

一种固相合成载体及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及一种固相合成载体及其制备方法和应用，该载体可以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

作为精准医疗的有效手段之一，越来越多的寡核苷酸药物获得批准上市。寡核苷酸药物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，具体方法是将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。

在寡核苷酸固相合成技术发展初期，常使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、4-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固相合成载体，该载体的取代度可以达到 100 -350 $\mu\text{mol/g}$ 。为进一步提高寡核苷酸的收率和纯度，Nitto Denko 公司申请的发明专利 US8653152 以苯乙烯、（甲基）丙烯酸、4-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固相合成载体。通过加入（甲基）丙烯酸抑制固相合成载体在不同溶剂中的溶胀波动来提高合成效率。

上述两种高分子聚合物载体均使用二乙烯基苯作为交联剂。在使用过程中，二乙烯基苯有两个主要问题，一是纯度不高，二是其具有三种不同性质的异构体。这就导致不同厂家、不同质量的二乙烯基苯所生产的树脂在性能上存在很大的差异。目前，一般工业二乙烯基苯纯度在 40-60%之间，除了二乙烯基苯之外，还含有一定数量的乙基苯乙烯，有的还含有少量的二乙苯。

在与其他单体进行共聚反应时，二乙烯基苯的三种异构体呈现出不同的反应活性，这对共聚物的结构和性能有着显著的影响。He Binglin 等（*Reactive Polymer*, 12(1990), 269-275）在对苯乙烯-二乙烯基苯共聚动力学的研究中发现，在共聚过程中，对二乙烯基苯和间二乙烯基苯的转化速率都比苯乙烯快。这就导致聚合反应初期形成的共聚物交联度高，在聚合后期形成的共聚物交联度低，进而导致树脂内部化学结构的不均匀。以苯乙烯-二乙烯基苯为骨架的大孔吸附树脂因为这种化学结构的不均匀，在使用过程中存在一系列问题，如会发生不同程度的破碎、达到吸附平衡的时间长、吸附后脱附易发生拖尾、再生不完全等。

1,2-二（4-乙基苯基）乙烷等两个乙烯基不在同一个苯环上的双烯交联剂与苯乙烯的反应活性相近，Sundell 等（*Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(1993), 2305-2311）以此类单体为交联剂制备出强酸性树脂，实验结果表明这些树脂比基于苯乙烯-二乙烯基苯共聚物的强酸树脂具有更高的机械强度。《1,2-双（对乙基苯基）乙烷聚合物的合成及其吸附性能研究》分别以 1,2-双（对乙基苯基）

乙烷和二乙烯基苯为交联剂制备出超高交联聚苯乙烯吸附树脂，实验结果表明以 1,2-双（对乙烯基苯基）乙烷为交联剂的吸附树脂在使用过程中没有拖尾现象、易再生。

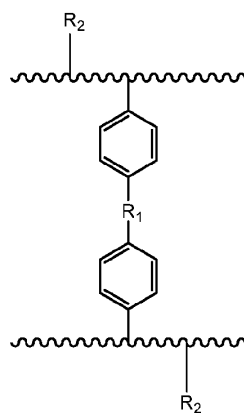
寡核苷酸药物因具有治疗效率高、药物毒性低、特异性强和应用领域广等优点，在抗病毒、高胆固醇、基因表达编辑、视觉失明和肝静脉阻塞等疾病治疗中崭露头角。寡核苷酸药物的需求量逐年增加。同时现有寡核苷酸固相合成载体存在内部结构不均匀，传质阻力大等问题导致寡核苷酸合成效率低，生产成本低。因此有必要开发一种固相合成载体使寡核苷酸药物可以大规模、低成本、高效率地合成，以满足寡核苷酸药物市场需求。

发明内容

为实现寡核苷酸大规模、低成本的生产，克服现有寡核苷酸固相合成载体存在的内部结构不均匀，传质阻力大等缺点，本发明提供了一种固相合成载体及其制备方法和应用。

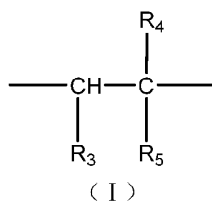
本发明选用两个乙烯基不在同一个苯环上的双烯化合物作为交联单体主要有以下三点作用：第一，该类单体和苯乙烯的竞聚率相近，有利于提高树脂内部化学结构的均匀性，形成均匀分布的活性位点。第二，树脂内部化学结构均匀性的提高，在树脂内部有利于形成均匀的孔道，降低传质阻力。第三，和二乙烯基苯相比，该类交联剂中存在柔性分子链，可以改善树脂在不同有机溶剂中的溶胀性能。

本发明公开了一种固相合成载体，所述载体聚合物骨架和官能团结构可用下式表示：

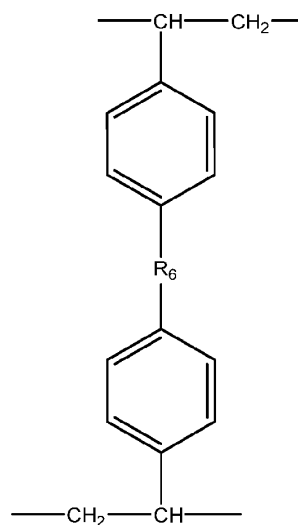


其中， $R_1 = -(\text{CH}_2)_n$ ， $n=0-3$ 的整数，或 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ ， m 为 1-4 的整数； $R_2 = -\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$ 。

在一些实施例中，所述固相合成载体为共聚物，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：

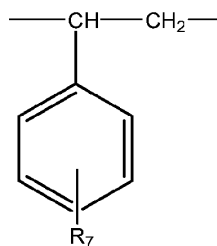


其中， R_3 为 $-\text{H}$ 、 $-\text{CN}$ 、或 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ ； R_4 为 $-\text{H}$ 或 $-\text{CH}_3$ ； R_5 为 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{OOCCH}_3$ 或 $-\text{CONH}_2$ ；



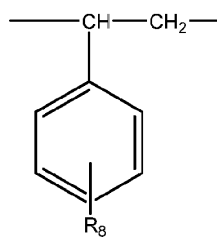
(II)

其中, R_6 为 $-(\text{CH}_2)_x-$, x 为 0-3 的整数, 或者 R_6 为 $\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{O}$, y 为 1-4 的整数;



(III)

其中, R_7 为 $-\text{H}$ 或 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_z-$ 或 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_z\text{O}-$, z 为 0-4 的整数, 或者 R_7 为 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$;



(IV)

其中, R_8 为 $-\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}_2\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OOCCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ 或 $-(\text{CH}_2)_4\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ 或 $-(\text{CH}_2)_4\text{OOCCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ 或 $-\text{COONH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}_2\text{COONH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$ 或 $-\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ 。

在一些实施例中, 所述载体的羟基或氨基的含量范围为 100-1000 $\mu\text{mol/g}$, 优选为 400-700 $\mu\text{mol/g}$ 。

在一些实施例中，所述载体的粒径范围为 35-200 μm ，优选为 50-100 μm 。

在一些实施例中，所述载体的平均孔径为 10-200nm，优选为 40-100nm。

本发明还公开了上述固相合成载体的制备方法，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；油相组成为交联单体、单乙烯基化合物、功能单体、改性单体、致孔剂和引发剂，其中，交联单体、单乙烯基化合物、功能单体和改性单体可以参与聚合反应，统称为单体；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，得到含有官能团为羟基或氨基的固相合成载体。

在一些实施例中，更具体地，所述交联单体为两个乙烯基不在同一个苯环上的双烯交联剂，包括 4,4'-二乙烯基联苯、二(4-乙烯基苯基)甲烷、1,2-二(4-乙烯基苯基)乙烷、1,3-二(4-乙烯基苯基)丙烷、二(4'-乙烯基苯氧基)甲烷、1,2-二(4'-乙烯基苯氧基)乙烷、1,3-二(4'-乙烯基苯氧基)丙烷、1,4-二(4'-乙烯基苯氧基)丁烷。优选的交联单体为 1,2-二(4-乙烯基苯基)乙烷中的一种或多种。

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，所述功能单体是指既具有可进行自由基聚合的双键，又含有羟基、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、对氯甲基苯乙烯等；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-乙烯基苯基酯单体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具有可以参与自由基聚合的双键，有含有氰基、酯基、酰胺基等官能团，包括但不限于丙烯腈、甲基丙烯腈、反丁烯二腈、1,4-二氰基-2-丁烯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺。

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，所述致孔剂为不参与聚合反应，不溶于水或微溶于水的有机溶剂或表面活性剂。所述致孔剂为芳香烃如苯、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；油溶性表面活性剂如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。

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45-95%；初始存在于油相中交联单体占单体总量的重量百分比为2.9-20%；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为0.1-15%；初始存在于油相中致孔剂重量为单体总重量的15-130%。

在本发明的一些更优选实施方案中，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62-86%；初始存在于油相中交联单体占单体总量的重量百分比为7-13%；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

比为 2-10%；初始存在油相中致孔剂重量为单体总重量的 30-110%。

在本发明的一些实施方案中，聚合温度为 50-90℃，优选为 70-85℃。

在本发明的一些实施例中，所述固相合成载体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量的重量百分比为 45-95%，交联单体占单体总量的重量百分比为 2.9-20%，功能单体占单体总量的重量百分比为 2-20%，改性单体占单体总量的重量百分比为 0.1-15%，致孔剂为单体总重量的 15-130%，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固相合成载体。

在本发明的一些实施例中，所述固相合成载体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量的重量百分比为 62-86%，交联单体占单体总量的重量百分比为 7-13%，功能单体占单体总量的重量百分比为 5-15%，改性单体占单体总量的重量百分比为 2-10%，致孔剂为单体总重量的 30-110%，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 70-85℃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固相合成载体。

通过上述方法能够得到本发明中的固相合成载体，即含有羟基或氨基的多孔树脂。在本发明中，取代度，即羟基或氨基的含量可以通过与 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，进而计算出载体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载体中氨基或羟基的含量。

载体的官能团含量由功能单体在单体重量中的占比决定，通过调整功能单体的用量可以得到一系列不同羟基或氨基的含量的载体。载体的取官能团含量决定了合成寡核苷酸量的多少，官能团含量太低，会降低单批次寡核苷酸产量；官能团含量太高，则影响寡核苷酸纯度。在本发明中，载体的官能团含量范围为100-1000 $\mu\text{mol/g}$ ，优选为400-700 $\mu\text{mol/g}$ 。

本发明中载体的粒径通过颗粒图像处理仪进行检测。即将载体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载体颗粒图像，通过计算机对载体的外貌特征和粒度进行分析和计算。

载体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，可以对载体的粒径进行调整。载体粒径如果太大，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。载体粒径如果太小，会造成合成过程压力过高，增加设备成本。在本发明中，载体的粒径范围为35-200 μm ，优选为50-100 μm 。

载体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。载体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，可以对载体的平均孔径进行调整。载体的平均孔径如果太小，会造成传质困难，影响合成效率；载体的平均孔径如果太大，会导致载体比表面积降低，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，载体的平均孔径为10-200nm，优选为40-100nm。

与现有技术相比，本发明主要有三点优势：第一，本发明选用和苯乙烯竞聚率相近的单体作为交联剂，有利于提高树脂内部化学结构的均匀性，形成均匀分布的活性位点。第二，树脂内部化学结构均匀性的提高，有利于在树脂内部形成均匀的孔道，降低传质阻力。第三，和二乙烯基苯相比，该类交联剂结构中存在柔性链，可以改善树脂在不同有机溶剂中的溶胀性能。

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3中载体的扫描电镜图片；

图4为实施例4中载体的扫描电镜图片；

图5为实施例5中载体的扫描电镜图片；

图6为实施例6中载体的扫描电镜图片；

图 7 为实施例 7 中载体的扫描电镜图片；
图 8 为实施例 8 中载体的扫描电镜图片；
图 9 为实施例 9 中载体的扫描电镜图片；
图 10 为实施例 1 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 11 为实施例 2 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 12 为实施例 3 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 13 为实施例 4 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 14 为实施例 5 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 15 为实施例 6 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 16 为实施例 7 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 17 为实施例 8 中载体通过压汞法得到的孔径分布；
图 18 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的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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取苯乙烯 108.8g、1,2-二（对乙烯基苯基）乙烷 14g、对氯甲基苯乙烯 12.2g、反丁烯二腈 5g、失水山梨醇三油酸酯 6g、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 80℃进行聚合 6h。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 μm 的树脂，进行真空干燥，得到氯含量为 565 $\mu\text{mmol/g}$ 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℃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，得到含有氨基的固相合成载体。所得氨基固相合成载体的氨基含量为 554 $\mu\text{mmol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 54nm。

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取甲基苯乙烯 77g、二（对乙烯基苯基）甲烷 28g、对氯甲基苯乙烯 14g、1,4-二氰基-2-丁烯 21g、失水山梨醇单油酸酯 15g、异辛醇 60g、邻苯二甲酸二丁酯 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℃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 μm 的树脂，进行真空干燥，得到氯含量为 646 $\mu\text{mmol/g}$ 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℃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 635 $\mu\text{mmol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 145nm。

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取乙基苯乙烯 123g、1,3-二（对乙烯基苯基）丙烷 8g、4-（4-溴丁基）苯乙烯 8.8g、丙烯腈 0.2g、聚氧乙烯山梨醇六硬脂酸酯 3g、异十二烷 18g、邻苯二甲酸二丁酯 5g 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 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 μm 的树脂，进行真空干燥，得到溴含量为 257 $\mu\text{mmol/g}$ 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 $\mu\text{mmol/g}$ ，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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取苯乙烯 112g、1,4-二（4'-乙氧基）丁烷 9g、对氯甲基苯乙烯 9g、丙烯酰胺 10g、

乙二醇脂肪酸酯 1g、甲苯 30g、邻苯二甲酸二丁酯 60g 和过氧化苯甲酰 4.5g，混合均匀，即为油相。将油相加入反应器中，开动搅拌，升温至 60°C 进行聚合 7h。反应结束后热水洗涤，乙醇回流提除去致孔剂取，筛分并收集粒径为 50-100 μm 的树脂，进行真空干燥，得到氯含量为 418 $\mu\text{mol/g}$ 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°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 410 $\mu\text{mol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 38nm。

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相。称取苯乙烯 83g、1,2-二（对乙烯基苯基）乙烷 23g、N-(4-乙烯基苯基)-乙酰胺 18g、反丁烯二腈 14g、失水山梨醇倍半油酸酯 2g、十二醇 10g、环己烷 10g 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°C 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 μm 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 822 $\mu\text{mol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 34nm。

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 107.7g、1,2-二（对乙烯基苯基）乙烷 12.8g、4-乙酰氧基苯乙烯 12.5g、反丁烯二腈 7g、失水山梨醇三油酸酯 10g、异辛醇 42g、异十二烷 21g 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 μm 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 538 $\mu\text{mol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 58nm。

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、30g 氯化钠，溶解备

用，即为水相；称取苯乙烯 128g、1,3-二（对乙烯基苯基）丙烷 8g、4-乙酰氧基苯乙烯 3g、反丁烯二腈 1g、聚氧乙烯山梨醇六硬脂酸酯 0.4g、邻苯二甲酸二丁酯 35g、甲苯 12g 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 μm 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 125 $\mu\text{mmol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 46nm。

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 83g、1,4-二（4'-乙烯苯氧基）丁烷 17g、苯甲酰氧基苯乙烯 27g、反丁烯二腈 13g、异辛醇 103g、异十二烷 51g 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°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 μm 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 843 $\mu\text{mmol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 42nm。

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 85g、1,2-二（对乙烯基苯基）乙烷 24g、4-乙烯基苯甲酸甲酯 18g、反丁烯二腈 13g、丙二醇单月桂酸酯 4g、邻苯二甲酸二丁酯 40g、异十二烷 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°C 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 50-100 μm 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 724 $\mu\text{mmol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 124nm。

对比例 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 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 50-100 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 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)	3.8	3.7	3.4	3.6	3.6	3.8	3.7	3.8	3.8
甲苯中的 溶胀度 (ml/g)	5.3	6.0	4.8	5.0	5.2	5.4	5.3	5.2	5.9

实施例 11

选取实施例 1、2、6、9 和对比例 1 中制备的固相合成载体以及 NittoPhase HL 固相合成载体合成寡核苷酸片段，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。

在反应器中称取固相合成载体 10g，50ml 乙腈溶胀 10min 后，加入 DMT-dT-3'-丁二酸 3.0g、HBTU 1.5g、DIEA 1.3ml，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 检测其纯度并计算其中寡核苷酸的收率，结果如表 2 所示。

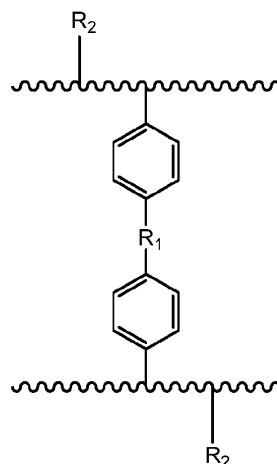
表 2. 树脂性能测试						
	实施例 1	实施例 2	实施例 6	实施例 9	对比例 1	NittoPhase HL
DMT 基团含量 ($\mu\text{mmol/g}$)	324	252	329	346	318	321*
甲苯中的溶胀度 (ml/g)	5.3	6.0	5.4	5.9	5.5	5.8
载体装填量 (g)	6.0	5.3	5.9	5.4	5.8	5.5
HPLC 纯度 (%)	88.5	89.7	89.3	86.3	85.4	79.5
收率 (%)	67.9	67.3	68.6	65.5	65.1	60.3
备注：*NittoPhase HL 负载 UnyLinker。						

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。

权 利 要 求 书

1. 一种固相合成载体，其特征在于，所述载体聚合物骨架和官能团的结构可用下式表示：



其中， $R_1 = -(CH_2)_n-$ ， n 为 0-3 的整数，或 $-O-(CH_2)_m-O-$ ， m 为 1-4 的整数； $R_2 = -OH$ 或 $-NH_2$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的固相合成载体，其特征在于，所述载体羟基或氨基的含量范围为 100-1000 $\mu\text{mol/g}$ 。

3. 根据权利要求 2 所述的固相合成载体，其特征在于，所述载体羟基或氨基的含量范围为 400-700 $\mu\text{mol/g}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的固相合成载体，其特征在于，所述载体粒径范围为 35-200 μm 。

5. 根据权利要求 4 所述的固相合成载体，其特征在于，所述载体粒径范围为 50-100 μm 。

6. 根据权利要求 1 所述的固相合成载体，其特征在于，所述载体的平均孔径为 10-200nm。

7. 根据权利要求 6 所述的固相合成载体，其特征在于，所述载体的平均孔径为 40-100nm。

8. 根据权利要求 1 所述的固相合成载体的制备方法，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：交联单体、单乙烯基化合物、功能单体、改性单体、致孔剂和引发剂，其中，交联单体、单乙烯基化合物、功能单体和改性单体可以参与聚合反应，统称为单体；

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 所述的固相合成载体的制备方法，其特征在于，所述多孔聚合物树脂可以进一步反应，得到含有官能团基为羟基或氨基的固相合成载体。

10. 根据权利要求 8 所述的固相合成载体的制备方法，其特征在于，所述交联单体为两个乙烯基不在同一个苯环上的双烯交联剂。

11. 根据权利要求 10 所述的固相合成载体的制备方法，其特征在于，所述交联单体包括 4,4'-二乙烯基联苯、二(4-乙烯基苯基)甲烷、1,2-二(4-乙烯基苯基)乙烷、1,3-二(4-乙烯基苯基)丙烷、二(4'-

乙烯苯氧基) 甲烷、1,2-二(4'-乙烯苯氧基) 乙烷、1,3-二(4'-乙烯苯氧基) 丙烷、1,4-二(4'-乙烯苯氧基) 丁烷中的一种或多种。

12. 根据权利要求 8 所述的固相合成载体的制备方法, 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。

13. 根据权利要求 12 所述的固相合成载体的制备方法, 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。

14. 根据权利要求 8 所述的固相合成载体的制备方法, 其特征在于, 所述功能单体是指单体中既具有可进行自由基聚合的双键, 又含有羟基、氨基、卤代基团或其他可通过反应转化为羟基、氨基的基团。

15. 根据权利要求 14 所述的固相合成载体的制备方法, 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 所述的固相合成载体的制备方法, 其特征在于, 所述改性单体是指单体中具有可以参与自由基聚合的双键, 又含有氰基、酯基、酰胺基。

17. 根据权利要求 16 所述的固相合成载体的制备方法, 其特征在于, 所述改性单体包括丙烯腈、甲基丙烯腈、反丁烯二腈、1,4-二氧基-2-丁烯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺。

18. 根据权利要求 8 所述的固相合成载体的制备方法, 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 所述的固相合成载体的制备方法, 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 所述的固相合成载体的制备方法, 其特征在于, 所述致孔剂为不参与聚合反应, 不溶于水或微溶于水的有机溶剂或表面活性剂。

21. 根据权利要求 20 所述的固相合成载体的制备方法, 其特征在于, 所述致孔剂为芳香烃如苯、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; 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; 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; 油溶性表面活性剂如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 所述的固相合成载体的制备方法，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 45-95%；

所述油相中交联单体占单体总量的重量百分比为 2.9-20%；

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 0.1-15%；

所述油相中致孔剂的重量为单体总重量的 15-130%。

23. 根据权利要求 22 所述的固相合成载体制备方法，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 62-86%；

所述油相中交联单体占单体总量的重量百分比为 7-13%；

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 30-110%。

24. 根据权利要求 8 所述的固相合成载体制备方法，其特征在于，所述聚合温度为 50-90℃。

25. 根据权利要求 24 所述的固相合成载体制备方法，其特征在于，所述聚合温度为 70-85℃。

26. 根据权利要求 8-25 所述的固相合成载体制备方法，其特征在于，所述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量的重量百分比为 45-95%，交联单体占单体总量的重量百分比为 2.9-20%，功能单体占单体总量的重量百分比为 2-20%，改性单体占单体总量的重量百分比为 0.1-15%，致孔剂为单体总重量的 15-130%，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固相合成载体。

27. 根据权利要求 26 所述的固相合成载体制备方法，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量的重量百分比

为 62-86%，交联单体占单体总量的重量百分比为 7-13%，功能单体占单体总量的重量百分比为 5-15%，改性单体占单体总量的重量百分比为 2-10%，致孔剂为单体总重量的 30-110%，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 70-85℃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固相合成载体。

28. 根据权利要求 8-27 所述的寡核苷酸固相合成载体制备方法，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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 108.8g、1,2-二（对乙烯基苯基）乙烷 14g、对氯甲基苯乙烯 12.2g、反丁烯二腈 5g、失水山梨醇三油酸酯 6g、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 80℃进行聚合 6h；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 μm 的树脂，进行真空干燥，得到氯含量为 565 $\mu\text{mol/g}$ 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，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 554 $\mu\text{mol/g}$ 的固相合成载体，使用压汞法测得平均孔径为 54nm。

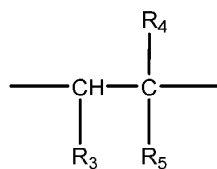
29. 根据权利要求 8-27 所述的寡核苷酸固相合成载体制备方法，其特征在于，所述的多孔羟基树脂的制备工艺包括如下步骤：

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、30g 氯化钠，溶解备用，即为水相；称取苯乙烯 107.7g、1,2-二（对乙烯基苯基）乙烷 12.8g、4-乙酰氧基苯乙烯 12.5g、反丁烯二腈 7g、失水山梨醇三油酸酯 10g、异辛醇 42g、异十二烷 21g 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 50-100 μm 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 538 $\mu\text{mol/g}$ ，使用压汞法测得平均孔径为 58nm。

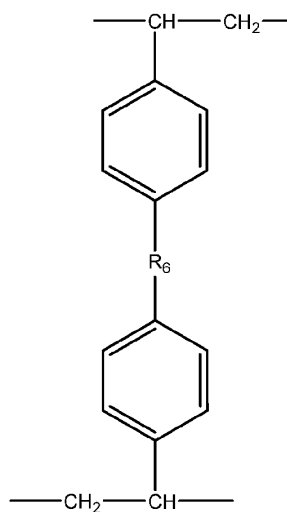
30. 根据权利要求 8-29 制备出的权利要求 1 所述的固相合成载体，可以应用于寡核苷酸的固相合成。

31. 根据权利要求 1-7 任一项所述的固相合成载体, 其特征在于, 所述固相合成载体为共聚物, 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:



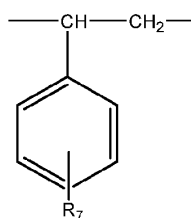
(I)

其中, R_3 为-H、-CN、或 $-\text{CH}_2\text{-CN}$; R_4 为-H或 $-\text{CH}_3$; R_5 为-CN、 $-\text{CH}_2\text{-CN}$ 、 $-\text{OOCH}_3$ 或 $-\text{CONH}_2$;



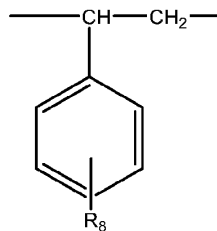
(II)

其中, R_6 为 $-(\text{CH}_2)_x-$, x 为 0-3 的整数, 或者 R_6 为 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{O}-$, y 为 1-4 的整数;



(III)

R_7 为-H或 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_z-$ 或 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_z\text{O}-$, z 为 0-4 的整数, 或者 R_7 为 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$;



(IV)

R₈ 为 -OH 或 -CH₂OH 或 -NH₂ 或 -CH₂NH₂ 或 -CH₂OOC-C₆H₄-OH 或 -CH₂OOCCH₂-C₆H₄-OH 或 -(CH₂)₄OOC-C₆H₄-OH 或 -(CH₂)₄OOCCH₂-C₆H₄-OH 或 -COONH-C₆H₄-NH₂ 或 -CH₂COONH-C₆H₄-NH₂ 或 -COO-C₆H₄-OH 或 -CH₂COO-C₆H₄-OH。