

一种应用于固相合成的多孔树脂及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种多孔树脂及其制备方法，该载体应用于寡核苷酸的固相合成，属于功能高分子材料制备领域。

背景技术

在过去的几十年里，人工合成的寡核苷酸已经广泛应用于靶向基因治疗。寡核苷酸是一类有 20 个左右碱基的短链核苷酸的总称，包括脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）。目前，寡核苷酸常使用化学方法合成，最通用的是固相亚磷酰胺三酯法合成，具体方法是固相合成载体装填在反应柱中，将溶解有反应物的溶液在一定的压力下快速流过反应柱完成反应。为提高反应效率，减少杂质的产生，溶液中的反应物要快速扩散到固相合成载体内与活性位点反应，反应生成的产物能够快速扩散到溶液中被带走。这就要求固相合成载体满足如下要求：1.载体必须包含单一活性位点（或反应基团），使核酸分子链能够连接在这些位点上，并在合成完成后能够裂解下来；2.载体在合成过程中应保持物理和化学稳定性；3.载体应有足够大的孔径和理想的孔径分布，有利于不断增长的核酸分子链和试剂能够快速、不受阻碍地接触；4.活性位点在载体上应均匀分布，以减少核酸分子链之间的相互干扰；5.载体骨架应表现出一定的疏水性，因为用于寡核苷酸合成的亚磷酰胺单体对水分敏感，水分的存在会导致反应效率下降；6.载体在不同溶剂中溶胀度接近，减小不同溶剂合成或洗涤过程由于溶胀差异造成的死体积，有利于反应试剂的均匀扩散和反应产物的快速洗涤去除。

在寡核苷酸固相合成技术发展初期，常用的固相合成载体有孔径可控玻璃微球（CPG）、改性硅胶等无机颗粒，但其缺点也很明显，即取代度（Loading）低（一般小于 100 $\mu\text{mol/g}$ ），导致寡核苷酸单批次产量受限，设备利用率低，生产成本低。为提高载体的取代度，Nitto Denko 公司和 Ionis 公司联合申请的发明专利 WO2006029023 以苯乙烯、对乙酰氧基苯乙烯、二乙烯基苯作为聚合单体，使用异辛烷、2-乙基己醇作为致孔剂制备出有机高分子聚合物作为寡核苷酸固相合成载体。该载体的取代度可以达到 100 -350 $\mu\text{mol/g}$ ，其缺点是载体较强的非极性导致使用鎓盐类缩合体系连接 linker 时反应效率较低，同时较强的非极性导致在合成或洗涤过程中使用甲苯和乙腈时树脂体积会发生较大变化，造成反应器中较大的死体积。随后，Nitto Denko 公司在美国发明专利 US8592542 中，以苯乙烯、对乙酰氧基苯乙烯、二乙烯基苯、（甲基）丙烯酸胺衍生物作为聚合单体。在美国发明专利 US8653152 中，以苯乙烯、对乙酰氧基苯乙烯、二乙烯基苯、（甲基）丙烯腈作为聚合单体。通过在聚合过程中加入极性单体，

制备出取代度更高（500 μ mmol/g 以上）的寡核苷酸固相合成载体。同时，极性单体的加入，有利于调节载体在不同溶剂（甲苯、乙腈）中的溶胀波动。但随之而来的问题是（甲基）丙烯酰胺类单体、（甲基）丙烯腈较为亲水，使用无水溶剂（无水乙腈）洗涤时难以把氧化步骤中加入的水分去除，影响下一步寡核苷酸的合成效率。同时溶剂法致孔得到的载体孔径分布不均匀，传质效果差，也会影响水分的去除和下一步寡核苷酸的合成效率。南开大学申请的中国发明专利 CN201210562165.9 以交联聚丙烯腈或交联聚甲基丙烯腈作为载体基本骨架。活性位点的引入通过加入乙酸乙烯酯、丙烯酸酯类或甲基丙烯酸酯类单体，通过碱解或与含有两个伯胺基的化合物反应引入羟基或氨基。此专利使用大量极性单体，使树脂在不同溶剂中的溶胀差异问题得以解决，但由于大量亲水性单体的使用，造成载体极为亲水，使用无水溶剂（乙腈）洗涤更加难以把载体中的水分去除，极大的影响下一步寡核苷酸的合成效率。

由于近年来寡核苷酸药物的研究取得巨大进展，越来越多的寡核苷酸药物开始进入临床阶段。对寡核苷酸合成载体的需求量越来越多，同时上述寡核苷酸载体存在的传质、溶胀、极性等问题导致寡核苷酸合成效率低，生产成本低。因此开发出一种多孔树脂使寡核苷酸药物可以大规模、低成本、高效率地合成，满足核苷酸药物市场需求是极有必要的。

发明内容

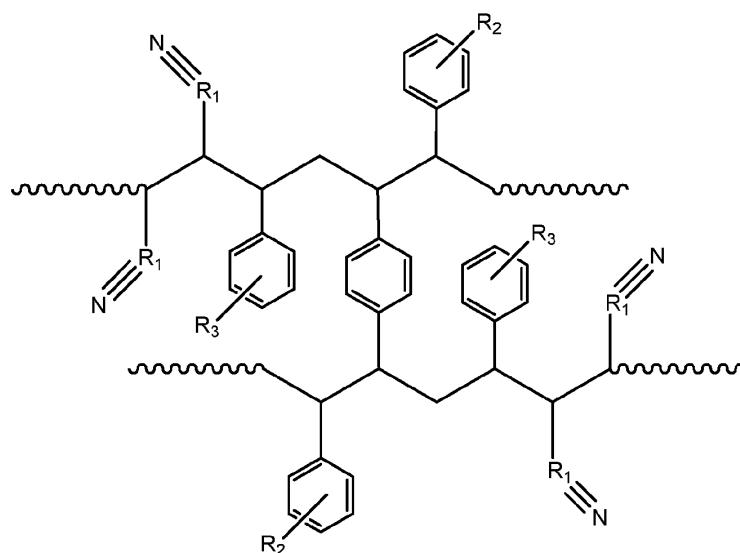
为实现寡核苷酸大规模、低成本的生产，克服现有载体传质效率低、洗涤过程不彻底、在不同溶剂中溶胀变化大等缺点，本发明提供了一种应用于固相合成的多孔树脂及其制备方法。

为了提高传质效率，本发明希望实现孔径大小合适并且均一的孔径分布。本发明使用高内相乳液作为模板致孔，与传统的致孔方法如反相法、相分离法、溶剂致孔法相比，该方法可以通过乳液液滴的大小准确控制孔径和分布。内相乳液液滴的大小又可以通过油溶性表面活性剂的分子量、HLB 值、用量等因素确定。本发明改变了致孔方式使得载体具有合适的孔径且孔径分布较窄，有利于寡核苷酸合成过程中反应试剂的扩散，提高反应效率，减少杂质的生成。

在聚合过程中加入改性单体有四个方面作用：第一，改性单体聚合速度较慢，不能进行均聚，只能与其他单体进行共聚，有利于活性位点的均匀分布。第二，加入少量改性单体即可对树脂的溶胀性能进行较大范围的调节，降低载体在不同溶剂中的溶胀体积变化，减小在寡核苷酸合成过程中反应器内部的死体积。第三，改性单体分子结构可以使鎇盐类缩合剂更为高效，保证连接 linker 的效率。第四，改性单体和（甲基）丙烯酰胺类单体、（甲基）丙烯腈相比较为疏水，可以降低水在载体内的传质阻力，减少水对寡核苷酸合成过程的影响，提高

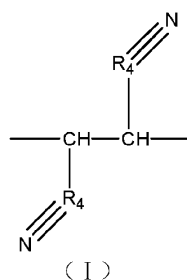
反应效率和收率。

本发明公开了一种应用于固相合成的多孔树脂，所述多孔树脂的其聚合物骨架和功能基的结构可用下式表示：

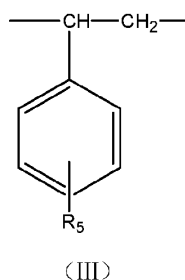
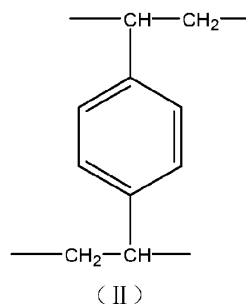


其中， $R_1 = -C$ 或 $-C-CH_2-$ ； $R_2 = -OH$ 或 $-CH_2OH$ 或 $-NH_2$ 或 $-CH_2NH_2$ 或 $-CH_2OOC-C_6H_4-OH$ 或 $-CH_2OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 或 $-(CH_2)_4OOC-C_6H_4-OH$ 或 $-(CH_2)_4OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 或 $-COONH-C_6H_4-NH_2$ 或 $-CH_2COONH-C_6H_4-NH_2$ 或 $-COO-C_6H_4-OH$ 或 $-CH_2COO-C_6H_4-OH$ ； $R_3 = -H$ ；或 $CH_3(CH_2)_n-$ ， n 为 0-4 的整数；或 $(CH_3)_2CH(CH_2)_n-$ ， n 为 0-2 的整数；或 $(CH_3)_3C-$ ；或 $CH_3CH_2CH(CH_3)-$ ；或 $CH_3CH_2C(CH_3)_2-$ ；或 $CH_3CH_2CH_2CH(CH_3)-$ ；或 $CH_3(CH_2)_n-O-$ ， n 为 0-4 的整数。

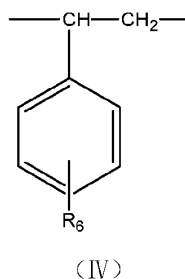
在一些实施例中，所述应用于固相合成的多孔树脂为共聚物，所述共聚物的骨架具有式（I）、式（II）、式（III）、式（IV）所示的重复结构单元：



其中， $R_4 = -C$ 或 $-C-CH_2-$ ；



其中， R_5 为 $-OH$ 或 $-CH_2OH$ 或 $-NH_2$ 或 $-CH_2NH_2$ 或 $-CH_2OOC-C_6H_4-OH$ 或 $-CH_2OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 或 $-(CH_2)_4OOC-C_6H_4-OH$ 或 $-(CH_2)_4OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 或 $-COONH-C_6H_4-NH_2$ 或 $-CH_2COONH-C_6H_4-NH_2$ 或 $-COO-C_6H_4-OH$ 或 $-CH_2COO-C_6H_4-OH$;



其中， R_6 为 $-H$ ；或 $CH_3(CH_2)_n-$ ， n 为 0-4 的整数；或 $(CH_3)_2CH(CH_2)_n-$ ， n 为 0-2 的整数；或 $(CH_3)_3C-$ ；或 $CH_3CH_2CH(CH_3)-$ ；或 $CH_3CH_2C(CH_3)_2-$ ；或 $CH_3CH_2CH_2CH(CH_3)-$ ；或 $CH_3(CH_2)_n-O-$ ， n 为 0-4 的整数。

在一些实施例中，所述应用于固相合成的多孔树脂的羟基或氨基的含量范围为 100-1000 μ mmol/g，优选为 400-700 μ mmol/g。

在一些实施例中，所述应用于固相合成的多孔树脂的粒径范围为 35-200 μ m，优选为 50-100 μ m。

在一些实施例中，所述应用于固相合成的多孔树脂的平均孔径为 10-200nm，优选为 40-100nm。

本发明还公开了上述应用于固相合成的多孔树脂的制备方法，制备过程包含以下步骤：分别配制水相和油相，水相组成为水、分散剂、无机盐；油相组成为单乙烯基化合物、交联单体、功能单体、改性单体、油溶性表面活性剂、稀释剂和引发剂，其中，单乙烯基化合物、交联单体、功能单体和改性单体可以参与聚合反应，统称为单体，油溶性表面活性剂和稀释剂不参与聚合反应，主要起致孔作用，统称为致孔剂；将油相加入水相中，开动搅拌并升温进行反应，反应结束后除去致孔剂，得到多孔聚合物树脂；多孔聚合物树脂可以进一步反应，得到含有功能基为羟基或氨基的固相合成载体。

在一些实施例中，所述单乙烯基化合物为芳香族单乙烯基化合物，包括苯乙烯及其苯环取代衍生物，取代基为含有 1 至 5 个碳原子的烷基，如甲基苯乙烯、乙基苯乙烯、正丙基苯乙烯、异丙基苯乙烯、正丁基苯乙烯、异丁基苯乙烯、仲丁基苯乙烯、叔丁基苯乙烯、正戊基苯乙烯、异戊基苯乙烯、仲戊基苯乙烯或叔戊基苯乙烯；或取代基为含有 1 至 5 个碳原子的烷氧基苯乙烯，如甲氧基苯乙烯、乙氧基苯乙烯、丙氧基苯乙烯、丁氧基苯乙烯或戊氧基苯乙烯。优选的单乙烯基化合物为苯乙烯。

在一些实施例中，所述交联单体为具有两个及以上非共轭乙烯基的多官能团单体，在本发明中优选为二乙烯基苯。所述二乙烯基苯为邻二乙烯基苯、间二乙烯基苯、对二乙烯基苯或三者的混合物。

在一些实施例中，所述功能单体是指既含有可以进行自由基聚合的双键，又具有羟基、氨基、卤代基团或其他通过反应可转化为羟基、氨基的基团。在寡核苷酸合成过程中，可反应性羟基或氨基作为连接寡核苷酸的活性位点，可以是氨基、氨烷基、羟基、羟烷基等。作为优选，可以是伯氨基、氨甲基、羟基、羟甲基等。包括但不限于羟基苯乙烯及其衍生物，如 4-羟基苯乙烯等，羟烷基苯乙烯及其衍生物，如 4-羟甲基苯乙烯等；酰氧基苯乙烯及其衍生物，如 4-乙酰氧基苯乙烯、苯甲酰氧基苯乙烯等；氨基苯乙烯及其衍生物，如 4-氨基苯乙烯等，氨烷基苯乙烯及其衍生物，如 4-氨甲基苯乙烯等；卤烷基苯乙烯单体，如 4-(4-溴丁基)苯乙烯、4-氯甲基苯乙烯等；4-乙烯基苯基酯单体，如 4-乙烯基苯甲酸甲酯，4-乙烯基苯乙酸乙酯等。

在一些实施例中，所述功能单体，部分单体中含有羟基保护基团或氨基保护基团，可以直接切除保护基团形成氨基或羟基，例如酰氧基苯乙烯可以通过碱或酸水解转化为羟基，作为连接寡核苷酸的活性位点；部分单体需要通过官能化反应转化为可以作为活性位点的氨基或羟基，例如：卤烷基苯乙烯可以通过水解转化为羟基或通过 Gabriel 反应转化为伯氨基，作为连接寡核苷酸的活性位点；部分单体需要链接带有氨基或羟基的连接臂作为活性位点，例

如：卤烷基苯乙烯可以与 4-羟基苯甲酸，4-羟基苯乙酸反应生成羟基，作为连接寡核苷酸的活性位点；还有部分单体需要上述的几种复合反应得到作为活性位点的氨基或羟基，例如：4-乙烯基苯基酯类单体需要先水解暴露羧基再与对苯二酚或对苯二胺反应得到作为活性位点的氨基或羟基。

在一些实施例中，所述改性单体是指单体中含有可以参与自由基聚合的双键，又具有两个氰基。其不能进行均聚，只能与其他单体进行共聚，包括但不限于反丁烯二腈、1,4-二氰基-2-丁烯等。在本发明中，优选为反丁烯二腈。

在一些实施例中，所述引发剂为有机过氧化物或偶氮化合物，包括但不限于过氧化苯甲酰、过氧化月桂酰、过氧化-2-乙基己酸叔丁酯、偶氮二异丁腈、偶氮二异戊腈、偶氮二异庚腈等。引发剂用量为单体总重量的 0.5-5%。

在一些实施例中，所述油溶性表面活性剂为不参与聚合反应，不溶于水或微溶于水的表面活性剂，包括但不限于失水山梨醇三油酸酯、聚氧乙烯山梨醇蜂蜡衍生物、失水山梨醇三硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇六硬脂酸酯、乙二醇脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、丙二醇单硬脂酸酯、失水山梨醇倍半油酸酯、聚氧乙烯山梨醇油酸酯、单硬脂酸甘油酯、羟基化羊毛脂、失水山梨醇单油酸酯、丙二醇单月桂酸酯、丙二醇脂肪酸酯中的一种或几种的组合。所述稀释剂为不参与聚合反应，不溶于水或为微溶于水的有机溶剂，包括但不限于芳香烃如苯、甲苯、乙苯等；脂肪烃如含有 6 个到 12 个碳的直链、支链或环烷烃如己烷、庚烷、辛烷、十二烷、异辛烷、异十二烷、环己烷等；卤代烃如氯仿、氯苯等；含有 4 个碳以上的酯如乙酸乙酯、乙酸丁酯、邻苯二甲酸二丁酯等；醇如含有 4 个到 12 个碳的直链、支链或环烷烃醇如己醇、环己醇、辛醇、异辛醇、癸醇、十二醇等。油溶性表面活性剂和稀释剂均不参与聚合反应，主要起致孔作用，统称为致孔剂。

在一些实施例中，所述水相包括水、分散剂和无机盐，所述分散剂是指水溶性高分子，包括但不限于聚乙烯醇、羟乙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、聚丙烯酸钠、聚乙烯吡咯烷酮中的一种或多种。分散剂用量为水相重量的 0.1-5%。所述无机盐作用是调节水相密度，同时减少油相中各组分在水相中的溶解度，使油珠更稳定的分散在水相中。包括但不限于氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸钠、硫酸钾、硫酸钙等中的一种或多种。无机盐的用量不超过水相的用量的 20%。

在一些实施例中，为减少树脂之间的粘结，提高聚合热的传导，同时提高设备利用率，提高生产效率。将油相和水相的重量比设置为 1:3-1:20。

在本发明的一些实施方案中，不同组分以如下量存在：初始存在于油相中单乙烯基化合

物占单体总量的重量百分比为 40-95.9%；初始存在于油相中交联单体占单体总量的重量百分比为 2-20%；初始存在于油相中功能单体占单体总量的重量百分比为 2-20%；初始存在于油相中改性单体占单体总量的重量百分比 0.1-20%；初始存在油相中致孔剂重量为单体总重量的 15-70%；油溶性表面活性剂占致孔剂总重量的 0.1-15%，稀释剂占致孔剂总重量的 85-99.9%。

在本发明的一些更优选实施方案中，不同组分如下量存在：初始存在于油相中单乙烯基化合物占单体总量的重量百分比为 60-88%；初始存在于油相中交联单体占单体总量的重量百分比为 5-15%；初始存在于油相中功能单体占单体总量的重量百分比为 5-15%；初始存在于油相中改性单体占单体总量的重量百分比 2-10%；初始存在油相中致孔剂重量为单体总重量的 25-50%。

在本发明的一些实施方案中，聚合温度为 50-90℃，优选为 60-85℃。

在本发明的一些实施例，所述应用于固相合成的多孔树脂的制备方法包含如下步骤：

在反应器中加入一定量的纯化水，并加入重量百分比为水相重量的 0.1-5%的分散剂和重量百分比不超过水相重量的 20%的无机盐，溶解备用，即为水相；油相与水相的重量比为 1:3-1:20，称取单乙烯基化合物、交联单体、功能单体、改性单体、致孔剂和引发剂，其中，单乙烯基化合物占单体总重量的 40-95.9%，交联单体占单体总重量的 2-20%，功能单体占单体总重量的 2-20%，改性单体占单体总重量的 0.1-20%，致孔剂为单体总重量的 15-70%，致孔剂中油溶性表面活性剂占致孔剂重量的 0.1-15%，稀释剂占致孔剂重量的 85-99.9%，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌并升温至 50-90℃进行反应，反应结束后除去致孔剂，筛分并收集合适粒径的树脂，进行真空干燥，得到多孔聚合物树脂。将树脂进一步反应，即可得到官能团为氨基或羧基的多孔树脂。

在本发明的一些实施例，所述应用于固相合成的多孔树脂的制备方法包含如下步骤：

在反应器中加入一定量的纯化水，并加入重量百分比为水相重量的 0.1-5%的分散剂和重量百分比不超过水相重量的 20%的无机盐，溶解备用，即为水相；油相与水相的重量比为 1:3-1:20，称取单乙烯基化合物、交联单体、功能单体、改性单体、致孔剂和引发剂，其中，单乙烯基化合物占单体总重量的 60-88%，交联单体占单体总重量的 5-15%，功能单体占单体总重量的 5-13%，改性单体占单体总重量的 2-10%，致孔剂为单体重量的 25-50%，致孔剂中油溶性表面活性剂占致孔剂重量的 0.1-15%，稀释剂占致孔剂重量的 85-99.9%，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌并升温至 60-85℃进行反应，反应结束后除去致孔剂，筛分并收集合适粒径的树脂，进行真空干燥，得到多孔聚合物树脂。将树脂进一步反应，

即可得到官能团为氨基或羧基的多孔树脂。

通过上述方法能够得到本发明中的应用于固相合成的多孔树脂，即含有羟基或氨基的多孔树脂。在本发明中，氨基或羟基的含量，即取代度，可以通过与 Fmoc-Leu-OH 反应，然后脱除 Fmoc 保护基，通过比色法确定所脱除的 Fmoc 的量，进而计算出多孔树脂中氨基或羟基的含量。

在一些实施例中，具体操作如下：准确称取 1.0g 载体，悬浮于 7ml 乙腈溶液中，然后加入 Fmoc-Leu-OH 0.5g，HBTU 0.5g 和 DIEA 0.5ml，在室温下搅拌反应 2h。反应结束后，依次用乙腈（每次用量 10ml，洗涤三次）、甲醇（每次用量 10ml，洗涤三次）洗涤树脂，然后将树脂烘干。精确称取 0.1000g 树脂，悬浮于 20%哌啶/DMF（v/v）溶液中，室温振荡 30min，过滤，收集滤液，用 DMF 洗涤树脂并收集滤液。将滤液合并后定容，稀释适当的倍数后测定其在 300nm 处的吸光度。通过一系列已知浓度的 Fmoc-Leu-OH 做类似的 Fmoc 脱除反应并测定吸光度，做出标准曲线。通过标准曲线计算出多孔树脂中氨基或羟基的含量。

多孔树脂的取代度由功能单体在单体总量中的占比决定，通过调整功能单体的用量可以得到一系列不同取代度的多孔树脂。多孔树脂的取代度决定了合成寡核苷酸量的多少，取代度太低，会降低单批次寡核苷酸产量；取代度太高，则影响寡核苷酸纯度。在本发明中，多孔树脂的取代度范围为 100-1000 μ mmol/g，优选为 400-700 μ mmol/g。

本发明中多孔树脂的粒径通过颗粒图像处理仪进行检测。即将多孔树脂均匀分布在载玻片上，用显微镜将载体颗粒放大，同时摄像机拍摄经显微镜放大的多孔树脂颗粒图像，通过计算机对多孔树脂的外貌特征和粒度进行分析和计算。

多孔树脂粒径的大小主要取决于水相中分散剂的种类和用量、致孔剂的种类和用量，悬浮聚合过程中搅拌的转速。通过调整这些条件，可以对多孔树脂的粒径进行调整。多孔树脂粒径如果太大，一方面会导致载体的比表面积降低，单位面积上的活性位点的数量增加，影响寡核苷酸纯度；另一方面粒径如果太大，会导致在合成寡核苷酸的过程中传质速度减慢，杂质增加。多孔树脂粒径如果太小，会造成合成过程压力过高，大大增加设备成本。在本发明中，多孔树脂的粒径范围为 35-200 μ m，优选为 50-100 μ m。

多孔树脂的平均孔径通过压汞法测得。即精确称取 0.1500-0.3000g 的样品放入全自动压汞仪 AutoPore IV 9500（Micromeritics Instrument Co.）中，并设置汞的接触角为 130°，表面张力为 485dyn/cm，在此条件下通过压汞法测得。多孔树脂平均孔径的大小主要取决于致孔剂的种类和用量，交联剂的用量，反应温度和时间等。通过调整这些条件，可以对多孔树脂的平均孔径进行调整。多孔树脂的平均孔径如果太小，会造成传质困难，影响合成效率；多

孔树脂的平均孔径如果太大，会导致多孔树脂比表面积降低，单位面积上的活性位点增加，在寡核苷酸合成过程，核苷增长会发生相互影响，影响寡核苷酸纯度。在本发明中，多孔树脂的平均孔径为 10-200nm，优选为 40-100nm。

与现有技术相比，本发明主要有四点优势：第一，改性单体可以对聚合速度进行调节，有利于活性位点的均匀分布。第二，对树脂的溶胀性能进行调节，降低载体在不同溶剂中的溶胀体积变化。第三，单体分子结构中的两个氰基可以使鎓盐类缩合剂更为高效，保证连接 linker 的效率。第四，与专利 US8592542 使用（甲基）丙烯酸胺类单体、和专利 US8653152 中使用（甲基）丙烯腈作为“改性单体”相比，本发明采用的改性单体较为疏水，可以快速地在洗涤过程去除残留在多孔树脂内微量的水分，减少水对寡核苷酸合成过程的影响，提高反应效率和收率。同时，本发明使用油性表面活性剂，以油包水型的乳液液滴作为模板致孔，可以准确控制载体孔径的大小和分布，有利于反应试剂的扩散，提高反应效率，减少杂质的生成。

附图说明

- 图 1 为实施例 1 中载体的扫描电镜图片；
- 图 2 为实施例 2 中载体的扫描电镜图片；
- 图 3 为实施例 6 中载体的扫描电镜图片；
- 图 4 为实施例 9 中载体的扫描电镜图片；
- 图 5 为实施例 1 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
- 图 6 为实施例 2 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
- 图 7 为实施例 6 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
- 图 8 为实施例 9 中载体通过压汞法得到的孔径分布。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明技术方案进行进一步的阐述，但本发明不限于这些实施例。

实施例 1

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取苯乙烯 110g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）10g、对氯甲基苯乙烯 12g、反丁烯二腈 8g、失水山梨醇单油酸酯 5g、异辛醇 45g 和过氧化苯甲酰 2.5g，混合均匀，即为油相。将油相加入反应器中，开动搅拌，升温至 80℃进行聚合 4h。反应结束后热水洗涤，乙醇回流提取除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100μm 的树脂，进行真空干燥，

得到氯含量为 550 μ mol/g 聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂, 500ml N,N-二甲基甲酰胺, 开动搅拌。然后加入 30g 邻苯二甲酰亚胺钾盐, 升温至 95°C 反应 16 小时。反应结束后冷却至室温, 然后用 N,N-二甲基甲酰胺洗涤 2 次, 纯化水洗涤至中性, 再用无水乙醇洗涤 3 次并滤干树脂。向反应器中加入 200g 的无水乙醇和 50g 的水合肼, 升温至 75°C 反应 16 小时。反应结束后用体积比为 50:50 的乙醇/纯化水溶液洗涤 3 次, 纯化水洗涤至中性, 再用无水乙醇洗涤 3 次并滤干洗涤液。向反应器中加入 200g 的无水乙醇和 50g 的浓盐酸, 升温至 60°C 反应 6h。反应结束后冷却至室温, 水洗至中性, 然后真空干燥, 得到含有氨基的固相合成载体。所得氨基固相合成载体的氨基的含量为 543 μ mol/g, 使用压汞法测得平均孔径为 48nm。

实施例 2

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠, 溶解备用, 即为水相。称取甲基苯乙烯 70g、二乙烯基苯 (重量百分含量 80%) 28g、对氯甲基苯乙烯 14g、1,4-二氰基-2-丁烯 28g、失水山梨醇三油酸酯 6g、异辛醇 45g、甲苯 30g 和过氧化苯甲酰 1g, 混合均匀, 即为油相。将油相加入反应器中, 开动搅拌, 升温至 70°C 进行聚合 8h。反应结束后热水洗涤, 乙醇回流提取除去致孔剂, 筛分并收集粒径为 50-100 μ m 的树脂, 进行真空干燥, 得到氯含量为 660 μ mol/g 聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂, 500ml N,N-二甲基甲酰胺, 开动搅拌。然后加入 35g 邻苯二甲酰亚胺钾盐, 升温至 95°C 反应 16 小时。反应结束后冷却至室温, 然后用 N,N-二甲基甲酰胺洗涤 2 次, 纯化水洗涤至中性, 再用无水乙醇洗涤 3 次并滤干树脂。向反应器中加入 200g 的无水乙醇和 50g 的水合肼, 升温至 75°C 反应 16 小时。反应结束后用体积比为 50:50 的乙醇/纯化水溶液洗涤 3 次, 纯化水洗涤至中性, 再用无水乙醇洗涤 3 次并滤干洗涤液。向反应器中加入 200g 的无水乙醇和 50g 的浓盐酸, 升温至 60°C 反应 6h。反应结束后冷却至室温, 水洗至中性, 然后真空干燥, 得到含有氨基的固相合成载体。所得氨基固相合成载体的氨基的含量为 650 μ mol/g, 使用压汞法测得平均孔径为 132nm。

实施例 3

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠, 溶解备用, 即为水相。称取乙基苯乙烯 127g、二乙烯基苯 (重量百分含量 80%) 4g、

4-(4-溴丁基)苯乙烯 8.8g、反丁烯二腈 0.2g、聚氧乙烯山梨醇蜂蜡衍生物 1g、异辛醇 12g、邻苯二甲酸二丁酯 12g 和过氧化苯甲酰 2.5g，混合均匀，即为油相。将油相加入反应器中，开动搅拌，升温至 65℃进行聚合 10h。反应结束后热水洗涤，乙醇回流提取除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100 μ m 的树脂，进行真空干燥，得到溴含量为 265 μ mmol/g 的聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂，600ml N,N-二甲基甲酰胺，开动搅拌。然后加入 4-羟基苯甲酸 5.4g，无水碳酸钾 5.4g，碘化钾 0.3g。升温至 75℃，反应 6h。反应结束后冷却至室温，水洗至中性，然后真空干燥，得到含有羟基的固相合成载体。所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 250 μ mmol/g，使用压汞法测得平均孔径为 23nm。

实施例 4

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取苯乙烯 110g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）11g、对氯甲基苯乙烯 9g、反丁烯二腈 10g、失水山梨醇三硬脂酸酯 0.5g、甲苯 20g、邻苯二甲酸二丁酯 40g 和过氧化苯甲酰 1g，混合均匀，即为油相。将油相加入反应器中，开动搅拌，升温至 60℃进行聚合 7h。反应结束后热水洗涤，乙醇回流提除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100 μ m 的树脂，进行真空干燥，得到氯含量为 425 μ mol/g 的聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂，300ml 无水乙醇，开动搅拌。在烧杯中称取 30g 氢氧化钠，用 300ml 去离子水溶解后缓慢加入反应器中。升温至 65℃，反应 6h。反应结束后冷却至室温，水洗至中性，然后真空干燥，得到含有羟基的固相合成载体。所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 420 μ mmol/g，使用压汞法测得平均孔径为 43nm。

实施例 5

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取苯乙烯 83g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）25g、N-(4-乙烯基苯基)-乙酰胺 18g、反丁烯二腈 14g、失水山梨醇三硬脂酸酯 3g、异辛醇 16g、异十二烷 8g 和过氧化苯甲酰 2g，混合均匀，即为油相。将油相加入反应器中，开动搅拌，升温至 55℃进行聚合 10h。反应结束后热水洗涤，乙醇回流提取除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100 μ m 的树脂，进行真空干燥，得到聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂, 300ml 无水乙醇, 开动搅拌。在烧杯中称取 30g 氢氧化钠, 用 300ml 去离子水溶解后缓慢加入反应器中。升温至 65°C, 反应 6h。反应结束后冷却至室温, 水洗至中性, 然后真空干燥, 得到含有氨基的固相合成载体。所得氨基固相合成载体的氨基的含量为 840 μ mmol/g, 使用压汞法测得平均孔径为 43nm。

实施例 6

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠, 溶解备用, 即为水相; 称取苯乙烯 111g、二乙烯基苯 (重量百分含量 80%) 11g、4-乙酰氧基苯乙烯 13g、反丁烯二腈 5g、失水山梨醇单油酸酯 8g、异辛醇 40g、异十二烷 20g 和过氧化苯甲酰 2.5g, 混合均匀, 即为油相; 将油相加入反应器中, 开动搅拌升温至 78°C 进行聚合 6h; 反应结束后用热水洗涤树脂, 乙醇回流提取除去致孔剂, 筛分并收集粒径为 50-100 μ m 的树脂, 进行真空干燥, 得到聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂, 加入 300ml 乙腈, 开动搅拌; 缓慢加入 7.5ml 水合肼, 室温下反应 3h; 反应结束后水洗至中性, 然后真空干燥, 得到含有羟基的固相合成载体。所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 550 μ mmol/g, 使用压汞法测得平均孔径为 64nm。

实施例 7

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠, 溶解备用, 即为水相; 称取苯乙烯 130g、二乙烯基苯 (重量百分含量 80%) 5g、4-乙酰氧基苯乙烯 4g、反丁烯二腈 1g、丙二醇脂肪酸酯 1g、异辛醇 40g、甲苯 10g 和过氧化苯甲酰 3.5g, 混合均匀, 即为油相; 将油相加入反应器中, 开动搅拌升温至 70°C 进行聚合 6h; 反应结束后用热水洗涤树脂, 乙醇回流提取除去致孔剂, 筛分并收集粒径为 50-100 μ m 的树脂, 进行真空干燥, 得到聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂, 加入 300ml 乙腈, 开动搅拌; 缓慢加入 7.5ml 水合肼, 室温下反应 3h; 反应结束后水洗至中性, 然后真空干燥, 得到含有羟基的固相合成载体。所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 175 μ mmol/g, 使用压汞法测得平均孔径为 53nm。

实施例 8

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 72g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）28g、苯甲酰氧基苯乙烯 27g、反丁烯二腈 13g、羟基化羊毛脂 5g、甲苯 10g、邻苯二甲酸二丁酯 20g 和过氧化苯甲酰 3g，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌升温至 80℃进行聚合 6h；反应结束后用热水洗涤树脂，乙醇回流提取除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100μm 的树脂，进行真空干燥，得到聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂，加入 300ml 乙腈，开动搅拌；缓慢加入 7.5ml 水合肼，室温下反应 3h；反应结束后水洗至中性，然后真空干燥，得到含有羟基的固相合成载体。所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 852μmmol/g，使用压汞法测得平均孔径为 47nm。

实施例 9

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 85g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）24g、4-乙炔基苯甲酸甲酯 18g、反丁烯二腈 13g、聚氧乙烯山梨醇油酸酯 4g、异十二烷 40g、邻苯二甲酸二丁酯 40g 和过氧化苯甲酰 2.5g，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌升温至 70℃进行聚合 6h；反应结束后用热水洗涤树脂，乙醇回流提取，筛分并收集粒径为 50-100μm 的树脂，进行真空干燥，得到聚合物多孔树脂。

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂，加入 300ml 乙腈，开动搅拌；然后加入对苯二酚 8.8g、HBTU 23g 和 DIEA 13ml，室温下反应 2h；反应结束后水洗至中性，然后真空干燥，得到含有羟基的固相合成载体。所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 735μmmol/g，使用压汞法测得平均孔径为 143nm。

实施例 10

测试实施例 1-9 中制备的固相合成载体分别在乙腈和甲苯中的溶胀度。测试方法如下，称取 1.5g 左右样品，放入具塞量筒中，分别加入甲苯或乙腈至相应刻度；然后用玻璃棒搅拌树脂和溶剂，使其充分溶胀，塞紧塞子；2-3 小时后，再用玻璃棒慢慢搅动树脂除去气泡，并使树脂分散均匀不结块；取出搅拌棒，将量筒在有橡胶垫的台面上墩敲使树脂堆积紧密，放置 24h 后读其体积，并计算其溶胀度。

结果如表 1 所示：

表 1. 树脂溶胀度测试									
	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	实施 例 8	实施 例 9
乙腈中的 溶胀度 (ml/g)	3.7	3.9	3.4	3.7	3.6	3.8	3.8	3.7	3.9
甲苯中的 溶胀度 (ml/g)	5.5	6.2	4.9	5.1	5.0	5.4	5.4	5.4	5.9

实施例 11

选取实施例中制备的固相合成载体以及 NittoPhase HL 固相合成载体，对树脂的性能进行评估。为了更直观的体现本发明的优势，载体填充量（g）=合成柱体积（ml）/载体在甲苯中的溶胀度（ml/g），在寡核苷酸的合成过程中洗涤体积限制为 1 个合成柱体积。

在反应器中依次称取固相合成载体 10g，50ml 乙腈溶胀 10min 后，加入适量的 DMT-dT-3'-丁二酸、HBTU、DIEA，在室温下反应 12h。反应结束后用乙腈洗涤 5 次，然后加入 Cap A（由 20ml 乙腈、7.5ml 吡啶、5.0ml N-甲基咪唑组成）和 Cap B（由 10ml 乙腈、4ml 乙酸酐），在室温下反应 30min。反应结束后用乙腈洗涤 5 次，真空干燥，得到负载有 DMT-dT 的载体。使用对甲苯磺酸/乙腈溶液将负载的 DMT 基团脱去，分光光度法在 412nm 波长下测定载体负载的 DMT 基团载量，结果如表 2 所示。

称取负载有 DMT-dT 的载体填充于合成柱中(32ml)，并将合成柱安装在 AKTA OligoPilot 100 上，合成具有 20 个碱基长度的寡核苷酸，序列为 d[ACGTACGTACGTACGTACGT]。合成过程如下：1.使用二氯甲烷溶胀树脂；2.使用 10%DCA/DCM 脱除 DMT 基团；3.使用无水乙腈洗涤；4.加入亚磷酰胺单体和活化试剂进行缩合；5.使用无水乙腈洗涤；6.加入氧化剂进行氧化；7. 使用无水乙腈洗涤；8.加入封端试剂进行封端；9.使用无水乙腈洗涤；10.重复步骤 2 开始进入下一个循环。

合成完成后，将载体取出进行干燥。然后放入玻璃瓶中，加入适量的浓氨水，在 55℃反应 16h 将寡核苷酸从载体上裂解下来，同时脱去碱基上的保护基团。通过过滤将载体和寡核苷酸分离，将滤液干燥，得到寡核苷酸粗粉，通过 HPLC 检测其纯度并计算寡核苷酸的收率。结果如表 2 所示。

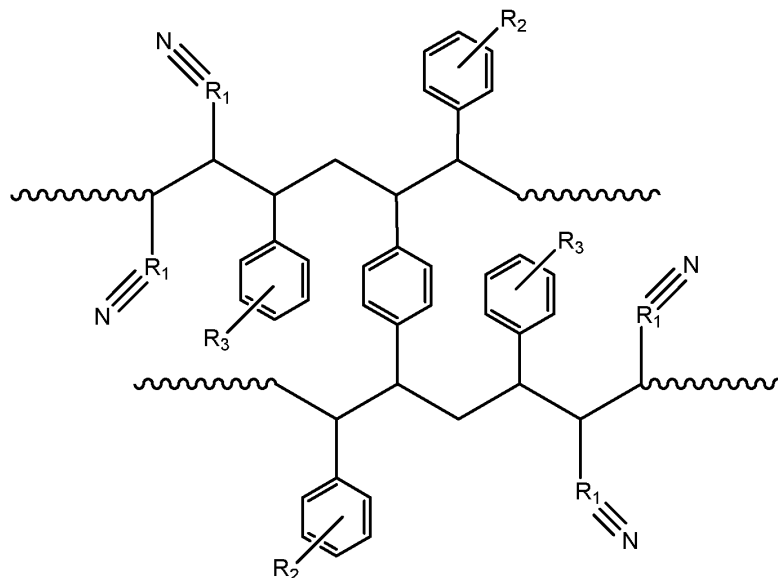
表 2. 树脂性能测试

	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	实施 例 8	实施 例 9	NittoPhase HL
DMT-dT-3'- 丁二酸加入 量 (g)	2.8	2.2	1.4	2.8	3.5	2.8	0.8	3.5	2.8	—
HBTU 加入 量 (g)	1.4	1.1	0.7	1.4	1.8	1.4	0.4	1.8	1.4	
DIEA 加入量 (ml)	1.3	1.0	0.7	1.3	1.6	1.3	0.4	1.6	1.3	
DMT 基团含 量($\mu\text{mmol/g}$)	318	241	133	298	408	315	72	392	328	321*
甲苯中的溶 胀度 (ml/g)	5.5	6.2	4.9	5.1	5.0	5.4	5.4	5.4	5.9	5.8
载体装填量 (g)	5.8	5.1	6.5	6.3	6.4	5.9	5.9	5.9	5.4	5.5
HPLC 纯度 (%)	85.4	86.2	81.9	82.3	81.4	86.3	84.2	83.0	83.5	79.5
收率 (%)	65.1	64.9	60.9	62.7	63.2	66.3	64.1	63.5	64.3	60.3
备注: *NittoPhase HL 负载 UnyLinker。										

由表 2 可知,使用本发明中的寡核苷酸固相合成载体,可以提高寡核苷酸的收率和纯度,有利于降低寡核苷酸的生产成本。

以上所述的仅仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前体下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

1. 一种应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂的聚合物骨架和功能基的结构可用下式表示：



其中， $R_1 = -C-$ 或 $-C-CH_2-$ ； $R_2 = -OH$ 或 $-CH_2OH$ 或 $-NH_2$ 或 $-CH_2NH_2$ 或 $-CH_2OOC-C_6H_4-OH$ 或 $-CH_2OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 或 $-(CH_2)_4OOC-C_6H_4-OH$ 或 $-(CH_2)_4OOCCH_2-C_6H_4-OH$ 或 $-COONH-C_6H_4-NH_2$ 或 $-CH_2COONH-C_6H_4-NH_2$ 或 $-COO-C_6H_4-OH$ 或 $-CH_2COO-C_6H_4-OH$ ； $R_3 = -H$ ；或 $CH_3(CH_2)_n-$ ， n 为 0-4 的整数；或 $(CH_3)_2CH(CH_2)_n-$ ， n 为 0-2 的整数；或 $(CH_3)_3C-$ ；或 $CH_3CH_2CH(CH_3)-$ ；或 $CH_3CH_2C(CH_3)_2-$ ；或 $CH_3CH_2CH_2CH(CH_3)-$ ；或 $CH_3(CH_2)_n-O-$ ， n 为 0-4 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂中羟基或氨基的含量为 100-1000 μ mol/g。

3. 根据权利要求 2 所述的应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂中羟基或氨基的含量为 400-700 μ mol/g。

4. 根据权利要求 1 所述的应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂粒径范围为 35-200 μ m。

5. 根据权利要求 4 所述的应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂粒径范围为 50-100 μ m。

6. 根据权利要求 1 所述的应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂的平均孔径为 10-200nm。

7. 根据权利要求 6 所述的应用于固相合成的多孔树脂，其特征在于，所述多孔树脂的平均孔径为 40-100nm。

8. 根据权利要求 1 所述的应用于固相合成的多孔树脂的制备方法, 其特征在于: 制备过程包括以下步骤:

A. 分别配制水相和油相, 水相组成: 水、分散剂、无机盐; 油相组成: 单乙烯基化合物、交联单体、功能单体、改性单体、油溶性表面活性剂、稀释剂和引发剂, 其中, 单乙烯基化合物、交联单体、功能单体和改性单体可以参与聚合反应, 统称为单体, 油溶性表面活性剂和稀释剂不参与聚合反应, 主要起致孔作用, 统称为致孔剂;

B. 将油相加入水相中, 开动搅拌并升温进行反应, 反应结束后除去致孔剂, 得到多孔聚合物树脂。

9. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 多孔聚合物树脂可以进一步反应, 得到含有功能基为羟基或氨基的多孔树脂。

10. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述单乙烯基化合物为芳香族单乙烯基化合物。

11. 根据权利要求 10 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述单乙烯基化合物包括苯乙烯及其苯环取代衍生物, 取代基为含有 1 至 5 个碳原子的烷基或烷氧基。

12. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述交联单体为具有两个及以上非共轭乙烯基的多官能团单体。

13. 根据权利要求 12 所得的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述交联单体为二乙烯基苯。

14. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述功能单体是指单体中既含有可以进行自由基聚合的双键, 又具有羟基、氨基、卤代基团或其他可通过反应可转化为羟基、氨基的基团。

15. 根据权利要求 14 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述功能单体包括羟基苯乙烯及其衍生物, 如 4-羟基苯乙烯; 羟烷基苯乙烯及其衍生物, 如 4-羟甲基苯乙烯; 酰氧基苯乙烯及其衍生物, 如 4-乙酰氧基苯乙烯、苯甲酰氧基苯乙烯; 氨基苯乙烯及其衍生物, 如 4-氨基苯乙烯; 氨烷基苯乙烯及其衍生物, 如 4-氨甲基苯乙烯; 卤烷基苯乙烯单体, 如 4-(4-溴丁基) 苯乙烯、对氯甲基苯乙烯; 4-乙烯基苯基酯单体, 如 4-乙烯基苯甲酸甲酯, 4-乙烯基苯乙酸乙酯。

16. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法, 其特征在于, 所述改性单体是指单体中含有可以参与自由基聚合的双键, 又具有两个氰基。

17. 根据权利要求 16 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述改性单体包括反丁烯二腈、1,4-二氰基-2-丁烯。

18. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述引发剂为有机过氧化物或偶氮化合物。

19. 根据权利要求 18 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述引发剂包括过氧化苯甲酰、过氧化月桂酰、过氧化-2-乙基己酸叔丁酯、偶氮二异丁腈、偶氮二异戊腈、偶氮二异庚腈。

20. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述油性表面活性剂为不参与聚合反应，不溶于水或微溶于水的表面活性剂。

21. 根据权利要求 20 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述油性表面活性剂包括失水山梨醇三油酸酯、聚氧乙烯山梨醇蜂蜡衍生物、失水山梨醇三硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇六硬脂酸酯、乙二醇脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、丙二醇单硬脂酸酯、失水山梨醇倍半油酸酯、聚氧乙烯山梨醇油酸酯、单硬脂酸甘油酯、羟基化羊毛脂、失水山梨醇单油酸酯、丙二醇单月桂酸酯中的一种或几种的组合。

22. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述稀释剂为不参与聚合反应、不溶于水或微溶于水的有机溶剂。

23. 根据权利要求 22 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述稀释剂包括芳香烃如苯、甲苯、乙苯；脂肪烃如含有 6 个到 12 个碳的直链、支链或环烷烃如己烷、庚烷、辛烷、十二烷、异辛烷、异十二烷、环己烷等；卤代烃如氯仿、氯苯；含有 4 个碳以上的酯如乙酸乙酯、乙酸丁酯、邻苯二甲酸二丁酯等；醇如含有 4 个到 12 个碳的直链、支链或环烷烃醇如己醇、环己醇、辛醇、异辛醇、癸醇、十二醇。

24. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，

所述水相中分散剂的重量百分比为 0.1-5%，无机盐的重量百分比不超过 20%；

所述油相和水相的重量比为 1:3-1:20；

所述油相中单乙烯基化合物占单体总量的重量百分比为 40-95.9%；

所述油相中交联单体占单体总量的重量百分比为 2-20%；

所述油相中功能单体占单体总量的重量百分比为 2-20%；

所述油相中改性单体占单体总量的重量百分比为 0.1-20%；

所述油相中致孔剂的重量为单体总重量的 15-70%；

所述致孔剂中油性表面活性剂占致孔剂总重量的 0.1-15%；

所述致孔剂中稀释剂占致孔剂总重量的 85-99.9%。

25. 根据权利要求 24 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，

所述油相中单乙烯基化合物占单体总量的重量百分比为 60-88%；

所述油相中交联单体占单体总量的重量百分比为 5-15%；

所述油相中功能单体占单体总量的重量百分比为 5-15%；

所述油相中改性单体占单体总量的重量百分比为 2-10%；

所述油相中致孔剂的重量为单体总重量的 25-50%。

26. 根据权利要求 8 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述的聚合温度为 50-90℃。

27. 根据权利要求 26 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述的聚合温度为 60-85℃。

28. 根据权利要求 8-27 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述的制备过程包含如下步骤：

在反应器中加入一定量的纯化水，并加入重量百分比为水相重量的 0.1-5%的分散剂和重量百分比不超过水相重量的 20%的无机盐，溶解备用，即为水相；油相与水相的重量比为 1:3-1:20，称取单乙烯基化合物、交联单体、功能单体、改性单体、致孔剂和引发剂，其中，单乙烯基化合物占单体总重量的 40-95.9%，交联单体占单体总重量的 2-20%，功能单体占单体总重量的 2-20%，改性单体占单体总重量的 0.1-20%，致孔剂为单体总重量的 15-70%，致孔剂中油性表面活性剂占致孔剂重量的 0.1-15%，稀释剂占致孔剂重量的 85-99.9%，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌并升温至 50-90℃进行反应，反应结束后除去致孔剂，筛分并收集合适粒径的树脂，进行真空干燥，得到多孔聚合物树脂，将树脂进一步反应，即可得到官能团为氨基或羧基的多孔树脂。

29. 根据权利要求 28 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述的制备过程包括如下步骤：

在反应器中加入一定量的纯化水，并加入重量百分比为水相重量的 0.1-5%的分散剂和重量百分比不超过水相重量的 20%的无机盐，溶解备用，即为水相；油相与水相的重量比为 1:3-1:20，称取单乙烯基化合物、交联单体、功能单体、改性单体、致孔剂和引发剂，其中，单乙烯基化合物占单体总重量的 60-88%，交联单体占单体总重量的 5-15%，功能单体占单体总重量的 5-15%，改性单体占单体总重量的 2-10%，致孔剂为单体重量的 25-50%，致孔剂中油性表面活性剂占致孔剂重量的 0.1-15%，稀释剂占致孔剂重量的 85-99.9%，混合均匀，

即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌并升温至 60-85℃进行反应，反应结束后除去致孔剂，筛分并收集合适粒径的树脂，进行真空干燥，得到多孔聚合物树脂，将树脂进一步反应，即可得到官能团为氨基或羧基的多孔树脂。

30. 根据权利要求 8-29 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述的多孔氨基树脂的制备工艺包括如下步骤：

在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 110g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）10g、对氯甲基苯乙烯 12g、反丁烯二腈 8g、失水山梨醇单油酸酯 5g、异辛醇 45g 和过氧化苯甲酰 2.5g，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌，升温至 80℃进行聚合 4h；反应结束后热水洗涤，乙醇回流提取除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100μm 的树脂，进行真空干燥，得到氯含量为 550μmol/g 的聚合物多孔树脂；

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂，500ml N,N-二甲基甲酰胺，开动搅拌；然后加入 30g 邻苯二甲酰亚胺钾盐，升温至 95℃反应 16 小时；反应结束后冷却至室温，然后用 N,N-二甲基甲酰胺洗涤 2 次，纯化水洗涤至中性，再用无水乙醇洗涤 3 次并滤干树脂；向反应器中加入 200g 的无水乙醇和 50g 的水合肼，升温至 75℃反应 16 小时；反应结束后用体积比为 50:50 的乙醇/纯化水溶液洗涤 3 次，纯化水洗涤至中性，再用无水乙醇洗涤 3 次并滤干洗涤液，向反应器中加入 200g 的无水乙醇和 50g 的浓盐酸，升温至 60℃反应 6h，反应结束后冷却至室温，水洗至中性，然后真空干燥，得到氨基含量为 543μmol/g 的固相合成载体，使用压汞法测得平均孔径为 48nm。

31. 根据权利要求 8-29 所述的应用于固相合成的多孔树脂制备方法，其特征在于，所述的多孔羟基树脂的制备工艺包括如下步骤：

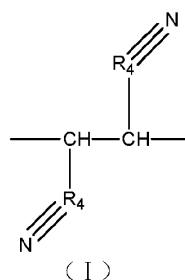
在装有冷凝器、搅拌器和温度计的 3L 反应器中加入 2L 纯化水、20g 聚乙烯醇、60g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 111g、二乙烯基苯（重量百分含量 80%）11g、4-乙酰氧基苯乙烯 13g、反丁烯二腈 5g、失水山梨醇单油酸酯 8g、异辛醇 40g、异十二烷 20g 和过氧化苯甲酰 2.5g，混合均匀，即为油相；将油相加入反应器中，开动搅拌升温至 78℃进行聚合 6h；反应结束后用热水洗涤树脂，乙醇回流提取除去致孔剂，筛分并收集粒径为 50-100μm 的树脂，进行真空干燥，得到聚合物多孔树脂；

在配备有冷凝器、搅拌器和温度计的 1L 反应器中加入 50g 聚合物多孔树脂，加入 300ml 乙腈，开动搅拌；缓慢加入 7.5ml 水合肼，室温下反应 3h；反应结束后水洗至中性，然后真空干燥，得到含有羟基的固相合成载体，所得羟基固相合成载体的羟基的含量为 550μmol/g，

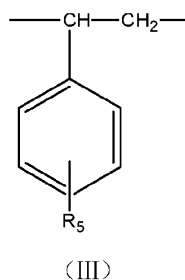
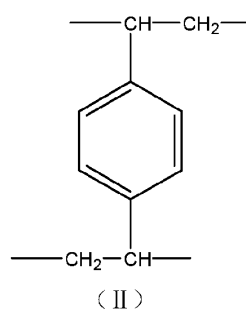
使用压汞法测得平均孔径为 64nm。

32. 根据权利要求 8-31 制备出的权利要求 1 应用于固相合成的多孔树脂, 可以应用于寡核苷酸的固相合成。

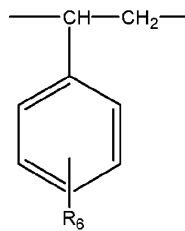
33. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的应用于固相合成的多孔树脂, 其特征在于, 所述多孔树脂为共聚物, 所述共聚物的骨架具有式 (I)、式 (II)、式 (III)、式 (IV) 所示的重复结构单元:



其中, $\text{R}_4 = \text{-C-}$ 或 $\text{-C-CH}_2\text{-}$;



其中, R_5 为 -OH 或 $\text{-CH}_2\text{OH}$ 或 -NH_2 或 $\text{-CH}_2\text{NH}_2$ 或 $\text{-CH}_2\text{OOC-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ 或 $\text{-CH}_2\text{OOCCH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ 或 $\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{OOC-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ 或 $\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{OOCCH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ 或 $\text{-COONH-C}_6\text{H}_4\text{-NH}_2$ 或 $\text{-CH}_2\text{COONH-C}_6\text{H}_4\text{-NH}_2$ 或 $\text{-COO-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ 或 $\text{-CH}_2\text{COO-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$;



(IV)

其中, R_6 为-H; 或 $CH_3(CH_2)_n-$, n 为 0-4 的整数; 或 $(CH_3)_2CH(CH_2)_n-$, n 为 0-2 的整数; 或 $(CH_3)_3C-$; 或 $CH_3CH_2CH(CH_3)-$; 或 $CH_3CH_2C(CH_3)_2-$; 或 $CH_3CH_2CH_2CH(CH_3)-$; 或 $CH_3(CH_2)_n-O-$, n 为 0-4 的整数。