[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02804271.9

[43] 公开日 2004 年 4 月 14 日

[11] 公开号 CN 1489633A

[22] 申请日 2002.1.29 [21] 申请号 02804271.9

[30] 优先权

[32] 2001. 1.30 [33] US [31] 60/264,920

[86] 国际申请 PCT/US02/02503 2002.1.29

[87] 国际公布 WO02/061138 英 2002.8.8

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.29

[71] 申请人 ISIS 药物公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 帕特里克·惠勒

丹尼尔·C·卡帕尔迪

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 3 页 说明书 14 页

[54] 发明名称 检测二氯乙酸中的水合三氯乙醛的方法

[57] 摘要

本发明描述了检测二氯乙酸中的水合三氯乙醛的方法。

ISSN1008-4274

1. 一种分析方法，其包括确定从二氯乙酸样品中获得的核磁共振光谱是否含有与水合三氯乙醛的 CH 质子相关的核磁共振峰。

2. 权利要求 1 所述的方法，其进一步包括将与所述水合三氯乙醛的 CH 质子相关的核磁共振峰的积分值和与所述二氯乙酸的至少一个质子相关的核磁共振峰的积分值进行比较。

3. 权利要求 2 所述的方法，其进一步包括根据对核磁共振峰积分值的比较而计算该二氯乙酸中水合三氯乙醛的浓度。

4. 权利要求 3 所述的方法，其中水合三氯乙醛的计算浓度低于 15ppm。

5. 权利要求 3 所述的方法，其中水合三氯乙醛的计算浓度低于 10ppm。

6. 权利要求 3 所述的方法，其中水合三氯乙醛的计算浓度低于 1ppm。

7. 权利要求 1 所述的方法，其进一步包括：

在所述样品中加入至少一种有机溶剂；和

将与所述水合三氯乙醛的 CH 质子相关的核磁共振峰和与所述至少一种有机溶剂的至少一个质子相关的核磁共振峰进行比较。

8. 权利要求 7 所述的方法，其中有机溶剂是甲苯。

9. 权利要求 7 所述的方法，其进一步包括根据对核磁共振峰积分值的比较而计算所述二氯乙酸中水合三氯乙醛的浓度。

10. 权利要求 9 所述的方法，其中水合三氯乙醛的计算浓度低于15ppm。

11. 权利要求 9 所述的方法，其中水合三氯乙醛的计算浓度低于10ppm。

12. 权利要求 9 所述的方法，其中水合三氯乙醛的计算浓度低于1ppm。

13. 权利要求 1 所述的方法，其进一步包括将带有至少一个保护基团的寡核苷酸与所述二氯乙酸接触。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中所述接触导致了从所述寡核苷酸上去除所述的至少一个保护基团。

15. 权利要求 14 所述的方法，其中所述保护基团被去除的寡核苷酸中不包含具有通式为 5'-O-CH(OH)(CCl_3)的基团。

16. 权利要求 14 所述的方法，其中所述保护基团被去除的寡核苷酸中不包含具有通式为 5'-O-CH(CCl_3)-O-的基团。

17. 权利要求 10 所述的方法，其中所述二氯乙酸在寡核苷酸合成中用做去保护剂。

18. 权利要求 17 所述的方法，其中所述寡核苷酸具有下述通式：d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp)；其中 P=P(O)S^-Na^+。

19. 权利要求 11 所述的方法，其中所述二氯乙酸在寡核苷酸合

成中用来除去羟基保护基团。

20. 权利要求 19 所述的方法，其中所述寡核苷酸具有下述通式：d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp); 其 中 P=P(O)S^-Na^+。

21. 权利要求 12 所述的方法，其中所述二氯乙酸在寡核苷酸合成中用来除去羟基保护基团。

22. 权利要求 21 所述的方法，其中所述寡核苷酸具有下述通式：d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp); 其 中 P=P(O)S^-Na^+。

23. 权利要求 21 所述的方法，其中所述寡核苷酸中不包含具有通式为 5'-O-CH(CCl_3)-O-的基团。

24. 一种溶剂，其含有的二氯乙酸的量大于约 50 重量%，并且基本上不含水合三氯乙醛。

25. 权利要求 24 中所述的溶剂，其中所含的水合三氯乙醛少于 15ppm。

26. 权利要求 24 中所述的溶剂，其中所含的水合三氯乙醛少于 10ppm。

27. 权利要求 24 中所述的溶剂，其中所含的水合三氯乙醛少于 1ppm。

28. 一种寡核苷酸，其基本不含水合三氯乙醛加成物。

检测二氯乙酸中的水合三氯乙醛的方法

发明领域

本发明主要涉及用于检测二氯乙酸中的水合三氯乙醛的新方法。

发明背景

众所周知，在多细胞生物中，大多数的躯体状态，包括大多数病态，是受蛋白所影响的。这些蛋白，或是直接作用，或是通过它们的酶或其它功能，在动物和人的许多疾病和调节功能中起到了主要作用。对于病态，经典的治疗方法通常集中于与这些蛋白相互作用以试图减轻它们的致病或增强疾病的功能。而较新的治疗方法则希望能够调节这些蛋白的实际产量。通过干扰蛋白的产生，可以获得最大的疗效，同时带来最小的副作用。因此，这些治疗方法的一个通常的目标，是对那些能够导致不所需的蛋白形成的基因表达进行干扰或调节。

抑制特定基因表达的一种方法是使用寡核苷酸，特别是与特定的靶信使 RNA（mRNA）序列互补的寡核苷酸。几种用于这种用途的寡核苷酸正在进行临床试验。寡核苷酸也可作为在转录调控过程中与双链 DNA 相互作用的转录因子的竞争性抑制剂，从而调节它们的作用。有几篇最近的报道描述了这些相互作用（参见例如 Bielinska, A.等, Science, 250(1990), 997-1000; 和 Wu, H.等, Gene, 89(1990), 203-209）。

除了这些用做蛋白的直接或间接调控因子等用途外，寡核苷酸及其类似物也可用于诊断测试。这些诊断测试可以使用生物体液、组织、完整细胞或分离的细胞成分来进行。与抑制基因表达时一样，诊断应用也是利用寡核苷酸及其类似物与核酸互补链杂交的能力。

寡核苷酸及其类似物还广泛用做研究试剂。它们对了解许多其它

生物分子的功能及制备其它生物分子是有用的。例如，在 PCR 反应中使用寡核苷酸及其类似物作为引物，已经导致产生了一个发展中的商业化工业。PCR 已经成为商业和研究实验室的支柱，PCR 的应用也已经多样化。例如，PCR 技术现在已经应用于法医鉴定、古生物学、进化研究和遗传评估领域。商业化导致了试剂盒的开发，从而帮助那些未受过分子生物学训练的人应用 PCR。寡核苷酸及其类似物，无论是天然存在的还是人工合成的，都可在这样的 PCR 技术中用做引物。

寡核苷酸及其类似物还可用于其它的实验室工作中。在常用的实验手册，如 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, J. Sambrook 等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 和 Current Protocols In Molecular Biology, F. M. Ausubel 等编, Current Publications, 1993 中，描述了几种这样的应用。这些应用包括作为合成的寡核苷酸探针与抗体和寡聚体化合物一起用于筛选表达文库、DNA 测序、通过聚合酶链式反应体外扩增 DNA 以及用于克隆 DNA 的定点诱变。参见上述的 Molecular Cloning, A Laboratory Manual 的第二册以及上述的 Current Protocols In Molecular Biology 第二卷中的“DNA-蛋白质相互作用及聚合酶链式反应”。寡核苷酸及其类似物作为探针、引物、接头和基因片段也已被开发出来并用于多种分子生物学方法中。

这些寡核苷酸的广泛使用已增长了对快速、廉价和高效地修饰和合成寡核苷酸的方法的需求。早期的寡核苷酸合成方法包括了磷酸二酯和磷酸三酯化学。Khorana 等, J. Molec. Biol. 72(1972), 209；Reese, Tetrahedron Lett. 34(1978), 3143-3179。这些方法最终导致产生了更为有效的现代方法，比如广泛使用的亚磷酰胺技术（参见如 Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach, Beaucage, S. L.；Iyer, R. P., Tetrahedron, 48(1992) 2223-2311 及其引用的参考文献），在该技术中，一个具有游离羟基的核苷或寡核苷酸在存在弱酸的条件下，与一个被保护的氰乙基亚磷酰胺单体反应形成了一个亚磷酸连接的结构。将亚磷酸连接氧化后再将氰乙基水解，就产

生了所需要的磷酸二酯或硫代磷酸酯连接。

固相技术在寡核苷酸合成方法中继续扮演主要角色。一般情况下，最靠近 3'端的核苷被锚定在固相支持物上，该固相支持物经活化后带有羟基或氨基残基。然后其它的核苷逐个加到其上，在加入的核苷的 3'-官能团与结合在固相支持物上的核苷的 5'-羟基之间形成所需的连接。这种逐个装配的方法中隐含了使用保护基团使加入的核苷的 5'-羟基失去反应性。在连接后，通过仔细地选择去保护试剂，可以将 5'-羟基去除。

二氯乙酸（DCA）在寡核苷酸合成中是一种常用的试剂，用于对核苷酸进行去封闭。因为添加新的核苷包括重复使用二氯乙酸以对 5'-羟基进行去保护，所以这种试剂应该尽可能不含污染物，以避免传播不纯物质和产生序列不合适的靶寡核苷酸，这一点很重要。因此就需要建立方法以检测二氯乙酸中的这类不纯物质。本发明就是针对这些以及其它的重要目的。

发明概述

已经发现水合三氯乙醛是商业化制备的二氯乙酸中的常见污染物。也已发现水合三氯乙醛在寡核苷酸合成过程中能与核苷的 5'-羟基反应形成不需要的副产物，如果要完全除去这些副产物是非常困难的。另外还已经发现二氯乙酸中的水合三氯乙醛可以检测，并且通过将水合三氯乙醛的 CH 质子的核磁共振峰的积分值与一个已知含量的内标进行比较，可以对其浓度进行准确的测量。

因此，本发明的一个目的是提供用于检测二氯乙酸中的水合三氯乙醛的方法。

本发明的另一个目的是提供测定二氯乙酸中的水合三氯乙醛浓度的方法，特别是对于用做寡核苷酸合成中的去保护试剂的二氯乙酸中

的水合三氯乙醛进行检测和测定其浓度。

本发明的另一个目的是提供用于制备不含不纯物质的寡核苷酸的方法，所述不纯物质是由二氯乙酸中存在的水合三氯乙醛所引起的。

这些目的以及其它的重要目的将在下面的详细描述中变得显而易见。

发明详述

在第一个实施方案中，本发明提供了一种分析方法，其包括确定从一个二氯乙酸样品获得的核磁共振光谱中是否包含了与水合三氯乙醛的 CH 质子相关的核磁共振峰。在某些优选实施方案中，本方法还包括了将与所述水合三氯乙醛的 CH 质子相关的该核磁共振峰的积分值和与所述二氯乙酸中的至少一个质子相关的核磁共振峰的积分值进行比较。在某些优选实施方案中，本方法还包括了基于上述的核磁共振峰积分值的比较而计算该二氯乙酸中的水合三氯乙醛浓度。在某些优选实施方案中，计算的水合三氯乙醛的浓度低于 15ppm。在某些优选实施方案中，计算的水合三氯乙醛的浓度低于 10ppm。在某些优选实施方案中，计算的水合三氯乙醛的浓度低于 1ppm。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种分析方法，其包括确定从一个二氯乙酸样品获得的核磁共振光谱中是否包含了与水合三氯乙醛的 CH 质子相关的核磁共振峰，此外还包括在该样品中加入了至少一种有机溶剂，以及将与所述水合三氯乙醛的 CH 质子相关的该核磁共振峰的积分值和与所述的至少一种有机溶剂的至少一个质子相关的核磁共振峰的积分值进行比较。在某些优选实施方案中，该有机溶剂是甲苯。在某些优选实施方案中，本方法还包括了基于所述的核磁共振峰积分值的比较而计算该二氯乙酸中的水合三氯乙醛浓度。在某些优选实施方案中，计算的水合三氯乙醛的浓度低于 15ppm。在某些优选实施方案中，计算的水合三氯乙醛的浓度低于 10ppm。在某些优选

实施方案中，计算的水合三氯乙醛的浓度低于 1ppm。在某些优选实施方案中，二氯乙酸在寡核苷酸合成中用做去保护试剂，用于制备具有下述通式的寡核苷酸：

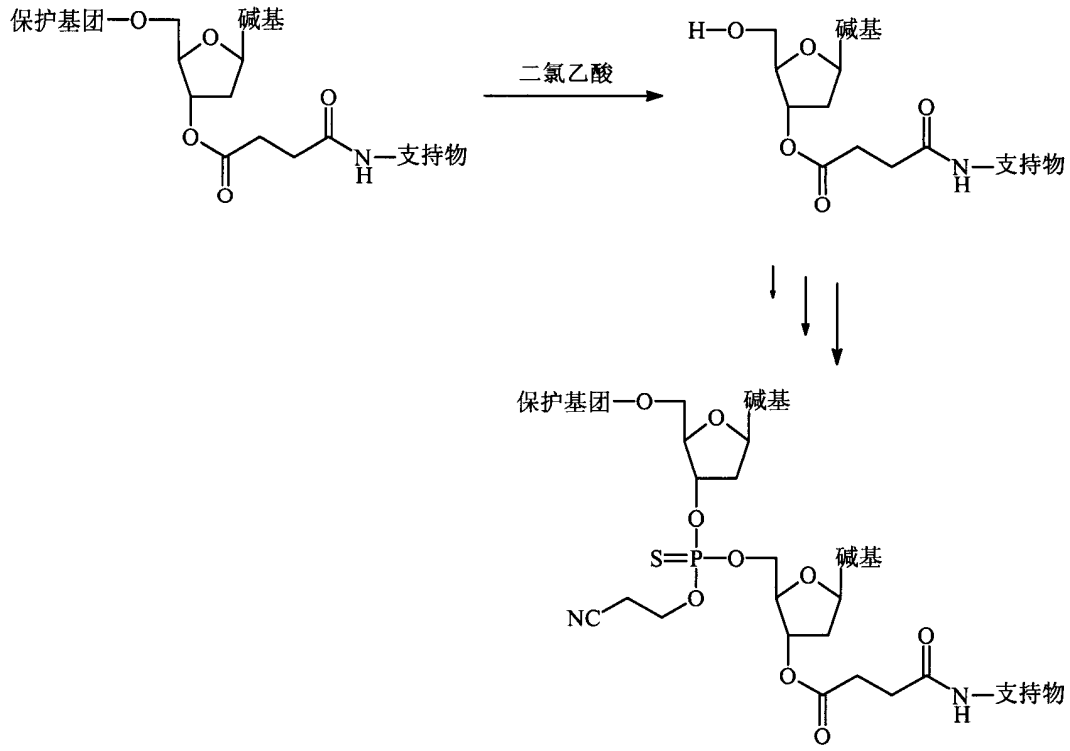
d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp)；其中 P=P(O)S^-Na^+。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种分析方法，包括确定从一个二氯乙酸样品获得的核磁共振光谱中是否包含了与水合三氯乙醛的 CH 质子相关的核磁共振峰，此外还包括将带有至少一个保护基团的寡核苷酸与该二氯乙酸接触。在某些实施方案中，接触导致了从该寡核苷酸上去除所述的至少一个保护基团。在某些实施方案中，去除了该保护基团的寡核苷酸中不含有通式为 5'-O-CH(OH)(CCl_3)的基团。在某些实施方案中，去除了该保护基团的寡核苷酸中不含有通式为 5'-O-CH(CCl_3)-O-的基团。

这些目的以及其它目的都源自于本发明人的一个发现，该发现就是水合三氯乙醛是商业化制备的二氯乙酸中的常见污染物。在此使用的术语“水合三氯乙醛”是指一种化学化合物，其结构为：$Cl_3CH(OH)_2$。在此使用的术语“二氯乙酸”（DCA）是指一种化学化合物，其结构为：$Cl_2HCC(=O)OH$。

众所周知，二氯乙酸（DCA）在寡核苷酸合成中是一种常用的试剂，用于对核苷酸进行去封闭。特别是在寡核苷酸合成中包括了重复使用二氯乙酸作为去保护试剂以将 5'-羟基保护基团（Prot）去封闭（流程图 1）：

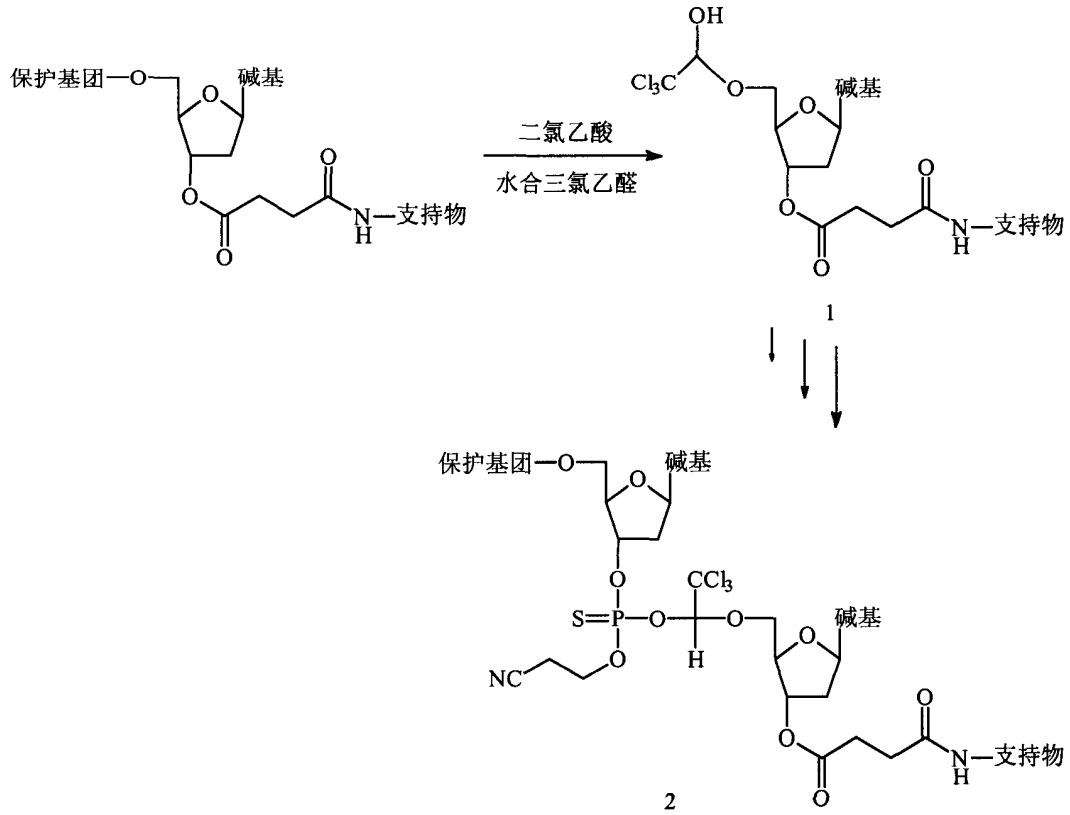
流程图 1



因此，在此所用的术语“羟基保护基团”（Prot）是指一个化学基团，它在某些条件下是稳定的，但在其它条件下可以被移除。一般来说，保护基团使化学官能团对特定的反应条件具有惰性，并可以添加到分子中的该官能团上以及从该官能团上移除而基本上对分子中的其它剩余部分没有损坏。具有代表性的羟基保护基团已有公开，参见 Beaucage 等，Tetrahedron(1992), 48, 2223-2311 以及 Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第二章，第二版，John Wiley & Sons, New York, 1991，分别在此以其全文引作参考。优选的保护基团包括二甲氧基三苯甲基（DMT）、单甲氧基三苯甲基、9-苯基呫吨-9-基（Pixyl）和 9-(对甲氧基苯基)呫吨-9-基(Mox)。

由于为了除去寡核苷酸保护基团需要重复使用二氯乙酸，因此在二氯乙酸中不含污染物，以避免传播不纯物质和产生序列不合适的靶寡核苷酸，这一点至关重要。本发明人发现，特定的不纯物质水合三氯乙醛，当存在于二氯乙酸中时，会反应生成副产物，在此称为三氯乙醇加成物 1 和 2，见下述流程图 2。

流程图 2



三氯乙醇加成物一旦形成就极为难以除去，并且如果不经检查，将通过每一个合成步骤传播。本发明人发现二氯乙酸中可以存在不同程度的水合三氯乙醛，这依赖于制备二氯乙酸所用的生产工艺。因此需要建立一种方法，可以在二氯乙酸用于寡核苷酸合成之前检测其中水合三氯乙醛的存在及浓度。然后可以建立技术规格，规定在寡核苷酸生产工艺中可以容许的最高的水合三氯乙醛浓度。在某些实施方案中，可容许的水合三氯乙醛浓度低于 15ppm，优选低于 10ppm，更优选低于 1ppm。最优选地，水合三氯乙醛的浓度低于可检测的限度。

因此，本发明部分针对于检测二氯乙酸中水合三氯乙醛存在的方法。本方法优选包括在用于生产工序前先对二氯乙酸的样品进行核磁共振（NMR）光谱分析。在样品中最好含有一种预先已知浓度的内标。在此所用的术语“内标”或“标准”是指任何含有质子的化合物，最好是溶剂，其质子的核磁共振峰可以与水合三氯乙醛的 CH 质子的核

磁共振峰相比较，从而可以确定存在的水合三氯乙醛的浓度。因此优选的是内标的质子共振的位置与水合三氯乙醛的位置不同，最好位于高场或低场。因此本发明打算使用与二氯乙酸本身的 CH 质子相关的峰的积分值作为内标，这一点值得注意。如果不使用二氯乙酸作为内标，最好从适当的液体溶剂中选择内标。这些液体溶剂包括卤代溶剂、碳氢化合物溶剂、醚类溶剂、质子或非质子溶剂，但并不以此为限。

合适的卤代溶剂包括一溴二氯甲烷、二溴一氯甲烷、溴仿、氯仿、一溴一氯甲烷、二溴甲烷、丁酰氯、二氯甲烷、三氯乙烯、1,1,1-三氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、1,1-二氯乙烷、2-氯丙烷、1,2,4-三氯苯、邻-二氯苯、氯苯、氟苯、二氯一氟甲烷、一氯二氟甲烷和三氟甲烷，但并不以此为限。

合适的碳氢化合物溶剂包括乙腈、苯、环己烷、戊烷、己烷、甲苯、环庚烷、甲基环己烷、庚烷、乙基苯、间、邻或对二甲苯、辛烷、1,2-二氢化茚和壬烷，但并不以此为限。

合适的醚类溶剂包括二甲氧基甲烷、四氢呋喃、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷、呋喃、二乙基醚、乙二醇、二甲基醚、乙二醇二乙基醚、二乙二醇二甲基醚、二乙二醇二乙基醚、三乙二醇二异丙基醚、苯甲醚或叔丁基甲基醚，但并不以此为限。

合适的极性质子溶剂包括甲醇、乙醇、2-硝基乙醇、2-氟乙醇、2,2,2-三氟乙醇、乙二醇、1-丙醇、2-丙醇、2-甲氧基乙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、2-乙氧基乙醇、二乙二醇、1-、2-或 3-戊醇、新戊醇、叔戊醇、环己醇、苯甲醇、苯酚和甘油，但并不以此为限。

合适的极性非质子溶剂包括二甲基甲酰胺（DMF）、二甲基乙酰胺（DMAC）、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮（DMPU）、1,3-二甲基-2-咪唑烷酮（DMI）、N-甲基吡咯烷酮（NMP）、甲酰胺、N-

甲基乙酰胺、N-甲基甲酰胺、乙腈（ACN）、二甲亚枫、丙腈、甲酸乙酯、乙酸甲酯、六氯丙酮、丙酮、丁酮、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸叔丁酯、环丁砜、N,N-二甲基丙酰胺、硝基甲烷、硝基苯和六甲基磷酰胺，但并不以此为限。

在优选实施方案中，内标应该对酸稳定。同时内标最好是一种相对非挥发性的溶剂，从而在标准品制备或核磁共振采集时使浓度变化的可能性减到最小。在其它一些优选实施方案中，内标是一种非质子溶剂。在另一些优选实施方案中，内标具有相对简单的核磁共振光谱，最好少于 4 个信号。在特定的优选实施方案中，溶剂是甲苯。

经过一般性指导，已知体积的二氯乙酸（DCA）可以溶解在已知体积的氘化的核磁共振溶剂中。如果需要另外加入化合物作为内标，即一种加到核磁共振管中用于将标准品的积分值与水合三氯乙醛的积分值进行比较的化合物，它的浓度可以加到例如大约 40ppm。然后可以使用任何核磁共振光谱仪，在适合于获得每一种组分的共振信号的条件下收集 ^1H 核磁共振信号。最好通过比较水合三氯乙醛的 CH 质子与内标的积分值（面积）来获得水合三氯乙醛与二氯乙酸的比率。正如本领域技术人员所容易理解的那样，根据通过积分值比较所得到的比率、二氯乙酸的浓度和任何所添加的内标的浓度，就可以计算出二氯乙酸中的水合三氯乙醛的浓度。因此该二氯乙酸就可以使用了。

一旦通过在此描述的方法测定了二氯乙酸的纯度，随后该二氯乙酸就可以用于实际上任何目的。特别是，可以将此二氯乙酸用于寡核苷酸合成过程以生产寡核苷酸。

在此所用的“寡核苷酸”是指含有多个单体亚基，由含磷的键，如亚磷酸、磷酸二酯、硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯键连接起来的化合物。这些单体亚基既可以含有自然存在的（即天然的）又可以含有非自然存在的合成部分，例如核苷亚基可以含有修饰的糖和/或核碱基

部分。因此，寡核苷酸这个术语包括了寡核苷酸、它们的类似物以及合成的寡核苷酸。这些寡核苷酸类似物一般来说在结构上与天然存在的和合成的野生型寡核苷酸有区别，但在功能上可以互换。因此，寡核苷酸类似物包括了所有那些能够有效地模拟所需的 RNA 或 DNA 链的结构和/或功能的结构，例如，可以与同一个靶杂交。合成的核苷这个术语，对于本发明来说，是指修饰过的核苷。具有代表性的修饰包括对核苷的杂环碱基部分进行修饰从而产生非天然存在的核碱基、对核苷的糖部分进行修饰，或者二者同时进行修饰。

在某些优选实施方案中，利用按照本发明的方法测试的二氯乙酸作为去保护剂制备的寡核苷酸具有下列通式：

d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp)，其中 P=P(O)S^-Na^+。

在此使用的“寡核苷酸合成”一词有其技术辨别的含义，是指利用本领域普通技术人员所熟悉的合成方法制备寡核苷酸。经过一般性指导，最靠近 3’端的核苷被锚定在固相支持物上，该固相支持物经活化后带有羟基或氨基残基。然后其它的核苷逐个加到其上，在加入的核苷的 3’-官能团与结合在固相支持物上的核苷的 5’-羟基之间形成所需的连接。在任何情况下，在所选的寡核苷酸的合成中最好使用一个保护基团使某些基团，如加入的核苷的 5’-羟基失去反应性。在连接以后，通过加入已测试过水合三氯乙醛含量的二氯乙酸来去除 5’-羟基保护基团。

本发明还针对于生产不含由于使用水合三氯乙醛污染的二氯乙酸所产生的副产物的寡核苷酸。一种这样的副产物是三氯乙醇加成物，它是水合三氯乙醛与 5’-羟基反应的结果（流程图 2）。因此，在此所用的术语“三氯乙醇加成物”是指一个核苷的 5’-羟基与水合三氯乙醛反应生成的一种不纯物质，其带有 $HOCH(CCl_3)$-O-CH_2-*基团，这里的*代表与核苷的 5’位置连接的位点。值得注意的是，在与加入的核

苷反应形成寡核苷酸后，在寡核苷酸中乙醇加成物的结构变为 P-O-$CH(CCl_3)$-O-CH_2*，其中 P 是加入的核苷中的磷原子。

在某些实施方案中，本发明提供了生产不含三氯乙醇加成物的寡核苷酸的方法。一般来说，该方法包括在用做去保护剂前先检测二氯乙酸中是否存在水合三氯乙醛。如果水合三氯乙醛存在，可按照下列步骤测定其浓度：做核磁共振分析，将水合三氯乙醛的 CH 质子的核磁共振峰的积分值与内标质子的核磁共振峰积分值进行比较，从而确定二氯乙酸中存在的水合三氯乙醛的浓度，如果水合三氯乙醛的浓度低于可接受的阈浓度，二氯乙酸就可以使用。在某些实施方案中，在二氯乙酸中可接受的水合三氯乙醛浓度低于 15ppm，优选低于 10ppm，更优选 5ppm，甚至更优选 1ppm。最优选地，水合三氯乙醛的浓度低于可检测的水平。

本发明的寡核苷酸可以通过使用固相支持物来合成。固相支持物是指在固相合成方法中能用做固相的基质，例如那些在 Caruthers 的美国专利 No. 4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679 和 5,132,418 以及 Koster 的美国专利 No. 4,725,677 和参考文献 34,069 中所描述的。在本技术领域中接头已知是一些短的分子，在固相合成技术中用于将固相支持物与起始合成子分子的官能团（如羟基）连接起来。合适的接头已在一些文献中披露，如 Oligonuclertides And Analogues A Practical Approach, Ekstein F.编，IRL 出版社，N.Y.，1991，第一章，第 1-23 页，在此以其全文引作参考。

在本发明中的固相支持物包括了那些在本技术领域中熟知的适合用于固相技术的固相支持物，例如可控孔径玻璃（CPG）、草酰化可控孔径玻璃（参见如 Alul 等，Nucleic Acids Research(1991), 19, 1527, 在此以其全文引作参考）、TentaGel 支持物——一种氨基聚乙二醇衍生的支持物（参见如 Wright 等，Tetrahedron Letters(1993), 34, 3373, 在此以其全文引作参考）和 Poros——一种聚苯乙烯/二乙烯苯的共聚物。

在与加入的核苷反应后，磷原子可以被硫化。在氧化过程中形成磷酸硫酯和磷酸二硫酯键的硫化剂包括Beaucage试剂(参见如Iyer, R.P.等，J. Chem. Soc. (1990) 112,1253-1254，和 Iyer, R.P.等，J. Org. Chem. (1990) 55, 4693-4699)、二硫化四乙基秋兰姆(参见如 Vu, H., Hirschbein, B.L., Tetrahedron Lett. (1991) 32, 3005-3008）、二苯甲酰四硫化物(参见如 Rao, M.V.等，Tetrahedron Lett. (1992), 33, 4839-4842)、二苯乙酰二硫化物（参见如 Kamer, P.C.J., Tetrahedron Lett., 1989, 30, 6757-6760)、双(O,O-二异丙氧基硫膦基)二硫化物(参见 Stec 等, Tetrahedron Lett., 1993, 34, 5317-5320)、3-乙氧基-1,2,4-二噻唑啉-5-酮(参见 Nucleic Acids Research, 1996 24, 1602-1607 和 Nucleic Acids Research (1996) 24, 3643-3644）、双(对氯苯磺酰)二硫化物（参见 Nucleic Acids Research (1995) 23, 4029-4033）、硫、与配基如三芳基、三烷基、三芳烷基或三烷芳基膦结合的硫。上述的参考文献在此以其全文引作参考。

其它可用于形成磷酸二酯或磷酸硫酯键的氧化剂包括碘/四氢呋喃/水/吡啶或过氧化氢/水或过氧化氢叔丁基或任何过酸如间氯过苯甲酸。在进行硫化时反应在无水条件下进行，同时隔绝空气特别是氧气，但在氧化时反应可以在有水溶液条件下进行。

使用按照本发明方法测试的二氯乙酸制备的寡核苷酸或寡核苷酸类似物可以与特定的靶杂交，它们优选含有从大约 5 到 50 个单体亚基。这类化合物更优选含有从大约 10 到 30 个单体亚基，尤其优选含有 15 到 25 个单体亚基。在用做构件组装较大的寡核苷酸化合物时，优选较小的寡聚体化合物。可制备二聚体、三聚体或更高聚合度的化合物的库在本发明的方法中用做合成子。使用通过液相化学合成的小的序列来自动化合成较大的寡核苷酸，这增加了连接的效率和最终的寡核苷酸的纯度。参见如 Miura, K.等，Chem. Pharm. Bull. (1987), 35, 833-836; Kumar, G.和 Poonian, M.S., J. Org. Chem. (1984) 49, 4905-4912; Bannwarth, W., Helvetica Chimica Acta, (1985) 68, 1907-1913; Wolter, A.

等, nucleosides and nucleotides, 1986, 5, 65-77，分别在此以其全文引作参考。

可以认识到，使用本发明的二氯乙酸制备的寡核苷酸可以用于诊断、治疗以及作为研究试剂和试剂盒。在包含了适当的可药用的稀释剂或载体后，它们可用在药物组合物中。参考下述的实施例可以对本发明有更进一步的理解。

实施例 1

检测二氯乙酸中的水合三氯乙醛

二氯乙酸试验样品（DCA，0.15mL）溶解于含 40ppm 甲苯的氘化的乙腈（0.5mL）中。使用 Varian Unity 400 核磁共振光谱仪收集 ^1H 核磁共振光谱，使用条件如下：脉冲角 30 度，扫描谱宽 6997.9 赫兹，32k 复点，总再循环延迟 45 秒。每个样品运行大约 1000 个瞬变值。数据处理采用零填充至带有 0.3 赫兹指数线增宽的 64k 复点。头两个点通过线性预测再生以使基线平滑，在快速傅里叶变换后通过样条拟合进一步平滑。

通过比较与水合三氯乙醛的 CH 质子相关的峰的积分值与甲苯的 CH_3 基团的峰的积分值计算出水合三氯乙醛的浓度。然后按照实施例 2 提出的步骤使用二氯乙酸制备 20 聚体的寡核苷酸。

实施例 2

制备 d(TpCpCpGpTpCpApTpCpGpCpTpCpCpTpCpApGpGpGp)；其中 $P=P(O)S^-Na^+$

5'-O-DMT-N^2-异丁酰-2'-脱氧鸟嘌呤核苷衍生的引物 HL 30 支持物被装入一个不锈钢反应器容器中。加入含有二氯乙酸的甲苯溶液（10%, v/v）将被保护的羟基去保护，产物用乙腈洗涤。加入 5'-O-DMT-N^2-异丁酰-2'-脱氧鸟嘌呤核苷-3'-O-(2-氰乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺溶液（0.2M）和 1-H-四唑的乙腈溶液(0.45M)，并在室温反应 5

分钟。加入含苯乙酰基二硫化物（0.2M）的 3-甲基吡啶-乙腈（1:1, v/v）溶液，室温反应 2 分钟。产物用乙腈（1:4 v/v）和 N-甲基咪唑-吡啶-乙腈（2:3:5, v/v/v）洗涤。2 分钟后通过用乙腈洗涤产物除去加帽混合物。

加入含有二氯乙酸的甲苯溶液（3%, v/v）将 5'-羟基去保护，产物用乙腈洗涤。加入 5'-O-DMT-N^2-异丁酰-2'-脱氧鸟嘌呤核苷-3'-O-(2-氰乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺溶液（0.2M）和 1-H-四唑的乙腈溶液(0.45M)，在室温反应 5 分钟。加入含苯乙酰基二硫化物（0.2M）的 3-甲基吡啶-乙腈（1:1, v/v）溶液，室温反应 2 分钟。产物用乙腈（1:4 v/v）、然后是乙酸酐-乙腈（1:4, v/v）和 N-甲基咪唑-吡啶-乙腈（2:3:5, v/v/v）组成的加帽混合物（1:1, v/v）洗涤。2 分钟后通过用乙腈洗涤产物除去加帽混合物。

为了制备 20 聚体的寡核苷酸，使 5'-羟基去保护、加入一种亚磷酰胺和一种活化剂、硫化、加帽以及插入的洗涤，这样的过程再重复 17 轮。得到的结合有寡核苷酸的支持物用氢氧化铵水溶液（30%）在 60°C 处理 12 小时，然后将产物过滤。滤液在减压条件下浓缩，残留物的水溶液通过反相高效液相色谱纯化。收集适当的级分，合并，在真空中浓缩。残余物的水溶液用乙酸钠水溶液（pH3.5）处理 45 分钟。加入乙醇沉淀后就可收集到标题物质 20 聚体的寡核苷酸的 2'-脱氧硫代磷酸酯。

正如本领域技术人员将认识到的，对于本发明的优选实施方案可进行大量的改动和修饰而并不脱离本发明的实质。这意味着所有这样的改变都落入本发明的范围之内。