

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 3 部門第 2 区分
 【発行日】令和 2 年 7 月 27 日 (2020.7.27)

【公表番号】特表 2019-518759 (P2019-518759A)
 【公表日】令和 1 年 7 月 4 日 (2019.7.4)
 【年通号数】公開・登録公報 2019-026
 【出願番号】特願 2018-565677 (P2018-565677)
 【国際特許分類】

C 0 7 H 1/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 H 1/06

C 1 2 N 15/10 1 1 2 Z

C 1 2 N 15/10 Z N A

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 6 月 12 日 (2020.6.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。

【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。

【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。

【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、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記疎水性吸着剤が、フェニル、ブチル、またはヘキシルを含み、前記疎水性吸着剤が少なくとも 15 cm 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。

【請求項 7】

前記塩が、 NH_4^+ 、 K^+ 、または Na^+ のうちのいずれかのカチオン、及び F^- 、 $[\text{SO}_4]^{2-}$ 、 $[\text{HPO}_4]^{2-}$ 、酢酸イオン、もしくは 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か、あるいは前記塩が、硫酸アンモニウムである、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 15 ~ 25 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 7のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

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 ~ 8のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

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、N (R)、もしくは C (R₁) (R)₂ (式中、R は H または C1 ~ C12 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、請求項 1 ~ 9のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記糖が、2' 位において、 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ 、及び $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ (式中、n 及び m は独立して、1 ~ 約 10 である) で置換されているか、または前記糖が、2' において $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ で置換されている、請求項 10に記載の方法。

【請求項 12】

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 ~ 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 ~ 12のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

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、請求項 1 ~ 13のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

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 ~ 14のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

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 17】

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 18】

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CNEt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 ~ 17のいずれか1項に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

表4、5、及び6に記載の結果に基づくと、HIC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、CNEt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、

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 15 cm 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、 NH_4^+ 、 K^+ 、または Na^+ のうちのいずれかのカチオン、及び F^- 、 $[\text{SO}_4]^{2-}$ 、 $[\text{HPO}_4]^{2-}$ 、酢酸イオン、もしくは 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。

[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 $\text{C}(\text{R}_1)(\text{R})_2$ (式中、R は H または C_{1-12} 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、 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ 、及び $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ (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。

[態様 21] 前記糖が、2' 位において $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ 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 ($\text{P}=\text{O}$)、ホスホロチオエート ($\text{P}=\text{S}$)、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。

[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。

[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。