

(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2004-517089
(P2004-517089A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl.⁷

C07H 21/00

F 1

C07H 21/00

テーマコード(参考)

4 C057

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2002-547942 (P2002-547942)	(71) 出願人	500060825 アベシア・リミテッド イギリス国マンチェスター エム9・8ズ イーエス, ブラックリー, ヘクサゴン・ハウ
(86) (22) 出願日	平成13年12月3日 (2001.12.3)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月5日 (2003.6.5)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 國際出願番号	PCT/GB2001/005338	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 國際公開番号	WO2002/046205	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 國際公開日	平成14年6月13日 (2002.6.13)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
(31) 優先権主張番号	0029610.3		
(32) 優先日	平成12年12月5日 (2000.12.5)		
(33) 優先権主張国	英國(GB)		
(31) 優先権主張番号	09/740,031		
(32) 優先日	平成12年12月20日 (2000.12.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの調製方法

(57) 【要約】

アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチド結合をアセンブルする工程と、該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する前に、アセトニトリルを除去する工程と、該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する工程と、を含むホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成プロセスが提供される。本プロセスは、ヌクレオチドの大規模合成に特に適する。アセトニトリルは、乾燥及び溶媒洗浄の一方又は両者によって、固体担体から除去されてもよい。好ましい洗浄溶媒は、トリアルキルアミンを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合をアセンブルする工程と、

(b) 該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する工程と、

を含み、該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する前に、オリゴヌクレオチドと固体担体との合算質量の 10 wt % 未満までアセトニトリルの濃度を減少させることを特徴とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの大規模合成プロセス。

【請求項 2】

(a) アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合をアセンブルする工程と、10

(b) 該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する前に、固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合を 1 以上の溶媒洗浄を用いる洗浄方式で洗浄する工程と、

(c) 該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する工程と、

を含み、該洗浄方式の最終洗浄は、アセトニトリル又はジオキサン以外の溶媒を用いることを特徴とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成プロセス。

【請求項 3】

前記溶媒は、芳香族炭化水素、脂肪族炭化水素、ハロアルカン、エステル、アルコール、アミド、塩基性求核性溶媒、極性エーテル、スルホキシド、水、バッファ水溶液、水と水混和性有機溶媒との混合物からなる群より選択される請求項 2 に記載のプロセス。20

【請求項 4】

前記溶媒は、トルエン、シクロヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、C₁ ~ C₄ アルキルアルコール、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリジノン、ピリジン、トリ(C₁ ~ C₄ - アルキル)アミン、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド、酢酸ナトリウム水溶液からなる群より選択される請求項 3 に記載のプロセス。

【請求項 5】

(a) アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合をアセンブルする工程と、

(b) 該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する前に、固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合を 1 以上の溶剤洗浄を用いる洗浄方式で洗浄する工程と、30

(c) 該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する工程と、

を含み、洗浄方式の最終洗浄は、トリアルキルアミンを含む溶液を溶媒洗浄として用いることを特徴とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成プロセス。

【請求項 6】

前記溶媒は、トリエチルアミンである請求項 4 又は 5 に記載のプロセス。

【請求項 7】

アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合をアセンブルする工程と；担持されたオリゴヌクレオチドを空気乾燥させる工程と；オリゴヌクレオチドを脱保護化するに十分な時間、乾燥した担持オリゴヌクレオチドをトリアルキルアミン、好ましくはトリエチルアミンと接触させる工程と；該固体担体からオリゴヌクレオチドを連続的に切断する工程と、を含むホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成プロセス。40

【請求項 8】

オリゴヌクレオチド及び固体担体の合算質量の 5 wt % 未満、特に約 1 wt % 未満までアセトニトリル濃度を減少させる請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 9】

10 mmol 以上のオリゴヌクレオチドのバッチサイズにて行われる請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 10】

固体担体上に担持された遊離水酸基を含むスクレオシド又はオリゴスクレオチドと、スクレオシドホスホロアミド又はオリゴスクレオチドホスホロアミドとをカップリングすることを含み、該固体担体は微孔性担体であることを特徴とするオリゴスクレオチドの調製プロセス。

【請求項 1 1】

前記固体担体は、アクリロイル-サルコシンメチルエステル、N,N-ジメチルアクリルアミド及びビス-アクリロイルエチレンジアミンの共重合により調製された担体から誘導されたアミン官能基化担体である請求項1～10のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 1 2】

前記アミン官能基化担体は、メチルエステル基とアルキルジアミン、好ましくはエチレンジアミンとの反応により誘導された1級アミン官能基を含む請求項11に記載のプロセス。

【請求項 1 3】

オリゴスクレオチドは、ウレタンリンカー、オキサリルリンカー、スクシニルリンカー及びアミノ誘導リンカーからなる群より選択される切断可能なリンカーを介して前記固体担体に結合されている請求項1～12のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 1 4】

オリゴスクレオチドは、切断試薬と接触することにより、前記固体担体から切断される請求項1～13のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 1 5】

前記切断試薬は、メチルアミン、メチルアミン水溶液、液化アンモニア、気体状アンモニア又は濃アンモニア水溶液を含む請求項14に記載のプロセス。

【請求項 1 6】

1～100のインターヌクレオシド結合を有するオリゴスクレオチドを調製するために用いられる請求項1～15のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 1 7】

インターヌクレオシド結合の少なくとも50%がホスホロチオエート化されている化合物を調製するために用いられる請求項1～16のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項 1 8】

前記インターヌクレオシド結合の90～100%がホスホロチオエート化されている請求項17に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホスホロチオエートオリゴスクレオチドの合成方法に関する。

【背景技術】

【0002】

過去15年間くらい、オリゴデオキシリボヌクレオチド(DNAシーケンス)、オリゴリボヌクレチド(RNAシーケンス)及びこれらの類似体の合成の開発において、非常に大きな進歩がなされている。“Methods in Molecular Biology, Vol. 20, Protocol for Oligonucleotides and Analogs”, Agrawal, S. Ed., Human Press, Totowa, 1993。研究の大半は、マイクロモル又はより小さなスケールで行われており、モノマー性ホスホロアミダイト(phosphoramidite)形成ブロックを含む自動化された固相合成(Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859～1862)が最も簡便なアプローチであることが証明されている。実際、今や、市販の合成装置で、高分子量DNAシーケンス及び比較的高分子量のRNAシーケンスをルーチン的に調製することができる。これらの合成オリゴスクレオチドは、バイオロジー及びバイオテクノロジーにおいて多数の非常に重要なニーズに合致している。

10

20

30

40

50

【0003】

一方、ミリグラム量は、一般に、分子生物学的目的にとって十分であり、100グラムよりも大きいグラム量は、臨床試験にとって必要とされる。潜在的なアンチセンスドラッグ (anti sense drugs) であるオリゴヌクレオチド類似体の幾つかは、今や、臨床試験に進んでいる。非常に近い将来に、これらのシーケンスの一つがAIDS又は一種の癌の治療に受け入れられるようになれば、特定のシーケンスのキログラム、マルチキログラム又はより大きな単位の量が必要になるであろう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

10
薬品工業において、現在関心のあるオリゴヌクレオチドの多くは、ホスホロチオエート化 - インターヌクレオシド結合 (phosphorothioated internucleoside linkage) を含む天然のオリゴヌクレオチドの類似体である。ホスホロチオエート結合が存在する場合、特にこのような結合が結合の大半をなす場合及び特にこれらがインターヌクレオシド結合の100%をなす場合には、最終製品中の不純な非ホスホロチオエート化結合の濃度は、薬理学的に許容されるレベルを維持することが強く望まれる。

【課題を解決するための手段】

【0005】

20
オリゴヌクレオチドの合成にとっての非常に多数のプロトコールは、用いられる試薬に対する溶媒としてアセトニトリルを用いる。アセトニトリルは、試薬及びオリゴヌクレオチド生成物に対して不活性であり、良好な溶媒特性を有し、環境的に許容され得るので、溶媒として魅力的である。一般に、大規模合成に対しては、オリゴヌクレオチド生成物を固体担体から切断するステージ中、高濃度のアセトニトリルが存在する。これまで、アセトニトリルの目に見える不活性特性ゆえに、高濃度のアセトニトリルは大規模合成に受け入れられてきた。しかし、本発明をなすに至った研究の間に、驚くべきことに、切断ステージ中に存在するアセトニトリルの濃度を減少させることにより、より高い純度のオリゴヌクレオチドを得ることができることを知見した。

【0006】

30
本発明の一側面によれば、(a)アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチド結合 (bound) をアセンブルするステージと、(b)該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断するステージとを含み、該オリゴヌクレオチドを該固体担体から切断する前に、アセトニトリルの濃度をオリゴヌクレオチドと固体担体の合算質量の10wt%未満にまで減少させることを特徴とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの大規模合成プロセスが提供される。

【0007】

40
ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、固相合成に関する公知の技術により、例えばH-フォスフォネート又は特にホスホロアミダイト化学を用いることにより、アセンブルすることができる。一般に、ホスホロアミダイトアプローチに対して、用いられているシーケンスは、固体担体に対するヌクレオシド結合、特に5'-位における固体担体に対するヌクレオシドの結合の脱保護 (deprotection) ; 担持されたオリゴヌクレオチド (持持オリゴヌクレオチド) を形成するための好ましくは3'-位ホスホロアミダイトヌクレオシドのカップリング ; 担持ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの製造のための硫化剤との反応による担持オリゴヌクレオチドの硫化 ; キャッピング剤による未反応担持ヌクレオシドのキャッピングである。このサイクルは、オリゴヌクレオチドの所望のシーケンスをアセンブルするに必要なだけ何度も繰り返される。混合されたホスフェート / ホスホロチオエート生成物が所望である場合には、硫化ステージを、所望の位置にホスフェート結合 (linkage) を製造するための酸化工程に代えてもよい。アセンブリの完了時に、及び担体からの切断の前に、一般的に、痕跡量の未反応試薬を除去するために、担持オリゴヌクレオチドをアセトニトリルで洗浄する。

【0008】

アセトニトリルは、担持オリゴヌクレオチドを乾燥することによって、場合によっては減圧下で乾燥することによって、除去することができる。アセトニトリルは、一般に、大気温度で、例えば15～30で除去されるが、30～80など、例えば40～60の昇温された温度を用いることもできる。

【0009】

本発明の第1の側面によるプロセスは、オリゴヌクレオチドの大規模合成に用いられる。オリゴヌクレオチドの大規模合成は、しばしば、オリゴヌクレオチドの10mmol以上10のバッチサイズであると考えられ、一般には15mmol以上、しばしば25mmol以上、例えば50mmolを越え、特に75mmolを越えるオリゴヌクレオチドのバッチサイズであると考えられる。多くの実施形態において、本発明のプロセスは、100～500mmolの範囲の規模でのオリゴヌクレオチド合成に対して用いられる。

【0010】

所望の生成物のアセンブリの完了時に、生成物を固体担体から切断してもよい。用いられる切断方法は、与えられた固体担体に関する当該分野で公知の方法でよい。生成物が切断可能なリンカーを介して固体担体に結合している場合には、リンカーに対して適切な切断方法が用いられる。例えば、メチルアミン、メチルアミン水溶液、液化アンモニア、気体状アンモニアとの接触、特に濃アンモニア水溶液との接触などがある。切断に続いて、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー及び適切な溶媒からの沈殿の1以上など当該分野で公知の技術を用いて、生成物を精製してもよい。例えば限外濾過による20生成物のさらなる処理を用いてもよい。

【0011】

本発明によるプロセスにおいて用いられる固体担体は、用いられる溶媒に実質的に不溶性であり、オリゴヌクレオチドの固相合成の分野で周知の担体を含む。例えば、シリカ、制御されたポアガラス、ポリスチレン、ポリスチレンを含むコポリマー、例えばポリスチレン-ポリ(エチレングリコール)コポリマー、及びポリビニルアセテートなどのポリマーを挙げることができる。さらに、所望であれば、微孔性又はソフトゲル担体、特にポリ(アクリルアミド)担体、ペプチドの固相合成に対して、より一般的に用いられるものなどを用いることもできる。好みのポリ(アクリルアミド)担体は、アミン官能性化担体、特にアクリロイル-サルコシンメチルエステル、N,N-ジメチルアクリルアミド及びビス-アクリロイルエチレンジアミンの共重合により調製された担体から誘導されたもの、例えばカタログ名称「PL DMA」(Polymer Laboratories)で市販されている担体などである。担体の調製の手順は、Atherton, E. ; Shepard, R. C. ; in Solid Phase Synthesis: A Practical Approach, Publ., IRL Press at Oxford University Press (1984)に記載されている。このような担体上の官能基は、メチルエステルであり、これはエチレンジアミンなどのアルキルジアミンとの反応により1級アミン官能基に最初に転換される。

【0012】

本発明の第2の側面によれば、(a)アセトニトリルの存在下で、固体担体に対するオリゴヌクレオチド結合をアセンブルする工程と、(b)該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する前に、1以上の溶媒洗浄を用いる洗浄方式で該固体担体に対するオリゴヌクレオチド結合を洗浄する工程と、(c)該固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する工程と、を含み、洗浄方式の最終洗浄には、アセトニトリル又はジオキサン以外の溶媒を用いることを特徴とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成プロセスが提供される。

【0013】

洗浄方式は、1以上の溶媒洗浄を用いる。洗浄方式が1回の洗浄を用いる場合、用いられる溶媒はアセトニトリル及びジオキサンを含まない。1回よりも多い溶媒洗浄が用いられる場合、アセトニトリル及びジオキサンを最終洗浄ステージ以外の洗浄ステージで用いて50

もよい。しかし、洗浄方式のすべてのステージにおいて、アセトニトリル及びジオキサンを用いないことが好ましい。

【0014】

用いることができる溶媒は、溶媒が用いられる条件下でオリゴヌクレオチドを分解しない不活性溶媒であることが好ましい。用いることができる不活性溶媒の例としては、不活性有機溶媒及び不活性水系溶媒を挙げることができる。

【0015】

好ましくは、溶媒による洗浄が効果的であり、アセトニトリルの濃度がオリゴヌクレオチドと担体の合算質量の10wt%未満にまで減少する。

用いることができる有機溶媒は、芳香族炭化水素、例えば、トルエン；脂肪族炭化水素、例えばシクロヘキサン；ハロアルカン、特にジクロロメタン；エステル、特に酢酸エチル、プロピオン酸メチル又はプロピオン酸エチルなどのアルキルエステル；アルコール、特にC₁～C₄アルキルアルコールなどの脂肪族アルコール、例えばメタノール、エタノール又はイソプロパノール；アミド、例えばジメチルホルムアミド及びN-メチルピロリジノン；塩基性求核性溶媒、例えばピリジン又はアルキルアミンなど、特にトリ(C₁～C₄-アルキル)アミンなどのトリ(アルキル)アミン；テトラヒドロフランなどの極性エーテル；例えばジメチルスルホキシドなどのスルホキシドを挙げることができる。

【0016】

用いることができる水系溶媒としては、水、バッファ水溶液、水と水混和性不活性有機溶媒の混合物、特に上述の溶媒を挙げることができる。

用いることができる固体担体は、本発明の第1の側面に関して上述した通りである。多くの実施形態において、担体がポリ(スチレン)など疎水性である場合には、有機溶媒を用いることが好ましいかもしれない。他の実施形態において、担体が制御されたポアガラス又はシリカなど親水性である場合には、水系溶媒を用いることが好ましいかもしれない。さらなる実施形態において、担体が微孔性である場合には、担体を膨潤させる溶媒を用いることが好ましいかもしれない。

【0017】

ある好ましい実施形態において、用いられる溶媒は、オリゴヌクレオチドから保護基を取り除くように、特にインターヌクレオシド結合からシアノエチル保護基及び核塩基(nucleobase)保護基を取り除くように作用する。好ましい溶媒は、アルキルアミン、特に、トリ(C₁～C₄)アミンなどのトリ(アルキル)アミンであり、最も好ましくトリエチルアミンである。

【0018】

本発明の第2の側面によるプロセスは、小規模オリゴヌクレオチド合成(すなわち<25mmol規模)及び本発明の第1の側面に関して上述したような大規模オリゴヌクレオチド合成の両者に用いることができる。

【0019】

本発明の第1の側面に関して上述した方法により、オリゴヌクレオチドをアセンブルして、洗浄後、固体担体から切断することができる。

本発明の第1の側面及び第2の側面の両者において、アセトニトリルの濃度は、オリゴヌクレオチド及び固体担体の合算質量の好ましくは5wt%未満、しばしば3wt%未満、特に約2wt%未満、特に約1wt%未満まで減少する。

【0020】

本発明の特に好ましい実施形態は、アセトニトリルの存在下で固体担体に対するオリゴヌクレオチドの結合をアセンブルする工程と、担持オリゴヌクレオチドを空気乾燥する工程と、乾燥した担持オリゴヌクレオチドをトリアルキルアミン、好ましくはトリエチルアミンと、オリゴヌクレオチドを脱保護するに十分な時間にわたり接触させる工程と、続いて固体担体からオリゴヌクレオチドを切断する工程と、を含む。

【0021】

本発明の関連する実施形態において、(a)アセトニトリルの存在下で、固体担体に対す

10

20

30

40

50

るオリゴヌクレオチド結合をアセンブルする工程と、(b)該固体担体からオリゴヌクレオチドを切斷する前に、1以上の溶媒洗浄を用いる洗浄方式で、固体担体に対するオリゴヌクレオチド結合を洗浄する工程と、(c)該固体担体からオリゴヌクレオチドを切斷する工程と、を含み、該洗浄方式の最終洗浄は、溶媒洗浄として、アセトニトリルを実質的に含まないアルカリアミン、好ましくはトリエチルアミンなどのトリ(C_1-C_4)アルキルアミンを用いることを特徴とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成プロセスが提供される。1回以上の溶媒洗浄が用いられてもよい。いかなる溶媒洗浄においても、アセトニトリルが用いられないことが好ましい。

【0022】

オリゴヌクレオチドが微孔性担体上で合成され担持されるホスホロアミダイト化学を用いるオリゴヌクレオチドの合成は、新規であると考えられる。したがって、本発明の第3の側面において、ヌクレオシドホスホロアミダイト又はオリゴヌクレオチドホスホロアミダイトを、固体担体上に担持された遊離水酸基を含むヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドとカップリングして、オリゴヌクレオチド亜リン酸トリエステルを形成することを含み、該固体担体が微孔性担体であることを特徴とするオリゴヌクレオチドの調製プロセスが提供される。

【0023】

微孔性担体は、好ましくはポリ(アクリルアミド)担体であり、所望であれば、ペプチドの固相合成に関してより一般的に用いられている担体を用いることができる。好ましいポリ(アクリルアミド)担体は、アミン官能基化担体、特にアクリロイルサルコシンメチルエステル、N,N-ジメチルアクリルアミド及びビス-アクリロイルエチレンジアミンの共重合により調製された担体から誘導されたもの、例えばカタログ名「PL DMA」(Polymer Laboratories)で市販されているものなどである。担体の調製の手順は、Atherton, E. ; Sheppard, R. C. ; in Solid Phase Synthesis: A Practical Approach, Publ., IRL Press at Oxford University Press (1984)に記載されている。この文献中の微孔性担体は、本願明細書に参照として組み込まれる。アミン官能基化担体上の官能基は、メチルエステルであり、これはエチレンジアミンなどのアルキルジアミンとの反応によって1級アミン官能基に最初に転換される。微孔性担体は、重合性ビーズの形態で用いられることが好ましい。

【0024】

本発明の第3の側面によるプロセスは、好ましくは、微孔性担体を膨潤させる溶媒の存在下で行われる。このような溶媒の例としては、ハロアルカン、特にジクロロメタン；エステル、特に酢酸エチル、プロピオン酸メチル、又はプロピオン酸エチルなどのアルキルエステル；テトラヒドロフランなどのエーテル；好ましくはジメチルホルムアミド及びN-メチルピロリジノンなどのアミドを挙げることができる。最も好ましい溶媒は、ジメチルホルムアミドである。

【0025】

用いられるヌクレオシドホスホロアミダイト又はオリゴヌクレオチドホスホロアミダイトは、3'-ホスホロアミダイト基又は5'-ホスホロアミダイト基、最も好ましくは3'-ホスホロアミダイト基を含み得る。一般的に、ホスホロアミダイトは、シアノエチルオキシホスホロアミダイトである。ヌクレオシドホスホロアミダイト又はオリゴヌクレオチドホスホロアミダイトは、一般的に、保護水酸基を含み、3'-位又は5'-位のいずれかにおける保護水酸基がホスホロアミダイトではない。好ましくは、5'-位における基が保護水酸基である。好ましい保護基は、ピキシル基及びトリチル基であり、特にジメトキシトリチル基である。

【0026】

用いられる遊離水酸基を含むヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドは、3'-水酸基又は5'-水酸基を含むものでよく、一般的に、3'-位又は5'-位のいずれか遊離水酸基ではない方を介して固体担体に結合されている。最も好ましくは、遊離水酸基を含むヌク

10

20

30

40

50

レオシド又はオリゴヌクレオチドは、3' - 位を介して固体担体に結合されていて、遊離5' 水酸基を含む。

【0027】

遊離水酸基を含むヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドは、一般的に、切断可能なリンカーを介して固体担体に結合されている。

ヌクレオシドホスホロアミド又はオリゴヌクレオチドホスホロアミドと、遊離水酸基を含むヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドと、のカップリングは、適切な活性化剤の存在下で起こる。このような活性化剤の例は、慣用のホスホロアミドオリゴヌクレオチド合成に関して当該分野で公知の活性化剤であり、テトラゾール、チオエチルテトラゾール、ニトロフェニルテトラゾール及びジシアノイミダゾールを挙げることができる。一般的に、ヌクレオシドホスホロアミド又はオリゴヌクレオチドホスホロアミドは、微孔性担体を膨潤させるために用いられる溶媒中の溶液として用いられる。微孔性担体を膨潤させるために用いられる溶媒中の溶液として活性化剤の添加の前に、ホスホロアミド溶液と遊離水酸基を含む膨潤された担体とを混合することが有利である。

【0028】

本発明の第3の側面のプロセスにおいて製造された亜リン酸オリゴヌクレオチドトリエステルは、一般的に、酸化又は硫化されて、リン酸オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドホスホロチオエートを形成する。用いられる酸化剤は、慣用のホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成に関して当該分野で公知の酸化剤であり、ヨーダイド、及びt-ブチルヒドロペルオキシドを挙げることができる。用いられる硫化剤は、慣用のホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成に関して当該分野で公知の硫化剤であり、キサンタンヒドライド(xanthanehydride)、フェニルアセチルジサルファイド及びBeaucage試薬を挙げることができる。酸化剤又は硫化剤は、一般的に、微孔性担体を膨潤させるために用いられる溶媒中の溶液として用いられる。

【0029】

当該分野において公知のキャッピング剤、例えばピリジン及び無水酢酸の混合物やピリジン及びN-メチルイミダゾールの混合物を用いるキャッピング処理を用いてもよい。キャッピング剤は、微孔性担体を膨潤させるために用いられる溶媒の存在下で用いられることが有利である。

【0030】

固体担体に結合しているリン酸オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドホスホロチオエート中に、一般的に5' - 位にて存在しているピキシル保護基又はトリチル保護基は、慣用の脱トリチル化技術、例えばジクロロ酢酸溶液での処理により除去することができる。好ましくは、ジクロロ酢酸は、例えばジクロロメタン又は有利にはアミド、特にジメチルホルムアミド又はN-メチルピロリジノンなど微孔性担体を膨潤させるために用いられる溶媒中の溶液として用いられる。ピキシル保護基又はトリチル保護基の除去は、さらなるカップリングの為に用いることができる遊離水酸基を生成させる。さらなるカップリングは、所望のシーケンスをアセンブルするために行うことができる。所望のシーケンスのアセンブリの完了時に、用いられたリンカーに対する適切な技術を用いて固体担体から生成物を切断することができる。

【0031】

本発明によるプロセスは、ホスホロチオエート化されたデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを合成するために用いることができる。ヌクレオチドは、ヌクレオチド分野で公知の塩基、保護基及び他の修飾を含むものでもよい。例えば、存在してもよい塩基としては、プリン及びピリミジン、一般的にA、G、T、C及びUを挙げることができる。存在してもよい他の塩基としては、ヒポキサンチン、イノシン及び2',6'-ジアミノプリンを挙げることができる。存在してもよい保護基としては、ベンジル基、アセチル基、フェノキシアセチル基及びイソブチリル基などの塩基保護基や、ピキシル基、トリチル基、特にジメトキシトリチル基などのヒドロキシ保護基を挙げることができる。リブヌクレオチドは、2' - 位にてメトキシ置換基又はメトキシエトキシ置換基などのアルコキシ置

10

20

30

40

50

換基又はアルコキシアルキル置換基により修飾されていてもよく、あるいは2' - 位にてターシャリブチルジメチルシリル、1 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル(F p m p)又は1 - (2 - クロロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル(C p m p)などのヒドロキシ保護基により保護されていてもよい。逆位ヌクレオシド(inverted nucleosides)、脱塩基ヌクレオシド(abstract nucleosides)及びL - ヌクレオシドを含む修飾剤が存在してもよい。デオキシリボヌクレオチドは、2' - 位で、2' - C - アルキル基により修飾されていてもよい。混合したデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチド、及び/又は混合したリン酸ヌクレオチド/ホスホロチオエートヌクレオチドを含むキメラヌクレオチドを調製してもよい。

10

【0032】

多くの実施形態において、本発明のプロセスを用いて、1 ~ 100のインターヌクレオシド結合、しばしば5 ~ 75のインターヌクレオシド結合、好ましくは8 ~ 50及び特に好ましくは10 ~ 30のインターヌクレオシド結合を有するオリゴヌクレオチドを調製する。一般的に、本発明のプロセスは、インターヌクレオシド結合の少なくとも50%がホスホチオエート化されている化合物、好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは90 ~ 100%がホスホチオエート化されている化合物を調製するために用いられる。

【0033】

本発明のプロセスにおいて用いることができる切断可能なリンカーの例としては、オリゴヌクレオチドの固相合成の分野で周知のリンカー、例えばウレタンリンカー、オキサリルリンカー、スクシニルリンカー及びアミノ誘導リンカーなどを挙げることができる。スクシニルリンカーが好ましい。

20

【0034】

さて、以下の実施例により本発明を制限することなく説明する。

[実施例1 ~ 3及び比較例A]

標準的なホスホロアミダイト化学を用いて、17個のホスホロチオエート基を含む完全にホスホロチオエート化されたデオキシリボヌクレオチドのサンプルを調製した。生成物をポリスチレン担体上にトリチル - オン(trityl on)で製造した。アセンブリ及び硫化の完了後に、担持ヌクレオチドをアセトニトリルで洗浄した。

30

【0035】

担持オリゴヌクレオチドの3種のサンプルを以下のように処理した。実施例1として、担持オリゴヌクレオチドを濾過漏斗上で空気乾燥させた。実施例2として、サンプルをトリエチルアミンで洗浄した。実施例3として、サンプルを2.5M酢酸ナトリウム水溶液で洗浄した。実施例2及び実施例3の各々において、洗浄は、わずかに減圧した状態であるが、アセトニトリルの蒸発を最小にするような圧力下で濾過漏斗上で行った。サンプル中のアセトニトリル含量(%w/w)はGCによって測定した。濃アンモニア水を用いる標準的なアンモノリシス条件を用いて、実施例1 ~ 3の生成物を切断して、オリゴヌクレオチド生成物を得た。比較例Aとして、担持オリゴヌクレオチドのさらに別のサンプルを同じ条件下で、しかし乾燥又は洗浄処理を行わずに切断した。各場合において、イオン交換クロマトグラフィーを用いて、サンプル中のP = O不純物の重量パーセンテージを決定した。結果を下記Table 1に示す。

40

【0036】

【表1】

Table 1

サンプル	アセトニトリル含量	% P=O
比較例A	33%	9%
実施例1	<1%	5%
実施例2	1%	5%
実施例3	9%	5%

【0037】

Table 1 に示す結果は、本発明のプロセスにより製造されたオリゴヌクレオチド（実施例1～3）が、切断の前にアセトニトリルの濃度を減少させなかった比較プロセスよりも、オリゴヌクレオチド生成物の純度を大幅に増加させたことを示す。 10

【0038】

[実施例4 - 微孔性担体を用いるオリゴヌクレオチドの合成]

以下の反応は、窒素雰囲気下で行った。

商標「PL DMA」としてPolymer Laboratories から入手したアミン官能基化ポリ（アクリルアミド）樹脂（装填1 mmol/g）を含むペプチド合成に一般的に用いられるタイプの40ml固相ガラス焼結／バブラー反応器に、5'-DMT-T-3'-サクシネットの3当量を添加した。十分なN-メチルピロリジノン（NMP）を添加して、窒素攪拌に移る直前に樹脂を作り、4当量のジイソプロピルカルボジイミド及び3当量のジイソプロピルエチルアミンを添加した。Kaiserテストにより示されるように樹脂の装填が完了するまで、混合物を窒素で攪拌した。樹脂をNMP（5×床容積）及びジクロロメタン（DCM、5×床容積）で洗浄した。DCM湿潤樹脂に10当量のピロールを添加して、DCM（2×床容積）中の15%v/v酢酸ジクロロ（DCA）溶液を添加した。混合物を窒素で1時間攪拌し、次いでDCM（5×床容積）及びNMP（5×床容積）で洗浄して、5'脱保護3'-担持Tを形成した。 20

【0039】

3当量の5'-DMT-T-3'-(シアノエチルオキシジイソプロピルアミノ)ホスホロアミドを上記で調製した担持Tに添加した。十分なNMPを添加して、窒素攪拌に移る直前に樹脂を作り、3.3当量のS-エチルテトラゾールを添加した。混合物を窒素で30分間攪拌し、次いでNMP（10×床容積）で洗浄した。Beaucage試薬（5当量）を用いて、60分間、十分なNMPの存在下で硫化を達成し、窒素攪拌に移る直前に樹脂を作った。樹脂をNMP（5×床容積）及びDCM（5×床容積）で洗浄し、5'-DMT保護担持ダイマーホスホチオエートを形成した。脱トリチル化、カップリング及び硫化サイクルをさらに2回繰り返して、5'-DMT担持テトラマーホスホチオエートを形成した。これを上記条件を用いて脱トリチル化した。固体担体からの切断、及びシアノエチル基の除去は、室温で、48時間、濃アンモニア水で処理して達成した。 30

【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
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/46205 A2

(51) International Patent Classification: C07H 21/00 (74) Agents: REVELL, Christopher et al.; Intellectual Property Group, Aveclia Limited, P.O. Box 42, Hexagon House, Blackley, Manchester M9 8ZS (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/05338

(22) International Filing Date: 3 December 2001 (03.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0029610.3 5 December 2000 (05.12.2000) GB
00740,031 20 December 2000 (20.12.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): AVECIA
LIMITED [GB/GB]; Hexagon House, Blackley, Manches-
ter M9 8ZS (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,

YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, 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, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DOUGLAS, Mark,
Edward [GB/GB]; Hexagon House, P.O. Box 42, Black-
ley, Manchester M9 8ZS (GB). MELLOR, Ben, James
[GB/GB]; Earls Road, Grangemouth, Stirlingshire FK3
8XG (GB). WELLINGS, Donald, Alfred [GB/GB]; P.O.
Box 13, The Heath, Runcom, Cheshire WA7 4QQ (GB).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 02/46205 A2

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF PHOSPHOROTHIONATE OLIGONUCLEOTIDES

(57) Abstract: A process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides is provided which comprises assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile; prior to cleaving the oligonucleotide from the solid support removing the acetonitrile; and cleaving the oligonucleotide from the solid support. The process is particularly suited to the large scale synthesis of nucleotides. The acetonitrile may be removed from the solid support by one or both to drying and by washing with solvents. Preferred washing solvents comprise trialkylamines.

PROCESS FOR THE PREPARATION OF PHOSPHOROTHIOATE
OLIGONUCLEOTIDES

The present invention concerns a method for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides.

In the past 15 years or so, enormous progress has been made in the development of the synthesis of oligodeoxyribonucleotides (DNA sequences), oligoribonucleotides (RNA sequences) and their analogues 'Methods in Molecular Biology, Vol. 20, Protocol for Oligonucleotides and Analogs', Agrawal, S. Ed., Humana Press, Totowa, 1993. Much of the work has been carried out on a *micromolar* or even smaller scale, and automated solid phase synthesis involving monomeric phosphoramidite building blocks Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 1859-1862 has proved to be the most convenient approach. Indeed, high molecular weight DNA and relatively high molecular weight RNA sequences can now be prepared routinely with commercially available synthesisers. These synthetic oligonucleotides have met a number of crucial needs in biology and biotechnology.

Whereas milligram quantities have generally sufficed for molecular biological purposes, gram to greater than 100 gram quantities are required for clinical trials. Several oligonucleotide analogues that are potential antisense drugs are now in advanced clinical trials. If, as seems likely in the very near future, one of these sequences becomes approved, say, for the treatment of AIDS or a form of cancer, kilogram, multikilogram or even larger quantities of a specific sequence or sequences will be required.

Many of the oligonucleotides currently of interest in the pharmaceutical industry are analogues of natural oligonucleotides which comprise phosphorothioated-internucleoside linkages. When phosphorothioate linkages are present, particularly when such linkages comprise a major proportion of the linkages, and especially when they comprise 100% of the internucleoside linkages, it is highly desirable that the concentration of impurity, non-phosphorothioated linkages in the final product is kept to a pharmacologically acceptable level.

A large number of protocols for the synthesis of oligonucleotides employ acetonitrile as a solvent for the reagents employed. Acetonitrile is attractive as a solvent because it is inert towards the reagents and oligonucleotide product, it has good solvation properties and is environmentally acceptable. Commonly, for large-scale syntheses, a high concentration of acetonitrile is present during the stage when the oligonucleotide product is cleaved from the solid support. Hitherto, this has been acceptable for large scale synthesis because of the perceived inert nature of acetonitrile. However, during the course of the studies resulting in the present invention, it has now been surprisingly found that higher purity oligonucleotides can be obtained by reducing the concentration of acetonitrile present during the cleavage stage.

According to one aspect of the present invention, there is provided a process for the large-scale synthesis of phosphorothioate oligonucleotides which comprises:

- a) assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile; and

5 b) cleaving the oligonucleotide from the solid support;
characterised in that the concentration of acetonitrile is reduced to less than 10% by weight of the oligonucleotide plus solid support prior to the cleavage of the oligonucleotide from the solid support.

10 The phosphorothioate oligonucleotides can be assembled by known techniques for solid phase synthesis, for example using H-phosphonate or particularly phosphoramidite chemistry. For the phosphoramidite approach, commonly, the sequence employed is: deprotection of the nucleoside bound to solid support, preferably at the 5'-position; coupling of a, preferably 3', phosphoramidite nucleoside to form a supported oligonucleotide; sulphurisation of the supported oligonucleotide by reaction with a sulphurising agent to produce a supported phosphorothioate oligonucleotide; and capping of unreacted supported nucleoside with a capping reagent. This cycle is then repeated as often as is necessary to assemble the desired sequence of the oligonucleotide. When a mixed phosphate/phosphorothioate product is desired, the sulphurisation stage can be replaced with an oxidation step to produce a phosphate linkage at the desired location.

15 20 On completion of the assembly, and prior to cleavage from the support, the supported oligonucleotide is commonly washed with acetonitrile in order to remove traces of unreacted reagents.

25 Acetonitrile can be removed by drying of the supported oligonucleotide, optionally under reduced pressure. The acetonitrile is commonly removed at ambient temperature, for example from 15 to 30°C, although elevated temperatures, such as from 30 to 80°C, for example from 40 to 60°C, may be employed.

30 The process according to the first aspect of the present invention is employed for large scale synthesis of oligonucleotides. Large scale synthesis of oligonucleotides is often regarded as being at or above a batch size of 10 nmol oligonucleotide, commonly at or above 15mmol, often at or above 25 mmol, for example greater than 50 mmol, and especially greater than 75 mmol of oligonucleotide. In many embodiments, the process of the present invention is employed for oligonucleotide synthesis at a scale in the range of from 100-500 mmol.

35 On completion of the assembly of the desired product, the product may be cleaved from the solid support. Cleavage methods employed are those known in the art for the given solid support. When the product is bound to the solid support via a cleavable linker, cleavage methods appropriate for the linker are employed, for example, contact with methylamine, aqueous methylamine solution, liquified ammonia, gaseous ammonia and particularly contact with concentrated aqueous ammonia solution.

Following cleavage, the product can be purified using techniques known in the art, such as one or more of ion-exchange chromatography, reverse phase chromatography, and precipitation from an appropriate solvent. Further processing of the product by for example ultrafiltration may also be employed.

5 Solid supports that are employed in the process according to the present invention are substantially insoluble in the solvent employed, and include those supports well known in the art for the solid phase synthesis of oligonucleotides. Examples include silica, controlled pore glass, polystyrene, copolymers comprising polystyrene such as polystyrene-poly(ethylene glycol) copolymers and polymers such as polyvinylacetate. 10 Additionally, microporous or soft gel supports, especially poly(acrylamide) supports, such as those more commonly employed for the solid phase synthesis of peptides may be employed if desired. Preferred poly(acrylamide) supports are amine-functionalised supports, especially those derived from supports prepared by copolymerisation of acryloyl-sarcosine methyl ester, N,N-dimethylacrylamide and bis-acryloyl ethylenediamine, 15 such as the commercially available (Polymer Laboratories) support sold under the catalogue name PL-DMA. The procedure for preparation of the supports has been described by Atherton, E.; Sheppard, R. C.; in *Solid Phase Synthesis: A Practical Approach*, Publ., IRL Press at Oxford University Press (1984). The functional group on such supports is a methyl ester and this is initially converted to a primary amine functionality by reaction with an alkyl diamine, such as ethylene diamine.

20 According to a second aspect of the present invention, there is provided a process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides which comprises:

- 25 a) assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile;
- b) prior to cleaving the oligonucleotide from the solid support, washing the oligonucleotide bound to a solid support with a washing regime employing one or more solvent washes; and
- c) cleaving the oligonucleotide from the solid support

30 characterised in that the final wash of the washing regime employs a solvent other than acetonitrile or dioxane.

35 The washing regime employs one or more solvent washes. When the washing regime comprises a single wash, the solvent employed is free from acetonitrile and dioxane. When more than one solvent wash is employed, acetonitrile and dioxane may be employed in the wash stages other than the final wash. However, it is preferred that acetonitrile and dioxane are not employed in any stage of the washing regime.

Solvents which can be employed are preferably inert solvents which do not degrade the oligonucleotide under the conditions under which the solvent is employed. Examples of inert solvents that can be employed include inert organic solvents and inert aqueous solvents.

Preferably, the washing with solvent is effected such that the concentration of acetonitrile is reduced to less than 10% by weight of the oligonucleotide plus solid support.

Organic solvents which can be employed include aromatic hydrocarbons, for example toluene; aliphatic hydrocarbons, for example cyclohexane; haloalkanes, particularly dichloromethane; esters, particularly alkyl esters such as ethyl acetate and methyl or ethyl propionate; alcohols, particularly aliphatic alcohols such as C₁₋₄ alkyl alcohols, for example methanol, ethanol or isopropanol; amides, such as dimethylformamide and N-methylpyrrolidinone; basic, nucleophilic solvents such as pyridine or alkylamines, especially tri(alkyl), such as tri(C₁₋₄-alkyl)amines; polar ethers such as tetrahydrofuran; and sulphoxides, for example dimethylsulphoxide.

Aqueous solvents that can be employed include water, aqueous buffer solutions, mixtures of water and water miscible inert organic solvents, especially those solvents described above.

Solid supports that may be employed are those described with the respect to the first aspect of the present invention. In many embodiments, it may be preferred to employ an organic solvent when the support is hydrophobic, such as poly(styrene). In other embodiments, it may be preferred to employ an aqueous solvent when the support is hydrophilic, such as controlled pore glass or silica. In further embodiments, when the support is microporous, it may be preferred to employ a solvent which swells the support.

In certain preferred embodiments, the solvent employed serves to remove protecting groups from the oligonucleotide, particularly betacyanoethyl protecting groups from the internucleotide linkages, and nucleobase protecting groups. Preferred solvents are alkylamines, especially tri(alkyl)amines, such as tri(C₁₋₄-alkyl)amines, and most preferably triethylamine.

The processes according to the second aspect of the present invention can be employed in both small (ie <25mmol scale) and large scale oligonucleotide synthesis as described above in respect of the first aspect of the present invention.

The oligonucleotides can be assembled, and after washing, cleaved from the solid support, by the methods described above in respect of the first aspect of the present invention.

In both the first and second aspects of the present invention, the acetonitrile concentration is preferably reduced to less than 5%, often less than 3%, particularly less than about 2%, and especially less than about 1%, by weight of the oligonucleotide plus solid support.

An especially preferred embodiment of the present invention comprises assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile, air drying the supported oligonucleotide, contacting the dried supported oligonucleotide with

a trialkylamine, preferably triethylamine, for sufficient time to deprotect the oligonucleotide, and subsequently cleaving the oligonucleotide from the solid support.

In a related embodiment of the present invention, there is provided a process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides which comprises:

- 5 a) assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile;
- b) prior to cleaving the oligonucleotide from the solid support, washing the oligonucleotide bound to a solid support with a washing regime employing one or more solvent washes; and
- 10 c) cleaving the oligonucleotide from the solid support

characterised in that the final wash of the washing regime employs as solvent wash a solution comprising an alkylamine, preferably a tri(C₁₋₄)alkylamine such as triethylamine, substantially free from acetonitrile. One or more solvent washes may be employed. It is preferred that acetonitrile is not employed in any of the solvent washes.

- 15 The synthesis of oligonucleotides using phosphoramidite chemistry wherein the oligonucleotide is synthesised supported on a microporous support is believed to be novel. Accordingly, in a third aspect of the present invention, there is provided a process for the preparation of an oligonucleotide which comprises coupling a nucleoside or oligonucleotide phosphoramidite with a nucleoside or oligonucleotide comprising a free hydroxy group supported on a solid support to form an oligonucleotide phosphite triester, characterised in that the solid support is a microporous support.

Microporous supports are preferably poly(acrylamide) supports, such as those more commonly employed for the solid phase synthesis of peptides, may be employed if desired. Preferred poly(acrylamide) supports are amine-functionalised supports, especially those derived from supports prepared by copolymerisation of acryloyl-sarcosine methyl ester, N,N-dimethylacrylamide and bis-acryloylethylenediamine, such as the commercially available (Polymer Laboratories) support sold under the catalogue name PL-DMA. The procedure for preparation of the supports has been described by Atherton, E.; Sheppard, R. C.; in *Solid Phase Synthesis: A Practical Approach*, Publ., IRL Press at Oxford University Press (1984), the microporous supports of which are incorporated herein by reference. The functional group on amine-functionalised supports is a methyl ester and this is initially converted to a primary amine functionality by reaction with an alkyl diamine, such as ethylene diamine. The microporous supports are preferably employed in the form of polymeric beads.

The process according to the third aspect of the present invention is preferably carried out in the presence of a solvent which swells the microporous support. Examples of such solvents include haloalkanes, particularly dichloromethane; esters, particularly alkyl esters such as ethyl acetate and methyl or ethyl propionate; ethers such as

tetrahydrofuran; and preferably amides, such as dimethylformamide and N-methylpyrrolidinone. The most preferred solvent is dimethylformamide.

5 The nucleoside or oligonucleotide phosphoramidite employed can comprise a 3'- or 5'-phosphoramidite group, most preferably a 3'-phosphoramidite group. Commonly, the phosphoramidite is a betacyanoethoxy phosphoramidite. The nucleoside or oligonucleotide phosphoramidite commonly comprises a protected hydroxy group at whichever of the 3'- or 5'-positions is not a phosphoramidite. Preferably, at the 5'-position is a protected hydroxy group. Preferred protecting groups are pixyl and trityl, especially dimethoxytrityl, groups.

10 The nucleoside or oligonucleotide comprising a free hydroxy group employed can comprise a 3'- or 5'- hydroxy group, and is commonly bound to the solid support via whichever of the 3'- or 5'- positions is not free hydroxy. Most preferably, the nucleoside or oligonucleotide comprising a free hydroxy group is bound to the solid support via the 3'-position, and comprises a free 5' hydroxy group.

15 The nucleoside or oligonucleotide comprising a free hydroxy group is commonly bound to the solid support via a cleavable linker.

20 The coupling of the nucleoside or oligonucleotide phosphoramidite with a nucleoside or oligonucleotide comprising a free hydroxy group takes place in the presence of a suitable activator. Examples of such activators are those known in the art for conventional phosphoramidite oligonucleotide synthesis, and include tetrazole, thioethyltetrazole, nitrophenyltetrazole and dicyanoimidazole. Commonly, the nucleoside or oligonucleotide phosphoramidite is employed as a solution in the solvent employed to swell the microporous support. Advantageously, the phosphoramidite solution is mixed with the swollen support comprising the free hydroxy group prior to addition of the activator as a solution in the solvent employed to swell the microporous support.

25 The oligonucleotide phosphite triester produced in the process of the third aspect of the present invention is commonly oxidised or sulphurised to form an oligonucleotide phosphate or phosphothioate. Oxidising agents employed are those known in the art for conventional phosphoramidite oligonucleotide synthesis, and include iodine and t-butylhydroperoxide. Sulphurising agents employed are those known in the art for conventional phosphoramidite oligonucleotide synthesis, and include xanthane hydride, phenylacetyl disulphide and Beaucage reagent. The oxidising or sulphurising agents are commonly employed as a solution in the solvent employed to swell the microporous support.

30 A capping treatment, employing capping agents known in the art, for example a mixture of pyridine and acetic anhydride and a mixture of pyridine and N-methylimidazole, may be employed. Advantageously, the capping agents are employed in the presence of the solvent employed to swell the microporous support.

5 Pixyl or trityl protecting groups present in the oligonucleotide phosphate or phosphorothioate bound to the solid support, commonly at the 5'-position, can be removed by conventional detritylation techniques, for example by treatment with a solution of dichloroacetic acid. Preferably the dichloroacetic acid is employed as a solution in the solvent employed to swell the microporous support, for example dichloromethane or advantageously and amide, particularly dimethylformamide or N-methylpyrrolidinone. Removal of the pixyl or trityl protecting groups produces a free hydroxyl group which can then be employed for further coupling. Further couplings can be carried out in order to assemble the desired sequence. On completion of the 10 assembly of the desired sequence, the product can be cleaved from the solid support using techniques appropriate to the linker employed.

10 The processes according to the present invention can be employed to synthesise phosphorothioated deoxyribonucleotides and ribonucleotides. The nucleotides may comprise bases, protecting groups and other modifications known in the nucleotide art. 15 For example, bases which may be present include purines and pyrimidines, commonly A, G, T, C and U. Other bases which may be present include hypoxanthine, inosine and 2,6-diaminopurine. Protecting groups which may be present include base-protecting groups, such as benzyl, acetyl, phenoxyacetyl and isobutyryl groups, and hydroxy-protecting groups, such as pixyl and trityl, especially dimethoxytrityl, groups. 20 Ribonucleotides may be modified at the 2'-position by an alkoxy or alkoxyalkyl substituent, such as a methoxy or methoxyethoxy substituent or may be protected at the 2'-position by a hydroxy protecting group such as tertiary butyldimethylsilyl, 1-(2-fluorophenyl)-4-methoxypiperidine-4-yl (Fpmp) or 1-(2-chlorophenyl)-4-methoxypiperidine-4-yl (Cmp). Other modifications, including inverted nucleosides, abasic nucleosides and 25 L-nucleosides may also be present. Deoxyribonucleotides may be modified at the 2'-position by a 2'-C-alkyl group. Chimeric nucleotides, including mixed deoxyribonucleotides and ribonucleotides, and/or mixed phosphate/phosphorothioate nucleotides can be prepared.

30 In many embodiments, the processes of the present invention are employed to prepare oligonucleotides having from 1 to 100, often from 5 to 75, preferably from 8 to 50 and particularly preferably from 10 to 30 internucleoside linkages. Commonly, the processes of the present invention are employed to prepare compounds wherein at least 50% of the internucleoside linkages are phosphorothioated, preferably at least 75%, and most preferably 90 to 100% phosphorothioated.

35 Examples of cleavable linkers that may be employed in the processes of the present invention include those well known in the art for the solid phase synthesis of oligonucleotides, such as urethane, oxanyl, succinyl, and amino-derived linkers. Succinyl linkers are preferred.

The invention will now be illustrated without limitation by the following examples.

Examples 1-3 and Comparison A

A sample of a fully phosphorothioated deoxyribonucleotide comprising 17 phosphorothioate groups was prepared using standard phosphoramidite chemistry. The product was produced trityl-on on a polystyrene support. After completion of the assembly and sulphurisation, the supported nucleotide was washed with acetonitrile.

5 Three samples of the supported oligonucleotide were treated as follows. For Example 1, the supported oligonucleotide was air dried on a filter funnel. For Example 2, the sample was washed with triethylamine. For Example 3, the sample was washed with 2.5M aqueous sodium acetate solution. In each of Examples 2 and 3, the washing took 10 place on a filter funnel under slightly reduced pressure, but operated so as to minimise evaporation of acetonitrile. The acetonitrile contents (% w/w) of the samples were measured by GC. The products of Examples 1 to 3 were cleaved using standard ammonolysis conditions using concentrated aqueous ammonia to obtain the oligonucleotide product. For Comparison A, a further sample of the supported 15 oligonucleotide was cleaved under the same conditions, but without a drying or washing treatment. In each case, the weight percentage of P=O impurity in the samples was determined using ion exchange chromatography. The results are given in Table 1 below.

Table 1

SAMPLE	Acetonitrile Content	% P=O
Comparison A	33%	9%
Example 1	<1%	5%
Example 2	1%	5%
Example 3	9%	5%

The results given in Table 1 show that the oligonucleotide produced by the processes of the present invention (Examples 1 to 3) gave significantly purer oligonucleotide products than the comparative process wherein the concentration of acetonitrile was not reduced prior to cleavage.

Example 4 - Synthesis of Oligonucleotide using a Microporous support

The following reaction was carried out under a nitrogen atmosphere.

To a 40 ml solid phase glass sinter/bubbler reactor of the type commonly employed in peptide synthesis, containing 1g of amine functionalised poly(acrylamide) resin (loading 1mmol/g) obtained from Polymer Laboratories under the trade name PL-DMA, was added 3 equivalents of 5'-DMT-T-3'-succinate. Sufficient N-methylpyrrolidinone (NMP) was added to make the resin just mobile to nitrogen agitation, followed by 4 equivalents of

5 diisopropylcarbodiimide and 3 equivalents of diisopropylethylamine. The mixture was agitated with nitrogen until loading of the resin was complete as shown by the Kaiser test. The resin was washed with NMP (5 x bed volume) and dichloromethane (DCM, 5 x bed volume). 10 equivalents of pyrrole was added to the DCM wet resin followed by a 15% v/v solution of dichloroacetic acid (DCA) in DCM (2 x bed volume). The mixture was agitated with nitrogen for 1 hour and then washed with DCM (5 x bed volume) and NMP (5 x bed volume) to form a 5'-deprotected 3'-supported T.

10 3 equivalents of 5'-DMT-T-3'-(betacyanoethoxydiisopropylamino)phosphoramidite was added to the supported T prepared above. Sufficient NMP was added to make the resin just mobile to nitrogen agitation, followed by 3.3 equivalents of S-ethyltetrazole. The mixture was agitated with nitrogen for 30 minutes, and then washed with NMP (10 x bed volume). Sulfurisation was achieved using Beaucage reagent (5 equivalents) for 60 minutes in the presence of sufficient NMP to make the resin just mobile to nitrogen agitation. The resin was washed with NMP (5 x bed volume) and DCM (5 x bed volume) to form a 5'-DMT protected supported dimer phosphorothioate. The detritylation, coupling and sulfurisation cycles were repeated 2 further times to form a 5'-DMT supported tetramer phosphorothioate. This was detritylated using the using the conditions given above. Cleavage from the solid support, and removal of betacyanoethyl groups was achieved by treatment with concentrated aqueous ammonia solution for 48 hours at room temperature.

CLAIMS

1. A process for the large-scale synthesis of phosphorothioate oligonucleotides which comprises:
 - 5 a) assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile; and
 - b) cleaving the oligonucleotide from the solid support;characterised in that the concentration of acetonitrile is reduced to less than 10% by weight of the oligonucleotide plus solid support prior to the cleavage of the oligonucleotide from the solid support.
- 10 2. A process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides which comprises:
 - 15 a) assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile;
 - b) prior to cleaving the oligonucleotide from the solid support, washing the oligonucleotide bound to a solid support with a washing regime employing one or more solvent washes; and
 - c) cleaving the oligonucleotide from the solid supportcharacterised in that the final wash of the washing regime employs a solvent other than acetonitrile or dioxane.
- 15 3. A process according to claim 2, wherein the solvent is selected from the group consisting of aromatic hydrocarbons, aliphatic hydrocarbons, haloalkanes, esters, alcohols, amides, basic, nucleophilic solvents, polar ethers, sulphoxides, water, aqueous buffer solutions and mixtures of water and water miscible organic solvents.
- 20 4. A process according to claim 3, wherein the solvent is selected from the group consisting of toluene, cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, methyl or ethyl propionate, C₁₋₄ alkyl alcohols, dimethylformamide and N-methylpyrrolidinone, pyridine, tri(C₁₋₄-alkyl)amines, tetrahydrofuran, dimethylsulphoxide and aqueous sodium acetate solution.
- 25 5. A process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides which comprises:
 - 30 a) assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile;
 - b) prior to cleaving the oligonucleotide from the solid support, washing the oligonucleotide bound to a solid support with a washing regime employing one or more solvent washes; and
 - c) cleaving the oligonucleotide from the solid support

characterised in that the final wash of the washing regime employs as solvent wash a solution comprising a trialkylamine.

6. A process according to either of claims 4 or 5, wherein the solvent is triethylamine.

5

7. A process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides comprising assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile; air drying the supported oligonucleotide; contacting the dried supported oligonucleotide with a trialkylamine, preferably triethylamine, for sufficient time to deprotect the oligonucleotide, and subsequently cleaving the oligonucleotide from the solid support.

10

8. A process according to any preceding claim, wherein the acetonitrile concentration is reduced to less than 5%, and especially less than about 1%, by weight of the oligonucleotide plus solid support.

15

9. A process according to any preceding claim which is operated at or above a batch size of 10 mmol of oligonucleotide.

20

10. A process for the preparation of an oligonucleotide which comprises coupling a nucleoside or oligonucleotide phosphoramidite with a nucleoside or oligonucleotide comprising a free hydroxy group supported on a solid support to form an oligonucleotide phosphite triester, characterised in that the solid support is a microporous support.

25

11. A process according to any preceding claim, wherein the solid support is an amine-functionalised support derived from supports prepared by copolymerisation of acryloyl-sarcosine methyl ester, N,N-dimethylacrylamide and bis-acryloylethylenediamine.

30

12. A process according to claim 11, wherein the amine-functionalised support comprises a primary amine functionality derived from reaction of the methyl ester group with an alkyl diamine, preferably ethylene diamine.

35

13. A process according to any preceding claim, wherein the oligonucleotide is bound to the solid support via a cleavable linker selected from the group consisting of urethane, oxanyl, succinyl, and amino-derived linkers.

14. A process according to any preceding claim wherein the oligonucleotide is cleaved from the solid support by contact with a cleaving reagent.

15. A process according to claim 14, wherein the cleavage reagent comprises methylamine, aqueous methylamine solution, liquified ammonia, gaseous ammonia or concentrated aqueous ammonia solution.

5 16. A process according to any preceding claim which is employed to prepare oligonucleotides having from 1 to 100 internucleoside linkages.

17. A process according to any preceding claim which is employed to prepare compounds wherein at least 50% of the internucleoside linkages are phosphorothioated.

10

18. A process according to claim 17, wherein 90 to 100% of the internucleoside linkages are phosphorothioated.

【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
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/046205 A3

(51) International Patent Classification: C07H 21/00 (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0029610.3 5 December 2000 (05.12.2000) GB
09740,031 20 December 2000 (20.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AVECIA
LIMITED (GB/GB); Hexagon House, Blackley, Manchester M9 8ZS (GB).



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
15 August 2002

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DOUGLAS, Mark, Edward (GB/GB); Hexagon House, P.O. Box 42, Blackley, Manchester M9 8ZS (GB). MELLOR, Ben, James (GB/GB); Parls Road, Grangemouth, Stirlingshire FK3 8XG (GB). WELLINGS, Donald, Alfred (GB/GB); P.O. Box 13, The Heath, Runcorn, Cheshire WA7 4QG (GB).

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:
15 August 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/046205 A3

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF PHOSPHOROTHIONATE OLIGONUCLEOTIDES

(57) Abstract: A process for the synthesis of phosphorothioate oligonucleotides is provided which comprises assembling an oligonucleotide bound to a solid support in the presence of acetonitrile; prior to cleaving the oligonucleotide from the solid support removing the acetonitrile; and cleaving the oligonucleotide from the solid support. The process is particularly suited to the large scale synthesis of nucleotides. The acetonitrile may be removed from the solid support by one or both to drying and by washing with solvents. Preferred washing solvents comprise trialkylamines.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International Application No. PCT/GB 01/05338	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 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 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, CHEM ABS Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	WO 97 40458 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 30 October 1997 (1997-10-30) examples 19,22 ---
X	US 6 111 086 A (SCARINGE STEPHEN A) 29 August 2000 (2000-08-29) example 11 ---
X	WO 92 09615 A (PHARMACIA LKB BIOTECH) 11 June 1992 (1992-06-11) example 5 ---
X	EP 0 323 152 A (APPLIED BIOSYSTEMS) 5 July 1989 (1989-07-05) example IV ---
	-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual compilation of the international search 25 April 2002	Date of mailing of the International search report 12.06.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL-2233 RA Hague Tel. (+31-70) 340-2340, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bardill, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/05338

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
A	WO 00 20431 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC ;SCOZZARI ANTHONY (US)) 13 April 2000 (2000-04-13) ----- X CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 25, 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 211802, ARSHADY, REZA; ATHERTON, ERIC; GAIT, MICHAEL J.; LEE, KAREN; SHEPPARD, R.C.: "Easily prepared polar support for solid phase peptide and oligonucleotide synthesis. Preparation of substance P and a nonadeoxyribonucleotide" XP002197392 abstract & J. CHEM. SOC. CHEM. COMMUN., 1979, pages 423-5, -----	10-18
E	WO 01 96358 A (SINHA NANDA D ;AVECIA BIOTECHNOLOGY INC (US)) 20 December 2001 (2001-12-20) page 13 -----	10-18
X	EP 0 288 310 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 26 October 1988 (1988-10-26) page 4, lines 19-26 page 11 -page 12 -----	10-18
X	WO 94 01446 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 20 January 1994 (1994-01-20) the whole document -----	10-18
X	US 4 753 985 A (ROSEVEAR ALAN ET AL) 28 June 1988 (1988-06-28) claim 3; example 6 -----	10-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/GB 01/05338	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort, justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 	
<p>Remark on Protest</p> <p style="text-align: center;"><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/GB 01 05338

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-9, 11-18 (partially)

Invention (1) as defined in claims 1-9 and 11-18 (partially) pertains to method of phosphorothioate oligonucleotide synthesis wherein the solvent acetonitrile is removed prior to the cleavage of the oligonucleotide from the support.

2. Claims: 10, 11-18 (partially)

Invention (2) as defined in claims 10 and 11-18 (partially) refers to the use of a microporous support for oligonucleotide triester synthesis.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 01/05338

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740458	A	30-10-1997	US 5869696 A EP 0843684 A2 JP 2000500158 T WO 9740458 A2	09-02-1999 27-05-1998 11-01-2000 30-10-1997
US 6111086	A	29-08-2000	NONE	
WO 9209615	A	11-06-1992	AT 133684 T DE 69116864 D1 EP 0514513 A1 ES 2084839 T3 JP 3161730 B2 JP 5503715 T WO 9209615 A1 US 5589586 A	15-02-1996 14-03-1996 25-11-1992 16-05-1996 25-04-2001 17-06-1993 11-06-1992 31-12-1996
EP 0323152	A	05-07-1989	US 4965349 A DE 3853060 D1 DE 3853060 T2 DE 3856481 D1 DE 3856481 T2 EP 0323152 A2 EP 0617047 A1 JP 2000796 A JP 2787775 B2 US 5231191 A	23-10-1990 23-03-1995 19-10-1995 23-08-2001 18-04-2002 05-07-1989 28-09-1994 05-01-1990 20-08-1998 27-07-1993
WO 0020431	A	13-04-2000	US 6069243 A AU 6409399 A EP 1119578 A1 WO 0020431 A1	30-05-2000 26-04-2000 01-08-2001 13-04-2000
WO 0196358	A	20-12-2001	AU 7552301 A WO 0196358 A1	24-12-2001 20-12-2001
EP 0288310	A	26-10-1988	AT 81799 T AU 1505888 A AU 618530 B2 AU 1505988 A CA 1315968 A1 DE 3875515 D1 DE 3875515 T2 DK 223388 A EP 0288310 A2 ES 2036679 T3 GR 3006883 T3 JP 1063858 A JP 2021262 C JP 7043359 B NO 881761 A , B, NZ 224284 A US 4965289 A US 5066784 A ZA 8802866 A	15-11-1992 27-10-1988 02-01-1992 05-01-1989 13-04-1993 03-12-1992 08-04-1993 25-10-1988 26-10-1988 01-06-1993 30-06-1993 09-03-1989 19-02-1996 15-05-1995 25-10-1988 27-11-1990 23-10-1990 19-11-1991 27-12-1989
WO 9401446	A	20-01-1994	WO 9401446 A2	20-01-1994
US 4753985	A	28-06-1988	CA 1206457 A1	24-06-1986

Form PCT/ISA/210 (parent/family annex) (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,ZM,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,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,OM,PH,P,L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100112634

弁理士 松山 美奈子

(72)発明者 ダグラス,マーク・エドワード

イギリス国マンチェスター エム9・8ズィーエス,ブラックリー,ヘクサゴン・ハウス,ピー・オー・ボックス 42

(72)発明者 メロー,ベン・ジェイムス

イギリス国スティーリングシャー エフケイ3・8エックスジー,グランジェマウス,アールス・ロード

(72)発明者 ウエリングス,ドナルド・アルフレッド

イギリス国チェシャー ダブリューエイ7・4キュージー,ランコーン,ザ・ヒース,ピー・オー・ボックス 13

F ターム(参考) 4C057 AA11 AA30 BB05 MM04 MM05 MM08