(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4523176号
(P4523176)

(45)発行日　平成22年8月11日(2010.8.11)　(24)登録日　平成22年6月4日(2010.6.4)

(51)Int.Cl.		F I		
C08F 212/36	(2006.01)	C08F 212/36	ZCC	
C08F 212/06	(2006.01)	C08F 212/06		
C08F 212/14	(2006.01)	C08F 212/14		
B01J 20/26	(2006.01)	B01J 20/26	G	
C07K 1/04	(2006.01)	C07K 1/04		

請求項の数 7　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-606650 (P2000-606650)
(86)(22)出願日	平成12年3月22日 (2000.3.22)
(65)公表番号	特表2002-540231 (P2002-540231A)
(43)公表日	平成14年11月26日 (2002.11.26)
(86)国際出願番号	PCT/IB2000/000331
(87)国際公開番号	WO2000/056790
(87)国際公開日	平成12年9月28日 (2000.9.28)
審査請求日	平成17年9月14日 (2005.9.14)
(31)優先権主張番号	09/273,513
(32)優先日	平成11年3月22日 (1999.3.22)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　597064713
ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス・アクチボラグ
スウェーデン国エスエー－７５１　８４
ウプサラ　ビヨルクガタン　３０
(74)代理人　100137545
弁理士　荒川　聡志
(72)発明者　ゲイアー・フォヌム
ノールウェー、エン－１４７６ラスタ、アスビヨルンスヴァイ４０番

審査官　川上　智昭

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アミノ基含有担体マトリックス、その使用および製造

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１種以上のモノビニル芳香族モノマーと１種以上のジビニル芳香族モノマーと１種以上のアミノ－モノビニル芳香族モノマーとの共重合で得られるポリビニル骨格［（－ＣＨＣＨ$_2$）$_n$］を有する担体マトリックスの上記アミノ－モノビニル芳香族モノマー由来のアミノ基に、ヌクレオシド／ヌクレオチド、デオキシヌクレオシド／デオキシヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドがその利用可能な３’－位を介して結合していて、その利用可能な５’－位が保護されているか又は保護されておらず、３’－位及び５’－位以外のヒドロキシ基又はアミノ基が保護されており、当該担体マトリックスが多孔性であって、ポア容積の１０％以上についてポアサイズ直径が１０～２０００Åの範囲内にあることを特徴とする、担体マトリックス。

【請求項２】

ポア容積の１０％以上についてポアサイズ直径が１００～１０００Åの範囲内にあることを特徴とする、請求項１記載の担体マトリックス。

【請求項３】

ポア容積の３０％以上についてポアサイズ直径が１００～１０００Åの範囲内にあることを特徴とする請求項２記載の担体マトリックス。

【請求項４】

当該マトリックスが単分散粒子集団の形態であることを特徴とする請求項１乃至請求項３のいずれか１項記載の担体マトリックス。

【請求項５】
当該マトリックスが、乾燥マトリックス１グラム当り１００マイクロモル超のモノマー単位からなるヌクレオチド／ヌクレオシド又はデオキシヌクレオチド／デオキシヌクレオシドの担持量を有することを特徴とする請求項１乃至請求項４のいずれか１項記載の担体マトリックス。
【請求項６】
当該マトリックスが、乾燥マトリックス１グラム当り１５０マイクロモル以上のモノマー単位からなるヌクレオチド／ヌクレオシド又はデオキシヌクレオチド／デオキシヌクレオシドの担持量を有することを特徴とする請求項５記載の担体マトリックス。
【請求項７】
オリゴ／ポリ－ヌクレオチド又はオリゴ／ポリ－ペプチドの固相合成のための、請求項１乃至請求項６のいずれか１項記載の担体マトリックスの使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
技術分野
この発明はアミノ基および／または誘導アミノ基が連結構造を介して付着しているポリマー炭化水素骨格［（－ＣＨＣＨ$_2$）$_n$］を含む担体マトリックスに関する。この骨格は以下では「ポリビニル骨格」または単に「骨格」と呼ぶことにする。
【０００２】
用語「誘導アミノ基」および「アミノ基から誘導された基」は該アミノ基では元のアミノ基の窒素が連結構造に結合したままで残っている基に化学的に変換されていることを意味する。
【０００３】
(背景技術)
既知の担体マトリックスでは、交差結合構造および純アミノ基と誘導アミノ基とを含む基はポリビニル骨格にある水素を置換したものであった。水素は、たとえばアルキル(メチル、エチル、など)、様々な形のアリール(たとえば、フェニル、ビニルフェニル、エチルフェニル、などのようなもの)、アシルオキシ、アリールオキシ、アルコキシ、などのようなその他の基によっても置換されている。これらの基は時にはさらに誘導化されている。
【０００４】
この型の担体マトリックスはたとえばクロマトグラフィーのような吸着および分配工程における固相として、および固相有機合成において、および細胞培養における担体として、およびたとえば酵素のような触媒のために、使用することができる。
【０００５】
この形の担体マトリックスは、以前はモノビニル化合物とジ－、トリ－およびポリ－ビニル化合物とを共重合させることによって製造されていた。これらモノマーの少なくとも１種は、重合反応後にアミノ基に変換できる官能基を含むものである。別法の一つでは、クロロメチルスチレンとジビニルベンゼンとを共重合させ、続いてアンモニアで処理していた。他の別法は残留したビニル基をアミン官能基が含まれる基に変換するものであった。
【０００６】
また、同様な担体マトリックスはポリビニル骨格を有する様々なポリマーをアンモニアガスプラズマによる処理によっても製造できることも示唆されている。例えば米国特許第５３６９０１２号参照。気相プラスマ処理ではこの骨格および／または結合基にある炭素原子に官能基が多少なりとも不規則に導入される。
【０００７】
同様なマトリックスを製造するための他の可能な方法は交差結合ポリスチレンのニトロ化と、それに続くニトロ基のアミノ基への還元である。ニトロ化は一般に酸化のような副反応多数を伴う非常に激しい条件下に行われる。それに続く、還元段階は比較的低い収率によって特徴付けられ、ポリスチレン上にニトロ基が未反応のまま残る。高度に交差結合し

た原料ではこれらの反応を満足に使用することが著しく困難である。副反応によってポリビニル骨格に直接付着する望ましくないニトロ基が得られる。

【０００８】

そこで以前から知られている担体マトリックスはアミン官能を導入するために必要な余分な工程のために、および副反応が起きるために、製造が比較的厄介であった。

【０００９】

アミノ基を有する多孔質マトリックスでは所与のマトリックスにおけるアミノ基の可用性が変動することが多いことをわれわれは発見した。この変動は例えばオリゴヌクレオチド固相合成および吸着工程などへの応用のためには最適であるとは考えられない。

【００１０】

オリゴヌクレオチド固相合成に使用するためのポリビニル骨格を含む商業的に購入できる担体マトリックスはマトリックスに付着する第一モノマーと共に販売されている。仕込量はマトリックス１ｇ当り第一のヌクレオチド約９０マイクロモルである(Primer Support High Load 30; Amersham Pharmacia Biotech AB、ウプサラ、スウェーデン)。

【００１１】

別段の指定がない限りヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、アミノ酸残基、ＤＮＡ、ＲＮＡ、オリゴ／ポリペプチドの各用語は、たとえばＤＮＡについてのＰＮＡ(ＷＯ９２２０７０３)およびＬＮＡのように、それら各々の合成類似体を含む。

【００１２】

アミノスチレンと重合可能な不飽和結合を含む他の化合物が関与する重合反応の研究は次の報告に記載されている：Imoto et al., Bull. Chem. Soc. Jap., 49(5): (1976) 1342-1345; Donya et al., Russ. J. Appl. Chem., 71(1): (1998) 132-137 (Zhurnal Prikladnoi Khimii 71(1): (1998) 127-132 から翻訳); Russ. J. Appl. Chem., 67(3:2): (1994) 400-404 (Zhurnal Prikladnoi Khimii 67(3): (1994) 450-454 から翻訳); Donya et al., Vysokomol Soedin Ser A Ser B, 36(12): (1994) 2068-2073; Donya et al., Vysokomol Soedin Ser A Ser B, 37 (5): (1995) 752-757; Donya et al., Vysokomol Soedin Ser B, 34(8): (1992) 3-8;およびDonya et al., Vysokomol Soedin Ser A, 34(12): (1992) 2068-2073。これらの文献のどれにも特異的な官能基を保持すると予想される交差結合ポリマー(担体マトリックス)の製造は記載されていない。

【００１３】

以前にアミノスチレンのホモ重合反応は自己阻害的(self-inhibiting)であろうという報告がある。Donya et al., Ukr. Khim. Zh. (ロシア語版) 56(9): (1990) 984-990 参照。

【００１４】

Masuda (Makromol. Chem. 190: (1989) 1007-1014) はスチレンとアミノスチレンとのラジカル重合反応における溶媒効果について報告した。

【００１５】

関連する問題はDyno Particle A/S (Dyno Specialty Chemicals A/S)名義で09.04.99に出願された英国特許出願第９９０８８１６３０号に記載がある。

【００１６】

米国特許第４２７５１８４号(Bargain et al., Rhone-Poulenc Industries)はビニルモノマーを記載しているが、このモノマーではビニル基がシリコン基を介して芳香族基に連結していてもよい。この芳香族基はアミノ基で官能化されていてもよい。これらのモノマーはビニル芳香族物質ではない。

【００１７】

本発明の目的

第一の目的は、ポリビニル骨格に連結構造を介して結合するアミノ基および／または誘導アミノ基を有する担体マトリックスを製造するための単純化された方法を提供することにある。

【００１８】

第二の目的は、アミノ基およびその誘導化型の可用性が改善された担体マトリックスを提

供することにある。

【００１９】

第三の目的はオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチド固相合成用の改善された担体マトリックスを提供することにある。ここに該マトリックスは、第一および第二の目的に従って改善され、所望のオリゴヌクレオチド／オリゴペプチドの収率改善を導く。

【００２０】

第四の目的は有機化合物の固相合成に使用するための、前記の型に属する改善された担体マトリックスを提供することにあり、その改良点は乾燥マトリックスグラム当り、≧１００マイクロモル、例えば≧１５０マイクロモル、さらに≧２００マイクロモルの有機試薬担持量（共有結合による付着）である。これらの数字は特にその有機試薬がヌクレオチド、デオキシヌクレオチド又はその類似体である場合の担体マトリックスについて示す。

【００２１】

第五の目的は有機化合物、特に強調すべきは低分子量有機化合物のコンビナトリアルライブラリー、の固相合成のための改善された担体マトリックスを提供することにある。

【００２２】

本発明

今回、アミノ基が適宜アシル化されていてもよいアミノ－（C_{0-10}）炭化水素ビニル芳香族モノマー１種以上を、他種のビニルモノマーと共重合させる場合にこれらの目的が達成できることが認識された。言い換えれば、重合反応後に得られるマトリックス内の実質的にすべてのアミノ基が同じ形、すなわち純粋なアミノ基であるか又はそのアシル化型である。

【００２３】

そこで本発明の第一の側面はアミノ基および／またはそのアシル化体が付着している担体マトリックスを製造する方法を含む。この方法はモノビニルモノマー(単量体Ｉ)１種またはそれ以上をジ－、トリ－またはポリビニルモノマー(単量体II)とともに共重合させる工程を含む。この方法はビニルモノマーの一部がアミノ－(C_{0-10})炭化水素基または対応するアミド基(アシル化されたアミノ－(C_{0-10})炭化水素基)が付着する芳香族環(モノマーIII)を有することによって特徴付けられる。重合反応の後に形成された重合体物質を集めて、さらに処理してもよい。このアミノ基および／またはそのアシル化体は、続いて所望の官能基に変換してもよい。例えば、アシル化されたアミノ基は加水分解によって対応するアミノ基に変換してもよい。このアミノ基は１級、２級または３級であってもよい。

【００２４】

このアミノ－(C_{0-10})炭化水素基は、好ましくはたとえばアミノモノビニルベンゼン(例えばアミノスチレンなど)およびアミノビニルナフタレンのように、すなわち炭化水素基が存在しない純粋なアミノ基であってもよい。このアミノ基は、たとえばアミド基におけるように誘導体化されていてもよい。このビニル基は芳香環に直接的に付着している。

【００２５】

アミノ－(C_{0-10})炭化水素基に存在する炭化水素基は、直線状、分枝状または環状であってもよい。これはおのおの芳香族基でも非芳香族基でもよい。また、好ましくは、たとえばフェニレンまたは純アルキレン基のような、すなわちアミノ基を芳香環に連結する炭素鎖はヘテロ原子を含まないものである。

【００２６】

単量体IIIは単量体Ｉおよび／または単量体IIの一部である。単量体IIIはアミノ－(C_{0-10})炭化水素－ビニル－芳香族化合物であって、そのビニル基とアミノ－(C_{0-10})炭化水素基とが互いにオルト－、メタ－またはパラ位に存在するアイソフォームであってもよい。単量体IIIはまたビニル基またはアミノ－(C_{0-10})炭化水素のいずれかを１位または２位に含むアミノ－(C_{0-10})炭化水素－ビニル－ナフタレン化合物であってもよい。

【００２７】

単量体IIIにおける、アシル化されていてもよいアミノ基は式：

$-NR_1R_2$

[式中、R_1およびR_2は
ａ)水素；
ｂ)直線状、分枝状および環状の炭化水素基または対応するアシル基；
から選択される]
を満足する。
【００２８】
各炭化水素基は炭素原子１～２０個を有する炭化水素基であってもよく、ヒドロキシ、アルコキシ又はアミノ基１個以上で適宜置換されていてもよく、及び鎖中の位置１ケ所以上にある炭素原子を置換することになる窒素（アミノ窒素）原子、酸素（エーテル酸素）原子又は硫黄（チオエーテル硫黄）原子を含んでいてもよい。
【００２９】
さらに特異的には、R_1およびR_2はアルキル、アラルキル、アリールアルキルおよびアリールを含み、このアリールはたとえば窒素または酸素のようなヘテロ原子がないか、１個またはそれ以上を含む置換または非置換フェニルを含む。アルコキシは好ましくは$C_{1\sim7}$－アルコキシである。R_1またはR_2に存在するかもしれないアミノ基の窒素は、たとえば$C_{1\sim7}$－アルキルのような炭化水素基１個または２個を有していてもよい。
【００３０】
R_1およびR_2の一方または双方は前記(ｂ)によってもよい。
【００３１】
単量体Ｉとして使用される化合物はアルケン、アクリレート／メタクリレート、アクリルアミド／メタクリルアミド、アクリロニトリル／メタクリロニトリル、たとえばその非置換または置換(メタ、オルトおよびパラ異性体)モノビニルベンゼンようなビニル芳香族化合物、その他である。また、単量体Ｉは、たとえばエチルのような例えば$C_{1\text{-}10}$－アルキル置換基を有するアルキルビニルベンゼンであってもよい。ビニルエーテル、スチリルエーテル(炭素に付着するエーテル酸素を有する)などは別の例である。ビニル基１個を有する単量体IIIのモノビニル体は単量体Ｉの一部である。
【００３２】
単量体IIとして使用される化合物は、アルカジエン、ビス型のアクリレート／メタクリレートおよびアクリルアミド／メタクリルアミド、ジビニルベンゼン(例えばメタ、オルトおよびパラ体)などの様々な型のジビニル芳香族化合物である。ビニル基を２個よりも多く有する対応する型も基本的には使用されるであろう。単量体IIは交差結合剤としても作用する。単量体IIはアルキル化された型であってもよく、また前記ジビニルモノマーのエーテル型であってもよい。ビニル基２個またはそれ以上を有する単量体IIIの型は、単量体IIの一部である。
【００３３】
典型的な重合反応混合物では百分率量％は以下の通りである：
単量体Ｉ：≧０.５％、例えば≧２０％および≦９９.５％、例えば≦９５％；
単量体II：≧０.５％、例えば≧５％および≦９９.５％、例えば≦８０％；
単量体III：≧０.５％および≦８０％。
単量体IIの百分率を増加させると最終ポリマーの剛性が増加し、有機溶媒中で膨潤する性能が低下する。
【００３４】
この百分率％の適切な選択は担体マトリックスの意図される使用に依存する。
【００３５】
マトリックスが例えば液体流通などからの圧力に抵抗する必要のない使用のためには典型的な百分率％は次の通りである：
単量体Ｉ：≧９５％、例えば≧９８％および≦９９.５％；
単量体II：≧０.５％および≦５％、例えば≦２％；
単量体III：≧５％、例えば≧１５％および≦８０％、例えば≦５０％。
得られるマトリックスは、核酸合成を除いて、殆どの種類の有機化合物の固相段階的合成

のために特に重要である。

【００３６】

マトリックスが圧力に抵抗する必要がある使用のために典型的な百分率％は：
単量体Ｉ：≧１０％、例えば５０％および≦９０％、例えば≦８０％；
単量体II：≧５％、例えば≧１０％および≦８０％、例えば≦５０％；
単量体III：≧０.５％、例えば≧２％および≦４０％、例えば≦３５％、さらに≦２０％。

【００３７】

得られるマトリックスはマトリックスがカラム／容器中に置かれて試薬を含む液流を通過させる適用のためには特に重要である。典型的な使用はクロマトグラフィーへの応用および核酸の固相合成である。

【００３８】

前記の百分率はw／wであって、重合反応混合物中に存在する重合可能なビニルモノマーの全量に基づいて算出される。

【００３９】

重合反応条件は使用するビニルモノマーおよび所望の最終ポリマーに依存することになろう。使用するビニルポリマーに依存して、この重合反応はアニオン性、カチオン性または遊離ラジカル性の重合反応として行ってもよい。

【００４０】

遊離ラジカル重合反応における反応性が相互にできるだけ近いモノマー(単量体Ｉ、IIおよびIII)を選択するのは好適である。

【００４１】

本発明に最も好適な種類の重合反応の一つは、遊離ラジカルおよび反応開始剤のシステムを利用する。反応開始システムは電子照射、γ線照射、ラジカル反応開始剤、その他である。典型的な反応開始剤は化学的、熱的および照射的な反応開始剤である。熱的反応開始剤はしばしば好適である。これは３０℃－９０℃の範囲で最善な効率を示す。単量体IIIにおける遊離アミノ基の存在は選択した重合反応条件下に遊離アミノ基とかなり反応する反応開始剤を選択しない点で有利である。

【００４２】

熱／化学的な反応開始剤はアゾ化合物(例えば２,２'－アゾビス(２,４－ジメチルバレロニトリル)、アゾイソニトリル、ペルオキシド(例えばベンゾイルペルオキシド)、ペルスルフェートである。

【００４３】

例えばフェントン試薬(過酸化水素＋Fe^{2+})などの酸化還元系も使用できる。

【００４４】

照射反応開始剤は典型的には紫外線領域で作用し、しばしばベンゾフェノン構造を持つか、またはベンゾイル誘導体である。必要であれば、選択した反応開始システムを適切な反応加速剤と組み合わせる。

【００４５】

アミノスチレンおよび／またはその他のアミノ－(C_{0-10})炭化水素ビニル芳香族化合物(特にアミノビニル芳香族化合物)が関与する効率的な遊離ラジカル重合反応が、これらモノマーがラジカル重合反応中に連鎖移動試薬としておよび／または阻害剤として作用するかもしれないという事実によって妨害されるかもしれないことはよく知られている。

【００４６】

当技術分野でよく知られているように、この問題を削減する方途の一つは重合反応系から酸素を除去することによる。

【００４７】

第二の方途は重合反応混合物内に前記のようなアミノ含有ビニル芳香族化合物、特にアミノビニル芳香族化合物、の欠陥を克服する重合反応エフェクター物質を添加することである。適切なエフェクター物質は連鎖移動試薬としておよび／または使用するアミノ含有ビ

ニル芳香族化合物の自己阻害性を中和する試薬として作用するものでもよい。この種類のエフェクターの効率はエフェクター物質の間およびラジカル重合反応系の間で変動するであろう。エフェクターの量と種類は重合反応が進行して本発明の内容に定義するようなアミノ基含有担体マトリックスを与えることができるように選択すべきである。このエフェクターは選択された溶媒成分、別の連鎖移動試薬、その他であってもよい。またある種の反応開始剤が反応開始剤としておよび／または連鎖移動試薬としておよび／またはアミノ置換ビニル芳香族化合物の自己阻害性を中和する試薬として作用する点に関して二重または三重の官能性を有してもよいことを予想することもできる。連鎖移動試薬および反応開始剤の定義および例示についてはOdian, George G., "Principles of Polymerization", ３版, A Wiley-Interscience Publication, (1991), pp 211-267を参照。適当な重合反応エフェクター物質を選択すれば、重合反応混合物内でのビニル化合物(たとえばビニル芳香族化合物など)の適切な重合反応様式を促進することができる。関連する混合物は前記定義のＩ型およびII型モノマーの双方を、重合可能なアミノ含有ビニル芳香族化合物(たとえばアミノビニル芳香族化合物)と共に含有する。

【００４８】

第三の方途はアミノ基が、例えばアシル化型に、保護されているアミノ基含有モノマーを使用するものである。こうすると遊離アミノ基の欠陥が減少して重合反応の阻害がなくなるかまたは非常に低下することになる。重合反応にアシル化型を使用した時には重合反応後、例えば加水分解による脱保護によって遊離アミノ基が形成される。

【００４９】

重合反応に効率的な量を含む採用すべき適切な条件はアミノスチレン、ジビニルベンゼンおよびその他のスチレンについて実験の部(Ａの部)に概説したように個別に反応開始剤、モノマーの種類、連鎖移動試薬、などに関して最適化しなければならない。例えば前記した特許文献および文献報告に定義されているような背景技術も参照。

【００５０】

反応の遅いビニル基は典型的には特別の注意を要する。これは、反応開始剤－反応促進剤系を適切に選択することによって、または当技術分野で知られているような電子照射を利用することによって適宜対応することができる。水素および／またはＣ－Ｃ二重結合に結合するsp^3－混成炭素のみを有するアリル基およびその他のアルケン基は反応の遅いビニル基の例である。

【００５１】

重合反応は通常のｏ／ｗ乳濁液／懸濁液および分散液内で行い、当技術分野で知られているような適切な条件を適用して多少なりとも球状の粒子を得てもよい。同様にしてバルク重合反応を利用してもよく、それに続いておそらく適当ならばブロックを粒子に崩壊させてもよい。

【００５２】

乳濁液、懸濁液および分散液内での重合反応に典型的な乳化剤および安定化剤も本発明に使用できる。よく知られている乳化剤および安定化剤はドデシル硫酸ナトリウム、アルキル化オリゴエチレングリコール、セルロース誘導体、などである。

【００５３】

いわゆる逆乳濁液(ｗ/ｏ-乳濁液)内で重合反応を行って、水滴が互いに連絡する、開いた球腔を有する多孔性の網状組織に分散させる(水はポローゲンとして作用する)ように条件を選択することを想定することもできる。例えば欧州特許第６０１３８号および米国特許第５２００４３３号を参照。これは内側のｗ/ｏ乳濁液がＨＩＰＥを形成する液滴の形をなす、所謂ｗ/ｏ/ｗ乳濁液に拡大できる。ＷＯ９５３１４８５を参照。この種の乳濁液は高内相乳濁液(high internal phase emulsions；ＨＩＰＥ)とも呼ばれる。

【００５４】

適切なポローゲンを重合反応混合物に含めることによって粒子／ビーズ型の多孔性物質およびモノリス的プラグ物質が得られる。典型的にはポローゲンはポリマーが形成される時に析出してチャネル／ポアを形成する化合物である。ポローゲンは液体、固体または気体

のいずれでもよく、重合反応後に除去できなければならない。液体のポローゲンは典型的には使用するモノマーを完全に溶解できるが、形成されたポリマー鎖は溶解できない。これは、ポリマー鎖が析出してポローゲンで満たされたポア系を含むポリマー物質を形成することになることを意味する。このポア系の特性はポローゲンの量および型に依存することになる。一般にポリマーの溶解度パラメータ値に近い溶解度パラメータ値を持つポローゲンは小さなポアの割合が比較的に多い弾性あるゲル様多孔性物質が得られる。たとえばトルエン、キシレン、メジチレン、などのような芳香族溶媒にはビニル芳香族化合物が重合する場合にこの効果を示す可能性がある。

【００５５】

ポローゲンとポリマーとの間の溶解度パラメータ値の相違が大きいポローゲンの使用は小さなポアの割合が小さな剛性の多孔性物質ができることが多い。ビニル芳香族化合物については、例えばアルカノールおよび脂肪族炭化水素をポローゲンとして使用するとこの効果が得られる。よく使用されてきたこの型のポローゲンはたとえばヘプタンのようなアルカン、たとえばデカノールのようなアルカノールであった。液体化合物の混合物もポローゲンとして使用されてきた。

【００５６】

ビニル芳香族モノマーおよびオリゴヌクレオチド固相合成に関しては液体芳香族溶媒を含むポローゲンは混合可能な他の液体との組合せでもよいがポローゲンとして好適である。

【００５７】

ポリマーをポローゲンとして使用してもよい。

【００５８】

前記に略述したポローゲンを選択するための一般的原則は非芳香族ビニルモノマーに基づくポリマーにも適用できる。

【００５９】

得られる多孔性物質は当技術分野でビニルポリマーについて知られているポアサイズ、ポア容積およびポア表面積を有するかもしれない。そこでポアサイズ直径は１０Åと１０００μｍの範囲内にある。ポアサイズ直径の最適な選択は典型的には意図する使用に依存し、たとえば当技術分野で知られている原則に従って選択することができる。

【００６０】

ある種の利用のためには、ポアの一定割合が一定限界以上または以下であるかまたは一定範囲内にあることが重要である。多孔性固相、特にオリゴヌクレオチドとその類似体のために担体マトリックスのポア容積の１０％またはそれ以上、たとえば３０％またはそれ以上について最適なポアサイズ直径は１０～２０００Å、例えば１００～１０００Åの範囲内でなければならないことが見出された。ビニル芳香族モノマーに基づくマトリックスでこのポア特性を得るために今までに見出された最良のポローゲンはトルエン、キシレンおよびメジチレンである。ビニル芳香族モノマーを溶解することおよびそれから得られるポリマーによって吸着されることに関する特性が同様な溶媒も使用できるであろうと信じられる。

【００６１】

ポアは不規則であることが多いが、これはサイズを評価するのが困難なことが多いことを意味する。本願明細書及び特許請求の範囲に記載したポアサイズ及びポアサイズ分布の数字はテトラヒドロフラン中でポリスチレンのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で得た値を示し、ポリスチレンの分子量とポアサイズとは次式によって関連付けられる：

ϕ（Å）＝０．６２（Ｍｗ）$^{0.59}$

［式中、

ϕ（Å）はÅを単位とするポアサイズ直径であり；

Ｍｗはポリスチレンの平均分子量である］

この方法は不規則な形のポアを円柱形のポアに近似するもので、Halasz et al, Angew. Chem. Int. Engl., 17: (1978) 901-908及びHalasz et al, Angew. Chem. Int. Engl., 19: (1980) 24-28に記載されている。

【００６２】
その物質が粒子状である場合には、その平均粒子サイズは典型的には１～１０００μｍ、好ましくは３～１０００μｍまたは３～５００μｍの範囲内にあり、すなわち粒子サイズは乳濁液重合反応では通常得られないものである。この粒子は、たとえばバルク重合反応から得られるブロックを崩壊させることによって得られるような不規則な形または懸濁液での重合反応で得られる球状(ビーズ)を持っている。この粒子は単分散または多分散であってもよく、単分散粒子集団ではその粒子の９５％またはそれ以上はその平均直径±５％の範囲内のサイズを有する。
【００６３】
本発明の粒子を製造するために特に重要な方法は、好ましくは種粒子を膨潤させる第一工程および次に重合反応の前にモノマーを取り込む第二工程を含む、いわゆる種粒子を利用することによるものである。例えばここに参考のために引用する米国特許第４３３６１７３号参照。米国特許第４３３６１７３号に記載されているように、本方法は次を意味する：
【００６４】
ｉ)次の工程を含む水性乳濁液または分散液を製造すること：
(Ａ)好ましくはポリマーを含み、および好ましくは直径＜１μｍを有する種粒子および分子量＜５０００および水溶解度＜10^{-2}ｇ／Ｌを有し、実質的に該種粒子によって吸着される物質１種またはそれ以上を含む物質Ｉを含む分散液または乳濁液を提供すること；および
(Ｂ)工程(Ａ)の分散液または乳濁液に次のものを添加すること：
ａ)物質IIであって、物質Ｉよりも少なくとも１０倍高い水溶性を示す部分的に水溶性の物質１種またはそれ以上を含み、その際、物質IIが物質Ｉを含む種粒子に浸透し、物質IIは該種粒子から物質Ｉが脱出する速度よりも実質的に大きい速度で該粒子に浸透し、物質Ｉを含む該粒子に浸透する該物質IIの量は容積で工程(Ａ)で使用した種粒子の少なくとも２０倍であるもの；および
ｂ)必要な乳化剤および重合反応開始剤；
該物質Ｉおよび物質IIであって、(ａ)添加した反応開始剤によって重合反応可能なモノマー１種またはそれ以上であり、また(ｂ)モノマーと同じ条件では重合反応をしない液体、を含有する物質を含むもの；
【００６５】
ii)反応開始剤を活性化することによる重合反応。
【００６６】
本発明による重合反応の後に、基－ＮR_1R_2を当技術分野で知られている方法によって基：
－$N^{(+)}R_1'R_2'R_3'$
に変換してもよい。
【００６７】
ここにR_3'は存在してもよく、存在しなくてもよい基である。(＋)はR_3'が存在する時(アンモニウム型)には、この窒素が陽電荷を持つことを意味し、R_3'が不在の時には、この窒素には電荷がないことを意味する。
【００６８】
R_3'が不在の時には、R_1'およびR_2'はR_1およびR_2と同じ基から選択される他に、式：－Ａ－Ｘを有する基から選択してもよい。ここに
(ａ)Ａは有機架橋構造である；および
(ｂ)Ｘは次を含む構造である：
(ｉ)求核性基または求電子性基を持つ物質または遊離ラジカルと反応して該物質またはその一部と共有結合的に該担体マトリックスに付着することのできる反応性基１種またはそれ以上；
(ii)そのような反応性基に変換できる基１個またはそれ以上；または

(iii)そのペアの別員の親和性結合を媒介する親和性ペアの一員。

【００６９】

R_3'が存在する時には、基－$N^{(+)}R_1'R_2'R_3'$はアンモニウム基であって、陽電荷を有する。R_1'、R_2'およびR_3'は窒素にアミン／アンモニウム官能性を提供する基である。これらはR_1'およびR_2'の中から選択されるが、これは－$N^{(+)}R_1'R_2'R_3'$窒素に直接的なsp^3混成炭素または芳香族炭素を提供する。

【００７０】

典型的にはＡは安定な有機鎖を含むが、ここには(ａ)炭素原子１～２０個を含む直線状、分枝状または環状の炭化水素鎖、(ｂ)エーテル、(ｃ)チオエーテル、(ｄ)アミド構造、(ｅ)エステル、(ｆ)アゾ、(ｇ)２級または３級アミン構造、などから選択された有機構造要素を１個またはそれ以上が存在する。好適な構造は典型的には、たとえばアセトアミドに匹敵するか、それよりも高い加水分解安定性を有する。ある種の応用では、一定位置での選択的切断を可能にするために安定性の低い構造を含めるのが有利なこともある。例えばポリマーの固相合成に関する以下の記載を参照。

【００７１】

前記の用語「安定な」はこの有機鎖が意図なしに劣化しないか、または本発明の担体マトリックスに存在するいかなる基ともまたはその使用の間に適用される条件下に反応しないことを意図するものである。

【００７２】

構造ＡはR_1'、R_2'およびR_3'の少なくとも２個に共通であってもよい。そこで、構造Ａは－$N^{(+)}R_1'R_2'R_3'$の窒素とともに－Ｎ＝Ｎ－、－Ｎ＝Ｃ＜、－N^+≡Ｎ、などを形成する末端基を有していてもよい。－N^+≡Ｎでは、－Ａ－Ｘは ≡Ｎであって、ここではＡとＸが同じである。

【００７３】

前記の構造Ｘに存在する反応性基は当技術分野でよく知られている。ヒドロキシ、アミノ、チオール、カルボキシなどおよびその活性化型は典型例である。

【００７４】

構造Ｘはヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドまたは核酸(ＤＮＡ、ＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、およびたとえばＰＮＡおよびＬＮＡのような類似体)であってもよく、これはその３'－位(オリゴヌクレオチドの一末端)でＡを介して担体マトリックスに連結し、および５'－位(オリゴヌクレオチドの一末端)は保護されているか保護されていない。もし存在するなら、アミノ基、燐酸基およびヒドロキシ基は好ましくは保護された形にある。Ｘがヌクレオチドである場合には２'－位は好ましくは保護される。

【００７５】

５’－位について普通な保護基はジメトキシトリチル（ＤＭＴｒ）である。

【００７６】

塩基性基内に存在するアミノ基については、最適な保護基は関連するヌクレオシド／ヌクレオチド、デオキシヌクレオチド／デオキシヌクレオシドまたは核酸に依存する。典型的なアミノ保護基はデオキシ体のためには：アデノシン－ベンゾイル／フェノキシアセチル、シトシン－ベンゾイル／イソブチリル／アセチル、グアニン－イソブチリル／イソプロピルフェノキシアセチル、チミジン－なし；およびヌクレオシド／ヌクレオチドのためには：アデノシン－フェノキシアセチル、シトシン－アセチル、グアノシン－イソプロピルフェノキシアセチル、ウラシル－なし；である。

【００７７】

典型的なホスフェート保護基はβ－シアノエチルである。ある変化体では、ホスフェート酸素は硫黄で置換してもよい。すなわちオリゴヌクレオチド鎖中ではホスフェート基は－Ｐ(Ｓ$^-$)(＝Ｏ)－[－Ｐ(＝Ｓ)(－Ｏ$^-$)－]であってもよい。

【００７８】

糖基の２'－位のためには、ｔ－ブチルジメチルシリルが典型的な保護基である。

【００７９】

有機構造Ａは成長しつつあるオリゴヌクレオチド鎖を切断することなしにオリゴヌクレオチド固相合成の反応サイクルが行える、すなわち構造Ａが最終切断工程までの様々な工程下に安定である、ように選択される。

【００８０】

オリゴヌクレオチド合成などのためには、構造Ａは典型的には成長しつつあるヌクレオチド鎖の第一ヌクレオチドの３'－位にエステル官能基を提供するが、Ａの他の構造要素はさらに安定である。Ａの他の構造要素はそこでアミド、純粋な炭化水素鎖、エーテル、チオエーテル、などであってもよい。別の例にはこのエステル基は単一なまたは反復したシリルエーテル構造で置換してもよい。たとえばここに参考のために引用するＷＯ９２０９６１５およびＷＯ９８０８８５７号参照。しかしながら当技術分野の熟練者にとっては構造Ａの変化多数がこの発明の範囲内に入ることは明白である。

【００８１】

Ｘはまたアミノ酸残基または前記定義の担体マトリックスにカルボキシ末端で連結したオリゴペプチドであってもよい。たとえばα－アミノ基などのアミノ基は当技術分野で知られているように保護されていても、非保護であってもよい。もし存在するなら、当技術分野で知られている様式で他のカルボキシ基および他のアミノ基およびチオール基は保護されていてもよい。この場合、架橋構造Ａの安定性要件はオリゴヌクレオチド固相合成のために有用なものとは相違するが、当技術分野の者によく知られている。

【００８２】

Ｘはいわゆる親和性ペアの一員であってもよく、ペアの他の一員を担体マトリックスに親和性結合(「親和性吸着」)するために使用してもよい。よく知られている親和性ペアは：

(ａ)陽荷電または陰荷電のもの(イオン交換；担体マトリックスに共有結合的に結合した１級、２級、３級および４級アンモニウム、スルフォネート、スルフェート、ホスホネート、ホスフェートおよびカルボキシから選択した基)、

(ｂ)抗体および抗原／ハプテン、

(ｃ)レクチンと炭化水素構造、および

(ｄ)ＩｇＧ結合蛋白質とＩｇＧ

である。水性溶液中で使用されることが多く、結合に選択性および特異性のあるＸの種類は水性媒体と固相との間の接触表面が疎水性である場合には妨害するであろうことが多い。そこで、本発明のこの態様では、例えばＡとしてヒドロキシ基含有物を付着させることによって、表面を親水性にすることが重要なことが多く、次にＸ、すなわち親和性ペアのメンバーを示す。親水性化操作および固相に親和性結合剤を共有結合的に連結する操作法は当技術分野でよく知られている。

【００８３】

本発明の第二の側面は

(ａ)ポリマー炭化水素骨格[ポリビニル骨格、$(-CH_2CH_2)_n$]；および

(ｂ)アミノ基またはアミノ基から誘導された基１個またはそれ以上であって　アミノ基の窒素が保持されているもの。これらの基はアリーレン基を含む連結構造を介して該骨格に結合する。この構造は骨格の水素を置換することによって骨格に結合する；

を含む担体マトリックスである。

【００８４】

この骨格のその他の水素は導入部(第１頁)に検討したように置換されていてもよい。連結構造は前記R_1およびR_2について定義した炭素鎖と同じ種類から選択する。

【００８５】

本発明の第二側面におけるマトリックスは、該アミノ基またはアミノ基から誘導される基の各々が直接的にその窒素を介してアリーレン基に付着することによって特徴付けられる。

【００８６】

好適な変化体ではアミノ基およびそれから誘導された基は構造：

$-N^{(+)}R_1"R_2"R_3"$

に一致する。
[式中、R_1” R_2”およびR_3”はR_1' R_2'およびR_3'と同じ基から選択される。(＋)は前記と同意義を有する]

【００８７】
本発明の担体マトリックスは典型的にはポリマーの０．０１～６ミリモル／ｇ、好ましくは０．１～４ミリモル／ｇの間の－$NR_1'R_2'R_3'$基含有率を有する。これらの数字は特に重合反応で得られる担体マトリックス、すなわち、アミノ基はNR_1R_2である、に適用される。
【００８８】
本発明第二側面の好適な変化では骨格が交差結合体であることを必要とする。交差結合は当技術分野で知られているようにして重合反応工程でビニル基を２個またはそれ以上有するモノマーを含めること、または重合反応の後に求電子的交差結合剤／求核的交差結合剤を使用する別個な交差結合反応のいずれかによって達成される。
【００８９】
典型的には、本質的に第二側面による骨格に直接的に付着する窒素は存在しない。すなわち、$-N^{(+)}R_1$”R_2”R_3”基の必須部分は、好ましくはアリーレン基を含む、連結構造を介して骨格に連結する。好適な変化体にあっては本質的にニトロ基またはニトロ化および後続するニトロ基のアミノ基への還元の結果として作製される形成された副反応に由来する基は存在しない。
【００９０】
前記骨格を含む担体マトリックスの気体プラスマ処理(アンモニアまたはその気体類似体)によって導入された窒素含有基に由来する$-N^{(+)}R_1$”R_2”R_3”は本発明のこの側面の好適な変化体からは排除される。
【００９１】
アリール基に直接結合する基$-N^{(+)}R_1$”R_2”R_3”の位置を除いて、本発明第二側面におけるマトリックスは本発明の第一側面に従って製造されたマトリックスについて記載した前記特性のいずれをも有していてもよい。
【００９２】
本発明の第三側面は本発明の方法で製造した担体を前記導入部に指摘した様々な分野で使用するための方法である。原理的に各々の使用のための様々な段階はそれ自体が知られており、将来の発展を排除するものではない。
【００９３】
使用の一つは有機化合物の段階的固相合成である。典型的にはこの合成はまた循環的である。この有機化合物は様々な類似二官能性モノマー１種またはそれ以上からなるポリマーであってもよい。用語「二官能性」はモノマー内の官能基１個が第二の機能との求核的／求電子的置換反応に関与することを意味する。ある循環の反応生成物を次の循環の出発物質として使用するように、この型の反応を循環的態様で行う時は、配列内に様々なモノマーを含むポリマー鎖が形成されることになる。各循環について、モノマー単位１個が担体マトリックスに一端で結合して成長しつつあるポリマー鎖に付加される。典型的なプロトコルは次項を含む：
【００９４】
１．その官能基の一つを介して担体マトリックスに結合し、第二官能基が保護されたモノマーの一つを含むＸを持つ前記定義の担体マトリックスを提供する；
２．適用できるならば第二官能基を脱保護する；
３．該第二官能基をその第一の官能基を活性化し、及び第二官能基を保護したモノマーと反応させる；
４．工程２～３を同一又は相異なるモノマーを用いて予定した回数だけ反復する；及び
５．形成されたポリマーを適宜担体から脱保護し、放出させる。
使用したモノマーがさらに反応に関与できる官能基を含む場合には適宜保護する。

典型的には洗浄段階を段階１～５の間に含める。
【００９５】
本発明のこの態様は正常なおよび修飾されたオリゴヌクレオチド(ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ(ＷＯ９２２０７０３)、ＬＮＡ、など)およびオリゴペプチドの固相合成のために殊に有用である。
【００９６】
Ａまたは担体マトリックスには、使用する試薬と副反応を起こすことができる遊離の求核的基があってはならない。禁忌されるべき典型的な基はＨＯ－またはアミノ基である。
【００９７】
担体マトリックス上にある核酸(例えばＤＮＡまたはＲＮＡオリゴヌクレオチドおよび類似体)の合成は当技術分野で知られている。そこで保護されたヌクレシド／デオキシヌクレオシドに等しいＸを有する担体マトリックスから出発する典型的なプロトコルは次のものを含む：
【００９８】
１.担体マトリックスに連結する５'－保護デオキシヌクレオシド／デオキシヌクレオチドを脱保護する；
２.５'－脱保護デオキシヌクレオシドを所望の５'－保護デオキシヌクレオシドの活性化されたアミダイトと反応させる；
３.工程１で脱保護されたデオキシヌクレオシドを工程２で導入されたデオキシヌクレオシドに結合するホスファイト基を酸化してホスフェートまたはチオホスフェートとする；
４.未反応５'－脱保護デオキシヌクレオシドをキャッピングする；
５.各サイクル内で同一または相異なるデオキシヌクレオシドを用いて１～４工程を所定の回数反復する；および
６.脱保護して生成したＤＮＡ(オリゴヌクレオチド)をマトリックスから放出する。
【００９９】
典型的には工程１～６の間に洗浄工程を含める。工程３および工程６を除いて全工程は典型的にはアセトニトリル(工程１、工程２および工程４)中で無水の条件下に行う。ＲＮＡ合成のための操作はデオキシヌクレオシドの代わりにヌクレオシドを用いるほかは類似している。工程２では反応条件を完全に無水に保持するが、添加するアミダイトの量はマトリックスに付着している第一モノマーの１.５当量まで下げてもよい。
【０１００】
オリゴヌクレオチド合成のプロトコルは殆ど粒子の形の担体マトリックスをベッドができるまで充填したカラム／反応容器内で行われる。試薬と洗浄液を好ましくは押出流としてカラムに通す。好ましくはこの粒子は多孔性であって、前記のように単分散または多分散であってもよい。適当なポアサイズ直径については前記を参照。
【０１０１】
固相上でのオリゴヌクレオチド合成に関する綜説についてはSanghvi Y. S. et al., "Chemical Synthesis and Purification of Phosphothioate Antisense Oligonucleotides", in "Manual of Antisense Methodology", G. Hartman and S. Endres (編) Kluwer Academic Publishers (1998), pages 1-19を参照。また、OligoPilot User Manual, Amersham Pharmacia Biotech AB, 特に第４章を参照。
【０１０２】
オリゴペプチド合成のためのプロトコルはオリゴヌクレオチド合成のためのプロトコルと類似である。そこで、例えばα－アミノ基などアミノ基が保護されたアミノ酸残基と等しいＸを有する担体マトリックスから出発して行う、典型的なプロトコルは次項からなる：
【０１０３】
１.最後に導入したアミノ酸残基の例えばα－アミノ基などのアミノ基を脱保　護する；
２.工程１で脱保護したアミノ基と適切に保護され、活性化されたアミノ酸誘導体とを反応させる；
３.同一または相異なるアミノ酸を用いて工程１～２を所定の回数反復する；および

４.脱保護し、担体マトリックスから形成したオリゴペプチドを放出する。
さらにPeptidsynthese: Miklos Bodanszky Peptide Chemistry, Springer Verlag 1988を参照。

【０１０４】
前記担体マトリックスは親和性吸着に使用する場合には、Ｘは前記のような親和性ペアの一員である。この使用は担体マトリックスと親和性ペアの他の一員を含む液体、典型的には水性液体、とを互いに接触させることからなる。条件は親和性結合を促進するように選択され、基本的にそれ自体当技術分野で知られている。続いて担体マトリックスを液体から分離し、望むならば親和性吸着したメンバーを放出させ、さらに処理する。

【０１０５】
本発明の第四側面はポリビニル骨格からなる多孔性担体マトリックスに連結構造Ｂを介してその３'－位(オリゴヌクレオチドの末端)に付着するヌクレオシド／ヌクレオチド、デオキシヌクレオシド／デオキシヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはこれらの化合物の類似体からなる。付着したものは好ましくは２'－、アミノ－およびホスフェート位置を保護し、５'－位(オリゴヌクレオチドの末端)は保護されるか、または非保護である。本発明のこの側面からは、担体マトリックスはポア容積の１０％またはそれ以上、たとえば３０％以上についてポアサイズ直径が１０～２０００Å、例えば１００～１０００Åの範囲内であることによって特徴付けられる。前記参照。好適な変化体では粒子は５～１００μm、特に１０～５０μmの範囲の平均直径を有する前記の通り単分散である。リンカー構造Ｂは本発明の第二側面について前記したものと同様にして３'－位に結合する基を提供する。構造Ｂに加えるにヌクレオシド／ヌクレオチド、デオキシヌクレオシド／デオキシヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、ポリビニル骨格にアリーレンを介して連結する基－$N^{(+)}R_1$”R_2”R_3” の部分であっても部分でなくてもよい。

【０１０６】
実験の部
重合反応
モノマー：ジビニルベンゼン(工業級)、メタおよびパラ－ジビニルベンゼン８０％(w/w)および主としてメタおよびパラ－エチルビニルベンゼン２０％(w/w)含有。スチレン(工業級)。アミノビニルベンゼン(アミノスチレン、ビニルアニリン)はOakwood社(米国)から入手。
単量体Ｉ：メタおよびパラ－エチルベンゼン＋アミノビニルベンゼン(単量体III)＋場合によってはスチレン。
単量体II：メタおよびパラ－ジビニルベンゼン。

【０１０７】
Ａ.多孔性(モノリス)プラグおよび多分散(多サイズ)粒子の集団
重合反応１：酸素不在下におけるスチレン、ジビニルベンゼンおよびアミノスチレンのラジカル重合反応
５０ｍＬ三頸丸底フラスコ中に反応開始剤２,２'－アゾビス(２,４－ジメチルバレロニトリル)(Ｖ－６５、Wako)(０.５２６ｇ、２.１２ミリモル)をトルエン(２３.３４ｇ)(ポローゲン)に溶解した。その後、モノマーであるジビニルベンゼン(３.００１ｇ、２３.１ミリモル)、スチレン(６.０１３ｇ、５７.６ミリモル)およびアミノスチレン(１.０００ｇ、８.３９ミリモル)を添加した。混合物をガラス棒で撹拌して均質な溶液を得た。次に反応フラスコに凝縮器を取付け、室温の油浴に入れた。パスツールピペットを付けたチューブを通して混合物に窒素ガスを通した。３０分間反応混合物表面下に窒素ガスをゆっくりと通した。この間、窒素ガス流は冷水凝縮器を通して導出した。その後、パスツールピペットを反応混合物の表面上に上げて、その後、実験中はその位置に維持してゆっくりとした窒素ガス流を継続した。次に油浴を７０℃に加温し、反応物をそのまま一夜放置した。２１時間後、反応フラスコを油浴から取出し、徐々に室温まで戻した。そこで反応混合物は湿った軟らかなゴム状ポリマープラグとなった。このプラグをスパーテルで小さな断片に分割し、ガラスフィルター漏斗に入れた。この断片を次にトルエン(１０×５０ｍＬ)で

洗浄した。トルエンがポリマープラグを非常によく膨張させたので洗浄操作は非常に遅かった。濾過操作の中間で断片を結晶化容器に移し、スパーテルを用いて小さな切片に切断して洗浄効果を高めた。洗浄操作後、ポリマー断片に残ったトルエンを真空オーブン(２５℃、約１ミリバール、２４時間)で蒸発させた。蒸発の間にポリマー断片はさらに細かい粒子に粉砕するのに十分なまで硬化した。最後にこの粒子をさらに細かい粒子まで粉砕した。

【０１０８】

生成物に存在するアミノスチレンモノマー単位はＦＴＩＲ、元素分析、熱分解ＧＣ－ＭＳおよびニンヒドリン呈色試験によって証明された。

【０１０９】

重合反応２：連鎖移動試薬(CBr_4)存在下におけるスチレン、ジビニルベンゼンおよびアミノスチレンのラジカル重合反応

試験管４本の中で、反応開始剤２，２'－アゾビス(２，４－ジメチルバレロニトリル)(Ｖ－６５)および連鎖移動試薬、四臭化炭素(CBr_4)をトルエン(ポローゲンでもある)に溶解した。次にジビニルベンゼン、スチレンおよびアミノスチレンを添加した。表１－３に記載の量を使用した。次に試験管を数秒間激しく振りまぜて均質な混合物とした。次に各試験管の反応混合物表面下に窒素ガスを５～１０分間通して酸素を除き、次にセプタムを装着した。さらに、各試験管にシリンジを取付けたバルーンに窒素を充填した。シリンジの針をセプタムに通して酸素が試験管に入らないことを確実にした。重合反応は全試験管を温度６０℃の油浴に入れて開始させ、そのまま一夜放置した。翌日にスパーテルを使用して生成したポリマープラグを断片化した。最後にポリマー断片をメタノール(４×１０ｍＬ)およびトルエン(１０×１０ｍＬ)で洗浄し、真空オーブン(２５℃、約１ミリバール、２４時間)で乾燥した。

【０１１０】

第１回の反応(表１)では重合反応の兆候は殆ど見られなかった。最大量の反応開始剤と組合せた最少量のCBr_4を用いた試料のみで粘度が僅かに増した。

表１－重合反応２における仕込量

【表１】

	A1	B1	C1	D1
ｱﾐﾉｽﾁﾚﾝ(g)	0.105	0.102	0.107	0.107
ｽﾁﾚﾝ(g)	0.601	0.599	0.599	0.612
ｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ(g)	0.308	0.311	0.302	0.306
V-65(mg)	39.5	67.4	35.7	60.5
CBr_4(g)	0.278	0.282	0.141	0.139
ﾄﾙｴﾝ(g)	3.079	3.141	2.753	2.800
全重量(g)	4.411	4.502	3.938	4.021
V-65(%)	3.0	5.0	3.0	5.0
CBr_4(ﾐﾘﾓﾙ)	0.838	0.850	0.425	0.419
ｱﾐﾉｽﾁﾚﾝ:CBr_4(ﾓﾙ:ﾓﾙ)	1:1	1:1	1:0.5	1:0.5

【０１１１】
第２回の反応(表２)では、はるかに少量のＣＢｒ$_4$を使用した。油浴中約２０時間後には全ての試験管には軟らかなポリマープラグを含んでいた。そこでこのポリマープラグを分析して重合反応の間に実際にポリマーマトリックスの中に取込まれたアミノスチレンの量を決定した。ＦＴＩＲ、元素分析およびニンヒドリン呈色試験はアミノスチレンが生成したポリマー中に取り込まれたことを示した。
表２－重合反応２における仕込量
【表２】

	A2	B2	C2	D2
ｱﾐﾉｽﾁﾚﾝ(g)	0.115	0.106	0.102	0.102
ｽﾁﾚﾝ(g)	0.640	0.600	0.619	0.623
ｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ(g)	0.328	0.312	0.324	0.316
V-65(mg)	31.8	54.7	31.5	53.6
CBr_4(g)	0.0287	0.0295	0.0132	0.0148
ﾄﾙｴﾝ(g)	2.494	2.534	2.443	2.495
全重量(g)	3.638	3.638	3.533	3.604
V-65(%)	2.8	5.0	2.9	4.8
CBr_4(ﾐﾘﾓﾙ)	0.087	0.089	0.040	0.045
ｱﾐﾉｽﾁﾚﾝ:CBr_4(ﾓﾙ:ﾓﾙ)	1:0.1	1:0.1	1:0.05	1:0.05

【０１１２】
第３回の反応(表３)ではさらに少量の連鎖移動試薬を使用して行った。今回は試験管によって結果が変動した。ＣＢｒ$_4$を最大量使用した試料２本では外見上良好なポリマープラグを形成した。最少量のＣＢｒ$_4$を最少量のＶ－６５と組合せて使用した試料では、重合反応は兆候も示さなかった。最少量のＣＢｒ$_4$を多量のＶ－６５と組合せて使用した試料では重合反応が見られたが、いくらかの相分離が起きたように思われた。この実験の試料についてはこれ以上の分析はしなかった。
表３－重合反応２における仕込量
【表３】

	A3	B3	C3	D3
ｱﾐﾉｽﾁﾚﾝ(g)	0.102	0.101	0.111	0.104
ｽﾁﾚﾝ(g)	0.612	0.606	0.614	0.606
ｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ(g)	0.315	0.325	0.301	0.300
V-65(mg)	30.8	53.0	31.0	52.6
CBr_4(g)	0.006	0.006	0.003	0.003
ﾄﾙｴﾝ(g)	2.417	2.642	2.419	2.473
全重量(g)	3.482	3.733	3.479	3.538
V-65(%)	2.9	4.9	2.9	4.9
CBr_4(ﾐﾘﾓﾙ)	0.017	0.017	0.009	0.008
ｱﾐﾉｽﾁﾚﾝ:CBr_4(ﾓﾙ:ﾓﾙ)	1:0.02	1:0.02	1:0.01	1:0.01

【０１１３】
ＦＩＴＲ：潰した様々なポリマー物質の赤外線スペクトルは拡散反射法(ＤＲＩＦＴ)を用いてPerkin Elmer 16 PC FITRで記録した。
【０１１４】
元素分析：試料を分析して窒素を測定した。Mikro Kemi ABによって使用された方法はＭＫ２００６とラベルした。
【０１１５】
熱分解ＧＣ－ＭＳ：熱分解ＧＣ－ＭＳ分析は重合反応１の最終反応生成物について行った。このＧＣ－ＭＳ装置はFinnigan Trace GCQであり、熱分解装置はPyrola 2000であった。熱分解は７００℃で行った。
【０１１６】
ニンヒドリン呈色試験：本試験はBunin(The combinatorial Index, Academic Press (1998) 214頁)が記載した操作に従った。ストック溶液３種を用意した。Ａ－ニンヒドリン(５００ｍｇ、２.８１ミリモル)のエタノール(１０ｍＬ)溶液；
Ｂ－フェノール(４０ｇ、４２５ミリモル)のエタノール(１０ｍＬ)溶液；およびＣ－ＫＣＮ溶液(２ｍＬ、０.００１Ｍ)のピリジン(全容１００ｍＬまで)希釈液。
ポリマー断片約２０ｍｇを秤量して試験管に入れた。次にストック溶液(Ａ、ＢおよびＣ)各２～３滴をポリマー断片に加え、試験管を温度約１００℃に維持した油浴で時々ふりまぜながら５分間加熱した。このように処理するとアミノ基を有する物質は暗青色に変色する。アミノ基を含まない材料は変色しない。
【０１１７】
Ｂ.オリゴヌクレオチド合成での使用に最適な粒子の製造
重合反応の手法：乳濁液中でスチレンの重合反応によって長さが比較的短いポリマー鎖を得て直径約０.５μｍの種粒子を製造した。この種粒子をポローゲンとしてのトルエンとモノマー(工業級のジビニルベンゼン、アミノビニルベンゼン、スチレン)とアゾ反応開始剤との添加および重合反応による２工程操作法によって膨潤させた。前記の適当な安定化剤、反応開始剤、などを含めた。このシステムを選択して、サイズ３０μｍの単分散系最終粒子を得た。この操作は米国特許第４３３６１７３号に略記されたものである。

【０１１８】
結果：
【表４】

ﾛｯﾄ	添加ｼﾞﾋﾞﾆﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝ %w/w	添加ｽﾁﾚﾝ* %w/w	添加アミノビニルベンゼン %w/w	ミリモル／ｇ**	ミリモル／ｇ***	多孔率 %
１	６４	１６＋０	１０	1.６７	1.７４	７０
２	５０	１２.５＋２７.５	１０	0.８４	0.８８	７０
３	６４	１６＋１０	１０	0.８４	0.９２	７０
４	４０	１０＋３０	２０	1.６７	1.６９	７０
５	３０	7.５＋４２.５	２０	1.６７	1.７２	７０
６	３０	7.５＋５２.５	１０	0.８４	0.９７	７０
７	２０	５＋５５	２０	1.６７	1.５７	７０
８	６４	１６＋１０	１０	0.８４	0.９８	７８
９	４０	１０＋４０	１０	0.８４	0.９４	７８

* ＝スチレンは工業級ジビニルベンゼンの一部としてのエチルスチレンおよび工業級スチレンを意味する。
** ＝モノマー全量１ｇ当り添加アミノ基のミリモル数。
***＝元素分析に基づく、生成粒子に含まれる窒素(アミノ基)のミリモル数。
％ｗ／ｗ値はモノマーの全量に基づく。
多孔率値は重合反応混合物中に含まれるトルエンの百分率に基づく。
【０１１９】
ポリスチレンのテトラヒドロフラン溶液を使用するポアサイズ分布の分析によって、ロット１～７のポア容積の４８～６１％は１１５～８８０Åの範囲内のポアサイズ直径を持つポア内にあって、ポア容積の３０％以上を構成することが見出された。
【０１２０】
オリゴヌクレオチドの合成：
５'－保護デオキシヌクレオチドの担体マトリックスへの導入
これは、最初に選択したデオキシヌクレオチドをその３'－位(５'－位をＤＭＴｒ－保護し、存在するならアミノ基を適当に保護しておく)でサクシニル化することによって行った。得られたコハク酸のモノエステルをイソブチリルクロロホルメートで活性化し、アミノ基を含む担体マトリックスに結合させた。この結合率はＤＭＴｒ化合物の放出およびこの化合物のＵＶ／ＶＩＳによる測定で決定した。最初はロット１(７０％ポローゲン)の担体マトリックス(粒子)は粒子１ｇ当り０.３４４ミリモルのヌクレオチドを結合することが見出された。残りのアミノ基は多分おそらく小さ過ぎるポア内に存在するためか、またはポリマー材料内に埋込まれているために、接近不能なので結合できないのであろう。
【０１２１】
オリゴヌクレオチドの合成
これは、Oligo Pilot II(Amersham Pharmacia Biotech AB、ウプサラ、スウェーデン)で

自動的に行った。ＤＭＴｒ－保護ヌクレオチド担体から出発してこの合成は次の工程を含んでいる：
１.３％(ｖ／ｖ)ジクロロ酢酸のジクロロメタン溶液によるジメトキシトリチの加水分解；
２.アセトニトリル洗浄；
３.０.４５Ｍ－テトラゾールのアセトニトリル溶液およびアミダイトのアセトニトリル溶液(担体に結合した出発ヌクレオチドに対して１.５当量)の添加；
４.アセトニトリル洗浄；
５.５０ｍＭ－I_2の１０％水および９０％ピリジン(ｖ／ｖ％)溶液によるホスファイトの酸化；
６.アセトニトリル洗浄；
７.アミダイトと反応しなかった未反応ヒドロキシ基のキャッピング。溶液Ａ(２０％Ｎ－メチルイミダゾールのアセトニトリル溶液)と溶液Ｂ(２０％無水酢酸、３０％２,６－ジメチルピリジンおよび５０％アセトニトリル)との等量；および
８.アセトニトリル洗浄。
２０量体を合成するためには工程１～８を１９サイクル行った後、次にオリゴヌクレオチドを完全に脱保護し、担体マトリックスから放出させる。

【０１２２】

生成した粒子の特性（膨潤率、剛性、担持性能、オリゴヌクレオチド合成の収率、価格など）を全て斟酌すると、優先権出願日にはロット６の担体マトリックスが最適であると考えられ、これを最初のプロトタイプとして使用した。さらにポローゲン（トルエン）を増量することによって、なお改善された粒子を得ることができる兆候があった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C08F 8/00 (2006.01) C08F 8/00

(56)参考文献 特開昭５４－１００４８９（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２６４６８７（ＪＰ，Ａ）
特開昭５３－０１０３８６（ＪＰ，Ａ）
特表平０６－５００３３１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C08F212/00,C08F220/00,C07K1/04