

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7640680号

(P7640680)

(45)発行日 令和7年3月5日(2025.3.5)

(24)登録日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(51)国際特許分類

C 0 8 J 9/28 (2006.01)

C 0 8 F 212/02 (2006.01)

F I

C 0 8 J 9/28

C 0 8 F 212/02

C E R

請求項の数 21 (全24頁)

(21)出願番号 特願2023-514051(P2023-514051)
(86)(22)出願日 令和3年2月24日(2021.2.24)
(65)公表番号 特表2023-539664(P2023-539664 A)
(43)公表日 令和5年9月15日(2023.9.15)
(86)国際出願番号 PCT/CN2021/077663
(87)国際公開番号 WO2022/110560
(87)国際公開日 令和4年6月2日(2022.6.2)
審査請求日 令和5年2月28日(2023.2.28)
(31)優先権主張番号 202011357390.X
(32)優先日 令和2年11月26日(2020.11.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 517446393
西安藍暁科技新材料股▲ふん▼有限公司
SUNRESIN NEW MATERIALS CO., LTD.
中国陕西省西安市高新区錦業路135号
No.135, Jinye Rd, Xi'an Hi-tech Industrial Development Zone, Xi'an, Shaanxi, 710075, China
(74)代理人 110001807
弁理士法人磯野国際特許商標事務所
(72)発明者 王朝陽
中国陕西省西安市高新区錦業路135号
(72)発明者 張チエン

最終頁に続く

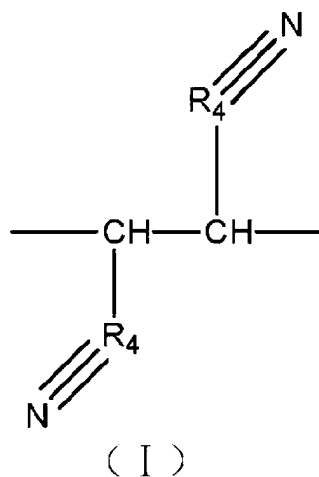
(54)【発明の名称】 固相合成用の多孔質樹脂及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

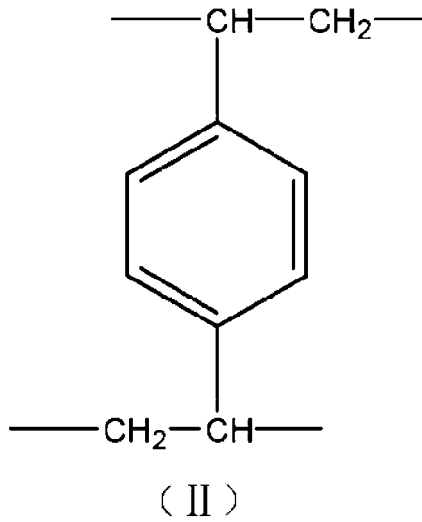
固相合成用の多孔質樹脂であって、前記多孔質樹脂は骨格に式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)で表される繰り返し構造単位を有する共重合体であり、

【化1】



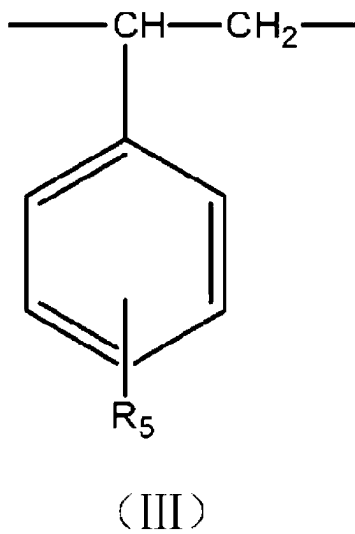
(ただし、R₄ = - C - 又は - C - CH₂ - である。)

【化 2】



10

【化 3】



20

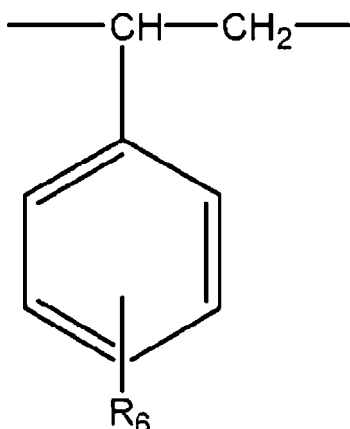
30

(ただし、 R_5 は、 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2OOC$
 $-C_6H_4-OH$ 、 $-CH_2OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 、 $-(CH_2)_4OOC-C_6H_4-OH$ 、 $-(CH_2)_4OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 、 $-CONH-C_6H_4-NH_2$
 $-CH_2CONH-C_6H_4-NH_2$ 、 $-COO-C_6H_4-OH$ 、又は $-CH_2COO$
 $-C_6H_4-OH$ である。)

40

50

【化 4】



(IV)

(ただし、 R_6 は —H 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{—}$ (n は $0 \sim 4$ の整数である。)、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{—}$ (n は $0 \sim 2$ の整数である。)、 $(\text{CH}_3)_3\text{C—}$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—}$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{—}$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—}$ 、又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{—O—}$ (n は $0 \sim 4$ の整数である。) である。)

(ただし、式 (I)、式 (II)、式 (III)、式 (IV) で表される繰り返し構造単位はそれぞれ変性単量体、架橋単量体、機能性単量体、及びモノビニル化合物に由来する。)

(ただし、単量体全量に対して前記モノビニル化合物は $40 \sim 95.9$ 重量%であり、単量体全量に対して前記架橋単量体は $2 \sim 20$ 重量%であり、単量体全量に対して前記機能性単量体は $2 \sim 20$ 重量%であり、単量体全量に対して前記変性単量体は $0.1 \sim 20$ 重量%である。)

(ただし、前記多孔質樹脂はヒドロキシ又はアミノの含有量が $100 \sim 1000 \mu\text{mol/g}$ であり、アミノ又はヒドロキシの前記含有量は、 Fmoc-Leu-OH と反応した後、 Fmoc 保護基を除去することにより得られ、比色法により除去した Fmoc の量を決定し、前記多孔質樹脂におけるアミノ又はヒドロキシの前記含有量を算出される。)

前記多孔質樹脂は、粒子画像処理装置により検出される、すなわち、前記多孔質樹脂をスライドガラスに均一に分布させ、顕微鏡で担体粒子を拡大させながら、カメラで顕微鏡により拡大された前記多孔質樹脂の粒子画像を撮影し、コンピュータによって前記多孔質樹脂の外観特徴及び粒度を分析して計算される粒径の範囲が $35 \sim 200 \mu\text{m}$ であり、

前記多孔質樹脂は、水銀圧入法により測定される、すなわち、サンプル $0.1500 \sim 0.3000 \text{ g}$ を正確に秤取して全自動水銀圧入装置 AutoPore IV 9500 ($\text{Micromeritics Instrument Co.}$) に入れ、汞の接触角を 130° 、表面張力を 485 dyn/cm に設定し、この条件で水銀圧入法により測定される平均孔径が $10 \sim 200 \text{ nm}$ である、ことを特徴とする固相合成用の多孔質樹脂。

【請求項 2】

ヒドロキシ又はアミノの含有量が $400 \sim 700 \mu\text{mol/g}$ であり、アミノ又はヒドロキシの前記含有量は、 Fmoc-Leu-OH と反応した後、 Fmoc 保護基を除去することにより得られ、比色法により除去した Fmoc の量を決定し、前記多孔質樹脂におけるアミノ又はヒドロキシの前記含有量を算出される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の固相合成用の多孔質樹脂。

【請求項 3】

前記多孔質樹脂は、粒子画像処理装置により検出される、すなわち、前記多孔質樹脂をスライドガラスに均一に分布させ、顕微鏡で担体粒子を拡大させながら、カメラで顕微鏡により拡大された前記多孔質樹脂の粒子画像を撮影し、コンピュータによって前記多孔質樹脂の外観特徴及び粒度を分析して計算される粒径の範囲が $50 \sim 100 \mu\text{m}$ である、こと

を特徴とする請求項 1 に記載の固相合成用の多孔質樹脂。

【請求項 4】

前記多孔質樹脂は、水銀圧入法により測定される、すなわち、サンプル 0.1500 ~ 0.3000 g を正確に秤取して全自動水銀圧入装置 AutoPore IV 9500 (Micromeritics Instrument Co.) に入れ、汞の接触角を 130°、表面張力を 485 dyn/cm に設定し、この条件で水銀圧入法により測定される平均孔径が 40 ~ 100 nm である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の固相合成用の多孔質樹脂。

【請求項 5】

固相合成用の多孔質樹脂の製造方法であって、水、分散剤、無機塩から構成される水相と、モノビニル化合物、架橋単量体、機能性単量体、変性単量体、油溶性界面活性剤、希釈剤及び開始剤から構成される油相とをそれぞれ調製するステップと、

前記油相を前記水相に加えて、攪拌して昇温させて、重合反応させて、前記重合反応の終了後、孔形成剤を除去し、多孔質重合体樹脂を得るステップと、を含み、

前記モノビニル化合物、前記架橋単量体、前記機能性単量体及び前記変性単量体は重合反応に関与し、前記油溶性界面活性剤及び前記希釈剤は重合反応に関与せず、主に孔形成作用を果たし、

前記変性単量体はトランスブテンジニトリル、1,4-ジシアノ-2-ブテンを含み、

前記モノビニル化合物はスチレン及びそのベンゼン環置換誘導体を含み、置換基は 1 ~ 5 個の炭素原子を含有するアルキル又はアルコキシであり、

前記架橋単量体はジビニルベンゼンであり、

前記機能性単量体は、4-ヒドロキシスチレン、4-ヒドロキシメチルスチレン、4-アセトキシスチレン、ベンゾイルオキシスチレン、4-アミノスチレン、4-アミノメチルスチレン、4-(4-プロモブチル)スチレン、p-クロロメチルスチレン、4-ビニル安息香酸メチル、4-エチルベンゼン酢酸エチルエステルを含み、

前記希釈剤は重合反応に関与しない有機溶媒であり、

前記分散剤は水溶性高分子であり、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルピロリドンのうちの 1 種又は複数種を含み、

前記油相において、単量体全量に対して前記モノビニル化合物は 40 ~ 95.9 重量%であり、

前記油相において、単量体全量に対して前記架橋単量体は 2 ~ 20 重量%であり、

前記油相において、単量体全量に対して前記機能性単量体は 2 ~ 20 重量%であり、

前記油相において、単量体全量に対して前記変性単量体は 0.1 ~ 20 重量%であり、

さらに前記多孔質重合体樹脂を反応させて、機能基としてヒドロキシ又はアミノを含有する多孔質樹脂を得て、

前記多孔質樹脂はヒドロキシ又はアミノの含有量が 100 ~ 1000 $\mu\text{mol/g}$ であり、アミノ又はヒドロキシの前記含有量は、Fmoc-Leu-OH と反応した後、Fmoc 保護基を除去することにより得られ、比色法により除去した Fmoc の量を決定し、前記多孔質樹脂におけるアミノ又はヒドロキシの前記含有量を算出され、

前記多孔質樹脂は、粒子画像処理装置により検出される、すなわち、前記多孔質樹脂をスライドガラスに均一に分布させ、顕微鏡で担体粒子を拡大させながら、カメラで顕微鏡により拡大された前記多孔質樹脂の粒子画像を撮影し、コンピュータによって前記多孔質樹脂の外観特徴及び粒度を分析して計算される粒径の範囲が 35 ~ 200 μm であり、

前記多孔質樹脂は、水銀圧入法により測定される、すなわち、サンプル 0.1500 ~ 0.3000 g を正確に秤取して全自動水銀圧入装置 AutoPore IV 9500 (Micromeritics Instrument Co.) に入れ、汞の接触角を 130°、表面張力を 485 dyn/cm に設定し、この条件で水銀圧入法により測定される平均孔径が 10 ~ 200 nm である、ことを特徴とする固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 6】

前記開始剤は有機過酸化物又はアゾ化合物である、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 7】

前記開始剤は過酸化ベンゾイル、過酸化ラウロイル、t-ブチルパーオキシ 2-エチルヘキサノエート、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)を含む、ことを特徴とする請求項 6 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 8】

前記油性界面活性剤は、トリオレイン酸ソルピタン、ポリオキシエチレンソルビトール蜜ロウ誘導体、トリスチアリン酸ソルピタン、ヘキサステアリン酸ポリオキシエチレンソルビトール、エチレングリコール脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、プロピレングリコールモノステアリン酸エステル、ソルピタンセスキオレイン酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールオレイン酸エステル、モノステアリン酸グリセリル、ヒドロキシラノリン、ソルピタンモノオレイン酸エステル、プロピレングリコールモノラウリン酸エステルのうちの 1 種又は複数種の組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

10

【請求項 9】

前記希釈剤は、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ドデカン、イソオクタン、イソドデカン、シクロヘキサン、クロロホルム、クロロベンゼン、酢酸エチル、酢酸ブチル、フタル酸ジブチル、ヘキサノール、シクロヘキサノール、オクタノール、イソオクタノール、デカノール、ドデカノールを含む、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

20

【請求項 10】

前記水相において、前記分散剤は 0.1 ~ 5 重量%、前記無機塩は 20 重量%以下であり、

前記油相と前記水相との重量比は 1 : 3 ~ 1 : 20 であり、

前記油相において、前記孔形成剤の重量は単量体全重量の 15 ~ 70 % であり、

前記孔形成剤中、前記油性界面活性剤は孔形成剤全重量の 0.1 ~ 15 % を占め、

前記孔形成剤中、前記希釈剤は孔形成剤全重量の 85 ~ 99.9 % を占める、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

30

【請求項 11】

前記重合温度は 50 ~ 90 である、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 12】

前記製造過程は、

反応器に一定量の精製水を加え、水相重量に対して前記分散剤を 0.1 ~ 5 重量%と水相重量に対して前記無機塩を 20 重量%以下とを加え、溶解して、前記水相を得るステップと、

前記油相と前記水相との重量比が 1 : 3 ~ 1 : 20 となるように、単量体全重量に対して、前記モノビニル化合物を 40 ~ 95.9 %、前記架橋単量体を 2 ~ 20 %、前記機能性単量体を 2 ~ 20 %、前記変性単量体を 0.1 ~ 20 %、孔形成剤重量に対して前記油性界面活性剤が 0.1 ~ 15 重量%を占め、前記希釈剤が 85 ~ 99.9 % を占める前記孔形成剤 15 ~ 70 %、前記開始剤と、を秤量し、均一に混合すると、前記油相を得るステップと、

40

前記油相を前記反応器に加えて、攪拌して 50 ~ 90 に昇温させ、反応させて、反応終了後、前記孔形成剤を除去し、篩分けして適切な粒径の樹脂を収集し、真空乾燥させ、多孔質重合体樹脂を得て、さらに樹脂を反応させ、アミノ又はヒドロキシ官能基とした多孔質樹脂を得るステップと、を含む、ことを特徴とする請求項 5 から 11 のいずれか 1 項に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 13】

50

前記多孔質アミノ樹脂の製造プロセスは、

凝縮器、攪拌器及び温度計を装備した 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得て、

スチレン 110 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量％）10 g、p - クロロメチルスチレン 12 g、トランスブテンジニトリル 8 g、ソルビタンモノオレイン酸エステル 5 g、イソオクタノール 45 g 及び過酸化ベンゾイル 2.5 g を秤量し、均一に混合すると、油相を得て、油相を反応器に加えて、攪拌し、80 に昇温させて 4 h 重合し、反応終了後、熱水で洗浄して、エタノール還流により孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径 50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、塩素含有量が 550 $\mu\text{mol/g}$ の重合体多孔質樹脂を得るステップと、

10

凝縮器、攪拌器及び温度計を装備した 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、N, N - ジメチルホルムアミド 500 ml を投入し、攪拌し、その後、フタルイミドカリウム塩 30 g を加え、95 に昇温させて 16 時間反応させ、反応終了後、室温に冷却させ、その後、N, N - ジメチルホルムアミドで 2 回洗浄し、精製水で中性となるまで洗浄し、次に、無水エタノールで 3 回洗浄し、樹脂をろ別して乾燥させ、反応器に無水エタノール 200 g とヒドラジン水和物 50 g を加え、75 に昇温させて 16 時間反応させ、反応終了後、体積比 50 : 50 のエタノール / 精製水溶液で 3 回洗浄し、精製水で中性となるまで洗浄し、次に、無水エタノールで 3 回洗浄し、洗浄液をろ別して除去し、反応器に無水エタノール 200 g と濃塩酸 50 g を加え、60 に昇温させて 6 h 反応させ、反応終了後、室温に冷却させ、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、アミノ含有量が 543 $\mu\text{mol/g}$ の、水銀圧入法により測定した平均孔径が 48 nm の固相合成担体を得るステップと、を含み、或いは、

20

前記多孔質ヒドロキシ樹脂の製造プロセスは、

凝縮器、攪拌器及び温度計を装備した 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入し、溶解して、水相を得て、

スチレン 111 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量％）11 g、4 - アセトキシスチレン 13 g、トランスブテンジニトリル 5 g、ソルビタンモノオレイン酸エステル 8 g、イソオクタノール 40 g、イソドデカン 20 g 及び過酸化ベンゾイル 2.5 g を秤量し、均一に混合すると、油相を得て、油相を反応器に加えて、攪拌して 78 に昇温させ、6 h 重合し、反応終了後、熱水で樹脂を洗浄して、エタノール還流により孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径 50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、重合体多孔質樹脂を得るステップと、

30

凝縮器、攪拌器及び温度計を装備した 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、アセトニトリル 300 ml を投入し、攪拌し、ヒドラジン水和物 7.5 ml をゆっくりと加え、室温で 3 h 反応させ、反応終了後、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシの含有量が 550 $\mu\text{mol/g}$ 、水銀圧入法により測定した平均孔径が 64 nm の、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得るステップと、を含む、ことを特徴とする請求項 5 から 12 のいずれか 1 項に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 14】

請求項 5 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法で製造した請求項 1 に記載の固相合成用の多孔質樹脂、のオリゴヌクレオチドの固相合成への使用。

40

【請求項 15】

前記油相において、単量体全量に対して前記モノビニル化合物は 60 ~ 88 重量％である、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 16】

前記油相において、単量体全量に対して前記架橋単量体は 5 ~ 15 重量％である、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 17】

前記油相において、単量体全量に対して前記機能性単量体は 5 ~ 15 重量％である、ことを特徴とする請求項 5 に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

50

【請求項 18】

前記油相において、単量体全量に対して前記変性単量体は2～10重量%である、ことを特徴とする請求項5に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 19】

前記油相において、前記孔形成剤の重量は単量体全重量の25～50%である、ことを特徴とする請求項5に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 20】

前記重合温度は60～85である、ことを特徴とする請求項5に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【請求項 21】

前記製造過程は、

反応器に一定量の精製水を加え、前記水相重量に対して前記分散剤を0.1～5重量%と水相重量に対して前記無機塩を20重量%以下とを加え、溶解して、前記水相を得るステップと、

前記油相と前記水相との重量比が1:3～1:20となるように、単量体全重量に対して、前記モノビニル化合物が60～88重量%と、前記架橋単量体が5～15重量%と、前記機能性単量体が5～15重量%と、前記変性単量体が2～10重量%と、孔形成剤重量に対して前記油性界面活性剤が0.1～1.5重量%を占め、前記希釈剤が85～99.9%を占める前記孔形成剤が25～50重量%と、前記開始剤と、を秤量し、均一に混合すると、前記油相を得るステップと、

前記油相を前記反応器に加えて、攪拌して60～85に昇温させ、反応させて、前記反応の終了後、前記孔形成剤を除去し、篩分けして適切な粒径の樹脂を収集し、真空乾燥させ、多孔質重合体樹脂を得て、さらに、この樹脂を反応させ、アミノ又はヒドロキシ官能基とした多孔質樹脂を得るステップと、を含む、ことを特徴とする請求項5から11のいずれか1項に記載の固相合成用の多孔質樹脂の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は多孔質樹脂及びその製造方法に関し、該担体はオリゴヌクレオチドの固相合成に用いられ、機能性高分子材料の製造分野に属する。

【背景技術】

【0002】

過去数十年の間、人工的に合成されたオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子治療に広く応用されてきた。オリゴヌクレオチドとは、約20個の塩基を持つ短鎖ヌクレオチドの総称で、デオキシリボ核酸(DNA)とリボ核酸(RNA)を含む。現在、オリゴヌクレオチドは一般的に化学的方法で合成され、固相ホスホロアミダイトリエステル法で合成されるのが最も一般的であり、具体的な方法は固相合成担体を反応カラムに充填し、反応物を溶解した溶液を一定の圧力で反応カラムに急速に流して反応を行うことである。反応効率を向上させ、不純物の発生を低減するために、溶液における反応物を固相合成担体内に速やかに拡散させて活性部位と反応させ、反応生成物を速やかに溶液中に拡散させて除去することが必要である。このため、固相合成担体には次のような要件を満たすことが求められる。1. 担体は必ず、核酸分子鎖がこれらの部位に連結でき、そして合成完了後に分解できる単一の活性部位(又は反応基)を含む。2. 担体は、合成中に物理的及び化学的安定性を維持しなければならない。3. 担体は、増大し続ける核酸分子鎖と試薬が迅速かつ阻害されることなく接触することを容易にするのに十分な大きさの細孔径及び理想的な細孔径分布を有するべきである。4. 活性部位は、核酸分子鎖間の相互干渉を減少させるために、担体に均一に分布しなければならない。5. オリゴヌクレオチド合成に使用されるホスホロアミダイト単量体が水分に敏感であり、水分の存在により反応効率が低下することから、担体骨格は一定の疎水性を示すべきである。6. 担体は異なる溶媒中での膨潤度が近く、異なる溶媒の合成又は洗浄プロセスの膨潤の差によるデッドボリュームを減少さ

10

20

30

40

50

せ、反応試薬の均一な拡散と反応生成物の迅速な洗浄除去に有利である。

【0003】

オリゴヌクレオチド固相合成技術の発展初期では、よく使用されている固相合成担体は細孔径制御可能なガラス微小球(CPG)、変性シリカゲルなどの無機粒子があるが、それらの欠点も明らかであり、すなわち、置換度(Loading)が低い(一般的に100 $\mu\text{mmol/g}$ より小さい)ため、オリゴヌクレオチドの単ロットの生産量が制限され、設備の利用率が低く、生産コストが高い。担体の置換度を高めるために、Nitto Denko社とIonis社が共同で出願した発明特許WO2006029023は、スチレン、p-アセトキシスチレン、ジビニルベンゼンを重合単量体とし、イソオクタン、2-エチルヘキサノールを孔形成剤として有機高分子重合体を調製し、オリゴヌクレオチド固相合成担体とした。この担体は置換度が100~350 $\mu\text{mmol/g}$ に達することができ、その欠点は担体の強い非極性によりオニウム塩類縮合系でリンカーを連結する時の反応効率が低く、また、強い非極性により合成又は洗浄過程でトルエンとアセトニトリルを使用する時に樹脂の体積が大きく変化し、反応器において大きなデッドボリュームが発生することである。その後、Nitto Denko社は米国特許US8592542において、スチレン、p-アセトキシスチレン、ジビニルベンゼン、(メタ)アクリルアミド誘導体を重合単量体としている。米国特許US8653152では、スチレン、p-アセトキシスチレン、ジビニルベンゼン、(メタ)アクリロニトリルを重合単量体としている。重合時に極性単量体を添加することにより、より高い置換度(500 $\mu\text{mmol/g}$ 以上)を有するオリゴヌクレオチド固相合成担体を製造する。また、極性単量体の添加は、異なる溶媒(トルエン、アセトニトリル)における担体の膨潤変動を調整するのに有利である。しかし、(メタ)アクリルアミド系単量体、(メタ)アクリロニトリルは親水性であるので、無水溶媒(無水アセトニトリル)で洗浄すると酸化ステップで加えた水分を除去することが困難であり、次のオリゴヌクレオチドの合成効率に影響する。また、溶媒法により孔を形成して得た細孔径分布が不均一で、物質移動効果が悪く、また、水分の除去と次のオリゴヌクレオチドの合成効率にも影響する。南開大学が出願した中国発明特許CN201210562165.9は、架橋ポリアクリロニトリル又は架橋ポリメタクリロニトリルを担体の基本骨格とする。活性部位の導入は、酢酸ビニル、アクリル酸エステル系又はメタクリル酸エステル系単量体を添加し、アルカリ分解又は2つの1級アミン基を有する化合物との反応によりヒドロキシ又はアミノを導入する。この特許は大量の極性単量体を使用しているので、樹脂の異なる溶媒における膨潤差の問題を解決するが、大量の親水性単量体の使用により、担体が極めて親水性であり、無水溶媒(アセトニトリル)を使用した洗浄により担体における水分を除去することが更に困難になり、次のオリゴヌクレオチドの合成効率に極めて大きな影響を与える。

【0004】

近年、オリゴヌクレオチド薬物の研究が巨大な進展を得たため、ますます多くのオリゴヌクレオチド薬物が臨床段階に入り始めた。オリゴヌクレオチド合成担体に対する需要量はますます多くなり、また、上記のオリゴヌクレオチド担体に存在する物質移動、膨潤、極性の問題によりオリゴヌクレオチド合成効率が低くなり、生産コストが高くなる。そのため、オリゴヌクレオチド薬物を大規模、低コスト、高効率で合成できる多孔質樹脂を開発し、ヌクレオチド薬物の市場需要を満たすことが極めて重要なことである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

オリゴヌクレオチドを大規模かつ低コストで製造することを可能とし、物質移動効率が低く、洗浄が不十分であり、異なる溶媒中での膨潤変化が大きいような従来の担体の欠点を解決するために、本発明は固相合成用の多孔質樹脂及びその製造方法を提供する。

【0006】

物質移動効率を向上させるために、本発明は、細孔径の大きさが適切で均一な細孔径分布を実現することが望ましい。本発明は、高内相エマルジョンをテンプレートとして孔を

形成するものであり、逆相法、相分離法、溶媒孔形成法等の従来の孔形成法に比べて、この方法は、エマルション液滴の大きさによって細孔径や細孔径分布を正確に制御することができる。内相エマルション液滴の大きさは油溶性界面活性剤の分子量、HLB値、使用量などの要素により決定され得る。本発明は、孔形成方式を変えて、担体が適切な細孔径を有し、細孔径分布が狭いようにするものであり、オリゴヌクレオチド合成プロセスにおける反応試薬の拡散に有利であり、反応効率を向上させ、不純物の生成を減少させる。

【0007】

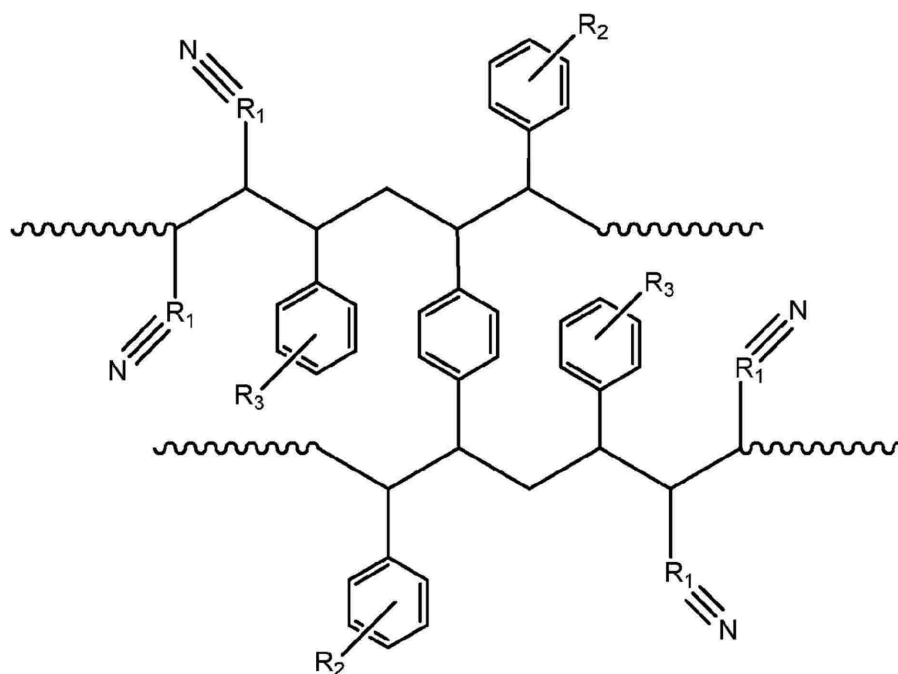
重合過程に変性単量体を添加することは以下の4つの作用がある。第一に、変性単量体の重合速度が遅く、単独重合を行うことができず、他の単量体と共重合することしかできず、活性部位の均一な分布に有利である。第二に、少量の変性単量体を添加することにより、樹脂の膨潤性を広範囲に調整することができ、異なる溶媒中での担体の膨潤体積の変化を低減させ、オリゴヌクレオチド合成における反応器内部のデッドボリュームを低減することができる。第三に、変性単量体の分子構造はオニウム塩系縮合剤をより効率的にし、リンカーの連結効率を確保することができる。第四に、変性単量体は(メタ)アクリルアミド系単量体、(メタ)アクリロニトリルと比べて疎水性であり、水の担体内での物質移動抵抗を下げ、オリゴヌクレオチド合成過程への水の影響を低減させ、反応効率と収率を高めることができる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、重合体骨格及び機能基の構造が下記の式で表される固相合成用の多孔質樹脂を提供する。

【化1】



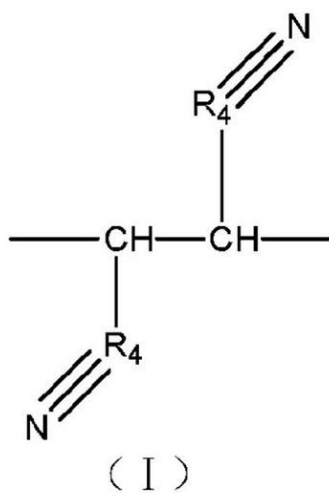
(ただし、 $R_1 = -C$ 又は $-C-CH_2-$ であり、 $R_2 = -OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2OOC-C_6H_4-OH$ 、 $-CH_2OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 、 $-(CH_2)_4OOC-C_6H_4-OH$ 、 $-(CH_2)_4OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 、 $-COONH-C_6H_4-NH_2$ 、 $-CH_2COONH-C_6H_4-NH_2$ 、 $-COO-C_6H_4-OH$ 、又は $-CH_2COO-C_6H_4-OH$ であり、 $R_3 = -H$ 、 CH_3 、 $(CH_2)_n$ - (n は 0 ~ 4 の整数である。)、 $(CH_3)_2CH(CH_2)_n$ - (n は 0 ~ 2 の整数である。)、 $(CH_3)_3C-$ 、又は $CH_3CH_2CH(CH_3)-$ 、 $CH_3CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、又は $CH_3(CH_2)_n-$

O - (n は 0 ~ 4 の 整数である。) である。)

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施例では、前記固相合成用の多孔質樹脂は、骨格に式 (I)、式 (II)、式 (III)、式 (IV) で表される繰り返し構造単位を有する共重合体である。

【 化 2 】

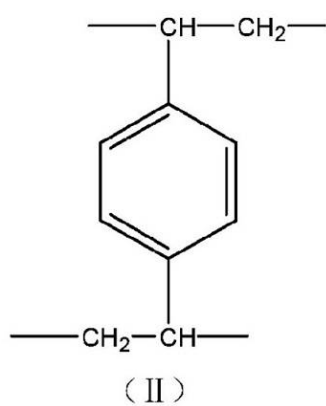


10

(ただし、 $R_4 = -C-$ 又は $-C-CH_2-$ である。)

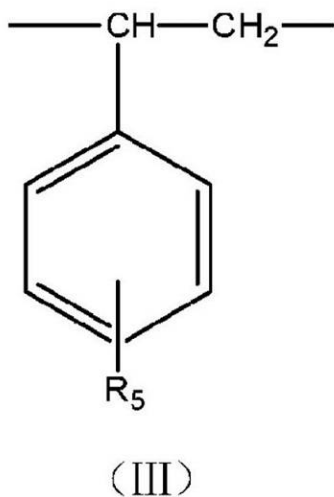
20

【 化 3 】



30

【 化 4 】



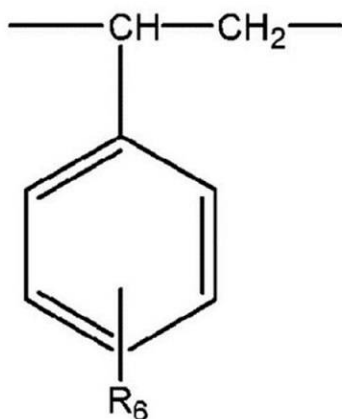
40

(ただし、 R_5 は、 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2OOC$)

50

- C₆H₄ - OH、- CH₂OOCCCH₂ - C₆H₄ - OH、- (CH₂)₄OOCC - C₆H₄ - OH、- (CH₂)₄OOCCCH₂ - C₆H₄ - OH、- COONH - C₆H₄ - NH₂、- CH₂COONH - C₆H₄ - NH₂、- COO - C₆H₄ - OH、又は - CH₂COO - C₆H₄ - OHである。))

【化5】



10

(ただし、R₆は - H、CH₃(CH₂)_n - (nは0～4の整数である。)、(CH₃)₂CH(CH₂)_n - (nは0～2の整数である。)、(CH₃)₃C -、CH₃CH₂CH(CH₃) -、CH₃CH₂C(CH₃)₂ -、CH₃CH₂CH₂CH(CH₃) -、又はCH₃(CH₂)_n - O - (nは0～4の整数である。)である。)

【0010】

いくつかの実施例では、前記固相合成用の多孔質樹脂において、ヒドロキシ又はアミノの含有量の範囲が100～1000 μmol/g、好ましくは400～700 μmol/gである。

【0011】

いくつかの実施例では、前記固相合成用の多孔質樹脂において、粒径の範囲が35～200 μm、好ましくは50～100 μmである。

30

【0012】

いくつかの実施例では、前記固相合成用の多孔質樹脂において、平均細孔径が10～200 nm、好ましくは40～100 nmである。

【0013】

本発明はまた、
製造過程は、

水、分散剤、無機塩から構成される水相と、モノビニル化合物、架橋単量体、機能性単量体、変性単量体、油性界面活性剤、希釈剤及び開始剤から構成される油相とをそれぞれ調製するステップであって、モノビニル化合物、架橋単量体、機能性単量体及び変性単量体は重合反応に関与し、単量体と総称し、油性界面活性剤及び希釈剤は重合反応に関与せず、主に孔形成作用を果たし、孔形成剤と総称するステップと、油相を水相に加えて、攪拌して昇温させて、反応させて、反応終了後、孔形成剤を除去し、多孔質重合体樹脂を得るステップと、さらに多孔質重合体樹脂を反応させて、機能基としてヒドロキシ又はアミノを含有する固相合成担体ステップと、を含む上記固相合成用の多孔質樹脂の製造方法を開示する。

40

【0014】

いくつかの実施例では、前記モノビニル化合物は芳香族モノビニル化合物であり、前記芳香族モノビニル化合物はスチレン及びそのベンゼン環置換誘導体であり、置換基が1～5個の炭素原子を含有するアルキルスチレン、例えばメチルスチレン、エチルスチレン、

50

ノルマルプロピルスチレン、イソプロピルスチレン、ノルマルブチルスチレン、イソブチルスチレン、s-ブチルスチレン、t-ブチルスチレン、n-ペンチルスチレン、イソペンチルスチレン、s-ペンチルスチレン又はt-ペンチルスチレン；又は置換基が1～5個の炭素原子を含有するアルコキシスチレン、例えばメトキシスチレン、エトキシスチレン、プロポキシスチレン、ブトキシスチレン又はペンチルオキシスチレンである。好ましいモノビニル化合物はスチレンである。

【0015】

いくつかの実施例では、前記架橋単量体は2つ以上の非共役ビニルを有する多官能基単量体であり、本発明では、好ましくはジビニルベンゼンである。前記ジビニルベンゼンはo-ジビニルベンゼン、m-ジビニルベンゼン、p-ジビニルベンゼン又はこれらの3つの混合物である。

10

【0016】

いくつかの実施例では、前記機能性単量体は、ラジカル重合可能な二重結合と、ヒドロキシ、アミノ、ハロゲン化基又は反応を通じてヒドロキシ、アミノに転化可能な基との両方を含有するものである。オリゴヌクレオチド合成過程では、反応性ヒドロキシ又はアミノはオリゴヌクレオチドを連結する活性部位となり、アミノ、アミノアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキルなどであってもよい。好ましくは、第1級アミノ、アミノメチル、ヒドロキシ、メチロールなどであってもよい。ヒドロキシスチレン及びその誘導体、例えば4-ヒドロキシスチレンなど、ヒドロキシアルキルスチレン及びその誘導体、例えば4-ヒドロキシメチルスチレンなど；アシルオキシスチレン及びその誘導体、例えば4-アセトキシスチレン、ベンゾイルオキシスチレンなど；アミノスチレン及びその誘導体、例えば4-アミノスチレンなど、アミノアルキルスチレン及びその誘導体、例えば4-アミノメチルスチレンなど；ハロアルキルスチレン単量体、例えば4-(4-ブロモブチル)スチレン、4-クロロメチルスチレンなど；4-ビニルフェニルエステル単量体、例えば4-ビニル安息香酸メチル、4-エテニルベンゼン酢酸エチルエステルなどを含むが、これらに限定されない。

20

【0017】

いくつかの実施例では、前記機能性単量体としては、ヒドロキシ保護基又はアミノ保護基が含有されており、保護基を直接切断することによってアミノ又はヒドロキシが形成され得る単量体があり、例えば、アシルオキシスチレンはアルカリ又は酸による加水分解によってヒドロキシに転化され、オリゴヌクレオチドを連結する活性部位となってもよく、官能化反応によって活性部位として機能し得るアミノ又はヒドロキシに転化する必要がある単量体もあり、例えば、ハロアルキルスチレンは加水分解によってヒドロキシに転化したり、Gabriel反応によって第1級アミノに転化して、オリゴヌクレオチドを連結する活性部位となってもよく、アミノ又はヒドロキシを備える連結アームを活性部位として連結する必要がある単量体もあり、例えば、ハロアルキルスチレンは4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸と反応してヒドロキシを生成し、オリゴヌクレオチドを連結する活性部位となってもよく、また、上記の複数の反応の組み合わせにより活性部位となるアミノ又はヒドロキシを取得する必要がある単量体もあり、例えば、4-ビニルフェニルエステル単量体系の単量体の場合、まず加水分解してヒドロキシを露出し、次にハイドロキノン又はp-フェニレンジアミンと反応して、活性部位となるアミノ又はヒドロキシを得る。

30

40

【0018】

いくつかの実施例では、前記変性単量体は、単量体においてラジカル重合に関与可能な二重結合と、2つのシアノとの両方を有するものである。このような変性単量体は単独重合ができず、他の単量体と共重合することしかできず、トランスブテンジニトリル、1,4-ジシアノ-2-ブテンなどを含むが、これらに限定されない。本発明では、好ましくはトランスブテンジニトリルである。

【0019】

いくつかの実施例では、前記開始剤は有機過酸化物又はアゾ化合物であり、過酸化ベン

50

ゾイル、過酸化ラウロイル、*t*-ブチルパーオキシ2-エチルヘキサノエート、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)などを含むが、これらに限定されない。開始剤の使用量は単量体全重量の0.5~5%である。

【0020】

いくつかの実施例では、前記油溶性界面活性剤は重合反応に関与せず、水に不溶又は微溶である界面活性剤であり、トリオレイン酸ソルピタン、ポリオキシエチレンソルピトール蜜ロウ誘導体、トリステアリン酸ソルピタン、ヘキサステアリン酸ポリオキシエチレンソルピトール、エチレングリコール脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、プロピレングリコールモノステアリン酸エステル、ソルピタンセスキオレイン酸エステル、ポリオキシエチレンソルピトールオレイン酸エステル、モノステアリン酸グリセリル、ヒドロキシラノリン、ソルピタンモノオレイン酸エステル、プロピレングリコールモノラウリン酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステルのうちの1種又は複数種の組み合わせを含むが、これらに限定されない。前記希釈剤は重合反応に関与せず、水に不溶又は微溶である有機溶媒であり、芳香族炭化水素例えばベンゼン、トルエン、エチルベンゼンなど；脂肪族炭化水素例えば炭素数6~12の直鎖、分岐鎖又は環状アルカン例えばヘキサン、ヘプタン、オクタン、ドデカン、イソオクタン、イソドデカン、シクロヘキサンなど；ハロ炭化水素例えばクロロホルム、クロロベンゼンなど；炭素数4以上のエステル例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、フタル酸ジブチルなど；アルコール例えば炭素数4~12の直鎖、分岐鎖又は環状アルカンアルコール、例えばヘキサノール、シクロヘキサノール、オクタノール、イソオクタノール、デカノール、ドデカノールなどを含むがこれらに限定されない。油溶性界面活性剤及び希釈剤はいずれも重合反応に関与せず、主に孔形成作用を果たし、孔形成剤と総称する。

【0021】

いくつかの実施例では、前記水相は水、分散剤及び無機塩を含み、前記分散剤は水溶性高分子であり、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルピロリドンのうちの1種又は複数種を含むが、これらに限定されない。分散剤の使用量は水相の重量の0.1~5%である。前記無機塩は、水相の密度を調整しながら、油相における各成分の水相での溶解度を下げ、油滴を水相により安定的に分散させる役割を果たす。前記無機塩は塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸カルシウム等のうちの1種又は複数種を含むがこれらに限定されない。無機塩の使用量は水相の使用量の20%以下である。

【0022】

いくつかの実施例では、樹脂間の粘着を減少させ、重合熱の電導性を高め、また、装置の利用率を向上させ、生産効率を高めるために、油相と水相との重量比は1:3~1:20に設定されている。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態では、各成分は以下のような量で存在する。初期では、油相中に存在するモノビニル化合物は単量体全量に対して40~95.9重量%であり、油相中に存在する架橋単量体は単量体全量に対して2~20重量%であり、油相中に存在する機能性単量体は単量体全量に対して2~20重量%であり、油相中に存在する変性単量体は単量体全量に対して0.1~20重量%であり、油相中に存在する孔形成剤の重量は単量体全重量の15~70%であり、油溶性界面活性剤は孔形成剤全重量の0.1~15%を占め、希釈剤は孔形成剤全重量の85~99.9%を占める。

【0024】

本発明のいくつかのより好適な実施形態では、各成分は以下のような量で存在する。初期では、油相中に存在するモノビニル化合物は単量体全量に対して60~88重量%であり、油相中に存在する架橋単量体は単量体全量に対して5~15重量%であり、油相中に

10

20

30

40

50

存在する機能性単量体は単量体全量に対して5～15重量%であり、油相中に存在する変性単量体は単量体全量に対して2～10重量%であり、油相中に存在する孔形成剤の重量は単量体全重量の25～50%である。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態では、重合温度は50～90、好ましくは60～85である。

【0026】

本発明のいくつかの実施例では、前記固相合成用の多孔質樹脂の製造方法は、

反応器に一定量の精製水を加え、水相重量に対して分散剤0.1～5重量%と水相重量に対して無機塩20重量%以下とを加え、溶解して、水相を得るステップと、油相と水相との重量比が1:3～1:20となるように、単量体全重量に対して、モノビニル化合物40～95.9%と、架橋単量体2～20%と、機能性単量体2～20%と、変性単量体0.1～20%と、孔形成剤重量に対して油性界面活性剤が0.1～15%、希釈剤が85～99.9%を占める孔形成剤15～70%と、開始剤と、を秤取し、均一に混合して、油相を得るステップと、油相を反応器に加えて、攪拌し、50～90に昇温させて、反応させて、反応終了後、孔形成剤を除去し、篩分けして適切な粒径の樹脂を収集し、真空乾燥させ、多孔質重合体樹脂を得るステップと、を含む。さらに樹脂を反応させ、アミノ又はヒドロキシを官能基とした多孔質樹脂を得る。

10

【0027】

本発明のいくつかの実施例では、前記固相合成用の多孔質樹脂の製造方法は、

反応器に一定量の精製水を加え、水相重量に対して分散剤0.1～5重量%と無機塩20重量%以下とを加え、溶解して、水相を得るステップと、油相と水相との重量比が1:3～1:20となるように、単量体全重量に対して、モノビニル化合物60～88%と、架橋単量体5～15%と、機能性単量体5～15%と、変性単量体2～10%と、孔形成剤重量に対して油性界面活性剤が0.1～15%、希釈剤が85～99.9%を占める孔形成剤25～50%と、開始剤と、を秤取し、均一に混合して、油相を得るステップと、油相を反応器に加えて、攪拌し、60～85に昇温させて、反応させて、反応終了後、孔形成剤を除去し、篩分けして適切な粒径の樹脂を収集し、真空乾燥させ、多孔質重合体樹脂を得るステップと、を含む。さらに樹脂を反応させ、官能基をアミノ又はヒドロキシとする多孔質樹脂を得る。

20

30

【0028】

上記方法によれば、本発明における固相合成用の多孔質樹脂、すなわち、ヒドロキシ又はアミノを含有する多孔質樹脂が得られる。本発明では、アミノ又はヒドロキシの含有量、すなわち置換度は、Fmoc-Leu-OHと反応した後、Fmoc保護基を除去し、比色法により除去したFmocの量を決定し、多孔質樹脂におけるアミノ又はヒドロキシの含有量を算出することにより得られてもよい。

【0029】

いくつかの実施例では、具体的な操作は以下のとおりである。担体1.0gを正確に秤取し、アセトニトリル溶液7mlに懸濁させた後、Fmoc-Leu-OH 0.5g、HBTU 0.5g及びDIEA 0.5mlを加え、室温で2h攪拌反応させる。反応終了後、アセトニトリル(1回あたりの使用量10ml、3回洗浄)、メタノール(1回あたりの使用量10ml、3回洗浄)を用いて樹脂を順次洗浄し、その後、樹脂をベークする。樹脂0.1000gを正確に秤取し、20%ピペリジン/DMF(v/v)溶液に懸濁させ、室温で30min振とうし、濾過して、濾液を収集し、DMFを用いて樹脂を洗浄し、濾液を収集する。濾液を併合して定容し、適切な倍数だけ希釈して、300nmでの吸光度を測定する。濃度が既知の一連のFmoc-Leu-OHを用いて同様なFmoc除去反応を行って、吸光度を測定し、検量線を作成する。検量線から多孔質樹脂中のアミノ又はヒドロキシの含有量を算出する。

40

【0030】

多孔質樹脂の置換度は機能性単量体の単量体全量における割合により決定され、機能性

50

単量体の使用量を調整することにより置換度の異なる一連の多孔質樹脂が得られ得る。多孔質樹脂の置換度はオリゴヌクレオチド合成量を決定し、置換度が低すぎると、1 ロットのオリゴヌクレオチドの産量が下がり、置換度が高すぎると、オリゴヌクレオチドの純度が影響を受ける。本発明では、多孔質樹脂の置換度の範囲は $100 \sim 1000 \mu\text{mmol} / \text{g}$ 、好ましくは $400 \sim 700 \mu\text{mmol} / \text{g}$ である。

【0031】

本発明では、多孔質樹脂の粒径は粒子画像処理装置により検出される。すなわち、多孔質樹脂をスライドガラスに均一に分布させ、顕微鏡で担体粒子を拡大させながら、カメラで顕微鏡により拡大された多孔質樹脂の粒子画像を撮影し、コンピュータによって多孔質樹脂の外観特徴及び粒度を分析して計算する。

10

【0032】

多孔質樹脂の粒径の大きさは主に水相における分散剤の種類と使用量、孔形成剤の種類と使用量、懸濁重合過程における攪拌の回転数により左右される。これらの条件を調整することにより、多孔質樹脂の粒径を調整することができる。多孔質樹脂の粒径が大きすぎると、一方では、担体の比表面積が下がり、単位面積あたり活性部位の数が増え、オリゴヌクレオチドの純度に悪影響を与え、他方では、オリゴヌクレオチドの合成過程において物質移動速度が遅くなり、不純物が増加する。多孔質樹脂の粒径が小さすぎると、合成過程における圧力が高すぎ、装置のコストが大幅に高まる。本発明では、多孔質樹脂の粒径の範囲は $35 \sim 200 \mu\text{m}$ 、好ましくは $50 \sim 100 \mu\text{m}$ である。

【0033】

20

多孔質樹脂の平均細孔径は水銀圧入法により測定される。すなわち、サンプル $0.1500 \sim 0.3000 \text{ g}$ を正確に秤取して全自動水銀圧入装置 AutoPore IV 9500 (Micromeritics Instrument Co.) に入れ、汞の接触角を 130° 、表面張力を 485 dyn/cm に設定し、この条件で水銀圧入法により測定される。多孔質樹脂の平均細孔径の大きさは主に孔形成剤の種類と使用量、架橋剤の使用量、反応温度や時間などにより左右される。多孔質樹脂の平均細孔径はこれらの条件を調整することにより調整され得る。多孔質樹脂の平均細孔径が小さすぎると、物質移動が困難になり、合成効率が影響を受け、多孔質樹脂の平均細孔径が大きすぎると、多孔質樹脂の比表面積が低下し、単位面積あたりの活性部位が増加し、オリゴヌクレオチド合成過程で、ヌクレオチドの増加により相互作用が発生し、オリゴヌクレオチドの純度が影響を受ける。本発明では、多孔質樹脂の平均細孔径は $10 \sim 200 \text{ nm}$ 、好ましくは $40 \sim 100 \text{ nm}$ である。

30

【発明の効果】

【0034】

従来技術に比べて、本発明は主に以下の4つの利点がある。第一に、変性単量体は重合速度を調整することができ、これは活性部位の均一な分布に有利である。第二に、樹脂の膨潤性能を調整することで、担体の異なる溶媒中での膨潤体積の変化を低減させる。第三に、単量体分子の構造における2つのシアノによりオニウム塩系縮合剤がより高性能になり、リンカーの連結効率が確保される。第四に、特許US8592542において「変性単量体」として使用される(メタ)アクリルアミド系単量体、特許US8653152において「変性単量体」として使用される(メタ)アクリロニトリルと比べて、本発明で使用される変性単量体は比較的に疎水的であり、洗浄過程において多孔質樹脂内に残留された微量の水分を素早く除去することができ、オリゴヌクレオチド合成過程への水の影響を低減させ、反応効率及び収率を高める。また、本発明は、油性界面活性剤を使用して、油中水型エマルション液滴をテンプレートとして孔を形成するものであり、担体の細孔径の大きさ及び分布を正確に制御することができ、反応試薬の拡散に有利であり、反応効率を高め、不純物の生成を減らす。

40

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】実施例1における担体の走査電子顕微鏡像である。

50

【図 2】実施例 2 における担体の走査電子顕微鏡像である。

【図 3】実施例 6 における担体の走査電子顕微鏡像である。

【図 4】実施例 9 における担体の走査電子顕微鏡像である。

【図 5】実施例 1 において水銀圧入法により得られる担体の細孔径分布である。

【図 6】実施例 2 において水銀圧入法により得られる担体の細孔径分布である。

【図 7】実施例 6 において水銀圧入法により得られる担体の細孔径分布である。

【図 8】実施例 9 において水銀圧入法により得られる担体の細孔径分布である。

【発明を実施するための形態】

【0036】

以下、特定実施例を参照して本発明の技術解決手段をさらに説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例 1】

【0037】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得た。スチレン 110 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量％）10 g、p-クロロメチルスチレン 12 g、トランスブテンジニトリル 8 g、ソルビタンモノオレイン酸エステル 5 g、イソオクタノール 45 g 及び過酸化ベンゾイル 2.5 g を秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、80 に昇温させて 4 h 重合した。反応終了後、熱水で洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径 50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、塩素含有量が 550 $\mu\text{mmol/g}$ の重合体多孔質樹脂を得た。

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、N,N-ジメチルホルムアミド 500 ml を投入し、攪拌した。その後、フタルイミドカリウム塩 30 g を加え、95 に昇温させて 16 時間反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、その後、N,N-ジメチルホルムアミドで 2 回洗浄し、精製水で中性となるまで洗浄し、次に、無水エタノールで 3 回洗浄し、樹脂をろ別して乾燥させた。反応器に無水エタノール 200 g とヒドラジン水和物 50 g を加え、75 に昇温させて 16 時間反応させた。反応終了後、体積比 50 : 50 のエタノール / 精製水溶液で 3 回洗浄し、精製水で中性となるまで洗浄し、次に、無水エタノールで 3 回洗浄し、洗浄液をろ別した。反応器に無水エタノール 200 g と濃塩酸 50 g を加え、60 に昇温させて 6 h 反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、アミノを含有する固相合成担体を得た。得たアミノ固相合成担体はアミノ含有量が 543 $\mu\text{mmol/g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が 48 nm である。

【実施例 2】

【0038】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得た。メチルスチレン 70 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量％）28 g、p-クロロメチルスチレン 14 g、1,4-ジシアノ-2-ブテン 28 g、トリオレイン酸ソルビタン 6 g、イソオクタノール 45 g、トルエン 30 g 及び過酸化ベンゾイル 1 g を秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、70 に昇温させて 8 h 重合した。反応終了後、熱水で洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径 50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、塩素含有量が 660 $\mu\text{mmol/g}$ の重合体多孔質樹脂を得た。

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、N,N-ジメチルホルムアミド 500 ml を投入し、攪拌した。その後、フタルイミドカリウム塩 35 g を加え、95 に昇温させて 16 時間反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、その後、N,N-ジメチルホルムアミドで 2 回洗浄し、精製水で中性となるまで洗浄し、次に、無水エタノールで 3 回洗浄し、樹脂をろ別して乾燥させた。反応器に無水エタノール

200 g とヒドラジン水和物 50 g を加え、75 に昇温させて16時間反応させた。反応終了後、体積比 50 : 50 のエタノール / 精製水溶液で3回洗浄し、精製水で中性となるまで洗浄し、次に、無水エタノールで3回洗浄し、洗浄液をろ別した。反応器に無水エタノール 200 g と濃塩酸 50 g を加え、60 に昇温させて6h 反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、アミノを含有する固相合成担体を得た。得たアミノ固相合成担体はアミノ含有量が $650 \mu\text{mmol} / \text{g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が 132 nm である。

【実施例 3】

【0039】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得た。エチルスチレン 127 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量%）4 g、4 - （4 - プロモブチル）スチレン 8 . 8 g、トランスブテンジニトリル 0 . 2 g、ポリオキシエチレンソルビトール蜜ロウ誘導体 1 g、イソオクタノール 12 g、フタル酸ジブチル 12 g 及び過酸化ベンゾイル 2 . 5 g を秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、65 に昇温させて10h 重合した。反応終了後、熱水で洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ の樹脂を収集し、真空乾燥させ、臭素含有量 $265 \mu\text{mmol} / \text{g}$ の重合体多孔質樹脂を得た。

10

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、N , N - ジメチルホルムアミド 600 ml を投入し、攪拌した。その後、4 - ヒドロキシ安息香酸 5 . 4 g、無水炭酸カリウム 5 . 4 g、ヨウ化カリウム 0 . 3 g を加えた。75 に昇温させて、6h 反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得た。得たヒドロキシ固相合成担体はヒドロキシ含有量が $250 \mu\text{mmol} / \text{g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が 23 nm である。

20

【実施例 4】

【0040】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得た。スチレン 110 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量%）11 g、p - クロロメチルスチレン 9 g、トランスブテンジニトリル 10 g、トリステアリン酸ソルビタン 0 . 5 g、トルエン 20 g、フタル酸ジブチル 40 g 及び過酸化ベンゾイル 1 g を秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、60 に昇温させて7h 重合した。反応終了後、熱水で洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ の樹脂を収集し、真空乾燥させ、塩素含有量が $425 \mu\text{mol} / \text{g}$ の重合体多孔質樹脂を得た。

30

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、無水エタノール 300 ml を投入し、攪拌した。ピーカーに水酸化ナトリウム 30 g を秤取し、脱イオン水 300 ml で溶解して、反応器にゆっくりと加えた。65 に昇温させて、6h 反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得た。得たヒドロキシ固相合成担体はヒドロキシ含有量が $420 \mu\text{mmol} / \text{g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が 43 nm である。

40

【実施例 5】

【0041】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得た。スチレン 83 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量%）25 g、N - （4 - ビニルフェニル） - アセトアミド 18 g、トランスブテンジニトリル 14 g、トリステアリン酸ソルビタン 3 g、イソオクタノール 16 g、イソドデカン 8 g 及び過酸化ベンゾイル 2 g を秤取し、均一に混合して

50

、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、55 に昇温させて10 h重合した。反応終了後、熱水で洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、重合体多孔質樹脂を得た。

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた1 L反応器に重合体多孔質樹脂50 g、無水エタノール300 mlを投入し、攪拌した。ピーカーに水酸化ナトリウム30 gを秤取し、脱イオン水300 mlで溶解して、反応器にゆっくりと加えた。65 に昇温させて、6 h反応させた。反応終了後、室温に冷却させ、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、アミノを含有する固相合成担体を得た。得たアミノ固相合成担体はアミノ含有量が840 $\mu\text{mmol/g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が43 nmである。

【実施例6】

10

【0042】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた3 L反応器に精製水2 L、ポリビニルアルコール20 g、塩化ナトリウム60 gを投入して、溶解して、水相を得た。スチレン111 g、ジビニルベンゼン（含有量80重量%）11 g、4 - アセトキシスチレン13 g、トランスブテンジニトリル5 g、ソルビタンモノオレイン酸エステル8 g、イソオクタノール40 g、イソドデカン20 g及び過酸化ベンゾイル2.5 gを秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、78 に昇温させて、6 h重合した。反応終了後、熱水で樹脂を洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、重合体多孔質樹脂を得た。

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた1 L反応器に重合体多孔質樹脂50 g、アセトニトリル300 mlを投入し、攪拌した。ヒドラジン水和物7.5 mlをゆっくりと加え、室温で3 h反応させた。反応終了後、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得た。得たヒドロキシ固相合成担体はヒドロキシ含有量が550 $\mu\text{mmol/g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が64 nmである。

20

【実施例7】

【0043】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた3 L反応器に精製水2 L、ポリビニルアルコール20 g、塩化ナトリウム60 gを投入して、溶解して、水相を得た。スチレン130 g、ジビニルベンゼン（含有量80重量%）5 g、4 - アセトキシスチレン4 g、トランスブテンジニトリル1 g、プロピレングリコール脂肪酸エステル1 g、イソオクタノール40 g、トルエン10 g及び過酸化ベンゾイル3.5 gを秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、70 に昇温させて6 h重合した。反応終了後、熱水で樹脂を洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、重合体多孔質樹脂を得た。

30

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた1 L反応器に重合体多孔質樹脂50 g、アセトニトリル300 mlを投入し、攪拌した。ヒドラジン水和物7.5 mlをゆっくりと加え、室温で3 h反応させた。反応終了後、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得た。得たヒドロキシ固相合成担体はヒドロキシ含有量が175 $\mu\text{mmol/g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が53 nmである。

40

【実施例8】

【0044】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた3 L反応器に精製水2 L、ポリビニルアルコール20 g、塩化ナトリウム60 gを投入して、溶解して、水相を得た。スチレン72 g、ジビニルベンゼン（含有量80重量%）28 g、ベンゾイルオキシスチレン27 g、トランスブテンジニトリル13 g、ヒドロキシラノリン5 g、トルエン10 g、フタル酸ジブチル20 g及び過酸化ベンゾイル3 gを秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、80 に昇温させて6 h重合した。反応終了後、熱水で樹脂を洗浄して、エタノールで還流して孔形成剤を抽出して除去し、篩分けして粒径50 ~ 100 μm

50

の樹脂を収集し、真空乾燥させ、重合体多孔質樹脂を得た。

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、アセトニトリル 300 ml を投入し、攪拌した。ヒドラジン水和物 7.5 ml をゆっくりと加え、室温で 3 h 反応させた。反応終了後、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得た。得たヒドロキシ固相合成担体はヒドロキシ含有量が $852 \mu\text{mmol/g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が 47 nm である。

【実施例 9】

【0045】

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 3 L 反応器に精製水 2 L、ポリビニルアルコール 20 g、塩化ナトリウム 60 g を投入して、溶解して、水相を得た。スチレン 85 g、ジビニルベンゼン（含有量 80 重量%）24 g、4 - ビニル安息香酸メチル 18 g、トランスブテンジニトリル 13 g、ポリオキシエチレンソルビトールオレイン酸エステル 4 g、イソドデカン 40 g、フタル酸ジブチル 40 g 及び過酸化ベンゾイル 2.5 g を秤取し、均一に混合して、油相を得た。油相を反応器に加えて、攪拌し、70 に昇温させて 6 h 重合した。反応終了後、熱水で樹脂を洗浄して、エタノールで還流して抽出し、篩分けして粒径 50 ~ 100 μm の樹脂を収集し、真空乾燥させ、重合体多孔質樹脂を得た。

凝縮器、攪拌器及び温度計を備えた 1 L 反応器に重合体多孔質樹脂 50 g、アセトニトリル 300 ml を投入し、攪拌した。その後、ハイドロキノン 8.8 g、HBTU 23 g 及び DIEA 13 ml を加え、室温で 2 h 反応させた。反応終了後、中性となるまで水洗し、その後、真空乾燥させ、ヒドロキシを含有する固相合成担体を得た。得たヒドロキシ固相合成担体はヒドロキシ含有量が $735 \mu\text{mmol/g}$ であり、水銀圧入法によって測定された平均細孔径が 143 nm である。

【実施例 10】

【0046】

実施例 1 ~ 9 で製造した固相合成担体のそれぞれのアセトニトリル及びトルエンでの膨潤度をテストした。以下のようにテストした。1.5 g 程度のサンプルを秤取して、栓付きメスシリンダに入れ、それぞれトルエン又はアセトニトリルを所定の目刻まで加えた。その後、ガラス棒を用いて樹脂と溶媒を攪拌して、十分に膨潤させ、栓を締め付け、2 ~ 3 時間後、ガラス棒を用いて樹脂を緩やかに攪拌して気泡を除去し、樹脂を均一に分散させて、ブロッキングを回避し、攪拌棒を取り出して、メスシリンダをゴムマット付きのテーブルに叩きつけて、樹脂を密にし、24 h 放置後、その体積を読み取り、その膨潤度を計算した。

結果を表 1 に示す。

【表 1】

表 1. 樹脂膨潤度試験									
	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9
アセトニトリルでの膨潤度 (ml/g)	3.7	3.9	3.4	3.7	3.6	3.8	3.8	3.7	3.9
トルエンでの膨潤度 (ml/g)	5.5	6.2	4.9	5.1	5.0	5.4	5.4	5.4	5.9

【実施例 11】

【0047】

実施例で製造した固相合成担体及びNittoPhase HL固相合成担体を利用して、樹脂の性能を評価した。本発明の優位性をより直観的に表現するために、担体充填量 (g) = 合成カラム体積 (ml) / 担体のトルエンでの膨潤度 (ml/g) とし、オリゴヌクレオチドの合成過程における洗浄体積は1つの合成カラム体積に限定された。

反応器に固相合成担体10g、アセトニトリル50mlを順次秤取して10min膨潤させた後、適量のDMT-dT-3'-コハク酸、HBTU、DIEAを加え、室温で12h反応させた。反応終了後、アセトニトリルで5回洗浄し、その後、Cap A (アセトニトリル20ml、ピリジン7.5ml、N-メチルイミダゾール5.0mlからなる) 及びCap B (アセトニトリル10ml、無水酢酸4ml) を加え、室温で30min反応させた。反応終了後、アセトニトリルで5回洗浄し、真空乾燥させ、DMT-dTを担持した担体を得た。p-トルエンスルホン酸/アセトニトリル溶液を用いて担持したDMT基を除去し、分光光度法によって412nm波の下で担体に担持されたDMT基の担持量を測定し、結果を表2に示す。

DMT-dTを担持した担体を合成カラム(32ml)に充填し、合成カラムをAKTA OligoPilot 100に取り付け、配列d[ACGTACGTACGTACGTACGT]の20塩基長のオリゴヌクレオチドを合成した。合成過程は以下のとおりである。1.ジクロロメタンを用いて樹脂を膨潤させた。2.10% DCA/DCMでDMT基を除去した。3.無水アセトニトリルで洗浄した。4.ホスホロアミダイト単量体及び活性化試薬を加えて縮合した。5.無水アセトニトリルで洗浄した。6.酸化剤を加えて酸化した。7.無水アセトニトリルで洗浄した。8.キャッピング試薬を加えてキャッピングした。9.無水アセトニトリルで洗浄した。10.ステップ2を繰り返して、次のサイクルを開始させた。

合成完了後、担体を取り出して乾燥させた。その後、ガラス瓶に入れて、適量の濃アンモニア水を加え、55℃で16h反応させ、オリゴヌクレオチドを担体から分解し取り出し、また、塩基での保護基を除去した。担体とオリゴヌクレオチドを濾過により分離し、濾液を乾燥させ、オリゴヌクレオチド粗粉を得て、HPLCによりその純度を検出し、オリゴヌクレオチドの収率を算出した。結果を表2に示す。

【表2】

表2. 樹脂性能試験										
	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	NittoPhase HL
DMT-dT-3'-コハク酸添加量 (g)	2.8	2.2	1.4	2.8	3.5	2.8	0.8	3.5	2.8	-
HBTU 添加量 (g)	1.4	1.1	0.7	1.4	1.8	1.4	0.4	1.8	1.4	
DIEA 添加量 (ml)	1.3	1.0	0.7	1.3	1.6	1.3	0.4	1.6	1.3	
DMT 基含有量 (μmol/g)	318	241	133	298	408	315	72	392	328	321*
トルエンでの膨潤度 (ml/g)	5.5	6.2	4.9	5.1	5.0	5.4	5.4	5.4	5.9	5.8
担体充填量 (g)	5.8	5.1	6.5	6.3	6.4	5.9	5.9	5.9	5.4	5.5
HPLC 純度 (%)	85.4	86.2	81.9	82.3	81.4	86.3	84.2	83.0	83.5	79.5
収率 (%)	65.1	64.9	60.9	62.7	63.2	66.3	64.1	63.5	64.3	60.3
注：*NittoPhase HL 担持UnyLinker。										

【0048】

表2から分かるように、本発明のオリゴヌクレオチド固相合成担体によれば、オリゴヌクレオチドの収率及び純度を向上させることができ、オリゴヌクレオチドの生産コストを

削減させるのに有利である。

【 0 0 4 9 】

なお、以上は本発明の好適な実施形態に過ぎず、当業者であれば、本発明の構想から逸脱せずに、いくつかの変形や改良が可能であり、これらは全て本発明の保護範囲に属する。

10

20

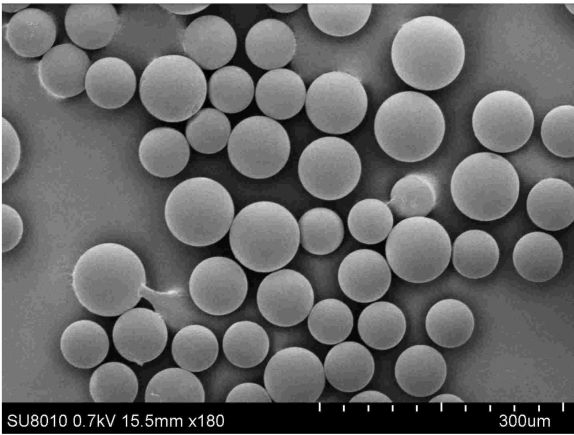
30

40

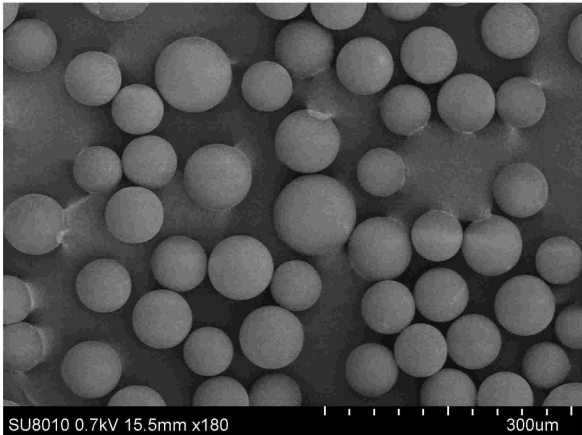
50

【図面】

【図 1】

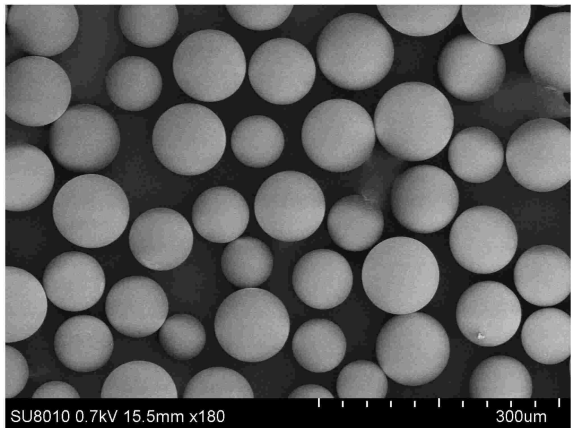


【図 2】

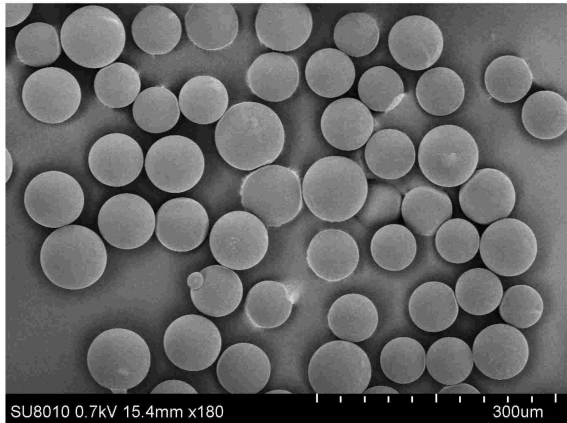


10

【図 3】



【図 4】



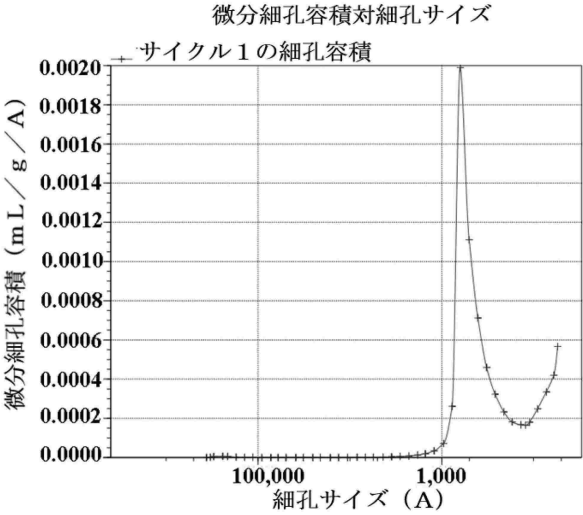
20

30

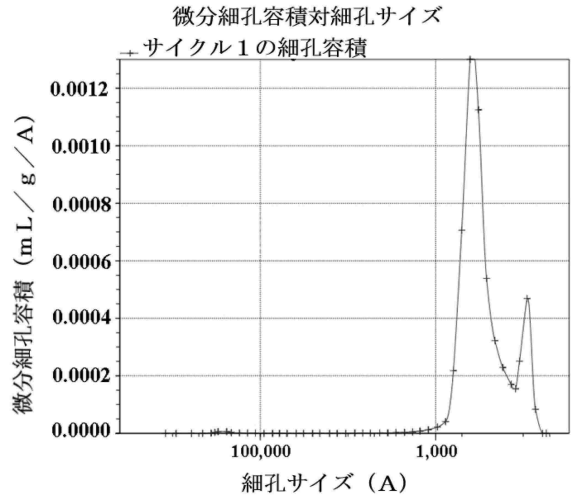
40

50

【図 5】

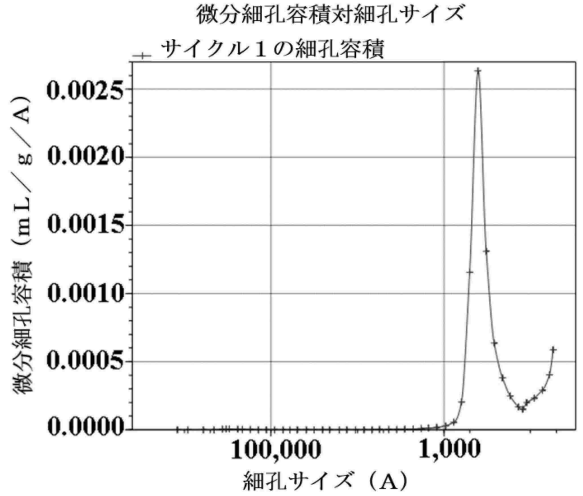


【図 6】

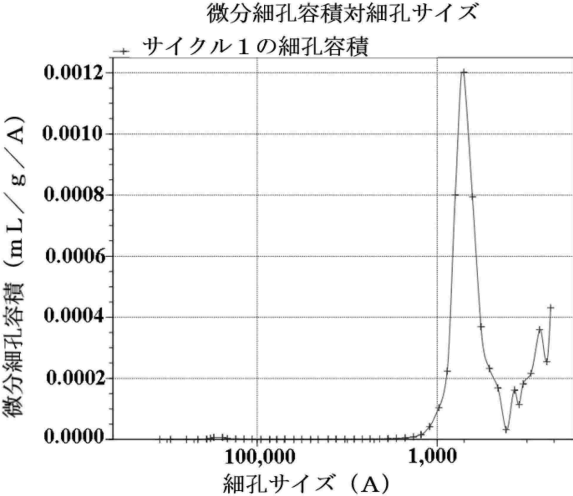


10

【図 7】



【図 8】



20

30

40

50

フロントページの続き

- 中国陝西省西安市高新区錦業路 1 3 5 号
(72)発明者 吳丹
中国陝西省西安市高新区錦業路 1 3 5 号
(72)発明者 趙偉傑
中国陝西省西安市高新区錦業路 1 3 5 号
(72)発明者 李延軍
中国陝西省西安市高新区錦業路 1 3 5 号
(72)発明者 劉瓊
中国陝西省西安市高新区錦業路 1 3 5 号
(72)発明者 寇曉康
中国陝西省西安市高新区錦業路 1 3 5 号
審査官 赤澤 高之
(56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 1 1 7 4 3 (J P , A)
特開 2 0 1 0 - 0 0 6 8 8 8 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 3 2 6 2 1 0 (U S , A 1)
特開 2 0 1 1 - 0 6 3 7 2 8 (J P , A)
特表 2 0 1 3 - 5 3 9 9 0 5 (J P , A)
特開平 0 6 - 3 0 6 0 3 7 (J P , A)
(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 0 8 J
C 0 8 F