

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-503560

(P2004-503560A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl.⁷

C07H 19/167

C07H 21/00

F I

C07H 19/167

C07H 21/00

テーマコード (参考)

4C057

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 127 頁)

(21) 出願番号	特願2002-510498 (P2002-510498)	(71) 出願人	502398012 プロリゴ・エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成13年6月12日 (2001.6.12)		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボールダー, ルックアウト・ロード 6200
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月10日 (2002.12.10)		
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/001392	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開番号	W02001/096357	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠武
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	60/211,344	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(32) 優先日	平成12年6月13日 (2000.6.13)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相オリゴ合成の普遍固形支持体とその製造及び使用の方法

(57) 【要約】

本発明は、固相オリゴ合成、及びより特定すると、固相オリゴヌクレオチド合成用の普遍固形支持体、その製造法、及びその使用法に関する。本発明の1つの側面は、固相オリゴ合成での使用に適した普遍固形支持体の製造法に関し、この方法は、(a) 固形支持体(例、CPG)の付帯官能基(例、 $-NH_2$)をリンカー試薬(例、塩化オキサリル)と反応させる工程により、付帯リンカー基(例、 $-C(=O)Cl$)を形成させる工程；(b) 過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により(例、回転蒸発装置を使用し)除去する工程；及び、(c) 前記付帯リンカー基を環式試薬(例、保護化イノシン)と反応させる工程により、付帯環式基を形成させる工程を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造法であって：

(a) 固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程により、付帯リンカー基を形成させる工程；

(b) 過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程；及び、

(c) 前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる工程により、付帯環式基を形成させる工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

固相オリゴヌクレオチド合成での使用に適した固形支持体の製造法であって：

10

(a) 固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程により、付帯リンカー基を形成させる工程；

(b) 過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程；

(c) 前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる工程により、付帯環式基を形成させる工程；及び、

(d) 過剰な未反応環式試薬及び／又はその副生成物の少なくとも一部を除去する工程を含む、前記方法。

【請求項 3】

固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる前記工程の後で：

20

(i) 前記固形支持体の残存する付帯官能基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化官能基を形成させる工程をさらに含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程の後で：

(i) 前記固形支持体の残存する付帯官能基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化官能基を形成させる工程をさらに含んでなる、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる前記工程の後で：

30

(i) 前記固形支持体の残存する付帯リンカー基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化リンカー基を形成させる工程をさらに含んでなる、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記キャッピング試薬が無水酢酸である、請求項 3、4、及び 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程が減圧及び／又は上昇温度の適用で達成される、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程が、過剰な未反応リンカー試薬の実質的な部分を除去する工程を伴う、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 9】

過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を除去する前記工程が蒸発だけで達成される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法の 1 つ以上の工程が蒸発装置を使用して実施される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法が回転蒸発装置若しくは蒸留装置を使用して実施される、請求項 1～9 のいずれ

50

か 1 項に記載の方法。

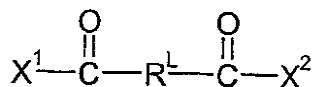
【請求項 1 2】

前記方法が回転蒸発装置を使用して実施される、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記リンカー試薬が式：

【化 1】



10

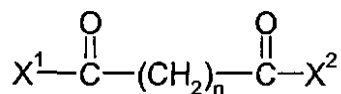
(式中：

X^1 と X^2 は、独立して、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ であり；そして、 R^L は、共有結合か、又は、1 ～ 10 の炭素原子と N、O、及び S から選択される 0 ～ 5 のヘテロ原子を含んでなる有機基である二価基を示す) を有し；そして、前記リンカー試薬が揮発液体である、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記リンカー試薬が式：

【化 2】



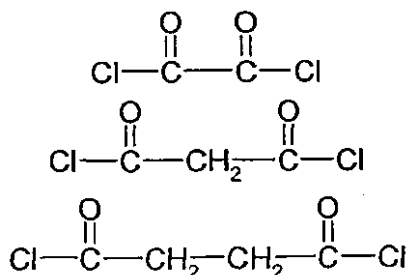
20

(式中： X^1 と X^2 は、独立して、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ であり；そして、 n は、0 ～ 2 の整数である) を有する、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記リンカー試薬が：

【化 3】



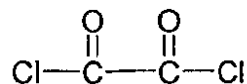
30

の 1 つである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記リンカー試薬が：

【化 4】



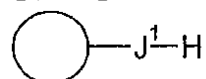
40

である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記固形支持体の前記付帯官能基が、以下のように示される $-J^1-H$ (ここで J^1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、又は $-S-$ である) である、

【化 5】



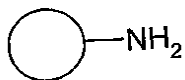
50

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記固形支持体の前記付帯官能基が、以下のように示される —NH_2 である、

【化 6】

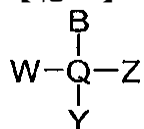


請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記環式試薬が式：

【化 7】



{式中：

Q は、環式基を示し、これは単一の非芳香環を有し、この環は 5 ～ 7 の環原子を有し、この環原子は：

(a) すべて炭素原子であるか、又は

(b) 炭素原子と、酸素、窒素、及びイオウから選択される 1 若しくは 2 つのヘテロ原子であり；

W は、反応共役基を示し、 —OH 、 —NH_2 、又は —SH であり；

B は、プリン若しくはピリミジン、又はその誘導体若しくは類似体である、塩基性部分を示し；

Y は、 —OH 、 —NH_2 、又は —SH であるオリゴ合成基、又はその保護化形態を示し；そして、

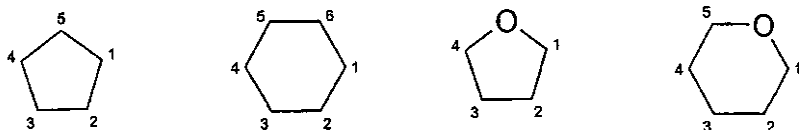
Z は、存在する場合、 —OH 、 —NH_2 、又は —SH である補助基、又はその保護化形態を示し；

ここで、前記 W、B、Y、及び Z は、存在する場合、共有結合により直接的にか、又は $\text{—CH}_2\text{—}$ 及び $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ から選択される中間共有連結により間接的に、前記 Q の炭素環原子へそれぞれ個別に付く} を有する、請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 20】

Q が：

【化 8】

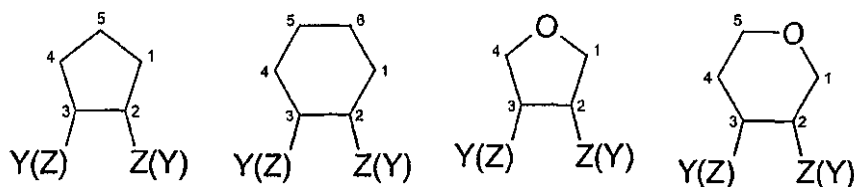


から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

環式試薬の Y—Q—Z 部分が：

【化 9】



10

20

30

40

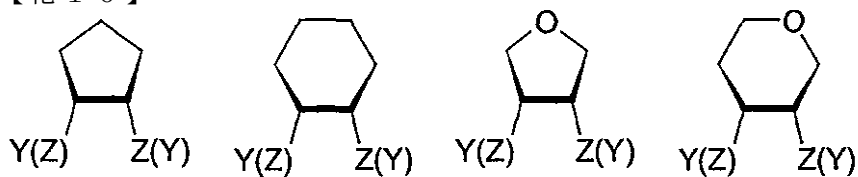
50

から選択される構造を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

環式試薬の Y-Q-Z 部分が：

【化 10】



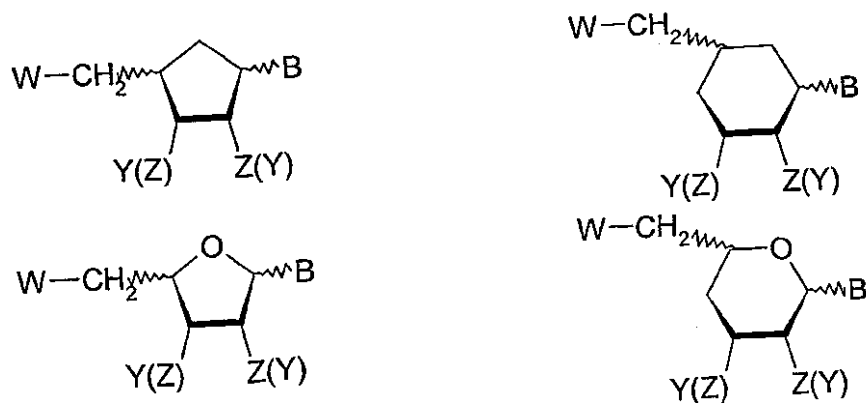
から選択される構造を有する、請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 23】

環式試薬が：

【化 11】



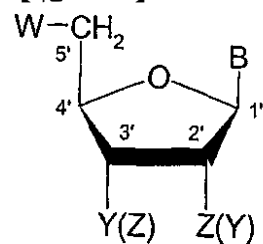
20

から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

環式試薬が：

【化 12】



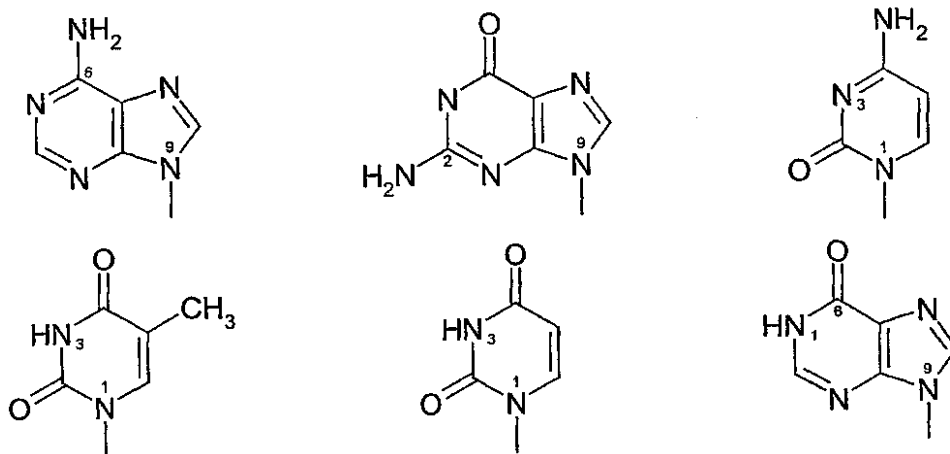
30

から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

B が、以下のもの、又はその保護化形態：

【化 1 3】



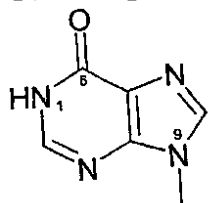
10

から選択される、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

B が、以下のもの、又はその保護化形態：

【化 1 4】



20

である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

W が $-OH$ である、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

Y が、 $-OH$ 又はその保護化形態である、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 9】

Z が、存在する場合、 $-OH$ 又はその保護化形態である、請求項 1 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

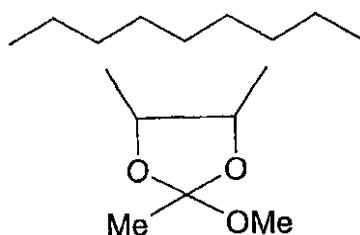
【請求項 3 0】

Z が、存在する場合、 $-OR$ （ここで、R は、アシル基、 $C_1 - 7$ アルキル基、又はシリル基である）の形態で保護化された $-OH$ である、請求項 1 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

Z と Y の両方が、脱保護化形態では、 $-OH$ であり、保護化形態では、構造：

【化 1 5】



40

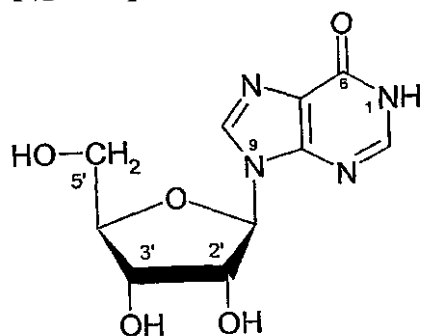
の $O-O$ -メトキシエチリデン基とともに、環式構造の一部と一緒に形成する、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

50

前記環式試薬が：

【化 1 6】



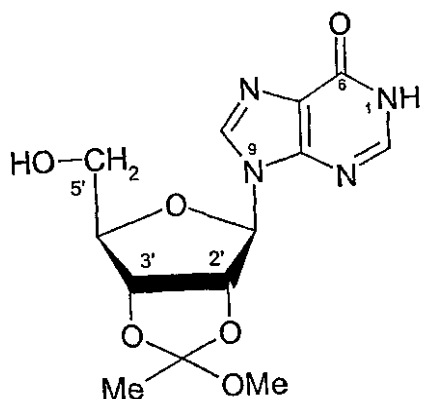
10

又はその保護化形態である、請求項 1 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記環式試薬が：

【化 1 7】



20

である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる前記工程が、付加塩基の存在下で実施される、請求項 1 ～ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

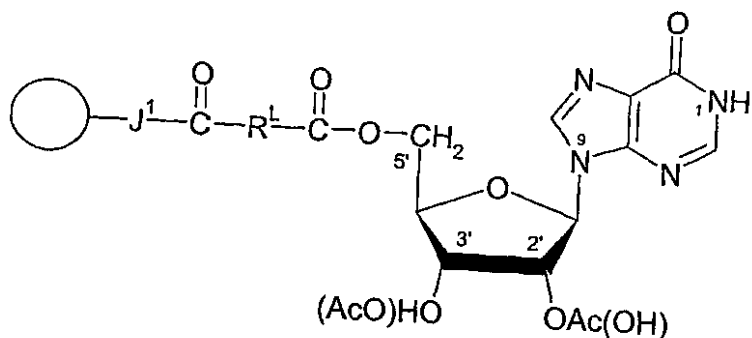
【請求項 3 5】

前記付加塩基が、ジメチルアミノピリジン (DMA P) 又は N-メチルイミダゾール (NMI) である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

式：

【化 1 8】



40

{式中：

J^1 は、 $-NH-$ であり；

R^L は、 $-(CH_2)_n-$ であり；そして、

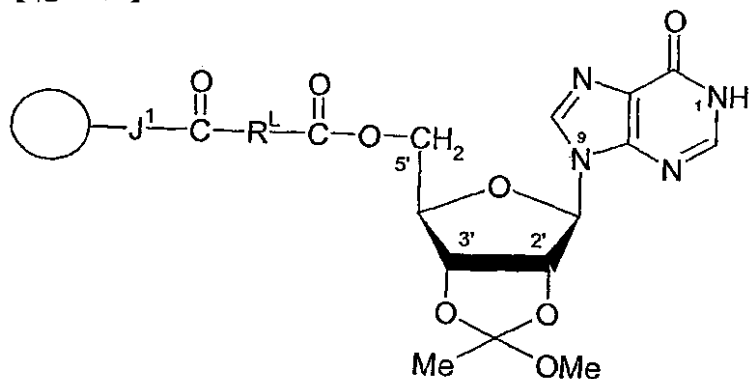
50

n は、0～10の整数である}の固形支持体、又はその保護化誘導体。

【請求項37】

式：

【化19】



10

{式中：

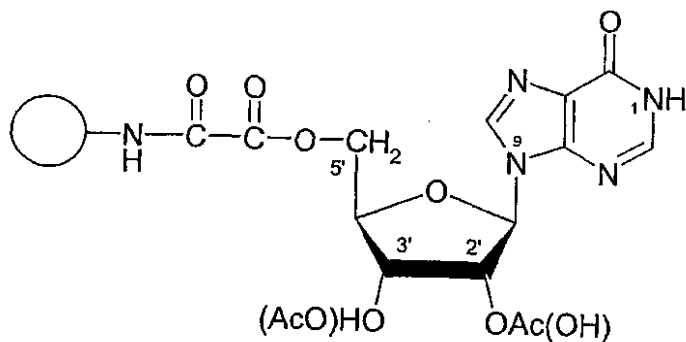
J^1 は、 $-NH-$ であり；

R^1 は、 $-(CH_2)_n-$ であり；そして、
n は、0～10の整数である}の固形支持体。

【請求項38】

式：

【化20】



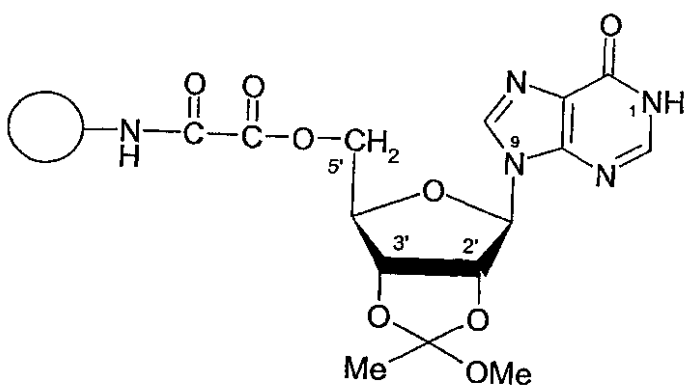
30

の固形支持体、又はその保護化形態。

【請求項39】

式：

【化21】



40

の固形支持体。

【請求項40】

請求項1～35のいずれか1項に記載の方法により製造される、固相オリゴヌクレオチド 50

合成での使用に適した固形支持体。

【請求項 4 1】

オリゴヌクレオチド合成の方法であって、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載される普遍固形支持体の製造法を利用する、前記方法。

【請求項 4 2】

オリゴヌクレオチド合成の方法であって、請求項 3 6 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載の普遍固形支持体を利用する、前記方法。

【請求項 4 3】

オリゴヌクレオチド合成の方法を使用して製造されたオリゴヌクレオチドであって、前記方法は請求項 1 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の普遍固形支持体の製造法を利用する、前記オリゴヌクレオチド。 10

【請求項 4 4】

請求項 3 6 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載の普遍固形支持体を使用して製造されたオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、概して固相オリゴ合成の分野に関し、より特定すると、固相オリゴヌクレオチド合成の普遍固形支持体、その製造法、及び、その使用の方法に関する。

【0002】

20

背景技術

修飾及び未修飾オリゴヌクレオチドの分子生物学の分野でのプローブ及びプライマーとしての広汎な使用、並びに、アンチセンス及び抗遺伝子オリゴヌクレオチドの治療薬としての潜在的な応用は、これら分子の新規で改善された合成法の不断の開発をますます重要にしている。

【0003】

オリゴヌクレオチド合成のいくつかの方法では、合成オリゴヌクレオチドの 3' 末端でヌクレオシドになるように定められている第一のヌクレオシドを固形支持体が含有することが必要とされる。そのような方法には、全部で 8 つの通例ヌクレオシド支持体（4 つが DNA 用で、4 つが RNA 用）の資材（inventory）が維持されることが求められる。さらに、異常ヌクレオシドは、ホスホロアミダイトとしてのみ入手可能であることが多く、支持体としては入手可能でないので、3' 末端に異常ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドは、容易には製造され得ない。さらに、そのような方法のもう 1 つの欠点は、3' -ヌクレオシドを含有するカラムの選択におけるエラーの潜在可能性である。このエラーの潜在可能性は通例のカラム形式の合成機ではかなり低いようだが、24、96又は192ウェルが一定グリッドに4つの支持体を含有し得る新世代の並列合成機では特に顕著になる。 30

【0004】

こういった諸問題を軽減するために、様々な「普遍」固形支持体が開発されてきた。これら普遍固形支持体は、3' 末端ヌクレオシドの性質にかかわらず任意のオリゴヌクレオチドを合成するために使用することが可能である。 40

【0005】

De Bear et al., 1987 は、保護化ウリジン基がスクシニル基を介して固形支持体へ連結している普遍固形支持体を記載する。この支持体は、第一に、4-ジメチルアミノピリジンの存在下で保護化ウリジンを無水コハク酸と反応させること、第二に、生じたコハク酸の半エステルを p-トルエンスルホンニトロトリアゾールで活性化させること、及び、第三に、この活性エステルを固形支持体の付帯（pendant）アミノ基と反応させることによって製造される。これらの工程は2日間以上を必要とし、ピリジン、メタノール、及びクロロホルムを用いた洗浄による精製に次いで、真空乾燥が含まれる。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかつ 50

た。

【0006】

Webb et al., 1987 は、オキシラン、アジリジン、又はエピスルフィド基を担う固形支持体、求核基、例えばフリーアミノ基を有するリンカー化合物、及び、コハク酸ペンタクロロフェニルを担う活性化ヌクレオシドを利用する普遍固形支持体を製造する方法を記載する。この普遍固形支持体は、クロマトグラフィー分離の必要性なしに製造されるようだ（第4カラム、41～42行）が、この合成は実に多くの精製工程（例えば、濾過、洗浄、乾燥）を必要とし、少なくとも2日間を必要とする（実施例1）。除去のために蒸発法を使用することはどこにも述べられていない。

【0007】

Nelson et al., 1989 は、2つの異なる保護化された基を有するアダプター化合物を記載する。一方（-O-DMT）はオリゴヌクレオチド合成用で、他方（-NHFMoc）は他の使用、例えばラベル付加のためである。このアダプターは、はじめに活性化スクシニル基を担うように誘導され、引き続き、固形支持体へカップルされる。これらの工程は多くの精製工程（例、洗浄、乾燥、濾過）を必要とする。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。固形支持体へのスクシニル化及びカップリングは20時間以上、そしてしばしばそれよりずっと長い時間を必要とした。

【0008】

Letsinger et al., 1992 は、例えば、オキサリルリンカーアーム（その文献の図1C及び図2を参照のこと）を利用する普遍固形支持体を記載する。オキサリルリンカーアームは、活性化されたオキサリル誘導体を使用して導入される（第4カラム、62～64行）。使用に先立って、より反応性の低いトリアゾリド誘導体へ塩化オキサリルを変換する（第5カラム、30～37行）。このヌクレオシドをロードされたオキサリル支持体は、一見すると1～8時間で製造され得て（第5カラム、43～45行）、実施例1では2.5時間を必要とした（第6カラム、43～56行）。この普遍固形支持体は、シリンジ装置で製造され、（液体、又は溶液中の）反応体が注入され、過剰な反応体がその後排出され、残渣は、溶媒（例、アセトニトリル、ピリジン、塩化メチレン、ジエチルエーテル）で数回濯ぎ、洗浄された。多くの精製工程（例、濯ぎ、洗浄）が必要とされる。除去のために蒸発法を使用することはどこにも述べられていない。

【0009】

Arnold, 1994 と Arnold, 1996 は、オリゴヌクレオチドの最終の切り離しを達成するために選択酸化に依存する普遍固形支持体を記載する。いずれの場合でも、オリゴヌクレオチドを固形支持体へ連結させるプライマー部分（例、リボシド）は、1つ以上の酸化可能な置換基を保有する（第6カラム、52～62行）。この合成は多くの精製工程（例、洗浄、濾過、乾燥、遠心分離、分画、及びカラムクロマトグラフィー）を必要とする（実施例1、3、5、及び7を参照のこと）。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。固形支持体、リンカー基、及びプライマー基の間の連結を形成するには6時間以上、そしてしばしばそれよりずっと長い時間を必要とした。

【0010】

Vu et al., 1995 は、2つの異なる保護化された基を有する数多くの異なるプライマーを記載する。一方はオリゴヌクレオチド合成用で、他方は他の使用、例えばラベル付加のためである。いずれの場合でも、初めにプライマーがリンカー基へ付けられ（スクシニル化）、引き続き、最終工程で支持体へカップルされ、これらの工程は多くの精製工程（例、濾過、洗浄、乾燥、及びカラムクロマトグラフィー）を必要とした（化合物4、5、及び6；12及び13；18及び19；25及び26；31及び32の合成を参照のこと）。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。スクシニル化と支持体へのカップリングは6時間以上、そしてしばしばそれよりずっと長い時間を必要とした。

10

20

30

40

50

【0011】

Schwartz et al., 1995 は、ヌクレオシド担持固形支持体を普遍固形支持体へ変換し得る普遍アダプター化合物を記載する。完全に保護化された2' (3')-O-ジメトキシトリチル-3' (2')-O-ベンゾイルウリジン-5'-O-(2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)である、このリンカー化合物は、慣用のホスホロアミダイト法を使用して、ヌクレオシド担持固形支持体へ連結される。

【0012】

McLean et al., 1997 は、求核基（例、ヒドロキシル、又は保護化ヒドロキシル）を担うホモ環式（例、シクロヘキシル）若しくはヘテロ環式（例、フラン、ピラン）の環がスパーサー基（例、スクシニル）により固形支持体へつながっている普遍固形支持体を記載する。この普遍固形支持体は、初めにリンカー基を環式基へ付けてから、このリンカー環式基を固形支持体へ付けることによって合成される。この合成は多くの精製工程（例、濾過、洗浄、乾燥、カラムクロマトグラフィー、分画）を必要とする（実施例1及び2、13及び14、16及び17、19、20及び21、23及び24、及び26を参照のこと）。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。リンカー基の環式基へのカップリングと、後続の固形支持体へのカップリングは、36時間以上、そしてしばしばそれよりずっと長い時間を必要とした。

【0013】

Lyttle et al., 1996 は、オリゴ合成用の（-O-DMTとしての）保護化ヒドロキシ基と切り離しの機構を促進する（カルバミン酸アシルとしての）保護化アミノ基を担うプロピル基（ここで、プロピル基は、スクシニル基を介して固形支持体へ結合している）の普遍固形支持体を記載する。この支持体は、普遍リンカーである、1-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2-O-スクシノイル-3-N-アシルオキシカルボニルプロパンを使用して製造される。コハク酸誘導体の形成（化合物5から化合物1へ）は、12時間以上と、カラムクロマトグラフィーを含む、いくつかの精製工程を必要とした。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。後続の固形支持体へのカップリングはさらに12時間を必要とした。

【0014】

Scheuer-Larsen et al., 1997 は、オリゴヌクレオチド合成用の（-O-DMTとしての）保護化ヒドロキシ基と（クロロアセチルとしての）保護化ヒドロキシル基を担うD-リボース基がスクシニル基により固形支持体へ連結している普遍固形支持体を記載する。コハク酸誘導体の形成と後続の固形支持体のカップリング（化合物5から6へ、スキーム1の工程f及びg）はいくつかの精製工程（例、洗浄、分画、及び乾燥）と44時間以上を必要とした。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。

【0015】

Reddy et al., 1997 は、ビシナル基（-XR¹及び-YR²）を担う環部分（-R³、好ましくはリボシド）が、例えば、エステル連結、リン酸連結（例、実施例8）、ホスホロアミデート連結（例、実施例11）、又はエステル連結（例、実施例13）により、典型的にはスクシニル基を介して固形支持体へ連結している普遍固形支持体を記載する。実施例13では、固形支持体を無水コハク酸で誘導化し、後続して2', 3'-保護化ウリジンと反応させる。この方法は3日以上と多くの精製工程（例、濾過、洗浄、及び乾燥）を必要とする。どの場合でも、過剰な試薬は、蒸発によるか又は蒸発によるだけでは除去されなかった。

【0016】

上記に記載のものを含めて、普遍固形支持体の製造及び使用についての既知の方法は複雑で時間がかかるので、容易かつ迅速に、より少ない工程で、より少なくてより単純な精製工程で製造され得て、合成されたオリゴヌクレオチドの簡単で速やかな切り離し及び脱保護化を促進する、オリゴヌクレオチド合成用の普遍固形支持体への高いニーズが存在する

10

20

30

40

50

。

【0017】

(a) (付帯リンカー基を形成させるために) 固形支持体を初めにリンカー試薬と反応させてから、(付帯環式基を形成させるために) 環式試薬と反応させ、(b) リンカー試薬が(i) 揮発性であるか、又は、より好ましくは揮発液体であり、(ii) 穏和な条件下で容易に切り離される連結基を産出するように選択する方法を利用することによって、蒸発によるか又は蒸発によるだけで過剰なリンカー試薬を除去するか又は実質的に除去することによって合成を大いに単純化することが可能になる。今日まで、そのような方法は、教示も示唆もされていない。

【0018】

従って、本発明の1つの目的は、オリゴヌクレオチド合成用普遍固形支持体の製造法の提供であって、この方法は迅速である(例、約3時間未満)。

本発明のもう1つの目的は、オリゴヌクレオチド合成用普遍固形支持体の製造法の提供であって、この方法は、例えば、過剰な未反応の環式試薬、(適宜) キャッピング試薬、及びその副生成物の除去のために、1回だけの精製工程(例、濾過)を利用する。

【0019】

本発明のもう1つの目的は、オリゴヌクレオチド合成用普遍固形支持体の製造法の提供であって、この方法は、そのような支持体を高収率かつ高ローディング(例、約60 μ mol/g)でもたらす。

【0020】

本発明のもう1つの目的は、オリゴヌクレオチド合成用普遍固形支持体の製造法の提供であって、この方法は、オリゴヌクレオチド合成に続く、実質的に減少した切り離し時間(例、75°Cで約1時間)の使用を可能にする。

【0021】

本発明のもう1つの目的は、オリゴヌクレオチド合成用普遍固形支持体の製造法の提供であって、この方法は、1つ以上の上記目的を満足させる。

発明の要約

本発明の1つの側面は、オリゴ合成の普遍固形支持体の製造法に関し、この支持体は、例えば、固相オリゴヌクレオチド合成に有用である。

【0022】

従って、1つの態様では、本発明は、固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造法に関し、この方法は：

(a) 固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程により、付帯リンカー基を形成させる工程；

(b) 過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程；及び、

(c) 前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる工程により、付帯環式基を形成させる工程を含む。

【0023】

1つの態様では、本発明は、固相オリゴヌクレオチド合成での使用に適した固形支持体の製造法に関し、この方法は：

(a) 固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程により、付帯リンカー基を形成させる工程；

(b) 過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程；

(c) 前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる工程により、付帯環式基を形成させる工程；及び、

(d) 過剰な未反応環式試薬及び／又はその副生成物の少なくとも一部を除去する工程を含む。

【0024】

1つの態様では、本方法は、固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる前記工程の後で：

10

20

30

40

50

(i) 前記固形支持体の残存する付帯官能基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化官能基を形成させる工程をさらに含む。

【0025】

1つの態様では、本方法は、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程の後で：

(i) 前記固形支持体の残存する付帯官能基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化官能基を形成させる工程をさらに含む。

【0026】

1つの態様では、本方法は、前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる前記工程の後で：

(i) 前記固形支持体の残存する付帯リンカー基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化リンカー基を形成させる工程をさらに含む。

【0027】

1つの態様では、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程が、減圧及び／又は上昇温度の適用で達成される。

1つの態様では、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程が、過剰な未反応リンカー試薬の実質的な部分を除去する工程を伴う。

【0028】

1つの態様では、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を除去する前記工程が、蒸発だけで達成される。

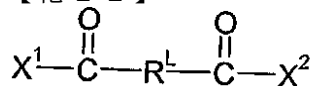
1つの態様では、前記方法の1つ以上の工程が蒸発装置を使用して実施される。1つの態様では、前記方法が回転蒸発 (rotavapor) 装置若しくは蒸留装置を使用して実施される。1つの態様では、前記方法が回転蒸発装置を使用して実施される。

【0029】

1つの態様では、前記リンカー試薬が式：

【0030】

【化22】



(式中：

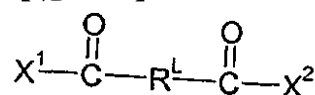
X^1 と X^2 は、独立して、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ であり；そして、 R^L は、共有結合か、又は、1～10の炭素原子とN、O、及びSから選択される0～5のヘテロ原子を含んでなる有機基である二価基を示す)を有し；そして、ここで前記リンカー試薬は揮発液体である。

【0031】

1つの態様では、前記リンカー試薬が式：

【0032】

【化23】



(式中：

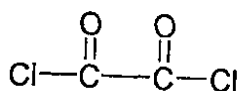
X^1 と X^2 は、独立して、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ であり；そして、 n は0～2の整数である)を有する。

【0033】

1つの好ましい態様では、前記リンカー試薬が：

【0034】

【化24】



である。

【0035】

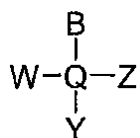
1つの態様では、前記固形支持体の前記付帯官能基が $-J^1-H$ であり、ここで J^1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、又は $-S-$ である。1つの態様では、前記固形支持体の前記付帯官能基が $-OH$ である。

【0036】

1つの態様では、前記環式試薬が式：

【0037】

【化25】



{式中：

Qは、環式基を示し；

Bは、塩基性基を示し；

Wは、反応共役基を示し；

Yは、オリゴ合成基を示し；そして、

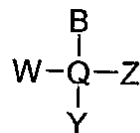
Zは、存在する場合、補助基を示す}を有する。

【0038】

1つの態様では、前記環式試薬が式：

【0039】

【化26】



{式中：

Qは、環式基を示し、これは単一の非芳香環を有し、この環は5～7の環原子を有し、この環原子は：

(a)すべて炭素原子であるか、又は

(b)炭素原子と、酸素、窒素、及びイオウから選択される1若しくは2つのヘテロ原子であり；

Wは、反応共役基を示し、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、又は $-SH$ であり；

Bは、プリン若しくはピリミジン、又はその誘導体若しくは類似体である、塩基性部分を示し；

Yは、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、又は $-SH$ であるオリゴ合成基、又はその保護化形態を示し；そして、

Zは、存在する場合、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、又は $-SH$ である補助基、又はその保護化形態を示し；

ここで、前記W、B、Y、及びZは、存在する場合、共有結合により直接的にか、又は $-CH_2-$ 及び $-CH_2CH_2-$ から選択される中間共有連結により間接的に、前記Qの炭素環原子へそれぞれ個別に付く}を有する。

【0040】

1つの好ましい態様では、前記環式試薬が：

【0041】

10

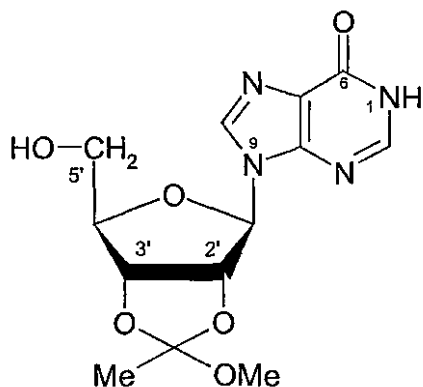
20

30

40

50

【化 2 7】



10

である。

【0042】

1つの態様では、前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる前記工程が、付加塩基の存在下で実施される。1つの態様では、前記付加塩基が、ジメチルアミノピリジン（DMA P）又はN-メチルイミダゾール（NMI）である。

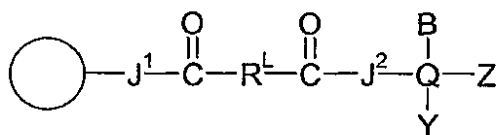
【0043】

本発明のもう1つの側面は、固相オリゴ合成、好ましくはオリゴヌクレオチド合成での使用に適した固形支持体に関し、この支持体は、以下の式：

20

【0044】

【化 2 8】



（式中、 J^1 、 J^2 、 R^L 、Q、B、Y、及びZは、本明細書に定義される通りである）を有する。

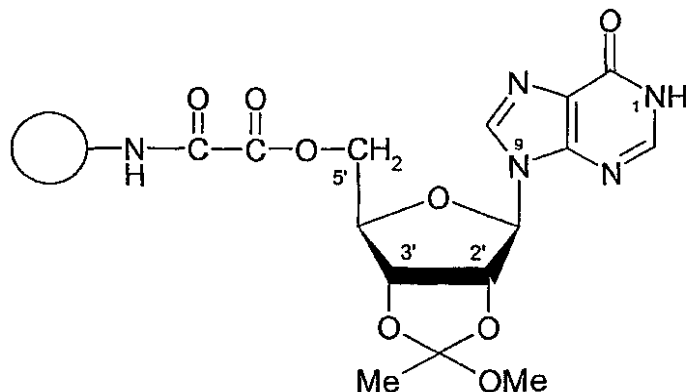
【0045】

30

1つの好ましい態様では、固形支持体が以下の式：

【0046】

【化 2 9】



40

を有する。

【0047】

本発明のもう1つの側面は、本明細書に記載のような方法により製造される、固相オリゴ合成、好ましくはオリゴヌクレオチド合成での使用に適した固形支持体に関する。

【0048】

本発明のもう1つの側面は、オリゴ合成、好ましくはオリゴヌクレオチド合成の方法に関

50

し、この方法は、本明細書に記載のような普遍固形支持体の製造法を利用する。

【0049】

本発明のもう1つの側面は、オリゴ合成、好ましくはオリゴヌクレオチド合成の方法に関し、この方法は、本明細書に記載のような普遍固形支持体を利用する。

【0050】

本発明のもう1つの側面は、オリゴ合成、好ましくはオリゴヌクレオチド合成の方法を使用して製造されたオリゴヌクレオチドに関し、この方法は、本明細書に記載のような普遍固形支持体の製造法を利用する。

【0051】

本発明のもう1つの側面は、オリゴ合成、好ましくはオリゴヌクレオチド合成の方法を使用して製造されたオリゴヌクレオチドに関し、この方法は、本明細書に記載のような普遍固形支持体を利用する。 10

【0052】

当業者には、本発明の個々の側面及び態様の特別な特徴が、本発明の他の側面及び態様にも関与することが明らかであろう。

発明の詳細な説明

本発明の1つの側面は、オリゴ合成の普遍固形支持体の製造法に関し、この支持体は、例えば、固相オリゴヌクレオチド合成に有用である。

【0053】

本明細書で使用される「オリゴ合成」という用語は、典型的には、但し絶対的ではないが、モノマー単位からのオリゴマー若しくはポリマーの合成に関し、オリゴマー若しくはポリマーの組成は関係ない。好ましいオリゴ合成は、オリゴヌクレオチド合成である。 20

【0054】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド合成」という用語は、典型的には、但し絶対的ではないが、モノマー単位（例、ヌクレオシドホスホロアミダイト）からのオリゴヌクレオチドと、その類似体、模擬体、及び誘導体の合成に関する。

【0055】

本明細書で使用されるように、「固相オリゴヌクレオチド合成」という用語は、周知の「液相オリゴヌクレオチド合成」法の場合とは対照的に、成長するオリゴマー（例、オリゴヌクレオチド）が固形支持体へ支持されているか又は他のやり方で付いている（即ち、共有連結している）合成法を記載するために慣用的な意味で使用される。 30

【0056】

固形支持体

「固形支持体」という用語は、本明細書では慣用的な意味で使用され、有機化学合成、より特定すると、固相オリゴヌクレオチド合成において慣用的に使用される固形支持体を意味する。

【0057】

固形支持体は、典型的には、1つ以上の不溶性若しくは実質的に不溶性の材料から形成され、この材料は無機物又は有機物であり得て、この材料は、オリゴヌクレオチド合成（例、脱保護化、カップリング、酸化、切り離し、等）の間に使用される試薬及び条件に関して化学的に不活性（又は実質的に化学的に不活性）である。 40

【0058】

1つの態様では、固形支持体が、無機のマクロ細孔性材料から形成される。無機材料の例には、限定されないが、シリカ、ケイソウ土、多孔ガラス、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、金属酸化物（例えば、酸化アルミニウム、酸化ニッケル、及び酸化鉄）、及び／又は粘土が含まれる。

【0059】

1つの態様では、固形支持体が有機ポリマー材料から形成され、このポリマー材料は、場合により架橋結合している。有機ポリマー材料の例には、限定されないが、セルロース、多糖、架橋多糖、ポリスチレン、架橋ポリスチレン、ポリアクリロイルモルホリド、ポリ 50

アミド樹脂、ポリアクリロイルピロリドン、ポリエチレングリコール、架橋ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールーポリスチレン、架橋デキストラン、及び／又は架橋アガロースが含まれる。

【0060】

1つの態様では、固形支持体が無機材料と有機ポリマー材料の両方から形成される。そのような固形支持体の例には、限定されないが、アクリルアミドーケイソウ土樹脂、PEPSYN K樹脂、及びPOLYHIPE樹脂が含まれる。

【0061】

本発明での使用に適している、通常使用される固形支持体には、限定されないが、制御孔ガラスビーズ（CPG）（例えば、Cruachem（登録商標）由来）、シリカゲルビーズ（例えば、Merck（登録商標）又はCPG社（登録商標）由来）、及びポリスチレンビーズ（例えば、Porasil C（登録商標）由来）が含まれる。

【0062】

オリゴヌクレオチド合成に関連して使用されてきた他の既知の固形支持体も、本発明による使用に適している（例えば、Gait, 1984 と Koester et al., 1990 を参照のこと）。

【0063】

固形支持体は好適な形態であればよく、限定されないが、樹脂、粒子、ビーズ、繊維、フィルム、等が含まれる。

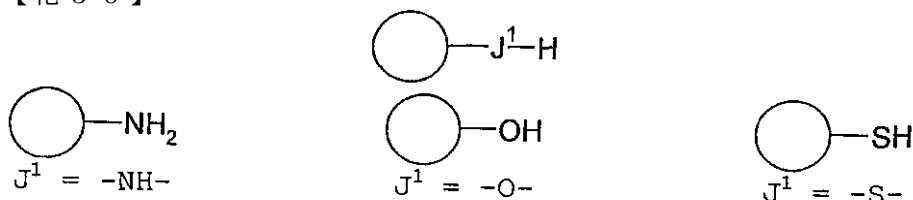
本発明での使用のために、固形支持体は「官能化」されなければならない、即ち、1つ以上の付帯官能基が固形支持体へ共有連結されている形態であるか、又はその形態になるように誘導化されなければならない。これらの付帯官能基により、例えば、固相オリゴヌクレオチド合成において、分子の固形支持体への付加、合成、伸張、及び／又は成長が可能になる。

【0064】

付帯官能基の例には、限定されないが、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、及び $-SH$ が含まれ、本明細書では $-J^1-H$ （ J^1 は、それぞれ、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、又は $-S-$ である）として明示される。これらの場合、固形支持体と付帯官能基は、以下に示されるように明示される。好ましい態様では、付帯官能基が $-NH_2$ である。

【0065】

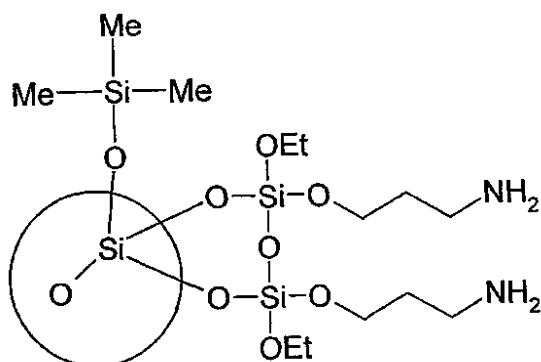
【化30】



固形支持体が官能化され得る方法の例は、Gait et al., 1984 に記載されている。例えば、1つの態様では、アミノ付帯官能基が、以下に示されるように（Gait et al., 1984 の46頁を参照のこと）、シロキシ基を介して固形支持体へ連結され得る。

【0066】

【化31】



10

付帯基は、定常法を使用して分子を共有連結により付けるために使用され得る。そのような連結の例には、限定されないが、アミド連結（ $-\text{NH}-\text{CO}-$ ）、エステル連結（ $-\text{O}-\text{CO}-$ ）、及びチオエステル連結（ $-\text{S}-\text{CO}-$ ）（いずれも、本明細書では $-\text{J}^1-\text{CO}-$ と明示される）が含まれる。

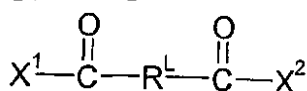
【0067】

リンカー試薬とリンカー基

本明細書で使用される「リンカー試薬」という用語は、式：

【0068】

【化32】



20

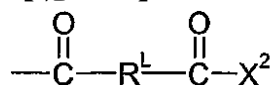
（式中、 X^1 と X^2 はハロゲン基を示し、独立して、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、又は $-\text{I}$ であり、そして R^L は、共有結合若しくは二価基を示す）の化合物に関する。1つの好ましい態様では、 X^1 と X^2 が、独立して、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、又は $-\text{I}$ である。

【0069】

本明細書で使用される「付帯リンカー基」という用語は、リンカー試薬から誘導され、以下の式：

【0070】

【化33】



30

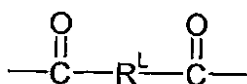
を有する一価部分に関する。

【0071】

本明細書で使用される「リンカー基」という用語は、リンカー試薬から誘導され、以下の式：

【0072】

【化34】



40

を有する二価部分に関する。

【0073】

1つの態様では、以下に論じられるように、 R^L が共有結合である。

1つの態様では、 R^L が、1～10の炭素原子と酸素、窒素、及びイオウから選択される0～5のヘテロ原子を含んでなる有機基である二価基を示す。

【0074】

1つの態様では、 R^L が二価 C_{1-10} アルキレン基を示す。本明細書で使用される「二価 C_{1-10} アルキレン基」という用語は、 C_{1-10} アルカンの2つの異なる炭素原子

50

のそれぞれから1つの水素原子を除去することによって得られる二価の部分に関する。

【0075】

本明細書で使用される「 C_{1-10} アルカン」という用語は、1～10の炭素原子を有する炭化水素化合物（水素と炭素の原子だけを含有する化合物）に関し、この化合物は、脂肪族若しくは脂環式であるか、又はその組合せであって、飽和しているか、部分的に不飽和であるか、又は完全に不飽和であり得る。

【0076】

本明細書で使用される「脂肪族」という用語は、直鎖若しくは分岐鎖であるが、環式ではない基に関する。本明細書で使用される「脂環式」という用語は、1つの環、又は、2つ又はそれ以上の環（例、スピロ環、縮合環、ブリッジ環）を有するが、芳香族ではない基に関する。本明細書で使用される「飽和している」という用語は、炭素-炭素二重結合も炭素-炭素三重結合も有さない基に関する。本明細書で使用される「不飽和」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合若しくは炭素-炭素三重結合を有する基に関する。

10

【0077】

飽和直鎖 C_{1-10} アルカンの例には、限定されないが、メタン、エタン、 n -プロパン、 n -ブタン、 n -ペンタン、及び n -ヘキサンが含まれる。

飽和分岐鎖 C_{1-10} アルカンの例には、限定されないが、イソブタン、イソペンタン、 neo -ペンタン、及びイソヘキサンが含まれる。

【0078】

飽和脂環式（炭素環式） C_{1-10} アルカン（「 C_{3-10} シクロアルカン」とも呼ばれる）の例には、限定されないが、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、並びに、メチルシクロプロパン、メチルシクロブタン、メチルシクロペンタン、及びメチルシクロヘキサンが含まれる。

20

【0079】

1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する不飽和 C_{1-10} アルカン（「 C_{2-7} アルケン」とも呼ばれる）の例には、限定されないが、エテン、プロペン、ブテン、及びブタジエンが含まれる。

【0080】

1つ以上の炭素-炭素三重結合を有する不飽和 C_{1-10} アルカン（「 C_{2-7} アルキン」とも呼ばれる）の例には、限定されないが、エチン、プロピン、ブチン、及びブタジインが含まれる。

30

【0081】

1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する不飽和脂環式（炭素環式） C_{1-10} アルカン（「 C_{3-10} シクロアルケン」とも呼ばれる）の例には、限定されないが、シクロプロペン及びシクロヘキセン、並びに、そのような基を含む基が含まれ、限定されないが、メチルシクロプロペン及びメチルシクロヘキセンが含まれる。

【0082】

1つの好ましい態様では、 C_{1-10} アルカンが、式 $CH_3 (CH_2)_n CH_3$ の飽和直鎖アルカンであり、ここで n は1～8の整数である。そのような飽和直鎖 C_{1-10} アルカンの例には、限定されないが、メタン、エタン、プロパン、 n -ブタン、及び n -ペンタンが含まれる。

40

【0083】

1つの好ましい態様では、 R^L が式 $-(CH_2)_n-$ を有し、ここで n は1～10の整数である。1つの好ましい態様では、 n が1～8の整数である。1つの好ましい態様では、 n が1～6の整数である。1つの好ましい態様では、 n が1～4の整数である。1つの好ましい態様では、 n が1～3の整数である。1つの好ましい態様では、 n が1～2の整数である。そのような基の例には、限定されないが、メチレン ($n=1$, $-CH_2-$)、エチレン ($n=2$, $-CH_2CH_2-$)、トリメチレン ($n=3$, $-CH_2CH_2CH_2-$)、テトラメチレン ($n=4$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$)、及びペンタメチレン (

50

$n = 5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ が含まれる。

【0084】

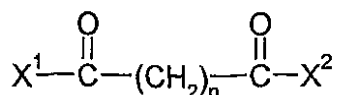
1つの好ましい態様では、 R^L が式 $-(\text{CH}_2)_n-$ であり、ここで n は0～10の整数である(n が0である場合、 R^L は共有結合である)。1つの好ましい態様では、 n が0～8の整数である。1つの好ましい態様では、 n が0～6の整数である。1つの好ましい態様では、 n が0～4の整数である。1つの好ましい態様では、 n が0～3の整数である。1つの好ましい態様では、 n が0～2の整数である。1つの好ましい態様では、 n が0又は1である。1つの好ましい態様では、 n が0であり、 R^L が共有結合である。

【0085】

1つの好ましい態様では、リンカー試薬が式：

【0086】

【化35】



を有し、ここで、 X^1 と X^2 は、独立して、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、又は $-\text{I}$ であり、 n は、0～10、より好ましくは0～8、より好ましくは0～6、より好ましくは0～4、より好ましくは0～3、より好ましくは0～2の整数である。1つの好ましい態様では、 n が0又は1である。1つの好ましい態様では、 n が0である。

【0087】

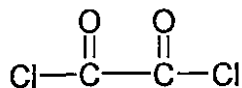
1つの好ましい態様では、 X^1 と X^2 が、独立して、 $-\text{Cl}$ 又は $-\text{Br}$ である。1つの好ましい態様では、 X^1 と X^2 が同一である。1つの好ましい態様では、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であるか、又はいずれも $-\text{Br}$ である。1つの好ましい態様では、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ である。

【0088】

1つの好ましい態様では、 R^L が共有結合であって、リンカー試薬が構造 $\text{X}^1-\text{CO}-\text{CO}-\text{X}^2$ を有する。そのような化合物は、好便にも、「二ハロゲン化オキサリル」と呼ばれる場合がある。1つの好ましい態様では、 R^L が共有結合であって、 X^1 と X^2 が同一である。1つの好ましい態様では、 R^L が共有結合であって、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であるか、又はいずれも $-\text{Br}$ である。1つの好ましい態様では、 R^L が共有結合であって、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であり、リンカー試薬が下記に示される通りであって、以下に示される、 -16°C の融点と約 64°C の沸点(1気圧)を有する、二塩化オキサリルとしばしば呼ばれる。

【0089】

【化36】



1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2-$ であって、リンカー試薬が構造 $\text{X}^1-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{X}^2$ を有する。そのような化合物は、好便にも、「二ハロゲン化マロニル」と呼ばれる場合がある。1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2-$ であって、 X^1 と X^2 が同一である。1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2-$ であって、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であるか、又はいずれも $-\text{Br}$ である。1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2-$ であって、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であり、リンカー試薬が下記に示される通りであって、以下に示される、約 58°C の沸点(26 mmHg, 3.5 kPa)を有する、二塩化マロニルとしばしば呼ばれる。

【0090】

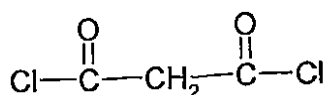
【化37】

10

20

30

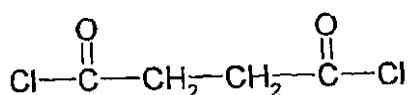
40



1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2-$ であって、リンカー試薬が構造 $\text{X}^1 - \text{CO} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{X}^2$ を有する。そのような化合物は、好便にも、「二ハロゲン化スクシニル」と呼ばれる場合がある。1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ であって、 X^1 と X^2 が同一である。1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ であって、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であるか、又はいずれも $-\text{Br}$ である。1つの好ましい態様では、 R^L が $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ であって、 X^1 と X^2 がいずれも $-\text{Cl}$ であり、リンカー試薬が下記に示される通りであって、以下に示される、 20°C の融点と約 194°C の沸点（1気圧）を有する、二塩化スクシニルとしばしば呼ばれる。

【0091】

【化38】



1つの態様では、 R^L が 1～10 の炭素原子と酸素、窒素、及びイオウから選択される 0～5 のヘテロ原子を含んでなる有機基である二価基を示し、この二価基の R^L は、場合により置換される C_{1-10} アルキレン基と場合により置換される C_{5-20} アリーレン基から選択される 1つ以上の部分を含み、これらの基は（複数存在する場合）共有結合若しくは共有連結を介して連結され、この二価基の R^L には、場合により、一方若しくは両方の末端に、末端共有ヘテロ原子連結が含まれ、この場合、それは、隣接したカルボニル基とより大きな共有連結を形成し得る。共有ヘテロ原子連結の例には、限定されないが、エーテル連結（ $-\text{O}-$ ）及びチオエーテル連結（ $-\text{S}-$ ）が含まれる。末端に位置づけられる場合、これらの連結は、それぞれエステル（ $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ）及びチオエステル（ $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ）連結を形成する。

【0092】

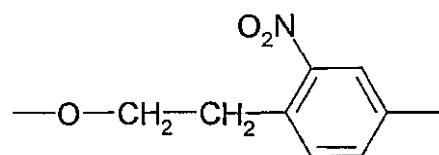
本明細書で使用される「 C_{5-20} アリーレン基」という用語は、場合により置換される C_{5-20} アレーンの 2つの異なる炭素原子のそれぞれから 1つの水素原子を除去することによって得られる二価部分に関する。

【0093】

1つの態様では、 R^L が、2-（2-ニトロフェニル）エチルと呼ばれる、以下の基を示す。例えば、Eritja et al., 1991 を参照のこと。

【0094】

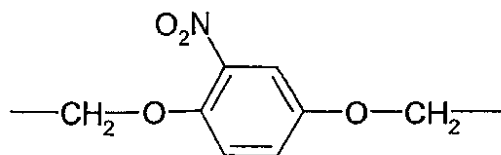
【化39】



1つの態様では、 R^L が、Q-支持体と呼ばれる、以下の基を示す。例えば、Ponett al., 1997 を参照のこと。

【0095】

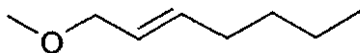
【化40】



1つの態様では、 R^L が、3'-アルキルカルボン酸と呼ばれる、以下の基を示す。例えば、Tracy et al., 1997 を参照のこと。

【0096】

【化41】



10

リンカー試薬の合成法は当技術分野で知られている。実際、リンカー試薬の多くは市販されている。

【0097】

好ましくは、リンカー試薬は、常圧（1気圧）と関連（relevant）温度、特に、固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程が実施される温度、及び／又は過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程が実施される温度、好ましくは後者の温度で液体であるように選択される。

【0098】

好ましくは、リンカー試薬は、関連温度で揮発化合物であるように選択される。本明細書で使用される「揮発」という用語は、関連温度で、好ましくは少なくとも10 Pa（約0.075 mmHg）、より好ましくは少なくとも100 Pa（約0.75 mmHg）、より好ましくは少なくとも1000 Pa（約7.5 mmHg）の実質蒸気圧を有する化合物（例、リンカー試薬）を記載する。

20

【0099】

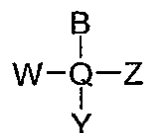
より好ましくは、リンカー試薬は、関連温度で揮発液体であるように選択される。

環式試薬

本明細書で使用される「環式試薬」という用語は、式：

【0100】

【化42】



30

{式中：

Qは、環式基を示し；

Bは、塩基性基を示し；

Wは、反応共役基を示し；

Yは、オリゴ合成基を示し；そして、

Zは、存在する場合、補助基を示す} の化合物に関する。

40

【0101】

環式基、Q

本明細書で使用される「環式基」という用語は、単一の非芳香環を有する部分に関し、この環は5～7の環原子を有し、この環原子は（a）すべて炭素原子である（この場合、この環は「炭素環式環」と呼ばれる場合がある）か、又は（b）炭素原子と、酸素、窒素、及びイオウから選択される1若しくは2つのヘテロ原子である（この場合、この環は「ヘテロ環式環」と呼ばれる場合がある）。

【0102】

50

環原子を結ぶ環結合は、単結合、二重結合、又は三重結合であり得るが、環そのものが芳香族であってはならない。1つの好ましい態様では、環結合が単結合又は二重結合である。1つの好ましい態様では、環結合がすべて単結合である。

【0103】

1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は5若しくは6つの環原子を有し、この環原子は(a)すべて炭素原子であるか、又は(b)炭素原子と、酸素、窒素、及びイオウから選択される1若しくは2つのヘテロ原子であり、すべての環結合が単結合である。

【0104】

1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は5若しくは6つの環原子を有し、この環原子は(a)すべて炭素原子であるか、又は(b)炭素原子と1つの酸素原子であり、すべての環結合が単結合である。 10

【0105】

1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は5つの環原子を有し、この環原子は(a)すべて炭素原子であるか、又は(b)炭素原子と1つの酸素原子であり、すべての環結合が単結合である。

【0106】

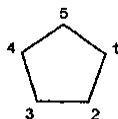
1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は6つの環原子を有し、この環原子は(a)すべて炭素原子であるか、又は(b)炭素原子と1つの酸素原子であり、すべての環結合が単結合である。 20

【0107】

1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は5つの環原子を有し、この環原子はすべて炭素原子であり、すべての環結合が単結合である。この場合、この環はシクロペンタン環である。

【0108】

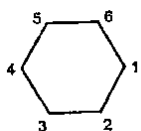
【化43】



1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は6つの環原子を有し、この環原子はすべて炭素原子であり、すべての環結合が単結合である。この場合、この環はシクロヘキサン環である。 30

【0109】

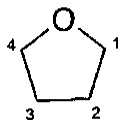
【化44】



1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は5つの環原子を有し、この環原子は炭素原子と1つの酸素原子であり、すべての環結合が単結合である。この場合、この環はテトラヒドロフラン環である。 40

【0110】

【化45】

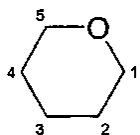


1つの好ましい態様では、環式基が単一の非芳香環を有し、この環は6つの環原子を有し 50

、この環原子は炭素原子と1つの酸素原子であり、すべての環結合が単結合である。この場合、この環はテトラヒドロピラン環である。

【0111】

【化46】



塩基性基のB、反応共役基のW、オリゴ合成基のY、及び補助基のZは、存在する場合、それぞれ個別に、直接的に（共有結合を介して）か又は間接的に（中間共有連結を介して）環式基Qの炭素環原子へ付く。中間共有連結の例には、限定されないが、 $-(CH_2)_n-$ （ここでnは1～4の整数である）、例えば $-CH_2-$ 及び $-CH_2CH_2-$ が含まれる。1つの好ましい態様では、これらの基は直接的に付く。

【0112】

1つの好ましい態様では、オリゴ合成基のYと、存在する補助基のZが、それぞれ直接的に、環式基Qの隣接した炭素環原子へ付く。1つの好ましい態様では、上記の基がcis配向で付く。

【0113】

環式基はまた、他の所望の置換基、即ち、B、W、Y、及びZ以外の置換基を有する場合がある。そのような所望の置換基の例には、限定されないが、 C_{1-7} アルキル基、 C_{1-7} アルコキシ基、及びアシル基が含まれる。

【0114】

塩基性基、B

塩基性基のBは、核酸塩基から誘導される。「核酸塩基」、「ヌクレオチド塩基」、及び「ヌクレオシド塩基」という用語は、本明細書では慣用的な意味で使用され、核酸中に典型的に見出されるような、プリン及びピリミジンの塩基とその誘導体及び類似体を意味する。

【0115】

好ましい核酸塩基には、よく知られた天然に存在するプリン：アデニン及びグアニンとピリミジン：シトシン、チミン、及びウラシルが含まれる。当技術分野で知られている核酸の他の例にはプリン及びピリミジンの誘導体及び類似体が含まれ、それには限定されないが、サルシン（sarcine）（ヒポキサンチン若しくはサルキンとしても知られている）、アジリジニルシトシン、4-アセチルシトシン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、 N^6 -イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、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、 N^6 -メチルアデニン、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-メトキシウラシル、2-メチルチオ- N^6 -イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、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、5-ペンチニルウラシル、及び2,6-ジアミノプリンが含まれる。

【0116】

1つの好ましい態様では、塩基性基のBが、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、及びサルシン（ヌクレオシドのイノシンに関連した塩基）からなる群から選択される核酸塩基、又はその保護化形態から誘導される。1つの好ましい態様では、塩基性部分のBが、サルシン又はその保護化形態から誘導される。

【0117】

環原子が慣用的にダッシュ（'）のつかない数（unprimed number）で数えられる塩基性部分のBは、好ましくは、塩基の環原子を介して環式試薬へ共有結合する。塩基は、好ましくは、塩基の環窒素原子を介して付く。ピリミジンでは、（N）－1位での付加が好ましいのに対し、プリンでは、（N）－9位での付加が好ましい。

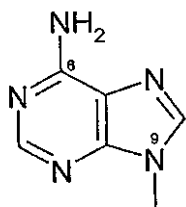
【0118】

1つの好ましい態様では、塩基性基のBが以下のもの又はその保護化形態から選択される：

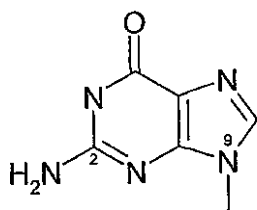
【0119】

【化47】

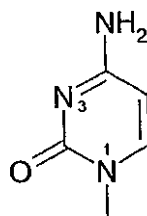
10



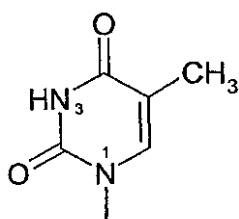
(アデニンから)



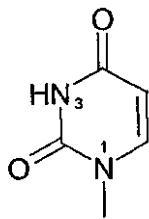
(グアニンから)



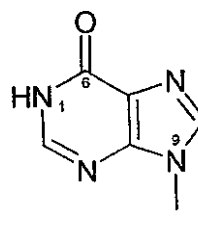
(シトシンから)



(チミンから)



(ウラシルから)



(サルシンから)

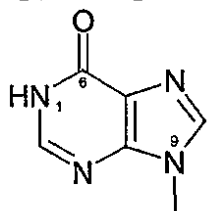
20

1つの好ましい態様では、塩基性基のBが以下のものであるか、又はその保護化形態である：

【0120】

【化48】

30



(サルシンから)

塩基性基のBの反応性官能基は、保護化又は非保護化の形態であり得る。そのような官能基の保護化形態は当技術分野でよく知られている。例えば、アデニン、グアニン、及びシトシンで見出されるような一級アミン（ $-NH_2$ ）は、アミド、例えば、イソブチルアミド又はベンズアミドとして保護化され得る。そのような保護化は、しばしばオリゴヌクレオチド合成の間に利用される。

40

【0121】

本明細書で使用される「保護化」という用語は、特定条件の下で他の利用可能な官能基に対してほとんど反応しない官能基を意味する。「官能基の保護化」という用語は、本明細書では慣用的な化学の意味で使用され、（pH、温度、放射線、溶媒、等のような）特定条件の下で、他のやり方では反応性になる官能基を可逆的に非反応性にするために利用される通常の化学的方法を意味する。そのような「保護化」、「ブロッキング」、又は「マスキング」の多種多様な方法が広く使用されていて、有機合成においてよく知られている。例えば、2つの同等でない反応性官能基を有し、その両方が特定条件の下では反応性に

50

なる化合物は、その官能基の一方を「保護化」、従って、特定条件の下で非反応性になるように誘導化し得て；このように保護化されると、その化合物は、有効にも1つだけの反応官能基を有する反応体として使用され得る。（他方の官能基が関与する）所望の反応が完了した後で、保護化された基を「脱保護化」して、その元の官能性へそれを戻すことが可能である。

【0122】

反応共役基、W

本明細書で使用される「反応共役基 (reactive conjugating)」という用語は、リンカー試薬の $-C(=O)X^2$ 基と反応して共有連結を形成することによって、それとコンジュゲートを形成する官能基を意味する。

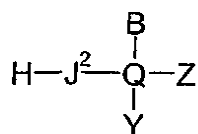
10

【0123】

好ましい態様では、反応共役基のWが $-J^2-H$ （ここで J^2 は $-O-$ 、 $-NH-$ 、又は $-S-$ である）であり、即ち、反応共役基のWは、それぞれ $-OH$ 、 $-NH_2$ 、又は $-SH$ である。この場合、環式試薬は、以下の式：

【0124】

【化49】



20

を有する。

【0125】

1つの好ましい態様では、反応共役基が $-OH$ 又は $-NH_2$ である。1つの好ましい態様では、反応共役基が $-OH$ である。

反応共役基が $-J^2-H$ である場合、 $-C(=O)X^2$ との反応時に形成される共有連結は $-C(=O)-J^2$ 、即ち、それぞれ、 $-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、及び $-C(=O)-S-$ である。

【0126】

以下に論じるように、反応共役基は、例えば、N-メチルイミダゾール (NMI) 及び／又は4-ジメチルアミノピリジン (DMAPI) のような塩基の存在により活性化され得る。そのような活性化は、反応共役基とリンカー試薬の $-C(=O)X^2$ 基との反応を促進する、及び／又は加速化する。

30

【0127】

オリゴ合成基、Y

本明細書で使用される「オリゴ合成基」という用語は、オリゴ合成を促進する官能基、又は保護化官能基、即ち、脱保護化及び／又は誘導化の形態である場合に好適なモノマーと反応し、所望のオリゴマーの成長を始動させる基を意味する。

【0128】

1つの態様では、オリゴ合成基のYが、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、又は $-SH$ であるか、又はその保護化形態である。1つの態様では、オリゴ合成基のYが $-OH$ であるか、又はその保護化形態である。

40

【0129】

1つの態様では、オリゴ合成基のYが保護化形態の $-OH$ 、 $-NH_2$ 、又は $-SH$ であり、これは、オリゴ合成において使用される脱保護化条件の下で脱保護化される。例えば、この基は、慣用的なオリゴヌクレオチド（例、ホスホロアミダイト）合成サイクル中の脱保護化工程で使用される条件の下で脱保護化され、このようにして、第一のヌクレオチドを付けるためのアンカーとして利用可能になる。典型的には、そして好ましくは、脱保護化工程は酸性条件を利用する。

【0130】

50

—OHを—ORとして保護する好適な保護基、Rの例には、限定されないが：t-ブチル（tBu）；

4-ジメトキシトリチル（MMT）；

4, 4'-ジメトキシトリチル（DMT）；

4, 4', 4''-tris-（ベンジルオキシ）トリチル（TBTr）；

4, 4', 4''-tris-（4, 5-ジクロロフタルイミド）トリチル（CPTr）；

4, 4', 4''-tris-（レブリニルオキシ）トリチル（TLTr）；

3-（イミダゾリルメチル）-4, 4'-ジメトキシトリチル（IDTr）；

9-フェニルキサンテン-9-イル（ピキシル）；

9-（p-メトキシフェニル）キサンテン-9-イル（Mox）；

4-デシルオキシトリチル（C₁₀Tr）；

4-ヘキサデシルオキシトリチル（C₁₆Tr）；

9-（4-オクタデシルオキシフェニル）キサンテン-9-イル（C₁₈Px）；及び、1, 1-bis-（4-メトキシフェニル）-1'-ピレニルメチル（BMPM）が含まれる。

【0131】

—NH₂を—NH—C（=O）—ORとして保護する、好適な保護基、—C（=O）ORの例には、限定されないが、tert-ブトキシカルボニル（—C（=O）—OC（CH₃）₃, t-Boc）；及び、ベンジルオキシカルボニル（—C（=O）—OCH₂Ph, CBZ）が含まれる。

【0132】

これらと他の好適な保護基については、例えば、Beaucage et al., 1992 に記載されている。

補助基、Z

本明細書で使用される「補助基」という用語は、場合により選択され、存在する場合、官能基、より好ましくは、保護化官能基である基を意味する。1つの態様では、補助基が保護化され、慣用的な（例、ホスホロアミダイト）オリゴヌクレオチド合成の間は安定していて、合成の後では、切り離しと同時に、即ち、慣用的な切り離し条件の下で脱保護化される。このように、保護化形態の補助基は、典型的には、保護化形態のオリゴ合成基と異なる。なぜなら、前者がオリゴ合成の間安定しているのに対し、後者は、オリゴ合成の1つ以上の工程の間、脱保護化されているか又は脱保護化の形態であるからである。

【0133】

補助基のZは、保護化若しくは脱保護化の形態で、オリゴ合成基のYと相互作用する、及び／又はそれと一緒に官能基を形成する。

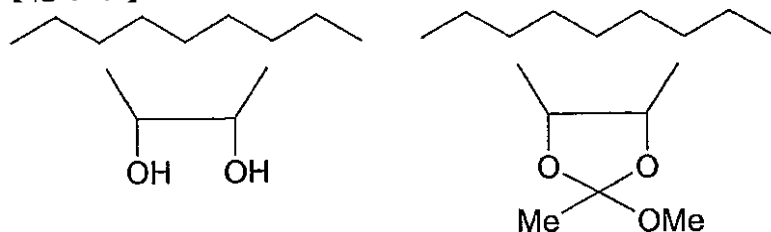
1つの態様では、補助基のZが—OH、—NH₂、又は—SHであるか、又はその保護化形態である。1つの好ましい態様では、補助基が—OH又はその保護化形態である。

【0134】

1つの好ましい態様では、補助基のZとオリゴ合成基のYの両方が、脱保護化形態では—OHであり、そして保護化形態では、以下に示されるように、一緒にO—O—メトシキエチリデン基と環式構造の一部を形成する：

【0135】

【化50】



1つの好ましい態様では、補助基が脱保護化形態で $-OH$ であり、保護化形態で $-OR$ である（ここで、 R は、アシル基、 $C_1 - 7$ アルキル基、又はシリル基である）。

【0136】

1つの好ましい態様では、補助基が、脱保護化形態では $-OH$ であり、保護化形態では $-OR$ である（ここで、 R はアシル基である）。

本明細書で使用される「アシル基」という用語は、式 $-C(=O)R$ の部分に関し、ここで、 R はアシル置換基、例えば $C_1 - 7$ アルキル基（ $C_1 - 7$ アルキルアシルと呼ばれる基になる）、 $C_3 - 20$ ヘテロシクリル基（ $C_3 - 20$ ヘテロシクリルアシルと呼ばれる基になる）、又は $C_5 - 20$ アリール基（ $C_5 - 20$ アリールアシルと呼ばれる基になる）、好ましくは $C_1 - 7$ アルキル基である。アシル基の例には、限定されないが、 $-C(=O)CH_3$ （アセチル）、 $-C(=O)CH_2CH_3$ （プロピオニル）、 $-C(=O)CH_2CH_2CH_3$ （ n -ブタノイル）、 $-C(=O)C(CH_3)_3$ （ t -ブタノイル）、及び $-C(=O)Ph$ （ベンゾイル）が含まれる。

【0137】

本明細書で使用される「 $C_1 - 7$ アルキル基」という用語は、脂肪族若しくは脂環式、又はその組合せであり得て、飽和、一部不飽和、又は完全不飽和であり得る、1～7の炭素原子を有する一価のアルキル基に関する。

【0138】

飽和直鎖 $C_1 - 7$ アルキル基の例には、限定されないが、メチル、エチル、 n -プロピル、 n -ブチル、及び n -ペンチル（アミル）が含まれる。

飽和分岐鎖 $C_1 - 7$ アルキル基の例には、限定されないが、イソプロピル、イソブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、及び neo -ペンチルが含まれる。

【0139】

飽和脂環式（炭素環式） $C_1 - 7$ アルキル基（「 $C_3 - 7$ シクロアルキル」基とも呼ばれる）の例には、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、及びシクロヘキシル、並びに、そのような基を含む基が含まれ、限定されないが、シクロプロピルメチル及びシクロヘキシルメチルが含まれる。

【0140】

1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する不飽和 $C_1 - 7$ アルキル基（「 $C_2 - 7$ アルケニル」基とも呼ばれる）の例には、限定されないが、エテニル（ビニル）及び2-プロペニル（アリル）が含まれる。

【0141】

1つ以上の炭素-炭素三重結合を有する不飽和 $C_1 - 7$ アルキル基（「 $C_2 - 7$ アルキニル」基とも呼ばれる）の例には、限定されないが、エチニル及び2-プロピニル（プロパルギル）が含まれる。

【0142】

1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する不飽和脂環式（炭素環式） $C_1 - 7$ アルキル基（「 $C_3 - 7$ シクロアルケニル」基とも呼ばれる）の例には、限定されないが、シクロプロペニル及びシクロヘキセニル、並びに、そのような基を含む基が含まれ、限定されないが、シクロプロペニルメチル及びメチルシクロヘキセニルメチルが含まれる。

【0143】

本明細書で使用される「 $C_3 - 20$ ヘテロシクリル」という用語は、脂環式（即ち、非芳香環式）化合物の環原子から水素原子を除去することによって得られる一価部分に関し、前記化合物は、3～20の環原子（このうち1～10は環ヘテロ原子であって、限定されないが、窒素、酸素、及びイオウが含まれる）を有する、1つの環、又は2以上の環（例、スピロ、縮合、ブリッジ）を有する。好ましくは、それぞれの環は3～7の環原子を有し、そのうち1～4は環ヘテロ原子である。「 $C_3 - 20$ 」は、炭素原子であれ、ヘテロ原子であれ、環原子を示す。

【0144】

1つの窒素環原子を有する $C_3 - 20$ ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、アジ

リジン、アゼチジン、ピロリジン、ピロリン、ピロリニン、ピペリジン、ジヒドロピリジン、及びテトラヒドロピリジンから誘導されるものが含まれる。

【0145】

1つの酸素環原子を有する C_{3-20} ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、オキシラン、オキセタン、オキソラン（テトラヒドロフラン）、オキソール（ジヒドロフラン）、オキサン（テトラヒドロピラン）、ジヒドロピラン、及びピランから誘導されるものが含まれる。

【0146】

1つのイオウ環原子を有する C_{3-20} ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、チオラン及びテトラヒドロチオピランから誘導されるものが含まれる。

10

2つの酸素環原子を有する C_{3-20} ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、ジオキサンから誘導されるものが含まれる。

【0147】

2つの窒素環原子を有する C_{3-20} ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、イミダゾリジン、イミダゾリン、及びピペラジンから誘導されるものが含まれる。

【0148】

1つの窒素環原子と1つの酸素環原子を有する C_{3-20} ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、テトラヒドロオキサゾール、ジヒドロオキサゾール、テトラヒドロイソオキサゾール、ジヒドロイソオキサゾール、モルホリン、テトラヒドロオキサジン、及びジヒドロオキサジンから誘導されるものが含まれる。

20

【0149】

1つの酸素環原子と1つのイオウ環原子を有する C_{3-20} ヘテロシクリル基の例には、限定されないが、オキサチオラン及びオキサチアンが含まれる。

本明細書で使用される「 C_{5-20} アリール」という用語は、芳香族化合物（ C_{5-20} アレーン）の環原子から1つの水素原子を除去することによって得られる一価部分に関し、前記化合物は、1つの環、又は2以上の縮合環を有し、5～20の環原子を有する。この環原子は、「カルボアリール基」のようにすべて炭素原子であり得るか、又は、「ヘテロアリール基」のように、1つ以上のヘテロ原子（限定されないが、酸素、窒素、及びイオウを含む）を含む場合がある。後者の場合、この基は、好便にも「 C_{5-20} ヘテロアリール」基と呼ばれ、ここで「 C_{5-20} 」は、炭素原子であれ、ヘテロ原子であれ、環原子を示す。好ましくは、それぞれの環は3～7の環原子を有し、その0～4つは環ヘテロ原子である。

30

【0150】

ヘテロ原子を有さない C_{5-20} アリール基（即ち、カルボアリール基）の例には、限定されないが、フェニル、ナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、及びピレンが含まれる。

【0151】

C_{5-20} ヘテロアリール基の例には、限定されないが、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル、フラニル、チエニル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピラニル、ピロニル、ベンゾピロニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、オキサトリアゾリル、オキサチアゾリル、及びオキサチアジニルが含まれる。

40

【0152】

本明細書で使用される「シリル基」という用語は、式 $-SiR_3$ の部分に関し、ここで R はシリル置換基であって、例えば、 $-H$ 、 C_{1-7} アルキル基、 C_{3-20} ヘテロシクリル基、又は C_{5-20} アリール基、好ましくは、 $-H$ 、 C_{1-7} アルキル基、又は C_{5-20} アリール基である。シリル基の例には、限定されないが、 $-SiH_3$ 、 $-SiH_2(CH_3)$ 、 $-SiH(CH_3)_2$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-Si(t-Bu)(CH_3)_2$ 、 $-Si(i-Pr)_3$ 、及び $-Si(t-Bu)_3$ が含まれる。

【0153】

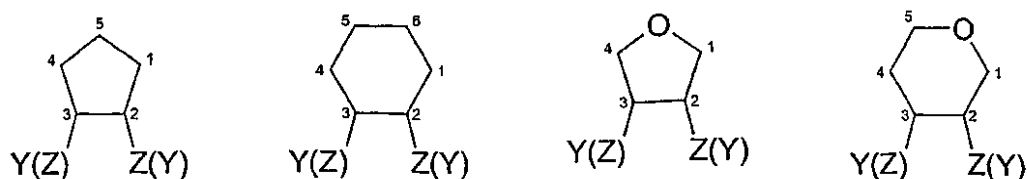
50

環式試薬の例

1つの好ましい態様では、オリゴ合成基のYと所望の補助基のZが共有結合により環式基のQへ直接的に連結し、「隣接」位置にある（即ち、YとZが、環式基Qの隣接した炭素環原子へ付いている）。隣接して付いたY及びZの基を有する環式部分、Qの例には、限定されないが、以下のものが含まれる：

【0154】

【化51】



10

「Y(Z)」と「Z(Y)」という表記は、4つの可能性のすべてを示す： $3' - Y - 2' - Z$ ； $3' - Z - 2' - Y$ ； $3' - Y - 2' - H$ （ここでZは不在である、即ち、Zは-Hである）；及び $3' - H - 2' - Y$ （ここでZは不在である、即ち、Zは-Hである）。

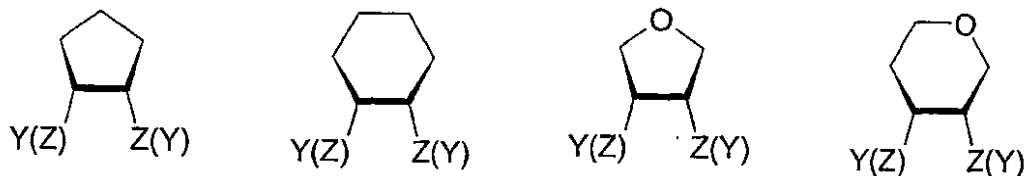
【0155】

1つの好ましい態様では、Y及びZ基が「cis」にも位置づけられる。cisで隣接して付いているY及びZ基（いずれも環の「下」にある）を有するそのような環式部分のQの例には、限定されないが、以下のものが含まれる：

20

【0156】

【化52】

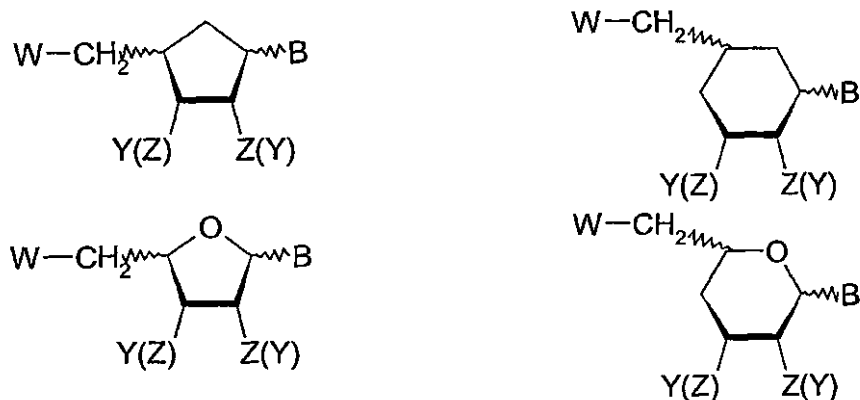


1つの好ましい態様では、W基が $-CH_2-$ 基により環式基のQへ共有連結し、B基が環式部分のQへ直接的に連結される。そのような環式試薬の例には、限定されないが、以下のものが含まれる：

30

【0157】

【化53】



40

1つの態様では、環式試薬が単糖の糖に類似する。環式形態の糖は、環原子の数に従って慣用的に命名される。例えば、フラノースは5員環を有し、ピラノースは6員環を有する。糖はまた、慣用的に全体の炭素原子数に従っても命名される。例えば、ペントースは5つの炭素原子を有し、ヘキソースは6つの炭素原子を有する。環式形態の糖は、慣用的に

50

、炭素原子の数と環置換基の配向の両方に従って、リボ (ribo) -、リキソ (lyxo) -、キシロ (xylo) -、ガラクト (galacto) -、スクロ (sacro) -、フルクト (fructo) -、及びアラビノ (arabino) - のような頭字語を使用してさらに命名される。さらに、糖は、その鏡像異性、ジアステレオ異性、又は立体異性の形態 (例、D-、L-、 α -、 β -、及びその組合せ) のいずれでもあり得る。

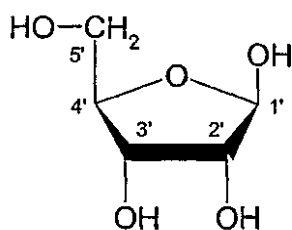
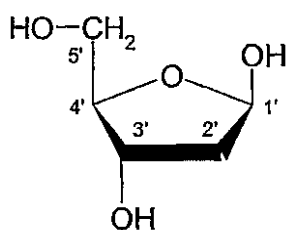
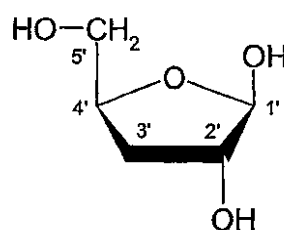
【0158】

1つの好ましい態様では、環式試薬が β -D-リボフラノース (β -D-リボースとも呼ばれる)、2'-デオキシ- β -D-リボフラノース (2'-デオキシ- β -D-リボースとも呼ばれる)、又は3'-デオキシ- β -D-リボフラノース (3'-デオキシ- β -D-リボースとも呼ばれる) に類似し、それらは以下の構造を有する：

10

【0159】

【化54】

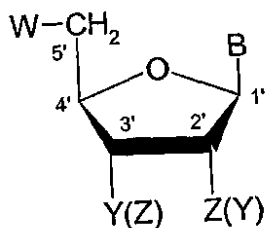
 β -D-リボース2'-デオキシ- β -D-リボース3'-デオキシ- β -D-リボース

20

このように、1つの好ましい態様では、環式試薬が以下の構造を有する。Zが存在する場合、この化合物は、 β -D-リボヌクレオシドである。Zが不在である (即ち、Zが-Hである) 場合、この化合物は、2'-デオキシ- β -D-リボヌクレオシドである。

【0160】

【化55】

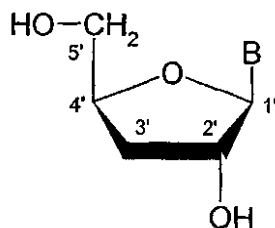
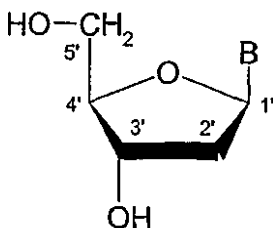
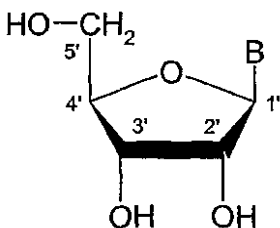


30

1つの好ましい態様では、以下の構造に示されるように、例えば、Wが-OHであり、Yが-OHであるか又はその保護化形態であり、Zが、存在する場合、-OHであるか又はその保護化形態である：

【0161】

【化56】



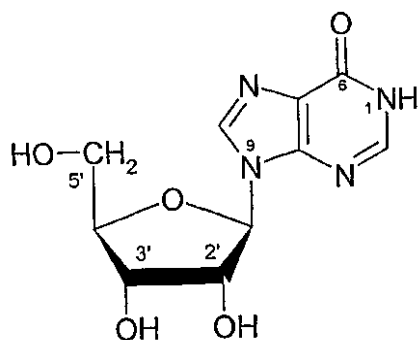
40

1つの好ましい態様では、環式試薬が、以下に示されるように、イノシンであるか又はその保護化形態である。

【0162】

【化57】

50

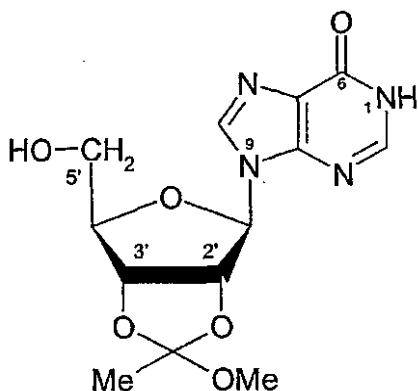


10

1つの好ましい態様では、環式試薬が、以下に示されるように、イノシン誘導体の9-β-D-(2'-3'-O-O-メトキシエチリデン-リボフラノシル)ヒポキサンチンであり、ここでは、2'-及び3'-ヒドロキシル基がO-O-メトキシエチリデン基としてともに保護されている。

【0163】

【化58】



20

反応装置

上記に述べたように、固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造の1工程は、例えば蒸発装置を使用して達成され得るように、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程を伴う。

30

【0164】

このように、1つの態様では、本方法の1つ以上の工程が、蒸発装置を使用して（即ち、その内部で）実施される。1つの態様では、ともかくも、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程が蒸発装置を使用して実施される。

【0165】

1つの態様では、ともかくも、固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程と過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程が、蒸発装置を使用して実施される。

【0166】

1つの態様では、ともかくも、固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程、そして前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる工程が蒸発装置を使用して実施される。

40

【0167】

もう1つの態様では、本方法のすべての工程が蒸発装置を使用して実施される。

本明細書で使用される「蒸発装置」という用語は、気密の無水条件（例、乾燥空気、乾燥窒素、乾燥アルゴンのような乾燥気体下の密閉環境）と、1つ以上の反応混合物の成分（例、試薬、生成物、副生成物、溶媒、等）、特に過剰なリンカー試薬の蒸発除去の両方を促進する、本方法の諸工程のような化学反応を行なうのに適した任意の装置に関する。

【0168】

50

好適な装置の例には、限定されないが、回転蒸発装置と蒸留装置が含まれる。1つの好ましい態様では、この装置が回転蒸発装置、例えば、B u c h i（登録商標）からのM o d e l R - 1 1 4である。

【0169】

支持体のリンカー試薬との反応

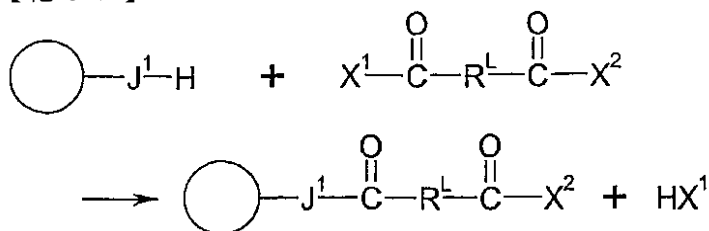
上記のように、固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造の1つの工程は、「活性化」工程、つまり、固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる工程により、付帯リンカー基を形成させる工程を伴う。

【0170】

この反応の例は以下に示される。

【0171】

【化59】



一般に、リンカー試薬は水に対して反応性であり、このことは二ハロゲン化オキサリルに対して特に当てはまる（ここで、 R^L は共有結合である）。従って、リンカー試薬の分解を回避するために、例えば蒸発装置を使用することによって達成され得るように、活性化工程は、好ましくは無水条件下、例えば、密閉された気密環境において、乾燥気体（乾燥空気、乾燥窒素、乾燥アルゴン）下で実施される。より無水の条件を使用すると、より高い収率が得られる。

【0172】

上記のように、固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造の1つの工程は、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する工程を伴う。

【0173】

本明細書で使用される「蒸発」という用語は、反応混合物の成分（例、試薬、生成物、副生成物、溶媒、等）が所望される生成物から、気体若しくは蒸気として、気体若しくは蒸気の相を介して除去されることに関する。

【0174】

好ましくは、リンカー試薬は、関連温度で揮発性の化合物、より好ましくは揮発性の液体であるように選択される。リンカー試薬がそのように選択されると、過剰なリンカー試薬は、蒸発により、例えば、減圧及び／又は上昇温度の適用により反応混合物から容易に除去され得る。このやり方では、追加の精製が必要とされないもので、このことにより、他のやり方では望ましくない副反応及び副生成物をもたらしてしまう、過剰な活性化剤（例、リンカー試薬）を除去するための個別の、集中的で、しばしば時間の浪費となる精製工程を必要とする方法に優る実質的な利点が提供される。例えば、先行技術の方法では、固形支持体の活性化と後続の始動化合物（例、環式試薬）との反応との間に、又は、始動化合物の活性化と後続の固形支持体との反応との間に、個別の精製工程が必ず必要になる。

【0175】

このように、1つの態様では、蒸発が減圧及び／又は上昇温度の適用により達成される。1つの好ましい態様では、蒸発が減圧の適用により達成される。1つの好ましい態様では、蒸発が上昇温度の適用により達成される。

【0176】

1つの態様では、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を除去する工程が、蒸発だけで、即ち、蒸発により、そして、濾過、吸い取り、洗浄（例、1つ以上の溶媒若しくは溶媒混合物を用いる）、乾燥（例、 MgSO_4 で）、溶媒分画（例、2つ以上の溶媒若し

10

20

30

40

50

くは溶媒混合物の間で)、粉碎、又はクロマトグラフィー(例、カラムクロマトグラフィー)のような他の非蒸発性の精製法を使用せずに、達成される。

【0177】

1つの態様では、蒸発により(又は蒸発によるだけで)過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を除去する工程が、過剰な未反応リンカー試薬の実質的な部分、好ましくは過剰な未反応リンカーの少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%を除去することを伴う。

【0178】

1つの態様では、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を除去する工程が、蒸発により(又は、蒸発によるだけで)、そしてさらに、例えば、共蒸発法で使用されるような溶媒若しくは共溶媒(例、ピリジン、メタノール)の追加をせずに達成される。 10

【0179】

1つの態様では、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を除去する工程が、蒸発により(又は、蒸発によるだけで)、そしてさらに、例えば、乾燥法で使用されるような乾燥剤(例、 P_2O_5)の使用を伴わずに達成される。

【0180】

好ましくは、固形支持体は、例えばオープン(例、100℃で30分)での乾燥によって達成され得るように、使用前に実質的に乾燥している。

好適な試薬の相対量と反応条件(例、温度、時間、等)は、当業者により容易に決定され得る。 20

【0181】

1つの好ましい態様では、各100gの固形支持体について約100~約1500mLのリンカー化合物が、より好ましくは約200~約1000mLのリンカー化合物が、より好ましくは約300~約800mLのリンカー化合物が使用される。

【0182】

1つの好ましい態様では、この反応が約0℃~約100℃、より好ましくは約20℃~約100℃の反応温度で行なわれる。

1つの好ましい態様では、この反応が約1~約240分、より好ましくは約5~約120分の反応時間で行なわれる。 30

【0183】

所望のキャッピング

上記のように、固相オリゴヌクレオチド合成での使用に適した固形支持体の製造には、場合により、付帯官能基についての「キャッピング工程」が含まれる。

【0184】

このように、1つの態様では、本方法は、固形支持体の付帯官能基をリンカー試薬と反応させる前記工程の後か、又は、過剰な未反応リンカー試薬の少なくとも一部を蒸発により除去する前記工程の後で：

(i) 前記固形支持体の残存する付帯官能基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化官能基を形成させる工程をさらに含む。 40

【0185】

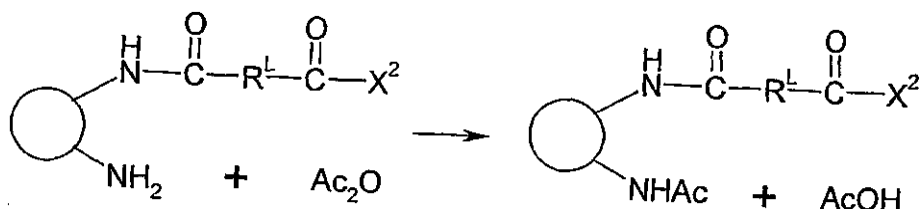
固形支持体の付帯官能基のリンカー試薬との反応に続き、所望の「キャッピング」工程が実施される場合があるが、ここでは「未使用の」付帯官能基(即ち、リンカー試薬と反応していない付帯官能基)が保護化か又は他の未反応性の形態へ変換される。

【0186】

例えば、付帯官能基が $-NH_2$ である場合、以下の反応に示されるように、無水酢酸(Ac_2O , $CH_3C(=O)-O-C(=O)CH_3$)が使用され得る。

【0187】

【化60】



他の好適なカップリングの試薬及び条件は当技術分野でよく知られていて、適宜使用され得る。

【0188】

付帯官能基が $-\text{OH}$ である場合、好適なカップリング試薬の例には、限定されないが、無水物とエステルが含まれる。

付帯官能基が $-\text{SH}$ である場合、好適なカップリング試薬の例には、限定されないが、ハロアセトアミドが含まれる。

【0189】

1つの好ましい態様では、カップリング試薬が室温又はその付近で揮発性の液体であるように選択され、そのため、過剰なカップリング試薬は、そしておそらくはカップリング副生成物も、過剰なリンカー試薬について上記に記載されたように、蒸発により除去され得る。

【0190】

好適な試薬の相対量と反応条件（例、温度、時間、等）は、当業者により容易に決定され得る。

1つの好ましい態様では、各100gの固形支持体について、カップリング試薬として約10～約200mLの無水酢酸と、約1～約20mLのN-メチルイミダゾール（NMI）、及び／又は約0.5～約2gの4-ジメチルアミノピリジン（DMAPI）が使用される。1つの好ましい態様では、各100gの固形支持体について、カップリング試薬として約20～約100mLの無水酢酸と、約2～約10mLのN-メチルイミダゾール（NMI）、及び／又は約1gの4-ジメチルアミノピリジン（DMAPI）が使用される。

【0191】

1つの好ましい態様では、この反応が約 0°C ～約 60°C 、より好ましくは約 20°C ～約 40°C の反応温度で行なわれる。

1つの好ましい態様では、この反応が約1～約60分、より好ましくは約2～約30分の反応時間で行なわれる。

【0192】

リンカーの環式試薬との反応

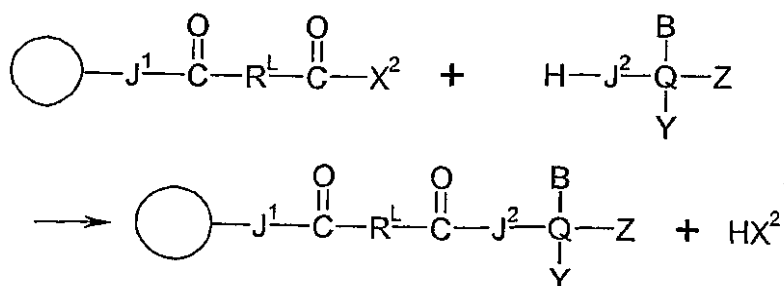
上記のように、固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造の1つの工程は、「カップリング」工程、即ち、付帯リンカー基を環式試薬と反応させる工程により、付帯環式基を形成させる工程を伴う。

【0193】

この反応（ここで、反応共役基のWは $-\text{J}^2-\text{H}$ であって、 J^2 は $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ であり、即ち、Wは $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、又は $-\text{SH}$ である）の例を以下に示す：

【0194】

【化61】



反応共役基は、例えば、N-メチルイミダゾール (NMI) 及び／又は4-ジメチルアミノピリジン (DMA P) のような塩基の存在により活性化され得る。そのような活性化は、反応共役基とリンカー試薬の $-C(=O)X^2$ 基との反応を促進する、及び／又は加速化する。この塩基はまた、リンカー試薬の $-C(=O)X^2$ 基との反応により発生する HX^2 (例、 HCl 、 HBr 、 HI) と結びつく場合がある。そのような塩基の例には、限定されないが、水性 $NaOH$ 、水性 KOH 、ピリジン、ジメチルアミノピリジン (DMA P)、及びN-メチルイミダゾール (NMI) が含まれる。

【 0 1 9 5 】

好適な試薬の相対量と反応条件（例、温度、時間、等）は、当業者により容易に決定され得る。

1つの好ましい態様では、各100gの固形支持体について、約200～約600mLのピリジン中の約5～約8gの環式試薬と、約20～約60mLのN-メチルイミダゾール（NMI）が使用される。1つの好ましい態様では、各100gの固形支持体について、約300～約500mLのピリジン中の約6～約7gの環式試薬と、約30～約50mLのN-メチルイミダゾール（NMI）が使用される。

【 0 1 9 6 】

1つの好ましい態様では、この反応が約0℃～約60℃、より好ましくは約20℃～約40℃の反応温度で行なわれる。

1つの好ましい態様では、この反応が約5～約60分、より好ましくは約10～約30分の反応時間で行なわれる。

【 0 1 9 7 】

所望のキャッピング

上記のように、固相オリゴヌクレオチド合成での使用に適した固形支持体の製造には、場合により、付帯リンカー基の「キャッピング工程」が含まれる。

【 0 1 9 8 】

このように、1つの態様では、本方法は、前記付帯リンカー基を環式試薬と反応させる前記工程の後で：

(i) 前記固形支持体の残存する付帯リンカー基の少なくとも一部をキャッピング試薬と反応させる工程により、付帯キャップ化リンカー基を形成させる工程をさらに含む。

【 0 1 9 9 】

付帯リンカー基の環式試薬との反応に続き、所望の「カップリング」工程が実施される場合があるが、ここでは「未使用の」付帯リンカー基（即ち、環式試薬と反応していない付帯リンカー基）が保護化か又は他の未反応性の形態へ変換される。

【 0 2 0 0 】

好適なキャッピングの試薬及び条件の例は、上記に記載されている。

所望の精製

上記のように、固相オリゴ合成での使用に適した固形支持体の製造には、場合により、過剰な未反応環式試薬、カップリング試薬（適用可能ならば）、及びそれらの副生成物の少なくとも一部を除去する工程が含まれる。

【 0 2 0 1 】

この除去を実施するには、任意の好適な方法を使用してよい。1つの好ましい態様では、

この除去は、例えば、フリット化ガラス漏斗、例えば E l v e t e c（登録商標）からの R O B U - P O R - 2（登録商標）を使用する濾過により達成される。

【0202】

本発明の好ましいクラスの普遍固形支持体の製造を図示する化学スキームを図1に示す。これには、所望の最終脱保護化工程が含まれ、これは典型的にはオリゴヌクレオチド合成の第一工程である。

【0203】

実施例に記載される普遍固形支持体の製造を図示する化学スキームを図2に示す。これには、所望の最終脱保護化工程が含まれ、これは典型的にはオリゴヌクレオチド合成の第一工程である。

10

【0204】

普遍固形支持体

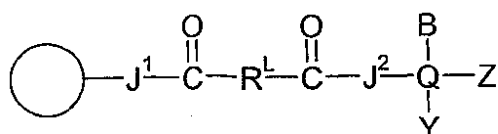
上記のように、本発明の1つの側面は、例えば、本明細書に記載の方法により製造されるような普遍固形支持体に関する。

【0205】

1つの態様では、普遍固形支持体は以下の式：

【0206】

【化62】



20

（式中、 J^1 、 J^2 、 R^L 、 Q 、 B 、 Y 、及び Z は、本明細書に定義される通りである）を有する。

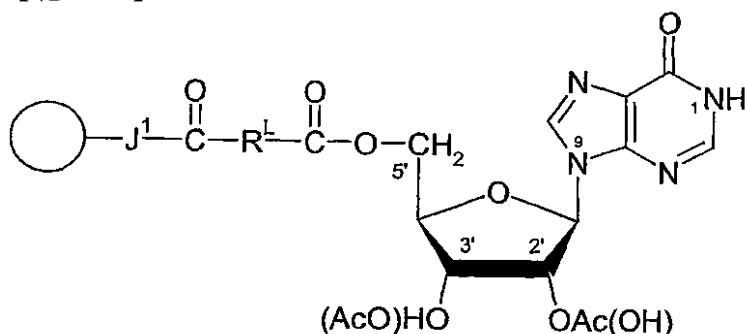
【0207】

1つの好ましい態様では、普遍固形支持体が以下のものであるか、又はその保護化形態であって、ここで J^1 と R^L は本明細書に定義される通りであるか、又はより好ましくは、 J^1 は $-NH-$ であり、 R^L は $-(CH_2)_n-$ であって、ここで n は、0～10の整数である：

30

【0208】

【化63】

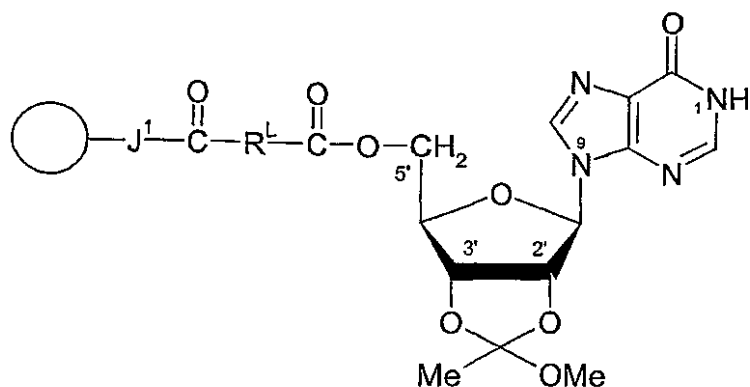


40

1つの好ましい態様では、普遍固形支持体が以下のものであって、ここで J^1 と R^L は本明細書に定義される通りであるか、又はより好ましくは、 J^1 は $-NH-$ であり、 R^L は $-(CH_2)_n-$ であって、ここで n は、0～10の整数である：

【0209】

【化64】

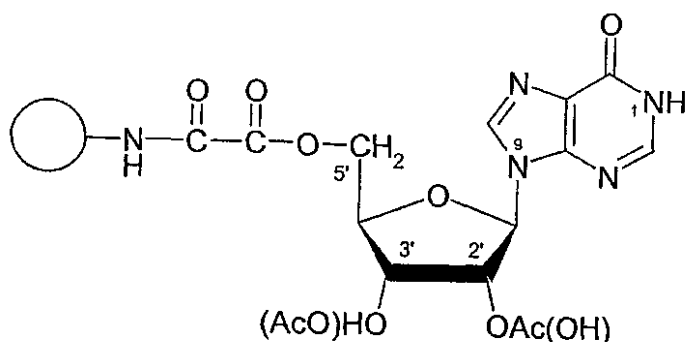


10

1つの好ましい態様では、普遍固形支持体が以下のものであるか、又はその保護化形態である：

【0210】

【化65】

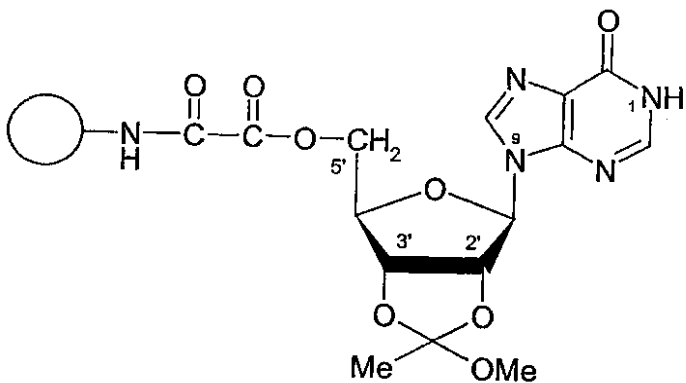


20

1つの好ましい態様では、普遍固形支持体が以下のものである：

【0211】

【化66】



30

オリゴヌクレオチド

40

本明細書で使用されるように、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、慣用的な意味で相互交換可能的に使用され、2つ（即ち、2-マー）又はそれより多い（即ち、n-マー）ヌクレオシドを含んでなる分子を意味し、それぞれのヌクレオシドは、ヌクレオシド間連結により少なくとも1つの他のヌクレオシドへ連結している。

「ヌクレオシド」という用語は、本明細書では慣用的な意味で使用され、「核酸塩基」（例、プリン、ピリミジン）へ連結した「糖」部分（例、リボース、2'-デオキシリボース）を含んでなる化合物を概して意味する。リボースとアデニン、グアニン、ウラシル、及びシトシンから形成される、よく知られたヌクレオシドの例は、それぞれ、「リボヌクレオシド」、即ち、アデノシン、グアノシン、ウリジン、及びシチジンである。デオキシリボースとアデニン、グアニン、チミン、及びシトシンから形成される、よく知られたヌ

50

クレオシドの例は、それぞれ、「デオキシリボヌクレオシド」、即ち、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、及びデオキシシチジンである。よく知られたヌクレオシド間連結の例には、リン酸ジエステル基、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-$ ；リン酸トリエステル基、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}')\text{O}-$ ；亜リン酸ジエステル基、 $-\text{OP}(\text{OH})\text{O}-$ ；亜リン酸トリエステル基、 $-\text{OP}(\text{OR}')\text{O}-$ ；及びホスホン酸基、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{R})\text{O}-$ が含まれる。

【0212】

オリゴヌクレオチドは、好便にも、「ヌクレオチド」ポリマー、即ち、ヌクレオチドモノマー単位からなるポリマーであるとみなされ得る。オリゴヌクレオチドは、線状、分岐、又は環式であり得るが、典型的には線状である。「ヌクレオチド」という用語は、慣用的にヌクレオシドのリン酸エステル、つまり、リン酸基（即ち、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、ここでそれぞれのRは、独立して、 $-\text{H}$ 、カチオン、又は有機基であり得る）、糖部分、及び核酸塩基を含んでなる化学部分を意味する。リボースとアデニン、グアニン、ウラシル、及びシトシンから形成される、よく知られたヌクレオチドの例は、それぞれ、「5'（若しくは3'）-リボヌクレオチド」、即ち、アデノシン5'（若しくは3'）-一リン酸、グアノシン5'（若しくは3'）-一リン酸、ウリジン5'（若しくは3'）-一リン酸、及びシチジン5'（若しくは3'）-一リン酸である。デオキシリボースとアデニン、グアニン、チミン、及びシトシンから形成される、よく知られたヌクレオチドの例は、それぞれ、「5'（若しくは3'）-2'-デオキシリボヌクレオチド」、即ち、デオキシアデノシン5'（若しくは3'）-一リン酸、デオキシグアノシン5'（若しくは3'）-一リン酸、デオキシチミジン5'（若しくは3'）-一リン酸、及びデオキシシチジン5'（若しくは3'）-一リン酸である。

10

20

【0213】

デオキシリボ核酸（DNA）とリボ核酸（RNA）は重要なオリゴヌクレオチドの例である。これらのオリゴヌクレオチドでは、すべてのヌクレオシド間ブリッジがリン酸ジエステル連結（ $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-$ ）であり、一様に5'-3'配向である。DNAが、核酸塩基のアデニン、グアニン、シトシン、及びチミンを主に含むデオキシリボヌクレオチドのポリマーであるのに対し、RNAは、核酸塩基のアデニン、グアニン、シトシン、及びウラシルを主に含むリボヌクレオチドのポリマーである。慣用上、単純なリボース及びデオキシリボヌクレオチドとそのポリマーは、オリゴヌクレオチドの5'末端からオリゴヌクレオチドの3'末端へ列挙されるその塩基（即ち、それぞれA、G、C、及びU；又はdA、dG、dC、及びT（又はdT））により表示され、ここで「d」は、デオキシリボヌクレオチドを示す。（チミジンはしばしば「デオキシチミジン」と呼ばれ、「dT」と省略されることに注意すること）。例えば、dGTは、デオキシグアノシンとデオキシチミジンから形成されるジヌクレオチドであって、ここではデオキシグアノシンの5'位が5'-OHであり、デオキシグアノシンの3'位はリン酸ジエステル結合を介してチミジンの5'位へ連結していて、そしてチミジンの3'位が3'-OHである。

30

【0214】

普遍固形支持体を使用するオリゴ合成

普遍固形支持体は、保護化若しくは非保護化のオリゴ合成基のY、例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、又はその保護化形態を利用することが可能な固相オリゴ合成の任意の方法で使用され得る。例えば、普遍固形支持体は、固相オリゴヌクレオチド合成で使用され得る。

40

【0215】

典型的には、オリゴヌクレオチド合成法の第一工程は、官能化された固形支持体を酸処理して、第一のモノマー試薬との反応のために官能基（例、オリゴ合成基）を脱保護化することである。このように、オリゴ合成基のYが保護化形態である場合、それは、好ましくは、オリゴヌクレオチド合成サイクルで使用されるのと同じ酸処理により脱保護化される。

【0216】

50

固相オリゴヌクレオチド合成は、当初はリン酸トリエステル（「トリエステル法」）若しくは亜リン酸（亜リン酸法）の使用を利用した。相対的に安定なモノヌクレオチドホスホロアミダイトカップリング単位の発見（例えば、Beaucage et al., 1981 を参照のこと）に伴って、固相オリゴヌクレオチド合成が実践的で、一般的になった。典型的な固相オリゴヌクレオチド合成は、4つの工程（脱保護化、カップリング、キャッピング、及び酸化）を反復的に実施することを伴う。

【0217】

標準法は、オリゴヌクレオチドの5'方向（即ち、3→5）への段階合成を伴う。第一の工程（「脱保護化」）では、3'-O基を介して3'-末端で固形支持体へ付いている成長中のオリゴヌクレオチドが5'脱保護化され、反応基（即ち、5'-OH基）を提供する。例えば、5'-OH基は、しばしば、ピリジン中の4,4'-ジメトキシトリチルクロリド（DMT-Cl）との反応により保護化されて5'-O-DMT基を産生し、これは塩基性の条件では安定であるが、酸性の条件、例えば、ジクロロ酢酸（DCA）又はトリクロロ酢酸（TCA）の存在下では容易に脱保護化される。

10

【0218】

第二の工程（「カップリング」）では、5'脱保護化された支持化オリゴヌクレオチドが所望されるヌクレオチドモノマーと反応し、それ自身、5'保護化された3'-ホスホロアミダイトへはじめて変換される。例えば、5'-OH基は5'-ODMT基の形態で保護化され得て、3'-OH基は、 $-OP(OR')NR_2$ {ここでRは、例えば、イソプロピル基、 $-CH(CH_3)_2$ 、エチル基、 $-CH_2CH_3$ 、又はメチル基、 $-CH_3$ であり、R'は、例えば、 $-H$ （ホスホロアミダイトジエステルを産生する）、又は $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 β -シアノエチル基、 $-CH_2CH_2CN$ 、又は C_6H_4Cl （ホスホロアミダイトトリエステルを産生する）}のような3'-ホスホロアミダイトへ変換され得る。モノマーの3'-ホスホロアミダイト基は、成長するオリゴヌクレオチドの脱保護化5'-OH基と反応し、亜リン酸連結の5'- $OP(OR')O-3'$ を産生する。例えば、Caruthers et al., 1995 を参照のこと。

20

【0219】

成長するオリゴヌクレオチドのすべてが提供されるモノマーと反応するわけではないので、「成長」しなかったものは不完全なオリゴヌクレオチドを産生し、故に、さらなる合成から除去されなければならない。このことは、第三の工程（「キャッピング」）により達成され、ここでは、すべての残存-OH基（即ち、未反応5'-OH基）が、例えば、無水酢酸（ $CH_3C(=O)-O-C(=O)CH_3$ ）との反応により酢酸エステル（5'- $OC(O)CH_3$ ）の形態でキャップされる。場合によっては、この脱保護化工程が、以下に論じる酸化工程に先行するのではなく、それに後続することに注意すること。

30

【0220】

第四の工程（「酸化」）では、成長中のオリゴヌクレオチドの新たに形成された亜リン酸基（即ち、5'- $OP(OR')O-3'$ ）が、例えば、水性のヨウ素及びピリジンとの反応により、リン酸基（即ち、5'- $OP(=O)(OR')O-3'$ ）へ変換される。

【0221】

次いで、この四工程法を反復し得る。酸化の後で得られるオリゴヌクレオチドが依然として5'-保護化（例、5'-ODMT）のままであり、上記の第一の脱保護化工程での使用に準備されているからである。

40

【0222】

本発明の1つの好ましい普遍固形支持体ではじめる、ホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成法の第一サイクルを図示する例を図1に示す。

ホスホロアミダイト法について上記で詳しく論じてきたが、本明細書に記載の普遍固形支持体はまた、他の固相オリゴヌクレオチド合成法にも使用され得る。そのような方法の例には、限定されないが、H-ホスホネート法（亜リン酸法としても知られている；例えば、Froehler et al., 1990；Froehler et al., 1986 を参照のこと）；及びリン酸トリエステル法（例えば、Stec et al., 1

50

985; Gallo et al., 1986; Gait, 1984 を参照のこと)が含まれる。

【0223】

本明細書に記載の普遍固形支持体はまた他の固相オリゴ合成法でも使用され、オリゴヌクレオチドの誘導体及び類似体を産生し得る。そのような生成物の例には、限定されないが、3'-及び/又は5'-末端で様々な修飾を有するDNA及びRNA;オリゴヌクレオシドメチルホスホネート (Agarwal et al., 1987);ホスホロチオエート (Beaucage et al., 1990);ホスホロジチオエート (Bjergarde et al., 1991);DNA/RNAコポリマー;ホスホジエステル/ホスホロチオエートコポリマー;環式オリゴヌクレオチド (Wang et al., 1994);2'-O-メチルRNA (Sproat et al., 1989);ペプチド核酸を含有する生成物 (Nielson et al., 1994);及び、モルホリン型骨格修飾核酸 (Stirchak et al., 1989; Summerton et al., 1991)が含まれる。

10

【0224】

固形支持体からの切り離し

例えば、所望のオリゴヌクレオチドが得られたオリゴ合成の後で、それは、切り離し工程において、切り離し試薬での処理により固形支持体から切り離され得る。切り離し工程は、切り離し温度で、切り離しの時間、実施される。

【0225】

切り離し工程は、単一の速い工程において、以下の結果の1つ以上、好ましくはすべてを達成する：

20

(a)オリゴマーの固形支持体からの切り離し、より特定すると、リンカー基と環式基との間の結合の切り離し。

【0226】

(b)環式基のオリゴマーからの切り離し、より特定すると、リン酸とオリゴマーとの間の結合の切り離し。例えば、 β -脱離反応は、環式リン酸基の付いた環式基とフリーOH基の付いたオリゴマーを産生し得る。

【0227】

(c)存在する場合、リン酸トリエステル ($-OP(=O)(OR')O-$ 、ここでR'はHではない)のリン酸ジエステル ($-OP(=O)_2O-$)への変換。

30

【0228】

(d)存在する場合、ヌクレオチド塩基の易塩基性保護化アミノ基の脱保護化。例えば、アデニン、グアニン、及びシトシンの一級アミンがオリゴ合成の間にアミドとして保護化された場合、それらは脱保護化されてフリーのアミノ基を産生し得る。

【0229】

切り離し工程の2つの例を図2及び3に示す。図2では、オリゴマーが3'→5'方向へ成長するオリゴヌクレオチドであり、5'-O基を介して固形支持体へ付く。オリゴヌクレオチド切り離し生成物は5'-OH基を有する。図3では、オリゴマーが5'→3'方向へ成長するオリゴヌクレオチドであり、3'-O基を介して固形支持体へ付く。オリゴヌクレオチド切り離し生成物は3'-OH基を有する。

40

【0230】

切り離しは、オリゴヌクレオチドを担う普遍固形支持体を好適な切り離し試薬と接触させることによって達成される。1つの態様では、切り離し試薬が以下のものの1つ以上を含む：(a)三級アミン (NR_3)、(b)二級アミン (NHR_2)、(c)一級アミン (RNH_2)、及び(d)水酸化アンモニウム (NH_4OH)。

【0231】

好適な三級アミンの例には、限定されないが、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルピペリジン、及びN-メチルピロリジンが含まれる。好適な二級アミンの例には、限定されないが、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジイソプロピルアミン

50

、及びピペリジンが含まれる。好適な一級アミンの例には、限定されないが、メチルアミン、エチルアミン、及びn-プロピルアミンが含まれる。

【0232】

切り離し試薬中の(a)～(d)の相対量は、存在する場合、モルベースで例えば1%～99%と、かなり変化する可能性がある。当業者は、許容されるか又は最適な量を容易に決定することができる。

【0233】

1つの好ましい態様では、切り離し試薬が(i)三級アミン(NR_3)若しくは二級アミン(NHR_2)と(ii)一級アミン(RNH_2)若しくは水酸化アンモニウム(NH_4OH)の混合物を含む。

10

【0234】

1つの好ましい態様では、切り離し試薬がメチルアミンを含む。1つの好ましい態様では、切り離し試薬がメチルアミンと1つ以上の他の成分を含む。

好適な試薬の相対量と反応条件(例、温度、時間、等)は、当業者により容易に決定され得る。

【0235】

好ましくは、切り離し温度は室温より高い。1つの態様では、切り離し温度が30℃であるか又はそれより高い(例、30～100℃)。1つの態様では、切り離し温度が50℃であるか又はそれより高い(例、50～100℃)。1つの態様では、切り離し温度が60℃であるか又はそれより高い(例、60～100℃)。1つの態様では、切り離し温度が70℃であるか又はそれより高い(例、70～100℃)。1つの態様では、切り離し温度が80℃であるか又はそれより高い(例、80～100℃)。

20

【0236】

切り離し時間は、選択される切り離し試薬及び切り離し温度に従って変化する。典型的には、切り離し時間は15分～24時間である。約75℃の温度では、切り離し時間は約1時間である。

【0237】

上記で論じたように、1つの好ましい態様では、リンカー基の R^L が共有結合であり、リンカー試薬が二ハロゲン化オキサリルである。この態様では、生じるオキサリル連結が、(a)カルボニル基に隣接したエステル基により分与される高い反応性を有し、この位置付けに関連した立体電子効果の結果として、水酸化物、アンモニア、及び一級及び二級アミンのような求核体による切り離しをきわめて受けやすい；及び(b)慣用のDNA及びRNA合成で使用される三級アミン(例えば、ピリジン、ルチジン)に対して安定である、という点で特に有利である。

30

【0238】

ローディング

本発明の普遍固形支持体は高いローディング(負荷量)で製造され得る。1つの態様では、固形支持体が30 $\mu\text{mol/g}$ 以上のローディング(例、30～100 $\mu\text{mol/g}$)を有する。1つの態様では、固形支持体が40 $\mu\text{mol/g}$ 以上のローディング(例、40～100 $\mu\text{mol/g}$)を有する。1つの態様では、固形支持体が50 $\mu\text{mol/g}$ 以上のローディング(例、50～100 $\mu\text{mol/g}$)を有する。1つの態様では、固形支持体が40～70 $\mu\text{mol/g}$ のローディングを有する。

40

【0239】

【実施例】

以下の実施例は本発明を例示するためにのみ提供され、本明細書に記載されるような本発明の範囲を制限するものではない。

【0240】

普遍固形支持体を、以下に記載のように、そして図2の化学スキームに例示されるように製造した。

オープン乾燥(100℃、30分)したアミノプロピル-CPG(100g, 250 μmol)

50

ル／g, Cruachem (登録商標)) を、高速 (240 回転／分)、室温、減圧 (約 500 ミリバール) の下で、回転蒸発システム (R-114, Buchi (登録商標)) を使用して、2 リットルフラスコ中の 500 mL (727.7 g) の塩化オキサリル ($\text{ClC}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})\text{Cl}$, Aldrich (登録商標)) に懸濁させた。10 分後、この混合物を 120 分にわたり 100°C へ加熱した。約 2.5 時間後に過剰な塩化オキサリルを蒸発させ、乾燥した活性化 CPG (即ち、付帯リンカー基の付いた CPG) を得た。

【0241】

(b) 乾燥ピリジン及び (c) N-メチルイミダゾール中の (a) 2'-3'-O-O-メトキシエチリデンイノシンの新鮮な溶液 (400 mL, 6.7 g の (a); 360 mL の (b)、及び 40 mL の (c)) を使用直前に調製した。 10

【0242】

上記の溶液を、高速 (240 回転／分) 及び室温で、回転蒸発フラスコ中の活性化 CPG へ加えた。このスラリーを減圧 (約 500 ミリバール) 下で 20 分混合した。

【0243】

40 mL の無水酢酸 (イノシン誘導体の量の 10%) をこの混合物へ加え、減圧 (500 ミリバール) 下、高速 (240 回転／分) で 5 分間、この混合物をそのままにした。

【0244】

生じたビーズをフリット化ガラス漏斗で濾過し、ピリジン (2 x 300 mL) とアセトニトリル (2 x 300 mL) で数回洗浄した。このビーズを真空で (室温) 乾燥させ、真空下、4°C で保存した。 20

【0245】

このようにして 100 g の普遍 CPG を得た。この CPG のローディングを制御し、それが 60 μ mol/g であることを示した。

参考文献

本発明と本発明に関連する技術水準をより十分に記載して開示するために、数多くの特許及び公表文献が上記に引用される。これら参考文献のすべての引用を以下に提供する。これら参考文献のそれぞれは、本明細書において、参照によりそのまま本発明の開示へ組込まれる。

Agarwal et al., 1987, Tetrahedron Letters, Vol. 28, p. 3539. 30

Arnold, 1996, 『オリゴヌクレオチドポリマーの支持体システム (Oligonucleotide Polymeric Support System)』米国特許第 5, 539, 097 号、1996 年 7 月 23 日発行。

Arnold, 1994, 『酸化切り離し可能なリンクを有するオリゴヌクレオチドポリマーの支持体システム (Oligonucleotide Polymeric Support System with an Oxidation Cleavable Link)』米国特許第 5, 362, 866 号、1994 年 11 月 08 日発行。

Beaucage et al., 1990, J. Am. Chem. Soc., Vol. 112, p. 1253. 40

Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters, Vol. 22, pp. 1859-1862.

Beaucage et al., 1992, 『表題 (Title)』Tetrahedron, Vol. 48, pp. 2223-2311.

Bjergarde et al., 1991, Nucleic Acids Research, Vol. 18, pp. 5843-5850. Carruthers, 1995, 米国特許第 4, 415, 732 号、1995 年 11 月 15 日発行。

DeBear et al., 1987, 『オリゴヌクレオチド合成の普遍ビーズ支持体 (A Universal Bead Support for Oligonucleotide Synthesis)』Nucleosides & Nucleotides, 50

- Vol. 6, No. 5, pp. 831-830.
- Eritja et al., 1991, Tetrahedron Letters, Vol. 32, pp. 1511-1514.
- Froehler et al., 1990, 米国特許第4,959,463号、1990年9月25日発行.
- Froehler et al., 1986, Nucleic Acids Research, Vol. 14, pp. 5399-5407.
- Gait, M. J., 1984, 『オリゴヌクレオチド合成：実践アプローチ (Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)』IRLプレス. 10
- Gallo et al., 1986, Nucleic Acids Research, Vol. 14, pp. 7405-7420.
- Koester et al., 1990, 米国特許第4,923,901号、1990年5月08日発行.
- Letsinger et al., 1992, 『固相ポリヌクレオチド合成用の不安定アンカー (Labile Anchors for Solid Phase Polynucleotide Synthesis)』米国特許第5,112,962号、1992年5月12日発行.
- Lyttle et al., 1996, 『固相DNA合成の新規普遍リンカー (A new Universal Linker for Solid Phase DNA Synthesis)』Nucleic Acids Research, Vol. 24, No. 14, pp. 2793-2798. 20
- McLean et al., 1997, 『化合物 (Compounds)』米国特許第5,681,945号、1997年10月28日承認.
- Nelson et al., 1989, 『新規CPG支持体を使用して合成された二官能性オリゴヌクレオチドプローブは単一塩基対突然変異を検出し得る (Bifunctional Oligonucleotide Probes Synthesized Using a Novel CPG Support are able to Detect Single Base Pair Mutations)』Nucleic Acids Research, Vol. 17, No. 18, pp. 7187-7193. 30
- Nielson et al., 1994, Bioconjugate Chem, Vol. 5, p. 3.
- Pon et al., 1997 Tetrahedron Letters, Vol. 38, pp. 3327-3330.
- Reddy et al., 1997, 『普遍固形支持体とその使用の方法 (Universal Solid Supports and Methods for Their Use)』国際特許公開WO97/40458号、1997年10月30日公開.
- Scheuer-Larsen et al., 1997, 『普遍固形支持体のオリゴヌクレオチド合成への導入 (Introduction of a Universal Solid Support for Oligonucleotide Synthesis)』Nucleosides and Nucleotides, Vol. 16, Nos. 1&2, pp. 67-80. 40
- Schwartz et al., 1995, 『任意の単一型固形支持体上でのDNA若しくはRNAの化学合成用の普遍アダプター (A Universal Adapter for Chemical Synthesis of DNA or RNA on any Type of Solid Support)』Tetrahedron Letters, Vol. 36, No. 1, pp. 27-30.
- Sproat et al., 1989, Nucleic Acids Research, Vol. 18, pp. 3373-3386.
- Stec et al., 1985, Tetrahedron Letters, Vol 50

. 26, p. 2191.

Stirchak et al., 1989, Nucleic Acids Research, Vol. 17, pp. 6129-6141.

Summerton et al., 1991, 米国特許第5,034,506号、1991年7月23日発行.

Tracy et al., 1997, Bioconjugate Chemistry, Vol. 8, pp. 99-102.

Vu et al., 1995, 『3'-[(ヒドロキシプロピル)アミノ]及び3'-[(ヒドロキシプロピル)トリグリシル]オリゴヌクレオチドコンジュゲートの自動合成へのフタロイル保護基の使用 (Use of Phthaloyl Protecting Group for the Automated Synthesis of 3'-[(Hydroxypropyl)amino] and 3'-[(Hydroxypropyl)triglycyl] Oligonucleotide Conjugates)』 Bioconjugate Chem., Vol. 6, pp. 599-607. 10

Wang et al., 1994, Nucleic Acids Research, Vol. 22, pp. 2326-2333.

Webb et al., 1992, 『固相オリゴヌクレオチド合成の支持体 (Support for Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis)』 米国特許第4,659,774号、1987年4月21日発行.

【図面の簡単な説明】 20

【図1】

図1は、本発明の好ましい普遍固形支持体のクラスの製造を例示する化学スキームである。

【図2】

図2は、実施例に記載される普遍固形支持体の製造を例示する化学スキームである。

【図3】

図3は、本発明の1つの好ましい普遍固形支持体で始めるホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成法の第一サイクルを例示する化学スキームである。

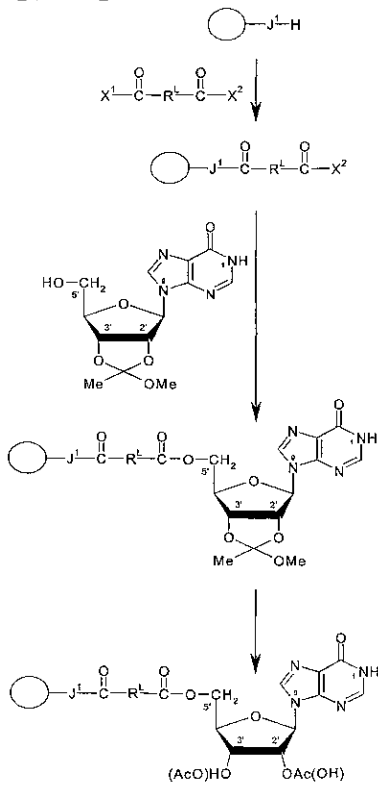
【図4】

図4は、本発明の好ましい普遍固形支持体を使用して3'→5'方向で成長したオリゴヌクレオチドの切り離し工程を例示する化学スキームである。 30

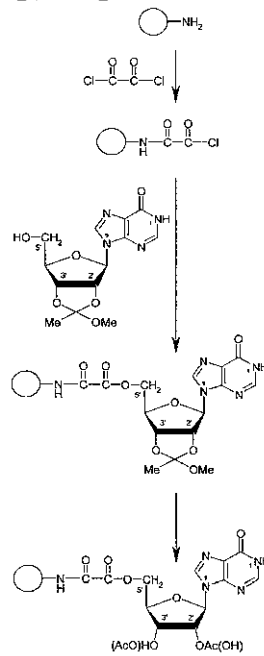
【図5】

図5は、本発明の好ましい普遍固形支持体を使用して5'→3'方向で成長したオリゴヌクレオチドの切り離し工程を例示する化学スキームである。

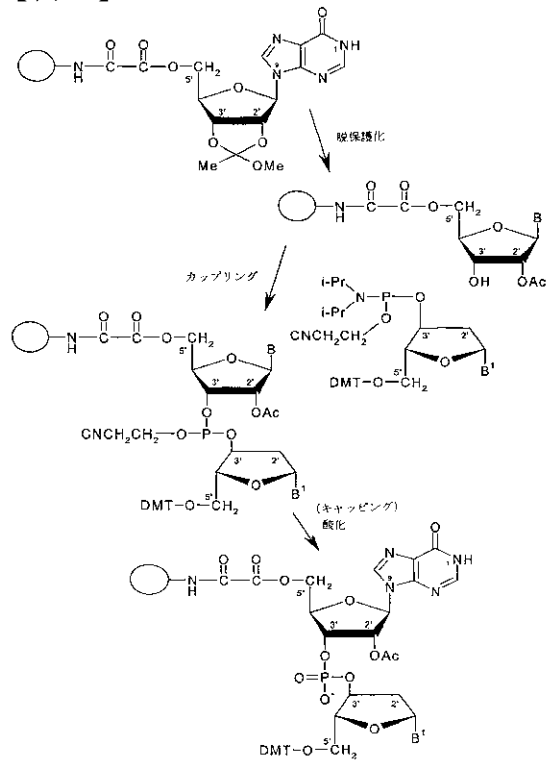
【図 1】



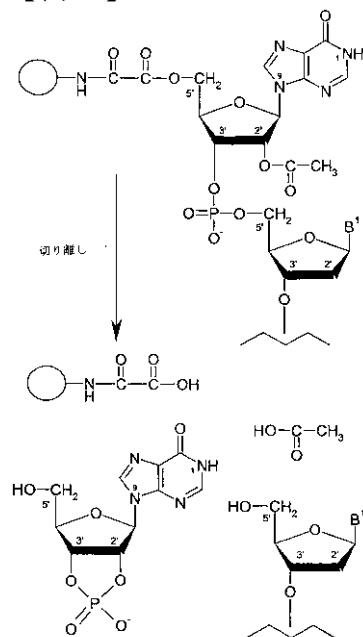
【図 2】



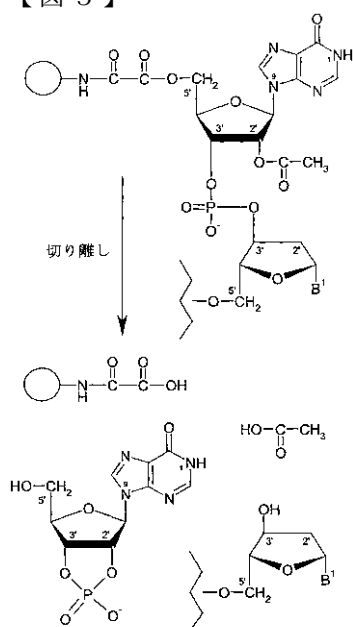
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96357 A2

(51) International Patent Classification: C07H 21/00

(21) International Application Number: PCT/FR01/0392

(22) International Filing Date: 12 June 2001 (12.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00/211,344 13 June 2000 (13.06.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENSET
[FR/FR], Intellectual Property Department, 24, rue Royale,
F-75008 Paris (FR).

(72) Inventor: and

(75) Inventor/Applicant (for US only): KUMAREV, Viktor
[RU/FR], 18, avenue de Lespinasse, F-93250 Villemaire
(FR).(74) Common Representative: GENSET, Intellectual Prop-
erty Department, 24, rue Royale, F-75008 Paris (FR).(81) Designated States (nationally): AB, AG, AI, AM, AU, AT,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GG, GL, GM, GR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MT, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 01/96357 A2

(54) Title: UNIVERSAL SOLID SUPPORTS FOR SOLID PHASE OLIGOSYNTHESIS AND METHODS FOR THEIR PREPA-
RATION AND USE(57) Abstract: This invention pertains to solid-phase oligosynthesis, and more particularly to universal solid supports for solid-phase
oligonucleotide synthesis, methods for their preparation, and methods for their use. One aspect of the invention pertains to a method
for the preparation of a universal solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis, which method comprises the steps of:
(a) reacting a pendant functional group (e.g., -NH₂) of a solid support (e.g., CPC) with a linker reagent (e.g., oxalyl chloride), thereby
forming a pendant linker group (e.g., -Cl-O-Cl); (b) removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation
(e.g., using a rotavapor apparatus); and, (c) reacting said pendant linker group with a cyclic reagent (e.g., protected inosine), thereby
forming a pendant cyclic group.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

UNIVERSAL SOLID SUPPORTS FOR SOLID PHASE OLIGOSYNTHESIS
AND METHODS FOR THEIR PREPARATION AND USE

TECHNICAL FIELD

5

This invention pertains generally to the field of solid-phase oligosynthesis, and more particularly to universal solid supports for solid-phase oligonucleotide synthesis, methods for their preparation, and methods for their use.

10

BACKGROUND

The widespread use of modified and unmodified oligonucleotides as probes and primers in the field of molecular biology as well as the potential applications of antisense and antigene oligonucleotides as therapeutics make the continuous development of new and improved synthetic methods for these molecules increasingly important.

Some procedures in oligonucleotide synthesis require that the solid support contain the first nucleoside which is destined to become the nucleoside at the 3'-terminus of the synthetic oligonucleotide. Such procedures require an inventory of all eight regular nucleoside supports (four for DNA and four for RNA) to be maintained. Moreover, unusual nucleosides are often available only as phosphoramidites and not as supports, and thus oligonucleotides with unusual nucleosides at the 3'-terminus can not be readily prepared. Furthermore, another drawback of such methods is the potential for an error in the selection of the column containing the 3'-nucleoside. Although this potential for error may be fairly low in regular column-type synthesizers, it is especially significant in the new generation of parallel synthesizers where 24, 96, or 192 wells may contain the four supports in a defined grid.

In order to alleviate these problems, various "universal" solid supports have been developed. These universal solid supports can be used to synthesize any oligonucleotide regardless of the nature of the 3'-terminal nucleoside.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

DeBear et al., 1987, describe a universal solid support in which a protected uridine group is linked via a succinyl group to a solid support. The support is prepared by, first, reacting protected uridine with succinic anhydride in the presence of 4-dimethylaminopyridine, second, activating the resulting succinate half-esters with p-toluenesulfonyl nitrotriazole, and third, reacting the active esters with pendant amino groups of a solid support. These steps require more than two days, and include purification by washing with pyridine, methanol, and chloroform, followed by vacuum desiccation. In no instance was excess reagent removed by evaporation or solely by evaporation.

Webb et al., 1987, describe methods of preparing universal solid supports which employ solid supports bearing oxirane, aziridine, or episulfide groups, linker compounds having nucleophilic groups, for example, free amino groups, and activated nucleosides bearing pentachlorophenyl succinates. Although the universal solid supports are apparently prepared without the need for chromatographic separation (col. 4, lines 41-42), the synthesis does require many purification steps (e.g., filtering, washing, drying) and at least two days time (Example 1). Nowhere is there any mention of using evaporative methods for removal.

Nelson et al., 1989, describe an adapter compound which has two different protected groups, one (-O-DMT) for oligonucleotide synthesis and one (-NHFMoc) for other use, e.g., label attachment. The adapter is first derivatized to bear an activated succinyl group, and subsequently coupled to the solid support. These steps require many purification steps (e.g., washing, drying, filtering). In no instance was excess reagent removed by evaporation or solely by evaporation. Succinylation and coupling to the support required more than 20 hours, and often much longer.

Letsinger et al., 1992, describe universal solid supports employing, for example, oxalyl linker arms (see Fig-1C and

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

Fig-2 therein). The oxalyl linker arm is introduced using an activated oxalyl derivative (col. 4, lines 62-64). Oxalyl chloride is converted to a less reactive triazolidine derivative prior to use (col. 5, lines 30-37). The nucleoside loaded oxalyl support apparently can be prepared in one to eight hours (col. 5, lines 43-45), and required 2.5 hours in Example 1 (col. 6, lines 44-56). The universal solid support was prepared in a syringe apparatus, with reactants (either liquid, or in solution) being injected, excess reactants subsequently ejected, and the residue rinsed or washed several times with solvent (e.g., acetonitrile, pyridine, methylene chloride, diethyl ether). Many purification steps (e.g., rinsing, washing) are required. Nowhere is there any mention of using evaporative methods for removal.

Arnold, 1994 and Arnold, 1996, describe universal solid supports which rely on selective oxidation in order to achieve final cleavage of the oligonucleotide. In each case, the primer moiety (e.g., riboside), which links the oligonucleotide to the solid support, possesses one or more oxidizable substituents (col. 6, lines 52-62). The synthesis requires many purification steps (e.g., washing, filtering, drying, centrifugation, partitioning, and column chromatography) (see Examples 1, 3, 5, and 7). In no instance was excess reagent removed by evaporation or solely by evaporation. Forming the linkages between the solid support, the linker group, and the primer group required more than 6 hours, and often much longer.

Vu et al., 1995, describe a number of different primers which have two different protected groups, one for oligonucleotide synthesis and one for other use, e.g., label attachment. In each case, the primer is first attached to a linker group (succinylation) and subsequently coupled to the support in the final step, and these steps required many purification steps (e.g., filtering, washing, drying, and column chromatography) (see synthesis for compounds 4, 5, & 6; 12 & 13; 18 & 19; 25 & 26; and 31 & 32). In no instance was

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

excess reagent removed by evaporation or solely by evaporation. Succinylation and coupling to the support required more than 6 hours, and often much longer.

- 5 Schwartz et al., 1995, describe a universal adapter compound which can convert a nucleoside-bearing solid support to a universal solid support. The linker compound, a fully protected 2' (3')-O-dimethoxytrityl-3' (2')-O-benzoyluridine-5'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidite), is linked
10 to the nucleoside-bearing solid support using conventional phosphoramidite methods.

- McLean et al., 1997, describe universal solid supports in which a homocyclic (e.g., cyclohexyl) or heterocyclic
15 (e.g., furan, pyran) ring bearing a nucleophilic group (e.g., hydroxyl or protected hydroxyl) is tethered to a solid support by a spacer group (e.g., succinyl). The universal solid supports are synthesized by first attaching a linker group to the cyclic group, and then attaching the linker-
20 cyclic group to the solid support. The synthesis requires many purification steps (e.g., filtering, washing, drying, column chromatography, partitioning) (see Examples 1&2, 13&14, 16&17, 19, 20&21, 23&24, and 26). In no instance was excess reagent removed by evaporation or solely by
25 evaporation. Coupling of the linker group to the cyclic group, and subsequent coupling to the solid support required more than 36 hours, and often much longer.

- Lytle et al., 1996, describe universal solid supports in
30 which a propyl group bearing a protected hydroxy group (as -O-DMT) for oligosynthesis, and a protected amino group (as allyl carbamate) to assist with the cleavage mechanism, wherein the propyl group is bound to the solid support via a succinyl group. The supports are prepared using a universal
35 linker, 1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-O-succinoyl-3-N-allyloxycarbonylpropane. Formation of the succinate derivative (compound 5 to compound 1) required over 12 hours and several purification steps, including column chromatography. In no instance was excess reagent removed by

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

evaporation or solely by evaporation. Subsequent coupling to a solid support required another 12 hours.

Scheuer-Larsen et al., 1997, describe a universal solid support in which a D-ribose group, bearing a protected hydroxy group (as -O-DMT) for oligonucleotide synthesis and a protected hydroxyl group (as chloroacetyl), is linked to a solid support by a succinyl group. Formation of the succinate derivative and subsequent coupling the solid support (compound 5 to 6, steps f and g, in Scheme 1) required several purification steps (e.g., washing, partitioning, and drying) and more than 44 hours. In no instance was excess reagent removed by evaporation or solely by evaporation.

Reddy et al., 1997, describe universal solid supports in which a ring moiety ($-R^3$, preferably a riboside), bearing vicinal groups ($-XR^1$ and $-YR^2$), is linked, for example, by an ester linkage, a phosphate linkage (e.g., Example 8), a phosphoramidate linkage (e.g., Example 11), or an ester linkage (e.g., Example 13), to a solid support, typically via a succinyl group. In Example 13, the solid support is derivatized with succinic anhydride and subsequently reacted with 2',3'-protected uridine. The process requires more than three days, and many purification steps (e.g., filtering, washing, and drying). In no instance was excess reagent removed by evaporation or solely by evaporation.

Known methods for the preparation and use of the universal solid supports, including those described above, are complex and time-consuming, and there is a great need for universal solid supports for oligonucleotide synthesis which may be prepared easily and quickly, in fewer steps, with fewer and simpler purification steps, and which facilitate simple and fast cleavage and deprotection of the synthesized oligonucleotide.

By employing a method in which (a) the solid support is first reacted with a linker reagent (to form a pendant linker

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

group) and then reacted with a cyclic reagent (to form a pendant cyclic group), and (b) the linker reagent is selected both (i) to be volatile, or, more preferably, a volatile liquid, and (ii) to yield a linkage group which is readily
5 cleaved under mild conditions, it is possible to greatly simplify the synthesis by removing, or substantially removing, excess linker reagent by evaporation, even solely by evaporation. Until now, such methods have not been taught or suggested.

10

Thus, one aim of the present invention is the provision of methods for the preparation of a universal solid support for oligonucleotide synthesis, which methods are rapid (e.g., less than about 3 hr).

15

Another aim of the present invention is the provision of methods for the preparation of a universal solid support for oligonucleotide synthesis, which methods employ only one purification step (e.g., filtration), for example, for the
20 removal of excess unreacted cyclic reagent, capping reagent (if applicable), and by-products thereof.

Another aim of the present invention is the provision of methods for the preparation of a universal solid support for
25 oligonucleotide synthesis, which methods give such supports in high yield and with high loading (e.g., about 60 $\mu\text{mole/g}$).

Another aim of the present invention is the provision of methods for the preparation of a universal solid supports for
30 oligonucleotide synthesis, which methods permit the use of a substantially reduced cleavage time following oligonucleotide synthesis (e.g., about 1 hr at 75°C).

Another aim of the present invention is the provision of
35 methods for the preparation of a universal solid supports for oligonucleotide synthesis, which methods satisfies one or more of the above aims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

Figure 1 is a chemical scheme illustrating the preparation of a preferred class of universal solid supports of the present invention.

5

Figure 2 is a chemical scheme illustrating the preparation of the universal solid support described in the Example.

Figure 3 is a chemical scheme illustrating the first cycle of a phosphoramidite oligonucleotide synthesis method, starting with one preferred universal solid support of the present invention.

10

Figure 4 is a chemical scheme illustrating the cleavage step for an oligonucleotide grown in a 3'65' direction using a preferred universal solid support of the present invention.

15

Figure 5 is a chemical scheme illustrating the cleavage step for an oligonucleotide grown in a 5'63' direction using a preferred universal solid support of the present invention.

20

SUMMARY OF THE INVENTION

One aspect of the present invention pertains to methods for the preparation of a universal solid support for oligosynthesis, which support is useful, for example, in solid-phase oligonucleotide synthesis.

25

Thus, in one embodiment, the present invention pertains to a method for the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis, which method comprises the steps of:

30

(a) reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent, thereby forming a pendant linker group;

35

(b) removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation; and,

(c) reacting said pendant linker group with a cyclic reagent, thereby forming a pendant cyclic group.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

In one embodiment, the present invention pertains to a method for the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligonucleotide synthesis, which method comprises the steps of:

- (a) reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent, thereby forming a pendant linker group;
- (b) removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation;
- (c) reacting said pendant linker group with a cyclic reagent, thereby forming a pendant cyclic group; and,
- (d) removing at least a portion of excess unreacted cyclic reagent and/or by-products thereof.

In one embodiment, the method further comprises, after said step of reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent, a step of:

- (i) reacting at least a portion of any remaining pendant functional groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped functional groups.

In one embodiment, the method further comprises, after said step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation, a step of:

- (i) reacting at least a portion of any remaining pendant functional groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped functional groups.

In one embodiment, the method further comprises, after said step of reacting said pendant linker group with a cyclic reagent, a step of:

- (i) reacting at least a portion of any remaining pendant linker groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped linker groups.

In one embodiment, said step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation is achieved with the application of reduced pressure and/or increased

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

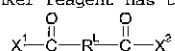
temperature.

In one embodiment, said step of removing at least a portion
of excess unreacted linker reagent by evaporation involves
5 removing a substantial portion of excess unreacted linker
reagent.

In one embodiment, said step of removing at least a portion
of excess unreacted linker reagent is achieved solely by
10 evaporation.

In one embodiment, one or more steps of said method are
performed using an evaporation apparatus. In one embodiment,
said method is performed using a rotavapor apparatus or a
15 distillation apparatus. In one embodiment, said method is
performed using a rotavapor apparatus.

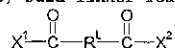
In one embodiment, said linker reagent has the formula:



wherein:

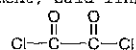
20 X^1 and X^2 are independently -Cl, -Br, or -I; and,
 R^L denotes a covalent bond or a divalent group which is
an organic group comprising from 1 to 10 carbon atoms and
from 0 to 5 heteroatoms selected from N, O, and S;
and wherein said linker reagent is a volatile liquid.

25 In one embodiment, said linker reagent has the formula:



wherein X^1 and X^2 are independently -Cl, -Br, or -I, and n is
an integer from 0 to 2.

30 In one preferred embodiment, said linker reagent is:



In one embodiment, said pendant functional group of said
solid support is $-\text{J}^1-\text{H}$, wherein J^1 is -NH-, -O-, or -S-. In

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

one embodiment, said pendant functional group of said solid support is -OH.

In one embodiment, said cyclic reagent has the formula:



5 wherein:

- Q denotes a cyclic group;
- B denotes a base group;
- W denotes a reactive conjugating group;
- Y denotes an oligosynthesis group; and,
- 10 Z, if present, denotes an auxiliary group.

In one embodiment, said cyclic reagent has the formula:



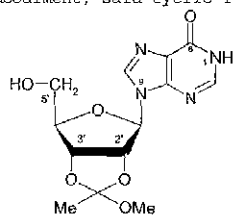
wherein:

- Q denotes a cyclic group, which has a single
- 15 non-aromatic ring, which ring has from 5 to 7 ring atoms, which ring atoms are:
 - (a) all carbon atoms; or,
 - (b) carbon atoms and one or two heteroatoms selected from oxygen, nitrogen, and sulfur;
- 20 W denotes a reactive conjugating group and is -OH, -NH₂, or -SH;
- B denotes a base moiety, which is a purine or pyrimidine or a derivative or analog thereof;
- Y denotes an oligosynthesis group, which is -OH, -NH₂, or
- 25 -SH, or a protected form thereof; and,
- Z, if present, denotes an auxiliary group, which is -OH, -NH₂, or -SH, or a protected form thereof;
- wherein said W, B, Y, and Z, if present, are each separately attached to a carbon ring atom of said Q, either
- 30 directly, via a covalent bond, or indirectly, via an intermediate covalent linkage selected from -CH₂- and -CH₂CH₂-.

WO 01/96357

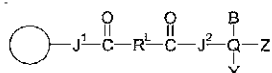
PCT/IB01/01392

In one preferred embodiment, said cyclic reagent is:



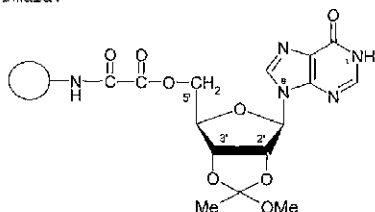
In one embodiment, said step of reacting said pendant linker group with a cyclic reagent is performed in the presence of an added base. In one embodiment, said added base is dimethylaminopyridine (DMAP) or N-methylimidazole (NMI).

Another aspect of the present invention pertains to a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis, preferably oligonucleotide synthesis, which support has the following formula:



wherein J¹, J², R¹, Q, B, Y, and Z are as defined herein.

In one preferred embodiment, the solid support has the following formula:



Another aspect of the present invention pertains to a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis, preferably oligonucleotide synthesis, prepared by a method as

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

described herein.

Another aspect of the present invention pertains to a method of oligosynthesis, preferably oligonucleotide synthesis,
5 which method employs a method for the preparation of a universal solid support as described herein.

Another aspect of the present invention pertains to a method of oligosynthesis, preferably oligonucleotide synthesis,
10 which method employs a universal solid support as described herein.

Another aspect of the present invention pertains to an oligonucleotide which has been prepared using a method of
15 oligosynthesis, preferably oligonucleotide synthesis, which method employs a method for the preparation of a universal solid support as described herein.

Another aspect of the present invention pertains to an oligonucleotide which has been prepared using a method of
20 oligosynthesis, preferably oligonucleotide synthesis, which method employs a universal solid support as described herein.

It will be apparent to the skilled artisan that particular
25 features of individual aspects and embodiments of the invention will also pertain to other aspects and embodiments of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

30 One aspect of the present invention pertains to methods for the preparation of a universal solid support for oligosynthesis, which support is useful, for example, in solid-phase oligonucleotide synthesis.

35 The term "oligosynthesis," as used herein, pertains to the synthesis of oligomers or polymers, typically, though not exclusively, from monomer units, without reference to the composition of the oligomer or polymer. A preferred

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

oligosynthesis is oligonucleotide synthesis.

The term "oligonucleotide synthesis," as used herein, pertains to the synthesis of oligonucleotides, and analogs, mimics, and derivatives thereof, typically, though not exclusively, from monomer units (e.g., nucleoside phosphoramidites).

As used herein, the term "solid-phase oligonucleotide synthesis" is used in the conventional sense to describe synthetic methods in which the growing oligomer (e.g., oligonucleotide) is supported or otherwise attached (i.e., covalently linked) to a solid support, in contrast to the case for well-known "solution-phase oligonucleotide synthesis" methods.

Solid Support

The term "solid support" is used herein in the conventional sense, and refers to solid supports conventionally used in organic chemical synthesis, and more particularly, solid-phase oligonucleotide synthesis.

The solid support is typically formed from one or more insoluble or a substantially insoluble materials, which materials may be inorganic or organic, which materials are chemically inert (or substantially chemically inert) with respect to the reagents and conditions used during oligonucleotide synthesis (e.g., deprotection, coupling, oxidation, cleavage, and the like).

In one embodiment, the solid support is formed from an inorganic macroporous material. Examples of inorganic materials include, but are not limited to, silica, kieselguhr, porous glass, aluminosilicate, borosilicate, metal oxides (for example, aluminium oxide, nickel oxide, and iron oxide), and/or clay.

In one embodiment, the solid support is formed from an

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

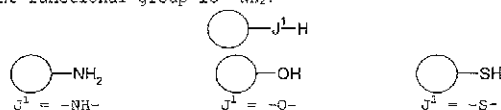
- organic polymeric material, which polymeric material is optionally crosslinked. Examples of organic polymeric materials include, but are not limited to, cellulose, polysaccharide, crosslinked polysaccharides, polystyrene, crosslinked polystyrene, polyacryloylmorpholide, polyamide resin, polyacryloyl pyrrolidone, polyethylene glycol, crosslinked polyethylene glycol, polyethylene glycol-polystyrene, cross-linked dextran, and/or cross-linked agarose.
- 10 In one embodiment, the solid support is formed from both an inorganic material and an organic polymeric material. Examples of such solid supports include, but are not limited to, acrylamide-kieselguhr resins, PBPSYN K resins, and POLYHIFE resins.
- 15 Commonly-used solid supports, which are suitable for use in the present invention, include but are not limited to, controlled pore glass beads (CPG) (for example, from Cruachem®), silica gel beads (for example, from Merck® or CPG, Inc.®), and polystyrene beads (for example, Porasil C®).
- Other known solid supports which have been used in connection with oligonucleotide synthesis are also suitable for use in accordance with the present invention (see, for example, 25 Gait, 1984 and Koester et al., 1990).
- The solid support may be in any suitable form, including but not limited to, resins, particles, beads, fibres, films, and the like.
- 30 For use in the present invention, the solid support must be "functionalized," that is, be in a form, or be derivatized to be in a form, in which one or more pendant functional groups are covalently linked to the solid support. These pendant 35 functional groups permit attachment, synthesis, extension, and/or growth of a molecule to the solid support, as in, for example, solid phase oligonucleotide synthesis.
- Examples of pendant functional groups include, but are not

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

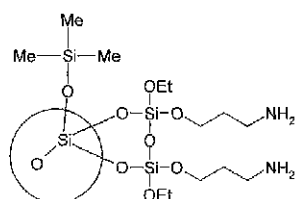
limited to, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, and $-\text{SH}$, also denoted herein as $-\text{J}^1\text{-H}$, wherein J^1 is $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, or $-\text{S}-$, respectively. In these cases, the solid support and the pendant functional group may be denoted as shown below. In a preferred embodiment, the

5 pendant functional group is $-\text{NH}_2$.



Examples of how solid supports may be functionalized are described in Gait et al., 1984. For example, in one embodiment, amino pendant functional groups may be linked to

10 the solid support via siloxy groups, as shown below (see page 46 of Gait et al., 1984).



Pendant groups may be used to attach molecules via a covalent linkage using routine methods. Examples of such linkages

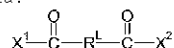
15 include, but are not limited to, an amide linkage ($-\text{NH}-\text{CO}-$), an ester linkage ($-\text{O}-\text{CO}-$), and a thioester linkage ($-\text{S}-\text{CO}-$) (all denoted herein as $-\text{J}^1-\text{CO}-$).

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

The Linker Reagent and the Linker Group

The term "linker reagent," as used herein, pertains to a compound of the formula:

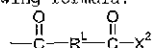


5

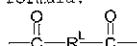
wherein X^1 and X^2 denote halogen atoms and are independently -F, -Cl, -Br, or -I, and R^L denotes a covalent bond or a divalent group. In one preferred embodiment, X^1 and X^2 are independently -Cl, -Br, or -I.

10

The term "pendant linker group," as used herein, pertains to a monovalent moiety which is derived from a linker reagent, and which has the following formula:



15 The term "linker group," as used herein, pertains to a divalent moiety which is derived from a linker reagent, and which has the following formula:



In one embodiment, as discussed below, R^L is a covalent bond.

20

In one embodiment, R^L denotes a divalent group which is an organic group comprising from 1 to 10 carbon atoms and from 0 to 5 heteroatoms selected from oxygen, nitrogen, and sulfur.

25 In one embodiment, R^L denotes a divalent C_{1-10} alkylene group. The term " C_{1-10} alkylene group," as used herein, pertains to divalent moieties obtained by removing one hydrogen atom from each of two different carbon atoms of a C_{1-10} alkane.

30

The term " C_{1-10} alkane," as used herein, pertains to hydrocarbon compounds (compounds containing only hydrogen and carbon atoms) having from 1 to 10 carbon atoms, which compounds may

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

- be aliphatic or alicyclic, or a combination thereof, and which may be saturated, partially unsaturated, or fully unsaturated.
- The term "aliphatic," as used herein, pertains to groups which are linear or branched, but not cyclic. The term "alicyclic," as used herein, pertains to groups which have one ring, or two or more rings (e.g., spiro, fused, bridged), but which are not aromatic. The term "saturated," as used herein, pertains to groups which do not have any carbon-carbon double bonds or carbon-carbon triple bonds. The term "unsaturated," as used herein, pertains to groups which have at least one carbon-carbon double bond or carbon-carbon triple bond.
- 15 Examples of saturated linear C₁₋₁₀alkanes include, but are not limited to, methane, ethane, n-propane, n-butane, n-pentane, and n-hexane.
- Examples of saturated branched C₁₋₁₀alkanes include, but are not limited to, iso-butane, iso-pentane, neo-pentane, and iso-hexane.
- 25 Examples of saturated alicyclic (carbocyclic) C₁₋₁₀alkanes (also referred to as "C₃₋₁₀cycloalkanes") include, but are not limited to, cyclopropane, cyclobutane, cyclopentane, cyclohexane, as well as methylcyclopropane, methylcyclobutane, methylcyclopentane, and methylcyclohexane.
- Examples of unsaturated C₁₋₁₀alkanes which have one or more carbon-carbon double bonds (also referred to as "C₂₋₇alkenes") include, but are not limited to, ethene, propene, butene, and butadiene.
- 35 Examples of unsaturated C₁₋₁₀alkynes which have one or more carbon-carbon triple bonds (also referred to as "C₂₋₇alkynes") include, but are not limited to, ethyne, propyne, butyne, and butadiyne.
- Examples of unsaturated alicyclic (carbocyclic) C₁₋₁₀alkanes

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

which have one or more carbon-carbon double bonds (also referred to as "C₃₋₁₀cycloalkenes") include, but are not limited to, cyclopropene and cyclohexene, as well as groups which comprise such groups, including but not limited to

5 methylcyclopropene and methylcyclohexene.

In one preferred embodiment, the C₁₋₁₀alkane is a saturated linear alkane of the formula CH₃(CH₂)_nCH₃, wherein n is an integer from 1 to 8. Examples of such saturated linear

10 C₁₋₁₀alkanes include, but are not limited to, methane, ethane, propane, n-butane, and n-pentane.

In one preferred embodiment, R^b has the formula -(CH₂)_n-, wherein n is an integer from 1 to 10. In one preferred

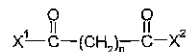
15 embodiment, n is an integer from 1 to 8. In one preferred embodiment, n is an integer from 1 to 6. In one preferred embodiment, n is an integer from 1 to 4. In one preferred embodiment, n is an integer from 1 to 3. In one preferred embodiment, n is an integer from 1 to 2. Examples of such

20 groups include, but are not limited to, methylene (n=1, -CH₂-), ethylene (n=2, -CH₂CH₂-), trimethylene (n=3, -CH₂CH₂CH₂-), tetramethylene (n=4, -CH₂CH₂CH₂CH₂-), and pentamethylene (n=5, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-).

25 In one preferred embodiment, R^b is -(CH₂)_n- wherein n is an integer from 0 to 10 (when n is 0, R^b is a covalent bond). In one preferred embodiment, n is an integer from 0 to 8. In one preferred embodiment, n is an integer from 0 to 6. In one preferred embodiment, n is an integer from 0 to 4. In

30 one preferred embodiment, n is an integer from 0 to 3. In one preferred embodiment, n is an integer from 0 to 2. In one preferred embodiment, n is 0 or 1. In one preferred embodiment, n is 0, and R^b is a covalent bond.

35 In one preferred embodiment, the linker reagent has the formula:



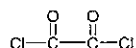
WO 01/96357

PCT/IB01/01392

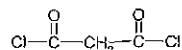
wherein X^1 and X^2 are independently -Cl, -Br, or -I, and n is an integer from 0 to 10, more preferably from 0 to 8, more preferably from 0 to 6, more preferably from 0 to 4, more preferably from 0 to 3, more preferably 0 to 2. In one preferred embodiment, n is 0 or 1. In one preferred embodiment, n is 0.

In one preferred embodiment, X^1 and X^2 are independently -Cl or -Br. In one preferred embodiment, X^1 and X^2 are the same. In one preferred embodiment, X^1 and X^2 are both -Cl or both -Br. In one preferred embodiment, X^1 and X^2 are both -Cl.

In one preferred embodiment, R^b is a covalent bond and the linker reagent has the structure $X^1\text{-CO-CO-}X^2$. Such compounds may be conveniently referred to as "oxalyl dihalides." In one preferred embodiment, R^b is a covalent bond and X^1 and X^2 are the same. In one preferred embodiment, R^b is a covalent bond and X^1 and X^2 are both -Cl or both -Br. In one preferred embodiment, R^b is a covalent bond and X^1 and X^2 are both -Cl, and the linker reagent is as shown below, and is often referred to as oxalyl dichloride, shown below, which has a melting point of -16EC and a boiling point of about 64EC (1 atm).



In one preferred embodiment, R^b is -CH₂- and the linker reagent has the structure $X^1\text{-CO-CH}_2\text{-CO-}X^2$. Such compounds may be conveniently referred to as "malonyl dihalides." In one preferred embodiment, R^b is -CH₂- and X^1 and X^2 are the same. In one preferred embodiment, R^b is -CH₂- and X^1 and X^2 are both -Cl or both -Br. In one preferred embodiment, R^b is -CH₂- and X^1 and X^2 are both -Cl, and the linker reagent is as shown below, and is often referred to as malonyl dichloride, shown below, which has a boiling point of about 58EC (26 mm Hg, 3.5 kPa).

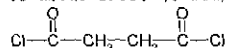


35

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

In one preferred embodiment, R^b is $-\text{CH}_2-$ and the linker reagent has the structure $\text{X}^1-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-\text{X}^2$. Such compounds may be conveniently referred to as "succinyl dihalides." In one preferred embodiment, R^b is $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ and X^1 and X^2 are the same. In one preferred embodiment, R^b is $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ and X^1 and X^2 are both $-\text{Cl}$ or both $-\text{Br}$. In one preferred embodiment, R^b is $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ and X^1 and X^2 are both $-\text{Cl}$, and the linker reagent is as shown below, and is often referred to as succinyl dichloride, shown below, which has a melting point of 20°C and a boiling point of about 194°C (1 atm).



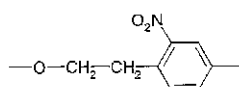
In one embodiment, R^b denotes a divalent group which is an organic group comprising from 1 to 10 carbon atoms and from 0 to 5 heteroatoms selected from oxygen, nitrogen, and sulfur, which divalent group, R^b , comprises one or more moieties selected from optionally substituted C_{1-10} alkylene groups and optionally substituted C_{5-20} arylene groups, which groups (if there are a plurality) are linked via a covalent bond or via a covalent linkage, and which divalent group, R^b , optionally includes a terminal covalent heteroatom linkage at one or both termini, in which case it may optionally form a larger covalent linkage with the adjacent carbonyl groups. Examples of covalent heteroatom linkages include, but are not limited to, an ether linkage ($-\text{O}-$) and a thioether linkage ($-\text{S}-$). When positioned at a terminus, these linkages form ester ($-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$) and thioester ($-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$) linkages, respectively.

The term " C_{5-20} arylene group," as used herein, pertains to a divalent moiety obtained by removing one hydrogen atom from each of two different carbon atoms of an optionally substituted C_{5-20} arene.

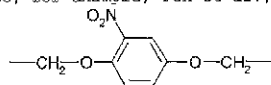
In one embodiment, R^b denotes the following group, referred to as 2-(2-nitrophenyl)ethyl. See, for example, Eritja et al., 1991.

WO 01/46357

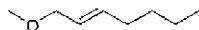
PCT/IB01/01392



In one embodiment, R^L denotes the following group, referred to as Q-support. See, for example, Pon et al., 1997.



- 5 In one embodiment, R^L denotes the following group, referred to as 3'-alkylcarboxylic acid. See, for example, Tracy et al., 1997.



- 10 Methods of synthesis for the linker reagents are known in the art. Indeed, many of the linker reagents are commercially available.

- Preferably, the linker reagent is selected to be a liquid at normal pressure (1 atm) and the relevant temperature, specifically, the temperature at which the step of reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent is performed, and/or the temperature at which the step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation is performed, preferably the latter.

- Preferably, the linker reagent is selected to be a volatile compound at the relevant temperature. The term "volatile," as used herein, describes a compound (e.g., a linker reagent) which has a substantial vapour pressure at the relevant temperature, preferably at least 10 Pa (~0.075 mm Hg), more preferably at least 100 Pa (~0.75 mm Hg), more preferably at least 1000 Pa (~7.5 mm Hg).

- 30 More preferably, the linker reagent is selected to be a volatile liquid at the relevant temperature.

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

Cyclic Reagent

The term "cyclic reagent," as used herein, pertains to a
 5 compound of the formula:



wherein:

- Q denotes a cyclic group;
- B denotes a base group;
- W denotes a reactive conjugating group;
- 10 Y denotes an oligosynthesis group; and,
- Z, if present, denotes an auxiliary group.

Cyclic Group, Q

- 15 The term "cyclic group," as used herein, pertains to a moiety which has a single non-aromatic ring, which ring has from 5 to 7 ring atoms, which ring atoms are (a) all carbon atoms (in which case the ring may be referred to as a "carbocyclic ring"), or (b) carbon atoms and one or two heteroatoms
 20 selected from oxygen, nitrogen, and sulfur (in which case the ring may be referred to as a "heterocyclic ring").

The ring bonds, which join the ring atoms, may be single, double, or triple bonds, but the ring itself must not be
 25 aromatic. In one preferred embodiment, the ring bonds are single or double bonds. In one preferred embodiment, the ring bonds are all single bonds.

In one preferred embodiment, the cyclic group has a single
 30 non-aromatic ring, which ring has 5 or 6 ring atoms, which ring atoms are (a) all carbon atoms or (b) carbon atoms and one or two heteroatoms selected from oxygen, nitrogen, and sulfur, and all ring bonds are single bonds.

- 35 In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 5 or 6 ring atoms, which

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

ring atoms are (a) all carbon atoms or (b) carbon atoms and one oxygen atom, and all ring bonds are single bonds.

5 In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 5 ring atoms, which ring atoms are (a) all carbon atoms or (b) carbon atoms and one oxygen atom, and all ring bonds are single bonds.

10 In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 6 ring atoms, which ring atoms are (a) all carbon atoms or (b) carbon atoms and one oxygen atom, and all ring bonds are single bonds.

15 In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 5 ring atoms, which ring atoms are all carbon atoms, and all ring bonds are single bonds. In this case, the ring is a cyclopentane ring.



20 In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 6 ring atoms, which ring atoms are all carbon atoms, and all ring bonds are single bonds. In this case, the ring is a cyclohexane ring.



In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 5 ring atoms, which ring atoms are carbon atoms and one oxygen atom, and all ring bonds are single bonds. In this case, the ring is a tetrahydrofuran ring.



30 In one preferred embodiment, the cyclic group has a single non-aromatic ring, which ring has 6 ring atoms, which ring atoms are carbon atoms and one oxygen atom, and all ring

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

bonds are single bonds. In this case, the ring is a tetrahydropyran ring.



The base group, B, the reactive conjugating group, W, the oligosynthesis group, Y, and the auxiliary group, Z, if present, are each separately attached to a carbon ring atom of the cyclic group, Q, either directly (via a covalent bond), or indirectly (via an intermediate covalent linkage). Examples of intermediate covalent linkages include, but are not limited to, $-(CH_2)_n-$, wherein n is an integer from 1 to 4, for example, $-CH_2-$ and $-CH_2CH_2-$. In one preferred embodiment, these groups are attached directly.

In one preferred embodiment, the oligosynthesis group, Y, and the auxiliary group, Z, which is present, are each directly attached to vicinal carbon ring atoms of the cyclic group, Q. In one preferred embodiment, these groups are attached with a cis orientation.

The cyclic group may also have other optional substituents, that is, substituents other than B, W, Y, and Z. Examples of such optional substituents include, but are not limited to, C_{1-3} alkyl groups, C_{1-3} alkoxy groups, and acyl groups.

25 The Base Group, B

The base group, B, is derived from a nucleic acid base. The terms "nucleic acid base," "nucleotide base," and "nucleoside base" are used herein in the conventional sense to refer to purine and pyrimidine bases, and derivatives and analogs thereof, such as those typically found in nucleic acids.

Preferred nucleic acid bases include the well-known naturally occurring purines: adenine and guanine; and pyrimidines: cytosine, thymine, and uracil. Other examples of the nucleic

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

acid bases known in the art include purine and pyrimidine derivatives and analogs, including but not limited to, sarcine (also known as hypoxanthine or sarkin), aziridinylcytosine, 4-acetylcytosine, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxymethylaminomethyluracil, N⁶-isopentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N⁶-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid, 5-pentynyluracil and 2,6-diaminopurine.

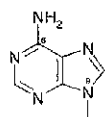
In one preferred embodiment, the base group, B, is derived from a nucleic acid base selected from the group consisting of: adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil, and sarcine (the base associated with the nucleoside inosine), or a protected form thereof. In one preferred embodiment, the base moiety, B, is derived from sarcine, or a protected form thereof.

The base moiety, B, for which the ring atoms are conventionally numbered with unprimed numbers, is preferably covalently attached to the cyclic reagent via a ring atom of the base. The base is preferably attached via a ring nitrogen atom of the base. For pyrimidines, attachment at the (N)-1-position is preferred, whereas for purines, attachment at the (N)-9 position is preferred.

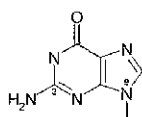
In one preferred embodiment, the base group, B, is selected from the following, or a protected form thereof:

WO 01/96357

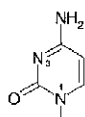
PCT/IB01/01392



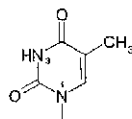
(from adenine)



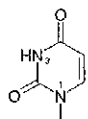
(from guanine)



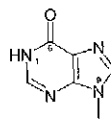
(from cytosine)



(from thymine)

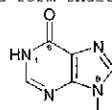


(from uracil)



(from sarcosine)

In one preferred embodiment, the base group, B, is the following, or a protected form thereof:



(from sarcosine)

- 5 The reactive functional groups of the base group, B, may be in protected or unprotected forms. Protected forms of such functional groups are well known in the art. For example, primary amines ($-NH_2$), such as those found in adenine, guanine, and cytosine, may be protected as an amide, for example, as isobutyramide or benzamide. Such protection is often employed during oligonucleotide synthesis.

The term "protected," as used herein, refers to functional groups which are essentially unreactive towards other available functional groups under specified conditions. The term "functional group protection" is used herein in the conventional chemical sense to refer to common chemical methods employed to reversibly render unreactive a functional group, which otherwise would be reactive, under specified conditions (such as pH, temperature, radiation, solvent, and the like). A wide variety of such "protecting," "blocking,"

WO 01/46357

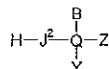
PCT/IB01/01392

or "masking" methods are widely used and well known in organic synthesis. For example, a compound which has two nonequivalent reactive functional groups, both of which would be reactive under specified conditions, may be derivatized to render one of the functional groups "protected," and therefore unreactive, under the specified conditions; so protected, the compound may be used as a reactant which has effectively only one reactive functional group. After the desired reaction (involving the other functional group) is complete, the protected group may be "deprotected" to return it to its original functionality.

Reactive Conjugating Group, W

The term "reactive conjugating group," as used herein, refers to a functional group which reacts with the $-C(=O)X^2$ group of the linker reagent to form a covalent linkage, and thereby form a conjugate therewith.

In a preferred embodiment, the reactive conjugating group, W, is $-J^2-H$, wherein J^2 is $-O-$, $-NH-$, or $-S-$, that is, the reactive conjugating group, W, is $-OH$, $-NR_2$, or $-SH$, respectively. In this case, the cyclic reagent has the following formula:



In one preferred embodiment, the reactive conjugating group is $-OH$ or $-NH_2$. In one preferred embodiment, the reactive conjugating group is $-OH$.

When the reactive conjugating group is $-J^2-H$, the covalent linkage formed upon reaction with $-C(=O)X^2$ is $-C(=O)-J^2$, that is, $-C(=O)-O-$, $-C(=O)-NH-$, and $-C(=O)-S-$, respectively.

As discussed below, the reactive conjugating group may be activated, for example, by the presence of a base such as N-methylimidazole (NMI) and/or 4-dimethylaminopyridine

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

(DMAP). Such activation facilitates and/or accelerates the reaction between the reactive conjugating group and the $-C(=O)X^2$ group of the linker reagent.

5 Oligosynthesis Group, Y

The term "oligosynthesis group," as used herein, refers to a functional group, or a protected functional group, which facilitates oligosynthesis, that is, a group which, when in a
10 deprotected and/or derivatized form, will react with a suitable monomer to initiate growth of desired oligomer.

In one embodiment, the oligosynthesis group, Y, is $-OH$, $-NH_2$, or $-SH$, or a protected form thereof. In one embodiment, the
15 oligosynthesis group, Y, is $-OH$ or a protected form thereof.

In one embodiment, the oligosynthesis group, Y, is $-OH$, $-NH_2$, or $-SH$ in a protected form, and which is deprotected under the deprotection conditions used in oligosynthesis. For
20 example, the group may be deprotected under the conditions used in the deprotection step in conventional oligonucleotide (e.g., phosphoramidite) synthesis cycle, and thus be available as the anchor for attachment of the first nucleotide. Typically and preferably, the deprotection step
25 employs acidic conditions.

Examples of suitable protecting groups, R, which protect $-OH$ as $-OR$, include, but are not limited to:

- t-butyl (tBu);
- 30 4-dimethoxytrityl (MMT);
- 4,4'-dimethoxytrityl (DMT);
- 4,4',4''-tris-(benzyloxy)trityl (TETr);
- 4,4',4''-tris-(4,5-dichlorophthalimido)trityl (CPTr);
- 4,4',4''-tris-(levulinoyloxy)trityl (TLTr);
- 35 3-(imidazolylmethyl)-4-4'-dimethoxytrityl (IDTr);
- 9-phenylxanthen-9-yl (pixyl);
- 9-(p-methoxyphenyl)xanthen-9-yl (Mox);
- 4-decyloxytrityl (C_{10} Tr);
- 4-hexadecyloxytrityl (C_{16} Tr);

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

9-(4-octadecyloxyphenyl)xanthene-9-yl ($C_{18}Px$); and,
 1,1-bis-(4-methoxyphenyl)-1'-pyrenyl methyl (BMPM).

Examples of suitable protecting groups, $-C(=O)OR$, which
 5 protect $-NH_2$ as $-NH-C(=O)-OR$, include, but are not limited to:
 tert-butoxy carbonyl ($-C(=O)-OC(CH_3)_3$, t-BOC); and,
 benzyloxy carbonyl ($-C(=O)-OCH_2Ph$, CBZ).

These and other suitable protecting groups are described, for
 10 example, in Beaucage et al., 1992.

Auxiliary Group, Z

The term "auxiliary group," as used herein, refers to a group
 15 which is optional, and which, if present, is a functional
 group or, more preferably, a protected functional group. In
 one embodiment, the auxiliary group is protected and is
 stable during conventional (e.g., phosphoramidite)
 20 oligonucleotide synthesis, and, following synthesis, is
 deprotected concurrently with cleavage, that is, under
 conventional cleavage conditions. Thus, the auxiliary group,
 in protected form, is typically different from the
 oligosynthesis group, in protected form, since the former is
 25 stable during oligosynthesis and the latter is deprotected,
 or in a deprotected form, during one or more steps of
 oligosynthesis.

The auxiliary group, Z, may, in protected or deprotected
 form, interact with, and/or form a functional group together
 30 with, the oligosynthesis group, Y.

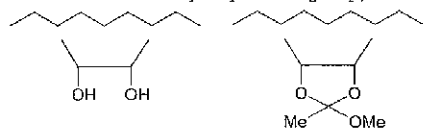
In one embodiment, the auxiliary group, Z, is $-OH$, $-NH_2$, or
 $-SH$, or a protected form thereof. In one preferred
 embodiment, the auxiliary group is $-OH$ or a protected form
 35 thereof.

In one preferred embodiment, both the auxiliary group, Z, and
 the oligosynthesis group, Y, in deprotected form, are $-OH$,
 and, in protected form, together form part of a cyclic

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

structure with an O-O-methoxyethylidene group, shown below:



In one preferred embodiment, the auxiliary group, in deprotected form, is -OH, and in protected form is -OR, wherein R is an acyl group, a C₁₋₇alkyl group, or a silyl group.

In one preferred embodiment, the auxiliary group, in deprotected form, is -OH, and in protected form is -OR, wherein R is an acyl group.

The term "acyl group," as used herein, pertains to a moiety of the formula -C(=O)R, wherein R is an acyl substituent, for example, a C₁₋₇alkyl group (to give a group referred to as C₁₋₇alkylacyl), a C₃₋₂₀heterocyclyl group (to give a group referred to as C₃₋₂₀heterocyclylacyl), or a C₅₋₂₀aryl group (to give a group referred to as C₅₋₂₀arylacyl), preferably a C₁₋₇alkyl group. Examples of acyl groups include, but are not limited to, -C(=O)CH₃ (acetyl), -C(=O)CH₂CH₃ (propionyl), -C(=O)CH₂CH₂CH₃ (n-butanoyl), -C(=O)C(CH₃)₃ (t-butanoyl), and -C(=O)Ph (benzoyl).

The term "C₁₋₇alkyl group," as used herein, pertains to monovalent alkyl groups having from 1 to 7 carbon atoms, which may be aliphatic or alicyclic, or a combination thereof, and which may be saturated, partially unsaturated, or fully unsaturated.

Examples of saturated linear C₁₋₇alkyl groups include, but are not limited to, methyl, ethyl, n-propyl, n-butyl, and n-pentyl (amyl).

Examples of saturated branched C₁₋₇alkyl groups include, but are not limited to, iso-propyl, iso-butyl, sec-butyl,

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

tert-butyl, and neo-pentyl.

Examples of saturated alicyclic (carbocyclic) C₁₋₇alkyl groups (also referred to as "C₃₋₇cycloalkyl" groups) include, but are not limited to, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, and cyclohexyl, as well as groups which comprise such groups, including, but not limited to, cyclopropylmethyl and cyclohexylmethyl.

10 Examples of unsaturated C₁₋₇alkyl groups which have one or more carbon-carbon double bonds (also referred to as "C₂₋₇alkenyl" groups) include, but are not limited to, ethenyl (vinyl) and 2-propenyl (allyl).

15 Examples of unsaturated C₁₋₇alkyl groups which have one or more carbon-carbon triple bonds (also referred to as "C₂₋₇alkynyl" groups) include, but are not limited to, ethynyl (ethynyl) and 2-propynyl (propargyl).

20 Examples of unsaturated alicyclic (carbocyclic) C₁₋₇alkyl groups which have one or more carbon-carbon double bonds (also referred to as "C₃₋₇cycloalkenyl" groups) include, but are not limited to, cyclopropenyl and cyclohexenyl, as well as groups which comprise such groups, including but not limited to cyclopropenylmethyl and cyclohexenylmethyl.

The term "C₃₋₂₀heterocyclyl," as used herein, pertains to a monovalent moiety obtained by removing a hydrogen atom from a ring atom of an alicyclic (i.e., non-aromatic cyclic) compound, said compound having one ring, or two or more rings (e.g., spiro, fused, bridged), having from 3 to 20 ring atoms, of which from 1 to 10 are ring heteroatoms, including, but not limited to, nitrogen, oxygen, and sulfur. Preferably, each ring has from 3 to 7 ring atoms, of which from 1 to 4 are ring heteroatoms. "C₃₋₂₀" denotes ring atoms, whether carbon atoms or heteroatoms.

Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having one nitrogen ring atom include, but are not limited to, those derived from

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

aziridine, azetidine, pyrrolidine, pyrroline, pyrrolinone, piperidine, dihydropyridine, and tetrahydropyridine.

5 Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having one oxygen ring atom include, but are not limited to, those derived from oxirane, oxetane, oxolane (tetrahydrofuran), oxole (dihydrofuran), oxane (tetrahydropyran), dihydropyran, and pyran.

10 Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having one sulfur ring atom include, but are not limited to, those derived from thiolane and tetrahydrothiopyran.

15 Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having two oxygen ring atoms include, but are not limited to, those derived from dioxane.

20 Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having two nitrogen ring atoms include, but are not limited to, those derived from imidazolidine, imidazoline, and piperazine.

25 Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having one nitrogen ring atom and one oxygen ring atom include, but are not limited to, those derived from tetrahydrooxazole, dihydrooxazole, tetrahydroisoxazole, dihydroisoxazole, morpholine, tetrahydrooxazine, and dihydrooxazine.

30 Examples of C₃₋₂₀heterocyclyl groups having one oxygen ring atom and one sulfur ring atom include, but are not limited to, oxathiolane and oxathiane.

35 The term "C₅₋₂₀aryl," as used herein, pertains to a monovalent moiety obtained by removing a hydrogen atom from a ring atom of an aromatic compound (a C₅₋₂₀arene), said compound having one ring, or two or more fused rings, and having from 5 to 20 ring atoms. The ring atoms may be all carbon atoms, as in "carboaryl groups," or may include one or more heteroatoms (including but not limited to oxygen, nitrogen, and sulfur), as in "heteroaryl groups." In the latter case, the group may

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

conveniently be referred to as a "C₃₋₂₀heteroaryl" group, wherein "C₃₋₂₀" denotes ring atoms, whether carbon atoms or heteroatoms. Preferably, each ring has from 3 to 7 ring atoms, of which from 0 to 4 are ring heteroatoms.

5

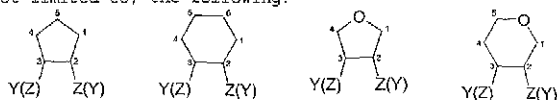
Examples of C₃₋₂₀aryl groups which do not have heteroatoms (i.e., (carboaryl groups) include, but are not limited to, phenyl, naphthyl, anthracenyl, phenanthrenyl, and pyrene.

- 10 Examples of C₃₋₂₀heteroaryl groups include, but are not limited to, pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, triazolyl, pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, triazinyl, furanyl, thienyl, thiazolyl, isothiazolyl, pyranyl, pyronyl, benzopyronyl, oxazolyl, isoxazolyl, oxadiazolyl, 15 oxatriazolyl, oxathiazolyl, and oxathiazinyl.

- The term "silyl group," as used herein, pertains to a moiety of the formula -SiR₃, where R is a silyl substituent, for example, -H, a C₁₋₂₀alkyl group, a C₃₋₂₀heterocyclyl group, or a 20 C₃₋₂₀aryl group, preferably -H, a C₁₋₂₀alkyl group, or a C₃₋₂₀aryl group. Examples of silyl groups include, but are not limited to, -SiH₃, -SiH₂(CH₃), -SiH(CH₃)₂, -Si(CH₃)₃, -Si(t-Bu)(CH₃)₂, -Si(i-Pr)₃, and -Si(t-Bu)₃.

25 Examples of Cyclic Reagents

- In one preferred embodiment, the oligosynthesis group, Y, and the optional auxiliary group, Z, are linked directly to cyclic group, Q, by a covalent bond, and are positioned 30 "vicinal" (i.e., Y and Z are attached to adjacent carbon ring atoms of the cyclic group, Q). Examples of cyclic moieties, Q, with vicinally attached Y and Z groups, include, but are not limited to, the following.



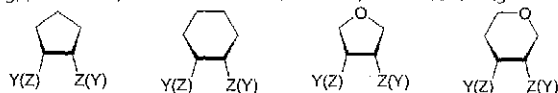
- 35 The notation "Y(Z)" and "Z(Y)" indicates all four of the

WO 01/46357

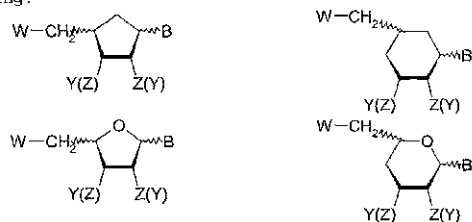
PCT/IB01/01392

possibilities: 3'-Y-2'-Z; 3'-Z-2'-Y; 3'-Y-2'-H (where Z is absent, i.e., Z is -H); and 3'-H-2'-Y (where Z is absent, i.e., Z is -H).

- 5 In one preferred embodiment, the Y and Z groups are also positioned "cis." Examples of such cyclic moieties, Q, with cis-vicinally attached Y and Z groups (both "down," below the ring), include, but are not limited to, the following:



- 10 In one preferred embodiment, the W group is covalently linked to the cyclic group, Q, via a -CH₂- group, and the B group is directly linked to the cyclic moiety, Q. Examples of such cyclic reagents include, but are not limited to, the following:



15

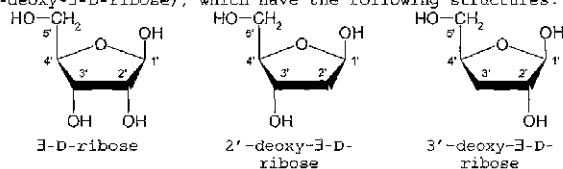
- In one embodiment, the cyclic reagent resembles a monosaccharide sugar. Sugars, in cyclic form, are conventionally named according to the number of ring atoms. For example, a furanose has a 5-membered ring and a pyranose has a 6-membered ring. Sugars are also conventionally named according to the overall number of carbon atoms. For example, a pentose has 5 carbon atoms and a hexose has 6 carbon atoms. Sugars, in cyclic form, are further conventionally named using prefixes, such as ribo-, lyxo-, xylo-, galacto-, sucro-, fructo-, and arabino-, according both to number of carbon atoms and the orientation of the ring substituents. Furthermore, sugars may be in any of

WO 01/96357

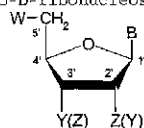
PCT/IB01/01392

their enantiomeric, diastereomeric or stereoisomeric forms (e.g., D-, L-, V-, E-, and combinations thereof).

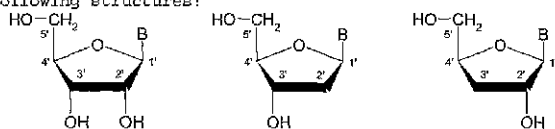
- In one preferred embodiment, the cyclic reagent resembles
 5 E-D-ribofuranose (also referred to as E-D-ribose),
 2'-deoxy-E-D-ribofuranose (also referred to as 2'-deoxy-E-D-ribose), or 3'-deoxy-E-D-ribofuranose (also referred to as 3'-deoxy-E-D-ribose), which have the following structures:



- 10 Thus, in one preferred embodiment, the cyclic reagent has the following structure. When Z is present, the compound is a E-D-ribonucleoside. When Z is absent (i.e., Z is -H), the compound is a 2'-deoxy-E-D-ribonucleoside.



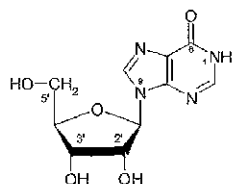
- 15 In one preferred embodiment, W is -OH, Y is -OH or a protected form thereof, and Z, if present, is -OH or a protected form thereof, for example, as shown in the following structures:



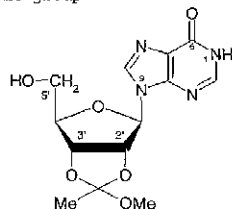
- In one preferred embodiment, the cyclic reagent is inosine,
 20 shown below, or a protected form thereof.

WO 01/96357

PCT/IB01/01392



In one preferred embodiment, the cyclic reagent is the inosine derivative, 9-β-D-(2'-3'-O-methoxyethylidene-ribofuranosyl)hypoxanthine, shown below, in which the 2'- and 3'- hydroxyl groups have been jointly protected as an O-methoxyethylidene group.



Reaction Apparatus

10 As mentioned above, one step of the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis involves: removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation, as may be achieved, for example, by using an evaporation apparatus.

15 Thus, in one embodiment, one or more steps of the method is performed using (i.e., within) an evaporation apparatus. In one embodiment, at least the step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation is performed using an evaporation apparatus.

20 In one embodiment, at least the step of reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent,

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

and the step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation, are performed using an evaporation apparatus.

- 5 In one embodiment, at least the steps of reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent, removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation, and reacting said pendant linker group with a cyclic reagent, are performed using an
10 evaporation apparatus.

In another embodiment, all of the steps of the method are performed using an evaporation apparatus.

- 15 The term "evaporation apparatus," as used herein, pertains to any apparatus suitable for carrying out chemical reactions, such as those in the steps of the present method, which facilitates both airtight anhydrous conditions (e.g., a sealed environment under a dry atmosphere, such as dry air,
20 dry nitrogen, dry argon) and evaporative removal of one or more reaction mixture components (e.g., reagent, product, by-product, solvent, and the like), particularly excess linker reagent.

- 25 Examples of suitable apparatus include, but are not limited to, a rotavapor apparatus and a distillation apparatus. In one preferred embodiment, the apparatus is a rotavapor apparatus, for example, Model R-114, from Büchi®.

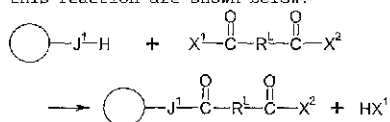
30 Reaction of Support with Linker Reagent

- As mentioned above, one step of the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis involves an "activating" step: reacting a pendant functional
35 group of a solid support with a linker reagent, thereby forming a pendant linker group.

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

Examples of this reaction are shown below.



In general, the linker reagent is reactive towards water, and this is particularly true for the oxalyl dihalides, where R^b is a covalent bond. Consequently, in order to avoid degradation of the linker reagent, the activating step is preferably performed under anhydrous conditions, for example, in a sealed, airtight environment, under an dry atmosphere (e.g., dry air, dry nitrogen, dry argon), as may be achieved, for example, by using an evaporation apparatus. Higher yields are obtained using more anhydrous conditions.

As mentioned above, one step of the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis involves: removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation.

The term "evaporation," as used herein, pertains to the removal of a reaction mixture component (e.g., reagent, product, by-product, solvent, and the like), from the desired product, as a gas or vapour, via the gas or vapour phase.

Preferably, the linker reagent is selected to be a volatile compound, more preferably a volatile liquid, at the relevant temperature. When the linker reagent is so selected, excess linker reagent may be easily removed from the reaction mixture by evaporation, for example, by the application of reduced pressure and/or increased temperature. In this way, no additional purification is required, and this provides a substantial advantage over methods which require a separate, intensive, and often time consuming, purification step, to remove excess activating agent (e.g., linker reagent) which would otherwise lead to undesired side-reactions and

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

by-products. For example, prior art methods invariably require a separate purification step between activation of the solid support and subsequent reaction with an initiating compound (e.g., cyclic reagent), or between activation of an
5 initiating compound and subsequent reaction with the solid support.

Thus, in one embodiment, the evaporation is achieved by the application of reduced pressure and/or increased temperature.
10 In one preferred embodiment, the evaporation is achieved by the application of reduced pressure. In one preferred embodiment, the evaporation is achieved by the application of increased temperature.

15 In one embodiment, the step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent is achieved solely by evaporation, that is, by evaporation and without the use of other non-evaporative methods of purification, such as filtration, blotting, washing (e.g., with one or more
20 solvents or solvent mixtures), drying (e.g., over MgSO_4), solvent partitioning (e.g., between two or more solvents or solvent mixtures), trituration, or chromatography (e.g., column chromatography).

25 In one embodiment, the step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation (or solely by evaporation) involves removing a substantial portion of excess unreacted linker reagent, preferably at least 50% of excess unreacted linker, more preferably at least 60%, more
30 preferably at least 70%, more preferably at least 80%, more preferably at least 90%.

In one embodiment, the step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent is achieved by evaporation.
35 (or solely by evaporation), and, additionally, without the addition of a solvent or co-solvent (e.g., pyridine, methanol), as used, for example, in co-evaporation methods.

In one embodiment, the step of removing at least a portion of

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

excess unreacted linker reagent is achieved by evaporation (or solely by evaporation), and, additionally, without the use of a desiccant (e.g., P_2O_5), as used, for example, in desiccation methods.

- 5
Preferably, the solid support is substantially dry before use, as may be achieved, for example, by drying in an oven (e.g., 30 min at 100°C).
- 10 Suitable relative amounts of reagents and reaction conditions (e.g., temperature, time, and the like) may readily be determined by the skilled artisan.

- In one preferred embodiment, from about 100 to about 1500 mL
15 of linker compound is used for each 100 g of solid support, more preferably from about 200 to about 1000 mL of linker compound, more preferably from about 300 to about 800 mL of linker compound.

- 20 In one preferred embodiment, the reaction is carried out at a reaction temperature of from about 0°C to about 100°C, more preferably from about 20°C to about 100°C.

- In one preferred embodiment, the reaction is carried out for
25 a reaction time of from about 1 to about 240 min, more preferably from about 5 to about 120 min.

Optional Capping

- 30 As mentioned above, the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis optionally includes a "capping step" for pendant functional groups.

- Thus, in one embodiment, the method further comprises, after
35 said step of reacting a pendant functional group of a solid support with a linker reagent, or, after said step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation, a step of:

(i) reacting at least a portion of any remaining pendant

WO 01/46357

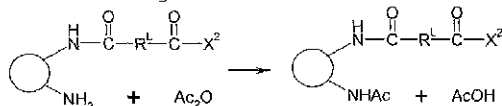
PCT/IB01/01392

functional groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped functional groups.

Following the reaction of the pendant functional group of a solid support with a linker reagent, an optional "capping" step may be performed, in which "unused" pendant functional groups (i.e., pendant functional groups which have not reacted with a linker reagent) are converted to a protected or otherwise unreactive form.

10

For example, where the pendant functional group is -NH_2 , acetic anhydride (Ac_2O , $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{-O-C}(=\text{O})\text{CH}_3$) may be used, as shown in the following reaction.



15 Other suitable capping reagents and conditions are well known in the art, and may be used where appropriate.

Where the pendant functional group is -OH , examples of suitable capping reagents include, but are not limited to, anhydrides and esters.

20

Where the pendant functional group is -SH , examples of suitable capping reagents include, but are not limited to, haloacetamides.

25

In one preferred embodiment, the capping reagent is selected to be a volatile liquid at, or near to, room temperature, so that excess capping reagent, and possibly capping by-products, can also be removed by evaporation, as described above for the excess linker reagent.

30

Suitable relative amounts of reagents and reaction conditions (e.g., temperature, time, and the like) may readily be determined by the skilled artisan.

35

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

In one preferred embodiment, from about 10 to about 200 mL of acetic anhydride, as capping reagent, and from about 1 to about 20 mL of N-methylimidazole (NMI) and/or from about 0.5 to about 2 g of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) is used for each 100 g of solid support. In one preferred embodiment,

from about 20 to about 100 mL of acetic anhydride, as capping reagent, and from about 2 to about 10 mL of N-methylimidazole (NMI) and/or about 1 g of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) is used for each 100 g of solid support.

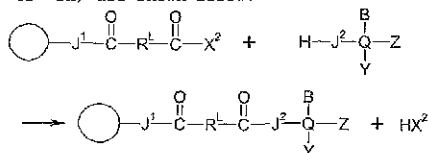
In one preferred embodiment, the reaction is carried out at a reaction temperature of from about 0°C to about 60°C, more preferably from about 20°C to about 40°C.

In one preferred embodiment, the reaction is carried out for a reaction time of from about 1 to about 60 min, more preferably from about 2 to about 30 min.

Reaction of Linker with Cyclic Reagent

As mentioned above, one step of the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis involves a "coupling" step: reacting the pendant linker group with a cyclic reagent, thereby forming a pendant cyclic group.

Examples of this reaction, wherein the reactive conjugating group, W, is $-J^2-H$ and J^2 is $-NH-$, $-O-$, or $-S-$ (i.e., W is $-NH_2$, $-OH$, or $-SH$) are shown below.



The reactive conjugating group may be activated, for example, by the presence of a base such as N-methylimidazole (NMI) and/or 4-dimethylaminopyridine (DMAP). Such activation

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

facilitates and/or accelerates the reaction between the reactive conjugating group and the $-C(=O)X^2$ group of the linker reagent. This base may also combine with the HX^2 (e.g., HCl, HBr, HI) liberated by reaction with the $-C(=O)X^1$ group of the linker reagent. Examples of such bases include, but are not limited to, aqueous NaOH, aqueous KOH, pyridine, dimethylaminopyridine (DMAP), and N-methylimidazole (NMI).

Suitable relative amounts of reagents and reaction conditions (e.g., temperature, time, and the like) may readily be determined by the skilled artisan.

In one preferred embodiment, from about 5 to about 8 g of cyclic reagent in from about 200 to about 600 mL of pyridine, and from about 20 to about 60 mL of N-methylimidazole (NMI) is used for each 100 g of solid support. In one preferred embodiment, from about 6 to about 7 g of cyclic reagent in from about 300 to about 500 mL of pyridine, and from about 30 to about 50 mL of N-methylimidazole (NMI) is used for each 100 g of solid support.

In one preferred embodiment, the reaction is carried out at a reaction temperature of from about 0°C to about 60°C, more preferably from about 20°C to about 40°C.

In one preferred embodiment, the reaction is carried out for a reaction time of from about 5 to about 60 min, more preferably from about 10 to about 30 min.

Optional Capping

As mentioned above, the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis optionally includes a "capping step" for pendant linker groups.

Thus, in one embodiment, the method further comprises, after said step of reacting said pendant linker group with a cyclic reagent, a step of:

(i) reacting at least a portion of any remaining pendant

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

linker groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped linker groups.

Following the reaction of the pendant linker groups with a cyclic reagent, an optional "capping" step may be performed, in which "unused" pendant linker groups (i.e., pendant linker groups which have not reacted with a cyclic reagent) are converted to a protected or otherwise unreactive form.

Examples of suitable capping reagents and conditions are described above.

Optional Purification

As mentioned above, the preparation of a solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis optionally includes a step of: removing at least a portion of excess unreacted cyclic reagent, capping reagent (if applicable), and by-products thereof.

Any suitable method may be used to effect this removal. In one preferred embodiment, the removal is achieved by filtration, for example, using a fritted glass funnel, for example, ROBU-POR-2® from Elvetec®.

A chemical scheme illustrating the preparation of a preferred class of universal solid supports of the present invention is shown in Figure 1, including an optional final deprotection step, which is typically the first step of oligonucleotide synthesis.

A chemical scheme illustrating the preparation of the universal solid support described in the Example is shown in Figure 2, including an optional final deprotection step, which is typically the first step of oligonucleotide synthesis.

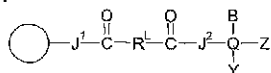
Universal Solid Supports

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

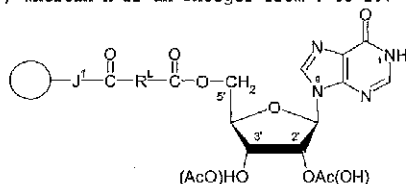
As mentioned above, one aspect of the present invention pertains to universal solid supports, for example, as prepared by the methods described herein.

- 5 In one embodiment, the universal solid support has the following formula:

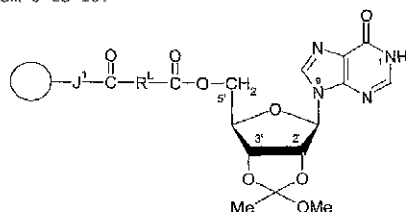


wherein J^1 , J^2 , R^L , B , Y , and Z are as defined herein.

- 10 In one preferred embodiment, the universal solid support is the following, or a protected form thereof, wherein J^1 and R^L are as defined herein, or more preferably, J^1 is $-\text{NH}-$ and R^L is $-(\text{CH}_2)_n-$, wherein n is an integer from 0 to 10:



- 15 In one preferred embodiment, the universal solid support is the following, wherein J^1 and R^L are as defined herein, or more preferably, J^1 is $-\text{NH}-$ and R^L is $-(\text{CH}_2)_n-$, wherein n is an integer from 0 to 10:

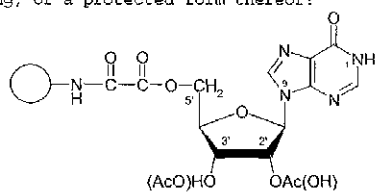


- 20 In one preferred embodiment, the universal solid support is

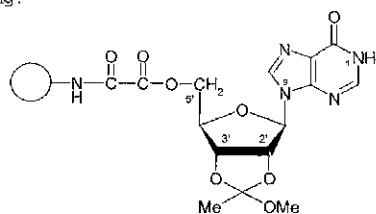
WO 01/96357

PCT/IB01/01392

the following, or a protected form thereof:



In one preferred embodiment, the universal solid support is the following:



WO 01/46357

PCT/IB01/01392

Oligonucleotides

As used herein, the terms "oligonucleotide" and
 5 "polynucleotide" are used interchangeably in the conventional
 sense to refer to molecules comprising two (hence 2-mer) or
 more (hence n-mer) nucleosides, each nucleoside being linked
 to at least one other nucleoside by an internucleoside
 linkage. The term "nucleoside" is used herein in the
 10 conventional sense and generally refers to compounds
 comprising a "sugar" moiety (e.g., ribose, 2'-deoxyribose)
 linked to a "nucleic acid base" (e.g., purines, pyrimidines).
 Examples of well-known nucleosides formed from ribose and
 adenine, guanine, uracil, and cytosine are, respectively, the
 15 "ribonucleosides": adenosine, guanosine, uridine, and
 cytidine. Examples of well-known nucleosides formed from
 deoxyribose and adenine, guanine, thymine, and cytosine are
 respectively, the "deoxyribonucleosides": deoxyadenosine,
 deoxyguanosine, deoxythymidine, and deoxycytidine. Examples
 20 of well-known internucleoside linkages include phosphate
 diester groups, $-OP(=O)(OH)O-$; phosphate triester groups,
 $-OP(=O)(OR')O-$; phosphite diester groups, $-OP(OH)O-$;
 phosphite triester groups, $-OP(OR')O-$; and phosphonate
 groups, $-OP(=O)(R)O-$.

25 Oligonucleotides may conveniently be considered to be
 "nucleotide" polymers, that is, polymers comprised of
 nucleotide monomer units. The oligonucleotide may be linear,
 branched, or cyclic, but is typically linear. The term
 30 "nucleotide" conventionally refers to a phosphate ester of a
 nucleoside; that is, a chemical moiety comprising a phosphate
 group (i.e., $-OP(=O)(OR)_2$, where each R may independently be
 $-H$, a cation, or an organic group), a sugar moiety, and a
 nucleic acid base. Examples of well-known nucleotides formed
 35 from ribose and adenine, guanine, uracil, and cytosine are,
 respectively, the "5' (or 3')-ribonucleotides": adenosine
 5' (or 3')-monophosphate, guanosine 5' (or 3')-monophosphate,
 uridine 5' (or 3')-monophosphate, and cytidine 5' (or 3')-
 monophosphate. Examples of well-known nucleotides formed

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

from deoxyribose and adenine, guanine, thymine, and cytosine are respectively, the "5' (or 3')-2'-deoxyribonucleotides": deoxyadenosine 5' (or 3')-monophosphate, deoxyguanosine 5' (or 3')-monophosphate, deoxythymidine 5' (or 3')-monophosphate, and deoxycytidine 5' (or 3')-monophosphate.

Deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) are important examples of oligonucleotides. In these oligonucleotides, all internucleoside bridges are phosphate diester linkages (-OP(=O)(OH)O-) and are uniformly in a 5'-3' orientation; DNA is a polymer of deoxyribonucleotides involving primarily the nucleic acid bases adenine, guanine, cytosine, and thymine, whereas RNA is a polymer of ribonucleotides involving primarily the nucleic acid bases adenine, guanine, cytosine, and uracil. As a matter of convention, simple ribo- and deoxyribonucleotides and their polymers are represented by their bases (i.e., A, G, C, and U; or dA, dG, dC, and T (or dT), respectively), listed from the 5'-end of the oligonucleotide to the 3'-end of the oligonucleotide, wherein "d" denotes a deoxyribonucleotide. (Note that thymidine is often referred to "deoxythymidine" and abbreviated as "dT".) For example, dGT is the dinucleotide of formed from deoxyguanosine and deoxythymidine, wherein the deoxyguanosine 5'-position is 5'-OH; the 3'-position of deoxyguanosine is linked to the 5'-position of the thymidine via a phosphate diester group; and the 3'-position of the thymidine is 3'-OH.

Oligosynthesis Using the Universal Solid Support

The universal solid support may be used in any method of solid-phase oligosynthesis capable of utilizing an protected or unprotected oligosynthesis group, Y, for example, -OH, -NH₂, -SH, or a protected form thereof. For example, the universal solid support may be used in solid-phase oligonucleotide synthesis.

Typically, the first step of any oligonucleotide synthesis method is an acid treatment of a functionalized solid

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

support, to deprotect a functional group (e.g., an oligosynthesis group) for reaction with the first monomer reagent. Thus, if the oligosynthesis group, Y, is in a protected form, is it preferably deprotected by the same acid treatment used in oligonucleotide synthesis cycle.

Solid-phase oligonucleotide syntheses initially employed the use of phosphate triesters (the "triesters method") or phosphites (the "phosphite method"). With the discovery of relatively stable mononucleoside phosphoramidite coupling units (see, for example, Beaucage et al., 1981), solid-phase oligonucleotide synthesis became practical and common. Typical solid-phase oligonucleotide synthesis involves reiteratively performing four steps: deprotection, coupling, capping, and oxidation.

Standard methods involve stepwise synthesis of the oligonucleotide in the 5'-direction (i.e., 365). In the first step ("deprotection"), the growing oligonucleotide, which is attached at the 3'-end via a 3'-O group to a solid support, is 5'-deprotected to provide a reactive group (i.e., a 5'-OH group). For example, the 5'-OH group is often protected by reaction with 4,4'-dimethoxytrityl chloride (DMT-Cl) in pyridine, to yield a 5'-O-DMT group, which is stable under basic conditions, but which is easily deprotected under acid conditions, for example, in the presence of dichloroacetic acid (DCA) or trichloroacetic acid (TCA).

In the second step ("coupling"), the 5'-deprotected supported oligonucleotide is reacted with the desired nucleotide monomer, which itself has first been converted to a 5'-protected, 3'-phosphoramidite. For example, the 5'-OH group may be protected in the form of a 5'-ODMT group and the 3'-OH group may be converted to a 3'-phosphoramidite, such as $-OP(OR')NR_2$, where R is, for example, an isopropyl group, $-CH(CH_3)_2$, an ethyl group, $-CH_2CH_3$, or a methyl group, $-CH_3$, and R' is, for example, $-H$ (yielding a phosphoramidite diester), or $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, the 3-cyanoethyl group, $-CH_2CH_2CN$, or $-C_2H_4Cl$.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

(yielding a phosphoramidite triester). The 3'-phosphoramidite group of the monomer reacts with the deprotected 5'-OH group of the growing oligonucleotide to yield the phosphite linkage 5'-OP(OR')O-3'. See, for example, Caruthers et al., 1995.

Not all of the growing oligonucleotides will couple with the provided monomer; those which have not "grown" would yield incomplete oligonucleotides and therefore must be withdrawn from further synthesis. This is achieved by the third step ("capping"), in which all remaining -OH groups (i.e., unreacted 5'-OH groups) are capped, for example, in the form of acetates (5'-OC(O)CH₃) by reaction with acetic anhydride (CH₃C(=O)-O-C(=O)CH₃). Note that, in some cases, this deprotection step follows, rather than precedes, the oxidation step discussed below.

In the fourth step ("oxidation"), the newly formed phosphite group (i.e., 5'-OP(OR')O-3') of the growing oligonucleotide is converted to a phosphate group (i.e., 5'-OP(=O)(OR')O-3'), for example, by reaction with aqueous iodine and pyridine.

The four-step process may then be reiterated, since the oligonucleotide obtained after oxidation remains 5'-protected (e.g., 5'-ODMT) and is ready for use in the first deprotection step described above.

As example illustrating the first cycle of a phosphoramidite oligonucleotide synthesis method, starting with one preferred universal solid support of the present invention, is shown in Figure 1.

Although the phosphoramidite method has been discussed in detail above, the universal solid support described herein may also be used in other methods of solid-phase oligonucleotide synthesis. Examples of such methods include, but are not limited to, H-phosphonate methods (also known as phosphite methods; see, for example, Froehler et al., 1990; Froehler et al., 1986); and phosphate triester methods (see,

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

for example, Stec et al., 1985; Gallo et al., 1986; Gait, 1984).

The universal solid support described herein may also be used in other methods of solid-phase oligosynthesis to yield oligonucleotide derivatives and analogs. Examples of such products include, but are not limited to: DNA and RNA with various modifications at the 3'- and/or 5'-terminus; oligonucleoside methylphosphonates (Agarwal et al., 1987); phosphorothioate (Beaucage et al., 1990); phosphorodithioate (Bjergaard et al., 1991); DNA/RNA copolymers; phosphodiester/phosphorothioate copolymers; cyclic oligonucleotides (Wang et al., 1994); 2'-O-methyl RNA (Sproat et al., 1989); products containing peptide nucleic acids (Nielson et al., 1994); and, morpholine-type backbone modified nucleic acids (Stirchak et al., 1989; Summerton et al., 1991).

Cleavage from Solid Support

Following oligosynthesis, for example, when the desired oligonucleotide has been obtained, it may be cleaved from the solid support by treatment with a cleavage reagent in a cleavage step. The cleavage step is performed for a cleavage time, at a cleavage temperature.

The cleavage step achieves one or more, and preferably all, of the following results, in a single fast step:

(a) cleavage of the oligomer from the solid support, more particularly, cleavage of the bond between the bond between the linker group and the cyclic group.

(b) cleavage of the cyclic group from the oligomer, more particularly, cleavage of the bond between the phosphate and the oligomer. For example, a β -elimination reaction may yield a cyclic group with a cyclic phosphate group and the oligomer with a free -OH group.

(c) conversion of phosphate triesters $(-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}')\text{O}-)$ where R' is not H) to the phosphate diesters $(-\text{OP}(=\text{O})_2\text{O}-)$, if

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

present. Phosphate triesters may be present, for example, if a phosphoramidite synthesis method was used.

(d) deprotection of base-labile protected amino groups of nucleotide bases, if present. For example, if the primary amines of adenine, guanine, and cytosine had been protected as amides during oligosynthesis, they may be deprotected to yield free amino groups.

Two examples of the cleavage step are shown in Figures 2 and 3. In Figure 2, the oligomer is a oligonucleotide grown in a 3'65' direction, and attached to the solid support via a 5'-O group. The oligonucleotide cleavage product has a 5'-OH group. In Figure 3, the oligomer is a oligonucleotide grown in a 3'63' direction, and attached to the solid support via a 3'-O group. The oligonucleotide cleavage product has a 3'-OH group.

The cleavage is achieved by contacting the universal solid support bearing the oligonucleotides with a suitable cleavage reagent. In one embodiment, the cleavage reagent comprises one or more of the following: (a) a tertiary amine (NR_3), (b) a secondary amine (NHR_2), (c) a primary amine (RNH_2), and (d) ammonium hydroxide (NH_4OH).

Examples of suitable tertiary amines include, but are not limited to, triethylamine, diisopropylethylamine, N-methylpiperidine, and N-methylpyrrolidine. Examples of suitable secondary amines include, but are not limited to, dimethylamine, diethylamine, diisopropylamine, and piperidine. Examples of suitable primary amines include, but are not limited to, methylamine, ethylamine, and n-propylamine.

The relative amounts of (a) through (d) in the cleavage reagent may vary considerably, for example, from 1% to 99%, on a molar basis, if present. One of skill in the art is readily able to determine acceptable or optimum amounts.

In one preferred embodiment, the cleavage reagent comprises a

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

mixture of (i) a tertiary amine (NR_3) or a secondary amine (NHR_2), and (ii) a primary amine (RNH_2), or ammonium hydroxide (NH_4OH).

- 5 In one preferred embodiment, the cleaving reagent comprises methylamine. In one preferred embodiment, the cleaving reagent comprises methylamine and one or more other components.
- 10 Suitable relative amounts of reagents and reaction conditions (e.g., temperature, time, and the like) may readily be determined by the skilled artisan.

Preferably, the cleavage temperature is above room
15 temperature. In one embodiment, the cleavage temperature is 30EC or greater (e.g., 30-100EC). In one embodiment, the cleavage temperature is 50EC or greater (e.g., 50-100EC). In one embodiment, the cleavage temperature is 60EC or greater (e.g., 60-100EC). In one embodiment, the cleavage
20 temperature is 70EC or greater (e.g., 70-100EC). In one embodiment, the cleavage temperature is 80EC or greater (e.g., 80-100EC).

The cleavage time will vary according the cleavage reagent
25 and cleavage temperature chosen. Typically, the cleavage time is from 15 min to 24 hours. At a temperature of about 75EC, the cleavage time is about 1 hr.

As discussed above, in one preferred embodiment, the linker
30 group, R^1 , is a covalent bond, and the linker reagent is an oxalyl dihalide. In this embodiment, the resulting oxalyl linkage is particularly advantageous in that (a) it has a high reactivity imparted by an ester group adjacent to a carbonyl group, and as a consequence of stereoelectronic
35 effects related to this positioning, it is highly susceptible to cleavage by nucleophiles such as hydroxide, ammonia, and primary and secondary amines; and (b) it is stable to tertiary amines (for example, pyridine, lutidine) which are used in conventional DNA and RNA synthesis.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

Loading

The universal solid supports of the present invention may be prepared with a high loading. In one embodiment, the solid support has a loading of more than 30 $\mu\text{mole/g}$ (e.g., 30-100 $\mu\text{mole/g}$). In one embodiment, the solid support has a loading of more than 40 $\mu\text{mole/g}$ (e.g., 40-100 $\mu\text{mole/g}$). In one embodiment, the solid support has a loading of more than 50 $\mu\text{mole/g}$ (e.g., 50-100 $\mu\text{mole/g}$). In one embodiment, the solid support has a loading of 40-70 $\mu\text{mole/g}$.

EXAMPLE

The following example is provided solely to illustrate the present invention and is not intended to limit the scope of the invention, as described herein.

A universal solid support was prepared as described below, and as illustrated in the chemical scheme in Figure 2.

Oven-dried (100°C, 30 min) aminopropyl-CPG (100 g, 250 $\mu\text{mole/g}$, Cruachem®) was suspended in 500 mL (727.7 g) of oxalyl chloride (ClC(=O)-C(=O)Cl , Aldrich®) in a 2 litre flask using a rotavapor system (R-114, Büchi®), at high speed (240 rev/min) at room temperature under reduced pressure (approx. 500 mbar). After 10 min, the mixture was heated to 100°C over 120 min. Excess oxalyl chloride was evaporated after about 2.5 hr, to give a dry activated CPG (i.e., CPG with pendant linker groups).

A fresh solution of (a) 2'-3'-O-O-methoxyethylidene inosine in (b) dry pyridine and (c) N-methylimidazole (400 mL, 6.7 g of (a); 360 mL of (b), and 40 mL of (c)) was prepared immediately before use.

The above solution was added to the activated CPG in the rotavapor flask at high speed (240 rev/min) and at room temperature. The slurry was mixed for 20 min under reduced

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

pressure (approx. 500 mbar).

40 mL of acetic anhydride (10% of the volume of inosine
derivative) was added to the mixture, and the mixture allowed
5 to stand for 5 min a high speed (240 rev/min) under reduced
pressure (approx. 500 mbar).

The resulting beads were filtered on a glass-fritted funnel
and washed several times with pyridine (2 x 300 mL) and
10 acetonitrile (2 x 300 mL). The beads were dried (room
temperature) in vacuum and stored under vacuum at 4°C.

The 100 g of universal CPG thus obtained. The loading of
this CPG was controlled and showed that it was 60 μ mole/g.

15

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

REFERENCES

A number of patents and publications are cited above in order to more fully describe and disclose the invention and the state of the art to which the invention pertains. Full citations for these references are provided below. Each of these references is incorporated herein by reference in its entirety into the present disclosure.

- 10 Agarwal et al., 1987, Tetrahedron Letters, Vol. 28, p. 3539.
- Arnold, 1996, "Oligonucleotide Polymeric Support System," U.S. Patent No. 5,539,097 issued 23 July 1996.
- Arnold, 1994, "Oligonucleotide Polymeric Support System with an Oxidation Cleavable Link," U.S. Patent No. 5,362,866
15 issued 08 November 1994.
- Beaucage et al., 1990, J. Am. Chem. Soc., Vol. 112, p.1253.
- Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters, Vol. 22, pp. 1859-1862.
- 20 Beaucage et al., 1992, "Title," Tetrahedron, Vol. 48, pp. 2223-2311.
- Bjergarde et al., 1991, Nucleic Acids Research, Vol. 18, pp. 5843-5850.
- 25 Carruthers, 1995, U.S. Patent No. 4,415,732, issued November 15, 1995.
- DeBear et al., 1987, "A Universal Bead Support for Oligonucleotide Synthesis," Nucleosides & Nucleotides, Vol. 6, No. 5, pp. 831-830.
- 30 Eritja et al., 1991, Tetrahedron Letters, Vol. 32, pp. 1511-1514.
- Froehler et al., 1990, US patent No. 4,959,463 issued 25 September 1990.
- Froehler et al., 1986, Nucleic Acids Research, Vol. 14, pp. 5399-5407.
- 35 Gait, M.J., 1984, Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach, IRL Press.
- Gallo et al., 1986, Nucleic Acids Research, Vol. 14, pp. 7405-7420.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

- Koeester et al. et al., 1990, U.S. Patent No. 4,923,901 issued 08 May 1990.
- Letsinger et al., 1992, "Labile Anchors for Solid Phase Polynucleotide Synthesis," U.S. Patent No. 5,112,962 issued
5 12 May 1992.
- Lyttle et al., 1996, "A new Universal Linker for Solid Phase DNA Synthesis," Nucleic Acids Research, Vol. 24, No. 14, pp. 2793-2798.
- McLean et al., 1997, "Compounds," U.S. Patent No.
10 5,681,945 granted 28 October 1997.
- Nelson et al., 1989, "Bifunctional Oligonucleotide Probes Synthesized Using a Novel CPG Support are able to Detect Single Base Pair Mutations," Nucleic Acids Research, Vol. 17, No. 18, pp. 7187-7193.
- 15 Nielson et al, 1994, Bioconjugate Chem, Vol. 5, p. 3.
- Pon et al., 1997, Tetrahedron Letters, Vol. 38, pp. 3327-3330.
- Reddy et al., 1997, "Universal Solid Supports and Methods for Their Use," International Patent Publication
20 number WO 97/40458, published 30 October 1997.
- Scheuch-Larsen et al., 1997, "Introduction of a Universal Solid Support for Oligonucleotide Synthesis," Nucleosides and Nucleotides, Vol. 16, Nos. 1&2, pp. 67-80.
- Schwartz et al., 1995, "A Universal Adapter for Chemical
25 Synthesis of DNA or RNA on any Single Type of Solid Support," Tetrahedron Letters, Vol. 36, No. 1, pp. 27-30.
- Sproat et al, 1989, Nucleic Acids Research, Vol. 18, pp. 3373-3386.
- Stec et al., 1985, Tetrahedron Letters, Vol. 26, p. 2191.
30
- Stirchak et al, 1989, Nucleic Acids Research, Vol. 17, pp. 6129-6141.
- Summerton et al., 1991, US patent No. 5,034,506 issued 23 July 1991.
- 35 Tracy et al., 1997, Bioconjugate Chemistry, Vol. 8, pp. 99-102.
- Vu et al., 1995, "Use of Phthaloyl Protecting Group for the Automated Synthesis of 3'-[(Hydroxypropyl)amino] and 3'-[(Hydroxypropyl)triglycyl] Oligonucleotide Conjugates,"

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

Bioconjugate Chem., Vol. 6, pp. 599-607.

Wang et al., 1994, Nucleic Acids Research, Vol. 22,
pp. 2326-2333.

- Webb et al., 1987, "Support for Solid-Phase
5 Oligonucleotide Synthesis," U.S. Patent No. 4,659,774 issued
21 April 1987.

WO 01/46357

PCT/IB01/01392

CLAIMS

1. A method for the preparation of a solid support suitable
for use in solid-phase oligosynthesis, which method
5 comprises the steps of:
 - (a) reacting a pendant functional group of a solid
support with a linker reagent, thereby forming a pendant
linker group;
 - (b) removing at least a portion of excess unreacted
10 linker reagent by evaporation; and,
 - (c) reacting said pendant linker group with a
cyclic reagent, thereby forming a pendant cyclic group.
2. A method for the preparation of a solid support suitable
15 for use in solid-phase oligonucleotide synthesis, which
method comprises the steps of:
 - (a) reacting a pendant functional group of a solid
support with a linker reagent, thereby forming a pendant
linker group;
 - 20 (b) removing at least a portion of excess unreacted
linker reagent by evaporation;
 - (c) reacting said pendant linker group with a
cyclic reagent, thereby forming a pendant cyclic group;
and,
 - 25 (d) removing at least a portion of excess unreacted
cyclic reagent and/or by-products thereof.
3. A method according to claim 1 or 2, further comprising,
after said step of reacting a pendant functional group
30 of a solid support with a linker reagent, a step of:
 - (i) reacting at least a portion of any remaining
pendant functional groups of said solid support with a
capping reagent, thereby forming pendant capped
functional groups.
- 35 4. A method according to any one of claims 1 to 3, further
comprising, after said step of removing at least a
portion of excess unreacted linker reagent by
evaporation, a step of:

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

- (i) reacting at least a portion of any remaining pendant functional groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped functional groups.
- 5
5. A method according to any one of claims 1 to 4, further comprising, after said step of reacting said pendant linker group with a cyclic reagent, a step of:
- (i) reacting at least a portion of any remaining pendant linker groups of said solid support with a capping reagent, thereby forming pendant capped linker groups.
- 10
6. A method according to any one of claims 3, 4, and 5, wherein said capping reagent is acetic anhydride.
- 15
7. A method according to any one of claims 1 to 6, wherein said step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation is achieved with the application of reduced pressure and/or increased temperature.
- 20
8. A method according to any one of claims 1 to 7, wherein said step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation involves removing a substantial portion of excess unreacted linker reagent.
- 25
9. A method according to any one of claims 1 to 8, wherein said step of removing at least a portion of excess unreacted linker reagent is achieved solely by evaporation.
- 30
10. A method according to any one of claims 1 to 9, wherein one or more steps of said method are performed using an evaporation apparatus.
- 35
11. A method according to any one of claims 1 to 9, wherein said method is performed using a rotavapor apparatus or

WO 01/96357

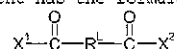
PCT/IB01/01392

a distillation apparatus.

12. A method according to any one of claims 1 to 9, wherein said method is performed using a rotavapor apparatus.

5

13. A method according to any one of claims 1 to 12, wherein said linker reagent has the formula:



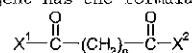
wherein

X^1 and X^2 are independently -Cl, -Br, or -I; and,

10

R^L denotes a covalent bond or a divalent group which is an organic group comprising from 1 to 10 carbon atoms and from 0 to 5 heteroatoms selected from N, O, and S; and wherein said linker reagent is a volatile liquid.

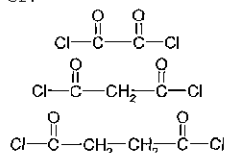
14. A method according to any one of claims 1 to 12, wherein said linker reagent has the formula:



wherein X^1 and X^2 are independently -Cl, -Br, or -I, and n is an integer from 0 to 2.

20

15. A method according to claim 14, wherein said linker reagent is one of:



16. A method according to claim 14, wherein said linker reagent is:

25

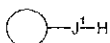


17. A method according to any one of claims 1 to 16, wherein

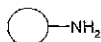
WO 01/96357

PCT/IB01/01392

said pendant functional group of said solid support is $-J^1-H$, wherein J^1 is $-NH-$, $-O-$, or $-S-$, denoted as follows:



- 5 18. A method according to claim 17, wherein said pendant functional group of said solid support is $-NH_2$, denoted as follows:



19. A method according to any one of claims 1 to 18, wherein
10 said cyclic reagent has the formula:



wherein:

- Q denotes a cyclic group, which has a single
non-aromatic ring, which ring has from 5 to 7 ring
15 atoms, which ring atoms are:

- (a) all carbon atoms; or,
(b) carbon atoms and one or two heteroatoms
selected from oxygen, nitrogen, and sulfur;

- 20 W denotes a reactive conjugating group and is $-OH$, $-NH_2$, or $-SH$;

- B denotes a base moiety, which is a purine or
pyrimidine or a derivative or analog thereof;

- 25 Y denotes an oligosynthesis group, which is $-OH$, $-NH_2$, or $-SH$, or a protected form thereof; and,

- Z, if present, denotes an auxiliary group, which is
30 $-OH$, $-NH_2$, or $-SH$, or a protected form thereof;

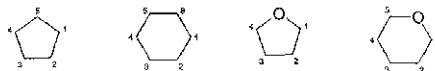
wherein said W, B, Y, and Z, if present, are each
separately attached to a carbon ring atom of said Q,

WO 01/96357

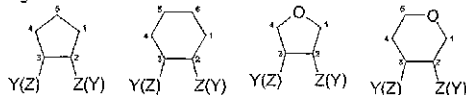
PCT/IB01/01392

either directly, via a covalent bond, or indirectly, via an intermediate covalent linkage selected from $-\text{CH}_2-$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

20. A method according to claim 19, wherein Q is selected from:

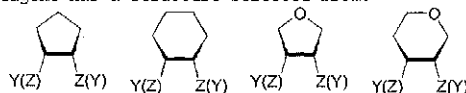


21. A method according to claim 20, the moiety Y-Q-Z of the cyclic reagent has a structure selected from:

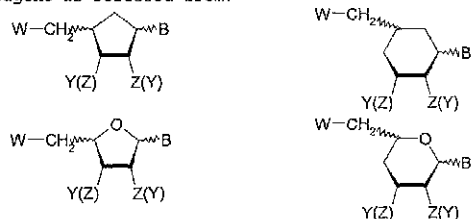


10

22. A method according to claim 21, the moiety Y-Q-Z of the cyclic reagent has a structure selected from:



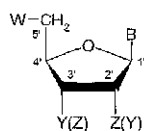
23. A method according to claim 22, wherein the cyclic reagent is selected from:



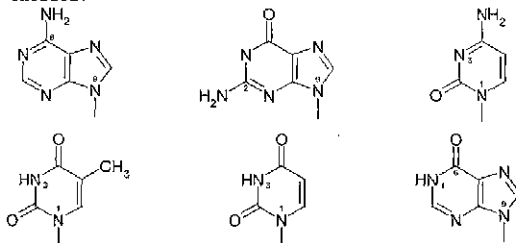
24. A method according to claim 22, wherein the cyclic reagent is selected from:

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

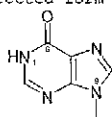


25. A method according to any one of claims 1 to 24, wherein B is selected from the following, or a protected form thereof:



5

26. A method according to claim 25, wherein B is the following, or a protected form thereof:



27. A method according to any one of claims 1 to 26, wherein W is -OH.

10

28. A method according to any one of claims 1 to 27, wherein Y is -OH or a protected form thereof.

29. A method according to any one of claims 1 to 28, wherein Z, if present, is -OH or a protected form thereof.

15

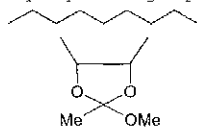
WO 01/96357

PCT/IB01/01392

30. A method according to any one of claims 1 to 29, wherein Z, if present, is -OH protected in the form of -OR, wherein R is an acyl group, a C₁-alkyl group, or a silyl group.

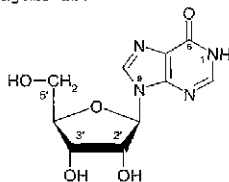
5

31. A method according to any one of claims 1 to 30, wherein both Z and Y, in deprotected form, are -OH, and, in protected form, together form part of a cyclic structure with an O-O-methoxyethylidene group of the structure:



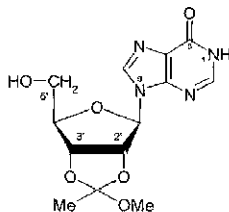
10

32. A method according to any one of claims 1 to 29, wherein said cyclic reagent is:



or a protected form thereof.

33. A method according to claim 32, wherein said cyclic reagent is:



34. A method according to any one of claims 1 to 33, wherein

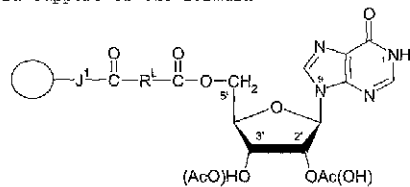
WO 01/96357

PCT/IB01/01392

said step of reacting said pendant linker group with a cyclic reagent is performed in the presence of an added base.

35. A method according to claim 34, wherein said added base is dimethylaminopyridine (DMAP) or *N*-methylimidazole (NMI).

36. A solid support of the formula:



wherein:

J^1 is -NH- ;

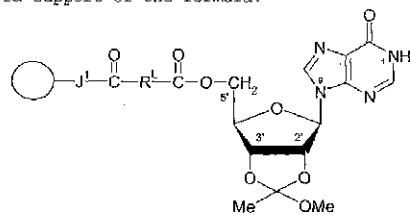
R^1 is $-(CH_2)_n-$; and,

n is an integer from 0 to 10;

or a protected form thereof.

37.

37. A solid support of the formula:



wherein:

J^1 is -NH- ;

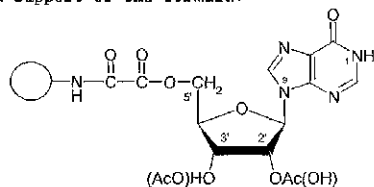
R^1 is $-(CH_2)_n-$; and,

n is an integer from 0 to 10.

WO 01/96357

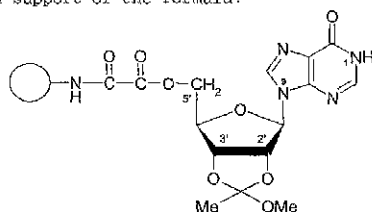
PCT/IB01/01392

38. A solid support of the formula:



or a protected form thereof.

39. A solid support of the formula:



5

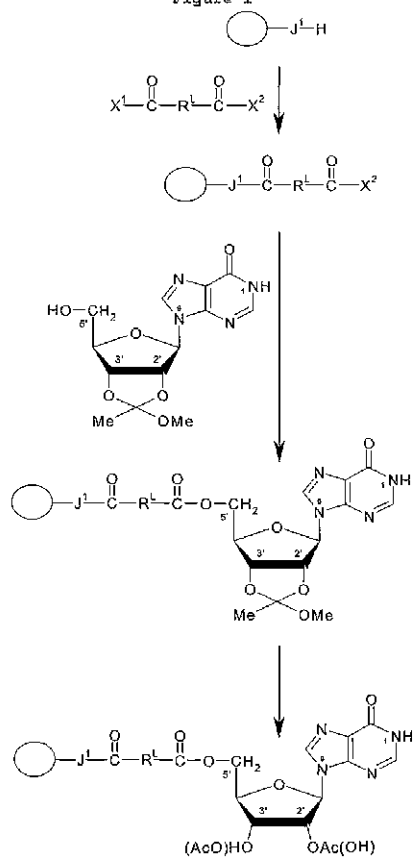
40. A solid support suitable for use in solid-phase oligonucleotide synthesis prepared by a method as described in any one of claims 1 to 35.
- 10 41. A method of oligonucleotide synthesis, which method employs a method for the preparation of a universal solid support as described in any one of claims 1 to 35.
- 15 42. A method of oligonucleotide synthesis, which method employs a universal solid support as described in any one of claims 36 to 39.
43. An oligonucleotide which has been prepared using a method of oligonucleotide synthesis, which method
- 20 employs a method for the preparation of a universal solid support as described in any one of claims 1 to 35.
44. An oligonucleotide which has been prepared using a

WO 01/96357

PCT/IB01/01392

universal solid support as described in any one of
claims 36 to 39.

Figure 1



WO 01/96357

2/5

PCT/IB01/01392

Figure 2

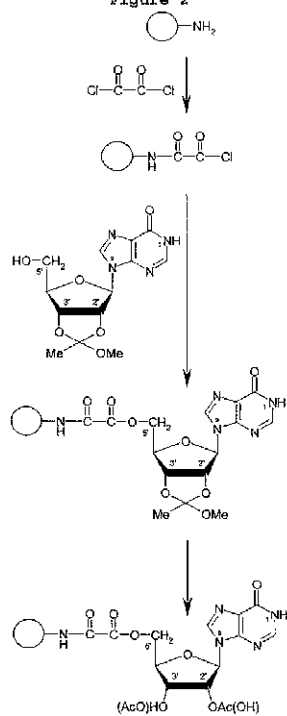


Figure 3

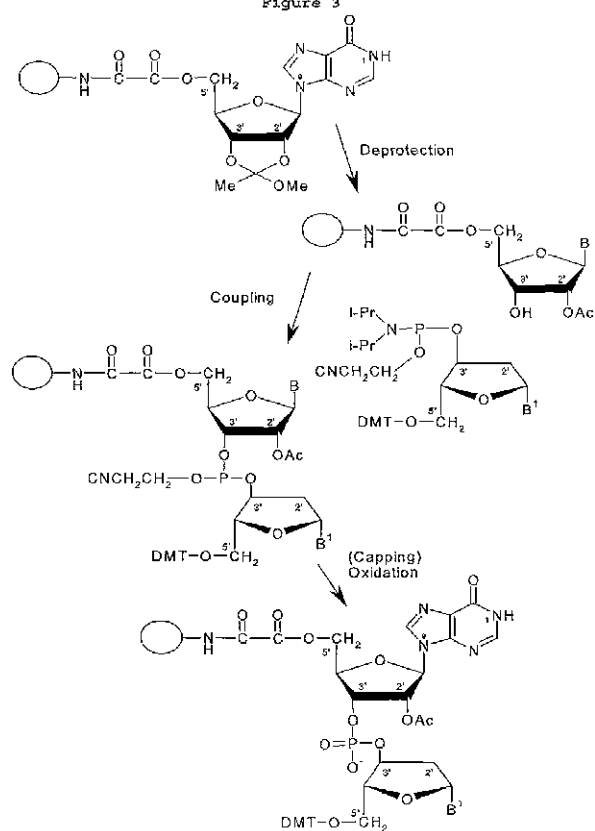


Figure 4

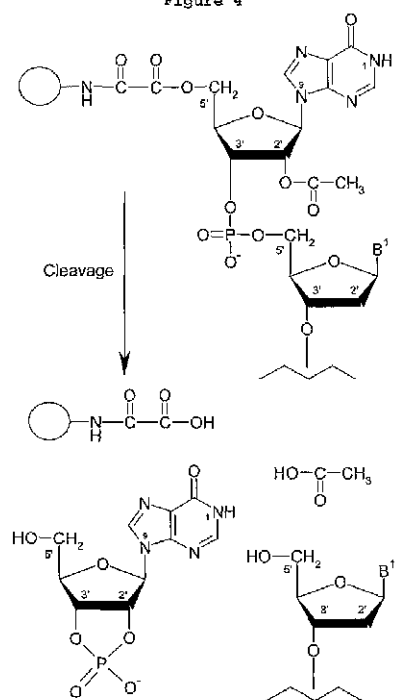
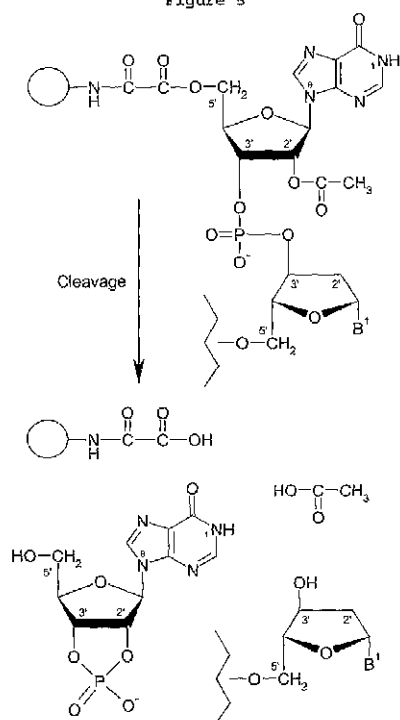


Figure 5



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096357 A3

- (51) International Patent Classification: **C07B 61/00**
C07H 21/00
- (21) International Application Number: PCT/IB01/01392
- (22) International Filing Date: 12 June 2001 (12.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/211,324 13 June 2000 (13.06.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENSET
[RU/RU]; Intellectual Property Department, 24, rue Royale,
F-75008 Paris (FR).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): KUMAREV, Viktor
[RU/RU]; 18, avenue de L'Esperance, F-93250 Villetonville
(FR).
- (74) Common Representative: GENSET; Intellectual Property
Department, 24, rue Royale, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
8 August 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide
to the Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/096357 A3

(54) Title: UNIVERSAL SOLID SUPPORTS FOR SOLID PHASE OLIGOSYNTHESIS AND METHODS FOR THEIR PREPA-
RATION AND USE

(57) Abstract: This invention pertains to solid-phase oligosynthesis, and more particularly to universal solid supports for solid-phase oligonucleotide synthesis, methods for their preparation, and methods for their use. One aspect of the invention pertains to a method for the preparation of a universal solid support suitable for use in solid-phase oligosynthesis, which method comprises the steps of: (a) reacting a pendant functional group (e.g., -NH₂) of a solid support (e.g., CPG) with a linker reagent (e.g., oxalyl chloride), thereby forming a pendant linker group (e.g., -Cl-O-Cl); (b) removing at least a portion of excess unreacted linker reagent by evaporation (e.g., using a rotavapor apparatus); and, (c) reacting said pendant linker group with a cyclic reagent (e.g., protected nucleoside), thereby forming a pendant cyclic group.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 01/01392
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07B61/00 C07H21/00		
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) IPC 7 C07B C07H		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 869 696 A (REDDY M PARAMESWARA ET AL) 9 February 1999 (1999-02-09)	1-3, 5, 7-12, 17-25, 27-31, 34, 35, 40, 41, 43, 44
Y	column 5 examples 2, 4, 6, 7, 13, 14, 28 -/-	1-12, 17-35, 40, 41, 43, 44
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: ** 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 *** 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 **** 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 31 May 2002		Date of mailing of the international search report 25/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 16 Patent, 200 NL - 2000 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2100, Telex 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Held, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 01/01392

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 5 112 962 A (LEISINGER ROBERT L ET AL) 12 May 1992 (1992-05-12) cited in the application figure 2	40
Y	example 2 claims 1,2	1-12, 17-35, 40,41, 43,44
X	BEAUCAGE S L ET AL: "ADVANCES IN THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHORAMIDITE APPROACH" TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 48, no. 12, 1992, pages 2223-2311, XP000915225 ISSN: 0040-4020 page 2227 -page 2233	1,17-24, 27-30, 40,41, 43,44
X	MATTEUCCI M D ET AL: "SYNTHESIS OF DEOXYOLIGONUCLEOTIDES ON A POLYMER SUPPORT" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 103, no. 11, 3 June 1981 (1981-06-03), pages 3185-3191, XP000562673 ISSN: 0002-7863 figure 1 page 3190, left-hand column -right-hand column, paragraph 1	1,3-5,7, 8,10-12, 17-25, 27-30, 40,41, 43,44
X	LYTTLE M. H. ET AL.: "A new universal linker for solid phase DNA synthesis" NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 24, no. 14, 1996, pages 2793-2798, XP002200839 cited in the application page 2794, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 2 figures 1,2	1,3,4, 6-8, 10-12, 17-24, 27-30, 40,41, 43,44

Form PCT/IB/92 (preparation of second draft) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 01/01392

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IWAI S ET AL: "A NEW SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHORO-P-ANISIDATE METHOD USING TETRAHYDROFURANYL PROTECTION OF 2'-HYDROXYL GROUPS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 15, no. 9, 11 May 1987 (1987-05-11), pages 3761-3772, XP002047319 ISSN: 0305-1048 page 3763 -page 3764 page 3769, last paragraph -page 3770, paragraph 2	1,2,13, 18,32-44
A	US 5 681 945 A (MCLEAN MICHAEL JOSEPH ET AL) 28 October 1997 (1997-10-28) cited in the application examples 14,17,24 claim 9	19-24
A	US 5 750 669 A (RAMALHO-ORTIGAO JOSE FLAVIO ET AL) 12 May 1998 (1998-05-12) example 4	1,2, 35-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International application No.
 PCT/IB 01/01392

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5869696	A	09-02-1999	EP 0843684 A2 27-05-1998 JP 2000500158 T 11-01-2000 WO 9740458 A2 30-10-1997
US 5112962	A	12-05-1992	NONE
US 5681945	A	28-10-1997	AT 170865 T 15-09-1998 AU 671629 B2 05-09-1996 AU 3898093 A 08-11-1993 CA 2131993 A1 14-10-1993 DE 69320949 D1 15-10-1998 DE 69320949 T2 12-05-1999 EP 0633890 A1 18-01-1995 FI 944567 A 30-09-1994 WO 9320091 A1 14-10-1993 JP 7505386 T 15-06-1995 NO 943667 A 30-09-1994 US 5886193 A 23-03-1999
US 5750669	A	12-05-1998	AT 151076 T 15-04-1997 AU 647143 B2 17-03-1994 AU 7947591 A 02-01-1992 CA 2045891 A1 03-01-1992 CS 9102014 A3 15-01-1992 DE 59108644 D1 07-05-1997 DK 464638 T3 13-10-1997 EP 0464638 A2 08-01-1992 ES 2099718 T3 01-06-1997 FI 913169 A 03-01-1992 GR 3023432 T3 29-08-1997 HU 62010 A2 29-03-1993 IE 912309 A1 15-01-1992 IL 98672 A 08-12-1995 JP 3186795 B2 11-07-2001 JP 5222088 A 31-08-1993 KR 200400 E1 15-06-1999 NO 303018 B1 18-05-1998 NZ 238769 A 25-11-1993 PT 98169 A ,8 30-09-1993 SK 279544 B6 02-12-1998 ZA 9105056 A 25-03-1992

Form PCT/IB/210 (table 1) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 クマレフ, ヴィクトル

フランス国エフー 9 3 2 5 0 ヴィレモンブル, アヴニュー・ド・レスピナッセ 1 8

Fターム(参考) 4C057 AA11 AA17 AA20 BB02 DD01 MM02 MM04 MM05