分、それらの類似体、又はそれらの誘導体の分離を促進する第２の分離基であってよい。Ｒｐが分離基ではなく、且つ第１の分離基（例えばＳｇ）が単一の分離部位を含むいくつかの実施形態では、コンジュゲートしたリガンドは、カチオン交換モノモーダルリガンドなどのモノモーダルリガンドである。分離基は、酸、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、カルボキシレート、スルホネート、又はホスフェートであってよい。Ｒｐが分離基ではなく、且つ第１の分離基（例えばＳｇ）が２つの分離部位を含むいくつかの実施形態では、コンジュゲートしたリガンドは

、コンジュゲートしたカチオン交換バイモーダルリガンドなどのバイモーダルリガンドである。Ｒｐが第２の分離基であり、且つ第１の分離基（例えばＳｇ）が単一の分離部位を含むいくつかの実施形態では、コンジュゲートしたリガンドは、コンジュゲートしたカチオン交換バイモーダルリガンドなどのバイモーダルリガンドである。Ｒｐが第２の分離基であり、且つ第１の分離基（例えばＳｇ）が２つの分離部位（例えば第１の分離部位と第２の分離部位）を含むいくつかの実施形態では、コンジュゲートしたリガンドは、コンジュゲートしたカチオン交換トリモーダルリガンドなどのトリモーダルリガンドである。

【００７１】

反応生成物が何であるかは、反応性官能基と基材の反応性部位が何であるかに依存する。例として、反応生成物としては、限定するものではないが、エステル、エーテル、チオエーテル、アミド、アミン（例えば第一級、第二級、第三級）、アルケン、尿素、カルバメート、カーボネート、チオ尿素、及びトリアゾールが挙げられる。

【００７２】

いくつかの実施形態では、分離基（Ｓｇ）は単一の分離部位を含み得る。

【００７３】

いくつかの実施形態では、分離基（Ｓｇ）は、２つの分離部位を含むことができ、一般式（ＩＩＩ）のものであってよい

$$Sm1-Sp_2-Sm2 \quad (III)$$

（式中、Ｓｍ１は第１の分離部位であり、Ｓｐ２はスペーサーであり、Ｓｍ２は第２の分離部位である）。第１及び第２の分離部位は、酸、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、カルボキシレート、スルホネート、又はホスフェートであってよい。スペーサー（Ｓｐ／Ｓｐ２）は、長さがＣ１～Ｃ１８、Ｃ１～Ｃ１０、Ｃ１～Ｃ６、Ｃ１～Ｃ４、Ｃ１～Ｃ３、又はＣ２～Ｃ４の炭素鎖であってよく、任意選択的には炭素鎖に沿った１つ以上のエーテル、エステル、ベンジル、フェニル、又はアミドで置換されていてもよい。２つの分離部位を含む分離基の例としては、アミノ安息香酸、アミノ二酢酸、アミノプロパン酸、３－アミノ－１－プロパンスルホン酸、及び３－アミノ－１－エチルスルホン酸が挙げられる。カチオン交換基材は、最初にベース基材（例えば膜又は不織布基材）をリンカー活性化剤及び触媒の溶液にさらし（例えば浸漬し）、次いでリガンドと任意選択的な触媒とを含む溶液に基材をさらし（例えば浸漬し）、最後に基材をクエンチング緩衝液に浸漬して未反応のリンカーを不活性化することによって調製することができる。例示的な一実施形態では、リンカー活性化剤はＮ，Ｎ－ジスクシミジルカーボネート（ＤＳＣ）であるか、又はこれを含み、触媒はトリエチルアミン（ＴＥＡ）を含む。

【００７４】

標的分子が核酸塩基／ヌクレオシド又は修飾された核酸塩基／ヌクレオシドである実施形態では、標的分子を溶解させるか若しくはその安定性を維持できるようにするために、又は望みのレベルの結合及び選択性を実現できるようにするために、標的分子を含む溶液に適切な溶媒、塩、又は他の添加剤が添加されてもよい。

【００７５】

精製プロセス中に使用される適切な塩としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム、塩化ルビジウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化セシウム、トリス塩基、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、及び硫酸アンモニウムなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、又は塩化マグネシウムが溶液に添加される。適切な塩は、１ｍＭ以上、５ｍＭ以上、又は１０ｍＭ以上、又は２０ｍＭ以上の量で添加することができる。適切な塩は、１００ｍＭ以下、５０ｍＭ以下、又は３０ｍＭ以下の量で添加することができる。塩は、１ｍＭ～１００ｍＭ、１ｍＭ～５０ｍＭ、５ｍＭ～３０ｍＭ、又は５ｍＭ～２０ｍＭの範囲の量で添加することができる。

【００７６】

精製プロセス中に使用される適切な溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ＤＭＳＯ、及びＤＭＦなどが挙げられる。いくつかの

実施形態では、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルが溶液に添加される。適切な溶媒は、５重量％以上、１０重量％以上、２０重量％以上、３０重量％以上、４０重量％以上、５０重量％以上、６０重量％以上、７０重量％以上、８０重量％以上、又は９０重量％以上の量で添加することができる。適切な溶媒は、９０重量％以下、８０重量％以下、７０重量％以下、６０重量％以下、５０重量％以下、４０重量％以下、３０重量％以下、又は２０重量％以下の量で添加することができる。溶媒は、１０重量％～９０重量％、２０重量％～８０重量％、３０重量％～７０重量％、又は１０重量％～５０重量％の範囲の量で添加することができる。

【００７７】

標的とリガンドとの間の電荷反発によって固定化塩基から標的分子を溶出させるために、異なる溶媒又はより高い導電率の緩衝液を使用することができる。

【００７８】

シトシン（Ｃ）及びグアニン（Ｇ）塩基は、ピリミジン環の４位にプロトン化可能な第一級アミンを含む。このアミンの電荷状態はプロトン化されて正電荷になり、その後これはカチオン交換クロマトグラフィー（ＣＥＸ）基材（例えば膜）を使用して選択性を付与することができる。別の核酸塩基の電荷状態も、溶液のｐＨを操作することによって操作することができる。例えば、シトシンの４位の位置にあるアミンのｐＫａは約４．４５である。グアニンについては、２位のアミンのｐＫａは約１２．３であり、９位のアミンは約９．２であり、１位のアミドは約３．３である。チミジンのアミドのｐＫａは約９．９６である。アデノシンのアミンのｐＫａは約３．５である。溶液のｐＨは、アミンをプロトン化し、カチオン交換クロマトグラフィーを利用するために、核酸塩基のｐＫａ未満になるように調整することができる。

【００７９】

カチオン交換クロマトグラフィーを使用して標的分子を分離又は精製する場合、分子をプロトン化された状態に維持するために、溶液のｐＨが標的分子のｐＫａ未満に留まるように、溶液のｐＨを監視及び制御することができる。標的の分解を避けるために、ｐＨを閾値より上に維持することもできる。ｐＨの閾値は、分子ごとに異なり得る。例えば、ＢＯＣは反応性基を保護するために使用され、これはジオキサン中４ＭのＨＣｌ又は酢酸中１ＭのＨＣｌなどの非常に酸性の条件で脱保護することができる。

【００８０】

いくつかの実施形態では、標的分子上のアルコール基及び／又はヒドロキシル基は、アミンを標的としたコンジュゲートを可能にするために合成の際の攻撃から保護することができる。保護基は、典型的には、酸溶液を使用して除去することができる。精製中、脱保護（トリクロロ酢酸又は塩酸を用いて行われることが多い）のｐＨよりも高いｐＨを維持するために、溶液の酸性度を監視及び制御することが望ましい場合がある。他方で、標的分子のプロトン化を誘導又は維持してカチオン交換分離を利用するためには、溶液のｐＨが標的分子のｐＫａ未満に維持されてもよい。

【００８１】

カチオン交換リガンドと結合した分子は、例えば導電率を上げ、ＣＥＸクロマトグラフィー媒体と標的分子との間の静電引力をスクリーニングすることによって溶出させることができる。一実施形態では、溶出は、標的分子中のアミンのｐＫａを超えるｐＨに変更し、標的分子内に中性電荷を形成し、それにより電荷相互作用を減少させ、溶出を誘発することによって行うことができる。異なる標的分子（又は標的分子と他の分子）は、直線勾配溶出又は段階的アイソクラティック溶出を使用して溶出することができる。

【００８２】

カチオン交換クロマトグラフィー（ＣＥＸ）基材を作製するために使用される基材は、任意の適切な材料であってよい。いくつかの実施形態では、官能化基材は、膜、樹脂、モノリス、ヒドロゲル、織布繊維質基材、不織布繊維質基材、又はそれらの組み合わせであるか、又はそれらを含む。一実施形態では、官能化基材は、膜であるか、又は膜を含む。一実施形態では、官能化基材は、織布若しくは不織布繊維質基材であるか、又はそれらを

含む。適切な膜及び不織布繊維質基材については、本開示の他の箇所で説明される。

【００８３】

一実施形態によれば、カチオン交換基材は、速い流速で標的分子を精製するために使用することができる。例えば、カチオン交換基材は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間で標的分子を精製するために使用することができる。滞留時間に望ましい下限はないが、実際には滞留時間は１秒以上である。カチオン交換基材は、膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置として配置することができる。膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間を提供することができる。一実施形態によれば、膜に基づく精製装置を使用することにより、生産性を大幅に向上させることができる。

【００８４】

いくつかの実施形態では、分離媒体はアニオン交換基材を含む。そのような基材は、標的分子（例えばヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基、又はそれらの類似体若しくは誘導体）を精製するためのアニオン交換に基づくクロマトグラフィーで使用することができる。アニオン交換は、負に帯電した標的分子を標的とする正に帯電した官能基を利用する。

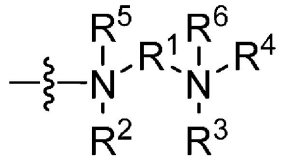
【００８５】

アニオン交換リガンドは、官能基ハンドルを介して基材にコンジュゲートすることができる。官能基ハンドルは基材と共有結合することができる。いくつかの実施形態では、アニオン交換リガンドは、二官能性、三官能性、又は他の多官能性分子から調製される。官能基の１つが官能基ハンドルとして機能することができる。官能基ハンドルは、式（Ｉ）に関して上で説明した通りであってよい。コンジュゲートしたアニオン交換リガンドは、式（ＩＩ）に関して上述したように、反応生成物Ｒｐ及びスペーサーＳｐを含み得る。コンジュゲートしたアニオン交換リガンドは、分離基Ｓｇをさらに含む。

【００８６】

分離媒体基材上に配置され得る適切なアニオン交換リガンドの例としては、第一級、第二級、第三級、及び第四級アミンが挙げられる。適切なアミンは、ジアミン、トリアミン、及びポリアミンであってよい。ジアミンは一般に次の式で表される：

【化２】



【００８７】

いくつかの実施形態では、R^1は、１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の脂肪族炭素鎖である。第四級アミンでは、R^2、R^3、R^4、R^5、及びR^6のそれぞれは、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さを有する脂肪族の直鎖、分岐鎖、又は環状の、置換又は無置換の炭素鎖から個別に選択される。第三級アミンでは、R^5とR^6は存在せず、R^2、R^3、及びR^4は第四級アミンと同様である。第二級アミンでは、R^5及びR^6は存在せず、R^2及びR^3はＨであり、R^4は第四級アミンと同様である。第一級アミンでは、R^5及びR^6は存在せず、R^2、R^3、及びR^4はＨである。いくつかの実施形態では、ジアミンの窒素は異なるレベルの置換を有する。例えば、あるアミンは第二級アミンであってよく、またあるアミンは第一級、第三級、又は第四級アミンであってよい。適切なトリアミン及びポリアミンは、３つ（トリアミン）以上のアミン基を有する類似の構造を有し得る。

【００８８】

第一級アミンの例としては、メチレンジアミン、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、ブチレンジアミン（プトレシン）、ペンチルアミン、又はアミンの１つを介して共有結合している末端アミン間の１～１８個の炭素を有する任意の脂肪族ジアミンが挙げられる。そのようなリガンドは、アミンのうちの１つを介して共有結合したエチレンジアミン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミンなどのポリアミンから製造することができる。

【００８９】

第二級アミンの例としては、上述した通りに追加のＲ基で置換された、基材に固定化された前述したいずれかの第一級アミンを挙げることができる。ジアミンが使用される場合には、第二級アミンは、両方のアミンを基材に結合させる基材との共有結合相互作用によっても形成され得る。直鎖ポリエチレンイミン、スペルミジン、又はスペルミンなど、リガンドの構造を有する第二級アミンを含むリガンドも固定化することができる。さらに、非末端第一級アミン（例えば３－アミノペンタン）を含む基も、基材にコンジュゲートして第二級アミンになることができる。

【００９０】

適切な第三級アミンの例としては、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルプロピレンジアミン、又は１～６個の炭素の範囲の脂肪族炭素基で一方若しくは両方のアミンが置換されており、且つR^1が末端アミン間に２～１８個の炭素を有する、任意の脂肪族ジアミンが挙げられる。

【００９１】

第四級アミンの例としては、四級化反応を受けて永久正電荷を持った前述した任意の第一級アミンが挙げられる。そのような反応は、ヨウ化メチルなどのアルキル基又はヨウ化ベンジルなどのアリール基を用いて行うことができる。第四級アミンとしては、さらに四級化反応を受けて永久正電荷を持った前述した任意の第三級アミンも挙げることができる。そのような反応は、ハロゲン化アルキルを使用して第三級アミンとの反応から第四級アンモニウム塩を形成するメンシュトキン反応によって説明することができる。そのような反応は、臭化ブチルなどの様々な長さのアルキル含有基、又は塩化ベンジルなどのアリール基、又はそれらの組み合わせを用いて行うことができる。さらに、第四級アミンを含む化合物を直接固定化することもできる。

【００９２】

リガンドは、アミン基に加えて追加の官能基を含み得る。リガンドは、アミンと任意の他の官能基との間に、１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さのリンカーを含み得る。

【００９３】

アニオン交換基材は、最初にベース基材（例えば膜又は不織布基材）をリンカー活性化剤及び触媒の溶液にさらし（例えば浸漬し）、次いでリガンドと任意選択的な触媒とを含む溶液に基材をさらし（例えば浸漬し）、最後に基材を緩衝液にさらす（例えば浸漬する）ことによって調製することができる。例示的な一実施形態では、リンカー活性化剤はＮ，Ｎ－ジスクシミジルカーボネート（ＤＳＣ）であるか、又はこれを含み、触媒はトリエチルアミン（ＴＥＡ）を含む。

【００９４】

例示的な一実施形態では、アニオン交換基材は３段階のプロセスで製造される。１段階目は、ベース基材をリンカー活性化剤と触媒との溶液にさらす（例えば浸漬する）ことを含む。これは、溶媒中に０．１ｍｇ／ｍＬ～１２０ｍｇ／ｍＬのＤＳＣ、及び５μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬのＴＥＡを含み得る。溶媒としては、ＤＭＳＯ、アセトニトリル、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ヘキサメチルホスホルアミド、スルホラン、又は基材（例えば膜）を膨潤させる任意の他の溶媒／溶液を挙げることができる。さらすことは、約１０℃～６０℃の温度で約１分間～１，８００分間行うことができる。例えば、１０ｍＬのＤＭＳＯに溶解した３００ｍｇのＤＳＣ、１３９μＬのＴＥＡに、４７ｍｍの直径と７０μｍの厚さを有する膜を４０℃で１６時間浸漬する

ことができる。

【００９５】

この例示的な実施形態では、第２段階目は、リガンドと任意選択的な触媒とを含む溶液に基材をさらす（例えば浸漬する）ことを含む。これは、溶媒中に約１μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬ、＜１００μＬ／ｍＬ、＜７５μＬ／ｍＬ、＜５０μＬ／ｍＬ、＜２０μＬ／ｍＬ、＜１０μＬ／ｍＬ、１μＬ／ｍＬ～１０μＬ／ｍＬ、１μＬ／ｍＬ～２０μＬ／ｍＬ、１μＬ／ｍＬ～５０μＬ／ｍＬ、１μＬ／ｍＬ～７５μＬ／ｍＬ、１μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬ、１０μＬ／ｍＬ～２０μＬ／ｍＬ、１０μＬ／ｍＬ～５０μＬ／ｍＬ、１０μＬ／ｍＬ～７５μＬ／ｍＬ、１０μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬ、２０μＬ／ｍＬ～５０μＬ／ｍＬ、２０μＬ／ｍＬ～７５μＬ／ｍＬ、２０μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬ、５０μＬ／ｍＬ～７５μＬ／ｍＬ、又は５０μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬのＤＭＥＤＡを含む。溶媒は、ＤＭＳＯ、又は別の有機溶媒、例えばアセトニトリル、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ヘキサメチルホスホルアミド、スルホランなど、又は基材を膨潤させる任意の他の溶媒／溶液であってよい。さらすことは、約１０℃～６０℃の温度で約１分～２４時間行うことができる。例えば、１５μＬ／ｍＬのＤＭＥＤＡのＤＭＳＯ溶液に膜を室温で３０分間入れることができる。

【００９６】

この例示的な実施形態では、３段階目は、２段階目からの基材を緩衝液にさらす（例えば浸漬する）ことを含む。これは、ｐＨ７．０～１０．０で０．０５Ｍ～４ＭのＴｒｉｓを含み得る。さらすことは、約１０℃～６０℃の温度で約１分～２４時間行うことができる。例えば、膜は、ｐＨ８．０の１ＭのＴｒｉｓ中に１６時間入れられる。

【００９７】

いくつかの実施形態では、アニオン交換基材は、米国特許出願公開第２０２００１８８５９Ａ１号明細書（Ｚｈｏｕら）に記載されている方法１に従って調製される。

【００９８】

標的分子がヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドである実施形態では、標的分子を溶解させるか若しくはその安定性を維持できるようにするために、又は望みのレベルの結合及び選択性を実現できるようにするために、標的分子を含む溶液に溶媒、塩、又は他の添加剤が添加されてもよい。

【００９９】

精製プロセス中に使用される適切な塩としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム、塩化ルビジウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化セシウム、トリス塩基、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、及び硫酸アンモニウムなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、又は塩化マグネシウムが溶液に添加される。適切な塩は、１ｍＭ以上、５ｍＭ以上、又は１０ｍＭ以上、又は２０ｍＭ以上の量で添加することができる。適切な塩は、１００ｍＭ以下、５０ｍＭ以下、又は３０ｍＭ以下の量で添加することができる。塩は、１ｍＭ～１００ｍＭ、１ｍＭ～５０ｍＭ、５ｍＭ～３０ｍＭ、又は５ｍＭ～２０ｍＭの範囲の量で添加することができる。

【０１００】

精製プロセス中に使用される適切な溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ＤＭＳＯ、及びＤＭＦなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルが溶液に添加される。適切な溶媒は、５重量％以上、１０重量％以上、２０重量％以上、３０重量％以上、４０重量％以上、５０重量％以上、６０重量％以上、７０重量％以上、８０重量％以上、又は９０重量％以上の量で添加することができる。適切な溶媒は、９０重量％以下、８０重量％以下、７０重量％以下、６０重量％以下、５０重量％以下、４０重量％以下、３０重量％以下、又は２０重量％以下の量で添加することができる。溶媒は、１０重量％～９０重量％、２０重量％～８０重量％、３０重量％～７０重量％、又は１０重量％～５０重量％の範囲の量で添加することができる。

【０１０１】
標的とリガンドとの間の電荷反発によって固定化塩基から標的分子を溶出させるために、異なる溶媒又はより高い導電率の緩衝液を使用することができる。
【０１０２】
一実施形態によれば、標的を含む供給溶液のｐＨは、標的分子が正に帯電した状態を維持するように調整され、このｐＨは、通常そのような分子のｐＫａよりも高い。他方で、供給溶液のｐＨは、正の状態を維持するためにアニオン交換膜リガンドのｐＫａよりも低く維持される。例えば、弱アニオン交換膜を使用して供給溶液からアデノシン一リン酸を捕捉する場合、供給溶液のｐＨは３～７の範囲に調整され得る。
【０１０３】
いくつかの実施形態では、分離媒体は、標的分子、不純物、又はその両方との疎水性相互作用を誘発する官能基を有する基材を含む。このような基材は、標的分子（例えばヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基、又はそれらの類似体若しくは誘導体）を精製するために疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）で使用することができる。疎水性相互作用クロマトグラフィーは、標的分子上の疎水性基と相互作用する疎水性官能基を使用する。疎水性相互作用は、標的分子と存在し得る不純物と間の疎水性の違いを利用する。核酸塩基は、基材上のＨＩＣリガンドと相互作用することにより利用することができる疎水性の環を含む。
【０１０４】
一実施形態では、そのようなリガンドとしては、３個以上の炭素を有する脂肪族鎖（一般に使用される長さには、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、及びドデシルが含まれる）、ベンジル、フェニル、フェノール、ピリジン、ボロン酸基、分岐ポリマー、例えばポリプロピレングリコール、硫黄含有親硫黄性リガンド、例えばプロパンチオール、２－ブタンチオール、３，６－ジオキサ－１，８－オクタンジチオール、オクタンチオール、ベンジルメルカプタン、２－メルカプトピリジン、チオフェノール、１，２－エタンジチオール、１，４－ベンゼンジメタンチオール、２－フェニルエタンチオールなど、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。疎水性相互作用リガンドは、式（Ｉ）に関して上述したように、官能基ハンドルを介して基材とコンジュゲートすることができる。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、標的分子は、核酸塩基若しくは修飾核酸塩基、ヌクレオシド若しくは修飾ヌクレオシド、又はヌクレオチド若しくは修飾ヌクレオチドである。リガンドと標的の両方に存在する疎水性基の相互作用によって結合が起こるようにするために、標的分子を含む溶液に溶媒、塩、又は他の添加剤が添加されてもよい。いくつかの実施形態では、コスモトロピック塩が溶液に添加される。場合によっては、コスモトロピック塩とカオトロピック塩との組み合わせが溶液に添加されてもよい。例えば、コスモトロピックアニオンとカオトロピックカチオンとの混合物を使用することができる。いくつかの実施形態では、コスモトロピック塩の割合を増加させ、且つ／又はカオトロピック塩の割合を減少させる。コスモトロピック塩は、水溶液中の非極性物質の溶解度を低下させる塩として知られている一方で、カオトロピック塩はその溶解度を増加させる。いくつかの実施形態では、溶液中の有機溶媒の割合を増加させることができる。別の実施形態では、溶液中の有機溶媒の割合を低下させることができる。別の実施形態では、コスモトロピック成分、カオトロピック成分、及び／又は有機溶媒の変化の組み合わせも使用することができる。
【０１０６】
標的分子を含む溶液に添加され得るコスモトロピック塩の例としては、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、リン酸カリウム、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、及びそれらの組み合わせが挙げられる。適切なコスモトロピック塩は、０．１Ｍ以上、０．５Ｍ以上、又は１．０Ｍ以上、又は２．０Ｍ以上の量で添加することができる。適切なコスモトロピック塩は、６．０Ｍ以下、５．０Ｍ以下、又は４．０Ｍ以下の量で添加することがで

きる。コスモトロピック塩は、０．１Ｍ～６Ｍ、０．５Ｍ～２．５Ｍ、又は０．５Ｍ～３．０Ｍの範囲の量で添加することができる。

【０１０７】

溶液中に存在し得るカオトロピック塩の例としては、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、及びそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、カオトロピック塩の量は、１Ｍ以下、０．５Ｍ以下、又は０．１Ｍ以下に維持される。いくつかの実施形態では、溶液はカオトロピック塩を含まないか、又は実質的に含まない。

【０１０８】

精製プロセス中に使用される適切な溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ＤＭＳＯ、及びＤＭＦなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルが溶液に添加される。適切な溶媒は、５重量％以上、１０重量％以上、２０重量％以上、３０重量％以上、４０重量％以上、５０重量％以上、６０重量％以上、７０重量％以上、８０重量％以上、又は９０重量％以上の量で添加することができる。適切な溶媒は、９０重量％以下、８０重量％以下、７０重量％以下、６０重量％以下、５０重量％以下、４０重量％以下、３０重量％以下、又は２０重量％以下の量で添加することができる。溶媒は、１０重量％～９０重量％、２０重量％～８０重量％、３０重量％～７０重量％、又は１０重量％～５０重量％の範囲の量で添加することができる。

【０１０９】

標的とリガンドとの間の電荷反発によって固定化塩基から標的分子を溶出させるために、異なる溶媒又は低い導電率の緩衝液を使用することができる。

【０１１０】

疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）基材を調製するために使用される基材は、任意の適切な材料であってよい。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）基材は、膜、樹脂、モノリス、ヒドロゲル、及び繊維などであるか、又はそれらを含む。一実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）基材は、膜であるか、又は膜を含む。一実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）基材は、不織布繊維質基材であるか、又は不織布繊維質基材を含む。

【０１１１】

一実施形態によれば、疎水性相互作用基材は、速い流速で標的分子を精製するために使用することができる。例えば、疎水性相互作用基材は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間で標的分子を精製するために使用することができる。滞留時間に望ましい下限はないが、実際には滞留時間は１秒以上である。疎水性相互作用基材は、膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置として配置することができる。膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間を提供することができる。一実施形態によれば、膜に基づく精製装置を使用することにより、生産性を大幅に向上させることができる。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、分離媒体はマルチモーダル媒体を含む。マルチモーダル媒体は、基材上に２つ以上のタイプのリガンド又は官能基を含む媒体である。マルチモーダル媒体は、リガンドと標的分子との間の相互作用を強化することができる。いくつかの実施形態では、マルチモーダル媒体は、イオン交換リガンド又は官能基と、１つの他のタイプのリガンド又は官能基とを含む。いくつかのそのような実施形態では、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンドと、少なくとも１つの他のタイプの官能基とを含む。いくつかの実施形態では、マルチモーダル媒体は、アニオン交換リガンドと少なくとも１つの他のタイプの官能基とを含む。少なくとも１つの他のタイプの官能基は、カチオン交換基又はアニオン交換基と同じリガンドの一部であってよく、或いは別のリガンド内にあってもよい。例えば、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンド又はアニオン交換リガンド

に加えて、疎水性相互作用基、水素結合基、親硫黄性基、又はそれらの組み合わせをさらに含み得る。一実施形態では、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンドと疎水性相互作用基との組み合わせを含む。一実施形態では、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンドと水素結合基との組み合わせを含む。一実施形態では、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンドと親硫黄性基との組み合わせを含む。マルチモーダル媒体は、３つ以上のタイプの官能基を含むこともできる。マルチモーダル媒体は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、並びにそれらの類似体及び誘導体を分離又は精製するために使用することができる。

【０１１３】

例示的な実施形態によれば、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンド及び親水性リガンドを含むリガンドを含む。

【０１１４】

例示的な実施形態によれば、マルチモーダル媒体は、カチオン交換リガンド及び疎水性相互作用リガンドを含むリガンドを含む。

【０１１５】

例示的な実施形態によれば、マルチモーダル媒体は、アニオン交換リガンド及び親水性リガンドを含むリガンドを含む。

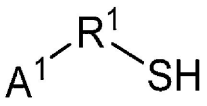
【０１１６】

例示的な実施形態によれば、マルチモーダル媒体は、アニオン交換リガンド及び疎水性相互作用リガンドを含むリガンドを含む。

【０１１７】

いくつかの例では、マルチモーダル媒体は、親硫黄性官能基も含むカチオン交換リガンドを含む。分離媒体基材上に配置され得る適切な親硫黄性カチオン交換リガンドの例としては、メルカプトカルボン酸及びその塩が挙げられる。親硫黄性カチオン交換リガンドは、次の式で表すことができる：

【化３】



（式中、R^1はスペーサー基である）。R^1は、１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素を含む、置換又は無置換の脂肪族又は芳香族基であってよい。R^1は、直鎖、分岐、又は環状であってよい。A^1は、カルボン酸（任意選択的には、安息香酸又はベンジル位などで芳香族基にコンジュゲートしている）又はスルホネート基である。

【０１１８】

適切な親硫黄性カチオン交換リガンドの例としては、メルカプト安息香酸（例えば２－メルカプト安息香酸又は４－メルカプト安息香酸）、並びにメルカプトスルホン酸及びその塩、例えば３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムが挙げられる。リガンドは、硫黄含有官能基と他の（例えば酸）官能基との間に、１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さのリンカーを含み得る。

【０１１９】

親硫黄性カチオン交換基材は、最初にベース基材（例えば膜又は不織布基材）をリンカー活性化剤及び触媒の溶液にさらし（例えば浸漬し）、次いでリガンドと任意選択的な触媒とを含む溶液に基材をさらし（例えば浸漬し）、最後に基材を緩衝液に浸漬することによって調製することができる。例示的な一実施形態では、リンカー活性化剤はＮ，Ｎ－ジスクシミジルカーボネート（ＤＳＣ）であるか、又はこれを含み、触媒はトリエチルアミン（ＴＥＡ）を含む。

【０１２０】

例示的な一実施形態では、親硫黄性カチオン交換基材は３段階のプロセスで製造される。１段階目は、ベース基材をリンカー活性化剤と触媒との溶液にさらす（例えば浸漬する）ことを含む。これは、溶媒中に０．１ｍｇ／ｍＬ～１２０ｍｇ／ｍＬのＤＳＣ、及び５μＬ／ｍＬ～１００μＬ／ｍＬのＴＥＡを含み得る。溶媒としては、ＤＭＳＯ、アセトニトリル、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ヘキサメチルホスホルアミド、スルホラン、又は基材（例えば膜）を膨潤させる任意の他の溶媒／溶液が挙げられる。さらすことは、約１０℃～６０℃の温度で約１分間～１，８００分間行うことができる。例えば、１０ｍＬのＤＭＳＯに溶解した３００ｍｇのＤＳＣ、１３９μＬのＴＥＡに、４７ｍｍの直径と７０μｍの厚さを有する膜を４０℃で１６時間浸漬することができる。

【０１２１】

この例示的な実施形態では、２段階目は、リガンドと任意選択的な触媒とを含む溶液に基材をさらす（例えば浸漬する）ことを含む。これは、溶媒中に約０．１ｍｇ／ｍＬ～１５０ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬ、又は１０ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含み得る。溶媒は、ＤＭＳＯ、又は別の有機溶媒、例えばアセトニトリル、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ヘキサメチルホスホルアミド、スルホランなど、又は基材を膨潤させる任意の他の溶媒／溶液であってよい。さらすことは、約１０℃～６０℃の温度で約１分～２４時間行うことができる。例えば、３００ｍｇの３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムと１ｍＬのＴＥＡとが１０ｍＬのＤＭＳＯに溶解している溶液中に、膜を４０℃で１６時間入れることができる。

【０１２２】

この例示的な実施形態では、３段階目は、２段階目からの基材を緩衝液にさらす（例えば浸漬する）ことを含む。これは、ｐＨ７．０～１０．０で０．０５Ｍ～４ＭのＴｒｉｓを含み得る。さらすことは、約１０℃～６０℃の温度で約１分～２４時間行うことができる。例えば、膜は、ｐＨ８．０の１Ｍのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ）中に１６時間入れられる。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、目的とする標的は、核酸塩基若しくは修飾核酸塩基、ヌクレオシド若しくは修飾ヌクレオシド、又はヌクレオチド若しくは修飾ヌクレオチドである。標的分子を溶解させるか若しくはその安定性を維持できるようにするために、又は望みのレベルの結合及び選択性を実現できるようにするために、溶液に適切な溶媒、塩、又は他の添加剤が添加されてもよい。

【０１２４】

精製プロセス中に使用される適切な塩としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム、塩化ルビジウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化セシウム、トリス塩基、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、及び硫酸アンモニウムなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、又は塩化マグネシウムが溶液に添加される。適切な塩は、１ｍＭ以上、５ｍＭ以上、又は１０ｍＭ以上、又は２０ｍＭ以上の量で添加することができる。適切な塩は、１００ｍＭ以下、５０ｍＭ以下、又は３０ｍＭ以下の量で添加することができる。塩は、１ｍＭ～１００ｍＭ、１ｍＭ～５０ｍＭ、５ｍＭ～３０ｍＭ、又は５ｍＭ～２０ｍＭの範囲の量で添加することができる。

【０１２５】

精製プロセス中に使用される適切な溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ＤＭＳＯ、及びＤＭＦなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、エタノール、イソプロパノール、又はアセトニトリルが溶液に添加される。適切な溶媒は、５重量％以上、１０重量％以上、２０重量％以上、３０重量％以上、４０重量％以上、５０重量％以上、６０重量％以上、７０重量％以上、８０重量％以上、又は９０重量％以上の量で添加することができる。適切な溶媒は、９０重量％以下、８０重量％以下、７０重量％以下、６０重量％以下、５０重量％以下、４０重量％以下、３０重

量％以下、又は２０重量％以下の量で添加することができる。溶媒は、１０重量％～９０重量％、２０重量％～８０重量％、３０重量％～７０重量％、又は１０重量％～５０重量％の範囲の量で添加することができる。

【０１２６】

標的とリガンドとの間の電荷反発によって固定化塩基から標的分子を溶出させるために、異なる溶媒又はより高い導電率の緩衝液を使用することができる。

【０１２７】

マルチモーダル媒体カチオン交換クロマトグラフィーを使用して標的分子を分離又は精製する場合、分子をプロトン化された状態に維持するために、溶液のｐＨが標的分子のｐＫａ未満に留まるように、溶液のｐＨを監視及び制御することができる。また、標的の分解を防止するためにｐＨを閾値よりも高く維持することもでき、これはリガンドが負に帯電した状態を維持するためにマルチモーダルリガンドのｐＫａよりも上である。適切なｐＨ範囲の例には、保護アルコールの有無にかかわらず、シチジン及びゲムシタビンのｐＨ１～３が含まれる。

【０１２８】

マルチモーダル媒体のカチオン交換リガンドと結合した分子は、例えば導電率を上げ、カチオン交換リガンドと標的分子との間の静電引力をスクリーニングすることによって溶出させることができる。一実施形態では、溶出は、標的分子中のアミンのｐＫａを超えるｐＨに変更し、標的分子内に中性電荷を形成し、それにより電荷相互作用を減少させ、溶出を誘発することによって行うことができる。異なる標的分子（又は標的分子と他の分子）は、直線勾配溶出又は段階的アイソクラティック溶出を使用して溶出することができる。

【０１２９】

マルチモーダル媒体アニオン交換クロマトグラフィーを使用して標的分子を分離又は精製する場合、分子を脱プロトン化状態に維持するために、溶液のｐＨが標的分子のｐＫａを超えたままになるように溶液のｐＨを監視及び制御することができる。また、標的の分解を防止するためにｐＨを閾値よりも低く維持することもでき、これはリガンドが正に帯電した状態を維持するためにマルチモーダルリガンドのｐＫａよりも下でもある。適切なｐＨ範囲の例には、アデノシン一リン酸精製についてのｐＨ３～１０が含まれる。

【０１３０】

マルチモーダル媒体のアニオン交換リガンドと結合した分子は、例えば、導電率を上げ、カチオン交換リガンドと標的分子の間の静電引力をスクリーニングすることによって溶出させることができる。一実施形態では、溶出は、標的分子中のｐＫａよりも低いｐＨに変更して電荷相互作用を減少させ、溶出を誘発することによって行うことができる。異なる標的分子（又は標的分子と他の分子）は、直線勾配溶出又は段階的アイソクラティック溶出を使用して溶出することができる。

【０１３１】

マルチモーダル媒体を製造するために使用される基材は、任意の適切な材料であってよい。いくつかの実施形態では、マルチモーダル媒体は、膜、樹脂、モノリス、ヒドロゲル、及び繊維などであるか、又はそれらを含む。一実施形態では、マルチモーダル媒体は、膜であるか、又は膜を含む。一実施形態では、マルチモーダル媒体は、不織布繊維質基材であるか、又は不織布繊維質基材を含む。

【０１３２】

一実施形態によれば、マルチモーダル媒体は、速い流速で標的分子を精製するために使用することができる。例えば、マルチモーダル媒体は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間で標的分子を精製するために使用することができる。滞留時間は分離装置の大きさにある程度依存し、小さな装置では滞留時間が１秒以下ほどに短い場合もある。滞留時間に望ましい下限はないが、実際には滞留時間は０．１秒以上である。マルチモーダル媒体は、膜クロマトグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置として配置することができる。膜クロマ

トグラフィーカラム、膜クロマトグラフィーカセット、又は他の膜クロマトグラフィー装置は、２分以下、１分以下、３０秒以下、１０秒以下、又は６秒以下の滞留時間を提供することができる。一実施形態によれば、膜に基づく精製装置を使用することにより、生産性を大幅に向上させることができる。

【０１３３】

例示的な実施形態

以下は、本開示による例示的な実施形態の非限定的なリストである。

【０１３４】

実施形態１は、膜と；膜上に固定化された複数のリガンドであって、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせを含む複数のリガンドと；を含む分離媒体である。

【０１３５】

実施形態２は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、それらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組み合わせを含む標的分子を反応混合物から分離するように構成されている、実施形態１の分離媒体である。

【０１３６】

実施形態３は、有機溶媒と共に使用するように構成されている、実施形態１又は２の分離媒体である。

【０１３７】

実施形態４は、複数のリガンドが、隣接するアミン間に１～１８個の炭素を含む脂肪族ジアミン又はトリアミンを含むアニオン交換リガンドを含む、実施形態１～３のいずれか１つの分離媒体である。

【０１３８】

実施形態５は、アニオン交換リガンドが、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルプロピレンジアミン、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態４の分離媒体である。

【０１３９】

実施形態６は、複数のリガンドが、アミノカルボン酸、アミノスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含むカチオン交換リガンドを含む、実施形態１～５のいずれか１つの分離媒体である。

【０１４０】

実施形態７は、カチオン交換リガンドが、アミノ基と酸又はスルホネート基との間に１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さのスペーサーを含むアミノ安息香酸、アミノ二酢酸、アミノプロパン酸、３－アミノ－１－プロパンスルホン酸、３－アミノ－１－エチルスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態６の分離媒体である。

【０１４１】

実施形態８は、複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、及び疎水性相互作用リガンドのうちの２つ以上を含む、実施形態１～７のいずれか１つの分離媒体である。

【０１４２】

実施形態９は、複数のリガンドが、カチオン交換性官能基と親硫黄性官能基とを有するリガンドを含む、実施形態１～８のいずれか１つの分離媒体である。

【０１４３】

実施形態１０は、複数のリガンドが、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせを含み、好ましくは複数のリガンドが、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含む、実施形態９の分離媒体である。

【０１４４】

実施形態１１は、複数のリガンドが、式（Ｉ）：

Ｆｈ－Ｓｐ－Ｓｇ　（Ｉ）

（式中、Ｆｈは官能基ハンドルであり、Ｓｐはスペーサーであり、Ｓｇは官能性分離基である）
を有するリガンドから形成され、
官能基ハンドルが、アミン；アルコール；活性化アルコール；エポキシド；イソシアネート；アルケン；アルキン；シクロアルケン；シクロオクチン；チオール；ジスルフィド；アジド；チオイソシアネート；Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド；マレイミド；活性化エステル；及び活性化カルボン酸から選択され、
スペーサーが、任意選択的には炭素鎖に沿った１つ以上のエーテル、エステル、ベンジル、フェニル、又はアミドで置換されていてもよい、長さがＣ１～Ｃ１８、Ｃ１～Ｃ１０、Ｃ１～Ｃ６、Ｃ１～Ｃ４、Ｃ１～Ｃ３、又はＣ２～Ｃ４の炭素鎖であり、
官能性分離基が、カチオン交換分離基、アニオン交換分離基、疎水性分離基、又は親硫黄性分離基である、
実施形態１～１０の分離媒体である。

【０１４５】
実施形態１２は、官能性分離基が、酸、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、カルボキシレート、スルホネート、又はホスフェートを含む、実施形態１１の分離媒体である。

【０１４６】
実施形態１３は、官能性分離基が、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アミン、又はそれらの組み合わせを含み、任意選択的には、官能基ハンドルが、第二級アミン、第三級アミン、又は第四級アミンを含み、隣接するアミンが、１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、１～４個の炭素、又は２～４個の炭素の脂肪族炭素鎖によって隔てられている、実施形態１１の分離媒体である。

【０１４７】
実施形態１４は、官能性分離基が、２個以上の炭素の長さを有する脂肪族鎖（任意選択的にはブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、及びドデシル）、ベンジル、フェニル、フェノール、ピリジン、ボロン酸、分岐ポリマー（任意選択的にはポリプロピレングリコール）、硫黄含有親硫黄性リガンド（任意選択的にはプロパンチオール、２－ブタンチオール、３，６－ジオキサ－１，８－オクタンジチオール、オクタンチオール、ベンジルメルカプタン、２－メルカプトピリジン、チオフェノール、１，２－エタンジチオール、１，４－ベンゼンジメタンチオール、若しくは２－フェニルエタンチオール）、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態１１の分離媒体である。

【０１４８】
実施形態１５は、官能基ハンドルがチオールを含み、官能性分離基が、酸、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、カルボキシレート、スルホネート、又はホスフェートを含む、実施形態１１の分離媒体である。

【０１４９】
実施形態１６は、ハウジングと；ハウジング内に配置された分離媒体とを含む分離装置であって、分離媒体が、膜と；膜上に固定化された複数のリガンドとを含み、複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせを含む、分離装置である。

【０１５０】
実施形態１７は、ハウジングがカセット又はカラムを含む、実施形態１６の分離装置である。

【０１５１】
実施形態１８は、反応混合物から核酸塩基を含む標的分子を分離するように分離媒体が構成されている、実施形態１６又は１７の分離装置である。

【０１５２】
実施形態１９は、分離媒体が有機溶媒と共に使用するように構成されている、実施形態１６～１８のいずれか１つの分離装置である。

【０１５３】
実施形態２０は、複数のリガンドが、隣接するアミン間に１～１８個の炭素を含む脂肪族ジアミン又はトリアミンを含むアニオン交換リガンドを含む、実施形態１６～１９のいずれか１つの分離装置である。
【０１５４】
実施形態２１は、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピレンジアミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルプロピレンジアミン、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態２０の分離装置である。
【０１５５】
実施形態２２は、複数のリガンドが、アミノカルボン酸、アミノスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含むカチオン交換リガンドを含む、実施形態１６～２１のいずれか１つの分離装置である。
【０１５６】
実施形態２３は、カチオン交換リガンドが、アミノ基と酸又はスルホネート基との間に１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、又は２～４個の炭素の長さのスペーサーを含むアミノ安息香酸、アミノ二酢酸、アミノプロパン酸、３－アミノ－１－プロパンスルホン酸、３－アミノ－１－エチルスルホン酸、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態２２の分離装置である。
【０１５７】
実施形態２４は、複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、親水性リガンド、及び疎水性相互作用リガンドのうちの２つ以上を含む、実施形態１６～２３のいずれか１つの分離装置である。
【０１５８】
実施形態２５は、複数のリガンドが、カチオン交換性官能基と親硫黄性官能基とを有するリガンドを含む、実施形態１６～２４のいずれか１つの分離装置である。
【０１５９】
実施形態２６は、複数のリガンドが、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせを含み、好ましくは複数のリガンドが、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含む、実施形態２５の分離装置である。
【０１６０】
実施形態２７は、複数のリガンドが、式（Ｉ）：
Ｆｈ－Ｓｐ－Ｓｇ　（Ｉ）
（式中、Ｆｈは官能基ハンドルであり、Ｓｐはスペーサーであり、Ｓｇは官能性分離基である）
を有するリガンドから形成され、
官能基ハンドルが、アミン；アルコール；活性化アルコール；エポキシド；イソシアネート；アルケン；アルキン；シクロアルケン；シクロオクチン；チオール；ジスルフィド；アジド；チオイソシアネート；Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド；マレイミド；活性化エステル；及び活性化カルボン酸から選択され、
スペーサーが、任意選択的には炭素鎖に沿った１つ以上のエーテル、エステル、ベンジル、フェニル、又はアミドで置換されていてもよい、長さがＣ１～Ｃ１８、Ｃ１～Ｃ１０、Ｃ１～Ｃ６、Ｃ１～Ｃ４、Ｃ１～Ｃ３、又はＣ２～Ｃ４の炭素鎖であり、
官能性分離基が、カチオン交換分離基、アニオン交換分離基、疎水性分離基、又は親硫黄性分離基である、
実施形態１６～２６の分離装置である。
【０１６１】
実施形態２８は、官能性分離基が、酸、スルホン酸、又はホスフェートを含む、実施形態２７の分離装置である。
【０１６２】
実施形態２９は、官能性分離基が、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四

級アミン、又はそれらの組み合わせを含み、任意選択的には、官能基ハンドルが、第二級アミン、第三級アミン、又は第四級アミンを含み、隣接するアミンが、１～１８個の炭素、１～１０個の炭素、１～６個の炭素、１～４個の炭素、又は２～４個の炭素の脂肪族炭素鎖によって隔てられている、実施形態２７の分離装置である。

【０１６３】

実施形態３０は、官能性分離基が、２個以上の炭素の長さを有する脂肪族鎖（任意選択的にはブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、及びドデシル）、ベンジル、フェニル、フェノール、ピリジン、ボロン酸、分岐ポリマー（任意選択的にはポリプロピレングリコール）、硫黄含有親硫黄性リガンド（任意選択的にはプロパンチオール、２－ブタンチオール、３，６－ジオキサ－１，８－オクタンジチオール、オクタンチオール、ベンジルメルカプタン、２－メルカプトピリジン、チオフェノール、１，２－エタンジチオール、１，４－ベンゼンジメタンチオール、若しくは２－フェニルエタンチオール）、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態２７の分離装置である。

【０１６４】

実施形態３１は、官能基ハンドルがチオールを含み、官能性分離基が、酸、スルホン酸、又はホスフェートを含む、実施形態２７の分離装置である。

【０１６５】

実施形態３２は、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、又はその類似体若しくは誘導体を含む標的分子を含む溶液を膜クロマトグラフィー装置に通すことを含む、標的分子の精製方法であって、膜クロマトグラフィー装置が、ハウジングと；ハウジング内に配置された分離媒体とを含み、分離媒体が、膜と；膜上に固定化された複数のリガンドとを含み、複数のリガンドが、アニオン交換リガンド、カチオン交換リガンド、親硫黄性リガンド、疎水性相互作用リガンド、親水性リガンド、又はそれらの組み合わせを含む、方法である。

【０１６６】

実施形態３３は、標的分子の合成後に反応混合物を含む溶液から標的分子が精製される、実施形態３２の方法である。

【０１６７】

実施形態３４は、分離媒体がアニオン交換膜を含む、実施形態３２又は３３の方法である。

【０１６８】

実施形態３５は、膜クロマトグラフィー装置内の溶液の滞留時間が６０秒以下である、実施形態３２～３４のいずれか１つの方法である。

【０１６９】

実施形態３６は、標的分子がヌクレオチド又は核酸である、実施形態３２～３５のいずれか１つの方法である。

【０１７０】

実施形態３７は、分離媒体が親硫黄性カチオン交換膜を含む、実施形態３２～３６のいずれか１つの方法である。

【０１７１】

実施形態３８は、親硫黄性カチオン交換膜が、親硫黄性官能基を有するカチオン交換リガンドを含む、実施形態３２～３７のいずれか１つの方法である。

【０１７２】

実施形態３９は、溶液が有機溶媒を含む、実施形態３２～３８のいずれか１つの方法である。

【０１７３】

実施形態４０は、複数のリガンドが、カチオン交換性官能基と親硫黄性官能基とを有するリガンドを含む、実施形態３２～３９のいずれか１つの方法である。

【０１７４】

実施形態４１は、複数のリガンドが、メルカプト安息香酸、メルカプトスルホン酸、それらの塩、又はそれらの組み合わせを含み、好ましくは複数のリガンドが、３－メルカプト－１－プロパンスルホン酸ナトリウムを含む、実施形態３２～４０のいずれか１つの方法である。

【０１７５】

実施形態４２は、分離媒体が実施形態１～１５のいずれか１つによるものである、及び／又は分離装置が実施形態１６～３１のいずれか１つによるものである、実施形態３２～４１のいずれか１つの方法である。

【実施例】

【０１７６】

これらの実施例は、例示目的にすぎず、添付の特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。実施例及び明細書の残りの部分における全ての部、パーセント割合、比などは、別段の明記がない限り重量基準である。

【０１７７】

様々なタイプの分離膜の性能を試験し、対照サンプルと比較して評価した。

【０１７８】

試験方法

１０％破過時の動的結合容量（ＤＢＣ$_{10\%}$）は、例えばＣｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ純粋高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）などの標準的なクロマトグラフィー法によって決定することができる。最初に、前記分離媒体をハウジングユニットに充填する。次いで、入れられた分離媒体をＦＰＬＣに接続する。次に、適切な波長のＵＶシグナルによって決定される標的の流出液濃度が供給濃度の１０％に到達するまで、一定のカラム体積／分流速（ＣＶ／分）で供給材料を分離媒体に通す。最後に、ＦＰＬＣシステム内の保持体積と分離媒体の体積に基づいて、ＤＢＣ$_{10\%}$は以下の通りに計算される：（（１０％破過－保持体積）×（供給液濃度））／（分離媒体の体積）＝ＤＢＣ$_{10\%}$（これは標的物質のｍｇ／クロマトグラフィー媒体のｍＬとして表される）。

【０１７９】

サンプル試験

ＤＢＣ$_{10\%}$は、上述した通りにクロマトグラフィーを使用して決定した。完全な結合－溶出クロマトグラフは、典型的には以下の４つのステップを含む：

ステップ１－平衡化：含まれている分離媒体を緩衝液Ａで平衡化する。

ステップ２－ローディング：ローディング物質を、１０％の破過が達成されるまで分離媒体を通して注入／ポンプ送液する。

ステップ３－洗浄：洗浄緩衝液を使用して媒体を洗浄する。洗浄緩衝液は、不純物の一部を洗い流すために単一の緩衝液又は複数の緩衝液であってよい。洗浄緩衝液には、緩衝液Ａ又は異なる緩衝液Ｂ、或いは緩衝液Ａ及び／又はＢ及び／又は追加の緩衝液（Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆなど）を含む緩衝液の組み合わせ、或いは緩衝液Ａ及び／又はＢ及び／又は追加の緩衝液（Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆなど）の間の勾配遷移、或いは緩衝液Ａ及び／又はＢ及び／又は追加の緩衝液（Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆなど）の組み合わせの間の勾配遷移が含まれ得る。

ステップ４－溶出：緩衝液Ｃを使用して、ローディング物質（標的及び不純物の一部など）を分離媒体から溶出する。溶出緩衝液には、緩衝液Ｃ又は異なる緩衝液Ｂ、或いは緩衝液Ｃ及び／又はＢ及び／又は追加の緩衝液（Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆなど）を含む緩衝液の組み合わせ、或いは緩衝液Ｃ及び／又はＢ及び／又は追加の緩衝液（Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆなど）の間の勾配遷移、或いは緩衝液Ｃ及び／又はＢ及び／又は追加の緩衝液（Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆなど）の組み合わせの間の勾配遷移が含まれ得る。

【０１８０】

溶出液は、さらなる分析のために回収することができる。

【０１８１】

上記の４つの主要なステップに加えて、場合によっては、サイクルを再開する前に、ストリッピング及び／又は定置洗浄（ＣＩＰ）ステップを行うこともできる。

【０１８２】
実施例１－ＡＥＸ膜の作製
ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１０ｍＬに溶解させたＮ，Ｎ－ジスクシイミジルカーボネート（ＤＳＣ）３００ｍｇとトリエチルアミン（ＴＥＡ）１３９μＬとの溶液に、直径４７ｍｍ、厚さ７０μｍの再生セルロース膜を４０℃で１６時間浸漬した。続いて、この膜を、ＤＭＳＯ　１ｍＬあたり１００μＬのＮ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン（ＤＭＥＤＡ）の溶液に室温で１６時間入れた。最後に、膜をｐＨ８．０の１ＭのＴｒｉｓに１６時間入れた。
【０１８３】
実施例２－親硫黄性ＣＥＸ膜の作製
３００ｍｇのＤＳＣと１３９μＬのＴＥＡとの溶液に、直径４７ｍｍ、厚さ７０μｍの再生セルロース膜を４０℃で１６時間浸漬した。この膜を、１０ｍＬのＤＭＳＯに溶解させた３００ｍｇの３－メルカプトプロパンスルホン酸ナトリウムと０．５ｍＬのＴＥＡとの溶液に４０℃で１６時間浸漬した。最後に、膜をｐＨ８．０の２００ｍＭのＴｒｉｓに１６時間入れた。
【０１８４】
実施例３－分離媒体のＤＢＣ
親硫黄性ＣＥＸ分離媒体の動的結合容量を様々な流速で試験した。分離膜は実施例２に従って作製した。
【０１８５】
４層の２４ｍｍの円形分離膜をミニカラム（膜体積＝０．１ｍＬ）に充填し、Ｃｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ　Ｐｕｒｅに連結して動的結合容量を決定した。この実施例では、ローディング物質は、１０ｍＭリン酸、ｐＨ２．０中の０．８ｍｇ／ｍＬのシチジンであった。シチジン溶液を、カラム体積／分（ＣＶ／分）で特定される様々な流速で、１０％の破過まで膜に適用した。ＤＢＣ$_{10\%}$の結果を図２にグラフで示す。
【０１８６】
図２から、流速が増加するとシチジンのＤＢＣ$_{10\%}$が増加することが分かる。トランスカラム圧力（ΔＣ）圧力は１１０ＣＶ／分で０．０６ＭＰａであり、これは流速をさらに上げることができる可能性があることを示している。
【０１８７】
実施例４－有機緩衝液系を用いたシチジンの分離
有機緩衝系中でシチジンを分離するための親硫黄性ＣＥＸ分離媒体の能力を試験した。分離膜は実施例２に従って作製した。２つの市販の製品、Ｍａｒｌｂｏｒｏｕｇｈ，ＭＡのＣｙｔｉｖａから入手可能なＨＩＴＲＡＰ（登録商標）ＳＰ　ＨＰカチオン交換クロマトグラフィーカラムと、Ｎａｔｒｉｘ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓから入手可能なＮＡＴＲＩＦＬＯ（登録商標）ＨＤ－Ｓｂカラムを比較サンプルとして使用した。ＨＩＴＲＡＰ（登録商標）ＳＰ　ＨＰは樹脂ベースの強カチオン交換クロマトグラフィーカラム製品であり、ＮＡＴＲＩＦＬＯ（登録商標）ＨＤ－Ｓｂは疎水性相互作用基が強化されたヒドロゲルベースの強カチオン交換カラム製品である。
【０１８８】
結合－溶出クロマトグラフィー分離プロセスのために、８層の２４ｍｍの円形分離膜をポリプロピレンカラムハウジング（膜体積＝０．２ｍＬ）に充填し、Ｃｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ　Ｐｕｒｅに連結した。シチジンを、決定されたカラム体積／分流速（ＣＶ／分）で、１０％の破過までロードした。分離プロセスでは表１に示す緩衝液のリストを使用した。
【０１８９】

【表１】

表 1. 緩衝液のリスト。

ステップ	緩衝液
平衡化	5 mM リン酸 pH 2.0, 50% EtOH 水溶液
カラム洗浄	50% EtOH 水溶液
溶出	0.5 M NaCl pH 7, 50% EtOH

【０１９０】
サンプルの分離膜、樹脂（ＨＩＴＲＡＰ（登録商標）ＳＰ　ＨＰ）、及びヒドロゲル（ＮＡＴＲＩＸ（登録商標）ＨＤ－Ｓｂ）市販製品のクロマトグラムをそれぞれ図３Ａ、３Ｂ、３Ｃに示す。表２に、流速、ＤＢＣ$_{10\%}$、トランスカラム圧力（ΔＣ）を含む操作パラメータ及び出力がまとめられている。
【０１９１】
【表２】

表 2. 操作パラメータ。

サンプル	流速 (CV/min)	DBC 10% (シチジンの mg / クロマトグラフィー媒体の mL)	最高ΔC 圧力 (MPa)
親硫黄性 CEX 膜	10	35.1	0.07
HITRAP® SP HP	0.5	17	0.07
NATRIFLO® HD-Sb	12.5	1.9	0.09

【０１９２】
カラムの結合容量が図４で比較されている。分離膜は、表１の有機緩衝系を使用すると樹脂の結合容量の約２倍、ヒドロゲルの結合容量の約１８倍の結合容量を有することが観察された。同じトランスカラム圧力では、分離媒体の流速は樹脂の流速よりも少なくとも２０倍速い。
【０１９３】
実施例５－水性緩衝液系を用いたシチジンの分離
ＣＥＸ分離樹脂が水性緩衝液系でシチジンを分離する能力を試験した。分離樹脂は、Ｃｙｔｉｖａから購入したＨＩＴＲＡＰ（登録商標）ＳＰ　ＨＰ樹脂であった。
【０１９４】
完全な水系（２．４８～１．９９の範囲の様々なｐＨを持つ２０ｍＭのリン酸ナトリウム）で結合－溶出クロマトグラフィー分離プロセス行うために、１ｍＬのＨＩＴＲＡＰ（登録商標）ＳＰ　ＨＰ樹脂をＣｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ　Ｐｕｒｅに連結した。
【０１９５】
ｐＨ２．４８又はｐＨ１．９９の溶液中の２０ｍＭリン酸ナトリウムに溶解したシチジンの結合－溶出プロファイルを図５Ａに示す。
【０１９６】
ｐＨ２．４８でローディングした最初のサイクルでは、洗浄相のテールエンドで始まるブロード化したバイモーダルの溶出ピークが得られた。ｐＨ１．９９の２０ｍＭリン酸ナトリウムを使用した図５Ａの結合－溶出プロファイルを図５Ｂに示す。
【０１９７】

ローディングｐＨを２．４８から１．９９に下げると、ｐＨ２．４８における結合－溶出サイクルで観察されるブロードなバイモーダルピークと比較して、溶出を単一のシャープな溶出ピークに分離できることが観察された。シチジン上のプロトン化アミンは酸性環境（低いｐＨ）でより多く存在し、より高いｐＨで存在する脱プロトン化シチジンよりもＣＥＸカラムへの吸着が強くなるという仮説が立てられる。樹脂を使用して精製を行うこともできたものの、精製は著しく遅い流速で行われたため、同じリガンドを用いた膜と比較してプロセス全体のクロマトグラフィーの生産性が低い。

【０１９８】

実施例６－ＤＢＣ、及びＡＥＸの回収

実施例１に従って、細孔径１μｍのアニオン交換（ＡＥＸ）分離媒体を調製した。８層の２４ｍｍの円形ＡＥＸ膜をハウジングユニット（膜体積＝０．２ｍＬ）に充填し、Ｃｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ　ｐｕｒｅに連結して動的結合容量を測定した。この実施例では、ローディング物質は、平衡化緩衝液に溶解した０．２５ｍｇ／ｍＬのアデノシン－５’－一リン酸（ＡＭＰ、９６．９８％）であった。ＡＭＰは、１０％の破過に達するまで、異なるカラム体積／分流速（ＣＶ／分）でロードした。分離プロセスで使用した緩衝液のリストを表３に示す。

【０１９９】

【表３】

表 3. 緩衝液のリスト。

ステップ	緩衝液
平衡化	20 mM Tris pH 7
カラム洗浄	DI 水
溶出	1 M NaCl

【０２００】

クロマトグラムの重ね合わせを図６Ａに示す。ＡＥＸ分離媒体のＤＢＣ１０％及びＡＭＰ回収率を図６Ｂに示す。図６Ｂから、流速を増加させても前記ＡＥＸ分離媒体の結合容量又はＡＭＰ回収率が低下しないことが分かる。

【０２０１】

実施例７－異なる導電率の緩衝液条件におけるＡＥＸのＤＢＣ

８層の２４ｍｍの円形ＡＥＸ膜をハウジングユニット（膜体積＝０．２ｍＬ）に充填し、Ｃｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ　ｐｕｒｅに連結して動的結合容量を決定した。膜は実施例１に従って作製した。この実施例では、供給液は、０、１００ｍＭ、又は２００ｍＭのＮａＣｌを添加した平衡緩衝液中に０．２５ｍｇ／ｍＬのＡＭＰを含むものであった。ＡＭＰは、１０％の破過まで、異なるカラム体積／分流速（ＣＶ／分）でロードした。ＤＢＣを図３に示す。分離プロセスで使用した緩衝液のリストを表４に示す。

【０２０２】

【表４】

表 4. 緩衝液のリスト

ステップ	緩衝液
平衡化	20 mM Tris pH 7 (0、100 mM、又は 200 mM の NaCl を含有)
カラム洗浄	DI 水
溶出	1 M NaCl

【０２０３】

異なる流速及び塩条件下におけるＤＢＣ１０％を図７Ａに示す。クロマトグラムの重ね合わせを図７Ｂに示す。図３から、各緩衝液条件において、流速を増加させても前記ＡＥＸ分離媒体の結合容量は減少しないことが分かる。しかしながら、図７Ｂに示されるように、塩濃度の増加により、前記ＡＥＸ分離媒体の結合容量は大幅に減少する。１０ＣＶ／ｍＬでは、ＤＢＣは、塩の添加なしの３８ｍｇ／ｍＬから、２００ｍＭのＮａＣｌの添加での２ｍｇ／ｍＬへと減少する。

【０２０４】

実施例８－有機緩衝系における様々なアルコール及びアミン保護を有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体中間体の分離

モノ及び／又はジ保護アルコール及び／又は保護アミンの組み合わせを有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体と、過剰の保護剤とを含む有機溶媒中の混合物（表３に記載の平衡化緩衝液で５０倍に希釈）から、脱保護されたアミンを有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体中間体を分離するための、親硫黄性－ＣＥＸ分離媒体の能力を試験した。分離膜は実施例２に従って作製した。

【０２０５】

８層の２４ｍｍの円形分離膜を膜ハウジング（膜体積＝０．２ｍＬ）に充填し、結合－溶出クロマトグラフィー分離プロセスのためにＣｙｔｉｖａ　ＡＥＫＴＡ　Ｐｕｒｅに連結した。モノ及び／若しくはジ保護アルコール並びに／又は保護アミンと過剰の保護剤との組み合わせと、ジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体との混合物を有機溶媒中に含むサンプル（表３に記載の平衡化緩衝液で５０倍に希釈）を、１０％の破過に到達するまで、決定されたカラム体積／分流速（ＣＶ／分）でロードした。表５に列挙した緩衝液を分離プロセスで使用した。

【０２０６】

【表５】

表 5. 緩衝液のリスト。

緩衝液
5 mM リン酸 pH 2/50% EtOH 水溶液
50% EtOH
0.5 M NaCl pH 7/50% EtOH 水溶液
30% イソプロピルアルコール

【０２０７】

このプロセスを１０回繰り返し、それぞれのクロマトグラムを図８Ａで重ね合わせた。

【０２０８】

結合－溶出精製サイクルは実行間で一貫していることが分かった。５回の実行ごとにサンプルを採取し、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（商標）Ｌｉｔｅ　ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから入手可能）を使用して２６０ｎｍにおけるＵＶ吸光度により濃度を評価した。収率は変動係数５．１７％で一貫していることが分かった。

【０２０９】

薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）分析のために供給液と溶出液のサンプルも採取した。ＴＬＣプレートの写真を図８Ｂに示す。左側が供給液サンプル、右側が溶出液サンプルである。図８Ｂに示されているように、モノアルコール保護（下）、ジアルコール保護（中）、及びトリ（上）保護を有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体を表す粗供給液（左）中の３つの種が、供給液中のジ保護種のバンドと同じ位置にある溶出液（右）中の濃縮されたジ保護種の単一バンドへと減少した。このことは、部分的に有機溶媒系でのＣＥＸ精製のためのピリミジン上のアミンペンダント基の利用の成功を示唆している。ここでのトリ保護種とは、ジ保護アルコールと保護アミンとを有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体を指す。プロトン化されたアミンは、アミンが保護されていない保護なしのアル

コール、モノ保護アルコール、及びジ保護アルコールの任意の組み合わせでのみ存在し、それにより保護されたアミンを持つ他のバリアントよりもＣＥＸカラムに強く引き寄せられるという仮説が立てられる。アミンが保護された分子では、ペンダントアミンはプロトン化できないため、ＣＥＸメカニズムによるカラムへの吸着が非常に弱くなる。

【０２１０】

実施例９－比較試験

モノ及び／又はジ保護アルコール及び／又は保護アミンの組み合わせを有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体と、過剰の保護剤とを含む有機溶媒中の混合物（表３に記載の平衡化緩衝液で５０倍に希釈）からの、脱保護されたアミンを有するジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体中間体の分離を、実施例２に従って作製したカチオン交換膜を使用して試験し、ＨＩＴＲＡＰ（登録商標）ＳＰ　ＨＰカチオン交換樹脂カラムを試験した。

【０２１１】

試験は１ｍＬ／分の流速で行い、処理時間は１２分であった。溶液は低導電率エタノール／リン酸塩混合物（低導電率）で希釈し、カラムは１ＭのＮａＣｌ（高導電率）で溶出した。

【０２１２】

樹脂カラムの樹脂体積は１ｍＬであり、推定結合容量は８ｍｇ／ｍＬであった。予測される大スケールでの滞留時間は、１サイクルあたり１２０分以上である。結合－溶出データを図９Ａに示す。

【０２１３】

膜カラムの媒体容量は０．１ｍＬであり、推定結合容量は８０ｍｇ／ｍＬであった。予測される大スケールでの滞留時間は、１サイクルあたり約２４分である。結合－溶出データを図９Ｂに示す。

【０２１４】

両方のカラムからの結合－溶出データを図９Ｃに重ねて合わせて示す。

【０２１５】

樹脂を使用して精製を行うこともできたが、流速が著しく遅いため、膜を用いて行った分離と比較して、プロセス全体のクロマトグラフィーの生産性が低くなった。

【０２１６】

ＨＰＬＣにより純度を比較すると、樹脂を使用した精製よりも膜を使用した精製の方がわずかに純度の高い溶出液が得られた。図９Ｄに、樹脂を用いて行った精製と膜を用いて行った精製の溶出液プールの純度を示すＨＰＬＣクロマトグラムを示す。さらに、溶出液の回転蒸発により、有機溶媒と保護剤を過剰に含む供給液から、ジ保護アルコールと保護されていないアミンとを有する標的のジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体の結晶が得られることが観察された。有機溶媒と保護剤を過剰に含む未精製の原料を回転蒸発させても結晶生成物は得られず、このことは、保護されていないアミンを有する目的の標的ジフルオロ置換ヌクレオシド誘導体が他の成分から分離されていることを示唆している。

【０２１７】

溶出は、塩濃度の増加と併せて有機溶媒組成を増加させることによって行うことができる。これは、下流の乾燥前の精製、又は低水分条件で行われる後続の合成工程に特に有利である。有機溶媒を使用すると、溶媒の割合が多くなって除去及び回収がより容易になるため、回転蒸発工程が加速される可能性がある。さらに、塩の使用が減ると、後続の精製工程で除去する必要がある物質が少なくなる。溶出は、９５％エタノール中５％という低さの１ＭのＮａＣｌを含む緩衝液（最終濃度５０ｍＭ）で行うことに成功した。

【０２１８】

実施例１０－ＭＣＰのＤＢＣ

樹脂ベースのメルカプトピリジン（ＭＣＰ）（Ｃｙｔｉｖａ　ＰｌａｓｍｉｄＳｅｌｅｃｔ）が水性緩衝液系でシチジンを分離する能力を試験した。２０ｍＭの酢酸ナトリウム、３Ｍの硫酸アンモニウム、ｐＨ４．１の中の濃度０．３１２５ｍｇ／ｍＬのシチジンを、樹脂ベースのＭＣＰ（Ｃｙｔｉｖａ　ＰｌａｓｍｉｄＳｅｌｅｃｔ）カラムに適用し、

２０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ７．０での溶出による結合を評価した。

【０２１９】

結合と溶出のサイクルを行うことに成功し、図１０に示すような溶出ピークが観察された。精製時間の短縮による生産性の向上は、膜ベースのＭＣＰを用いた同様の精製の結果であろうと予想される。さらに、これらの条件及び同様の条件が他のＨＩＣカラムにも適用できると仮説が立てられる。

【０２２０】

本明細書で引用された全ての参考文献及び刊行物は、本開示と直接矛盾する可能性がある範囲を除き、その全体が参照により本開示に明示的に組み込まれる。特定の実施形態が本明細書で図示及び説明されているが、本開示の範囲から逸脱することなしに、様々な代替及び／又は同等の実施によって示された及び説明された特定の実施形態が置き換えられ得ることが当業者に理解されるであろう。本開示は、本明細書に記載の例示的な実施形態及び実施例によって不当に限定されることを意図しておらず、そのような実施例及び実施形態は例示としてのみ示されており、本開示の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図されていることが理解されるべきである。

【図面】

【図１Ａ】

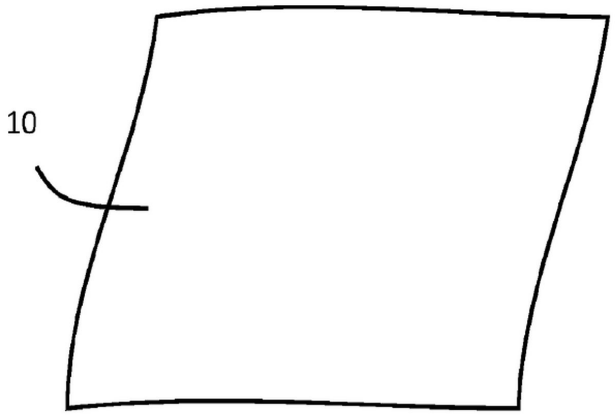


FIG. 1A

【図１Ｂ】

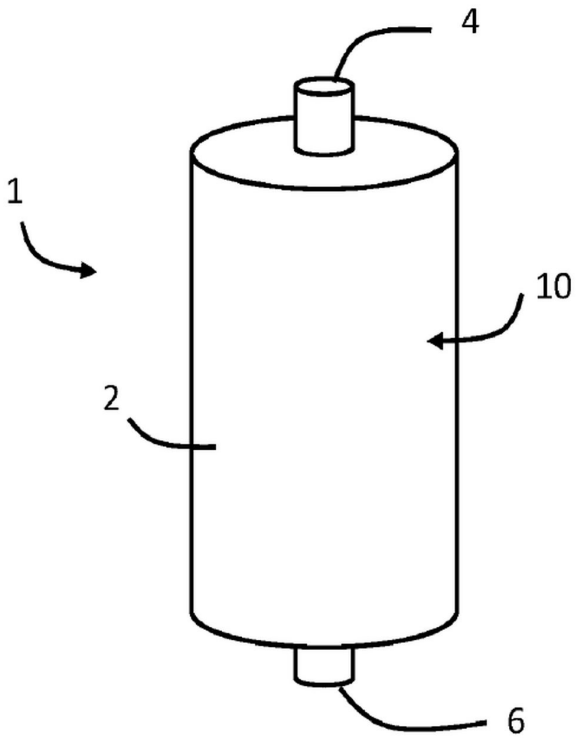


FIG. 1B

【図２】

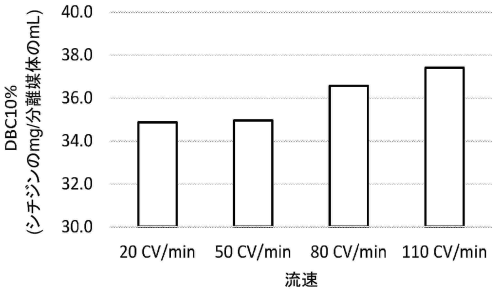


図 2

【図３Ａ】

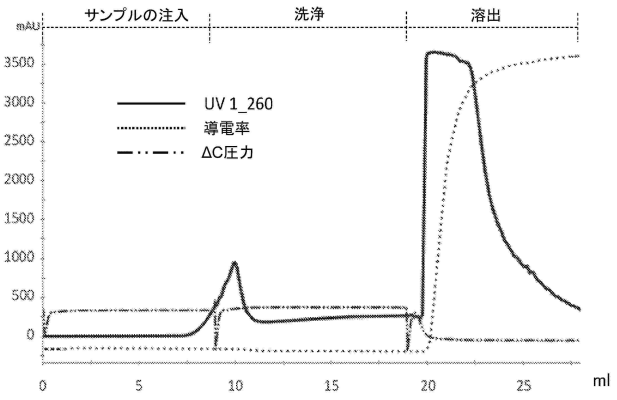


図 3A

【図３Ｂ】

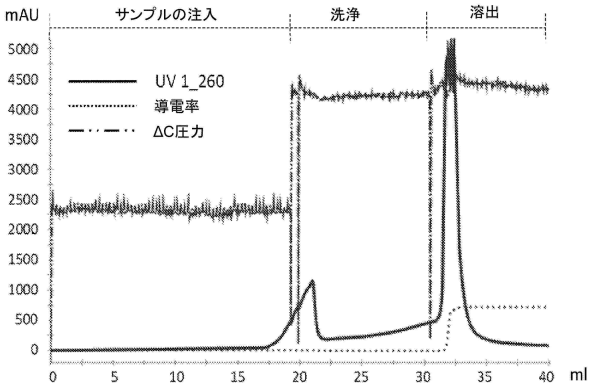


図 3B

【図３Ｃ】

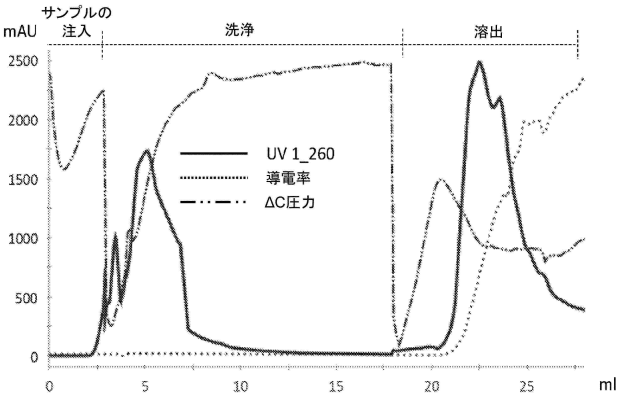


図 3C

【図４】

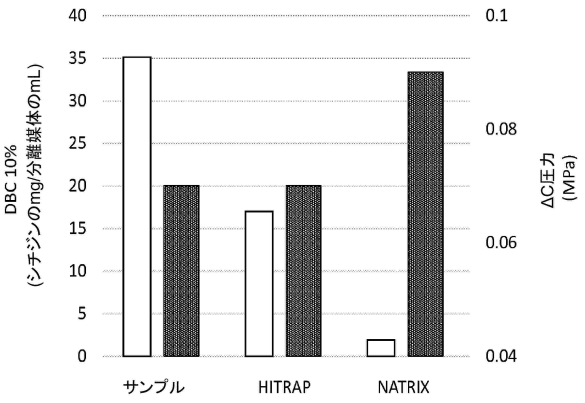


図 4

【図５Ａ】

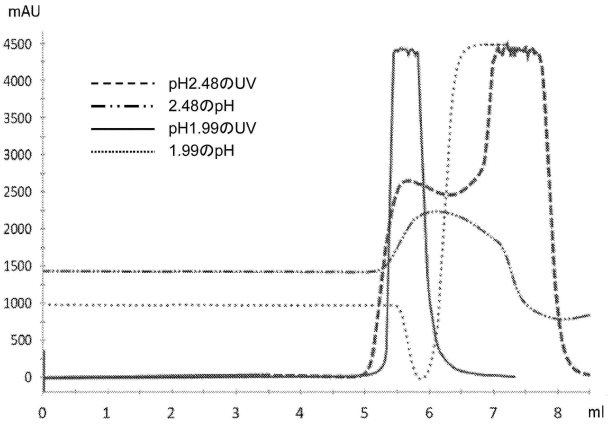


図 5A

【図５Ｂ】

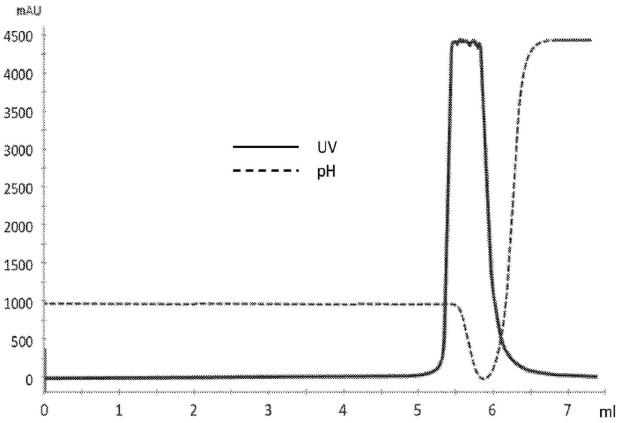


FIG. 5B

【図６Ａ】

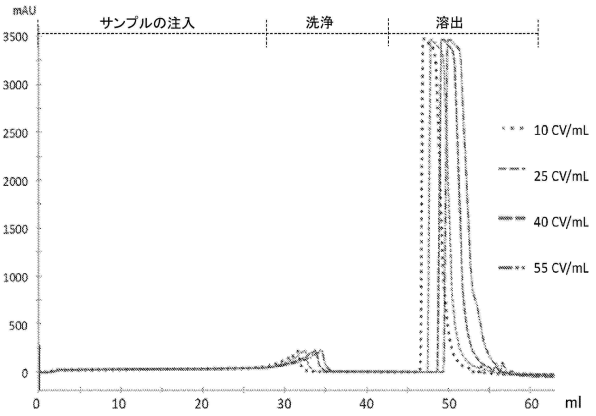


図 6A

【図６Ｂ】

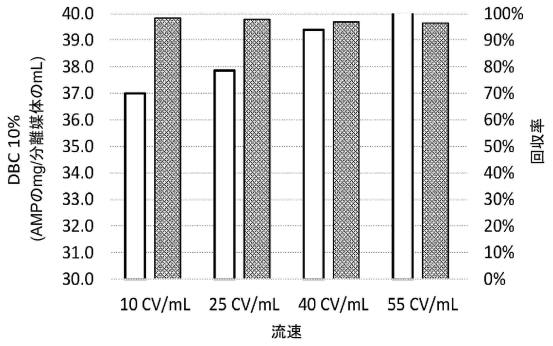


図 6B

【図７Ａ】

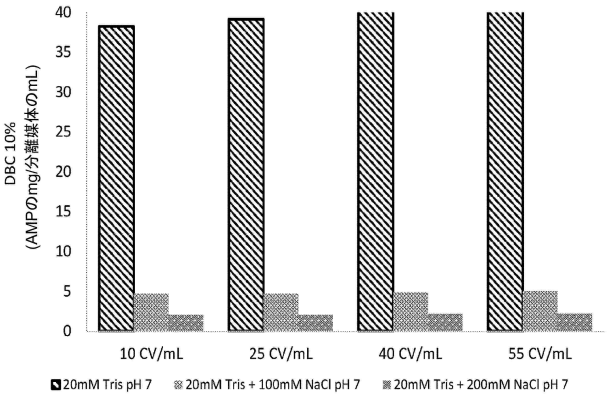


図 7A

【図７Ｂ】

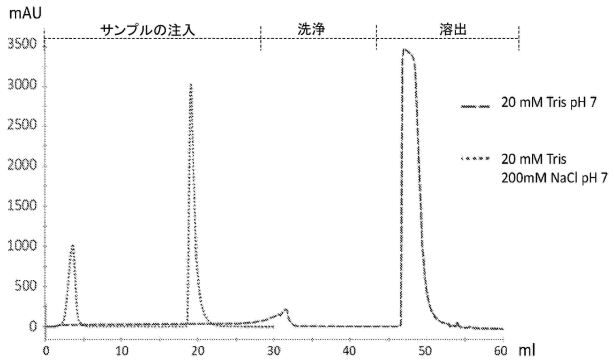


図 7B

【図８Ａ】

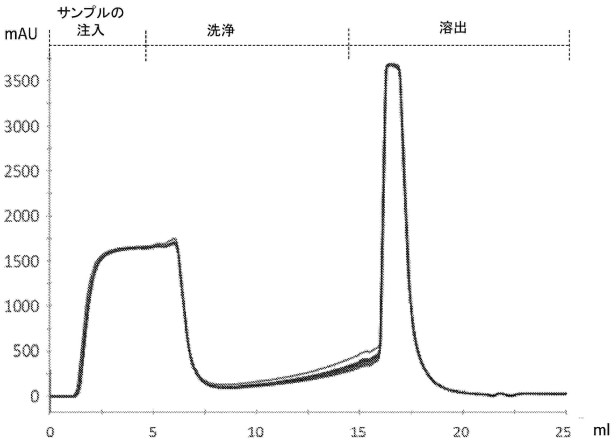


図 8A

【図８Ｂ】

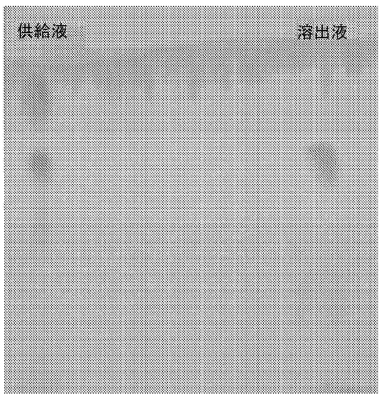


図8B

【図９Ａ】

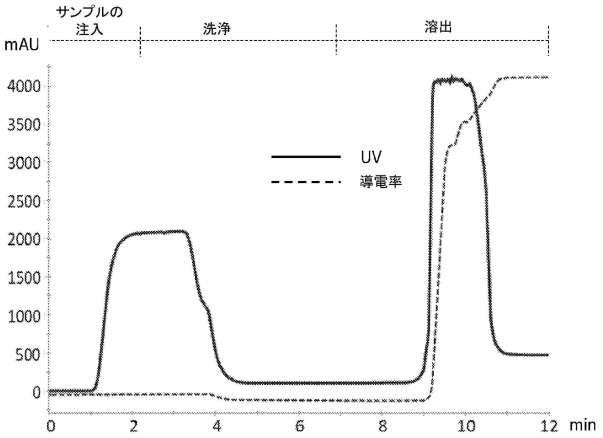


図9A

【図９Ｂ】

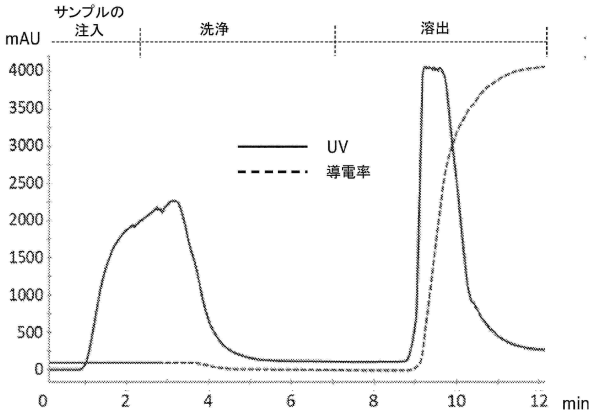


図9B

【図９Ｃ】

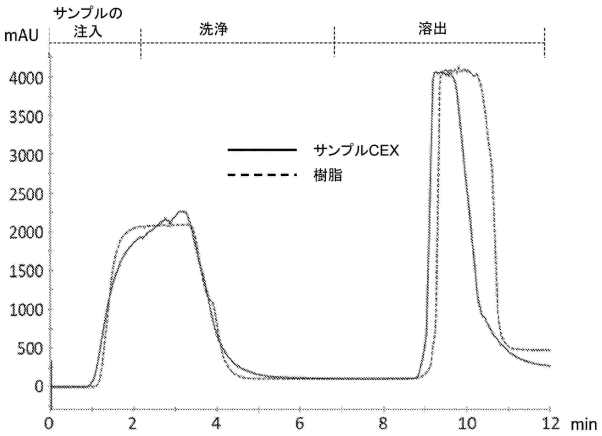


図9C

【図９Ｄ】

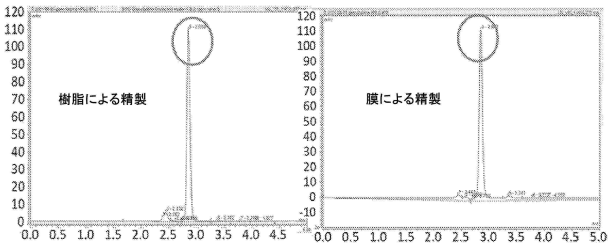


図9D

【図１０】

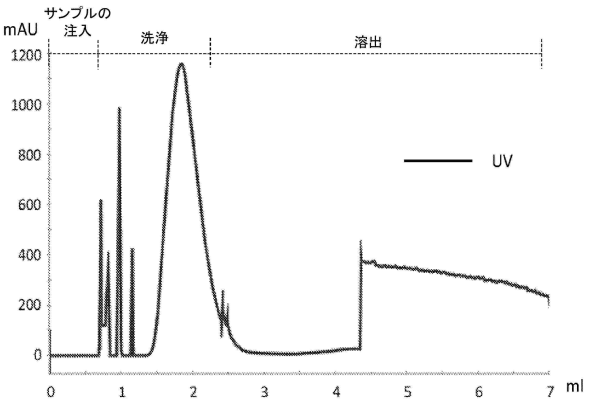


図10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/036740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01D15/36 B01D15/32 B01D15/38 B01J20/28 C07K1/16
C12N15/10 B01J41/20 B01J47/12 C07K1/18
ADD.
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)
B01D G01N C40B C07K B01J C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/188859 A1 (ZHOU JINXIANG [US] ET AL) 18 June 2020 (2020-06-18) cited in the application paragraph [0072]; claim 1 paragraph [0078] paragraphs [0001], [0061], [0058], [0116], [0117] paragraph [0072]; figures 1, 2 claim 2 paragraph [0119] ----- -/--	1-5,8, 11-16, 19,22, 24,26,30

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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
"T" 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	Date of mailing of the international search report
19 October 2022	23/12/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Oikonomou, Evdokia

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/036740

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/047086 A1 (ZHOU JINXIANG [US]) 13 February 2020 (2020-02-13) claim 1 paragraph [0010] paragraph [0074] paragraph [0011]; claim 15 claim 5 paragraph [0062] paragraph [0064] -----	1-3,8, 11-14, 19,22-26
X	US 2012/074068 A1 (HOERL HANS-HEINRICH [DE] ET AL) 29 March 2012 (2012-03-29) paragraphs [0084], [0087]; claim 1 paragraph [0044] claim 11 -----	1-5,8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/036740

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

4, 5, 15, 16, 24(completely); 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26
30(partially)----------

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2022/036740

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 4, 5, 15, 16, 24(completely); 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26, 30(partially)

A separation media comprising: a membrane; and a plurality of ligands immobilized on the membrane, the plurality of ligands comprising anion-exchange ligands.

---

2. claims: 6, 7, 17, 18(completely); 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26, 30(partially)

A separation media comprising: a membrane; and a plurality of ligands immobilized on the membrane, the plurality of ligands comprising cation-exchange ligands.

---

3. claims: 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26, 30(all partially)

A separation media comprising: a membrane; and a plurality of ligands immobilized on the membrane, the plurality of ligands comprising thiophilic ligands.

---

4. claims: 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26, 30(all partially)

A separation media comprising: a membrane; and a plurality of ligands immobilized on the membrane, the plurality of ligands comprising hydrophobic interaction ligands.

---

5. claims: 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26, 30(all partially)

A separation media comprising: a membrane; and a plurality of ligands immobilized on the membrane, the plurality of ligands comprising hydrophilic ligands.

---

6. claims: 9, 10, 20, 21, 27-29, 31, 32(completely); 1-3, 8, 11-14, 19, 22, 23, 25, 26, 30(partially)

A separation media comprising: a membrane; and a plurality of ligands immobilized on the membrane, the plurality of ligands comprising a combination of cation-exchange with thiophilic ligands.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/036740

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020188859 A1	18-06-2020	CA 3118156 A1	18-06-2020
		CN 113195519 A	30-07-2021
		EP 3894428 A1	20-10-2021
		JP 2022512344 A	03-02-2022
		US 2020188859 A1	18-06-2020
		WO 2020123714 A1	18-06-2020
US 2020047086 A1	13-02-2020	NONE	
US 2012074068 A1	29-03-2012	CN 102802781 A	28-11-2012
		DE 102009057993 A1	20-01-2011
		EP 2440326 A1	18-04-2012
		JP 5547281 B2	09-07-2014
		JP 2012530147 A	29-11-2012
		US 2012074068 A1	29-03-2012
		WO 2010142363 A1	16-12-2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

フォース ストリート １４００

(72)発明者 グオ， ビン

アメリカ合衆国 ミネソタ ５５４３１， ブルーミントン， ウエスト ナインティフォース ストリート １４００