

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7075359号  
(P7075359)

(45)発行日 令和4年5月25日(2022.5.25)

(24)登録日 令和4年5月17日(2022.5.17)

(51)国際特許分類	F I			
C 0 7 H 1/06 (2006.01)	C 0 7 H 1/06			
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	1 1 2 Z		
	C 1 2 N 15/10		Z N A	

請求項の数 17 (全20頁)

(21)出願番号	特願2018-565677(P2018-565677)	(73)特許権者	398050098 バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド Biogen MA Inc. アメリカ合衆国02142マサチューセツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリート225番
(86)(22)出願日	平成29年6月13日(2017.6.13)	(74)代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(65)公表番号	特表2019-518759(P2019-518759A)	(74)代理人	100118902 弁理士 山本 修
(43)公表日	令和1年7月4日(2019.7.4)	(74)代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(86)国際出願番号	PCT/US2017/037126	(74)代理人	100120112 中西 基晴
(87)国際公開番号	WO2017/218454		
(87)国際公開日	平成29年12月21日(2017.12.21)		
審査請求日	令和2年6月12日(2020.6.12)		
(31)優先権主張番号	62/492,402		
(32)優先日	平成29年5月1日(2017.5.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/349,970		
(32)優先日	平成28年6月14日(2016.6.14)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチドの精製のための疎水性相互作用クロマトグラフィー

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

標的オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含有する混合物から前記標的オリゴヌクレオチドを分離するための方法であって、

a) 前記混合物に塩を添加するステップであって、塩が硫酸アンモニウムである、ステップと、

b) 疎水性吸着剤の容量の32～78%の動的負荷容量において、希釈された前記混合物を前記疎水性吸着剤に接触させるステップであって、疎水性吸着剤がフェニルまたはヘキシルを含む、ステップと、

c) 前記疎水性吸着剤を塩水溶液で洗浄するステップと、

d) 前記標的オリゴヌクレオチドを溶離液で溶離するステップと、

e) 前記標的オリゴヌクレオチドを含む溶出液を収集するステップと

を含み、前記生成物関連不純物が少なくとも1つのn-1不純物を含み、これにより前記生成物関連不純物から前記標的オリゴヌクレオチドが分離される、前記方法。

## 【請求項2】

標的のチオール化オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含有する混合物から前記標的オリゴヌクレオチドを分離するための方法であって、

a) 前記混合物に塩を添加するステップであって、塩が硫酸アンモニウムである、ステップと、

b) 疎水性吸着剤の容量の40～100%の動的負荷容量において、希釈された前記混合

物を前記疎水性吸着剤に接触させるステップであって、疎水性吸着剤がフェニルまたはヘキシルを含む、ステップと、

c) 前記疎水性吸着剤を塩水溶液で洗浄するステップと、

d) 前記標的オリゴヌクレオチドを溶離液で溶離するステップと、

e) 前記標的オリゴヌクレオチドを含む溶出液を収集するステップと

を含み、前記生成物関連不純物が少なくとも1つのP=O不純物を含み、これにより前記生成物関連不純物から前記標的オリゴヌクレオチドが分離される、前記方法。

【請求項3】

前記塩が前記混合物に塩水溶液として添加されるか、または前記塩が前記混合物に直接溶解され、かつ、前記洗浄ステップの流速が負荷流速よりも遅い、請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項4】

前記溶離液が、水、塩水溶液、エチレングリコール、もしくはプロピレングリコール、またはそれらの混合物から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最初の1～25%、10～25%もしくは5～10%を含まないように遅延されるか、または前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最後の1～25%、5～10%もしくは10～25%を含まない、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記疎水性吸着剤が少なくとも15cmの床高で充填される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項7】

前記標的オリゴヌクレオチドが15～25個のヌクレオチドを含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記標的オリゴヌクレオチドが、アデニン、グアニン、チミン(5-メチルウラシル)、シトシン、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、7-デアザプリン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から独立して選択される核酸塩基を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項9】

前記標的オリゴヌクレオチドが、置換されていてもよい糖を含むか、2つの非ジェミナル環原子が架橋して二環式核酸(BNA)を形成しているか、または、前記糖の環酸素原子が、SもしくはN(R) (式中、RはHまたはC1～C12アルキルである)に置き換えられているか、あるいはこれらの組み合わせである、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記糖が、2'位において、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、 $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$  (式中、n及びmは独立して、1～10である)で置換されているか、または前記糖が、2'において $O(CH_2)_2OCH_3$ で置換されている、請求項9に記載の方法。

40

【請求項11】

前記標的オリゴヌクレオチドが、RNAのみ、DNAのみ、RNA及びDNAの組み合わせ、またはギャップマーを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記標的オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル(P=O)、ホスホロチオエート(P=S)、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記標的オリゴヌクレオチドの配列が(配列番号1)または(配列番号2)である、請求

50

項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記標的オリゴヌクレオチドが、4, 4'-ジメトキシトリチル(DMT)を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの P = O 不純物を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの n - 1 不純物を更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの脱塩基不純物、少なくとも 1 つの C N E t 不純物、または少なくとも 1 つの N + 1 不純物を更に含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) の下で、2016 年 6 月 1 4 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 3 4 9 , 9 7 0 号及び 2 0 1 7 年 5 月 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 4 9 2 , 4 0 2 号に基づく出願日の利益を主張するものであり、各出願の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2017 年 6 月 1 2 日に作成された上記 A S C I I コピーは、1 2 3 4 2 9 - 0 0 1 2 0 \_ S L . t x t という名称であり、8 3 9 バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

オリゴヌクレオチドは、研究及び医学的目的のために化学的に合成され得る短い D N A または R N A オリゴマーである。オリゴヌクレオチドは、典型的には、特定の配列を生成するためのヌクレオチド残基の段階的な付加によって調製される。合成中にステップのいずれかが非効率的であると、その結果、ヌクレオチドを欠いているオリゴマー(「N - 1 不純物」)または望ましいホスホチオエステル結合の代わりにホスホジエステル結合を有するオリゴマー(「P = O 不純物」)が生じる可能性がある。加えて、合成中または合成後の酸化条件への曝露により、P = S 結合が P = O 結合に変換され、P = O 不純物が生じる場合がある。望ましい配列をもつオリゴヌクレオチドの合成完了後、標的オリゴヌクレオチドは、失敗した配列の全てならびに N - 1 不純物及び P = O 不純物と併せて混合物として得られる。これらの不純物は次に、標的オリゴヌクレオチドから分離する必要がある。

【0004】

一般的に使用されている分離技術の 1 つは、オリゴヌクレオチドを精製するために使用される逆相高圧液体クロマトグラフィー(r p - H P L C)であるが、r p - H P L C は一般に、N - 1 不純物、P = O 不純物、脱塩基不純物、C N E t 不純物、及び/または N + 1 不純物を効果的に除去することができない。r p - H P L C の別の不利な点としては、かなりの量の有機溶媒の使用が挙げられ、このため、処分上の問題のほか、防爆設備において精製を行う必要性が生じる。

【0005】

したがって、N - 1 不純物、P = O 不純物、脱塩基不純物、C N E t 不純物、及び/または N + 1 不純物を除去することができ、かつ大規模な商業的プロセスに好適なオリゴヌクレオチド精製方法が必要とされている。

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【0006】

本発明は、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）を使用して標的オリゴヌクレオチドを精製する方法を記載する。特に、本明細書に記載の方法は、特定の動的負荷容量で、標的オリゴヌクレオチドと生成物関連不純物との混合物を、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂（または疎水性吸着剤）に適用することを含む。特許請求される方法は、標的オリゴヌクレオチドからのN - 1不純物及びP = O不純物の分離を改善するとともに、精製プロセス中の有機溶媒の使用を回避する。ある特定の実施形態では、特許請求される方法は、脱塩基不純物、CNEt不純物、及び/またはN + 1不純物を除去することもできる。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0007】

【図1】動的負荷容量とP = O不純物の除去との間の関係を示すプロットである。

【図2】動的負荷容量とN - 1不純物の除去との間の関係を示すプロットである。

【図3】脱塩基不純物、CNEt不純物、及びP = O不純物の例示的な構造を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0008】

本発明は、オリゴヌクレオチドの合成中に発生する生成物関連不純物からオリゴヌクレオチドを分離するための方法に関する。標的オリゴヌクレオチドのみならず様々な生成物関連不純物も含有する粗製のオリゴヌクレオチド混合物を、特定の動的負荷容量で疎水性吸着剤に適用する、新しいプロセスが開発された。この新しい方法は、N - 1不純物及びP = O不純物を含む、ある特定の生成物関連不純物の除去を改善する。標的オリゴヌクレオチドの疎水性は、そのN - 1不純物及びP = O不純物と比較して同様であると予想され、これらの不純物はまた、疎水性相互作用に依拠するプロセス規模のrp - HPLCによって除去されないため、このような改善は驚くべきものであった。ある特定の実施形態では、特許請求される方法は、rp - HPLCによる除去が困難な脱塩基不純物、CNEt不純物、及びN + 1不純物を除去することもできる。

20

## 【0009】

本発明の第1の実施形態は、標的オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含む混合物から標的オリゴヌクレオチドを分離するための方法であって、

- a) 混合物に塩を添加するステップと、
  - b) 疎水性吸着剤の容量の約32 ~ 約78%の動的負荷容量において、希釈された混合物を疎水性吸着剤に接触させるステップと、
  - c) 疎水性吸着剤を塩水溶液で洗浄するステップと、
  - d) 標的オリゴヌクレオチドを溶離液で溶離するステップと、
  - e) 標的オリゴヌクレオチドを含む溶出液を収集するステップと
- を含み、生成物関連不純物が少なくとも1つのN - 1不純物を含み、これにより生成物関連不純物から標的オリゴヌクレオチドが分離される、方法である。

30

## 【0010】

本発明の第2の実施形態は、標的のチオール化オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含む混合物から標的オリゴヌクレオチドを分離するための方法であって、

- a) 混合物に塩を添加するステップと、
  - b) 疎水性吸着剤の容量の約40 ~ 約100%の動的負荷容量において、希釈された混合物を疎水性吸着剤に接触させるステップと、
  - c) 疎水性吸着剤を塩水溶液で洗浄するステップと、
  - d) 標的オリゴヌクレオチドを溶離液で溶離するステップと、
  - e) 標的オリゴヌクレオチドを含む溶出液を収集するステップと
- を含み、生成物関連不純物が少なくとも1つのP = O不純物を含み、これにより生成物関連不純物から標的オリゴヌクレオチドが分離される、方法である。

40

50

## 【 0 0 1 1 】

本明細書で使用されるとき、「生成物関連不純物」とは、標的オリゴヌクレオチドの合成中に発生する不要な副産物を指す。ある特定の実施形態では、生成物関連不純物は、i) N - 1不純物、ii) P = O不純物、またはiii) それらの組み合わせ、またはiv) これら3つのうちのいずれかの混合物である。本明細書で使用されるとき、「N - 1不純物」とは、カップリング反応の失敗が原因で、標的オリゴヌクレオチドと比べていずれかの位置で1つのヌクレオチドが欠損しているオリゴヌクレオチドである。本明細書で使用されるとき、「P = O不純物」とは、硫化反応の失敗または合成後の意図せぬ酸化が原因で、標的オリゴヌクレオチドの望ましいホスホロチオエート結合の代わりにホスホジエステル結合を含有するオリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、第1の実施形態

10

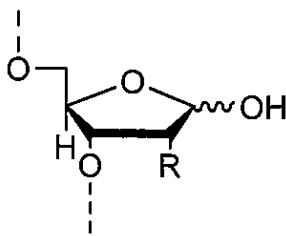
## 【 0 0 1 2 】

ある特定の実施形態では、生成物関連不純物は、脱塩基不純物、CNEt不純物及び/またはN + 1不純物を含む場合もある。本明細書で使用されるとき、「N + 1不純物」とは、標的オリゴヌクレオチドと比べていずれかの位置で1つの異なるヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドである。本明細書で使用されるとき、「脱塩基不純物」とは、標的オリゴヌクレオチドと比較して核酸塩基を欠損している1つ以上のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドであり、ここでヌクレオチドは、以下に示す構造、

20

## 【 0 0 1 3 】

## 【化1】



## 【 0 0 1 4 】

を有する。

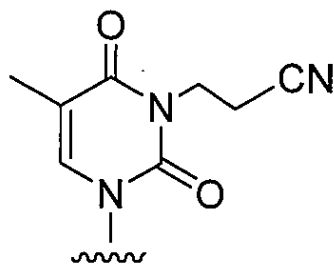
30

## 【 0 0 1 5 】

脱塩基不純物の例示的な構造を図3に示す。特定の実施形態では、脱塩基不純物において欠損している核酸塩基は、アデノシン及び/またはグアニンである。本明細書で使用されるとき、「CNEt」不純物とは、標的オリゴヌクレオチドの非修飾チミン核酸塩基の代わりに修飾チミン核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチドであり、ここで修飾チミン核酸塩基は、以下の構造、

## 【 0 0 1 6 】

## 【化2】



40

## 【 0 0 1 7 】

を有する。CNEt不純物の例示的な構造を図3に示す。

## 【 0 0 1 8 】

50

ある特定の実施形態では、生成物関連不純物は、ショートマー (shortmer) 不純物を含む。本明細書で使用されるとき、「ショートマー不純物」とは、標的オリゴヌクレオチドと比べていずれかの位置で1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くのヌクレオチドが欠損しているオリゴヌクレオチドである。

【0019】

ある特定の実施形態では、生成物関連不純物は、初期溶出不純物 (EEI: earlier-eluting impurity) を含む。本明細書で使用されるとき、「初期溶出不純物」とは、本明細書に記載の精製方法を使用した場合に標的オリゴヌクレオチドの前に溶出する不純物である。一実施形態では、EEIは、N-1不純物等のショートマー不純物、P=O不純物、及び/または脱塩基不純物を含む。

10

【0020】

ある特定の実施形態では、生成物関連不純物は、後期溶出不純物 (LEI: later-eluting impurity) を含む。本明細書で使用されるとき、「後期溶出不純物」とは、本明細書に記載の精製方法を使用した場合に標的オリゴヌクレオチドの後に溶出する不純物である。一実施形態では、LEIは、N+1不純物を含む。

【0021】

「オリゴヌクレオチド」とは、複数の結合したヌクレオチドを含む化合物を意味する。ある特定の実施形態では、複数のヌクレオチドのうちの1つ以上は修飾されている。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のリボヌクレオチド (RNA) 及び/またはデオキシリボヌクレオチド (DNA) を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNAのみ、DNAのみを含むか、またはRNA及びDNAの両方を含む。特定の実施形態では、標的オリゴヌクレオチドはギャップマーである。「ギャップマー」とは、RNase H切断を支援する複数のヌクレオチドを有する内部領域が1個以上のヌクレオチドを有する外部領域間に位置付けられるキメラ化合物を意味し、内部領域を含むこれらのヌクレオチドは、外部領域を含むヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドとは化学的に異なる。ある特定の実施形態では、標的オリゴヌクレオチドは、10~100、10~50、10~25、15~100、15~50、または15~25個のヌクレオチドを含む。

20

【0022】

「ヌクレオチド」とは、核酸塩基及び糖部分を含む化合物を意味する。ヌクレオチドとしては、天然に存在するヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、ならびに模倣塩基及び/または糖基を有するヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。「修飾ヌクレオチド」とは、天然に存在するRNAまたはDNAヌクレオチドと比較して少なくとも1つの修飾を含むヌクレオチドである。そのような修飾は、糖部分及び/または核酸塩基にあってもよい。ヌクレオチドは、核酸塩基または糖部分のいずれかにおいて、多様な置換基のうちのいずれで修飾されていてもよい。

30

【0023】

「ヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチドの一部として2つのヌクレオチドをひとつに結合させる結合基を含むヌクレオチドを指す。結合基の2つの主なクラスは、リン原子の存在または非存在によって定義される。代表的なリン含有結合としては、ホスホジエステル (P=O)、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、及びホスホロチオエート (P=S) が挙げられるが、これらに限定されない。代表的なリン不含結合基としては、メチレンメチルイミノ (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-)、チオジエステル (-O-C(O)-S-)、チオノカルバメート (-O-C(O)(NH)-S-)、シロキサソ (-O-Si(H)<sub>2</sub>-O-)、及びN,N'-ジメチルヒドラジン (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-) が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、結合基は、ホスホジエステル (P=O) またはホスホロチオエート (P=S) である。ある特定の実施形態では、第1及び第2の実施形態に関して記載される方法の標的オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル (P=O)、ホスホロチオエート (P=S)、またはそれらの組み合わせのみを結合基として含む。

40

50

## 【0024】

「核酸塩基」は、ヌクレオシドの複素環塩基部分を意味する。ある特定の実施形態では、核酸塩基は、別の核酸の核酸塩基に水素結合することが可能な任意の原子または原子群を含み得る。核酸塩基は、天然に存在してもよいし、または修飾されていてもよい。「非修飾」または「天然」核酸塩基、例えばプリン核酸塩基のアデニン(A)及びグアニン(G)、ならびにピリミジン核酸塩基のチミン(T) (または5-メチルウラシル)、シトシン(C)及びウラシル(U)に加えて、例えば、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、7-デアザプリン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンを含む、当業者に公知である多くの修飾核酸塩基または核酸塩基模倣物が、第1または第2のいずれかの実施形態に記載の方法によって分離される標的オリゴヌクレオチドへの組み込みに適している。ある特定の実施形態では、この方法は、第1または第2の実施形態に関して記載されるとおりであり、核酸塩基は、アデニン、グアニン、チミン(5-メチルウラシル)、及び5-メチルシトシンから選択される。

10

## 【0025】

「糖部分」とは、天然糖もしくは修飾糖、または糖代用物を意味する。

## 【0026】

「天然糖」とは、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)のリボフラノース部分を意味する。

## 【0027】

「修飾糖」とは、天然糖のもの以外の少なくとも1つの置換基を含むリボフラノース部分を意味する。そのような修飾は、限定されないが、置換基の付加、二環式核酸(BNA)を形成するための非ジェミナル環原子の架橋、リボシル環酸素原子の、S、N(R)、またはC(R<sup>1</sup>)(R<sup>2</sup> (Rは、H、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキル、または保護基である)への置き換え、及びこれらの組み合わせを含む。ある特定の実施形態では、糖は、HまたはOH以外の置換基を含むように2'位で修飾されている(「2'修飾」または「2'置換」)。代替的には、修飾は、糖の5'位にある。ある特定の実施形態では、糖は、糖の2'位及び5'位で修飾されている。

20

## 【0028】

本発明で有用な糖修飾の例としては、OH、F、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、またはO-アルキル-O-アルキル(ここで、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換または非置換のC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルまたはC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルケニル及びアルキニルであり得る)から選択される糖置換基を含む化合物が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、そのような置換基は、ハライド(Fを含むがこれに限定されない)、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル、-OCF<sub>3</sub>、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>、2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)、またはO-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)(式中、各R<sub>m</sub>及びR<sub>n</sub>は、独立して、Hまたは置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルである)の中から選択される。特に、第1及び第2の実施形態に記載の方法において使用するのに好適な修飾ヌクレオシドは、2'-メトキシエトキシ(「MOE」もしくは「2'-MOE」または「2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>」)、2'-O-メチル(「2'-OMe」または「2'-O-CH<sub>3</sub>」)、または2'-フルオロ(2'-F)である。

30

40

## 【0029】

ある特定の実施形態では、O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub>、及びO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>(式中、n及びmは独立して、1~約10である)から選択される置換基を2'位に有する修飾ヌクレオシドである。他の2'-糖置換基としては、C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリールまたはO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクリル、及びアミノアルキルアミノが挙げられる。

50

## 【0030】

ある特定の実施形態では、アセチル (Ac) ; ベンゾイル (Bz) ; ベンジル (Bn) ;  
 -メトキシエトキシメチルエーテル (MEM) ; ジメトキシトリチル、[ビス-(4-  
 メトキシフェニル)フェニルメチル] (DMT) ; メトキシメチルエーテル (MOM) ;  
 メトキシトリチル [(4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル、MMT) ; p-メトキ  
 シベンジルエーテル (PMB) ; メチルチオメチルエーテル ; ピバロイル (Piv) ; テ  
 トラヒドロピラニル (THP) ; テトラヒドロフラン (THF) ; トリチル (トリフェニ  
 ルメチル、Tr) ; シリルエーテル (トリメチルシリル (TMS) エーテル、tert-  
 プチルジメチルシリル (TBDMs) エーテル、トリ-イソ-プロピルシリルオキシメチ  
 ル (TOM) エーテル、及びトリイソプロピルシリル (TIPS) エーテルを含むがこれ  
 らに限定されない) ; メチルエーテル、エトキシエチルエーテル (EE)、及び5'-O-  
 (-メチル-6-ニトロピペロニルオキシカルボニル) (MeNPOC) から選択され  
 る酸素原子の置換基を5'位に有する修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、5'  
 位は-ODMTである。

10

## 【0031】

修飾糖部分を有するヌクレオシドの例は、限定されないが、5'-ビニル、5'-メチル、  
 5'-ODMT、4'-S、2'-F、2'-O<sub>3</sub>C 及び 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> の  
 置換基を含むヌクレオシドを含む。

## 【0032】

ある特定の実施形態では、2'-糖置換基は、アラビノ(上)位またはリボ(下)位のい  
 ずれかにある。ある特定のそのような実施形態では、2'-アラビノ修飾は、2'-Fアラビ  
 ノ (FANA) である。また、糖の他の位置、特に3'末端ヌクレオシド上または2'-5'  
 結合オリゴヌクレオチド内の糖の3'位、及び5'末端ヌクレオチドの5'位において同様の  
 修飾を行うこともできる。

20

## 【0033】

本明細書で使用されるとき、「アルキル」という用語は、完全に飽和した分枝状または非  
 分枝状の炭化水素部分を指す。好ましくは、アルキルは、1~20個の炭素原子、より好  
 ましくは1~16個の炭素原子、1~10個の炭素原子、1~6個の炭素原子、または1  
 ~4個の炭素原子を含む。一部の実施形態では、アルキルは、6~20個の炭素原子を含  
 む。アルキルの代表的な例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、  
 n-ブチル、sec-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペ  
 ンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル  
 、2,3-ジメチルペンチル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、またはn-デ  
 シルが挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0034】

「アルケニル」とは、直鎖状でも分枝状でもよく、少なくとも1つの炭素-炭素二重結  
 合を有する不飽和炭化水素基を指す。2~6個の炭素原子を有するアルケニル基が好ましい  
 場合がある。アルケニル基は、1つ、2つ、または3つ以上の炭素-炭素二重結合を含有  
 してもよい。アルケニル基の例としては、エチニル、n-プロペニル、イソプロペニル、  
 n-ブタ-2-エニル、n-ヘキサ-3-エニル等が挙げられる。

40

## 【0035】

「アルキニル」とは、直鎖状でも分枝状でもよく、少なくとも1つの炭素-炭素三重結  
 合を有する不飽和炭化水素基を指す。2~6個の炭素原子を有するアルキニル基が好ましい  
 場合がある。アルキニル基は、1つ、2つ、または3つ以上の炭素-炭素三重結合を含有  
 してもよい。アルキニル基の例としては、エチニル、n-プロピニル、n-ブタ-2-イ  
 ニル、n-ヘキサ-3-イニル等が挙げられる。

## 【0036】

「アリール」という用語は、環部分に6~14個の炭素原子を有する、単環式、二環式、  
 または三環式の芳香族炭化水素基を指す。一実施形態では、アリールという用語は、6~  
 10個の炭素原子を有する単環式及び二環式の芳香族炭化水素基を指す。アリール基の代

50

表的な例としては、フェニル、ナフチル、フルオレニル、及びアントラセニルが挙げられる。「アリール」という用語は、少なくとも1つの環が芳香族であり、かつ1つまたは2つの非芳香族炭化水素環（複数可）に縮合している、二環式または三環式基も指す。非限定的な例としては、テトラヒドロナフタレン、ジヒドロナフタレニル、及びインダニルが挙げられる。「アリールアルキル」とは、アルキレンリンカーを介して分子の残部に結合したアリール基である。「アルカリール」とは、アリーレンリンカーを介して分子の残部に結合したアルキル基である。

#### 【0037】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロシクリル」という用語は、飽和または不飽和の、単環式または二環式の環系（例えば、架橋環系またはスピロ環系）で、3～7つの環員、または特に3～6つの環員もしくは5～7つの環員を有し、環員のうち少なくとも1つがヘテロ原子であり、環員のうち最大4つ（例えば、1、2、3、または4つ）がヘテロ原子であり得るものを指し、ここでヘテロ原子は、独立して、O、S、及びNから選択され、Cは酸化型（例えば、C(O)）であってよく、Nは酸化型（例えば、N(O)）または四級化型であってよく、Sは任意選択でスルホキシド及びスルホンに酸化されていてもよい。不飽和の複素環式環は、ヘテロアリール環を含む。本明細書で使用されるとき、「ヘテロアリール」という用語は、O、S、及びNから独立して選択される1～4つのヘテロ原子を有する、芳香族の5員または6員の単環式環系を指し、ここでNは酸化型（例えば、N(O)）または四級化型であってよく、Sは任意選択でスルホキシド及びスルホンに酸化されていてもよい。一実施形態では、ヘテロシクリルは、3～7員の飽和単環式環、または3～6員の飽和単環式環、または5～7員の飽和単環式環である。一実施形態では、ヘテロシクリルは、3～7員の単環式環、または3～6員の単環式環、または5～7員の単環式環である。別の実施形態では、ヘテロシクリルは、6員または7員の二環式環である。ヘテロシクリル基は、ヘテロ原子または炭素原子に結合していてもよい。

#### 【0038】

「二環式ヌクレオシド」または「BNA」とは、ヌクレオシドの糖部分が、糖環の2つの炭素原子をつなぐ架橋を含むことにより、二環式糖部分が形成されたヌクレオシドを意味する。BNAの例は、限定されないが、リボシル環の4'及び2'の原子間に架橋を含むヌクレオシド（「4'-2'二環式ヌクレオシド」）、例えば、糖環の2'炭素原子と4'炭素原子とをつなぐようにフラノース環の2つの炭素原子をつなぐ架橋を含むフラノース環を含む。

#### 【0039】

ある特定の実施形態では、標的オリゴヌクレオチドは、1つ以上のBNAヌクレオシドを含み、ここで架橋は、式： $4' - \text{---} - \text{D} - (\text{CH}_2) - \text{O} - 2' (\text{---} - \text{D} - \text{LNA})$ ;  $4' - (\text{CH}_2) - \text{S} - 2'$ ;  $4' - \text{---} - \text{L} - (\text{CH}_2) - \text{O} - 2' (\text{---} - \text{L} - \text{LNA})$ ;  $4' - (\text{CH}_2)_2 - \text{O} - 2' (\text{ENA})$ ;  $4' - \text{C}(\text{C}_1\text{H})_2 - \text{O} - 2' (\text{PCT/US 2008/068922を参照のこと})$ ;  $4' - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{O} - 2' (\text{「cet」})$ 及び $4' - \text{C} - \text{H}(\text{CH}_2\text{OCH}_3) - \text{O} - 2' (2008年7月15日に交付された米国特許第7,399,845号を参照のこと)$ ;  $4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{OCH}_3) - 2' (\text{PCT/US 2008/064591を参照のこと})$ ;  $4' - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{N}(\text{CH}_3) - 2' (2004年9月2日に公開された米国特許出願公開第US 2004-0171570号を参照のこと)$ ;  $4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}) - \text{O} - 2' (2008年9月23日に交付された米国特許第7,427,672号を参照のこと)$ ;  $4' - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{CH}_3) - 2'$ 及び $4' - \text{CH} - \text{C}(=\text{CH}_2) - 2' (\text{PCT/US 2008/066154を参照のこと})$ のうちの1つを含み、式中、Rは、独立して、H、C<sub>1</sub>～C<sub>12</sub>アルキル、または保護基である。ある特定の実施形態では、本発明は、二環式糖部分ではない修飾糖部分を含む修飾ヌクレオシドを提供する。

#### 【0040】

「糖代用物」とは、ヌクレオシドの糖の代わりになることができるリボフラノース環以外の構造を意味する。糖代用物の例としては、6員環、酸素が例えば硫黄または窒素に置き

10

20

30

40

50

換えられて例えばモルホリノを形成した糖、及び4'-チオ含有糖が挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

ある特定の実施形態では、第1または第2のいずれかの実施形態に記載の方法によって分離される標的オリゴヌクレオチドは、

T C A C T T T C A T A A T G C T G G (配列番号1)

の配列(5'から3')を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドであり、ここで、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'-メトキシエチル(MOE)ヌクレオシドであり、各シトシンは、5'-メチルシトシンである。配列番号1はB I I B 0 5 8としても知られ、W O 2 0 0 7 / 0 0 2 3 9 0、W O 2 0 1 0 / 1 4 8 2 4 9、及びU S 8, 9 8 0, 8 5 3に記載されており、各々の教示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0042】

ある特定の実施形態では、第1または第2のいずれかの実施形態に記載の方法によって分離される標的オリゴヌクレオチドは、

C A G G A T A C A T T T C T A C A G C T (配列番号2)

の配列(5'から3')を有する5-10-5 MOEギャップマーであり、ここで、ヌクレオシド1~5及び16~20の各々は、2'-O-メトキシエチルリボース修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド6~15の各々は、2'-デオキシヌクレオシドであり、ヌクレオシド2~3、4~5、16~17、及び18~19の間のヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合であり、ヌクレオシド1~2、3~4、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、11~12、12~13、13~14、14~15、15~16、17~18、及び19~20の間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシンは、5'-メチルシトシンである。配列番号2は、次の化学表記: m C e s A e o G e s G e o A e s T d s A d s m C d s A d s T d s T d s T d s m C d s T d s A d s m C e o A e s G e o m C e s T eによって記述され、ここで、

20

Aは、アデニンであり、

m Cは、5'-メチルシトシンであり、

Gは、グアニンであり、

Tは、チミンであり、

eは、2'-O-メトキシエチルリボース修飾糖であり、

dは、2'-デオキシリボース糖であり、

sは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、

oは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

30

【0043】

配列番号2はB I I B 0 6 7またはI S I S 6 6 6 8 5 3としても知られ、W O 2 0 1 5 1 5 3 8 0 0に記載されており、この教示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0044】

疎水性吸着剤(すなわち、「疎水性樹脂」とは、第1及び第2の実施形態に記載の方法において標的オリゴヌクレオチドが生成物関連不純物から分離され得るように標的オリゴヌクレオチドが結合する任意の物質である。例えば、疎水性吸着剤は、親水性炭水化物: 架橋アガロース、及び合成コポリマー物質を含む。特に、疎水性吸着剤は、フェニル、ブチル、またはヘキシルのいずれかを含む。例えば、H e x y l 6 5 0 Cは好適な疎水性吸着剤である。更に、疎水性吸着剤は、少なくとも15cm、例えば少なくとも20cm、少なくとも25cm、もしくは少なくとも30cm; または約15cm~約30cm; 約15cm~20cm、約20~約25cm、もしくは約25cm~約30cmの床高で充填される。

40

【0045】

「動的負荷容量」は、典型的な流動条件下でクロマトグラフィー樹脂に結合する生成物(

50

例えば、オリゴヌクレオチド生成物)の量と定義され、当業者に公知の数ある負荷因子の中でもとりわけ、特定の流動条件及び負荷塩濃度において決定される。これは、生成物レベルがフロースルー(「破過点」と称される)において測定される前に負荷され得る量に基づいて計算される。特に、分離しようとする物質は、流動様式において(バッチ方式で行われる静的様式とは対照的に)、特定の流速、例えば、約100~約250cm/時間、特に200cm/時間で樹脂に適用される。当業者であれば、塩中の生成物の溶解度に基づいてその塩の濃度を選択し、また、ビーズサイズ、床高、及び他の変数に基づいて流速を選択して、入り口圧力を超えないようにして特定の動的負荷比を達成する方法が分かるであろう。

#### 【0046】

例えば、オリゴヌクレオチド混合物に対する疎水性吸着剤の容量が50mg/mL(動的)である場合、50mg/mLの混合物の適用は、100%の動的負荷容量におけるものとなる。同様に、50mg/mLの疎水性吸着剤に対して、25mg/mLの混合物の適用は、50%の動的負荷容量におけるものとなる。第1の実施形態に記載の方法では、動的負荷容量は、約32%~約78%、例えば、約32%~約45%、約40%~約50%、約45%~約55%、約50%~約60%、約55%~約65%、約60%~約70%、約65%~約78%、または約32%~約50%、約40%~約75%、または約50%~約78%である。第2の実施形態に記載の方法では、動的負荷容量は、約40%~約100%、例えば、約40%~約50%、約50%~約60%、約60%~約70%、約70%~約80%、約80%~約90%、約90%~約100%、約40%~約75%、または約40%~約60%、または約40%~約80%である。第1及び第2の両実施形態に記載の方法では、動的負荷容量は、約40%~約78%、例えば、約40%~約45%、約45%~約50%、約50%~約55%、約55%~約60%、約60%~約65%、約65%~約70%、約70%~約75%、または約40%~約50%、約40%~約75%、または約50%~約78%である。

#### 【0047】

第3の実施形態では、この方法は、第1または第2のいずれかの実施形態に関して記載されるとおりであり、塩は混合物に塩水溶液として添加されるか、または塩は混合物に直接溶解される。特に、塩は、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、または $\text{Na}^+$ のうちのいずれかのカチオン、及び $\text{F}^-$ 、 $[\text{SO}_4]^{2-}$ 、 $[\text{HPO}_4]^{2-}$ 、酢酸イオン、もしくは $\text{Cl}^-$ からなるいずれかのアニオン、またはそれらの組み合わせを含む。具体的には、塩は硫酸アンモニウムである。

#### 【0048】

第4の実施形態では、この方法は、第1、第2、または第3の実施形態のいずれかに関して記載されるとおりであり、洗浄ステップの流速は負荷流速よりも遅い。特に、負荷ステップの流速は、約150cm/時間~約250cm/時間であり、洗浄ステップの流速は、約50cm/時間~約150cm/時間であり、例えば、負荷ステップの流速は、約175cm/時間~約225cm/時間であり、洗浄ステップの流速は、約75cm/時間~約125cm/時間である。特に、負荷ステップの流速は、約200cm/時間からであり、洗浄ステップの流速は、約100cm/時間からである。

#### 【0049】

第5の実施形態では、この方法は、第1、第2、第3、または第4の実施形態のいずれかに関して記載されるとおりであり、溶離液は、水、塩水溶液、エチレングリコール、もしくはプロピレングリコール、またはそれらの混合物から選択される。特に、塩は、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、または $\text{Na}^+$ のうちのいずれかのカチオン、及び $\text{F}^-$ 、 $[\text{SO}_4]^{2-}$ 、 $[\text{HPO}_4]^{2-}$ 、酢酸イオン、もしくは $\text{Cl}^-$ からなるいずれかのアニオン、またはそれらの組み合わせを含む。特定すると、塩は硫酸アンモニウムである。

#### 【0050】

第6の実施形態では、この方法は、第1、第2、第3、第4、または第5の実施形態のいずれかに関して記載されるとおりであり、溶出液の収集は、生成物の溶出ピークの最初の

10

20

30

40

50

2 ~ 25 %、最初の2 ~ 10 %、最初の2 ~ 8 %、最初の4 ~ 6 %、最初の5 ~ 10 %、または最初の10 ~ 25 %を含まないように遅延される。より具体的な実施形態では、収集は、生成物の溶出ピークの最初の5 %を含まないように遅延される。特に、溶出液は複数の画分に収集され、画分サイズは、別々の画分中の生成物関連不純物から標的オリゴヌクレオチドを分離するように調節される。画分サイズは、オリゴヌクレオチドと生成物関連不純物との間の溶出時間の差、分離しようとする標的オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含有する粗生成物の量等に部分的に応じて、当業者によって容易に決定され得る。

#### 【0051】

また第6の実施形態では、この方法は、第1、第2、第3、第4、または第5の実施形態のいずれかに関して記載されるとおりであり、溶出液の収集は、生成物の溶出ピークの最初と最後の2 ~ 25 %を含まない。より具体的には、溶出液の収集は、生成物の溶出ピークの最初と最後の2 ~ 10 %、最初と最後の2 ~ 8 %、最初と最後の4 ~ 6 %、最初と最後の5 ~ 10 %、または最初と最後の10 ~ 25 %を含まない。別の具体的な実施形態では、溶出液の収集は、生成物の溶出ピークの最初と最後の5 %を含まない。

10

#### 【0052】

一実施形態では、イソクラチック洗浄方式として知られる洗浄ステップ中、洗浄液を一定に保つ。代替的には、グラジエント洗浄方式として知られる洗浄ステップ中、洗浄液を変化させる。グラジエント洗浄において、洗浄液は、高イオン強度または極性から低イオン強度または極性に変化させてよい。極性またはイオン強度の低下は、水溶液の塩濃度を低下させること、または、より極性のある溶媒、例えば水、もしくは他の極性溶媒、例えば、エチレンもしくはプロピレングリコールの、より高塩濃度の溶液に対する体積比を増加させることにより、達成することができる。代替的には、洗浄液は、低極性または高イオン強度から高極性または低イオン強度に変化させてもよい。別の代替形態では、グラジエント洗浄ステップの後にイソクラチック洗浄ステップが続いてもよく、またはその逆であってもよい。

20

#### 【0053】

一実施形態では、イソクラチック溶出方式として知られる溶出中、溶離液を一定に保つ。代替的には、グラジエント溶出方式として知られる溶出中、溶離液を変化させる。グラジエント溶出において、溶離液は、高イオン強度または低極性から低イオン強度または高極性に変化させてよい。極性の上昇またはイオン強度の低下は、水溶液の塩濃度を低下させること、または、より極性のある溶媒、例えば水、もしくは他の極性溶媒、例えば、エチレンもしくはプロピレングリコールの、より高塩濃度の溶液に対する体積比を増加させることにより、達成することができる。代替的には、溶離液は、低極性または高イオン強度から高極性または低イオン強度に変化させてもよい。別の代替形態では、グラジエント溶出の後にイソクラチック溶出が続いてもよく、またはその逆であってもよい。

30

#### 【0054】

一実施形態では、本明細書に記載される本発明の方法は、E E I及び/またはL E Iを除去することもできる。別の実施形態では、本明細書に記載される本発明の方法は、ショートマー不純物、N + 1不純物、脱塩基不純物、C N E t不純物、及びP = O不純物から選択される少なくとも1つの生成物関連不純物を除去することができる。別の実施形態では、本明細書に記載される本発明の方法は、N - 1不純物、P = O不純物、ならびに、N - 1不純物以外のショートマー不純物、N + 1不純物、脱塩基不純物、及びC N E t不純物から選択される少なくとも1つの生成物関連不純物を除去することができる。別の実施形態では、本明細書に記載される本発明の方法は、N - 1不純物、P = O不純物、N - 1不純物以外のショートマー不純物、N + 1不純物、脱塩基不純物、及びC N E t不純物を除去することができる。

40

#### 【0055】

「標的オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含有する混合物から標的オリゴヌクレオチドを分離すること」または「生成物関連不純物を除去すること」とは、本明細書に記

50

載の生成物関連不純物、例えばN - 1不純物、P = O不純物、脱塩基不純物、CNEt不純物、またはN + 1不純物のうちの1つ以上の、少なくとも15%、例えば、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、または60%を、混合物から除去することを意味する。

【実施例】

【0056】

実施例1 N - 1不純物またはP = O不純物の除去

物質：

カラム：6.84mL Phenyl Sepharose Fast Flow高置換

床高：20cm

生成物希釈緩衝液：850mM硫酸アンモニウム、50mMトリス、pH8.5

平衡化緩衝液：800mM硫酸アンモニウム、50mMトリス、pH8.5

粗生成物負荷：765mM硫酸アンモニウム、50mMトリス、pH8.5

洗浄緩衝液：440mM硫酸アンモニウム、50mMトリス、pH8.5

溶出緩衝液：40mM硫酸アンモニウム、50mMトリス、pH8.5

ストリップ：脱イオン水

定置洗浄：1N水酸化ナトリウム

保存：0.1N水酸化ナトリウム

UVモニタ：295nm

【0057】

方法：

- 試料の調製：試料（配列番号2）を希釈緩衝液で10倍に希釈した（最終的な硫酸アンモニウム濃度は765mMである）。

- サイクル法：200cm/時間で4カラム体積（CV）の800mM硫酸アンモニウム、50mMトリス（pH8.5）によりカラムを平衡化した。次の3つの異なる動的負荷容量において、200cm/時間の速度で試料を負荷した：

ラン1：8.8%の動的負荷容量で負荷。

ラン2：47%の動的負荷容量で負荷。

ラン3：100%の動的負荷容量で負荷。

100cm/時間で7CVの440mM硫酸アンモニウム、50mMトリス（pH8.5）を用い、カラムを洗浄した。200cm/時間で6CVの40mM硫酸アンモニウム、50mMトリス（pH8.5）を用い、カラム溶出を行った。200cm/時間で2CVの脱イオン水を用い、カラムのストリッピングを行った。200cm/時間で3CVの1N水酸化ナトリウムによりカラムを清浄にし、200cm/時間で3CVの0.1N水酸化ナトリウム中に保存した。

【0058】

結果：

n - 1不純物及びP = O不純物の相対除去量を、それぞれ、以下の表1及び2に提供する。

【0059】

【表1】

表1 N-1不純物の除去

不純物	粗生物中の出発レベル%	低負荷率(4mg/mL)におけるHIC溶出物中の量、ラン1	中負荷率(21mg/mL)におけるHIC溶出物中の量、ラン2	高負荷率(45mg/mL)におけるHIC溶出物中の量、ラン3
N-1	3.2	3.2	2.6	4.4

【0060】

## 【表 2】

表 2 P=O不純物の除去

不純物	粗生物中の出発レベル%	低負荷率(4mg/mL)における HIC 溶出物中の量、ラン1	中負荷率(21mg/mL)における HIC 溶出物中の量、ラン2
P=O	2. 6	3. 9	2. 1

10

## 【0061】

表 1 及び 2 に記載の結果に基づくと、n - 1 不純物及び P = O 不純物を除去するためには適切な動的負荷容量の使用が必要である。

## 【0062】

実施例 2 動的負荷容量と P = O 不純物除去との間の関係

実験計画法 (Design Expert (商標) v9) ソフトウェアを使用し、P = O 生成物関連不純物の除去に対する動的負荷容量の影響の評価を完了した。統計的設計法の種類は、中心複合であった。研究の種類は、応答曲面法であった。床高 20 cm 及び動的結合容量 45 mg/mL の Phenyl Sepharose カラムを用い、50 ランを行った。洗浄緩衝液は 440 mM 硫酸アンモニウムであり、溶出緩衝液は 40 mM 硫酸アンモニウムであった。それぞれ 7 カラム体積及び 6 カラム体積の洗浄緩衝液及び溶出緩衝液を使用した。実施例 1 において上記したものと同一条件を使用し、配列番号 2 をオリゴヌクレオチドとして使用した。

20

## 【0063】

この分析の結果は、P = O 不純物に関しては、負荷容量が 42% ~ 100% (すなわち、図 1 のチャートにおいて 19 mg/mL ~ 45 mg/mL) のとき、P = O 不純物の除去が改善することを示す。

## 【0064】

実施例 3 動的負荷容量と N - 1 不純物除去との間の関係

N - 1 生成物関連不純物の除去に対する動的負荷容量の影響の評価を図 2 に示す。図 2 には 5 ランがプロットされており、これらは、45 mg/mL の疎水性吸着剤の 9、24、47、69、及び 100% の負荷容量に対応する。N - 1 の低減率は、粗生物中の N - 1 の出発レベルから計算した。この分析により、負荷比が N - 1 の低減において重要な唯一の因子であると結論された。したがって、この統計分析によれば、他の変数は、N - 1 の低減に対して重要でない。

30

## 【0065】

物質：

カラム：6.84 mL Phenyl Sepharose Fast Flow 高置換 (Ge Healthcare Life Sciences、P/C: 17-0973-05)

40

床高：20 cm

生成物希釈緩衝液：850 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

平衡化緩衝液：800 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

粗生成物負荷：765 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

洗浄緩衝液：440 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

400 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

溶出緩衝液：40 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

10 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス、pH 8.5

ストリップ：脱イオン水

定置洗浄：1 N 水酸化ナトリウム

50

保存：0.1 N水酸化ナトリウム

UVモニタ：295 nm

【0066】

方法：

- 試料の調製：試料（配列番号2）を希釈緩衝液で10倍に希釈した（最終的な硫酸アンモニウム濃度は765 mMである）。

- サイクル法：200 cm / 時間で4カラム体積（CV）の800 mM硫酸アンモニウム、50 mMトリス（pH8.5）によりカラムを平衡化した。表3に示した5つの異なる負荷比において、200 cm / 時間の速度で試料を負荷した。

【0067】

【表3】

表3 ランの負荷量に基づくN-1低減に関するD○E変数

負荷量 (%)	洗浄緩衝液 (mM 硫酸アンモニウム、50mM トリス、pH8.5)	洗浄CV	溶出緩衝液 (mM 硫酸アンモニウム、50mM トリス、pH8.5)	溶出CV
9	440	7	40	6
24	400	10	10	10
47	440	7	40	6
69	400	4	10	2
100	440	7	40	6

【0068】

表3に規定の洗浄緩衝液及びCVを用い、100 cm / 時間でカラムを洗浄した。表3に規定の溶出緩衝液及びCVを用い、200 cm / 時間でカラム溶出を行った。200 cm / 時間で2CVの脱イオン水を用い、カラムのストリッピングを行った。200 cm / 時間で3CVの1 N水酸化ナトリウムによりカラムを清浄にし、200 cm / 時間で3CVの0.1 N水酸化ナトリウム中に保存した。

【0069】

図2に示すように、負荷容量が40%～78%であるとき、N-1不純物の除去が改善する。

【0070】

実施例4 脱塩基不純物、CNEt不純物、またはN+1不純物の除去

物質：

カラム：81 mL、Phenyl Sepharose Fast Flow高置換を充填

床高：15 cm、ベッド直径：2.6 cm

生成物希釈緩衝液：575 mM硫酸アンモニウム、50 mMトリス、pH8.5

平衡化緩衝液：500 mM硫酸アンモニウム、50 mMトリス、pH8.5

粗生成物負荷：500 mM硫酸アンモニウム、50 mMトリス、pH8.5

洗浄緩衝液：250 mM硫酸アンモニウム、50 mMトリス、pH8.5

溶出緩衝液：10 mM硫酸アンモニウム、50 mMトリス、pH8.5

ストリップ：水

定置洗浄：1 N水酸化ナトリウム

保存：0.1 N水酸化ナトリウム

UVモニタ：295 nm

【0071】

方法：

- 試料の調製：粗試料（配列番号 1）を生成物希釈緩衝液で 7.7 倍に希釈した（最終的な硫酸アンモニウム濃度は 500 mM である）。

- クロマトグラフィーカラム法：150 cm / 時間で 5 カラム体積（CV）の 500 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス（pH 8.5）によりカラムを平衡化した。希釈した粗試料を、47%（26.5 mg 生成物 / mL 樹脂）の動的負荷容量において 150 cm / 時間の流速で負荷した。

【0072】

75 cm / 時間で 7 CV の 250 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス（pH 8.5）を用い、カラムを洗浄した。150 cm / 時間で 9 CV の 10 mM 硫酸アンモニウム、50 mM トリス（pH 8.5）を用い、カラム溶出を行い、ピークを収集した。150 cm / 時間で 3 CV の脱イオン水を用い、カラムのストリッピングを行った。150 cm / 時間で 3 CV の 1 N 水酸化ナトリウムによりカラムを清浄にし、150 cm / 時間で 3 CV の 0.1 N 水酸化ナトリウム中に保存した。

10

【0073】

結果：

粗生物中の量に対する脱塩基不純物、CNE t 不純物、及び N + 1 不純物の相対除去量を、それぞれ、以下の表 4、5、及び 6 に提供する。

【0074】

【表 4】

表 4 脱塩基不純物の除去

20

不純物	粗生物中の出発 レベル%	H I C 溶出物中 のレベル%
脱塩基	0.34	0.19

【0075】

【表 5】

表 5 CNE t 不純物の除去

30

不純物	粗生物中の出発 レベル%	H I C 溶出物中 のレベル%
N+1	0.31	0.20

【0076】

【表 6】

表 6 N + 1 不純物の除去

40

不純物	粗生物中の出発 レベル%	H I C 溶出物中 のレベル%
N+1	1.25	0.20

【0077】

表 4、5、及び 6 に記載の結果に基づくと、H I C カラムの動的結合容量の中心で負荷を行うことで、脱塩基不純物、CNE t 不純物、及び N + 1 不純物の除去が可能になる。

発明の態様

[ 態様 1 ] 標的オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含有する混合物から前記標的オリゴヌクレオチドを分離するための方法であって、

50

- a) 前記混合物に塩を添加するステップと、
- b) 疎水性吸着剤の容量の約32～約78%の動的負荷容量において、希釈された前記混合物を前記疎水性吸着剤に接触させるステップと、
- c) 前記疎水性吸着剤を塩水溶液で洗浄するステップと、
- d) 前記標的オリゴヌクレオチドを溶離液で溶離するステップと、
- e) 前記標的オリゴヌクレオチドを含む溶出液を収集するステップと
- を含み、前記生成物関連不純物が少なくとも1つのn-1不純物を含み、これにより前記生成物関連不純物から前記標的オリゴヌクレオチドが分離される、前記方法。
- [ 態様 2 ] 標的のチオール化オリゴヌクレオチド及び生成物関連不純物を含有する混合物から前記標的オリゴヌクレオチドを分離するための方法であって、
- a) 前記混合物に塩を添加するステップと、
- b) 疎水性吸着剤の容量の約40～約100%の動的負荷容量において、希釈された前記混合物を前記疎水性吸着剤に接触させるステップと、
- c) 前記疎水性吸着剤を塩水溶液で洗浄するステップと、
- d) 前記標的オリゴヌクレオチドを溶離液で溶離するステップと、
- e) 前記標的オリゴヌクレオチドを含む溶出液を収集するステップと
- を含み、前記生成物関連不純物が少なくとも1つのP=O不純物を含み、これにより前記生成物関連不純物から前記標的オリゴヌクレオチドが分離される、前記方法。
- [ 態様 3 ] 前記塩が前記混合物に塩水溶液として添加されるか、または前記塩が前記混合物に直接溶解される、態様1または2に記載の方法。
- [ 態様 4 ] 前記洗浄ステップの流速が負荷流速よりも遅い、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 5 ] 前記溶離液が、水、塩水溶液、エチレングリコール、もしくはプロピレングリコール、またはそれらの混合物から選択される、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 6 ] 前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最初の1～25%を含まないように遅延される、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 7 ] 前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最初の10～25%を含まないように遅延される、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 8 ] 前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最初の5～10%を含まないように遅延される、態様1～6のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 9 ] 前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最後の1～25%を含まない、態様1～8のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 10 ] 前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最後の5～10%を含まない、態様9に記載の方法。
- [ 態様 11 ] 前記溶出液の収集が、前記生成物の溶出ピークの最後の10～25%を含まない、態様9に記載の方法。
- [ 態様 12 ] 前記疎水性吸着剤が少なくとも15cmの床高で充填される、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 13 ] 前記塩が、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、または $\text{Na}^+$ のうちのいずれかのカチオン、及び $\text{F}^-$ 、 $[\text{SO}_4]^{2-}$ 、 $[\text{HPO}_4]^{2-}$ 、酢酸イオン、もしくは $\text{Cl}^-$ からなるいずれかのアニオン、またはそれらの組み合わせを含む、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 14 ] 前記塩が硫酸アンモニウムである、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 15 ] 前記疎水性吸着剤が、フェニル、ブチル、またはヘキシルを含む、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 16 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが15～25個のヌクレオチドを含む、先行態様のいずれかに記載の方法。
- [ 態様 17 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、アデニン、グアニン、チミン(5-メチルウラシル)、シトシン、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、7-デアザプリン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から独立して選択される核酸塩基を含む、先行態様のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

方法。

[ 態様 18 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、アデニン、グアニン、チミン ( 5 - メチルウラシル )、及び 5 - メチルシトシンからなる群から独立して選択される核酸塩基を含む、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 19 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、任意選択で置換されている糖を含むか、2つの非ジェミナル環原子が架橋して二環式核酸 ( BNA ) を形成しているか、または、前記糖の環酸素原子が、S、N ( R )、もしくは C ( R<sub>1</sub> ) ( R )<sub>2</sub> ( 式中、R は H または C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキルである )、及びこれらの組み合わせに置き換えられている、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 20 ] 前記糖が、2' 位において、O [ ( CH<sub>2</sub> )<sub>n</sub>O ]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O ( CH<sub>2</sub> )<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O ( CH<sub>2</sub> )<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O ( CH<sub>2</sub> )<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、OCH<sub>2</sub>C ( =O ) N ( H ) CH<sub>3</sub>、及び O ( CH<sub>2</sub> )<sub>n</sub>ON [ CH<sub>2</sub> )<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> ]<sub>2</sub> ( 式中、n 及び m は独立して、1 ~ 約 10 である ) で置換されている、態様 19 に記載の方法。

10

[ 態様 21 ] 前記糖が、2' において O ( CH<sub>2</sub> )<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> で置換されている、態様 19 に記載の方法。

[ 態様 22 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、RNA のみ、DNA のみ、または RNA 及び DNA の組み合わせを含む、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 23 ] 前記標的オリゴヌクレオチドがギャップマーである、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 24 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル ( P = O )、ホスホロチオエート ( P = S )、またはそれらの組み合わせを含む、先行態様のいずれかに記載の方法。

20

[ 態様 25 ] 前記標的オリゴヌクレオチドの配列が ( 配列番号 1 ) である、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 26 ] 前記標的オリゴヌクレオチドの配列が ( 配列番号 2 ) である、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 27 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、4, 4' - ジメトキシトリチル ( DMT ) を含む、先行態様のいずれかに記載の方法。

[ 態様 28 ] 前記標的オリゴヌクレオチドが、4, 4' - ジメトキシトリチル ( DMT ) を含まない、態様 1 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

30

[ 態様 29 ] 前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの P = O 不純物を更に含む、態様 1 に記載の方法。

[ 態様 30 ] 前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの n - 1 不純物を更に含む、態様 2 に記載の方法。

[ 態様 31 ] 前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの脱塩基不純物を更に含む、態様 1 ~ 30 のいずれかに記載の方法。

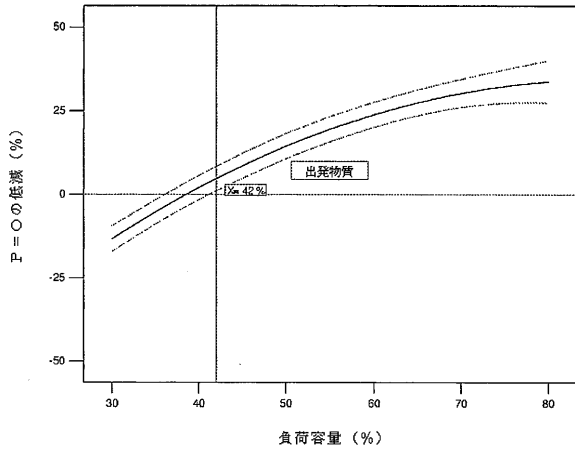
[ 態様 32 ] 前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの CNEt 不純物を更に含む、態様 1 ~ 31 のいずれかに記載の方法。

[ 態様 33 ] 前記生成物関連不純物が、少なくとも 1 つの N + 1 不純物を更に含む、態様 1 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

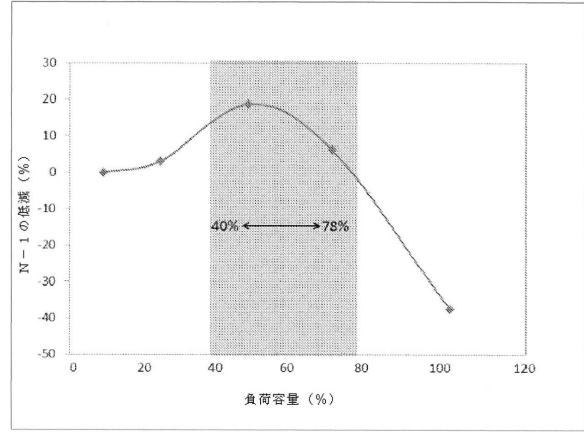
40

【図面】

【図 1】

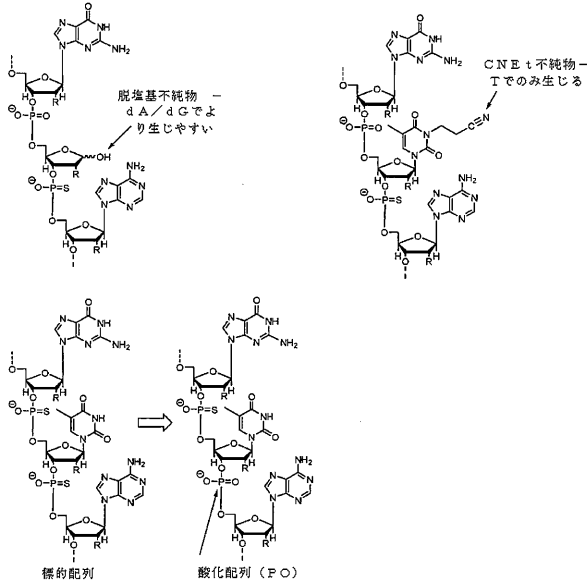


【図 2】



10

【図 3】



20

30

【配列表】

[0007075359000001.app](#)

40

50

---

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100188374

弁理士 一宮 維幸

(72)発明者 グロンケ, ロバート・エス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02142, ケンブリッジ, ビニー・ストリート 225, バ  
イオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジョシ, ラトネッシュ・エス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02142, ケンブリッジ, ビニー・ストリート 225, バ  
イオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド

審査官 神谷 昌克

(56)参考文献 国際公開第02/004027(WO, A1)

特表平10-505577(JP, A)

特開昭61-072797(JP, A)

特開昭60-104097(JP, A)

特表2006-501250(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07H

Caplus/REGISTRY(STN)