



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112218664 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(21) 申请号 201980031169.4

(22) 申请日 2019.05.10

(30) 优先权数据

62/670,709 2018.05.11 US

62/715,684 2018.08.07 US

62/723,375 2018.08.27 US

62/776,432 2018.12.06 US

PCT/US2019/027109 2019.04.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/031672 2019.05.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/217784 EN 2019.11.14

(71) 申请人 波涛生命科学有限公司

地址 新加坡新加坡市

(72) 发明人 詹森·敬新·张

钱德拉·瓦尔格赛 岩本直树

西科都·夏克提·希瓦利拉

纳扬塔拉·科塔里

安·菲根·杜宾

塞尔维·拉马萨米

帕查穆图·坎德萨米

贾亚坎森·库马拉萨米

戈帕尔·雷迪·博米涅尼

苏布拉马尼安·马拉潘

塞苏马德哈万·迪娃卡奥门奈

大卫·查尔斯·唐奈·巴特勒

陆根良 杨海琳 清水护

普拉肖特·莫尼安

(74) 专利代理机构 深圳中一联合知识产权代理有限公司 44414

代理人 王丽

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书153页

(54) 发明名称

寡核苷酸组合物及其使用方法

(57) 摘要

除其他事项外，本披露提供了设计的DMD寡核苷酸、组合物、及其使用方法。在一些实施例中，本披露提供了如下技术，这些技术可用于通过跳读外显子51或外显子53来修复突变体DMD转录物，使得可以将转录物翻译成内部截短的、但具有至少部分功能的肌营养不良蛋白质变体。在一些实施例中，本披露提供了可用于调节DMD转录物剪接的技术。在一些实施例中，提供的技术可以改变肌营养不良蛋白(DMD) DMD转录物的剪接。在一些实施例中，本披露提供了用于治疗如肌肉营养不良等疾病的方法，该肌肉营养不良包括但不限于杜氏肌肉营养不良、贝克肌肉营养不良等。

1. 一种寡核苷酸, 该寡核苷酸具有WV-14791的结构:

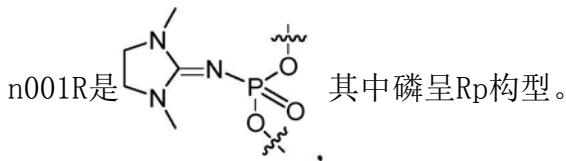
fU\*SfC\*SfCn001RfG\*SfG\*SfUn001RfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmAmGfG\*SfU\*SfGn001RfU\*SfU\*SfC\*SfU,

或其药学上可接受的盐形式, 其中:

f代表经2' -F修饰的核苷;

\*S代表Sp硫代磷酸酯;

m代表经2' -OMe修饰的核苷; 并且



其中磷呈Rp构型。

2. 一种寡核苷酸, 该寡核苷酸具有WV-13826的结构:

fU\*SfC\*SfC\*SfG\*SfG\*SfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmAmGfG\*SfU\*SfG\*SfU\*SfU\*SfC,

或其药学上可接受的盐形式, 其中:

f代表经2' -F修饰的核苷;

\*S代表Sp硫代磷酸酯;

m代表经2' -OMe修饰的核苷。

3. 一种寡核苷酸, 该寡核苷酸具有WV-13864的结构:

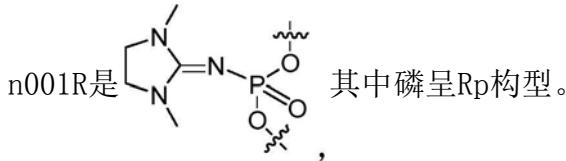
fC\*SfU\*SfCn001RfC\*SfG\*SfGn001RfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmAfG\*SfG\*SfU\*SfGn001RfU\*SfU\*SfC,

或其药学上可接受的盐形式, 其中:

f代表经2' -F修饰的核苷;

\*S代表Sp硫代磷酸酯;

m代表经2' -OMe修饰的核苷; 并且



其中磷呈Rp构型。

4. 一种寡核苷酸, 该寡核苷酸具有WV-13835的结构:

fU\*SfC\*SfC\*SfG\*SfG\*SfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmAmGfG\*SfU\*SfG\*SfU\*SfU\*SfC\*SfU,

或其药学上可接受的盐形式, 其中:

f代表经2' -F修饰的核苷;

\*S代表Sp硫代磷酸酯; 并且

m代表经2' -OMe修饰的核苷。

5. 一种寡核苷酸, 该寡核苷酸具有WV-143444的结构:

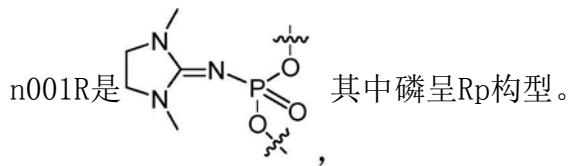
fC\*SfU\*SfCn001RfC\*SfG\*SfGn001RfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmAfGfG\*SfU\*SfGn001RfU\*SfU\*SfC,

或其药学上可接受的盐形式, 其中:

f代表经2' -F修饰的核苷;

\*S代表Sp硫代磷酸酯；

m代表经2'-OMe修饰的核苷；并且



6. 如权利要求1-5中任一项所述的寡核苷酸，其中该寡核苷酸呈盐形式。
7. 如权利要求6所述的寡核苷酸，其中该盐形式是钠盐。
8. 如权利要求7所述的寡核苷酸，其中该钠盐中钠离子的数量等于该寡核苷酸中硫代磷酸酯键联和磷酸酯键联的总数量。
9. 一种手性受控的寡核苷酸组合物，该手性受控的寡核苷酸组合物包含多个如权利要求1-8中任一项所述的寡核苷酸，其中相对于具有与该寡核苷酸相同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋制剂，该手性受控的寡核苷酸组合物富集该寡核苷酸。
10. 一种药物组合物，该药物组合物包含治疗有效量的如权利要求1-8中任一项所述的寡核苷酸、以及选自以下的药学上可接受的非活性成分：药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的赋形剂、和药学上可接受的载体。
11. 如权利要求10所述的药物组合物，其中该药物组合物是溶液。
12. 一种寡核苷酸组合物，用于在疾病的治疗中使用，所述使用包含改变靶转录物的剪接，  
其中：该寡核苷酸组合物的特征在于：当该寡核苷酸组合物与转录物剪接系统中的靶转录物接触时，相对于在参考条件下所观察到的，该转录物的剪接发生改变，这些参考条件选自由以下组成的组：不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合。
13. 如权利要求12所述使用的寡核苷酸组合物，其中
  - (a) 相对于不存在该组合物，该靶转录物的剪接发生改变，优选地其中该靶转录物是肌营养不良蛋白的前mRNA，并且其中该改变是相对于不存在该组合物，一个或多个外显子以增加的水平被跳读，更优选地其中肌营养不良蛋白的外显子53相对于不存在该组合物以增加的水平被跳读；或
  - (b) 其中该寡核苷酸组合物是如权利要求9-11中任一项所述的组合物。
14. 如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸、或如权利要求9-13中任一项所述的组合物，用于在治疗杜氏肌肉营养不良中使用，所述使用包含向易患该疾病或患有该疾病的受试者施用如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸、或如权利要求9-13中任一项所述的组合物。
15. 一种用于预防或治疗DMD的方法，该方法包括向易患该疾病或患有该疾病的受试者施用有效量的DMD寡核苷酸。
16. 如权利要求15所述的方法，其中该受试者具有适于外显子51跳读的DMD基因突变，并且该DMD寡核苷酸可以提供外显子51跳读。
17. 如权利要求15所述的方法，其中该受试者具有适于外显子53跳读的DMD基因突变，并且该DMD寡核苷酸可以提供外显子53跳读。
18. 如权利要求15所述的方法，其中该寡核苷酸是如权利要求1-8中任一项所述的寡核

昔酸。

19. 如权利要求15所述的方法,其中将该寡核昔酸以如权利要求9-13中任一项所述的组合物施用。

20. 一种用于制备寡核昔酸的方法,该方法包括使用手性助剂、亚磷酰胺或叠氮化物试剂、或者在说明书中描述的条件。

21. 一种寡核昔酸、手性助剂、亚磷酰胺、组合物、或方法,如在说明书中描述的。

## 寡核苷酸组合物及其使用方法

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2018年5月11日提交的美国临时申请号62/670,709、于2018年8月7日提交的美国临时申请号62/715,684、于2018年8月27日提交的美国临时申请号62/723,375、于2018年12月6日提交的美国临时申请号62/776,432、以及于2019年4月11日提交的PCT申请号PCT/US19/27109的优先权，其各自的全部内容通过引用并入本文。

### 背景技术

[0002] 寡核苷酸可用于治疗、诊断、研究、和纳米材料应用。天然存在的核酸(例如，未经修饰的DNA或RNA)用于治疗的用途可能受限，例如，因为天然存在的核酸对细胞外和细胞内核酸酶的不稳定性和/或天然存在的核酸的细胞渗透和分布不良。需要新的且改善的DMD寡核苷酸以及DMD寡核苷酸组合物，例如像，能够调节用于治疗肌肉营养不良的肌营养不良蛋白外显子51或外显子53的跳读的新DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物。

### 发明内容

[0003] 除其他事项外，本披露涵盖了以下认识：DMD寡核苷酸的结构元件(如碱基序列、化学修饰(例如，糖、碱基、和/或核苷酸间键联的修饰及其模式)、和/或立体化学(例如，骨架手性中心的立体化学(手性核苷酸间键联)、和/或其模式))可以对DMD寡核苷酸特性(例如，外显子51或53的跳读、毒性、稳定性、蛋白质结合特征等)具有显著影响。

[0004] 在一些实施例中，本披露提供了能够介导DMD外显子51或外显子53的跳读的DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中，DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物可用于治疗肌肉营养不良。在一些实施例中，DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物是本文披露的(包括但不限于表A1中的)DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物。

[0005] 在一些实施例中，如本文所述的示例数据所证明，提供的技术特别可用于降低突变体mRNA(例如，包含有害突变的DMD转录物)和/或由其编码的蛋白质的水平、和增加修复的mRNA(例如，其中跳读外显子51或外显子53以缺失、改正或补偿有害突变的DMD转录物)和/或由其编码的蛋白质的水平。

[0006] 在一些实施例中，提供的技术特别可用于调节DMD转录物的剪接，例如，增加所希望的剪接产物的水平和/或减少不希望的剪接产物的水平。在一些实施例中，提供的技术特别可用于降低DMD转录物(例如，前mRNA、RNA等)的水平，并且在许多情况下，降低由此类DMD转录物(如mRNA、蛋白质等)产生或编码的产物的水平。在一些实施例中，前mRNA或mRNA或RNA被从一个细胞区室(例如，细胞核、细胞质等)转移到另一个细胞区室、和/或被一种或多种酶修饰。

[0007] 例如，在一些实施例中，肌营养不良蛋白基因可以包含外显子，该外显子包含与肌肉营养不良(包括但不限于杜氏肌肉营养不良(Duchenne (Duchenne's) muscular dystrophy, DMD)和贝克肌肉营养不良(Becker (Becker's) muscular dystrophy, BMD))相关的一种或多种突变。在一些实施例中，疾病相关的外显子包含外显子中的突变(例如，错义

突变、移码突变、无义突变、提前终止密码子等)。在一些实施例中,本披露提供了用于有效地跳读疾病相关的肌营养不良蛋白外显子、同时保留或恢复读框使得可以产生较短的(例如,内部截短的)、但是具有部分功能的肌营养不良蛋白(例如,变体)的组合物和方法。

[0008] 除其他事项外,本披露证明了可以使用化学修饰和/或立体化学来调节由DMD寡核苷酸组合物剪接的DMD转录物。在一些实施例中,本披露提供了化学修饰和立体化学的组合来改善DMD寡核苷酸的特性,例如,它们改变DMD转录物的剪接的能力。在一些实施例中,本披露提供了手性受控的(chirally controlled) DMD寡核苷酸组合物,当与参考条件(例如,不存在组合物、存在参考组合物(例如,具有相同的构造(如本领域技术人员所理解的,除非另有说明,否则构造通常是指分子实体中原子的同一性和连接性(以及对应的键多重性)的描述,但是省略了由它们的空间排列引起的任何区别)的DMD寡核苷酸的立体随机(立体随机的)组合物、不同的手性受控的DMD寡核苷酸组合物等)、及其组合等)相比时,该手性受控的DMD寡核苷酸组合物提供了增加的DMD外显子51或DMD外显子53的跳读以产生经修饰的(例如,修复的)mRNA,该经修饰的mRNA可以被翻译以产生内部截短的、但至少具有部分功能的肌营养不良蛋白质变体。

[0009] 在一些实施例中,与参考条件相比,提供的手性受控的DMD寡核苷酸组合物出人意料地有效。在一些实施例中,DMD外显子51或53的剪接可以增强超过5、10、15、20、25、30、40、50、或100倍。

[0010] 本披露认识到提供低毒性DMD寡核苷酸组合物及其使用方法的挑战。在一些实施例中,本披露提供了具有降低的毒性的DMD寡核苷酸组合物和方法。在一些实施例中,本披露提供了具有减少的免疫应答诱导的DMD寡核苷酸组合物和方法。

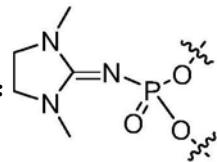
[0011] 在一些实施例中,本披露提供了具有增强的hTLR9活性拮抗作用的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,肌肉营养不良与例如肌肉组织中的炎症相关。在一些实施例中,提供的技术(例如,DMD寡核苷酸、组合物、方法等)提供了增强的活性(例如,外显子跳读活性)和hTLR9拮抗活性两者,这些活性可以对与炎症相关的一种或多种病症和/或疾病有效。在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸和/或其组合物提供了外显子跳读能力以及降低的毒性和/或炎症水平两者。

[0012] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸包含(各自独立地选自多种类型的)多个核苷酸间键联。多种类型的核苷酸间键联在特性上不同。不希望受任何理论束缚,本披露指出天然磷酸酯键联(磷酸二酯核苷酸间键联)是阴离子的,并且当在体内以其自身使用而没有其他化学修饰时可以是不稳定的;硫代磷酸酯核苷酸间键联是阳离子的,通常在体内比天然磷酸酯键联更稳定,并且通常更具疏水性;中性核苷酸间键联(如本披露中例示的包含环状胍部分的中性核苷酸间键联)在生理pH下是中性的、在体内可以比天然磷酸酯键联更稳定、并且更具疏水性。

[0013] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸包含经修饰的核苷酸间键联,该经修饰的核苷酸间键联是在pH[例如,人生理pH(约7.4)、递送位点(例如,细胞器、细胞、组织、器官、生物体等)的pH等]下是非负电荷的(中性或阳离子的)核苷酸间键联。不希望受任何特定理论的束缚,在至少一些情况下,与不包含中性核苷酸间键联的相当的核酸相比,DMD寡核苷酸中的中性核苷酸间键联可以提供改善的特性和/或外显子51或53的跳读,例如改善的递送、对外切核酸酶和内切核酸酶改善的抗性、改善的细胞摄取、改善的内体逃逸和/或改善的核摄取等。

[0014] 在一些实施例中,非负电荷的核苷酸间键联包含环状胍部分。在一些实施例中,非

负电荷的核苷酸间键联具有以下结构:



(n001) 或其立体异构体(例如,n001R

或n001S)。在一些实施例中,包含环状胍部分的中性核苷酸间键联是手性受控的。在一些实施例中,本披露涉及包含DMD寡核苷酸的组合物,该DMD寡核苷酸包含至少一个中性核苷酸间键联和至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0015] 除其他事项外,本披露涵盖了以下认识:立体随机DMD寡核苷酸制剂含有多个不同的化学实体,这些化学实体例如,在DMD寡核苷酸链内的单独的骨架手性中心的立体化学结构上彼此不同。在不控制骨架手性中心的立体化学的情况下,立体随机DMD寡核苷酸制剂提供包含未确定水平的DMD寡核苷酸立体异构体的不受控制的(或立体随机)组合物。尽管这些立体异构体可以具有相同的碱基序列和/或化学修饰,但是至少由于它们不同的骨架立体化学它们是不同的化学实体,并且如本文所阐述的,它们可以具有不同的特性,例如,外显子51或53的跳读、毒性、分布等。除其他事项外,本披露提供了手性受控的组合物,这些手性受控的组合物是或者含有目的DMD寡核苷酸的特定的立体异构体;与手性不受控的组合物相比,手性受控的组合物包含受控水平的DMD寡核苷酸的特定的立体异构体。在一些实施例中,特定的立体异构体可以通过以下来定义,例如,通过其碱基序列、其骨架键联模式、其骨架手性中心模式、和骨架磷修饰模式等。如本领域所理解的,在一些实施例中,碱基序列可以仅是指碱基的序列和/或是指DMD寡核苷酸中的核苷残基(例如,相对于标准天然存在的核苷(如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶、和尿嘧啶)的糖和/或碱基组分)的同一性和/或修饰状态和/或是指此类残基的杂交特征(即,与特定的互补性残基杂交的能力)。在一些实施例中,本披露证明了通过在DMD寡核苷酸内包含和/或定位特定的手性结构而实现的特性改善(例如,改善的外显子51或53的跳读、较低的毒性等)可以与通过以下实现的那些相当或者甚至更好:使用化学修饰(例如,特定的骨架键联、残基修饰等(例如,通过使用某些类型的经修饰的磷酸酯[例如,硫代磷酸酯、经取代的硫代磷酸酯等]、糖修饰[例如,2'-修饰等]、和/或碱基修饰[例如,甲基化等])。在一些实施例中,本披露证明了包含某些化学修饰(例如,2'-F、2'-OMe、硫代磷酸酯核苷酸间键联等)的DMD寡核苷酸的手性受控的DMD寡核苷酸组合物证明了出乎意料高的外显子跳读效率。

[0016] 在一些实施例中,本披露提供了包含多种DMD寡核苷酸的DMD寡核苷酸组合物,这些寡核苷酸:

1) 具有与DMD转录物中的靶序列互补的共同的碱基序列;并且

2) 包含一个或多个经修饰的糖部分和经修饰的核苷酸间键联,其中该DMD寡核苷酸是本文所述的(例如,在表A1中的)DMD寡核苷酸。

[0017] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸组合物的特征在于:当该DMD寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53的跳读增加),该参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合。

[0018] 在一些实施例中,参考条件是不存在组合物。在一些实施例中,参考条件是存在参

考组合物。包含参考多种DMD寡核苷酸的示例参考组合物在本披露中广泛地描述。在一些实施例中,与提供的组合物中的多种DMD寡核苷酸相比,参考多种DMD寡核苷酸具有不同的结构元件(化学修饰、立体化学等)。在一些实施例中,参考组合物是具有相同的化学修饰的DMD寡核苷酸的立体随机制剂。在一些实施例中,参考组合物是立体异构体的混合物,而提供的组合物是一个立体异构体的手性受控的DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中,参考多种DMD寡核苷酸与提供的组合物中的多种DMD寡核苷酸具有相同的碱基序列、相同的糖修饰、相同的碱基修饰、相同的核苷酸间键联修饰、和/或相同的立体化学,但是不同的化学修饰(例如,碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联修饰等)。

[0019] 示例剪接系统是本领域广泛已知的。在一些实施例中,剪接系统是体内或体外系统,其包括足以实现相关靶DMD转录物的剪接的组分。在一些实施例中,剪接系统是或包含剪接体(例如,蛋白质和/或其RNA组分)。在一些实施例中,剪接系统是或包含细胞器膜(例如,核膜)和/或细胞器(例如,细胞核)。在一些实施例中,剪接系统是或包含细胞或其群体。在一些实施例中,剪接系统是或包含组织。在一些实施例中,剪接系统是或包含生物体,例如,动物,例如哺乳动物,如小鼠、大鼠、猴子、狗、人等。

[0020] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,该DMD寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定DMD寡核苷酸类型的多种DMD寡核苷酸:

- 1) 碱基序列;
- 2) 骨架键联模式;
- 3) 骨架手性中心模式;以及
- 4) 骨架磷修饰模式,其中该DMD寡核苷酸是本文所述的(例如,在表A1中的)DMD寡核苷酸。

[0021] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,该DMD寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定DMD寡核苷酸类型的多种DMD寡核苷酸:

- 1) 碱基序列;
- 2) 骨架键联模式;
- 3) 骨架手性中心模式;以及
- 4) 骨架磷修饰模式,

该组合物是手性受控的,并且相对于具有相同的碱基序列的DMD寡核苷酸的基本上外消旋制剂,该组合物富集特定DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸,

该DMD寡核苷酸组合物的特征在于:当该DMD寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53的跳读增加),这些参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合,其中该DMD寡核苷酸是本文所述的(例如,在表A1中的)DMD寡核苷酸。

[0022] 在一些实施例中,本披露提供了表A1中的寡核苷酸的手性受控的寡核苷酸组合物,其中寡核苷酸包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20或更多个)手性受控的核苷酸间键联(例如,S、R、nS、或nR的那些),并且其中寡核苷酸任选地以药学上可接受的盐形式。在一些实施例中,以钠盐提供寡核苷酸。

[0023] 在一些实施例中,如本文所述的,多种寡核苷酸具有相同的构造。在一些实施例

中,对于组合物中的多种寡核苷酸的手性受控的核苷酸间键联,在具有多种寡核苷酸的相同构造的组合物中所有寡核苷酸的至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%、优选地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%在手性受控的核苷酸间键联中具有相同键联磷构型。

[0024] 在一些实施例中,DMD转录物是肌营养不良蛋白基因或其变体。

[0025] 在一些实施例中,本披露提供了包含本文披露的任何DMD寡核苷酸的组合物。在一些实施例中,本披露提供了包含本文披露的任何手性受控的DMD寡核苷酸的组合物。在一些实施例中,本披露提供了包含本文披露的任何手性受控的DMD寡核苷酸的组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子51或DMD外显子53的跳读。

[0026] 在一些实施例中,本披露涉及任何本文所述的(例如,在表A1中的)单独的DMD寡核苷酸。

[0027] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸和/或组合物能够介导外显子51的跳读。在一些实施例中,此类DMD寡核苷酸和组合物的非限制性实例包括以下那些:WV-12494、WV-12130、WV-12131、WV-12132、WV-12133、WV-12134、WV-12135、WV-12136、WV-12496、WV-12495、WV-12123、WV-12124、WV-12125、WV-12126、WV-12127、WV-12128、WV-12129、WV-12553、WV-12554、WV-12555、WV-12556、WV-12557、WV-12558、WV-12559、WV-12872、WV-12873、WV-12876、WV-12877、WV-12878、WV-12879、WV-12880、WV-12881、WV-12882、和WV-12883、以及具有碱基序列(包含这些DMD寡核苷酸中的任一个的至少15个连续碱基)的其他DMD寡核苷酸。

[0028] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸(例如,DMD寡核苷酸)能够介导外显子53的跳读。此类DMD寡核苷酸的非限制性实例包括:WV-12880、WV-13826、WV-13827、WV-14791、WV-9517、WV-13835、WV-13864、WV-14344、以及具有碱基序列(包含任何这些DMD寡核苷酸的至少15个连续碱基)的其他DMD寡核苷酸。

[0029] 在一些实施例中,本披露涉及制造本文披露的(例如,在表A1中的)任何DMD寡核苷酸的方法。

[0030] 在一些实施例中,本披露涉及包含本文披露的(例如,在表A1中的)任何DMD寡核苷酸的药物。

[0031] 在一些实施例中,本披露提供了选自任何表的DMD寡核苷酸的手性受控的DMD寡核苷酸组合物。

[0032] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸包含核苷酸间键联,该核苷酸间键联是天然磷酸酯键联或硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施例中,硫代磷酸酯核苷酸间键联不是手性受控的。在一些实施例中,硫代磷酸酯核苷酸间键联是手性受控的核苷酸间键联(例如,Sp或Rp)。

[0033] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸包含非负电荷的核苷酸间键联。在一些实施例中,DMD寡核苷酸包含中性核苷酸间键联。在一些实施例中,中性核苷酸间键联是或包含环状胍部分。

[0034] 在一些实施例中,核苷酸间键联包含胍部分。在一些实施例中,核苷酸间键联包含环状胍部分。在一些实施例中,核苷酸间键联包含具有以下结构的环状胍部分:n001。在一些实施例中,中性核苷酸间键联或包含环状胍部分的核苷酸间键联是立体化学受控的。

[0035] 通常,如本文所述的DMD寡核苷酸组合物的特性可使用任何适当测定评估。对于不同的组合物(例如,立体控制的与非立体控制的、和/或不同的立体控制的组合物)的相对毒性和/或蛋白质结合特性通常理想地在相同的测定中确定,在一些实施例中基本上同时,并且在一些实施例中参考历史结果。

[0036] 本领域内普通技术人员将清楚和/或将能够容易地开发出用于特定DMD寡核苷酸组合物的适当测定。本披露提供了某些特定测定的描述,例如可用于评估DMD寡核苷酸组合物行为的一个或多个特征,例如,补体活化、注射位点炎症、蛋白质结合等。

[0037] 例如,可用于评估DMD寡核苷酸组合物的毒性和/或蛋白质结合特性的某些测定可以包括本文描述和/或示例的任何测定。

[0038] 在一些实施例中,本披露提供了包含具有相同碱基序列的多种DMD寡核苷酸的DMD寡核苷酸组合物,其中该多种寡核苷酸包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个手性受控的核苷酸间键联。在一些实施例中,本披露提供了包含具有相同构造的多种DMD寡核苷酸的DMD寡核苷酸组合物,其中该多种寡核苷酸包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个手性受控的核苷酸间键联。在一些实施例中,当寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53的跳读增加),该参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合。在一些实施例中,与参考条件相比,以增加的水平(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500或更多倍)提供具有一个外显子(例如,在一些实施例中,外显子51;在一些实施例中,外显子53)跳读和/或由其编码的蛋白质的剪接产物。

[0039] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,该DMD寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定DMD寡核苷酸类型的多种DMD寡核苷酸:

- 1) 碱基序列;
- 2) 骨架键联模式;
- 3) 骨架手性中心模式;以及
- 4) 骨架磷修饰模式,

其中:

该多种中的寡核苷酸包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个手性受控的核苷酸间键联;以及

该DMD寡核苷酸组合物的特征在于:当该DMD寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53的跳读增加),该参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合。

[0040] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗或预防肌肉营养不良的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的DMD寡核苷酸组合物。

[0041] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗或预防肌肉营养不良的方法,该方法包括向受试者施用包含多种DMD寡核苷酸的DMD寡核苷酸组合物,该多种DMD寡核苷酸:

- 1) 具有与DMD转录物中的靶序列互补的共同的碱基序列;并且

2) 包含一个或多个经修饰的糖部分和经修饰的核苷酸间键联,

该DMD寡核苷酸组合物的特征在于:当该DMD寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53的跳读增加),这些参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合,其中该DMD寡核苷酸是本文所述的(例如,在表A1中的)DMD寡核苷酸。

[0042] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗或预防肌肉营养不良的方法,该方法包括向受试者施用手性受控的DMD寡核苷酸组合物,该手性受控的DMD寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定DMD寡核苷酸类型的多种DMD寡核苷酸:

- 1) 碱基序列;
- 2) 骨架键联模式;
- 3) 骨架手性中心模式;以及
- 4) 骨架磷修饰模式,

该组合物是手性受控的,并且相对于具有相同的碱基序列的DMD寡核苷酸基本上外消旋制剂,该组合物富集特定DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸,其中

该DMD寡核苷酸组合物的特征在于:当该DMD寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53的跳读增加),这些参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合,其中该DMD寡核苷酸是本文所述的(例如,在表A1中的)DMD寡核苷酸。

[0043] 在一些实施例中,提供的寡核苷酸包含至少一个,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个非负电荷的核苷酸间键联,其实任选地以及独立地手性受控的。在一些实施例中,提供的寡核苷酸包含手性受控的非负电荷的核苷酸间键联。在一些实施例中,非负电荷的核苷酸间键联是n001。

[0044] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,该DMD寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定DMD寡核苷酸类型的多种DMD寡核苷酸:

- 1) 碱基序列;
- 2) 骨架键联模式;
- 3) 骨架手性中心模式;以及
- 4) 骨架磷修饰模式,

其中:

该多种中的寡核苷酸包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个手性受控的核苷酸间键联;以及

该多种中的寡核苷酸包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个非负电荷的核苷酸间键联。

[0045] 在一些实施例中,在肌肉营养不良中,跳读DMD外显子51或DMD外显子53之后,肌营养不良蛋白的功能可以通过内部截短的、但至少具有部分功能的肌营养不良蛋白质变体恢复、或至少部分地恢复。

[0046] 在一些实施例中,肌肉营养不良包括但不限于杜氏肌肉营养不良(DMD)和贝克肌

肉营养不良 (BMD)。

[0047] 在一些实施例中,本披露提供了药物组合物,该药物组合物包含本披露的DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物、和药学上可接受的载体。

[0048] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗肌肉营养不良(杜氏肌肉营养不良(DMD)、或贝克肌肉营养不良(BMD))的方法,该方法包括向易患该疾病或者患有该疾病的受试者施用本披露中所述的组合物。

[0049] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗肌肉营养不良、杜氏肌肉营养不良(DMD)、或贝克肌肉营养不良(BMD)的方法,该方法包括向易患该疾病或患有该疾病的受试者施用包含本文披露的任何DMD寡核苷酸的组合物。在一些实施例中,组合物是包含有效量的寡核苷酸的药物组合物,并且是手性受控的。在一些实施例中,寡核苷酸以盐形式(例如,钠盐)提供。

[0050] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗肌肉营养不良、杜氏肌肉营养不良(DMD)、或贝克肌肉营养不良(BMD)的方法,该方法包括(a)向易患该疾病或者患有该疾病的受试者施用包含本文披露的任何DMD寡核苷酸的组合物,和(b)向该受试者施用另外的治疗,该另外的治疗能够预防、治疗、减轻或减缓肌肉营养不良、杜氏肌肉营养不良(DMD)、或贝克肌肉营养不良(BMD)的至少一个症状的进展。

### 定义

[0051] 如本文所用,除非另外指明,应用下列定义。出于此披露的目的,化学元素根据以下来鉴别:Periodic Table of the Elements[元素周期表],CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics[化学与物理手册],第75版。另外,有机化学的一般原理描述于:“Organic Chemistry[有机化学]”,Thomas Sorrell,University Science Books[大学科学书籍],索萨利托:1999及“March’s Advanced Organic Chemistry[马奇高级有机化学]”,第5版,编辑:Smith,M.B.和March,J.,John Wiley&Sons[约翰威利父子公司],纽约:2001。

[0052] 大约:如本文所用,关于数字的术语“大约”或“约”通常用于包括在任一方向上(大于或小于)落入所述数字的5%、10%、15%、或20%范围内的数字,除非另有指明或另外从上下文明显可见(除了会小于可能值的0%或者超过可能值的100%的这种数字)。在一些实施例中,关于剂量使用的术语“约”意指 $\pm 5\text{mg/kg/天}$ 。

[0053] 相当的:术语“相当的”在本文中用于描述两组(或更多组)彼此充分相似的条件或环境,以允许比较所获得的结果或观察到的现象。在一些实施例中,相当的条件或环境的组的特征在于多个基本相同的特征和一个或少数变化的特征。本领域普通技术人员将理解,当由足够数量和类型的基本相同的特征表征时,条件的组彼此是相当的,以保证合理的结论,即在不同组的条件或环境下获得的结果或观察到的现象的差异是由那些变化的特征的变化引起或指示的。

[0054] 给药方案:如本文所用,“给药方案”或“治疗方案”是指单独地向受试者施用且通常相隔一定时间段施用的一组单位剂量(通常超过一个)。在一些实施例中,给定治疗剂具有推荐的给药方案,其可涉及一个或多个剂量。在一些实施例中,给药方案包括多个剂量,每个剂量彼此分开相同长度的时间段;在一些实施例中,给药方案包含多个剂量及至少两个用于隔开单独剂量的不同时间段。在一些实施例中,给药方案内的所有剂量具有相同的

单位剂量的量。在一些实施例中，给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施例中，给药方案包含以第一剂量的量的第一剂量，然后是以不同于第一剂量的量的第二剂量的量的一个或多个另外的剂量。在一些实施例中，给药方案包含以第一剂量的量的第一剂量，然后是以与第一剂量的量相同的第二剂量的量的一个或多个另外的剂量。

[0055] 杂原子：术语“杂原子”意指不是碳或氢的原子。在一些实施例中，杂原子是氧、硫、氮、磷、硼或硅（包括氮、硫、磷、或硅的任何氧化的形式；任何碱性氮或杂环的可取代氮的季铵化形式（例如，如在3,4-二氢-2H-吡咯基中的N）、NH（如在吡咯烷基中）或NR<sup>+</sup>（如在N-取代的吡咯烷基中）；等）。在一些实施例中，杂原子是硼、氮、氧、硅、硫、或磷。在一些实施例中，杂原子是氮、氧、硅、硫、或磷。在一些实施例中，杂原子是氮、氧、硫、或磷。在一些实施例中，杂原子是氮、氧、或硫。

[0056] 体外：如本文所用，术语“体外”是指在人造环境中发生的事件，例如在试管或反应容器中，在细胞培养物中等，而不是在生物体（例如，动物、植物和/或微生物）内。

[0057] 体内：如本文所用，术语“体内”是指在生物体（例如，动物、植物和/或微生物）内发生的事件。

[0058] 部分不饱和的：如本文所用，术语“部分不饱和的”是指包括至少一个双键或三键的环部分。术语“部分不饱和的”意在涵盖具有多个不饱和位点的环，但是不意在包括如本文所定义的芳基或杂芳基部分。

[0059] 药物组合物：如本文所用，术语“药物组合物”是指与一种或多种药学上可接受的载体一起配制的活性剂。在一些实施例中，活性剂以适合于在治疗方案中施用的单位剂量存在，其显示当施用相关群体时实现受控制的治疗效果的统计学显著概率。在一些实施例中，药物组合物能以固体或液体形式被特别配制以进行施用，包括适用于以下的那些：口服施用，例如，浸液（drench）（水性或非水溶液或悬浮液）、片剂（例如针对口腔、舌下和全身吸收的那些）、丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂（应用于舌）；肠胃外施用，例如，作为例如无菌溶液或悬浮液或持续释放的配制品通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射；局部应用，例如，作为乳膏剂、软膏剂、或控制释放贴剂或喷雾剂应用于皮肤、肺或口腔；阴道内或直肠内，例如作为阴道栓剂、乳膏剂或泡沫剂；舌下；眼部；透皮；或经鼻、肺以及应用于其他粘膜表面。

[0060] 药学上可接受的：如本文所用，短语“药学上可接受的”是指在合理医学判断的范围内适合于与人和动物的组织接触使用而无过多毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物、和/或剂型。

[0061] 药学上可接受的载体：如本文所用，术语“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的材料、组合物或媒介物，如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料，其涉及将主题化合物从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的一部分。在与配制品的其他成分相容并且对患者无害的意义上，每种载体必须是“可接受的”。可充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括：糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；粉状黄芪胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇，如丙二醇；多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇；pH缓冲溶液；聚酯、聚碳酸酯和/或聚酰酐；以及在药物配制品中采用

的其他无毒相容的物质。

[0062] 药学上可接受的盐:如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指适合于在制药环境中使用的此类化合物的盐,即,在合理医学判断的范围内,适合于与人和低等动物的组织接触使用而无不当毒性、刺激、过敏反应等并且与合理的效益/风险比相称的盐。药学上可接受的盐是本领域熟知的。例如,S.M.Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences[药物科学杂志],66:1-19(1977)中详细地描述了药学上可接受的盐。在一些实施例中,药学上可接受的盐包括但不限于,无毒的酸加成盐,其是使用无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或使用有机酸(如乙酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)或通过使用本领域中所使用的其他方法(如离子交换)形成的氨基基团的盐。在一些实施例中,药学上可接受的盐包括但不限于己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐(lactobionate)、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等。在一些实施例中,药学上可接受的盐适当地包括使用平衡离子(如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、具有从1至6个碳原子的烷基、磺酸根以及芳基磺酸根)形成的无毒铵、季铵以及胺阳离子。在一些实施例中,提供的化合物(例如,寡核苷酸)包含一个或多个酸性基团(例如,天然磷酸酯键联基团、硫代磷酸酯键联基团等),且药学上可接受的盐是碱金属盐、碱土金属盐或铵盐(例如,N(R)<sub>3</sub>的铵盐,其中每个R独立地如本披露中所定义和描述的)。代表性的碱金属盐或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等的盐。在一些实施例中,药学上可接受的盐是钠盐。在一些实施例中,药学上可接受的盐是钾盐。在一些实施例中,药学上可接受的盐是钙盐。在一些实施例中,药学上可接受的盐适当地包括使用平衡离子(如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、具有从1至6个碳原子的烷基、磺酸根以及芳基磺酸根)形成的无毒铵、季铵以及胺阳离子。在一些实施例中,提供的化合物包含多于一个酸性基团,例如,寡核苷酸可以包含两个或更多个酸性基团(例如,天然磷酸酯键联和/或经修饰的核苷酸间键联)。在一些实施例中,这种化合物的药学上可接受的盐(或者通常,盐)包含两个或更多个阳离子,该两个或更多个阳离子可以是相同的或不同的。在一些实施例中,在药学上可接受的盐(或通常,盐)中,具有足够酸度的每个酸性基团以其盐形式独立地存在(例如,在包含天然磷酸酯键联和硫代磷酸酯核苷酸间键联的寡核苷酸中,天然磷酸酯键联和硫代磷酸酯核苷酸间键联的每个以其盐形式独立地存在)。在一些实施例中,寡核苷酸(例如,提供的DMD寡核苷酸)的药学上可接受的盐是提供的DMD寡核苷酸的钠盐。在一些实施例中,寡核苷酸(例如,DMD寡核苷酸)的药学上可接受的盐是这种寡核苷酸的钠盐,其中每个酸性键联(例如,每个天然磷酸酯键联和硫代磷酸酯核苷酸间键联)以钠盐形式(所有钠盐)存在。

[0063] 保护基团:如本文所用,术语“保护基团,”是本领域熟知的并且包括在Protecting Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护基团]T.W.Greene和P.G.M.Wuts,第3

版,John Wiley&Sons[约翰威立父子公司],1999(其全部内容通过引用并入本文)中详细描述的那些。还包括那些特别适用于核昔和核昔酸化学的保护基团,例如,在Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry[当前的核酸化学方案](由Serge L.Beaucage等人编辑,06/2012,章节2的全部内容通过引用并入本文)中描述的那些。合适的氨基-保护基团包括氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-芴基氨基甲酸甲酯(Fmoc)、9-(2-磺酸基)芴基氨基甲酸甲酯、9-(2,7-二溴)芴基氨基甲酸甲酯、2,7-二-叔丁基-[9-(10,10-二氧化代-10,10,10,10-四氢噻吨基)]氨基甲酸甲酯(DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯酰基氨基甲酸酯(Phenoc)、2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(Troc)、2-三甲基甲硅烷基乙基氨基甲酸酯(Teoc)、2-苯基乙基氨基甲酸酯(hZ)、1-(1-金刚烷基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(Adhoc)、1,1-二甲基-2-卤代乙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-2,2-二溴乙基氨基甲酸酯(DB-t-BOC)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(TCB0C)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙基氨基甲酸酯(Bpoc)、1-(3,5-二-叔丁基苯基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(t-Bumeoc)、2-(2' 和4' -吡啶基)乙基氨基甲酸酯(Pyoc)、2-(N,N-二环己基甲酰胺基)乙基氨基甲酸酯、氨基甲酸叔丁酯(BOC)、1-金刚烷基氨基甲酸酯(Adoc)、氨基甲酸乙烯基酯(Voc)、氨基甲酸烯丙基酯(A11oc)、1-异丙基烯丙基氨基甲酸酯(Ipaoc)、肉桂基氨基甲酸酯(Coc)、4-硝基肉桂基氨基甲酸酯(Noc)、8-喹啉基氨基甲酸酯、N-羟基哌啶基氨基甲酸酯、烷基二硫氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯(Cbz)、对甲氧基苄基氨基甲酸酯(Moz)、对硝基苄基氨基甲酸酯、对溴苄基氨基甲酸酯、对氯苄基氨基甲酸酯、2,4-二氯苄基氨基甲酸酯、4-甲基亚磺酰基苄基氨基甲酸酯(Msz)、9-蒽基氨基甲酸甲酯、联苯基氨基甲酸甲酯、2-甲硫基乙基氨基甲酸酯、2-甲基磺酰基乙基氨基甲酸酯、2-(对甲苯磺酰基)乙基氨基甲酸酯、[2-(1,3-二噻烷基)]氨基甲酸甲酯(Dmoc)、4-甲硫基苯基氨基甲酸酯(Mtpc)、2,4-二甲硫基苯基氨基甲酸酯(Bmpc)、2-磷鎓基乙基氨基甲酸酯(Peoc)、2-三苯基磷鎓基异丙基氨基甲酸酯(Ppoc)、1,1-二甲基-2-氰基乙基氨基甲酸酯、间-氯-对酰氨基苄基氨基甲酸酯、对(二羟基硼烷基)苄基氨基甲酸酯、5-苯并异噁唑基氨基甲酸甲酯、2-(三氟甲基)-6-色酮基氨基甲酸甲酯(Tcro)、间-硝基苯基氨基甲酸酯、3,5-二甲氧基苄基氨基甲酸酯、邻-硝基苄基氨基甲酸酯、3,4-二甲氧基-6-硝基苄基氨基甲酸酯、苯基(邻-硝基苯基)甲基氨基甲酸酯、吩噻嗪基-(10)-羧基衍生物、N'-对甲苯磺酰基氨基羧基衍生物、N'-苯基氨基硫代羧基衍生物、氨基甲酸叔戊酯、S-苯基硫氨基甲酸酯、对氰基苄基氨基甲酸酯、环丁基氨基甲酸酯、环己基氨基甲酸酯、环戊基氨基甲酸酯、环丙基氨基甲酸甲酯、对-癸氧基苄基氨基甲酸酯、2,2-二甲氧基羧基乙基氨基甲酸酯、邻-(N,N-二甲基甲酰胺基)苄基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲酰胺基)丙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基丙炔基氨基甲酸酯、二(2-吡啶基)氨基甲酸甲酯、2-呋喃基氨基甲酸甲酯、2-碘乙基氨基甲酸酯、异冰片基氨基甲酸酯、异丁基氨基甲酸酯、异烟基氨基甲酸酯、对-(对'-甲氧基苯基偶氮基)苄基氨基甲酸酯、1-甲基环丁基氨基甲酸酯、1-甲基环己基氨基甲酸酯、1-甲基-1-环丙基氨基甲酸甲酯、1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苯基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(对苯基偶氮基苯基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-苯基乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(4-吡啶基)乙基氨基甲酸酯、苯基氨基甲酸酯、对-(苯基偶氮基)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三甲基苄基氨基甲酸酯、甲酰胺、乙酰胺、氯乙酰胺、三氯乙酰胺、三氟乙酰胺、苯基乙酰胺、3-苯基丙酰胺、氮苯酰胺、3-吡啶基甲酰胺、N-苯甲酰基苯基丙氨酰衍生物、苯甲酰胺、对-苯基苯甲酰胺、邻-硝

基苯基乙酰胺、邻-硝基苯氧基乙酰胺、乙酰基乙酰胺、(N'-二硫苄氧基羰基氨基)乙酰胺、3-(对-羟基苯基)丙酰胺、3-(邻-硝基苯基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻-硝基苯氧基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻-苯基偶氮基苯氧基)丙酰胺、4-氯丁酰胺、3-甲基-3-硝基丁酰胺、邻-硝基肉桂酰胺、N-乙酰基甲硫氨酸衍生物、邻-硝基苯甲酰胺、邻-(苯甲酰基氨基甲基)苯甲酰胺、4,5-二苯基-3-噁唑啉-2-酮、N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫琥珀酰亚胺(Dts)、N-2,3-二苯基马来酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二甲硅烷基氮杂环戊烷加合物(STABASE)、5-取代的1,3-二甲基-1,3,5-三氮杂环己烷-2-酮、5-取代的1,3-二苄基-1,3,5-三氮杂环己烷-2-酮、1-取代的3,5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲基胺、N-烯丙基胺、N-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基胺(SEM)、N-3-乙酰氧基丙基胺、N-(1-异丙基-4-硝基-2-氧基-3-吡咯啉-3-基)胺、季铵盐、N-苄基胺、N-二(4-甲氧基苯基)甲基胺、N-5-二苯并环庚胺、N-三苯基甲基胺(Tr)、N-[4-甲氧基苯基]联苯基甲基]胺(MMTr)、N-9-苯基芴基胺(PhF)、N-2,7-二氯-9-芴基亚甲胺、N-二茂铁基甲基氨基(Fcm)、N-2-吡啶甲基氨基N'-氧化物、N-1,1-二甲硫基亚甲胺、N-苄基亚甲胺、N-对甲氧基苄基亚甲胺、N-二苯基亚甲胺、N-[2-吡啶基]三甲苯基]亚甲胺、N-(N',N'-二甲基氨基亚甲基)胺、N,N'-异亚丙二胺、N-对-硝基苄基亚甲胺、N-亚水杨酸基胺、N-5-氯亚水杨酸基胺、N-(5-氯-2-羟基苯基)苯基亚甲胺、N-环己基亚甲胺、N-(5,5-二甲基-3-氧基-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基二取代硼酸衍生物、N-[苯基(五羰基铬-或钨)羰基]胺、N-铜螯合物、N-锌螯合物、N-硝胺、N-硝基胺、N-氧化胺、联苯基膦酰胺(Dpp)、二甲硫基膦酰胺(Mpt)、联苯基硫代膦酰胺(Ppt)、二烷基氨基磷酸酯、联苄基氨基磷酸酯、联苯基氨基磷酸酯、苯次磺酰胺、邻-硝基苯次磺酰胺(Nps)、2,4-二硝基苯次磺酰胺、五氯苯次磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯次磺酰胺、三苯基甲基次磺酰胺、3-硝基吡啶次磺酰胺(Npys)、对-甲苯磺酰胺(Ts)、苯磺酰胺、2,3,6,-三甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺酰胺(Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mte)、4-甲氧基苯磺酰胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺酰胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺酰胺(iMds)、2,2,5,7,8-戊甲基色满-6-磺酰胺(Pmc)、甲磺酰胺(Ms)、β-三甲基甲硅烷基乙磺酰胺(SES)、9-蒽磺酰胺、4-(4',8'-二甲氧基萘基甲基)苯磺酰胺(DNMBS)、苄基磺酰胺、三氟甲基磺酰胺、和苯酰基磺酰胺。

[0064] 适当保护的羧酸进一步包括但不限于甲硅烷基-、烷基-、烯基-、芳基-、和芳基烷基-保护的羧酸。合适的甲硅烷基基团的实例包括三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基联苯基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等。合适的烷基基团的实例包括甲基、苄基、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、三苯甲基、叔丁基、四氢吡喃-2-基。合适的烯基基团的实例包括烯丙基。合适的芳基基团的实例包括任选地经取代的苯基、联苯基、或萘基。合适的芳基烷基基团的实例包括任选地经取代的苄基(例如,对甲氧基苄基(MPM)、3,4-二甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、对卤代苄基、2,6-二氯苄基、对氰基苄基)、以及2-吡啶甲基和4-吡啶甲基。

[0065] 合适的羟基保护基团甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲基硫代甲基(MTM)、叔丁基硫代甲基、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苄氧基甲基(BOM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(对-AOM)、愈创木酚甲基(GUM)、叔丁氧基甲基、4-戊烯基氧基甲基(POM)、甲硅烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、二(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基(SEMOR)、四氢吡喃基(THP)、3-溴四氢吡

喃基、四氢噻喃基、1-甲氧基环己基、4-甲氧基四氢吡喃基(MTHP)、4-甲氧基四氢噻喃基S,S-二氧化物、1-[ (2-氯代-4-甲基) 苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二噁烷-2-基、四氢呋喃基、四氢噻吩基(tetrahydrothiofuryl)、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-桥亚甲基苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-(苯基氢硒基)乙基、叔丁基、烯丙基、对氯苯基、对甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苄基、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、对卤代苄基、2,6-二氯苄基、对氰基苄基、对苯基苄基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基-N-氧化基、二苯基甲基、 $p,p'$ -二硝基二苯甲基、5-二苯并环庚基、三苯基甲基、 $\alpha$ -萘基二苯基甲基、对甲氧基苯基二苯基甲基、二(对甲氧基苯基)苯基甲基、三(对甲氧基苯基)甲基、4-(4'-溴苯酰基氧基苯基)二苯基甲基、4,4',4"-三(4,5-二氯邻苯二甲酰亚胺基苯基)甲基、4,4',4"-三(乙酰丙酰基氧基苯基)甲基、4,4',4"-三(苯甲酰基氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)二(4',4"-二甲氧基苯基)甲基、1,1-二(4-甲氧基苯基)-1'-芘基甲基、9-蒽基、9-(9-苯基)吨基、9-(9-苯基-10-氧代)蒽基、1,3-苯并二硫烷-2-基、苯并异噻唑基S,S-二氧化基、三甲基甲硅烷基(TMS)、三乙基甲硅烷基(TES)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)、二甲基异丙基甲硅烷基(IPDMS)、二乙基异丙基甲硅烷基(DEIPS)、二甲基叔己基(thexy1)甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、三苄基甲硅烷基、三对二甲苯基甲硅烷基、三苯基甲硅烷基、二苯基甲基甲硅烷基(DPMS)、叔丁基甲氧基苯基甲硅烷基(TB MPS)、甲酸酯、苯甲酰甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、对氯苯氧基乙酸酯、3-苯基丙酸酯、4-氧代戊酸酯(乙酰丙酸酯)、4,4-(亚乙基二硫代)戊酸酯(乙酰丙酰基二硫代乙缩醛)、新戊酸酯、金刚酸酯(adamantoate)、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、对苯基苯甲酸酯、2,4,6-三甲基苯甲酸酯(菜酸酯(mesitoate))、烷基甲基碳酸酯、9-芴基甲基碳酸酯(Fmoc)、烷基乙基碳酸酯、烷基2,2,2-三氯乙基碳酸酯(Troc)、2-(三甲基甲硅烷基)乙基碳酸酯(TMSEC)、2-(苯基磺酰基)乙基碳酸酯(Psec)、2-(三苯基磷鎓基)乙基碳酸酯(Peoc)、烷基异丁基碳酸酯、烷基乙烯基碳酸酯、烷基烯丙基碳酸酯、烷基对硝基苯基碳酸酯、烷基苄基碳酸酯、烷基对甲氧基苄基碳酸酯、烷基3,4-二甲氧基苄基碳酸酯、烷基邻硝基苄基碳酸酯、烷基对硝基苄基碳酸酯、烷基S-苄基硫代碳酸酯、4-乙氧基-1-萘基碳酸酯、二硫代碳酸甲酯、2-碘苯甲酸酯、4-叠氮基丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻-(二溴甲基)苯甲酸酯、2-甲酰基苯磺酸酯、2-(甲硫基甲氧基)乙基、4-(甲硫基甲氧基)丁酸酯、2-(甲硫基甲氧基甲基)苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯氧基乙酸酯、2,4-二(1,1-二甲基丙基)苯氧基乙酸酯、氯二苯基乙酸酯、异丁酸酯、单琥珀酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、对-(甲氧基羰基)苯甲酸酯、 $\alpha$ -萘甲酸酯、硝酸酯、烷基N,N,N',N"-四甲基二氨基磷酸酯、烷基N-苯基氨基甲酸酯、硼酸酯、二甲基硫脲基、烷基2,4-二硝基苯基次磺酸酯、硫酸酯、甲磺酸酯(methanesulfonate、mesylate)、苄基磺酸酯以及甲苯磺酸酯(Ts)。为了保护1,2-二醇或1,3-二醇，保护基团包括亚甲基缩醛、亚乙基缩醛、1-叔丁基亚乙基缩酮、1-苯基亚乙基缩酮、(4-甲氧基苯基)亚乙基缩醛、2,2,2-三氯亚乙基缩醛、缩丙酮、亚环戊基缩酮、亚环己基缩酮、亚环庚基缩酮、亚苄基缩醛、对-甲氧基亚苄基缩醛、2,4-二甲氧基亚苄基缩酮、3,4-二甲氧基亚苄基缩醛、2-硝基亚苄

基缩醛、甲氧基亚甲基缩醛、乙氧基亚甲基缩醛、二甲氧基亚甲基原酸酯、1-甲氧基亚乙基原酸酯、1-乙氧基亚乙基原酸酯、1,2-二甲氧基亚乙基原酸酯、 $\alpha$ -甲氧基亚苄基原酸酯、1-(N,N-二甲基氨基)亚乙基衍生物、 $\alpha$ -(N,N'-二甲基氨基)亚苄基衍生物、2-氧杂亚环戊基原酸酯、二-叔丁基亚甲硅烷基基团(DTBS)、1,3-(1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷亚基)衍生物(TIPDS)、四-叔丁氧基二硅氧烷-1,3-二亚基衍生物(TBDS)、碳酸酯、环硼酸酯、乙基硼酸酯、和苯基硼酸酯。

[0066] 在一些实施例中，羟基保护基团是乙酰基、叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、对氯苯基、2,4-二硝基苯基、苄基、苯甲酰基、对苯基苯甲酰基、2,6-二氯苄基、联苯基甲基、对硝基苄基、三苯基甲基(三苯甲基)、4,4'-二甲氧基三苯甲基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基联苯基甲硅烷基、三苯基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、苯甲酰基甲酸酯、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、新戊酰、9-芴基甲基碳酸酯、甲磺酸、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、三苯甲基、单甲氧基三苯甲基(MMTr)、4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr)和4,4',4"-三甲氧基三苯甲基(TMTr)、2-氰基乙基(CE或Cne)、2-(三甲基甲硅烷基)乙基(TSE)、2-(2-硝基苯基)乙基、2-(4-氰基苯基)乙基2-(4-硝基苯基)乙基(NPE)、2-(4-硝基苯基磺酰基)乙基、3,5-二氯苯基、2,4-二甲基苯基、2-硝基苯基、4-硝基苯基、2,4,6-三甲基苯基、2-(2-硝基苯基)乙基、丁基硫代簇基、4,4',4"-三(苯甲酰基氧基)三苯甲基、联苯基氨基甲酰基、乙酰丙酰基(levulinyl)、2-(二溴甲基)苯甲酰基(Dbmb)、2-(异丙基硫代甲氧基甲基)苯甲酰基(Ptmt)、9-苯基氧杂蒽-9-基(苯基咕吨基(pixyl))或9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基(MOX)。在一些实施例中，每个羟基保护基团独立地选自乙酰基、苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基联苯基甲硅烷基、和4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些实施例中，羟基保护基团选自由以下组成的组：三苯甲基、单甲氧基三苯甲基和4,4'-二甲氧基三苯甲基基团。

[0067] 在一些实施例中，磷保护基团是在整个寡核苷酸合成中与核苷酸间磷键联接的基团。在一些实施例中，磷保护基团与核苷酸间硫代磷酸酯键联的硫原子附接。在一些实施例中，磷保护基团与核苷酸间硫代磷酸酯键联的氧原子附接。在一些实施例中，磷保护基团与核苷酸间磷酸酯键联的氧原子附接。在一些实施例中，磷保护基团是2-氰基乙基(CE或Cne)、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-硝基乙基、2-碘酰基乙基、甲基、苄基、邻硝基苄基、2-(对硝基苯基)乙基(NPE或Npe)、2-苯基乙基、3-(N-叔丁基甲酰胺基)-1-丙基、4-氧代戊基、4-甲硫基-1-丁基、2-氰基-1,1-二甲基乙基、4-N-甲基氨基丁基、3-(2-吡啶基)-1-丙基、2-[N-甲基-N-(2-吡啶基)]氨基乙基、2-(N-甲酰基,N-甲基)氨基乙基、4-[N-甲基-N-(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]丁基。

[0068] 蛋白质：如本文所用，术语“蛋白质”是指多肽(即，通过肽键彼此连接的至少两个氨基酸的串)。在一些实施例中，蛋白质仅包括天然存在的氨基酸。在一些实施例中，蛋白质包括一个或多个非天然存在的氨基酸(例如，与相邻的氨基酸形成一个或多个肽键的部分)。在一些实施例中，蛋白质链中的一个或多个残基含有非氨基酸部分(例如，聚糖等)。在一些实施例中，蛋白质包括多于一条个多肽链，例如一个或多个二硫键连接或通过其他方式缔结。在一些实施例中，蛋白质含有L-氨基酸、D-氨基酸、或两者；在一些实施例中，蛋白质含有一个或多个氨基酸修饰或本领域已知的类似物。有用的修饰包括，例如，末端乙酰

化、酰胺化、甲基化等。术语“肽”通常用于是指具有小于约100个氨基酸、小于约50个氨基酸、小于20个氨基酸、或小于10个氨基酸的长度的多肽。

[0069] 受试者:如本文所用,术语“受试者”或“测试受试者”是指任何生物体,向该生物体中依照本披露施用提供的化合物或组合物,例如,用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。通常的受试者包括动物(例如,哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物、和人;昆虫;蠕虫;等)和植物。在一些实施例中,受试者可能患有和/或易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)。

[0070] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指表现出一个目的特征或特性的总体的或接近总体的范围或程度的定性的状态。本领域的普通技术人员应当理解的是生物学以及化学现象很少(如果有的话)会达到完成和/或进行到完成或实现或避免一个绝对的结果。因此,本文使用术语“基本上”来获得在许多生物学和/或化学现象中潜在地缺少的内在的完全性。

[0071] 患有:“患有”疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体已经诊断为和/或显示出疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状。

[0072] 易患:“易患”疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体是比一般公众成员具有更高的发展疾病、障碍和/或病症的风险的个体。在一些实施例中,易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体可以未被诊断出患有该疾病、障碍和/或病症。在一些实施例中,易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体可以表现出该疾病、障碍和/或病症的症状。在一些实施例中,易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体可以不表现出该疾病、障碍和/或病症的症状。在一些实施例中,易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体将会发展该疾病、障碍和/或病症。在一些实施例中,易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的个体将不会发展该疾病、障碍和/或病症。

[0073] 全身:如本文所用的短语“全身施用”、“全身地施用”、“外周施用”、和“外周地施用”具有其领域所理解的含义,是指施用化合物或组合物使其进入受体的系统。

[0074] 互变异构形式:本文所用和本领域通常理解的短语“互变异构形式”用于描述能够容易地相互转化的有机化合物的不同异构形式。互变异构体的特征可在于氢原子或质子的形式迁移,伴随着单键和相邻双键的转换。在一些实施例中,互变异构体可以由质子互变异构体(即,质子的重新定位)产生。在一些实施例中,互变异构体可以由价态互变(即,成键电子的快速重组)产生。所有此类互变异构形式旨在包括在本披露的范围内。在一些实施例中,化合物的互变异构形式彼此以移动平衡存在,因此制备单独物质的尝试导致形成混合物。在一些实施例中,化合物的互变异构形式是可分离和可离析的化合物。在本披露的一些实施例中,可以提供化学组合物,其是或包括化合物的单个互变异构形式的纯的制剂。在本披露的一些实施例中,可以提供作为化合物的两个或更多个互变异构形式的混合物的化学组合物。在某些实施例中,此类混合物含有等量的不同的互变异构形式;在某些实施例中,此类混合物含有不同量的化合物的至少两个不同的互变异构形式。在本披露的一些实施例中,化学组合物可以含有化合物的所有互变异构形式。在本披露的一些实施例中,化学组合物可以含有化合物的少于所有互变异构形式。在本披露的一些实施例中,化学组合物可以含有化合物的一个或多个互变异构形式,因为互变现象其量随着时间的推移而变化。在本披露的一些实施例中,互变异构体是酮-烯醇互变异构体。化学领域的技术人员将认识到,

可以使用化学领域中已知的任何合适的试剂“捕获”(即,化学修饰以使其保持“烯醇”形式)酮-烯醇互变异构体,以提供烯醇衍生物,其随后可以使用本领域已知的一种或多种合适的技术分离。除非另外指明,否则本披露涵盖相关化合物的所有互变异构形式,无论是纯的形式还是彼此的混合物。

[0075] 治疗剂:如本文所用,短语“治疗剂”是指当施用于受试者时具有治疗效果和/或引发所希望的生物学和/或药理学效果的药剂。在一些实施例中,治疗剂是任何物质,该物质可用于缓解、改善、减轻、抑制、预防、延迟疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状或特征的发作,降低疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状或特征的严重程度,和/或降低疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状或特征的发生率。

[0076] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”意指当作为治疗方案的一部分施用时引发所希望的生物反应的物质(例如,治疗剂、组合物和/或配制品)的量。在一些实施例中,物质的治疗有效量是当施用于患有或易患疾病、障碍和/或病症(例如,肌肉营养不良)的受试者时,足以治疗、诊断、预防、和/或延迟疾病、障碍和/或病症的发作的量。如本领域的普通技术人员将理解,物质的有效量可取决于以下这类因素变化:如所希望的生物学终点、待递送的物质、靶细胞或组织等。例如,用于治疗疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的配制品中化合物的有效量是缓解、改善、减轻、抑制、预防、延迟疾病、障碍、和/或病症的一个或多个症状或特征的发作,降低疾病、障碍、和/或病症的一个或多个症状或特征的严重程度,和/或降低疾病、障碍、和/或病症的一个或多个症状或特征的发生率的量。在一些实施例中,以单个剂量施用治疗有效量;在一些实施例中,利用多个单位剂量以递送治疗有效量。

[0077] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treat、treatment、或treating)”是指用于部分地或完全缓解、改善、减轻、抑制、预防、延迟疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状或特征的发作,降低疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状或特征的严重程度,和/或降低疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的一个或多个症状或特征的发生率的任何方法。治疗可以施用于未表现出疾病、障碍、和/或病症(例如,肌肉营养不良)的迹象的受试者。在一些实施例中,治疗可以施用给仅表现出疾病、障碍、和/或病症的早期迹象的受试者,例如出于降低与疾病、障碍、和/或病症相关的病理学风险的目的。

[0078] 单位剂量:如本文所用,表述“单位剂量”是指作为单个剂量和/或以药物组合物的物理离散单位施用的量。在很多实施例中,单位剂量含有预定量的活性剂。在一些实施例中,单位剂量含有整个单个剂量的药剂。在一些实施例中,施用多于一个单位剂量以实现总单个剂量。在一些实施例中,需要或预期需要施用多个单位剂量,以实现预期的效果。单位剂量可以是例如含有预定量的一种或多种治疗剂、预定量的固体形式的一种或多种治疗剂的一定体积的液体(例如,可接受的载体),含有预定量的一种或多种治疗剂等的持续释放配制品或药物递送装置。应当理解,单位剂量可以存在于配制品中,该配制品除了一种或多种治疗剂之外,还包括任何各种组分。例如,如下文所述,可包括可接受的载体(例如,药学上可接受的载体)、稀释剂、稳定剂、缓冲剂、防腐剂等。本领域技术人员将理解,在很多实施例中,特定的治疗剂的总适当日剂量可包含一部分或多个单位剂量,并且可由例如在合理

的医学判断范围内的主治医师决定。在一些实施例中,对于任何特定受试者或生物体的特定的有效剂量水平将取决于多种因素,这些因素包括正在治疗的障碍和障碍的严重程度;所采用的特定的活性化合物的活性;所采用的特定的组合物;受试者的年龄、体重、总体健康、性别和饮食;施用时间,和所采用的特定的活性化合物的排泄率;治疗的持续时间;与所采用的特定化合物组合或一致使用的药物和/或另外的疗法,以及医学领域中熟知的相似因素。

[0079] 不饱和的:如本文所用,术语“不饱和的”意指具有一个或多个不饱和单元的部分。

[0080] 野生型:如本文所用的术语“野生型”具有其本领域理解的含义,是指具有在“正常”(与突变体、患病、改变等对比)状态或背景中在自然界中发现的结构和/或活性的实体。本领域普通技术人员将理解,野生型基因和多肽通常以多种不同形式(例如,等位基因)存在。

[0081] 核酸:术语“核酸”包括任何核苷酸、其类似物、和其聚合物。如本文所用,术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA)或其类似物)的聚合形式。这些术语是指分子的一级结构,并且包括双链DNA和单链DNA、以及双链RNA和单链RNA。这些术语包括作为RNA或DNA的等效物、类似物,其由核苷酸类似物和经修饰的多核苷酸(例如但不限于甲基化、保护和/或加帽的核苷酸或多核苷酸)制成。该术语涵盖多核糖核苷酸或寡核糖核苷酸(RNA)和多脱氧核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸(DNA);衍生自核碱基和/或经修饰的核碱基的N-糖昔或C-糖昔的RNA或DNA;衍生自糖和/或经修饰的糖的核酸;和衍生自磷酸桥和/或经修饰的磷-原子桥的核酸(在本文中也称为“核苷酸间键联”)。该术语涵盖含有核碱基、经修饰的核碱基、糖、经修饰的糖、天然的天然磷酸核苷酸间键联或非天然核苷酸间键联的任何组合的核酸。实例包括但不限于含有核糖部分的核酸、含有脱氧核糖部分的核酸、含有核糖和脱氧核糖两者部分的核酸、含有核糖和经修饰核糖部分的核酸。除非另有说明,否则前缀“多(poly-)”是指含有2至约10,000个核苷酸单体单元的核酸,并且其中前缀“寡(oligo-)”是指含有2至约200个核苷酸单体单元的核酸。

[0082] 核苷酸:如本文所用,术语“核苷酸”是指多核苷酸的单体单元,其由杂环碱基、糖、和一个或多个磷酸基团、或含磷的核苷酸间键联组成。天然存在的碱基(鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、和尿嘧啶(U))是嘌呤或嘧啶的衍生物,但应该理解为还包括天然地和非天然存在的碱基类似物。天然存在的糖包括戊糖(五碳糖)脱氧核糖(发现于天然DNA中)或核糖(发现于天然RNA中),但应理解为还包括天然和非天然存在的糖类似物,如具有2'-修饰的糖、锁核酸(LNA)中的糖、和磷二酰胺吗啉代寡聚物(phosphorodiamidate morpholino oligomer,PMO)。将核苷酸经由核苷酸间键联进行连接以形成核酸、或多核苷酸。许多核苷酸间键联是本领域已知的(例如但不限于天然磷酸酯键联、硫代磷酸酯键联、硼烷磷酸酯键联等)。人工核酸包括PNA(肽核酸)、磷酸三酯、硫代磷酸酯、H-膦酸酯、氨基膦酸酯、硼烷磷酸酯、甲基膦酸酯、膦酰基乙酸酯(phosphonoacetate)、硫代膦酰基乙酸酯、及天然核酸的磷酸酯骨架的其他变体等。在一些实施例中,核苷酸是包含天然存在的核碱基、天然存在的糖、和天然磷酸酯键联的天然核苷酸。在一些实施例中,核苷酸是经修饰的核苷酸或核苷酸类似物,其是可用于代替天然核苷酸的结构类似物。

[0083] 经修饰的核苷酸:术语“经修饰的核苷酸”包括在结构上与天然核苷酸不同但能执行天然核苷酸的至少一种功能的任何化学部分。在一些实施例中,经修饰的核苷酸包含在

糖、碱基和/或核苷酸间键联处的修饰。在一些实施例中，经修饰的核苷酸包含经修饰的糖、经修饰的核碱基、和/或经修饰的核苷酸间键联。在一些实施例中，经修饰的核苷酸能够具有核苷酸的至少一种功能，例如，在能够与包含至少互补碱基序列的核酸碱基配对的聚合物中形成亚基。

[0084] 类似物：术语“类似物”包括在结构上与参考化学部分或部分的类别不同但能执行此类参考化学部分或部分的类别的至少一种功能的任何化学部分。作为非限制性实例，核苷酸类似物在结构上与核苷酸不同，但能执行核苷酸的至少一种功能；核碱基类似物在结构上与核碱基不同，但能执行核碱基的至少一种功能；糖类似物在结构上与核碱基不同，但能执行糖的至少一种功能等。

[0085] 核苷：术语“核苷”是指其中核碱基或经修饰的核碱基与糖或经修饰的糖共价结合的部分。

[0086] 经修饰的核苷：术语“经修饰的核苷”是指与天然核苷在化学上不同的，但能执行核苷的至少一种功能的化学部分。在一些实施例中，经修饰的核苷衍生自天然核苷或与天然核苷在化学上相似，但其包含使其与天然核苷有区别的化学修饰。经修饰的核苷的非限制性实例包括在碱基和/或糖处包含修饰的那些。经修饰的核苷的非限制性实例包括在糖上具有2'-修饰的那些。经修饰的核苷的非限制性实例还包括无碱基核苷（其缺乏核碱基）。在一些实施例中，经修饰的核苷能够具有核苷的至少一种功能，例如，在能够与包含至少互补碱基序列的核酸碱基配对的聚合物中形成部分。

[0087] 核苷类似物：术语“核苷类似物”是指与天然核苷在化学上不同但能执行核苷的至少一种功能的化学部分。在一些实施例中，核苷类似物包含糖的类似物和/或核碱基的类似物。在一些实施例中，经修饰的核苷能够具有核苷的至少一种功能，例如，在能够与包含互补碱基序列的核酸碱基配对的聚合物中形成部分。

[0088] 糖：术语“糖”是指呈封闭和/或开放形式的单糖或多糖。在一些实施例中，糖是单糖。在一些实施例中，糖是多糖。糖包括但不限于核糖、脱氧核糖、戊呋喃糖、戊吡喃糖、和己吡喃糖部分。如本文所用，术语“糖”还涵盖用于代替常规糖分子的结构类似物，如二醇、形成核酸类似物的骨架的聚合物、二醇核酸（“GNA”）等。如本文所用，术语“糖”还涵盖用于代替天然核苷酸或天然存在的核苷酸的结构类似物，如经修饰的糖和核苷酸糖。在一些实施例中，糖是D-2-脱氧核糖。在一些实施例中，糖是 $\beta$ -D-脱氧呋喃核糖。在一些实施例中，糖部分是 $\beta$ -D-脱氧呋喃核糖部分。在一些实施例中，糖是D-核糖。在一些实施例中，糖是 $\beta$ -D-呋喃核糖。在一些实施例中，糖部分是 $\beta$ -D-呋喃核糖部分。在一些实施例中，糖是任选地经取代的 $\beta$ -D-脱氧呋喃核糖或 $\beta$ -D-呋喃核糖。在一些实施例中，糖部分是任选地经取代的 $\beta$ -D-脱氧呋喃核糖或 $\beta$ -D-呋喃核糖部分。在一些实施例中，寡核苷酸（例如，DMD寡核苷酸）、核酸等中的糖部分/单元是包含各自独立地与核苷酸间键联连接的一个或多个碳原子的糖，例如，任选地经取代的 $\beta$ -D-脱氧呋喃核糖或 $\beta$ -D-呋喃核糖，这些糖5'-C和/或3'-C各自独立地与核苷酸间键联（例如，天然磷酸酯键联、经修饰的核苷酸间键联、手性受控的核苷酸间键联等）连接。

[0089] 经修饰的糖：术语“经修饰的糖”是指可以替换糖的部分。经修饰的糖模拟糖的空间排列、电子特性、或一些其他物理化学特性。在一些实施例中，经修饰的糖是经取代的 $\beta$ -D-脱氧呋喃核糖或 $\beta$ -D-呋喃核糖。在一些实施例中，经修饰的糖包含2'-修饰。在一些实施

例中,经修饰的糖包含与两个糖碳原子(例如,C2和C4)连接的接头(例如,任选地经取代的二价杂脂肪族),例如,发现于LNA中。在一些实施例中,接头是-0-CH(R)-,其中R如本披露中所述。在一些实施例中,接头是-0-CH(R)-,其中0与C2连接,并且-CH(R)-与糖的C4连接,并且R如本披露中所述。在一些实施例中,R是甲基。在一些实施例中,R是-H。在一些实施例中,-CH(R)-是S构型。在一些实施例中,-CH(R)-是R构型。

[0090] 核碱基:术语“核碱基”是指参与氢键合的核酸部分,氢键合以序列特异性方式将一条核酸链与另一条互补链结合。最常见的天然存在的核碱基是腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)、和胸腺嘧啶(T)。在一些实施例中,经修饰的核碱基是经取代的核碱基,该核碱基选自A、T、C、G、U、及其互变异构体。在一些实施例中,天然存在的核碱基是经修饰的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶、或胸腺嘧啶。在一些实施例中,天然存在的核碱基是甲基化的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶、或胸腺嘧啶。在一些实施例中,核碱基是“经修饰的核碱基”,例如,除腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)、和胸腺嘧啶(T)之外的核碱基。在一些实施例中,经修饰的核碱基是甲基化的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶、或胸腺嘧啶。在一些实施例中,经修饰的核碱基模拟核碱基的空间排列、电子特性或一些其他物理化学特性,并保留氢键合的特性,氢键合以序列特异性方式将一条核酸链与另一条核酸链结合。在一些实施例中,经修饰的核碱基可与所有五种天然存在的碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、或鸟嘌呤)配对,而基本上不影响熔解行为、被细胞内酶识别、或寡核苷酸双链体的活性。如本文所用,术语“核碱基”还涵盖用于代替天然核苷酸或天然存在的核苷酸的结构类似物,如经修饰的核碱基和核碱基类似物。在一些实施例中,核碱基是任选地经取代的A、T、C、G、或U、或者经取代的核碱基,该核碱基选自A、T、C、G、或U及其互变异构体。

[0091] 经修饰的核碱基:术语“经修饰的核碱基”、“经修饰的碱基”等是指与核碱基化学上不同的,但是能执行核碱基的至少一种功能的化学部分。在一些实施例中,经修饰的核碱基是包含修饰的核碱基。在一些实施例中,经修饰的核碱基能够具有核碱基的至少一种功能,例如,在能够与包含至少互补碱基序列的核酸碱基配对的聚合物中形成部分。在一些实施例中,经修饰的核碱基是经取代的核碱基,该核碱基选自A、T、C、G、U、及其互变异构体。

[0092] 手性配体:术语“手性配体”或“手性助剂”是指为手性的部分并且可以结合到反应中,使得反应能以某些立体选择性进行。在一些实施例中,术语还可以是指包含此类部分的化合物。

[0093] 阻断基团:术语“阻断基团”是指掩蔽官能团反应性的基团。随后可以通过去除阻断基团来掩蔽官能团。在一些实施例中,阻断基团是保护基团。

[0094] 部分:术语“部分”是指分子的特定的区段或官能团。化学部分通常是嵌入或附加于分子的公认的化学实体。在一些实施例中,化合物的部分是通过从化合物中去除一个或多个-H和/或其等效物而由化合物形成的单价、二价或多价基团。在一些实施例中,取决于其上下文,“部分”还可以指化合物或实体,从该化合物或实体衍生出部分。

[0095] 固体支持物:当核酸、寡核苷酸、或其他化合物的制剂的上下文中使用时,术语“固体支持物”是指能够合成核酸、寡核苷酸、或其他化合物的任何支持物。在一些实施例中,该术语是指玻璃或聚合物,其不溶于在合成核酸进行的反应步骤中使用的介质,并且衍生化以包含反应性基团。在一些实施例中,固体支持物是高度交联的聚苯乙烯(HCP)或可控孔度

玻璃(CPG)。在一些实施例中，固体支持物是可控孔度玻璃(CPG)。在一些实施例中，固体支持物是可控孔度玻璃(CPG)和高度交联的聚苯乙烯(HCP)的杂合支持物。

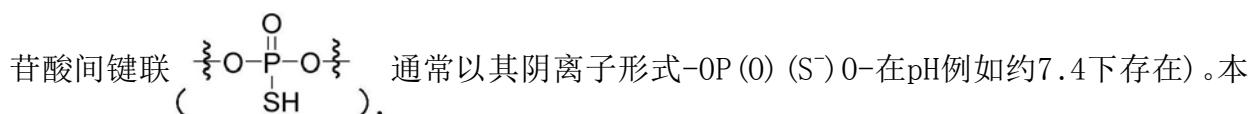
[0096] 读框：术语“读框”是指双链的DNA分子的六个可能的读框之一，每个方向三个。用于确定哪些密码子用于编码氨基酸的读框在DNA分子编码序列内。

[0097] 反义：如本文所用，“反义”核酸分子包含核苷酸序列，其与编码蛋白质的“有义”核酸互补，例如与双链cDNA分子的编码链互补、与mRNA序列互补或与基因的编码链互补。因此，反义核酸分子可以经由氢与有义核酸分子键合。在一些实施例中，可以从两条链产生转录物(例如，DMD转录物)。在一些实施例中，转录物可以编码或可以不编码蛋白质产物。在一些实施例中，当针对或靶向特定的核酸序列时，“反义”序列可以是指与特定的核酸序列互补的序列。

[0098] 寡核苷酸：术语“寡核苷酸”是指核苷酸单体的聚合物或低聚物，该核苷酸单体含有核碱基、经修饰的核碱基、糖、经修饰的糖、天然磷酸酯键联、或非天然核苷酸间键联的任何组合。

[0099] 本披露的寡核苷可具有各种长度。在特定的实施例中，寡核苷的长度范围可以从约20至约200个核苷。在多个相关实施例中，(单链的、双链的、和三链的)寡核苷的长度范围可以从约4至约10个核苷、从约10至约50个核苷、从约20至约50个核苷、从约15至约30个核苷、从约20至约30个核苷。在一些实施例中，寡核苷的长度为从约9至约39个核苷。在一些实施例中，寡核苷的长度为至少15个核苷。在一些实施例中，寡核苷的长度为至少20个核苷。在一些实施例中，寡核苷的长度为至少25个核苷。在一些实施例中，寡核苷的长度为至少30个核苷。在一些实施例中，寡核苷是长度为至少18个核苷的互补链的双链体。在一些实施例中，寡核苷是长度为至少21个核苷的互补链的双链体。在一些实施例中，出于寡核苷酸长度的目的，独立计数的每个核苷包含选自A、T、C、G、U及其互变异构体的任选地经取代的核碱基。

[0100] 核苷酸间键联：如本文所用，短语“核苷酸间键联”通常是指核酸的或者寡核苷酸的核苷酸单元之间的键联(通常含磷的键联)，并且与如上文和本文使用的“糖间键联”、“核苷间键联”、和“磷原子桥”可互换地使用。如本领域技术人员所理解的，天然DNA和RNA含有天然磷酸酯键联。在一些实施例中，核苷酸间键联是天然磷酸酯键联(-OP(0)(OH)O-)，在pH例如约7.4下以其阴离子形式-OP(0)(O-)O-存在)，如在天然存在的DNA和RNA分子中发现的。在一些实施例中，核苷酸间键联是经修饰的核苷酸间键联(或非天然核苷酸间键联)，其与天然磷酸酯键联结构上不同，但可以用于代替天然磷酸酯键联，例如，硫代磷酸酯核苷酸间键联、PMO键联等。在一些实施例中，核苷酸间键联是经修饰的核苷酸间键联，其中天然磷酸二酯键联的一个或多个氧原子独立地被一个或多个有机或无机部分替换。在一些实施例中，此种有机或无机部分选自但不限于=S、=Se、=NR'、-SR'、-SeR'、-N(R')<sub>2</sub>、B(R')<sub>3</sub>、-S-、-Se-和-N(R')-，其中每个R'独立地如下文所定义和描述的。在一些实施例中，核苷酸间键联是磷酸三酯键联。在一些实施例中，核苷酸间键联是硫代磷酸二酯键联(硫代磷酸酯核



领域普通技术人员理解，由于键联中存在酸或碱部分，核苷酸间键联可以在给定pH下作为

阴离子或阳离子存在。

[0101] 除非另有说明,否则寡核苷酸序列之前的Rp/Sp标识描述了在手性受控的核苷酸间键联(寡核苷酸序列的按顺序从5'至3')中的键联磷的构型。

[0102] 寡核苷酸类型:如本文所用,短语“寡核苷酸类型”用于定义具有以下的寡核苷酸:特定碱基序列、骨架键联模式(即,核苷酸间键联类型(例如,天然磷酸酯键联、硫代磷酸酯核苷酸间键联、负电荷的核苷酸间键联、中性核苷酸间键联等)模式)、骨架手性中心模式(即,键联磷立体化学(Rp/Sp)模式)、和骨架磷修饰模式。在一些实施例中,具有共同指定的“类型”的寡核苷酸彼此在结构上相同。

[0103] 本领域技术人员将理解,本披露的合成方法在合成寡核苷酸(例如,DMD寡核苷酸)链期间提供一定程度的控制,使得可以提前设计和/或选择寡核苷酸链的每个核苷酸单元以在键联磷处具有特定的立体化学和/或在键联磷处具有特定的修饰、和/或具有特定的碱基、和/或具有特定的糖。在一些实施例中,提前设计和/或选择寡核苷酸链以在键联磷处具有立体中心的特定组合。在一些实施例中,设计和/或确定寡核苷酸链以在键联磷处具有修饰的特定组合。在一些实施例中,设计和/或选择寡核苷酸链以具有碱基的特定组合。在一些实施例中,设计和/或选择寡核苷酸链以具有一个或多个以上结构特征的特定组合。本披露提供了包含多种寡核苷酸分子(例如,手性受控的寡核苷酸组合物)或由其组成的组合物。在一些实施例中,所有此类分子是相同的类型。在一些实施例中,所有此类分子彼此在结构上相同。在一些实施例中,提供的组合物包含不同类型的多种寡核苷酸,通常以预定的(非随机)相对量。在一些实施例中,寡核苷酸是如本文所述的DMD寡核苷酸。

[0104] 手性受控:如本文所用,“手性受控”是指控制寡核苷酸(例如,DMD寡核苷酸)内的手性核苷酸间键联中的手性键联磷的立体化学标识。在一些实施例中,通过寡核苷酸的糖和碱基部分中不存在的手性元件实现控制,例如,在一些实施例中,通过在寡核苷酸制备期间使用一种或多种手性助剂实现控制,如在本披露中例示的,手性助剂通常是寡核苷酸制备期间使用的手性亚磷酰胺的一部分。与手性受控相比,本领域普通技术人员认识到,如果使用常规寡核苷酸合成来形成手性核苷酸间键联,则不使用手性助剂的这样的常规寡核苷酸合成不能控制手性核苷酸间键联处的立体化学。在一些实施例中,控制了寡核苷酸内手性核苷酸间键联中每个手性键联磷的立体化学标识。

[0105] 手性受控的寡核苷酸组合物:如本文所用,术语“手性受控(立体控制的或立体定义的)的寡核苷酸组合物”、“手性受控(立体控制的或立体定义的)的核酸组合物”等是指包含多种寡核苷酸(或核酸、手性受控的寡核苷酸或手性受控的核酸)的组合物,该多种寡核苷酸(或核酸、手性受控的寡核苷酸或手性受控的核酸)共享:1)共同的碱基序列,2)共同的骨架键联模式;3)共同的骨架手性中心模式以及4)共同的骨架磷修饰模式(特定类型的寡核苷酸),其中该多种寡核苷酸(或核酸)在一个或多个手性核苷酸间键联(手性受控的核苷酸间键联,其手性键联磷呈Rp或Sp,而非如同非手性受控的核苷酸间键联一样的随机Rp和Sp混合物)处共享相同的立体化学。手性受控的寡核苷酸组合物中多种寡核苷酸(或核酸)的水平是非随机的(预先确定的、受控制的)。手性受控的寡核苷酸组合物通常通过手性受控的寡核苷酸制剂进行制备,以立体选择性地形成一个或多个手性核苷酸间键联(例如,使用本披露中例示的手性助剂,与非手性受控的(立体随机、非立体选择性、外消旋)寡核苷酸合成(如,使用非手性助剂或手性催化剂的传统的基于亚磷酰胺的寡核苷酸合成)相比以有

目的地控制立体选择性)。相对于具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式、和共同的骨架磷修饰模式的寡核苷酸的基本上外消旋制剂，手性受控的寡核苷酸组合物富集多种寡核苷酸。在一些实施例中，手性受控的寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定寡核苷酸类型的多种寡核苷酸：1) 碱基序列；2) 骨架键联模式；3) 骨架手性中心模式；以及4) 骨架磷修饰模式，其中相对于具有相同的碱基序列、骨架键联模式、和骨架磷修饰模式的寡核苷酸的基本上外消旋制剂，该手性受控的寡核苷酸组合物富集特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。如本领域普通技术人员容易理解的，这种富集的特征在于：与基本上外消旋制剂相比，在每个手性受控的核苷酸间键联处，较高水平的键联磷具有所希望的构型。在一些实施例中，每个手性受控的核苷酸间键联相对于其手性键联磷独立地具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的非对映纯度。在一些实施例中，各自独立地具有至少90%的非对映纯度。在一些实施例中，各自独立地具有至少95%的非对映纯度。在一些实施例中，各自独立地具有至少97%的非对映纯度。在一些实施例中，各自独立地具有至少98%的非对映纯度。在一些实施例中，多种中的寡核苷酸具有相同的构造。在一些实施例中，多种中的寡核苷酸具有相同的构造和立体化学，并且在结构上相同。

[0106] 在一些实施例中，手性受控的寡核苷酸组合物中的多种寡核苷酸共享相同的碱基序列，如果有的话，相同的核碱基、糖、和核苷酸间键联修饰，以及独立地在一个或多个手性受控的核苷酸间键联的键联磷手性中心处的相同的立体化学(Rp或Sp)，尽管某些键联磷手性中心的立体化学可以不同。在一些实施例中，手性受控的寡核苷酸组合物中的所有寡核苷酸的约0.1%-100% (例如，约1%-100%、5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、95%-100%、50%-90%、或约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%、或至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%) 是该多种寡核苷酸。在一些实施例中，在共享共同的碱基序列的手性受控的寡核苷酸组合物中的所有寡核苷酸的约0.1%-100% (例如，约1%-100%、5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、95%-100%、50%-90%、或约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%、或至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%) 是该多种寡核苷酸。在一些实施例中，在共享共同的碱基序列、共同的骨架键联模式、和共同的骨架磷修饰模式的手性受控的寡核苷酸组合物中的所有寡核苷酸的约0.1%-100% (例如，约1%-100%、5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、95%-100%、50%-90%、或约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%、或至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%) 是该多种寡核苷酸。在一些实施例中，手性受控的寡核苷酸组合物中的所有寡核苷酸的，或在共享共同的碱基序列的组合物中的所有寡核苷酸(例如，多种寡核苷酸或寡核苷酸类型)的，或在共享共同的碱基序列、共同的骨架键联模式、和共同的骨架磷修饰模式的组合物中的所有寡

核苷酸(例如,多种寡核苷酸或寡核苷酸类型)的,或在共享共同的碱基序列、共同的碱基修饰模式、共同的糖修饰模式、共同的核苷酸间键联类型模式、和/或共同的核苷酸间键联修饰模式生物组合物中的所有寡核苷酸(例如,多种寡核苷酸或寡核苷酸类型)的,或在共享相同的构造的组合物中的所有寡核苷酸的约0.1%-100%(例如,约1%-100%、5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、95%-100%、50%-90%、或约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%、或至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%)是该多种寡核苷酸。在一些实施例中,百分比为至少(DP)<sup>NCI</sup>,其中DP是选自85%-100%的百分比,并且NCI是手性受控的核苷酸间键联的数量。在一些实施例中,DP是至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%。在一些实施例中,DP是至少85%。在一些实施例中,DP是至少90%。在一些实施例中,DP是至少95%。在一些实施例中,DP是至少96%。在一些实施例中,DP是至少97%。在一些实施例中,DP是至少98%。在一些实施例中,DP是至少99%。在一些实施例中,DP反映了键联磷手性中心手性受控的核苷酸间键联的非对映纯度。在一些实施例中,可以通常使用包含这种核苷酸间键联和适当的二聚体(被核苷酸间键联连接的两个核苷单元)来评估核苷酸间键联的键联磷手性中心的非对映纯度。在一些实施例中,多种寡核苷酸在约1-50个(例如,约1-10、1-20、5-10、5-20、10-15、10-20、10-25、10-30,或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个)手性核苷酸间键联处共享相同的立体化学。在一些实施例中,多种寡核苷酸在约0.1%-100%(例如,约1%-100%、5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100%、90%-100%、95%-100%、50%-90%、约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%、或至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或99%)的手性核苷酸间键联处共享相同的立体化学。在一些实施例中,每个手性核苷酸间键联是手性受控的核苷酸间键联,并且组合物是完全手性受控的寡核苷酸组合物。在一些实施例中,不是所有的手性核苷酸间键联都是手性受控的核苷酸间键联,并且组合物是部分地手性受控的寡核苷酸组合物。在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物包含预定水平的单独的寡核苷酸或核酸类型。例如,在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物包含在预定水平的(例如,如上文描述的)一个寡核苷酸类型。在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物包含超过一种寡核苷酸类型,各自独立地在预定水平。在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物包含多种寡核苷酸类型,各自独立地在预定水平。在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物是寡核苷酸类型的寡核苷酸的组合物,该组合物包含预定水平的寡核苷酸类型的多种寡核苷酸。在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物是包含多种DMD寡核苷酸的手性受控的DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中,手性受控的寡核苷酸组合物是DMD寡核苷酸类型的寡核苷酸的组合物。

[0107] 手性纯:如本文所用,短语“手性纯”用于描述寡核苷酸或其组合物,其中全部或几乎所有的寡核苷酸分子(其余为杂质)相对于键联磷原予以单个非对映异构形式存在。在很

多实施例中,如本领域技术人员所理解的,手性纯寡核苷酸组合物基本上是纯的,因为组合物中基本上所有寡核苷酸在结构上相同(是相同的立体异构体)。

[0108] 键联磷:如本文所定义,短语“键联磷”用于指示所提及的特定磷原子是核苷酸间键联中存在的磷原子,该磷原子对应于天然磷酸酯键联的磷原子,如在天然存在的DNA和RNA中存在。在一些实施例中,键联磷原子在经修饰的核苷酸间键联中。.在一些实施例中,键联磷原子是手性的。

[0109] 出于本披露的目的,化学元素根据以下来鉴别:Periodic Table of the Elements[元素周期表],CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics[化学与物理手册],第67版,1986-87,内封面。

[0110] 除非另有说明,否则包括化合物(例如,DMD寡核苷酸、药剂等)的盐(如,药学上可接受的酸或碱加成盐)、立体异构形式、和互变异构形式。除非另有说明,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”以及“该(the)”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确地指示(反之亦然)。因此,例如,提及的“一种化合物”可以包括多种此类化合物。

## 具体实施方式

[0111] 合成的寡核苷酸在各种应用中提供有用的分子工具。例如,寡核苷酸可用于治疗、诊断、研究、和新的纳米材料应用。天然存在的核酸(例如,未经修饰的DNA或RNA)的使用受到限制,例如,它们对内切核酸酶和外切核酸酶的易感性。因此,已研发出各种合成对应物来避开这些缺点。这些包括合成的寡核苷酸,这些合成的寡核苷酸含有化学修饰(例如,碱基修饰、糖修饰、骨架修饰等),这些化学修饰尤其使这些分子不易降解并改善寡核苷酸(例如,DMD寡核苷酸)的其他特性。化学修饰也可能导致某些不希望的效果,例如增加的毒性等。从结构的角度来看,对天然磷酸酯键联的修饰可以引入手性,并且寡核苷酸的某些特性可能受到形成寡核苷酸的骨架的磷原子构型的影响。

[0112] 在一些实施例中,本披露涉及DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物,其具有与DMD靶核酸至少部分地互补的序列,并且在一些实施例中,其能够介导DMD外显子的跳读。在一些实施例中,DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物能够介导DMD外显子51或53的跳读。

[0113] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物包含对核苷酸间键联(例如,骨架)、糖、和/或核碱基的任何各种修饰。

[0114] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物是本文披露的(例如,在表A1中的)任何DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物。

[0115] 在一些实施例中,骨架(例如,磷原子的构型)的手性、或包括在骨架中的天然磷酸酯键联或非天然核苷酸间键联、和/或糖和/或核碱基的修饰、和/或添加化学部分可以影响DMD寡核苷酸的特性和活性,这些特性和活性例如,DMD寡核苷酸(例如,与肌营养不良蛋白(DMD)DMD转录物序列反义的DMD寡核苷酸)跳读DMD外显子51或DMD外显子53的能力、和/或DMD寡核苷酸的其他特性(包括但不限于增加的稳定性、改进的药代动力学、和/或减少的免疫原性等)。用于评估提供的化合物(例如,DMD寡核苷酸)及其组合物的特性和/或活性的适合的测定是本领域广泛已知的,并且可以依照本披露使用。

[0116] 在一些实施例中,DMD转录物是前mRNA。在一些实施例中,剪接产物是成熟RNA。在一些实施例中,剪接产物是mRNA。在一些实施例中,剪接调节或改变包含DMD外显子51或DMD

外显子53的跳读。

[0117] 在一些实施例中，提供的组合物中的提供的DMD寡核苷酸(例如，多种中的DMD寡核苷酸)包含碱基修饰、糖修饰和/或核苷酸间键联修饰。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含碱基修饰和糖修饰。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含碱基修饰和核苷酸间键联修饰。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含糖修饰和核苷酸间修饰。在一些实施例中，提供的组合物包含碱基修饰、糖修饰和核苷酸间键联修饰。示例化学修饰(如碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联修饰等)是本领域广泛已知的，其包括但不限于此披露中描述的那些。在一些实施例中，经修饰的碱基是经取代的A、T、C、G或U。在一些实施例中，糖修饰是2'-修饰。在一些实施例中，2'-修饰是2-F修饰。在一些实施例中，2'-修饰是2'-OR<sup>1</sup>，其中R<sup>1</sup>不是氢。在一些实施例中，2'-修饰是2'-OR<sup>1</sup>，其中R<sup>1</sup>是任选地经取代的烷基。在一些实施例中，2'-修饰是2'-OMe。在一些实施例中，2'-修饰是2'-MOE。在一些实施例中，经修饰的糖部分是桥连双环或多环。在一些实施例中，经修饰的糖部分是具有5-20个环原子的桥连双环或多环，其中一个或多个环原子任选地且独立地是杂原子。示例环结构是本领域广泛已知的，如在BNA、LNA等中发现的那些。

[0118] 在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核苷酸间键联。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个手性经修饰的核苷酸间键联。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个手性受控的手性经修饰的核苷酸间键联。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个天然磷酸酯键联。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核苷酸间键联和一个或多个天然磷酸酯键联。在一些实施例中，经修饰的核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联。在一些实施例中，每个经修饰的核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联。

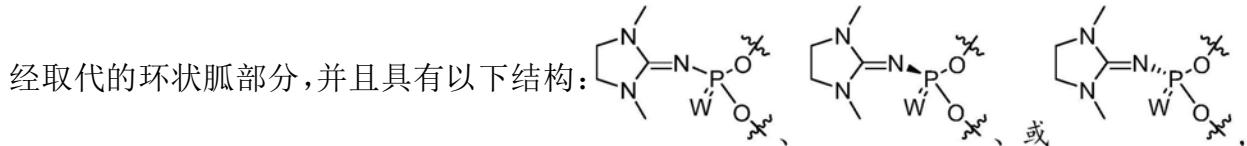
[0119] 在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核苷酸间键联和一个或多个天然磷酸酯键联两者。在一些实施例中，包含经修饰的核苷酸间键联和天然磷酸酯键联两者的DMD寡核苷酸及其组合物提供改善的特性，例如，外显子51或53的跳读和毒性等。在一些实施例中，经修饰的核苷酸间键联是手性核苷酸间键联。在一些实施例中，经修饰的核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联。在一些实施例中，经修饰的核苷酸间键联是经取代的硫代磷酸酯键联。

[0120] 除其他事项外，本披露涵盖了以下认识：立体随机DMD寡核苷酸制剂含有多个不同的化学实体，这些化学实体例如，在DMD寡核苷酸链内的单独的骨架键联磷手性中心的立体化学结构上彼此不同。在不控制骨架手性中心的立体化学的情况下，立体随机DMD寡核苷酸制剂提供了不受控的组合物，该不受控的组合物包含相对于不受控的手性中心(例如，手性键联磷)的未确定水平的DMD寡核苷酸立体异构体。尽管这些立体异构体可以具有相同的碱基序列，但至少由于它们不同的骨架立体化学，它们是不同的化学实体，并且如本文所证明的，它们可以具有不同的特性(例如，外显子51或53的跳读、毒性等)。除其他事项外，本披露提供了新的DMD寡核苷酸组合物，其中一个或多个键联磷手性中心的立体化学是独立地受控的(例如，在手性受控的核苷酸间键联中)。在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物，该手性受控的DMD寡核苷酸组合物是或含有目的DMD寡核苷酸的特定的立体异构体。

[0121] 在一些实施例中，在DMD寡核苷酸中，骨架手性中心模式可以提供改善的一种或多

种活性或一种多种特征,这些活性或特征包括但不限于:DMD外显子51或DMD外显子53的改善的跳读、增加的稳定性、增加的活性、低毒性、低免疫应答、改善的蛋白质结合特征、与某些蛋白质增加的结合、和/或增强的递送。

[0122] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个非负电荷的核苷酸间键联。在一些实施例中,非负电荷的核苷酸间键联是带正电荷的核苷酸间键联。在一些实施例中,非负电荷的核苷酸间键联是中性核苷酸间键联。在一些实施例中,经修饰的核苷酸间键联(例如,非负电荷的核苷酸间键联)包含任选地经取代的胍部分。在一些实施例中,经修饰的核苷酸间键联包含任选地经取代的环状胍部分。在一些实施例中,经修饰的核苷酸间键联包含任选地



其中W是0。在一些实施例中,非负电荷的核苷酸间键联是立体化学受控的。

[0123] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸可以与DMD转录物结合,并且通过诱导(例如,介导)外显子51或53的跳读改变DMD转录物的剪接模式。在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸提供了外显子的外显子跳读,效率大于在一个或多个合适的条件(例如,如本文所述的条件)下相当的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,提供的跳读效率是在一个或多个合适的条件(例如,如本文所述的条件)下相当的DMD寡核苷酸的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或更多,或者2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50或更多倍。

[0124] 在一些实施例中,与参考条件相比,提供的手性受控的DMD寡核苷酸组合物出人意料地有效。在一些实施例中,外显子52或53的跳读(例如,如通过所希望的mRNA、蛋白质等的增加的水平,不希望的mRNA、蛋白质等的降低的水平所测量的)可以被增强超过5、10、15、20、25、30、40、50或100倍。在一些实施例中,通过相比于参考条件的所希望的mRNA水平的增加来测量改变。在一些实施例中,通过相比于参考条件的不希望的mRNA水平的降低来测量改变。在一些实施例中,参考条件是不存在DMD寡核苷酸处理。在一些实施例中,参考条件是具有相同碱基序列和化学修饰的DMD寡核苷酸的立体随机组合物。

[0125] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸组合物的特征在于:当该DMD寡核苷酸组合物与DMD转录物剪接系统中的DMD转录物接触时,相对于在参考条件下所观察到的,该DMD转录物的剪接发生改变(例如,外显子51或53发生跳读),这些参考条件选自由以下组成的组:不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合。在一些实施例中,所希望的剪接产物(例如,缺乏外显子51或53的一个产物)增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000倍或更多。在一些实施例中,在参考条件下不存在所希望的剪接参考(例如,不能通过定量PCR可靠地检测)。在一些实施例中,如本披露中所例示,在提供的组合物中的多种DMD寡核苷酸(例如多个DMD寡核苷酸)的水平是预定的。

[0126] 在一些实施例中,具有共同的碱基序列的DMD寡核苷酸可以具有相同的核苷修饰

(例如,糖修饰、碱基修饰等)的模式。在一些实施例中,核苷修饰模式可以通过位置和修饰的组合来表示。在一些实施例中,可以省略所有非手性键联(例如,PO)。在一些实施例中,具有相同的碱基序列的DMD寡核苷酸具有相同的构造。

[0127] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸组合物是手性受控的。

[0128] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸组合物不是立体随机的,并且不是非对映异构体的外消旋制剂。

[0129] 如本领域普通技术人员所理解的,通过核苷酸单体的非立体选择性和/或低立体选择性偶联来制备DMD寡核苷酸的立体随机或外消旋制剂,通常不使用任何手性助剂、手性修饰试剂、和/或手性催化剂。在一些实施例中,在基本上外消旋(或手性不受控的)的DMD寡核苷酸制剂中,所有或大多数偶联步骤不是手性受控的,因为偶联步骤没有特异性地进行以提供增强的立体选择性。DMD寡核苷酸的示例基本上外消旋制剂是从常用的亚磷酰胺DMD寡核苷酸合成(本领域熟知的方法),通过用二硫代四乙基秋兰姆或(TETD)或3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮1,1-二氧化物(BDTD)硫化亚磷酸三酯来制备硫代磷酸酯DMD寡核苷酸。在一些实施例中,DMD寡核苷酸的基本上外消旋制剂提供了基本上外消旋的DMD寡核苷酸组合物(或手性不受控的DMD寡核苷酸组合物)。在一些实施例中,核苷酸单体的至少一个偶联具有低于约60:40、70:30、80:20、85:15、90:10、91:9、92:8、97:3、98:2、或99:1的非对映选择性。在一些实施例中,每个核苷酸间键联独立地具有小于约60:40、70:30、80:20、85:15、90:10、91:9、92:8、97:3、98:2、或99:1的非对映选择性。在一些实施例中,非对映选择性小于约60:40。在一些实施例中,非对映选择性小于约70:30。在一些实施例中,非对映选择性小于约80:20。在一些实施例中,非对映选择性小于约90:10。在一些实施例中,非对映选择性小于约91:9。在一些实施例中,至少一个核苷酸间键联具有小于约90:10的非对映选择性。在一些实施例中,每个核苷酸间键联独立地具有小于约90:10的非对映选择性。在一些实施例中,非手性受控的核苷酸间键联具有不超过90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、或55%的非对映异构体纯度。在一些实施例中,纯度不超过90%。在一些实施例中,纯度不超过85%。在一些实施例中,纯度不超过80%。

[0130] 相反,在手性受控的DMD寡核苷酸组合物中,相对于手性键联磷,至少一种且通常每种手性受控的核苷酸间键联(如,手性受控的DMD寡核苷酸组合物的DMD寡核苷酸的那些)独立地具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的非对映异构体纯度。在一些实施例中,非对映异构体纯度是95%或更多。在一些实施例中,非对映异构体纯度是96%或更多。在一些实施例中,非对映异构体纯度是97%或更多。在一些实施例中,非对映异构体纯度是98%或更多。在一些实施例中,非对映异构体纯度是99%或更多。除其他事项外,本披露的技术通常提供具有高非对映异构体纯度的手性受控的核苷酸间键联。

[0131] 如本领域普通技术人员所理解的,可以通过二聚体形成的非对映选择性/在相同的或相当的条件下形成的二聚体的核苷酸间键联的非对映异构体纯度来评估偶联的非对映选择性或核苷酸间键联的非对映异构体纯度(diastereomeric purity)(非对映纯度),其中二聚体具有相同的5'-和3'-核苷和核苷酸间键联。

[0132] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的(和/或立体化学纯的)DMD寡核苷酸组合物,其包含由具有以下而定义的多种DMD寡核苷酸:

- 1) 共同的碱基序列；
- 2) 共同的骨架键联模式；和

3) 共同的骨架手性中心模式，该组合物是单一DMD寡核苷酸的基本上纯的制剂，因为该组合物中至少约10%的DMD寡核苷酸具有共同的碱基序列和长度、共同的骨架键联模式、和共同的骨架手性中心模式，其中在本文中(例如，在表A1中)提供了寡核苷酸。

[0133] 在一些实施例中，本披露提供了多种DMD寡核苷酸的手性受控的DMD寡核苷酸组合物，其中相对于相同的DMD寡核苷酸的基本上外消旋制剂，该组合物富集单一DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸。在一些实施例中，本披露提供了多种DMD寡核苷酸的手性受控的DMD寡核苷酸组合物，其中相对于相同的DMD寡核苷酸的基本上外消旋制剂，该组合物富集通过以下定义的单一DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸：

- 1) 碱基序列；
- 2) 骨架键联模式；
- 3) 骨架手性中心模式；以及
- 4) 骨架磷修饰模式，其中在本文中(例如，在表A1中)提供了寡核苷酸。

[0134] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物，该手性受控的DMD寡核苷酸组合物包含通过以下定义的特定DMD寡核苷酸类型的多种DMD寡核苷酸：

- 1) 碱基序列；
- 2) 骨架键联模式；
- 3) 骨架手性中心模式；以及
- 4) 骨架磷修饰模式。

其中相对于具有相同碱基序列和长度的DMD寡核苷酸的基本上外消旋制剂，该组合物富集特定DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸，其中在本文中(例如，在表A1中)提供了寡核苷酸。

[0135] 在一些实施例中，DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式和共同的糖修饰模式。在一些实施例中，DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式和共同的碱基修饰模式。在一些实施例中，DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式和共同的核苷修饰模式。在一些实施例中，特定类型的DMD寡核苷酸具有相同的构造。在一些实施例中，DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸是相同的。

[0136] 在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物是DMD寡核苷酸类型的基本上纯的制剂，因为该组合物中并非该DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸在所述DMD寡核苷酸类型的制备过程中(在一些情况下在某些纯化步骤之后)是杂质形式。

[0137] 在一些实施例中，组合物中的DMD寡核苷酸的至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或95%具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式和共同的骨架手性中心模式。

[0138] 在一些实施例中，具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式和共同的骨架手性中心模式的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式。在一些实施例中，具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式和共同的骨架手性中心模式的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式和共同的核苷修饰模式。在一些实施例中，具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式和共同的骨架手性中心模式的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式和共同的糖修饰

模式。在一些实施例中，具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式和共同的骨架手性中心模式的DMD寡核苷酸具有共同的骨架磷修饰模式和共同的碱基修饰模式。在一些实施例中，具有共同的碱基序列、共同的骨架键联模式和共同的骨架手性中心模式的DMD寡核苷酸是相同的。

[0139] 在一些实施例中，DMD寡核苷酸类型的手性受控的DMD寡核苷酸组合物的纯度表示为组合物中的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型的百分比。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约10%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约20%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约30%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约40%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约50%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约60%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约70%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约80%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约90%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约92%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约94%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约95%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约96%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约97%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约98%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的至少约99%的DMD寡核苷酸是DMD寡核苷酸类型。

[0140] 在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物的纯度可以通过其制备过程中的每个偶联步骤的立体选择性被控制。在一些实施例中，偶联步骤具有60%的立体选择性（例如，非对映选择性）（由偶联步骤形成的新的核苷酸间键联的60%具有预期的立体化学）。在这种偶联步骤后，形成的新的核苷酸间键联可以被称为具有60%的纯度。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少60%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少70%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少80%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少85%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少90%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少91%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少92%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少93%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少94%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少95%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少96%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少97%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少98%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有至少99%的立体选择性。在一些实施例中，每个偶联步骤具有几乎100%的立体选择性。

[0141] 在一些实施例中，在提供的组合物中，具有特定DMD寡核苷酸类型(由1)碱基序列；2)骨架键联模式；3)骨架手性中心模式；和4)骨架磷修饰模式定义)的碱基序列的DMD寡核苷酸的至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、97%或99%是特定DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸。在一些实施例中，具有特定DMD寡核苷酸类型的碱基序列、骨架键联模式、和骨架磷修饰模式的DMD寡核苷酸的至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、97%或99%是特定DMD寡核苷酸类型的DMD寡核苷酸。

[0142] 在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含一个或多个手性经修饰的磷酸酯键联。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有包括一个或多个经修饰的骨架键联、碱基和/或糖的DMD寡核苷酸。

[0143] 在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约80%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约85%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约90%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约91%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约92%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约93%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约94%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约95%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约96%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约97%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约98%的立体化学纯度。在一些实施例中，提供的手性受控的(和/或立体化学纯的)制剂具有大于约99%的立体化学纯度。

[0144] 在一些实施例中，一个或多个是一个。在一些实施例中，一个或多个是两个。在一些实施例中，一个或多个是三个。在一些实施例中，一个或多个是四个。在一些实施例中，一个或多个是五个。在一些实施例中，一个或多个是六个。在一些实施例中，一个或多个是七个。在一些实施例中，一个或多个是八个。在一些实施例中，一个或多个是九个。在一些实施例中，一个或多个是十个。在一些实施例中，一个或多个是至少一个。在一些实施例中，一个或多个是至少两个。在一些实施例中，一个或多个是至少三个。在一些实施例中，一个或多个是至少四个。在一些实施例中，一个或多个是至少五个。在一些实施例中，一个或多个是至少六个。在一些实施例中，一个或多个是至少七个。在一些实施例中，一个或多个是至少八个。在一些实施例中，一个或多个是至少九个。在一些实施例中，一个或多个是至少十个。

[0145] 在一些实施例中，碱基序列(例如，多种DMD寡核苷酸的共同的碱基序列、特定DMD寡核苷酸类型的碱基序列等)包含或是与基因或DMD转录物(例如，肌营养不良蛋白或DMD)互补的序列。在一些实施例中，共同的碱基序列包含或是与基因100%互补的序列。

[0146] 在一些实施例中，手性核苷酸间键联的键联磷是手性受控的。在一些实施例中，手性核苷酸间键联是硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施例中，提供的组合物的DMD寡核苷酸中的每个手性核苷酸间键联是硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0147] 如本领域技术人员所理解的，核苷酸间键联、天然磷酸酯键联、硫代磷酸酯核苷酸间键联等能以其盐形式(取决于它们的环境pH)存在。除非另外指明，否则当提及此类核苷酸间键联时，此类盐形式包括在本申请中。

[0148] 在一些实施例中，本披露的DMD寡核苷酸包含一个或多个经修饰的糖部分。在一些实施例中，本披露的DMD寡核苷酸包含一个或多个经修饰的碱基部分。如本领域技术人员所知的并描述在本披露中的，可以将各种修饰引入糖和碱基部分。例如，在一些实施例中，修饰是US 9006198、WO 2014/012081、WO/2015/107425、和WO/2017/062862中描述的修饰，其各自的糖修饰和碱基修饰通过引用并入本文。

### 肌营养不良蛋白

[0149] 在一些实施例中，本披露提供了技术(例如，DMD寡核苷酸、组合物、方法等)，这些技术涉及肌营养不良蛋白(DMD)基因或由其编码的产物(DMD转录物、蛋白质(例如，肌营养不良蛋白质的各种变体)等)。

[0150] 在一些实施例中，本披露提供了技术(包括DMD寡核苷酸和组合物及其使用方法)，这些技术用于治疗肌肉营养不良(包括但不限于杜氏肌肉营养不良(也缩写为DMD)和贝克肌肉营养不良(BMD))。在一些实施例中，DMD包含一个或多个突变。在一些实施例中，此类突变与患有或易患肌肉营养不良的受试者中肌营养不良蛋白质的降低的生物学功能相关。

[0151] 在一些实施例中，肌营养不良蛋白(DMD)基因、或其产物、或其变体或部分可以称为DMD、BMD、CMD3B、DXS142、DXS164、DXS206、DXS230、DXS239、DXS268、DXS269、DXS270、DXS272、MRX85、或肌营养不良蛋白；外部ID:OMIM:300377MGI:94909；同源基因:20856；基因卡(GeneCards):DMD；在人类中:Entrez:1756；Ensembl:ENSG00000198947；UniProt:P11532；RefSeq(mRNA):NM\_000109；NM\_004006；NM\_004007；NM\_004009；NM\_004010；RefSeq(蛋白质):NP\_000100；NP\_003997；NP\_004000；NP\_004001；NP\_004002；位置(UCSC):Chr X:31.1-33.34Mb；在小鼠中:Entrez:13405；Ensembl:ENSMUSG0000045103；UniProt:P11531；RefSeq(mRNA):NM\_007868；NM\_001314034；NM\_001314035；NM\_001314036；NM\_001314037；RefSeq(蛋白质):NP\_001300963；NP\_001300964；NP\_001300965；NP\_001300966；NP\_001300967；位置(UCSC):Chr X:82.95-85.21Mb。

[0152] 据报道，DMD基因含有79个外显子，分布在X染色体上超过230万bp的遗传不动位置(genetic real estate)；然而，据报道仅有大约14,000bp(<1%)用于翻译成蛋白质(编码序列)。据报道，约99.5%的遗传序列(即内含子序列)从230万bp的初始异核RNA DMD转录物中剪接，以提供成熟的14,000bp mRNA，其包括肌营养不良蛋白质产生的所有关键信息。在一些实施例中，患有DMD的患者在DMD基因中具有一个或多个突变，该DMD基因阻止野生型DMD mRNA的适当构建和/或野生型肌营养不良蛋白质的产生，并且患有DMD的患者在他们的肌肉经常显示出显著的肌营养不良蛋白缺乏。

[0153] 在一些实施例中，肌营养不良蛋白DMD转录物(例如，mRNA、或蛋白质)涵盖与可替代的剪接相关或由其产生的那些。例如，在分析骨骼肌、脑和心脏组织中的DMD基因的剪接模式后，报道了肌营养不良蛋白基因的十六种可替代的DMD转录物。Sironi等人2002FEBS

Letters [FEBS 通讯] 517: 163-166。

[0154] 据报道, 肌营养不良蛋白具有若干种同种型。在一些实施例中, 肌营养不良蛋白是指特定的同种型。已经报道了至少三种全长肌营养不良蛋白同种型, 各自由组织-特定的启动子控制。Klamut 等人 1990 Mol. Cell. Biol. [分子生物学杂志] 10: 193-205; Nudel 等人 1989 Nature [自然] 337: 76-78; Gorecki 等人 1992 Hum. Mol. Genet. [人类分子遗传学] 1: 505-510。据报道, 肌肉同种型主要在骨骼肌中表达, 但也在平滑肌和心肌中表达 [Bies, R.D., Phelps, S.F., Cortez, M.D., Roberts, R., Caskey, C.T. 和 Chamberlain, J.S. 1992 Nucleic Acids Res. [核酸研究] 20: 1725-1731], 据报道, 脑肌营养不良蛋白对皮质神经元具有特异性, 但也可在心脏和小脑神经元中检测到, 而据报道, 浦肯野细胞 (Purkinje-cell) 类型几乎占了所有小脑肌营养不良蛋白 [Gorecki 等人 1992 Hum. Mol. Genet. [人类分子遗传学] 1: 505-510]。据报道, 可替代的剪接提供了肌营养不良蛋白多样化的手段: 据报道, 基因的 3' 区域经历了可替代的剪接, 该可替代的剪接产生脑神经元、心脏浦肯野纤维、和平滑肌细胞中的组织特异性 DMD 转录物 [Bies 等人 1992 Nucleic Acids Res. [核酸研究] 20: 1725-1731; 和 Feener 等人 1989 Nature [自然] 338: 509-511], 而在骨骼肌基因的 5' 区域已经报道了 12 种可替代的剪接模式 [Surono 等人 1997 Biochem. Biophys. Res. Commun. [生物化学与生物物理研究通讯] 239: 895-899]。

[0155] 在一些实施例中, 肌营养不良蛋白 mRNA、基因或蛋白质是回复突变型版本。其中, 报告了回复突变型肌营养不良蛋白, 例如在: Hoffman 等人 1990 J. Neurol. Sci. [神经科学杂志] 99: 9-25; Klein 等人 1992 Am. J. Hum. Genet. [美国人类遗传学杂志] 50: 950-959; 以及 Chelly 等人 1990 Cell [细胞] 63: 1239-1348; Arahata 等人 1998 Nature [自然] 333: 861-863; Bonilla 等人 1988 Cell [细胞] 54: 447-452; Fanin 等人 1992 Neur. Disord. [神经发育障碍杂志] 2: 41-45; Nicholson 等人 1989 J. Neurol. Sci. [神经科学杂志] 94: 137-146; Shimizu 等人 1988 Proc. Jpn. Acad. Sci. [美国国家科学院院刊] 64: 205-208; Sicinski 等人 1989 Science [科学] 244: 1578-1580; 以及 Sherratt 等人 Am. J. Hum. Genet. [美国人类遗传学杂志] 53: 1007-1015。

[0156] DMD 基因中的各种突变可以和/或据报道引起肌肉营养不良, 包括外显子 51 或 53 中的一些。

### 肌肉营养不良

[0157] 包含本文所述的一个或多种 DMD 寡核苷酸的组合物可以用于治疗或延迟肌肉营养不良、或其至少一个症状的发作。在一些实施例中, 肌肉营养不良 (MD) 是导致 (增加) 骨骼肌随时间减弱和分解的一组肌肉病症、疾病、或障碍中的任一种。主要影响肌肉的病症、疾病或障碍, 当症状开始时的无力程度以及症状恶化的速度。许多 MD 患者最终将无法行走。在许多情况下, 肌肉营养不良是致命的。一些类型也与其他器官 (包括中枢神经系统) 的问题有关。在一些实施例中, 肌肉营养不良是杜氏肌肉营养不良 (DMD) 或贝克肌肉营养不良 (BMD)。

[0158] 在一些实施例中, 据报道, 杜氏肌肉营养不良的症状是与肌肉萎缩相关的肌肉无力, 其中随意肌肉首先受到影响, 尤其是臀部、骨盆区域、大腿、肩膀和小腿的那些。据报道, 肌肉无力也会在手臂、颈部和其他部位发生。据报道, 小腿经常肿大。据报道, 症状通常出现在六岁之前, 并且可能出现在婴儿早期。报道的其他身体症状是: 走路、踩踏或跑步的尴尬方式 (在一些情况下, 由于小腿肌肉张力增加, 患者倾向于以前脚行走), 频繁跌倒, 疲劳, 运

动技能(例如,跑步、单脚跳跃、双脚跳跃)困难,腰椎脊柱前凸过度、可能导致髋屈肌缩短,不寻常的整体姿势和/或行走、踩踏或跑步的方式,跟腱和腿筋的肌肉挛缩损害功能,进行性行走困难,肌纤维畸形,舌头和小腿肌肉的假性肥大(肿大),神经行为障碍(例如,ADHD)、学习障碍(例如,阅读障碍)的高风险,以及特定认知技能(例如,短期言语记忆)的非进行性弱点,被认为是大脑中缺乏肌营养不良蛋白或肌营养不良蛋白功能失调的结果,最终丧失行走能力(通常在12岁时),骨骼畸形(包括一些情况下的脊柱侧凸),以及从躺着或坐姿起身麻烦。

[0159] 在一些实施例中,据报道,贝克肌肉营养不良(BMD)是由产生缩短但框内DMD转录物的突变引起,导致产生截短的、但具有部分功能的一种或多种蛋白质。据报道,此类一种或多种具有部分功能的蛋白质保留了关键氨基末端,富含半胱氨酸和C末端结构域,但通常缺乏中心杆结构域的元件,据报道该中心杆结构域的功能意义较小。England等人1990Nature[自然],343,180-182。

[0160] 在一些实施例中,BMD表型的范围从轻度DMD到实际上无症状,这取决于精确突变和产生的肌营养不良蛋白的水平。Yin等人2008Hum.Mol.Genet.[人类分子遗传学]17:3909-3918。

[0161] 在一些实施例中,具有框外突变的营养不良患者通常被诊断为具有更严重的杜氏肌肉营养不良,并且具有框内突变的营养不良患者通常被诊断为具有不太严重的贝克肌肉营养不良。然而,少数患有框架内缺失的患者被诊断患有杜氏肌肉营养不良(包括在外显子50或51开始或结束的缺失突变的那些,其编码部分铰链区,如外显子47至51、48至51、和49至53的缺失)。不希望受任何特定理论的束缚,本披露指出尽管存在相同的外显子缺失,但据报道患者与患者之间疾病严重程度的可变性可以与以下有关:特定缺失断点对mRNA剪接效率和/或模式的影响;基因组重排后的翻译或DMD转录效率;和截短的蛋白质结构的稳定性或功能。Yokota等人2009Arch.Neurol.[神经病学年鉴]66:32。

#### 外显子跳读作为用于肌肉营养不良的治疗

[0162] 在一些实施例中,肌肉营养不良的治疗包含使用能够介导肌营养不良蛋白(DMD)外显子51或53的跳读的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗肌肉营养不良的方法,该方法包括向患有该疾病或易患该疾病的受试者施用DMD寡核苷酸、或包含DMD寡核苷酸的组合物。特别地,除其他事项外,本披露证明了,与其他方面相同但非手性受控的DMD寡核苷酸/寡核苷酸组合物相比,手性受控的DMD寡核苷酸/手性受控的DMD寡核苷酸组合物出乎意料地有效调节外显子跳读。在一些实施例中,本披露证明了将一个或多个非负电荷的核苷酸间键联掺入DMD寡核苷酸中可以极大地改善递送和/或整体外显子跳读效率。

[0163] 在一些实施例中,肌肉营养不良的治疗使用DMD寡核苷酸,其中该DMD寡核苷酸能够介导(例如,指导)DMD外显子51或DMD外显子53的跳读。在一些实施例中,DMD寡核苷酸能够介导外显子的跳读,该外显子包含突变(例如,移码、插入、缺失、错义、或无义突变、或其他突变),其中翻译具有跳读的外显子的mRNA产生截短的但功能性(或主要功能性)的DMD蛋白质。

[0164] 在一些实施例中,包含DMD寡核苷酸的组合物可用于治疗中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍。在一些实施例中,本披露涉及治疗中枢神经系统的肌营养不良蛋白

相关的障碍的方法,其中该方法包括向患有中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍的患者施用治疗有效量DMD寡核苷酸的步骤。在一些实施例中,将DMD寡核苷酸在中枢神经系统外部(作为非限制性实例,静脉内或肌肉内)施用患有中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍的患者,并且DMD寡核苷酸能够通过血脑屏障进入中枢神经系统。在一些实施例中,将DMD寡核苷酸直接施用中枢神经系统(作为非限制性实例,经由鞘内、心室内、颅内等递送)。

[0165] 在一些实施例中,中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍、或其症状可以是以下的任一个或多个:智力下降,长期记忆力下降,短期记忆力下降,语言障碍,癫痫,自闭症谱系障碍,注意缺陷多动障碍(ADHD),强迫症,学习问题,行为障碍,脑容量减少,灰质体积减小,较低的白质分数各向异性,较高的白质径向扩散率,颅骨形状的异常,或海马体、苍白球、尾壳核、下丘脑、前连合、导水管周围灰质、内囊、杏仁核、胼胝体、隔核、伏隔核、伞部(fimbria)、脑室、或中脑丘脑的体积和结构的有害改变。在一些实施例中,展示肌肉营养不良的肌肉相关的症状的患者还展示中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍的症状。

[0166] 在一些实施例中,中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍与以下相关、与以下有关系、和/或由以下引起:肌营养不良蛋白基因的基因产物(如全长肌营养不良蛋白或者肌营养不良蛋白的较小同种型,包括但不限于Dp260、Dp140、Dp116、Dp71或Dp40)的水平、活性、表达和/或分布的异常。在一些实施例中,将DMD寡核苷酸施用至肌肉营养不良患者的中枢神经系统中,以改善中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍的一种或多种系统。在一些实施例中,中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍与以下相关、与以下有关系、和/或由以下引起:肌营养不良蛋白基因的基因产物(如全长肌营养不良蛋白或者肌营养不良蛋白的较小同种型,包括但不限于Dp260、Dp140、Dp116、Dp71或Dp40)的水平、活性、表达和/或分布的异常。在一些实施例中,向患有中枢神经系统的肌营养不良蛋白相关的障碍的患者施用DMD寡核苷酸增加肌营养不良蛋白基因的基因产物的水平、活性、和/或表达,和/或改善肌营养不良蛋白基因的基因产物的分布。

[0167] 在一些实施例中,本披露提供了用于调节肌营养不良蛋白前mRNA剪接的技术,其中切除外显子51或外显子53以去除突变。

[0168] 在一些实施例中,在DMD患者中,DMD基因包含外显子(包含突变),并且通过DMD外显子51或DMD外显子53的跳读至少部分地治疗障碍。

[0169] 在一些实施例中,在DMD患者中,DMD基因或DMD转录物在一个或多个外显子中具有突变,该突变是错义或无义突变和/或缺失、插入、反向、易位或复制。

[0170] 在一些实施例中,在肌肉营养不良的治疗中,跳读DMD的外显子(例如,外显子51或53),其中该外显子编码一串对DMD蛋白功能不是必需的氨基酸,或者其跳读可以提供具有完全功能或至少具有部分功能的DMD蛋白质。

[0171] 在一些实施例中,在肌肉营养不良的治疗中,DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子51或53的跳读,从而产生mRNA,从该mRNA可以翻译成人工内部截短的DMD蛋白质变体,该DMD蛋白质变体提供至少部分改善的或完全恢复的生物学活性。

[0172] 在一些实施例中,由具有跳读的外显子51或跳读的外显子53的肌营养不良蛋白DMD转录物产生的内部截短的DMD蛋白质变体比末端截短的DMD蛋白质(例如,由具有框外缺失的肌营养不良蛋白DMD转录物产生)更具功能性。

[0173] 在一些实施例中,由具有跳读的外显子51或跳读的外显子53的肌营养不良蛋白DMD转录物产生的内部截短的DMD蛋白质变体对无义介导的衰变更具抗性,其可降解末端截短的DMD蛋白质(例如,由具有框外缺失的肌营养不良蛋白DMD转录物产生)。

[0174] 在一些实施例中,肌肉营养不良的治疗使用DMD寡核苷酸,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子51或DMD外显子53的跳读。

[0175] 在一些实施例中,本披露涵盖了以下认识:可以利用DMD突变的性质和位置来设计外显子跳读策略。在一些实施例中,如果DMD患者在外显子中具有突变,则跳读突变的外显子可以产生内部截短的(内部缩短的)、但至少具有部分功能的DMD蛋白质变体。

[0176] 在一些实施例中,DMD患者具有改变DMD转录物剪接的突变,例如通过灭活剪接所需的位点、或活化隐蔽位点以使其活化以进行剪接,或通过创建可替代的(例如,不自然)剪接位点。在一些实施例中,这种突变导致产生具有低活性或无活性的蛋白质。在一些实施例中,剪接调节(例如,外显子跳读、抑制这种突变等)可以用于去除或减少这种突变的影响,例如通过恢复适当的剪接以产生具有恢复的活性的蛋白质,或产生具有改善或恢复的活性等的内部截短的肌营养不良蛋白质变体。

[0177] 在一些实施例中,恢复读框可以将框外突变转换为框内突变;在一些实施例中,在人中,这种变化可以将严重的杜氏肌肉营养不良转化为更温和的贝克肌肉营养不良。

[0178] 在一些实施例中,在施用包含DMD寡核苷酸的组合物之前,分析DMD患者或怀疑患有DMD的患者的DMD基因型。

[0179] 在一些实施例中,在施用包含DMD寡核苷酸的组合物之前,分析DMD患者或怀疑患有DMD的患者的DMD表型。

[0180] 在一些实施例中,分析DMD患者的基因型和表型,以在施用包含DMD寡核苷酸的组合物之前确定DMD基因型和DMD表型的关系。

[0181] 在一些实施例中,在施用包含DMD寡核苷酸的组合物之前,遗传地证实患者具有营养不良。

[0182] 在一些实施例中,DMD或患者的DMD基因型或遗传验证的分析包含确定患者是否在DMD中具有一个或多个有害突变。

[0183] 在一些实施例中,DMD或患者的DMD基因型或遗传验证的分析包含确定患者是否在DMD中具有一个或多个有害突变和/或分析DMD剪接和/或检测DMD的剪接变体,其中通过DMD的异常拼接产生剪接变体。

[0184] 在一些实施例中,DMD基因型的分析或DMD的遗传验证通知选择包含可用于治疗的DMD寡核苷酸的组合物。

[0185] 在一些实施例中,从患者或患者的一个或多个细胞或一个或多个组织去除或复制异常或突变DMD基因,并且将异常或突变DMD基因、或包含异常或突变的其部分,或其拷贝插入细胞中。在一些实施例中,此细胞可用于测试包含DMD寡核苷酸的各种组合物,以预测这种组合物是否可用于治疗患者。在一些实施例中,该细胞是成肌细胞或肌小管(myotubule)。

[0186] 在一些实施例中,个体或患者可以在用DMD寡核苷酸治疗之前产生DMD的一种或多种剪接变体,通常每种变体以非常低的水平产生。在一些实施例中,任何合适的方法可用于检测在施用DMD寡核苷酸之前、期间或之后在患者中产生的低水平的剪接变体。

[0187] 在一些实施例中,在施用包含DMD寡核苷酸的组合物之前,分析患者和/或其组织产生DMD基因的各种剪接变体。

[0188] 在一些实施例中,本披露提供了用于设计DMD寡核苷酸(例如,能够介导DMD的DMD外显子51或DMD外显子53的跳读的DMD寡核苷酸)的方法。在一些实施例中,本披露利用本文所述的基本原理设计和任选的序列步移来设计DMD寡核苷酸,例如,用于在一种或多种测定和/或条件下测试外显子跳读。在一些实施例中,在合理设计后开发有效的DMD寡核苷酸,包括使用给定生物系统的各种信息。

[0189] 在一些实施例中,在用于开发DMD寡核苷酸的方法中,设计DMD寡核苷酸以与一个或多个潜在的剪接相关基序退火,然后测试它们介导外显子跳读的能力。

#### 用于评估寡核苷酸和寡核苷酸组合物的示例技术

[0190] 用于评估DMD寡核苷酸的特性和/或活性的各种技术可以依照本披露利用,例如,US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/015575、WO 2017/192664、WO 2017/062862、WO 2017/192679、WO 2017/210647等。

[0191] 例如,依照本披露,可以评估DMD寡核苷酸在各种测定(包括体外和体内测定)中介导外显子跳读的能力。体外测定可以在本文所述的或本领域已知的各种测试细胞(包括但不限于Δ 48–50患者来源的成肌细胞)中进行。体内测试可以在本文所述或本领域已知的测试动物(包括但不限于小鼠、大鼠、猫、猪、狗、猴、或非人灵长类动物)中进行。

[0192] 作为非限制性实例,下文描述了许多测定用于评估DMD寡核苷酸的特性/活性。各种其他合适的测定可用并且可用于评估DMD寡核苷酸特性/活性,包括未设计用于外显子跳读的DMD寡核苷酸的那些(例如,对于可以涉及RNA酶H以降低靶DMD转录物水平的DMD寡核苷酸的,描述在US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/015575、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647等中的测定)。

[0193] 可以评估DMD寡核苷酸介导肌营养不良蛋白RNA中外显子51或53的跳读的能力,其可以使用巢式PCR、qRT-PCR和/或测序作为非限制性实例进行测试。

[0194] 可以评估DMD寡核苷酸介导蛋白质恢复的能力(例如,产生缺少与跳读的外显子中编码的密码子对应的氨基酸的内部截短的肌营养不良蛋白质变体,其与在外显子跳读之前产生的蛋白质(如果有的话)相比具有改善的功能),其可以通过许多蛋白质检测和/或定量方法(例如蛋白质印迹,免疫染色等)进行评估。肌营养不良蛋白的抗体可商购的,或者如果需要,可以开发用于所希望的目的。

[0195] 可以评估DMD寡核苷酸介导稳定恢复蛋白质产生的能力。在非限制性实例中,可以在血清和组织稳定性的测定中测试恢复的蛋白质的稳定性。

[0196] 可以评估DMD寡核苷酸结合蛋白质(如白蛋白)的能力。示例相关技术包括例如在WO 2017/015555、WO 2017/015575等中描述的那些。

[0197] 可以评估DMD寡核苷酸的免疫活性,例如通过细胞因子活化、补体活化、TLR9活性等的测定。示例性相关技术包括例如在WO 2017/015555、WO 2017/015575、WO 2017/192679、WO 2017/210647等中描述的那些。

[0198] 在一些实施例中,可以在以下测试DMD寡核苷酸的功效,例如,计算机分析和预测、无细胞提取物、用人工构建体转染的细胞、动物(如具有人肌营养不良蛋白转基因或其部分的小鼠)、正常和营养不良的人肌源性细胞系、和/或临床试验。可能需要利用一种以上的测

定,因为正常和营养不良的人肌源性细胞系有时在某些条件下可产生不同的功效结果(Mitrapant等人2009Mol.Ther.[分子理论]17:1418)。

[0199] 在一些实施例中,可以在细胞中体外测试DMD寡核苷酸。在一些实施例中,在细胞中体外测试涉及一种或多种DMD寡核苷酸的裸式递送(gymnotic delivery),或使用递送剂或转染子的递送,其中许多是本领域已知的并且可以依照本披露使用。

[0200] 在一些实施例中,可以在正常人骨骼肌细胞(hSkMC)中体外测试DMD寡核苷酸。参见,例如,Arechavala等人2007Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]18:798-810。

[0201] 在一些实施例中,可以在来自DMD患者的肌肉外植体中测试DMD寡核苷酸。来自DMD患者的肌肉外植体报道于例如,Fletcher等人2006J.Gene Med.[基因医学杂志]8:207-216;McClosrey等人2006Neur.Dis.[临床神经学]16:583-590;以及Arechavala等人2007Hum.Gene Ther.[人类基因疗法]18:798-810。

[0202] 在一些实施例中,细胞是或包含来自DMD患者的培养的肌肉细胞。参见,例如:Aartsma-Rus等人2003Hum.Mol.Genet.[人类分子遗传学]8:907-914。

[0203] 在一些实施例中,单独的DMD寡核苷酸可以证明在某些情况下其跳读外显子51或53的能力的实验与实验间可变性。在一些实施例中,取决于使用哪种细胞、生长条件和其他实验因子,单独的DMD寡核苷酸可以证明其跳读外显子51或53的能力的可变性。为了控制变异,通常在相同或基本相同的条件下测定待测试的DMD寡核苷酸和对照DMD寡核苷酸。

[0204] 体外实验还包括用患者来源的成肌细胞进行的那些。本文描述了来自这些实验的某些结果。在某些此类实验中,将细胞在骨骼生长培养基中培养以使它们保持在分裂/未成熟的成肌细胞状态。然后将培养基更换为“分化”培养基(含有胰岛素和2%马血清),同时在培养基中添加DMD寡核苷酸用于给药。细胞分化为肌管,因为它们被给药一段合适的时间,例如,RNA实验总共4d以及蛋白质实验总共6d(此类条件称为‘0d预分化’(RNA为0d+4d,蛋白为0d+6d))。

[0205] 不希望受任何特定理论的束缚,本披露指出,可能需要知道DMD寡核苷酸是否能够进入成熟肌管并诱导这些细胞以及“未成熟”细胞中的跳读。在一些实施例中,本披露提供了测试DMD寡核苷酸在肌管中的作用的测定。在一些实施例中,使用不同于‘0d预分化’的给药方案,其中将成肌细胞在分化培养基中预分化成肌管持续数天(4d或7d或10d),然后施用DMD寡核苷酸。某些相关的方案在实例19中描述。

[0206] 在一些实施例中,本披露证明,在预分化实验中,DMD寡核苷酸(不包括为PMO的那些)通常产生约相同水平的RNA跳读和肌营养不良蛋白质恢复,而不管给药前的分化培养基中细胞培养的天数。在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸,其能够进入成肌细胞和肌管中并且在成肌细胞和肌管中有活性。在一些实施例中,在 $\Delta$ 45-52DMD患者细胞(也称为D45-52或de145-52)或 $\Delta$ 52DMD患者细胞(也称为D52或de152)中体外测试DMD寡核苷酸,具有0、4或7天的预分化。

[0207] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸可以在各种动物模型中的任何一种或多种中进行测试,这些动物模型包括非哺乳动物和哺乳动物模型;作为非限制性实例,包括新杆状线虫属(Caenorhabditis)、果蝇属(Drosophila)、斑马鱼、小鼠、大鼠、猫、狗和猪。参见,例如,以下中的综述:McGreevey等人2015Dis.Mod.Mech.[疾病模型和机制]8:195-213。

[0208] mdx小鼠的实例用途报道在,例如:Lu等人2003Nat.Med.[自然医学]9:1009;

Jearawiriyapaisarn等人2008Mol.Ther.[分子疗法],16,1624-1629;Yin等人2008Hum.Mol.Genet.[人类分子遗传学],17,3909-3918;Wu等人2009Mol.Ther.[分子疗法],17,864-871;Wu等人2008Proc.Natl Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],105,14814-14819;Mann等人2001Proc.Nat.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]98:42-47;以及Gebski等人2003Hum.Mol.Gen.[人类分子遗传学]12:1801-1811。

[0209] 可以在狗中测试DMD寡核苷酸的功效,如,金毛猎犬肌肉营养不良(GRMD)动物模型。Lu等人2005Proc.Natl.Acad.Sci.U S A[美国国家科学院院刊]102:198-203;Alter等人2006Nat.Med.[自然医学]12:175-7;McClosrey等人2006Gene Ther.[基因疗法]13:1373-81;以及Yokota等人2012Nucl.Acid Ther.[核酸疗法]22:306。

[0210] 可以在测试动物体内评估DMD寡核苷酸有效递送至各种组织(例如,骨骼、心脏和/或膈肌);在非限制性实例中,这可以通过杂交ELISA和动物组织中的分布测试来测试。

[0211] 可以在测试动物体内评估DMD寡核苷酸的血浆PK;作为非限制性实例,这可以通过测定AUC(曲线下面积)和半衰期来测试。

[0212] 在一些实施例中,可以经由肌肉内施用至测试动物的肌肉在体内测试DMD寡核苷酸。

[0213] 在一些实施例中,可以经由肌肉内施用进入测试动物的腓肠肌中体内测试DMD寡核苷酸。

[0214] 在一些实施例中,可以经由肌肉内施用进入小鼠的腓肠肌中体内测试DMD寡核苷酸。

[0215] 在一些实施例中,可以经由肌肉内施用进入小鼠模型(转基因整个人肌营养不良蛋白基因座)的腓肠肌中体内测试DMD寡核苷酸。参见,例如:Bremmer-Bout等人2004Mol.Ther.[分子疗法]10,232-240。

[0216] 可以进行另外的测试来评估DMO DMD寡核苷酸(包括中心成核纤维计数和肌营养不良蛋白阳性纤维计数、以及功能性握力分析)的功效。作为非限制性实例,参见以下报道的实验方案:Yin等人2009Hum.Mol.Genet.[人类分子遗传学]18:4405-4414。

[0217] 作为非限制性实例,测试DMD寡核苷酸的另外的方法包括以下中报道的方法:Kinalli等人2009Lancet[柳叶刀]8:918;Bertoni等人2003Hum.Mol.Gen.[人类分子遗传学]12:1087-1099。

#### 寡核苷酸和组合物的某些实例

[0218] 在一些实施例中,本披露提供了可用于各种目的的DMD寡核苷酸和/或DMD寡核苷酸组合物,这些目的例如,调节跳读、降低水平的DMD转录物、改善水平的有益蛋白质、治疗病症、疾病和障碍等。在一些实施例中,本披露提供了具有改善的特性(例如,增加的外显子51或53的跳读、降低的毒性等)的DMD寡核苷酸组合物。除其他事项外,本披露的DMD寡核苷酸包含化学修饰、立体化学、和/或其组合,这些修饰可以改善DMD寡核苷酸的各种特性和活性。表A1中列出了非限制性实例。在一些实施例中,DMD寡核苷酸类型是如表A1中的DMD寡核苷酸的碱基序列、骨架键联模式、骨架手性中心模式、和骨架磷修饰模式定义的类型,其中该DMD寡核苷酸包含至少一个手性受控的核苷酸间键联(“立体化学/键联”中的至少一个R或S)。

[0219] 在一些实施例中,本披露涉及本文所述的(例如,在表A1中的)DMD寡核苷酸。

[0220] 在下表中, ID指示鉴定或DMD寡核苷酸编号; 并且描述指示经修饰的序列。

表 A1. 示例寡核苷酸。

ID	描述	裸序列	链环/立体化学
WV-3152	fU * SfC * SfA * SfG * SfG * SmAfA * SmGfA * SmUfG *	UCAAGGAAGAU GGCAUUUCU	SSSSS SOSOS OSOSSSSS S
WV-7336	fU * fC * fA * fA * fGfG * mAfA * mGmGfC * fU * mGmGfC * fA *	UCAAGGAAGAU GGCAUUUCU	XXXXO XOXOX XOOXX XXX X
WV-9517	fC * SfU * SfC * SfC * SfG * SfG * SfU * SfU * SmCfU * SmG *	CUCGGGUUCUGAAGGUUC	SSSSS SSSSS SOOSSSSS
WV-12880	SfA * SmAmGfG * SfU * SfG * SfU * SfU * SmCfU * SmG *	CUCGGGUUCUGAAGGUUC	SS nX SS nX SSOSS SOSSS nX SS
WV-13405	SfA * SmAfG * SfG * SfU * SfGn001fU * SfU * SmCfU * SmG *	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT	00000 00000 00000 00000
WV-13406	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	CTCCGGTTCTGAAGGTGTT	00000 00000 00000 00000
WV-13407		TGCCTCCGGITCTGAAGGTGTT CTTGTAA	00000 00000 00000 00000
WV-13826	fU * SfC * SfC * SfG * SfG * SfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA *	UCCGGGUUCUGAAGGUUC	SSSSS SSSSS SOOSSSSS
WV-13827	fC * SfU * SfC * SfC * SfG * SfG * SfU * SfU * SmCfU * SmG *	CUCGGGUUCUGAAGGUUC	SSSSS SSSSS SOOSSSSS
WV-13835	SfA * SmAmGfG * SfU * SfG * SfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA *	UCCGGGUUCUGAAGGUUC	SSSSS SSSSS SOOSSSSS
WV-13864	fC * SfU * SfCn001RfC * SfG * SfGn001RfU * SfU * SmCfU *	CUCGGGUUCUGAAGGUUC	SS nR SS nR SSOSS SOSSS nR SS
WV-14344	SmG * SfA * SmAfG * SfG * SfGn001RfU * SfU * SmCfU *	CUCGGGUUCUGAAGGUUC	SS nR SS nR SSOSS SOSSS nR SS
WV-14522	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001RfU * SfU * SmCfU *	UCAAGGAAGAU GGCAUUUCU	SS nX SS nX OSOSOSSS nX SS
WV-14523	SmGmGfCn001fA * SfA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	UCAAGGAAGAU GGCAUUUCU	SS nX SS nX OSOSOO nX SS nX
WV-	fU * SfC * SfCn001RfG * SfG * SfU * SmCfU * SmG *	UCCGGGUUCUGAAGGUUC	SS nR SS nR

14791	SfA * SmAmGIG * SIU * SfGn001fIU * SIU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SOSSSOSS nR SSS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfA * SmAfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SSSOSOS SOO
15860	SmGmGfCn001fA * SfU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	nX SS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mAFA * SmGmA * SfU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SS nX
15861	SmGmGfC * SfA * SIU * SIU * SfU * SRC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	OSOSOOSSSSSS S
WV-	fU * SfC * SfA * SfA * SfG * SfG * SmAfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SSSSS SOSOS SOO
15862	SmGmGfCn001fA * SfU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	nX SS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SSSSS OSSOO
17859	SmGmGfCn001fA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	nX SS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SmAfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SSSOSOS SOS
17860	SmGmG * SfCn001fA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	nX SS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SSSSS OSSOS
17861	SmGmG * SfCn001fA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	nX SS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SSSSS OSSOS
17862	SmGfG * SfCn001fA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	nX SS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mA * SfA * SmGmA * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SS nX SSOSS
17863	* SmGmGfC * SfA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	OSSSS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mAFA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SS nX
17864	SmGmG * SfC * SfA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	OSOSOSSS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mA * SfA * SmGmA * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SS nX SSOSS
17865	* SmGmG * SfC * SfA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	OSSSS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001fA * SfA * SmGmA * SIU *	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SS nX SS nX SS
17866	SmGfG * SfC * SfA * SIU * SfU * SfUn001fU * SfC * SIU	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	OSSSS nX SS
WV-	fU * SfG * SfAn001fA * SfA * SfU * SfUn001fC * SIU * SmG * SfC *	UGAAAUCUGCCAGAGCAGGU	SS nX SS nX SSSSS
20034	SmC * SfA * SmG * SfA * SfG * SfC * SfAn001fG * SfG * SIU	UGAAAUCUGCCAGAGCAGGU	SSSSS nX SS
WV-	fU * SfG * SfAn001fA * SfA * SfU * SfUn001fC * SIU * SmG * SfC *	UGAAAUCUGCCAGAGCAGGU	SS nX SS nX SSSSS
20034	SmC * SfA * SmG * SfA * SfG * SfC * SfAn001fG * SfG * SIU	AAUCUGCCAGAGCAGGUACC	SSSSS nX SS
WV-	fA * SfA * SIUn001fC * SfU * SfGn001fC * SfC * SmA * SfG *	AAUCUGCCAGAGCAGGUACC	SS nX SS nX SSSSS
20037	Sma * SfG * SmC * SfA * SfG * SfG * SIU * SfG * SfC * SfC	AAUCUGCCAGAGCAGGUACC	SSSSS nX SS
WV-	fC * SIU * SfGn001fC * SfC * SfAn001fG * SfA * SmG * SfC *	CUGCCAGAGCAGGUACCUC	SS nX SS nX SSSSS
20040	Sma * SfG * SmG * SfU * SfA * SfC * SfChn001fU * SfC * SfC	CUGCCAGAGCAGGUACCUC	SS nX SS nX SSSSS
WV-	fC * SfC * SfAn001fG * SfA * SfGn001fC * SfA * SmG * SfG *	CCAGAGCAGGUACCUCAAC	SS nX SS nX SSSSS
20043	Smu * SfA * SmC * SfC * SIU * SfC * SfCn001fA * SfA * SfC	CCAGAGCAGGUACCUCAAC	SS nX SS nX SSSSS
WV-	fG * SfA * SfGn001fC * SfA * SfGn001fG * SIU * SmA * SfC *	GAGCAGGUACCUCAACAU	SS nX SS nX SSSSS
20046	SmC * SIU * SmC * SfC * SfA * SfA * SfCn001fA * SfU * SfC	GAGCAGGUACCUCAACAU	SSSSS nX SS

WV-20049	fC * SfA * SfGn001fG * SfU * SfAn001fC * SfC * SmU * SfC *	CAGGUACCUCCAAACAUCUAG	SS nX SS nX SSSSS
WV-20050	SfC * SfA * SmA * SfC * SfA * SfU * SfCn001fA * SfA * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-20051	fA * SfG * SfUn001fU * SfA * SfCn001fC * SfU * SmC * SfC *	AGGUACCUCCAACAUCUAGG	SS nX SS nX SSSSS
WV-20052	SfA * SmC * SfA * SfU * SfC * SmC * SfA *	GGUACCUCCAACAUCUAGGA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20053	fG * SfG * SfUn001fA * SfC * SfCn001fU * SfC * SmC * SfA *	GGUACCUCCAACAUCUAGGA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20054	SfA * SmA * SfU * SfC * SfCn001fG * SfG * SfA *	GUACCUCCAACAUCUAGGA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20055	fU * SfC * SfCn001fC * SfU * SfCn001fA * SfA * SfG *	UACCUCCAACAUCUAGGAAG	SS nX SS nX SSSSS
WV-20056	SfU * SfC * SmA * SfA * SfG * SfC * SmA * SfU *	ACCUCCAACAUCUAGGAAGA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20057	fC * SfC * SfUn001fC * SfC * SfCn001fA * SfU * SmC * SfA *	CCUCCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20058	SfU * SfC * SfCn001fA * SfA * SfCn001fA * SfU * SmC * SfA *	CCUCCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20059	SfA * SmG * SfA * SmG * SfA * SmG * SfA *	CCUCCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20060	SfA * SmG * SfA * SmG * SfA * SmG * SfA *	CCUCCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20061	fA * SfC * SfAn001fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SmG * SfA *	UCCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20062	SfA * SmG * SfA * SmU * SfG * SmG * SfA *	UCCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20063	fA * SfA * SmCn001fA * SfA * SmGn001fG * SfA * SmG * SfG *	CCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20064	SfA * SmG * SfA * SmG * SfA * SmG * SfA *	CCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20064	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SmG * SfG * SmG * SfA *	CCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-	fC * SfA * SmU * SfG * SmG * SfG * SmA * SfU *	CCAAACAUCAAGGAAGAU	SS nX SS nX SSSSS

20065	Smg * Sig * Smc * Sfa * Sfu * Smu * SfU * SmCn001fc * Sfu * Sfa	AAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	SSSSSS nX SS
WV-fA	* Sfa * Sga * Sgn001fg * Sfa * Sfan001fg * Sfa * Smu * SfG *	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
20066	Smg * SIC * SmA * Sfu * Sfu * SmG * SfG	SS nX SS nX SSSSS	SS nX SS nX SSSSS
WV-fA	* SfG * SfGn001fa * Sfa * SfGn001fa * Sfu * SmG * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
20067	Smc * Sfa * Smu * Sfu * Smc * SfU * Smu * SfU * SmG * SfG	AGGAAGAUGGCAUUUCUAGU	SS nX SS nX SSSSS
WV-fG	* SfG * Sfan001fa * SfG * Sfan001fg * SfU * SmG * SfG	GGAAAGAUGGCAUUUCUAGUU	SS nX SS nX SSSSS
20068	Sma * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fG	* Sfa * Sfan001fg * Sfa * Sfu * Smu001fg * SfG * Smc * Sfa *	GAAGAUGGCAUUUCUAGUUU	SS nX SS nX SSSSS
20069	Smu * Smu * Smu * Smu * SfC * Sfu * Sfa * SfGn001fu * Sfu * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fA	* Sfa * Sgn001fa * Smu * SfGn001fg * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUJG	SS nX SS nX SSSSS
20070	Smu * Smu * Smc * Sfu * Sfa * SmG * Smu001fu * Sfu * Smu * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fA	* Sfa * Sgn001fa * Smu * SfG * Smc * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUJG	SS nX SS nX SSSSS
20070	Smu * Smu * Smc * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fA	* SfG * Sfan001fg * SfC * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUJG	SS nX SS nX SSSSS
20071	Smu * Smc * Smu * Sfa * SmG * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu	AGAUGGCAUUUCUAGUUUJG	SS nX SS nX SSSSS
WV-fG	* Sfa * Smu001fg * SfG * SfCn001fa * Smu * Smu * Smu * Smu * Smu	GAAGAUGGCAUUUCUAGUUUJG	SS nX SS nX SSSSS
20072	Smc * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fA	* Smu * Smu * SfGn001fg * Smu	AUGGCAUUUCUAGUUUJGAG	SS nX SS nX SSSSS
20073	Smu * Sfa * Smg * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fA	* Smu * Smu * SfGn001fg * Smu	AUGGCAUUUCUAGUUUJGAG	SS nX SS nX SSSSS
20073	Smu * Sfa * Smg * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fU	* Smu * Smu * SfGn001fc * Sfa * Smu001fu * Smu * Smu * Smu * Smu	UGGCAAUUUCUAGUUUJGAGA	SS nX SS nX SSSSS
20074	Sma * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fG	* SfCn001fa * Smu	GGCAUUUCUAGUUUJGAGAU	SS nX SS nX SSSSS
20075	Smg * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fG	* SfC * Sfa001fu * Smu	GCAUUUCUAGUUUJGAGAU	SS nX SS nX SSSSS
20076	Smu * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fG	* SfC * Sfan001fu * Smu	CAUUUCUAGUUUJGAGAU	SS nX SS nX SSSSS
20077	Smu * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fA	* Smu * Smu * Smu001fu * Smu	AUUUCUAGUUUJGAGAU	SS nX SS nX SSSSS
20078	Smu * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-fU	* Smu * Smu * Smu001fc * Smu	UUUCUAGUUUJGAGAU	SS nX SS nX SSSSS
20079	Smg * Smg * SmA * Smu	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS

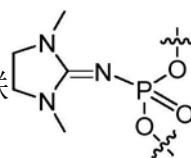
WV- 20080	fU * SIU * SfCn001fU * SfA * SfGn001fU * SIU * SmU * SfG *	UUCUAGUUUGGAGAUGGCCAG	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20081	fU * SfC * SIUn001fA * SfG * SIU * SmG * SfG *	UCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20082	SmA * SIG * SmA * SIU * SIG * SfCn001fA * SfG * SIU	CUAGUUUGGAGAUGGCAGUU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20083	fC * SIU * SfAn001fG * SIU * SIUn001fU * SfG * SmG * SfA *	CUAGUUUGGAGAUGGCAGUU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20084	SfG * SfA * SmU * SIG * SfC * SfAn001fG * SIU * SIU * SfC *	CUAGUUUGGAGAUGGCAGUU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20085	fG * SIU * SIUn001fU * SfG * SfGn001fA * SfG * SmA * SIU *	GUUUGGAGAUGGCAGUUUCCU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20086	SfG * SIG * SmC * SfA * SIG * SIU * SIUn001fU * SfC * SfC *	GUUUGGAGAUGGCAGUUUCCU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20087	fU * SIU * SIUn001fG * SfG * SfAn001fU * SfA * SmU * SfG *	UUUGGAGAUGGCAGUUUCCU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20088	SfG * SIG * SmC * SfA * SIG * SIU * SIUn001fU * SfC * SfA	UUUGGAGAUGGCAGUUUCCU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20089	SfC * SfA * SmU * SIU * SfC * SfC * SfAn001fU * SfA * SfG *	UUUGGAGAUGGCAGUUUCCU	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20090	fG * SfG * SfAn001fG * SfA * SIUn001fG * SfG * SmC * SfA *	GGAGAUUGCAGUUUCCUUAAG	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20091	SmU * SIU * SmC * SfC * SfC * SfAn001fG * SfU * SfA	GGAGAUUGCAGUUUCCUUAAG	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20092	fG * SfA * SIUn001fG * SfG * SfCn001fA * SfG * SmU * SIU *	GGAGAUUGCAGUUUCCUUAAGAA	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20093	SmU * SfC * SmC * SIU * SIU * SfA * SfGn001fU * SfA * SfA	GGAGAUUGCAGUUUCCUUAAGAA	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20094	fA * SIU * SfGn001fG * SfC * SfC * SfAn001fA * SfC * SfC *	AUGGCAGUUUCCUUAAGUAAC	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20095	SmC * SfC * SmU * SfU * SfA * SfG * SIUn001fA * SfA * SfC	AUGGCAGUUUCCUUAAGUAAC	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20096	fG * SfC * SfA * SmU * SfU * SfU * SfU * SfU * SfU * SfU *	GGCAGUUUCCUUAAGUAACCA	SS nX SS nX SSSSS
WV- 20097	SmU * SfA * SmG * SIU * SfA * SfC * SfC * SmC * SIU *	GGCAGUUUCCUUAAGUAACCA	SS nX SS nX SSSSS

20097	Sma * SIG * SmU * SfA * SfC * SfCn001fa * SfC * SfA	AGUUUCUUAGUAACCACAG	SS nX SS nX SSSSS
WV-fA * SIG * SmU * SfU * SfU * SfCn001fc * SfA * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
SmG * SfU * SmA * SfA * SfC * SfA * SfAn001fc * SfA * SfG	SS nX SS nX SSSSS	SSSSSS nX SS	
WV-fG * SfU * SmU * SfU * SfC * SfC * SfCn001fu * SfU * SmA * SfG *	GUUUCCUUAGUAACCACAGG	SS nX SS nX SSSSS	
WV-SmU * SfA * SmA * SfC * SfC * SfCn001fa * SfG * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fU * SmU * SmU * SfU * SfC * SfC * SfCn001fu * SfA * SmG * SfU *	UUUCCUUAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
WV-SmA * SfA * SmC * SfC * SfC * SfCn001fg * SfG * SfU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fU * SmU * SfCn001fc * SfU * SmU * SfA * SfG * SmU * SfA *	UUUCCUUAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20101 SmA * SfC * SmC * SfA * SfC * SfA * SfGn001fg * SfU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fU * SmC * SfCn001fu * SmU * SfA * SfGn001fg * SfU * SmA * SfA *	UCCUUAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20102 SmC * SfC * SmA * SfC * SfA * SfG * SfGn001fu * SfU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fC * SfC * SmU * SfU * SmU * SfA * SfG * SmU * SfA *	CCUUUAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20103 SmC * SfA * SmC * SfA * SfG * SmU * SfU * SmU * SfC *	CCUUUAGUAACCACAGGU	SSSSSS nX SS	
WV-fC * SmU * SmU * SfU * SmU * SfG * SmU * SfA * SmC * SfC *	CUUAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20104 SmA * SfC * SmA * SfG * SmG * SfG * SmU * SfU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fU * SmU * SfAn001fg * SfU * SfAn001fa * SfC * SmC * SfA *	UUAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20105 SmC * SfA * SmG * SfG * SmU * SfU * SfGn001fu * SfG * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fU * SmA * SfGn001fu * SmA * SfAn001fc * SfC * SmA * SfC *	UAGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20106 SmA * SfG * SmG * SmU * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fA * SmU * SmU * SfU * SmU * SfU * SmU * SfU * SmU * SfU *	AGUAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20107 SmG * SmG * SmU * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fG * SmU * SfAn001fa * SfC * SfCn001fa * SfC * SmA * SfG *	GUAAACCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20108 SmG * SmU * SmU * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fU * SmA * SfAn001fc * SfC * SfAn001fc * SfA * SmG * SfG *	UAACCAAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20109 SmU * SmU * SmG * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fA * SmA * SfCd001fc * SfA * SfC * SfCn001fa * SfG * SmG * SmU	AACCAACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20110 SmU * SmG * SmU * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fA * SmC * SfCn001fa * SfC * SfAn001fg * SmU * SmG * SmU *	ACCAAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20111 SmG * SmU * SmG * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fC * SfAn001fc * SfA * SfGn001fg * SmU * SmU * SmG * SmU	CCACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20112 SmU * SmG * SmU * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fC * SmC * SfCn001fa * SfC * SfC * SfCn001fu * SmU * SmG * SmU *	CACAGGU	SS nX SS nX SSSSS	
20113 SmG * SmU * SmC * SmU * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	
WV-fA * SmC * SfAn001fg * SmG * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	ACAGGUUGUGU	SS nX SS nX SSSSS	
20114 SmU * SmC * SmA * SmC * SmU * SmU * SmU * SmU * SmU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS	

WV-	fC * SfA * SfGn001fG * SfU * SfUn001fG * SfU * SmG * SfU *	CAGGUUGUGUCAACCAGAGUA	SS nX SS nX SSSSS
20115	Smc * SfA * SmC * SfC * SfA * SfG * SfAn001fG * SfU * SfA	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fA * SfG * SfGn001fU * SfU * SfGn001fU * SfG * SmU * SfC *	AGGUUGUGUCAACCAGAGUA	SS nX SS nX SSSSS
20116	Sma * SfC * SmC * SfA * SfG * SfA * SfGn001fU * SfA * SfA	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fG * SfG * SfUn001fU * SfG * SfUn001fG * SfU * SmC * SfA *	GGUUUGUGUCAACCAGAGUA	SS nX SS nX SSSSS
20117	Smc * SfC * SmA * SfG * SfA * SfG * SfUn001fA * SfA * SfC	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fG * SfU * SfUn001fG * SfU * SfGn001fU * SfC * SmA * SfC *	GUUGUGUCACCAGAGUAACA	SS nX SS nX SSSSS
20118	Smc * SfA * SmG * SfA * SfG * SfU * SfAn001fA * SfC * SfA	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fU * SfU * SfGn001fU * SfG * SfUn001fC * SfA * SmC * SfC *	UUGUGUCACCAGAGUAACAG	SS nX SS nX SSSSS
20119	Sma * SfG * SmA * SfG * SfU * SfA * SfAn001fC * SfA * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fU * SfG * SfUn001fG * SfU * SfCn001fA * SfC * SmC * SfA *	UGUGUCACCAGAGUAACAGU	SS nX SS nX SSSSS
20120	Smg * SfA * SmG * SfU * SfA * SfCn001fA * SfG * SfU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fG * SfU * SfGn001fU * SfC * SfCn001fC * SfC * SmA * SfG *	GUGUCACCAGAGUAACAGUC	SS nX SS nX SSSSS
20121	Sma * SfG * SmU * SfA * SfC * SfUn001fG * SfU * SfC	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fU * SfG * SfUn001fC * SfA * SfCn001fC * SfA * SmG * SfA *	UGUACACCAGAGUAACAGUCU	SS nX SS nX SSSSS
20122	Smg * SfU * SmA * SfA * SfC * SfA * SfCn001fU * SfC * SfU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fG * SfU * SfCn001fA * SfC * SfCn001fA * SfG * SmA * SfG *	GUCACCAGAGUAACAGUCUG	SS nX SS nX SSSSS
20123	Smu * SfA * SmA * SfC * SfA * SmG * SfU * SfU * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fU * SfC * SfAn001fC * SfC * SfAn001fG * SfA * SmG * SfU *	UCACCAAGAGUAACAGUCUGA	SS nX SS nX SSSSS
20124	Sma * SfA * SmC * SfA * SfG * SfU * SfCn001fU * SfG * SfA	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fC * SfA * SfCn001fC * SfA * SfGn001fA * SfG * SmU * SfA *	CACCAAGAGUAACAGUCUGAG	SS nX SS nX SSSSS
20125	Sma * SfC * SmA * SfG * SfU * SfC * SfUn001fG * SfA * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fA * SfC * SfCn001fA * SfG * SfAn001fG * SfU * SmA * SfA *	ACCAGAGUAACAGUCUGAGU	SS nX SS nX SSSSS
20126	Smc * SfA * SmG * SfU * SfC * SfU * SfGn001fA * SfG * SfU	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fC * SfC * SfAn001fG * SfA * SfGn001fU * SfA * SmA * SfC *	CCAGAGUAACAGUCUGAGUA	SS nX SS nX SSSSS
20127	Sma * SfG * SmU * SfC * SfU * SfG * SfAn001fG * SfU * SfA	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fC * SfA * SfGn001fA * SfG * SfUn001fA * SfA * SmC * SfA *	CAGAGUAACAGUCUGAGUAG	SS nX SS nX SSSSS
20128	Smg * SfU * SmC * SfU * SfG * SfA * SfGn001fU * SfA * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fA * SfG * SfAn001fG * SfU * SfAn001fA * SfC * SmA * SfG *	AGAGUAACAGUCUGAGUAGG	SS nX SS nX SSSSS
20129	Smu * SfC * SmU * SfG * SfA * SfG * SfUn001fA * SfG * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fG * SfA * SfGn001fU * SfA * SfAn001fC * SfA * SmG * SfU *	GAGUAACAGUCUGAGUAGGA	SS nX SS nX SSSSS
20130	Smc * SfU * SmG * SfA * SfG * SfU * SfAn001fG * SfG * SfA	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fA * SfG * SmU001fA * SfA * SfGn001fA * SfG * SmU * SfC *	AGUAACAGUCUGAGUAGGAG	SS nX SS nX SSSSS
20131	Smu * SfG * SmA * SfG * SfU * SfA * SfGn001fG * SfA * SfG	SSSSSS nX SS	SSSSSS nX SS
WV-	fG * SfU * SfAn001fA * SfC * SfAn001fG * SfU * SmC * SfU *	GUAAACAGUCUGAGUAGGC	SS nX SS nX SSSSS

20132	SmG * SfA * SmG * SfU * SfA * SfG * SfG * SfGn001fa * SfG * SfC	UAACAGUCUGAGUAGGAGCU	SSSSS nX SS
WV-20133	fU * SfA * SfAn001fc * SfA * SfGn001fu * SfC * SmU * SfG * SmA * SfG * SmU * SfG * SfA * SfC * SfU	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20134	fa * SfA * SfCn001fa * SfG * SfG * SfUn001fc * SfU * SmG * SfA * SmG * SfU * SmA * SfG * SfA * SmG * SfU * SmA * SfG * SfG * SfGn001fc * SfU * SfA * SfA	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20135	fa * SfC * SfAn001fg * SfU * SfCn001fu * SfG * SmA * SfG * SmU * SfA * SmG * SfG * SfA * SfG * SfC * SfA * SfGn001fu * SfC * SmG * SfU * SfG * SfCn001fu * SfA * SfA	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20136	fc * SfA * SfGn001fu * SfC * SfUn001fg * SfA * SmG * SfU * SmA * SfG * SmG * SfC * SfA * SfU * SmG * SfG * SfU * SmA * SfG * SfC * SfC * SfUn001fa * SfA * SfA * SfA	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20137	fa * SfG * SfUn001fc * SfU * SfGn001fa * SfG * SmU * SfA * SmG * SfG * SmA * SfG * SmA * SfG * SfU * SfCn001fu * SfG * SfAn001fa * SfA * SfA * SfA	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20138	fg * SfU * SfCn001fg * SfG * SfAn001fg * SfU * SmA * SfG * SmG * SfA * SmG * SfC * SfU * SfA * SfA * SfU	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20139	fU * SfC * SfUn001fg * SfA * SfGn001fu * SfA * SmG * SfG * SmA * SfG * SmC * SfU * SfA * SfA * SfAn001fa * SfU * SfA	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS
WV-20140	fc * SfU * SfGn001fa * SfG * SfUn001fa * SfG * SmG * SfA * SmG * SfC * SmU * SfA * SfA * SfA * SfU	SS nX SS nX SSSSS	SSSSS nX SS

表中的缩写：

n001: 非负电荷的键联  (除非另外指明, 否则其是立体随机的(例如, 作为 n001R、或n001S))；

50

在表 A1 中：

表 A1 中的空格用于格式和可读性, 例如, OXXXXXX XXXXXX XXXXX XXXXX 说明了与 OXXXXXX XXXXXX XXXXX 相同的立体化学;

\*S 和\*S 均指示硫代磷酸酯核苷酸间键联, 其中键联磷具有 Sp 构型; 等。

表 A1 中列出的所有 DMD 寡核苷酸是单链的。如本申请中所述, 它们可以用作单链, 或用作与一条或多条其他链形成复合物的链。由于它们的长度, 一些序列被分成多行。

ID: 寡核苷酸的标识号。

WV-13405、WV-13406 和 WV-13407 是完全 PMO (吗啉代寡核苷酸)。

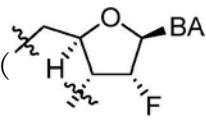
n001R:为手性受控的并且具有Rp构型的n001;

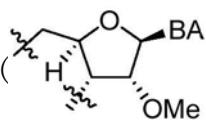
n001S:为手性受控的并且具有Sp构型的n001;

nX:以键联/立体化学,n0或nX指示立体随机n001;

nR:以键联/立体化学,nR指示为手性受控的并且具有Rp构型的n001;

nS:以键联/立体化学,nS指示为手性受控的并且具有Sp构型的n001;

F、f:在以下核苷(例如,fA( , 其中BA是核碱基A)上的2'-F修饰;

m:在以下核苷(例如,mA( , 其中BA是核碱基A)上的2'-OMe修饰;

\*、PS:硫代磷酸酯;

\*R、R、Rp:Rp构型的硫代磷酸酯;

\*S、S、Sp:Sp构型的硫代磷酸酯;

X:立体随机的硫代磷酸酯;

O、PO:磷酸二酯(磷酸酯)。当在两个核苷单元之间未指定核苷酸间键联时,核苷酸间键联是磷酸二酯键联(天然磷酸酯键联)。

[0221] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸的每个硫代磷酸酯核苷酸间键联独立地是手性受控的核苷酸间键联。在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸组合物是表A1中列出的DMD寡核苷酸类型的手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中DMD寡核苷酸的每个硫代磷酸酯核苷酸间键联独立地是手性受控的核苷酸间键联。

[0222] 在一些实施例中,本披露提供了包含多种DMD寡核苷酸分子或由其组成的组合物(例如,手性受控的DMD寡核苷酸组合物)。在一些实施例中,多种中所有DMD寡核苷酸都是相同类型的,即所有均具有相同的碱基序列、骨架键联模式、骨架手性中心模式、和骨架磷修饰模式。在一些实施例中,相同类型的所有的DMD寡核苷酸在结构上相同。在一些实施例中,提供的组合物通常以受控制的量包含多种DMD寡核苷酸类型中的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,提供的手性受控的DMD寡核苷酸组合物包含两个或更多个提供的DMD寡核苷酸类型的组合。

[0223] 在一些实施例中,本披露的DMD寡核苷酸组合物是手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中其多种中DMD寡核苷酸的序列包含表A1中列出的碱基序列或由其组成。

[0224] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13405。

[0225] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13405。

[0226] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13406。

[0227] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13407。

[0228] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

13826。

[0229] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13827。

[0230] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13835。

[0231] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13835。

[0232] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13864。

[0233] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14344。

[0234] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14522。

[0235] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14523。

[0236] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14791。

[0237] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-15860。

[0238] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-15860。

[0239] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-15861。

[0240] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-15862。

[0241] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17859。

[0242] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17860。

[0243] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17861。

[0244] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17862。

[0245] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17863。

[0246] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17864。

[0247] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17865。

- [0248] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17866。
- [0249] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20034。
- [0250] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20037。
- [0251] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20040。
- [0252] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20043。
- [0253] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20046。
- [0254] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20049。
- [0255] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20050。
- [0256] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20051。
- [0257] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20052。
- [0258] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20053。
- [0259] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20054。
- [0260] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20055。
- [0261] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20056。
- [0262] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20057。
- [0263] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20058。
- [0264] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20059。
- [0265] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20060。
- [0266] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20061。
- [0267] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

20062。

[0268] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20063。

[0269] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20064。

[0270] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20065。

[0271] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20066。

[0272] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20067。

[0273] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20067。

[0274] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20068。

[0275] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20069。

[0276] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20070。

[0277] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20071。

[0278] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20072。

[0279] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20073。

[0280] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20074。

[0281] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20075。

[0282] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20076。

[0283] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20076。

[0284] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20077。

[0285] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20078。

[0286] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20079。

- [0287] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20080。
- [0288] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20081。
- [0289] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20082。
- [0290] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20083。
- [0291] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20084。
- [0292] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20085。
- [0293] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20086。
- [0294] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20087。
- [0295] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20088。
- [0296] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20089。
- [0297] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20090。
- [0298] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20091。
- [0299] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20092。
- [0300] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20093。
- [0301] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20094。
- [0302] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20095。
- [0303] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20096。
- [0304] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20097。
- [0305] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20098。
- [0306] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

20099。

[0307] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20100。

[0308] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20101。

[0309] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20102。

[0310] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20103。

[0311] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20104。

[0312] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20105。

[0313] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20106。

[0314] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20107。

[0315] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20108。

[0316] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20109。

[0317] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20110。

[0318] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20111。

[0319] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20112。

[0320] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20113。

[0321] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20114。

[0322] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20115。

[0323] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20116。

[0324] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20117。

[0325] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20118。

- [0326] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20119。
- [0327] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20120。
- [0328] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20121。
- [0329] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20122。
- [0330] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20123。
- [0331] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20124。
- [0332] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20125。
- [0333] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20126。
- [0334] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20127。
- [0335] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20128。
- [0336] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20129。
- [0337] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20130。
- [0338] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20131。
- [0339] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20132。
- [0340] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20133。
- [0341] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20134。
- [0342] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20135。
- [0343] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20136。
- [0344] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20137。
- [0345] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

20138。

[0346] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20139。

[0347] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20140。

[0348] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13835。

[0349] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13864。

[0350] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14344。

[0351] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸WV-13835的手性受控的组合物。

[0352] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸WV-13864的手性受控的组合物。

[0353] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸WV-14344的手性受控的组合物。

[0354] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13405。

[0355] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13406。

[0356] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13407。

[0357] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13826。

[0358] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13827。

[0359] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13835。

[0360] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-13864。

[0361] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14344。

[0362] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14522。

[0363] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14523。

[0364] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-14791。

[0365] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-15860。

[0366] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

15861。

[0367] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-15862。

[0368] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17859。

[0369] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17860。

[0370] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17861。

[0371] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17862。

[0372] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17863。

[0373] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17864。

[0374] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17865。

[0375] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-17866。

[0376] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20034。

[0377] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20037。

[0378] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20040。

[0379] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20043。

[0380] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20046。

[0381] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20049。

[0382] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20050。

[0383] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20051。

[0384] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20052。

[0385] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20053。

- [0386] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20054。
- [0387] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20055。
- [0388] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20056。
- [0389] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20057。
- [0390] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20058。
- [0391] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20059。
- [0392] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20060。
- [0393] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20061。
- [0394] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20062。
- [0395] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20063。
- [0396] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20064。
- [0397] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20065。
- [0398] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20066。
- [0399] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20067。
- [0400] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20068。
- [0401] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20069。
- [0402] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20070。
- [0403] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20071。
- [0404] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20072。
- [0405] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

20073。

[0406] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20074。

[0407] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20075。

[0408] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20076。

[0409] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20076。

[0410] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20077。

[0411] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20078。

[0412] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20079。

[0413] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20080。

[0414] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20081。

[0415] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20082。

[0416] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20083。

[0417] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20084。

[0418] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20085。

[0419] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20086。

[0420] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20087。

[0421] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20088。

[0422] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20089。

[0423] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20090。

[0424] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20091。

- [0425] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20092。
- [0426] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20093。
- [0427] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20094。
- [0428] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20095。
- [0429] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20096。
- [0430] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20097。
- [0431] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20098。
- [0432] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20099。
- [0433] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20100。
- [0434] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20101。
- [0435] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20102。
- [0436] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20103。
- [0437] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20104。
- [0438] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20105。
- [0439] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20106。
- [0440] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20107。
- [0441] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20108。
- [0442] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20109。
- [0443] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20110。
- [0444] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-

20111。

[0445] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20112。

[0446] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20113。

[0447] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20114。

[0448] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20115。

[0449] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20116。

[0450] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20117。

[0451] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20118。

[0452] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20119。

[0453] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20120。

[0454] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20121。

[0455] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20122。

[0456] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20123。

[0457] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20124。

[0458] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20125。

[0459] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20126。

[0460] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20127。

[0461] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20128。

[0462] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20129。

[0463] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20130。

- [0464] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20131。
- [0465] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20132。
- [0466] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20133。
- [0467] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20134。
- [0468] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20135。
- [0469] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20136。
- [0470] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20137。
- [0471] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20138。
- [0472] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20139。
- [0473] 在一些实施例中,本披露提供了DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸是WV-20140。
- [0474] 在一些实施例中,这种提供的寡核苷酸组合物可以是手性受控的,并且包含多个寡核苷酸,其中一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)核苷酸间键联是手性受控的。在一些实施例中,每个手性核苷酸间键联独立地是手性受控的。在一些实施例中,手性受控的核苷酸间键联具有S、R、nR或nS,如表A1中的“键联/立体化学”所示。
- [0475] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13405。
- [0476] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13406。
- [0477] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13407。
- [0478] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13826。
- [0479] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13827。
- [0480] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13835。
- [0481] 在一些实施例中,本披露提供了手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中该DMD寡核苷酸能够介导DMD外显子的跳读,并且该DMD寡核苷酸是WV-13864。











昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20124。

[0580] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20125。

[0581] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20126。

[0582] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20127。

[0583] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20128。

[0584] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20129。

[0585] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20130。

[0586] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20131。

[0587] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20132。

[0588] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20133。

[0589] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20134。

[0590] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20135。

[0591] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20136。

[0592] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20137。

[0593] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20138。

[0594] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20139。

[0595] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的DMD寡核昔酸组合物，其中该DMD寡核昔酸能够介导DMD外显子的跳读，并且该DMD寡核昔酸是WV-20140。

[0596] 在一些实验中，提供的DMD寡核昔酸可以提供出人意料地高的外显子51或53的跳读，例如，当与曲萨珀森(Drisapersen)和/或依普勒森(Eteplirsen)中的那些相比时。例如，与曲萨珀森和/或依普勒森相比，各种手性受控的DMD寡核昔酸组合物每个显示出介导肌营养不良蛋白中外显子51或53的跳读的优异的能力(在一些实施例中高出很多倍)。本披露中作为实例提供了某些数据。

[0597] 在一些实施例中，当在小鼠中测定实例DMD寡核昔酸时，通过以测试量(例如，

10mg/kg、30mg/kg等)经由尾静脉在雄性C57BL/10ScSnmdmdx小鼠(4-5周龄)中静脉内注射DMD寡核苷酸。在一些实施例中,在测试时间(例如在注射后的例如第2、7和/或14天等)收获组织,在一些实施例中,在液氮中新鲜冷冻并储存在-80°C直至分析。

[0598] 依照本披露,可以使用各种测定来评估DMD寡核苷酸水平。在一些实施例中,使用测试品系列稀释作为标准曲线,使用杂交-ELISA来定量组织中的DMD寡核苷酸水平:例如,在示例程序中,将马来酸酐活化的96孔板(皮尔斯公司(Pierce)15110)用50μl的捕获探针在500nM在2.5%NaHC03(吉博公司(Gibco),25080-094)中在37°C涂覆2小时。然后将板用PBST(PBS+0.1%Tween-20)洗涤3次,并用5%无脂乳-PBST在37°C封闭1小时。测试品DMD寡核苷酸系列稀释到基质中。将该标准品与原始样品一起用裂解缓冲液(4M胍;0.33%N-月桂基肌氨酸;25mM柠檬酸钠;10mM DTT)稀释,使得所有样品中的DMD寡核苷酸量小于100ng/mL。将20μl的稀释的样品与PBST中稀释的180μl的333nM检测探针混合,然后在PCR机器(65°C 10min,95°C 15min,4°C∞)中变性。50μl变性的样品在封闭的ELISA板中一式三份进行分配,并在4°C孵育过夜。在3次PBST洗涤后,添加PBST中的1:2000链霉亲和素-AP(50μl/孔),并在室温孵育1小时。用PBST充分洗涤后,添加100μl的AttoPhos(普洛麦格公司(Promega)S1000),在室温在黑暗中孵育10min,并在平板读数器(分子仪器公司(Molecular Device),M5)上读取荧光通道:Ex435nm、Em555nm。通过4-参数回归根据标准曲线计算样品中的寡核苷酸。

[0599] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸在血浆和组织匀浆中都是稳定的。

#### 用于外显子51的外显子跳读的示例肌营养不良蛋白寡核苷酸和组合物

[0600] 在一些实施例中,本披露提供了用于介导(例如,小鼠、人等的)DMD中外显子51跳读的DMD寡核苷酸、DMD寡核苷酸组合物及其使用方法。

[0601] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸和/或组合物能够介导外显子51的跳读。

[0602] 在一些实施例中,此类DMD寡核苷酸和组合物的非限制性实例包括以下那些:WV-12494、WV-12130、WV-12131、WV-12132、WV-12133、WV-12134、WV-12135、WV-12136、WV-12496、WV-12495、WV-12123、WV-12124、WV-12125、WV-12126、WV-12127、WV-12128、WV-12129、WV-12553、WV-12554、WV-12555、WV-12556、WV-12557、WV-12558、WV-12559、WV-12872、WV-12873、WV-12876、WV-12877、WV-12878、WV-12879、WV-12880、WV-12881、WV-12882、WV-12883、WV-3152、WV-15860、WV-20034、WV-20037、WV-20040、WV-20043、WV-20046、WV-20049、WV-20050、WV-20051、WV-20052、WV-20053、WV-20054、WV-20055、WV-20056、WV-20057、WV-20058、WV-20059、WV-20060、WV-20061、WV-20062、WV-20063、WV-20064、WV-20065、WV-20066、WV-20067、WV-20068、WV-20069、WV-20070、WV-20071、WV-20072、WV-20073、WV-20074、WV-20075、WV-20076、WV-20077、WV-20078、WV-20079、WV-20080、WV-20081、WV-20082、WV-20083、WV-20084、WV-20085、WV-20086、WV-20087、WV-20088、WV-20089、WV-20090、WV-20091、WV-20092、WV-20093、WV-20094、WV-20095、WV-20096、WV-20097、WV-20098、WV-20099、WV-20100、WV-20101、WV-20102、WV-20103、WV-20104、WV-20105、WV-20106、WV-20107、WV-20108、WV-20109、WV-20110、WV-20111、WV-20112、WV-20113、WV-20114、WV-20115、WV-20116、WV-20117、WV-20118、WV-20119、WV-20120、WV-20121、WV-20122、WV-20123、WV-20124、WV-20125、WV-20126、WV-20127、WV-20128、WV-20129、WV-20130、WV-20131、WV-20132、WV-20133、WV-20134、WV-20135、WV-20136、WV-

20137、WV-20138、WV-20139、WV-20140、以及具有碱基序列(包含任何这些DMD寡核苷酸的至少15个连续碱基)的其他DMD寡核苷酸。

[0603] 在一些实施例中,外显子51跳读的目的区域的序列在小鼠和人之间不同。

[0604] 依照本披露,可以使用各种测定来评估用于外显子跳读的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,为了测试用于人中的外显子51跳读的DMD寡核苷酸的化学和立体化学的特定组合的功效,可以制备具有小鼠序列的相应DMD寡核苷酸,然后在小鼠中进行测试。本披露认识到在外显子51的人和小鼠同源物中存在一些差异(下面加下划线):

M GTGGTTACTAAGGAAACTGTCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTGCTGTGGAG

H GTGGTTACTAAGGAAACTGCCCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTGGAG

其中M是小鼠,nt 7571-7630;并且H是人,nt 7665-7724。

[0605] 由于这些差异,可以制备用于跳读外显子51的稍微不同的DMD寡核苷酸用于在小鼠和人中进行测试。作为非限制性实例,以下DMD寡核苷酸序列可用于人和小鼠中的测试:

人DMD寡核苷酸序列:UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU

小鼠DMD寡核苷酸序列:GCAAAGAAGAUGGCAUUUCU

对人与小鼠之间的错配加下划线。

[0606] 可以用碱基序列(例如,UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU)、以及特定的化学模式、核苷酸间键联、立体化学、和另外的化学部分(如果有的话)的特定组合来构建旨在用于治疗人受试者的DMD寡核苷酸。可以在人细胞中体外测试或在人受试者体内测试这种DMD寡核苷酸,但是例如在小鼠中测试可能具有有限的适应性,因为两者的碱基序列具有错配。

[0607] 可以用对应的小鼠碱基序列(GCAAAGAAGAUGGCAUUUCU)和相同的化学模式、核苷酸间键联、立体化学、和另外的化学部分(如果有的话)构建对应的DMD寡核苷酸。可以在小鼠体内测试这种DMD寡核苷酸。构建并测试了包含小鼠碱基序列的若干种DMD寡核苷酸。

[0608] 在一些实施例中,可以在小鼠中测试人DMD外显子跳读DMD寡核苷酸,已经将该DMD寡核苷酸进行修饰以包含DMD基因(包含人序列)。

[0609] 本文描述了包含各种模式修饰的各种DMD寡核苷酸。下表示出了某些DMD寡核苷酸的测试结果。通常,数字指定跳读的量,其中100指示100%跳读,并且0表示没有跳读,除非另有说明。为了测定DMD的外显子跳读,将DMD寡核苷酸在△52人患者来源的成肌细胞和/或△45-52人患者来源的成肌细胞(人细胞,其中外显子52或外显子45-52已经被缺失)体外测试。除非另有说明,否则在各种实验中,DMD寡核苷酸是裸式(gymnotically)递送。

#### 表1. 某些DMD寡核苷酸的活性

在体外测试各种DMD外显子51DMD寡核苷酸的活性。

数字指示跳读DMD外显子23的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

测试的量为:10、3.3和1.1uM。

浓度	10	3.3	1.1	浓度	10	3.3	1.1
WV-3152	20.8	9	4.1	WV-14522	36.9	10.4	4.7
	22	10	4.9		27.4	10.4	4.2
	17.3	9.3	3.2		21	12.6	5.6
	21.3	7.2	4.4		26.5	10.4	5.7
WV-15860	27.4	13.2	12.7	WV-14523	27.2	8.1	6.2
	30.4	15.4	9		28.3	8.5	4.9
	33	14.2	6		18.4	9.1	3.6
	33.4	16.9	5.9		18.7	9.6	4.4
WV-15861	26.6	9.2	5.6	模拟物	0.21		
	28.5	6.1	5.4		0.35		
	34.1	8.2	5.2		0.48		
	29.9	11.1	4		0.24		
WV-15862	30.7		7.8				
	33.3		7.2				
	21.9	15.1	6.8				
	26.4	13.2	7.2				

表2. 某些DMD寡核苷酸的活性

体外测试用于跳读DMD外显子51的寡核苷酸。

数字指示跳读DMD外显子23的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

使用的DMD寡核苷酸的浓度:10、3.3和1.1uM。

	10 uM	3.3 uM	1.1 uM		10 uM	3.3 uM	1.1 uM
模拟物	0.2	0.3	0.2	WV-17861	37.6	22.6	9
	0.3	0.2	0.3		38.8	22.5	8.9
	0.2	0	0.2		40.7	24.4	13.2
	0.2	0.6	0.2		41.7	25.4	11.6
WV-7336	3.1	1.6	0.7	WV-17862	38.4	18.9	8.1
	8.9	1.8	0.1		34.1	19.6	9
	5.4	1.4	0.9		34.8	26	10
	4.9	1.5	0.7		36.1	21.4	9.5
WV-3152	32.4	26.5	7.5	WV-17863	32.7	18.2	9.2
	27.2	22.2	8.4		35.1	18.9	9.3
	28	14.5	7.6		34.8	18.2	8.6
	26.8	14.8	7.3		30.7	17	9
WV-15860	43.3	25.7	10.2	WV-17864	37.3	23.6	11.7
	37.9	23.8	9.6		41.4	23.3	10.6
	38.4	24.5	11.2		39.9	20.6	17.5
	42.4	21.9	11		38.8	21.7	10.2
WV-17859	42.3	26.7	16.3	WV-17865	35.9	16.5	9.3
	41.3	26	16.8		34	16.7	7.5
	39.9	22.9	15.5		34.4	17.5	11.9
	48.6	23.6	14.9		34.1	17.8	9.8
WV-17860	38.1	19.3	11.7	WV-17866	48.7	28.4	17.7
	35.3	19.2	12		43.3	28.6	13.1
	41	28.2	16.4		44.5	24.8	15.4
	40.4	21.9	11.1		45.1	30.5	16.3

表3. 某些DMD寡核苷酸的活性

体外测试用于跳读DMD外显子51的寡核苷酸。

数字指示跳读DMD外显子23的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

使用的DMD寡核苷酸的浓度:10和3.3uM。

	10 uM	3.3 uM		10 uM	3.3 uM
模拟物	0	0	WV-20058	14.6	4.8
	0	0			
	0	0		12	3.7
	0	0		12.6	3.5
WV-20034	15.9	7	WV-20061	35.8	26.5
	17.1	8.4			
	16.1	7.3		39.3	24.2
	15.3	7.2		39.9	22.8
WV-20037	29.7	18.3	WV-20064	26.5	17.6
	27.2	17.5			
	26.6	19.4		24.5	16.4
	29.2	18.4		27.5	17.1
WV-20040	9.6	4.9	WV-20067	15.7	8.3
	9.1	5.2		16.8	9.3
	11.4	3.5		17.3	8.6
	10.9	2.9		16.3	8.7
WV-20043	20.2	9.6	WV-20070	41.3	26.4
	20.4	9.8		31.7	22.3
	18.9	9.8		39.7	27.2
	21	10.4		38.4	26.9
WV-20046	28.5	14.7	WV-20073	30.9	21.1
	29.8	14.2		26.9	17.9
	29.2	15.8		31.1	20.2
	26.6	14.5		30.7	22.2
WV-20049	20.9	11.6	WV-20076	23.2	16.8
				18.9	11.4
	18.6	12.2		21.8	16.9
	18.4	11.7		22.8	15.8

WV-20052	28.8	18.8	WV-3152	35.7	24.8
	30.1	18.6		33.5	24.9
	29.6	20.1		32.1	25.3
WV-20055	26.8	17	WV-15860	41.9	27.5
	25.3	16.6		43.6	30.7
	24.1	17		42.4	30

表4A. 某些DMD寡核苷酸的活性

体外测试用于跳读DMD外显子51的寡核苷酸。

以10uM给药寡核苷酸4d。

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20093	35	34	35	38
WV-15860	29	31	26	23	WV-20092	25	26	25	25
WV-20140	1	1	1	1	WV-20091	28	27	30	32
WV-20139	3	3	2	2	WV-20090	21	19	22	22
WV-20138			2	3	WV-20089	8	7	8	9
WV-20137	4	5			WV-20088	22	21	26	25
WV-20136					WV-20087	28	28	33	32
WV-20135	5	5	5	5	WV-20086	25	25	27	26
WV-20134	5	6	5	4	WV-20085	33	31	30	31
WV-20133	17	17	13	13	WV-20084	21	22	21	21
WV-20132	8	8	6	6	WV-20083	21	21	19	17
WV-20131	14	16	12	12	WV-20082	42	37	32	30
WV-20130	10	9	8	8	WV-20081	41	41	30	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20080	49	44	26	25
WV-20128	9	9	8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20127			8	8	WV-20078	27	28	36	35
WV-20126	7	8	8	7	WV-20077	10	10	10	10

WV-20125	8	8	8	8	WV-20076	45	45	45	41
WV-20124	22	21	21	21	WV-20075	40	31	37	42
WV-20123	13	13	14	12	WV-20074	55	57	53	56
WV-20122	11	12	12	11	WV-20073	51	55	51	50
WV-20121	21	22	22	21	WV-20072	41	36	37	36
WV-20120	28	30	32	33	WV-20071	42	40	44	46
WV-20119	52	50			WV-20070	18	18	25	25
WV-20118	39	37	27	26	WV-20069	11	11	10	9
WV-20117	18	17	15	18	WV-20068	20	17	20	18
WV-20116	20	20	17	17	WV-20067	12	9	11	11
WV-20115	8	8	8	6	WV-20066	12	11	13	12
WV-20114	19	20	15	14	WV-20065	16	15	16	14
WV-20113	20	18	17	15	WV-20064	37	35	37	36
WV-20112	16	15	12	12	WV-20063	19		24	22
WV-20111	31	30	33	31	WV-20062	6	6	7	7
WV-20110	14	14	14	12	WV-20061	24	23	26	24
WV-20109	20	21	25	24	WV-20060	16	17	16	17
WV-20108	27	25	22	22	WV-20059	55	42	62	67
WV-20107	20	19	16	14	WV-20058	28	30	33	33
WV-20106	44	42	34	37	WV-20057	37	38	37	34
WV-20105	23	22	18	18	WV-20056	35	34	33	35
WV-20104	41	40	33	28	WV-20055			40	40
WV-20103	48	52	53	53	WV-20054	25	25	35	36
WV-20102	54	52	55	59	WV-20053	43	45	46	46
WV-20101	38	39	38	43	WV-20052	47	47	53	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20051	30	33	30	30
WV-20099	53	51	47	48	WV-20050	29	28	28	26
WV-20098	46	44	45	46	WV-20049	41	41	38	38
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	24	23	22	21
WV-20096	45	41	42	43					
WV-20095	43	41	50	47					
WV-20094	55	50	57	55					

表4B.某些DMD寡核苷酸的活性

将患者△48-50细胞用分化培养基中的寡核苷酸给药4d。通过Trizol提取来收获RNA。

将TaqMan信号标准化为SFSR9内部对照。

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

	10 uM	3.3 uM		10 uM	3.3 uM
模拟物	0	0	WV-20058	14.6	4.8
	0	0			
	0	0		12	3.7
	0	0		12.6	3.5
WV-20034	15.9	7	WV-20061	35.8	26.5
	17.1	8.4			
	16.1	7.3		39.3	24.2
	15.3	7.2		39.9	22.8
WV-20037	29.7	18.3	WV-20064	26.5	17.6
	27.2	17.5			
	26.6	19.4		24.5	16.4
	29.2	18.4		27.5	17.1
WV-20040	9.6	4.9	WV-20067	15.7	8.3
	9.1	5.2		16.8	9.3
	11.4	3.5		17.3	8.6
	10.9	2.9		16.3	8.7
WV-20043	20.2	9.6	WV-20070	41.3	26.4
	20.4	9.8		31.7	22.3
	18.9	9.8		39.7	27.2
	21	10.4		38.4	26.9
WV-20046	28.5	14.7	WV-20073	30.9	21.1
	29.8	14.2		26.9	17.9

	29.2	15.8		31.1	20.2
	26.6	14.5		30.7	22.2
WV-20049	20.9	11.6	WV-20076	23.2	16.8
				18.9	11.4
	18.6	12.2		21.8	16.9
	18.4	11.7		22.8	15.8
WV-20052	28.8	18.8	WV-3152	35.7	24.8
	30.1	18.6		33.5	24.9
	29.6	20.1		32.1	25.3
WV-20055	26.8	17	WV-15860	41.9	27.5
	25.3	16.6		43.6	30.7
	24.1	17		42.4	30

表4C. 某些DMD寡核苷酸的活性

在自由摄取条件下,将在分化培养基中的寡核苷酸给药患者来源的 $\Delta$ 48-50细胞持续4天。通过Trizol提取来收获RNA。将DMD‘跳读’的TaqMan信号和DMD‘总’转录物标准化为SFSR9内部对照。

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

	10 uM	3.3 uM	1.1 uM
模拟物	0.2	0.3	0.2
	0.3	0.2	0.3
	0.2	0	0.2
	0.2	0.6	0.2
WV-7336	3.1	1.6	0.7
	8.9	1.8	0.1
	5.4	1.4	0.9
	4.9	1.5	0.7

WV-3152	32.4	26.5	7.5
	27.2	22.2	8.4
	28	14.5	7.6
	26.8	14.8	7.3
WV-15860	43.3	25.7	10.2
	37.9	23.8	9.6
	38.4	24.5	11.2
	42.4	21.9	11
WV-17859	42.3	26.7	16.3
	41.3	26	16.8
	39.9	22.9	15.5
	48.6	23.6	14.9
WV-17860	38.1	19.3	11.7
	35.3	19.2	12
	41	28.2	16.4
	40.4	21.9	11.1
WV-17861	37.6	22.6	9
	38.8	22.5	8.9
	40.7	24.4	13.2
	41.7	25.4	11.6
WV-17862	38.4	18.9	8.1
	34.1	19.6	9
	34.8	26	10
	36.1	21.4	9.5
WV-17863	32.7	18.2	9.2
	35.1	18.9	9.3
	34.8	18.2	8.6
	30.7	17	9
WV-17864	37.3	23.6	11.7
	41.4	23.3	10.6
	39.9	20.6	17.5

	38.8	21.7	10.2
WV-17865	35.9	16.5	9.3
	34	16.7	7.5
	34.4	17.5	11.9
	34.1	17.8	9.8
WV-17866	48.7	28.4	17.7
	43.3	28.6	13.1
	44.5	24.8	15.4
	45.1	30.5	16.3

表4D. 某些DMD寡核苷酸的活性

在自由摄取条件下,将在分化培养基中的寡核苷酸给药患者来源的Δ 48-50细胞持续4天。通过基于珠的提取收获来自24WP的RNA。将DMD‘跳读’的TaqMan信号和DMD‘总’转录物标准化为SFSR9内部对照。

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比,其中100表示100%跳读)。

	10 uM	3.3 uM		10 uM	3.3 uM
模拟物	0	0	WV-20058	14.6	4.8
	0	0			
	0	0		12	3.7
	0	0		12.6	3.5
WV-20034	15.9	7	WV-20061	35.8	26.5
	17.1	8.4			
	16.1	7.3		39.3	24.2
	15.3	7.2		39.9	22.8
WV-20037	29.7	18.3	WV-20064	26.5	17.6
	27.2	17.5			
	26.6	19.4		24.5	16.4
	29.2	18.4		27.5	17.1
WV-20040	9.6	4.9	WV-20067	15.7	8.3

	9.1	5.2		16.8	9.3
	11.4	3.5		17.3	8.6
	10.9	2.9		16.3	8.7
WV-20043	20.2	9.6	WV-20070	41.3	26.4
	20.4	9.8		31.7	22.3
	18.9	9.8		39.7	27.2
	21	10.4		38.4	26.9
WV-20046	28.5	14.7	WV-20073	30.9	21.1
	29.8	14.2		26.9	17.9
	29.2	15.8		31.1	20.2
	26.6	14.5		30.7	22.2
WV-20049	20.9	11.6	WV-20076	23.2	16.8
				18.9	11.4
	18.6	12.2		21.8	16.9
	18.4	11.7		22.8	15.8
WV-20052	28.8	18.8	WV-3152	35.7	24.8
	30.1	18.6		33.5	24.9
	29.6	20.1		32.1	25.3
WV-20055	26.8	17	WV-15860	41.9	27.5
	25.3	16.6		43.6	30.7
	24.1	17		42.4	30

表4E. 某些DMD寡核苷酸的活性

条件和参数: 将在生物复制品中的96WP中的Δ 48-50细胞(Delta 48-50) (无预分化) 在10uM持续4天

裂解样品并在珠裂解缓冲液中加热(baked), 在-80℃冷冻

基于珠子的提取和手动(与Bravo对比)洗涤

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比, 其中100表示100%跳读)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20094	55	50	57	55
WV-15860	29	31	26	23	WV-20093	35	34	35	38
WV-20140	1	1	1	1	WV-20092	25	26	25	25
WV-20139	3	3	2	2	WV-20091	28	27	30	32
WV-20138			2	3	WV-20090	21	19	22	22
WV-20137	4	5			WV-20089	8	7	8	9
WV-20136					WV-20088	22	21	26	25
WV-20135	5	5	5	5	WV-20087	28	28	33	32
WV-20134	5	6	5	4	WV-20086	25	25	27	26
WV-20133	17	17	13	13	WV-20085	33	31	30	31
WV-20132	8	8	6	6	WV-20084	21	22	21	21
WV-20131	14	16	12	12	WV-20083	21	21	19	17
WV-20130	10	9	8	8	WV-20082	42	37	32	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20081	41	41	30	30
WV-20128	9	9	8	8	WV-20080	49	44	26	25
WV-20127			8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20126	7	8	8	7	WV-20078	27	28	36	35
WV-20125	8	8	8	8	WV-20077	10	10	10	10
WV-20124	22	21	21	21	WV-20076	45	45	45	41
WV-20123	13	13	14	12	WV-20075	40	31	37	42
WV-20122	11	12	12	11	WV-20074	55	57	53	56
WV-20121	21	22	22	21	WV-20073	51	55	51	50
WV-20120	28	30	32	33	WV-20072	41	36	37	36
WV-20119	52	50			WV-20071	42	40	44	46
WV-20118	39	37	27	26	WV-20070	18	18	25	25
WV-20117	18	17	15	18	WV-20069	11	11	10	9
WV-20116	20	20	17	17	WV-20068	20	17	20	18
WV-20115	8	8	8	6	WV-20067	12	9	11	11
WV-20114	19	20	15	14	WV-20066	12	11	13	12
WV-20113	20	18	17	15	WV-20065	16	15	16	14
WV-20112	16	15	12	12	WV-20064	37	35	37	36

WV-20111	31	30	33	31	WV-20063	19		24	22
WV-20110	14	14	14	12	WV-20062	6	6	7	7
WV-20109	20	21	25	24	WV-20061	24	23	26	24
WV-20108	27	25	22	22	WV-20060	16	17	16	17
WV-20107	20	19	16	14	WV-20059	55	42	62	67
WV-20106	44	42	34	37	WV-20058	28	30	33	33
WV-20105	23	22	18	18	WV-20057	37	38	37	34
WV-20104	41	40	33	28	WV-20056	35	34	33	35
WV-20103	48	52	53	53	WV-20055			40	40
WV-20102	54	52	55	59	WV-20054	25	25	35	36
WV-20101	38	39	38	43	WV-20053	43	45	46	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20052	47	47	53	46
WV-20099	53	51	47	48	WV-20051	30	33	30	30
WV-20098	46	44	45	46	WV-20050	29	28	28	26
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	41	41	38	38
WV-20096	45	41	42	43	WV-20049	24	23	22	21
WV-20095	43	41	50	47					

表4F.某些DMD寡核苷酸的活性

将△48-50细胞在游离摄取条件下用10uM寡核苷酸在分化培养基中处理4天。用安捷伦(Agilent)基于珠的方案提取RNA，并用随机六聚体逆转录。TaqMan测定针对总DMD转录物或对应于跳读的转录物的外显子连接，每个都与hSFSR9内部对照多重运行。

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比，其中100表示100%跳读)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20094	55	50	57	55
WV-15860	29	31	26	23	WV-20093	35	34	35	38
WV-20140	1	1	1	1	WV-20092	25	26	25	25
WV-20139	3	3	2	2	WV-20091	28	27	30	32
WV-20138			2	3	WV-20090	21	19	22	22

WV-20137	4	5			WV-20089	8	7	8	9
WV-20136					WV-20088	22	21	26	25
WV-20135	5	5	5	5	WV-20087	28	28	33	32
WV-20134	5	6	5	4	WV-20086	25	25	27	26
WV-20133	17	17	13	13	WV-20085	33	31	30	31
WV-20132	8	8	6	6	WV-20084	21	22	21	21
WV-20131	14	16	12	12	WV-20083	21	21	19	17
WV-20130	10	9	8	8	WV-20082	42	37	32	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20081	41	41	30	30
WV-20128	9	9	8	8	WV-20080	49	44	26	25
WV-20127			8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20126	7	8	8	7	WV-20078	27	28	36	35
WV-20125	8	8	8	8	WV-20077	10	10	10	10
WV-20124	22	21	21	21	WV-20076	45	45	45	41
WV-20123	13	13	14	12	WV-20075	40	31	37	42
WV-20122	11	12	12	11	WV-20074	55	57	53	56
WV-20121	21	22	22	21	WV-20073	51	55	51	50
WV-20120	28	30	32	33	WV-20072	41	36	37	36
WV-20119	52	50			WV-20071	42	40	44	46
WV-20118	39	37	27	26	WV-20070	18	18	25	25
WV-20117	18	17	15	18	WV-20069	11	11	10	9
WV-20116	20	20	17	17	WV-20068	20	17	20	18
WV-20115	8	8	8	6	WV-20067	12	9	11	11
WV-20114	19	20	15	14	WV-20066	12	11	13	12
WV-20113	20	18	17	15	WV-20065	16	15	16	14
WV-20112	16	15	12	12	WV-20064	37	35	37	36
WV-20111	31	30	33	31	WV-20063	19		24	22
WV-20110	14	14	14	12	WV-20062	6	6	7	7
WV-20109	20	21	25	24	WV-20061	24	23	26	24
WV-20108	27	25	22	22	WV-20060	16	17	16	17
WV-20107	20	19	16	14	WV-20059	55	42	62	67

WV-20106	44	42	34	37	WV-20058	28	30	33	33
WV-20105	23	22	18	18	WV-20057	37	38	37	34
WV-20104	41	40	33	28	WV-20056	35	34	33	35
WV-20103	48	52	53	53	WV-20055			40	40
WV-20102	54	52	55	59	WV-20054	25	25	35	36
WV-20101	38	39	38	43	WV-20053	43	45	46	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20052	47	47	53	46
WV-20099	53	51	47	48	WV-20051	30	33	30	30
WV-20098	46	44	45	46	WV-20050	29	28	28	26
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	41	41	38	38
WV-20096	45	41	42	43	WV-20049	24	23	22	21
WV-20095	43	41	50	47					

表4G. 某些DMD寡核苷酸的活性

将Δ48-50细胞在游离摄取条件下用10uM寡核苷酸在分化培养基中处理4天。用安捷伦(Agilent)基于珠的方案提取RNA，并用随机六聚体逆转录。TaqMan测定针对总DMD转录物或对应于跳读的转录物的外显子连接，每个都与hSFSR9内部对照多重运行。

数字指示跳读DMD外显子51的量(占总mRNA的百分比，其中100表示100%跳读)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20094	55	50	57	55
WV-15860	29	31	26	23	WV-20093	35	34	35	38
WV-20140	1	1	1	1	WV-20092	25	26	25	25
WV-20139	3	3	2	2	WV-20091	28	27	30	32
WV-20138			2	3	WV-20090	21	19	22	22
WV-20137	4	5			WV-20089	8	7	8	9
WV-20136					WV-20088	22	21	26	25
WV-20135	5	5	5	5	WV-20087	28	28	33	32
WV-20134	5	6	5	4	WV-20086	25	25	27	26
WV-20133	17	17	13	13	WV-20085	33	31	30	31

WV-20132	8	8	6	6	WV-20084	21	22	21	21
WV-20131	14	16	12	12	WV-20083	21	21	19	17
WV-20130	10	9	8	8	WV-20082	42	37	32	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20081	41	41	30	30
WV-20128	9	9	8	8	WV-20080	49	44	26	25
WV-20127			8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20126	7	8	8	7	WV-20078	27	28	36	35
WV-20125	8	8	8	8	WV-20077	10	10	10	10
WV-20124	22	21	21	21	WV-20076	45	45	45	41
WV-20123	13	13	14	12	WV-20075	40	31	37	42
WV-20122	11	12	12	11	WV-20074	55	57	53	56
WV-20121	21	22	22	21	WV-20073	51	55	51	50
WV-20120	28	30	32	33	WV-20072	41	36	37	36
WV-20119	52	50			WV-20071	42	40	44	46
WV-20118	39	37	27	26	WV-20070	18	18	25	25
WV-20117	18	17	15	18	WV-20069	11	11	10	9
WV-20116	20	20	17	17	WV-20068	20	17	20	18
WV-20115	8	8	8	6	WV-20067	12	9	11	11
WV-20114	19	20	15	14	WV-20066	12	11	13	12
WV-20113	20	18	17	15	WV-20065	16	15	16	14
WV-20112	16	15	12	12	WV-20064	37	35	37	36
WV-20111	31	30	33	31	WV-20063	19		24	22
WV-20110	14	14	14	12	WV-20062	6	6	7	7
WV-20109	20	21	25	24	WV-20061	24	23	26	24
WV-20108	27	25	22	22	WV-20060	16	17	16	17
WV-20107	20	19	16	14	WV-20059	55	42	62	67
WV-20106	44	42	34	37	WV-20058	28	30	33	33
WV-20105	23	22	18	18	WV-20057	37	38	37	34
WV-20104	41	40	33	28	WV-20056	35	34	33	35
WV-20103	48	52	53	53	WV-20055			40	40
WV-20102	54	52	55	59	WV-20054	25	25	35	36

WV-20101	38	39	38	43	WV-20053	43	45	46	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20052	47	47	53	46
WV-20099	53	51	47	48	WV-20051	30	33	30	30
WV-20098	46	44	45	46	WV-20050	29	28	28	26
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	41	41	38	38
WV-20096	45	41	42	43	WV-20049	24	23	22	21
WV-20095	43	41	50	47					

#### 用于外显子53的外显子跳读的示例肌营养不良蛋白寡核苷酸和组合物

[0610] 在一些实施例中,本披露提供了用于介导(例如,小鼠、人等的)DMD中外显子53跳读的DMD寡核苷酸、DMD寡核苷酸组合物及其使用方法。

[0611] 在一些实施例中,可以在小鼠中测试DMD寡核苷酸(例如,人DMD外显子53跳读DMD寡核苷酸),已经将该DMD寡核苷酸进行修饰以包含DMD基因(包含人外显子53序列)。

[0612] 在一些实施例中,DMD寡核苷酸(例如,DMD寡核苷酸)能够介导外显子53的跳读。此类DMD寡核苷酸的非限制性实例包括:WV-12880、WV-13826、WV-13827、WV-14791、WV-9517、WV-13835、WV-13864、WV-14344、以及具有碱基序列(包含任何这些DMD寡核苷酸的至少15个连续碱基)的其他DMD寡核苷酸。

[0613] 本披露中描述了用于跳读肌营养不良蛋白外显子53的各种实验的结果。例如,来自序列识别筛选的数据在以下表5中显示。

[0614] 测试另外的DMD寡核苷酸其介导DMD外显子的跳读的能力(如以下显示)。完全PMO(吗啉代)DMD寡核苷酸具有以下序列:

PMO SR	WV-13405	GTTGCCTCCGGTCTGAAGGTGTT
PMO WV	WV-13406	CTCCGGTCTGAAGGTGTT
PMO	WV-13407	TGCCTCCGGTCTGAAGGTGTTCTGTA

WV-13407也称为PMO NS。

表5.某些DMD寡核苷酸的示例数据。

数字指示相对于对照的跳读量。

寡核苷酸浓度 [uM]	WV-951	WV-1382	WV-1382	WV-1383	模拟物
10 uM	7	6	7	5	
	45.7	46.5	23.1	40.5	1.2
	46.3	45.8	22.9	58.8	1.1
	49.3	46.8	26.8	54.5	1.3
3.3 uM	48.5	50.3	28.1	55.2	1.2
	18.1	20.3	7.9	24.6	1
	17	19.5	8.3	25.3	1.1
	22.6	19.7	8.8	26.6	1.1
1.1 uM	22.8	20.2	8.3	27.2	1.1
	6	7	2.9	7.9	1
	6	6.2	2.7	7.4	1.2
	6.9	7.3	0.7	9.6	0.9
	6.6	6.8	0.9	9.1	0.7

	WV-9517	WV-12880	WV-13864	WV-14344	模拟物
10 uM	36.1	60.2	66.8	47.9	0.9
	38.3	62.0	67.0	46.8	1.0
	44.5	60.9	68.7	56.8	1.2
	43.9	59.2	69.6	56.3	1.0
3.3 uM	15.4	38.3	45.3	25.1	0.9
	15.8	37.3	45.6	27.0	0.9
	18.8	37.9	50.5	39.2	1.0
	18.8	39.6	49.3	38.9	1.0
1.1 uM	4.7	15.8	21.5	12.2	0.6
	4.9	14.4	22.6	12.4	0.9
	6.4	18.5	24.9	17.2	1.1
	6.2	16.2	13.2	17.1	0.9
0.3 uM	2.2	5.0	6.6	5.7	0.8
	1.8	5.0	5.9	5.7	0.9

	2.7	7.4	8.2	7.2	1.0
	2.7	7.5	8.2	6.9	1.0

表6. 某些DMD寡核苷酸的示例数据。

各种DMD寡核苷酸的跳读效率, 测试DMD外显子53的跳读。数字表示外显子53的跳读。

将△45–52患者成肌细胞分化7天, 然后在分化培养基中裸式条件下用DMD寡核苷酸处理4d。通过Trizol提取收获RNA并通过TaqMan分析跳读。

浓度	10 uM	3.3 uM	1.1 uM	0.3 uM	0.1 uM
模拟物	1.1	1.2		0.8	1.0
	1.0	1.1	2.0	0.9	1.0
	1.1	0.7	1.1	1.0	1.1
	1.2	0.7	1.1	0.9	1.0
WV-13405 (PMO)	44.8	28.6	18.1	9.5	4.0
	44.8	23.4	17.4	8.7	4.0
	51.2	26.5	11.4	5.1	3.7
	50.8	25.6	11.2	5.5	3.6
WV-9517	35.9	18.3	6.5	2.2	1.9
	36.6	17.3	6.4	2.1	1.9
	40.2	23.4	5.5	2.7	1.7
	38.7	25.6	5.9	2.2	1.8
Wv-12880	57.3	36.3	16.4	4.8	7.5
	55.8	37.0	18.1	2.8	4.7
	57.5	35.9	16.6	8.0	7.4
	58.9	33.0	16.5	7.2	6.8
WV-13864	68.1	45.1	22.6	10.5	7.4
	68.0	44.5	23.0	12.0	5.6
	67.5	43.1	24.3	8.4	6.0
	64.8	44.5	19.9	3.3	6.1
WV-13835	40.2	21.5	6.3	2.8	2.0

	39.4	20.3	9.7	2.5	2.0
	50.0	21.0	5.5	3.2	2.0
	47.7	20.6	6.0	3.3	2.2
WV-14791	41.4	25.9	7.4	4.7	0.7
	40.3	24.8	5.8	4.0	0.5
	40.1	24.9	9.1	4.3	3.9
	41.3	27.2	8.9	4.6	3.5
WV-14344	50.1	28.6	13.6	6.4	3.8
	47.4	28.6	8.8	5.8	4.7
	54.9	46.1	18.0	11.4	6.6
	55.7	38.3	18.7	11.8	6.0

表7. 某些DMD寡核苷酸的示例数据。

各种DMD寡核苷酸的跳读效率, 测试DMD外显子53的跳读。数字表示外显子53的跳读。

在分化培养基中裸式条件下, 用DMD寡核苷酸处理△45-52患者成肌细胞4d(4天)。通过Trizol提取收获RNA并通过TaqMan分析跳读。

	10 uM	3.3 uM	1.1 uM	0.3 uM	0.1 uM
模拟物	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7
	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7
	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7
	0.5	0.5	0.7	0.6	0.7
Wv-13405 (PMO)	9.4	1.5	3.4	1.1	0.8
	9.3	1.4	3.1	1.1	0.8
	6.6	2.8	1.5	0.9	0.8
	6.3	2.6	1.5	1.0	0.8
WV-9517	29.3	8.4	2.6	1.0	0.7
	28.7	9.2	3.0	1.1	0.8
	16.6	6.6	2.3	1.1	0.7
	16.9	6.8	2.2	1.1	0.9

WV-12880	37.9	17.7	9.6	3.4	1.3
	38.8	19.9	9.1	3.3	1.4
	31.4	16.1	7.9	3.3	1.6
	31.6	16.8	8.0	3.0	1.5
WV-13864	55.9	28.6	11.7	4.3	2.0
	54.3	27.8	11.6	4.6	2.0
	43.4	22.2	10.7	4.2	2.0
	43.0	22.7	9.8	3.8	2.1
WV-13835	38.7	11.6	2.9	1.3	0.9
	37.2	11.0	2.9	1.3	0.8
	42.3	13.1	3.5	1.2	0.9
	41.5	10.0	3.1	1.3	0.9
WV-14791	26.3	12.1	5.2	1.9	1.3
	24.8	11.2	4.7	2.1	1.1
	28.0	13.0	5.2	2.2	1.2
	27.6	12.4	4.9	2.1	1.4
WV-14344	36.2	17.8	8.0	2.7	1.7
	37.4	17.0	7.1	2.7	1.8
	37.4	22.3	9.8	3.7	1.7
	36.6	22.6	9.9	3.7	1.5

以高达30uM的多种浓度体外测试若干种DMD寡核苷酸(包括WV-9517、WV-13864、WV-13835、和WV-14791)用于在HEK-蓝-TLR9细胞(16小时裸式摄取)中的TLR9活化。WV-13864和WV-14791包含Rp构型的手性受控的非负电荷的核苷酸间键联。WV-9517、WV-13864、WV-13835、和WV-14791未表现出显著的TLR9活化(小于2-倍TLR9诱导;数据未显示)。与水相比,WV-13864和WV-14791在PBMC细胞因子释放测定中也表现出高达30uM的可忽略信号(数据未显示)。

#### 用于制备寡核苷酸和组合物的示例方法

[0615] 除其他事项外,本披露提供了用于制备寡核苷酸和寡核苷酸组合物(包括手性受控的寡核苷酸和手性受控的寡核苷酸核苷酸)的技术(方法、试剂、条件、纯化方法等)。如本文所述,可以依照本披露,利用各种技术(方法、试剂、条件、纯化方法等)制备提供的寡核苷酸及其组合物,包括但不限于以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO

2018/237194、和/或WO 2019/055951，其各自的制备技术通过引用并入本文。

[0616] 在一些实施例中，本披露提供了手性受控的寡核苷酸，例如，手性受控的DMD寡核苷酸。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过50%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约55%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约60%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约65%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约70%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约75%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约80%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约85%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约90%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约91%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约92%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约93%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约94%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约95%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约96%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约97%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约98%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约99.5%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约99.6%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约99.7%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约99.8%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过约99.9%。在一些实施例中，提供的手性受控的DMD寡核苷酸的纯度超过至少约99%。

[0617] 在一些实施例中，手性受控的寡核苷酸组合物（例如，手性受控的DMD寡核苷酸组合物）是设计为包含单一寡核苷酸类型的组合物。在某些实施例中，此类组合物是约50%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约50%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约55%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约60%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约70%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约75%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约80%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约85%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约90%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约91%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约92%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约93%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约94%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约95%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约96%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约97%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约98%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约99%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约99.5%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约99.6%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约99.7%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约99.8%非对映异构体纯的。在一些实施例中，此类组合物是约99.9%非对映异构体纯

的。在一些实施例中，此类组合物是至少约99%非对映异构体纯的。

[0618] 除其他事项外，本披露认识到寡核苷酸(例如，DMD寡核苷酸)的立体选择性(而非立体随机或外消旋)制备的挑战。除其他事项外，本披露提供了立体选择性制备包含多个(例如，超过5、6、7、8、9、或10个)核苷酸间键联的寡核苷酸，并且特别地包含多个(例如，超过5、6、7、8、9、或10个)手性核苷酸间键联的DMD寡核苷酸的方法和试剂。在一些实施例中，在寡核苷酸(如DMD寡核苷酸)的立体随机或外消旋制剂中，形成具有小于90:10、95:5、96:4、97:3、或98:2非对映选择性的至少一个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，对于立体选择性或手性受控的寡核苷酸(如DMD寡核苷酸)的制备，形成具有大于90:10、95:5、96:4、97:3、或98:2非对映选择性的每个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，对于立体选择性或手性受控的DMD寡核苷酸制剂，形成具有大于95:5非对映选择性的每个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，对于立体选择性或手性受控的DMD寡核苷酸制剂，形成具有大于96:4非对映选择性的每个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，对于立体选择性或手性受控的DMD寡核苷酸制剂，形成具有大于97:3非对映选择性的每个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，对于立体选择性或手性受控的DMD寡核苷酸制剂，形成具有大于98:2非对映选择性的每个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，对于立体选择性或手性受控的DMD寡核苷酸制剂，形成具有大于99:1非对映选择性的每个手性核苷酸间键联。在一些实施例中，寡核苷酸(例如，DMD寡核苷酸)中的手性核苷酸间键联的非对映选择性可通过模型反应测量，例如在基本上相同或相当的条件下形成二聚体，其中二聚体与手性核苷酸间键联具有相同的核苷酸间键联、二聚体的5'-核苷与手性核苷酸间键联的5'-端的核苷相同、二聚体的3'-核苷与手性核苷酸间键联的3'-端的核苷相同。

[0619] 在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸组合物是设计为包含多种DMD寡核苷酸类型的组合物。在一些实施例中，本披露的方法允许产生手性受控的DMD寡核苷酸文库，使得预选量的任何一种或多种手性受控的DMD寡核苷酸类型可以与任何一种或多种其他手性受控的DMD寡核苷酸类型混合，以产生手性受控的DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中，预选量的DMD寡核苷酸类型是具有任一种上述非对映异构体纯度的组合物。

[0620] 在一些实施例中，本披露提供了用于制得手性受控的寡核苷酸(例如，DMD寡核苷酸)的方法，该方法包括以下步骤：

- (1) 偶联；
- (2) 加帽；
- (3) 任选地修饰；
- (4) 去封闭；以及
- (5) 重复步骤(1)–(4)，直至实现所希望的长度。

[0001] 在一些实施例中，本披露提供了例如用于制备DMD寡核苷酸的方法，该方法包括一个或多个循环，每个循环独立地包含：

- (1) 偶联步骤；
- (2) 任选地，修饰前加帽步骤；
- (3) 修饰步骤；
- (4) 任选地，修饰后加帽步骤；以及
- (5) 任选地去封闭步骤。

[0621] 在一些实施例中，循环包括一个或多个修饰前加帽步骤。在一些实施例中，循环包括一个或多个修饰后加帽步骤。在一些实施例中，循环包括一个或多个修饰前和修饰后加帽步骤。在一些实施例中，循环包括一个或多个解封步骤。在一些实施例中，循环包含偶联步骤、修饰前加帽步骤、修饰步骤、修饰后加帽步骤、和去封闭步骤。在一些实施例中，循环包含偶联步骤、修饰前加帽步骤、修饰步骤、和去封闭步骤。在一些实施例中，循环包含偶联步骤、修饰步骤、修饰后加帽步骤、和去封闭步骤。在一些实施例中，包含偶联步骤、修饰前加帽步骤、修饰步骤、修饰后加帽步骤、和去封闭步骤。在一些实施例中，一个或多个循环包含偶联步骤、修饰前加帽步骤、修饰步骤、和去封闭步骤。在一些实施例中，一个或多个循环包含偶联步骤、修饰步骤、修饰后加帽步骤和去封闭步骤。

[0622] 当描述提供的方法时，“循环”一词具有本领域普通技术人员所理解的普通含义。在一些实施例中，步骤(1)–(4)的一个轮回称为循环。在一些实施例中，一些循环包含修饰。在一些实施例中，一些循环不包含修饰。在一些实施例中，一些循环包含修饰并且一些循环不包含修饰。在一些实施例中，每个循环独立地包含修饰步骤。在一些实施例中，每个循环不包含循环步骤。

[0623] 在一些实施例中，为了形成手性受控的核苷酸间键联，利用包含手性助剂的手性纯的亚磷酰胺来立体选择性地形成手性受控的核苷酸间键联。可以依照本披露利用各种亚磷酰胺和手性助剂，例如，以下中描述的那些：US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951，其各自的亚磷酰胺和手性助剂通过引用并入本文。

[0624] 在一些实施例中，这种核苷酸间键联是中性核苷酸间键联。在一些实施例中，这种核苷酸间键联是手性受控的核苷酸间键联。在一些实施例中，这种核苷酸间键联包含手性助剂部分。在一些实施例中，这种核苷酸间键联不包含手性助剂部分。在一些实施例中，手性助剂部分在修饰期间脱落。

[0625] 提供的技术提供各种优势。除其他事项外，如本文所证明的，提供的技术可以大大改善寡核苷酸合成粗品纯度和产率，特别是对于经修饰的和/或手性纯的寡核苷酸（如DMD寡核苷酸），其提供对治疗目的而言至关重要的许多特性和活性。由于能够为治疗上重要的DMD寡核苷酸提供出乎意料地高的粗品纯度和产率，提供的技术可以显著降低制造成本（通过例如简化的纯化、大大提高的总产率等）。在一些实施例中，提供的技术可以容易地按比例放大以产生用于临床目的的足够数量和质量的DMD寡核苷酸。在一些实施例中，在G<sup>2</sup>中包含吸电子基团的手性助剂（例如，PSM手性助剂）的提供的技术特别可用于制备包含P–N键的手性受控的核苷酸间键联（例如，非负电荷的核苷酸间键联，如n001），并且可以显著简化制造操作、降低成本和/或促进下游形成。

[0626] 在一些实施例中，提供的技术提供了改善的试剂相容性。例如，如本披露所证明的，提供的技术提供了使用不同试剂系统进行氧化、硫化和/或叠氮化物反应的灵活性，特别是对于手性受控的DMD寡核苷酸合成。

[0627] 除其他事项外，本披露提供了高粗品纯度的DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中，本披露提供了高粗品纯度的手性受控的DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中，本披露提供了高粗品纯度的手性受控的DMD寡核苷酸。在一些实施例中，本披露提供了高粗品纯度

和/或高立体纯度的DMD寡核苷酸。

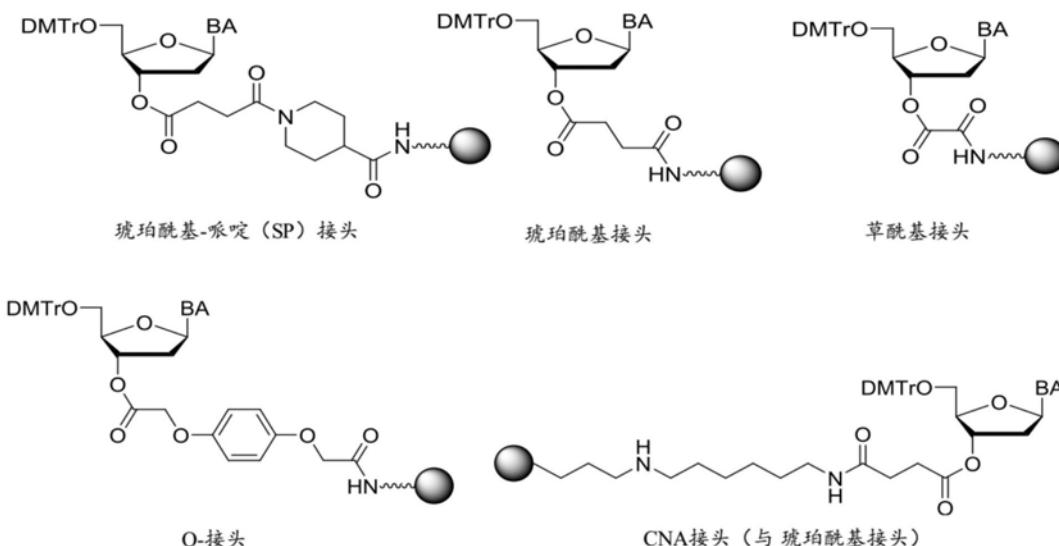
#### 支持物和接头

[0628] 在一些实施例中,可以在溶液中制备寡核苷酸。在一些实施例中,可以使用支持物制备寡核苷酸。在一些实施例中,使用固体支持物制备寡核苷酸。可以依照本披露利用的合适的支持物包括,例如,以下中描述的固体支持物:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其各自的固体支持物通过引用并入本文。

[0629] 在一些实施例中,利用接头部分在合成期间将寡核苷酸链连接至支持物。合适的接头在本领域中广泛地利用,并且包括以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其各自的接头通过引用并入本文。

[0630] 在一些实施例中,连接部分是琥珀酰胺酸接头、或琥珀酸酯接头(-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-)、或草酰基接头(-CO-CO-)。在一些实施例中,连接部分和核苷通过酯键而键合在一起。在一些实施例中,连接部分和核苷通过酰胺键而键合在一起。在一些实施例中,连接部分将核苷与另外的核苷酸或核酸连接。合适的接头描述于,例如,01igonucleotides And Analogues A Practical Approach[寡核苷酸和类似物实用的方法],Ekstein,F.编辑,IRL Press[IRL出版公司],纽约,1991,章节1,以及Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis[用于寡核苷酸合成的固体支持物],Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.[核酸化学中的当前方案],2000,3.1.1-3.1.28。在一些实施例中,使用通用接头(UnyLinker)将寡核苷酸与固体支持物附接(Ravikumar等人,Org.Process Res.Dev.[有机加工研究与开发],2008,12(3),399-410)。在一些实施例中,使用其他通用接头(Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.[核酸化学中的当前方案],2000,3.1.1-3.1.28)。在一些实施例中,使用各种正交接头(如二硫化的接头)(Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.[核酸化学中的当前方案],2000,3.1.1-3.1.28)。

[0631] 除其他事项外,本披露认识到可以选择或设计接头以与寡核苷酸合成中采用的一组反应条件相容。在一些实施例中,为了避免寡核苷酸的降解并避免脱硫,在脱保护之前选择性地去除助剂基团。在一些实施例中,DPSE基团可以通过F<sup>-</sup>离子选择性地去除。在一些实施例中,本披露提供了在DPSE脱保护条件(例如,在MeCN中的0.1M TBAF、在THF或MeCN中的0.5M HF-Et<sub>3</sub>N等)下稳定的接头。在一些实施例中,提供的接头是如以下例示的接头:



### 溶剂

[0632] 寡核苷酸的合成通常在非质子有机溶剂中进行。在一些实施例中，溶剂是腈类溶剂，例如像乙腈。在一些实施例中，溶剂是碱性胺溶剂，例如像吡啶。在一些实施例中，溶剂是醚溶剂，例如像四氢呋喃。在一些实施例中，溶剂是卤代烃，例如像二氯甲烷。在一些实施例中，使用溶剂的混合物。在某些实施例中，溶剂是任何一种或多种上述类型溶剂的混合物。

[0633] 在一些实施例中，当非质子有机溶剂不是碱性时，在反应步骤中存在碱。在存在碱的一些实施例中，碱是胺碱，例如像吡啶、喹啉、或N,N-二甲基苯胺。其他胺碱的实例包括吡咯烷、哌啶、N-甲基吡咯烷、吡啶、喹啉、N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)、或N,N-二甲基苯胺。

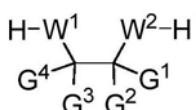
[0634] 在一些实施例中，碱不是胺碱。

[0635] 在一些实施例中，非质子有机溶剂是无水的。在一些实施例中，新鲜蒸馏无水非质子有机溶剂。在一些实施例中，新鲜蒸馏的无水非质子有机溶剂是碱性胺溶剂，例如像吡啶。在一些实施例中，新鲜蒸馏的无水非质子有机溶剂是醚溶剂，例如像四氢呋喃。在一些实施例中，新鲜蒸馏的无水非质子有机溶剂是腈类溶剂，例如像乙腈。

### 手性试剂/手性助剂

[0636] 在一些实施例中，使用手性试剂(也可称为手性助剂)以在手性受控的寡核苷酸的产物中赋予立体选择性。许多手性试剂(也由本领域技术人员和在本文中称为手性助剂)可以依照本披露的方法使用。此类手性试剂的实例在本文和以下中描述：US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/098264、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951，其各自的手性助剂通过引用并入。

[0637] 在一些实施例中，手性试剂是具有式3-AA的化合物：

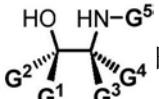


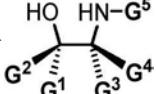
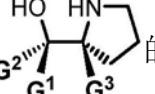
式 3-AA

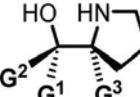
其中每个变量独立地如本文所述。

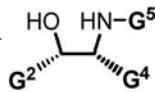
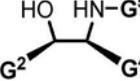
[0638] 在式3-AA的一些实施例中,  $W^1$  和  $W^2$  独立地是  $-NG^5-$ 、 $-O-$ 、或  $-S-$ ;  $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^4$ 、和  $G^5$  独立地是氢, 或选自以下的任选地经取代的基团: 脂肪族、烷基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂脂肪族、杂环基、杂芳基、或芳基; 或者  $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^4$ 、和  $G^5$  中两个是  $G^6$  (一起形成任选地经取代的饱和的、部分不饱和的、或不饱和的高达约20个环原子的碳环或含杂原子的环, 该碳环或含杂原子的环是单环或多环、稠和的或未稠和的), 并且  $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^4$ 、和  $G^5$  中不超过四个是  $G^6$ 。与具有式3-I的化合物相似,  $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^4$ 、或  $G^5$  中任一个任选地被氧化、硫代、烷基、烯基、炔基、杂芳基、或芳基部分取代。在一些实施例中, 这种取代包括在手性受控的寡核苷酸产生中的立体选择性。在一些实施例中, 含有杂原子的部分(例如, 杂脂肪族、杂环基、杂芳基等)具有1-5个杂原子。在一些实施例中, 杂原子选自氮、氧、硫和硅。在一些实施例中, 至少一个杂原子是氮。在一些实施例中, 脂肪族、烷基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂脂肪族、杂环基、杂芳基、或芳基基团具有1-20、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7或1-6个碳原子。

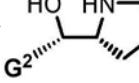
[0639] 在一些实施例中,  $W^1$  是  $-NG^5-0-$ 。在一些实施例中,  $W^1$  是  $-NG^5-0-$ , 其中  $-0-$  与  $-H$  键合。在一些实施例中,  $W^1$  是  $-NG^5-$ 。在一些实施例中,  $G^5$  以及  $G^3$  和  $G^4$  一起形成具有0-3个杂原子(除  $W^1$  的氮原子之外)的任选地经取代的3-10元环。在一些实施例中,  $G^5$  和  $G^3$  一起形成具有0-3个杂原子(除  $W^1$  的氮原子之外)的任选地经取代的3-10元环。在一些实施例中,  $G^5$  和  $G^4$  一起形成具有0-3个杂原子(除  $W^1$  的氮原子之外)的任选地经取代的3-10元环。在一些实施例中, 所形成的环是任选地经取代的4、5、6、7、或8元环。在一些实施例中, 所形成的环是任选地经取代的4元环。在一些实施例中, 所形成的环是任选地经取代的5元环。在一些实施例中, 所形成的环是任选地经取代的6元环。在一些实施例中, 所形成的环是任选地经取代的7元环。

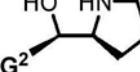
[0640] 在一些实施例中, 提供的手性试剂具有  的结构。在一些实施例中, 提供

的手性试剂具有  的结构。在一些实施例中, 提供的手性试剂具有 

结构。在一些实施例中, 提供的手性试剂具有  的结构。在一些实施例中, 提供的手

性试剂具有  的结构。在一些实施例中, 提供的手性试剂具有 

在一些实施例中, 提供的手性试剂具有  的结构。在一些实施例中, 提供的手性试

剂具有  的结构。

[0641] 在一些实施例中,  $W^1$  是  $-NG^5$ ,  $W^2$  是  $O$ ,  $G^1$  和  $G^3$  各自独立地是氢或选自以下的任选地经取代的基团:  $C_{1-10}$  脂肪族、杂环基、杂芳基和芳基,  $G^2$  是  $-C(R)_2Si(R)_3$ , 并且  $G^4$  和  $G^5$  一起形成任选地经取代的饱和的、部分不饱和的、或不饱和的高达约20环原子的含杂原子的环, 该含杂原子的环是单环或多环、稠和的或未稠和的。在一些实施例中, 每个  $R$  独立地是氢, 或选自以

下的任选地经取代的基团: $C_{1-6}$ 脂肪族、碳环基、芳基、杂芳基、和杂环基。在一些实施例中, $G^2$ 是 $-C(R)_2Si(R)_3$ ,其中 $-C(R)_2-$ 是任选地经取代的 $-CH_2-$ ,并且 $-Si(R)_3$ 的每个R独立地是选自以下的任选地经取代的基团: $C_{1-10}$ 脂肪族、杂环基、杂芳基和芳基。在一些实施例中, $-Si(R)_3$ 的至少一个R独立地是任选地经取代的 $C_{1-10}$ 烷基。在一些实施例中, $-Si(R)_3$ 的至少一个R独立地是任选地经取代的苯基。在一些实施例中, $-Si(R)_3$ 的一个R独立地是任选地经取代的苯基,并且另外两个R独立地是任选地经取代的 $C_{1-10}$ 烷基。在一些实施例中, $-Si(R)_3$ 的一个R独立地是任选地经取代的 $C_{1-10}$ 烷基,并且另外两个R独立地是任选地经取代的苯基。在一些实施例中, $G^2$ 是任选地经取代的 $-CH_2Si(Ph)(Me)_2$ 。在一些实施例中, $G^2$ 是任选地经取代的 $-CH_2Si(Me)(Ph)_2$ 。在一些实施例中, $G^4$ 和 $G^5$ 一起形成任选地经取代的饱和的含有一个氮原子的5-6元环( $G^5$ 附接在其上)。在一些实施例中, $G^4$ 和 $G^5$ 一起形成任选地经取代的饱和的含有一个氮原子的5元环。在一些实施例中, $G^1$ 是氢。在一些实施例中, $G^3$ 是氢。在一些实施例中, $G^1$ 和 $G^3$ 均是氢。

[0642] 在一些实施例中, $W^1$ 是 $-NG^5$ , $W^2$ 是0, $G^1$ 和 $G^3$ 各自独立地是 $R^1$ , $G^2$ 是 $-R^1$ ,并且 $G^4$ 和 $G^5$ 一起形成任选地经取代的饱和的、部分不饱和的、或不饱和的高达约20个环原子的含杂原子的环,该含杂原子的环是单环或多环、稠和的或未稠和的,其中 $R^1$ 是选自以下的任选地经取代的基团: $C_{1-20}$ 脂肪族、具有1-5个杂原子的 $C_{1-20}$ 脂肪族、 $C_{6-20}$ 芳基、具有1-5个杂原子的 $C_{5-20}$ 杂芳基、及其组合(例如,脂肪族-芳基/杂芳基、杂脂肪族-芳基/杂芳基)。在一些实施例中, $G^1$ 和 $G^3$ 各自独立地是R。在一些实施例中, $G^1$ 和 $G^3$ 各自独立地是-H。在一些实施例中, $G^2$ 通过碳原子与分子的剩余部分连接,并且碳原子被一个或多个吸电子基团取代。在一些实施例中, $G^2$ 是被一个或多个吸电子基团取代的甲基。在一些实施例中, $G^2$ 是被一个且不超过一个吸电子基团取代的甲基。在一些实施例中, $G^2$ 是被两个或更多个吸电子基团取代的甲基。除其他事项外,具有包含吸电子基团的 $G^2$ 的手性助剂可以容易地被碱除去(碱不稳定的,例如,在基本上不含水的无水条件下;在很多情况下,优选地在包含含有此类手性助剂的核苷酸间键联的寡核苷酸被暴露于条件/试剂系统(包含大量的水,特定的在碱(例如,使用NH<sub>4</sub>OH切割条件/试剂系统)的存在下)之前去除,并且提供了如本文所述的各种优势,例如,高粗品纯度、高产率、高立体选择性、更简化的操作、较少的步骤、进一步降低的制造成本、和/或更简化的下游配制品(例如,切割后的少量的一种或多种盐)等。在一些实施例中,如在实例所示,此类助剂可以提供与其他官能团和/或保护基团的可替代的或另外的化学相容性。在一些实施例中,如实例所证明的,碱基不稳定的助剂特别可用于构建手性受控的非负电荷的核苷酸间键联(例如,中性核苷酸间键联,如n001);在一些情况下,如实例所证明的,它们可以提供显著改善的产率和/或粗品纯度与高立体选择性,例如当在无水条件下使用碱去除时使用。在一些实施例中,这种手性助剂经由氧原子与键联磷键合(例如,其对应于在对应的手性助剂化合物中的-OH基团),手性助剂中与氧键合的碳原子( $\alpha$ 碳)也与-H(除了其他基团;在一些实施例中,仲碳)键合,并且手性助剂中的剩余的碳原子( $\beta$ 碳)与一个或两个吸电子基团键合。在一些实施例中, $-W^2-H$ 是-OH。在一些实施例中, $G^1$ 是-H。在一些实施例中, $G^2$ 包含一个或两个吸电子基团或者可以通过碱基促进手性助剂的去除。在一些实施例中, $G^1$ 是-H, $G^2$ 包含一个或两个吸电子基团, $-W^2-H$ 是-OH。在一些实施例中, $G^1$ 是-H, $G^2$ 包含一个或两个吸电子基团, $-W^2-H$ 是-OH, $-W^1-H$ 是- $NG^5-H$ ,并且 $G^3$ 和 $G^4$ 之一与 $G^5$ 一起与居于它们之间的原子形成如本文所述的环(例如,任选地经取代的3-20元单环、二环或多环,该环具有

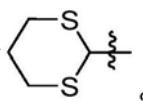
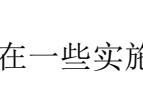
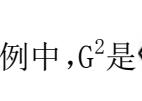
除氮原子( $G^5$ 在其上)之外的0-5个杂原子(例如,任选地经取代的3、4、5、或6元单环饱和的环,该环除氮原子之外( $G^5$ 在其上)无其他杂原子))。

[0643] 如本领域技术人员所理解的,各种吸电子基团是本领域已知的并且可以依照本披露利用。在一些实施例中,吸电子的基团包含和/或通过例如,-S(0)-、-S(0)<sub>2</sub>-、-P(0)(R<sup>1</sup>)-、-P(S)R<sup>1</sup>-、或-C(0)-与碳原子连接。在一些实施例中,吸电子基团是-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、-C(0)R<sup>1</sup>、-C(0)OR'、-C(0)N(R')<sub>2</sub>、-S(0)R<sup>1</sup>、-S(0)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>、-P(W)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(0)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(0)(OR')<sub>2</sub>、或-P(S)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>。在一些实施例中,吸电子基团是芳基或杂芳基,例如,被-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、-C(0)R<sup>1</sup>、-C(0)OR'、-C(0)N(R')<sub>2</sub>、-S(0)R<sup>1</sup>、-S(0)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>、-P(W)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(0)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(0)(OR')<sub>2</sub>、或-P(S)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>中的一个或多个取代的苯基。

[0644] 在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-L"-R',其中L'是-C(R)<sub>2</sub>-或任选地经取代的-CH<sub>2</sub>- ,并且L"是-P(0)(R')-、-P(0)(R')<sub>2</sub>-、-P(0)(OR')-、-P(0)(OR')<sub>2</sub>-、-P(0)[N(R')] -、-P(0)[N(R')]<sub>2</sub>-、-P(0)[N(R')] [N(R')] -、-P(S)(R')-、-S(0)<sub>2</sub>-、-S(0)<sub>2</sub>O-、-S(0)-、-C(0)-、-C(0)N(R')-、或-S-,其中每个R'独立地是如本文所述的R<sup>1</sup>。在一些实施例中,L'是-C(R)<sub>2</sub>-。在一些实施例中,L'是任选地经取代的-CH<sub>2</sub>-。

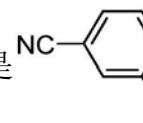
[0645] 在一些实施例中,L'是-C(R)<sub>2</sub>-。在一些实施例中,每个R独立地是氢,或选自以下的任选地经取代的基团:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>脂肪族、碳环基、芳基、杂芳基、和杂环基。在一些实施例中,L'是-CH<sub>2</sub>-。在一些实施例中,L"是-P(0)(R')-、-P(S)(R')-、-S(0)<sub>2</sub>-。在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-C(0)N(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-P(0)(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-P(S)(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中,每个R'独立地是任选地经取代的脂肪族、杂脂肪族、芳基、或杂芳基,如本披露中所述(例如,针对R描述的那些实施例)。在一些实施例中,每个R'独立地是任选地经取代的苯基。在一些实施例中,每个R'独立地是任选地经取代的苯基,其中一个或多个取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,每个R'独立地是经取代的苯基,其中一个或多个取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,每个R'独立地是经取代的苯基,其中取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,两个R'是相同的。在一些实施例中,两个R'是不同的。在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-S(0)R'。在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-C(0)N(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中, $G^2$ 是-L'-S(0)<sub>2</sub>R'。在一些实施例中,R'是任选地经取代的脂肪族、杂脂肪族、芳基、或杂芳基,如本披露中所述(例如,针对R描述的那些实施例)。在一些实施例中,R'是任选地经取代的苯基。在一些实施例中,R'是任选地经取代的苯基,其中一个或多个取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,R'是经取代的苯基,其中一个或多个取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,R'是经取代的苯基,其中每个取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,R'是经单取代的苯基,其中取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,R'是经单取代的苯基,其中取代基独立地选自-CN、-OMe、-Cl、-Br、和-F。在一些实施例中,取代基是吸电子基团。在一些实施例中,吸电子基团是-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、-C(0)R<sup>1</sup>、-C(0)OR'、-C(0)N(R')<sub>2</sub>、-S(0)R<sup>1</sup>、-S(0)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>、-P(W)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(0)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(0)(OR')<sub>2</sub>、或-P(S)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>。

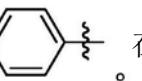
[0646] 在一些实施例中, $G^2$ 是任选地经取代的-CH<sub>2</sub>-L"-R,其中L"和R各自独立地如本披露中所述。在一些实施例中, $G^2$ 是任选地经取代的-CH(-L"-R)<sub>2</sub>,其中L"和R各自独立地如本披露中所述。在一些实施例中, $G^2$ 是任选地经取代的-CH(-S-R)<sub>2</sub>。在一些实施例中, $G^2$ 是任选地

经取代的-CH<sub>2</sub>-S-R。在一些实施例中，两个R基团与居于它们之间的原子一起形成环。在一些实施例中，所形成的环是任选地经取代的具有0-2个杂原子(除插入杂原子之外)的5、6、7元环。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是任选地经取代的。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是。

一些实施例中，-S-可以转化为-S(0)-或-S(0)<sub>2</sub>- (例如，通过氧化)，例如，以便于通过碱基去除。

[0647] 在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-R'，其中每个变量如本披露中所述。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-R'。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-C(R')<sub>3</sub>。在一些实施例中，R'是任选地经取代的芳基或杂芳基。在一些实施例中，R'是经取代的芳基或杂芳基，其中一个或多个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，-L'-是任选地经取代的-CH<sub>2</sub>-，并且R'是R，其中R是任选地经取代的芳基或杂芳基。在一些实施例中，R是经取代的芳基或杂芳基，其中一个或多个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，R是经取代的芳基或杂芳基，其中每个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，R是被两个或更多个取代基取代的芳基或杂芳基，其中每个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，吸电子基团是-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、-C(O)R<sup>1</sup>、-C(O)OR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-S(O)R<sup>1</sup>、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>、-P(W)

(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR')<sub>2</sub>、或-P(S)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>。在一些实施例中，R'是。在一

些实施例中，R'是p-NO<sub>2</sub>Ph-。在一些实施例中，R'是。在一些实施例中，R'是

MeO2C-C6H4-C≡N。在一些实施例中，R'是Me2N(O)C6H4-C≡N。在一些实施例中，R'是

Me3C(O)C6H4-C≡N。在一些实施例中，R'是Cl-C6H4-C≡N。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是

RO2S-C6H4-C≡N。在一些实施例中，R'是MeO2S-C6H4-C≡N。在一些实施例中，R'是

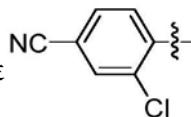
PhO2S-C6H4-C≡N。在一些实施例中，R'是2,4,6-三氯苯基。在一些实施例中，R'是2,4,6-三氟苯基。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH(4-氯苯基)<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH(R')<sub>2</sub>，其中每个

R'是PhO2S-C6H4-C≡N。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH(R')<sub>2</sub>，其中每个R'是MeO2S-C6H4-C≡N。在一

些实施例中，R'是-C(O)R。在一些实施例中，R'是CH<sub>3</sub>C(O)-。

[0648] 在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-S(O)<sub>2</sub>R'，其中每个变量如本披露中所述。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>R'。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-S(O)R'，其中每个变量如本披露中所述。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)R'。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-C(O)<sub>2</sub>R'，其中每个变量如本披露中所述。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-C(O)<sub>2</sub>R'。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-C(O)R'，其中每个变量如本披露中所述。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-C(O)R'。在一些实施例中，-L'-是任选地经取代的-CH<sub>2</sub>-，并且R'是R。在一些实施例中，R是任选地经取代的芳基或杂芳基。在一

些实施例中，R是任选地经取代的脂肪族。在一些实施例中，R是任选地经取代的杂脂肪族。在一些实施例中，R是任选地经取代的杂芳基。在一些实施例中，R是任选地经取代的芳基。在一些实施例中，R是任选地经取代的苯基。在一些实施例中，R不是苯基，或单取代的、二取代的、或三取代的苯基，其中每个取代基选自-NO<sub>2</sub>、卤素、-CN、-C<sub>1-3</sub>烷基、和C<sub>1-3</sub>烷氧基。在一些实施例中，R是经取代的芳基或杂芳基，其中一个或多个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，R是经取代的芳基或杂芳基，其中每个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，R是被两个或更多个取代基取代的芳基或杂芳基，其中每个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中，吸电子基团是-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、-C(O)R<sup>1</sup>、-C(O)OR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-S(O)R<sup>1</sup>、-S(O)R<sup>1</sup>R'、-P(W)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR')<sub>2</sub>、或-P(S)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>。在一些实施例中，R'

是苯基。在一些实施例中，R'是经取代的苯基。在一些实施例中，R'是。在一些实施例中，R'

是。在一些实施例中，R'

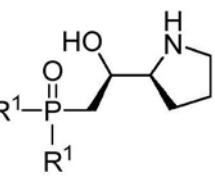
是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族。在一些实施例中，R'是叔丁基。在一些实施例中，R'是异丙基。在一些实施例中，R'是甲基。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>C(O)OMe。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>C(O)Ph。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>C(O)-tBu。

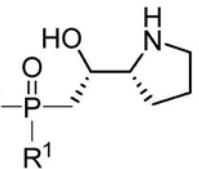
**[0649]** 在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-NO<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-S(O)<sub>2</sub>N(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-S(O)<sub>2</sub>NHR'。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NHR'。在一些实施例中，R'是甲基。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NH(CH<sub>3</sub>)。在一些实施例中，R'是-CH<sub>2</sub>Ph。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>Ph)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>Ph)<sub>2</sub>。在一些实施例中，R'是苯基。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NHPh。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)Ph。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>Ph)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NHPh。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>Ph)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)Ph。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-S(O)<sub>2</sub>(R')(OR')。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(R')(OR')。在一些实施例中，每个R'是甲基。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)(OCH<sub>3</sub>)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(Ph)(OCH<sub>3</sub>)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>Ph)(OCH<sub>3</sub>)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>Ph)(OCH<sub>3</sub>)。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-S(O)<sub>2</sub>OR'。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>OPh。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>Ph。

**[0650]** 在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-P(O)(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-P(O)(R')<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-P(O)[N(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-P(O)[N(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-P(O)[O(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-P(O)[O(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-P(O)(R')[N(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-P(O)(R')[N(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-P(O)(R')[O(R')]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-P(O)(R')[O(R')]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-P(O)(OR')[N(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-CH<sub>2</sub>-P(O)(OR')[N(R')<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。在一些实施例中，G<sup>2</sup>是-L'-C(O)N(R')<sub>2</sub>，其中每个变量如本披露中所述。在一些实施例中，G<sup>2</sup>

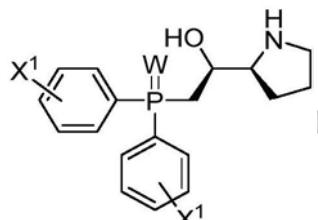
是 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})(\text{R}')_2$ 。在一些实施例中，每个 $\text{R}'$  独立地是 $\text{R}$ 。在一些实施例中，一个 $\text{R}'$  是任选地经取代的脂肪族，并且一个 $\text{R}$ 是任选地经取代的芳基。在一些实施例中，一个 $\text{R}'$  是任选地经取代的 $\text{C}_{1-6}$ 脂肪族，并且一个 $\text{R}$ 是任选地经取代的苯基。在一些实施例中，每个 $\text{R}'$  独立地是任选地经取代的 $\text{C}_{1-6}$ 脂肪族。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_3)\text{Ph}$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_3)_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{Ph})_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_2\text{Ph})_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{CH}_3)\text{Ph}]_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{CH}_3)_2]_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{CH}_2\text{Ph})_2]_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

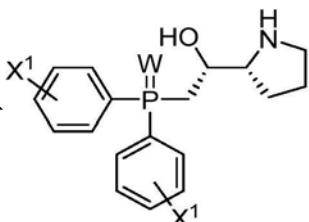
[0651] 在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{L}'-\text{SR}'$ 。在一些实施例中， $\text{G}^2$ 是 $-\text{CH}_2-\text{SR}'$ 。在一些实施例中， $\text{R}'$  是任选地经取代的苯基。在一些实施例中， $\text{R}'$  是苯基。

[0652] 在一些实施例中，提供的手性试剂具有  的结构，其中每个 $\text{R}^1$ 独立

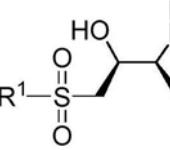
地如本披露中所述。在一些实施例中，提供的手性试剂具有  的结构，其中每

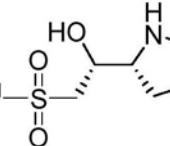
个 $\text{R}^1$ 独立地如本披露中所述。在一些实施例中，每个 $\text{R}^1$ 独立地是如本披露中所述的 $\text{R}$ 。在一些实施例中，每个 $\text{R}^1$ 独立地是 $\text{R}$ ，其中 $\text{R}$ 是如本披露中所述的任选地经取代的脂肪族、芳基、杂脂肪族、或杂芳基。在一些实施例中，每个 $\text{R}^1$ 是苯基。在一些实施例中， $\text{R}^1$ 是 $-\text{L}-\text{R}'$ 。在一些实施例中， $\text{R}^1$ 是 $-\text{L}-\text{R}'$ ，其中 $\text{L}$ 是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、或 $-\text{N}(\text{R}')$ 。在一些实施例中，提供的手性试剂具有

 的结构，其中每个 $\text{X}^1$ 独立地是 $-\text{H}$ 、吸电子基团、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、或 $-\text{F}$ ，并且 $\text{W}$ 是 $\text{O}$ 或 $\text{S}$ 。在一些实施例中，提供的手性试剂具有

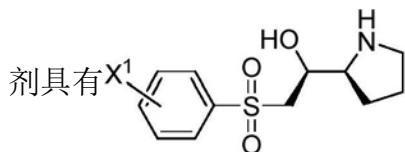
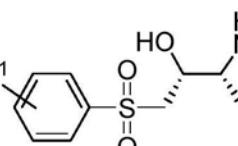
 的结

构，其中每个 $\text{X}^1$ 独立地是 $-\text{H}$ 、吸电子基团、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、或 $-\text{F}$ ，并且 $\text{W}$ 是 $\text{O}$ 或 $\text{S}$ 。在一些实施例中，每个 $\text{X}^1$ 独立地是 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、或 $-\text{F}$ ，其中 $\text{R}$ 不是 $-\text{H}$ 。在一些实施例中， $\text{R}$ 是任选地经取代的 $\text{C}_{1-6}$ 脂肪族。在一些实施例中， $\text{R}$ 是任选地经取代的 $\text{C}_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中， $\text{R}$ 是 $-\text{CH}_3$ 。在一些实施例中，一个或多个 $\text{X}^1$ 独立地是吸电子基团（例如， $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、卤素、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ 等）。

[0653] 在一些实施例中,提供的手性试剂具有  的结构,其中R<sup>1</sup>如本披露

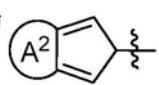
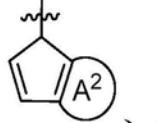
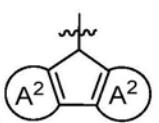
中所述。在一些实施例中,提供的手性试剂具有  的结构,其中R<sup>1</sup>如本披露中

所述。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是如本披露中所述的R。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是R,其中R是如本披露中所述的任选地经取代的脂肪族、芳基、杂脂肪族、或杂芳基。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是-L-R'。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是-L-R',其中L是-O-、-S-、或-N(R')。在一些实施例中,提供的手性试

剂具有  的结构,其中X<sup>1</sup>是-H、吸电子基团、-NO<sub>2</sub>、-CN、-OR、-Cl、-Br、或-F,并且W是O或S。在一些实施例中,提供的手性试剂具有  的结构,其中

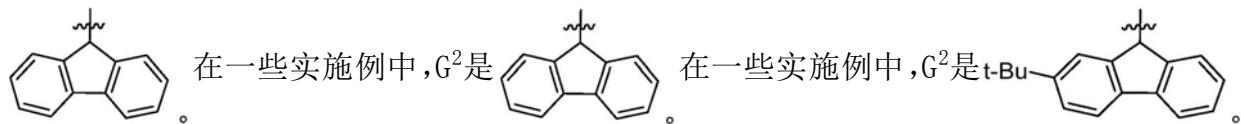
X<sup>1</sup>是-H、吸电子基团、-NO<sub>2</sub>、-CN、-OR、-Cl、-Br、或-F,并且W是O或S。在一些实施例中,X<sup>1</sup>是-CN、-OR、-Cl、-Br、或-F,其中R不是-H。在一些实施例中,R是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族。在一些实施例中,R是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施例中,R是-CH<sub>3</sub>。在一些实施例中,X<sup>1</sup>是吸电子基团(例如,-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、-C(O)R<sup>1</sup>、-C(O)OR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-S(O)R<sup>1</sup>、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>、-P(W)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR')<sub>2</sub>、-P(S)(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>等)。在一些实施例中,X<sup>1</sup>为不是-CN、-NO<sub>2</sub>、或卤素的吸电子基团。在一些实施例中,X<sup>1</sup>不是-H、-CN、-NO<sub>2</sub>、卤素、或C<sub>1-3</sub>烷氧基。

[0654] 在一些实施例中,G<sup>2</sup>是-CH(R<sup>21</sup>)-CH(R<sup>22</sup>)=C(R<sup>23</sup>)(R<sup>24</sup>),其中每个R<sup>21</sup>、R<sup>22</sup>、R<sup>23</sup>、和R<sup>24</sup>独立地是R。在一些实施例中,R<sup>22</sup>和R<sup>23</sup>均为R,并且两个R基团与居于它们之间的原子一起形成如本文所述的任选地经取代的芳基或杂芳基环。在一些实施例中,一个或多个取代基独立地是吸电子基团。在一些实施例中,R<sup>21</sup>和R<sup>24</sup>均为R,并且两个R基团与居于它们之间的原子一起形成如本文所述的任选地经取代的环。在一些实施例中,R<sup>21</sup>和R<sup>24</sup>均为R,并且两个R基团与居于它们之间的原子一起形成如本文所述的任选地经取代的饱和环或者部分饱和环。在一些实施例中,R<sup>22</sup>和R<sup>23</sup>均为R,并且两个R基团与居于它们之间的原子一起形成如本文所述的任选地经取代的芳基环或杂芳基环,并且R<sup>21</sup>和R<sup>24</sup>均为R,并且两个R基团与居于它们之间的原子一起形成如本文所述的任选地经取代的部分饱和环。在一些实施例中,R<sup>21</sup>是-H。在一些实施例中,R<sup>24</sup>是-H。在一些实施例中,G<sup>2</sup>是任选地经取代的  。在一些实施例

中,G<sup>2</sup>是任选地经取代的  、  或  ,其中每个环A<sup>2</sup>独立地是如

本文所述的3-15元单环、双环或多环。在一些实施例中,环A<sup>2</sup>是如本文所述的具有1-5个杂

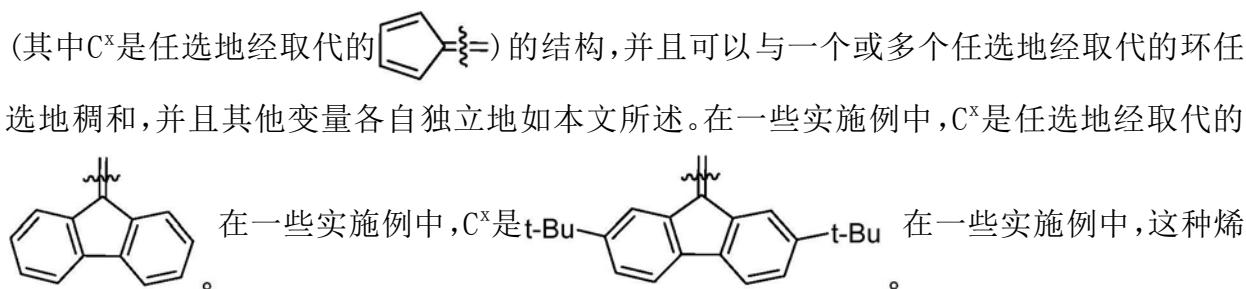
原子的任选地经取代的5-10元单环芳基环或杂芳基环。在一些实施例中，环A<sup>2</sup>是如本文所述的任选地经取代的苯环。在一些实施例中，在一些实施例中，G<sup>2</sup>是任选地经取代的



在一些实施例中，G<sup>2</sup>是 。

[0655] 在一些实施例中，手性助剂是DPSE助剂。在一些实施例中，手性助剂是PSM助剂。

[0656] 在一些实施例中，当与碱接触时，手性助剂部分(例如，核苷酸间键联，其对应的化合物是具有式3-I或3-AA的化合物)可以作为烯烃释放，该烯烃与通过从对应的化合物中去除水分子(消除G<sup>2</sup>的-W<sup>2</sup>-H=-OH和α-H)而形成的产物具有相同的结构。在一些实施例中，这种烯烃具有(吸电子基团)C=C(R<sup>1</sup>)-L-N(R<sup>5</sup>)(R<sup>6</sup>)、(吸电子基团)H=C(R<sup>1</sup>)-L-N(R<sup>5</sup>)(R<sup>6</sup>)、CH(-L'-R')=C(R<sup>1</sup>)-L-N(R<sup>5</sup>)(R<sup>6</sup>) (其中CH基团是任选地经取代的)、或C<sup>x</sup>=C(R<sup>1</sup>)-L-N(R<sup>5</sup>)(R<sup>6</sup>) (其中C<sup>x</sup>是任选地经取代的) 的结构，并且可以与一个或多个任选地经取代的环任选地稠合，并且其他变量各自独立地如本文所述。在一些实施例中，C<sup>x</sup>是任选地经取代的



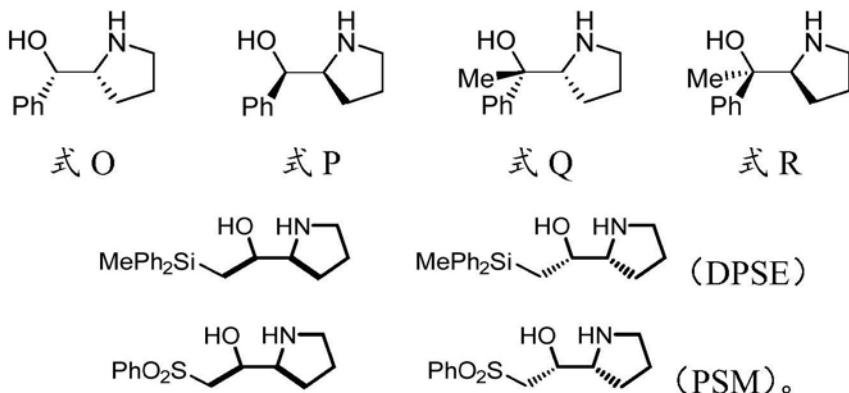
在一些实施例中，这种烯烃是

在一些实施例中，这种烯烃是

中，这种烯烃是

[0657] 在一些实施例中，手性试剂是氨基醇。在一些实施例中，手性试剂是氨基硫。在一些实施例中，手性试剂是氨基苯酚。在一些实施例中，手性试剂是(S)和(R)-2-甲基氨基-1-苯基乙醇、(1R,2S)-麻黄碱、或(1R,2S)-2-甲基氨基-1,2-联苯基乙醇。

[0658] 在本披露的一些实施例中，手性试剂是具有以下式之一的化合物：



[0659] 如本领域技术人员所理解的，手性试剂通常是立体纯的或基本上立体纯的，并且

通常用作基本上不含其它立体异构体的单一立体异构体。在一些实施例中，本披露的化合物是立体纯的或基本上立体纯的。

[0660] 如本文所证明的，当用于制备手性核苷酸间键联时，为了获得立体选择性，通常使用立体化学纯的手性试剂。除其他事项外，本披露提供了立体化学纯的手性试剂，包括具有所述结构的那些。

[0661] 手性试剂的选择，例如，由式Q表示的异构体或其立体异构体（式R）允许特定控制键联磷的手性。因此，可以在每个合成循环中选择Rp或Sp构型，允许控制手性受控的DMD寡核苷酸的整体三维结构。在一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸具有所有Rp立体中心。在本披露的一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸具有所有Sp立体中心。在本披露的一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸中的每个键联磷独立地是Rp或Sp。在本披露的一些实施例中，手性受控的DMD寡核苷酸中的每个键联磷独立地是Rp或Sp，并且至少一个是Rp，以及至少一个是Sp。在一些实施例中，进行Rp和Sp中心的选择以赋予手性受控的DMD寡核苷酸特定的三维超结构。此类选择的实例在本文中进一步详述。

[0662] 在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸包含手性助剂部分，例如，以核苷酸间键联。在一些实施例中，手性助剂与键联磷连接。在一些实施例中，手性助剂通过W<sup>2</sup>与键联磷连接。在一些实施例中，手性助剂通过W<sup>2</sup>（其中W<sup>2</sup>是0）与键联磷连接。任选地，W<sup>1</sup>（例如，当W<sup>1</sup>是-NG<sup>5</sup>-时）在DMD寡核苷酸合成期间被加帽。在一些实施例中，将DMD寡核苷酸中的手性助剂中的W<sup>1</sup>加帽，例如，通过DMD寡核苷酸合成期间的加帽试剂。在一些实施例中，可以有目的地加帽W<sup>1</sup>以调节DMD寡核苷酸特性。在一些实施例中，将W<sup>1</sup>用-R<sup>1</sup>加帽。在一些实施例中，R<sup>1</sup>是-C(O)R'。在一些实施例中，R'是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族。在一些实施例中，R'是甲基。

[0663] 在一些实施例中，以手性试剂在上文描绘的循环中的特定的步骤被去除的能力选择依照本披露使用的手性试剂。例如，在一些实施例中，希望在修饰键联磷的步骤期间去除手性试剂。在一些实施例中，希望在修饰键联磷的步骤之前去除手性试剂。在一些实施例中，希望在修饰键联磷的步骤之后去除手性试剂。在一些实施例中，希望在第一偶联步骤已经发生之后但在第二偶联步骤发生之前去除手性试剂，使得在第二偶联期间（并且同样对于另外的后续的偶联步骤）在生长的DMD寡核苷酸上不存在手性试剂。在一些实施例中，在“去封闭”反应期间去除手性试剂，该“去封闭”在键联磷的修饰之后但在随后的循环开始之前发生。本文描述了用于去除的示例方法和试剂。

[0664] 在一些实施例中，当进行修饰和/或去封闭步骤时，实现了手性助剂的去除，如方案I中所示。将手性助剂去除与其他转化（如修饰和去封闭）组合在一起可以是有益的。本领域普通技术人员将理解，保存的步骤/转化可以提高合成的总效率（例如，关于产率和产物纯度），尤其是对于更长的DMD寡核苷酸。方案I示出了在修饰和/或去封闭期间去除手性助剂的一个实例。

[0665] 在一些实施例中，依照本披露的方法使用的手性试剂特征在于：其在某些条件下是可去除的。例如，在一些实施例中，手性试剂是针对其在酸性条件下被去除的能力来选择的。在某些实施例中，手性试剂是针对其在温和地酸性条件下被去除的能力来选择的。在某些实施例中，手性试剂是针对其通过E1消除反应（例如，由于在酸性条件下在手性试剂上形成阳离子中间体而发生去除，导致手性试剂从DMD寡核苷酸上切割）被去除的能力来选择的。在一些实施例中，手性试剂的特征在于：它具有被认为能够容纳或促进E1消除反应的结

构。相关领域的技术人员将理解,可以设想哪些结构倾向于经历此类消除反应。

[0666] 在一些实施例中,手性试剂是针对其与亲核试剂一起去除的能力来选择的。在一些实施例中,手性试剂是针对其与胺亲核试剂一起去除的能力来选择的。在一些实施例中,手性试剂是针对其与除胺之外的亲核试剂一起去除的能力来选择的。

[0667] 在一些实施例中,手性试剂是针对其与碱基一起去除的能力来选择的。在一些实施例中,手性试剂是针对其与胺一起去除的能力来选择的。在一些实施例中,手性试剂是针对其与除胺之外的碱基一起去除的能力来选择的。

[0668] 在一些实施例中,可以在使用前分离包含手性助剂的手性纯的亚磷酰胺。在一些实施例中,可以不分离而使用包含手性助剂的手性纯的亚磷酰胺-在一些实施例中,可以将其在形成后直接使用。

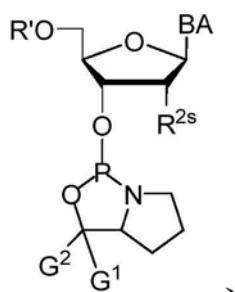
### 活化

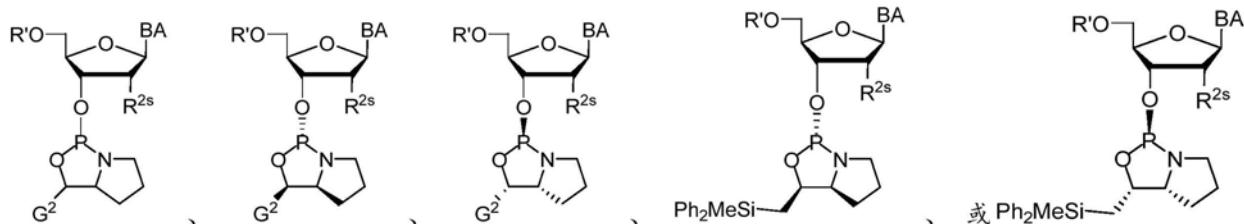
[0669] 如本领域技术人员所理解的,DMD寡核苷酸制备可以使用各种条件、试剂等以活化反应组分,例如,在亚磷酰胺制备期间、在循环期间的一个或多个步骤期间、在循环后切割/脱保护期间等。可以依照本披露利用的各种活化技术包括但不限于描述于以下的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其各自的活化技术通过引用并入。实例中示出了某些活化技术(例如,试剂、条件、方法等)。

### 偶联

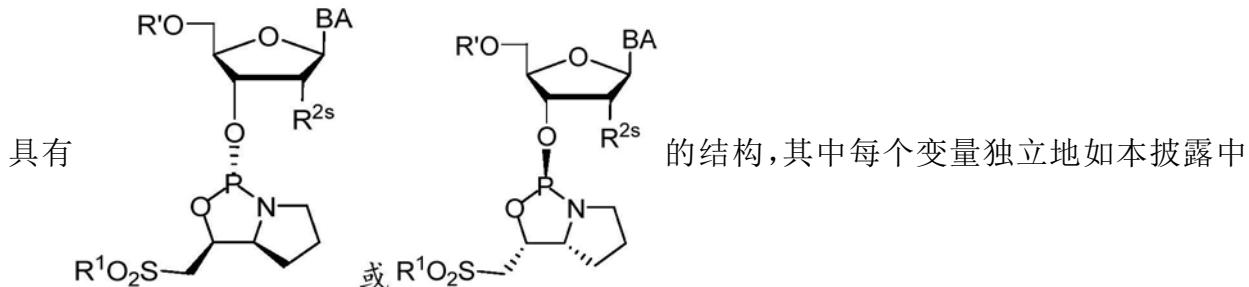
[0670] 在一些实施例中,本披露的循环包含立体选择性缩合/偶联步骤以形成手性受控的核苷酸间键联。对于缩合,通常使用活化试剂,如4,5-二氰基咪唑(DCI)、4,5-二氯咪唑、1-苯基咪唑鎓三氟甲磺酸酯(PhIMT)、苯并咪唑鎓三氟甲磺酸酯(BIT)、苯并三唑、3-硝基-1,2,4-三唑(NT)、四唑、5-乙基硫代四唑(ETT)、5-苄基硫代四唑(BTT)、5-(4-硝基苯基)四唑、N-氰基甲基吡咯烷鎓三氟甲磺酸酯(CMPT)、N-氰基甲基哌啶鎓三氟甲磺酸酯、N-氰基甲基二甲基铵三氟甲磺酸酯等。包括手性亚磷酰胺的合适的条件和试剂包括描述在以下的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其各自的缩合试剂、条件和方法通过引用并入。实例中示出了某些偶联技术(例如,试剂、条件、方法等)。

[0671] 在一些实施例中,用于偶联的手性亚磷酰胺具有



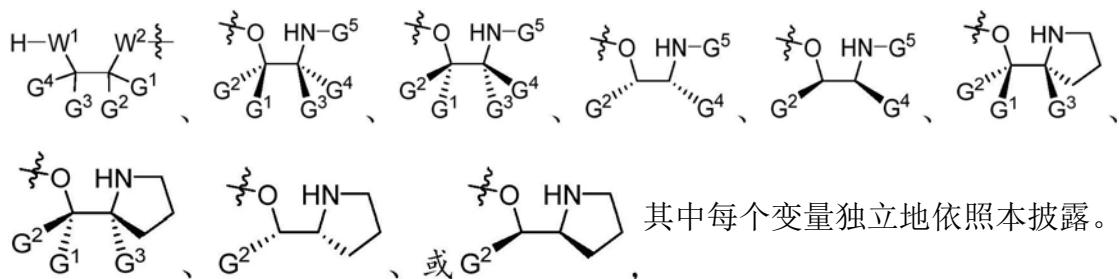


的结构,其中R<sup>2s</sup>是-H、-F、或-OR,并且其他变量各自独立地如本披露中所述。在一些实施例中,G<sup>1</sup>或G<sup>2</sup>包含如本披露中所述的吸电子基团。在一些实施例中,用于偶联的手性亚磷酰胺



所述。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是如本披露中所述的R'。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是如本披露中所述的R。在一些实施例中,R是如本披露中所述的任选地经取代的苯基。在一些实施例中,R是苯基。在一些实施例中,R是如本披露中所述的任选地经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族。在一些实施例中,R是如本披露中所述的任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基。例如,在一些实施例中,R是甲基;在一些实施例中,R是异丙基;在一些实施例中,R是叔丁基;等。在一些实施例中,R'是寡核苷酸合成中的5'-阻断基团,例如,DMTr。在一些实施例中,BA是如本文所述的任选地受保护的核碱基。在一些实施例中,BA是任选地经取代的A、T、G、C、U、或其互变异构体。在一些实施例中,BA是受保护的核碱基。在一些实施例中,BA是任选地经取代的受保护的A、T、G、C、U、或其互变异构体。在一些实施例中,R'是保护基团。在一些实施例中,R'是DMTr。在一些实施例中,R<sup>2s</sup>是-H、-F、或-OMe。在一些实施例中,R<sup>2s</sup>是-H。在一些实施例中,R<sup>2s</sup>是-F。在一些实施例中,R<sup>2s</sup>是-OMe。

[0672] 在一些实施例中,偶联步骤中形成的核苷酸间键联包含与键联磷键合的

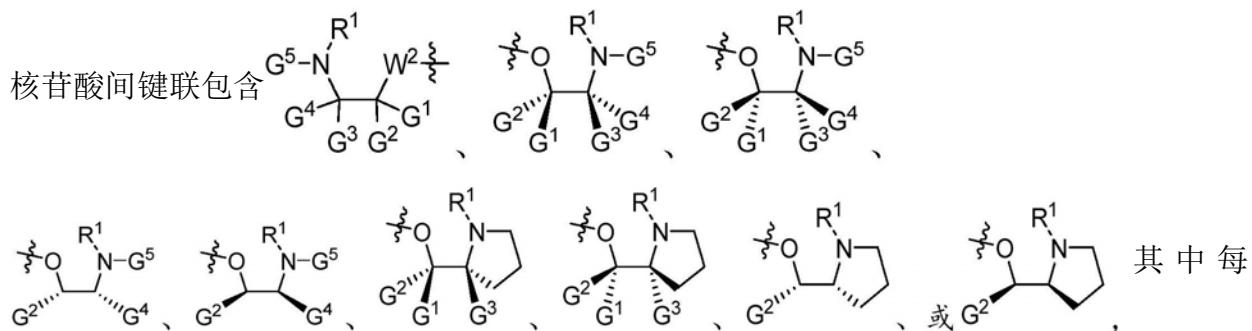


[0673] 在一些实施例中,偶联形成核苷酸间键联,其具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的立体选择性。在一些实施例中,立体选择性是85%或更多。在一些实施例中,立体选择性是85%或更多。在一些实施例中,立体选择性是90%或更多。在一些实施例中,立体选择性是91%或更多。在一些实施例中,立体选择性是92%或更多。在一些实施例中,立体选择性是93%或更多。在一些实施例中,立体选择性是94%或更多。在一些实施例中,立体选择性是95%或更多。在一些实施例中,立体选择性是96%或更多。在一些实施例中,立体选择性是97%或更多。在一些实施例中,立体选择

性是98%或更多。在一些实施例中，立体选择性是99%或更多。

### 加帽 (Capping)

[0674] 如果最终核酸大于二聚体，则未反应的-OH部分通常用封闭/加帽基团进行加帽。寡核苷酸中的手性助剂也可以用阻断基团被加帽以形成加帽的缩合中间体。合适的加帽技术(例如,试剂、条件等)包括以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其各自的加帽技术通过引用并入。在一些实施例中,加帽试剂是羧酸或其衍生物。在一些实施例中,加帽试剂是R' COOH。在一些实施例中,加帽步骤将R' COO-引入手性助剂中未反应的5'-OH基团和/或氨基基团。在一些实施例中,循环可以包含两个或更多个加帽步骤。在一些实施例中,循环包含在偶联产物的修饰之前的第一加帽(例如,将P(III)转化为P(V)),以及在偶联产物的修饰之后的另一加帽。在一些实施例中,在酰胺化条件下进行第一加帽,该酰化条件例如包含酰化试剂(例如,具有(RCO)<sub>2</sub>O(例如,Ac<sub>2</sub>O)的酸酐)和碱(例如,2,6-二甲基吡啶)。在一些实施例中,第一加帽对氨基基团(例如,核苷酸间键联中的手性助剂的氨基)进行加帽。在一些实施例中,加帽步骤中形成的



个变量独立地依照本披露。在一些实施例中,R<sup>1</sup>是R-C(0)-。在一些实施例中,R是CH<sub>3</sub>-。在一些实施例中,每个手性受控的偶联(例如,使用手性助剂)之后进行第一加帽。通常,使用传统亚磷酰胺来构建天然磷酸酯键联的非手性受控的偶联的循环不包含第一加帽。在一些实施例中,进行第二加帽,例如在酯化条件下(例如,传统亚磷酰胺寡核苷酸合成的加帽条件),其中游离的5'-OH被加帽。

[0675] 实例中示出了某些加帽技术(例如,试剂、条件、方法等)。

### 修饰

[0676] 在一些实施例中,核苷酸间键联(其中其键联磷作为P(III)存在)被修饰以形成另一种经修饰的核苷酸间键联。在很多实施例中,通过与亲电试剂反应修饰P(III)。依照本披露可以使用合适的P(III)的各种类型的反应。合适的修饰技术(例如,试剂(例如,硫化试剂、氧化试剂等)、病症等)包括以下描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其每个的修饰技术通过引用结合在此。

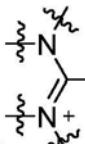
[0677] 在一些实施例中,如实例中说明,本披露提供了用于引入非负电荷的核苷酸间键联(包括中性核苷酸间键联)的修饰剂。

[0678] 在一些实施例中,修饰在循环内。在一些实施例中,修饰可以再循环之外。例如,在

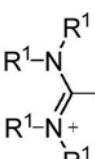
一些实施例中,可以在达到DMD寡核苷酸链之后进行一个或多个修饰步骤以在一个或多个核苷酸间键联和/或其他位置同时引入修饰。

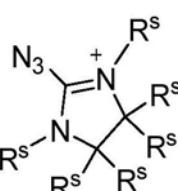
[0679] 在一些实施例中,修饰包括使用点击化学,例如,其中DMD寡核苷酸(例如,核苷酸间键联)的炔基与叠氮化物反应。依照本披露可以利用用于点击化学的各种试剂和条件。在一些实施例中,叠氮化物具有 $R^1-N_3$ (其中 $R^1$ 是如在本披露中所述的)的结构。在一些实施例中, $R^1$ 是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施例中, $R^1$ 是异丙基。

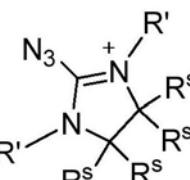
[0680] 在一些实施例中,如在实例中证明,在合适的条件下,通过使P(III)键联与叠氮化

物或叠氮基咪唑啉盐反应(例如,包含的化合物;在一些实施例中,称为叠氮化物

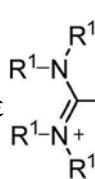
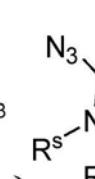
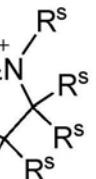
反应),可以将P(III)键联转化为非负电荷的核苷酸间键联。在一些实施例中,叠氮基咪唑

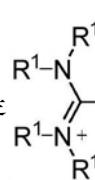
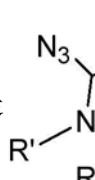
啉盐是PF<sub>6</sub><sup>-</sup>的盐。在一些实施例中,叠氮基咪唑啉盐是的盐。在一些实施例中,有

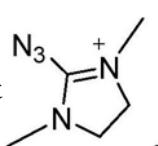
用的试剂是的盐,其中每个R<sup>s</sup>独立地是R<sup>1</sup>。在一些实施例中,有用的试剂是

的盐。包含氮阳离子的此类试剂也含有抗衡阴离子(例如,如在本披露中所

述的Q<sup>-</sup>),该抗衡阴离子是本领域广泛已知的并且包含在各种化学试剂中。在一些实施例

中,有用的试剂是Q<sup>+</sup>Q<sup>-</sup>,其中Q<sup>+</sup>是、、或、并且Q<sup>-</sup>是抗衡

阴离子。在一些实施例中,Q<sup>+</sup>是。在一些实施例中,Q<sup>+</sup>是。在一些实

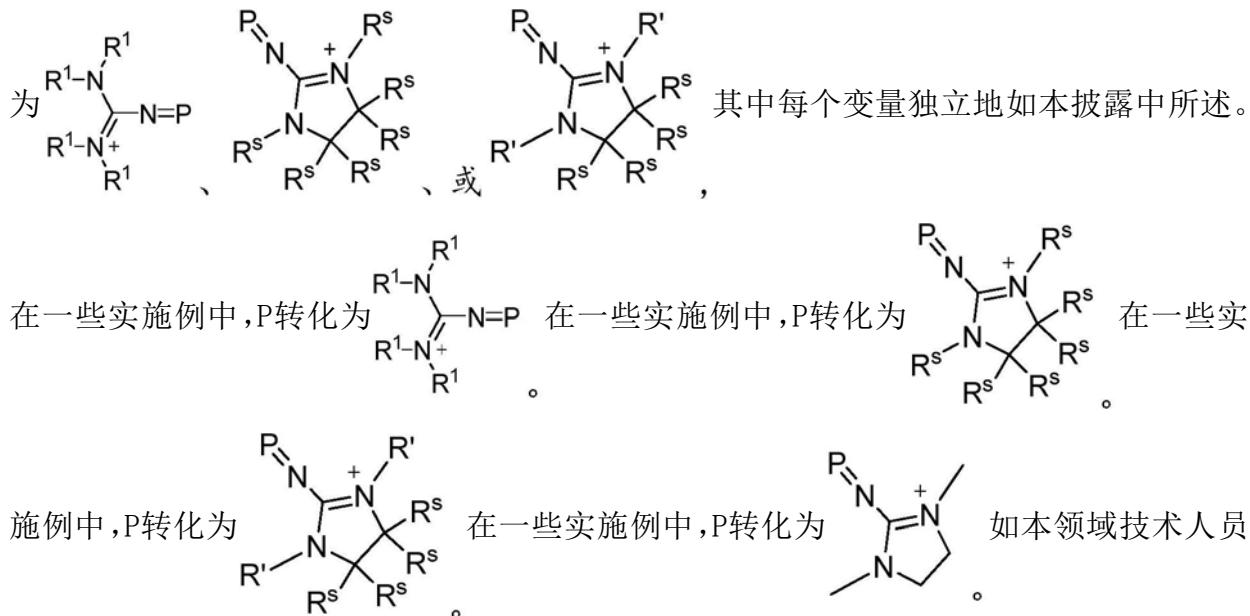
施例中,Q<sup>+</sup>是。如本领域技术人员所理解的,在具有结构Q<sup>+</sup>Q<sup>-</sup>的化合物中,通常Q

<sup>+</sup>中正电荷的数量等于Q<sup>-</sup>中负电荷的数量。在一些实施例中,Q<sup>+</sup>是单价阳离子,并且Q<sup>-</sup>是单价

阴离子。在一些实施例中，Q<sup>-</sup>是F<sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、BF<sub>4</sub><sup>-</sup>、PF<sub>6</sub><sup>-</sup>、TfO<sup>-</sup>、Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>、AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>或SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>。在一些实施例中，Q<sup>-</sup>是PF<sub>6</sub><sup>-</sup>。本领域技术人员容易理解，许多其他类型的抗衡阴离子是可获得的并且可以依照本披露使用。在一些实施例中，叠氮基咪唑啉盐是2-叠氮基-1,3-二甲基咪唑啉六氟磷酸盐。

[0681] 在一些实施例中，P(III)键联与具有R-G<sup>Z</sup>的结构的亲电试剂(其中R是如在本披露中所述的，并且G<sup>Z</sup>是离去基团，例如，-Cl、-Br、-I、-OTf、-OMs、-O甲苯磺酰基等)反应。在一些实施例中，R是-CH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R是-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R是-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R是-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R是CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，R是PhCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，R是HC≡C-CH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，R是H<sub>3</sub>C-C≡C-CH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，R是CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，R是CH<sub>3</sub>SCH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，R是-CH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R是-CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R是-CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>3</sub>。

[0682] 在一些实施例中，在修饰步骤后，将P(III)键联磷转化为P(V)核苷酸间键联。在一些实施例中，将P(III)键联磷转化为P(V)核苷酸间键联，并且与键联磷结合的所有基团保持不变。在一些实施例中，键联磷从P转化为P(=O)。在一些实施例中，键联磷从P转化为P(=S)。在一些实施例中，键联磷从P转化为P(=N-L-R<sup>5</sup>)。在一些实施例中，键联磷从P转化



所理解的，对于每种阳离子，通常存在抗衡阴离子，使得系统(例如，化合物、组合物等)中正电荷的总数等于负电荷的总数。在一些实施例中，抗衡阴离子是如在本披露中所述的Q<sup>-</sup>(例如，F<sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、BF<sub>4</sub><sup>-</sup>、PF<sub>6</sub><sup>-</sup>、TfO<sup>-</sup>、Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>、AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>、SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>等)。

[0683] 在一些实施例中，这种核苷酸间键联是手性受控的。在一些实施例中，所有此类核苷酸间键联是手性受控的。在一些实施例中，此类核苷酸间键联的至少一个的键联磷是Rp。在一些实施例中，此类核苷酸间键联的至少一个的键联磷是Sp。在一些实施例中，此类核苷酸间键联的至少一个的键联磷是Rp，并且此类核苷酸间键联的至少一个的键联磷是Sp。在一些实施例中，本披露的DMD寡核苷酸包含一个或多个(例如，1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、1-40、1-50、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个等)此类核苷酸间键联。在一些实施例中，此类DMD寡核苷酸进一步包含一个或多个其他类型的核苷酸间键联，例如，一个或多个天然磷酸酯键联、和/或一个或多个硫代磷酸

酯核苷酸间键联(例如,在一些实施例中,其中的一个或多个独立地是手性受控的;在一些实施例中,其每个独立地是手性受控的;在一些实施例中,至少一个是Rp;在一些实施例中,至少一个是Sp;在一些实施例中,至少一个是Rp,并且至少一个是Sp;等)。在一些实施例中,此类DMD寡核苷酸是立体纯的(基本上不含其他立体异构体)。在一些实施例中,本披露提供了此类DMD寡核苷酸的手性受控的DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中,本披露提供了此类DMD寡核苷酸的手性纯的DMD寡核苷酸组合物。

[0684] 在一些实施例中,修饰以80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的立体选择性进行。在一些实施例中,立体选择性是85%或更多。在一些实施例中,立体选择性是85%或更多。在一些实施例中,立体选择性是90%或更多。在一些实施例中,立体选择性是91%或更多。在一些实施例中,立体选择性是92%或更多。在一些实施例中,立体选择性是93%或更多。在一些实施例中,立体选择性是94%或更多。在一些实施例中,立体选择性是95%或更多。在一些实施例中,立体选择性是96%或更多。在一些实施例中,立体选择性是97%或更多。在一些实施例中,立体选择性是98%或更多。在一些实施例中,立体选择性是99%或更多。在一些实施例中,修饰是立体定向的。

#### 去封闭

[0685] 在一些实施例中,循环包含循环步骤。在一些实施例中,生长的DMD寡核苷酸的5'羟基基团被封闭(即,被保护)并且必须被去封闭以随后与核苷偶联配偶体反应。

[0686] 在一些实施例中,使用酰化来去除阻断基团。合适的去封闭技术(例如,试剂、病症等)包括以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其每个的去封闭技术通过引用结合在此。某些去封闭技术(例如,试剂、条件、方法等)在实例中进行了说明。

#### 切割和脱保护

[0687] 在某些阶段,例如,在达到所希望的DMD寡核苷酸长度后,进行切割和/或脱保护以使封闭的核碱基等脱保护并从支持物上切割DMD寡核苷酸产物。在一些实施例中,分开进行切割和脱保护。在一些实施例中,在一个步骤中、或在两个或更多个步骤中(但不在其间分离产物)进行切割和脱保护。在一些实施例中,切割和/或脱保护利用碱性条件和升高的温度。在一些实施例中,对于某些手性助剂,需要氟化物条件(例如,TBAF、HF-ET<sub>3</sub>N等,任选地具有另外的碱)。合适的切割和脱保护技术(例如,试剂、条件等)包括以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951,其每个的切割和脱保护技术通过引用结合在此。某些切割和脱保护技术(例如,试剂、条件、方法等)在实例中进行了说明。

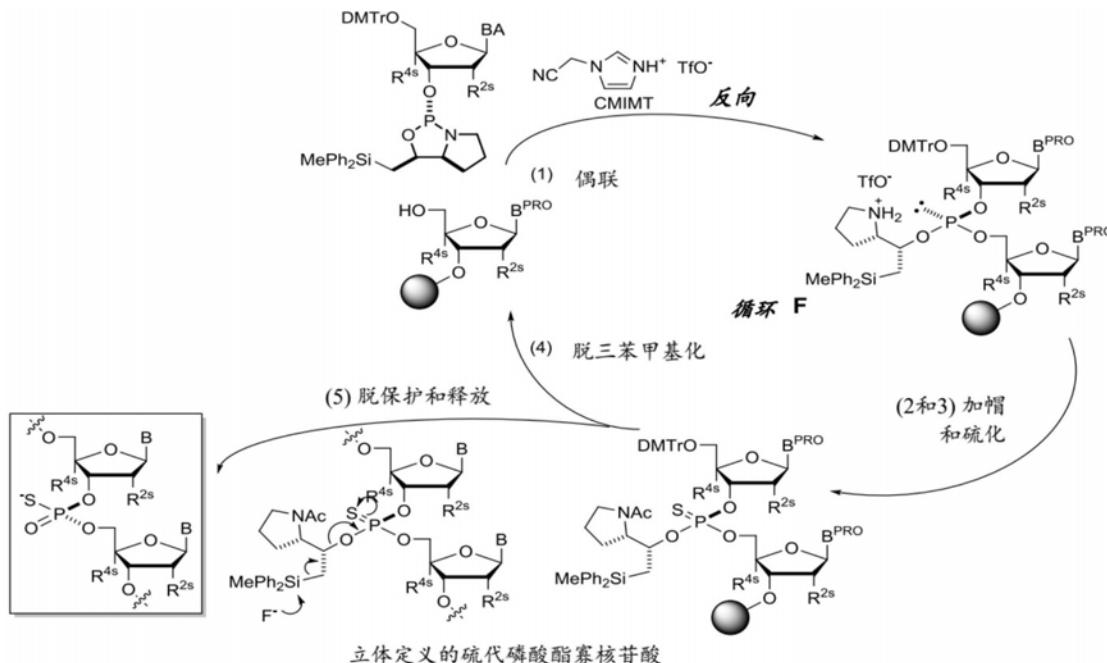
[0688] 在一些实施例中,在碱性条件下去除某些手性助剂。在一些实施例中,使DMD寡核苷酸与碱(例如,具有N(R)<sub>3</sub>的结构的胺)接触以去除某些手性助剂(例如,包含如在本披露中所述的G<sup>2</sup>中的吸电子的基团的那些)。在一些实施例中,碱是NHR<sub>2</sub>。在一些实施例中,每个R独立地是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族。在一些实施例中,每个R独立地是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>

烷基。在一些实施例中，胺是DEA。在一些实施例中，胺是TEA。在一些实施例中，作为溶液提供胺，例如，乙腈溶液。在一些实施例中，这种接触在无水条件下进行。在一些实施例中，在实现所希望的DMD寡核苷酸长度(例如，合成后循环的第一步骤)之后，立即进行这种接触。在一些实施例中，在去除手性助剂和/或保护基团，和/或从固体支持物切割DMD寡核苷酸之前进行这种接触。在一些实施例中，与碱接触可以去除标准DMD寡核苷酸合成中使用的氰基乙基基团，提供能以盐形式存在的天然磷酸酯键联(其中阳离子是例如铵盐)。

### 循环

[0689] 用于制备本披露的DMD寡核苷酸的合适的循环包括以下中描述的那些：US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647(例如，方案I、I-b、I-c、I-d、I-e、I-f等)、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951，其各自的循环通过引用并入。例如，在一些实施例中，示例循环是方案I-f。在实例中说明了某些循环(例如，用于制备天然磷酸酯键联，利用其他手性助剂等)。

方案I-e. 使用DPSE手性助剂的示例循环。



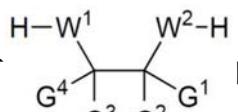
[0690] 在一些实施例中，R<sup>2s</sup>是H或-OR<sup>1</sup>，其中R<sup>1</sup>不是氢。在一些实施例中，R<sup>2s</sup>是H或-OR<sup>1</sup>，其中R<sup>1</sup>是任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施例中，R<sup>2s</sup>是H。在一些实施例中，R<sup>2s</sup>是-OMe。在一些实施例中，R<sup>2s</sup>是-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>。在一些实施例中，R<sup>2s</sup>是-F。在一些实施例中，R<sup>4s</sup>是-H。在一些实施例中，R<sup>4s</sup>和R<sup>2s</sup>一起形成如在本披露中所述的桥-L-0-。在一些实施例中，-O-在2'位置与碳连接。在一些实施例中，L是-CH<sub>2</sub>-。在一些实施例中，L是-CH(Me)-。在一些实施例中，L是-(R)-CH(Me)-。在一些实施例中，L是-(S)-CH(Me)-。

### 纯化和表征

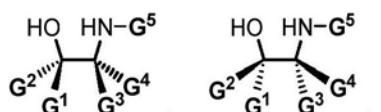
[0691] 可以利用各种纯化和/或表征技术(方法、仪器、方案等)来纯化和/或表征依照本披露的DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物。在一些实施例中，使用各种类型的HPLC/UPLC技术进行纯化。在一些实施例中，表征包含MS、NMR、UV等。在一些实施例中，纯化和表征可以一起进行，例如HPLC-MS、UPLC-MS等。示例纯化和表征技术包括以下中描述的那些：US

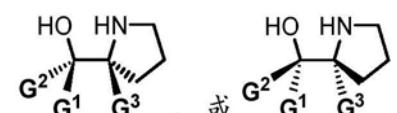
9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/223056、WO 2018/237194、和/或WO 2019/055951，其各自的纯化和表征技术通过引用并入。

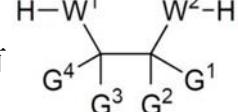
[0692] 在一些实施例中，本披露提供了用于制备提供的DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物的方法。在一些实施例中，提供的方法包括提供具有如本文所述的式3-AA的结构的提供

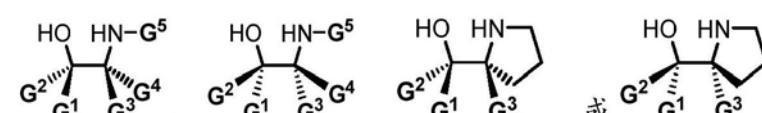
的手性试剂。在一些实施例中，提供的方法包括提供具有  的结构的提供的

手性试剂，其中W<sup>1</sup>是-NG<sup>5</sup>，W<sup>2</sup>是O，G<sup>1</sup>和G<sup>3</sup>各自独立地是氢或选自以下的任选地经取代的基团：C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>脂肪族、杂环基、杂芳基和芳基，G<sup>2</sup>是-C(R)<sub>2</sub>Si(R)<sub>3</sub>或-C(R)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>，并且G<sup>4</sup>和G<sup>5</sup>一起形成高达约20个环原子任选地经取代的含杂原子的饱和的、部分不饱和的、或不饱和的环，这些环是单环或多环、稠和的或未稠和的，其中每个R独立地是氢，或者选自以下的任选地经取代的基团：C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>脂肪族、碳环基、芳基、杂芳基、和杂环基。

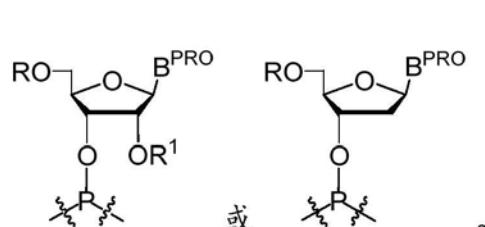
[0693] 在一些实施例中，提供的手性试剂具有  、

 的结构，其中每个变量独立地如本披露所描述的。在一些实施

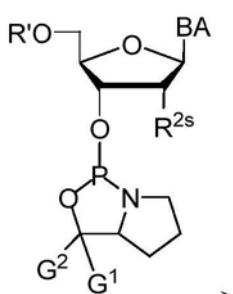
例中，提供的方法包含提供亚磷酰胺，该亚磷酰胺包含来自具有  、

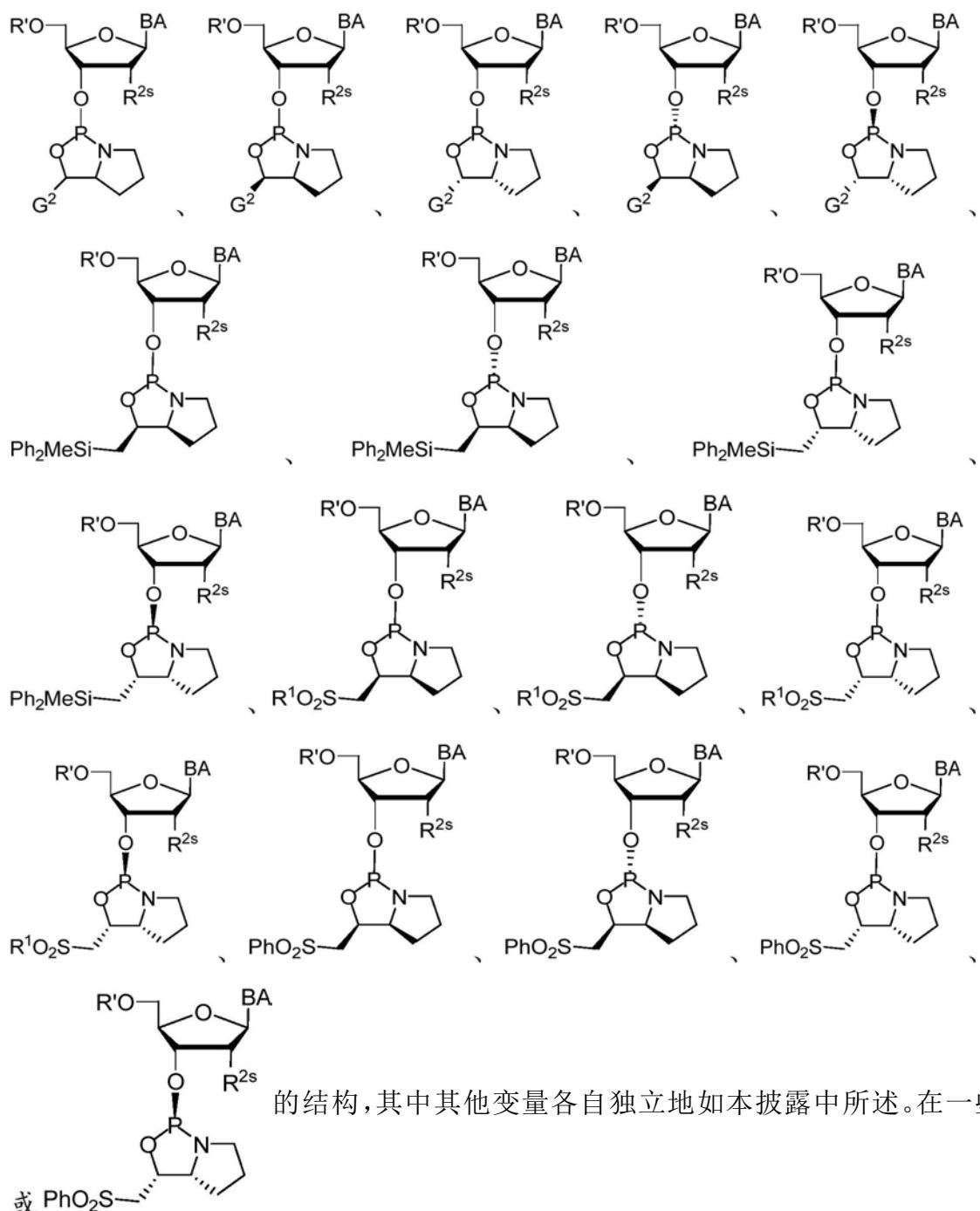
 的结构的手性试剂的部分的，其中-

W<sup>1</sup>H和-W<sup>2</sup>H、或者羟基和氨基基团与亚磷酰胺的磷原子形成键。在一些实施例中，-W<sup>1</sup>H和-W<sup>2</sup>H、或者羟基和氨基基团与亚磷酰胺的磷原子形成键，例如，以



在一些实施例中，亚磷酰胺具有





的结构，其中其他变量各自独立地如本披露中所述。在一些实施例

中,  $R^{2s}$  是 -H。在一些实施例中,  $R^{2s}$  是 -F。在一些实施例中,  $R^{2s}$  是 -OMe。在一些实施例中,  $R'$  是 DMTr。在一些实施例中, BA 是任选地经取代的 A、T、C、G、U 或 A、T、C、G、U 的任选地经取代的互变异构体。

[0694] 在一些实施例中， $G^2$ 是 $-C(R)_2Si(R)_3$ ，其中 $-C(R)_2-$ 是任选地经取代的 $-CH_2-$ ，并且 $-Si(R)_3$ 的每个R独立地是选自以下的任选地经取代的基团：C<sub>1-10</sub>脂肪族、杂环基、杂芳基和芳基。在一些实施例中， $-Si(R)_3$ 的至少一个R独立地是任选地经取代的C<sub>1-10</sub>烷基。在一些实施例中， $-Si(R)_3$ 的至少一个R独立地是任选地经取代的苯基。在一些实施例中， $-Si(R)_3$ 的一个R独立地是任选地经取代的苯基，并且另外两个R独立地是任选地经取代的C<sub>1-10</sub>烷基。在一些实施例中， $-Si(R)_3$ 的一个R独立地是任选地经取代的C<sub>1-10</sub>烷基，并且另外两个R独立地是

任选地经取代的苯基。在一些实施例中,  $G^2$  是任选地经取代的  $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{Ph})(\text{Me})_2$ 。在一些实施例中,  $G^2$  是任选地经取代的  $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{Me})(\text{Ph})_2$ 。在一些实施例中,  $G^2$  是  $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{Me})(\text{Ph})_2$ 。在一些实施例中,  $G^4$  和  $G^5$  一起形成任选地经取代的饱和的含有一个氮原子的 5-6 元环 ( $G^5$  附接在其上)。在一些实施例中,  $G^4$  和  $G^5$  一起形成任选地经取代的饱和的含有一个氮原子的 5 元环。在一些实施例中,  $G^1$  是氢。在一些实施例中,  $G^3$  是氢。在一些实施例中,  $G^1$  和  $G^3$  均是氢。在一些实施例中,  $G^1$  和  $G^3$  均为氢,  $G^2$  是  $-\text{C}(\text{R})_2\text{Si}(\text{R})_3$ , 其中  $-\text{C}(\text{R})_2-$  是任选地经取代的  $-\text{CH}_2-$ , 并且  $\text{R}-\text{Si}(\text{R})_3$  的每个独立地是选自以下的任选地经取代的基团:  $\text{C}_{1-10}$  脂肪族、杂环基、杂芳基和芳基, 并且  $G^4$  和  $G^5$  一起形成含有一个氮原子的任选地经取代的饱和的 5 元环。在一些实施例中, 提供的方法进一步包括提供含有氟的试剂。在一些实施例中, 提供的含有氟的试剂在合成后从寡核苷酸去除手性试剂、或者从手性试剂形成的产物。依照本披露可以利用各种已知的含有氟的试剂(包括用于去除  $-\text{SiR}_3$  基团的那些  $\text{F}^-$  源), 例如,  $\text{TBAF}$ 、 $\text{HF}_3\text{-Et}_3\text{N}$  等。在一些实施例中, 与传统的方法(如浓缩氨)相比, 含有氟的试剂提供了更好的结果, 例如, 更短的治疗时间、较低的温度、较少的去硫化等。在一些实施例中, 对于某个含有氟的试剂, 本披露提供了用于改善结果的接头, 例如, 在去除手性试剂(或在 DMD 寡核苷酸合成期间由其形成的产物)期间从支持物较少的切割 DMD 寡核苷酸。在一些实施例中, 提供的接头是 SP 接头。在一些实施例中, 本披露证明可以利用 HF-碱复合物(如  $\text{HF-NR}_3$ ), 以在去除手性试剂(或在 DMD 寡核苷酸合成期间由其形成的产物)期间控制切割。在一些实施例中,  $\text{HF-NR}_3$  是  $\text{HF-NEt}_3$ 。在一些实施例中,  $\text{HF-NR}_3$  能够使用传统的接头, 例如琥珀酰基接头。

[0695] 在一些实施例中, 如本文所述,  $G^2$  例如, 在其  $\alpha$  位置包含吸电子基团。在一些实施例中,  $G^2$  是被一个或多个吸电子基团取代的甲基。在一些实施例中, 吸电子的基团包含和/或通过例如,  $-\text{S}(0)-$ 、 $-\text{S}(0)_2-$ 、 $-\text{P}(0)(\text{R}^1)-$ 、 $-\text{P}(\text{S})\text{R}^1-$ 、或  $-\text{C}(0)-$  与碳原子连接。在一些实施例中, 吸电子基团是  $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、卤素、 $-\text{C}(0)\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(0)\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(0)\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(0)\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(0)_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(0)(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(0)(\text{OR}')_2$ 、或  $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ 。在一些实施例中, 吸电子基团是芳基或杂芳基, 例如, 被  $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、卤素、 $-\text{C}(0)\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(0)\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(0)\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(0)\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(0)_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(0)(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(0)(\text{OR}')_2$ 、或  $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$  中的一个或多个取代的苯基。在一些实施例中,  $G^2$  是  $-\text{CH}_2\text{S}(0)\text{R}'$ 。在一些实施例中,  $G^2$  是  $-\text{CH}_2\text{S}(0)_2\text{R}'$ 。在一些实施例中,  $G^2$  是  $-\text{CH}_2\text{P}(0)(\text{R}')_2$ 。描述了另外的示例实施例, 例如, 对于手性试剂/助剂。

[0696] 可以使用多种合适的技术来确认立体控制的寡核苷酸(例如, 通过本文或本领域所述的方法制备的寡核苷酸)包含预期的立体控制的(手性受控的)核苷酸间键联。立体控制的(手性受控的)寡核苷酸包含至少一个立体控制的核苷酸间键联, 该核苷酸间键联可以是例如, 包含磷的立体控制的核苷酸间键联, 以  $\text{R}_p$  构型的立体控制的硫代磷酸酯核苷酸间键联(PS)、以  $\text{S}_p$  构型的 PS 等。作为非限制性实例, 有用的技术包括: NMR(例如, 1D(一维)和/或 2D(二维) $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HETCOR(异核相关光谱))、HPLC、RP-HPLC、质谱、LC-MS、和/或立体特异性核酸酶。在一些实施例中, 立体特异性核酸酶包括: 全能核酸酶(benzonase)、微球菌核酸酶、和 svPDE(蛇毒磷酸二酯酶), 其对  $\text{R}_p$  构型的核苷酸间键联(例如,  $\text{R}_p$  构型的 PS)具有特异性; 和核酸酶 P1、绿豆核酸酶、和核酸酶 S1, 其对  $\text{S}_p$  构型的核苷酸间键联(例如,  $\text{S}_p$  构型的 PS)具有特异性。

[0697] 在一些实施例中, 本披露涉及确认或鉴定寡核苷酸(例如, DMD 寡核苷酸)的骨架的立体化学模式、和/或特定的核苷酸间键联的立体化学的方法。在一些实施例中, DMD 寡核苷

酸包含含有磷的立体控制的核苷酸间键联、Rp构型的立体控制的硫代磷酸酯(PS)、或Sp构型的PS。在一些实施例中,DMD寡核苷酸包含至少一个立体控制的核苷酸间键联和非立体控制的至少一个核苷酸间键联。在一些实施例中,方法包括用立体特异性核酸酶消化DMD寡核苷酸。在一些实施例中,立体特异性核酸酶选自:全能核酸酶(benzonase)、微球菌核酸酶、和svPDE(蛇毒磷酸二酯酶),其对Rp构型的核苷酸间键联(例如,Rp构型的PS)具有特异性;和核酸酶P1、绿豆核酸酶、和核酸酶S1,其对Sp构型的核苷酸间键联(例如,Sp构型的PS)具有特异性。在一些实施例中,分析通过用立体特异性核酸酶消化产生的DMD寡核苷酸或其片段。在一些实施例中,通过NMR、1D(一维)和/或2D(二维) $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HETCOR(异核相关谱)、HPLC、RP-HPLC、质谱、LC-MS、UPLC等分析DMD寡核苷酸或其片段(例如,通过立体特异性核酸酶消化产生的)。在一些实施例中,DMD寡核苷酸或其片段与具有已知的立体化学模式的DMD寡核苷酸的化学合成的片段进行比较。

[0698] 不希望受任何特定理论的束缚,本披露指出,在至少一些情况下,特定的核酸酶的立体定向性可以通过修饰(例如,2'-修饰)糖、通过碱基序列、或通过立体化学上下文来改变。例如,在一些实施例中,全能核酸酶和微球菌核酸酶(其对Rp核苷酸间键联具有特异性)两者均能够切割分离的PS Rp核苷酸间键联(由PS Sp核苷酸间键联侧翼的)。

[0699] 可以利用各种技术和材料。在一些实施例中,本披露提供了有用的技术的组合。例如,在一些实施例中,可以通过用立体特异性核酸酶消化DMD寡核苷酸、并通过任何种类技术(例如,基于质荷比的分离、NMR、HPLC、质谱等)分析所得片段(例如,核酸酶消化产物)来确认DMD寡核苷酸的一个或多个特定的核苷酸间键联的立体化学。在一些实施例中,通过例如,经由控制立体化学的技术产生的与化学合成的片段(例如,二聚体、三聚体、四聚体等)进行比较(例如,NMR,HPLC,质谱等),可以确认用立体特异性核酸酶消化DMD寡核苷酸的产物的立体化学。

[0700] 在又一个实例中,测试不同的DMD寡核苷酸以确认核苷酸间键联处于预期的构型。DMD寡核苷酸能够跳读DMD的外显子51;DMD寡核苷酸中的大多数核苷酸是2'-F,并且其余为2'-OMe;DMD寡核苷酸中的大部分核苷酸间键联是Sp构型的PS,并且其余为PO。通过用立体特异性核酸酶消化来测试此DMD寡核苷酸,并分析所得的消化片段(例如,通过LC-MS并通过与已知立体化学的化学合成片段比较)。结果证实DMD寡核苷酸具有立体控制的核苷酸间键联的预期模式。

[0701] 在一些实施例中,NMR可用于表征和/或确认立体化学。在一组示例实验中,测试包含立体控制的CpG基序的一组DMD寡核苷酸以证实CpG基序的预期立体化学。该组的寡核苷酸包含具有pCpGp的结构的基序,其中C是胞嘧啶,G是鸟嘌呤,并且p是立体随机或立体控制的硫代磷酸酯(例如,以Rp或Sp构型)。例如,一种DMD寡核苷酸包含pCpGp结构,其中硫代磷酸酯(例如,ppp)的立体化学模式是RRR;在另一种DMD寡核苷酸,ppp的立体化学模式是RSS;在另一种DMD寡核苷酸,ppp的立体化学模式是RSR;等。在该组中,表示了ppp的所有可能的立体化学模式。在pCpGp结构外的DMD寡核苷酸部分中,所有核苷酸间键联均为PO;DMD寡核苷酸中的所有核苷均为2'-脱氧基。这些各种DMD寡核苷酸在NMR中测试,没有用立体特异性核酸酶消化,并且观察到独特的峰模式,表明每个PS是Rp或Sp产生的独特的峰,并证实DMD寡核苷酸包含预期的立体化学的立体控制的PS核苷酸间键联。

[0702] 确认了各种其他立体控制的DMD寡核苷酸的核苷酸间键联的立体化学模式,其中

该DMD寡核苷酸包含多种化学修饰和立体化学模式。

#### 生物学应用、示例用途、和给药方案

[0703] 如本文所述,提供的组合物和方法可用于各种目的,例如,以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、和/或WO 2017/210647。

[0704] 在一些实施例中,提供的技术在靶DMD转录物中跳读外显子51或53。制备了包含各种类型的经修饰的核苷酸间键联(包括许多包含非负电荷的核苷酸间键联(例如,n001),其具有各种碱基序列和/或靶向各种核酸(例如,各种基因的DMD转录物))的许多DMD寡核苷酸,并且说明了各种有用特性、活性和/或优点。

[0705] 在一些实施例中,本披露提供了用于调节系统中DMD转录物或由其编码的产物的水平的方法,该方法包括施用有效量的提供的DMD寡核苷酸或其组合物。在一些实施例中,本披露提供了用于调节系统中DMD转录物或由其编码的产物的水平的方法,该方法包括使DMD转录物与提供的DMD寡核苷酸或其组合物接触。在一些实施例中,系统是体外系统。在一些实施例中,系统是细胞。在一些实施例中,系统是组织。在一些实施例中,系统是器官。在一些实施例中,系统是生物。在一些实施例中,系统是受试者。在一些实施例中,系统是人。在一些实施例中,DMD转录物的调节水平降低DMD转录物的水平。在一些实施例中,DMD转录物的调节水平提高DMD转录物的水平。

[0706] 在一些实施例中,本披露提供了用于预防或治疗与核酸序列或由其编码的产物相关的病症、疾病、或障碍的方法,该方法包括向患有或易患其的受试者施用有效量的提供的DMD寡核苷酸或其组合物,其中该DMD寡核苷酸或其组合物调节核酸序列的DMD转录物的水平。在一些实施例中,核酸序列是基因。在一些实施例中,DMD转录物的调节水平降低DMD转录物的水平。在一些实施例中,DMD转录物的调节水平提高DMD转录物的水平。

[0707] 在一些实施例中,例如,通过敲低、外显子跳读等调节的DMD转录物的水平改变至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、100、200、500、或1000倍。

[0708] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物调节剪接。在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物促进外显子跳读,从而产生一定水平的DMD转录物,其在外显子跳读之前具有增加的DMD转录物的有益功能。在一些实施例中,有益功能是编码具有增加的生物学功能的蛋白质。在一些实施例中,本披露提供了用于调节剪接的方法,该方法包括向剪接系统施用提供的DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物,其中改变至少一个DMD转录物的剪接(例如,外显子51或53的跳读增加)。在一些实施例中,至少一个剪接产物的水平增加至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、100、200、500、或1000倍。在一些实施例中,本披露提供了用于调节DMD剪接的方法,该方法包括向剪接系统施用提供的DMD寡核苷酸或其组合物。

[0709] 在一些实施例中,本披露提供了用于预防或治疗DMD的方法,该方法包括向易患该疾病或者患有该疾病的受试者施用药物组合物,该药物组合物包含有效量的提供的DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物。

[0710] 在一些实施例中,提供的组合物和方法提供了与参考模式相比改善的DMD转录物

的剪接模式,该参考模式是来自选自下组的参考条件的模式,该组由以下组成:不存在组合物、存在参考组合物、及其组合。改善可以是任何所希望的生物学功能的改善。在一些实施例中,例如,在DMD中,改善是产生mRNA,从中产生具有改善的生物活性的肌营养不良蛋白质。

[0711] 在一些实施例中,特别地有用的和有效的是手性受控的DMD寡核苷酸和手性受控的DMD寡核苷酸组合物,其中这些DMD寡核苷酸(或在手性受控的DMD寡核苷酸组合物中的多个DMD寡核苷酸)任选地包含一个或多个非负电荷的核苷酸间键联。除其他事项外,此类DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物可以提供大大改善的效果、更好的递送、更低的毒性等。

[0712] 在一些实施例中,跳读DMD的外显子53。

[0713] 在一些实施例中,将提供的DMD寡核苷酸组合物以低于其他相当的参考DMD寡核苷酸组合物的剂量和/或频率施用,在改变靶DMD转录物的剪接方面具有相当的效果。在一些实施例中,将立体控制的(手性受控的)DMD寡核苷酸组合物以低于其他相当的立体随机的参考DMD寡核苷酸组合物的剂量和/或频率施用,在改变靶DMD转录物的剪接方面具有相当的效果。如果需要,由于其较低的毒性,所提供的组合物也可以较高的剂量/频率给药。

[0714] 在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸、组合物和方法具有低毒性,例如,当与参考组合物相比时。如本领域已知的,DMD寡核苷酸在施用于例如细胞、组织、生物体等时可以诱导毒性。在一些实施例中,DMD寡核苷酸可以诱导不希望的免疫应答。在一些实施例中,DMD寡核苷酸可以诱导补体活化。在一些实施例中,DMD寡核苷酸可以诱导补体的可替代的途径的活化。在一些实施例中,DMD寡核苷酸可以诱导炎症。除其他事项外,补体系统具有可以破坏细胞的强烈的细胞溶解活性,因此应调整以减少潜在的伤害。在一些实施例中,DMD寡核苷酸诱导的血管损伤是DMD寡核苷酸开发(例如,药物用途)中的复发攻击。在一些实施例中,当施用高剂量DMD寡核苷酸时,炎症的主要来源涉及活化可替代的补体级联。在一些实施例中,补体活化是与含有硫代磷酸酯的DMD寡核苷酸相关的常见挑战,并且还存在一些硫代磷酸酯序列以诱导先天免疫细胞活化的潜力。在一些实施例中,细胞因子释放与DMD寡核苷酸的施用相关。例如,在一些实施例中,观察到白细胞介素-6(IL-6)单核细胞趋化蛋白(MCP-1)和/或白细胞介素-12(IL-12)的增加。参见例如,Frazier,Antisense Oligonucleotide Therapies:The Promise and the Challenges from a Toxicologic Pathologist's Perspective[反义寡核苷酸疗法:毒理学病理学家的承诺和挑战].ToxicolPathol.[毒物病理学],43:78-89,2015;和Engelhardt等人,Scientific and Regulatory Policy Committee Points-to-consider Paper:Drug-induced Vascular Injury Associated with Nonsmall Molecule Therapeutics in Preclinical Development:Part 2.Antisense Oligonucleotides[科学与监管政策委员会的重点论文:临床前开发中与非小分子药物治疗相关的药物诱发的血管损伤:第2部分,反义寡核苷酸].ToxicolPathol.[毒物病理学]43:935-944,2015。

[0715] 本文提供的寡核苷酸组合物可用作调节许多细胞过程和机制(包括但不限于DMD转录、翻译、免疫应答、表观遗传学等)的药剂。另外,本文提供的DMD寡核苷酸组合物可用作研究和/或诊断目的的试剂。本领域普通技术人员将容易认识到,本披露的披露内容不限于特定用途,而是适用于需要使用合成寡核苷酸的任何情况。除其他事项外,提供的组合物可用于各种治疗、诊断、农业和/或研究应用。

[0716] 可以利用各种给药方案来施用提供的手性受控的DMD寡核苷酸组合物,例如,以下中描述的那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、和/或WO 2017/210647,其各自的给药方案通过引用并入本文。

[0717] 在一些实施例中,由于它们的低毒性,所提供的DMD寡核苷酸和组合物能以更高的剂量和/或更高的频率施用。在一些实施例中,由于其改进的递送(和其他特性),所提供的组合物能以较低剂量和/或较低频率施用以实现生物学效应,例如临床功效。

[0718] 单个剂量可含有不同量的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,单个剂量可含有各种量的一种类型的手性受控的DMD寡核苷酸,如本申请所希望的合适的。在一些实施例中,单个剂量含有约1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300或更多(例如,约350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000或更多)mg的一种类型的手性受控的DMD寡核苷酸。在一些实施例中,手性受控的DMD寡核苷酸以单个剂量和/或总剂量按比手性不受控的DMD寡核苷酸低的量施用。在一些实施例中,归因于改善的功效,手性受控的DMD寡核苷酸以单个剂量和/或总剂量按比手性不受控的DMD寡核苷酸低的量施用。在一些实施例中,手性受控的DMD寡核苷酸以单个剂量和/或总剂量按比手性不受控的DMD寡核苷酸高的量施用。在一些实施例中,归因于改善的安全性,手性受控的DMD寡核苷酸以单个剂量和/或总剂量按比手性不受控的DMD寡核苷酸高的量施用。

#### 药物组合物

[0719] 当用作治疗剂时,将本文所述的提供的DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物作为药物组合物施用。在一些实施例中,药物组合物包含治疗有效量的提供的DMD寡核苷酸或其药学上可接受的盐,以及选自以下的至少一种药学上可接受的非活性成分:药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的赋形剂、和药学上可接受的载体。在一些实施例中,在提供的组合物中提供的DMD寡核苷酸能以盐(优选地,药学上可接受的盐,例如,钠盐、铵盐等)存在。在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸的盐包含两个或更多个阳离子,例如,在一些实施例中,高达DMD寡核苷酸中负电荷的酸性基团(例如,磷酸根、硫代磷酸根等)的数量。如本领域技术人员所理解的,能以盐形式(特别地,药学上可接受的盐形式)提供的和/或利用本文所述的DMD寡核苷酸。

[0720] 在一些实施例中,本披露提供了提供的DMD寡核苷酸(例如,手性受控的DMD寡核苷酸)的盐、及其药物组合物。在一些实施例中,盐是药学上可接受的盐。在一些实施例中,可以捐赠给碱的每种氢离子(例如,在水溶液、药物组合物等的条件下)被非H<sup>+</sup>阳离子替换。例如,在一些实施例中,DMD寡核苷酸的药学上可接受的盐是全金属离子盐,其中每个核苷酸间键联(例如,天然磷酸酯键联、硫代磷酸二酯键联等)的每个氢离子(例如,-OH、-SH等,在水中足够酸性)被金属离子替换。在一些实施例中,所提供的盐是全钠盐。在一些实施例中,所提供的药学上可接受的盐是全钠盐。在一些实施例中,所提供的盐是全钠盐,其中为天然磷酸酯键联(酸形式-O-P(0)(OH)-O-) (如果存在的话)的每个核苷酸间键联以其钠盐形式(-O-P(0)(ONa)-O-)存在,并且为硫代磷酸二酯键联(硫代磷酸酯核苷酸间键联;酸形式-O-P(0)(SH)-O-) (如果存在的话)的每个核苷酸间键联以其钠盐形式(O-P(0)(SNa)-O-)存在。

[0721] 在一些实施例中,配制药物组合物用于静脉内注射、口服施用、口腔施用、吸入、鼻

腔施用、局部施用、眼部施用或耳部施用。在一些实施例中，药物组合物是片剂、丸剂、胶囊、液体、吸入剂、鼻喷雾剂溶液、栓剂、悬浮液、凝胶、胶体、分散体、悬浮液、溶液、乳液、软膏、洗液、滴眼液、或滴耳液。

[0722] 在一些实施例中，本披露提供了药物组合物，该药物组合物包含与药学上可接受的赋形剂混合的手性受控的DMD寡核苷酸、或其组合物。本领域技术人员将认识到药物组合物包括上述的手性受控的DMD寡核苷酸或其组合物的药学上可接受的盐。

[0723] 多种超分子纳米载体可用于递送核酸。示例纳米载体包括但不限于脂质体、阳离子聚合物复合物、和各种聚合物。核酸与各种聚阳离子的复合是用于细胞内递送的另一种方法；这包括使用聚乙二醇化的聚阳离子、聚乙烯胺(PEI)复合物、阳离子嵌段共聚物、和树状聚合物。若干种阳离子纳米载体(包括PEI和聚酰胺树状聚合物)有助于从内体释放内容物。其他方法包括使用聚合物纳米颗粒、聚合物胶束、量子点和脂质复合物。在一些实施例中，DMD寡核苷酸与另一分子缀合。

[0724] 除本文所述的示例递送策略以外，还已知另外的核酸递送策略。

[0725] 在治疗和/或诊断应用中，本披露的化合物可以配制用于多种施用方式，包括全身和局部(topical或localized)施用。技术和配制品通常可以在Remington, The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿：药学科学与实践]，(第20版2000)中找到。

[0726] 提供的DMD寡核苷酸及其组合物在宽剂量范围内有效。例如，在治疗成年人时，每天约0.01至约1000mg、约0.5至约100mg、约1至约50mg以及每天约5至约100mg的剂量是可以使用的剂量实例。准确的剂量将取决于施用途径、施用的化合物的形式、待治疗的受试者、待治疗的受试者的体重、以及主治医师的偏好和经验。

[0727] 药学上可接受的盐通常是本领域普通技术人员所熟知的，并且可以包括例如但不限于乙酸盐、苯磺酸盐(benzenesulfonate)、苯磺酸盐(besylate)、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、乙二胺四乙酸钙、牛磺酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、丙酸酯月桂硫酸盐(estolate)、酚磺乙胺(esylate)、延胡索酸盐、葡萄糖酸盐(gluceptate)、葡萄糖酸盐(gluconate)、谷氨酸盐、乙醇酰氨基苯胂酸盐(glycolylarsanilate)、己基间苯二酚盐(hexylresorcinate)、海巴明(hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、羟萘甲酸盐、碘化物、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐(pamoate/emberonate)、泛酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐(subacetate)、琥珀酸盐、硫酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、或茶氯酸盐(teoclinate)。其他药学上可接受的盐可以例如在Remington, The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿：药学科学与实践]，(第20版2000)中找到。优选的药学上可接受的盐包括例如乙酸盐、苯甲酸盐、溴化物、碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、双羟萘酸盐(pamoate/emberonate)、磷酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐或酒石酸盐。

[0728] 如本领域具有普通技术的人所理解的，DMD寡核苷酸可以配制成许多盐，例如用于药物用途。在一些实施例中，盐是金属阳离子盐和/或铵盐。在一些实施例中，盐是DMD寡核苷酸的金属阳离子盐。在一些实施例中，盐是DMD寡核苷酸的铵盐。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等。在一些实施例中，盐是DMD寡核苷酸的钠盐。在一些实施例中，药学上可接受的盐在适当时包括与DMD寡核苷酸形成的无毒铵、季铵、和胺阳

离子。如本领域具有普通技术的人所理解的，DMD寡核苷酸的盐可含有多个阳离子，例如钠离子，因为在DMD寡核苷酸内可存在多种阴离子。

[0729] 取决于所治疗的具体病症，可将此类药剂配制成液体或固体剂型，并全身或局部施用。如本领域技术人员已知的，可以例如以定时或持续低释放形式递送这些药剂。配制和施用的技术可以在Remington, The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药学科学与实践]，(第20版2000)中找到。合适的途径可包括口服、口腔、通过吸入喷雾、舌下、直肠、透皮、阴道、穿粘膜、鼻或肠施用；肠外递送，包括肌内、皮下、髓内注射，以及鞘内、直接心室内、静脉内、关节内、胸骨内、滑膜内、肝内、病灶内、颅内、腹膜内、鼻内或眼内注射，或其他递送方式。

[0730] 对于注射剂，本披露的药剂可以在水性溶液中进行配制和稀释，如在生理相容性缓冲液中，例如汉克氏(Hank's)溶液、格林氏(Ringer's)溶液、或生理盐水缓冲液。对于这种穿粘膜施用，在配制品中使用适于障碍物渗透的渗透剂。此类渗透剂是本领域公知的。

[0731] 使用药学上可接受的惰性载体将本文公开的用于实施本披露的化合物配制成适于全身施用的剂量在本披露的范围内。通过适当选择载体和合适的制造方法，本披露的组合物，特别是配制成溶液的组合物，可以胃肠外施用，例如通过静脉内注射。

[0732] 可以使用本领域熟知的药学上可接受的载体将化合物(例如，DMD寡核苷酸)容易地配制成适于口服施用的剂量。此类载体使得本披露的化合物被配制为片剂、丸剂、胶囊、液体、胶体、糖浆剂、药浆、悬浮液等，用于由被治疗的受试者(例如患者)口服摄取。

[0733] 对于鼻或吸入递送，本披露的药剂也可以通过本领域技术人员已知的方法配制，并且可以包括例如但不限于增溶、稀释或分散物质(如，盐水、防腐剂(如苯甲醇)、吸收促进剂和碳氟化合物)的实例。

[0734] 在某些实施例中，DMD寡核苷酸和组合物递送至CNS。在某些实施例中，DMD寡核苷酸和组合物递送至脑脊髓液。在某些实施例中，DMD寡核苷酸和组合物施用至脑实质。在某些实施例中，DMD寡核苷酸和组合物通过鞘内施用或脑室内施用而递送至动物/受试者。本文所述的DMD寡核苷酸和组合物在中枢神经系统内的广泛分布可通过实质内施用、鞘内施用、或脑室内施用来实现。

[0735] 在某些实施例中，肠胃外施用通过注射进行，例如通过针筒、泵等进行。在某些实施例中，注射是快速浓注。在某些实施例中，注射直接施用至组织，如纹状体、尾状核、皮质、海马体、和小脑。

[0736] 在某些实施例中，特异性定位药剂的方法(如，通过快速浓注)将中值有效浓度(EC50)降低20、25、30、35、40、45或50倍。在某些实施例中，靶组织是脑组织。在某些实施例中，靶组织是纹状体组织。在某些实施例中，降低EC50是所希望的，因为这减少了在有需要的患者中实现药理学结果所需的剂量。

[0737] 在某些实施例中，DMD寡核苷酸通过注射或输注递送，每个月、每两个月、每90天、每3个月、每6个月一次；一年两次或一年一次。

[0738] 适于在本披露中使用的药物组合物包括以下组合物，其中所述组合物包含有效量的活性成分以实现它的预期目标。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力之内，尤其是根据于本文提供的具体公开内容。

[0739] 除活性成分外，这些药物组合物可以含有合适的药学上可接受的载体(包含赋形

剂和助剂),这些载体有助于将活性化合物加工成可药用的制剂。用于口服施用而配制的制剂可以呈片剂、糖衣丸、胶囊或溶液的形式。

[0740] 用于口服使用的药物制剂可通过以下方法获得:将活性化合物与固体赋形剂组合,任选地研磨所得混合物,并加工所述颗粒混合物(如果希望的话,在添加合适的助剂之后),以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂尤其是填充剂,如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠(CMC)、和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP:聚维酮(povidone))。如果需要,可添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或海藻酸或其盐(如海藻酸钠)。

[0741] 糖衣丸芯提供有合适的包衣。为此目的,可以使用浓缩的糖溶液,所述糖溶液可以任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆胶、聚乙二醇(PEG)、和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料添加到片剂或糖衣丸包衣中,以用于标识或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0742] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制成的插接式胶囊(push-fit capsule)以及由明胶与增塑剂(如甘油或山梨醇)制成的密封式软胶囊。插接式胶囊可以包含与填充剂(如乳糖)、粘合剂(如淀粉)和/或润滑剂(如滑石或硬脂酸镁)以及任选地稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮在合适的液体,如脂肪油、液体石蜡、或液体聚乙二醇(PEG)中。此外,还可以添加稳定剂。

[0743] 在一些实施例中,本文所述的任何DMD寡核苷酸或其组合、或包含本文所述的DMD寡核苷酸的任何组合物可以与本文所述的或本领域已知的任何药物制剂组合。

#### 组合疗法

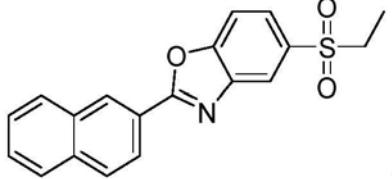
[0744] 在一些实施例中,除了提供的DMD寡核苷酸或DMD寡核苷酸组合物(例如,包含DMD寡核苷酸的组合物)之外,向受试者施用另外的治疗(包括但不限于,治疗剂或方法)。在一些实施例中,将包含一种或多种DMD寡核苷酸的组合物(两种或更多种组合物,每个包含DMD寡核苷酸)与另外的治疗一起施用至患者。

[0745] 在一些实施例中,本披露涉及用于治疗肌肉营养不良、杜氏肌肉营养不良(DMD)或贝克肌肉营养不良(BMD)的方法,该方法包括(a)向易患该疾病或患有该疾病的受试者施用包含提供的DMD寡核苷酸的组合物,和(b)向该受试者施用另外的治疗,该另外的治疗能够预防、治疗、减轻或减缓肌肉营养不良的进展。在一些实施例中,另外的治疗是包含第二DMD寡核苷酸的组合物。

[0746] 在一些实施例中,另外的治疗能够自身预防、治疗、减轻或减缓肌肉营养不良的进展。在一些实施例中,当与提供的DMD寡核苷酸一起施用时,另外的治疗能够预防、治疗、减轻或减缓肌肉营养不良的进展。

[0747] 在一些实施例中,在包含提供的DMD寡核苷酸(例如,提供的DMD寡核苷酸)的组合物之前、之后、或同时,向受试者施用另外的治疗。在一些实施例中,组合物包含一种或多种DMD寡核苷酸和另外的治疗两者。在一些实施例中,一种或多种DMD寡核苷酸和一种或多种另外的治疗在分开的组合物中。在一些实施例中,本披露提供了用于组合疗法的技术(例如,组合物、方法等),例如与其他治疗剂和/或医疗程序组合。在一些实施例中,提供的DMD寡核苷酸和/或组合物可以与一个或多个其他治疗剂一起使用。在一些实施例中,提供的组

合物包含提供的DMD寡核苷酸、和一个或多个其他治疗剂。在一些实施例中，当与组合物中提供的DMD寡核苷酸相比时，一个或多个其他治疗剂可以具有一个或多个不同的靶、和/或针对靶的一个或多个不同的机制。在一些实施例中，治疗剂是DMD寡核苷酸。在一些实施例中，治疗剂是小分子药物。在一些实施例中，治疗剂是蛋白质。在一些实施例中，治疗剂是抗体。可以依照本披露利用许多治疗剂。例如，用于DMD的DMD寡核苷酸可以与调节抗肌萎缩蛋白相关蛋白(utrophin)产生的一种或多种治疗剂(抗肌萎缩蛋白相关蛋白调节剂)一起使用。在一些实施例中，抗肌萎缩蛋白相关蛋白调节剂促进抗肌萎缩蛋白相关蛋白的产生。在一些实施例中，抗肌萎缩蛋白相关蛋白调节剂是依珠卓米(ezutromid)。在一些实施例中，

抗肌萎缩蛋白相关蛋白调节剂是  或其药学上可接受的盐。在

一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸或其组合物在一个或多个其他治疗剂和/或医疗程序之前、同时或之后施用。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸或其组合物与一个或多个其他治疗剂和/或医疗程序同时施用。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸或其组合物在一个或多个其他治疗剂和/或医疗程序之前施用。在一些实施例中，提供的DMD寡核苷酸或其组合物在一个或多个其他治疗剂和/或医疗程序之后施用。在一些实施例中，提供的组合物包含一个或多个其他治疗剂。

[0748] 在一些实施例中，将包含DMD寡核苷酸的组合物与另外的药剂共同施用，以改善目的DMD外显子的跳读。在一些实施例中，另外的药剂是抗体、DMD寡核苷酸、蛋白质、或小分子。在一些实施例中，另外的药剂干扰参与剪接的蛋白质。在一些实施例中，另外的药剂干扰参与剪接的蛋白质，其中该蛋白质是SR蛋白质。

[0749] 在一些实施例中，另外的药剂干扰参与剪接的蛋白质，其中该蛋白质是SR蛋白质，该蛋白质含有具有丝氨酸(S)和精氨酸(R)氨基酸残基的一个或多个长重复序列的蛋白质结构域。据报道，SR蛋白在细胞中严重磷酸化，并参与组成型和可替代的剪接。Long等人2009Biochem.J.[生物化学杂志]417:15-27;Shepard等人2009Genome Biol.[基因组生物学]10:242。在一些实施例中，另外的药剂是抑制或减少SR蛋白激酶的化学化合物。在一些实施例中，抑制或降低SR蛋白激酶的化学化合物是SRPIN340。SRPIN340报道在，例如，Fukuhura等人2006Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]103:11329-11333中。在一些实施例中，化学化合物是对Cdc样激酶(C1k)具有特异性的激酶抑制剂，其也能够磷酸化SR蛋白质。在一些实施例中，对能够磷酸化SR蛋白质的Cdc样激酶(C1k)特异的激酶抑制剂是TG003。据报道，TG003在体外和体内均影响剪接。Nowak等人2010J.Biol.Chem.[生物化学杂志]285:5532-5540;Muraki等人2004J.Biol.Chem.[生物化学杂志]279:24246-24254;Yomoda等人2008Genes Cells[基因细胞]13:233-244;以及Nishida等人2011Nat Commun.[自然通讯]2:308。

[0750] 在一些实施例中，在患有肌肉营养不良的患者中，肌肉组织被脂肪和结缔组织替代，并且受影响的肌肉可能由于脂肪含量增加而看起来更大，这种情况称为假性肥大。在一些实施例中，将包含一种或多种DMD寡核苷酸的组合物与以下治疗一起施用：减少或预防脂肪或纤维或结缔组织的发展、或由脂肪或纤维或结缔组织替换肌肉组织。

[0751] 在一些实施例中,包含一种或多种DMD寡核苷酸的组合物与以下治疗一起施用:减少或预防脂肪或纤维或结缔组织的发育、或由脂肪或纤维或结缔组织替换肌肉组织,其中该治疗是结缔组织生长因子(CTGF)的抗体、纤维化的中枢介质(例如,FG-3019)。在一些实施例中,将包含一种或多种DMD寡核苷酸的组合物与降低人体脂肪含量的药剂一起施用。

[0752] 另外的治疗包括:通过免疫调节剂(例如,类固醇和转化生长因子- $\beta$ 抑制剂)减缓疾病的进展、诱导或引入可补偿肌纤维中肌营养不良蛋白缺乏的蛋白质(例如抗肌萎缩蛋白相关蛋白、双糖链蛋白聚糖、和层粘连蛋白)、或支持肌肉再生反应(例如肌肉生长抑制素和激活素2B)。

[0753] 在一些实施例中,另外的治疗是能够恢复肌细胞内钙的正常平衡的小分子。

[0754] 在一些实施例中,另外的治疗是能够通过校正称为雷诺丁受体钙通道复合物(RyR)的一种通道的活性来恢复肌细胞内钙的正常平衡的小分子。在一些实施例中,这种小分子是Rycal ARM210 (ARMGO制药公司(ARMGO Pharma),塔瑞镇(Tarry Town),纽约)。

[0755] 在一些实施例中,另外的治疗是类黄酮。

[0756] 在一些实施例中,另外的治疗是类黄酮,如表儿茶素。表儿茶素是从可可树中收获的黑巧克力中发现的类黄酮,已在动物和人类中报道,其增加心脏和肌肉中新线粒体的产生(例如,线粒体生物发生),同时刺激肌肉组织的再生。

[0757] 在一些实施例中,另外的治疗是卵泡抑素基因治疗。

[0758] 在一些实施例中,另外的治疗是卵泡抑素344的腺相关病毒递送,以增加肌肉力量并预防肌肉萎缩和纤维化。

[0759] 在一些实施例中,另外的治疗是糖皮质激素。

[0760] 在一些实施例中,另外的治疗是强的松。

[0761] 在一些实施例中,另外的治疗是地夫可特。

[0762] 在一些实施例中,另外的治疗是伐莫龙(vamorolone)(VBP15)。

[0763] 在一些实施例中,另外的治疗是递送外源肌营养不良蛋白基因或合成形式或其部分,如微肌营养不良蛋白基因。

[0764] 在一些实施例中,另外的治疗是递送外源肌营养不良蛋白基因或其部分(如微肌营养不良蛋白基因(如SGT-001))、用于递送合成的肌营养不良蛋白基因或微肌营养不良蛋白的腺相关病毒(AAV)载体介导的基因转移系统(实体生命科学公司(Solid BioSciences),剑桥,马萨诸塞州)。

[0765] 在一些实施例中,另外的治疗是干细胞治疗。

[0766] 在一些实施例中,另外的治疗是类固醇。

[0767] 在一些实施例中,另外的治疗是皮质类固醇。

[0768] 在一些实施例中,另外的治疗是强的松。

[0769] 在一些实施例中,另外的治疗是 $\beta$ -2激动剂。

[0770] 在一些实施例中,另外的治疗是离子通道抑制剂。

[0771] 在一些实施例中,另外的治疗是钙通道抑制剂。

[0772] 在一些实施例中,另外的治疗是为黄原胶的钙通道抑制剂。在一些实施例中,另外的治疗是为甲基黄嘌呤的钙通道抑制剂。在一些实施例中,另外的治疗是己酮可可碱的钙通道抑制剂。在一些实施例中,另外的治疗是为选自以下的甲基黄嘌呤衍生物的钙通道抑

制剂：己酮可可碱、呋喃茶碱、利索茶碱、丙戊茶碱、喷替茶碱、茶碱、托巴茶碱、阿比茶碱、恩丙茶碱、及其衍生物。

[0773] 在一些实施例中，另外的治疗是心脏病或心血管疾病的治疗。

[0774] 在一些实施例中，另外的治疗是血压药物。

[0775] 在一些实施例中，另外的治疗是手术。

[0776] 在一些实施例中，另外的治疗是手术以固定缩短的肌肉、拉直脊柱或治疗心脏或肺部问题。

[0777] 在一些实施例中，另外的治疗是支架、助行器、站立助行器、或用于行走的其他机械辅助。

[0778] 在一些实施例中，另外的治疗是运动和/或物理治疗。

[0779] 在一些实施例中，另外的治疗是辅助通气。

[0780] 在一些实施例中，另外的治疗是抗惊厥、免疫抑制剂、或便秘治疗。

[0781] 在一些实施例中，另外的治疗是NF- $\kappa$ B的抑制剂。

[0782] 在一些实施例中，另外的治疗包含水杨酸和/或二十二碳六烯酸(DHA)。

[0783] 在一些实施例中，另外的治疗是依达奈珍(edsalonexent)(CAT-1004, Catabasis)，水杨酸、和二十二碳六烯酸(DHA)的缀合物。

[0784] 在一些实施例中，另外的治疗是基于细胞的治疗。

[0785] 在一些实施例中，另外的治疗是包含同种异体心球样(cardiosphere)衍生的细胞。

[0786] 在一些实施例中，另外的治疗是加帽-1002(Capricor)。

[0787] 在一些实施例中，y、t、n和m(例如，在立体化学模式中)独立地是1-20，如在本披露中所述的。在一些实施例中，y是1。在一些实施例中，y是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中，y是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中，y是1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10。在一些实施例中，y是1。在一些实施例中，y是2。在一些实施例中，y是3。在一些实施例中，y是4。在一些实施例中，y是5。在一些实施例中，y是6。在一些实施例中，y是7。在一些实施例中，y是8。在一些实施例中，y是9。在一些实施例中，y是10。

[0788] 在一些实施例中，n是1。在一些实施例中，n是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中，n是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中，n是1-10。在一些实施例中，n是1、2、3、4、5、6、7或8。在一些实施例中，n是1。在一些实施例中，n是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施例中，n是3、4、5、6、7或8。在一些实施例中，n是4、5、6、7或8。在一些实施例中，n是5、6、7或8。在一些实施例中，n是6、7或8。在一些实施例中，n是7或8。在一些实施例中，n是1。在一些实施例中，n是2。在一些实施例中，n是3。在一些实施例中，n是4。在一些实施例中，n是5。在一些实施例中，n是6。在一些实施例中，n是7。在一些实施例中，n是8。在一些实施例中，n是9。在一些实施例中，n是10。

[0789] 在一些实施例中，m是0-50。在一些实施例中，m是1-50。在一些实施例中，m是1。在一些实施例中，m是2-50。在一些实施例中，m是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中，m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施例中，m是3、4、5、6、7或8。在一些实施例中，m是4、5、6、7或8。在一些实施例中，m是5、6、7或8。在一些实施例中，m是6、7或8。在一些实施例中，m是7或8。在一些实施例中，m是0。在一些实施例中，m是1。在一些实施例中，m是2。

在一些实施例中， $m$ 是3。在一些实施例中， $m$ 是4。在一些实施例中， $m$ 是5。在一些实施例中， $m$ 是6。在一些实施例中， $m$ 是7。在一些实施例中， $m$ 是8。在一些实施例中， $m$ 是9。在一些实施例中， $m$ 是10。在一些实施例中， $m$ 是11。在一些实施例中， $m$ 是12。在一些实施例中， $m$ 是13。在一些实施例中， $m$ 是14。在一些实施例中， $m$ 是15。在一些实施例中， $m$ 是16。在一些实施例中， $m$ 是17。在一些实施例中， $m$ 是18。在一些实施例中， $m$ 是19。在一些实施例中， $m$ 是20。在一些实施例中， $m$ 是21。在一些实施例中， $m$ 是22。在一些实施例中， $m$ 是23。在一些实施例中， $m$ 是24。在一些实施例中， $m$ 是25。在一些实施例中， $m$ 是至少2。在一些实施例中， $m$ 是至少3。在一些实施例中， $m$ 是至少4。在一些实施例中， $m$ 是至少5。在一些实施例中， $m$ 是至少6。在一些实施例中， $m$ 是至少7。在一些实施例中， $m$ 是至少8。在一些实施例中， $m$ 是至少9。在一些实施例中， $m$ 是至少10。在一些实施例中， $m$ 是至少11。在一些实施例中， $m$ 是至少12。在一些实施例中， $m$ 是至少13。在一些实施例中， $m$ 是至少14。在一些实施例中， $m$ 是至少15。在一些实施例中， $m$ 是至少16。在一些实施例中， $m$ 是至少17。在一些实施例中， $m$ 是至少18。在一些实施例中， $m$ 是至少19。在一些实施例中， $m$ 是至少20。在一些实施例中， $m$ 是至少21。在一些实施例中， $m$ 是至少22。在一些实施例中， $m$ 是至少23。在一些实施例中， $m$ 是至少24。在一些实施例中， $m$ 是至少25。在一些实施例中， $m$ 至少大于25。

[0790] 在一些实施例中， $t$ 是1-20。在一些实施例中， $t$ 是1。在一些实施例中， $t$ 是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中， $t$ 是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中， $t$ 是1-5。在一些实施例中， $t$ 是2。在一些实施例中， $t$ 是3。在一些实施例中， $t$ 是4。在一些实施例中， $t$ 是5。在一些实施例中， $t$ 是6。在一些实施例中， $t$ 是7。在一些实施例中， $t$ 是8。在一些实施例中， $t$ 是9。在一些实施例中， $t$ 是10。在一些实施例中， $t$ 是11。在一些实施例中， $t$ 是12。在一些实施例中， $t$ 是13。在一些实施例中， $t$ 是14。在一些实施例中， $t$ 是15。在一些实施例中， $t$ 是16。在一些实施例中， $t$ 是17。在一些实施例中， $t$ 是18。在一些实施例中， $t$ 是19。在一些实施例中， $t$ 是20。

[0791] 在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少3。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少4。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少5。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少6。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少7。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少8。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少9。在一些实施例中， $t$ 和 $m$ 各自独立地是至少10。

[0792] 如本披露中使用的，在一些实施例中，“一个或多个”是1-200、1-150、1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-40、1-30、或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25。在一些实施例中，“一个或多个”是一个。在一些实施例中，“一个或多个”是两个。在一些实施例中，“一个或多个”是三个。在一些实施例中，“一个或多个”是四个。在一些实施例中，“一个或多个”是五个。在一些实施例中，“一个或多个”是六个。在一些实施例中，“一个或多个”是七个。在一些实施例中，“一个或多个”是八个。在一些实施例中，“一个或多个”是九个。在一些实施例中，“一个或多个”是十个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少一个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少两个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少三个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少四个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少五个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少六个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少七个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少八个。在一些实施例中，“一个

或多个”是至少九个。在一些实施例中，“一个或多个”是至少十个。如本披露中使用的，在一些实施例中，“至少一个”是1-200、1-150、1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-40、1-30、或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25。在一些实施例中，“至少一个”是一个。在一些实施例中，“至少一个”是两个。在一些实施例中，“至少一个”是三个。在一些实施例中，“至少一个”是四个。在一些实施例中，“至少一个”是五个。在一些实施例中，“至少一个”是六个。在一些实施例中，“至少一个”是七个。在一些实施例中，“至少一个”是八个。在一些实施例中，“至少一个”是九个。在一些实施例中，“至少一个”是十个。

[0793] 除其他事项外，本披露提供了以下示例实施例：

1. 一种寡核苷酸，该寡核苷酸具有WV-14791的结构：

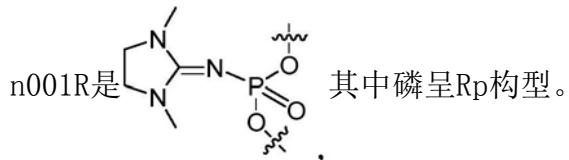
fU\*SfC\*SfCn001RfG\*SfG\*SfUn001RfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmA GfG\*SfU\*SfGn001RfU\*SfU\*SfC\*SfU，

或其药学上可接受的盐形式，其中：

$f$ 代表经 $2'$ -F修饰的核昔；

$*S$ 代表Sp硫代磷酸酯；

$m$ 代表经 $2'$ -OMe修饰的核昔；并且



2. 一种寡核苷酸，该寡核苷酸具有WV-13826的结构：

fU\*SfC\*SfC\*SfG\*SfG\*SfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmA GfG\*SfU\*SfG\*SfU\*SfU\*SfC，

或其药学上可接受的盐形式，其中：

$f$ 代表经 $2'$ -F修饰的核昔；

$*S$ 代表Sp硫代磷酸酯；

$m$ 代表经 $2'$ -OMe修饰的核昔。

3. 一种寡核苷酸，该寡核苷酸具有WV-13864的结构：

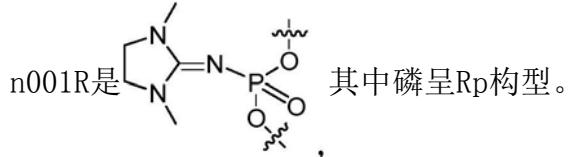
fC\*SfU\*SfCn001RfC\*SfG\*SfGn001RfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmA fG\*SfG\*SfU\*SfGn001RfU\*SfU\*SfC，

或其药学上可接受的盐形式，其中：

$f$ 代表经 $2'$ -F修饰的核昔；

$*S$ 代表Sp硫代磷酸酯；

$m$ 代表经 $2'$ -OMe修饰的核昔；并且



4. 一种寡核苷酸，该寡核苷酸具有WV-13835的结构：

fU\*SfC\*SfC\*SfG\*SfG\*SfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmA GfG\*SfU\*SfG\*SfU\*SfU\*SfC\*SfU，

或其药学上可接受的盐形式，其中：

f代表经2'-F修饰的核苷；

\*S代表Sp硫代磷酸酯；并且

m代表经2'-OMe修饰的核苷。

5. 一种寡核苷酸，该寡核苷酸具有WV-143444的结构：

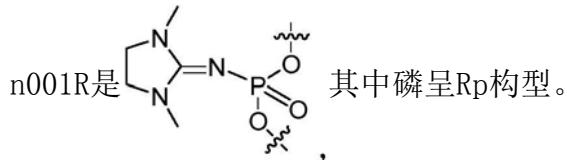
fC\*SfU\*SfCn001RfC\*SfG\*SfGn001RfU\*SfU\*SmCfU\*SmG\*SfA\*SmAfGfG\*SfU\*SfGn001RfU\*SfU\*SfC，

或其药学上可接受的盐形式，其中：

f代表经2'-F修饰的核苷；

\*S代表Sp硫代磷酸酯；

m代表经2'-OMe修饰的核苷；并且



6. 如实施例1-5中任一项所述的寡核苷酸，其中该寡核苷酸呈盐形式。

7. 如实施例6所述的寡核苷酸，其中该盐形式是钠盐。

8. 如实施例7所述的寡核苷酸，其中该钠盐中钠离子的数量等于该寡核苷酸中硫代磷酸酯键联和磷酸酯键联的总数量。

9. 一种手性受控的寡核苷酸组合物，该手性受控的寡核苷酸组合物包含多个如实施例1-8中任一项所述的寡核苷酸，其中相对于具有与该寡核苷酸相同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋制剂，该手性受控的寡核苷酸组合物富集该寡核苷酸。

10. 一种药物组合物，该药物组合物包含治疗有效量的如实施例1-8中任一项所述的寡核苷酸，以及选自以下的药学上可接受的非活性成分：药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的赋形剂、和药学上可接受的载体。

11. 如实施例10所述的药物组合物，其中该药物组合物是溶液。

12. 一种寡核苷酸组合物，用于在疾病的治疗中使用，所述使用包含改变靶转录物的剪接，

其中：该寡核苷酸组合物的特征在于：当该寡核苷酸组合物与转录物剪接系统中的靶转录物接触时，相对于在参考条件下所观察到的，该转录物的剪接发生改变，这些参考条件选自由以下组成的组：不存在该组合物、存在参考组合物、及其组合。

13. 如实施例12所述使用的寡核苷酸组合物，其中

(a) 相对于不存在该组合物，该靶转录物的剪接发生改变，优选地其中该靶转录物是肌营养不良蛋白的前mRNA，并且其中该改变是相对于不存在该组合物，一个或多个外显子以增加的水平被跳读，更优选地其中肌营养不良蛋白的外显子53相对于不存在该组合物以增加的水平被跳读；或

(b) 其中该寡核苷酸组合物是如实施例9-11中任一项所述的组合物。

14. 如实施例1至8中任一项所述的寡核苷酸、或如实施例9-13中任一项所述的组合物，用于在治疗杜氏肌肉营养不良中使用，所述使用包含向易患该疾病或患有该疾病的受试者

施用如实施例1至8中任一项所述的寡核苷酸、或如实施例9-13中任一项所述的组合物。

15. 一种用于预防或治疗DMD的方法,该方法包括向易患该疾病或患有该疾病的受试者施用有效量的DMD寡核苷酸。

16. 如实施例15所述的方法,其中该受试者具有适于外显子51跳读的DMD基因突变,并且该DMD寡核苷酸可以提供外显子51跳读。

17. 如实施例15所述的方法,其中该受试者具有适于外显子53跳读的DMD基因突变,并且该DMD寡核苷酸可以提供外显子53跳读。

18. 如实施例15所述的方法,其中该寡核苷酸是如实施例1-8中任一项所述的寡核苷酸。

19. 如实施例15所述的方法,其中将该寡核苷酸以如实施例9-13中任一项所述的组合物施用。

20. 一种用于制备寡核苷酸的方法,该方法包括使用手性助剂、亚磷酰胺或叠氮化物试剂、或者在说明书中描述的条件。

21. 一种寡核苷酸、手性助剂、亚磷酰胺、组合物、或方法,如在说明书中描述的。

#### 实例

[0794] 上述内容是对本披露的某些非限制性实施例的描述。因此,应理解,本文所述的披露的实施例仅说明本披露的原理的应用。本文对所示实施例的细节的引用并非旨在限制任何权利要求的范围。

[0795] 用于制备、以及用于评估寡核苷酸和寡核苷酸组合物的特性和/或活性的某些方法是本领域广泛已知的,这些方法包括但不限于以下中描述的那些:US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 2015/0211006、US 2017/0037399、WO 2017/015555、WO 2017/192664、WO 2017/015575、W02017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192679、和WO 2017/210647,其各自的方法和试剂通过引用并入本文。申请人在本文描述了用于制备提供的DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物的示例方法。

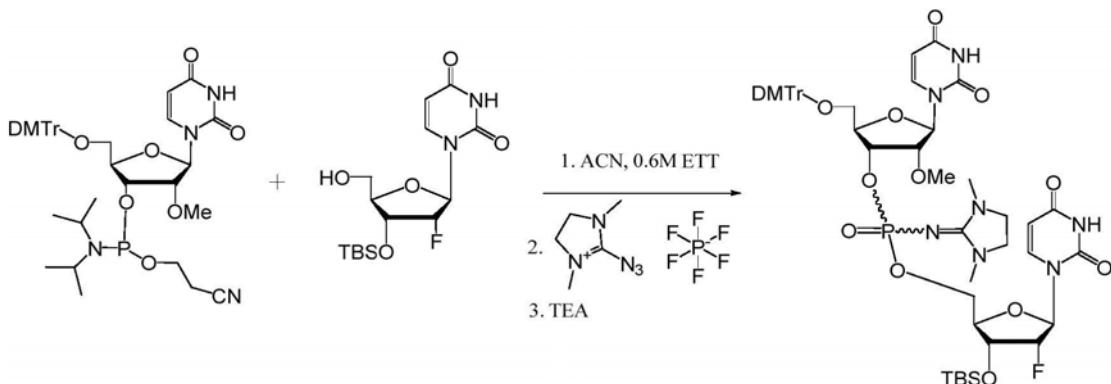
[0796] 从下面描述的示例可以更全面地理解本披露的某些实施例的功能和优点。以下实施例旨在说明此类实施例的某些益处。

#### 实例1.DMD寡核苷酸组合物的示例合成

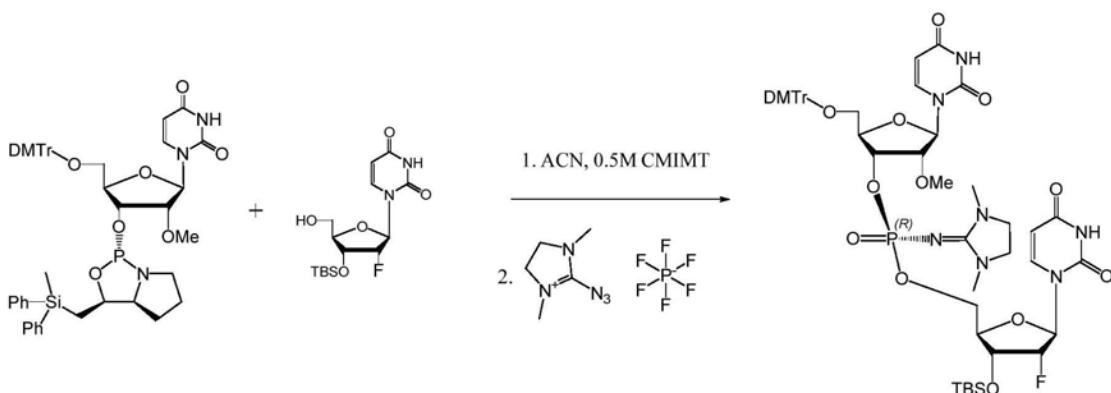
[0797] 用于制备DMD寡核苷酸及其组合物的某些技术是本领域广泛已知的。在一些实施例中,使用在以下的一个或多个中描述的技术(例如,试剂(例如,固体支持物、偶联试剂、切割试剂、亚磷酰胺等)、手性助剂、溶剂(例如,用于反应、洗涤等)、循环、反应条件(例如,时间、温度等)等)来制备本披露的DMD寡核苷酸和DMD寡核苷酸组合物:US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 2015/0211006、US 2017/0037399、WO 2017/015555、WO 2017/192664、WO 2017/015575、W02017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192679、WO 2017/210647、PCT/US18/35687、PCT/US18/38835、和PCT/US18/51398。

#### 实例2.包含环状胍部分的氨基磷酸酯核苷酸间键联的示例合成

[0798] 如本文说明的,依照本披露,可以从亚磷酸酯核苷酸间键联(包括立体纯的亚磷酸酯核苷酸间键联)容易地制备氨基磷酸酯核苷酸间键联。



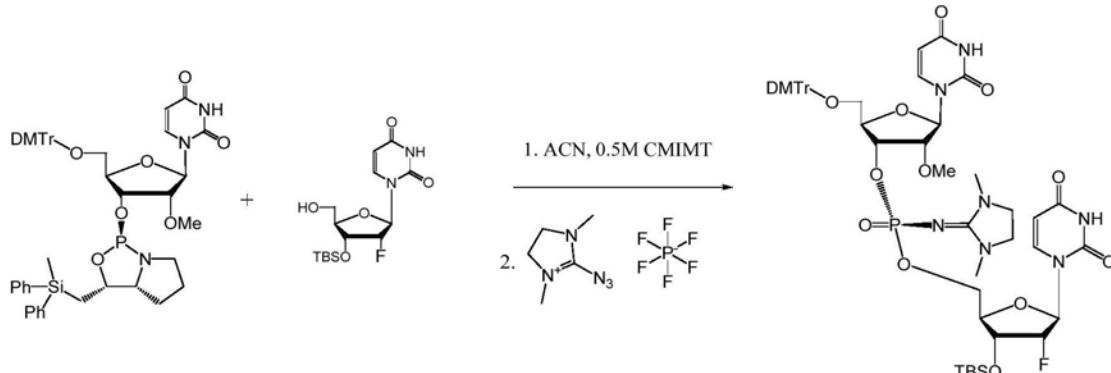
[0799] 在氩气气氛在室温下,向亚酰胺(amidite) (474mg, 0.624mmol, 1.5当量, 通过与干乙腈共蒸发并且在真空下持续最小12h预干燥) 和TBS保护的醇 (150mg, 0.41mmol, 通过与干乙腈共蒸发并且在真空下持续最小12h预干燥) 在干乙腈(5.2ml) 中的搅拌的溶液中添加5-(乙基硫代)-1H-四唑(ETT, 2.08ml, 0.6M, 3当量)。将反应混合物搅拌5min, 然后通过LCMS监测, 然后添加2-叠氮基-1,3-二甲基咪唑啉六氟磷酸盐(356mg, 1.24mmol, 3当量) 在乙腈(1ml) 中的溶液。一旦反应完全(约5min后, 通过LCMS监测), 然后添加三乙胺(0.17ml, 1.24mmol, 3当量), 并反应通过LCMS监测。将反应混合物在减压下浓缩然后再溶于二氯甲烷(50ml) 中, 用水(25ml)、饱和的碳酸氢钠水溶液(25ml)、和盐水(25ml)洗涤, 并用硫酸镁干燥。在减压下将溶剂去除。将粗产物通过硅胶柱(80g), 使用DCM(5%三乙胺) 和MeOH作为洗脱液进行纯化。收集含有产物的级分, 并将溶剂蒸发。所得产物可以含有TEA.HCl盐。为了去除盐, 将产物再溶于DCM(50ml) 中, 并用饱和的水溶液碳酸氢钠(20ml) 和盐水(20ml) 洗涤, 然后用硫酸镁干燥, 并将溶剂蒸发。获得浅黄色固体。产率: 440mg (89%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ-1.34, -1.98。MS C<sub>51</sub>H<sub>65</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>PSi的计算值: [M]<sup>+</sup>1078.17, 观察值: 1078.57 [M+H]<sup>+</sup>。



[0800] 立体纯的(Rp)二聚体的合成。

[0801] 在氩气气氛在室温下,向L-DPSE手性亚酰胺(1.87g, 2.08mmol, 1.5当量, 通过与干乙腈共蒸发并且在真空下持续最小12h预干燥) 和TBS保护的醇(500mg, 1.38mmol, 通过与干乙腈共蒸发并且在真空下持续最小12h预干燥) 在干乙腈(18mL) 中的搅拌的溶液中添加2-(1H-咪唑-1-基)乙腈三氟甲磺酸酯(CMIMT, 5.54mL, 0.5M, 2当量)。将所得反应混合物搅拌5min, 然后通过LCMS监测, 然后添加2-叠氮基-1,3-二甲基咪唑啉六氟磷酸盐(1.18g, 4.16mmol, 3当量) 在乙腈(2mL) 中的溶液。一旦反应完全(约5min后, 通过LCMS监测), 将反应混合物在减压下浓缩然后再溶于二氯甲烷(70mL) 中, 用水(40mL)、饱和的碳酸氢钠水溶液(40mL) 和盐水(40mL) 洗涤, 并用硫酸镁干燥。在减压下将溶剂去除。将粗产物通过硅胶柱

(120g) (使用DCM (5%三乙胺) 和MeOH作为洗脱剂) 纯化。收集含有产物的级分，并将溶剂蒸发。所得产物含有TEA.HCl盐。为了去除盐，将产物再溶于DCM (50mL) 中，并用饱和的碳酸氢钠水溶液 (20mL) 和盐水 (20mL) 洗涤，然后用硫酸镁干燥，并将溶剂蒸发。获得淡黄色泡沫固体。产率：710mg (47%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ-1.38。MS C<sub>51</sub>H<sub>65</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>PSi的计算值：[M]<sup>+</sup> 1078.17, 观察值：1078.19.



[0802] 立体纯的(Sp)二聚体的合成

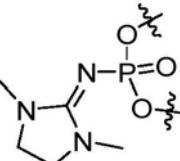
[0803] 遵循与Rp二聚体相同的程序。代替L-DPSE手性亚酰胺，使用D-DPSE手性亚酰胺。获得淡黄色泡沫固体。产率：890mg (59%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ-1.93。MS C<sub>51</sub>H<sub>65</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>PSi的计算值：[M]<sup>+</sup> 1078.17, 观察值：1078.00.

[0804] 在实例<sup>31</sup>P NMR (在80.0的磷酸内标) 中，立体随机制剂分别在-1.34和-1.98显示两个峰；立体纯的Rp制剂在-1.93显示峰，并且立体纯的Sp制剂在-1.38显示峰。

### 实例3. 制备具有包含中性胍基团的核苷酸间键联的DMD寡核苷酸

[0805] 依照本披露中所述的技术，可以制备具有各种中性和/或阳离子的核苷酸间键联 (例如，在生理pH) 的DMD寡核苷酸。下面说明的是包含代表性的此类核苷酸间键联的DMD寡核苷酸的制备。

[0806] WV-11237是包含四个核苷酸间键联的DMD寡核苷酸，其具有



(n001) 向骨架引入中性性质并降低骨架的总负电荷。预期的分子量：7113.4。

[0807] 例如，下面描述WV-11237的一种制备，这些制备包括某些合成条件和分析结果。简而言之，使用L-DPSE亚酰胺和典型的DPSE偶联循环 (包含脱三苯甲基→偶联→预加帽 (Pre-Cap) →硫醇化→后加帽 (Post-Cap)) 构建立体纯核苷酸间键联。修饰对于n001核苷酸间键联的循环，并包含脱三苯甲基→偶联→二甲基咪唑鎓处理→后加帽。与某些氧化循环相比，例如，用I<sub>2</sub>-吡啶-水来氧化P(III) 的氧化步骤被二甲基咪唑鎓处理替换。

[0808] 示例制备的某些条件和/或结果。

合成规模：127μmol

合成条件 (立体纯的核苷酸间键联)

合成步骤	条件
脱三苯甲基	3% DCA, 在甲苯中, 300 cm/hr, 436 UV 观察
偶联	2.5 当量的 0.2M 手性亚酰胺, 67% 的 0.6M CMIMT

	再循环时间: 10 min
预加帽 B	试剂: 20:30:50: 乙酸酐: 二甲基酰胺: 乙腈 1.5 CV, 3 min CT
硫醇化	试剂: 0.2 M 苍耳烷氢化物 0.6 CV, 6 min CT
加帽 (1:1 帽 A+帽 B)	0.4 CV, 0.8 min CT

加帽A=20%:80% =NMI:ACN(v/v)

加帽B=20%:30%:50% =Ac<sub>2</sub>O:2,6-二甲基吡啶:ACN(v/v/v)

合成条件(立体随机n001)

合成步骤	条件
脱三苯甲基	3% DCA, 在甲苯中, 300 cm/hr, 436 UV 观察
偶联	2.5 当量的 0.2M 标准亚酰胺, 67% 的 0.6M ETT 再循环时间: 8 min
二甲基咪唑鎓处理:	2.30 CV, 5 min CT, 3.5 当量
加帽 (1:1 帽 A+帽 B)	0.4 CV, 0.8 min CT

合成过程参数:

合成器:AKTA Oligopilot 100

固体支持物:CPG 2' 氟-U (85umol/g)

合成规模:127umol; 1.5gm

柱直径:20mm

柱体积:6.3mL

立体纯的偶联试剂:

单体:0.2M在MeCN (2' 氟-dA-L-DPSE, 2' 氟-dG-L-DPSE, 2' -OMe-A-L-DPSE) 中; 0.2M在20%异丁腈/MeCN (2' 氟-dC-L-DPSE, 2' 氟-U-L-DPSE) 中

去封闭:3%DCA, 在甲苯中

活化剂:0.6M CMIMT, 在MeCN中

硫化:0.2M苍耳烷氢化物, 在吡啶中

帽A:20%NMI, 在MeCN中

帽B:乙酸酐、二甲基酰胺、MeCN (20:30:50)

预加帽:净帽B

立体随机偶联试剂:

单体:0.2M,在MeCN(2'OMeA和2'OMeG)中

去封闭:3%DCA,在甲苯中

活化剂:0.6M ETT,在MeCN中

2-叠氮基-1,3-二甲基咪唑啉-六氟磷酸盐:0.1M,在MeCN中

帽A:20%NMI,在MeCN中

帽B:乙酸酐、二甲基砒啶、MeCN

脱保护条件:

通过首先用5M TEA.HF(在DMSO、H<sub>2</sub>O、三乙胺(pH 6.8)中)处理支持物对一个罐脱保护。

孵育:3h,室温,80μL/μmol。随后添加氨水(200μL/μmol)。孵育:24h,35°C。使用0.45μm过滤器对脱保护的材料无菌过滤。

产率:720.D./μmol

TEA.HF在DMSO/水中配制5X溶液,5/1,v/v:

试剂	溶剂/试剂	体积(mL)	总体积(mL)
在 DMSO/水 (5/1, v/v) 中(5X) TEA.HF	DMSO	55.0	100
	水	11.0	
	三乙胺(TEA)	9.0	
	三乙胺三氟化物 (TEA.3HF)	25.0	

[0809] 在示例粗UPLC色谱图中,有四个不同的峰,所有都具有7113.2的相同的所希望的分子量:

	RT	面积	%面积	身高
9	7.843	402732	16.75	212901
10	7.884	941388	39.14	327190
11	7.968	595232	24.75	275741
12	8.025	353090	14.68	150141

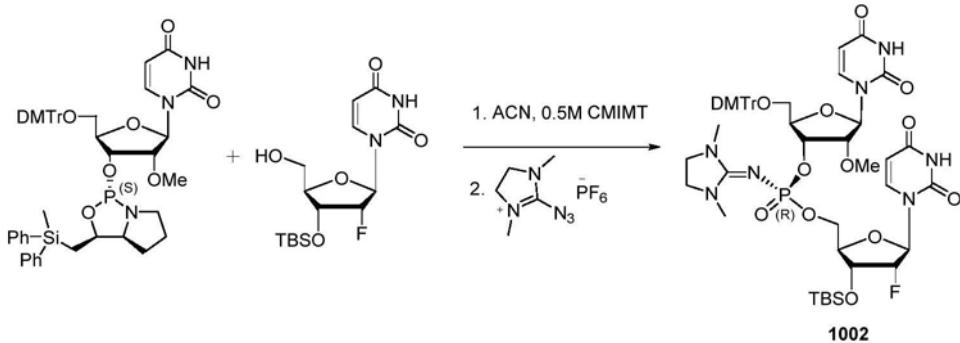
[0810] 示例最终QC UPLC色谱图显示四个不同的峰,所有都具有7113.2的所希望的分子量(%纯度95.32)。粗LC-MS显示7113.2的所希望的分子量的单个峰(数据未显示)。示例最终QC LC-MS显示具有7113.1的所希望的分子量的主峰。

[0811] 可以使用相似的循环条件或其变体制备其他DMD寡核苷酸,这取决于每种DMD寡核苷酸的特定化学性质。

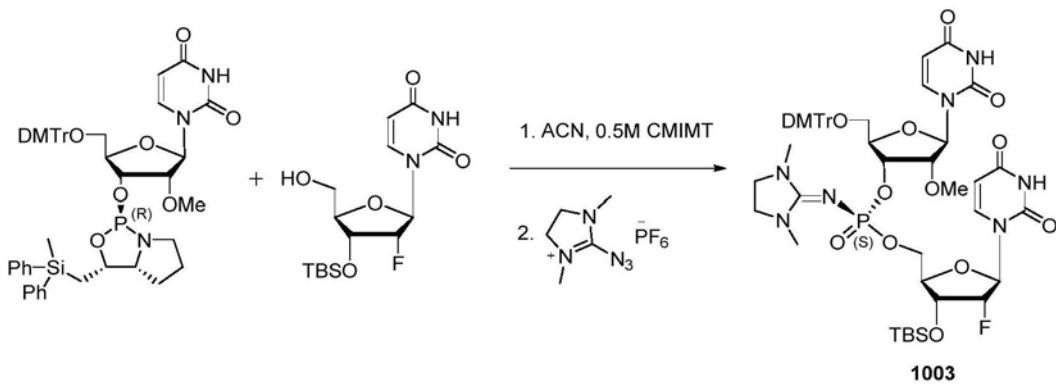
## 实例4. 手性受控的非负电荷的核苷酸间键联

[0812] 二聚体合成。

[0813] 此程序是制得立体纯的二聚体磷酸酯骨架,然后将其并入DMD寡核苷酸(例如,反义DMD寡核苷酸或ASO、单链的RNAi药剂或ssRNA等)的可选择位点。第二种方法是使用自动的DMD寡核苷酸合成器合成分子以在特定位点或完全DMD寡核苷酸处引入非负电荷的核苷酸间键联(例如,中性核苷酸间键联)。



[0814] 立体纯的(Rp)二聚体的一般实验程序(B):在氩气氛围下在室温下,向L(或)D-DPSE手性亚酰胺(1.87g,2.08mmol,1.5当量,通过与干乙腈共蒸发并且将其保持在真空下持续最小12h预干燥)和TBS保护的醇(500mg,1.38mmol,通过与干乙腈共蒸发并且将其保持在真空下持续最小12h预干燥)在干乙腈(18mL)中的搅拌的溶液中添加2-(1H-咪唑-1-基)乙腈三氟甲磺酸酯(CMIMT,5.54mL,0.5M,2当量)。将所得反应混合物搅拌5min,然后通过LCMS监测,然后添加2-叠氮基-1,3-二甲基咪唑啉六氟磷酸盐(1.18g,4.16mmol,3当量)在乙腈(2mL)中的溶液。一旦反应完全(约5min后,通过LCMS监测),然后将反应混合物在减压下浓缩然后再溶于二氯甲烷(70mL)中,用水(40mL)、饱和的碳酸氢钠水溶液(40mL)和盐水(40mL)洗涤,用硫酸镁干燥。在减压下将溶剂去除。将粗产物通过硅胶柱(120g),使用DCM(2%三乙胺)和MeOH作为洗脱液进行纯化。蒸发含有产物的级分。获得淡黄色泡沫固体1002。产率:710mg(47%)。 $^{31}\text{P}$  NMR(162MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ -1.38。MS(ES)m/z C<sub>51</sub>H<sub>65</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>PSi的计算值:[M]<sup>+</sup>1077.40,观察值:1078.19[M+H]<sup>+</sup>。



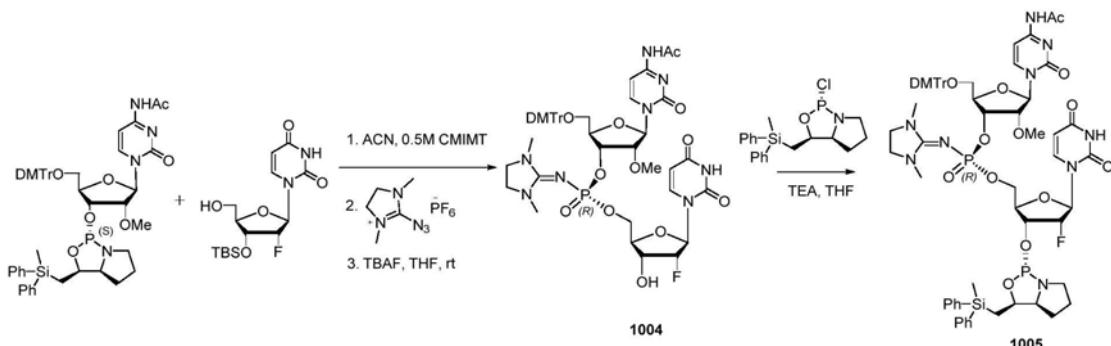
[0815] 立体纯的(Sp)二聚体1003:程序B遵循上文所示的。使用D-DPSE手性亚酰胺。获得淡黄色泡沫固体。产率:890mg(59%)。 $^{31}\text{P}$  NMR(162MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ -1.93。MS(ES)m/z C<sub>51</sub>H<sub>65</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>PSi的计算值:[M]<sup>+</sup>1077.40,观察值:1078.00[M+H]<sup>+</sup>。

[0816] 脱保护TBS基团的通用实验程序(C):在rt,向TBS保护的化合物(9.04mmol)在THF(70mL)中的搅拌的溶液中添加TBAF(1.0M,13.6mmol)。将反应混合物在室温搅拌2-4h。LCMS显示没有剩余起始材料,然后浓缩,然后使用ISCO-combiflash系统(330g金rediSep高性能硅胶柱预平衡的3CV,2%TEA,在DCM中)和DCM/甲醇/2%TEA作为梯度洗脱液进行纯化。将含

有柱级分的产物合并在一起并蒸发,然后在高真空下干燥得到纯的产物。

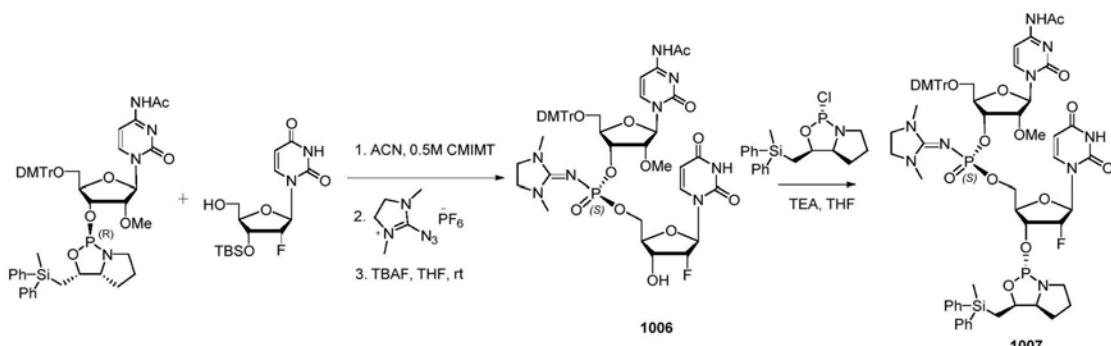
[0817] 手性亚酰胺的一般实验程序(D):在35℃,将TBS脱保护的化合物(2.5mmol)通过与80mL的无水甲苯(30mL × 2)共蒸发进行干燥,并在高真空下干燥过夜。然后将干燥的其溶于THF(30mL)中,随后添加三乙胺(17.3mmol),然后将反应混合物冷却至-65℃[对于鸟嘌呤:在-65℃添加2.5mmol TMS-C1;对于无鸟嘌呤,未添加TMS-C1]。通过注射器经2min将[(1R,3S,3aS)-1-氯-3-((甲基联苯甲硅烷基)甲基)四氢-1H,3H-吡咯并[1,2-c][1,3,2]氧杂氮杂磷杂茂(或)(1S,3R,3aR)-1-氯-3-((甲基联苯甲硅烷基)甲基)四氢-1H,3H-吡咯并[1,2-c][1,3,2]氧杂氮杂磷杂茂(1.8当量)的THF溶液添加至以上反应混合物中,然后逐渐温至室温。在20-30min,在室温,TLC以及LCMS指示起始材料转化为产物(反应时间:1h)。然后在氩气下使用无空气过滤管过滤反应混合物,用THF洗涤并在26℃在旋转蒸发仪下干燥得到粗固体材料,通过ISCO-combiflash系统(40g高rediSep高性能硅胶柱(用CH<sub>3</sub>CN/5%TEA的3CV,然后用DCM/5%TEA预平衡的3CV),使用DCM/CH<sub>3</sub>CN/5%TEA作为溶剂(化合物10-40DCM/CH<sub>3</sub>CN/5%TEA中洗脱)进行纯化。蒸发后,将合并在一起的柱级分在高真空下干燥,得到白色固体,以给出分离的产率。

[0818] <sup>31</sup>P NMR(磷酸在80.0的内标):1001:-1.34和-1.98。1002:-1.93。1003:-1.38。1001、1002、和1003的<sup>1</sup>H NMR证明了非对映异构体的多个氢的不同化学位移。LCMS显示两种非对映异构体的保留时间也不同。在一种情况下,观察到以下保留时间:1001为1.90和2.15,并且一种非对映异构体为1.92,另一种为非对映异构体为2.17。



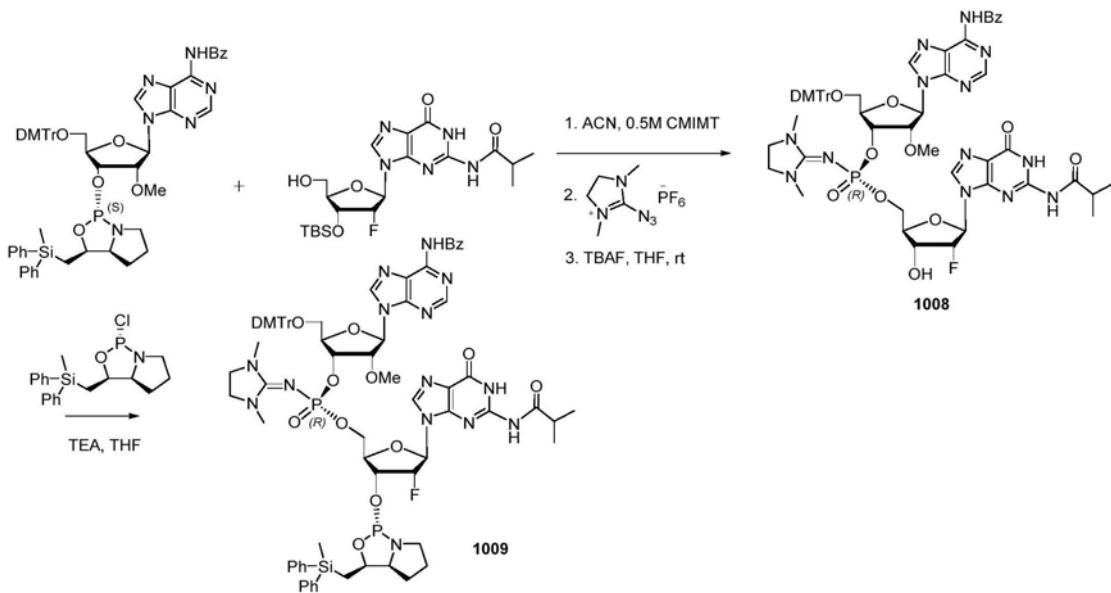
[0819] 化合物1004:随后是程序B和C,灰白色泡沫固体,产率:(36%)。<sup>31</sup>P NMR(162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ-1.23。MS (ES) m/z C<sub>47</sub>H<sub>54</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>14</sub>P的计算值:[M]<sup>+</sup>1004.34,观察值:1043.21[M+K]<sup>+</sup>。

[0820] 化合物1005:使用程序D,灰白色泡沫固体,产率:(81%)。<sup>31</sup>P NMR(162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.43,-2.52。MS (ES) m/z C<sub>66</sub>H<sub>76</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub>Si的计算值:[M]<sup>+</sup>1343.46,观察值:1344.85[M+H]<sup>+</sup>。



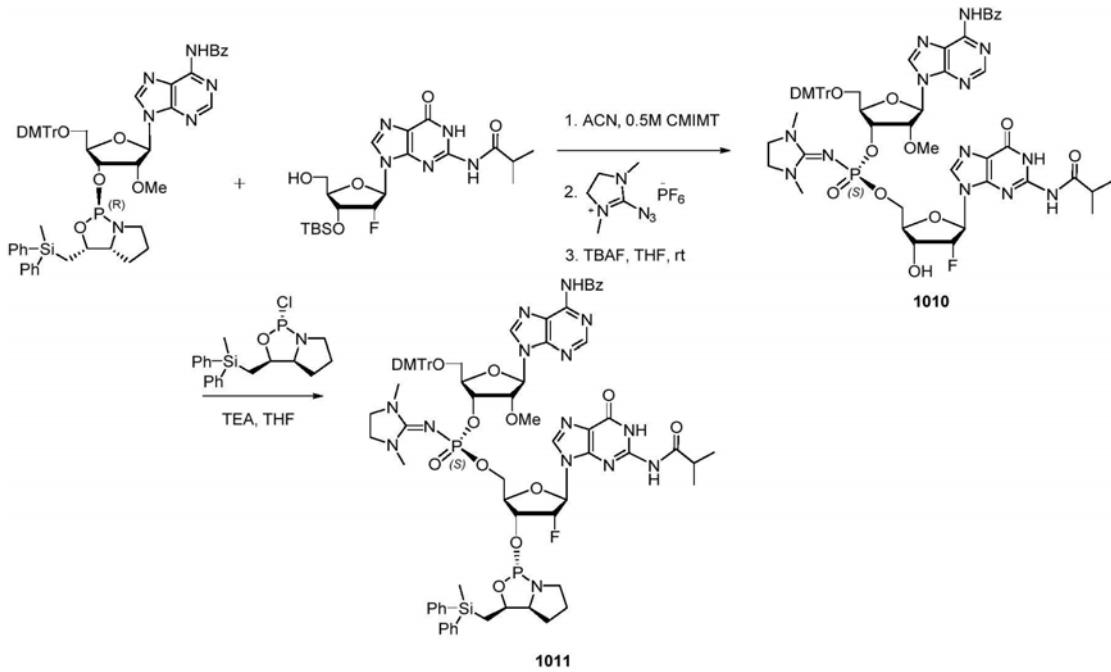
[0821] 化合物1006:随后是程序B、和C,灰白色泡沫固体,产率:(47%)。<sup>31</sup>P NMR(162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ-2.54。MS (ES) m/z C<sub>47</sub>H<sub>54</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>14</sub>P的计算值:[M]<sup>+</sup>1004.34,观察值:1043.12[M+K]<sup>+</sup>。

[0822] 化合物1007:使用程序D,灰白色泡沫固体,产率:(81%)。 $^{31}\text{P}$  NMR (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.55, -2.20。MS (ES) m/z C<sub>66</sub>H<sub>76</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub>Si的计算值:[M]<sup>+</sup>1343.46,观察值:1344.75[M+H]<sup>+</sup>。



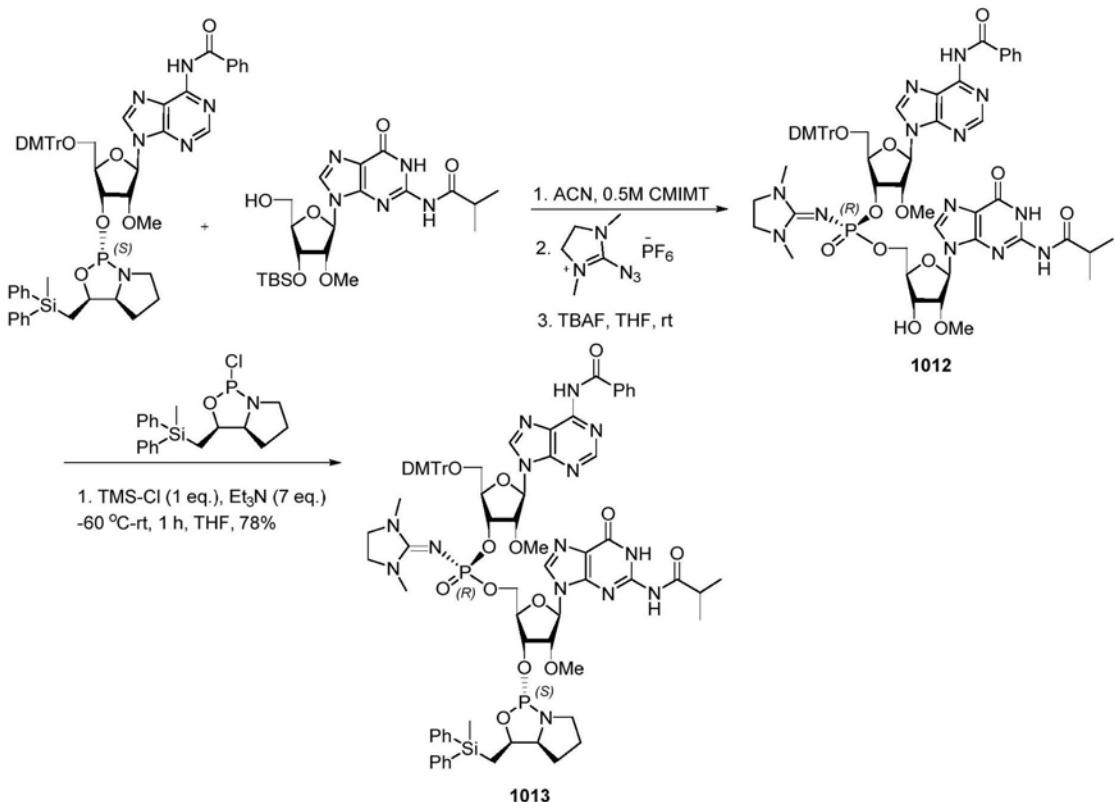
[0823] 化合物1008:随后是程序B和C,灰白色泡沫固体,产率:(36%)。 $^{31}\text{P}$  NMR (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ -1.38。MS (ES) m/z C<sub>58</sub>H<sub>63</sub>FN<sub>13</sub>O<sub>13</sub>P的计算值:[M]<sup>+</sup>1199.43,观察值:1200.76[M+H]<sup>+</sup>。

[0824] 化合物1009:使用程序D,灰白色泡沫固体,产率:(60%)。 $^{31}\text{P}$  NMR (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157.26, -2.86。MS (ES) m/z C<sub>77</sub>H<sub>85</sub>FN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>Si的计算值:[M]<sup>+</sup>1538.55,观察值:1539.93[M+H]<sup>+</sup>。



[0825] 化合物1010:随后是程序B和C,灰白色泡沫固体,产率:(36%)。 $^{31}\text{P}$  NMR (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ -2.82。MS (ES) m/z C<sub>58</sub>H<sub>63</sub>FN<sub>13</sub>O<sub>13</sub>P的计算值:[M]<sup>+</sup>1199.43,观察值:1200.19[M+H]<sup>+</sup>。

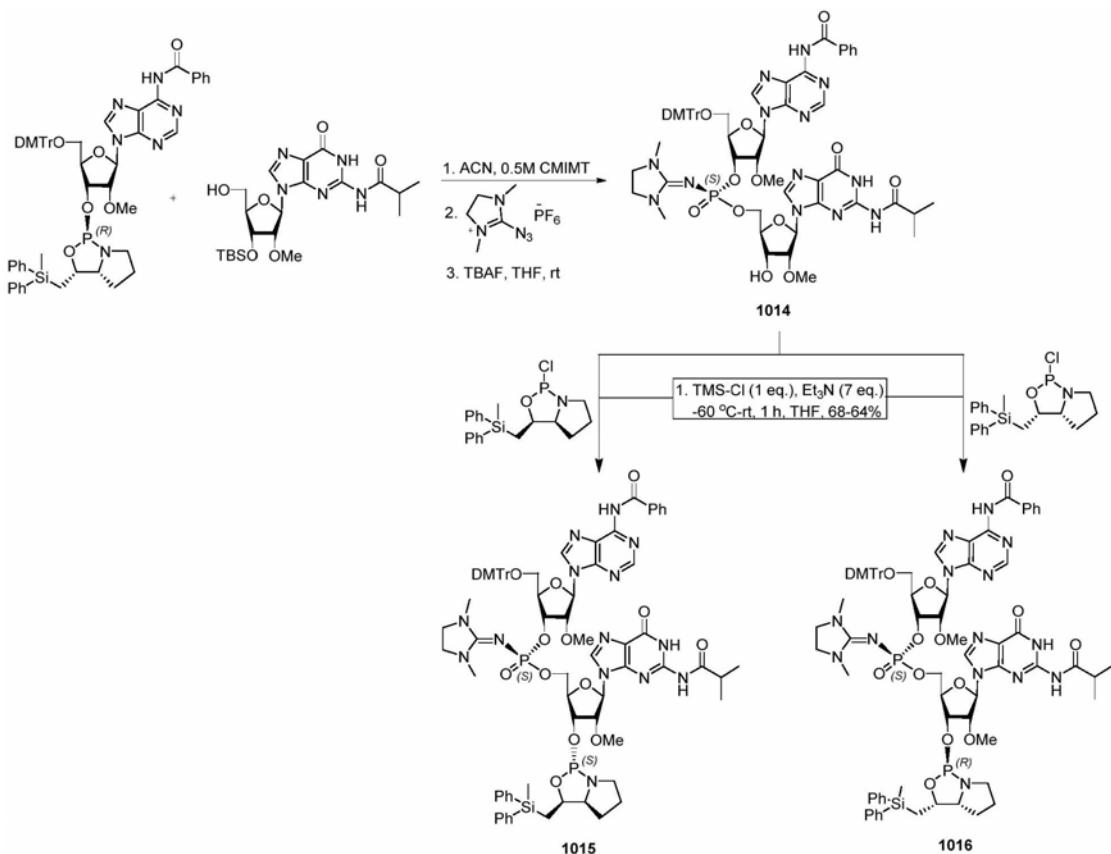
[0826] 化合物1011:使用程序D,灰白色泡沫固体,产率:(63%)。 $^{31}\text{P}$  NMR (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.56, -2.99。MS (ES) m/z C<sub>77</sub>H<sub>85</sub>FN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>Si的计算值:[M]<sup>+</sup>1538.55,观察值:1539.83[M+H]<sup>+</sup>。



[0827] 化合物 1012：随后是程序 B 和 C，灰白色泡沫固体，产率：(36%)。[ $\alpha$ ]

<sup>23</sup>  
 $D = -25.74 (c 1.06, \text{CHCl}_3)$ 。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, 氯仿-d)  $\delta$ -1.83。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  12.14 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.25-7.94 (m, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.72-7.48 (m, 2H), 7.44 (dd,  $J=8.2, 6.7\text{Hz}$ , 2H), 7.35-7.26 (m, 2H), 7.24-7.02 (m, 8H), 6.81-6.56 (m, 4H), 6.04 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 5.67 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 4.83 (dt,  $J=8.6, 4.4\text{Hz}$ , 1H), 4.71-4.54 (m, 2H), 4.49 (dt,  $J=14.2, 4.8\text{Hz}$ , 2H), 4.35 (ddt,  $J=11.0, 5.1, 3.2\text{Hz}$ , 1H), 4.28-4.09 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 3.37 (d,  $J=3.3\text{Hz}$ , 7H), 3.33-3.17 (m, 5H), 2.82 (s, 5H), 2.74-2.60 (m, 1H), 1.92 (s, 2H), 1.72-1.50 (m, 1H), 1.08 (d,  $J=6.9\text{Hz}$ , 3H), 0.94 (d,  $J=6.9\text{Hz}$ , 3H)。MS (ES) m/z C<sub>59</sub>H<sub>66</sub>N<sub>13</sub>O<sub>14</sub>P 的计算值: 1211.45 [M]<sup>+</sup>, 观察值: 1212.42 [M+H]<sup>+</sup>。

[0828] 化合物 1013：使用程序 D，灰白色泡沫固体，产率：(78%)。[ $\alpha$ ]<sup>23</sup>  
 $D = -15.48 (c 0.96, \text{CHCl}_3)$ 。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, 氯仿-d)  $\delta$  159.42, -2.47。MS (ES) m/z C<sub>78</sub>H<sub>88</sub>N<sub>14</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub>Si 的计算值: 1550.57 [M]<sup>+</sup>, 观察值: 1551.96 [M+H]<sup>+</sup>。



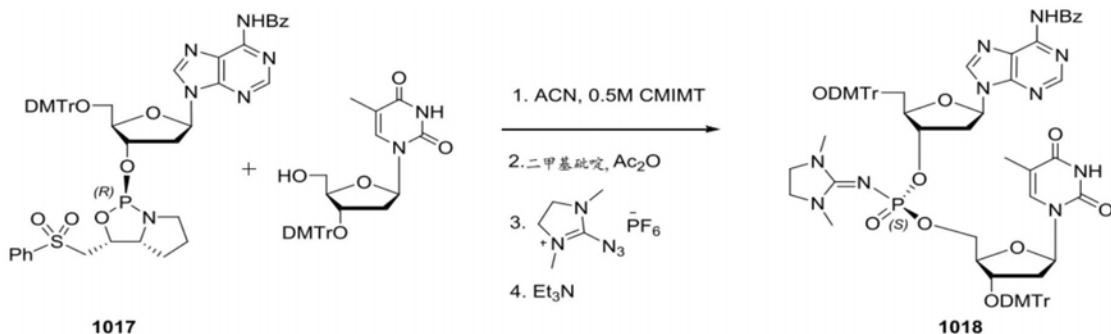
[0829] 化合物1014：随后是程序B和C，灰白色泡沫固体，产率：(30%)。[ $\alpha$ ]

<sup>23</sup>  
 $D = -21.45$  (*c* 0.55, CHCl<sub>3</sub>)。MS (ES) m/z C<sub>59</sub>H<sub>66</sub>N<sub>13</sub>O<sub>14</sub>P的计算值: 1211.45 [M]<sup>+</sup>，观察值: 1212.80 [M+H]<sup>+</sup>。

[0830] 化合物1015：使用程序D，灰白色泡沫固体，产率：(68%)。[ $\alpha$ ]<sup>23</sup><sub>D</sub> = -15.63

(*c* 1.44, CHCl<sub>3</sub>)。MS (ES) m/z C<sub>78</sub>H<sub>88</sub>N<sub>14</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub>Si的计算值: 1550.57 [M]<sup>+</sup>，观察值: 1551.77 [M+H]<sup>+</sup>。

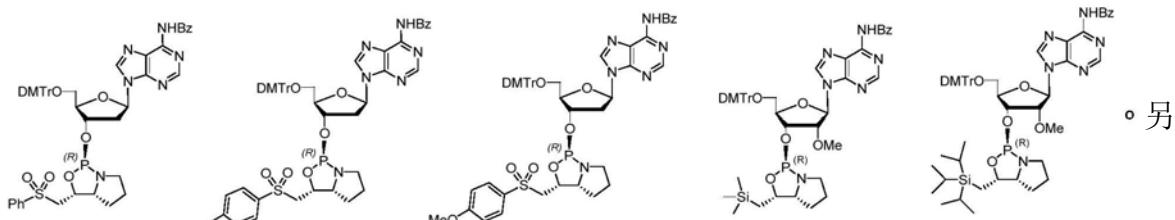
[0831] 化合物1016：使用程序D，灰白色泡沫固体，产率：(64%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.64, -2.67。MS (ES) m/z C<sub>78</sub>H<sub>88</sub>N<sub>14</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub>Si的计算值: 1550.57 [M]<sup>+</sup>，观察值: 1551.77 [M+H]<sup>+</sup>。



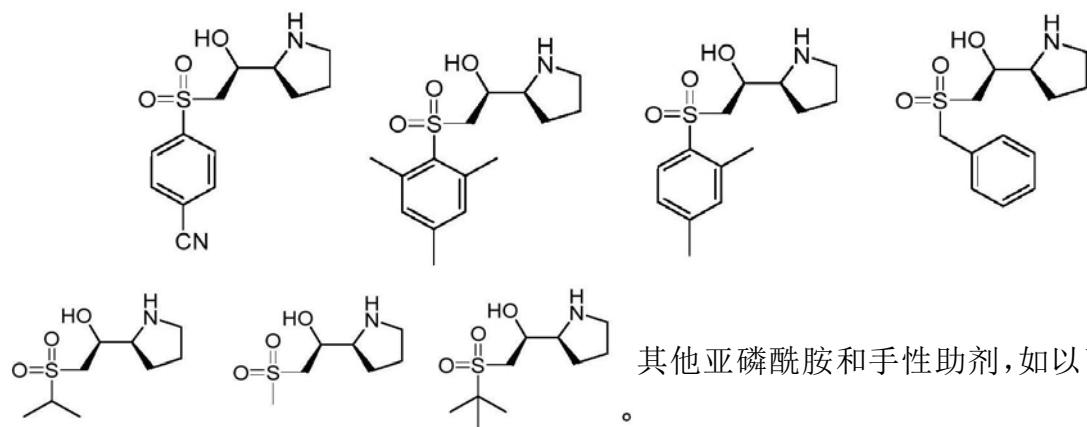
[0832] 使用磺酰基亚酰胺的对于立体纯的二聚体的一般实验程序(E)：在氩气氛在室温下，向立体纯的磺酰基亚酰胺1017 (259mg, 0.275mmol, 1.5当量) 和TBS保护的醇 (100mg, 0.18mmol) 在干乙腈 (2mL) 中的搅拌的溶液中添加2-(1H-咪唑-1-基)乙腈三氟甲磺酸酯 (CMIMT, 0.73mL, 0.36mmol, 0.5M, 2当量)。所得反应混合物搅拌5min，并通过LCMS监测，然后

添加乙酸酐(2M,在ACN中,0.18mL,0.36mmol,2当量)和二甲基础啶(2M,在ACN中,0.18mL,0.36mmol,2当量)的混合物,然后搅拌约5min,然后添加2-叠氮基-1,3-二甲基咪唑啉六氟磷酸盐(104.7mg,0.367mmol,2当量)在乙腈(1mL)中的溶液。一旦反应完全(约5min后,通过LCMS监测),然后添加三乙胺(0.13mL,0.91mmol,5当量)并通过LCMS监测。一旦反应完全,将其在减压下浓缩,然后再溶于二氯甲烷(50mL)中,用水(25mL)、饱和的碳酸氢钠水溶液(25mL)和盐水(25mL)洗涤,用硫酸镁干燥。在减压下将溶剂去除。将粗产物通过硅胶柱(80g),使用DCM(2%三乙胺)和MeOH作为洗脱液进行纯化。收集含有产物的级分并蒸发。获得灰白色固体1018。产率:204mg(82%)。 $^{31}\text{P}$  NMR(162MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ-1.87。MS(ES)m/z C<sub>74</sub>H<sub>75</sub>FN<sub>10</sub>O<sub>14</sub>P的计算值:[M]<sup>+</sup>1359.44,观察值:1360.39[M+H]<sup>+</sup>。

[0833] 可以用于合成的另外的亚磷酰胺包括:



外的有用的手性助剂包括:

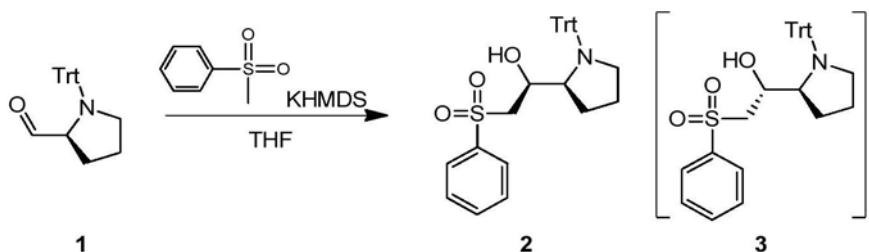


其他亚磷酰胺和手性助剂,如以下中描述的。

那些:US 9695211、US 9605019、US 9598458、US 2013/0178612、US 20150211006、US 20170037399、WO 2017/015555、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/098264、PCT/US18/35687、和/或PCT/US18/38835,其各自的手性助剂和亚磷酰胺通过引用并入。

#### 实例5. 手性受控的寡核苷酸制剂-示例有用的手性助剂的示例技术

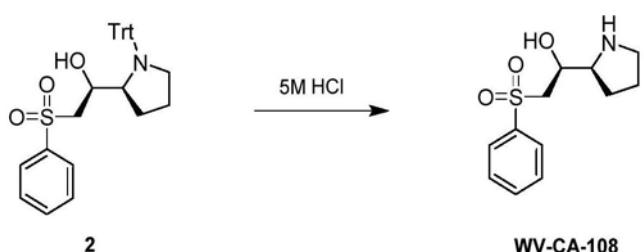
[0834] 除其他事项外,本披露提供了用于制备手性受控的核苷酸间键联的技术(例如,手性助剂、亚磷酰胺、循环、条件、试剂等)。在一些实施例中,提供的技术特别可用于制备包含P-N=(其中P是键联)的某些核苷酸间键联,例如,非负电荷的核苷酸间键联、中性核苷酸间键联等。在一些实施例中,该键联磷是三价的。在本文实例中描述了某些示例技术(手性助剂及其配制品、亚磷酰胺及其配制品、循环、条件、试剂等)。除其他事项外,当与参考手性助剂(例如,式O、P、Q、R或DPSE的手性助剂)相比时,此类手性助剂提供更温和的反应条件、更高的官能团相容性、可替代的脱保护和/或切割条件、更高的粗品和/或纯化的产率、更高的粗品纯度、更高的产物纯度、和/或更高的(或基本上相同的或相当的)立体选择性。



[0835] 两个批次并行:在-70℃,向甲基苯磺酰基(102.93g,658.96mmol,1.5当量)在THF(600mL)的溶液中逐滴添加KHMDS(1M,658.96mL,1.5当量),并缓慢地经30min温热至-30℃。然后将混合物冷却至-70℃。在-70℃,逐滴添加化合物1(150g,439.31mmol,1当量)在THF(400mL)中的溶液。将混合物在-70℃下搅拌3hr。TLC(石油醚:乙酸乙酯=3:1,R<sub>f</sub>=0.1)指示化合物1被完全消耗,并且检测到一个具有较大极性的主要的新斑点。合并2个批次。将反应混合物通过添加饱和NH<sub>4</sub>Cl(水性,1000mL)淬灭,然后用EtOAc(1000mL x 3)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并在减压下浓缩以给出1000mL溶液。然后添加MeOH(600mL),在减压下浓缩以给出1000mL溶液,然后过滤残余物并用MeOH(150mL)洗涤;将残余物用THF(1000mL)和MeOH(600mL)溶解,然后在减压下浓缩以给出1000mL溶液。然后过滤以给出残余物,并用MeOH(150mL)洗涤。并且再重复一遍。获得呈白色固体的化合物2(248g,粗品)。并将合并的母液在减压下浓缩以给出呈黄色油的化合物3(200g,粗品)。

[0836] 化合物2:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ = 7.80 (d, J = 7.5Hz, 2H), 7.74–7.66 (m, 1H), 7.61–7.53 (m, 2H), 7.47 (d, J = 7.5Hz, 6H), 7.24–7.12 (m, 9H), 4.50–4.33 (m, 1H), 3.33 (s, 1H), 3.26 (ddd, J = 2.9, 5.2, 8.2Hz, 1H), 3.23–3.10 (m, 2H), 3.05–2.91 (m, 2H), 1.59–1.48 (m, 1H), 1.38–1.23 (m, 1H), 1.19–1.01 (m, 1H), 0.31–0.12 (m, 1H)。

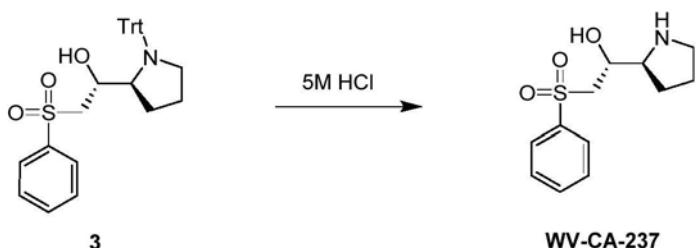
[0837] 化合物WV-CA-108的制备。



[0838] 向化合物2 (248g, 498.35mmol, 1当量) 在THF (1L) 中的溶液中添加HCl (5M, 996.69mL, 10当量)。将混合物在15°C 搅拌1hr。TLC (石油醚:乙酸乙酯=3:1, R<sub>f</sub>=0.03) 指示化合物2被完全消耗，并且检测到一个具有较大极性的主要的新斑点。将所得混合物用MTBE (500mL x 3) 洗涤。将合并的有机层用水 (100mL) 反萃取。将合并水层用5M NaOH水溶液调节至pH 12，并用DCM (500mL x 3) 萃取。将合并的有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤并浓缩以得到白色固体。获得呈白色固体的JW-CA-108 (122.6g, 粗品)。

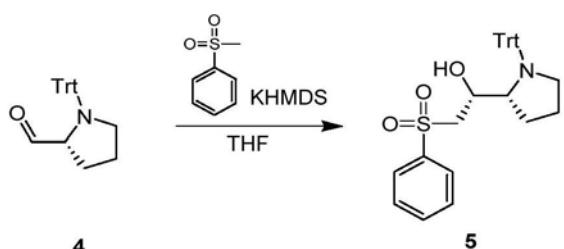
[0839]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  = 7.95 (d,  $J$  = 7.5Hz, 2H), 7.66 (t,  $J$  = 7.5Hz, 1H), 7.57 (t,  $J$  = 7.7Hz, 2H), 4.03 (ddd,  $J$  = 2.6, 5.3, 8.3Hz, 1H), 3.37-3.23 (m, 2H), 3.20-3.14 (m, 1H), 2.91-2.75 (m, 3H), 2.69 (br s, 1H), 1.79-1.54 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz, 氯仿-d)  $\delta$  = 139.58, 133.83, 129.28, 127.98, 67.90, 61.71, 59.99, 46.88, 25.98, 25.84; LCMS [M+H] $^+$ : 256.1. LCMS纯度: 100%。SFC 100% 纯度。

### [0840] 化合物WV-CA-237的制备。



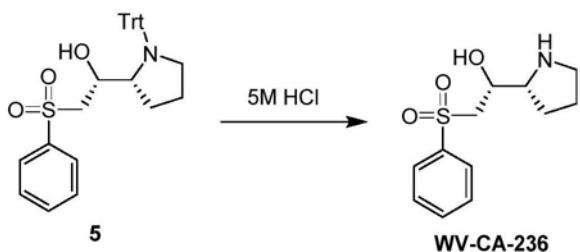
[0841] 向化合物3(400.00g,803.78mmol)在THF(1.5L)中的溶液中添加HCl(5M,1.61L)。将混合物在15℃搅拌2hr。TLC指示化合物3被完全消耗，并且检测到一个具有较大极性的主要的新斑点。将所得混合物用MTBE(500mL x 3)洗涤。将合并水层用5M NaOH水溶液调节至pH 12，并用DCM(500mL x 1)和EtOAc(1000mL x 2)萃取。将合并的有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤，并浓缩以得到棕色固体。获得呈棕色固体的WV-CA-237(100g,粗品)。

[0842] 将残余物通过柱色谱法(SiO<sub>2</sub>,石油醚/乙酸乙酯=3/1至乙酸乙酯:甲醇=1:2)进行纯化以给出24g粗品。然后将4g残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex luna C18 250x50mm x 10μm;流动相:[水(0.05%HCl)-ACN];B%:2%→20%,15min)进行纯化以给出呈白色固体的所希望的化合物(2.68g,产率65%)。获得呈白色固体的WV-CA-237(2.68g)。WV-CA-237:<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=7.98-7.88(m,2H),7.68-7.61(m,1H),7.60-7.51(m,2H),4.04(dt,J=2.4,5.6Hz,1H),3.85(ddd,J=3.1,5.6,8.4Hz,1H),3.37-3.09(m,3H),2.95-2.77(m,3H),1.89-1.53(m,4H),1.53-1.39(m,1H);<sup>13</sup>C NMR(101MHz,氯仿-d)δ=139.89,133.81,133.70,129.26,129.16,128.05,127.96,68.20,61.77,61.61,61.01,60.05,46.67,28.02,26.24,25.93;LCMS [M+H]<sup>+</sup>:256.1.LCMS纯度:80.0%。SFCdr=77.3:22.7。



[0843] 向化合物4(140g,410.02mmol)在THF(1400mL)中的溶液中添加甲基苯磺酰基(96.07g,615.03mmol)，然后在0.5hr添加KHMDS(1M,615.03mL)。将混合物在-70至-40℃搅拌3hr。TLC指示化合物4被消耗并且形成一个新的斑点。在0℃，将反应混合物通过添加饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液3000mL淬灭，然后用EtOAc(3000mL)稀释并用EtOAc(2000mL x 3)萃取。经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤，并在减压下浓缩以给出残余物。向粗品中添加THF(1000mL)和MeOH(1500mL)，在45℃在减压下浓缩直至剩余约1000mL残余物，过滤固体。重复3次数。获得呈黄色固体的化合物5(590g,72.29%产率)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=7.81(d,J=7.5Hz,2H),7.75-7.65(m,1H),7.62-7.53(m,2H),7.48(br d,J=7.2Hz,6H),7.25-7.11(m,9H),4.50-4.37(m,1H),3.31-3.11(m,3H),3.04-2.87(m,2H),1.60-1.48(m,1H),1.39-1.24(m,1H),1.11(dt,J=4.5,8.8,12.8Hz,1H),0.32-0.12(m,1H)。

[0844] 化合物WV-CA-236的制备。



[0845] 向化合物5 (283g, 568.68mmol) 在THF (1100mL) 中的溶液中添加HCl (5M, 1.14L)。将混合物在25℃搅拌2hr。TLC指示化合物5被消耗，并且形成两个新的斑点。将反应混合物用MTBE (1000mL × 3) 洗涤，然后在0℃将水相通过添加NaOH (5M) 进行碱化直至pH=12，然后用DCM (1000mL × 3) 萃取以给出残余物，经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤，并在减压下浓缩以给出残余物。获得呈黄色固体的化合物WV-CA-236 (280g, 1.10mol, 96.42%产率)。

[0846] 在0℃，将粗产物添加至HCl/EtOAc (1400mL, 4M)，2hr后，过滤白色固体并用MeOH (1000mL × 3) 洗涤固体。LCMS显示固体含有另一个峰 (MS = 297)。然后向白色固体添加H<sub>2</sub>O (600mL) 并用DCM (300mL × 3) 洗涤。向水相添加NaOH (5M) 直至pH=12。然后用DCM (800mL) 稀释，并用DCM (800mL × 4) 萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤，并在减压下浓缩以给出产物。获得呈黄色固体的化合物WV-CA-236 (280g)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ = 8.01–7.89 (m, 2H), 7.69–7.62 (m, 1H), 7.61–7.51 (m, 2H), 4.05 (ddd, J = 2.8, 5.2, 8.4Hz, 1H), 3.38–3.22 (m, 2H), 3.21–3.08 (m, 1H), 2.95–2.72 (m, 4H), 1.85–1.51 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101MHz, 氯仿-d) δ = 139.75, 133.76, 129.25, 127.94, 67.57, 61.90, 60.16, 46.86, 25.86。LCMS [M+H]<sup>+</sup>: 256. LCMS纯度: 95.94. SFC纯度: 99.86%。

#### 实例6. 手性受控的寡核苷酸制剂-示例有用的亚磷酰胺的示例技术

[0847] 除其他事项外，本披露提供了用于寡核苷酸合成的亚磷酰胺。在一些实施例中，提供的亚磷酰胺特别可用于制备手性受控的核苷酸间键联。在一些实施例中，提供的亚磷酰胺特别可用于制备包含P=N=的手性受控的核苷酸间键联，例如，非负电荷的核苷酸间键联或中性核苷酸间键联等。在一些实施例中，该键联磷是三价的。在一些实施例中，该键联磷是五价的。

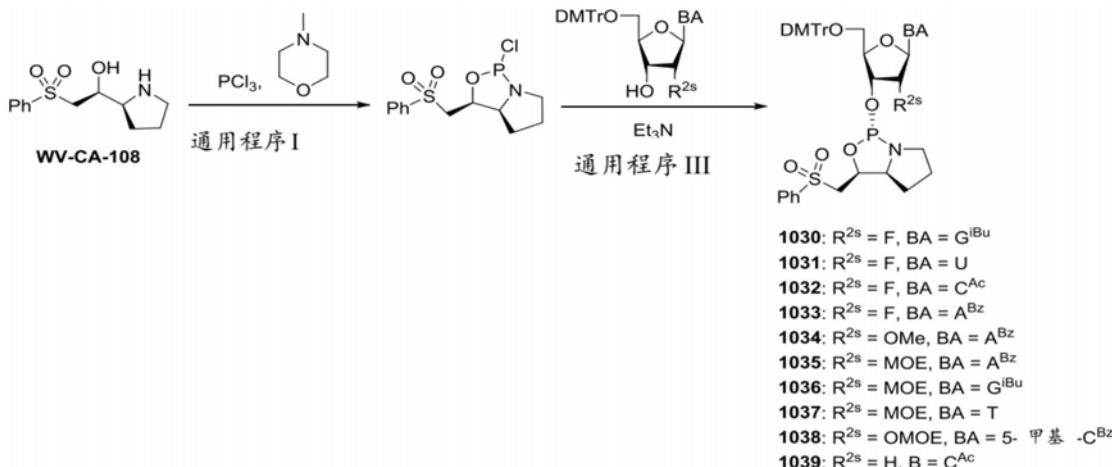
[0848] 氯衍生物的通用程序I: 在一些实施例中，在示例程序中，在35℃在旋转蒸发器中通过将手性助剂 (174.54mmol) 与无水甲苯 (80mL × 3) 共沸蒸发进行干燥，并在真空下干燥过夜。在氩下通过套管 (起始温度:-10.0℃，最大温度0℃, 28min添加)，将溶于无水THF (200mL) 中的此干燥的手性助剂 (174.54mmol) 和4-甲基吗啉 (366.54mmol) 的溶液添加至放置在三颈圆底烧瓶中的在无水THF (150mL) 中的三氯膦经冰冷却的(异丙醇-干冰浴) 溶液 (37.07g, 16.0mL, 183.27mmol) 中，并将反应混合物在15℃下温热1hr。之后，在氩下使用无气过滤管 (Chemglass: 过滤管, 24/40 Inner Joints, 80mm OD Medium Frit, Airfree, 舒伦克公司 (Schlenk))，将沉淀的白色固体通过真空过滤。在氩下在低温 (25℃)，用旋转蒸发器去除溶剂，并将获得的粗半固体在真空下干燥过夜 (约15h)，并直接用于下个步骤。

[0849] 氯衍生物的通用程序I: 在一些实施例中，在示例程序中，在35℃在旋转蒸发器中通过将手性助剂 (174.54mmol) 与无水甲苯 (80mL × 3) 共沸蒸发进行干燥，并在真空下干燥过夜。在氩下通过套管 (起始温度:-10.0℃，最大温度0℃, 28min添加)，将溶于无水THF (200mL) 中的此干燥的手性助剂 (174.54mmol) 和4-甲基吗啉 (366.54mmol) 的溶液添加至放

置在三颈圆底烧瓶中的在无水THF (150mL) 中的三氯膦经冰冷却的(异丙醇-干冰浴)溶液(37.07g, 16.0mL, 183.27mmol)中, 并将反应混合物在15℃下温热1hr。之后, 在氩下使用无气过滤管(Chemglass: 过滤管, 24/40 Inner Joints, 80mm OD Medium Frit, Airfree, 舒伦克公司(Schlenk)) , 将沉淀的白色固体通过真空过滤。在氩下在低温(25℃), 用旋转蒸发器去除溶剂, 并将获得的粗半固体在真空下干燥过夜(约15h), 并直接用于下个步骤。

[0850] 偶联的一般程序III: 在一些实施例中, 在示例程序中, 在35℃, 将核昔(9.11mmol)通过与60mL无水甲苯(60mL × 2)共蒸发进行干燥, 并在真空下过夜干燥。将干燥的核昔于干THF (78mL) 中, 随后添加三乙胺(63.80mmol)然后在氩下冷却至-5℃(对于2' F-dG/2' OMe-dG情况, 使用0.95当量的TMS-C1)。通过套管经3min添加粗品(从一般程序I(或)II制得, 14.57mmol)的THF溶液, 然后逐渐温至室温。在室温1hr后, TLC指示SM转化为产物(总反应时间1h), 然后在0℃将反应混合物用H<sub>2</sub>O (4.55mmol)淬灭, 并且添加无水MgSO<sub>4</sub>(9.11mmol)并搅拌10min。然后将反应混合物使用无气过滤管在氩下进行过滤, THF用洗涤, 并在26℃在旋转蒸发仪下干燥以得到白色粗品固体产物, 将其在高真空下过夜干燥。将粗产物通过ISCO-Combiflash系统(用乙腈预平衡的rediSep高性能硅胶柱), 使用乙酸乙酯/己烷, 用1%TEA作为溶剂(化合物在100%EtOAc/己烷/1%Et<sub>3</sub>N中洗脱)(对于2' F-dG情况, 使用乙腈/乙酸乙酯与1%TEA)进行纯化。将合并在一起柱积分蒸发后, 将残余物在高真空下干燥以得到呈白色固体的产物。

[0851] 亚酰胺(1030-1039)的制备。



[0852] 1030的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(73%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ153.32。(ES) m/z C<sub>47</sub>H<sub>50</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:940.98 [M]<sup>+</sup>, 观察值:941.78 [M+H]<sup>+</sup>。

[0853] 1031的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(78%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ153.62。(ES) m/z C<sub>42</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:831.85 [M]<sup>+</sup>, 观察值:870.58 [M+K]<sup>+</sup>。

[0854] 1032的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(68%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ153.95。(ES) m/z C<sub>44</sub>H<sub>46</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:872.26 [M]<sup>+</sup>, 观察值:873.62 [M+H]<sup>+</sup>。

[0855] 1033的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。白色泡沫固体。产率:(87%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ151.70。(ES) m/z C<sub>50</sub>H<sub>48</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>9</sub>PS的计算值:958.29 [M]<sup>+</sup>, 观察值:959.79,

960.83 [M+H]<sup>+</sup>。

[0856] 1034的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(65%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ154.80。(ES) m/z C<sub>51</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:971.31 [M]<sup>+</sup>, 观察值:971.81 [M+H]<sup>+</sup>。

[0857] 1035的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(76%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ156.50。(ES) m/z C<sub>53</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>PS的计算值:1014.33 [M]<sup>+</sup>, 观察值:1015.81 [M+H]<sup>+</sup>。

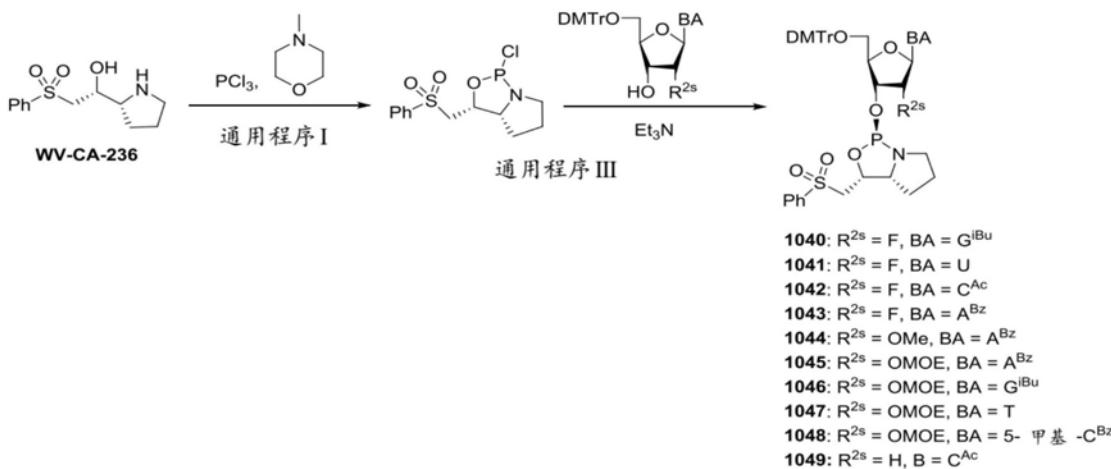
[0858] 1036的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(78%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ156.40。(ES) m/z C<sub>50</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>PS的计算值:996.34 [M]<sup>+</sup>, 观察值:997.90 [M+H]<sup>+</sup>。

[0859] 1037的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(73%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ154.87。(ES) m/z C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>PS的计算值:901.30 [M]<sup>+</sup>, 观察值:940.83 [M+K]<sup>+</sup>。

[0860] 1038的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(75%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ154.94。(ES) m/z C<sub>53</sub>H<sub>57</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>PS的计算值:1004.34 [M]<sup>+</sup>, 观察值:1005.86 [M+H]<sup>+</sup>。

[0861] 1039的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(80%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ153.52。(ES) m/z C<sub>44</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:854.28 [M]<sup>+</sup>, 观察值:855.41 [M+H]<sup>+</sup>。

[0862] 亚酰胺(1040–1049)的制备。



[0863] 1040的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(78%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ157.80。(ES) m/z C<sub>47</sub>H<sub>50</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:940.98 [M]<sup>+</sup>, 观察值:941.68 [M+H]<sup>+</sup>。

[0864] 1041的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(78%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ157.79。(ES) m/z C<sub>42</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:831.85 [M]<sup>+</sup>, 观察值:870.68 [M+K]<sup>+</sup>。

[0865] 1042的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(78%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ158.07。(ES) m/z C<sub>44</sub>H<sub>46</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:872.26 [M]<sup>+</sup>, 观察值:873.62 [M+H]<sup>+</sup>。

[0866] 1043的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。白色泡沫固体。产率:(86%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ156.48。(ES) m/z C<sub>50</sub>H<sub>48</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>9</sub>PS的计算值:958.29 [M]<sup>+</sup>, 观察值:959.79, 960.83 [M+H]<sup>+</sup>。

[0867] 1044的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(65%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ154.80。(ES) m/z C<sub>51</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:971.31 [M]<sup>+</sup>, 观察值:971.81 [M+H]<sup>+</sup>。

[0868] 1045的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(77%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ154.74。(ES) m/z C<sub>53</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>PS的计算值:1014.33 [M]<sup>+</sup>, 观察值:1015.81 [M+H]<sup>+</sup>。

[0869] 1046的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(76%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ155.05。(ES) m/z C<sub>50</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>PS的计算值:996.34 [M]<sup>+</sup>, 观察值:997.90 [M+H]<sup>+</sup>。

[0870] 1047的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(75%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ155.44。(ES) m/z C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>PS的计算值:901.30 [M]<sup>+</sup>, 观察值:940.83 [M+K]<sup>+</sup>。

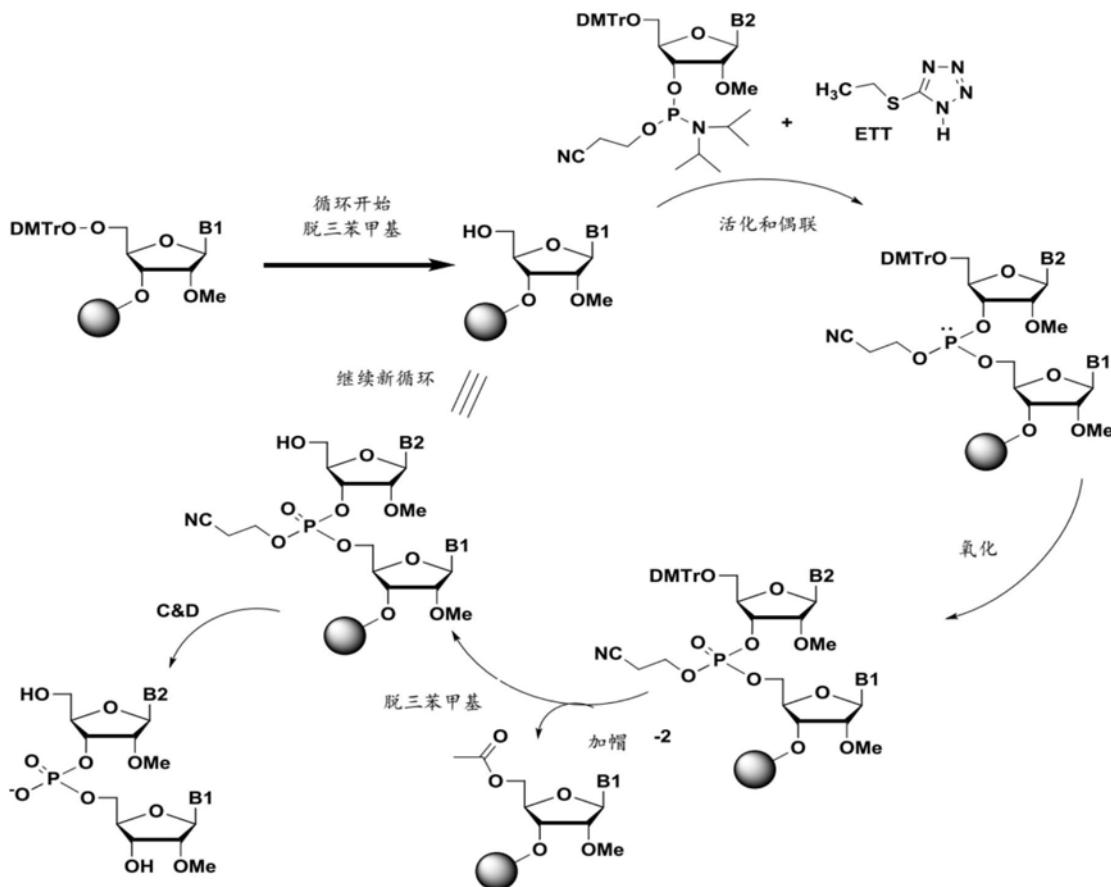
[0871] 1048的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(73%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ155.96。(ES) m/z C<sub>53</sub>H<sub>57</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>PS的计算值:1004.34 [M]<sup>+</sup>, 观察值:1005.86 [M+H]<sup>+</sup>。

[0872] 1049的制备:一般程序I遵循一般程序III使用。灰白色泡沫固体。产率:(80%)。<sup>31</sup>P NMR (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ156.37。(ES) m/z C<sub>44</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>PS的计算值:854.28 [M]<sup>+</sup>, 观察值:855.31 [M+H]<sup>+</sup>。

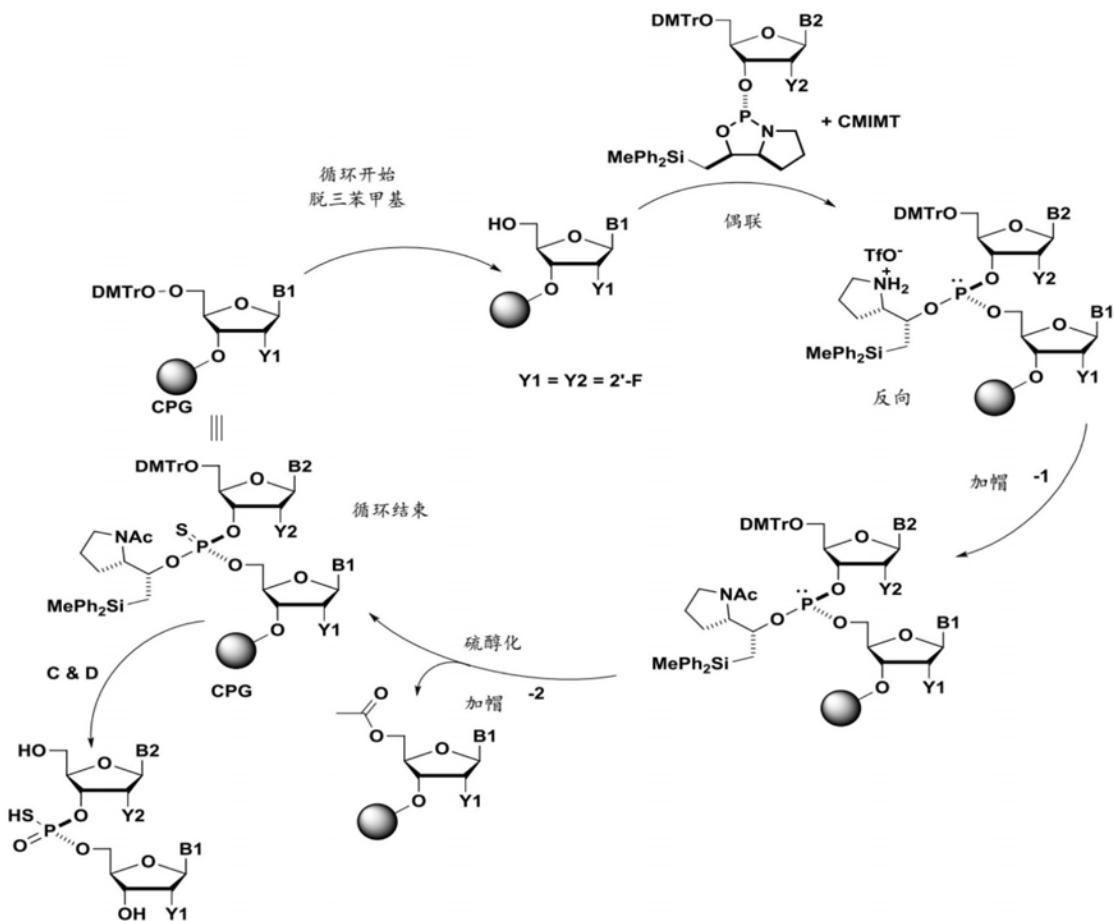
实例7. 用于手性受控的寡核苷酸制剂的示例技术-用于寡核苷酸合成的示例循环、条件、和试剂

[0873] 在一些实施例中,本披露提供了特别可用于制备手性受控的核苷酸间键联的技术(例如,试剂、溶剂、条件、循环参数、切割方法、脱保护方法、纯化方法等)。在一些实施例中,此类核苷酸间键联(例如,非负电荷的核苷酸间键联或中性核苷酸间键联等)包含P-N=,其中P是键联磷。在一些实施例中,该键联磷是三价的。在一些实施例中,该键联磷是五价的。如本文所证明的,本披露的技术可以提供温和的反应条件、高官能团相容性、可替代的脱保护和/或切割条件、高粗品和/或纯化的产率、高粗品纯度、高产物纯度、和/或高立体选择性。

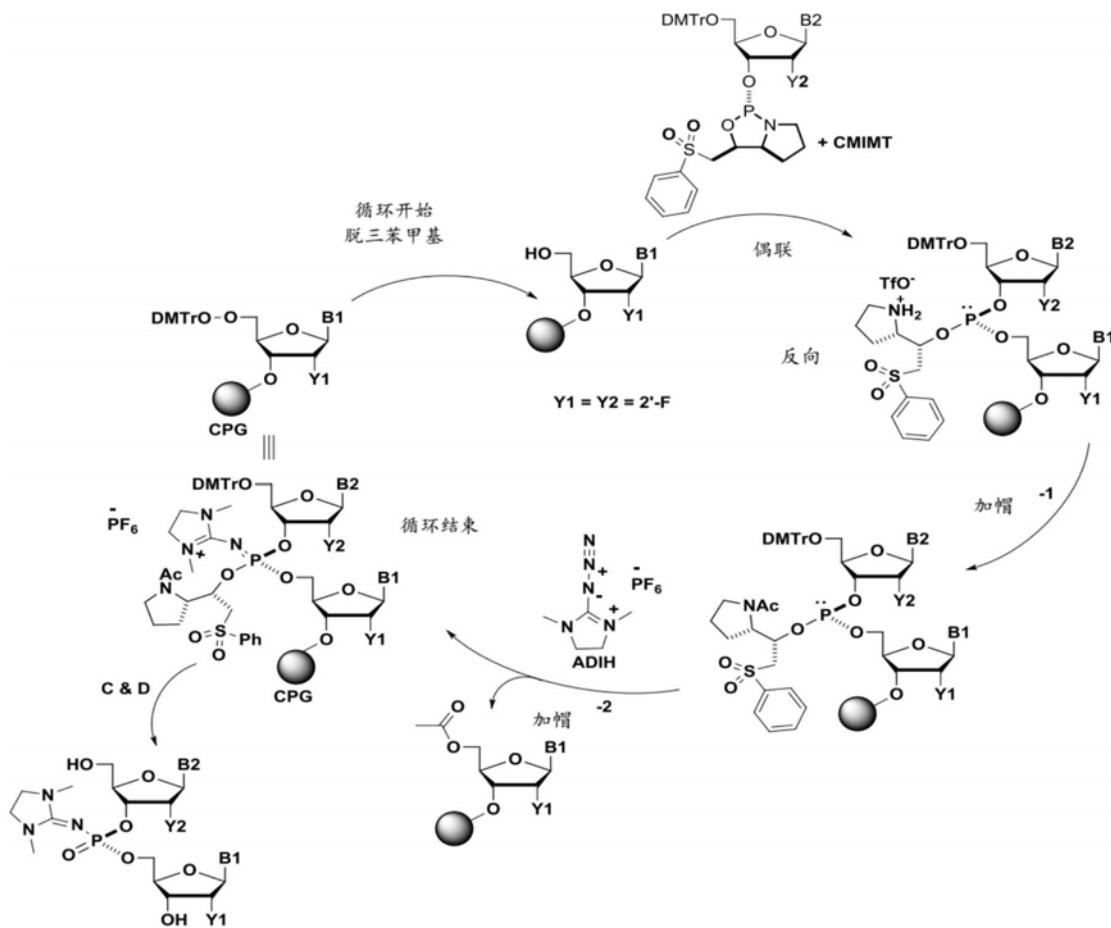
[0874] 在一些实施例中,用于制备天然磷酸酯键联的循环包含以下或由其组成:脱保护(例如,脱三苯甲基化)、偶联、氧化(例如,使用I<sub>2</sub>/Pyr/水或本领域可用的其他合适的方法)和加帽(例如,本文所述的加帽2或本领域可用的其他合适的方法)。下面描述了一个示例循环,其中B1和B2独立地是核碱基。如本领域技术人员所理解的,各种修饰例(例如,糖修饰、碱基修饰等)是相容的并且可以包括在内。



[0875] 在一些实施例中,用于制备非天然磷酸酯键联(例如,硫代磷酸酯核苷酸间键联)的循环包含以下或由其组成:脱保护(例如,脱三苯甲基化)、偶联、第一加帽(例如,如本文所述的加帽-1)、修饰(例如,使用XH的硫醇化或本领域可用的其他合适的方法)、和第二加帽(例如,如本文所述的加帽-2、或本领域可用的其他合适的方法)。下面描述了一个示例循环,其中B1和B2独立地是核碱基。如本领域技术人员所理解的,各种修饰例(例如,糖修饰、碱基修饰等)是相容的并且可以包括在内。在一些实施例中,使用DPSE手性助剂的循环称为DPSE循环或DPSE亚酰胺循环。



[0876] 在一些实施例中，用于制备非天然磷酸酯键联(例如，某些非负电荷的核苷酸间键联、中性核苷酸间键联等)或其盐形式的循环包含以下或由其组成：脱保护(例如，脱三苯甲基化)、偶联、第一加帽(例如，如本文所述的加帽-1)、修饰(例如，使用ADIH或本领域可用的其他合适的方法)、和第二加帽(例如，如本文所述的加帽-2、或本领域可用的其他合适的方法)。下面描述了一个示例循环，其中B1和B2独立地是核碱基。如本领域技术人员所理解的，各种修饰例(例如，糖修饰、碱基修饰等)是相容的并且可以包括在内。在一些实施例中，使用PSM手性助剂的循环称为PSM循环或PSM亚酰胺循环。



[0877] 可以依照本披露利用各种切割和脱保护方法。在一些实施例中，如本领域技术人员所理解的，可以鉴于以下调节切割和脱保护的参数(例如，碱、溶剂、温度、当量、时间等)：例如，待制备的DMD寡核苷酸的结构(例如，核碱基、糖、核苷酸间键联、及其修饰/保护)、固体支持物、反应规模等。在一些实施例中，切割和脱保护包含一个、或者两个或更多个个体步骤。例如，在一些实施例中，利用两步骤切割和脱保护。在一些实施例中，切割和脱保护步骤包含在合适的溶剂(例如，DMSO/H<sub>2</sub>O)中，以合适的量(例如，约100或更多(例如，100±5)mL/mmol)含氟的试剂(例如，TEA-HF，任选地用另外的碱如TEA缓冲)，以及在合适的温度(例如，约0-100、0-80、0-50、0-40、0-30、0、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100℃(例如，在一个实例中，27±2℃))进行合适的时间段(例如，约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50或更多小时(例如，在一个实例中，6±0.5h))。在一些实施例中，切割和脱保护步骤包含在合适的溶剂(例如，水)(例如，浓NH<sub>4</sub>OH)，在合适的量(例如，约200或更多(例如，200±5)mL/mmol)的适合的碱基(例如，NR<sub>3</sub>)，并且在合适的温度(例如，约0-100、0-80、0-50、0-40、0-30、0、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100℃(例如，在一个实例中，37±2℃))进行合适的时间段(例如，约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50或更多小时(例如，在一个实例中，24±1h))。在一些实施例中，切割和脱保护包含两个步骤或由两个步骤组成，其中一个步骤(例如，步骤1)是1x TEA-HF，以DMSO/H<sub>2</sub>O、100±5mL/mmol、27±2℃和6±0.5h，并且另一个步骤(例如，步骤2)是浓NH<sub>4</sub>OH、200±5mL/mmol、37±2℃和24±1h。本文描述了切割和脱保护过程的某些实例。

[0878] 如本领域技术人员所理解的,DMD寡核苷酸合成通常在固体支持物上进行。许多类型的固体支持物是可商购的和/或能以其他方式制备/获得,并且可以依照本披露利用。在一些实施例中,固体载体是CPG。在一些实施例中,固体支持物是NittoPhase HL。可以基于所希望的应用选择固体载体的类型和尺寸,并且在一些情况下,对于特定用途,一种类型的固体载体可以比另一种更好地进行。在一些实施例中,观察到对于某些配制品,与某些聚合物固体支持物(如NittoPhase HL)相比,CPG可以提供更高的粗品产率和/或纯度。

[0879] 亚胺酸盐通常以合适的浓度溶于溶剂中。在一些实施例中,亚酰胺溶于ACN中。在一些实施例中,亚酰胺溶于两个或更多个溶剂的混合物中。在一些实施例中,亚酰胺溶于ACN和IBN(例如,20% ACN/80% IBN)的混合物。可以利用各种浓度的亚酰胺,并且可以鉴于具体的条件(例如,固体支持物、待制备的DMD寡核苷酸、反应时间、规模等)进行调节。在一些实施例中,利用约0.01-0.5、0.05-0.5、0.1-0.5、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45或0.5M的浓度。在一些实施例中,利用约0.2M的浓度。在很多实施例中,亚酰胺溶液是干燥的。在一些实施例中,利用3 Å分子筛以干燥亚酰胺溶液(或保持亚酰胺溶液干燥)。在一些实施例中,利用在约15-20% v/v的分子筛。

[0880] 各种当量的亚酰胺可用于DMD寡核苷酸合成中。如本领域技术人员将理解的,可以鉴于具体的条件(例如,固体支持物、待制备的DMD寡核苷酸、反应时间、规模等)调节亚酰胺的当量,并且在合成期间可以利用相同的或不同的等价物。在一些实施例中,亚酰胺的当量是约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5或更多。在一些实施例中,合适的当量是约2。在一些实施例中,合适的当量是约2.5。在一些实施例中,合适的当量是约3。在一些实施例中,合适的当量是约3.5。在一些实施例中,合适的当量是约4。

[0881] 许多活化剂是本领域可用的,并且可以依照本披露利用。在一些实施例中,活化剂是ETT。在一些实施例中,活化剂是CMIMT。在一些实施例中,将CMIMT用于手性受控的合成。如本领域技术人员所理解的,相同的或不同的活化剂可以用于不同的亚酰胺,并且能以不同的量利用。在一些实施例中,以约40-100%,例如,40%、50%、60%、70%、80%或90%递送利用活化剂。在一些实施例中,递送是约60%(例如,对于ETT)。在一些实施例中,递送是约70%(例如,对于CMIMT)。在一些实施例中,活化剂/亚酰胺的摩尔比率是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。在一些实施例中,摩尔比率是约3-6。在一些实施例中,摩尔比率是约1。在一些实施例中,摩尔比率是约2。在一些实施例中,摩尔比率是约3。在一些实施例中,摩尔比率是约4。在一些实施例中,摩尔比率是约5。在一些实施例中,摩尔比率是约6。在一些实施例中,摩尔比率是约7。在一些实施例中,摩尔比率是约8。在一些实施例中,摩尔比率是约9。在一些实施例中,摩尔比率是约10。在一些实施例中,摩尔比率是约2-5、2-4或3-4(例如,对于ETT)。在一些实施例中,摩尔比率是约3.7(例如,对于ETT)。在一些实施例中,摩尔比率是约3-8、4-8、4-7、4-6、5-7、5-8或5-6(例如,对于CMIMT)。在一些实施例中,摩尔比率是约5.8(例如,对于CMIMT)。

[0882] 如本领域技术人员所理解的,可以将各种合适的流速和反应时间用于DMD寡核苷酸合成,并且可以根据待制备的DMD寡核苷酸、规模、合成设置等进行调节。在一些实施例中,用于合成的再循环流速为约200cm/h。在一些实施例中,再循环时间是约1-10分钟。在一些实施例中,再循环时间是约8分钟。在一些实施例中,再循环时间是约10分钟。

[0883] 许多技术可用于修饰P(III)键联,例如,在偶联后。例如,可以使用各种方法将P

(III) 键联转化为P(V)P(=O)-型键联,例如,经由氧化。在一些实施例中,利用I<sub>2</sub>/Pyr/H<sub>2</sub>O。相似地,许多方法可用于将P(III)键联转化为P(V)P(=S)-型键联,例如,经由硫化。在一些实施例中,如本文所示,XH用作硫醇化试剂。用于将P(III)键联转化为P(V)P(=N)-型键联的技术也是广泛可用的,并且可以依照本披露使用。在一些实施例中,如本文所示,采用ADIH。本文描述了合适的反应参数。在一些实施例中,将ADIH在约0.01-0.5、0.05-0.5、0.1-0.5、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45或0.5M的浓度下使用。在一些实施例中,ADIH的浓度是约0.25M。在一些实施例中,ADIH的浓度是约0.3M。在一些实施例中,将ADIH以约1-50、1-40、1-30、1-25、1-20、1-10,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45或50或更多当量使用。在一些实施例中,ADIH的当量是约7.5。在一些实施例中,ADIH的当量是约10。在一些实施例中,ADIH的当量是约15。在一些实施例中,ADIH的当量是约20。在一些实施例中,ADIH的当量是约23。在一些实施例中,ADIH的当量是约25。在一些实施例中,ADIH的当量是约30。在一些实施例中,ADIH的当量是约35。在一些实施例中,一个实验,以15.2当量、以及15min接触时间利用ADIH。在一些实施例中,取决于亚酰胺,可以调节试剂的浓度、当量、接触时间,例如,可以调节ADIH。

[0884] 本披露的技术适合于各种规模的制备。在一些实施例中,以数百umol或更多进行合成。在一些实施例中,规模是约200umol。在一些实施例中,规模是约300umol。在一些实施例中,规模是约400umol。在一些实施例中,规模是约500umol。在一些实施例中,规模是约550umol。在一些实施例中,规模是约600umol。在一些实施例中,规模是约650umol。在一些实施例中,规模是约700umol。在一些实施例中,规模是约750umol。在一些实施例中,规模是约800umol。在一些实施例中,规模是约850umol。在一些实施例中,规模是约900umol。在一些实施例中,规模是约950umol。在一些实施例中,规模是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25、或更多mmol。在一些实施例中,规模是约1mmol或更多。在一些实施例中,规模是约2mmol或更多。在一些实施例中,规模是约5mmol或更多。在一些实施例中,规模是约10mmol或更多。在一些实施例中,规模是约15mmol或更多。在一些实施例中,规模是约20mmol或更多。在一些实施例中,规模是约25mmol或更多。

[0885] 在一些实施例中,观察到的产率为85-900D/umol(例如,对于10.2mmol合成为85,0000D/mmol,具有58.4%粗品纯度(%FLP))。

[0886] 除其他事项外,当用于制备包含手性受控的核苷酸间键联的DMD寡核苷酸(例如,包含P-N=(其中P是键联磷)的那些)时,本披露的技术可以提供各种优势。例如,如本文所证明的,本披露的技术可以提供高粗品纯度和产率(例如,在很多实施例中,对于20-mer DMD寡核苷酸,约55%-60%全长产物),具有最少量的较短DMD寡核苷酸(例如,来自不完全偶联、分解等)。除其他事项外,此类高粗品产率和/或纯度可以显著减少下游纯化并且可以显著降低生产成本和商品成本,并且在一些实施例中,极大地促进或使得大规模商业生产、临床试验和/或商业化销售成为可能。

[0887] 用于制备手性受控的DMD寡核苷酸组合物-WV-13864的示例程序。

[0888] 以下描述了使用可控孔径玻璃(CPG)低堆积密度固体支持物(例如,2'-fC(乙酰基),经由CNA接头CPG(600Å LBD))的用于制备WV-13864的示例程序。有用的亚磷酰胺包括5'-ODMTr-2'-F-dA(N6-Bz)-(L)-DPSE亚磷酰胺、5'-ODMTr-2'-F-dC(N4-Ac)-(L)-DPSE亚磷

酰胺、5'-ODMTr-2'-F-dG (N2-iBu) - (L) -DPSE 亚磷酰胺、5'-ODMTr-2'-F-dU- (L) -DPSE 亚磷酰胺、5'-ODMTr-2'-OMe-G (N<sup>2</sup>-iBu) - (L) -DPSE 亚磷酰胺、5'-ODMTr-2'-F-dC (N4-Ac) - (L) -PSM 亚磷酰胺、5'-ODMTr-2'-F-dG (N2-iBu) - (L) -PSM 亚磷酰胺、5' -DMT-2' -OMe-A (Bz) -β-氰基乙基亚磷酰胺、和5' -DMT-2' -OMe-C (Ac) -β-氰基乙基亚磷酰胺。

[0889] 使用0.1M Xanthane氢化物溶液(XH)进行硫醇化。利用0.3M的在乙腈中的2-叠氮基-1,3-二甲基-咪唑啉六氟磷酸盐(ADIH)形成中性PN键联。氧化溶液是在吡啶/水中的0.04-0.06M碘,90/10,v/v。帽A是在乙腈中的N-甲基咪唑,20/80,v/v。帽B是乙酸酐/2,6-二甲基砒啶/乙腈,20/30/50,v/v/v。使用甲苯中的3%二氯乙酸进行去封闭。使用的NH<sub>4</sub>OH是28%-30%浓度的氢氧化铵。

[0890] 脱三苯甲基。

[0891] 为了开始合成,使5' -ODMTr-2' -F-dC (N4-Ac) -CPG固体支持物经受酸催化通过用甲苯中的3% (DCA) 处理从5' -羟基去除DMTr保护基团。DMTr去除步骤通常用强烈的红色或橙色可视化,并且可以通过UV手表命令在436nm的波长下监测。

[0892] 可以在合成循环开始时重复去除DMTr。在每种情况下,在脱三苯甲基化后,用乙腈洗涤支持物结合的材料,为下一步合成做准备。

[0893] 偶联。

[0894] 将亚酰胺以0.2M的浓度溶于乙腈(ACN)或溶于20%异丁腈(IBN)/80%ACN中,无需密度校正。在使用前,将溶液经分子筛(3Å)干燥不小于4h(15%-20%,v/v)。

亚酰胺	溶剂	浓度	MS3Å
5'-ODMTr-2'-OMe-A(N6-Bz)-CE	ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-OMe-C(N4-Ac)-CE	ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dA(N6-Bz)-(L)-DPSE	ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dC(N4-Ac)-(L)-DPSE	ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dU-(L)-DPSE	20% IBN/80% ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dG(N2-iBu)-(L)-DPSE	ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-OMe-G(N2-iBu)-(L)-DPSE	20% IBN/80% ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dC(N4-Ac)-(L)-PSM	ACN	0.2 M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dG(N2-iBu)-(L)-PSM	ACN	0.2 M	15-20%, v/v

[0895] 利用双活化剂(CMIMT和ETT)偶联方法。将两个活化剂均以0.5M的浓度溶于ACN中。将CMIMT已用于手性受控的偶联,其中CMIMT与亚酰胺摩尔比率为5.833/1。将ETT用于标准亚酰胺(对于,天然磷酸酯键联)的偶联,其中ETT与亚酰胺摩尔比率为3.752/1。对于所有DPSE和PSM亚酰胺的再循环时间为10min,除了mG-L-DPSE的为8min。将所有标准亚酰胺偶联8min。

[0896] 加帽-1(Cap-1、Capping-1、第一加帽(first capping))。

[0897] 使用了帽B( $\text{Ac}_2\text{O}/2,6\text{-二甲基砒啶}/\text{MeCN}(2:3:5, \text{v/v/v})$ )。在一些实施例中,加帽-1将仲胺基团加帽到,例如,手性助剂上。在一些实施例中,仲胺的不完全保护可能导致副反应,导致偶联失败的偶联或形成一种或多种副产物。在一些实施例中,加帽-1可能不是酯化的有效条件(例如,对于加帽未反应的5'-OH,是效率不及加帽-2(第二加帽)的条件)。

[0898] DPSE循环的硫醇化。

[0899] 在加帽-1之后,用硫化试剂修饰亚磷酸酯中间体P(III)。在一个示例制备中,1.2CV(6-7当量)的硫化试剂(0.1M XH/吡啶-ACN,1:1,v/v)经由流过模式经6min的接触时间通过合成柱递送以形成P(V)。

[0900] PSM循环的叠氮化物反应。

[0901] 在加帽-1后,使用在ACN中的合适的试剂(例如,包含-N<sub>3</sub>,如ADIH)以形成中性核苷酸间键联(PN键联)。在示例准备中,在各自的循环中,利用对于fG-L-PSM,10.3当量的0.25M ADIH经10min接触时间,并且对于fC-L-PSM,25.8当量的0.3M ADIH经15min接触时间。

[0902] 标准核苷酸循环的氧化。

[0903] 加帽-1步骤对于标准亚酰胺循环不是必须的。在将标准亚酰胺偶联到固体支持物上之后,用0.05M的碘/水/吡啶溶液氧化亚磷酸盐中间体(P(III))以形成P(V)。在示例制备中,3.5当量的氧化溶液递通过流通模式经2min接触时间送至柱用于有效氧化。

[0904] 加帽-2(Cap-2、Capping-2、第二加帽(second capping))。

[0905] 对于每个循环的固相DMD寡核苷酸合成的偶联效率为大约97%-100%,并且通过例如,DMTr阳离子的释放进行监测。将残余的未偶联5'-羟基基团(根据detrit监测,通常为1%-3%)在固体支持物上)用帽A(在乙腈中的20%N-甲基咪唑(NMI/ACN=20/80,v/v))和帽B(20%:30%:50% =  $\text{Ac}_2\text{O}:2,6\text{-二甲基砒啶}:\text{ACN}$ (v/v/v))试剂(例如,1:1)封闭。通过流通模式经0.8min接触时间将两种试剂(例如,0.4CV)递送至柱,以预防形成失败的序列。在此步骤中也可以保护未加帽的胺基团。

[0906] 如本文所示,在一些实施例中,DPSE亚酰胺或DPSE循环是脱三苯甲基化->偶联->加帽-1(Cap-1或Capping-1,第一加帽)->硫醇化->加帽-2(加帽-1,后加帽,第二加帽);在一些实施例中,PSM亚酰胺或PSM循环是脱三苯甲基化->偶联->加帽-1(Cap-1或Capping-1,第一加帽)->叠氮化物反应->加帽-2(加帽-1,后加帽,第二加帽);在一些实施例中,标准亚酰胺或标准循环(传统的,非手性受控的)是脱三苯甲基化->偶联->氧化->加帽-2(加帽-1,后加帽,第二加帽)。

[0907] 选择合成循环并重复直至达到所希望的长度。

[0908] 胺洗涤。

[0909] 在一些实施例中,提供的技术对于制备包含核苷酸间键联(包含P-N=,其中P是键联磷)的DMD寡核苷酸是特别地有效的。在一些实施例中,提供的技术包含将DMD寡核苷酸中间体与碱接触。在一些实施例中,在达到所希望的DMD寡核苷酸长度后进行接触。在一些实施例中,这种接触提供了包含核苷酸间键联的DMD寡核苷酸,这些核苷酸间键联包含P-N=,其中P是键联磷。在一些实施例中,接触去除了手性助剂(例如,具有通过碳原子与分子的剩余部分连接的G<sup>2</sup>的那些,并且碳原子与至少一个吸电子基团(例如,WV-CA-231、WV-CA-236、WV-CA-240等)连接)。在一些实施例中,利用碱或碱溶液进行接触,该碱或碱溶液基本上不含OH<sup>-</sup>或水(无水)。在一些实施例中,碱是胺(例如,N(R)<sub>3</sub>)。在一些实施例中,碱是N,N-二乙

胺(DEA)。在一些实施例中，碱溶液是20%DEA/ACN。在一些实施例中，这种与碱的接触降低了副产物水平，这些副产物在包含P-N=的核苷酸间键联的一个或多个位置处具有天然磷酸酯键联。

[0910] 在示例制备中，在完成DMD寡核苷酸核苷酸合成循环后，通过经15min接触时间在乙腈中的5个柱体积的20%DEA进行柱上胺洗涤。

[0911] 在一些实施例中，与碱接触也可以去除2-氨基乙基基团，用于构建标准天然磷酸酯键联。在一些实施例中，与碱接触提供天然磷酸酯键联(例如，以盐形式，其中阳离子是胺碱的对应的铵盐)。

[0912] 切割和脱保护。

[0913] 在与碱接触后，将DMD寡核苷酸暴露于进一步的切割和脱保护。在示例性制备中，助剂去除(例如，DPSE)、切割和去保护是两步过程。在步骤1中，在27°C±2°C，用1x TEA-HF溶液(DMSO:水:TEA.3HF:TEA=43:8.6:2.8:1=v/v/v/v, 100±5uL/umol)处理具有DMD寡核苷酸的CPG固体支持物持续6±0.5h。然后在37°C±2°C，将大批的浆料用浓氢氧化铵(28%-30%，200±10mL/mmol)处理24±1h(步骤2)以释放DMD寡核苷酸形成固体支持物。通过过滤收集粗产物。将滤液与固体支持物的洗涤液(例如，水)合并。在一些实施例中，观察到产率为约80-900D/umole。

[0914] 除其他事项外，提供的技术提供的高粗品纯度和/或产率。在许多制剂(各种规模、试剂浓度、反应时间等)中，获得约55%-60%的粗品纯度(%FLP)，其具有最少量的较短DMD寡核苷酸(例如，来自不完全偶联、分解、副反应)等。在很多实施例中，最显著的较短DMD寡核苷酸的量不超过约2%-10%，通常不超过2%-4%(例如，在一些实施例中，低至约2%(最显著的较短DMD寡核苷酸是N-3))。

[0915] 各种技术可用于DMD寡核苷酸纯化，并且可以依照本披露使用。在一些实施例中，使用例如，AEX纯化、和/或UF/DF将粗产物进一步纯化(例如，超过90%纯度)。

[0916] 使用本文所述的技术，在各种规模(从umol至mmol)制备包含不同的碱基序列、修饰(例如，核碱基、糖、和核苷酸间键联修饰)和/或其模式、键联磷立体化学和/或其模式等各种DMD寡核苷酸。此类DMD寡核苷酸具有各种靶并且可以通过各种机制起作用。某些此类DMD寡核苷酸呈现于本披露的表中。

[0917] 如本领域技术人员所理解的，本文描述的实例仅用于说明。本领域技术人员将理解，可以根据例如仪器、规模、试剂、反应物、所希望的结果等来调整各种条件、参数等。使用依照本披露的各种技术可以进一步改进某些结果。除其他事项外，提供的DMD寡核苷酸及其组合物可以提供显著改善的特性和/或外显子51或53的跳读，例如，在各种测定和体内模型中，并且可以特别用于预防和/或治疗各种病症、障碍、或疾病。在本文实例中提供了某些数据。

#### 实例8. 用于裸式给药的患者成肌细胞的“预分化”时间线

[0918] 可以依照本披露利用各种技术，例如描述在以下的那些：US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 2015/0211006、US 2017/0037399、WO 2017/015555、WO 2017/192664、WO 2017/015575、WO 2017/062862、WO 2017/160741、WO 2017/192679、和WO 2017/210647等以评估本披露的技术的特性和/或活性。在一些实施例中，与合适的参考技术(例如，基于DMD寡核苷酸的立体随机组合物的技术，其具有相同的碱基序列但在生理

pH下没有中性和/或阳离子核苷酸间键联)相比,本披露的技术(例如,DMD寡核苷酸和组合物及其使用方法)证明出乎意料优异结果。以下描述的是可用于评估本披露中所述的DMD寡核苷酸的特性和/或活性的示例技术。本领域技术人员理解,可以改变/修改下面说明的条件,并且另外和/或可替代地,可以根依照本披露利用其他合适的试剂、温度、条件、时间段、量等。

[0919] 除非另有说明,否则在各种实验中,实验中使用的细胞和动物用于对于那些细胞或动物典型的条件。除非另有说明,否则在体外实验中,各种细胞在标准条件下生长(例如,用于特定细胞类型、细胞系或相似细胞类型或细胞系的最常见条件),例如,使用普通生长培养基、常温(37C),以及典型的马萨诸塞州剑桥(Cambridge, MA)的重力和大气压力。将动物保持在标准实验室条件下,通常在室温或几度较冷,具有正常的饲养条件、笼子大小等。除非另有说明,否则细胞和动物都不会经受极端温度(例如,冷休克或热休克)、压力、重力、环境声音、食物、或营养物质剥夺等。

[0920] 维持患者来源的成肌细胞系:

[0921] 将DMD  $\Delta$  52和DMD  $\Delta$  45-52成肌细胞维持在补充有5%FBS、1X青霉素-链霉素、和1X L-谷氨酰胺的完全骨骼肌生长培养基(PromoCell公司,海德堡,德国)中。用Matrigel:DMEM溶液(1:100)涂覆烧瓶或平板持续合适的一段时间,例如30min,之后通过抽吸去除Matrigel:DMEM溶液,然后将细胞接种到完全骨骼肌生长培养基(Skeletal Muscle Growth Medium)中。

[0922] 标准给药程序(预分化0天)

[0923] 在第1天:用Matrigel:DMEM溶液涂覆合适的细胞生长容器,例如6孔板或24孔板。在例如37°C/5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育合适的一段时间(例如,30min)。抽吸并将适量的细胞接种到细胞生长容器中,例如150K细胞/孔(总共1500μl的完全生长培养基,6孔板中)和30K细胞/孔(500μl的生长培养基,24孔板中)。在合适的条件下孵育合适的时间,例如37°C、5% CO<sub>2</sub>过夜。

[0924] 在第2天:制备合适的分化培养基,例如DMEM+5%马血清+10μg/ml胰岛素。在分化培养基中制备合适的DMD寡核苷酸稀释液,例如30uM、10uM、3.33uM、1.11uM、0.37uM的系列稀释液。从贴壁细胞中抽吸生长培养基,并将DMD寡核苷酸:分化培养基溶液添加至细胞。直至收获细胞,寡核苷酸保留在细胞上(没有培养基改变)。

[0925] 在第6天:获得RNA。在典型的程序中,例如用冷PBS洗涤适量的细胞(例如来自24孔板的孔的细胞),然后添加适量的用于RNA提取和样品储存/RNA提取的试剂,例如,在24孔板中的500μl/孔TRIZOL并在-80°C的冷冻板或继续RNA提取以获得RNA。

[0926] 在第8天:获得蛋白质。在典型的程序中,将适量的细胞(例如6孔板孔中的细胞)例如用冷PBS洗涤。然后添加适量的合适的切割缓冲液-例如,在典型的程序中,200μl/孔的RIPA补充有用于6孔板的蛋白酶抑制剂。切割后,可以储存样品,例如在-80°C冷冻,或继续进行蛋白质提取。

[0927] 可以采用其他合适的程序,例如,以下描述的那些程序。如本领域技术人员所理解的,可以修改许多参数(如试剂、温度、条件、时间段、量等)。

[0928] 4天预分化给药程序

[0929] 在第1天:用Matrigel:DMEM溶液涂覆6孔板或24孔板。在37°C、5%CO<sub>2</sub>孵育30min。

抽吸,接种150K细胞/孔(总共1500 $\mu$ l的完全生长培养基,6孔板中)和30K细胞/孔(500 $\mu$ l的生长培养基,24孔板中)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育过夜。

[0930] 在第2天:如下制备分化培养基:DMEM+5%马血清+10 $\mu$ g/ml胰岛素。抽吸生长培养基并用分化培养基取代。

[0931] 在第6天:细胞分化4天。在分化培养基中制备DMD寡核苷酸稀释液,例如30uM、10uM、3.33uM、1.11uM、0.37uM的系列稀释液。从贴壁细胞中抽吸分化培养基,并将DMD寡核苷酸:分化培养基溶液添加至细胞。直至收获细胞,寡核苷酸保留在细胞上(没有培养基改变)。

[0932] 在第10天:用冷PBS洗涤24孔板中的细胞,在24孔板中添加500 $\mu$ l/孔TRIZOL并在-80℃冷冻板或继续RNA提取。

[0933] 在第12天:用冷PBS洗涤6孔板中的细胞。添加200 $\mu$ l/孔的RIPA,补充有蛋白酶抑制剂。在-80℃冷冻板或继续进行蛋白质提取。

[0934] 7天预分化给药程序

[0935] 在第1天:用Matrigel:DMEM溶液涂覆6孔板或24孔板。在37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育30min。抽吸,接种150K细胞/孔(总共1500 $\mu$ l的完全生长培养基,6孔板中)和30K细胞/孔(500 $\mu$ l的生长培养基,24孔板中)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育过夜。

[0936] 在第2天:如下制备分化培养基:DMEM+5%马血清+10 $\mu$ g/ml胰岛素。抽吸生长培养基并用分化培养基取代。

[0937] 在第9天:细胞分化7天。在分化培养基中制备DMD寡核苷酸稀释液,例如30uM、10uM、3.33uM、1.11uM、0.37uM的系列稀释液。从贴壁细胞中抽吸分化培养基,并将DMD寡核苷酸:分化培养基溶液添加至细胞。直至收获细胞,寡核苷酸保留在细胞上(没有培养基改变)。

[0938] 在第13天:用冷PBS洗涤24孔板中的细胞,在24孔板中添加500 $\mu$ l/孔TRIZOL并在-80℃冷冻板或继续RNA提取。

[0939] 在第15天:用冷PBS洗涤6孔板中的细胞。添加200 $\mu$ l/孔的RIPA,补充有蛋白酶抑制剂。在-80℃冷冻板或继续进行蛋白质提取。

[0940] 10天预分化给药程序

[0941] 在第1天:用Matrigel:DMEM溶液涂覆6孔板或24孔板。在37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育30min。抽吸,接种150K细胞/孔(总共1500 $\mu$ l的完全生长培养基,6孔板中)和30K细胞/孔(500 $\mu$ l的生长培养基,24孔板中)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育过夜。

[0942] 在第2天:如下制备分化培养基:DMEM+5%马血清+10 $\mu$ g/ml胰岛素。抽吸生长培养基并用分化培养基取代。

[0943] 在第12天:细胞分化10天。在分化培养基中制备DMD寡核苷酸稀释液,例如30uM、10uM、3.33uM、1.11uM、0.37uM的系列稀释液。从贴壁细胞中抽吸分化培养基,并将DMD寡核苷酸:分化培养基溶液添加至细胞。直至收获细胞,寡核苷酸保留在细胞上(没有培养基改变)。

[0944] 在第16天:用冷PBS洗涤24孔板中的细胞,在24孔板中添加500 $\mu$ l/孔TRIZOL并在-80℃冷冻板或继续RNA提取。

[0945] 在第18天:用冷PBS洗涤6孔板中的细胞。添加200 $\mu$ l/孔的RIPA,补充有蛋白酶抑制

剂。在-80°C冷冻板或继续进行蛋白质提取。

等效物

[0946] 已经描述了本披露的一些说明性实施例，对于本领域技术人员来说显而易见的是，前述仅仅是说明性的而非限制性的，仅作为示例呈现。许多修改和其他说明性实施例在本领域普通技术人员的范围内，并且预期落入本披露的范围内。特别地，尽管本文呈现的许多示例涉及方法行为或系统元素的特定组合，但应理解，那些行为和那些元素能以其他方式组合以实现相同的目标。仅结合一个实施例讨论的行为、元素和特征不旨在从其他实施例中的相似角色中排除。此外，对于在以下权利要求中列举的一个或多个手段加功能限制（如果有的话），这些手段不旨在限于本文披露的用于执行所列举功能的手段，而是旨在覆盖用于执行该列举的功能的任何手段（现在已知或以后开发的）。

[0947] 在权利要求书中使用诸如“第一”、“第二”、“第三”等序数术语来修改权利要求元素，这本身并不表示一个权利要求元素相对于另一权利要求元素的任何优先、居先或次序，或执行方法的行为的时间顺序，而是仅用作标记，以区分具有相同名称的一个权利要求元素与具有相同名称的另一元素（但用于序数词）以区分权利要求元素。类似地，使用a)、b) 等或i)、ii) 等本身并不意味权利要求中的步骤的任何优先、居先或次序。类似地，在说明书中使用这些术语本身并不意味任何需要的优先、居先或次序。

[0948] 前述书面说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。本披露限于所提供的示例的范围。实施例旨在说明本发明的一个或多个方面，并且其他功能上等同的实施例也在本发明的范围内。除了本文示出和描述的那些之外，各种修改将通过前述描述对于本领域技术人员变得清楚并且处于所附权利要求的范围内。本发明的每个实施例不一定涵盖本发明的优点和目的。