(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113278617 A
(43)申请公布日 2021.08.20

(21)申请号 202110675033.6
(22)申请日 2015.01.16
(30)优先权数据
61/928,405 2014.01.16 US
62/063,359 2014.10.13 US
(62)分案原申请数据
201580011393.9 2015.01.16
(71)申请人 波涛生命科学有限公司
地址 新加坡新加坡城
(72)发明人 米纳 大卫·巴特勒 岩本直树
内纳德·斯夫尔齐卡帕
格雷戈里·L·韦尔迪
伊万·兹洛泰夫
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 韩晓帆
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)

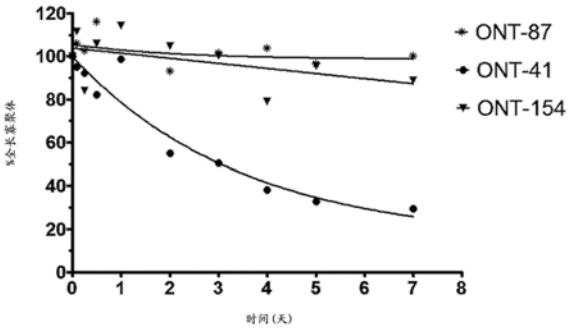
权利要求书2页 说明书245页 附图52页

(54)发明名称

手性设计

(57)摘要

本发明涉及手性设计。本发明涉及具有所选设计的手性控制的寡核苷酸、手性控制的寡核苷酸组合物及其制备和使用方法。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物对核酸聚合物提供了与参照寡核苷酸组合物不同的切割样式。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物在核酸聚合物的互补序列中提供了单一位点切割。



CN 113278617 A

1.一种手性控制的寡核苷酸组合物,其包含通过具有以下来定义的寡核苷酸:

1)共同碱基序列和长度;

2)共同骨架键联样式;和

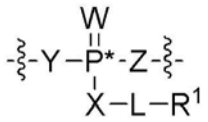
3)共同骨架手性中心样式,

所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物,其中所述组合物中至少约10%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式;其中:

所述共同碱基序列具有至少17个碱基;或

所述单一寡核苷酸包含11个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。

2.权利要求1所述的组合物,其中每个手性的经修饰磷酸酯键联独立地具有式I的结构:



(I)

其中:

P*是不对称磷原子,并且是Rp或Sp;

W是O、S或Se;

X、Y和Z各自独立地是-O-、-S-、-N(-L-R^1)-或L;

L是共价键或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基,其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地且独立地被以下替换:任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-;

R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{50}脂族,其中一个或更多个亚甲基单元任选地且独立地被以下替换:任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-;

R′各自独立地是-R、-C(O)R、-CO_2R或-SO_2R,或:

同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳环,或

同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的芳环、碳环、杂环或杂芳环;

-Cy-是选自亚苯基、亚碳环基、亚芳基、亚杂芳基或亚杂环基的任选地经取代的二价环;

R各自独立地是氢或选自C_1-C_6脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团;并且

-§-各自独立地表示与核苷的连接。

3.权利要求2所述的组合物,其中每个手性的经修饰磷酸酯键联是硫代磷酸酯键联。

4.权利要求2所述的组合物，其中X是-S-并且-L-R^1不是氢。

5.权利要求1至4中任一项所述的组合物，其中所述共同骨架手性中心样式从5’至3’包含(Rp)n(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8，并且n是1、2、3、4、5、6、7或8。

6.权利要求1至4中任一项所述的组合物，其中所述共同骨架手性中心样式从5’至3’包含Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

7.权利要求1至4中任一项所述的组合物，其中所述共同骨架手性中心样式从5’至3’包含$Rp(Sp)_2$。

8.权利要求1至4中任一项所述的组合物，其中所述骨架手性中心样式从5’至3’包含(Np)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，m是2、3、4、5、6、7或8，并且Np各自独立地是Rp或Sp。

9.权利要求8所述的组合物，其中n是1。

10.权利要求9所述的组合物，其中t是2、3、4、5、6、7或8。

手性设计

[0001] 本申请是申请号为201580011393.9的中国专利申请的分案申请，原申请是2015年1月16日提交的PCT国际申请PCT/IB2015/000395于2016年8月30日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年1月16日提交的美国临时申请序列号61/928,405和2014年10月13日提交的美国临时申请序列号62/063,359的优先权，其各自整体通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及具有所选设计的手性控制的寡核苷酸、手性控制的寡核苷酸组合物及其制备和使用方法。

背景技术

[0005] 寡核苷酸可用于治疗、诊断、研究和纳米材料应用。天然核酸(例如，未经修饰DNA或RNA)在用于治疗时可例如由于其对细胞外和细胞内核酸酶的不稳定性和/或其差的细胞渗透性和分布而受到限制。另外，体外研究表明，反义寡核苷酸的性质例如结合亲和性、与互补RNA的序列特异性结合(Cosstick和Eckstein，1985；LaPlanche等，1986；Latimer等，1989；Hacia等，1994；Mesmaeker等，1995)以及对核酸酶的稳定性可受磷原子绝对立体化学构型的影响(Cook等，US005599797A)。因此，需要新的改进的寡核苷酸和寡核苷酸组合物，例如新的反义和siRNA寡核苷酸和寡核苷酸组合物。

发明内容

[0006] 本发明尤其涵盖以下认识：立构无规(stereorandom)寡核苷酸制备物包含多个不同的化学实体，所述化学实体彼此的差异在于寡核苷酸链内的各骨架手性中心的立体化学结构。另外，本发明涵盖以下见解：立构无规寡核苷酸制备物通常不可能包含相关核苷酸的每种可能的立体异构体。因此，本发明尤其提供作为目标寡核苷酸的特定立体异构体的新化学实体。也就是说，本发明提供了单一核苷酸化合物的基本上纯的制备物，其中特定寡核苷酸化合物可以通过其碱基序列、其长度、其骨架键联样式及其骨架手性中心样式定义。

[0007] 本发明尤其证明，特定寡核苷酸的各立体异构体可能表现出彼此不同的稳定性和/或活性。另外，本公开内容证明，通过寡核苷酸内特定手性结构的引入和/或定位实现的稳定性改善可比得上或甚至优于通过使用某些经修饰骨架键联、碱基和/或糖(例如，通过使用某些类型的经修饰磷酸酯、2'-修饰、碱基修饰等)实现的那些。

[0008] 本发明尤其认识到，寡核苷酸的特性和活性可以通过优化其骨架手性中心样式来调节。在一些实施方案中，本发明提供了寡核苷酸的组合物，其中所述寡核苷酸具有共同骨架手性中心样式，其出人意料地极大提高了所述寡核苷酸的稳定性和/或生物活性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了提高的稳定性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了出人意料地提高的活性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了提高的稳

定性和活性。在一些实施方案中，当寡核苷酸用于切割核酸聚合物时，寡核苷酸的骨架手性中心样式本身出人意料地改变了靶核酸聚合物的切割样式。在一些实施方案中，骨架手性中心样式有效地阻止了第二位点的切割。在一些实施方案中，骨架手性中心样式产生了新切割位点。在一些实施方案中，骨架手性中心样式使切割位点数目最小化。在一些实施方案中，骨架手性中心样式使切割位点数目最小化，使得在靶核酸聚合物与寡核苷酸互补的序列内的仅一个位点切割靶核苷酸聚合物。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了切割位点的切割效率。在一些实施方案中，寡核苷酸的骨架手性中心样式改善了靶核酸聚合物的切割。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了选择性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式使脱靶效应(off-target effect)最小化。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了选择性，例如，差异仅在于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)的两个靶序列之间的切割选择性。

[0009] 本申请中引用的所有出版物和专利文件通过引用整体并入本文。

[0010] 定义

[0011] 脂族：本文中使用的术语“脂族”或“脂族基团”意指直链(即，非支链)或支链的、经取代或未经取代的、完全饱和或含有一个或更多个不饱和单元的烃链，或者完全饱和或含有一个或更多个不饱和单元但非芳族的、与分子其余部分具有单一连接点的单环烃或者双环或多环烃(在本文中也称为“碳环”、“脂环”或“环烷基”)。在一些实施方案中，脂族基团含有1-50个脂族碳原子。除非另外规定，否则脂族基团含有1-10个脂族碳原子。在一些实施方案中，脂族基团含有1-6个脂族碳原子。在一些实施方案中，脂族基团含有1-5个脂族碳原子。在另一些实施方案中，脂族基团含有1-4个脂族碳原子。在另一些实施方案中，脂族基团含有1-3个脂族碳原子，并且在另一些实施方案中，脂族基团含有1-2个脂族碳原子。在一些实施方案中，“环脂族”(或“碳环”或“环烷基”)是指完全饱和或含有一个或更多个不饱和单元但非芳族的、与分子的其余部分具有单一连接点的单环或双环C_3-C_{10}烃。在一些实施方案中，“环脂族”(或“碳环”或“环烷基”)是指完全饱和或含有一个或更多个不饱和单元但非芳族的、与分子的其余部分具有单一连接点的单环C_3-C_6烃。合适的脂族基团包括但不限于直链或支链的、经取代或未经取代的烷基、烯基、炔基及其混杂物(hybrid)，例如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。

[0012] 亚烷基：术语“亚烷基”是指二价烷基。“亚烷基链”是聚亚甲基，即-$(CH_2)_n$-，其中n是正整数，优选1至6、1至4、1至3、1至2或2至3。经取代亚烷基链是其中一个或更多个亚甲基氢原子被取代基替换的聚亚甲基。合适的取代基包括以下对于经取代脂族基团所述的那些。

[0013] 亚烯基：术语“亚烯基”是指二价烯基。经取代亚烯基链是其中一个或更多个氢原子被取代基替换的含有至少一个双键的聚亚甲基。合适的取代基包括以下对于经取代脂族基团所述的那些。

[0014] 动物：本文中使用的术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中，“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中，“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中，非人动物是哺乳动物(例如，啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中，动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类和/或蠕虫。在一些实施方案中，动物可以是转基因动物、基因工程

动物(genetically-engineered animal)和/或克隆。

[0015] 大约:除非另有说明或另外根据上下文明显的,否则关于数值的本文中使用的术语“大约”或“约”通常视为包括在任一方向(大于或小于)落入所述数值的5%、10%、15%或20%的范围内的数值(除非这样的数值将小于可能值的0%或超过可能值的100%)。在一些实施方案中,关于剂量使用术语“约”是指±5mg/kg/天。

[0016] 芳基:单独使用或如在“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳基氧基烷基”中作为较大部分的一部分使用的术语“芳基”是指具有总计5至14个环成员的单环和双环体系,其中体系中的至少一个环是芳族,并且其中体系中的每个环含有3至7个环成员。术语“芳基”可与术语“芳基环”互换使用。在本发明的某些实施方案中,“芳基”是指可携带一个或更多个取代基的芳族环体系,其包括但不限于苯基、联苯基、萘基、蒽基等。在本文中所用的术语“芳基”的范围内也包括其中芳族环与一个或更多个非芳族环稠合的基团,如茚满基、邻苯二甲酰亚胺基、萘酰亚胺基、菲啶基或四氢萘基等。

[0017] 特征部分:本文中使用的蛋白质或多肽的短语“特征部分”是含有共同作为蛋白质或多肽的特征的一段连续氨基酸或多段连续氨基酸的集合的部分。每个所述连续段通常将含有至少两个氨基酸。此外,本领域普通技术人员将了解蛋白质的特征通常需要至少5、10、15、20个或更多个氨基酸。一般来说,特征部分是除以上指定的序列特性(sequence identity)之外,也与相关完整蛋白质共有至少一种功能特征的部分。

[0018] 特征序列:“特征序列”是存在于多肽或核酸家族的所有成员中的序列,并且因此可被本领域普通技术人员用于确定所述家族的成员。

[0019] 特征结构元件:术语“特征结构元件”是指存在于多肽、小分子或核酸家族的所有成员中的独特结构元件(例如,核心结构、侧基部分(pendant moiety)的集合、序列元件等),并且因此可被本领域普通技术人员用于确定所述家族的成员。

[0020] 相当的:术语“相当的”在本文中用于描述彼此足够类似以允许比较所获得的结果或所观察到的现象的两组(或更多组)条件或情况。在一些实施方案中,相当的组的条件或情况的特征为多种基本上相同特征和一种或少数不同特征。本领域普通技术人员将理解,条件组在具有以下特征时是彼此相当的:足够数目和类型的基本上相同特征以保证得出以下合理结论:在不同组的条件或情况下获得的结果或观察到的现象的差异是由那些不同特征的变化引起或指示那些不同特征的变化。

[0021] 给药方案:本文中使用的“给药方案”或“治疗方案”是指通常相隔多段时间来各自地向对象施用的一组单位剂量(通常超过一个)。在一些实施方案中,给定治疗剂具有可涉及一个或更多个剂量的推荐给药方案。在一些实施方案中,给药方案包括各自彼此相隔相同时长的一段时间的多个剂量;在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量和分隔各自剂量的至少两个不同时间段。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量都具有相同单位给药量。在一些实施方案中,给药方案内的不同剂量具有不同量。在一些实施方案中,给药方案包括第一给药量的第一剂量,之后是一个或更多个不同于所述第一给药量的第二给药量的额外剂量。在一些实施方案中,给药方案包括第一给药量的第一剂量,之后是一个或更多个与所述第一给药量相同的第二给药量的额外剂量。

[0022] 等效剂:本领域普通技术人员在阅读本公开内容时将了解在本发明的背景下,可用药剂的范围不限于本文中明确提及或例示的那些。特别地,本领域技术人员将认识到活

性剂通常具有由核心和连接的侧基部分组成的结构，并且还将了解所述核心和/或侧基部分的简单变化形式可不显著改变药剂的活性。例如，在一些实施方案中，用具有相当的三维结构和/或化学反应性特征的基团取代一个或更多个侧基部分可产生与母体参照化合物或部分等效的经取代化合物或部分。在一些实施方案中，添加或移除一个或更多个侧基部分可产生与母体参照化合物等效的经取代化合物。在一些实施方案中，例如通过添加或移除少数键(通常不超过5、4、3、2或1个键，并且常常仅单个键)来改变核心结构可产生与母体参照化合物等效的经取代化合物。在许多实施方案中，可使用可易于获得的原料、试剂和常规或提供的合成操作，通过如例如以下所述的一般反应方案中例示的方法，或通过其修改形式来制备等效化合物。在这些反应中，也有可能利用自身已知，但未在此未提及的变体。

[0023] 等效剂量：术语“等效剂量”在本文中用于比较实现相同生物学结果的不同药学活性剂的剂量。如果两种不同药剂的剂量达到相当的生物学结果水平或程度，那么根据本发明，所述剂量被视为彼此“等效”。在一些实施方案中，使用如本文中所述的体外和/或体内测定来确定用于根据本发明使用的不同药用剂的等效剂量。在一些实施方案中，用于根据本发明使用的一种或更多种溶酶体活化剂在与参照溶酶体活化剂的剂量等效的剂量下使用；在一些所述实施方案中，用于所述目的的参照溶酶体活化剂选自：小分子别构活化剂(例如吡唑并嘧啶)、亚氨基糖(例如异法戈明(isofagomine))、抗氧化剂(例如n-乙酰基-半胱氨酸)和细胞运输调控剂(例如Rabla多肽)。

[0024] 杂脂族：术语“杂脂族”是指其中选自C、CH、CH_2或CH_3的一个或更多个单元独立地被杂原子替换的脂族基团。在一些实施方案中，杂脂族基团是杂烷基。在一些实施方案中，杂脂族基团是杂烯基。

[0025] 杂芳基：单独使用或作为例如“杂芳烷基”或“杂芳烷氧基”的较大部分中的一部分使用的术语“杂芳基”和“杂芳-”是指具有5至10个环原子，优选5、6或9个环原子；具有6、10或14个在环状阵列(cyclic array)中共有的π电子；并且除碳原子之外具有1至5个杂原子的基团。术语“杂原子”是指氮、氧或硫，并且包括氮或硫的任何氧化形式以及碱性氮的任何季铵化形式。杂芳基包括但不限于：噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吲哚嗪基(indolizinyl)、嘌呤基、萘啶基和蝶啶基。本文中使用的术语“杂芳基”和“杂芳-”也包括其中杂芳族环与一个或更多个芳基、环脂族或杂环基环稠合的基团，其中连接基团或点在杂芳族环上。非限制性实例包括：吲哚基、异吲哚基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、吲唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、酞嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、4H-喹嗪基、咔唑基、吖啶基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基和吡啶并[2,3-b]-1,4-噁嗪-3(4H)-酮。杂芳基可以是单环或双环的。术语“杂芳基”可与术语“杂芳基环”、“杂芳基基团”或“杂芳族”互换使用，所述术语中的任一个都包含任选地经取代的环。术语“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的烷基，其中烷基和杂芳基部分独立地被任选地取代。

[0026] 杂原子：术语“杂原子”是指氧、硫、氮、磷、硼、硒或硅中的一个或更多个(包括氮、硼、硒、硫、磷或硅的任何氧化形式；任何碱性氮的季铵化形式；或杂环的可取代氮，例如N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或NR+(如在N-取代的吡咯烷基中))。

[0027] 杂环:本文中使用的术语“杂环”、“杂环基”、“杂环基团”和“杂环环”可互换使用,并且是指饱和或部分不饱和并且除碳原子之外具有一个或更多个、优选一至四个如上定义的杂原子的稳定3至7元单环或7-10元双环杂环部分。当关于杂环的环原子使用时,术语“氮”包括经取代的氮。例如,在具有0-3个选自氧、硫或氮的杂原子的饱和或部分不饱和环中,氮可以是N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)、或$^{+}$NR(如在N-取代的吡咯烷基中)。

[0028] 杂环可在产生稳定结构的任何杂原子或碳原子处连接于其侧基,并且任何环原子都可任选地被取代。所述饱和或部分不饱和杂环基团的实例包括但不限于:四氢呋喃基、四氢噻吩基(tetrahydrothiophenyl)吡咯烷基、哌啶基、吡咯啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、噁唑烷基、哌嗪基、二氧杂环己烷基(dioxanyl)、二氧杂环戊烷基(dioxolanyl)、二氮杂䓬基(diazepinyl)、氧氮杂䓬基(oxazepinyl)、硫氮杂䓬基(thiazepinyl)、吗啉基和奎宁环基(quinuclidinyl)。术语“杂环”、“杂环基”、“杂环基环”、“杂环基团(heterocyclic group)”、“杂环部分”和“杂环基团(heterocyclic radical)”在本文中可互换使用,并且也包括其中杂环基与一个或更多个芳基、杂芳基或环脂族环稠合的基团,例如二氢吲哚基、3H-吲哚基、色烷基(chromanyl)、菲啶基或四氢喹啉基,其中连接基团或点在杂环基环上。杂环基可以是单环或双环的。术语“杂环基烷基”是指被杂环基取代的烷基,其中烷基和杂环基部分独立地被任选地取代。

[0029] 腹膜内:如本文所用的短语“腹膜内施用(intraperitoneal administration)”和“腹膜内施用(administered intraperitonealy)”具有其在本领域中理解的含义,是指向对象的腹膜中施用化合物或组合物。

[0030] 体外:本文中使用的术语“体外”是指事件发生在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中等,而非在生物体(例如,动物、植物和/或微生物)内。

[0031] 体内:本文使用的术语“体内”是指事件发生在生物体(例如动物、植物和/或微生物)内。

[0032] 低级烷基:术语“低级烷基”是指C_{1-4}直链或支链烷基。示例性低级烷基是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和叔丁基。

[0033] 低级卤烷基:术语“低级卤烷基”是指被一个或更多个卤素原子取代的C_{1-4}直链或支链烷基。

[0034] 任选地经取代:如本文中所述,本发明化合物可含有“任选地经取代的”部分。一般来说,术语“经取代”无论前边是否有术语“任选地”都是指指定部分的一个或更多个氢被合适的取代基替换。除非另有说明,否则“任选地经取代的”基团可在基团的每个可取代位置处具有合适的取代基,并且当任何给定结构中的超过一个位置可被选自指定组的超过一个取代基取代时,在每个位置处的取代基可相同或不同。本发明考虑的取代基组合优选是导致形成稳定的或化学可行的化合物的那些。本文中使用的术语“稳定”是指化合物在经受允许其生产、检测以及在某些实施方案中其回收、纯化以及用于本文中公开的一个或更多个目的条件时基本上不改变。

[0035] “任选地经取代的”基团的可取代碳原子上的合适的单价取代基独立地是卤素;-$(CH_2)_{0-4}R^{o}$;-$(CH_2)_{0-4}OR^{o}$;-O$(CH_2)_{0-4}R^{o}$、-O-$(CH_2)_{0-4}C(O)OR^{o}$;-$(CH_2)_{0-4}CH(OR^{o})_2$;-$(CH_2)_{0-}$

$_4SR^o$；-$(CH_2)_{0-4}Ph$，其可被R^o取代；-$(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$，其可被$R^o$取代；-CH=CHPh，其可被$R^o$取代；-$(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$-吡啶基，其可被$R^o$取代；-$NO_2$；-CN；-$N_3$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)_2$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)R^o$；-$N(R^o)C(S)R^o$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)NR^o_2$；-$N(R^o)C(S)NR^o_2$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)OR^o$；-$N(R^o)N(R^o)C(O)R^o$；-$N(R^o)N(R^o)C(O)NR^o_2$；-$N(R^o)N(R^o)C(O)OR^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)R^o$；-$C(S)R^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)SR^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^o_3$；-$(CH_2)_{0-4}OC(O)R^o$；-$OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^-$，$SC(S)SR^o$；-$(CH_2)_{0-4}SC(O)R^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)NR^o_2$；-$C(S)NR^o_2$；-$C(S)SR^o$；-$SC(S)SR^o$，-$(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^o_2$；-$C(O)N(OR^o)R^o$；-$C(O)C(O)R^o$；-$C(O)CH_2C(O)R^o$；-$C(NOR^o)R^o$；-$(CH_2)_{0-4}SSR^o$；-$(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^o$；-$(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^o$；-$(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^o$；-$S(O)_2NR^o_2$；-$(CH_2)_{0-4}S(O)R^o$；-$N(R^o)S(O)_2NR^o_2$；-$N(R^o)S(O)_2R^o$；-$N(OR^o)R^o$；-$C(NH)NR^o_2$；-$P(O)_2R^o$；-$P(O)R^o_2$；-$OP(O)R^o_2$；-$OP(O)(OR^o)_2$；-$SiR^o_3$；-($C_{1-4}$直链或支链亚烷基)$O-N(R^o)_2$；或-($C_{1-4}$直链或支链亚烷基)$C(O)O-N(R^o)_2$，其中各$R^o$可如下所定义被取代，并且独立地是氢、$C_{1-6}$脂族、-$CH_2Ph$、-$O(CH_2)_{0-1}Ph$、-$CH_2$-(5-6元杂芳基环)，或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环，或尽管具有以上定义，但两个独立出现的R^o与其一个或更多个间插原子一起形成可如下所定义被取代的具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的3-12元饱和、部分不饱和或芳基单环或双环。

[0036] R^o(或两个独立出现的R^o与其间插原子一起形成的环)上的合适的单价取代基独立地是卤素、-$(CH_2)_{0-2}R^\bullet$、-(卤代$R^\bullet$)、-$(CH_2)_{0-2}OH$、-$(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$；-O(卤代$R^\bullet$)、-CN、-$N_3$、-$(CH_2)_{0.2}C(O)R^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}C(O)OH$、-$(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}SH$、-$(CH_2)_{0-2}NH_2$、-$(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$、-$NO_2$、-$SiR^\bullet_3$、-$OSiR^\bullet_3$、-$C(O)SR^\bullet$、-($C_{1-4}$直链或支链亚烷基)$C(O)OR^\bullet$或-$SSR^\bullet$，其中各$R^\bullet$未被取代或当前边有“卤代”时仅被一个或更多个卤素取代，并且独立地选自C_{1-4}脂族、-CH_2Ph、-$O(CH_2)_{0-1}Ph$，或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环。R^o的饱和碳原子上的合适的二价取代基包括=O和=S。

[0037] “任选地经取代的”基团的饱和碳原子上的合适的二价取代基包括以下：=O、=S、=NNR^*_2、=$NNHC(O)R^*$、=$NNHC(O)OR^*$、=$NNHS(O)_2R^*$、=NR^*、=NOR^*、-$O(C(R^*_2))_{2-3}O$-或-$S(C(R^*_2))_{2-3}S$-，其中各独立出现的R^*选自氢，可如下所定义被取代的C_{1-6}脂族，或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未取代的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环。结合于“任选地经取代的”基团的邻近可取代碳的合适的二价取代基包括：-$O(CR^*_2)_{2-3}O$-，其中各独立出现的R^*选自氢，可如下所定义被取代的C_{1-6}脂族，或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未取代的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环。

[0038] R^*的脂族基团上的合适的取代基包括卤素、-$R^\bullet$、-(卤代$R^\bullet$)、-OH、-$OR^\bullet$、-O(卤代$R^\bullet$)、-CN、-C(O)OH、-$C(O)OR^\bullet$、-NH_2、-$NHR^\bullet$、-$NR^\bullet_2$或-NO_2，其中各$R^\bullet$未被取代或当前边有“卤基”时仅被一个或更多个卤素取代，并且独立地是C_{1-4}脂族、-CH_2Ph、-$O(CH_2)_{0-1}Ph$或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环。

[0039] “任选地经取代的”基团的可取代氮上的合适的取代基包括$\mathbf{-R^\dagger}$、$\mathbf{-NR^\dagger_2}$、$\mathbf{-C(O)R^\dagger}$、$\mathbf{-C(O)OR^\dagger}$、$\mathbf{-C(O)C(O)R^\dagger}$、$\mathbf{-C(O)CH_2C(O)R^\dagger}$、$\mathbf{-S(O)_2R^\dagger}$、$\mathbf{-S(O)_2NR^\dagger_2}$、$\mathbf{-C(S)NR^\dagger_2}$、$\mathbf{-C(NH)NR^\dagger_2}$或$\mathbf{-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger}$；其中各$\mathbf{R^\dagger}$独立地是氢、可如下所定义被取代的$C_{1-6}$脂族、未被取代的-OPh，或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫

的杂原子的未被取代的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环，或尽管具有以上定义，但两个独立出现的$\mathbf{R}^{\dagger}$与其间插原子一起形成具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未被取代的3-12元饱和、部分不饱和或芳基单环或双环。

[0040] $\mathbf{R}^{\dagger}$的脂族基团上的合适的取代基独立地是卤素、-R•、-(卤代R•)、-OH、-OR•、-O(卤代R•)、-CN、-C(O)OH、-C(O)OR•、-NH_2、-NHR•、-$NR•_2$或-NO_2，其中各R•未被取代或当前边有“卤基”时仅被一个或更多个卤素取代，并且独立地是C_{1-4}脂族、-CH_2Ph、-O$(CH_2)_{0-1}$Ph，或具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5-6元饱和、部分不饱和或芳基环。

[0041] 经口：本文中使用的短语“经口施用(oral administration)”和“经口施用(administered orally)”具有其在本领域中理解的含义，是指通过口(mouth)来施用化合物或组合物。

[0042] 胃肠外：本文中使用的短语“胃肠外施用(parenteral administration)”和“胃肠外施用(administered parenterally)”具有其在本领域中理解的含义，是指除经肠和表面施用以外的施用模式，通常通过注射来进行，并且包括但不限于：静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、脊椎内和胸骨内注射和输注。

[0043] 部分不饱和：本文中使用的术语“部分不饱和”是指环部分包括至少一个双键或三键。术语“部分不饱和”旨在涵盖环具有多个不饱和位点，但不旨在包括如本文中定义的芳基或杂芳基部分。

[0044] 药物组合物：本文中使用的术语“药物组合物”是指与一种或更多种可药用载体一起配制的活性剂。在一些实施方案中，活性剂是以适于在对相关群体施用时显示达到预定治疗作用的统计显著概率的治疗方案中施用的单位给药量存在。在一些实施方案中，药物组合物可被特别配制来以固体或液体形式施用，所述形式包括适合于以下的那些：经口施用，例如兽用顿服药(drench)(水性或非水性溶剂或混悬剂)、片剂(例如以口含、舌下和全身性吸收为目标的那些)、大丸剂(bolus)、散剂、颗粒剂、用于向舌施用的糊剂；胃肠外施用，例如通过以例如无菌溶液剂或混悬剂、或持续释放制剂形式进行皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射；表面施用，例如作为乳膏剂、软膏剂或控制释放贴剂或向皮肤、肺或口腔施用的喷雾剂；阴道内或直肠内，例如作为子宫托(pessary)、乳膏剂或泡沫；舌下；经眼；经皮；或经鼻、经肺以及向其他黏膜表面施用。

[0045] 可药用：本文中使用的短语“可药用”是指在合理医学判断的范围内适用于与人和动物的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应(allergic response)或其他问题或并发症，与合理益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0046] 可药用载体：本文中使用的术语“可药用载体”是指涉及将主题化合物自身体的一个器官或部分携带或运输至身体的另一器官或部分的可药用材料、组合物或载剂，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。各载体在可与制剂的其他成分相容和不损伤患者的意义上必须是“可接受的”。可充当可药用载体的材料的一些实例包括：糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；粉末状西黄蓍胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，例如可可豆脂和栓剂蜡；油类，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇类，例如丙二醇；多元醇，例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；酯类，例如油酸乙酯和月

桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等张盐水;林格液(Ringer's solution);乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;和用于药物制剂中的其他无毒可相容物质。

[0047] 可药用盐:本文中使用的术语"可药用盐"是指适用于药用情况下的此类化合物的盐,即在合理医学判断的范围内适用于与人和低等动物的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应等并且与合理益处/风险比相称的盐。可药用盐是本领域中公知的。例如,S.M.Berge等在J.Pharmaceutical Sciences,66:1-19(1977)中详细描述了可药用盐。在一些实施方案中,可药用盐包括但不限于:无毒酸加成盐,其为氨基与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或与有机酸(例如乙酸、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使用的其他方法(例如离子交换)形成的盐。在一些实施方案中,可药用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、乙烷磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、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、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐(pamoate)、果胶酸盐(pectinate)、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、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等盐。在一些实施方案中,适当时,可药用盐包括使用反离子,如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、具有1至6个碳原子的烷基、磺酸根和芳基磺酸根形成的无毒铵、季铵和胺阳离子盐。

[0048] 前药:一般来说,本文中使用的以及如本领域中所理解的术语"前药"是在向生物体施用时,在身体中被代谢以递送目标活性(例如治疗或诊断)剂的实体。通常来说,所述代谢涉及移除至少一个"前药部分"以形成活性剂。多种形式的"前药"在本领域中是已知的。对于所述前药部分的实例,参见:

[0049] a)Design of Prodrugs,H.Bundgaard编,(Elsevier,1985)以及Methods in Enzymology,42:309-396,K.Widder等编(Academic Press,1985);

[0050] b)Prodrugs and Targeted Delivery,J.Rautio编(Wiley,2011);

[0051] c)Prodrugs and Targeted Delivery,J.Rautio编(Wiley,2011);

[0052] d)A Textbook of Drug Design and Development,Krogsgaard-Larsen编;

[0053] e)Bundgaard,第5章"Design and Application of Prodrugs",H.Bundgaard,第113-191页(1991);

[0054] f)Bundgaard,Advanced Drug Delivery Reviews,8:1-38(1992);

[0055] g)Bundgaard等,Journal of Pharmaceutical Sciences,77:285(1988);以及

[0056] h)Kakeya等,Chem.Pharm.Bull.,32:692(1984)。

[0057] 如本文中所述的其他化合物一样,前药可以多种形式中的任一种来提供,例如晶体形式、盐形式等。在一些实施方案中,前药是以其可药用盐形式提供。

[0058] 保护基:本文中使用的术语"保护基"是本领域中公知的,并且包括详述于Protecting Groups in Organic synthesis,T.W.Greene和P.G.M.Wuts,第3版,John

Wiley&Sons,1999中的那些,该参考文献通过引用整体并入本文。也包括描述于Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,Serge L.Beaucage等编06/2012中的特别适合于核苷和核苷酸化学的那些保护基,第2章通过引用整体并入本文。合适的氨基保护基包括氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸9-芴基甲酯(Fmoc)、氨基甲酸9-(2-磺基)芴基甲酯、氨基甲酸9-(2,7-二溴)芴基甲酯、氨基甲酸2,7-二-叔丁基-[9-(10,10-二氧代-10,10,10,10-四氢噻吨基)]甲酯(DBD-Tmoc)、氨基甲酸4-甲氧基苯甲酰甲酯(Phenoc)、氨基甲酸2,2,2-三氯乙酯(Troc)、氨基甲酸2-三甲基甲硅烷基乙酯(Teoc)、氨基甲酸2-苯基乙酯(hZ)、氨基甲酸1-(1-金刚烷基)-1-甲基乙酯(Adpoc)、氨基甲酸1,1-二甲基-2-卤代乙酯、氨基甲酸1,1-二甲基-2,2-二溴乙酯(DB-t-BOC)、氨基甲酸1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙酯(TCBOC)、氨基甲酸1-甲基-1-(4-联苯基)乙酯(Bpoc)、氨基甲酸1-(3,5-二-叔丁基苯基)-1-甲基乙酯(t-Bumeoc)、氨基甲酸2-(2'-和4'-吡啶基)乙酯(Pyoc)、氨基甲酸2-(N,N-二环己基甲酰氨基)乙酯、氨基甲酸叔丁酯(BOC)、氨基甲酸1-金刚烷酯(Adoc)、氨基甲酸乙烯酯(Voc)、氨基甲酸烯丙酯(Alloc)、氨基甲酸1-异丙基烯丙酯(Ipaoc)、氨基甲酸肉桂酯(Coc)、氨基甲酸4-硝基肉桂酯(Noc)、氨基甲酸8-喹啉酯、氨基甲酸N-羟基哌啶酯、二硫代氨基甲酸烷基酯、氨基甲酸苄酯(Cbz)、氨基甲酸对甲氧基苄酯(Moz)、氨基甲酸对硝基苄酯、氨基甲酸对溴代苄酯、氨基甲酸对氯代苄酯、氨基甲酸2,4-二氯代苄酯、氨基甲酸4-甲基亚磺酰基苄酯(Msz)、氨基甲酸9-蒽基甲酯、氨基甲酸二苯基甲酯、氨基甲酸2-甲硫基乙酯、氨基甲酸2-甲基磺酰基乙酯、氨基甲酸2-(对甲苯磺酰基)乙酯、氨基甲酸[2-(1,3-二硫杂环己基)]甲酯(Dmoc)、氨基甲酸4-甲硫基苯酯(Mtpc)、氨基甲酸2,4-二甲硫基苯酯(Bmpc)、氨基甲酸2-磷鎓基乙酯(Peoc)、氨基甲酸2-三苯基磷鎓基异丙酯(Ppoc)、氨基甲酸1,1-二甲基-2-氰基乙酯、氨基甲酸间氯-对酰氧基苄酯、氨基甲酸对(二羟基硼烷基)苄酯、氨基甲酸5-苯并异噁唑基甲酯、氨基甲酸2-(三氟甲基)-6-色酮基甲酯(Tcroc)、氨基甲酸间硝基苯酯、氨基甲酸3,5-二甲氧基苄酯、氨基甲酸邻硝基苄酯、氨基甲酸3,4-二甲氧基-6-硝基苄酯、氨基甲酸苯基(邻硝基苯基)甲酯、吩噻嗪基-(10)-羰基衍生物、N'-对甲苯磺酰基氨基羰基衍生物、N'-苯基氨基硫羰基衍生物、氨基甲酸叔戊酯、硫代氨基甲酸S-苄酯、氨基甲酸对氰基苄酯、氨基甲酸环丁酯、氨基甲酸环己酯、氨基甲酸环戊酯、氨基甲酸环丙基甲酯、氨基甲酸对癸基氧基苄酯、氨基甲酸2,2-二甲氧基羰基乙烯酯、氨基甲酸邻(N,N-二甲基甲酰氨基)苄酯、氨基甲酸1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲酰氨基)丙酯、氨基甲酸1,1-二甲基丙炔酯、氨基甲酸二(2-吡啶基)甲酯、氨基甲酸2-呋喃基甲酯、氨基甲酸2-碘代乙酯、氨基甲酸异冰片酯、氨基甲酸异丁酯、氨基甲酸异烟碱酯、氨基甲酸对(对'-甲氧基苯基偶氮基)苄酯、氨基甲酸1-甲基环丁酯、氨基甲酸1-甲基环己酯、氨基甲酸1-甲基-1-环丙基甲酯、氨基甲酸1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苯基)乙酯、氨基甲酸1-甲基-1-(对苯基偶氮基苯基)乙酯、氨基甲酸1-甲基-1-苯基乙酯、氨基甲酸1-甲基-1-(4-吡啶基)乙酯、氨基甲酸苯酯、氨基甲酸对(苯基偶氮基)苄酯、氨基甲酸2,4,6-三-叔丁基苯酯、氨基甲酸4-(三甲基铵)苄酯、氨基甲酸2,4,6-三甲基苄酯、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、吡啶甲酰胺、3-吡啶基甲酰胺、N-苯甲酰基苯基丙氨酰基衍生物、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、乙酰乙酰胺、(N'-二硫基苄基氧基羰基氨基)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(苯甲酰氧基甲基)苯甲酰胺、4,5-二苯基-3-噁唑啉-2-酮、N-苯邻二甲酰亚胺、N-二硫代琥珀酰亚胺(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-2-酮、5-取代的1,3-二苄基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、1-取代的3,5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲胺、N-烯丙胺、N-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲胺(SEM)、N-3-乙酰氧基丙胺、N-(1-异丙基-4-硝基-2-氧代-3-吡咯啉-3-基)胺、季铵盐、N-苯甲胺、N-二(4-甲氧基苯基)甲胺、N-5-二苯并环庚胺、N-三苯基甲胺(Tr)、N-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]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-亚苄胺、N-对甲氧基亚苄胺、N-二苯基亚甲胺、N-[(2-吡啶基)均三甲苯基]亚甲胺、N-(N',N'-二甲基氨基亚甲基)胺、N,N'-异亚丙二胺、N-对硝基亚苄胺、N-亚水杨基胺、N-5-氯亚水杨基胺、N-(5-氯-2-羟基苯基)苯基亚甲胺、N-亚环己胺、N-(5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五羰基铬-或钨)羰基]胺、N-铜螯合物、N-锌螯合物、N-硝基胺、N-亚硝基胺、胺N-氧化物、二苯基膦酰胺(Dpp)、二甲硫基膦酰胺(Mpt)、二苯硫基膦酰胺(Ppt)、氨基磷酸二烷酯、氨基磷酸二苄酯、氨基磷酸二苯酯、苯亚磺酰胺、邻硝基苯亚磺酰胺(Nps)、2,4-二硝基苯亚磺酰胺、五氯苯亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯亚磺酰胺、三苯基甲基亚磺酰胺、3-硝基吡啶亚磺酰胺(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)、2,2,5,7,8-五甲基色烷-6-磺酰胺(Pmc)、甲烷磺酰胺(Ms)、β-三甲基甲硅烷基乙烷磺酰胺(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甲酰甲基磺酰胺。

[0059] 合适保护的羧酸还包括但不限于: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、叔丁基二苯基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等。合适的烷基的实例包括甲基、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。合适的烯基的实例包括烯丙基。合适的芳基的实例包括任选地经取代的苯基、联苯或萘基。合适的芳基烷基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、O-硝基苄基、对硝基苄基、对卤苄基、2,6-二氯苄基、对氰基苄基)以及2-吡啶甲基和4-吡啶甲基。

[0060] 合适的羟基保护基包括甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲硫基甲基(MTM)、叔丁基硫基甲基、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苄基氧基甲基(BOM)、对甲氧基苄基氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(p-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、双(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、4-甲氧基四氢噻喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二氧杂环己烷-2-基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、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-苄基氧基乙基、1-甲基-1-苄基氧基-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、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、α-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'-溴苯甲酰甲基氧基苯基)二苯基甲基、4,4',4"-三(4,5-二氯苯二甲酰亚氨基苯基)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)双(4',4"-二甲氧基苯基)甲基、1,1-双(4-甲氧基苯基)-1'-芘基甲基、9-蒽基、9-(9-苯基)呫吨基、9-(9-苯基-10-氧代)蒽基、1,3-苯并硫杂环戊烷-2-基、苯并异噻唑基S,S-二氧、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(TBMPS)、甲酸酯、苯甲酰基甲酸酯、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-(亚乙基二硫基)戊酸酯(乙酰丙酰基二硫基缩醛)、新戊酸酯、金刚酸酯、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(三菜酸酯(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、甲基二硫代碳酸酯、2-碘代苯甲酸酯、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-双(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、邻-(甲氧基羰基)苯甲酸酯、α-萘甲酸酯、硝酸酯、烷基N,N,N',N'-四甲基磷酰二胺、N-苯基氨基甲酸烷酯、硼酸酯、二甲基硫代膦酰基、2,4-二硝基苯基次磺酸烷酯、硫酸酯、甲烷磺酸酯(甲磺酸酯)、苄基磺酸酯和甲苯磺酸酯(Ts)。对于保护1,2-二醇或1,3-二醇,保护基包括亚甲基缩醛、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、丙酮化合物、亚环戊基缩酮、亚环己基缩酮、亚环庚基缩酮、亚苄基缩醛、对甲氧基亚苄胺缩醛、2,4-二甲氧基亚苄胺缩酮、3,4-二甲氧基亚苄胺缩醛、2-硝基亚苄胺缩醛、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-乙氧基次乙基原酸酯、1,2-二甲氧基亚乙基原酸酯、α-甲氧基亚苄胺原酸酯、1-(N,N-二甲基氨基)亚乙基衍生物、α-(N,N'-二甲基氨基)亚苄胺衍生物、2-氧杂亚环戊基原酸酯、二叔丁基亚甲硅烷基(DTBS)、1,3-(1,1,3,3-四异丙

基二亚硅氧烷基)衍生物(TIPDS)、四-叔丁氧基二硅氧烷-1,3-二亚基衍生物(TBDS)、环状碳酸酯、环状硼酸酯、乙基硼酸酯和苯基硼酸酯。

[0061] 在一些实施方案中,羟基保护基是乙酰基、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、二苯基甲基、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、叔丁基二苯基甲硅烷基、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、新戊酰基、9-芴基甲基碳酸酯、甲磺酸酯、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、丁基硫羰基、4,4′,4″-三(苯甲酰基氧基)三苯甲基、二苯基氨基甲酰基、乙酰丙酰基、2-(二溴甲基)苯甲酰基(Dbmb)、2-(异丙基硫基甲氧基甲基)苯甲酰基(Ptmt)、9-苯基呫吨-9-基(pixyl)或9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基(MOX)。在一些实施方案中,各羟基保护基独立地选自乙酰基、苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基和4,4′-二甲氧基三苯甲基。在一些实施方案中,羟基保护基选自三苯甲基、单甲氧基三苄基和4,4′-二甲氧基三苯甲基。

[0062] 在一些实施方案中,磷保护基是在整个寡核苷酸合成期间连接于核苷酸间磷键联的基团。在一些实施方案中,磷保护基连接于核苷酸间硫代磷酸酯键联的硫原子。在一些实施方案中,磷保护基连接于核苷酸间硫代磷酸酯键联的氧原子。在一些实施方案中,磷保护基连接于核苷酸间磷酸酯键联的氧原子。在一些实施方案中,磷保护基是2-氰基乙基(CE或Cne)、2-三甲基硅烷基乙基、2-硝基乙基、2-磺酰基乙基、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-叔丁基甲酰氨基)-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。

[0063] 蛋白质:本文中使用的术语“蛋白质”是指多肽(即,一串至少两个通过肽键彼此连接的氨基酸)。在一些实施方案中,蛋白质仅包含天然氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质包含一个或更多个非天然氨基酸(例如与邻近氨基酸形成一个或更多个肽键的部分)。在一些实施方案中,蛋白质链中的一个或更多个残基含有非氨基酸部分(例如聚糖等)。在一些实施方案中,蛋白质包含超过一个例如通过一个或更多个二硫键连接或通过其他手段缔合的多肽链。在一些实施方案中,蛋白质含有L-氨基酸、D-氨基酸或两者;在一些实施方案中,蛋白质含有一个或更多个本领域中已知的氨基酸修饰或类似物。可用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化等。术语“肽”通常用于指长度小于约100个氨基酸、小于约50个氨基酸、小于20个氨基酸或小于10个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,蛋白质是抗体、抗体片段、其生物活性部分和/或其特征部分。

[0064] 样品:本文中使用的“样品”是特定生物体或从其获得的材料。在一些实施方案中,样品是获自或来自于如本文中所述的目标来源的生物样品。在一些实施方案中,目标来源

包括生物体，如动物或人。在一些实施方案中，生物样品包括生物组织或流体。在一些实施方案中，生物样品是或包括骨髓；血液；血细胞；腹水；组织或细针活检样品；含有细胞的体液；自由浮动的核酸；痰；唾液；尿；脑脊髓液；腹膜液；胸膜液；粪便；淋巴液；妇科流体；皮肤拭子；阴道拭子；口腔拭子；鼻拭子；洗涤物或灌洗物，如导管灌洗物或支气管肺泡灌洗物；抽吸物；刮屑；骨髓标本；组织活检标本；手术标本；粪便；其他体液、分泌物和/或排泄物；和/或从其得到的细胞等。在一些实施方案中，生物样品是或包括从个体获得的细胞。在一些实施方案中，样品是通过任何适当手段直接获自目标来源的“初级样品”。例如，在一些实施方案中，初级生物样品是通过选自活检(例如细针抽吸或组织活检)、手术、体液(例如血液、淋巴液、粪便等)收集等的方法获得。在一些实施方案中，如根据上下文将明确的是，术语“样品”是指通过处理(例如通过移除一种或更多种组分和/或通过添加一种或更多种试剂)初级样品获得的制备物。例如，使用半透膜进行过滤。这样的“经处理样品”可包括例如从样品提取或通过使初级样品经受例如扩增或逆转录mRNA、分离和/或纯化某些组分等的技术获得的核酸或蛋白质。在一些实施方案中，样品是生物体。在一些实施方案中，样品是植物。在一些实施方案中，样品是动物。在一些实施方案中，样品是人。在一些实施方案中，样品是人以外的生物体。

[0065] 立体化学异构体形式：本文中使用的短语“立体化学异构体形式”是指由按照相同键顺序键合的相同原子组成，但具有不可互换的不同三维结构的不同化合物。在本发明的一些实施方案中，提供的化学组合物可以是或包括化合物的个体立体化学异构体形式的纯制备物；在一些实施方案中，提供的化学组合物可以是或包括所述化合物的两种或更多种立体化学异构体形式的混合物。在某些实施方案中，这样的混合物含有等量的不同立体化学异构体形式；在某些实施方案中，这样的混合物含有不同量的至少两种不同立体化学异构体形式。在一些实施方案中，化学组合物可含有化合物的所有非对映体和/或对映体。在一些实施方案中，化学组合物可含有化合物的少于所有的非对映体和/或对映体。在一些实施方案中，如果期望本发明化合物的特定对映体，则其可例如通过不对称合成，或通过用手性助剂衍生来制备，其中分离所得非对映体混合物，并且切割辅助基团以提供纯的期望对映体。或者，当分子含有碱性官能团如氨基时，非对映体盐用适当光学活性的酸形成，并且例如通过分级结晶来拆分。

[0066] 对象：本文中使用的术语“对象”或“测试对象”是指根据本发明，例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的向其施用所提供的化合物或组合物的任何生物体。典型对象包括动物(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。在一些实施方案中，对象可患有和/或易患有疾病、障碍和/或病症。

[0067] 基本上：本文中使用的术语“基本上”是指表现总体或接近总体范围或程度的目标特征或性质的定性情况。生物领域普通技术人员将理解，如果曾发生，那么生物学和化学现象很少达到完全和/或进行至完全或达到或避免绝对结果。因此，术语“基本上”在本文中用于获取许多生物学和/或化学现象中固有的潜在完全性缺乏。

[0068] 患有：“患有”疾病、障碍和/或病症的个体已被诊断有和/或表现出疾病、障碍和/或病症的一种或更多种症状。

[0069] 易患有：“易患有”疾病、障碍和/或病症的个体是发生所述疾病、障碍和/或病症的风险高于公众成员的个体。在一些实施方案中，易患有疾病、障碍和/或病症的个体可尚未

被诊断有所述疾病、障碍和/或病症。在一些实施方案中，易患有疾病、障碍和/或病症的个体可表现出所述疾病、障碍和/或病症的症状。在一些实施方案中，易患有疾病、障碍和/或病症的个体可不表现出所述疾病、障碍和/或病症的症状。在一些实施方案中，易患有疾病、障碍和/或病症的个体将发生所述疾病、障碍和域病症。在一些实施方案中，易患有疾病、障碍和/或病症的个体将不发生所述疾病、障碍和/或病症。

[0070] 全身性：本文中使用的短语“全身性施用(systemic administration)”、“全身施用(administered systemically)”、“外周性施用(peripheral administration)”和“外周施用(administered peripherally)”具有其在本领域中理解的含义，是指施用化合物或组合物以使其进入接受者的系统。

[0071] 互变异构形式：本文中使用的短语“互变异构形式”用于描述有机化合物的能够轻易相互转化的不同异构形式。互变异构体的特征可在于氢原子或质子进行形式迁移，伴有单键和邻近双键的转换。在一些实施方案中，互变异构体可由质子移变互变异构(即质子重新定位)产生。在一些实施方案中，互变异构体可由价位互变异构(即成键电子快速重构)产生。所有此类互变异构形式都旨在包括在本发明的范围内。在一些实施方案中，化合物的互变异构形式以彼此动态平衡存在，因此制备单独物质的尝试导致形成混合物。在一些实施方案中，化合物的互变异构形式是可分开以及可分离化合物。在本发明的一些实施方案中，可提供是或包括化合物的单一互变异构形式的纯制备物的化学组合物。在本发明的一些实施方案中，化学组合物可以化合物的两种或更多种互变异构形式的混合物形式提供。在某些实施方案中，所述混合物含有等量的不同互变异构形式；在某些实施方案中，所述混合物含有化合物的不同量的至少两种不同互变异构形式。在本发明的一些实施方案中，化学组合物可含有化合物的所有互变异构形式。在本发明的一些实施方案中，化学组合物可含有化合物的少于所有的互变异构形式。在本发明的一些实施方案中，化学组合物可含有化合物的一种或更多种互变异构形式，其数量由于相互转化而随时间变化。在本发明的一些实施方案中，互变异构是酮-烯醇互变异构。化学领域技术人员将认识到酮-烯醇互变异构体可使用化学领域中已知的任何适合试剂来“捕获(trapped)”(即化学改性以使其保持“烯醇”形式)，以提供可随后使用本领域中已知的一种或更多种适合技术加以分离的烯醇衍生物。除非另有说明，否则本发明涵盖相关化合物的所有互变异构形式，无论呈纯的形式或呈彼此混合。

[0072] 治疗剂：本文中使用的短语“治疗剂”是指当向对象施用时具有治疗作用和/或引起期望生物学和/或药理学作用的任何药剂。在一些实施方案中，治疗剂是可用于减轻、改善、缓和、抑制、预防疾病、障碍和/或病症，延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其一种或更多种症状或特征之发生的任何物质。

[0073] 治疗有效量：本文中使用的术语“治疗有效量”是指物质(例如治疗剂、组合物和/或制剂)在作为治疗方案的一部分施用时引起期望生物反应的量。在一些实施方案中，物质的治疗有效量是当向患有或已患有疾病、障碍和/或病症的对象施用时足以治疗、诊断、预防所述疾病、障碍和/或病症和/或延迟其发作的量。如本领域普通技术人员将了解，物质的有效量可根据诸如期望生物终点、待递送的物质、靶细胞或组织等的因素而变化。例如，制剂中的化合物的用以治疗疾病、障碍和/或病症的有效量是减轻、改善、缓和、抑制、预防所述疾病、障碍和/或病症，延迟其发作、减轻其严重性和/或降低其一种或更多种症状或特征

之发生的量。在一些实施方案中，治疗有效量是以单次剂量施用；在一些实施方案中，递送治疗有效量需要多个单位剂量。

[0074] 治疗：本文中使用的术语“治疗(treat、treatment或treating)”是指用于部分或完全减轻、改善、缓和、抑制、预防疾病、障碍和/或病症，延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其一种或更多种症状或特征之发生的任何方法。治疗可向未表现出疾病、障碍和/或病症的征象的对象施用。在一些实施方案中，治疗可向仅表现出疾病、障碍和/或病症的早期征象的对象施用例如以达到降低发生与所述疾病、障碍和/或病症相关的病理状况之风险的目的。

[0075] 不饱和本文中使用的术语“不饱和”是指某一部分(moiety)具有一个或更多个不饱和单元。

[0076] 单位剂量：本文中使用的词语“单位剂量”是指作为单次剂量和/或以药物组合物的物理不连续单元施用的量。在许多实施方案中，单位剂量含有预定量的活性剂。在一些实施方案中，单位剂量含有药剂的整个单次剂量。在一些实施方案中，施用超过一个单位剂量以达到总单次剂量。在一些实施方案中，需要或预期需要施用多个单位剂量以达到预定作用。单位剂量可以是例如一定体积的含有预定量的一种或更多种治疗剂的液体(例如可接受的载体)、预定量的一种或更多种呈固体形式的治疗剂、含有预定量的一种或更多种治疗剂的持续释放制剂或药物递送装置等。应了解单位剂量可存在于除治疗剂之外还包含多种组分中的任一种的制剂中。例如，可如下文所述包含可接受的载体(例如可药用载体)、稀释剂、稳定剂、缓冲剂、防腐剂等。本领域技术人员应了解，在许多实施方案中，特定治疗剂的合适总日剂量可包括单位剂量的一部分或多个单位剂量，并且可例如由主治医师在合理医学判断的范围确定。在一些实施方案中，用于任何特定对象或生物体的具体有效剂量水平可取决于多种因素，包括所治疗的障碍和障碍的严重性；所用具体活性化合物的活性；所用具体组合物；对象的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食；所用具体活性化合物的施用时间和排泄速率；治疗的持续时间；与所用一种或更多种具体化合物组合或同时使用的药物和/或其他治疗；以及医学领域中公知的类似因素。

[0077] 野生型：本文中使用的术语“野生型”具有其在本领域中理解的含义，是指具有如在自然界中存在于“正常”(与突变、患病、改变等相对)状态或背景下的结构和/或活性的实体。本领域普通技术人员将了解野生型基因和多肽常以多种不同形式(例如等位基因)存在。

[0078] 核酸：术语“核酸”包括任何核苷酸、其类似物以及其聚合物。本文中使用的术语“多核苷酸”是指任何长度的聚合形式的核苷酸(核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA))。这些术语是指分子的一级结构，并且因此包括双链和单链DNA以及双链和单链RNA。这些术语包括RNA或DNA的由核苷酸类似物和经修饰多核苷酸(例如但不限于甲基化、经保护的和/或加帽的核苷酸或多核苷酸)制得的类似物作为等效物。所述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)；源于核苷碱基和/或经修饰核苷碱基的N-糖苷或C-糖苷的RNA或DNA；源于糖和/或经修饰糖的核酸；以及源于磷酸酯桥(phosphate bridge)和/或经修饰磷原子桥(在本文中也称为“核苷酸间键联(internucleotide linkage)”)的核酸。该术语涵盖含有核苷碱基、经修饰核苷碱基、糖、经修饰糖、磷酸酯桥或经修饰磷原子桥的任何组合的核酸。实例包括并且不限于含有核糖部

分的核酸、含有脱氧核糖部分的核酸、含有核糖与脱氧核糖部分两者的核酸、含有核糖和经修饰核糖部分的核酸。前缀多是指核酸含有2至约10,000个核苷酸单体单元,并且其中前缀寡是指核酸含有2至约200个核苷酸单体单元。

[0079] 核苷酸:本文中使用的术语“核苷酸”是指多核苷酸的由杂环碱基、糖和一个或更多个磷酸酯基团或含磷核苷酸间键联组成的单体单元。天然碱基(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,但应了解也包括天然和非天然碱基类似物。天然糖是戊糖(五碳糖)脱氧核糖(其形成DNA)或核糖(其形成RNA),但应了解也包括天然和非天然糖类似物。核苷酸是通过核苷酸间键联连接以形成核酸或多核苷酸。许多核苷酸间键联在本领域中是已知的(例如但不限于磷酸酯、硫代磷酸酯、硼代磷酸酯等)。人工核酸包括PNA(肽核酸)、磷酸三酯、硫代磷酸酯、H-膦酸酯、氨基磷酸酯、硼代磷酸酯、甲基膦酸酯、膦酰基乙酸酯、硫代膦酰基乙酸酯和天然核酸的磷酸酯骨架的其他变体,如本文中所述的那些。

[0080] 核苷:术语“核苷”是指其中核苷碱基或经修饰核苷碱基共价结合于糖或经修饰糖的部分。

[0081] 糖:术语“糖”是指呈闭合和/或打开形式的单糖。糖包括但不限于核糖、脱氧核糖、呋喃戊糖、吡喃戊糖和吡喃己糖部分。本文中使用的该术语也涵盖替代常规糖分子使用的结构类似物,如二醇,其聚合物形成核酸类似物二醇核酸(“GNA”)的骨架。

[0082] 经修饰糖:术语“经修饰糖”是指可替代糖的部分。经修饰糖模拟糖的空间排列、电子性质或某种其他物理化学性质。

[0083] 核苷碱基:术语“核苷碱基”是指核酸的涉及使一个核酸链以序列特异性方式结合于另一互补链的氢键合中的部分。最常见的天然核苷碱基是腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。在一些实施方案中,天然核苷碱基是经修饰腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,天然核苷碱基是甲基化腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,核苷碱基是“经修饰核苷碱基”,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)以外的核苷碱基。在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是甲基化腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,经修饰核苷碱基模拟核苷碱基的空间排列、电子性质或某种其他物理化学性质,并且保留使一个核酸链以序列特异性方式结合于另一核酸链的氢键合的性质。在一些实施方案中,经修饰核苷碱基可与全部五种天然碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤)配对,而基本上不影响解链行为、被细胞内酶的识别或寡核苷酸双链体的活性。

[0084] 手性配体:术语“手性配体”或“手性助剂”是指具有手性并且可并入反应中以使所述反应可以某一立体选择性进行的部分。

[0085] 缩合试剂:在缩合反应中,术语“缩合试剂”是指使反应性较小的位点活化,并且致使其更易受另一试剂攻击的试剂。在一些实施方案中,所述另一试剂是亲核试剂。

[0086] 封闭基团:术语“封闭基团”是指掩蔽官能团的反应性的基团。官能团可随后通过移除封闭基团来去掩蔽。在一些实施方案中,封闭基团是保护基。

[0087] 部分:术语“部分”是指分子的特定区段或官能团。化学部分常被认定是包埋在分子中或附接于分子的化学实体。

[0088] 固体支持物:术语“固体支持物”是指使得能够合成核酸的任何支持物。在一些实

施方案中,该术语是指不溶于用于执行合成核酸的反应步骤中的介质中,并且被衍生化以包含反应性基团的玻璃或聚合物。在一些实施方案中,固体支持物是高交联聚苯乙烯(Cross-linked Polystyrene,HCP)或可控孔度玻璃(Controlled Pore Glass,CPG)。在一些实施方案中,固体支持物是可控孔度玻璃(CPG)。在一些实施方案中,固体支持物是可控孔度玻璃(CPG)和高交联聚苯乙烯(HCP)的杂合支持物。

[0089] 连接部分:术语"连接部分"是指任选地位于末端核苷与固体支持物之间或末端核苷与另一核苷、核苷酸或核酸之间的任何部分。

[0090] DNA分子:"DNA分子"是指脱氧核糖核苷酸(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶)的呈其单链形式或双链螺旋形式的聚合物形式。该术语仅指分子的一级和二级结构,并且不将其限于任何特定三级形式。因此,该术语包括尤其存在于线性DNA分子(例如限制片段)、病毒、质粒和染色体中的双链DNA。在讨论特定双链DNA分子的结构时,在本文中可根据仅沿非转录DNA链(即具有与mRNA同源的序列的链)以5'至3'方向给出序列的正常惯例来描述序列。

[0091] 编码序列:DNA"编码序列"或"编码区"是当置于适当表达控制序列的控制下时,在体内被转录和翻译成多肽的双链DNA序列。编码序列("开放阅读框"或"ORF")的边界是由在5'(氨基)末端的起始密码子和在3'(羧基)末端的翻译终止密码子来确定。编码序列可包括但不限于原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(例如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列,和合成DNA序列。聚腺苷酸化信号和转录终止序列通常位于编码序列的3'。术语"非编码序列"或"非编码区"是指多核苷酸序列的不翻译成氨基酸的区域(例如5′和3′未翻译区域)。

[0092] 阅读框:术语"阅读框"是指双链DNA分子的六个可能的阅读框(在每个方向上有三个)中的一个。所用阅读框决定哪些密码子用于编码DNA分子的编码序列内的氨基酸。

[0093] 反义:本文中使用的"反义"核酸分子包含与编码蛋白质的"有义"核酸互补,例如与双链cDNA分子的编码链互补、与mRNA序列序列或与基因的编码链互补的核苷酸序列。因此,反义核酸分子可通过氢键与有义核酸分子缔合。

[0094] 摆动位置:本文中使用的"摆动位置"是指密码子的第三位置。在一些实施方案中,DNA分子中的在密码子的摆动位置内的突变在氨基酸水平上产生沉默或保守性突变。例如,存在四个编码甘氨酸的密码子,即GGU、GGC、GGA和GGG,因此任何摆动位置核苷酸突变成选自A、U、C和G的任何其他核苷酸都不导致编码的蛋白质在氨基酸水平上变化,并且因此是沉默取代。

[0095] 沉默取代:"沉默取代"或"沉默突变"是其中密码子内的核苷酸被修饰,但不导致由所述密码子编码的氨基酸残基变化的取代或突变。实例包括密码子的第三位置中的突变以及某些密码子的第一位置中的突变,如在密码子"CGG"中,其在突变成AGG时仍然编码Arg。

[0096] 基因:本文中使用的术语"基因"、"重组基因"和"基因构建体"是指编码蛋白质或其一部分的DNA分子或DNA分子的一部分。DNA分子可含有编码蛋白质的开放阅读框(作为外显子序列),并且还可包括内含子序列。本文中使用的术语"内含子"是指存在于给定基因中的不翻译成蛋白质,并且在一些而非所有情况下存在于外显子之间的DNA序列。如本领域中公知的那样,可期望的是基因可操作地连接于(或其可包含)一个或更多个启动子、增强子、阻遏子和/或其他调控序列以调节基因的活性或表达。

[0097] 互补DNA:本文中使用的“互补DNA”或“cDNA”包括通过由mRNA逆转录合成并且已从其中移除间插序列(内含子)的重组多核苷酸。

[0098] 同源性:“同源性”或“同一性”或“类似性”是指两个核酸分子之间的序列类似性。同源性和同一性可各自通过比较可出于比较目的而比对的各序列中的位置来确定。当所比较的序列中的等效位置由相同碱基占据时,那么分子在那个位置是相同的;当等效位点由相同或类似核酸残基(例如在空间和/或电子性质方面类似)占据时,那么分子可称为在那个位置是同源的(类似的)。表述为同源性/类似性或同一性百分比是指在由所比较的序列共有的位置处相同或类似核酸数目的函数。“无关”或“非同源”序列与本文中所述的序列共有小于40%同一性、小于35%同一性、小于30%同一性、或小于25%同一性。在比较两个序列时,不存在残基(氨基酸或核酸)或存在额外残基也会降低同一性和同源性/类似性。

[0099] 在一些实施方案中,术语“同源性”描述用于鉴定具有类似功能或基序的基因的基于数学的序列类似性比较。本文中所述的核酸序列可用作“查询序列”来相对于公开数据库进行搜索,例如以鉴定其他家族成员、相关序列或同源物。在一些实施方案中,此类搜索可使用Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。在一些实施方案中,BLAST核苷酸搜索可用NBLAST程序(计分=100,字长=12)来进行以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。在一些实施方案中,为出于比较目的获得空位比对,可如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述利用空位BLAST。当利用BLAST和空位BLAST程序时,可使用相应程序(例如XBLAST和BLAST)的缺省参数(参见www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0100] 同一性:本文中使用的“同一性”是指当序列被比对以使序列匹配最大,即考虑空位和插入时,在两个或更多个序列中的相应位置处的相同核苷酸残基的百分比。同一性可易于通过已知方法计算,所述方法包括但不限于Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,第1部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编,M Stockton Press,New York,1991;和Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J.Applied Math.,48:1073(1988)中所述的那些。用以确定同一性的方法被设计来给出与测试的序列之间的最大匹配。此外,用以确定同一性的方法被编纂在公开可用的电脑程序中。用以确定两个序列之间的同一性的电脑程序方法包括但不限于GCG程序包(Devereux,J.等,Nucleic Acids Research 12(1):387(1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul,S.F.等,J.Molec.Biol.215:403-410(1990)以及Altschul等Nuc.Acids Res.25:3389-3402(1997))。BLAST X程序可自NCBI和其他来源公开获得(BLAST Manual,Altschul,S.等,NCBI NLM NIH Bethesda,Md.20894;Altschul,S.等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990))。公知的Smith Waterman算法也可用于确定同一性。

[0101] 异源:DNA序列的“异源”区域是较大DNA序列内在自然界中未发现与所述较大序列相关的可鉴定DNA区段。因此,当异源区域编码哺乳动物基因时,所述基因可通常由在来源生物体的基因组中不侧接(flank)哺乳动物基因组DNA的DNA侧接。异源编码序列的另一实

例是其中编码序列自身不存在于自然界中的序列(例如其中基因组编码序列含有内含子的cDNA或具有不同于未经修饰基因的密码子或基序的合成序列)。等位基因变化形式或天然突变事件不产生如本文中所定义的异源DNA区域。

[0102] 转换突变:术语“转换突变”是指DNA序列中的碱基变化,其中嘧啶(胞苷(C)或胸苷(T))被另一嘧啶替换,或嘌呤(腺苷(A)或鸟苷(G))被另一嘌呤替换。

[0103] 颠换突变:术语“颠换突变”是指DNA序列中的碱基变化,其中嘧啶(胞苷(C)或胸苷(T))被嘌呤(腺苷(A)或鸟苷(G))替换,或嘌呤被嘧啶替换。

[0104] 寡核苷酸:术语“寡核苷酸”是指含有核苷碱基、经修饰核苷碱基、糖、经修饰糖、磷酸酯桥或经修饰磷原子桥(在本文中也称为“核苷酸间键联”,其在本文进一步定义)的任何组合的核苷酸单体的聚合物或寡聚体。

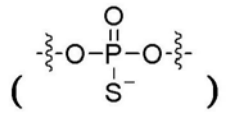
[0105] 寡核苷酸可以是单链或双链的。本文中使用的术语“寡核苷酸链”涵盖单链寡核苷酸。单链寡核苷酸可具有双链区域,并且双链寡核苷酸可具有单链区域。示例性寡核苷酸包括但不限于结构基因、包括控制和终止区域的基因、自我复制性系统(如病毒或质粒DNA)、单链和双链siRNA和其他RNA干扰试剂(RNAi剂或iRNA剂)、shRNA、反义寡核苷酸、核酶、微小RNA、微小RNA模拟物、超级微小RNA(supermir)、适体(aptamer)、反义微小RNA(antimer)、微小RNA拮抗剂(antagomir)、Ul衔接头(Ul adaptor)、成三链体寡核苷酸(triplex-formingoligonucleotide)、G四链体寡核苷酸(G-quadruplex oligonucleotide)、RNA活化剂、免疫刺激性寡核苷酸和诱饵寡核苷酸(decoy oligonucleotide)。

[0106] 有效诱导RNA干扰的双链和单链寡核苷酸在本文中也称为siRNA、RNAi剂或iRNA剂。在一些实施方案中,这些RNA干扰诱导性寡核苷酸与称为RNAi诱导的沉默复合物(RNAi-induced silencing complex,RISC)的细胞质多蛋白质复合物缔合。在许多实施方案中,单链和双链RNAi剂具有足够长度,以使其可被内源性分子,例如被Dicer切割,以产生可进入RISC机构,并且参与RISC介导的靶序列(例如靶mRNA)切割的较小寡核苷酸。

[0107] 本发明的寡核苷酸可具有多种长度。在一些特定实施方案中,寡核苷酸的长度可在约2至约200个核苷酸的范围内。在多个相关实施方案中,单链、双链和三链寡核苷酸的长度可在约4至约10个核苷酸、约10至约50个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约15至约30个核苷酸、约20至约30个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是约9至约39个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少4个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少5个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少6个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少7个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少8个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少9个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少10个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少11个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少12个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少15个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少20个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少25个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是长度是至少18个核苷酸的互补链的双链体。在一些实施方案中,寡核苷酸是长度是至少21个核苷酸的互补链的双链体。

[0108] 核苷酸间键联:本文中使用的短语“核苷酸间键联”一般是指寡核苷酸的核苷酸单元之间的含磷键联,并且可与如以上以及本文中使用的“糖间键联”和“磷原子桥”互换。在

一些实施方案中，核苷酸间键联是如存在于天然DNA和RNA分子中的磷酸二酯键联。在一些实施方案中，核苷酸间键联是“经修饰核苷酸间键联”，其中磷酸二酯键联的各氧原子任选地并独立地被有机或无机部分替换。在一些实施方案中，所述有机或无机部分选自但不限于=S、=Se、=NR’、-SR’、-SeR’、-N(R’)$_2$、B(R’)$_3$、-S-、-Se-和-N(R’)-，其中各R’独立地如下所定义和描述。在一些实施方案中，核苷酸间键联是磷酸三酯键联、硫代磷酸二酯键联

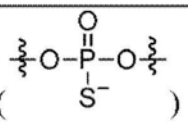
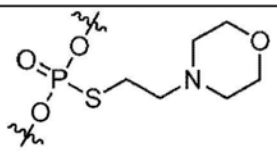
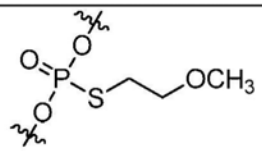
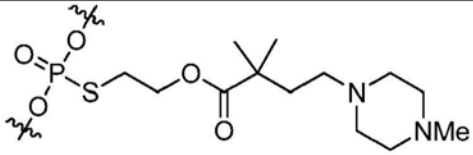
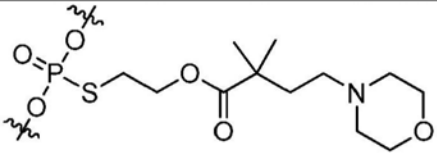


或经修饰硫代磷酸三酯键联。本领域普通技术人员应了解由于在键联中存在酸或碱部分，在给定pH下，核苷酸间键联可作为阴离子或阳离子存在。

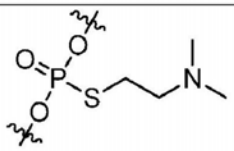
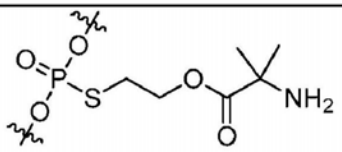
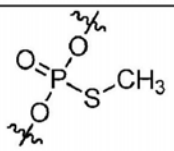
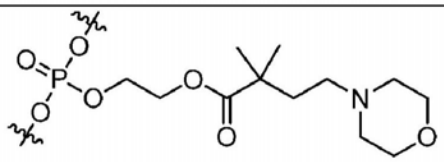
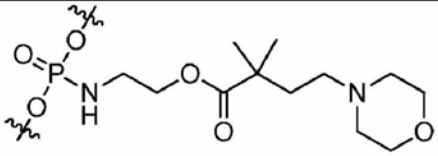
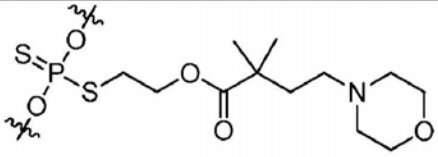
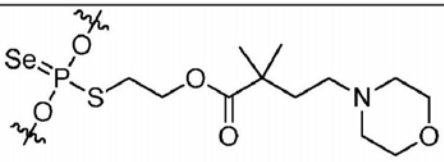
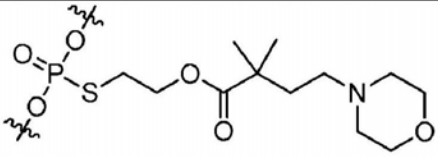
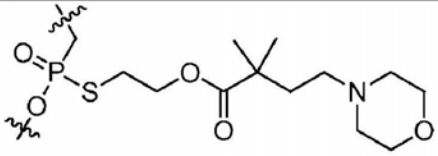
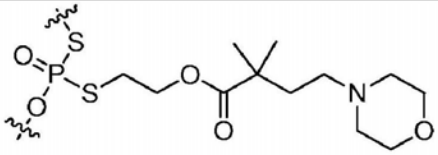
[0109] 除非另外规定，否则当与寡核苷酸序列一起使用时，s、s1、s2、s3、s4、s5、s6和s7各自独立地表示如下表1中所说明的以下经修饰核苷酸间键联。

[0110] 表1.示例性经修饰核苷酸间键联。

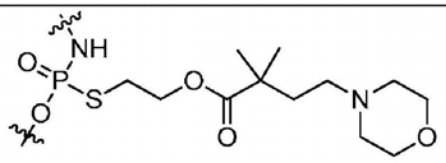
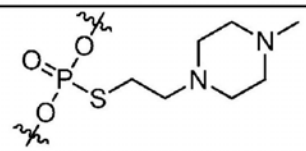
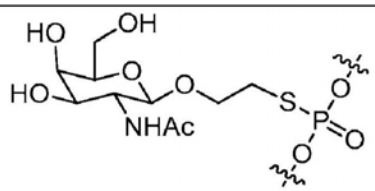
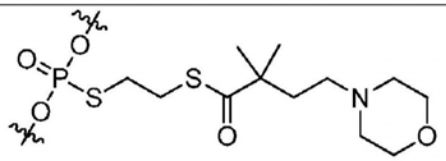
[0111]

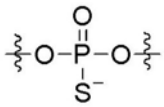
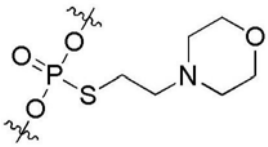
符号	经修饰核苷酸间键联
s	 硫代磷酸酯
s1	
s2	
s3	
s4	

[0112]

s5	
s6	
s7	
s8	
s9	
s10	
s11	
s12	
s13	
s14	

[0113]

s15	
s16	
s17	
s18	

[0114] 例如，(Rp，Sp)-ATsCs1GA具有1)T与C之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联（）；和2)C与G之间的具有结构的硫代磷酸三酯核苷酸间键联。除非另外规定，否则在寡核苷酸序列之前的Rp/Sp符号依次自寡核苷酸序列的5'至3'描述核苷酸间键联中的手性键联磷原子的构型。例如，在(Rp，Sp)-ATsCs1GA中，T与C之间的"s"键联中的磷具有Rp构型，并且C与G之间的"s1"键联中的磷具有Sp构型。在一些实施方案中，"全(Rp)"或"全(Sp)"用于指示寡核苷酸中的所有手性键联磷原子都分别具有相同Rp或Sp构型。例如，全-(Rp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC指示寡核苷酸中的所有手性键联磷原子都具有Rp构型；全-(Sp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC指示寡核苷酸中的所有手性键联磷原子都具有Sp构型。

[0115] 寡核苷酸类型：本文中使用的短语"寡核苷酸类型"用于定义具有特定碱基序列、骨架键联样式(即核苷酸间键联类型样式，例如磷酸酯、硫代磷酸酯等)、骨架手性中心样式(即键联磷立体化学样式(Rp/Sp))和骨架磷修饰样式(例如式I中的"-XLR^1"基团样式)的寡核苷酸。具有常见指定"类型"的寡核苷酸在结构上是彼此相同的。

[0116] 本领域技术人员将了解本发明的合成方法在合成寡核苷酸链期间提供控制程度以使寡核苷酸链的各核苷酸单元可提前被设计和/或选择以具有在键联磷处的特定立体化学和/或在键联磷处的特定修饰、和/或特定碱基和/或特定糖。在一些实施方案中，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。在一些实施方案中，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。在一些实施方案中，设计和/或选择寡核苷酸链以具有碱基的特定组合。在一些实施方案中，设计和/或选择寡核苷酸链以具有一种或更多种以上结构特征的特定组合。本发明提供了包含多种寡核苷酸分子或由多种寡核苷酸分子组成的组合物(例如手性控制的寡核苷酸组合物)。在一些实施方案中，所

有所述分子都具有相同类型(即在结构上是彼此相同的)。然而,在许多实施方案中,所提供的组合物通常以预定相对量包含多种不同类型的寡核苷酸。

[0117] 手性控制:本文中使用的“手性控制”是指能够控制寡核苷酸链内每个手性键联磷的立体化学符号。短语“手性控制的寡核苷酸”是指关于手性键联磷以单一非对映体形式存在的寡核苷酸。

[0118] 手性控制的寡核苷酸组合物:本文中使用的短语“手性控制的寡核苷酸组合物”是指含有预定水平的个体寡核苷酸类型的寡核苷酸组合物。例如,在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物包含一种寡核苷酸类型。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物包含超过一种寡核苷酸类型。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物包含多种寡核苷酸类型的混合物。本文进一步描述示例性手性控制的寡核苷酸组合物。

[0119] 手性纯:本文中使用的短语“手性纯”用于描述手性控制的寡核苷酸组合物,其中所有寡核苷酸都关于键联磷以单一非对映异构形式存在。

[0120] 手性均一:本文中使用的短语“手性均一”用于描述寡核苷酸分子或类型,其中所有核苷酸单元都在键联磷处具有相同立体化学。例如,核苷酸单元都在键联磷处具有Rp立体化学的寡核苷酸是手性均一的。同样,核苷酸单元都在键联磷处具有Sp立体化学的寡核苷酸是手性均一的。

[0121] 预定:预定是指例如与随机发生或达到相反,蓄意地进行选择。本领域普通技术人员在阅读本说明书的情况下将了解,本发明提供了允许选择特定寡核苷酸类型来制备所提供的组合物和/或包括在所提供的组合物中,并且进一步允许精确控制任选地以所选特定相对量进行所选特定类型的制备,以制备所提供的组合物的新的且出人意料的技术。此类所提供的组合物如本文中所述是“预定的”。因为可含有某些个体寡核苷酸类型的组合物碰巧已通过不能被控制来有意产生特定寡核苷酸类型的过程产生,所以它们不是“预定”组合物。在一些实施方案中,预定组合物是可有意再产生(例如通过重复受控过程)的组合物。

[0122] 键联磷:如本文中所定义,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,所述磷原子对应于如存在于天然DNA和RNA中的核苷酸间键联的磷酸二酯的磷原子。在一些实施方案中,键联磷原子在经修饰核苷酸间键联中,其中磷酸二酯键联的各氧原子任选地且独立地被有机或无机部分替换。在一些实施方案中,键联磷原子是式I的P*。在一些实施方案中,键联磷原子是手性的。在一些实施方案中,手性键联磷原子是式I的P*。

[0123] P修饰:本文中使用的术语“P修饰”是指在键联磷处的除立体化学修饰以外的任何修饰。在一些实施方案中,P修饰包括添加、取代或移除共价连接于键联磷的侧基部分。在一些实施方案中,“P修饰”是-X-L-R^1,其中X、L和R^1各自独立地如本文以及以下所定义和描述。

[0124] 嵌段聚体(blockmer):本文中使用的术语“嵌段聚体”是指表征各个体核苷酸单元的结构特征样式的特征在于存在至少两个在核苷酸间磷键联处共有共同结构特征的连续核苷酸单元的寡核苷酸链。共同结构特征是指在键联磷处的共同立体化学或在键联磷处的共同修饰。在一些实施方案中,至少两个在核苷酸间磷键联处共有共同结构特征的连续核苷酸单元称为“嵌段”。

[0125] 在一些实施方案中,嵌段聚体是“立体嵌段聚体”,例如至少两个连续核苷酸单元在键联磷处具有相同立体化学。所述至少两个连续核苷酸单元形成“立体嵌段”。例如,(Sp,

Sp)-ATsCs1GA是立体嵌段聚体,因为至少两个连续核苷酸单元Ts和Cs1在键联磷处具有相同立体化学(均是Sp)。在相同寡核苷酸(Sp,Sp)-ATsCs1GA中,TsCs1形成嵌段,并且它是立体嵌段。

[0126] 在一些实施方案中,嵌段聚体是"P修饰嵌段聚体",例如至少两个连续核苷酸单元在键联磷处具有相同修饰。这样的至少两个连续核苷酸单元形成"P修饰嵌段"。例如,(Rp,Sp)-ATsCsGA是P修饰嵌段聚体,因为至少两个连续核苷酸单元Ts和Cs具有相同P修饰(即两者均是硫代磷酸二酯)。在相同寡核苷酸(Rp,Sp)-ATsCsGA中,TsCs形成嵌段,并且它是P修饰嵌段。

[0127] 在一些实施方案中,嵌段聚体是"键联嵌段聚体",例如至少两个连续核苷酸单元在键联磷处具有相同立体化学和相同修饰。至少两个连续核苷酸单元形成"键联嵌段"。例如,(Rp,Rp)-ATsCsGA是键联嵌段聚体,因为至少两个连续核苷酸单元Ts和Cs具有相同立体化学(均是Rp)和P修饰(均是硫代磷酸酯)。在相同寡核苷酸(Rp,Rp)-ATsCsGA中,TsCs形成嵌段,并且它是键联嵌段。

[0128] 在一些实施方案中,嵌段聚体包含一个或更多个独立地选自立体嵌段、P修饰嵌段和键联嵌段的嵌段。在一些实施方案中,嵌段聚体关于一个嵌段是立体嵌段聚体,和/或关于另一嵌段是P修饰嵌段聚体,和/或关于另一嵌段是键联嵌段聚体。例如,(Rp,Rp,Rp,Rp,Rp,Sp,Sp,Sp)-AAsTsCsGsAs1Ts1Cs1Gs1ATCG关于立体嵌段AsTsCsGsAs1(在键联磷处都是Rp)或Ts1Cs1Gs1(在键联磷处都是Sp)是立体嵌段聚体,关于P修饰嵌段AsTsCsGs(都是s键联)或As1Ts1Cs1Gs1(都是s1键联)是P修饰嵌段聚体,或关于键联嵌段AsTsCsGs(在键联磷处都是Rp,并且都是s键联)或Ts1Cs1Gs1(在键联磷处都是Sp,并且都是s1键联)是键联嵌段聚体。

[0129] 交替聚体(altmer):本文中使用的术语"交替聚体"是指表征每个单独核苷酸单元的结构特征样式的特征在于寡核苷酸链的两个连续核苷酸单元在核苷酸间磷键联处不共有特定结构特征的寡核苷酸链。在一些实施方案中,设计交替聚体以使其包含重复样式。在一些实施方案中,设计交替聚体以使其不包含重复样式。

[0130] 在一些实施方案中,交替聚体是"立体交替聚体",例如两个连续核苷酸单元在键联磷处不具有相同立体化学。例如,(Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC。

[0131] 在一些实施方案中,交替聚体是"P修饰交替聚体",例如两个连续核苷酸单元在键联磷处不具有相同修饰。例如,全(Sp)-CAs1GsT,其中各键联磷具有不同于其他键联磷的P修饰。

[0132] 在一些实施方案中,交替聚体是"键联交替聚体",例如两个连续核苷酸单元在键联磷处不具有相同立体化学或相同修饰。例如,(Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp)-GsCs1CsTs1CsAs1GsTs1CsTs1GsCs1TsTs2CsGs3CsAs4CsC。

[0133] 单聚体:本文中使用的术语"单聚体"是指表征每个单独核苷酸单元的结构特征样式使得链内所有核苷酸单元都在核苷酸间磷键联处共有至少一种共同结构特征的寡核苷酸链。共同结构特征是指在键联磷处的共同立体化学或在键联磷处的共同修饰。

[0134] 在一些实施方案中,单聚体是"立体单聚体",例如所有核苷酸单元都在键联磷处具有相同立体化学。例如,全-(Sp)-CsAs1GsT,其中所有键联都具有Sp磷。

[0135] 在一些实施方案中,单聚体是“P修饰单聚体”,例如所有核苷酸单元都在键联磷处具有相同修饰。例如,(Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC,其中所有核苷酸间键联都是硫代磷酸二酯。

[0136] 在一些实施方案中,单聚体是“键联单聚体”,例如所有核苷酸单元都在键联磷处具有相同立体化学和相同修饰。例如,全-(Sp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC,其中所有核苷酸间键联都是具有Sp键联磷的硫代磷酸二酯。

[0137] 间隔聚体佃apmer):本文中使用的术语“间隔聚体”是指特征在于寡核苷酸链的至少一个核苷酸间磷键联是磷酸二酯键联(例如存在于天然DNA或RNA中的那些)的寡核苷酸链。在一些实施方案中,寡核苷酸链的多于一个核苷酸间磷键联是磷酸二酯键联,如存在于天然DNA或RNA中的那些。例如,全-(Sp)-CAs1GsT,其中C与A之间的核苷酸间键联是磷酸二酯键联。

[0138] 跳跃聚体(skipmer):本文中使用的术语“跳跃聚体”是指一种类型的间隔聚体,其中寡核苷酸链的每隔一个核苷酸间磷键联是磷酸二酯键联,例如存在于天然DNA或RNA中的那些,并且寡核苷酸链的每隔一个核苷酸间磷键联是经修饰核苷酸间键联。例如,全-(Sp)-AsTCs1GAs2TCs3G。

[0139] 出于本发明的目的,化学元素是根据Handbook of Chemistry and Physics,第67版,1986-87内封面(inside cover)的CAS版元素周期表来确定。

[0140] 本文中所述的关于本发明的化合物和组合物的方法和结构也适用于这些化合物和组合物的可药用酸或碱加成盐和所有立体异构体形式。

附图说明

[0141] 图1.用大鼠肝匀浆物孵育后的反相HPLC。当在37℃下用大鼠全肝匀浆物孵育不同天数时测量剩余寡核苷酸的总量。发现ONT-154的体外代谢稳定性与具有2’-MOE翼区(wing)的ONT-87类似,同时二者具有比立构无规的2’-MOE间隔聚体(ONT-41,米泊美生(Mipomersen))更好的稳定。通过反相HPLC测量剩余全长寡聚体的量,其中用内标物将目标峰的峰面积归一化。

[0142] 图2.大鼠全肝匀浆物中米泊美生(ONT-41)的多种手性纯类似物的降解。当在37℃下用大鼠全肝匀浆物孵育不同天时测量剩余寡核苷酸的总量。发现人ApoB序列ONT-41(米泊美生)的手性纯非对映体的体外代谢稳定性随Sp核苷酸间键联的增多而提高。通过反相HPLC测量剩余全长寡聚体的量,其中用内标物将目标峰的峰面积归一化。

[0143] 图3.大鼠全肝匀浆物中小鼠ApoB序列(ISIS 147764,ONT-83)的多种手性纯类似物的降解。当在37℃下用大鼠全肝匀浆物孵育不同天数时测量剩余寡核苷酸的总量。发现鼠ApoB序列(ONT-83,2’-MOE间隔聚体,立构无规硫代磷酸酯)的手性纯非对映体的体外代谢稳定性随Sp核苷酸间键联的增多而提高。通过反相HPLC测量剩余全长寡聚体的量,其中用内标物将目标峰的峰面积归一化。

[0144] 图4.经过24小时的一段时间后大鼠全肝匀浆物中米泊美生类似物ONT-75的降解。图示出了大鼠全肝匀浆物中ONT-75的稳定性。

[0145] 图5.经过24小时的一段时间后大鼠全肝匀浆物中米泊美生类似物ONT-81的降解。该图示出了大鼠全肝匀浆物中ONT-81的稳定性。

[0146] 图6.ONT-87、ONT-88和ONT-89的敲减(knockdown)的持续时间。立体异构体可表现出显著不同的敲减持续时间。ONT-87导致比其立体异构体显著更持久的抑制。在多项体内研究中观察到了ONT-87作用持续时间的延长。在某些体内研究中,ONT-88表现出与ONT-41(米泊美生)类似的效力和回收谱(recovery profile)。给予Hu ApoB转基因小鼠(n＝4)10mpk IP推注,2X/周,持续三周。将小鼠随机化分到研究组中,在第1、4、8、11、15、18和22天,基于在每个给药天给药之前测量的个体小鼠体重以10mg/kg腹膜内(IP)给药。在第0、17、24、31、38、45和52天通过颌下(颊)出血以及在第52天处死时通过心脏穿刺收集血液,然后处理成血清。通过ELISA测量ApoB。显著的:给药后3周时保持72%对比于35%的敲减。

[0147] 图7.HPLC谱,表现了在人血清中确定的具有多个Rp、Sp或立构无规硫代磷酸酯键联的siRNA双链体的代谢稳定性的差异。

[0148] 图8.立体化学对RNase H活性的影响。使寡核苷酸与RNA杂交,然后在1×RNase H缓冲液的存在下在37℃用RNase H孵育。在120分钟时从上到下为:ONT-89、ONT-77、ONT-81、ONT-80、ONT-75、ONT-41、ONT-88、ONT-154、ONT-87,ONT-77/154彼此非常接近。

[0149] 图9.在与靶向人ApoB mRNA的同一区域的硫代磷酸酯寡核苷酸的立体异构体的不同制备物杂交时,20聚体RNA的人RNase H1切割的分析。切割的特异性位点受不同立体化学的强烈影响。箭头表示切割的位置(切割位点)。通过UPLC/MS分析产物。箭头的长度表示反应混合物中存在的产物的量,其由UV峰面积与该片段的理论消光系数的比例确定(箭头越大,检出的切割产物越多)。(A):切割图的图例。(B)和(C):寡核苷酸的切割图。

[0150] 图10.不同寡核苷酸组合物的切割图((A)-(C))。这三个序列靶向FOXO1 mRNA中的不同区域。每个序列利用五种不同化学过程研究。切割图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体30分钟后获得的反应混合物。箭头表示切割位点,(┬)表示在反应混合物中鉴定了5'-磷酸酯物质和5'-OH 3'-OH物质两种片段。(┌)表示仅检出5'-磷酸酯物质,(┐)表示在质谱分析中仅检出了5'-OH 3'-OH组分。箭头长度表示反应混合物中存在的产物的量,其由UV峰面积与所述片段的理论消光系数的比例确定(箭头越大,检出的切割产物越多)。仅在反应混合物中不能检出5'-OH 3'-OH的情况下,将5'-磷酸酯物质峰用于量化。通过由反相HPLC测量的反应混合物中剩余的全长RNA的量确定切割速率。在固定时间点通过30mM Na_2EDTA淬灭反应。

[0151] 图11.具有不同共有碱基序列和长度的寡核苷酸组合物的切割图((A)-(B))。图示出了立构无规DNA组合物(上图)和三种不同的且立体化学纯的寡核苷酸组合物的比较。数据比较了手性控制的寡核苷酸组合物与靶向FOXO1 mRNA中的不同区域的两种立构无规硫代磷酸酯寡核苷酸组合物(ONT-366和ONT-367)的结果。每个图示出了立构无规DNA(上图)和三种不同的且立体化学纯的寡核苷酸制备物的比较。切割图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体30分钟后获得的反应混合物。箭头表示切割位点,(┬)表示在反应混合物中鉴定了5'-磷酸酯物质和5'-OH 3'-OH物质两种片段。(┌)表示仅检出5'-磷酸酯物质,(┐)表示在质谱分析中仅检出了5'-OH 3'-OH组分。箭头长度表示反应混合物中存在的产物的量,其由UV峰面积与所述片段的理论消光系数的比例确定(箭头越大,检出的切割产物越多)。仅在反应混合物中不能检出5'-OH 3'-OH的情况下,将5'-磷酸酯物质峰用于量化。

[0152] 图12.立体化学对RNase H活性的影响。在两个独立的实验中，使靶向FOXO1 mRNA的相同区域的反义寡核苷酸与NRA杂交，然后在1×RNase H缓冲液的存在下于37℃用RNase H孵育。使用RP-HPLC由全长RNA在254nm的峰面积测量全长RNA的消失。A)：在60分钟时从上到下：ONT-355、ONT-316、ONT-367、ONT-392、ONT-393和ONT-394(60分钟时ONT-393和ONT-394大致相同；在5分钟时ONT-393具有更高的％剩余RNA底物)。(B)：在60分钟时从上到下：ONT-315、ONT-354、ONT-366、ONT-391、ONT-389和ONT-390。通过由反相HPLC测量的反应混合物中剩余的全长RNA的量确定切割速率。在固定时间点通过30mM Na_2EDTA淬灭反应。

[0153] 图13.反义寡核苷酸的周转(Turnover)。制备双链体，每个DNA链浓度等于6μM，RNA为100μM。将这些双链体用0.02μM RNase H酶孵育，并且使用RP-HPLC由全长RNA在254nm的峰面积测量全长RNA的消失。通过由反相HPLC测量的反应混合物中剩余的全长RNA的量确定切割速率。在固定时间点通过30mM Na_2EDTA淬灭反应。在40分钟时从上到下：ONT-316、ONT-367和ONT-392。

[0154] 图14.比较无规硫代磷酸酯寡核苷酸和靶向同一FOXO1 mRNA区域的六种不同的且立体化学纯的寡核苷酸制备物的切割图。

[0155] 图15.立体化学对RNase H活性的影响。使反义寡核苷酸与NRA杂交，然后在1×RNase H缓冲液的存在下于37℃用RNase H孵育。观察立体化学对RNase H活性的依赖性。ONT-367(无规DNA)与ONT-316(5-10-52’-MOE间隔聚体)的比较中也明显的是组成化学物质对RNase H活性的依赖性。在40分钟时从上到下：ONT-316、ONT-421、ONT-367、ONT-392、ONT-394、ONT-415和ONT-422(在40分钟时ONT-394/415/422具有类似水平；在5分钟时，DNA/RNA双链体中％剩余RNA为ONT-422＞ONT-394＞ONT-415)。

[0156] 图16.立体化学对RNase H活性的影响。使靶向FOXO1 mRNA的相同区域的反义寡核苷酸与NRA杂交，然后在1×RNase H缓冲液的存在下于37℃用RNase H孵育。观察立体化学对RNase H活性的依赖性。在40分钟时从上到下：ONT-396、ONT-409、ONT-414、ONT-408(40分钟时ONT-396/409/414/408具有类似水平)、ONT-404、ONT-410、ONT-402(40分钟时ONT-404/410/408有类似水平)、ONT-403、ONT-407、ONT-405、ONT-401、ONT-406和ONT-400(40分钟时ONT-401/405/406/400有类似水平)。

[0157] 图17.立体化学对RNase H活性的影响。使靶向FOXO1 mRNA的相同区域的反义寡核苷酸与NRA杂交，然后在1×RNase H缓冲液的存在下于37℃用RNase H孵育。观察立体化学对RNase H活性的依赖性。观察到ONT-406以稍微超过磷酸二酯寡核苷酸ONT-415的速率引起双链体RNA的切割。在40分钟时从上到下：ONT-396、ONT-421、ONT-392、ONT-394、ONT-415ONT-406和ONT-422(40分钟时ONT-394/415/406有类似水平；在5分钟时，DNA/RNA双链体中的％剩余RNA为ONT-394＞ONT-415＞ONT-406)。

[0158] 图18.当RNA(ONT-388)与立构无规DNA ONT-367(上)和具有重复三联体基序3’-SSR-5’的立体纯DNA ONT-394(下)形成双链体时获得的RNA切割产物的示例性UV色谱图。2.35分钟：7聚体；3.16分钟：8聚体和p-6聚体；4.48分钟：P-7聚体；5.83分钟：P-8聚体；6.88分钟：12聚体；9.32分钟：13聚体；10.13分钟：P-11聚体；11.0分钟：P-12聚体和14聚体；11.93分钟：P-13聚体；13.13分钟：P-14聚体。ONT-394(最下面)峰分配：4.55分钟：p-7聚体；4.97分钟：10聚体；9.53分钟：13聚体。

[0159] 图19.RNA切割产物的电喷雾电离质谱。当在1×RNase H缓冲液的存在下用RNase

H孵育这些双链体30分钟时，上面为由双链体ONT-387，RNA/ONT-354，(7-6-7，DNA-2'-OMe-DNA)获得的RNA片段，下面为由ONT-387，RNA/ONT-315，(5-10-5，2'-MOE间隔聚体)获得的RNA片段。

[0160] 图20.在用RNase H孵育30分钟后ONT-406和ONT-388双链体的UC色谱图和TIC。

[0161] 图21.示例性的提出的切割。假设手性控制的寡核苷酸组合物能够如所述切割靶标。

[0162] 图22.靶向突变亨廷顿mRNA的示例性的等位基因特异性切割。(A)和(B)：示例性寡核苷酸。(C)-(E)：切割图。(F)-(H)：RNA切割。制备立构无规和手性控制的寡核苷酸组合物，以靶向用于等位基因选择性地抑制突变亨廷顿的单核苷酸多态性。靶向ONT-453(muHTT)和ONT-454(wtHTT)的ONT-450(立构无规)在RNA切割及其切割图中表现出微小差异。靶向ONT-453(muHTT)和ONT-454(wtHTT)的3'-SSR-5'基序在RNase H识别位点中具有选择性落点(placement)的手性控制的ONT-451在RNA切割速率中表现出大的差异。从切割图中，值得注意的是，设置3'-SSR-5'基序以指导在第8位和第9位之间切割，如果从RNA的5′端阅读，其在错配之后。靶向ONT-453(muHTT)和ONT-454(wtHTT)的3'-SSR-5'基序在RNase H识别位点中具有选择性落点的ONT-452在RNA切割速率中具有适度差异。设置3'-SSR-5'基序以指导在第7位和第8位之间切割，如果从RNA的5′端阅读，其在错配之前。示例性数据说明了3'-SSR-5'基序落点位置对于实现提高的等位基因特异性切割的辨别的意义。所有切割图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体30分钟后获得的反应混合物。箭头表示切割位点，(┬)表示在反应混合物中鉴定了5'-磷酸酯物质和5'-OH 3'-OH物质两种片段。(┌)表示仅检出5'-磷酸酯物质，(┐)表示在质谱分析中仅检出了5'-OH 3'-OH组分。箭头长度表示反应混合物中存在的代谢物的量，其由UV峰面积与所述片段的理论消光系数的比例确定。仅在反应混合物中不能检出5'-OH 3'-OH的情况下，将5'-磷酸酯物质峰用于量化。

[0163] 图23.(A)-(C)：靶向FOXO1 mRNA的示例性定位基因特异性切割。

[0164] 图24.用ApoB寡核苷酸处理后ApoB mRNA的体外剂量响应沉默。具有或不具有2'-MOE翼区的立体化学纯的非对映体表现出与ONT-41(米泊美生)类似的效力。

[0165] 图25.立构无规组合物(ONT-367)与手性控制的寡核苷酸组合物(ONT-421，全Sp，以及ONT-455，全Rp)和DNA(ONT-415)的RNase H切割图(A)和RNA切割速率(B)的比较。这些序列靶向FOXO1 mRNA中的相同区域。切割图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体5分钟后获得的反应混合物。箭头表示切割位点，(┬)表示在反应混合物中鉴定了5'-磷酸酯物质和5'-OH 3'-OH物质两种片段。(┌)表示仅检出5'-磷酸酯物质，(┐)表示在质谱分析中仅检出了5'-OH 3'-OH组分。箭头长度表示反应混合物中存在的代谢物的量，其由UV峰面积与所述片段的理论消光系数的比例确定。仅在反应混合物中不能检出5'-OH 3'-OH的情况下，将5'-磷酸酯物质峰用于量化。通过由反相HPLC测量的反应混合物中剩余的全长RNA的量确定切割速率。在固定时间点通过30mM Na_2EDTA淬灭反应。

[0166] 图26.含有位置从DNA的3'端开始变化的一个Rp的序列的切割图的比较。这些序列靶向FOXO1 mRNA中的相同区域。切割图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体5分钟后获得的反应混合物。箭头表示切割位点，(┬)表示在反应混合物中

鉴定了5’-磷酸酯物质和5’-OH 3’-OH物质两种片段。(┌)表示仅检出5’-磷酸酯物质，(┐)表示在质谱分析中仅检出了5’-OH 3’-OH组分。箭头长度表示反应混合物中存在的代谢物的量，其由UV峰面积与所述片段的理论消光系数的比例确定。仅在反应混合物中不能检出5’-OH 3’-OH的情况下，将5’-磷酸酯物质峰用于量化。

[0167] 图27.(A)立体纯寡核苷酸(ONT-406)、(ONT-401)、(ONT-404)和(ONT-408)的RNase H切割速率的比较。所有四个序列是具有一个Rp键联的立体纯硫代磷酸酯。这些序列靶向FOXO1 mRNA中的相同区域。所有双链体在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育。在固定时间点通过30mM Na_2EDTA淬灭反应。通过由反相HPLC测量的反应混合物中剩余的全长RNA的量确定切割速率。发现ONT-406和ONT-401具有优异的切割速率。(B)RNase H测定(10μM寡核苷酸)中％切割的RNA和体内测定(20nM寡核苷酸)中％RNA敲减之间的相关性。所有序列靶向FOXO1 mRNA中的相同区域。当相对于相同反应混合物的DNA归一化时，通过RNA的UV峰面积确定剩余RNA的量。所有上图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体5分钟后获得的反应混合物。ONT-396至ONT-414的所有序列具有一个Rp硫氮磷酸酯并且其Rp的位置不同。ONT-421(全Sp)硫代磷酸酯在体外测定中无活性。其符合当ONT-421与互补RNA形成双链体时RNase H测定中RNA差的切割速率。

[0168] 图28.在大鼠血清中2天，单Rp行进(walk)PS DNA(ONT-396-ONT-414)、立构无规PS DNA(ONT-367)、全-Sp PS DNA(ONT-421)和全-Rp PS DNA(ONT-455)的血清稳定性测定。注意的是在测试终点ONT-396和ONT-455分解。

[0169] 图29.含有半聚体(hemimer)的示例性寡核苷酸。(A)：切割图。(B)：RNA切割测定。(C)：FOXO1 mRNA敲减。在一些实施方案中，在序列的5’-端引入2’-修饰提高了与靶RNA结合的稳定性，同时保持了RNase H活性。在RNase H测定(10μM寡核苷酸)中，ONT-367(立构无规硫代磷酸酯DNA)和ONT-440(5-15，2’-F-DNA)具有类似的切割图和类似的RNA切割速率。在一些实施方案中，ONT-440(5-11，2’-F-DNA)可具有更好的细胞渗透特性。在一些实施方案中，不对称2’-修饰提供了Tm优点，同时保持了RNase H活性。引入RSS基序可以进一步提高半聚体中的RNase H效率。切割图来自于在1×PBS缓冲液的存在下于37℃用RNase H1C孵育各双链体5分钟后获得的反应混合物。箭头表示切割位点，(┬)表示在反应混合物中鉴定了5’-磷酸酯物质和5’-OH 3’-OH物质两种片段。(┌)表示仅检出5’-磷酸酯物质，(┐)表示在质谱分析中仅检出了5’-OH 3’-OH组分。箭头长度表示反应混合物中存在的代谢物的量，其由UV峰面积与所述片段的理论消光系数的比例确定。仅在反应混合物中不能检出5’-OH 3’-OH的情况下，将5’-磷酸酯物质峰用于量化。

[0170] 图30.切割测定的示例性质谱数据。上：ONT-367的数据：2.35分钟：7聚体；3.16分钟：8聚体和P-6聚体；4.58分钟：P-7聚体；5.91分钟：P-8聚体；7.19分钟：12聚体；9.55分钟：13聚体；10.13分钟：P-11聚体；11.14分钟：P-12聚体和14聚体；12.11分钟：P-13聚体；13.29分钟：P-14聚体；14.80分钟：全长RNA(ONT-388)，以及18.33分钟：立构无规DNA(ONT-367)。下：ONT-406的数据：4.72分钟：p-rArUrGrGrCrUrA，5’-磷酸化7聚体RNA；9.46分钟：5’-rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrA，5’-OH 3’-OH 13聚体RNA；16.45分钟：全长RNA(ONT-388)；19.48和19.49分钟：立体纯DNA(ONT-406)。

具体实施方式

[0171] 合成寡核苷酸提供在广泛多种应用中可用的分子工具。例如，寡核苷酸可用于治疗、诊断、研究和新型纳米材料应用中。天然核酸(例如未经修饰DNA或RNA)的使用例如因其易受核酸内切酶和核酸外切酶影响而受限制。因此，多种合成对应物已被开发来避免这些缺点。这些包括含有致使这些分子较不易受降解影响的骨架修饰的合成寡核苷酸。从结构观点来看，对核苷酸间磷酸酯键联的所述修饰引入手性。已变得明确的是寡核苷酸的某些性质可受形成寡核苷酸的骨架的磷原子的构型影响。例如，体外研究已显示反义核苷酸的性质(如结合亲和力、结合互补RNA的序列特异性、对核酸酶的稳定性)尤其受骨架的手性(例如磷原子的构型)影响。

[0172] 本发明尤其涵盖以下认识：立构无规寡核苷酸制备物包含多个不同的化学实体，所述化学实体彼此的差异在于寡核苷酸链内的个体骨架手性中心的立体化学结构。另外，本发明涵盖以下见解：立构无规寡核苷酸制备物通常不可能包含相关核苷酸的每种可能的立体异构体。因此，本发明尤其提供了目标寡核苷酸的特定立体异构体的新化学实体。也就是说，本发明提供了单一核苷酸化合物的基本上纯的制备物，其中特定寡核苷酸化合物可以通过其碱基序列、其长度、其骨架键联样式及其骨架手性中心样式定义。

[0173] 本发明尤其证明，特定寡核苷酸的个体立体异构体可能表现出彼此不同的稳定性和/或活性。另外，本公开内容证明，通过寡核苷酸内特定手性中心的引入和/或定位实现的稳定性改善可相当于或甚至优于通过使用某些经修饰骨架、碱基和/或糖(例如，通过使用某些类型的经修饰磷酸酯、2'-修饰、碱基修饰等)实现的那些。本公开内容在一些实施方案中还证明，通过寡核苷酸内特定手性中心的引入和/或定位实现的活性改善可相当于或甚至优于通过使用某些经修饰骨架、碱基和/或糖(例如，通过使用某些类型的经修饰磷酸酯、2'-修饰、碱基修饰等)实现的那些。在一些实施方案中，当寡核苷酸用于切割所述核酸聚合物时，寡核苷酸内特定手性中心的引入和/或定位可以出人意料地改变所述核酸聚合物的切割样式。例如，在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了靶核酸聚合物的出人意料的高切割效率。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了新切割位点。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了更少切割位点，例如，通过阻断某些已经存在的切割位点。甚至更出人意料地，在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了靶核酸聚合物的与用于切割的寡核苷酸互补的序列内的仅一个位点的切割。在一些实施方案中，通过选择用于最小化切割位点数目的骨架手性中心样式，实现了更高切割效率。

[0174] 在一些实施方案中，本发明提供了手性控制(和/或立体化学纯)的寡核苷酸组合物，其包含通过具有以下来定义的寡核苷酸：

[0175] 1)共同碱基序列和长度；

[0176] 2)共同骨架键联样式；和

[0177] 3)共同骨架手性中心样式，所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物，其中所述组合物中至少约10％的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。寡核苷酸的骨架手性中心样式可以通过从5'到3'的键联磷立体化学(Rp/Sp)的组合表示。例如，如下文示例的，ONT-154具有5S-$(SSR)_3$-5S样式，ONT-80具有S_{19}。

[0178] 在一些实施方案中，本发明提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物，其中

相对于相同寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中，本发明提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物，其中相对于相同寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸共有以下：

[0179] 1)共同碱基序列和长度；

[0180] 2)共同骨架键联样式；和

[0181] 3)共同骨架手性中心样式。

[0182] 在一些实施方案中，在寡核苷酸的基本上外消旋(或手性未控制)的制备物中，全部或大部分偶联步骤不是手性控制的，其中偶联步骤不是特别进行以提供增强的立体选择性。寡核苷酸的示例性的基本上外消旋制备物是通过用二硫化四乙基秋兰姆(tteraethylthiuram disulfide)或(TETD)或者3H-1,2-苯二硫醇-3-酮1,1-二氧化物(BDTD)对亚磷酸三酯进行本领域中公知的硫化过程的硫代磷酸酯寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，寡核苷酸的基本上外消旋的制备物提供了基本上外消旋的寡核苷酸组合物(或手性未控制的寡核苷酸组合物)。

[0183] 在一些实施方案中，本发明提供了手性控制的寡核苷酸组合物，其包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[0184] 1)共同碱基序列和长度；

[0185] 2)共同骨架键联样式；和

[0186] 3)共同骨架手性中心样式；

[0187] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是一种寡核苷酸类型的基本上纯的制备物，其中组合物中不是所述寡核苷酸类型的寡核苷酸是来自所述寡核苷酸类型的制备过程的杂质，在一些情况下，在某些纯化操作之后。

[0188] 在一些实施方案中，组合物中至少约20％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约25％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约30％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约35％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约40％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约45％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约50％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约55％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约60％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约65％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约70％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、

共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约75％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约80％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约85％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约90％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约92％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约94％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约95％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中至少约91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，组合物中大于约99％的寡核苷酸具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式。在一些实施方案中，寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物的纯度可以表示为组合物中具有共同碱基序列和长度、共同骨架键联样式和共同骨架手性中心样式的寡核苷酸的百分比。

[0189] 在一些实施方案中，寡核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物的纯度表示为组合物中所述寡核苷酸类型的寡核苷酸的百分比。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约10％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约20％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约30％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约40％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约50％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约60％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约70％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约80％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约90％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约92％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约94％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约95％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约96％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约97％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约98％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少约99％的寡核苷酸为相同寡核苷酸类型。

[0190] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物的纯度可以通过其制备过程中每个偶联步骤的立体选择性控制。在一些实施方案中，偶联步骤具有60％的立体选择性(例

如,非对映体选择性)(由偶联步骤形成的60%新核苷酸间键联具有预期的立体化学)。在这样的偶联步骤后,形成的新核苷酸间键联可指具有60%纯度。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少60%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少70%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少80%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少85%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少90%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少91%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少92%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少93%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少94%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少95%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少96%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少97%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少98%的立体选择性。在一些实施方案中每个偶联步骤具有至少99%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有至少99.5%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有几乎100%的立体选择性。在一些实施方案中,每个偶联步骤具有几乎100%的立体选择性,其中通过分析方法(例如,NMR、HPLC等),来自偶联步骤的所有可检测产物具有预期立体选择性。

[0191] 在一些实施方案中,提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是反义寡核苷酸(例如,chiromersen)。在一些实施方案中,提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是siRNA寡核苷酸。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物是可以是以下的寡核苷酸:反义寡核苷酸、微小RNA拮抗剂(antagomir)、微小RNA(microRNA)、前微小RNA(pre-microRN)、反义微小RNA(antimir)、超微小RNA(supermir)、核酶(ribozyme)、U1衔接头(Ul adaptor)、RNA活化剂、RNAi剂、诱饵寡核苷酸(decoy oligonucleotide)、成三链体寡核苷酸(triplex forming oligonucleotide)、适体(aptamer)或佐剂(adjuvant)。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是反义寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是微小RNA拮抗剂寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是微小RNA寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是前微小RNA寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是反义微小RNA寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是超微小RNA寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是核酶寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是U1衔接头寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是RNA活化剂寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是RNAi剂寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是诱饵寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是成三链体寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是适体寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物是佐剂寡核苷酸的组合物。

[0192] 在一些实施方案中,提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是包含一个或更多个经修饰骨架键联、碱基和/或糖的寡核苷酸的制备物。

[0193] 在一些实施方案中,提供的核苷酸包含一个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中,提供的核苷酸包含两个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实

施方案中，提供的核苷酸包含三个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的核苷酸包含四个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的核苷酸包含五个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的核苷酸包含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个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含5个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含6个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含7个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含8个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含9个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含10个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含11个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含12个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含13个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含14个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含15个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含16个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含17个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含18个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含19个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含20个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含21个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含22个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含23个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含24个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸类型包含25个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。

[0194] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％手性的经修饰磷酸酯键联。这样的示例性手性的经修饰磷酸酯键联描述在上文和本文中。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％的Sp构型的手性的经修饰磷酸酯键联。

[0195] 在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约80％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约85％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约90％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有大于约91％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约92％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约93％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约94％的立体化学纯度。在一些

实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约95％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约96％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约97％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约98％的立体化学纯度。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物具有大于约99％的立体化学纯度。

[0196] 在一些实施方案中，手性的经修饰磷酸键联是手性硫代磷酸酯键联，即硫代磷酸酯核苷酸间键联，在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，所有手性的经修饰磷酸键联是手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约10％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约20％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约30％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约40％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约50％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约60％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约70％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约80％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约95％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Sp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约10％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约20％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约30％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约40％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约50％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约60％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约70％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约80％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的至少约95％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约10％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约20％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约30％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供

的寡核苷酸的小于约40％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约50％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约60％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约70％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约80％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的小于约95％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联为Rp构象。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸具有仅一个Rp手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸具有仅一个Rp手性硫代磷酸酯核苷酸间键联，其中所有核苷酸间键联为手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，手性硫代磷酸酯核苷酸间键联是手性硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，每个手性硫代磷酸酯核苷酸间键联独立地是手性硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，每个核苷酸间键联独立地是手性硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，每个核苷酸间键联独立地是手性硫代磷酸二酯键联，并且仅一个是Rp。

[0197] 在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是包含一个或更多个经修饰碱基的寡核苷酸的。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是不包含经修饰碱基的寡核苷酸的。示例性的这种经修饰碱基在上文和本文中描述。

[0198] 在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少8个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少9个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是是具有至少10个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少11个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少12个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少13个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少14个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少15个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少16个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少17个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少18个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少19个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少20个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少21个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少22个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的

制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少23个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少24个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少25个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是具有至少30、35、40、45、50、55、60、65、70或75个碱基之共同碱基序列的寡核苷酸的制备物。

[0199] 在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物包含含有在糖部分修饰的一个或更多个残基的寡核苷酸。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物包含含有在糖部分的2'位置修饰(在本文中也称为"2'-修饰")的一个或更多个残基的寡核苷酸。示例性的这种修饰在上文和本文中描述，并且包括但不限于2'-OMe、2'-MOE、2'-LNA、2'-F等。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)制备物包含含有一个或更多个2'-修饰之残基的寡核苷酸。例如，在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个为2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)修饰残基的残基。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)制备物包含不含有任何2'-修饰的寡核苷酸。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)的制备物是不含任何2'MOE残基的寡核苷酸。即，在一些实施方案中，提供的寡核苷酸不是MOE-修饰的。

[0200] 在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)寡核苷酸具有翼区-核心-翼区(在本文中也一般表示为X-Y-X)的遗传基序。在一些实施方案中，每个翼区包含一个或更多个具有特定修饰的残基，所述修饰在核心不存在于"Y"部分中。在一些实施方案中，每个翼区包含一个或更多个具有2′修饰的残基，所述2'修饰不存在于核心部分中。例如，在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)寡核苷酸具有表示为X-Y-X的翼区-核心-翼区基序，其中每个"X"部分的残基是特定类型的2'修饰残基，并且核心"Y"部分中的残基不是相同特定类型的2'修饰残基。例如，在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)寡核苷酸具有表示为X-Y-X的翼区-核心-翼区基序，其中每个"X"部分的残基是2'-MOE修饰残基，并且核心"Y"部分中的残基不是2'-MOE修饰残基。在一些实施方案中，提供的手性控制(和/或立体化学纯)寡核苷酸具有表示为X-Y-X的翼区-核心-翼区基序，其中每个"X"部分的残基是2'-MOE修饰残基，并且核心"Y"部分中的残基是2'-脱氧核糖核苷酸。相关领域技术人员将承认，上文和本文描述的所有这样的2'-修饰均考虑在这样的X-Y-X基序的范围内。

[0201] 在一些实施方案中，每个翼区独立地具有一个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有两个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有三个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有四个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有五个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有六个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有七个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有八个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有九个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，每个翼区独立地具有十个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，每个翼区具有一个碱基的长度。在某些实施方案中，每个翼区具有两个碱基的长度。在某些实施方案

中，每个翼区具有三个碱基的长度。在某些实施方案中，每个翼区具有四个碱基的长度。在某些实施方案中，每个翼区具有五个碱基的长度。

[0202] 在一些实施方案中，核心区域具有一个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有一个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有两个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有三个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有四个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有五个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有六个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有七个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有八个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有九个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有十个或更多个碱基的长度。在一些实施方案中，核心区域具有11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有十个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有3个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有4个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有5个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有6个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有7个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有8个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有9个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有10个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有11个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有12个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有13个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有14个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有15个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有16个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有17个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有18个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有19个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有11个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有12个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有13个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有14个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有15个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有16个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有17个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有18个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有19个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有20个或更多个碱基的长度。在某些实施方案中，核心区域具有大于20个或更多个碱基的长度。

[0203] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的翼区-核心-翼区(即，X-Y-X)基序在数值上表示为例如5-10-5，意味着寡核苷酸的每个翼区为5个碱基长度，并且寡核苷酸的核心区域是10个碱基长度。在一些实施方案中，是例如翼区-核心-翼区基序为例如2-16-2、3-14-3、4-12-4、5-10-5等中的任一个。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序为5-10-5。

[0204] 在一些实施方案中，提供的这种翼区-核心-翼区(即，X-Y-X)基序的寡核苷酸的核苷酸间键联全部是手性的经修饰磷酸酯键联。在一些实施方案中，提供的这种翼区-核心-翼区(即，X-Y-X)基序的寡核苷酸的核苷酸间键联全部是手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，提供的这种翼区-核心-翼区基序的寡核苷酸的核苷酸间键联是至少约10％、20％、30％、40％、50％、50％、70％、80％或90％手性的经修饰磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，提供的这种翼区-核心-翼区基序的寡核苷酸的手性寡核苷酸的核苷酸

间键联是至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，提供的这种翼区-核心-翼区基序的寡核苷酸的手性寡核苷酸的核苷酸间键联是至少约10％、20％、30％、40％、50％、50％、70％、80％或90％Sp构象的手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0205] 在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的每个翼区任选地包含手性的经修饰磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的每个翼区任选地包含手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的每个翼区包含手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的两个翼区具有相同的核苷酸间键联立体化学。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的两个翼区具有不同的核苷酸间键联立体化学。在一些实施方案中，翼区的每个核苷酸间键联独立地为手性核苷酸间键联。

[0206] 在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域任选地包含手性的经修饰磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域任选地包含手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含核苷酸间键联立体化学的重复样式。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是(Sp)mRp或Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是(Sp)mRp或Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是(Sp)mRp，其中m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是(Sp)mRp或Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是包含至少33％S构象的核苷酸间键联的基序。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是包含至少50％S构象的核苷酸间键联的基序。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是包含至少66％S构象的核苷酸间键联的基序。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是选自RpRpSp和SpSpRp的重复三联体基序。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是重复RpRpSp。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式，其中所述重复样式是重复SpSpRp。

[0207] 在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含(Sp)mRp或Rp(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含Rp(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在

核心区域的骨架手性中心样式包含(Sp)mRp。在一些实施方案中，m是2。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含Rp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含(Sp)$_2$Rp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含(Rp)$_2$Rp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含RpSpRp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含SpRpRp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含(Sp)$_2$Rp。

[0208] 在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Sp)mRp或Rp(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含Rp(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Sp)mRp。在一些实施方案中，m是2。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含Rp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Sp)$_2$Rp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Rp)$_2$Rp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含RpSpRp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含SpRpRp(Sp)$_2$。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其在核心区域的骨架手性中心样式包含(Sp)$_2$Rp。

[0209] 如本文中限定的，m是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，m是3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，m是4、5、6、7或8。在一些实施方案中，m是5、6、7或8。在一些实施方案中，m是6、7或8。在一些实施方案中，m是7或8。在一些实施方案中，m是2。在一些实施方案中，m是3。在一些实施方案中，m是4。在一些实施方案中，m是5。在一些实施方案中，m是6。在一些实施方案中，m是7。在一些实施方案中，m是8。

[0210] 在一些实施方案中，重复样式是(Sp)m(Rp)n，其中n独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，并且m独立地如上文中所限定和本文中所述。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Sp)m(Rp)n。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其核心区域中的骨架手性中心样式包含(Sp)m(Rp)n。在一些实施方案中，重复样式是(Rp)n(Sp)m，其中n独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，并且m独立地如上文中所限定和本文中所述。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其核心区域中的骨架手性中心样式包含(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，(Rp)n(Sp)m是(Rp)(Sp)$_2$。在一些实施方案中，(Sp)n(Rp)m是(Sp)$_2$(Rp)。

[0211] 在一些实施方案中，重复样式是(Sp)m(Rp)n(Sp)t，其中n和t各自独立地是1、2、3、

4、5、6、7或8，并且m独立地如上文中所限定和本文中所述。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Sp)m(Rp)n(Sp)t。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其核心区域中的骨架手性中心样式包含(Sp)m(Rp)n(Sp)t。在一些实施方案中，重复样式是(Sp)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，并且m独立地如上文中所限定和本文中所述。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Sp)t(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其核心区域中的骨架手性中心样式包含(Sp)t(Rp)n(Sp)m。

[0212] 在一些实施方案中，重复样式是(Np)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，Np独立地是Rp或Sp，并且m独立地如上文中所限定和本文中所述。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Np)t(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其核心区域中的骨架手性中心样式包含(Np)t(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，重复样式是(Np)m(Rp)n(Sp)t，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，Np独立地是Rp或Sp，并且m独立地如上文中所限定和本文中所述。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其骨架手性中心样式包含(Np)m(Rp)n(Sp)t。在一些实施方案中，本发明提供了核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物，其核心区域中的骨架手性中心样式包含(Np)m(Rp)n(Sp)t。在一些实施方案中，Np是Rp。在一些实施方案中，Np是Sp。在一些实施方案中，所有Np相同。在一些实施方案中，所有Np是Sp。在一些实施方案中，至少一个Np不同于其他Np。在一些实施方案中，t是2。

[0213] 如本文中限定的，n是1、2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，n是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，n是3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，n是4、5、6、7或8。在一些实施方案中，n是5、6、7或8。在一些实施方案中，n是6、7或8。在一些实施方案中，n是7或8。在一些实施方案中，n是1。在一些实施方案中，n是2。在一些实施方案中，n是3。在一些实施方案中，n是4。在一些实施方案中，n是5。在一些实施方案中，n是6。在一些实施方案中，n是7。在一些实施方案中，n是8。

[0214] 如本文中限定的，t是1、2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，t是2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，t是3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中，t是4、5、6、7或8。在一些实施方案中，t是5、6、7或8。在一些实施方案中，t是6、7或8。在一些实施方案中，t是7或8。在一些实施方案中，t是1。在一些实施方案中，t是2。在一些实施方案中，t是3。在一些实施方案中，t是4。在一些实施方案中，t是5。在一些实施方案中，t是6。在一些实施方案中，t是7。在一些实施方案中，t是8。

[0215] 在一些实施方案中，m和t中的至少一个大于2。在一些实施方案中，m和t中的至少一个大于3。在一些实施方案中，m和t中的至少一个大于4。在一些实施方案中，m和t中的至少一个大于5。在一些实施方案中，m和t中的至少一个大于6。在一些实施方案中，m和t中的至少一个大于7。在一些实施方案中，m和t中的每一个大于2。在一些实施方案中，m和t中的每一个大于3。在一些实施方案中，m和t中的每一个大于4。在一些实施方案中，m和t中的每一个大于5。在一些实施方案中，m和t中的每一个大于6。在一些实施方案中，m和t中的每一个大于7。

[0216] 在一些实施方案中，n是1，并且m和t中的至少一个大于1。在一些实施方案中，n是1，并且m和t各自独立地大于1。在一些实施方案中，m＞n并且t＞n。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_2Rp(Sp)_2$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_2Rp(Sp)_2$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是SpRp$(Sp)_2$。在一些实施方案中，(Np)t(Rp)n(Sp)m是(Np)tRp(Sp)m。在一些实施方案中，(Np)t(Rp)n(Sp)m是$(Np)_2Rp(Sp)m$。在一些实施方案中，(Np)t(Rp)n(Sp)m是$(Rp)_2Rp(Sp)m$。在一些实施方案中，(Np)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_2Rp(Sp)m$。在一些实施方案中，(Np)t(Rp)n(Sp)m是RpSpRp(Sp)m。在一些实施方案中，(N-)t(Rp)n(Sp)m是SpRpRp(Sp)m。

[0217] 在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是SpRpSpSp。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_2Rp(Sp)_2$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_3Rp(Sp)_3$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_4Rp(Sp)_4$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是(Sp)tRp$(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是SpRp$(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_2Rp(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_3Rp(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_4Rp(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)t(Rp)n(Sp)m是$(Sp)_5Rp(Sp)_5$。

[0218] 在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_2Rp(Sp)_2$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_3Rp(Sp)_3$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_4Rp(Sp)_4$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是(Sp)mRp$(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_2Rp(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_3Rp(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_4Rp(Sp)_5$。在一些实施方案中，(Sp)m(Rp)n(Sp)t是$(Sp)_5Rp(Sp)_5$。

[0219] 在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少一个Rp核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少一个Rp硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少两个Rp核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少两个Rp硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少三个Rp核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少三个Rp硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少4、5、6、7、8、9或10个Rp核苷酸间键联。在一些实施方案中，翼区-核心-翼区基序的核心区域包含至少4、5、6、7、8、9或10个Rp硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0220] 在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中每个“X”翼区中的残基是2’-MOE-修饰的残基。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中核心“Y”区域中的残基是2’-脱氧核苷酸残基。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中所有核苷酸间键联是硫代磷酸酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中所有核苷酸间键联是手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中每个“X”翼区中的残基是2’MOE-修饰的残基，核心“Y”区域中的残基是2’-脱氧核苷酸残基，并且所有核苷酸间键联是手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0221] 在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中每个“X”翼区中的残基不是2’-MOE-修饰的残基。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中

核心“Y”区域中的残基是2’-脱氧核苷酸残基。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中所有核苷酸间键联是硫代磷酸酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中所有核苷酸间键联是手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，翼区-核心-翼区基序是5-10-5基序，其中每个“X”翼区中的残基不是2’-MOE-修饰的残基，核心“Y”区域中的残基是2’-脱氧核苷酸残基，并且所有核苷酸间键联是手性硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0222] 在某些实施方案中，提供了手性控制(和/或立体化学纯)的制备物，其包含碱基序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC的寡核苷酸。

[0223] 在一些实施方案中，本发明提供了寡核苷酸的立体化学设计参数。即，本公开内容尤其证明了沿着寡核苷酸链的不同位置的立体化学结构对例如寡核苷酸的稳定性和/或活性的影响，包括对寡核苷酸与同源配体和/或与加工酶的相互作用的影响。本发明特别提供了结构引入或反映了设计参数的寡核苷酸。相对于具有相同碱基序列和长度的立构无规制备物，这样的寡核苷酸是新化学实体。

[0224] 在一些实施方案中，本发明提供了反义寡核苷酸的立体化学设计参数。在一些实施方案中，本发明特别提供了可以被RNase H结合和/或切割的寡核苷酸的设计参数。在一些实施方案中，本发明提供了siRNA寡核苷酸的立体化学设计参数。在一些实施方案中，本发明特别提供了可以被例如DICER、Argonaute蛋白(例如Argonaute-1和Argonaute-2)结合和/或切割的寡核苷酸的设计参数。

[0225] 在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少两个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少三个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少四个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少五个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少六个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少七个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少八个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少九个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的一个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的两个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的三个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八

个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的四个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的五个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的六个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的七个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的八个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的九个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的十个是手性的。

[0226] 在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少两个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少三个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少四个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少五个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少六个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少七个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的一个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的两个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的三个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的四个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的五个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的六个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的七个是手性的。在一些实施方案中，第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的八个是手性的。

[0227] 在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的，并且至少一个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的，并且至少一个核

苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少两个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少三个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少四个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少五个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少六个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少七个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少八个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少九个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少10个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少11个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少12个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少13个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少14个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少15个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少16个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少17个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少18个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少19个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，至少20个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，一个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，两个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，三个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，四个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，五个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，六个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，七个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，八个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，九个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，10个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，11个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，12个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，13个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，14个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，15个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，16个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，17个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，18个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，19个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，20个核苷酸间键联是非手性的。在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中所有核苷酸间键联是非手性的，除了第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的。

[0228] 在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的，并且至少一个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的，并且至少一个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少两个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少三个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少四个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少五个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少六个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少七个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少八个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少九个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少10个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少11个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少12个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方

案中，至少13个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少14个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少15个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少16个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少17个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少18个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少19个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，至少20个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，一个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，两个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，三个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，四个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，五个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，六个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，七个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，八个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，九个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，10个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，11个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，12个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，13个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，14个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，15个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，16个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，17个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，18个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，19个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，20个核苷酸间键联是磷酸酯。在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中所有核苷酸间键联是磷酸酯，除了第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的。

[0229] 在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第八个、第九个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的，并且所述区域中全部核苷间键联中的至少10％是非手性的。在一些实施方案中，提供的组合物的单一寡核苷酸包含这样的区域，其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的，并且所述区域中全部核苷间键联中的至少10％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少20％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少30％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少40％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少50％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少60％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少70％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少80％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少90％是非手性的。在一些实施方案中，所述区域中全部核苷间键联中的至少50％是非手性的。在一些实施方案中，非手性核苷酸间键联是磷酸酯键联。在一些实施方案中，每个非手性核苷酸间键联是磷酸酯键联。

[0230] 在一些实施方案中，所述区域的第一个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中，所述区域的第一个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中，所述区域的第二个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中，所述区域的第二个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中，所述区域的第三个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中，所述区域的第三个

核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第五个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第五个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第七个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第七个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第八个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第八个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第九个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第九个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第十八个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第十八个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第十九个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第十九个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第二十个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述区域的第二十个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[0231] 在一些实施方案中,所述区域具有至少21个碱基的长度。在一些实施方案中,所述区域具有21个碱基的长度。在一些实施方案中,提供的组合物中的单一寡核苷酸的具有至少21个碱基的长度。在一些实施方案中,提供的组合物中的单一寡核苷酸具有21个碱基的长度。

[0232] 在一些实施方案中,手性核苷酸间键联具有式I的结构。在一些实施方案中,手性核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,提供的组合物的单一寡核苷酸中的每个手性核苷酸间键联独立地具有式I的结构。在一些实施方案中,提供的组合物的单一寡核苷酸中的每个手性核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[0233] 如本领域一般技术人员知道以及本公开内容中描述的,可以向糖部分的2'-位置引入多种修饰。常用的2'-修饰包括但不限于2'-OR^1,其中R^1不是氢。在一些实施方案中,修饰时2'-OR,其中R是任选地经取代的脂族。在一些实施方案中,修饰是2'-OMe。在一些实施方案中,修饰是2'-O-MOE。在一些实施方案中,本发明证明特定手性纯核苷酸间键联的引入和/或定位可以提供稳定性改善,所述改善比得上或优于使用经修饰骨架键联、碱基和/或糖实现的那些。在一些实施方案中,提供的组合物的提供的单一核苷酸在糖上没有修饰。在一些实施方案中,提供的组合物的提供的单一核苷酸在糖的2'-位置没有修饰(即,2'-位置的两个基团是-H/-H或-H/-OH)。在一些实施方案中,提供的组合物的提供的单一核苷酸不具有任何2'-MOE修饰。

[0234] 在一些实施方案中,与立构无规寡核苷酸组合物相比,提供的组合物的单一核苷酸是Argonaute蛋白(例如,hAgo-1和hAgo-2)的更好的底物。本公开内容中所述的手性纯键联的选择和/或位置可用于设计用于与诸如siRNA的这样的蛋白质相互作用的寡核苷酸的参数。

[0235] 在一些实施方案中,提供的组合物的单一核苷酸中至少约25%的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中,提供的组合物的单一核苷酸中至少约30%的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中,提供的组合物的单一核苷酸中至少约35%的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中,提供的组合物的单一核苷酸中至少约40%的其核苷酸

间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约45％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约50％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约55％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约60％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约65％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约70％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约75％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约80％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约85％的其核苷酸间键联是Sp构型。在一些实施方案中，提供的组合物的单一核苷酸中至少约90％的其核苷酸间键联是Sp构型。

[0236] 在一些实施方案中，提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸：

[0237]

143	(*Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	$(SSR)_3$-SS
ONT-87	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC	(5R-$(SSR)_3$-5R)

[0238] 具有下划线的核苷酸是2’-修饰的。

[0239] 在一些实施方案中，提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸：

[0240]

143	(*Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	$(SSR)_3$-SS
ONT-87	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC	(5R-$(SSR)_3$-5R)

[0241] 具有下划线的核苷酸是2’-O-MOE修饰的。

[0242] 在一些实施方案中，提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸：

[0243]

ONT-106	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuudT**s**dT	PCSK9有义
ONT-107	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuudT**s**dT	PCSK9有义
ONT-108	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdT**s**dT	PCSK9反义
ONT-109	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdT**s**dT	PCSK9反义
ONT-110	(*Rp*, *Rp*)- a**s**AGcAAAAcAGGUCuAGAAdT**s**dT	PCSK9反义
ONT-111	(*Sp*, *Rp*)- a**s**GcAAAAcAGGUCuAGAAdT**s**dT	PCSK9反义
ONT-112	(*Sp*, *Sp*)- a**s**GcAAAAcAGGUCuAGAAdT**s**dT	PCSK9反义
ONT-113	(*Rp*, *Sp*)- a**s**GcAAAAcAGGUCuAGAAdT**s**dT	PCSK9反义

[0244] 其中小写字母表示2’-OMe RNA残基；大写字母表示2’-OH RNA残基；并且粗体和“s”表示硫代磷酸酯部分；以及

[0245]

PCSK9 (1)	(全(*Sp*))- ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (2)	(全(*Rp*))- ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (3)	(全(*Sp*))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT
PCSK9 (4)	(全(*Rp*))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT
PCSK9 (5)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (6)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT

[0246] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;并且"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[0247]

PCSK9 (7)	(全(*Rp*))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (8)	(全(*Sp*))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

[0248]

PCSK9 (9)	(全(*Rp*))- AsAGcAAAAcsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (10)	(全(*Sp*))- AsAGcAAAAcsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (11)	(全(*Rp*))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (12)	(全(*Sp*))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (13)	(全(*Rp*))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (14)	(全(*Sp*))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (15)	(全(*Rp*))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (16)	(全(*Sp*))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (17)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (18)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

[0249] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[0250]

PCSK9 (19)	(全(*Rp*))- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (20)	(全(*Sp*))- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (21)	(全(*Rp*))- UfsuCfsuAfsgAfscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (22)	(全(*Sp*))- UfsuCfsuAfsgAfscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (23)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (24)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT

[0251] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示2'-F RNA残基;d=2'-脱氧残

基;并且“s”表示硫代磷酸酯部分;以及

[0252]

PCSK9 (25)	(全(*R*p))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (26)	(全(*S*p))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (27)	(全(*R*p))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (28)	(全(*S*p))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (29)	(全(*R*p))- asAfsgCfsaAfsaAfscAfsgGfsuCfsuAfsgAfsadTsdT

[0253]

PCSK9 (30)	(全(*S*p))- asAfsgCfsaAfsaAfscAfsgGfsuCfsuAfsgAfsadTsdT
PCSK9 (31)	(*R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (32)	(*S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT

[0254] 其中小写字母表示2’-OMe RNA残基;大写字母表示2’-F RNA残基;d=2’-脱氧残基;并且“s”表示硫代磷酸酯部分。

[0255] 在一些实施方案中,提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:d[$A_RC_SA_RC_SA_RC_SA_RC_SA_RC$]、d[$C_SC_SC_SC_RC_RC_SC_SC_SC_SC_SC$]、d[$C_SC_SC_SC_SC_SC_SC_SC_RC_RC_SC$]和d[$C_SC_SC_SC_SC_SC_RC_RC_SC_SC$],其中R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联。

[0256] 在一些实施方案中,提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:$GGA_RT_SG_RT_ST_R{}^{m}C_STCGA$、$GGA_RT_RG_ST_ST_R{}^{m}C_RTCGA$、$GGA_ST_SG_RT_RT_S{}^{m}C_STCGA$,其中R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联,所有其他键联是PO,并且每个^{m}C是5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸。

[0257] 在一些实施方案中,提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下寡核苷酸:$T_kT_k{}^{m}C_kAGT{}^{m}CATGA{}^{m}CT_kT{}^{m}C_k{}^{m}C_k$,其中每个带有下标“k”的核苷表示(S)-cEt修饰,R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联,每个^{m}C是5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸,并且所有核苷酸间键联是具有选自以下的立体化学样式的硫代磷酸酯(PS):RSSSRSRRRS、RSSSSSSSSS、SRRSRSSSSR、SRSRSSRSSR、RRRSSSRSSS、RRRSRSSRSR、RRSSSRSRSR、SRSSSRSSSS、SSRRSSRSRS、SSSSSSRRSS、RRRSSRRRSR、RRRRSSSSRS、SRRSRRRRRR、RSSRSSRRRR、RSRRSRRSRR、RRSRSSRSRS、SSRRRRRSRR、RSRRSRSSSR、RRSSRSRRRR、RRSRSRRSSS、RRSRSSSRRR、RSRRRRSRSR、SSRSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSSRSS、RRRSSRRSRS、SRRSSRRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRRRRSR、RRRRRRRRRR和SSSSSSSSSS。

[0258] 在一些实施方案中,提供的组合物中的单一寡核苷酸不是选自以下寡核苷酸:$T_kT_k{}^{m}C_kAGT{}^{m}CATGA{}^{m}CTT_k{}^{m}C_k{}^{m}C_k$,其中每个带有下标“k”的核苷表示(S)-cEt修饰,R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联,每个^{m}C是5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸,并且所有核苷酸间键联还具有选自以下的立体化学样式的硫代磷酸酯(PS):RSSSRSRRRS、RSSSSSSSSS、SRRSRSSSSR、SRSRSSRSSR、RRRSSSRSSS、RRRSRSSRSR、RRSSSRSRSR、SRSSSRSSSS、SSRRSSRSRS、SSSSSSRRSS、RRRSSRRRSR、RRRRSSSSRS、SRRSRRRRRR、RSSRSSRRRR、RSRRSRRSRR、RRSRSSRSRS、SSRRRRRSRR、RSRRSRSSSR、RRSSRSRRRR、RRSRSRRSSS、RRSRSSSRRR、RSRRRRSRSR、SSRSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSSRSS、RRRSSRRSRS、SRRSSRRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRRRRSR、RRRRRRRRRR和SSSSSSSSSS。

[0259] 经修饰寡核苷酸结构

[0260] 如上文指出的，鉴于寡核苷酸组合物适用于多种应用和适应症中，本领域技术人员已致力于开发寡核苷酸结构的相较于天然寡核苷酸分子，可具有优选或期望的特征或属性(例如如用于特定应用和适应症中)的修饰形式。以下描述示例性此类修饰。

[0261] WO2010/141471(在本文中是“Traversa I”)教导了修饰以具有降低的净聚阴离子电荷的不同类型的核酸构建体的修饰。WO2010/039543(在本文中是“Travera II”)教导了用于制备聚阴离子电荷降低的中性多核苷酸(NN)的组合物和方法。WO2008/008476(在本文中是“Traversa III”)描述SATE(Imbach型)磷酸酯前药的合成。Traversa I、II和III未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0262] WO2010/072831(在本文中是“Girindus等”)也教导了寡核苷酸的修饰。具体来说，Girindus等教导了使用硫化试剂来产生硫代磷酸三酯作为前药。Girindus等未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0263] 类似地，WO2004/085454(在本文中是“Avecia I”)教导了通过例如使聚H-膦酸二酯短暂硅烷基化来制备硫代磷酸酯寡核苷酸。WO2001/027126(在本文中是“Avecia II”)教导了用于通过使H-膦酸酯单体偶联于固体承载的5’-羟基寡核苷酸，并且进一步使所得H-膦酸二酯硫化成硫代磷酸三酯来固相合成磷酸三酯寡核苷酸的方法。WO2001/064702(在本文中是“Avecia III”)的公开内容类似于Avecia II，并且进一步描述在不同固体支持物上进行固相合成。Avecia I、II和III未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0264] WO1997/006183(在本文中是“Chiron”)教导了阳离子核苷酸间键联包含不对称磷的寡核苷酸，如立体纯酰胺化物。Chiron教导了通过使非对映体的混合物结晶或通过使用例如柱色谱法进行拆分获得的立体纯寡核苷酸。Chiron未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0265] WO2009/146123(在本文中是“Spring Bank I”)教导了用于使用经取代磷酸酯寡核苷酸和硫代磷酸三酯治疗病毒性感染的组合物和方法。WO2007/070598(在本文中是“Spring Bank II”)教导了磷酸三酯前药作为抗病毒核酸，并且教导了硫代磷酸酯前药的合成。Spring Bank I和II未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0266] EP0779893(在本文中是“Hybridon”)教导了用于提高细胞对反义寡核苷酸的摄取的亲脂性前药，并且观察到Rp和Sp硫代磷酸酯和硫代磷酸三酯二聚体可具有不同酶稳定性性质。Hybridon未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0267] WO1997/047637(在本文中是“Imbach I”)一般性教导了Imbach“SATE”(S-酰基硫代乙基)前药寡核苷酸组合物和方法。Imbach I描述例如生物可逆性磷酸三酯前药以及使用合成后烷基化或含有前药基团的亚磷酰胺制备某些前药寡核苷酸。US 6,124,445(在本文中是“Imbach II”)教导了经修饰反义和嵌合前药寡核苷酸。Imbach I和II未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及其制备和使用方法。

[0268] WO2006/065751(在本文中是“Beaucage”)教导了包含热不稳定性取代基(所述取代基是通过亚磷酰胺单体引入)的CpG寡核苷酸硫代磷酸酯前药以及其应用。Beaucage未教导如由本发明所述的手性控制的寡核苷酸、其组合物以及制备和使用所述寡核苷酸和组合物的方法。

[0269] Takeshi Wada等开发了用于使用亚酰胺化物手性助剂立体控制合成P手性核酸的新方法(JP4348077、WO2005/014609、WO2005/092909和WO2010/064146,在本文中共同称为“Wada I”)。具体来说,WO2010/064146(在本文中称为“Wada II”)公开用于合成磷原子修饰的核酸的方法,其中控制在磷处的立体化学构型。然而,Wada II的方法受限制,因为其不提供以控制和设计方式对各手性键联磷进行单独P修饰。即,Wada II的用于P修饰的键联的方法提供了产生缩合的中间聚H-膦酸酯寡核苷酸链,其一旦被构建成所需长度,即在键联磷处被大量修饰以提供例如所需硫代磷酸二酯、氨基磷酸酯或硼代磷酸酯或其他所述磷原子修饰的核酸(在文献的第36页方案6中称为途径B)。此外,Wada II的H-膦酸酯寡核苷酸链具有较短长度(例如二聚体、三聚体或四聚体)。结合在途径B中不存在加帽步骤的事实(此通常由于“n-1”型副产物累积而呈现低粗纯度),Wada II途径关于合成较长寡核苷酸含有局限性。尽管Wada II一般地涵盖特定寡核苷酸可被考虑来在各键联磷处含有不同修饰,但Wada II未描述或表明如本文中所述的用于将所述修饰进行受控迭代性安置的方法。就Wada II描述不需要在于键联磷处修饰之前完全装配H-膦酸酯中间寡核苷酸的合成循环(在其中称为途径A,第35页,方案5“通过途径A合成包含式1的手性X磷酸酯部分的核酸(Synthesis of a nucleic acid comprising a chiral X-phosphonate moiety of Formula 1via Route)A”)而言,这个一般性公开内容未教导如由本发明提供了的为安置某些P修饰所需的某些关键步骤,并且尤其不具有任何程度的效率和通用性以使这个循环将适用于合成手性控制的P修饰的寡核苷酸,并且尤其是长度较长的寡核苷酸。

[0270] Wada II的至少一种所述低效性由Wada等在WO2012/039448(在本文中是“Wada III”)中指示。Wada III教导了在Wada II方法中用于产生H-膦酸酯寡核苷酸的新手性助剂,所述寡核苷酸一旦构建即可随后被修饰来尤其提供硫代磷酸酯等。Wada等在Wada III中观察到Wada II中公开的四种类型的手性助剂在键联磷处与磷形成强键,并且因此不允许高效移除。Wada III指示移除Wada II手性助剂需要严苛条件,所述条件倾向于损害产物寡核苷酸的完整性。Wada III观察到这在合成长链寡核苷酸时尤其成问题,原因至少是随着一个或更多个降解反应进行,产生可进一步与产物寡核苷酸反应并且使产物寡核苷酸降解的其他副产物。因此,Wada III提供可在温和酸性条件下通过释放H-膦酸酯核苷酸间键联的S_N1机制(途径B),或在相对温和碱性条件下通过β-消除路径更高效地自寡核苷酸切割的手性助剂。

[0271] 化学和合成领域技术人员将立刻了解与产生手性控制的寡核苷酸(如由本发明提供了的那些)相关的复杂性。例如,为合成和分离手性控制的寡核苷酸,用于各单体添加的条件必须设计成使(1)化学可与增长的寡核苷酸的每个部分相容;(2)在各单体添加期间产生的副产物不损害增长的寡核苷酸的结构和立体化学完整性;以及(3)粗最终产物组合物是允许分离所需手性控制的寡核苷酸产物的组合物。

[0272] 寡核苷酸硫代磷酸酯已显示治疗潜力(Stein等,Science(1993),261:1004-12;Agrawal等,Antisence Res.and Dev.(1992),2:261-66;Bayever等,Antisense Res.and

Dev.(1993),3:383-390)。在不考虑硫代磷酸酯的立体化学下制备的寡核苷酸硫代磷酸酯以2^n非对映体的混合物形式存在,其中n是核苷酸间硫代磷酸酯键联的数目。这些非对映异构硫代磷酸酯的化学和生物性质可不同。例如,Wada等(Nucleic Acids Symposium Series第51期第119-120页;doi:10.1093/nass/nrm060)发现立体确定的(Rp)-(Ups)9U/(Ap)9A双链体显示的T_m值高于天然(Up)9U/(Ap)9A,并且立体确定的(Sp)-(Ups)9U不形成双链体。在另一实例中,在由Tang等(Nucleosides Nucleotides(1995),14:985-990)进行的研究中,发现立体纯Rp-寡脱氧核糖核苷硫代磷酸酯具有的对人血清内源性核酸酶的稳定性低于磷手性未确定的母体寡脱氧核糖核苷硫代磷酸酯。手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物

[0273] 本发明提供了具有高粗纯度和高非对映体纯度的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本发明提供了具有高粗纯度的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本发明提供了具有高非对映体纯度的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物。

[0274] 在一些实施方案中,本发明提供了手性控制的寡核苷酸组合物,其包含通过具有以下来定义的寡核苷酸:

[0275] 1)共同碱基序列和长度;

[0276] 2)共同骨架键联样式;和

[0277] 3)共同骨架手性中心样式,所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物,其中所述组合物中至少约10%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[0278] 在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,其中相对于相同寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,其中相对于所述寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸共有以下:

[0279] 1)共同碱基序列和长度;

[0280] 2)共同骨架键联样式;和

[0281] 3)共同骨架手性中心样式。

[0282] 在一些实施方案中,本发明提供了手性控制的寡核苷酸组合物,其包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[0283] 1)共同碱基序列和长度;

[0284] 2)共同骨架键联样式;

[0285] 3)共同骨架手性中心样式;

[0286] 所述组合物是手性控制的,其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[0287] 在一些实施方案中,如本领域技术人员了解的,在寡核苷酸的基本上外消旋(或手性未控制)的制备物中,全部或大部分偶联步骤不是手性控制的,其中偶联步骤不是特别进行以提供增强的立体选择性。寡核苷酸的示例性的基本上外消旋制备物是通过用二硫化四乙基秋兰姆或(TETD)或者3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮1,1-二氧化物(BDTD)对亚磷酸三酯进

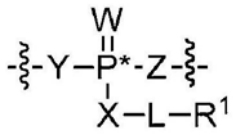
行本领域周知的硫化过程的硫代磷酸酯寡核苷酸的制备物。在一些实施方案中，寡核苷酸的基本上外消旋的制备物提供了基本上外消旋的寡核苷酸组合物(或手性未控制的寡核苷酸组合物)。

[0288] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是一种寡核苷酸类型的基本上纯的制备物，其中组合物中不是所述寡核苷酸类型的寡核苷酸是来自所述寡核苷酸类型的制备过程的杂质，在一些情况下，在某些纯化操作之后。

[0289] 在一些实施方案中，本发明提供了包含一个或更多个关于手性键联磷是非对映体纯的核苷酸间键联的寡核苷酸。在一些实施方案中，本发明提供了包含一个或更多个具有式I结构的非对映体纯核苷酸间键联的寡核苷酸。在一些实施方案中，本发明提供了包含一个或更多个关于手性键联磷是非对映体纯的核苷酸间键联以及一个或更多个磷酸二酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中，本发明提供了包含一个或更多个具有式I结构的非对映体纯核苷酸间键联以及一个或更多个磷酸二酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中，本发明提供了包含一个或更多个具有式I-c结构的非对映体纯核苷酸间键联以及一个或更多个磷酸二酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中，所述寡核苷酸是通过使用如本申请中所述的立体选择性寡核苷酸合成来制备以形成预设计的关于手性键联磷是非对映体纯的核苷酸间键联。例如，在一种示例性寡核苷酸(Rp/Sp,Rp/Sp,Rp/Sp,Rp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Rp,Rp,Rp,Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGs1Cs1As1CsC]中，前三个核苷酸间键联是使用传统寡核苷酸合成方法构建，并且非对映体纯核苷酸间键联是在如本申请中所述的立体化学控制下构建。以下进一步描述示例性核苷酸间键联，包括具有式I结构的那些。

[0290] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的立体化学和/或不同的P修饰。在某些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰。在某些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰，并且其中所述手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰，并且其中所述手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少一个硫代磷酸二酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰，并且其中所述手性控制的寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸三酯核苷酸间键联。在某些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰，并且其中所述手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少一个硫代磷酸三酯核苷酸间键联。

[0291] 在某些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个独立地具有式I结构的经修饰核苷酸间键联：

[0292] 

(I)

[0293] 其中各变量如下所定义和描述。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个式I经修饰核苷酸间键联，并且其中所述寡核苷酸内的个体式I核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个式I经修饰核苷酸间键联，并且其中所述寡核苷酸内的个体式I核苷酸间键联具有相对于彼此不同的-X-L-R^1。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个式I经修饰核苷酸间键联，并且其中所述寡核苷酸内的个体式I核苷酸间键联具有相对于彼此不同的X。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个式I经修饰核苷酸间键联，并且其中所述寡核苷酸内的个体式I核苷酸间键联具有相对于彼此不同的-L-R^1。

[0294] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的立体化学和/或不同的P修饰。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的立体化学，并且其中所述手性控制的寡核苷酸的至少一部分结构的特征在于具有交替立体化学的重复样式。

[0295] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰，其中其在-XLR^1部分中具有不同X原子，和/或因其中其在-XLR^1部分中具有不同L基团，和/或其中其在-XLR^1部分中具有不同R^1原子。

[0296] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸内的至少两个个体核苷酸间键联具有相对于彼此不同的立体化学和/或不同的P修饰，并且所述寡核苷酸具有由下式表示的结构：

[0297] [S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4…S^BnxR^Bny]

[0298] 其中：

[0299] R^B各自独立地表示在键联磷处具有R构型的核苷酸单元的嵌段；

[0300] S^B各自独立地表示在键联磷处具有S构型的核苷酸单元的嵌段；

[0301] n1-ny各自是零或整数，其中要求至少一个奇数n和至少一个偶数n必须是非零以使寡核苷酸包含至少两个相对于彼此具有不同立体化学的个体核苷酸间键联；并且

[0302] 其中n1-ny的总和在2与200之间，并且在一些实施方案中，在选自2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或25以上的下限与选自5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190和200的上限之间，其中所述上限大于所述下限。

[0303] 在一些所述实施方案中，各n具有相同值；在一些实施方案中，各偶数n与各其他偶数n具有相同值；在一些实施方案中，各奇数n与各其他奇数n具有相同值；在一些实施方案中，至少两个偶数n彼此具有不同值；在一些实施方案中，至少两个奇数n彼此具有不同值。

[0304] 在一些实施方案中，至少两个邻近n彼此相等，以使提供的寡核苷酸包含具有相等长度的S立体化学键联和R立体化学键联的邻近嵌段。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含具有相等长度的S和R立体化学键联的重复嵌段。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含S和R立体化学键联的重复嵌段，其中至少两个所述嵌段具有彼此不同的长度；在一些所述实施方案中，各S立体化学嵌段具有相同长度，并且具有不同于各R立体化学长度的长度，所述各R立体化学长度可任选地是彼此相同的长度。

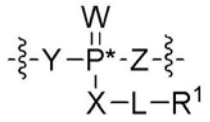
[0305] 在一些实施方案中，至少两个跳跃邻近n彼此相等，以使提供的寡核苷酸包含至少两个具有第一立体化学的键联嵌段，其在长度方面彼此相等，并且由具有另一立体化学的键联嵌段分隔，所述分隔嵌段与具有第一立体化学的嵌段可具有相同长度或不同长度。

[0306] 在一些实施方案中，与提供的寡核苷酸的末端的键联嵌段相关的n具有相同长度。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸具有键联立体化学相同的末端嵌段。在一些所述实施方案中，末端嵌段是由具有另一键联立体化学的中间嵌段彼此分隔。

[0307] 在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是立体嵌段聚体。在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是立体跳跃聚体。在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是立体交替聚体。在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是间隔聚体。

[0308] 在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸具有任何上述样式，并且还包含P修饰样式。例如，在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是立体跳跃聚体和P修饰跳跃聚体。在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是立体嵌段聚体和P修饰交替聚体。在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4\cdots S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是立体交替聚体和P修饰嵌段聚体。

[0309] 在一些实施方案中，提供的式[$S^Bn1R^Bn2S^Bn3R^Bn4...S^BnxR^Bny$]寡核苷酸是手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个独立地具有式I结构的经修饰核苷酸间键联：

[0310] 

(I)

[0311] 其中：

[0312] P＊是不对称磷原子，并且是Rp或Sp；

[0313] W是O、S或Se；

[0314] X、Y和Z各自独立地是-O-、-S-、-N(-L-R^1)-或L；

[0315] L是共价键或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[0316] R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{50}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地

并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[0317] 各R′独立地是-R、-C(O)R、-CO_2R或-SO_2R，或：

[0318] 同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环，或

[0319] 同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的芳基、碳环、杂环或杂芳基环；

[0320] -Cy-是选自亚苯基、亚碳环基、亚芳基、亚杂芳基或亚杂环基的任选地经取代的二价环；

[0321] 各R独立地是氢或选自C_1-C_6脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团；并且

[0322] –{–各自独立地表示与核苷的连接。

[0323] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷酸间磷键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含例如硫代磷酸酯或硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少两个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少三个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少四个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少五个硫代磷酸三酯键联。本文中进一步描述了示例性所述经修饰核苷酸间磷键联。

[0324] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含不同核苷酸间磷键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少一个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少一个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少两个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少三个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少四个硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少五个硫代磷酸三酯键联。本文进一步描述了示例性所述经修饰核苷酸间磷键联。

[0325] 在一些实施方案中，硫代磷酸三酯键联包含例如用于控制反应的立体选择性的手性助剂。在一些实施方案中，硫代磷酸三酯键联不包含手性助剂。在一些实施方案中，有意维持硫代磷酸三酯键联直至向对象施用，和/或在向对象施用期间有意维持硫代磷酸三酯键联。

[0326] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸连接于固体支持物。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸从固体支持物切割。

[0327] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少两个连续的经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少两个连续的硫代磷酸三酯核苷酸间键联。

[0328] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是嵌段聚体。在一些实施方案中，手性控

制的寡核苷酸是立体嵌段聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是P修饰嵌段聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是键联嵌段聚体。

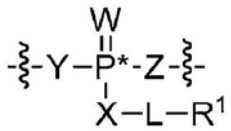
[0329] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是交替聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是立体交替聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是P修饰交替聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是键联交替聚体。

[0330] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是单聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是立体单聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是P修饰单聚体。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是键联单聚体。

[0331] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是间隔聚体。

[0332] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是跳跃聚体。

[0333] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个独立地具有式I结构的经修饰核苷酸间键联：

[0334] 

(I)

[0335] 其中：

[0336] P＊是不对称磷原子，并且是Rp或Sp；

[0337] W是O、S或Se；

[0338] X、Y和Z各自独立地是-O-、-S-、-N(-L-R^1)-或L；

[0339] L是共价键或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[0340] R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{50}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[0341] 各R′独立地是-R、-C(O)R、-CO_2R或-SO_2R，或：

[0342] 同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环，或

[0343] 同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的芳基、碳环、杂环或杂芳基环；

[0344] -Cy-是选自亚苯基、亚碳环基、亚芳基、亚杂芳基或亚杂环基的任选地经取代的二价环；

[0345] 各R独立地是氢或选自C_1-C_6脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团；并且

[0346] -{-各自独立地表示与核苷的连接。

[0347] 如以上以及本文中所一般定义，P＊是不对称磷原子，并且是Rp或Sp。在一些实施方案中，P＊是Rp。在另一些实施方案中，P＊是Sp。在一些实施方案中，寡核苷酸包含一个或更多个式I核苷酸间键联，其中各P＊独立地是Rp或Sp。在一些实施方案中，寡核苷酸包含一个或更多个式I核苷酸间键联，其中各P＊是Rp。在一些实施方案中，寡核苷酸包含一个或更多个式I核苷酸间键联，其中各P＊是Sp。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中P＊是Rp。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中P＊是Sp。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中P＊是Rp，以及至少一个式I核苷酸间键联，其中P＊是Sp。

[0348] 如以上以及本文中所一般定义，W是O、S或Se。在一些实施方案中，W是O。在一些实施方案中，W是S。在一些实施方案中，W是Se。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中W是O。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中W是S。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中W是Se。

[0349] 如以上以及本文中所一般定义，各R独立地是氢或选自C_1-C_6脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团。

[0350] 在一些实施方案中，R是氢。在一些实施方案中，R是选自C_1-C_6脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团。

[0351] 在一些实施方案中，R是任选地经取代的C_1-C_6脂族。在一些实施方案中，R是任选地经取代的C_1-C_6烷基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的直链或支链己基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的直链或支链戊基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的直链或支链丁基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的直链或支链丙基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的乙基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的甲基。

[0352] 在一些实施方案中，R是任选地经取代的苯基。在一些实施方案中，R是经取代的苯基。在一些实施方案中，R是苯基。

[0353] 在一些实施方案中，R是任选地经取代的碳环基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的C_3-C_{10}碳环基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的单环碳环基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的环庚基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的环己基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的环戊基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的环丁基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的环丙基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的双环碳环基。

[0354] 在一些实施方案中，R是任选地经取代的芳基。在一些实施方案中，R是任选地经取代的双环芳基环。

[0355] 在一些实施方案中，R是任选地经取代的杂芳基。在一些实施方案中，R是具有1-3个独立地选自氮、硫或氧的杂原子的任选地经取代的5-6元单环杂芳基环。在一些实施方案中，R是具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的经取代的5-6元单环杂芳基环。在一些实施方案中，R是具有1-3个独立地选自氮、硫或氧的杂原子的未取代的5.6元单环杂芳基环。

[0356] 在一些实施方案中，R是具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元单环杂芳基环。在一些实施方案中，R是具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子

的任选地经取代的6元单环杂芳基环。

[0357] 在一些实施方案中,R是具有1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元单环杂芳基环。在一些实施方案中,R选自吡咯基、呋喃基或噻吩基。

[0358] 在一些实施方案中,R是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元杂芳基环。在某些实施方案中,R是具有1个氮原子和选自硫或氧的另一杂原子的任选地经取代的5元杂芳基环。示例性R基团包括任选地经取代的吡唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基或异噁唑基。

[0359] 在一些实施方案中,R是具有1-3个氮原子的6元杂芳基环。在另一些实施方案中,R是具有1-2个氮原子的任选地经取代的6元杂芳基环。在一些实施方案中,R是具有2个氮原子的任选地经取代的6元杂芳基环。在某些实施方案中,R是具有1个氮的任选地经取代的6元杂芳基环。示例性R基团包括任选地经取代的吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、三嗪基或四嗪基。

[0360] 在某些实施方案中,R是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的8-10元双环杂芳基环。在一些实施方案中,R是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在另一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在某些实施方案中,R是具有1个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中,R是任选地经取代的吲哚基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的氮杂双环[3.2.1]辛烷基。在某些实施方案中,R是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中,R是任选地经取代的氮杂吲哚基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的苯并咪唑基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的苯并噻唑基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的苯并噁唑基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的吲唑基。在某些实施方案中,R是具有3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。

[0361] 在某些实施方案中,R是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在另一些实施方案中,R是具有1个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中,R是任选地经取代的喹啉基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的异喹啉基。根据一个方面,R是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中,R是喹唑啉或喹喔啉。

[0362] 在一些实施方案中,R是任选地经取代的杂环基。在一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的3-7元饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的经取代的3-7元饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未取代的3-7元饱和或部分不饱和杂环。

[0363] 在一些实施方案中,R是任选地经取代的杂环基。在一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6元饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中,R是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6元部分不饱和杂

环。在一些实施方案中,R是具有2个氧原子的任选地经取代的6元部分不饱和杂环。

[0364] 在某些实施方案中,R是具有1.2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的3.7元饱和或部分不饱和杂环。在某些实施方案中,R是环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、氧杂环庚烷基、氮丙啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、氮杂环庚烷基、硫杂环丙烷基、硫杂环丁烷基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、硫杂环庚烷基、二氧杂戊环烷基、氧硫杂环戊烷基、噁唑烷基、咪唑烷基、噻唑烷基、二硫杂环戊烷基、二噁烷基、吗啉基、氧硫杂环己烷基、哌嗪基、硫代吗啉基、二硫杂环己基、二氧杂环庚烷基、氧杂氮杂环庚烷基、氧硫杂环庚烷基、二硫杂环庚烷基、二氮杂环庚烷基、二氢呋喃酮基、四氢吡喃酮基、氧杂环庚酮基、吡咯烷酮基、哌啶酮基、氮杂环庚酮基、二氢噻吩酮基、四氢噻喃酮基、硫杂环庚烷酮基、噁唑啶酮基、噁嗪烷酮基、氧杂氮杂环庚烷酮基、二氧杂戊环烷酮基、二噁烷酮基、二氧杂环庚烷酮基、氧硫杂啉酮基、氧硫杂环己烷酮基、氧硫杂环庚烷酮基、噻唑烷酮基、噻嗪烷酮基、硫杂氮杂环庚烷酮基、咪唑烷酮基、四氢嘧啶酮基、二氮杂环庚烷酮基、咪唑烷二酮基、噁唑烷二酮基、噻唑烷二酮基、二氧环戊烷二酮基、氧杂硫杂环戊烷二酮基、哌嗪二酮基、吗啉二酮基、硫代吗啉二酮基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、吗啉基、硫代吗啉基、哌啶基、哌嗪基、吡咯烷基、四氢噻吩基或四氢噻喃基。在一些实施方案中,R是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元饱和或部分不饱和杂环。

[0365] 在某些实施方案中,R是具有1.2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5.6元部分不饱和单环。在某些实施方案中,R是任选地经取代的四氢吡啶基、二氢噻唑基、二氢噁唑基或噁唑啉基。

[0366] 在一些实施方案中,R是具有1.4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的8-10元双环饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中,R是任选地经取代的二氢吲哚基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的异二氢吲哚基。在一些实施方案中,R是任选地经取代的1,2,3,4-四氢喹啉。在一些实施方案中,R是任选地经取代的1,2,3,4-四氢异喹啉。

[0367] 如以上以及本文中所一般定义,各R′独立地是-R、-C(O)R、-CO_2R或-SO_2R,或:

[0368] 同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环,或

[0369] 同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的芳基、碳环、杂环或杂芳基环。

[0370] 在一些实施方案中,R’是-R、-C(O)R、-CO_2R或-SO_2R,其中R如上所定义并如本文中所述。

[0371] 在一些实施方案中,R’是-R,其中R如以上以及本文中所定义和描述。在一些实施方案中,R’是氢。

[0372] 在一些实施方案中,R’是-C(O)R,其中R如上所定义并如本文中所述。在一些实施方案中,R’是-CO_2R,其中R如上所定义并如本文中所述。在一些实施方案中,R’是-SO_2R,其中R如上所定义并如本文中所述。

[0373] 在一些实施方案中,同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环。在一些实施方案中,同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取

代的芳基、碳环、杂环或杂芳基环。

[0374] 如以上以及本文中所一般定义，-Cy-是选自亚苯基、亚碳环基、亚芳基、亚杂芳基或亚杂环基的任选地经取代的二价环。

[0375] 在一些实施方案中，-Cy-是任选地经取代的亚苯基。在一些实施方案中，-Cy-是任选地经取代的亚碳环基。在一些实施方案中，-Cy-是任选地经取代的亚芳基。在一些实施方案中，-Cy-是任选地经取代的亚杂芳基。在一些实施方案中，-Cy-是任选地经取代的亚杂环基。

[0376] 如以上以及本文中所一般定义，X、Y和Z各自独立地是-O-、-S-、-N(-L-R^1)-或L，其中L和R^1各自独立地如上所定义和如下所述。

[0377] 在一些实施方案中，X是-O-。在一些实施方案中，X是-S-。在一些实施方案中，X是-O-或-S-。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中X是-O-。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中X是-S-。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中X是-O-，以及至少一个式I核苷酸间键联，其中X是-S-。在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个式I核苷酸间键联，其中X是-O-，以及至少一个式I核苷酸间键联，其中X是-S-，以及至少一个式I核苷酸间键联，其中L是任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-。

[0378] 在一些实施方案中，X是-N(-L-R^1)-。在一些实施方案中，X是-N(R^1)-。在一些实施方案中，X是-N(R')-。在一些实施方案中，X是-N(R)-。在一些实施方案中，X是-NH-。

[0379] 在一些实施方案中，X是L。在一些实施方案中，X是共价键。在一些实施方案中，X是或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-。在一些实施方案中，X是任选地经取代的C_1-C_{10}亚烷基或C_1-C_{10}亚烯基。在一些实施方案中，X是亚甲基。

[0380] 在一些实施方案中，Y是-O-。在一些实施方案中，Y是-S-。

[0381] 在一些实施方案中，Y是-N(-L-R^1)-。在一些实施方案中，Y是-N(R^1)-。在一些实施方案中，Y是-N(R')-。在一些实施方案中，Y是-N(R)-。在一些实施方案中，Y是-NH-。

[0382] 在一些实施方案中，Y是L。在一些实施方案中，Y是共价键。在一些实施方案中，Y是或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-。在一些实施方案中，Y是任选地经取代的C_1-C_{10}亚烷基或C_1-C_{10}亚烯基。在一些实施方案中，Y是亚甲基。

[0383] 在一些实施方案中，Z是-O-。在一些实施方案中，Z是-S-。

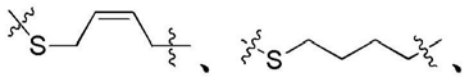
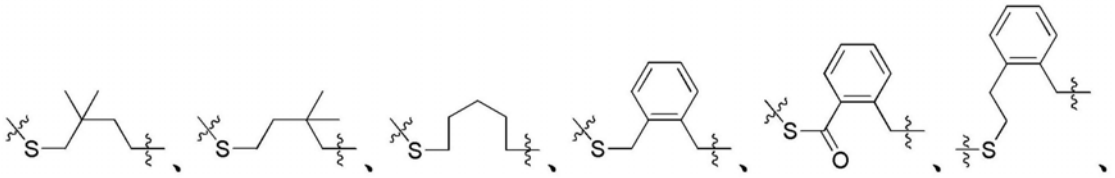
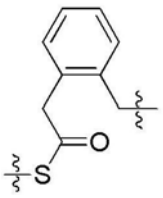
[0384] 在一些实施方案中，Z是-N(-L-R^1)-。在一些实施方案中，Z是-N(R^1)-。在一些实施方案中，Z是-N(R')-。在一些实施方案中，Z是-N(R)-。在一些实施方案中，Z是-NH-。

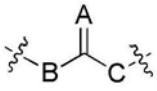
[0385] 在一些实施方案中，Z是L。在一些实施方案中，Z是共价键。在一些实施方案中，Z是或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-。在一些实施方案中，Z是任选地经取代的C_1-C_{10}亚烷基或C_1-C_{10}亚烯基。在一些实施方案中，Z是亚甲基。

[0386] 如以上以及本文中所一般定义，L是共价键或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-。

[0387] 在一些实施方案中，L是共价键。在一些实施方案中，L是任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-。

[0388] 在一些实施方案中，L具有结构-L^1-V-，其中：

[0389] L^1是选自以下的任选地经取代的基团：、、、C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、亚碳环基、亚芳基、C_1-C_6亚杂烷基、亚杂环基和亚杂芳基；

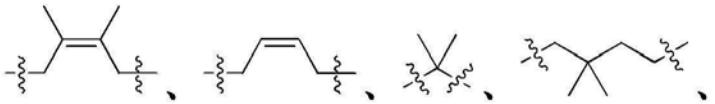
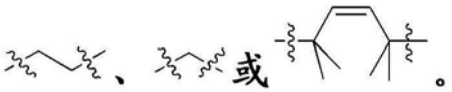
[0390] V选自-O-、-S-、-NR'-、C(R')$_2$、-S-S-、-B-S-S-C-、或选自以下的任选地经取代的基团：C_1-C_6亚烷基、亚芳基、C_1-C_6亚杂烷基、亚杂环基和亚杂芳基；

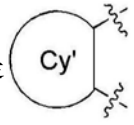
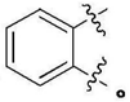
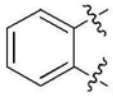
[0391] A是=O、=S、=NR'或=C(R')$_2$；

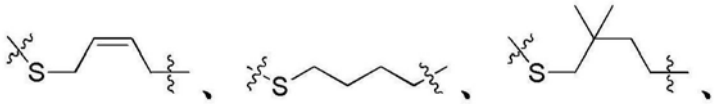
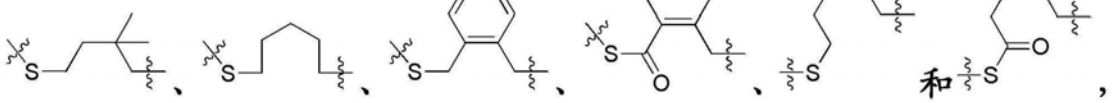
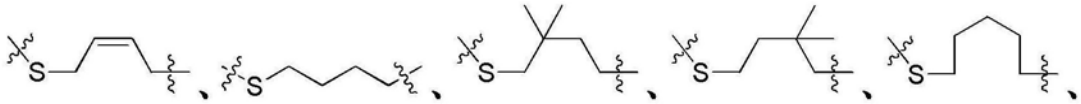
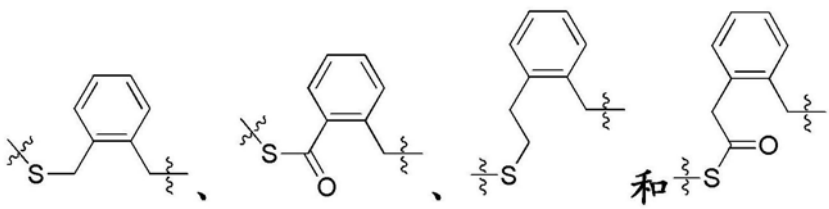
[0392] B和C各自独立地是-O-、-S-、-NR'-、-C(R')$_2$-或选自以下的任选地经取代的基团：

C_1-C_6亚烷基、亚碳环基、亚芳基、亚杂环基或亚杂芳基;并且

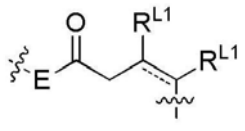
[0393] 各R’独立地如上所定义和如本文中所述。

[0394] 在一些实施方案中,L^1是、或。

[0395] 在一些实施方案中,L^1是,其中环Cy’是任选地经取代的亚芳基、亚碳环基、亚杂芳基或亚杂环基。在一些实施方案中,L^1是任选地经取代的。在一些实施方案中,L^1是。

[0396] 在一些实施方案中,L^1连接于X。在一些实施方案中,L^1是选自以下的任选地经取代的基团:、并且硫原子连接于V。在一些实施方案中,L^1是选自以下的任选地经取代的基团:、和,并且碳原子连接于X。

[0397] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0398] ,

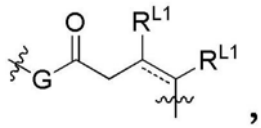
[0399] 其中:

[0400] E是-O-、-S-、-NR’-或-C(R’)$_2$-;

[0401] ┈┈是单键或双键;

[0402] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、碳环、杂芳基或杂环;并且各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0403] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0404] ,

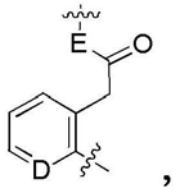
[0405] 其中:

[0406] G是-O-、-S-或-NR';

[0407] -----是单键或双键;并且

[0408] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环。

[0409] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0410] ,

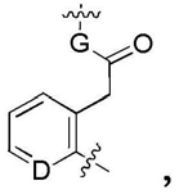
[0411] 其中:

[0412] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-;

[0413] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-;并且

[0414] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0415] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

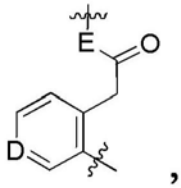
[0416] ,

[0417] 其中:

[0418] G是-O-、-S-或-NR';

[0419] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-。

[0420] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0421] ,

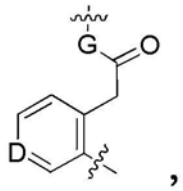
[0422] 其中:

[0423] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-;

[0424] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-;并且

[0425] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0426] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

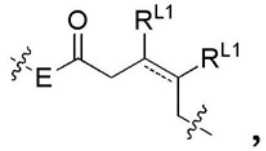
[0427] ,

[0428] 其中:

[0429] G是-O-、-S-或-NR';

[0430] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-。

[0431] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0432] ,

[0433] 其中:

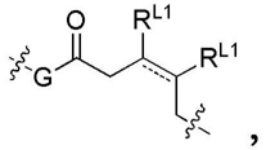
[0434] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-;

[0435] ┈┈是单键或双键;

[0436] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环;

[0437] 并且各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0438] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0439] ,

[0440] 其中:

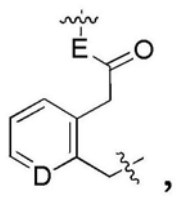
[0441] G是-O-、-S-或-NR';

[0442] ┈┈是单键或双键;

[0443] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环;

[0444] 并且各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0445] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0446] ,

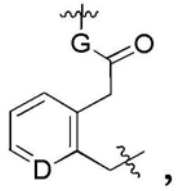
[0447] 其中：

[0448] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-；

[0449] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO$_2$)-、=C(CO$_2$-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-；并且

[0450] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0451] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0452] 

，

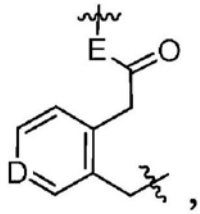
[0453] 其中：

[0454] G是-O-、-S-或-NR'；

[0455] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO$_2$)-、=C(CO$_2$-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-；并且

[0456] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0457] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0458] 

，

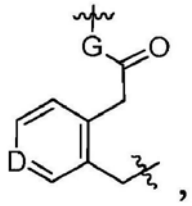
[0459] 其中：

[0460] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-；

[0461] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO$_2$)-、=C(CO$_2$-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-；并且

[0462] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0463] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0464] 

，

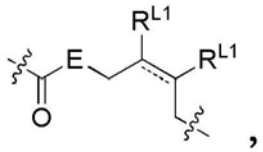
[0465] 其中：

[0466] G是-O-、-S-或-NR'；

[0467] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO$_2$)-、=C(CO$_2$-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-；并且

[0468] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0469] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0470] 

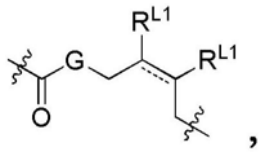
[0471] 其中：

[0472] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-；

[0473] ┈┈是单键或双键；

[0474] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环；并且各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0475] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0476] 

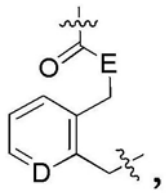
[0477] 其中：

[0478] G是-O-、-S-或-NR'；

[0479] ┈┈是单键或双键；

[0480] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环；并且各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0481] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0482] 

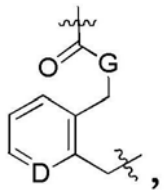
[0483] 其中：

[0484] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-；

[0485] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-；并且

[0486] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0487] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0488] 

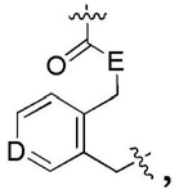
[0489] 其中：

[0490] G是-O-、-S-或-NR'；

[0491] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-；并且

[0492] R'如上所定义并如本文中所述。

[0493] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0494] 

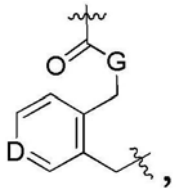
[0495] 其中:

[0496] E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-;

[0497] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-;并且

[0498] 各R'独立地如上所定义和如本文中所述。

[0499] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0500] 

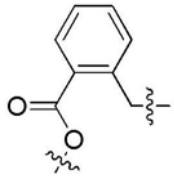
[0501] 其中:

[0502] G是-O-、-S-或-NR';

[0503] D是=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO_2)-、=C(CO_2-(C_1-C_6脂族))-或=C(CF_3)-;并且

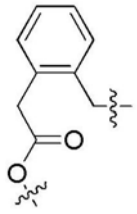
[0504] R'如上所定义并如本文中所述。

[0505] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0506] 

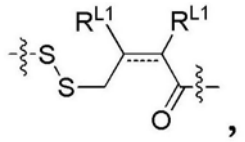
[0507] 其中苯基环任选地被取代。在一些实施方案中,苯基环未被取代。在一些实施方案中,苯基环被取代。

[0508] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

[0509] 

[0510] 其中苯基环任选地被取代。在一些实施方案中,苯基环未被取代。在一些实施方案中,苯基环被取代。

[0511] 在一些实施方案中,L具有以下结构:

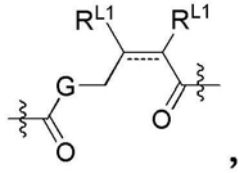
[0512] 

[0513] 其中：

[0514] ----是单键或双键；并且

[0515] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环。

[0516] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0517] 

[0518] 其中：

[0519] G是-O-、-S-或-NR'；

[0520] ----是单键或双键；并且

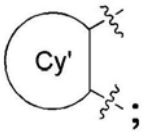
[0521] 两个R^{L1}与其所结合的两个碳原子一起形成任选地经取代的芳基、C_3-C_{10}碳环、杂芳基或杂环。

[0522] 如以上以及本文中所一般定义，E是-O-、-S-、-NR'-或-C(R')$_2$-，其中各R'独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，E是-O-、-S-或-NR'-。在一些实施方案中，E是-O-、-S-或-NH-。在一些实施方案中，E是-O-。在一些实施方案中，E是-S-。在一些实施方案中，E是-NH-。

[0523] 如以上以及本文中所一般定义，G是-O-、-S-或-NR'，其中各R'独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，G是-O-、-S-或-NH-。在一些实施方案中，G是-O-。在一些实施方案中，G是-S-。在一些实施方案中，G是-NH-。

[0524] 在一些实施方案中，L是-L^3-G-，其中：

[0525] L^3是任选地经取代的C_1-C_5亚烷基或亚烯基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-O-、-S-，-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-S(O)-、-S(O)$_2$-或

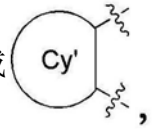
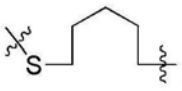


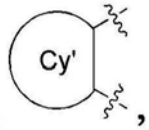
；

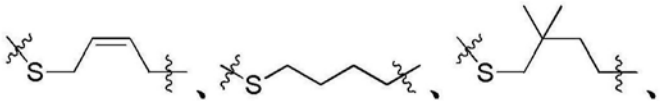
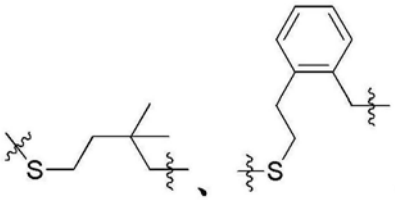
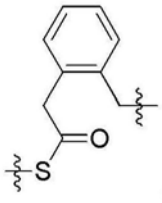
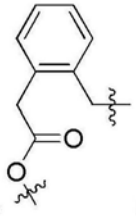
[0526] 并且其中G、R'和环Cy'各自独立地如上所定义和如本文中所述。

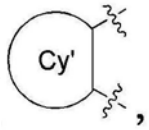
[0527] 在一些实施方案中，L是-L^3-S-，其中L^3如上所定义并如本文中所述。在一些实施方案中，L是-L^3-O-，其中L^3如上所定义并如本文中所述。在一些实施方案中，L是-L^3-N(R')-，其中L^3和R'各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，L是-L^3-NH-，其中L^3和R'各自独立地如上所定义和如本文中所述。

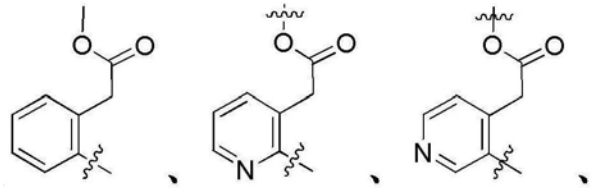
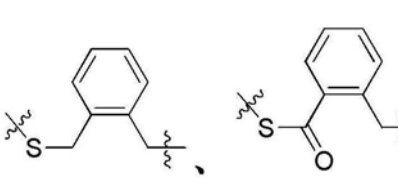
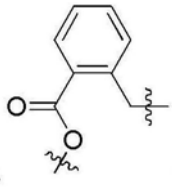
[0528] 在一些实施方案中，L^3是任选地经取代的C_5亚烷基或亚烯基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-O-、-S-，-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-S

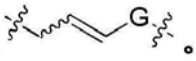
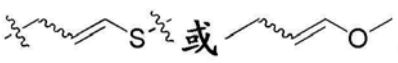
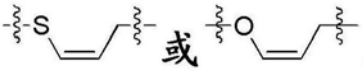
(O)-、-S(O)$_2$-或，并且R'和环Cy'各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，L^3是任选地经取代的C_5亚烷基。在一些实施方案中，-L^3-G-是。

[0529] 在一些实施方案中，L^3是任选地经取代的C_4亚烷基或亚烯基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-O-、-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-或，并且R'和Cy'各自独立地如上所定义和如本文中所述。

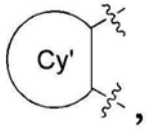
[0530] 在一些实施方案中，-L^3-G-是、、、、、或。

[0531] 在一些实施方案中，L^3是任选地经取代的C_3亚烷基或亚烯基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-O-、-S-，-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-或，并且R'和Cy'各自独立地如上所定义和如本文中所述。

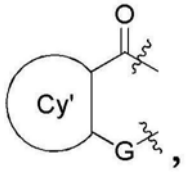
[0532] 在一些实施方案中，-L^3-G-是、、或。

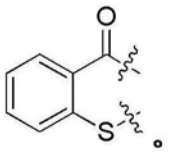
[0533] 在一些实施方案中，L是。在一些实施方案中，L是。在一些实施方案中，L是。

[0534] 在一些实施方案中，L^3是任选地经取代的C_2亚烷基或亚烯基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-O-、-S-，-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-S

(O)-、-S(O)$_2$-或

，并且R'和Cy'各自独立地如上所定义和如本文中所述。

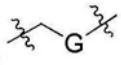
[0535] 在一些实施方案中，-L^3-G-是

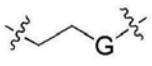
，其中G和Cy'各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，L是

。

[0536] 在一些实施方案中，L是-L^4-G-，其中L^{4}是任选地经取代的C_1-C_2亚烷基；并且G如上所定义并如本文中所述。在一些实施方案中，L是-L^4-G-，其中L^{4}是任选地经取代的C_1-C_2亚烷基；G如上所定义和如本文中所述；并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是-L^4-G-，其中L^{4}是任选地经取代的亚甲基；G如上所定义和如本文中所述；并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是-L^4-G-，其中L^{4}是亚甲基；G如上所定义和如本文中所述；并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是-L^4-G-，其中L^{4}是任选地经取代的-$(CH_2)_2$-；G如上所定义和如本文中所述；并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是-L^4-G-，其中L^{4}是-$(CH_2)_2$-；G如上所定义和如本文中所述；并且G连接于R^1。

[0537] 在一些实施方案中，L是

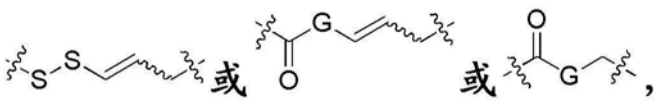
，其中G如上所定义和如本文中所述，并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是

，其中G如上所定义和如本文中所述，并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是

，其中G如上所定义和如本文中所述，并且G连接于R^1。在一些实施方案中，L是

，其中硫原子连接于R^1。在一些实施方案中，L是

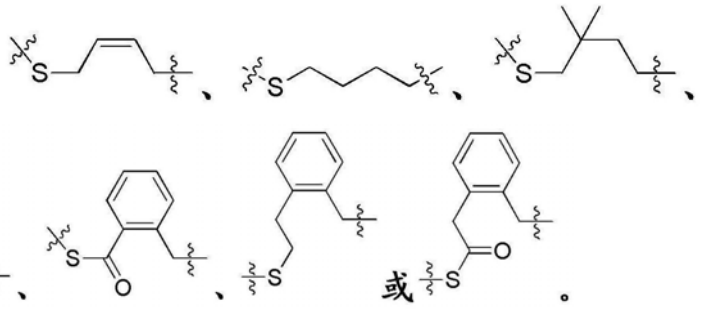
，其中氧原子连接于R^1。

[0538] 在一些实施方案中，L是

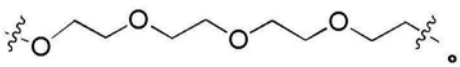
，其中G如上所定义并如本文中所述。

[0539] 在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-S-C(O)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的直链或支链C_1-C_9亚烷基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R')-、-N(R')S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中R'和-Cy-各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-S-C(O)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的C_1-C_6亚烷基。在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-

S-C(O)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的C_1-C_6亚烯基。在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-S-C(O)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的C_1-C_6亚烷基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烯基、亚芳基或亚杂芳基。在一些实施方案中，在一些实施方案中，R^{L3}是任选地经取代的-S-(C_1-C_6亚烯基)-、-S-(C_1-C_6亚烷基)-、-S-(C_1-C_6亚烷基)-亚芳基-(C_1-C_6亚烷基)-、-S-CO-亚芳基-(C_1-C_6亚烷基)-或-S-CO-(C_1-C_6亚烷基)-亚芳基-(C_1-C_6亚烷基)-。

[0540] 在一些实施方案中，L是 

[0541] 在一些实施方案中，L是 。在一些实施方案中，L是 。在一些实施方案中，

。

[0542] 在一些实施方案中，以上以及本文中所述的L实施方案中的硫原子连接于X。在一些实施方案中，以上以及本文中所述的L实施方案中的硫原子连接于R^1。

[0543] 如以上以及本文中所一般定义，R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{50}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{10}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0544] 在一些实施方案中，R^1是氢。在一些实施方案中，R^1是卤素。在一些实施方案中，R^1是-F。在一些实施方案中，R^1是-Cl。在一些实施方案中，R^1是-Br。在一些实施方案中，R^1是-I。

[0545] 在一些实施方案中，R^1是R，其中R如上所定义并如本文中所述。

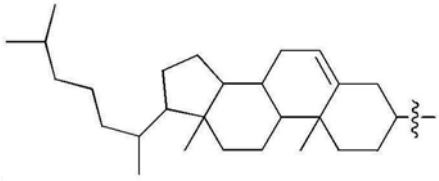
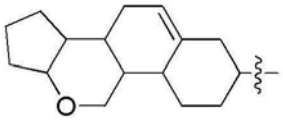
[0546] 在一些实施方案中，R^1是氢。在一些实施方案中，R^1是选自以下的任选地经取代的基团：C_1-C_{50}脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基。

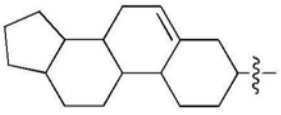
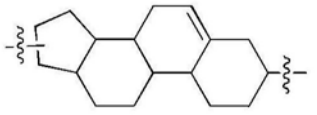
[0547] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{50}脂族。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{10}脂族。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_6脂族。在一些实施方

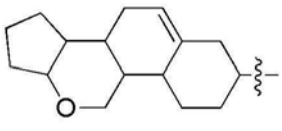
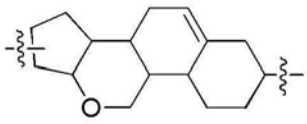
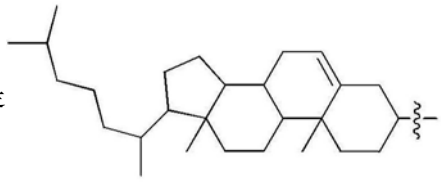
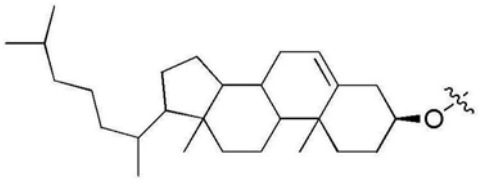
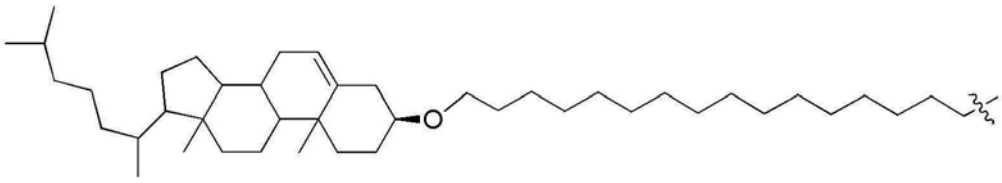
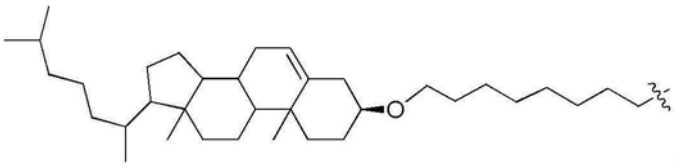
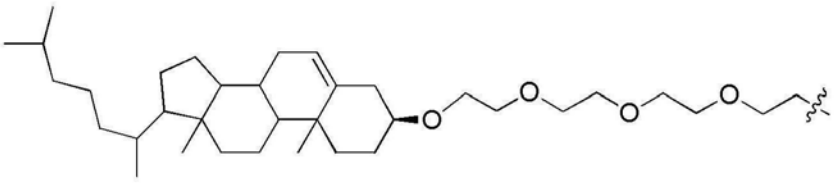
案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_6烷基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的直链或支链己基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的直链或支链戊基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的直链或支链丁基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的直链或支链丙基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的乙基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的甲基。

[0548] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的苯基。在一些实施方案中，R^1是取代的苯基。在一些实施方案中，R^1是苯基。

[0549] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的碳环基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_3-C_{10}碳环基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的单环碳环基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的环庚基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的环己基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的环戊基。在一些实施方案中，R1是任选地经取代的环丁基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的环丙基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的双环碳环基。

[0550] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{50}多环烃。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{50}多环烃，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的。在一些实施方案中，R^1是。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的。

[0551] 在一些实施方案中，R^1是包含一个或更多个任选地经取代的多环烃部分的任选地经取代的C_1-C_{50}脂族。在一些实施方案中，R^1是包含一个或更多个任选地经取代的多环烃部分的任选地经取代的C_1-C_{50}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是包含一个或更多个任选地经取代的、、


或

的任选地经取代的C_1-C_{50}脂族。在一些实施方案中,R^1是

。在一些实施方案中,R^1是

。在一些实施方案中,R^1是

。在一些实施方案中,R^1是

。在一些实施方案中,R^1是

。

[0552] 在一些实施方案中,R^1是任选地经取代的芳基。在一些实施方案中,R^1是任选地经取代的双环芳基环。

[0553] 在一些实施方案中,R^1是任选地经取代的杂芳基。在一些实施方案中,R^1是具有1-3个独立地选自氮、硫或氧的杂原子的任选地经取代的5-6元单环杂芳基环。在一些实施方案中,R^1是具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的经取代的5-6元单环杂芳基环。在一些实施方案中,R^1是具有1-3个独立地选自氮、硫或氧的杂原子的未取代的5-6元单环杂芳基环。

[0554] 在一些实施方案中,R^1是具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元单环杂芳基环。在一些实施方案中,R^1是具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6元单环杂芳基环。

[0555] 在一些实施方案中,R^1是具有1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元单环杂芳基环。在一些实施方案中,R^1选自吡咯基、呋喃基或噻吩基。

[0556] 在一些实施方案中,R^1是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元杂芳基环。在某些实施方案中,R^1是具有1个氮原子和选自硫或氧的另一杂原子的任

选地经取代的5元杂芳基环。示例性R^1基团包括任选地经取代的吡唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基或异噁唑基。

[0557] 在一些实施方案中，R^1是具有1-3个氮原子的6元杂芳基环。在另一些实施方案中，R^1是具有1-2个氮原子的任选地经取代的6元杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是具有2个氮原子的任选地经取代的6元杂芳基环。在某些实施方案中，R^1是具有1个氮的任选地经取代的6元杂芳基环。示例性R^1基团包括任选地经取代的吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、三嗪基或四嗪基。

[0558] 在某些实施方案中，R^1是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的8-10元双环杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在另一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在某些实施方案中，R^1是具有1个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的吲哚基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的氮杂双环[3.2.1]辛烷基。在某些实施方案中，R^1是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的氮杂吲哚基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的苯并咪唑基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的苯并噻唑基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的苯并噁唑基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的吲唑基。在某些实施方案中，R^1是具有3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5,6-稠合杂芳基环。

[0559] 在某些实施方案中，R^1是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在另一些实施方案中，R^1是具有1个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的喹啉基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的异喹啉基。根据一个方面，R^1是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6,6-稠合杂芳基环。在一些实施方案中，R^1是喹唑啉或喹喔啉。

[0560] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的杂环基。在一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的3-7元饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的经取代的3-7元饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未取代的3-7元饱和或部分不饱和杂环。

[0561] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的杂环基。在一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6元饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中，R^1是具有2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的6元部分不饱和杂环。在一些实施方案中，R^1是具有2个氧原子的任选地经取代的6元部分不饱和杂环。

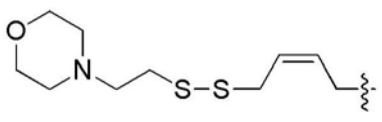
[0562] 在某些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的3-7元饱和或部分不饱和杂环。在某些实施方案中，R^1是环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、氧杂环庚烷基、氮丙啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、氮杂环庚烷基、硫杂环丙烷基、硫杂环丁烷基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、硫杂环庚烷基、二氧杂戊环烷基、氧硫杂

环戊烷基、噁唑烷基、咪唑烷基、噻唑烷基、二硫杂环戊烷基、二噁烷基、吗啉基、氧硫杂环己烷基、哌嗪基、硫代吗啉基、二硫杂环己基、二氧杂环庚烷基、氧杂氮杂环庚烷基、氧硫杂环庚烷基、二硫杂环庚烷基、二氮杂环庚烷基、二氢呋喃酮基、四氢吡喃酮基、氧杂环庚酮基、吡咯烷酮基、哌啶酮基、氮杂环庚酮基、二氢噻吩酮基、四氢噻喃酮基、硫杂环庚烷酮基、噁唑啶酮基、噁嗪烷酮基、氧杂氮杂环庚烷酮基、二氧杂戊环烷酮基、二噁烷酮基、二氧杂环庚烷酮基、氧硫杂啉酮基、氧硫杂环己烷酮基、氧硫杂环庚烷酮基、噻唑烷酮基、噻嗪烷酮基、硫杂氮杂环庚烷酮基、咪唑烷酮基、四氢嘧啶酮基、二氮杂环庚烷酮基、咪唑烷二酮基、噁唑烷二酮基、噻唑烷二酮基、二氧环戊烷二酮基、氧杂硫杂环戊烷二酮基、哌嗪二酮基、吗啉二酮基、硫代吗啉二酮基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、吗啉基、硫代吗啉基、哌啶基、哌嗪基、吡咯烷基、四氢噻吩基或四氢噻喃基。在一些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元饱和或部分不饱和杂环。

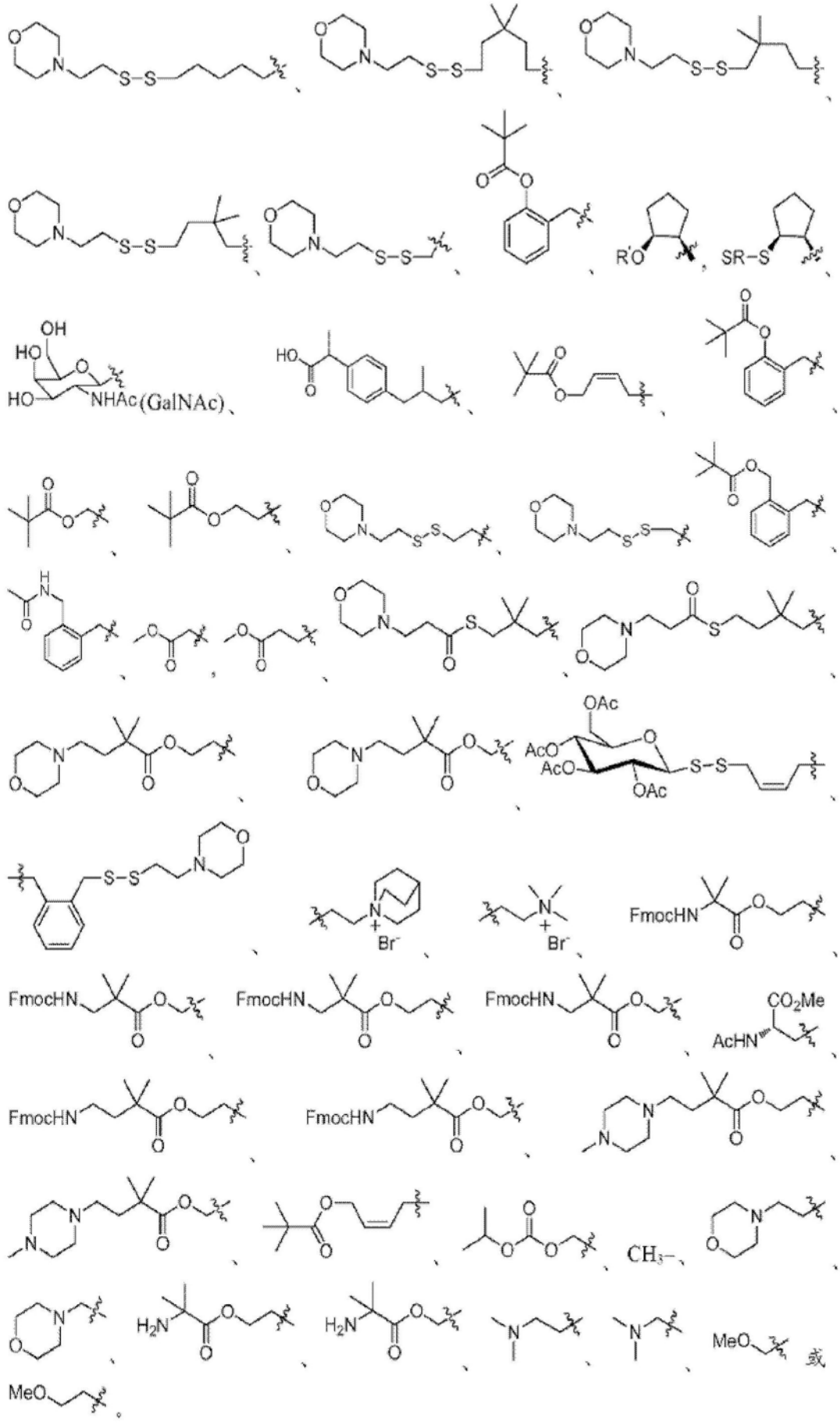
[0563] 在某些实施方案中，R^1是具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5-6元部分不饱和单环。在某些实施方案中，R^1是任选地经取代的四氢吡啶基、二氢噻唑基、二氢噁唑基或噁唑啉基。

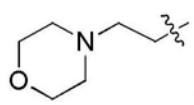
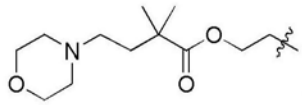
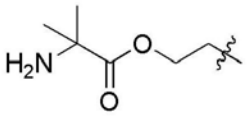
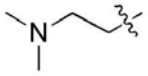
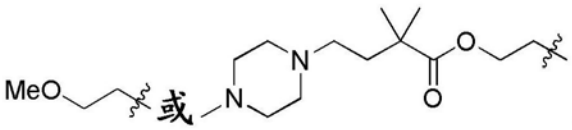
[0564] 在一些实施方案中，R^1是具有1-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的8-10元双环饱和或部分不饱和杂环。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的二氢吲哚基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的异二氢吲哚基。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的1,2,3,4-四氢喹啉。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的1,2,3,4-四氢异喹啉。

[0565] 在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{10}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{10}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各R’独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是任选地经取代的C_1-C_{10}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-OC(O)-或-C(O)O-，其中各R’独立地如上所定义和如本文中所述。

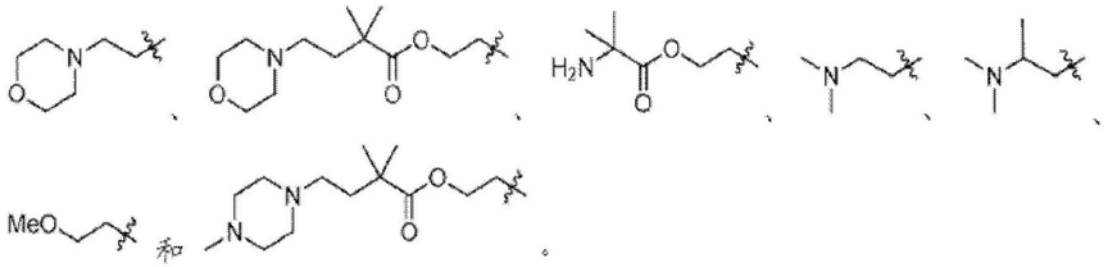
[0566] 在一些实施方案中，R^1是 

、

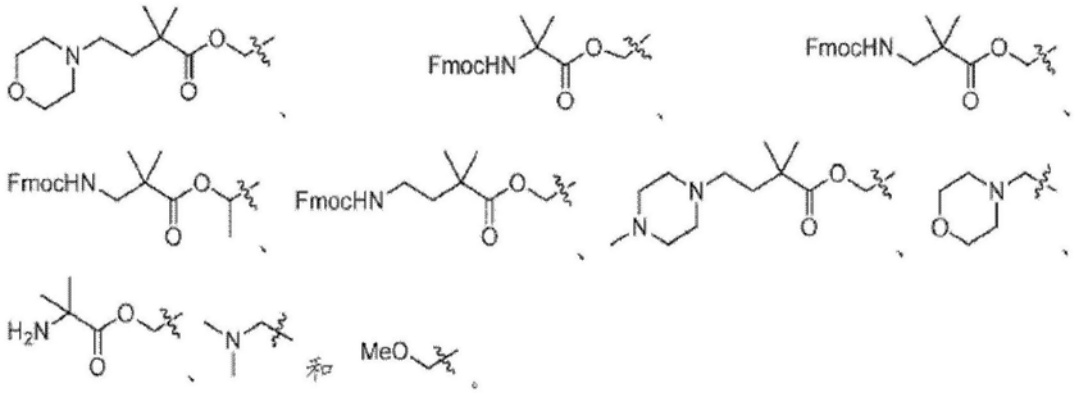
[0567] 
NHAc(GalNAc)
Br⁻
Br⁻
FmocHN
FmocHN
FmocHN
FmocHN
FmocHN
FmocHN
AcHN
CH₃
MeO
或
MeO

[0568] 在一些实施方案中，R^1是CH_3-、、、、、。

[0569] 在一些实施方案中，R^1包含连接于L的末端任选地经取代的-$(CH_2)_2$-部分。以下描述示例性所述R^1基团：

[0570] 

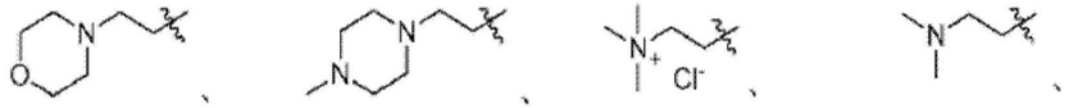
[0571] 在一些实施方案中，R^1包含连接于L的末端任选地经取代的-(CH_2)-部分。以下描述示例性所述R^1基团：

[0572] 

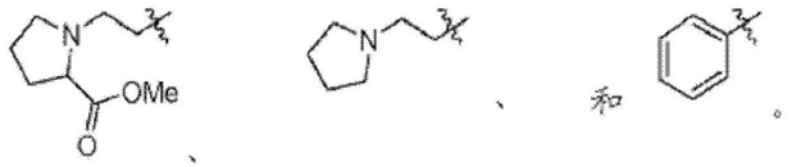
[0573] 在一些实施方案中，R^1是-S-R^{L2}，其中R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，并且R'和-Cy-各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是-S-R^{L2}，其中硫原子与L基团中的硫原子连接。

[0574] 在一些实施方案中，R^1是-C(O)-R^{L2}，其中R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，并且R'和-Cy-各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，R^1是-C(O)-R^{L2}，其中羰基与L基团中的G连接。在一些实施方案中，R^1是-C(O)-R^{L2}，其中羰基与L基团中的硫原子连接。

[0575] 在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9烷基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9烯基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9炔基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-Cy-或-C(O)-。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-Cy-。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的亚杂环基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的亚芳基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的亚杂芳基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_3-C_{10}亚碳环基。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中两个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-Cy-或-C(O)-。在一些实施方案中，R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中两个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：-Cy-或-C(O)-。以下描述示例性R^{L2}基团：

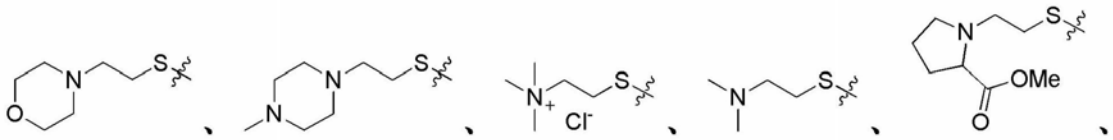


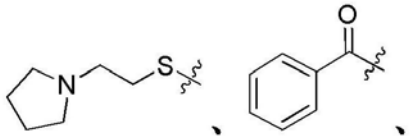
[0576]



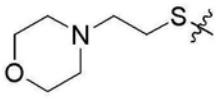
[0577] 在一些实施方案中，R^1是氢或选自以下的任选地经取代的基团：

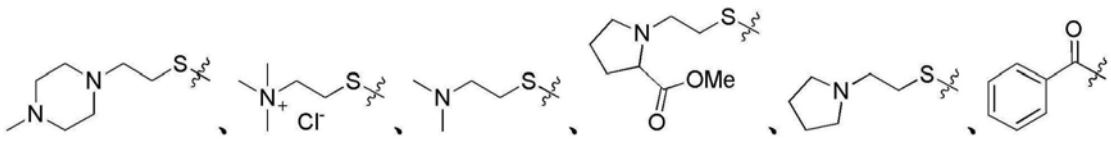
[0578]



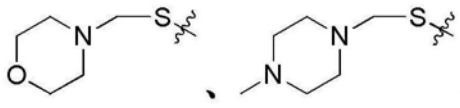


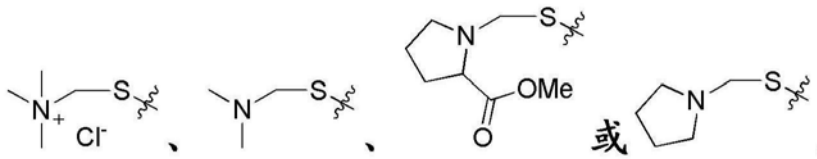
-S-(C_1-C_{10}脂族)、C_1-C_{10}脂族、芳基、C_1-C_6杂烷基、杂芳基和杂环基。在一些实施方案中，R^1是



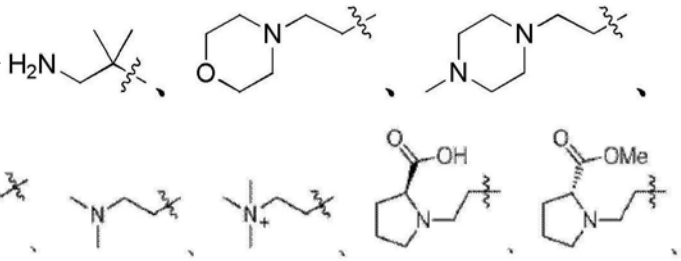


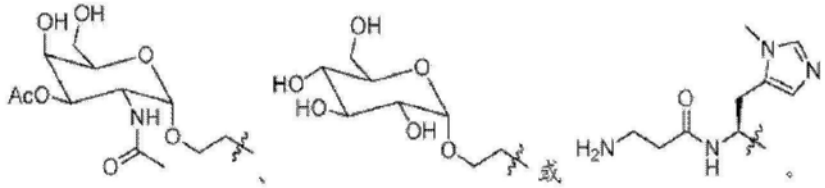
或-S-(C_1-C_{10}脂族)。在一些实施方案中，R^1是





[0579] 在一些实施方案中，R^1是选自以下的任选地经取代的基团：-S-(C_1-C_6脂族)、C_1-C_{10}脂族、C_1-C_6杂脂族、芳基、杂环基和杂芳基。

[0580] 在一些实施方案中，R^1是

[0581] 

[0582] 在一些实施方案中，以上以及本文中所述的R^1实施方案中的硫原子与以上以及本文中所述的L实施方案中的硫原子、G、E或-C(O)-部分连接。在一些实施方案中，以上以及本文中所述的R^1实施方案中的-C(O)-部分与以上以及本文中所述的L实施方案中的硫原子、G、E或-C(O)-部分连接。

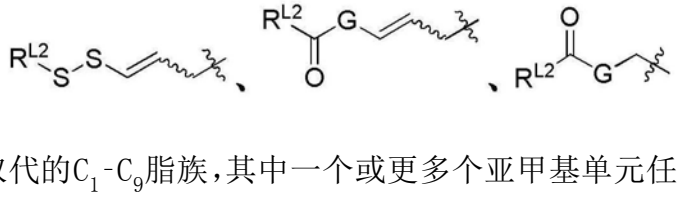
[0583] 在一些实施方案中，-L-R^1是以上以及本文中所述的L实施方案和R^1实施方案的任何组合。

[0584] 在一些实施方案中，-L-R^1是-L^3-G-R^1，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0585] 在一些实施方案中，-L-R^1是-L^4-G-R^1，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0586] 在一些实施方案中，-L-R^1是-L^3-G-S-R^{L2}，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

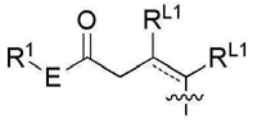
[0587] 在一些实施方案中，-L-R^1是-L^3-G-C(O)-R^{L2}，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0588] 在一些实施方案中，-L-R^1是，其中R^{L2}是任选地经取代的C_1-C_9脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-，并且各G独立地如上所定义和如本文中所

述。

[0589] 在一些实施方案中，-L-R^1是-R^{L3}-S-S-R^{L2}，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，-L-R^1是-R^{L3}-C(O)-S-S-R^{L2}，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

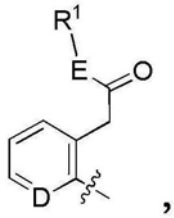
[0590] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0591] 

，

[0592] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

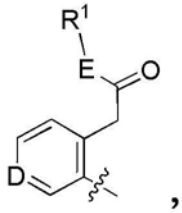
[0593] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0594] 

，

[0595] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

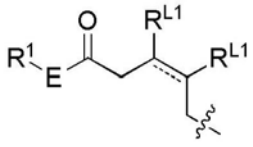
[0596] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0597] 

，

[0598] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

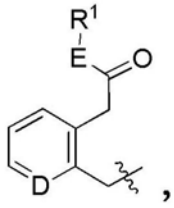
[0599] 在一些实施方案中，-L-R1具有以下结构：

[0600] 

，

[0601] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

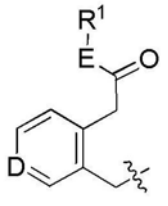
[0602] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0603] 

，

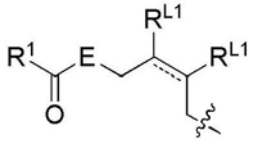
[0604] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0605] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0606] 

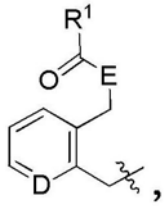
[0607] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0608] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0609] 

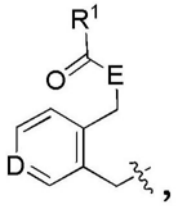
[0610] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0611] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0612] 

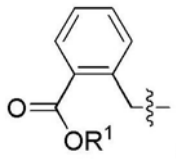
[0613] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0614] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0615] 

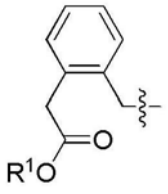
[0616] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0617] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0618] 

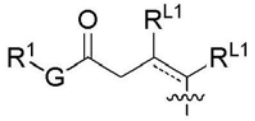
[0619] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0620] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0621] 

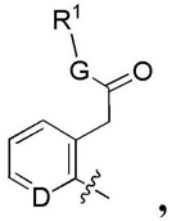
[0622] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0623] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0624] 

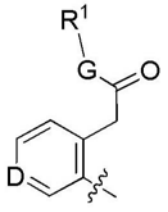
[0625] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0626] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0627] 

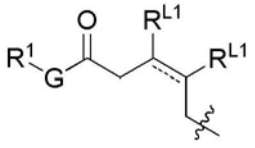
[0628] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0629] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0630] 

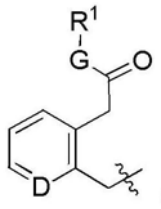
[0631] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0632] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0633] 

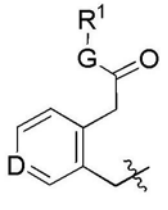
[0634] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0635] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0636] 

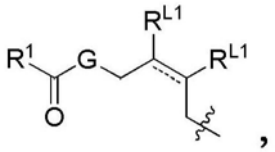
[0637] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0638] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0639] 

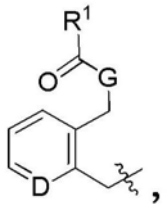
[0640] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0641] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0642] 

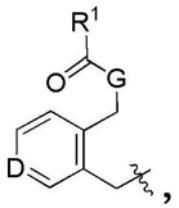
[0643] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0644] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0645] 

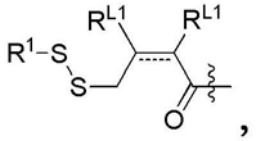
[0646] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0647] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0648] 

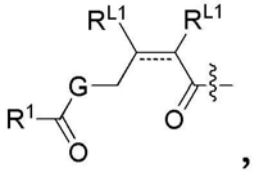
[0649] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0650] 在一些实施方案中，-L-R^1具有以下结构：

[0651] 

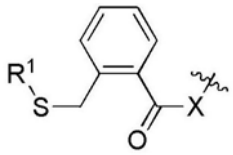
[0652] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0653] 在一些实施方案中，L具有以下结构：

[0654] 

[0655] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

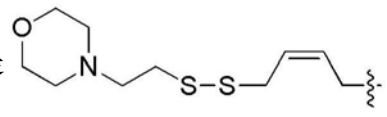
[0656] 在一些实施方案中，-X-L-R^1具有以下结构：

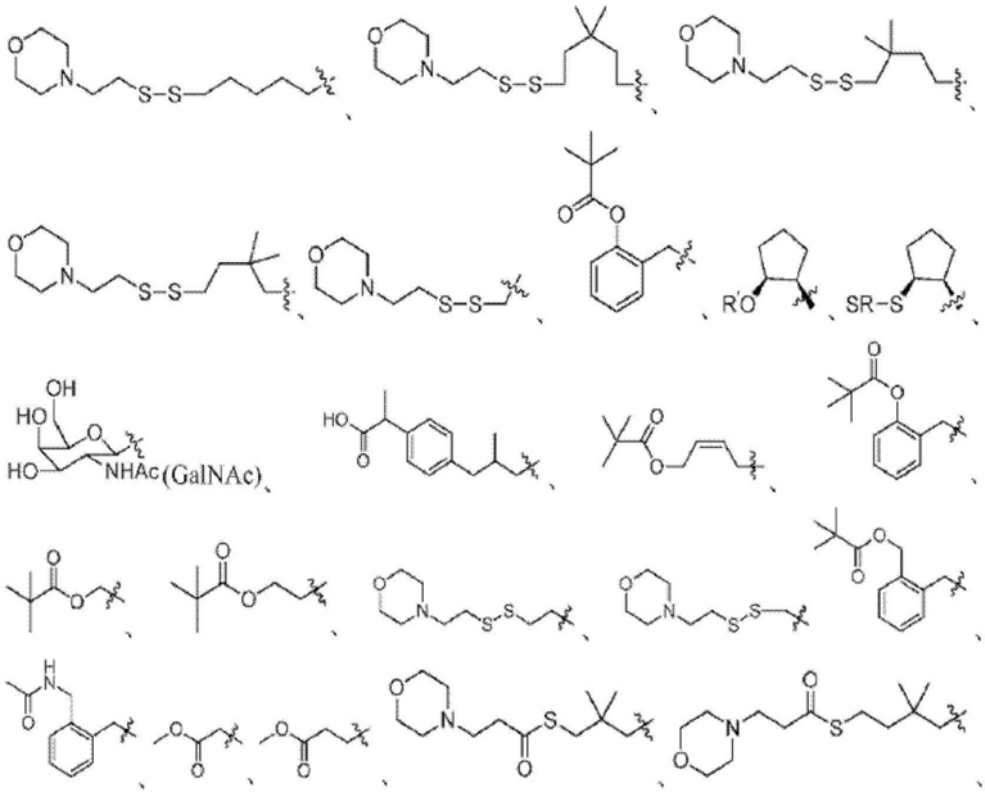
[0657] 

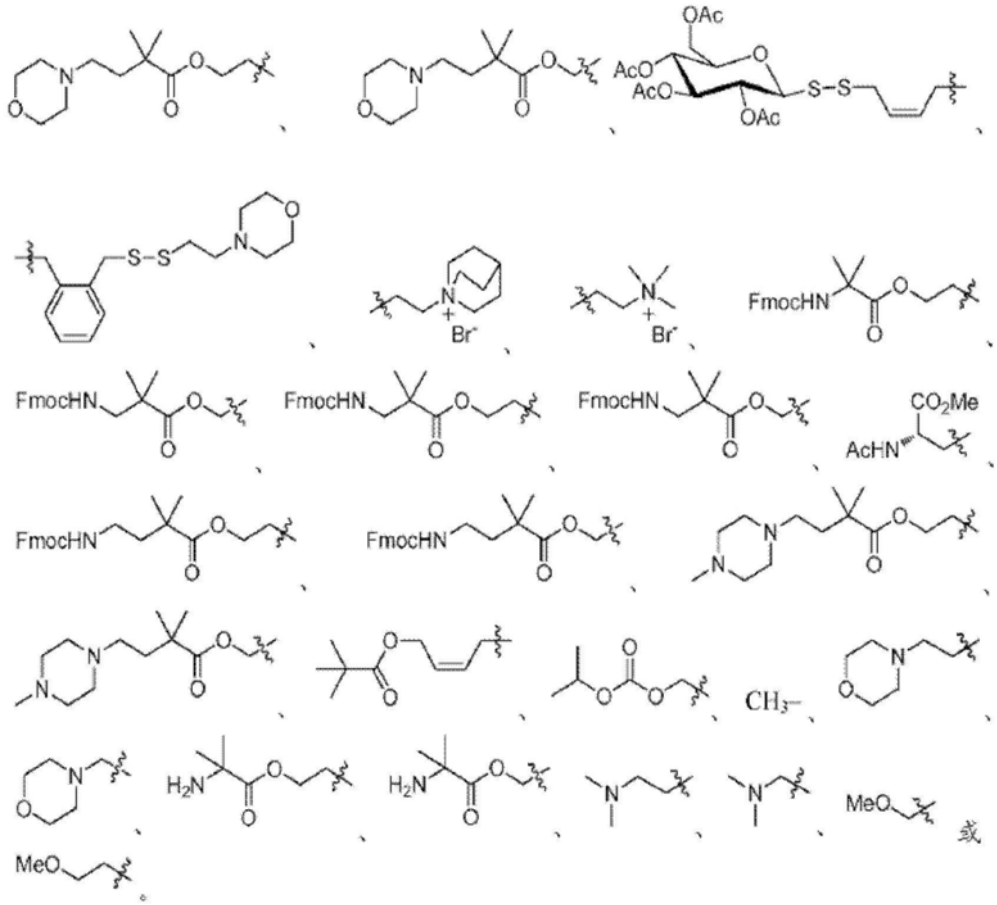
[0658] 其中：

[0659] 苯基环任选地被取代，并且

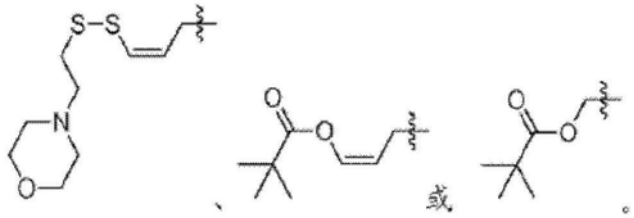
[0660] R^1和X各自独立地如上所定义和如本文中所述。

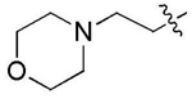
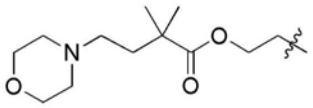
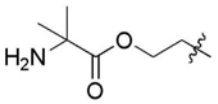
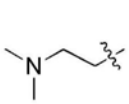
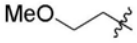
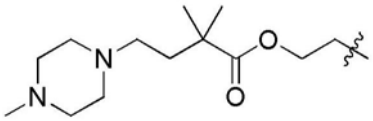
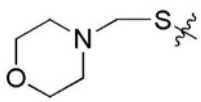
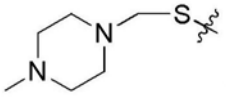
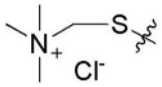
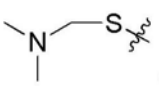
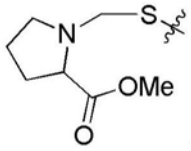
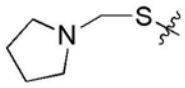
[0661] 在一些实施方案中，-L-R^1是 



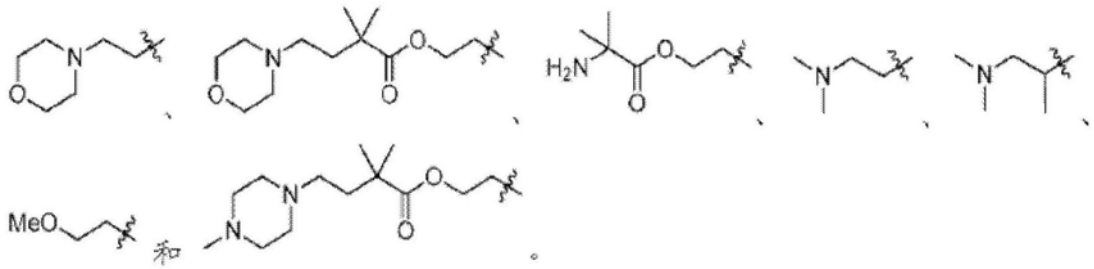
[0662] 

[0663] 在一些实施方案中，-L-R^1是：

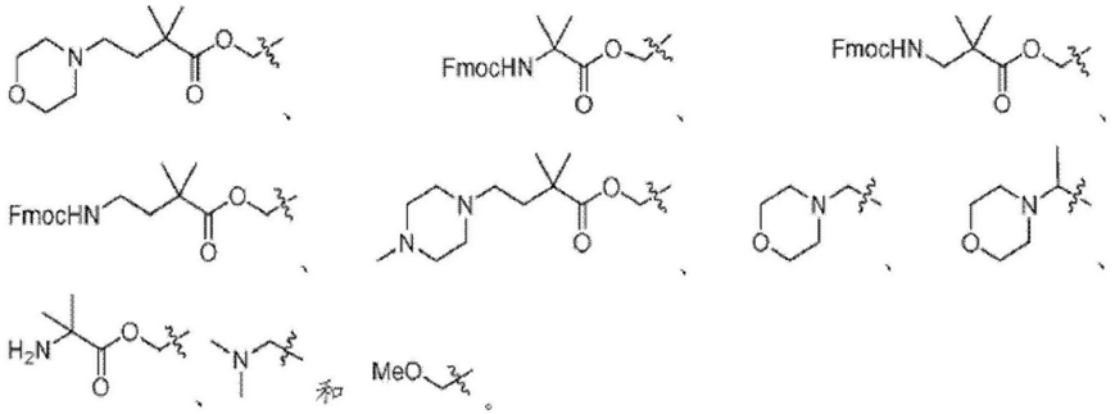
[0664] 

[0665] 在一些实施方案中，-L-R^1是CH_3-、、、、、或。在一些实施方案中，-L-R^1是、、、、或。

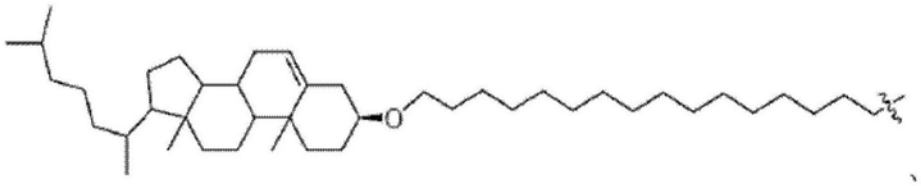
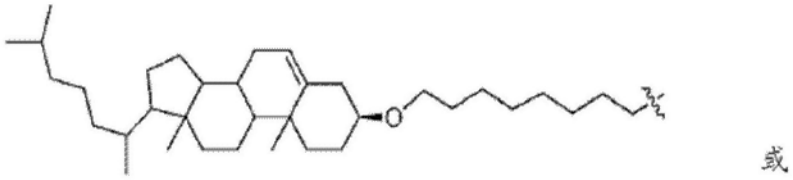
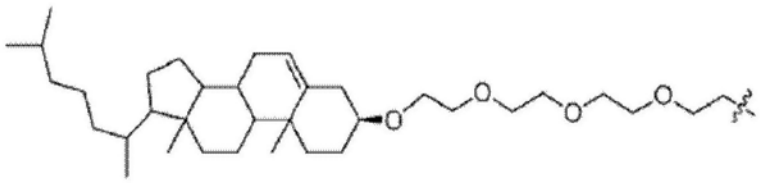
[0666] 在一些实施方案中，-L-R^1包含连接于X的末端任选地经取代的-$(CH_2)_2$-部分。在一些实施方案中，-L-R^1包含连接于X的末端-$(CH_2)_2$-部分。以下描述示例性所述-L-R^1部分：

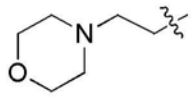
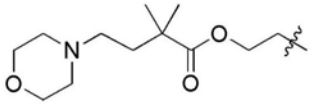
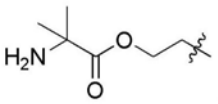
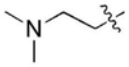
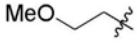
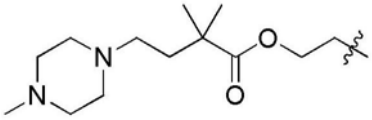
[0667] 

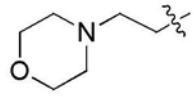
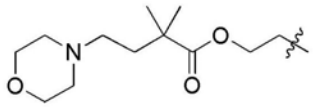
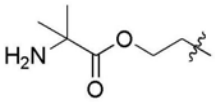
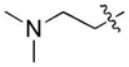
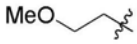
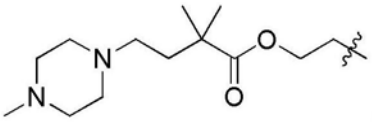
[0668] 在一些实施方案中，-L-R^1包含连接于X的末端任选地经取代的-(CH_2)-部分。在一些实施方案中，-L-R^1包含连接于X的末端-(CH_2)-部分。以下描述示例性所述-L-R^1部分：

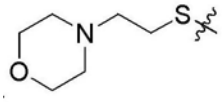
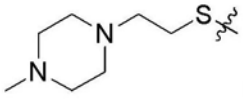
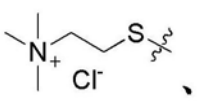
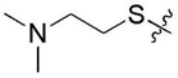
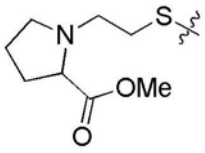
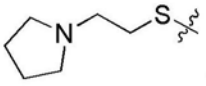
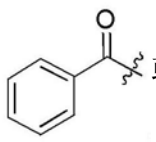
[0669] 

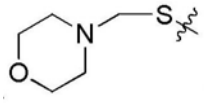
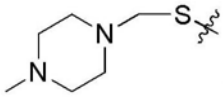
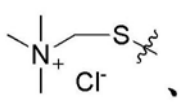
[0670] 在一些实施方案中，-L-R^1是

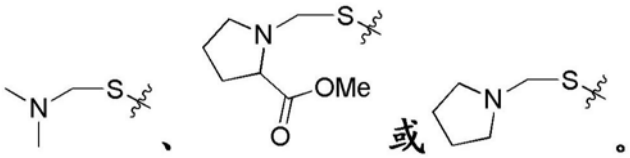
[0671] 

或

。

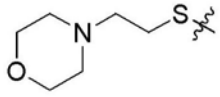
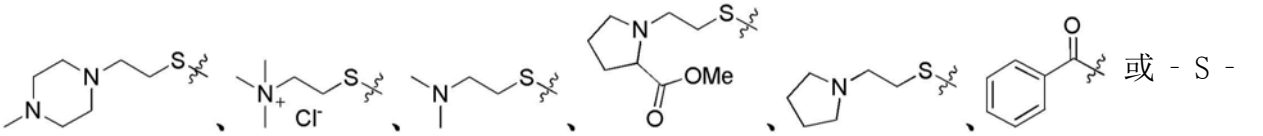
[0672] 在一些实施方案中，-L-R^1是CH_3-、、、、、、或并且X是-S-。；

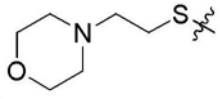
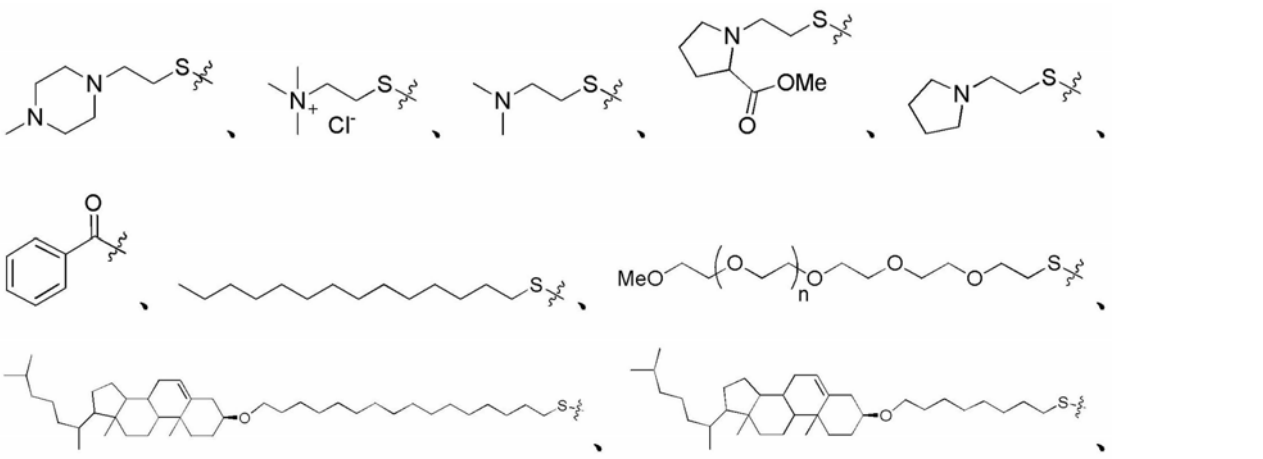
[0673] 在一些实施方案中，-L-R^1是CH_3-、、、、、或X是-S-，W是O，Y是-O-，并且Z是-O-。，

[0674] 在一些实施方案中，R^1是、、、、、、或-S-(C_1-C_{10}脂族)。

[0675] 在一些实施方案中，R^1是、、、

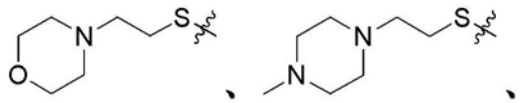


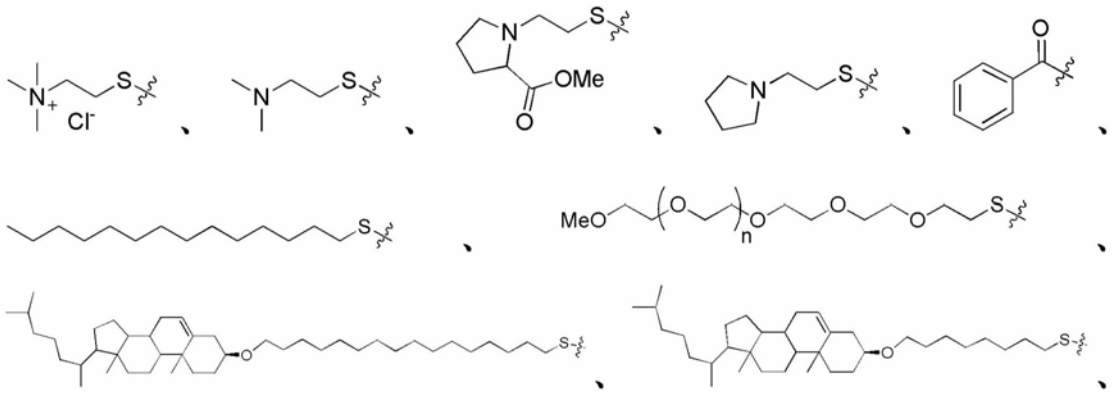
[0676] 在一些实施方案中，X是-O-或-S-，并且R^1是、或-S-(C_1-C_{10}脂族)。

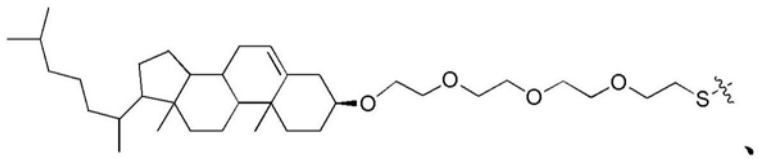
[0677] 在一些实施方案中，X是-O-或-S-，并且R^1是、-S-(C_1-C_{10}脂族)或-S-(C_1-C_{50}脂族)。

[0678] 在一些实施方案中，L是共价键，并且-L-R^1是R^1。

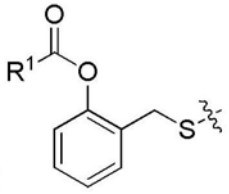
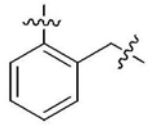
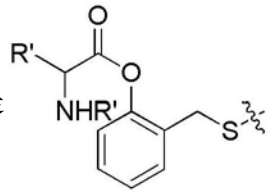
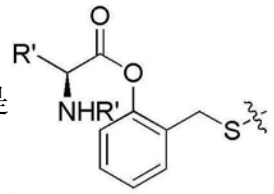
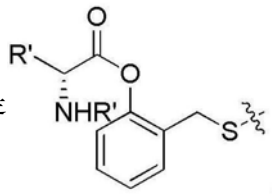
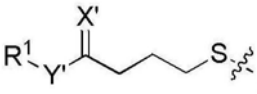
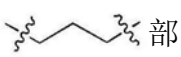
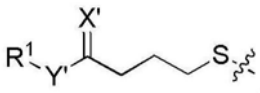
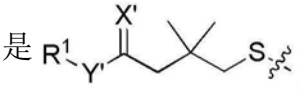
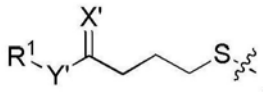
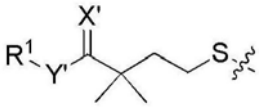
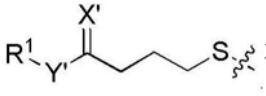
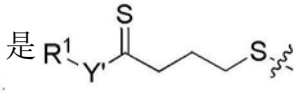
[0679] 在一些实施方案中，-L-R^1不是氢。

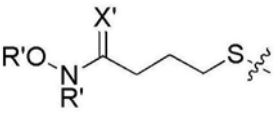
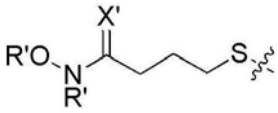
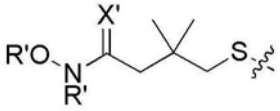
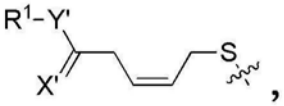
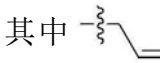
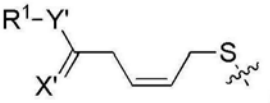
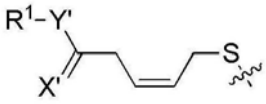
[0680] 在一些实施方案中，-X-L-R^1是R^1是、

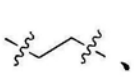
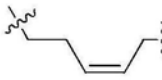
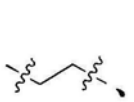
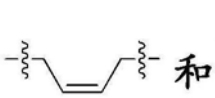
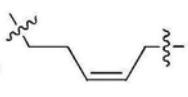
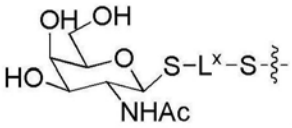




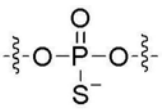
-S-(C_1-C_{10}脂族)或-S-(C_1-C_{50}脂族)。

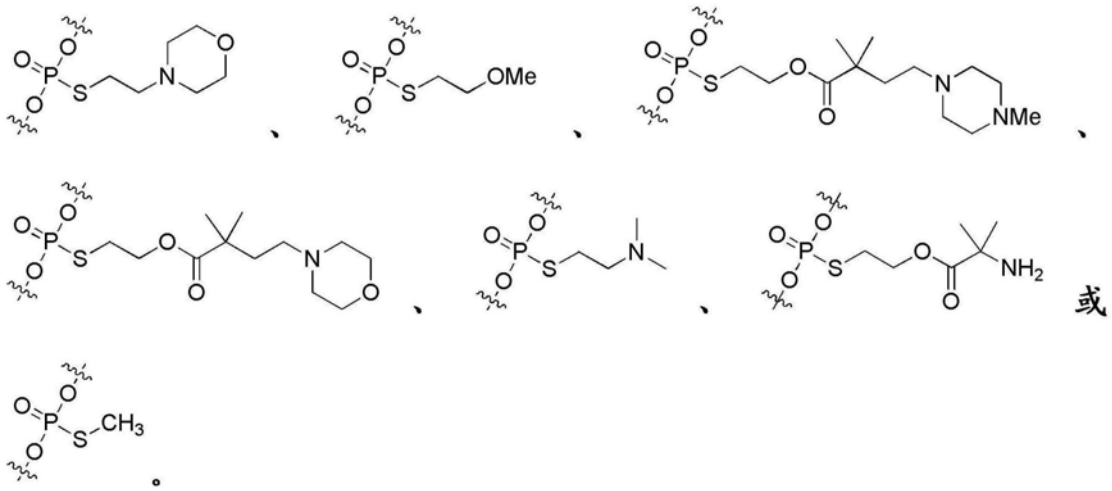
[0681] 在一些实施方案中，-X-L-R^1具有结构，其中部分任选地被取代。在一些实施方案中，-X-L-R^1是。在一些实施方案中，-X-L-R^1是。在一些实施方案中，-X-L-R^1是。在一些实施方案中，-X-L-R^1具有结构，其中X'是O或S，Y'是-O-、-S-或-NR'-，并且部分任选地被取代。在一些实施方案中，Y'是-O-、-S-或-NH-。在一些实施方案中，是。在一些实施方案中，是。在一些实施方案中，是。在一些

实施方案中，-X-L-R^1具有结构，其中X'是O或S，并且部分任选地被取代。在一些实施方案中，是。在一些实施方案中，-X-L-R^1是，其中任选地被取代。在一些实施方案中，-X-L-R^1是，其中被取代。在一些实施方案中，-X-L-R^1是，其中未被取代。

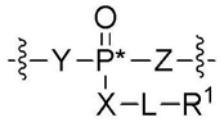
[0682] 在一些实施方案中，-X-L-R^1是R^1-C(O)-S-L^x-S-，其中L^x是选自以下的任选地经取代的基团：、、、和。在一些实施方案中，L^x是、、、和。在一些实施方案中，-X-L-R^1是$(CH_3)_3C$-S-S-L^x-S-。在一些实施方案中，-X-L-R^1是R^1-C(=X')-Y'-$C(R)_2$-S-L^x-S-。在一些实施方案中，-X-L-R^1是R-C(=X')-Y'-CH_2-S-L^x-S-。在一些实施方案中，-X-L-R^1是。

[0683] 如本领域技术人员将了解，本文中所述的许多-X-L-R^1基团是可切割的，并且在向对象施用之后可转化成-X^-。在一些实施方案中，-X-L-R^1是可切割的。在一些实施方案中，-X-L-R^1是-S-L-R^1，并且在向对象施用之后转化成-S^-。在一些实施方案中，转化是由对象的酶促进。如本领域技术人员所了解，确定-S-L-R^1基团在施用之后是否转化成-S^-的方法在本领域中是广泛已知并实施的，包括用于研究药物代谢和药物动力学的那些。

[0684] 在一些实施方案中，具有式I结构的核苷酸间键联是、



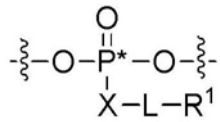
[0685] 在一些实施方案中，式I核苷酸间键联具有式I-a结构：

[0686] 

(I-a)

[0687] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

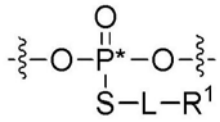
[0688] 在一些实施方案中，式I核苷酸间键联具有式I-b结构：

[0689] 

(I-b)

[0690] 其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0691] 在一些实施方案中，式I核苷酸间键联是具有式I-c结构的硫代磷酸三酯键联：

[0692] 

(I-c)

[0693] 其中：

[0694] P＊是不对称磷原子，并且是Rp或Sp；

[0695] L是共价键或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[0696] R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{50}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-

O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[0697] 各R′独立地是-R、-C(O)R、-CO$_2$R或-SO$_2$R，或：

[0698] 同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环，或

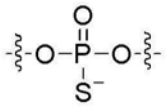
[0699] 同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的芳基、碳环、杂环或杂芳基环；

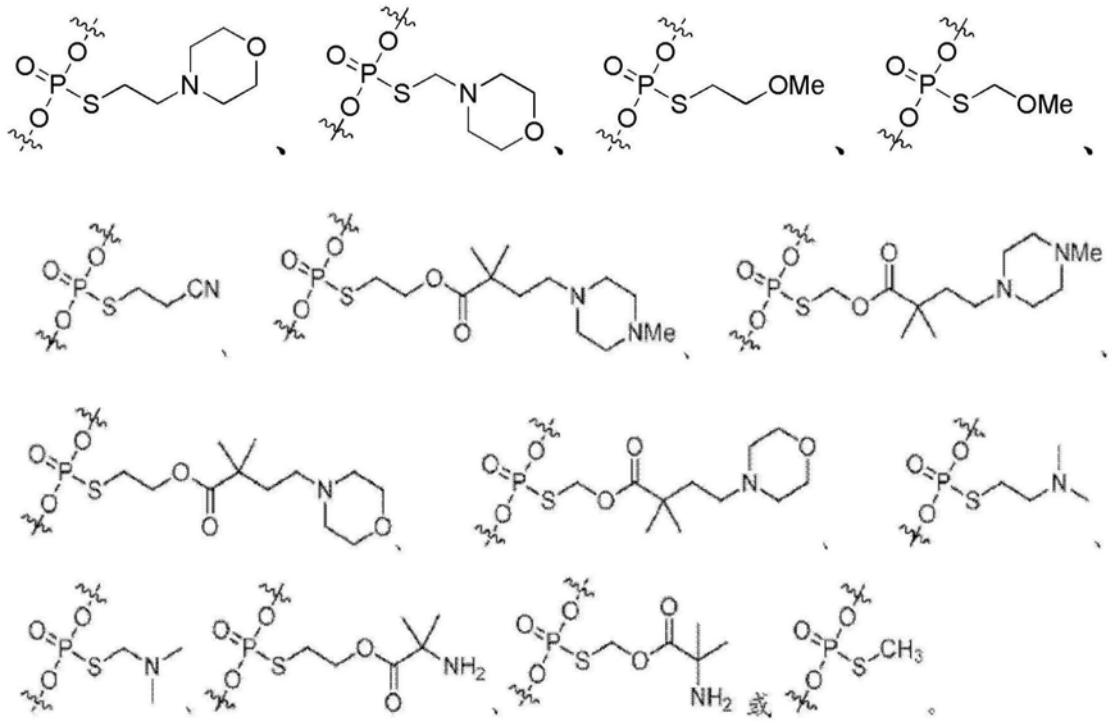
[0700] -Cy-是选自亚苯基、亚碳环基、亚芳基、亚杂芳基或亚杂环基的任选地经取代的二价环；

[0701] 各R独立地是氢或选自C$_1$-C$_6$脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团；

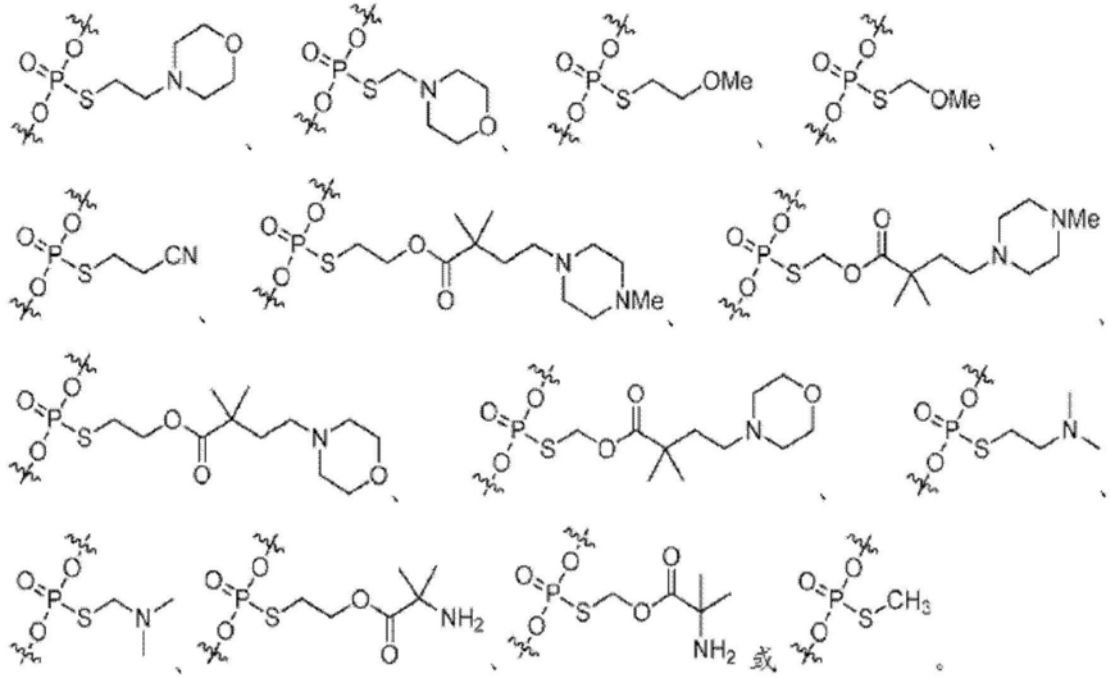
[0702] -§-各自独立地表示与核苷的连接；并且

[0703] 当L是共价键时，R^{1}不是-H。

[0704] 在一些实施方案中，具有式I结构的核苷酸间键联是 、



[0705] 在一些实施方案中，具有式I-c结构的核苷酸间键联是

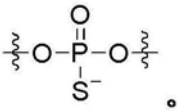
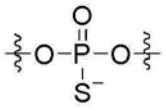
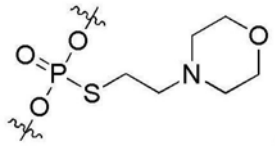
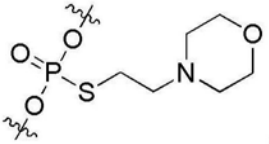
[0706] 

[0707] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含一个或更多个磷酸二酯键联和一个或更多个具有式I-a、I-b或I-c的经修饰核苷酸间键联。

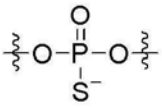
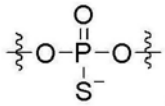
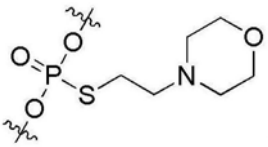
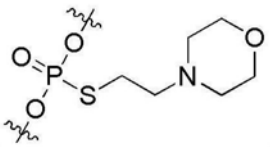
[0708] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少一个具有式I-c结构的硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少两个具有式I-c结构的硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少三个具有式I-c结构的硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少四个具有式I-c结构的硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少五个具有式I-c结构的硫代磷酸三酯键联。

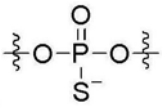
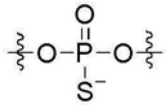
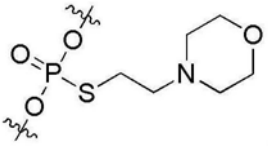
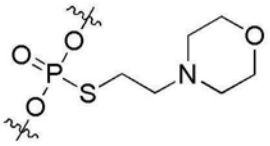
[0709] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中所述序列与GCCTCAGTCTGCTTCGCACC具有超过50％同一性。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中所述序列与GCCTCAGTCTGCTTCGCACC具有超过60％同一性。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中所述序列与GCCTCAGTCTGCTTCGCACC具有超过70％同一性。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中所述序列与GCCTCAGTCTGCTTCGCACC具有超过80％同一性。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中所述序列与GCCTCAGTCTGCTTCGCACC具有超过90％同一性。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中所述序列与

GCCTCAGTCTGCTTCGCACC具有超过95%同一性。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC。

[0710] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中至少一个核苷酸间键联具有手性键联磷。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中至少一个核苷酸间键联具有式I结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中各核苷酸间键联具有式I结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中至少一个核苷酸间键联具有式I-c结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中各核苷酸间键联具有式I-c结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中至少一个核苷酸间键联是。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中各核苷酸间键联是。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中至少一个核苷酸间键联是。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含存在于GCCTCAGTCTGCTTCGCACC中的序列，其中各核苷酸间键联是。

[0711] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联具有手性键联磷。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联具有式I结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联具有式I结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联具有式I-c结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联具有式I-c结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，

其中至少一个核苷酸间键联是 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联是。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联是 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其包含序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联是。

[0712] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联具有手性键联磷。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联具有式I结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联具有式I结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联具有式I-c结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联具有式I-c结构。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联是 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联是。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个核苷酸间键联是 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各核苷酸间键联是。

[0713] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个键联磷是Rp。本领域普通技术人员了解的是在其中手性控制的寡核苷酸包含RNA序列的某些实施方案中，各T独立地并任选地被U替换。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各键联磷是Rp。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个键联磷是Sp。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各键联磷是Sp。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是嵌段聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是立体嵌段聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是P修饰嵌段聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是键联嵌段聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是交替聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是立体交替聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是P修饰交替聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是键联交替聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是单聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是立体单聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是P修饰单聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是键联单聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是间隔聚体。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中所述寡核苷酸是跳跃聚体。

[0714] 在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各胞嘧啶任选地并独立地被5-甲基胞嘧啶替换。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中至少一个胞嘧啶任选地并独立地被5-甲基胞嘧啶替换。在一些实施方案中，本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸，其具有序列GCCTCAGTCTGCTTCGCACC，其中各胞嘧啶任选地并独立地被5-甲基胞嘧啶替换。

[0715] 在一些实施方案中，设计手性控制的寡核苷酸以使一个或更多个核苷酸包含在某些条件下倾向于“自动释放”的磷修饰。即，在某些条件下，设计特定磷修饰以使其自寡核苷酸自我切割来提供例如磷酸二酯，如存在于天然DNA和RNA中的那些。在一些实施方案中，所述磷修饰具有结构-O-L-R^1，其中L和R^1各自独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，自动释放基团包括吗啉代基团。在一些实施方案中，自动释放基团的特征在于能够

将试剂递送至核苷酸间磷接头中，所述试剂有助于对磷原子的进一步修饰，例如脱硫。在一些实施方案中，试剂是水，并且进一步的修饰是水解以形成如存在于天然DNA和RNA中的磷酸二酯。

[0716] 在一些实施方案中，设计手性控制的寡核苷酸以使通过在磷处的一个或更多个特定修饰来改进所得药物性质。在本领域中文件充分证明的是某些寡核苷酸由核酸酶迅速降解，并且表现穿过细胞质细胞膜的不良细胞摄取(Poijarvi-Virta等，Curr.Med.Chem.(2006)，13(28)；3441-65；Wagner等，Med.Res.Rev.(2000)，20(6)：417-51；Peyrottes等，Mini Rev.Med.Chem.(2004)，4(4)：395-408；Gosselin等，(1996)，43(1)：196-208；Bologna等，(2002)，Antisense&Nucleic Acid Drug Development 12：33-41)。例如，Vives等(Nucleic Acids Research(1999)，27(20)：4071-76)发现叔丁基SATE前寡核苷酸相较于母体寡核苷酸显示细胞渗透显著提高。

[0717] 在一些实施方案中，在键联磷处的修饰的特征在于其能够通过一种或更多种酯酶、核酸酶和/或细胞色素P450酶(包括但不限于下表1中所列的那些)转化成磷酸二酯，如天然DNA和RNA中存在的那些。

[0718] 表1.示例性酶。

[0719]

家族	基因
CYP1	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1

[0720]

CYP3	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP4	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP5	CYP5A1
CYP7	CYP7A1, CYP7B1
CYP8	CYP8A1 (前列环素合成酶)、CYP8B1 (胆汁酸生物合成)
CYP11	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP17	CYP17A1
CYP19	CYP19A1
CYP20	CYP20A1
CYP21	CYP21A2
CYP24	CYP24A1
CYP26	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1
CYP27	CYP27A1 (胆汁酸生物合成)、CYP27B1 (维生素D3 1-α羟化酶，活化维生素D3)、CYP27C1 (功能未知)
CYP39	CYP39A1
CYP46	CYP46A1
CYP51	CYP51A1 (羊毛固醇14-α脱甲基酶)

[0721] 在一些实施方案中，在磷处的修饰产生特征在于充当前药的P修饰部分，例如在移除之前，P修饰部分有助于寡核苷酸递送至期望位置中。例如，在一些实施方案中，P修饰部分由键联磷处的PEG化产生。相关领域技术人员将了解多种PEG链长度是可用的，并且对链长度的选择将部分地由PEG化寻求达到的结果所决定。例如，在一些实施方案中，实现PEG化

以降低RES摄取,并且延长寡核苷酸的体内循环寿命。

[0722] 在一些实施方案中,根据本发明使用的PEG化试剂的分子量为约300g/mol至约100,000g/mol。在一些实施方案中,PEG化试剂的分子量为约300g/mol至约10,000g/mol。在一些实施方案中,PEG化试剂的分子量为约300g/mol至约5,000g/mol。在一些实施方案中,PEG化试剂的分子量为约500g/mol。在一些实施方案中,PEG化试剂的分子量为约1000g/mol。在一些实施方案中,PEG化试剂的分子量为约3000g/mol。在一些实施方案中,PEG化试剂的分子量为约5000g/mol。

[0723] 在某些实施方案中,PEG化试剂是PEG500。在某些实施方案中,PEG化试剂是PEG1000。在某些实施方案中,PEG化试剂是PEG3000。在某些实施方案中,PEG化试剂是PEG5000。

[0724] 在一些实施方案中,P修饰部分的特征在于其充当PK增强剂,例如脂质、PEG化脂质等。

[0725] 在一些实施方案中,P修饰部分的特征在于其充当促进细胞进入和/或内体逃逸(endosomal escape)的试剂,如膜破坏性脂质或肽。

[0726] 在一些实施方案中,P修饰部分的特征在于其充当靶向试剂。在一些实施方案中,P修饰部分是或包含靶向试剂。本文中使用的短语“靶向试剂”是以下实体:其与目标有效载荷(payload)(例如与寡核苷酸或寡核苷酸组合物)缔合,并且也与目标靶标位点相互作用以使当与所述靶向试剂缔合时,所述目标有效载荷靶向所述目标靶标位点的程度基本上大于当所述目标有效载荷不与所述靶向试剂缔合时,在另外可比条件下观察到的程度。靶向试剂可以是或包含多种化学部分中的任一个,所述部分包括例如小分子部分、核酸、多肽、碳水化合物等。靶向试剂由Adarsh等“Organelle Specific Targeted Drug Delivery-A Review,”International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences,2011,第895页进一步描述。

[0727] 示例性所述靶向试剂包括但不限于蛋白质(例如转铁蛋白)、寡肽(例如环状和无环含RGD的寡肽)、抗体(单克隆和多克隆抗体,例如IgG、IgA、IgM、IgD、IgE抗体)、糖/碳水化合物(例如单糖和/或寡糖(甘露糖、甘露糖-6-磷酸、半乳糖等))、维生素(例如叶酸盐)或其他小生物分子。在一些实施方案中,靶向部分是类固醇分子(例如胆汁酸,包括胆酸、脱氧胆酸、脱氢胆酸;可的松(cortisone);地高辛(digoxigenin);睾固酮(testosterone);胆固醇;阳离子类固醇,如具有在可的松环的3位通过双键连接的三甲基氨基甲基酰肼基团的可的松等)。在一些实施方案中,靶向部分是亲脂性分子(例如脂环族烃、饱和和不饱和脂肪酸、蜡、萜烯和聚脂环族烃,如金刚烷胺和巴克敏斯特富勒烯(buckminsterfullerene))。在一些实施方案中,亲脂性分子是类萜,如维生素A、视黄酸、视黄醛或脱氢视黄醛。在一些实施方案中,靶向部分是肽。

[0728] 在一些实施方案中,P修饰部分是式-X-L-R^1靶向试剂,其中X、L和R^1各自如上式I中所定义。

[0729] 在一些实施方案中,P修饰部分的特征在于其有助于细胞特异性递送。

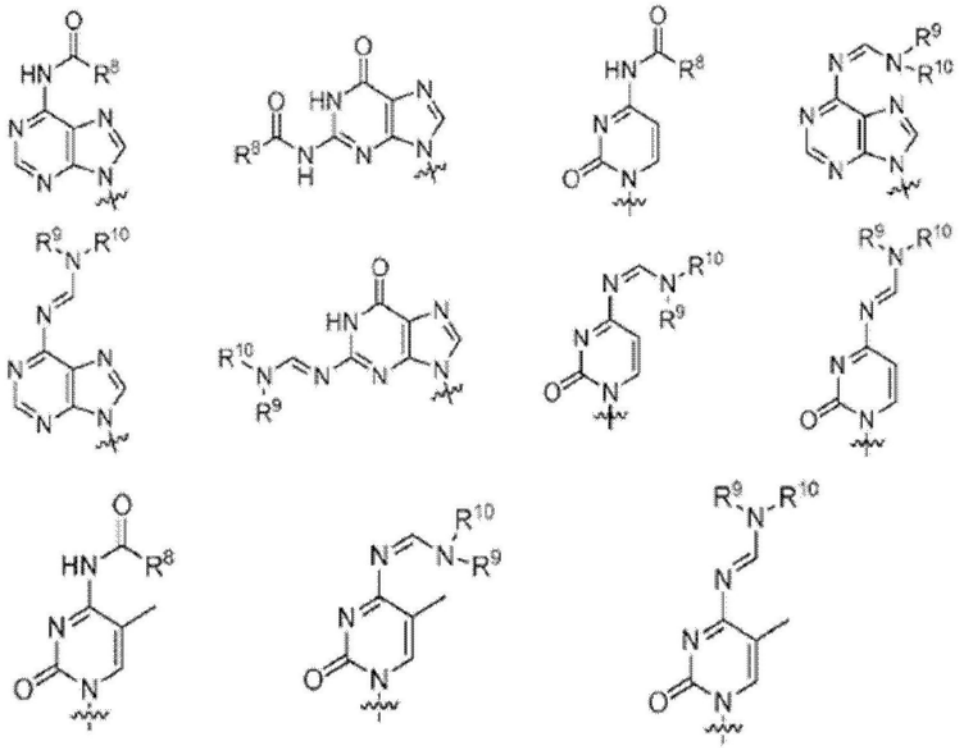
[0730] 在一些实施方案中,P修饰部分的特征在于其属于一个或更多个上述种类。例如,在一些实施方案中,P修饰部分充当PK增强剂和靶向配体。在一些实施方案中,P修饰部分充当前药和内体逃逸试剂。相关领域技术人员将认识到众多其他所述组合是可能的,并且由

本发明考虑。

[0731] 核苷碱基

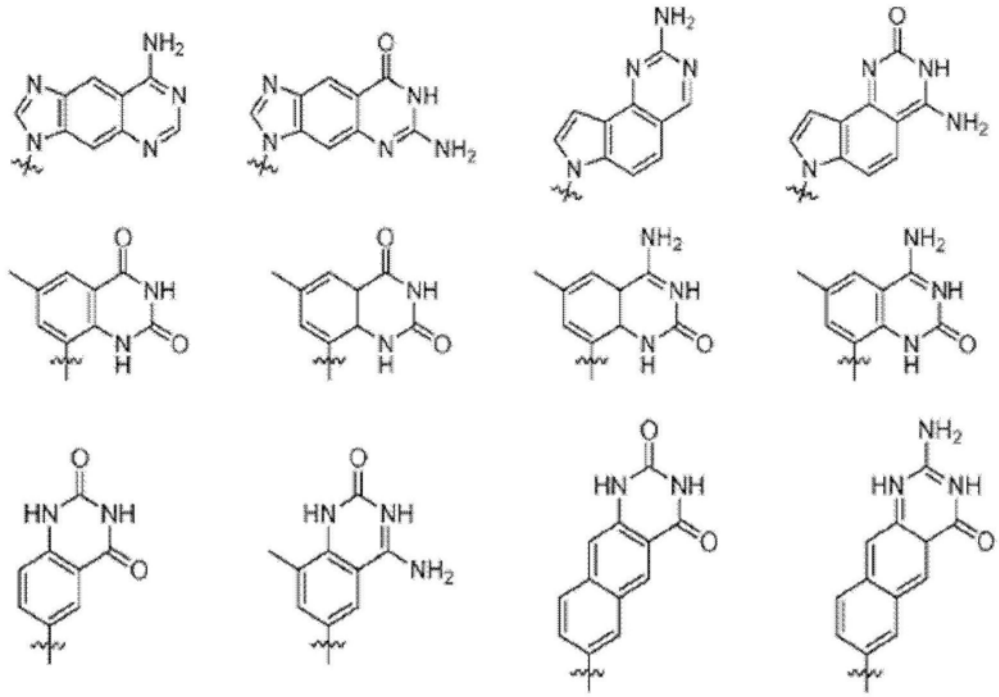
[0732] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸中存在的核苷碱基是天然核苷碱基或来自于天然核苷碱基的经修饰核苷碱基。实例包括但不限于它们的相应氨基由酰基保护基保护的尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤；2-氟尿嘧啶、2-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、氮杂胞嘧啶、嘧啶类似物(如假异胞嘧啶和假尿嘧啶)和其他经修饰核苷碱基，如8-取代的嘌呤、黄嘌呤或次黄嘌呤(后两个是天然降解产物)。示例性经修饰核苷碱基公开于Chiu和Rana，RNA，2003，9，1034-1048；Limbach等Nucleic Acid Research，1994，22，2183-2196以及Revankar和Rao，Compreh ensive Natural Products Chemistry，第7卷，313中。

[0733] 由以下通式表示的化合物也被考虑作为经修饰核苷碱基：

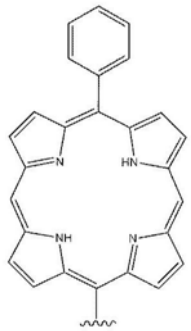
[0734] 

[0735] 其中R^8是选自具有1至15个碳原子的脂族、芳基、芳烷基、芳基氧基烷基、碳环基、杂环基或杂芳基的任选地经取代的直链或支链基团，仅作为实例，包括甲基、异丙基、苯基、苄基或苯氧基甲基；并且R^9和R^{10}各自独立地是选自直链或支链脂族、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基的任选地经取代的基团。

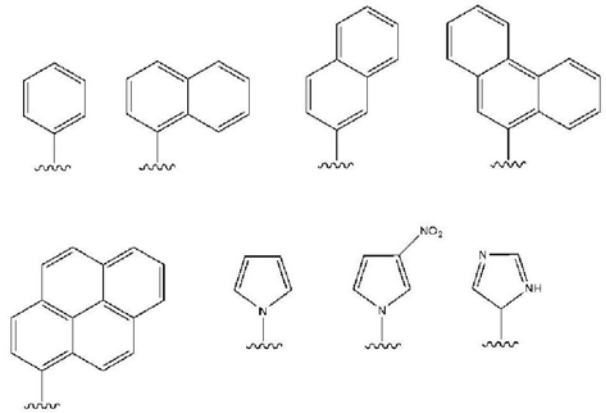
[0736] 经修饰核苷碱基也包括尺寸扩大的核苷碱基，其中已添加一个或更多个芳基环(如苯基环)。Glen Research目录(www.glenresearch.com)；Krueger AT等，Acc.Chem.Res.，2007，40，141-150；Kool，ET，Acc.Chem.Res.，2002，35，936-943；Benner S.A.等，Nat.Rev.Genet.，2005，6，553-543；Romesberg，F.E.等，Curr.Opin.Chem.Biol.，2003，7，723-733；Hirao，I.，Curr.Opin.Chem.Biol.，2006，10，622-627中所述的核酸碱基替换被考虑作为可用于合成本文中所述的核酸。以下显示这些尺寸扩大的核苷碱基的一些实例：

[0737] 

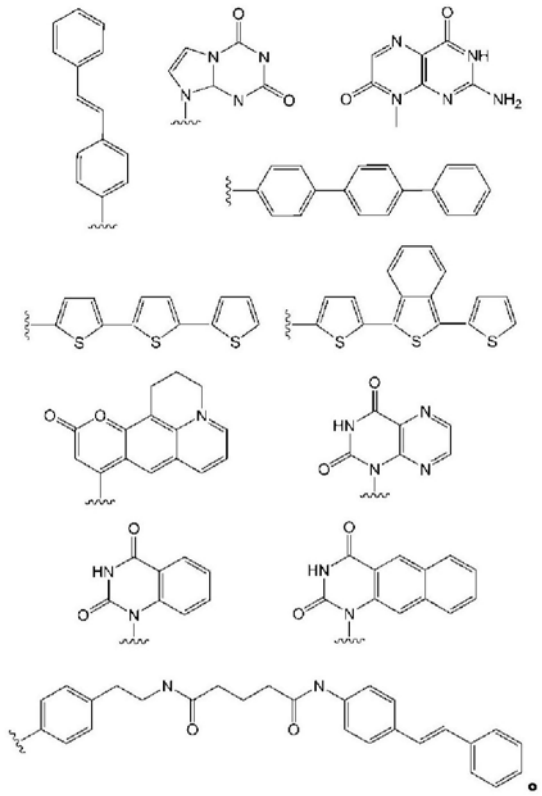
[0738] 在本文中,经修饰核苷碱基也涵盖不被视为核苷碱基、而是其他部分的结构,例如但不限于咕啉或卟啉源性环。卟啉源性碱基替换已描述于Morales-Rojas,H和Kool,ET,Org.Lett.,2002,4,4377-4380中。以下显示可用作碱基替换物的卟啉源性环的一实例:

[0739] 

[0740] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基具有任选地经取代的任一以下结构:

[0741] 

[0742] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基具有荧光性。示例性所述荧光性经修饰核苷碱基包括菲、芘、芴、异黄嘌呤、异黄蝶呤、三联苯、三噻吩、苯并三噻吩、香豆素、无水茶碱(lumazine)、栓系的芴、苯并尿嘧啶和萘并尿嘧啶,如下所示:

[0743] 

[0744] 在一些实施方案中，经修饰核苷碱基未被取代。在一些实施方案中，经修饰核苷碱基被取代。在一些实施方案中，经修饰核苷碱基被取代以使其含有例如连接于荧光部分、生物素或抗生蛋白部分或其他蛋白质或肽的杂原子、烷基或连接部分。在一些实施方案中，经修饰核苷碱基是在最经典意义上不是核苷碱基、但与核苷碱基起类似作用的“通用碱基”。所述通用碱基的一个代表性实例是3-硝基吡咯。

[0745] 在一些实施方案中，其他核苷也可用于本文中公开的方法中，并且包括并入与经修饰糖共价结合的经修饰核苷碱基或核苷碱基的核苷。并入有经修饰核苷碱基的核苷的一些实例包括4-乙酰基胞苷；5-(羧基羟甲基)尿苷；2′-O-甲基胞苷；5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷；5-羧基甲基氨基甲基尿苷；二氢尿苷；2′-O-甲基假尿苷；β,D-半乳糖基Q核苷；2′-O-甲基鸟苷；N^6-异戊烯基腺苷；1-甲基腺苷；1-甲基假尿苷；1-甲基鸟苷；1-甲基肌苷；2,2-二甲基鸟苷；2-甲基腺苷；2-甲基鸟苷；N^7-甲基鸟苷；3-甲基-胞苷；5-甲基胞苷；5-羟甲基胞苷；5-甲酰基胞嘧啶；5-羧基胞嘧啶；N^6-甲基腺苷；7-甲基鸟苷；5-甲基氨基乙基尿苷；5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷；β,D-甘露糖基Q核苷；5-甲氧基羰基甲基尿苷；5-甲氧基尿苷；2-甲硫基-N^6-异戊烯基腺苷；N-((9-B,D-呋喃核糖基-2-甲基硫代嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸；N-((9-β,D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)-N-甲基氨基甲酰基)苏氨酸；尿苷-5-氧基乙酸甲酯；尿苷-5-氧基乙酸(v)；假尿苷；Q核苷；2-硫代胞苷；5-甲基-2-硫代尿苷；2-硫代尿苷；4-硫代尿苷；5-甲基尿苷；2′-O-甲基-5-甲基尿苷；和2′-O-甲基尿苷。

[0746] 在一些实施方案中，核苷包括在6′位具有(R)或(S)手性的6′-修饰的双环核苷类似物，并且包括美国专利No.7,399,845中所述的类似物。在另一些实施方案中，核苷包括在5′位具有(R)或(S)手性的5′-修饰的双环核苷类似物，并且包括美国专利申请公布No.20070287831中所述的类似物。

[0747] 在一些实施方案中，核苷碱基或经修饰核苷碱基包含一种或更多种生物分子结合

部分，例如抗体、抗体片段、生物素、抗生蛋白、抗生蛋白链菌素、受体配体或螯合部分。在另一些实施方案中，核苷碱基或经修饰核苷碱基是5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶或2,6-二氨基嘌呤。在一些实施方案中，核苷碱基或经修饰核苷碱基是通过用荧光或生物分子结合部分取代来修饰。在一些实施方案中，核苷碱基或经修饰核苷碱基上的取代基是荧光部分。在一些实施方案中，核苷碱基或经修饰核苷碱基上的取代基是生物素或抗生蛋白。

[0748] 教导了某些以上指示的经修饰核苷碱基以及其他经修饰核苷碱基的制备的代表性美国专利包括但不限于以上记述的美国专利No.3,687,808以及美国专利No.4,845,205;No.5,130,30;No.5,134,066;No.5,175,273;No.5,367,066;No.5,432,272;No.5,457,187;No.5,457,191;No.5,459,255;No.5,484,908;No.5,502,177;No.5,525,711;No.5,552,540;No.5,587,469;No.5,594,121,No.5,596,091;No.5,614,617;No.5,681,941;No.5,750,692;No.6,015,886;No.6,147,200;No.6,166,197;No.6,222,025;No.6,235,887;No.6,380,368;No.6,528,640;No.6,639,062;No.6,617,438;No.7,045,610;No.7,427,672;和No.7,495,088，其各自通过引用整体并入本文。

[0749] 糖

[0750] 最常见的天然核苷酸包含连接于核苷碱基腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)的核糖。也涵盖经修饰核苷酸，其中核苷酸中的磷酸酯基团或键联磷可连接于糖或经修饰糖的多个位置。作为非限制性实例，磷酸酯基团或键联磷可连接于糖或经修饰糖的2′、3′、4′或5′羟基部分。在本文中中，还涵盖并入有如本文中所述的经修饰核苷碱基的核苷酸。在一些实施方案中，根据本发明方法使用包含未保护的-OH部分的核苷酸或经修饰核苷酸。

[0751] 其他经修饰糖也可并入提供的寡核苷酸内。在一些实施方案中，经修饰糖在2′位含有一个或更多个包括以下中的一个的取代基：-F；-CF_3、-CN、-N_3、-NO、-NO_2、-OR’、-SR’或-N(R’)$_2$，其中各R’独立地如上所定义和如本文中所述；-O-(C_1-C_{10}烷基)、-S-(C_1-C_{10}烷基)、-NH-(C_1-C_{10}烷基)或-N(C_1-C_{10}烷基)$_2$；-O-(C_2-C_{10}烯基)、-S-(C_2-C_{10}烯基)、-NH-(C_2-C_{10}烯基)或-N(C_2-C_{10}烯基)$_2$；-O-(C_2-C_{10}炔基)、-S-(C_2-C_{10}炔基)、-NH-(C_2-C_{10}炔基)或-N(C_2-C_{10}炔基)$_2$；或-O-(C_1-C_{10}亚烷基)-O-(C_1-C_{10}烷基)、-O-(C_1-C_{10}亚烷基)-NH-(C_1-C_{10}烷基)或-O-(C_1-C_{10}亚烷基)-NH(C_1-C_{10}烷基)$_2$、-NH-(C_1-C_{10}亚烷基)-O-(C_1-C_{10}烷基)或-N(C_1-C_{10}烷基)-(C_1-C_{10}亚烷基)-O-(C_1-C_{10}烷基)，其中所述烷基、亚烷基、烯基和炔基可以是经取代的或未经取代的。取代基的实例包括并不限于-O(CH_2)$_n$$OCH_3$和-O($CH_2$)$_n$$NH_2$(其中n是1至约10)、MOE、DMAOE、DMAEOE。本文中也考虑WO 2001/088198;以及Martin等，Helv.Chin.Acta，1995，78，486-504中所述的经修饰糖。在一些实施方案中，经修饰糖包含一个或更多个选自以下的基团：经取代甲硅烷基、RNA切割基团、报道基团、荧光标记、嵌入剂、用于改进核酸的药物动力学性质的基团、用于改进核酸的药效学性质的基团、或具有类似性质的其他取代基。在一些实施方案中，修饰是在糖或经修饰糖的2′、3′、4′、5′或6′位中的一个或更多个处进行，包括3′末端核苷酸上的糖的3′位或在5′末端核苷酸的5′位中。

[0752] 在一些实施方案中，核糖的2’-OH被包括以下中的一个的取代基替换：-H、-F；-CF_3、-CN、-N_3、-NO、-NO_2、-OR’、-SR’或-N(R’)$_2$，其中各R’独立地如上所定义和如本文中所述；-O-(C_1-C_{10}烷基)、-S-(C_1-C_{10}烷基)、-NH-(C_1-C_{10}烷基)或-N(C_1-C_{10}烷基)$_2$；-O-(C_2-C_{10}烯基)、-S-(C_2-C_{10}烯基)、-NH-(C_2-C_{10}烯基)或-N(C_2-C_{10}烯基)$_2$；-O-(C_2-C_{10}炔基)、-S-(C_2-C_{10}炔

基)、-NH-(C_2-C_{10}炔基)或-N(C_2-C_{10}炔基)$_2$;或-O-(C_1-C_{10}亚烷基)-O-(C_1-C_{10}烷基)、-O-(C_1-C_{10}亚烷基)-NH-(C_1-C_{10}烷基)或-O-(C_1-C_{10}亚烷基)-NH(C_1-C_{10}烷基)$_2$、-NH-(C_1-C_{10}亚烷基)-O-(C_1-C_{10}烷基)或-N(C_1-C_{10}烷基)-(C_1-C_{10}亚烷基)-O-(C_1-C_{10}烷基),其中所述烷基、亚烷基、烯基和炔基可被取代或未被取代。在一些实施方案中,2'-OH被-H替换(脱氧核糖)。在一些实施方案中,2'-OH被-F替换。在一些实施方案中,2'-OH被-OR'替换。在一些实施方案中,2'-OH被-OMe替换。在一些实施方案中,2'-OH被-OCH_2CH_2OMe替换。

[0753] 经修饰糖也包括锁定核酸(LNA)。在一些实施方案中,糖碳原子上的两个取代基一起形成二价部分。在一些实施方案中,两个取代基在两个不同的糖碳原子上。在一些实施方案中,形成的二价部分具有本文定义的-L-结构。在一些时候方案中,-L-是-O-CH_2-,其中-CH_2-任选地被取代。在一些实施方案中,-L-是-O-CH_2-。在一些实施方案中,-O-CH_2-是-O-CH(Et)-。在一些实施方案中,-L-在糖部分的C2和C4之间。在一些实施方案中,锁定核酸具有以下指示的结构。指示了具有以下结构的锁定核酸,其中Ba表示如本文中所述的核苷碱基或经修饰核苷碱基,并且其中R^{2s}是-OCH_2C4'-。

[0754]



C2'OCH_2C4' = LNA (锁定核酸)

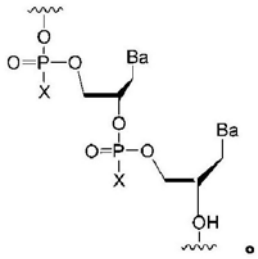
R^{2s} = OCH_2C4'

[0755] 在一些实施方案中,经修饰糖是ENA,例如Seth等,J Am Chem Soc.2010年10月27日;132(42):14942-14950中所述的那些。在一些实施方案中,经修饰糖是存在于XNA(异核酸)中的那些中的任一个,例如阿拉伯糖、失水己糖醇、苏糖、2'氟阿拉伯糖或环己烯。

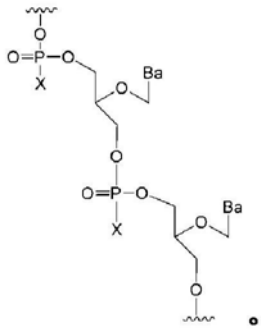
[0756] 经修饰糖包括糖模拟物,例如替代戊呋喃糖基糖的环丁基或环戊基部分。教导了所述经修饰糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利No.:4,981,957;5,118,800;5,319,080;和5,359,044。考虑的一些经修饰糖包括其中核糖环内的氧原子被氮、硫、硒或碳替换的糖。在一些实施方案中,经修饰糖是经修饰核糖,其中核糖环内的氧原子被氮替换,并且其中氮任选地被烷基(例如甲基、乙基、异丙基等)取代。

[0757] 经修饰糖的非限制性实例包括形成甘油核酸(GNA)类似物的甘油。以下显示GNA类似物的一个实例,并且描述于Zhang,R等,J.Am.Chem.Soc.,2008,130,5846-5847;Zhang L等,J.Am.Chem.Soc.,2005,127,4174-4175以及Tsai CH等,PNAS,2007,14598-14603中(X=O^-):

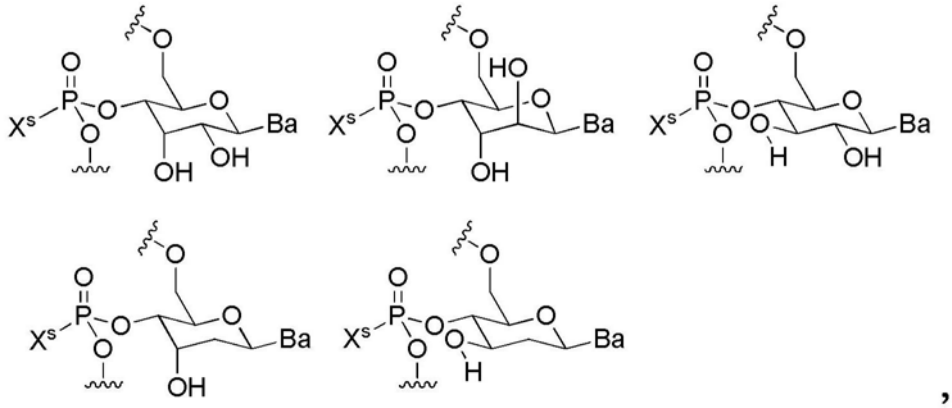
[0758]



[0759] GNA衍生类似物的另一实例,即基于甲酰基甘油的混合缩醛胺的柔性核酸(FNA),描述于Joyce GF等,PNAS,1987,84,4398-4402以及Heuberger BD和Switzer C,J.Am.Chem.Soc.,2008,130,412-413中,并且如下所示:

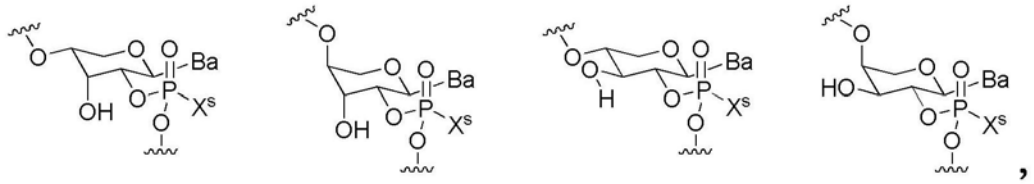
[0760] 

[0761] 经修饰糖的另外的非限制性实例包括己吡喃糖基(6’至4’)、戊吡喃糖基(4’至2’)、戊吡喃糖基(4’至3’)或丁呋喃糖基(3’至2’)糖。在一些实施方案中,己吡喃糖基(6’至4’)糖具有任一下式:

[0762] 

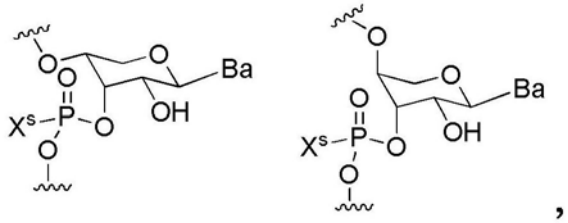
[0763] 其中X^s对应于本文中所述的P修饰基团“-XLR^1”,并且Ba如本文所定义。

[0764] 在一些实施方案中,戊吡喃糖基(4’至2’)糖具有任一下式:

[0765] 

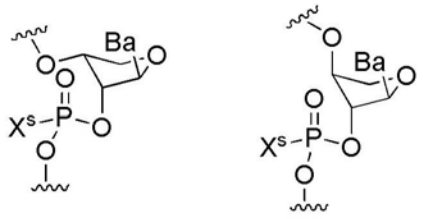
[0766] 其中X^s对应于本文中所述的P修饰基团“-XLR^1”,并且Ba如本文所定义。

[0767] 在一些实施方案中,戊吡喃糖基(4’至3’)糖具有任一下式:

[0768] 

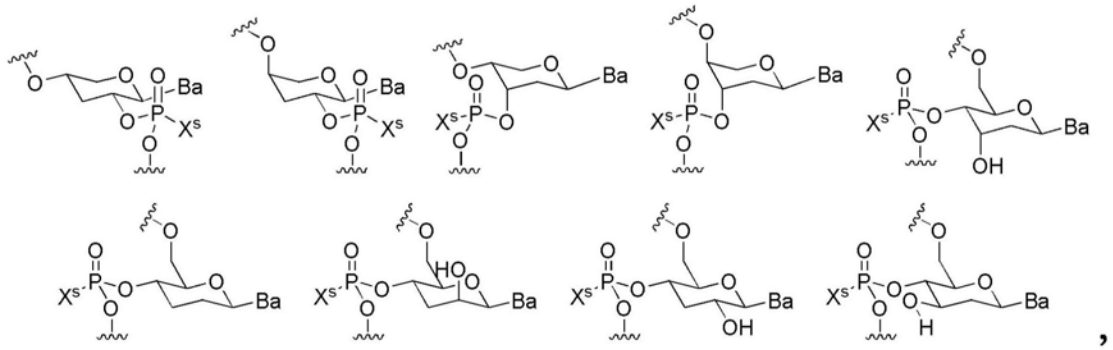
[0769] 其中X^s对应于本文中所述的P修饰基团“-XLR^1”,并且Ba如本文所定义。

[0770] 在一些实施方案中,丁呋喃糖基(3’至2’)糖具有任一下式:

[0771] 

[0772] 其中X^s对应于本文中所述的P修饰基团“-XLR^1”，并且Ba如本文所定义。

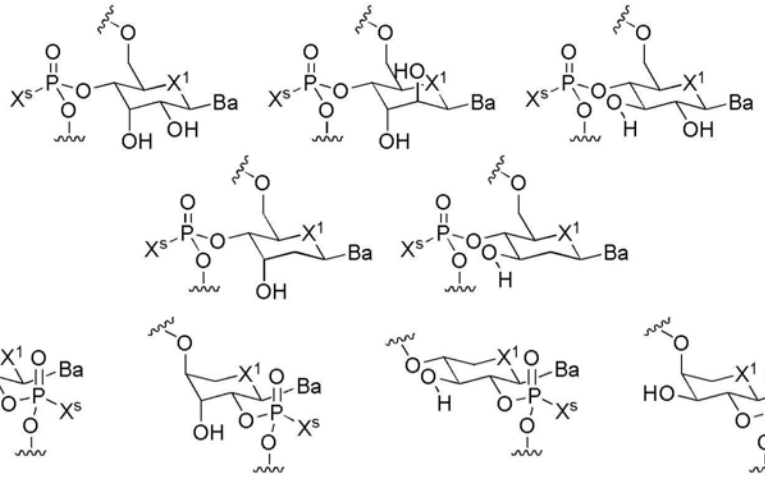
[0773] 在一些实施方案中，经修饰糖具有任一下式：

[0774] 

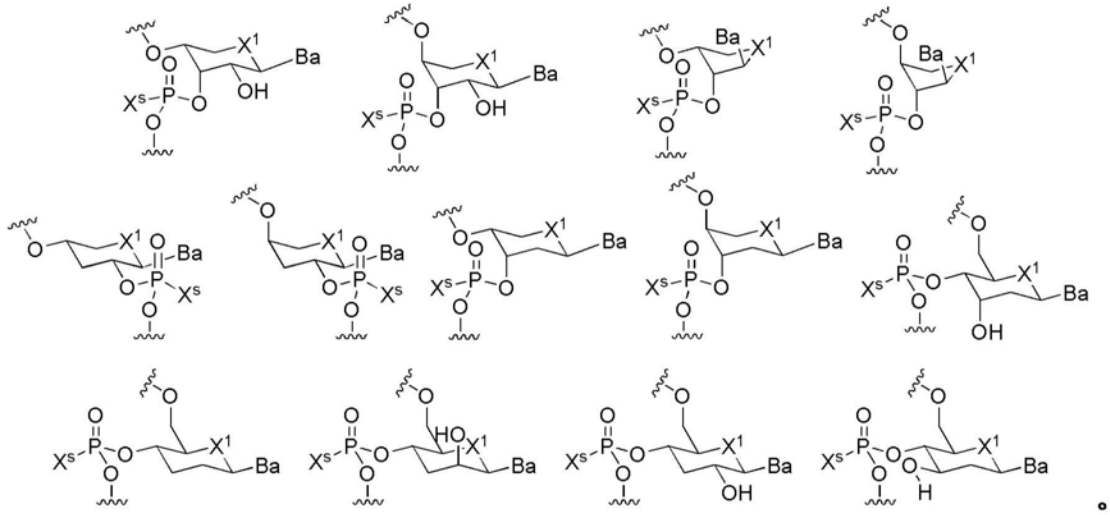
[0775] 其中X^s对应于本文中所述的P修饰基团“-XLR^1”，并且Ba如本文所定义。

[0776] 在一些实施方案中，糖部分中的一个或更多个羟基任选地并独立地被以下替换：卤素、R’、-N(R’)$_2$、-OR’或-SR’，其中各R’独立地如上所定义和如本文中所述。

[0777] 在一些实施方案中，糖模拟物如下所说明，其中X^s对应于本文中所述的P修饰基团“-XLR^1”，Ba如本文所定义，并且X^1选自-S-、-Se-、-CH_2-、-NMe-、-NEt-或-NiPr-。



[0778]



[0779] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物中至少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%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或更多(例如55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多)(包括端值)的糖被修饰。在一些实施方案中，仅嘌呤残基被修饰(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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或50%以上[例如55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多]的嘌呤残基被修饰)。在一些实施方案中，仅嘧啶残基被修饰(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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或50%以上[例如55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多]的嘌呤残基被修饰)。在一些实施方案中，嘌呤残基与嘧啶残基两者均被修饰。

[0780] 经修饰糖和糖模拟物可通过本领域中已知的方法来制备，包括但不限于：

A.Eschenmoser,Science(1999),284:2118;M.Bohringer等,Helv.Chim.Acta(1992),75:1416-1477;M.Egli等,J.Am.Chem.Soc.(2006),128(33):10847-56;A.Eschenmoser in Chemical synthesis:Gnosis to Prognosis,C.Chatgilialoglu和V.Sniekus编,(Kluwer Academic,Netherlands,1996),第293页;K.-U.Schoning等,Science(2000),290:1347-1351;A.Eschenmoser等,Helv.Chim.Acta(1992),75:218;J.Hunziker等,Helv.Chim.Acta(1993),76:259;G.Otting等,Helv.Chim.Acta(1993),76:2701;K.Groebke等,Helv.Chim.Acta(1998),81:375;以及A.Eschenmoser,Science(1999),284:2118。关于2′修饰的修饰可见于Verma,S.等Annu.Rev.Biochem.1998,67,99-134以及其中所有参考文献中。对核糖的特定修饰可见于以下参考文献中:2'-氟(Kawasaki等,J.Med.Chem.,1993,36,831-841)、2'-MOE(Martin,P.Helv.Chim.Acta 1996,79,1930-1938)、"LNA"(Wengel,J.Acc.Chem.Res.1999,32,301-310)。在一些实施方案中,经修饰糖是通过引用并入本文的PCT公布号WO2012/030683中所述,并且描述于本申请的图26-30中的那些中的任一个。

[0781] 寡核苷酸

[0782] 在一些实施方案中,本发明提供了手性控制的寡核苷酸和寡核苷酸组合物。例如,在一些实施方案中,提供的组合物含有预定水平的一种或更多种个体寡核苷酸类型,其中寡核苷酸类型由以下定义:1)碱基序列;2)骨架键联样式;3)骨架手性中心样式;和4)骨架P修饰样式。

[0783] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是单聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是P修饰单聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是立体单聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是具有构型Rp的立体单聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是具有构型Sp的立体单聚体。

[0784] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是交替聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是P修饰交替聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是立体交替聚体。

[0785] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是嵌段聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是P修饰嵌段聚体。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是立体嵌段聚体。

[0786] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是间隔聚体。

[0787] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是跳跃聚体。

[0788] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸是半聚体。在一些实施方案中,半聚体是这样的寡核苷酸,其中5'-端或3'-端包含具有寡核苷酸的其余部分不具有的结构特征。在一些实施方案中,5'-端或3'-端具有或包含2至20个核苷酸。在一些实施方案中,结构特征是碱基修饰。在一些实施方案中,结构特征是糖修饰。在一些实施方案中,结构特征是P修饰。在一些实施方案中,结构特征是手性核苷酸间键联的立体化学。在一些实施方案中,结构特征是或包含碱基修饰、糖修饰、P修饰或手性核苷酸间键联的立体化学,或者其组合。在一些实施方案中,半聚体是这样的寡核苷酸,其中5'.端序列的各糖部分共有共同修饰。在一些实施方案中,半聚体是这样的寡核苷酸,其中3'.端序列的各糖部分共有共同修饰。在一些实施方案中,5'或3'端序列的共同糖修饰不被寡核苷酸中任意其他糖部分共有。在一些实施方案中,示例性半聚体是这样的寡核苷酸,其在一端包含经修饰或未经经修饰的2'-O.烷基糖修饰的核苷、双环糖修饰的核苷、β.D.脱氧核糖核苷(例如2′-MOE修饰的核苷、和LNA™或ENA™二环糖修饰的核苷),并且在另一端包含具有不同糖部分的核苷(例如经修饰或未经修

饰的2′-O-烷基糖修饰的核苷、双环糖修饰的核苷或天然核苷)的序列。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是单聚体、交替聚体、嵌段聚体、间隔聚体、半聚体和跳跃聚体中的一种或更多种的组合。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是单聚体是单聚体、交替聚体、嵌段聚体、间隔聚体和跳跃聚体中的一种或更多种的组合。例如，在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是交替聚体和间隔聚体二者。在一些实施方案中，寡核苷酸是间隔聚体和跳跃聚体二者。化学和合成领域的技术人员将承认，多种其他样式的组合可供使用并且仅受根据本发明方法合成提供好的寡核苷段所需的组成部分的商业可得性和合成可及性的限制。在一些实施方案中，半聚体结构提供了有利益处，如图29中所示。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是5'-半聚体，其在5'-端部分中包含经修饰糖部分。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是5'-半聚体，其在5'-端部分中包含经修饰2'-糖部分。

[0789] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的核苷酸。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷酸。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的核苷。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的LNA。

[0790] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的核碱基。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的天然核碱基。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的经修饰核碱基。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个5-甲基胞苷;5-羟甲基胞苷、5-甲酰基胞嘧啶或5-羧基胞嘧啶。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个5-甲基胞苷。

[0791] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的糖。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个存在于天然DNA和RNA中的任选地经取代的糖。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的核糖或脱氧核糖。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的核糖或脱氧核糖，其中核糖或脱氧核糖部分的一个或更多个羟基任选地并独立地被以下替换:卤素、R'、-N(R')$_2$、-OR'或-SR'，其中各R'独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被以下取代:卤素、R'、-N(R')$_2$、-OR'或-SR'，其中各R'独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被卤素取代。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被一个或更多个-F卤素取代。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被-OR'取代，其中各R'独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被-OR'取代，其中各R'独立地是任选地经取代的C_1-C_6脂族。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被-OR'取代，其中各R'独立地是任选地经取代的C_1-C_6烷基。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被-OMe取代。在一些实施方案中，

提供的寡核苷酸包含一个或更多个任选地经取代的脱氧核糖，其中脱氧核糖的2'位任选地并独立地被-O-甲氧基乙基取代。

[0792] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是单链寡核苷酸。

[0793] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是杂交的寡核苷酸链。在某些实施方案中，提供的寡核苷酸是部分杂交的寡核苷酸链。在某些实施方案中，提供的寡核苷酸是完全杂交的寡核苷酸链。在某些实施方案中，提供的寡核苷酸是双链寡核苷酸。在某些实施方案中，提供的寡核苷酸是三链寡核苷酸(例如三链体)。

[0794] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是嵌合的。例如，在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是DNA-RNA嵌合体、DNA-LNA嵌合体等。

[0795] 在一些实施方案中，包含WO2012/030683中描述的寡核苷酸的任一结构都可根据本发明方法来修饰以提供其手性控制的变体。例如，在一些实施方案中，手性控制的变体包含在任何一个或更多个键联磷处的立体化学修饰和/或在任何一个或更多个键联磷处的P修饰。例如，在一些实施方案中，预先选择WO2012/030683的寡核苷酸的特定核苷酸单元以在该核苷酸单元的键联磷处进行立体化学修饰，和/或在该核苷酸单元的键联磷处进行P修饰。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸具有图26-30中描述的任一结构。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是图26-30中描述的任一结构的变体(例如修饰形式)。WO2012/030683的公开内容通过引用整体并入本文。

[0796] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是治疗剂。

[0797] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是反义寡核苷酸。

[0798] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是抗基因寡核苷酸。

[0799] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是诱饵寡核苷酸。

[0800] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是DNA疫苗的一部分。

[0801] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是免疫调节性寡核苷酸，例如免疫刺激性寡核苷酸和免疫抑制性寡核苷酸。

[0802] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是佐剂。

[0803] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是适体。

[0804] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是核酶。

[0805] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是脱氧核酶(DNA酶(DNAzyme或DNA酶))。

[0806] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是siRNA。

[0807] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是微小RNA或miRNA。

[0808] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是ncRNA(非编码RNA)，包括长非编码RNA(lncRNA)和小非编码RNA，如piwi相互作用性RNA(piRNA)。

[0809] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸与结构RNA互补，例如tRNA。

[0810] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是核酸类似物，例如GNA、LNA、PNA、TNA和吗啉代寡核苷酸。

[0811] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是P修饰的前药。

[0812] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是引物。在一些实施方案中，引物是用于基于聚合酶的链反应(即PCR)中来扩增核酸。在一些实施方案中，引物是用于PCR的任何已知变化形式，如逆转录PCR(RT-PCR)和实时PCR中。

[0813] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸被表征为能够调节RNase H活化。例如，在一些实施方案中，RNase H活化通过立体控制的硫代磷酸酯核酸类似物的存在来调节，其中天然DNA/RNA比Rp立体异构体更易受影响或同样易受影响，所述Rp立体异构体又比相应Sp立体异构体更易受影响。

[0814] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸被表征为能够间接或直接提高或降低蛋白质的活性或抑制或促进蛋白质的表达。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的特征在于其可用于控制细胞增殖、病毒复制和/或任何其他细胞信号传导过程。

[0815] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约200个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约180个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约160个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约140个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约120个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约100个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约90个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约80个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约70个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约60个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约50个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约40个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约30个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约29个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约28个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约27个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约26个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约25个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约24个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约23个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约22个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约21个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约2至约20个核苷酸单元。

[0816] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约200个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约180个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约160个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约140个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约120个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约100个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约90个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约80个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约70个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约60个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约50个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约40个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约30个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约29个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约28个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约27个核苷酸单元。在

一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约26个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约25个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约24个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约23个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约22个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约21个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约4至约20个核苷酸单元。

[0817] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约5至约10个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约10至约30个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约15至约25个核苷酸单元。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的长度是约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸单元。

[0818] 在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少2个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少3个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少4个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少5个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少6个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少7个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少8个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少9个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少10个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少11个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少12个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少13个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少14个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少15个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少16个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少17个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少18个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少19个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少20个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少21个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少22个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少23个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少24个核苷酸单元。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少25个核苷酸单元。在一些其他实施方案中，寡核苷酸的长度是至少30个核苷酸单元。在一些其他实施方案中，寡核苷酸是长度是至少18个核苷酸单元的互补链的双链体。在一些其他实施方案中，寡核苷酸是长度是至少21个核苷酸单元的互补链的双链体。

[0819] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的5’末端和/或3’末端被修饰。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的5’末端和/或3’末端被末端帽部分修饰。在本文中以及在本领域中广泛描述了示例性所述修饰，包括末端帽部分，例如但不限于美国专利申请公布US 2009/0023675A1中所述的那些。

[0820] 在一些实施方案中，特征在于：

[0821] 1)共同碱基序列和长度；

[0822] 2)共同骨架键联样式；和

[0823] 3)共同骨架手性中心样式，的寡核苷酸类型的寡核苷酸具有相同化学结构。例如，其具有相同的碱基序列、相同的骨架键联样式(即，核苷酸间键联类型样式，例如，磷酸酯、硫代磷酸酯等)、相同的骨架手性中心样式(即，键联磷立体化学样式(RpASp))、和相同的骨

架磷修饰样式(例如,式I中"-XLR[1]"样式)。

[0824] 寡核苷酸的种类

[0825] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸包含米泊美生序列或米泊美生序列的一部分。米泊美生是基于以下碱基序列GCCT/UCAGT/UCT/UGCT/UT/UCGCACC。在一些实施方案中,一个或更多个任何核苷酸或键联都可根据本发明加以修饰。在一些实施方案中,本发明提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有序列G*-C*-C*-U*-C*-dA-dG-dT-dC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G*-C*-A*-C*-C*[d=2'-脱氧基,*=2'-O-(2-甲氧基乙基)],所述序列具有3'→5'硫代磷酸酯键联。在整篇申请中描述了示例性经修饰米泊美生序列,包括但不限于表2中的那些。

[0826] 在某些实施方案中,提供的寡核苷酸是米泊美生单聚体。在某些实施方案中,提供的寡核苷酸是具有构型Rp的米泊美生单聚体。在某些实施方案中,提供的寡核苷酸是具有构型Sp的米泊美生单聚体。

[0827] 下表2中描述包含米泊美生序列或米泊美生序列的一部分的示例性手性控制的寡核苷酸。

[0828] 表2.示例性米泊美生相关序列。

[0829]

寡聚体	立体化学/序列	描述
101	全-(*Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	全-R
102	全-(*Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	全-S
103	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5R-9S-5R
104	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp* *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5S-9R-5S
105	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp* *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1S-17R-1S
106	(*Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1R-17S-1R
107	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	$(R/S)_9R$
108	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	$(S/R)_9S$
109	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp* *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3S-13R-3S
110	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3R-13S-3R
111	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	$18S/R^{19}$
112	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*,	$18S/R^{9}$

	Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	
113	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R^2
114	(*Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	$(RRS)_6$-R
115	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	S-$(RRS)_6$
116	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	RS-$(RRS)_5$-RR
122	全-(*Rp*)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	全-R
123	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp* *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	1S-17R-1S
124	全-(*Sp*)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	全-S
126	全-(*Rp*)-d[Cs2As2Gs2T]	全-R
127	全-(*Rp*)-d[Cs3As3Gs3T]	全-R
128	全-(*Sp*)-d[Cs4As4Gs4T]	全-S
129	全-(*Sp*)-d[Cs5As5Gs5T]	全-S
130	全-(*Sp*)-d[Cs6As6Gs6T]	全-S
131	全-(*Rp*)-d[Gs7Cs7Cs7Ts7Cs7As7Gs7Ts7Cs7Ts7Gs7Cs7Ts7Ts7Cs7Gs7Cs7As7Cs7C]	全-R
132	全-(*Sp*)-d[Gs7Cs7Cs7Ts7Cs7As7Gs7Ts7Cs7Ts7Gs7Cs7Ts7Ts7Cs7Gs7Cs7As7Cs7C]	全-S
133	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-d[Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mCs1As15mCs15mC]	5R-9S-5R
134	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp* *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mCs1As15mCs15mC]	5S-9R-5S
135	全-(*Rp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	全-R
136	全-(*Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	全-S
137	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	1S-9R-1S
138	(*Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	2S-7R-2S
139	(*Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	1R-9S-1R
140	(*Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	2R-7S-2R
141	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	3S-5R-3S
142	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	3R-5S-3R

[0830]

[0831]

143	(*Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	$(SSR)_3$-SS
144	(*Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	$(RRS)_3$-RR
145	全-(*Rp*)-d[5mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mC]	全-R
146	全-(*Rp*)-d[Gs15mCs1Ts1G]	全-R
147	全-(*Rp*)-d[5mCs1As1Gs1T]	全-R
148	全-(*Rp*)-d[5mCs2As2Gs2Ts25mCs2Ts2Gs25mCs2Ts2Ts25mCs2G]	全-R
149	全-(*Rp*)-d[5mCs4As4Gs4Ts45mCs4Ts4Gs45mCs4Ts4Ts45mCs4G]	全-R
151	全-(*Sp*)-d[Cs1AsGs1T]	全-S
152	全-(*Sp*)-d[Cs1AGs1T]	全-S
153	全-(*Sp*)-d[CAs1GsT]	全-S
157	全-(*Sp*)-d[5mCs1As1Gs1T]	全-S
158	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs1GsCsACsC]	5S-9R-4S
159	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1CsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs1GsCs2As2Cs2C]	5S-9R-5S
160	全-(*Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	全-R
161	全-(*Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	全-S
162	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	5R-9S-5R
163	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	5S-9R-5S
164	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	1S-17R-1S
165	(*Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	1R-17S-1R
166	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	$(R/S)_9R$
167	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	$(S/R)_9S$
168	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]	3S-13R-3S

[0832]

	$(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	
169	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	3R-13S-3R
170	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	$18S/R^{19}$
171	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	$18S/R^{9}$
172	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp* *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	$18S/R^{2}$
173	(*Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	$(RRS)_6$-R
174	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	S-$(RRS)_6$
175	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_{MOE}$	RS-$(RRS)_5$-RR
176	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)(Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1)$_{MOE}$d[As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1] $(Gs15mCs1As15mCs15mC)_{MOE}$	RS-$(RRS)_5$-RR
177	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)(Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1)$_{MOE}$d[AGT5mCTG5mCTT5mC] $(Gs25mCs2As25mCs25mC)_{MOE}$	RS-$(RRS)_5$-RR
178	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*)-$(Gs5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] $(Gs5mCsAs5mCs5mC)_F$ (F: 2-fluorodeoxyribose)	S-$(RRS)_6$
179	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)d[Gs8Cs8Cs8Ts8Cs8As8Gs8Ts8Cs8Ts8Gs8Cs8Ts8Ts8Cs8Gs8Cs8As8Cs8C]	RS-$(RRS)_5$-RR
180	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs9As9Cs9C]	RS-$(RRS)_5$-RR
181	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts10Cs10Gs10Cs10As10Cs10C]	RS-$(RRS)_5$-RR
182	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts11Cs11Gs11Cs11As11Cs11C]	RS-$(RRS)_5$-RR
183	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp* *Rp*)d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts12Cs12Gs12Cs12As12Cs12C]	RS-$(RRS)_5$-RR

[0833]

184	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*)d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts13Cs13Gs13Cs13As13Cs13C]	RS-(RRS)$_5$-RR
185	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*)d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts14Cs14Gs14Cs14As14Cs14C]	RS-(RRS)$_5$-RR
186	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*)d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts15Cs15Gs15Cs15As15Cs15C]	RS-(RRS)$_5$-RR
187	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp Rp*)d[GsCsCs1TsCsAs]GsUs2CsUsGsd[CsTs3TsCsGs]CsAs4CsC	RS-(RRS)$_5$-RR
188	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsACsC]	5S-9R-4S
189	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1CsACs1C]	5S-9R-4S
190	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs8Cs8Cs8Ts8Cs8As8Gs8Ts8Cs8Ts8Gs8Cs8Ts8Ts8Cs8Gs8Cs1ACs8C]	5S-9R-4S
191	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs1ACs9C]	5S-9R-4S
192	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts10Cs10Gs10Cs1ACs10C]	5S-9R-4S
193	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts11Cs11Gs11Cs1ACs11C]	5S-9R-4S
194	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts12Cs12Gs12Cs1ACs12C]	5S-9R-4S
195	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts13Cs13Gs13Cs1ACs13C]	5S-9R-4S
196	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts14Cs14Gs14Cs1ACs14C]	5S-9R-4S
197	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts15Cs15Gs15Cs1ACs15C]	5S-9R-4S
198	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-GsCsCsUsCsAsGsUsCsUsGsCsUsUsCsGsCsACsC	5S-9R-4S
199	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs1Cs1Cs1Us1Cs1As1Gs1Us1Cs1Us1Gs1Cs1Us1Us1Cs1Gs1CsACs1C	5S-9R-4S
200	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-	5S-9R-4S

[0834]

	Gs8Cs8Cs8Us8Cs8As8Gs8Us8Cs8Us8Gs8Cs8Us8Us8Cs8Gs8Cs1ACs8C	
201	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs9Cs9Cs9Us9Cs9As9Gs9Us9Cs9Us9Gs9Cs9Us9Us9Cs9Gs9Cs1ACs9C	5S-9R-4S
202	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs10Cs10Cs10Us10Cs10As10Gs10Us10Cs10Us10Gs10Cs10Us10Us10Cs10Gs10Cs1ACs10C	5S-9R-4S
203	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs11Cs11Cs11Us11Cs11As11Gs11Us11Cs11Us11Gs11Cs11Us11Us11Cs11Gs11Cs1ACs11C	5S-9R-4S
204	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs12Cs12Cs12Us12Cs12As12Gs12Us12Cs12Us12Gs12Cs12Us12Us12Cs12Gs12Cs1ACs12C	5S-9R-4S
205	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs13Cs13Cs13Us13Cs13As13Gs13Us13Cs13Us13Gs13Cs13Us13Us13Cs13Gs13Cs1ACs13C	5S-9R-4S
206	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs14Cs14Cs14Us14Cs14As14Gs14Us14Cs14Us14Gs14Cs14Us14Us14Cs14Gs14Cs1ACs14C	5S-9R-4S
207	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-Gs15Cs15Cs15Us15Cs15As15Gs15Us15Cs15Us15Gs15Cs15Us15Us15Cs15Gs15Cs1ACs15C	5S-9R-4S

[0835] 寡核苷酸组合物

[0836] 本发明提供了包含多种提供的寡核苷酸或由多种提供的寡核苷酸组成的组合物(例如手性控制的寡核苷酸组合物)。在一些实施方案中,所有所述提供的寡核苷酸都具有相同类型,即所有都具有相同碱基序列、骨架键联样式(即核苷酸间键联类型样式,例如磷酸酯、硫代磷酸酯等)、骨架手性中心样式(即键联磷立体化学样式(Rp/Sp))和骨架磷修饰样式(例如式I中的"-XLR^1"基团样式)。然而,在许多实施方案中,提供的组合物通常以预定相对量包含多种寡核苷酸类型。

[0837] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物是手性纯米泊美生组合物。也就是说,在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物提供了关于键联磷的构型呈单一非对映体形式的米泊美生。

[0838] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物是手性均一米泊美生组合物。也就是说,在一些实施方案中,米泊美生的每个键联磷都呈Rp构型,或米泊美生的每个键联磷都呈Sp构型。

[0839] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含一种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。化学和医学领域技术人员将认识到对提供的组合物中的一种或更多种类型的提供的寡核苷酸中的每一种的选择以及量将取决于所述组合物的预定用途。也就是说,相关领域技术人员将设计提供的手性控制的寡核苷酸组合物以使其中包含的提供的寡核苷酸的量和类型导致组合物总体上具有某些期望的特征(例如生物学上期望的、治疗上期望的等)。

[0840] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含两种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含三种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合

物包含四种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含五种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含六种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含七种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含八种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含九种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含十种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含十五种或更多种提供的寡核苷酸类型的组合。

[0841] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物是一定量的具有Rp构型的手性均一米泊美生和一定量的具有Sp构型的手性均一米泊美生的组合。

[0842] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物是一定量的具有Rp构型的手性均一米泊美生、一定量的具有Sp构型的手性均一米泊美生和一定量的一种或更多种具有所需非对映异构形式的手性纯米泊美生的组合。

[0843] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸选自PCT/US2013/050407中描述的那些，其通过引用并入本文。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含选自PCT/US2013/050407中描述的那些的寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[0844] 用于制备手性控制的寡核苷酸及其组合物的方法

[0845] 本发明提供了用于制备包含一种或更多种特定核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸和手性控制的组合物的方法。如上所指示，本文中使用的短语“寡核苷酸类型”定义了具有特定碱基序列、骨架键联样式、骨架手性中心样式和骨架磷修饰样式(例如“-XLR^1”基团)的寡核苷酸。具有常见指定“类型”的寡核苷酸在结构上关于碱基序列、骨架键联样式、骨架手性中心样式和骨架磷修饰样式是彼此相同的。

[0846] 在一些实施方案中，本发明中提供的手性控制的寡核苷酸具有不同于相应立构无规寡核苷酸混合物的性质。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸具有不同于立构无规寡核苷酸混合物的亲脂性。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸在HPLC上具有不同保留时间。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸可具有显著不同于相应立构无规寡核苷酸混合物的峰保留时间。在如本领域中一般所实施来使用HPLC纯化寡核苷酸期间，某些手性控制的寡核苷酸即使不完全损失，也将大部分损失。在如本领域中一般所实施来使用HPLC纯化寡核苷酸期间，某些手性控制的寡核苷酸即使不完全损失，也将大部分损失。一个后果是立构无规寡核苷酸混合物的某些非对映体(某些手性控制的寡核苷酸)在测定中未被测试。另一后果是在各批次之间由于不可避免的仪器和人为误差，假定“纯”立构无规寡核苷酸将具有不一致组成，因为组合物中的非对映体及其相对量和绝对量在各批次之间不同。本发明中提供的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物克服了所述问题，因为手性控制的寡核苷酸是以手性控制的方式以单一非对映体形式合成，并且手性控制的寡核苷酸组合物包含预定水平的一种或更多种个体寡核苷酸类型。

[0847] 化学和合成领域技术人员将了解本发明的合成方法在合成提供的寡核苷酸的各步骤期间提供了控制程度，以使寡核苷酸的各核苷酸单元可提前被设计和/或选择以在键联磷处具有特定立体化学和/或在键联磷处具有特定修饰、和/或特定碱基和/或特定糖。在

一些实施方案中，提前设计和/或选择提供的寡核苷酸以在核苷酸间键联的键联磷处具有立体中心的特定组合。

[0848] 在一些实施方案中，使用本发明方法制备的提供的寡核苷酸被设计和/或确定为具有键联磷修饰的特定组合。在一些实施方案中，使用本发明方法制备的提供的寡核苷酸被设计和/或确定为具有碱基的特定组合。在一些实施方案中，使用本发明方法制备的提供的寡核苷酸被设计和/或确定为具有糖的特定组合。在一些实施方案中，使用本发明方法制备的提供的寡核苷酸被设计和/或确定为具有一种或更多种以上结构特征的特定组合。

[0849] 本发明方法表现出高度手性控制。例如，本发明方法有助于控制提供的寡核苷酸内的每一单个键联磷的立体化学构型。在一些实施方案中，本发明方法提供了一种寡核苷酸，其包含一个或更多个独立地具有式I结构的经修饰核苷酸间键联。

[0850] 在一些实施方案中，本发明方法提供了一种寡核苷酸，其是米泊美生单聚体。在一些实施方案中，本发明方法提供了一种寡核苷酸，其是具有构型Rp的米泊美生单聚体。在一些实施方案中，本发明方法提供了一种寡核苷酸，其是具有构型Sp的米泊美生单聚体。

[0851] 在一些实施方案中，本发明方法提供了一种手性控制的寡核苷酸组合物，即含有预定水平的个体寡核苷酸类型的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含一种寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含超过一种寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含多种寡核苷酸类型。本文描述了根据本发明制备的示例性手性控制的寡核苷酸组合物。

[0852] 在一些实施方案中，本发明方法提供了关于键联磷的构型是手性纯的米泊美生组合物。也就是说，在一些实施方案中，本发明方法提供了米泊美生组合物，其中米泊美生关于键联磷的构型以单一非对映体形式存在于组合物中。

[0853] 在一些实施方案中，本发明方法提供了关于键联磷的构型是手性均一的米泊美生组合物。也就是说，在一些实施方案中，本发明方法提供了米泊美生组合物，其中所有核苷酸单元关于键联磷的构型都具有相同立体化学，例如所有核苷酸单元在键联磷处都具有Rp构型，或所有核苷酸单元在键联磷处都具有Sp构型。

[0854] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过50％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约55％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约60％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约65％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约70％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约75％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约80％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约85％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约90％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约91％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约92％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约93％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约94％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约95％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约96％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约97％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约98％。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约99％。在一些实施方案中，提供的

手性控制的寡核苷酸的纯度超过约99.5%。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约99.6%。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约99.7%。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约99.8%。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过约99.9%。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸的纯度超过至少约99%。

[0855] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是被设计为包含单一寡核苷酸类型的组合物。在某些实施方案中，所述组合物是约50%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约50%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约50%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约55%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约60%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约65%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约70%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约75%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约80%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约85%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约90%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约91%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约92%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约93%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约94%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约95%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约96%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约97%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约98%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约99%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约99.5%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约99.6%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约99.7%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约99.8%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是约99.9%非对映体纯。在一些实施方案中，所述组合物是至少约99%非对映体纯。

[0856] 在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是被设计为包含多种寡核苷酸类型的组合物。在一些实施方案中，本发明方法允许产生手性控制的寡核苷酸文库以使预先选择量的任何一种或更多种手性控制的寡核苷酸类型可与任何一种或更多种其他手性控制的寡核苷酸类型混合来产生手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，预先选择量的寡核苷酸类型是具有任一上述非对映体纯度的组合物。

[0857] 在一些实施方案中，本发明提供了用于制备手性控制的寡核苷酸的方法，其包括以下步骤：

[0858] (1)偶联；

[0859] (2)加帽；

[0860] (3)修饰；

[0861] (4)去封闭；以及

[0862] (5)重复步骤(1)-(4)直至达到期望的长度。

[0863] 当描述提供的方法时，用词“循环”具有其如本领域普通技术人员所理解的普通含义。在一些实施方案中，一轮步骤(1)-(4)称为一个循环。

[0864] 在一些实施方案中，本发明提供了用于制备手性控制的寡核苷酸组合物的方法，其包括以下步骤：

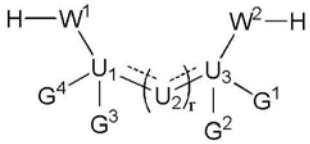
[0865] (a)提供一定量的第一手性控制的寡核苷酸；以及

[0866] (b)任选地提供一定量的一种或更多种其他手性控制的寡核苷酸。

[0867] 在一些实施方案中,第一手性控制的寡核苷酸是如本文中所述的寡核苷酸类型。在一些实施方案中,一种或更多种其他手性控制的寡核苷酸是一种或更多种如本文中所述的寡核苷酸类型。

[0868] 相关化学和合成领域技术人员将认识到当使用本发明方法合成时,提供的寡核苷酸的结构变化和立体化学构型具有一定程度的通用性和控制性。例如,在第一循环完成之后,随后循环可使用为该随后循环个体选择的核苷酸单元来进行,在一些实施方案中,所述核苷酸单元包含不同于第一循环核苷碱基和/或糖的核苷碱基和/或糖。同样,随后循环的偶联步骤中使用的手性助剂可不同于第一循环中使用的手性助剂,以使第二循环产生具有不同立体化学构型的磷键联。在一些实施方案中,新形成的核苷酸间键联中的键联磷的立体化学通过使用立体化学纯亚磷酰胺来控制。另外,随后循环的修饰步骤中使用的修饰试剂可不同于第一循环或先前循环中使用的修饰试剂。这个迭代装配方法的累积作用是使得提供的寡核苷酸的各组分可在结构上和在构型上被高度定制。这个方法的另一优势是加帽步骤使"n-1"杂质的形成最少化,所述杂质否则将使得分离提供的寡核苷酸极具挑战,并且尤其是分离长度较长的寡核苷酸。

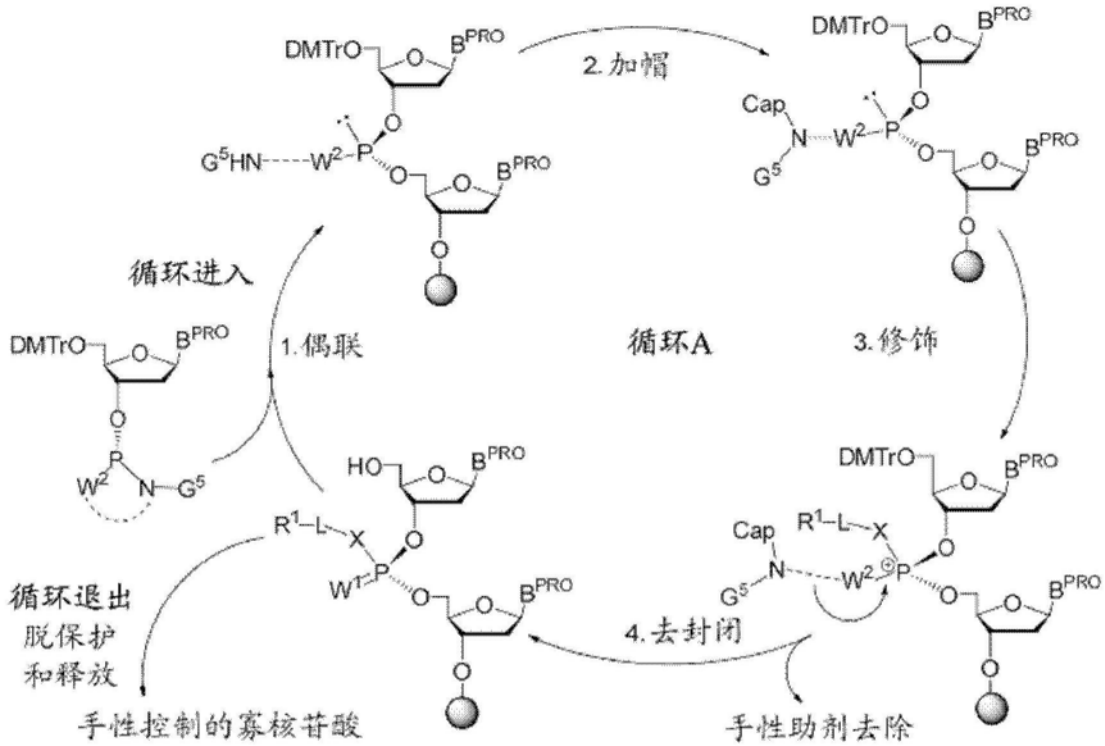
[0869] 在一些实施方案中,用于制备手性控制的寡核苷酸的方法的示例性循环说明于方案I中。在方案I中,●表示固体支持物以及任选地一部分连接于固体支持物的增长的手性控制的寡核苷酸。例示的手性助剂具有式3-I的结构:

[0870] 

式 3-I

[0871] 以下对其进一步描述。"帽"是通过加帽步骤引至氮原子的任何化学部分,并且在一些实施方案中,是氨基保护基。本领域普通技术人员了解在第一循环中,在开始时可仅有一个核苷连接于固体支持物,并且可任选地在去封闭之前进行循环退出。如本领域技术人员所了解,B^{PRO}是寡核苷酸合成中使用的受保护的碱基。以下进一步描述方案I的上述循环的各步骤。

[0872] 方案I.合成手性控制的寡核苷酸。

[0873] 

[0874] 在固体支持物上合成

[0875] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸的合成在固相上进行。在一些实施方案中，保护固体支持物上存在的反应性基团。在一些实施方案中，未保护固体支持物上存在的反应性基团。在寡核苷酸合成期间，在若干合成循环中用多种试剂处理固体支持物以实现用个体核苷酸单元逐步延长增长的寡核苷酸链。在链末端的直接连接于固体支持物的核苷单元称为本文中使用的“第一核苷”。第一核苷是通过接头部分结合于固体支持物，所述接头部分即在CPG、聚合物或其他固体支持物与核苷之间具有共价键的二价基团。接头在被进行来装配寡核苷酸链的合成循环期间保持完整，并且在链装配之后被切割以自载体释放寡核苷酸。

[0876] 用于固相核酸合成的固体支持物包括例如美国专利4,659,774、5,141,813、4,458,066;Caruthers美国专利号4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679和5,132,418;Andrus等美国专利号5,047,524、5,262,530;以及Koster美国专利号4,725,677(再颁布为Re34,069)中所述的载体。在一些实施方案中，固相是有机聚合物载体。在一些实施方案中，固相是无机聚合物载体。在一些实施方案中，有机聚合物载体是聚苯乙烯、氨基甲基聚苯乙烯、聚乙二醇-聚苯乙烯接枝共聚物、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、高度交联聚合物(HCP)、或其他合成聚合物、碳水化合物(如纤维素和淀粉或其他聚合碳水化合物)、或其他有机聚合物和任何共聚物、复合材料或以上无机或有机材料的组合。在一些实施方案中，无机聚合物载体是二氧化硅、氧化铝、作为硅胶载体的可控聚合玻璃(CPG)、或氨基丙基CPG。其他适用固体支持物包括氟固体支持物(参见例如WO/2005/070859)、长链烷基胺(LCAA)可控孔度玻璃(CPG)固体支持物(参见例如S.P.Adams,K.S.Kavka,E.J.Wykes,S.B.Holder和G.R.Galluppi,J.Am.Chem.Soc.,1983,105,661-663;G.R.Gough,M.J.Bruden和P.T.Gilham,Tetrahedron Lett.,1981,22,4177-4180)。膜载体和聚合膜(参见例如Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis,

Peptides,Proteins and Nucleic Acids,第21章第157-162页,1994 Roger Epton编以及美国专利号4,923,901)也可用于合成核酸。一旦形成,膜即可被化学官能化以用于核酸合成中。除官能团连接于膜之外,使用连接于膜的接头或间隔子基团也用于一些实施方案中来使膜与合成的链之间的空间位阻最小化。

[0877] 其他合适的固体支持物包括本领域中通常已知适用于固相方法中的那些,包括例如以PrimerTM 200载体销售的玻璃、可控孔度玻璃(CPG)、草酰基-可控孔度玻璃(参见例如Alul等,Nucleic Acid Research,1991,19,1527)、TentaGel载体-一种氨基聚乙二醇衍生化载体(参见例如Wright等,Tetrahedron Lett.,1993,34,3373)和Poros-聚苯乙烯/二乙烯苯共聚物。

[0878] 表面活化的聚合物已被证明用于在多种固体支持物介质上合成天然和经修饰核酸以及蛋白质。固体支持物材料可以是在孔隙性方面适合地均一,具有足够胺含量和足够柔性以经受任何伴随操作而不丧失完整性的任何聚合物。合适的所选材料的实例包括尼龙、聚丙烯、聚酯、聚四氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯和硝酸纤维素。视研究者的设计而定,其他材料可充当固体支持物。考虑到一些设计,可选择例如包镀金属(特别是金或铂)(参见例如美国公布号20010055761)。在寡核苷酸合成的一个实施方案中,例如使核苷锚定于用羟基或氨基残基官能化的固体支持物。或者,固体支持物被衍生以提供酸不稳定性三烷氧基三苯甲基,如三甲氧基三苯甲基(TMT)。在不受理论束缚下,预期存在三烷氧基三苯甲基保护基将允许在通常在DNA合成仪上使用的条件下进行初始脱三苯甲基化。为用氨水较快释放溶液中的寡核苷酸材料,任选地将二乙醇酸酯接头引于载体上。

[0879] 在一些实施方案中,作为替代地自5′至3′方向合成提供的寡核苷酸。在一些实施方案中,核酸是通过增长的核酸的5′末端连接于固体支持物,由此呈现出其3′基团用于反应,即使用5′-核苷亚磷酰胺或在酶促反应中(例如使用核苷5′-三磷酸进行连接和聚合)。当考虑5’至3’合成时,本发明的迭代步骤保持不变(即加帽和在手性磷上修饰)。

[0880] 连接部分

[0881] 连接部分或接头任选地用于使固体支持物连接于包含游离亲核部分的化合物。合适的接头是已知的,如用于在固相合成技术中使固体支持物连接于初始核苷分子的官能团(例如羟基)的短分子。在一些实施方案中,连接部分是琥珀酰胺酸接头或琥珀酸酯接头(-CO-CH_2-CH_2-CO-)或草酰基接头(-CO-CO-)。在一些实施方案中,连接部分和核苷是通过酯键键结在一起。在一些实施方案中,连接部分和核苷是通过酰胺键键结在一起。在一些实施方案中,连接部分使核苷连接于另一核苷酸或核酸。合适的接头公开于例如Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach,Ekstein,F.编,IRL Press,N.Y.,1991,第1章以及Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis,Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.,2000,3.1.1-3.1.28中。

[0882] 接头部分用于使包含游离亲核部分的化合物连接于另一核苷、核苷酸或核酸。在一些实施方案中,连接部分是磷酸二酯键联。在一些实施方案中,连接部分是H-膦酸酯部分。在一些实施方案中,连接部分是如本文中所述的经修饰磷键联。在一些实施方案中,通用接头(UnyLinker)用于使寡核苷酸连接于固体支持物(Ravikumar等,Org.Process Res.Dev.,2008,12(3),399-410)。在一些实施方案中,使用其他通用接头(Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.,2000,3.1.1-3.1.28)。在一些实施方案中,使用多种正交

接头(如二硫化物接头)(Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.,2000,3.1.1-3.1.28)。

[0883] 一般性条件-用于合成的溶剂

[0884] 提供的寡核苷酸的合成通常在非质子性有机溶剂中进行。在一些实施方案中,溶剂是腈溶剂,例如乙腈。在一些实施方案中,溶剂是碱性胺溶剂,例如吡啶。在一些实施方案中,溶剂是醚溶剂,例如四氢呋喃。在一些实施方案中,溶剂是卤化烃,例如二氯甲烷。在一些实施方案中,使用溶剂的混合物。在某些实施方案中,溶剂是任何一种或更多种上述类别的溶剂的混合物。

[0885] 在一些实施方案中,当非质子性有机溶剂不是碱性时,反应步骤中存在碱。在其中存在碱的一些实施方案中,所述碱是胺碱,例如吡啶、喹啉或N,N-二甲基苯胺。示例性的其他胺碱包括吡咯烷、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。

[0886] 在一些实施方案中,碱不是胺碱。

[0887] 在一些实施方案中,非质子性有机溶剂是无水的。在一些实施方案中,无水非质子性有机溶剂是新鲜蒸馏的。在一些实施方案中,新鲜蒸馏的无水非质子性有机溶剂是碱性胺溶剂,例如吡啶。在一些实施方案中,新鲜蒸馏的无水非质子性有机溶剂是醚溶剂,例如四氢呋喃。在一些实施方案中,新鲜蒸馏的无水非质子性有机溶剂是腈溶剂,例如乙腈。

[0888] 活化

[0889] 用第一活化试剂处理非手性H-膦酸酯部分以形成第一中间体。在一个实施方案中,在缩合步骤期间将第一活化试剂添加到反应混合物中。第一活化试剂的使用取决于反应条件,如用于反应的溶剂。第一活化试剂的实例是光气、氯甲酸三氯甲酯、双(三氯甲基)碳酸酯(BTC)、草酰氯、Ph_3PCl_2、$(PhO)_3PCI_2$、N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰氯(BopCl)、1,3-二甲基-2-(3-硝基-1,2,4-三唑-1-基)-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮杂磷杂环戊烷鎓六氟磷酸盐(MNTP)或3-硝基-1,2,4-三唑-1-基-三(吡咯烷-1-基)磷鎓六氟磷酸盐(PyNTP)。

[0890] 非手性H-膦酸酯部分的实例是以上方案中所示的化合物。DBU表示1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯。H^+DBU可以是例如铵离子、烷基铵离子、杂芳族亚铵离子或杂环亚铵离子,其中任一个是伯、仲、叔或季或单价金属离子。

[0891] 与手性试剂反应

[0892] 在第一活化步骤之后,活化的非手性H-膦酸酯部分与式(Z-I)或(Z-I')所示手性试剂反应以形成式(Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')或(Z-Vb')手性中间体。

[0893] 立体特异性缩合步骤

[0894] 用第二活化试剂和核苷处理式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')或(Z-Vb'))手性中间体以形成缩合的中间体。核苷可在固体支持物上。第二活化试剂的实例是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盐(PhIMT)、苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(BIT)、苯并三唑、3-硝基-1,2,4-三唑(NT)、四唑、5-乙基硫基四唑(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盐(CMPT)、N-氰基甲基哌啶鎓三氟甲磺酸盐、三氟甲磺酸N-氰基甲基二甲基铵。式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')或(Z-Vb'))手性中间体可以

单体形式分离。通常来说，手性中间体Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')或(Z-Vb'))不分离，并且在同一锅中经受与核苷或经修饰核苷的反应以提供作为缩合的中间体的手性亚磷酸酯化合物。在另一些实施方案中，当方法是通过固相合成进行时，过滤包含化合物的固体支持物以去除副产物、杂质和/或试剂。

[0895] 加帽步骤

[0896] 如果最终核酸大于二聚体，那么未反应的-OH部分用封闭基团加帽，并且化合物中的手性助剂也可用封闭基团加帽以形成加帽的缩合的中间体。如果最终核酸是二聚体，那么加帽步骤不必要。

[0897] 修饰步骤

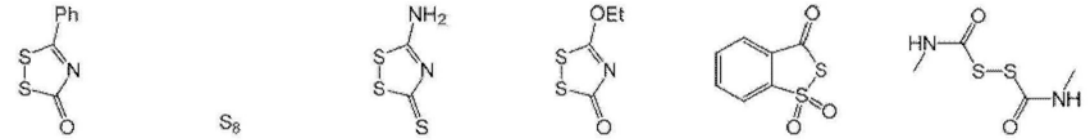
[0898] 化合物通过与亲电子试剂反应来修饰。可对加帽的缩合的中间体进行修饰步骤。在一些实施方案中，修饰步骤使用硫亲电子试剂、硒亲电子试剂或硼酸化试剂来进行。修饰步骤的实例是氧化和硫化步骤。

[0899] 在方法的一些实施方案中，硫亲电子试剂是具有下式中的一个的化合物：

[0900] S_8(式Z-B)、Z^{z1}-S-S-Z^{z2}或Z^{z1}-S-V^z-Z^{z2}；

[0901] 其中Z^{z1}和Z^{z2}独立地是烷基、氨基烷基、环烷基、杂环、环烷基烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、酰基、酰胺、酰亚胺或硫羰基，或Z^{z1}和Z^{z2}一起形成可经取代或未经取代的3至8元脂环族环或杂环；V^z是SO_2、O或NR^f；并且R^f是氢、烷基、烯基、炔基或芳基。

[0902] 在方法的一些实施方案中，硫亲电子试剂是下式Z-A、Z-B、Z-C、Z-D、Z-E或Z-F化合物：

[0903] 

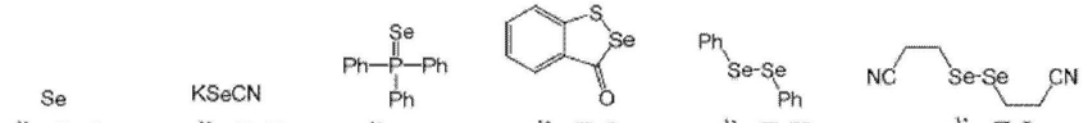
式 Z-A 式 Z-B 式 Z-C 式 Z-D 式 Z-E 式 Z-F

[0904] 在一些实施方案中，硒亲电子试剂是具有下式中的一个的化合物：

[0905] Se(式Z-G)、Z^{z3}-Se-Se-Z^{z4}或Z^{z3}-Se-V^z-Z^{z4}；

[0906] 其中Z^{z3}和Z^{z4}独立地是烷基、氨基烷基、环烷基、杂环、环烷基烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、酰基、酰胺、酰亚胺或硫羰基，或Z^{z3}和Z^{z4}一起形成可经取代或未经取代的3至8元脂环族环或杂环；V^z是SO_2、S、O或NR^f；并且R^f是氢、烷基、烯基、炔基或芳基。

[0907] 在一些实施方案中，硒亲电子试剂是式Z-G、Z-H、Z-I、Z-J、Z-K或Z-L化合物。

[0908] 

式 Z-G 式 Z-H 式 Z-I 式 Z-J 式 Z-K 式 Z-L

[0909] 在一些实施方案中，硼酸化试剂是硼烷-N,N-二异丙基乙胺(BH_3DIPEA)、硼烷-吡啶(BH_3 Py)、硼烷-2-氯吡啶(BH_3 CPy)、硼烷-苯胺(BH_3 An)、硼烷-四氢呋喃(BH_3 THF)或硼烷-二甲基硫化物(BH_3 Me_2S)。

[0910] 在方法的一些实施方案中，修饰步骤是氧化步骤。在方法的一些实施方案中，修饰

步骤是使用如本申请中在以上所述的类似条件的氧化步骤。在一些实施方案中，氧化步骤如例如JP 2010-265304 A和WO2010/064146中所公开。

[0911] 链延长循环和脱保护步骤

[0912] 将加帽的缩合的中间体去封闭，以在增长的核酸链的5’末端移除封闭基团来提供化合物。任选地使化合物再进入链延长循环以形成缩合的中间体、加帽的缩合的中间体、修饰的加帽的缩合的中间体和5’脱保护的修饰的加帽中间体。在至少一轮链延长循环之后，通过移除手性助剂配体和其他保护基，例如核苷碱基、经修饰核苷碱基、糖和经修饰糖保护基来进一步将5’脱保护的修饰的加帽中间体去封闭，以提供核酸。在另一些实施方案中，包含5’-OH部分的核苷是来自如本文中所述的先前链延长循环的中间体。在另一些实施方案中，包含5’-OH部分的核苷是由另一已知核酸合成方法获得的中间体。在其中使用固体支持物的实施方案中，接着自固体支持物切割磷原子修饰的核酸。在某些实施方案中，出于纯化目的使核酸连接在固体支持物上，接着在纯化之后自固体支持物切割。

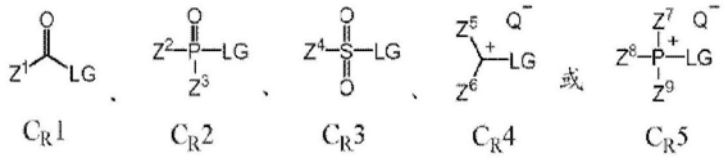
[0913] 在另一些实施方案中，包含5’-OH部分的核苷是由另一已知核酸合成方法获得的中间体。在另一些实施方案中，包含5’-OH部分的核苷是由如本申请中所述的另一已知核酸合成方法获得的中间体。在另一些实施方案中，包含5’-OH部分的核苷是由包括一个或更多个在方案I中说明的循环的另一已知核酸合成方法获得的中间体。在另一些实施方案中，包含5’-OH部分的核苷是由包括一个或更多个在方案I-b、I-c或I-d中说明的循环的另一已知核酸合成方法获得的中间体。

[0914] 在一些实施方案中，本发明提供了使用稳定的并且可商购获得的材料作为原料的寡核苷酸合成方法。在一些实施方案中，本发明提供了用以使用非手性原料产生立体控制的磷原子修饰的寡核苷酸衍生物的寡核苷酸合成方法。

[0915] 在一些实施方案中，本发明方法在脱保护步骤下不导致降解。此外，方法不需要特殊加帽试剂来产生磷原子修饰的寡核苷酸衍生物。

[0916] 缩合试剂

[0917] 根据本发明方法适用的缩合试剂(C_R)具有任一以下通式：

[0918] 

C_R1、C_R2、C_R3、C_R4、C_R5

[0919] 其中Z^1、Z^2、Z^3、Z^4、Z^5、Z^6、Z^7、Z^8和Z^9独立地是选自烷基、氨基烷基、环烷基、杂环、环烷基烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基或杂芳基氧基的任选地经取代的基团，或其中Z^2和Z^3、Z^5和Z^6、Z^7和Z^8、Z^8和Z^9、Z^9和Z^7、或Z^7和Z^8和Z^9中的任一个一起形成3至20元脂环族环或杂环；Q^-是反阴离子；并且LG是离去基团。

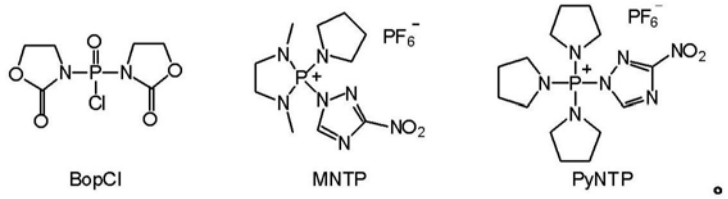
[0920] 在一些实施方案中，缩合试剂C_R的反离子是Cl^-、Br^-、BF_4^-、PF_6^-、TfO^-、Tf_2N^-、AsF_6^-、ClO_4^-或SbF_6^-，其中Tf是CF_3SO_2。在一些实施方案中，缩合试剂C_R的离去基团是F、Cl、Br、I、3-硝基-1,2,4-三唑、咪唑、烷基三唑、四唑、五氟苯或1-羟基苯并三唑。

[0921] 根据本发明方法使用的缩合试剂的实例包括但不限于五氟苯甲酰氯、羰基二咪唑(CDI)、1-均三甲苯磺酰基-3-硝基三唑(MSNT)、1-乙基-3-(3’-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI-HCl)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(PyBOP)、N,N’-双

(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰氯(BopCl)、2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)和O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、DIPCDI;N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰溴(BopBr)、1,3-二甲基-2-(3-硝基-1,2,4-三唑-1-基)-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮杂磷杂环戊烷鎓六氟磷酸盐(MNTP)、3-硝基-1,2,4-三唑-1-基-三(吡咯烷-1-基)磷鎓六氟磷酸盐(PyNTP)、溴三吡咯烷子基磷鎓六氟磷酸盐(PyBrOP);O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N′,N′-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU);以及四甲基氟甲脒六氟磷酸盐(TFFH)。在某些实施方案中,缩合试剂C_R的反离子是Cl^-、Br^-、BF_4^-、PF_6^-、TfO^-、Tf_2N^-、AsF_6^-、ClO_4^-或SbF_6^-,其中Tf是CF_3SO_2。

[0922] 在一些实施方案中,缩合试剂是1-(2,4,6-三异丙基苯磺酰基)-5-(吡啶-2-基)四唑化物、新戊酰氯、溴三吡咯烷子基磷鎓六氟磷酸盐、N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰氯(BopCl)或2-氯-5,5-二甲基-2-氧代-1,3,2-二氧杂磷杂环戊烷。在某一实施方案中,缩合试剂是N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰氯(BopCl)。在一些实施方案中,缩合试剂选自WO/2006/066260中所述的那些。

[0923] 在一些实施方案中,缩合试剂是1,3-二甲基-2-(3-硝基-1,2,4-三唑-1-基)-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮杂磷杂环戊烷鎓六氟磷酸盐(MNTP)或3-硝基-1,2,4-三唑-1-基-三(吡咯烷-1-基)磷鎓六氟磷酸盐(PyNTP):

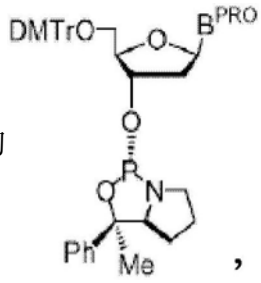
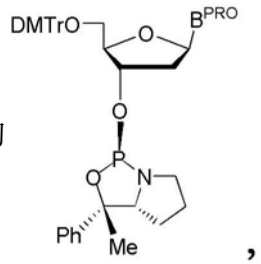
[0924] 

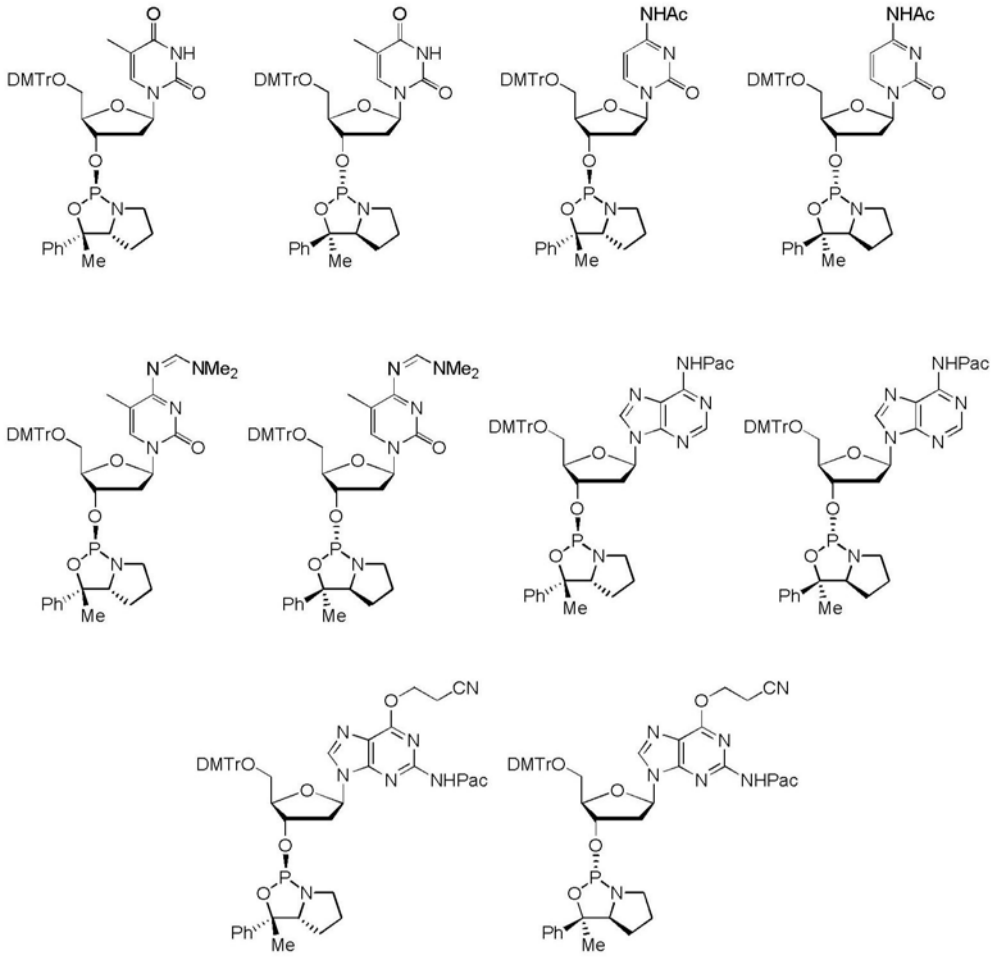
[0925] 核苷偶联配偶体的碱基和糖的选择

[0926] 如本文中所述,供根据本发明方法使用的核苷偶联配偶体可彼此相同,或可彼此不同。在一些实施方案中,用于合成提供的寡核苷酸的核苷偶联配偶体彼此具有相同的结构和/或立体化学构型。在一些实施方案中,用于合成提供的寡核苷酸的各核苷偶联配偶体与寡核苷酸的某些其他核苷偶联配偶体不具有相同的结构和/或立体化学构型。本文描述供根据本发明方法使用的示例性核苷碱基和糖。相关化学和合成领域技术人员将认识到本文中所述的核苷碱基和糖的任何组合都被预期供根据本发明方法使用。

[0927] 偶联步骤:

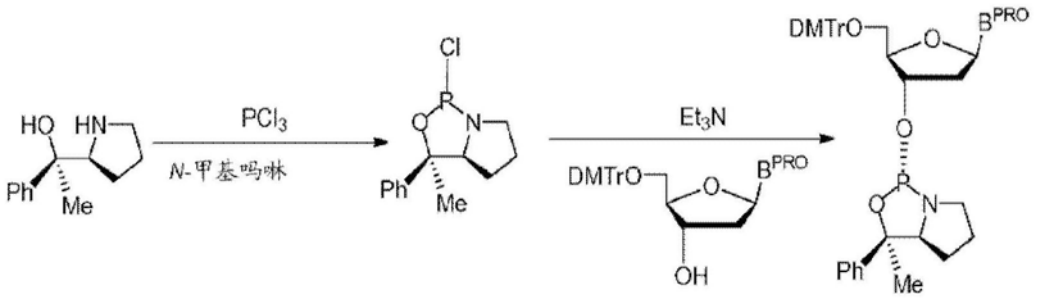
[0928] 供根据本发明使用的示例性偶联操作以及手性试剂和缩合试剂尤其概述于Wada I(JP4348077;WO2005/014609;WO2005/092909)、Wada II(WO2010/064146)和Wada III(WO2012/039448)中。供根据本发明使用的手性核苷偶联配偶体在本文中也称为"Wada亚酰

胺化物”。在一些实施方案中，偶联配偶体具有结构  其中B^{PRO}是受保护的核苷碱基。在一些实施方案中，偶联配偶体具有结构  其中B^{PRO}是受保护的核苷碱基。以下描述作为偶联配偶体的示例性手性亚磷酰胺：

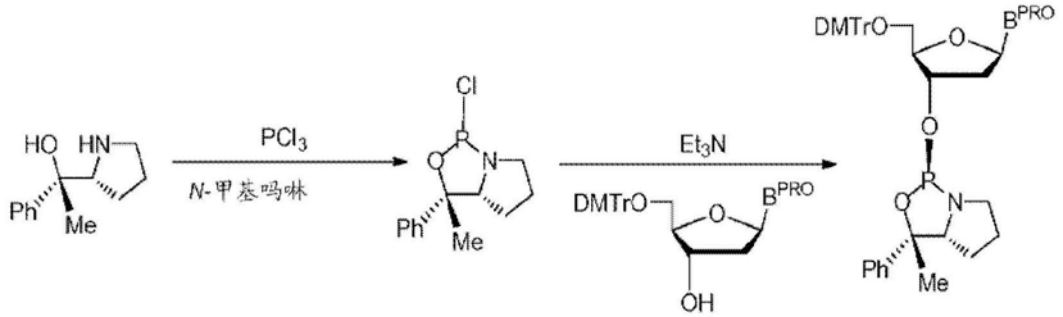
[0929] 

[0930] 以下方案II中描述一种用于合成偶联配偶体的方法。

[0931] 方案II.偶联配偶体的示例性合成。



[0932]



[0933] 在一些实施方案中，偶联步骤包括使寡核苷酸的核苷酸单元的游离羟基与核苷偶联配偶体在适合条件下反应以实现偶联。在一些实施方案中，偶联步骤之前是去封闭步骤。例如，在一些实施方案中，增长的寡核苷酸的5'羟基被封闭(即受保护)，并且必须去封闭以随后与核苷偶联配偶体反应。

[0934] 一旦增长的寡核苷酸的适当羟基已被去封闭，洗涤并干燥载体以为递送包含手性试剂的溶液和包含活化剂的溶液做准备。在一些实施方案中，手性试剂和活化剂同时递送。在一些实施方案中，共递送包括递送一定量的溶液形式的手性试剂(例如亚磷酰胺溶液)和一定量的在诸如腈溶剂(例如乙腈)的极性非质子性溶剂中的溶液形式的活化剂(例如CMPT溶液)。

[0935] 在一些实施方案中，偶联步骤提供粗产物组合物，其中手性亚磷酸酯产物以非对映体过量＞95％存在。在一些实施方案中，手性亚磷酸酯产物以非对映体过量＞96％存在。在一些实施方案中，手性亚磷酸酯产物以非对映体过量＞97％存在。在一些实施方案中，手性亚磷酸酯产物以非对映体过量＞98％存在。在一些实施方案中，手性亚磷酸酯产物以非对映体过量＞99％存在。

[0936] 加帽步骤：

[0937] 提供的用于制备手性控制的寡核苷酸的方法包括加帽步骤。在一些实施方案中，加帽步骤是单一步骤。在一些实施方案中，加帽步骤是两个步骤。在一些实施方案中，加帽步骤超过两个步骤。

[0938] 在一些实施方案中，加帽步骤包括对手性助剂的游离胺加帽以及对任何残余未反应的5'羟基加帽的步骤。在一些实施方案中，手性助剂的游离胺和未反应的5'羟基用相同加帽基团来加帽。在一些实施方案中，手性助剂的游离胺和未反应的5'羟基用不同加帽基团来加帽。在某些实施方案中，用不同加帽基团加帽允许在合成寡核苷酸期间移除一个加帽基团的选择性超过移除另一加帽基团。在一些实施方案中，两个基团的加帽同时发生。在一些实施方案中，两个基团的加帽迭代发生。

[0939] 在某些实施方案中，加帽迭代发生，并且包括对游离胺加帽的第一步骤，继之是对

游离5'羟基加帽的第二步骤,其中游离胺与5'羟基两者均用相同加帽基团加帽。例如,在一些实施方案中,手性助剂的游离胺是使用酸酐(例如苯氧基乙酸酐,即Pac_2O)加帽,随后用相同酸酐对5'羟基加帽。在某些实施方案中,用相同酸酐对5'羟基加帽发生在不同条件下(例如在一种或更多种其他试剂存在下)。在一些实施方案中,对5'羟基加帽在胺碱存在下在醚溶剂中(例如NMI(N-甲基咪唑),在THF中)发生。短语"加帽基团"在本文中可与短语"保护基"和"封闭基团"互换使用。

[0940] 在一些实施方案中,胺加帽基团的特征在于其有效地对胺加帽,因此其防止中间亚磷酸酯种类重排和/或分解。在一些实施方案中,选择能够保护手性助剂的胺以防止核苷酸间键联磷的分子内切割的加帽基团。

[0941] 在一些实施方案中,5'羟基加帽基团的特征在于其有效地对羟基加帽,因此其防止出现由于未能在第一循环中反应,但接着在一个或更多个随后循环中反应的寡核苷酸链的反应而产生的"短聚体",例如"n-m"(m和n是整数,并且m<n;n是靶向的寡核苷酸中的碱基的数目)杂质。存在所述短聚体(尤其"n-1")对粗寡核苷酸的纯度具有有害影响,并且使得寡核苷酸的最终纯化变得繁重,并且通常是低产率的。

[0942] 在一些实施方案中,特定帽是基于其促进在特定条件下的特定类型的反应的趋势来选择。例如,在一些实施方案中,选择能够促进E1消除反应的加帽基团,所述反应从增长的寡核苷酸上切割帽和/或助剂。在一些实施方案中,选择能够促进E2消除反应的加帽基团,所述反应从增长的寡核苷酸上切割帽和/或助剂。在一些实施方案中,选择能够促进β-消除反应的加帽基团,所述反应从增长的寡核苷酸上切割帽和/或助剂。

[0943] 修饰步骤:

[0944] 本文中使用的短语"修饰步骤"和"P修饰步骤"可互换使用,并且一般是指用于安置经修饰核苷酸间键联的任何一个或更多个步骤。在一些实施方案中,经修饰核苷酸间键联具有式I结构。本发明的P修饰步骤发生在装配提供的寡核苷酸期间而非在提供的寡核苷酸装配完成之后。因此,提供的寡核苷酸的各核苷酸单元可在安置核苷酸单元所处的循环期间在键联磷处被个体地修饰。

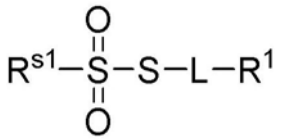
[0945] 在一些实施方案中,合适的P修饰试剂是硫亲电子试剂、硒亲电子试剂、氧亲电子试剂、硼酸化试剂或叠氮化物试剂。

[0946] 例如,在一些实施方案中,硒试剂是元素硒、硒盐或取代的二硒化物。在一些实施方案中,氧亲电子试剂是元素氧、过氧化物或取代的过氧化物。在一些实施方案中,硼酸化试剂是硼烷-胺(例如N,N-二异丙基乙胺(BH_3·DIPEA)、硼烷-吡啶(BH_3·PY)、硼烷-2-氯吡啶(BH_3·CPy)、硼烷-苯胺(BH_3·An))、硼烷-醚试剂(例如硼烷-四氢呋喃(BH_3·THF))、硼烷-二烷基硫化物试剂(例如BH_3·Me_2S)、苯胺-氰基硼烷或三苯基膦-烷氧羰基硼烷。在一些实施方案中,叠氮化物试剂包含能够经受随后还原以提供胺基团的叠氮化物基团。

[0947] 在一些实施方案中,P修饰试剂是如本文中所述的硫化试剂。在一些实施方案中,修饰步骤包括使磷硫化以提供硫代磷酸酯键联或硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中,修饰步骤提供具有式I核苷酸间键联的寡核苷酸。

[0948] 在一些实施方案中,本发明提供了硫化试剂以及其制备和使用方法。

[0949] 在一些实施方案中,所述硫化试剂是硫代磺酸酯试剂。在一些实施方案中,硫代磺酸酯试剂具有式S-I结构:

[0950] 

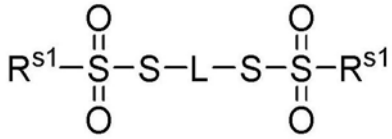
S-I

[0951] 其中：

[0952] R^{s1}是R;并且

[0953] R、L和R^1各自独立地如以上以及本文中所定义和描述。

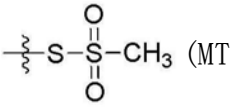
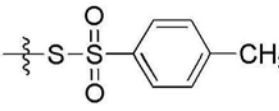
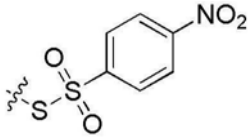
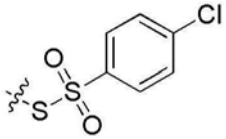
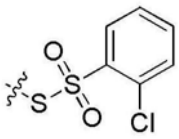
[0954] 在一些实施方案中，硫化试剂是双(硫代磺酸酯)试剂。在一些实施方案中，双(硫代磺酸酯)试剂具有式S-II结构：

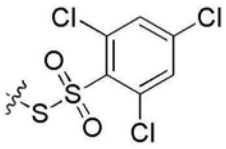
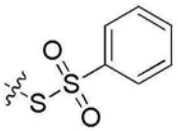
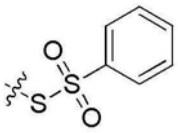
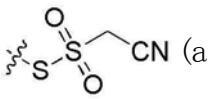
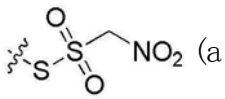
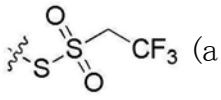
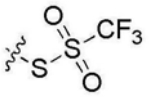
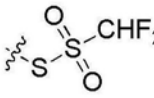
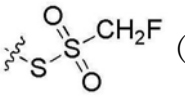
[0955] 

S-II

[0956] 其中R^{s1}和L各自独立地如以上以及本文中所定义和描述。

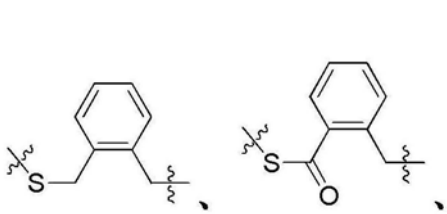
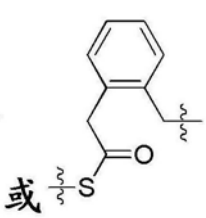
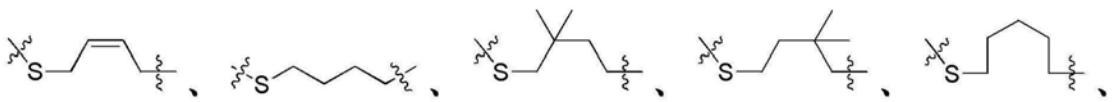
[0957] 如以上所一般定义，R^{s1}是R，其中R如以上以及本文中所定义和描述。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的脂族、芳基、杂环基或杂芳基。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的烷基。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的烷基。在一些实施方案中，R^{s1}是甲基。在一些实施方案中，R^{s1}是氰基甲基。在一些实施方案中，R^{s1}是硝基甲基。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的芳基。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是对硝基苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是对甲基苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是对氯苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是邻氯苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是2,4,6-三氯苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是五氟苯基。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的杂环基。在一些实施方案中，R^{s1}是任选地经取代的杂芳基。

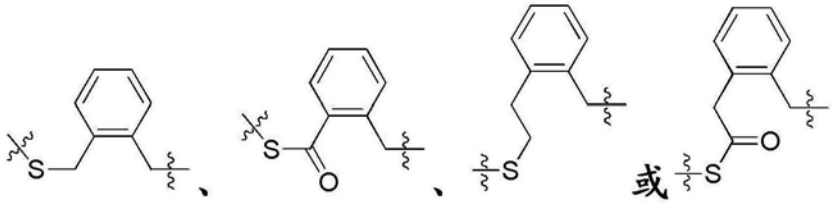
[0958] 在一些实施方案中，R^{s1}-S(O)$_2$S-是(MTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(O)$_2$S-是(TTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(O)$_2$S-是(NO$_2$PheTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(O)$_2$S-是(p-ClPheTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(O)$_2$S-是(o-ClPheTS)。在一些实施方案中，R^{S1}-S(O)$_2$S-是


(2,4,6-TriClPheTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(PheTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(PFPheTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(a-CNMTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(a-NO_2MTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(a-CF_3MTS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(a-CF_3TS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(a-CHF_2TS)。在一些实施方案中，R^{s1}-S(0)$_2$S-是(a-CH_2FTS)。

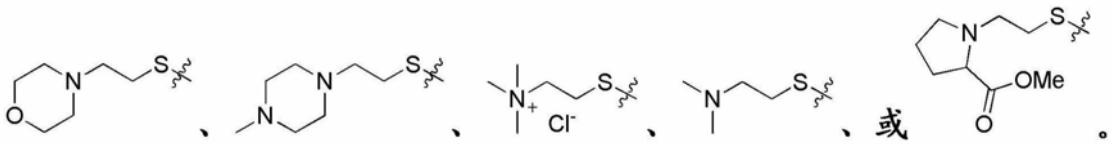
[0959] 在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中L是-S-R^{L3}-或-S-C(0)-R^{L3}-。在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-S-C(0)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的C_1-C_6亚烷基。在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-S-C(0)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的C_1-C_6亚烯基。在一些实施方案中，L是-S-R^{L3}-或-S-C(0)-R^{L3}-，其中R^{L3}是任选地经取代的C_1-C_6亚烷基，其中一个或更多个亚甲基单元任选地并独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烯基、亚芳基或亚杂芳基。在一些实施方案中，在一些实施方案中，R^{L3}是任选地经取代的-S-(C_1-C_6亚烯基)-、-S-(C_1-C_6亚烷基)-、-S-(C_1-C_6亚烷基)-亚芳基-(C_1-C_6亚烷基)-、-S-CO-亚芳基-(C_1-C_6亚烷基)-或-S-CO-(C_1-C_6亚烷基)-亚芳基-(C_1-C_6亚烷基)-。在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中L是-S-R^{L3}-或-S-C(0)-R^{L3}-，并且硫原子连接于R^1。

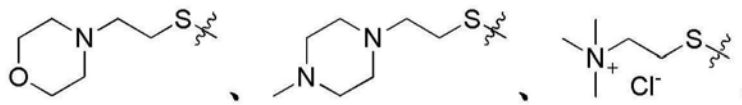
[0960] 在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中L是亚烷基、亚烯基、亚芳基或亚杂芳基。

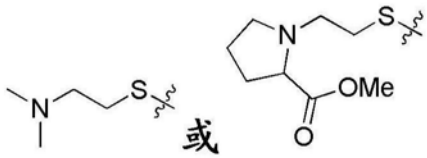
[0961] 在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中L是、或。在一些实施方案中，L是、


其中硫原子连接于R^1。

[0962] 在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中R^1是

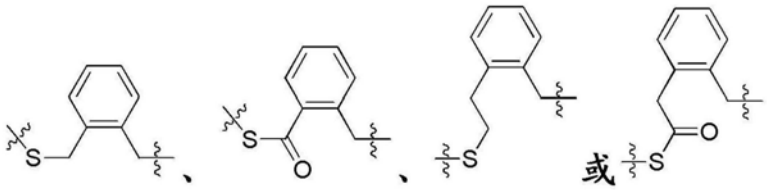

在一些实施方案中，R^1是

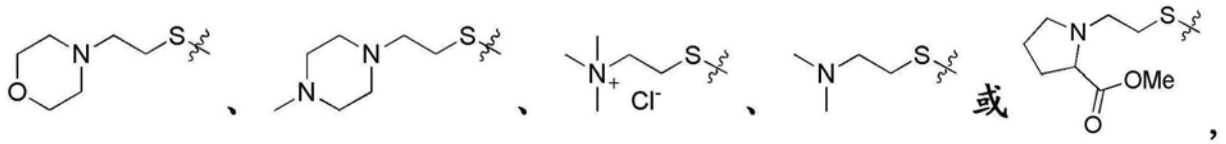



其中硫原子连接于L。

[0963] 在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中L是




其中硫原子连接于R^1；并且R^1是

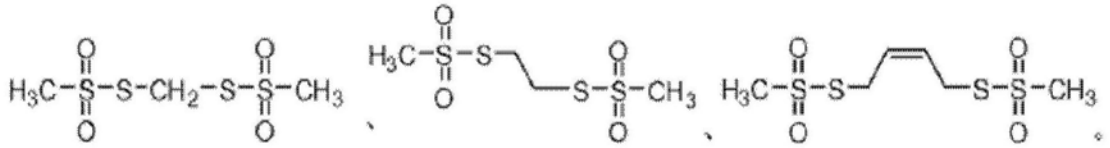


其中硫原子连接于L。

[0964] 在一些实施方案中，硫化试剂具有结构S-I或S-II，其中R^1是-S-R^{L2}，其中R^{L2}如以上以及本文中所定义和描述。在一些实施方案中，R^{L2}是选自以下的任选地经取代的基团：-S-(C_1-C_6亚烷基)-杂环基、-S-(C_1-C_6亚烯基)-杂环基、-S-(C_1-C_6亚烷基)-N(R')$_2$、-S-(C_1-C_6亚烷基)-N(R')$_3$，其中各R'如上所定义并如本文中所述。

[0965] 在一些实施方案中，-L-R^1是-R^{L3}-S-S-R^{L2}，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。在一些实施方案中，-L-R^1是-R^{L3}-C(O)-S-S-R^{L2}，其中各变量独立地如上所定义和如本文中所述。

[0966] 以下描述示例性式S-II双(硫代磺酸酯)试剂：

[0967] 

[0968] 在一些实施方案中，硫化试剂是具有下式中的一个的化合物：

[0969] S_8、R^{s2}-S-S-R^{s3}或R^{s2}-S-X^s-R^{s3}，

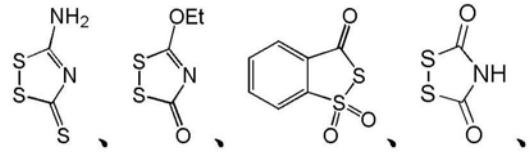
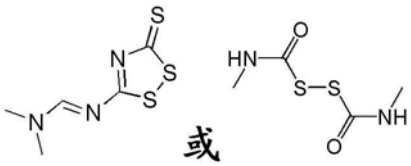
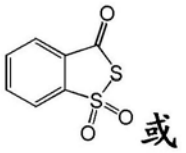
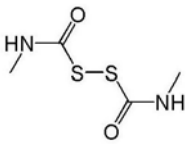
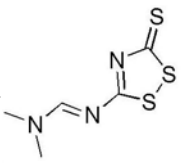
[0970] 其中：

[0971] R^{s2}和R^{s3}各自独立地是选自以下的任选地经取代的基团：脂族、氨基烷基、碳环基、杂环基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、酰基、酰胺、酰亚胺或硫羰基；或

[0972] R^{s2}和R^{s3}与其所结合的原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环；

[0973] X^s是-S(O)$_2$-、-O-或-N(R')-；并且

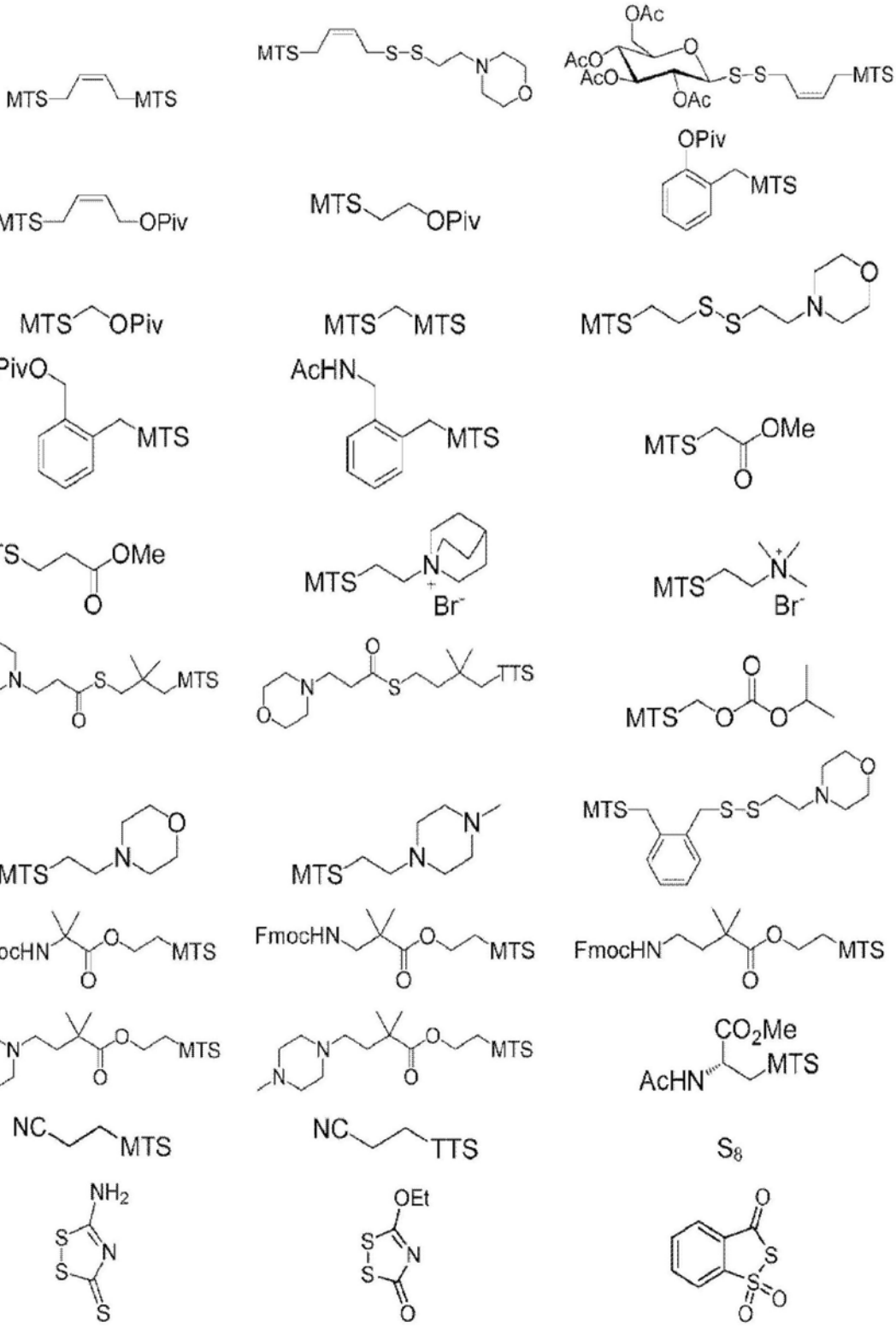
[0974] R'如以上以及本文中所定义和描述。

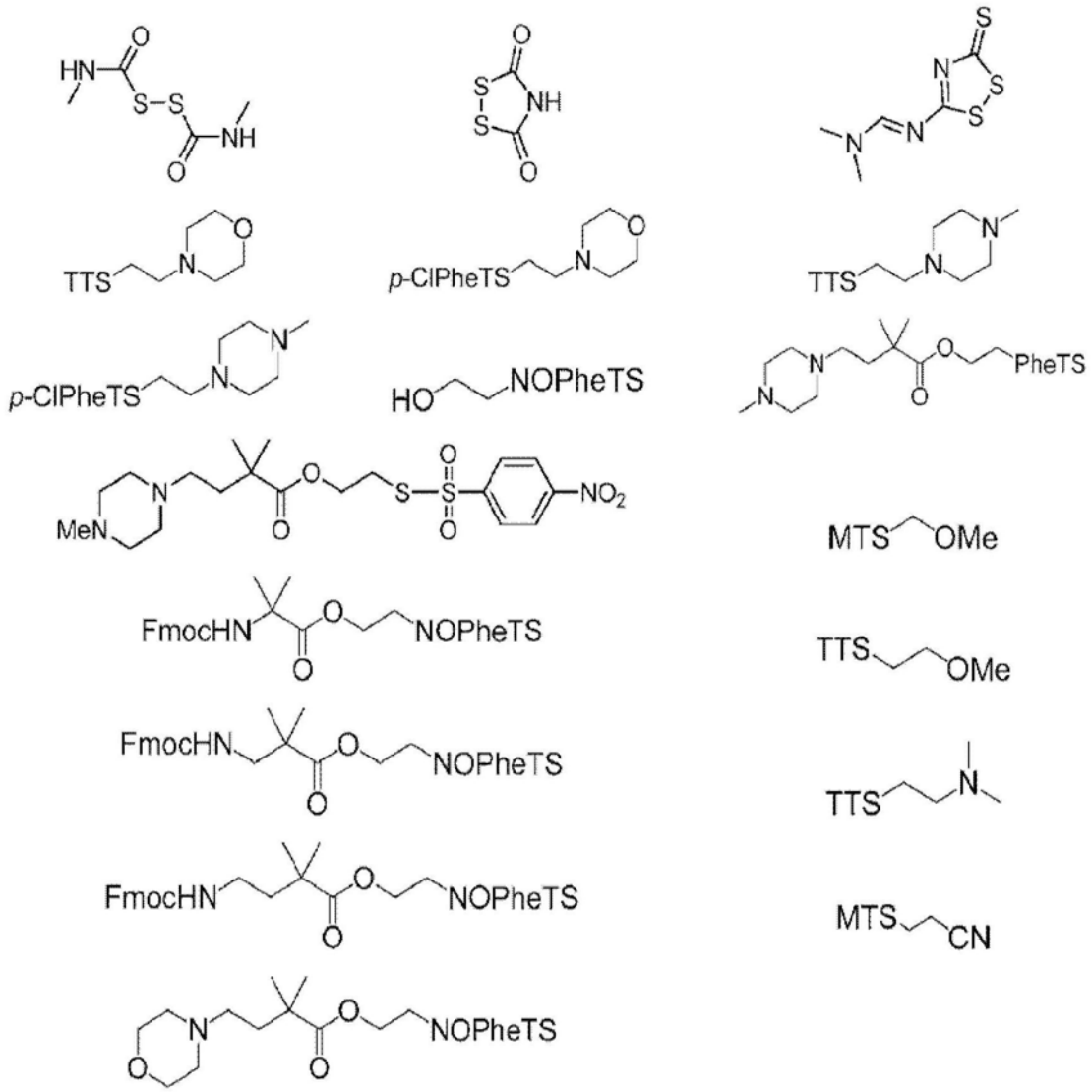
[0975] 在一些实施方案中，硫化试剂是S_8、、或。在一些实施方案中，硫化试剂是S_8、或。在一些实施方案中，硫化试剂是。

[0976] 下表5中描述示例性硫化试剂。

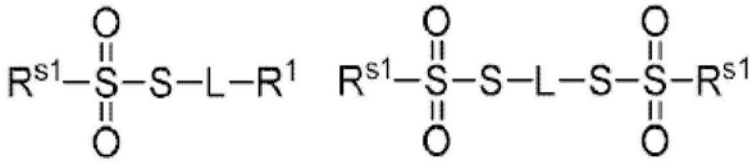
[0977] 表5.示例性硫化试剂

[0978]


MTS MTS
MTS S S N O
OAc AcO AcO O OAc S S MTS
OPiv MTS
MTS OPiv
MTS OPiv
MTS MTS
MTS S S N O
PivO MTS
AcHN MTS
MTS OMe O
MTS OMe O
MTS N Br-
MTS N Br-
O N S MTS O
O N S TTS O
MTS O O
MTS N O
MTS N N
MTS S S N O
FmocHN O MTS O
FmocHN O MTS O
FmocHN O MTS O
N O MTS O
N O MTS O
CO2Me AcHN MTS
NC MTS
NC TTS
S8
NH2 S N S S
OEt S N S O
O S S O O

[0979] 

[0980] 在一些实施方案中，提供的硫化试剂用于修饰H-膦酸酯。例如，在一些实施方案中，H-膦酸酯寡核苷酸是使用例如Wada I或Wada II的方法合成，并且是使用式S-I或S-II硫化试剂修饰：

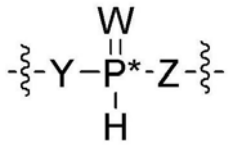
[0981] 

S-I S-II

[0982] 其中R^{S1}、L和R^1各自如以上以及本文中所述和定义。

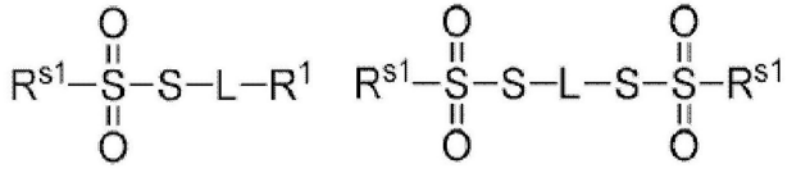
[0983] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于合成硫代磷酸三酯的方法，其包括以下步骤：

[0984] i)使具有以下结构的H-膦酸酯：

[0985] 

[0986] 其中W、Y和Z各自如以上以及本文中所述和定义，与硅烷基化试剂反应以提供硅烷基氧基膦酸酯；以及

[0987] ii)使所述硅烷基氧基膦酸酯与具有结构S-I或S-II的硫化试剂：

[0988] 

S-I S-II

[0989] 反应以提供硫代磷酸三酯。

[0990] 在一些实施方案中，替代硫化试剂使用硒亲电子试剂以引入对核苷酸间键联的修饰。在一些实施方案中，硒亲电子试剂是具有下式中的一个的化合物：

[0991] Se、R^{s2}-Se-Se-R^{s3}或R^{s2}-Se-X^s-R^{s3}，

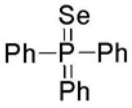
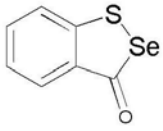
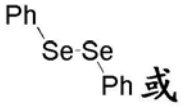
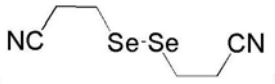
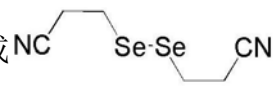
[0992] 其中：

[0993] R^{s2}和R^{s3}各自独立地是选自以下的任选地经取代的基团：脂族、氨基烷基、碳环基、杂环基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、酰基、酰胺、酰亚胺或硫羰基；或

[0994] R^{s2}和R^{s3}与其所结合的原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳基环；

[0995] X^s是-S(O)$_2$-、-O-或-N(R')-；并且

[0996] R'如以上以及本文中所定义和描述。

[0997] 在另一些实施方案中，硒亲电子试剂是化合物Se、KSeCN、、、或。在一些实施方案中，硒亲电子试剂是Se或。

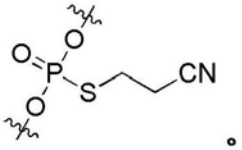
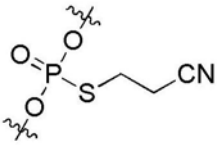
[0998] 在一些实施方案中，供根据本发明使用的硫化试剂的特征在于与单一硫原子(例如-S$^-$或=S)相反，在硫化期间转移至磷的部分是经取代的硫(例如-SR)。

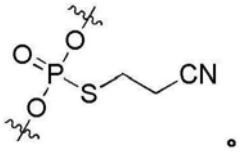
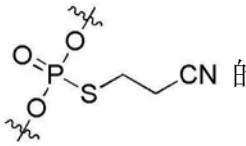
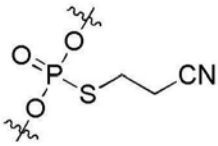
[0999] 在一些实施方案中，供根据本发明使用的硫化试剂的特征在于试剂的活性可通过用某一吸电子或供电子基团修饰试剂来调谐。

[1000] 在一些实施方案中，供根据本发明使用的硫化试剂的特征在于其是结晶的。在一些实施方案中，供根据本发明使用的硫化试剂的特征在于其具有高度结晶性。在某些实施方案中，供根据本发明使用的硫化试剂的特征在于试剂易于通过例如重结晶纯化。在某些

实施方案中，供根据本发明使用的硫化试剂的特征在于其基本上不含含硫杂质。在一些实施方案中，基本上不含含硫杂质的硫化试剂表现出提高的效率。

[1001] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸包含一个或更多个磷酸二酯键联。为了合成所述手性控制的寡核苷酸，将一个或更多个修饰步骤任选地替换成氧化步骤以安置相应磷酸二酯键联。在一些实施方案中，氧化步骤以类似于普通寡核苷酸合成的方式进行。在一些实施方案中，氧化步骤包括使用I_2。在一些实施方案中，氧化步骤包括使用I_2和吡啶。在一些实施方案中，氧化步骤包括使用含0.02M I_2的THF/吡啶/水(70:20:10-v/v/v)共溶剂系统。方案I-c中描述示例性循环。

[1002] 在一些实施方案中，使用硫代磷酸酯前体合成包含硫代磷酸酯键联的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，所述硫代磷酸酯前体是  。在一些实施方案中， 在循环退出之后在标准脱保护/释放操作期间被转化成硫代磷酸二酯键联。以下进一步描述实例。

[1003] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸包含一个或更多个磷酸二酯键联和一个或更多个硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸包含一个或更多个磷酸二酯键联和一个或更多个硫代磷酸二酯键联，其中至少一个磷酸二酯键联当自3'至5'合成时安置在所有硫代磷酸二酯键联之后。为了合成所述手性控制的寡核苷酸，在一些实施方案中，将一个或更多个修饰步骤任选地替换成氧化步骤以安置相应磷酸二酯键联，并且安置各硫代磷酸二酯键联的硫代磷酸酯前体。在一些实施方案中，硫代磷酸酯前体在达成所需寡核苷酸长度之后被转化成硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，在循环期间或在循环退出之后的脱保护/释放步骤使硫代磷酸酯前体转化成硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，硫代磷酸酯前体的特征在于其能够通过β-消除路径来移除。在一些实施方案中，硫代磷酸酯前体是  。如本领域普通技术人员所了解，在合成期间使用例如  的硫代磷酸酯前体的一个益处是在某些条件下， 比硫代磷酸酯更稳定。

[1004] 在一些实施方案中，硫代磷酸酯前体是如本文中所述的磷保护基，例如2-氰基乙基(CE或Cne)、2-三甲基硅烷基乙基、2-硝基乙基、2-磺酰基乙基、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-甲基硫基-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。以下进一步描述实例。

[1005] 在本文中以及在实施例部分中描述用于合成所需硫化试剂的方法。

[1006] 如上所指示,在一些实施方案中,硫化发生在从增长的寡核苷酸上切割手性试剂的条件下。在一些实施方案中,硫化发生在不从增长的寡核苷酸上切割手性试剂的条件下。

[1007] 在一些实施方案中,将硫化试剂溶解于合适的溶剂中,并递送至柱中。在某些实施方案中,溶剂是极性非质子性溶剂,如腈溶剂。在一些实施方案中,溶剂是乙腈。在一些实施方案中,硫化试剂的溶液通过在腈溶剂(例如乙腈)中混合硫化试剂(例如如本文中所述的硫代磺酸酯衍生物)与BSTFA(N,O-双-三甲基硅烷基-三氟乙酰胺)来制备。在一些实施方案中,不包括BSTFA。例如,本发明人已发现反应性相对更大的通式R^{s2}-S-S(O)$_2$-g^{s3}硫化试剂经常可以在不存在BSTFA的情况下成功参与硫化反应。仅给出一个实例,发明人已证明当R^{s2}是对硝基苯基,并且R^{s3}是甲基时,那么不需要BSTFA。鉴于本公开,本领域技术人员将易于能够确定不需要BSTFA的其他情况和/或硫化试剂。

[1008] 在一些实施方案中,硫化步骤在室温下进行。在一些实施方案中,硫化步骤在较低温度,如约0℃、约5℃、约10℃或约15℃下进行。在一些实施方案中,硫化步骤在大于约20℃的高温下进行。

[1009] 在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约120分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约90分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约60分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约30分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约25分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约20分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约15分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约1分钟至约10分钟。在一些实施方案中,操作硫化反应约5分钟至约60分钟。

[1010] 在一些实施方案中,操作硫化反应约5分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约10分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约15分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约20分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约25分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约30分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约35分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约40分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约45分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约50分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约55分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约60分钟。

[1011] 出人意料地发现根据本发明方法制备的某些硫化修饰产物出人意料地稳定。在一些实施方案中,出人意料地稳定的产物是硫代磷酸三酯。在一些实施方案中,出人意料地稳定的产物是包含一个或更多个具有式I-c结构的核苷酸间键联的手性控制的寡核苷酸。

[1012] 相关领域技术人员将认识到本文中所述的硫化方法和本文中所述的硫化试剂也适用于修饰H-膦酸酯寡核苷酸,如Wada II(WO2010/064146)中所述的那些的背景下。

[1013] 在一些实施方案中,硫化反应的逐步硫化效率为至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,硫化反应提供纯度是至少98%的粗二核苷酸产物组合物。在一些实施方案中,硫化反应提供纯度是至少90%的粗四核苷酸产物组合物。在一些

实施方案中，硫化反应提供纯度是至少70％的粗十二核苷酸产物组合物。在一些实施方案中，硫化反应提供纯度是至少50％的粗二十核苷酸产物组合物。

[1014] 一旦修饰键联磷的步骤完成，寡核苷酸即经受另一去封闭步骤以为再进入循环做准备。在一些实施方案中，手性助剂在硫化之后保持完整，并且在随后去封闭步骤期间去封闭，所述去封闭步骤必须发生在再进入循环之前。重复去封闭、偶联、加帽和修饰的过程直至增长的寡核苷酸达到所需长度，此时寡核苷酸可立刻自固体支持物切割，或出于纯化目的保持连接于载体并稍后切割。在一些实施方案中，一个或更多个保护基存在于一个或更多个核苷酸碱基上，并且自载体切割寡核苷酸以及将碱基脱保护发生在单一步骤中。在一些实施方案中，一个或更多个保护基存在于一个或更多个核苷酸碱基上，并且自载体切割寡核苷酸以及将碱基脱保护发生在一个以上步骤中。在一些实施方案中，脱保护以及自载体切割发生在使用例如一种或更多种胺碱的碱性条件下。在某些实施方案中，所述一种或更多种胺碱包括丙胺。在某些实施方案中，一种或更多种胺碱包括吡啶。

[1015] 在一些实施方案中，自载体切割和/或脱保护发生在约30℃至约90℃的高温下。在一些实施方案中，自载体切割和/或脱保护发生在约40℃至约80℃的高温下。在一些实施方案中，自载体切割和/或脱保护发生在约50℃至约70℃的高温下。在一些实施方案中，自载体切割和/或脱保护发生在约60℃的高温下。在一些实施方案中，自载体切割和/或脱保护发生在环境温度下。

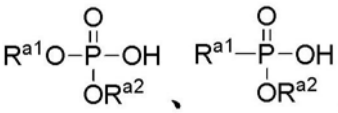
[1016] 本文描述和/或相关领域中通常已知示例性纯化操作。

[1017] 值得注意的是，在各循环期间从增长的寡核苷酸上移除手性助剂至少因以下原因而有益：(1)当在磷上安置潜在敏感性官能团时，助剂将不必在寡核苷酸合成结束时在单独步骤中移除；以及(2)倾向于经受副反应和/或受随后化学过程干扰的不稳定磷-助剂中间体得以避免。因此，在各循环期间移除手性助剂使得总合成更高效。

[1018] 尽管以上描述在循环的背景下的去封闭步骤，但以下包括其他一般性方法。

[1019] 去封闭步骤

[1020] 在一些实施方案中，偶联步骤之前是去封闭步骤。例如，在一些实施方案中，增长的寡核苷酸的5’羟基被封闭(即受保护)，并且必须被去封闭以随后与核苷偶联配偶体反应。

[1021] 在一些实施方案中，使用酸化移除封闭基团。在一些实施方案中，酸是布仑斯特(**Brønsted**)酸或路易斯(Lewis)酸。适用的布仑斯特酸是在有机溶剂或水(在80％乙酸的情况下)中，pKa(25℃，在水中)值为-0.6(三氟乙酸)至4.76(乙酸)的羧酸、烷基磺酸、芳基磺酸、磷酸及其衍生物、膦酸及其衍生物、烷基膦酸及其衍生物、芳基膦酸及其衍生物、次膦酸、二烷基次膦酸和二芳基次膦酸。酸化步骤中使用的酸的浓度(1％至80％)取决于酸的酸性。必须考虑酸强度，因为强酸条件将导致脱嘌呤/脱嘧啶，其中嘌呤基或嘧啶基碱基从核糖环和/或其他糖环上切割。在一些实施方案中，酸选自$R^{a1}COOH$、$R^{a1}SO_3H$、$R^{a3}SO_3H$、其中R^{a1}和R^{a2}各自独立地是氢或任选地经取代的烷基或芳基，并且R^{a3}是任选地经取代的烷基或芳基。

[1022] 在一些实施方案中，酸化通过路易斯酸在有机溶剂中实现。示例性所述适用的路

易斯酸是$Zn(X^a)_2$，其中X^a是Cl、Br、I或CF_3SO_3。

[1023] 在一些实施方案中，酸化步骤包括添加自缩合的中间体有效移除封闭基团而不移除嘌呤部分的一定量的布仑斯特酸或路易斯酸。

[1024] 适用于酸化步骤中的酸也包括但不限于有机溶剂中的10％磷酸、有机溶剂中的10％盐酸、有机溶剂中的1％三氟乙酸、有机溶剂中的3％二氯乙酸或三氯乙酸或水中的80％乙酸。选择这个步骤中使用的任何布仑斯特酸或路易斯酸的浓度以使酸浓度不超过导致从糖部分上切割核苷碱基的浓度。

[1025] 在一些实施方案中，酸化包括添加有机溶剂中的1％三氟乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加有机溶剂中的约0.1％至约8％三氟乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加有机溶剂中的3％二氯乙酸或三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加有机溶剂中的约0.1％至约10％二氯乙酸或三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加有机溶剂中的3％三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加机溶剂中的约0.1％至约10％三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加水中的80％乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加水中的约50％至约90％、或约50％至约80％、约50％至约70％、约50％至约60％、约70％至约90％乙酸。在一些实施方案中，酸化包括进一步向酸性溶剂中添加阳离子清除剂。在某些实施方案中，阳离子清除剂可以是三乙基硅烷或三异丙基硅烷。在一些实施方案中，封闭基团通过包括添加有机溶剂中的1％三氟乙酸的酸化来去封闭。在一些实施方案中，封闭基团是通过包括添加有机溶剂中的3％二氯乙酸的酸化来去封闭。在一些实施方案中，封闭基团是通过包括添加有机溶剂中的3％三氯乙酸的酸化来去封闭。在一些实施方案中，封闭基团是通过包括添加二氯甲烷中的3％三氯乙酸的酸化来去封闭。

[1026] 在某些实施方案中，本发明方法在合成仪上完成，并且使增长的寡核苷酸的羟基去封闭的步骤包括递送一定量的溶剂至合成仪柱中，所述柱含有寡核苷酸所连接的固体支持物。在一些实施方案中，溶剂是卤化溶剂(例如二氯甲烷)。在某些实施方案中，溶剂包含一定量的酸。在一些实施方案中，溶剂包含一定量的有机酸，例如三氯乙酸。在某些实施方案中，酸以约1％至约20w/v％的量存在。在某些实施方案中，酸以约1％至约10％w/v的量存在。在某些实施方案中，酸以约1％至约5w/v％的量存在。在某些实施方案中，酸以约1至约3w/v％的量存在。在某些实施方案中，酸以约3w/v％的量存在。本文进一步描述用于将羟基去封闭的方法。在一些实施方案中，酸以3w/v％存在于二氯甲烷中。

[1027] 在一些实施方案中，手性助剂在去封闭步骤之前移除。在一些实施方案中，手性助剂在去封闭步骤期间移除。

[1028] 在一些实施方案中，循环退出在去封闭步骤之前进行。在一些实施方案中，循环退出在去封闭步骤之后进行。

[1029] 用于移除封闭基团/保护基的一般性条件

[1030] 位于核苷碱基或糖部分上的官能团(如羟基或氨基部分)通常在合成期间用封闭(保护)基团(部分)封闭，并且随后去封闭。一般来说，封闭基团致使分子的化学官能基对特定反应条件呈惰性，并且可稍后自分子中的所述官能基移除而基本上不损害分子的其余部分(参见例如Green和Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis，第2版，John Wiley&Sons，New York，1991)。例如，氨基可用氮封闭基团封闭，所述封闭基团如苯二甲酰亚氨基、9-芴基甲氧基羰基(FMOC)、三苯基甲基亚磺酰基、t-BOC、4，4’-二甲氧基三苯甲基

(DMTr)、4-甲氧基三苯甲基(MMTr)、9-苯基黄嘌呤-9-基(Pixyl)、三苯甲基(Tr)或9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基(MOX)。羧基可被保护为乙酰基。羟基可被保护,如四氢吡喃基(THP)、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(Ctmp)、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基(Fpmp)、1-(2-氯乙氧基)乙基、3-甲氧基-1,5-二甲氧甲酰基戊-3-基(MDP)、双(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE)、三异丙基硅烷基氧基甲基(TOM)、1-(2-氰基乙氧基)乙基(CEE)、2-氰基乙氧基甲基(CEM)、[4-(N-二氯乙酰基-N-甲基氨基)苄基氧基]甲基、2-氰基乙基(CN)、新戊酰氧基甲基(PivOM)、乙酰丙酰氧基甲基(ALE)。已描述了其他代表性羟基封闭基团(参见例如Beaucage等,Tetrahedron,1992,46,2223)。在一些实施方案中,羟基封闭基团是酸不稳定性基团,如三苯甲基、单甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基、9-苯基黄嘌呤-9-基(Pixyl)和9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基(MOX)。化学官能团也可通过以前体形式包括它们来封闭。因此,叠氮基可被视为胺的封闭形式,因为叠氮基易于转化成胺。核酸合成中利用的其他代表性保护基是已知的(参见例如Agrawal等编,Protocols for Oligonucleotide Conjugates,Humana Press,New Jersey,1994,第26卷,第1-72页)。

[1031] 多种方法是已知的,并且用于从核酸上移除封闭基团。在一些实施方案中,移除所有封闭基团。在一些实施方案中,移除一部分封闭基团。在一些实施方案中,可调整反应条件以选择性移除某些封闭基团。

[1032] 在一些实施方案中,如果存在,那么核苷碱基封闭基团可在提供的寡核苷酸装配之后用酸性试剂切割。在某一实施方案中,如果存在,那么核苷碱基封闭基团可在既不是酸性,也不是碱性的条件下切割,例如可用氟化物盐或氢氟酸络合物切割。在一些实施方案中,如果存在,那么核苷碱基封闭基团可在提供的寡核苷酸装配之后在碱或碱性溶剂存在下切割。在某些实施方案中,一个或更多个核苷碱基封闭基团的特征在于其可在提供的寡核苷酸装配之后在碱或碱性溶剂存在下切割,但对在提供的寡核苷酸装配期间发生的一个或更多个早先脱保护步骤的特定条件稳定。

[1033] 在一些实施方案中,不需要核苷碱基的封闭基团。在一些实施方案中,需要核苷碱基的封闭基团。在一些实施方案中,某些核苷碱基需要一个或更多个封闭基团,而其他核苷碱基不需要一个或更多个封闭基团。

[1034] 在一些实施方案中,寡核苷酸在合成之后自固体支持物切割。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用丙胺。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用于吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用于吡啶中的20%丙胺。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用于无水吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用于无水吡啶中的20%丙胺。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用极性非质子性溶剂,如乙腈、NMP、DMSO、砜和/或卢剔啶。在一些实施方案中,自固体支持物切割包括使用溶剂(例如极性非质子性溶剂)和一种或更多种伯胺(例如C_{1-10}胺)、和/或甲氧基胺、肼和纯无水氨中的一个或更多个。

[1035] 在一些实施方案中,将寡核苷酸脱保护包括使用丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸脱保护包括使用于吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸脱保护包括使用于吡啶中的20%丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸脱保护包括使用于无水吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸脱保护包括使用于无水吡啶中的20%丙胺。

[1036] 在一些实施方案中，寡核苷酸在切割期间脱保护。

[1037] 在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约室温下进行。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在高温下进行。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在高于约30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃或100℃下进行。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃或100℃下进行。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约40-80℃下进行。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约50-70℃下进行。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约60℃下进行。

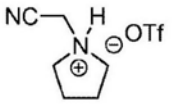
[1038] 在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约0.1-5小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约3-10小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约5-15小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约10-20小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约15-25小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约20-40小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约2小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约5小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约10小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约15小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约18小时。在一些实施方案中，进行自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护约24小时。

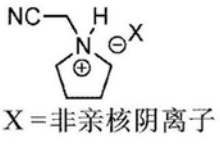
[1039] 在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在室温下进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在室温下进行约5-48小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在室温下进行约10-24小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在室温下进行约18小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在高温下进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在高温下进行约0.5-5小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约60℃下进行约0.5-5小时。在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护是在约60℃下进行约2小时。

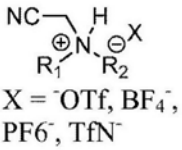
[1040] 在一些实施方案中，自固体支持物切割寡核苷酸或将寡核苷酸脱保护包括使用丙胺，并且在室温或高温下进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。示例性条件是于吡啶中的20％丙胺在室温下约18小时，以及于吡啶中的20％丙胺在60℃下约18小时。

[1041] 在一些实施方案中，活化剂是“Wada”活化剂，即所述活化剂来自以上引用的Wada I、II或III文件中的任一个。

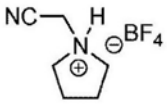
[1042] 以下描述示例性活化基团：

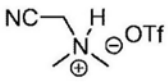


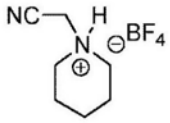


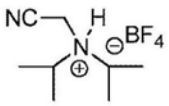


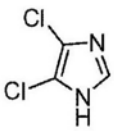


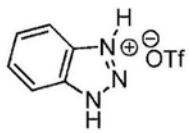




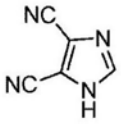


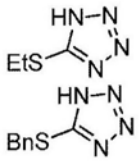


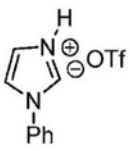


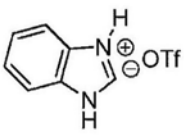


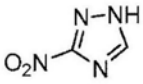
[1043]

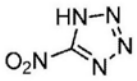






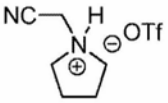


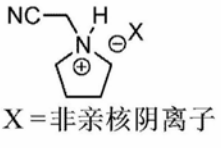


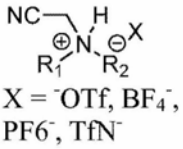




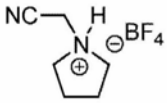
[1044] 在一些实施方案中，活化试剂选自



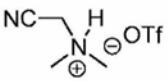


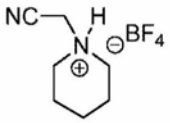


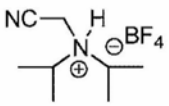


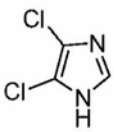


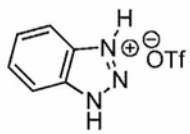
[1045]

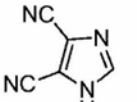


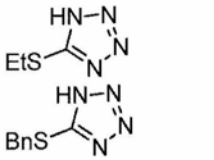


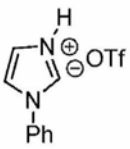


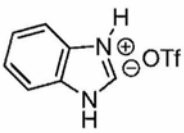


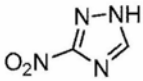


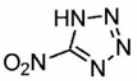






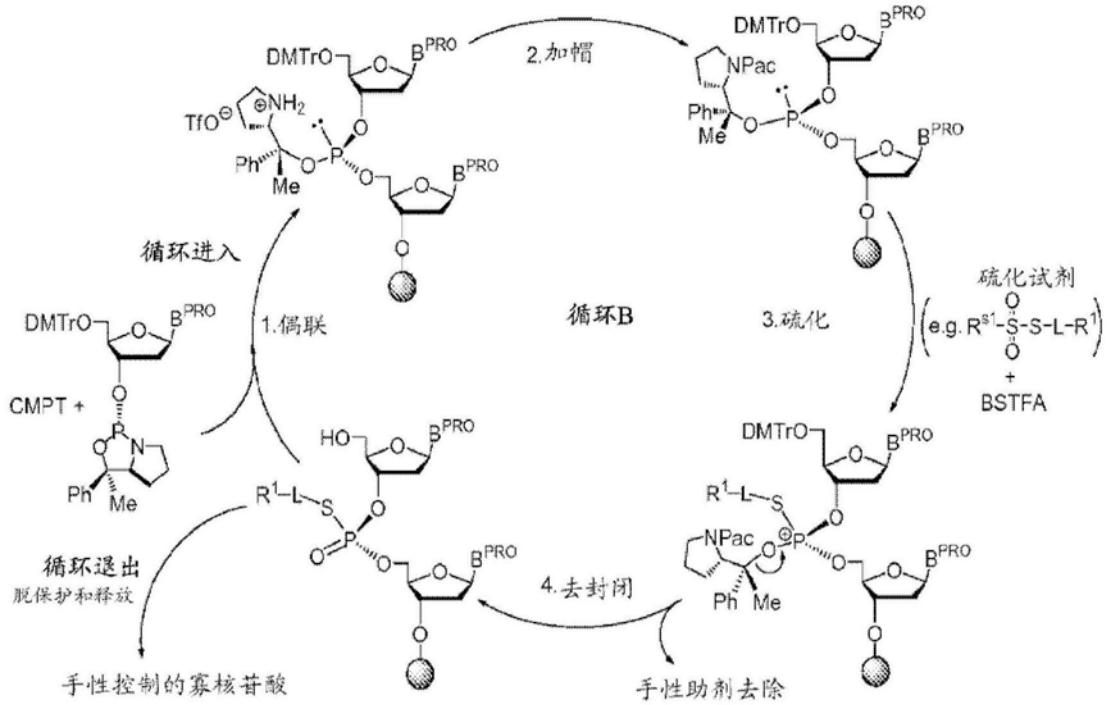






[1046] 方案I-b中描述示例性循环。

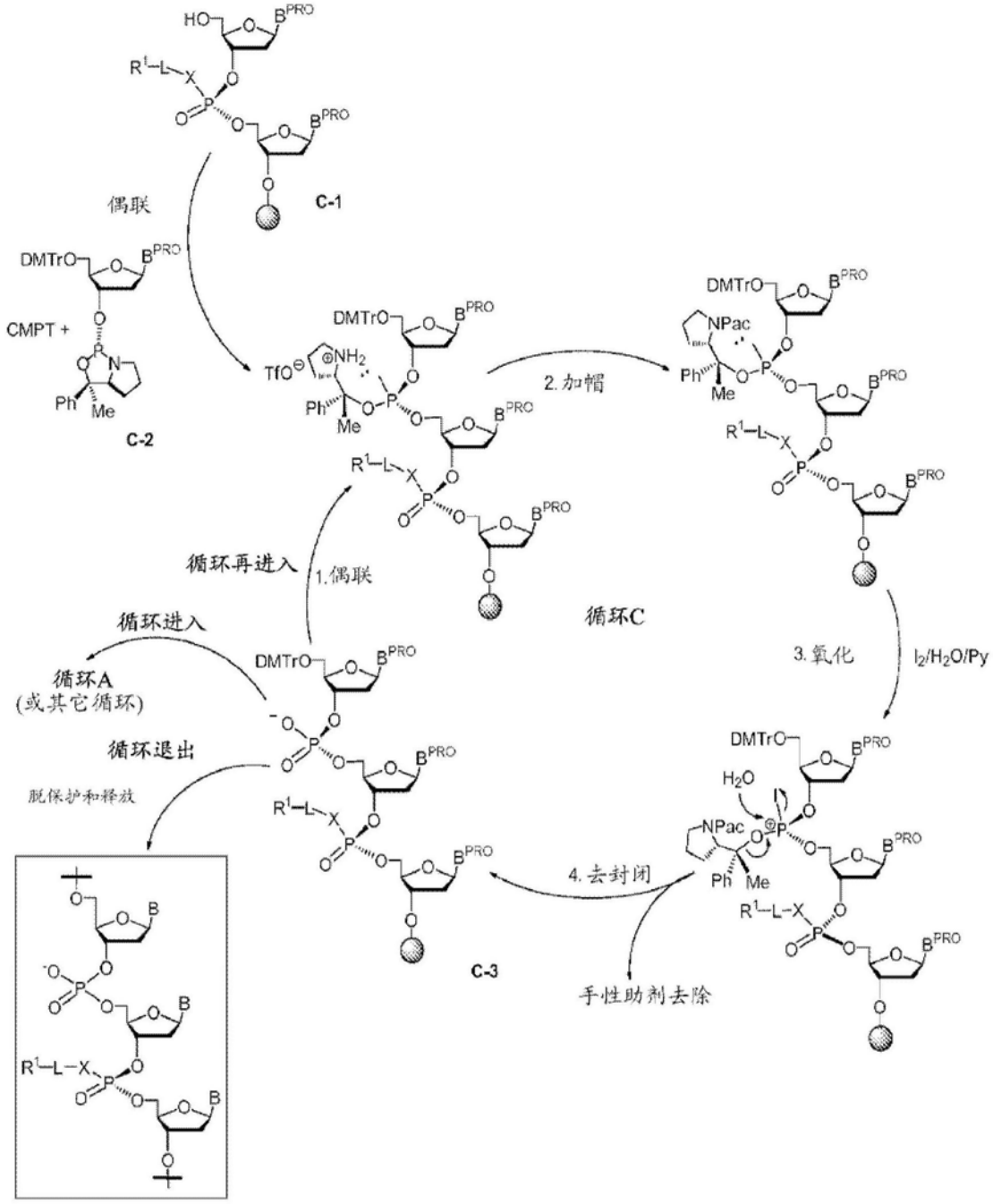
[1047] 方案I-b.安置硫代磷酸酯键联。

[1048] 

[1049] 在方案I-c中说明示例性循环。

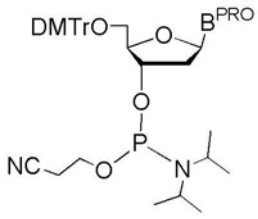
[1050] 方案1-c.在手性控制的寡核苷酸中安置磷酸二酯键联与经修饰核苷酸间键联两者。

[1051]

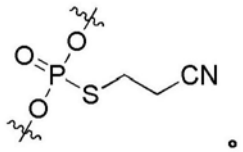


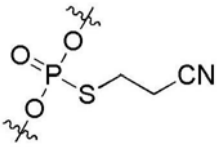
[1052] 在方案I-c中,使固体支持物上的寡核苷酸(或核苷酸或具有经修饰核苷酸间键联的寡核苷酸)(C-1)与亚磷酰胺C-2偶联。在偶联和加帽之后,进行氧化步骤。在去封闭之后,形成磷酸二酯键联。循环产物C-3可再进入循环C以安置更多磷酸二酯键联,或进入其他循环以安置其他类型的核苷酸间键联,或去到循环出口。

[1053] 在一些实施方案中,在方案I-c中,可替代C-2使用非手性纯亚磷酰胺。在一些实施方案中,使用用DMTr保护的β-氰基乙基亚磷酰胺。在一些实施方案中,所用亚磷酰胺具有以下结构:

[1054] 

[1055] 在一些实施方案中，使用硫代磷酸二酯前体会提高寡核苷酸在合成期间的稳定性。在一些实施方案中，使用硫代磷酸二酯前体会改进手性控制的寡核苷酸合成的效率。在一些实施方案中，使用硫代磷酸二酯前体会改进手性控制的寡核苷酸合成的产率。在一些实施方案中，使用硫代磷酸二酯前体会改进手性控制的寡核苷酸合成的产物纯度。

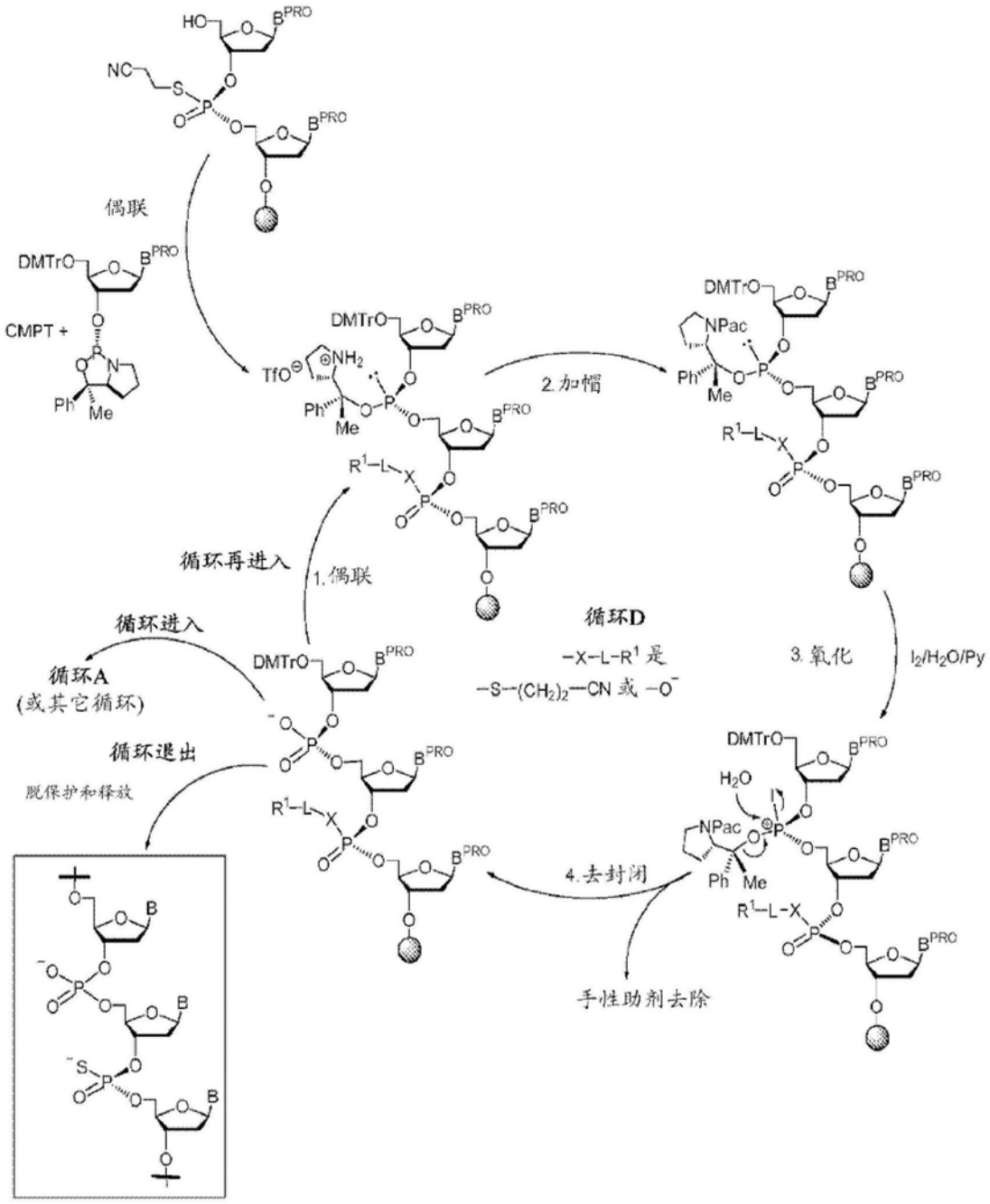
[1056] 在一些实施方案中，以上提及的方法中的硫代磷酸二酯前体是 

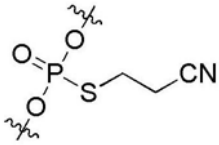
在一些实施方案中， 

是在脱保护/释放期间转化成硫代磷酸二酯键联。方案I-d中描述示例性循环。以下描述更多实例。

[1057] 方案I-d.手性控制的寡核苷酸合成中的硫代磷酸二酯前体。

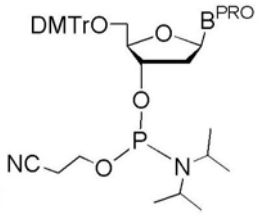
[1058]



[1059] 如方案I-d中所说明，硫代磷酸酯键联与磷酸二酯键联两者均可并入同一手性控制的寡核苷酸中。如本领域普通技术人员所了解，使用如上所述的循环，提供的方法不需要硫代磷酸二酯和磷酸二酯是连续的——在其之间可形成其他核苷酸间键联。在方案I-d中，替代硫代磷酸二酯键联而安置硫代磷酸二酯前体  在一些实施方案中，所述替代提供在某些步骤，例如氧化步骤期间的提高的合成效率。在一些实施方案中，使用硫代磷酸二酯前体通常会改进手性控制的寡核苷酸在合成和/或储存期间的稳定性。在循环退出之后，在脱保护/释放期间，硫代磷酸二酯前体转化成硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中，使用硫代磷酸二酯前体是有益的，甚至当磷酸二酯键联不存在于手性控制的寡核

苷酸中，或在合成期间不需要氧化步骤时。

[1060] 如方案I-c中，在一些实施方案中，非手性纯亚磷酰胺可用于包含氧化步骤的循环。在一些实施方案中，使用用DMTr保护的β-氰基乙基亚磷酰胺。在一些实施方案中，所用亚磷酰胺具有结构



[1061] 在一些实施方案中，本发明方法提供富含特定寡核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物。

[1062] 在一些实施方案中，至少约10％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约20％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约30％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约40％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约50％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约60％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约70％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约80％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约90％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约95％的提供的粗组合物具有特定寡核苷酸类型。

[1063] 在一些实施方案中，至少约1％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约2％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约3％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约4％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约5％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约10％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约20％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约30％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约40％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约50％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约60％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约70％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约80％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约90％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。在一些实施方案中，至少约95％的提供的组合物具有特定寡核苷酸类型。

[1064] 生物学应用和示例性用途

[1065] 本发明尤其认识到，寡核苷酸的特性和活性可以通过使用提供的手性控制的寡核苷酸组合物优化其骨架手性中心样式来调节。在一些实施方案中，本发明提供了手性控制的寡核苷酸组合物，其中所述寡核苷酸具有共同骨架手性中心样式，所述共同骨架手性中心样式增强其稳定性和/或生物活性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了出人意料的高的稳定性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式出人意料地提供了极大提高的活性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提供了提高的稳定性和活性两者。在一些实施方

案中，当寡核苷酸用于切割核酸聚合物时，寡核苷酸的骨架手性中心样式本身出人意料地改变了靶核酸聚合物的切割样式。在一些实施方案中，骨架手性中心样式有效阻止第二位点的切割。在一些实施方案中，骨架手性中心样式产生新切割位点。在一些实施方案中，骨架手性中心样式最小化了切割位点的数目。在一些实施方案中，骨架手性中心样式最小化了切割位点的数目，以使得靶核酸聚合物在靶核酸聚合物与寡核苷酸互补的序列内的仅一个位点切割。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了切割位点的切割效率。在一些实施方案中，寡核苷酸的骨架手性中心样式改善了靶核酸聚合物的切割。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了选择性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式最小化了脱靶效应。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了选择性，例如通过点突变或单核苷酸多态性(SNP)区别的靶序列之间的切割选择性。在一些实施方案中，骨架手性中心样式提高了选择性，例如通过仅一个点突变或单核苷酸多态性(SNP)区别的靶序列之间的切割选择性。

[1066] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于控制切割核酸聚合物的方法，所述方法包括提供手性控制的寡核苷酸组合物，所述组合物包含通过具有以下来定义的寡核苷酸：

[1067] 1)共同碱基序列和长度，其中所述共同碱基序列是或包含与存在于所述核酸聚合物中的序列互补的序列；

[1068] 2)共同骨架键联样式；

[1069] 3)共同骨架手性中心样式，所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物，其中所述组合物中至少约10％的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式；以及

[1070] 其中以不同于在提供手性未控制的寡核苷酸组合物时的切割样式的切割样式切割所述核酸聚合物。

[1071] 如本文中使用的，核酸聚合物的切割样式由切割位点的数目、切割位点的位置和每个位点处切割的百分比定义。在一些实施方案中，切割样式具有多个切割位点，并且每个位点处切割的百分比不同。在一些实施方案中，切割样式具有多个切割位点，并且每个位点处切割的百分比相同。在一些实施方案中，切割样式具有仅一个切割位点。在一些实施方案中，切割样式彼此的差异在于其具有不同数目的切割位点。在一些实施方案中，切割样式彼此的差异在于至少一个切割位置不同。在一些实施方案中，切割样式彼此的差异在于至少一个共同切割位点处切割的百分比不同。在一些实施方案中，切割样式彼此的差异在于其具有不同数目的切割位点，和/或至少一个切割位置不同，和/或至少一个共同切割位点处切割的百分比不同。

[1072] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于控制切割核酸聚合物的方法，所述方法包括以下步骤：

[1073] 使核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1074] 1)共同碱基序列和长度，其中所述共同碱基序列是或包含与存在于所述核酸聚合物中的靶序列互补的序列；

[1075] 2)共同骨架键联样式；和

[1076] 3)共同骨架手性中心样式；

[1077] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有该特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[1078] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于控制切割核酸聚合物的方法，所述方法包括以下步骤：

[1079] 使核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1080] 1)共同碱基序列和长度，其中所述共同碱基序列是或包含与存在于所述核酸聚合物中的靶序列互补的序列；

[1081] 2)共同骨架键联样式；和

[1082] 3)共同骨架手性中心样式；

[1083] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有该特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述接触在发生所述核酸聚合物的切割的条件下进行。

[1084] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于改变使用第一寡核苷酸组合物导致的核酸聚合物的第一切割样式的方法，其包括提供第二手性控制的寡核苷酸组合物，所述第二手性控制的寡核苷酸组合物包含通过具有以下来定义的寡核苷酸：

[1085] 1)共同碱基序列和长度，其中所述共同碱基序列是或包含与存在于所述核酸聚合物中的序列互补的序列；

[1086] 2)共同骨架键联样式；

[1087] 3)共同骨架手性中心样式，所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物，其中所述组合物中至少约10％的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式；以及

[1088] 其中以不同于所述第一切割样式的切割样式切割所述核酸聚合物。

[1089] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于改变当其核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与参照寡核苷酸组合物相接触时所观察到的切割样式的方法，所述参照寡核苷酸组合物包含具有特定碱基序列和长度的寡核苷酸，所述特定碱基序列是或包含与所述靶序列互补的序列，所述方法包括：

[1090] 使所述核酸聚合物与具有所述特定碱基序列和长度的寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述组合物是手性控制的，其中相对于具有所述特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1091] 1)所述特定碱基序列和长度；

[1092] 2)特定骨架键联样式；和

[1093] 3)特定骨架手性中心样式，

[1094] 所述接触在发生所述核酸聚合物的切割的条件下进行。

[1095] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物降低了靶序列中切割位点的数目。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶序列中提供了单位点切割。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物在靶序列中的切割位点提供了提高的切割速率。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物在靶序列中的切割位点提供

了提高的效率。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物在切割靶核酸聚合物中提供了提高的周转。

[1096] 在一些实施方案中，切割以与参照切割样式不同的切割样式发生。在一些实施方案中，参照切割样式是当在相当的条件下使核酸聚合物与参照寡核苷酸组合物相接触时所观察到的切割样式。在一些实施方案中，参照寡核苷酸组合物是共有手性控制的寡核苷酸组合物的共同碱基序列和长度的寡核苷酸的手性未控制(例如，立构无规)的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，参照寡核苷组合物是共有共同序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物。

[1097] 在一些实施方案中，核酸聚合物是RNA。在一些实施方案中，核酸聚合物是寡核苷酸。在一些实施方案中，核酸聚合物是RNA寡核苷酸。在一些实施方案中，核酸聚合物是转录物。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的寡核苷酸与待切割核酸聚合物形成双链体。

[1098] 在一些实施方案中，通过酶切割核酸聚合物。在一些实施方案中，酶切割由核酸聚合物形成的双链体。在一些实施方案中，酶是RNase H。在一些实施方案中，酶是Dicer。在一些实施方案中，酶是Argonaute蛋白。在一些实施方案中，酶是Ago2。在一些实施方案中，酶在蛋白质复合物中。示例性蛋白质复合物是RNA诱导的沉默复合物(RISC)。

[1099] 在一些实施方案中，提供的包含具有共同骨架手性中心样式之寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合提供了出人意料的高选择性，使得可以选择性靶向在靶区域内仅具有小序列变异的核酸聚合物。在一些实施方案中，核酸聚合物是来自等位基因的转录物。在一些实施方案中，可以通过提供的手性控制的寡核苷酸组合物选择性靶向来自不同等位基因的转录物。

[1100] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物及其方法使得能够精确控制靶序列内的切割位点。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列周围。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列上游附近。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列上游5个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列上游4个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列上游3个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列上游2个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列上游1个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列下游附近。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列下游5个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列下游4个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列下游3个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列下游2个碱基对以内。在一些实施方案中，切割位点在RpSpSp骨架手性中心序列下游1个碱基对以内。因此，本发明尤其提供了对靶序列内切割位点的控制。在一些实施方案中，示例性切割描述在图21中。在一些实施方案中，图21中描述的切割表示RpSpSp骨架手性中心序列下游2个碱基对位点处的切割。如本公开内容中广泛描述的，RpSpSp骨架手性中心序列可以存在以下单个或重复单元：(Np)m(Rp)n(Sp)t、(Np)t(Rp)n(Sp)m、(Sp)m(Rp)n(Sp)t、(Sp)t(Rp)n(Sp)m、(Rp)n(Sp)m、(Rp)m(Sp)n、(Sp)mRp和/或Rp(Sp)m，其各自独立地在上文和本文中描述。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中

RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对位点处产生新切割位点(例如,参见图21),其中如果使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物,所述新切割位点不存在(无法检出)。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对切割位点处的切割(例如,参见图21),其中该位点的切割以比当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时更高的百分比发生。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在该位点处的切割是参照寡核苷酸组合物的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500或1000倍(例如,当通过位点处的切割百分比测量时)。在一些实施方案中,与使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物相比,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对切割位点处提供了加速的切割(例如,参见图21)。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物的切割比参照寡核苷酸组合物快至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500或1000倍。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对处的切割位点(例如,参见图21)是当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时的切割位点。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对处的切割位点(例如,参见图21)在当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时的切割位点的1个碱基对以内。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对处的切割位点(例如,参见图21)在当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时的切割位点的2个碱基对以内。在一些实施方案中,其在3个碱基对以内。在一些实施方案中,其在4个碱基对以内。在一些实施方案中,其在5个碱基对以内。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对处的切割位点是当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时的主要切割位点中的一个。在一些实施方案中,该位点是当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时具有最高切割百分比的切割位点。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物在靶分子中RpSpSp骨架手性中心下游2个碱基对处的切割位点是当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时具有较高切割速率的切割位点中的一个。在一些实施方案中,该位点是当使用参照(例如,手性未控制的)寡核苷酸组合物时具有最高切割速率的切割位点。

[1101] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高一个或更多个位点处的切割,例如,相对于参照(例如,手性未控制/立构无规的)寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,相对于参照(例如,手性未控制/立构无规的)组合物,提供的手性控制的寡核苷酸组合物选择性提高单一位点处的切割。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物通过提供更高切割速率提高位点处的切割。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物通过在位点处提供更高切割百分比提高在所述位点处的切割。位点处的切割百分比可以通过本领域中周知和熟悉的多种方法确定。在一些实施方案中,通过分析切割产物确定位点处的切割百分比,例如,通过图18、图19和图30中示出的HPLC-MS;还参见示例性切割图,例如图9、图10、图11、图14、图22、图25和图26。在一些实施方案中,提高是相对于参照寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,提高是相对于另一切割位点。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了为参照寡核苷酸组合物的优选切割位点的位点处的切割。在一些实施方案中,优选切割位点或优选切割位点组是与一个或更多个其他切割位点相比具

有相对更高切割百分比的一个或更多个位点。在一些实施方案中，优选切割位点可以指示酶的偏好性。例如，对于RNase H，当使用DNA寡核苷酸时，得到的切割位点可能指示RNase H的偏好性。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了为酶的优选切割位点的位点处的切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了不是参照寡核苷酸组合物的优选切割位点的位点处的切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了不是参照寡核苷酸组合物的优选切割位点的位点处的切割，有效产生了当使用参照寡核苷酸组合物时不存在的新切割位点。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了距离靶向突变或SNP5个碱基对以内的位点处的切割，从而提高了不期望的靶寡核苷酸的选择性切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了距离靶向突变或SNP 4个碱基对以内的位点处的切割，从而提高了不期望的靶寡核苷酸的选择性切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了距离靶向突变或SNP 3个碱基对以内的位点处的切割，从而提高了不期望的靶寡核苷酸的选择性切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了距离靶向突变或SNP 2个碱基对以内的位点处的切割，从而提高了不期望的靶寡核苷酸的选择性切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高了靶向突变或SNP的紧邻上游或下游的位点处的切割，从而提高了不期望的靶寡核苷酸的选择性切割(例如图22，面板D，muRNA)。

[1102] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物抑制一个或更多个位点处的切割，例如，相对于参照(例如，手性未控制/立构无规的)寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，相对于参照(例如，手性未控制/立构无规的)组合物，提供的手性控制的寡核苷酸组合物选择性抑制单一位点处的切割。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物通过提供更低切割速率抑制位点处的切割。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物通过在位点处提供更低切割百分比抑制在所述位点处的切割。在一些实施方案中，抑制是相对于参照寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，抑制是相对于另一切割位点。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物抑制为参照寡核苷酸组合物的优选切割位点的位点处的切割。在一些实施方案中，优选切割位点或优选切割位点组是与一个或更多个其他切割位点相比具有相对更高切割百分比的一个或更多个位点。在一些实施方案中，优选切割位点可以指示酶的偏好性。例如，对于RNase H，当使用DNA寡核苷酸时，得到的切割位点可能指示RNase H的偏好性。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物抑制了为酶的优选切割位点的位点处的切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物抑制不是参照寡核苷酸组合物的优选切割位点的位点处的切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物抑制参照寡核苷酸组合物的所有切割位点。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物一般提高靶寡核苷酸的切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物一般抑制非寡核苷酸的切割。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提高靶寡核苷酸的切割并抑制非寡核苷酸的切割。使用图22面板D为例，切割的靶寡核苷酸是muRNA，而非靶寡核苷酸是wtRNA。在包含具有突变或SNP的患病组织的对象中，用于切割的靶寡核苷酸可以是具有突变或SNP的转录物，而非靶寡核苷酸可以是不具有突变或SNP的正常转录物，例如健康组织中表达的那些。

[1103] 在一些实施方案中，除了本文中所述的骨架手性中心样式以外，提供的寡核苷酸

任选地包含经修饰碱基、经修饰糖、经修饰骨架键联及其任意组合。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是单聚体、交替聚体、嵌段聚体、间隔聚体、半聚体和跳跃聚体。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸包含一个或更多个单聚体、交替聚体、嵌段聚体、间隔聚体、半聚体或跳跃聚体或者其任意组合。在一些实施方案中，除了本文的骨架手性中心样式以外，提供的寡核苷酸是半聚体。在一些实施方案中，除了本文中所述骨架手性中心样式以外，提供的寡核苷酸是具有经修饰糖部分的5'-半聚体。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸是具有2'-修饰糖部分的5'-半聚体。合适的修饰是本领域中周知的，例如，本申请中描述的那些。在一些实施方案中，修饰是2'-F。在一些实施方案中，修饰是2'-MOE。在一些实施方案中，修饰是s-cEt。

[1104] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1105] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1106] 1)共同碱基序列和长度；

[1107] 2)共同骨架键联样式；

[1108] 3)共同骨架手性中心样式；

[1109] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1110] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含靶等位基因和同一核酸序列的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。

[1111] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1112] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1113] 1)共同碱基序列和长度；

[1114] 2)共同骨架键联样式；

[1115] 3)共同骨架手性中心样式；

[1116] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1117] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含靶等

位基因和同一核酸序列的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平，

[1118] 所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之转录物的条件下进行。

[1119] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1120] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1121] 1)共同碱基序列和长度；

[1122] 2)共同骨架键联样式；

[1123] 3)共同骨架手性中心样式；

[1124] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1125] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含同一靶核酸序列之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物的以下抑制水平：

[1126] a)大于当所述组合物不存在时的抑制水平；

[1127] b)大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平；或

[1128] c)既大于当所述组合物不存在时的抑制水平，又大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。

[1129] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1130] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1131] 1)共同碱基序列和长度；

[1132] 2)共同骨架键联样式；

[1133] 3)共同骨架手性中心样式；

[1134] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1135] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含同一靶核酸序列之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物的以下抑制水平：

[1136] a)大于当所述组合物不存在时的抑制水平；

[1137] b)大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平；或

[1138] c)既大于当所述组合物不存在时的抑制水平，又大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平，

[1139] 所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之转录物的条件下进行。

[1140] 在一些实施方案中，通过转录物的切割抑制所述转录物。在一些实施方案中，特异性核苷酸特征序列元件在内含子中。在一些实施方案中，特异性核苷酸特征序列元件在外显子中。在一些实施方案中，特异性核苷酸特征序列元件部分在外显子中，部分在内含子中。在一些实施方案中，特异性核苷酸特征序列元件包含将一个等位基因与其他等位基因区别开的突变。在一些实施方案中，突变是缺失。在一些实施方案中，突变是插入。在一些实施方案中，突变是点突变。在一些实施方案中，特异性核苷酸特征序列元件包含将一个等位基因与其他等位基因区别开的至少一个单核苷酸多态性(SNP)。

[1141] 在一些实施方案中，靶核酸序列是靶基因。

[1142] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制序列包含至少一个单核苷酸多态性(SNP)的基因的方法，其包括提供手性控制的寡核苷酸组合物，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含通过具有以下来定义的寡核苷酸：

[1143] 1)共同碱基序列和长度，其中所述共同碱基序列是或包含与存在于来自第一等位基因之转录物中的序列完全互补但是不与存在于来自第二等位基因之转录物中的相应序列互补的序列，其中存在于所述转录物中的所述序列包含SNP位点；

[1144] 2)共同骨架键联样式；

[1145] 3)共同骨架手性中心样式，所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物，其中所述组合物中至少约10％的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式；以及

[1146] 其中来自所述第一等位基因的转录物的抑制比来自所述第二等位基因的转录物的抑制高至少5倍。

[1147] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1148] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1149] 1)共同碱基序列和长度；

[1150] 2)共同骨架键联样式；

[1151] 3)共同骨架手性中心样式；

[1152] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1153] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转

录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1154] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1155] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1156] 1)共同碱基序列和长度；

[1157] 2)共同骨架键联样式；

[1158] 3)共同骨架手性中心样式；

[1159] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1160] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍，

[1161] 所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之转录物的条件下进行。

[1162] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1163] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1164] 1)共同碱基序列和长度；

[1165] 2)共同骨架键联样式；

[1166] 3)共同骨架手性中心样式；

[1167] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1168] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍，

[1169] 所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之表达的条件下进行。

[1170] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1171] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1172] 1)共同碱基序列和长度；

[1173] 2)共同骨架键联样式；

[1174] 3)共同骨架手性中心样式；

[1175] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1176] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平：

[1177] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1178] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1179] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1180] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1181] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1182] 1)共同碱基序列和长度；

[1183] 2)共同骨架键联样式；

[1184] 3)共同骨架手性中心样式；

[1185] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1186] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平：

[1187] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1188] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1189] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍，

[1190] 所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之转录物的条件下进行。

[1191] 在一些实施方案中，本发明提供了一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一

靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1192] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1193] 1)共同碱基序列和长度；

[1194] 2)共同骨架键联样式；

[1195] 3)共同骨架手性中心样式；

[1196] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1197] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平：

[1198] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1199] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1200] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍，

[1201] 所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之表达的条件下进行。

[1202] 在一些实施方案中，特定等位基因之转录物的抑制水平大于当所述组合物不存在时。在一些实施方案中，相对于当所述组合物不存在时，特定等位基因之转录物的抑制水平为至少1.1倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低1.1倍。在一些实施方案中，水平为至少1.2倍。在一些实施方案中，水平为至少1.3倍。在一些实施方案中，水平为至少1.4倍。在一些实施方案中，水平为至少1.5倍。在一些实施方案中，水平为至少1.6倍。在一些实施方案中，水平为至少1.7倍。在一些实施方案中，水平为至少1.8倍。在一些实施方案中，水平为至少1.9倍。在一些实施方案中，水平为至少2倍。在一些实施方案中，水平为至少3倍。在一些实施方案中，水平为至少4倍。在一些实施方案中，水平为至少5倍。在一些实施方案中，水平为至少6倍。在一些实施方案中，水平为至少7倍。在一些实施方案中，水平为至少8倍。在一些实施方案中，水平为至少9倍。在一些实施方案中，水平为至少10倍。在一些实施方案中，水平为至少11倍。在一些实施方案中，水平为至少12倍。在一些实施方案中，水平为至少13倍。在一些实施方案中，水平为至少14倍。在一些实施方案中，水平为至少15倍。在一些实施方案中，水平为至少20倍。在一些实施方案中，水平为至少30倍。在一些实施方案中，水平为至少40倍。在一些实施方案中，水平为至少50倍。在一些实施方案中，水平为至少75倍。在一些实施方案中，水平为至少100倍。在一些实施方案中，水平为至少150倍。在一些实施方案中，水平为至少200倍。在一些实施方案中，水平为至少300倍。在一些实施方案中，水平为至少400倍。在一些实施方案中，水平为至少500倍。在一些实施方案中，水平为至少750倍。在一些实施方案中，水平为至少1000倍。在一些实施方案中，水平为至少5000倍。

[1203] 在一些实施方案中，特定等位基因之转录物的抑制水平大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。在一些实施方案中，特定定位基因之转录物的抑制水平为对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平的至少1.1倍。在一些实施方案中，水平为至少1.2倍。在一些实施方案中，水平为至少1.3倍。在一些实施方案中，水平为至少1.4倍。在一些实施方案中，水平为至少1.5倍。在一些实施方案中，水平为至少1.6倍。在一些实施方案中，水平为至少1.7倍。在一些实施方案中，水平为至少1.8倍。在一些实施方案中，水平为至少1.9倍。在一些实施方案中，水平为至少2倍。在一些实施方案中，水平为至少3倍。在一些实施方案中，水平为至少4倍。在一些实施方案中，水平为至少5倍。在一些实施方案中，水平为至少6倍。在一些实施方案中，水平为至少7倍。在一些实施方案中，水平为至少8倍。在一些实施方案中，水平为至少9倍。在一些实施方案中，水平为至少10倍。在一些实施方案中，水平为至少11倍。在一些实施方案中，水平为至少12倍。在一些实施方案中，水平为至少13倍。在一些实施方案中，水平为至少14倍。在一些实施方案中，水平为至少15倍。在一些实施方案中，水平为至少20倍。在一些实施方案中，水平为至少30倍。在一些实施方案中，水平为至少40倍。在一些实施方案中，水平为至少50倍。在一些实施方案中，水平为至少75倍。在一些实施方案中，水平为至少100倍。在一些实施方案中，水平为至少150倍。在一些实施方案中，水平为至少200倍。在一些实施方案中，水平为至少300倍。在一些实施方案中，水平为至少400倍。在一些实施方案中，水平为至少500倍。在一些实施方案中，水平为至少750倍。在一些实施方案中，水平为至少1000倍。在一些实施方案中，水平为至少5000倍。

[1204] 在一些实施方案中，特定等位基因之转录物的抑制水平大于当所述组合物不存在时，并且抑制水平大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。在一些实施方案中，特定等位基因之转录物的抑制水平相对于当所述组合物不存在时为至少1.1倍，并且为对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平的至少1.1倍。在一些实施方案中，各倍数独立地如上文所述。

[1205] 在一些实施方案中，体系是包含转录物的组合物。在一些实施方案中，体系是包含来自不同等位基因之转录物的组合物。在一些实施方案中，体系可以是体内或体外的，并且无论怎样可以包含一个或更多个细胞、组织、器官或生物体。在一些实施方案中，体系包含一个或更多个细胞。在一些实施方案中，体系包含一个或更多个组织胞。在一些实施方案中，体系包含一个或更多个器官。在一些实施方案中，体系包含一个或更多个生物体。在一些实施方案中，体系是对象。

[1206] 在一些实施方案中，转录物的抑制，或者转录转录物之等位基因的表达的抑制，可以在体外测定中测量。在一些实施方案中，在测定中使用来自转录物并且包含特异性核苷酸特征序列元件的序列，而不是使用全长转录物。在一些实施方案中，测定是生化测定。在一些实施方案中，测定是生化测定，其中在手性控制的寡核苷酸组合物的存在下测试酶对核酸聚合物如转录物或来自转录物并且包含特异性核苷酸特征序列元件的序列的切割。

[1207] 在一些实施方案中，向对象施用提供的手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，对象是动物。在一些实施方案中，对象是植物。在一些实施方案中，对象是人。

[1208] 在一些实施方案中，为了等位基因特异性抑制来自特定等位基因的转录物，在特异性核苷酸特征序列元件内的序列差异(例如，突变)附近的位点切割转录物，所述序列差

异使来自特定等位基因的转录物区别于来自其他等位基因的转录物。在一些实施方案中，在该序列差异附近的位点处选择性切割转录物。在一些实施方案中，当使用手性未控制的寡核苷酸组合物时，在该序列差异附近的位点以更高百分比切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异的位点处切割转录物。在一些实施方案中，仅在特异性核苷酸特征序列元件内的序列差异位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游或上游5个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游或上游4碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游或上游3个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中在序列差异下游或上游2个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游或上游1个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游5个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游4个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游3个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游2个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异下游1个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异上游5个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异上游4个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异上游3个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异上游2个碱基对以内的位点处切割转录物。在一些实施方案中，在序列差异上游1个碱基对以内的位点处切割转录物。在没有本申请在本公开内容中提供的手性控制的寡核苷酸组合物及其方法的情况下，对切割样式的这种精确控制和导致的对来自特定等位基因之转录物的高选择性抑制将是不可能的。

[1209] 在一些实施方案中，本发明提供了用于通过特异性抑制来自特定等位基因(例如，造成或可能造成疾病的等位基因)之转录物来治疗对象或预防对象中的疾病的方法。在一些实施方案中，本发明提供了用于治疗患有疾病的对象的方法，包括向对象施用包含手性控制的寡核苷酸组合物的药物组合物，其中来自造成疾病或有利于疾病的等位基因的转录物被选择性抑制。在一些实施方案中，本发明提供了用于治疗患有疾病的对象的方法，包括向对象施用包含手性控制的寡核苷酸组合物的药物组合物，其中来自造成疾病的等位基因的转录物被选择性抑制。在一些实施方案中，本发明提供了用于治疗患有疾病的对象的方法，包括向对象施用包含手性控制的寡核苷酸组合物的药物组合物，其中来自有利于疾病的等位基因的转录物被选择性抑制。在一些实施方案中，本发明提供了用于治疗患有疾病的对象的方法，包括向对象施用包含手性控制的寡核苷酸组合物的药物组合物，其中来自与疾病有关的等位基因的转录物被选择性抑制。在一些实施方案中，本发明提供了用于预防对象中的疾病的方法，其通过特异性抑制来自可能造成疾病的特定等位基因的转录物来实现。在一些实施方案中，本发明提供了用于预防对象中的疾病的方法，其通过特异性抑制来自提高对象中疾病风险的特定等位基因的转录物来实现。在一些实施方案中，提供的方法包括向对象施用包含手性控制的寡核苷酸组合物的药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物还包含药用载体。

[1210] 涉及导致疾病之等位基因的疾病是本领域中公知的，包括但不限于以下中描述的那些：Hohjoh，Pharmaceuticals 2013，6，522-535；美国专利申请US 2013/0197061；Østergaard等，Nucleic Acids Research 2013，41(21)，9634-9650；和Jiang等，

Science 2013,342,111-114。在一些实施方案中,疾病是亨廷顿病(Huntington's disease)。在一些实施方案中,疾病是人肥厚性心肌病(human hypertrophic cardiomyopathy,HCM)。在一些实施方案中,疾病是扩张性心肌病。在一些实施方案中,导致疾病之等位基因是肌球蛋重链(MHC)的等位基因。在一些实施方案中,示例性疾病选自:

[1211]

疾病	靶基因	靶变异
家族式阿尔兹海默病	淀粉样前体蛋白(APP)	K670N-M671L(瑞典突变体)
	淀粉样前体蛋白(APP)	K670N-M671L(瑞典突变体)
	淀粉样前体蛋白(APP)	V717F(伦敦突变体)
	淀粉样前体蛋白(APP)	V717I(伦敦突变体)
	早老蛋白 1(PSEN1)	L392V

[1212]

肌萎缩性侧索硬(ALS)	超氧化物歧化酶(SOD1)	G93A
	超氧化物歧化酶(SOD1)	G85R
慢通道先天性肌无力综合征(SCCMS)	乙酰胆碱受体(AChR)	aS226F

[1213]

疾病	靶基因	靶变异
与染色体 17 相关联的伴有帕金森病的额颞叶性痴呆(FTDP-17)	微管相关蛋白 TAU(MAPT)	V337M
埃-当综合征(vEDS)	前胶原 III 型(COL3A1)	G252V
镰状细胞贫血	血红蛋白-β 基因座(HBB)	E6V
家族性淀粉样多神经病(FAP)	甲状腺素运载蛋(TTR)	V30M
进行性骨化性纤维发育不良(FOP)	活化素 A 受体 I 型(ACVR1)	R206H,G356D
	活化素 A 受体 I 型(ACVR1)	R206H
肿瘤	磷脂酰肌醇-3-激酶,催化亚基,α 多肽(PIOK3CA)	1633G –>A 3140A–> G
脊髓小脑性共济失调 1 型	Ataxin-1(ATXN1)	扩大的 CAG 重复的翼区

[1214]

疾病	靶基因	靶变异
马-约病/脊髓小脑性共济失调3型（MJD/SCA3）	ATAXIN3/MJD1	与扩大的CAG重复相关联的SNP
脊髓小脑性共济失调 7 型（SCA7）	Ataxin-7（ATXN7）	与扩大的CAG重复相关联的SNP
帕金森病	富含亮氨酸的重复激酶 2（LRRK2）	R1441G，R1441C
	富含亮氨酸的重复激酶 2（LRRK2）	G20195S

[1215]

	α-突触核蛋白	A30P
亨廷顿病	亨廷顿（HTT）	与扩大的CAG重复相关联的SNP
肥厚性心肌病	MYH7	R403Q

[1216] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物和方法的示例性靶标以及可以利用所述组合物和方法治疗的疾病包括：

[1217]

疾病	靶基因	靶变异
家族式阿尔兹海默病	淀粉样前体蛋白（APP）	K670N-M671L（瑞典突变体）
	淀粉样前体蛋白（APP）	K670N-M671L（瑞典突变体）
	淀粉样前体蛋白（APP）	V717F（伦敦突变体）
	淀粉样前体蛋白（APP）	V717I（伦敦突变体）
	早老蛋白 1（PSEN1）	L392V
肌萎缩性侧索硬（ALS）	超氧化物歧化酶（SOD1）	G93A
	超氧化物歧化酶（SOD1）	G85R
慢通道先天性肌无力综合征（SCCMS）	乙酰胆碱受体（AChR）	aS226F, aT254I, aS269I
与染色体 17 相关联的伴有帕金森病的额颞叶性痴呆（FTDP-17）	微管相关蛋白 TAU（MAPT）	V337M
埃-当综合征（vEDS）	前胶原 III 型（COL3A1）	G252V
镰状细胞贫血	血红蛋白-β 基因座（HBB）	E6V

[1218]

疾病	靶基因	靶变异
家族性淀粉样多神经病（FAP）	甲状腺素运载蛋（TTR）	V30M
进行性骨化性纤维发育不良（FOP）	活化素A受体I型（ACVR1）	R206H, G356D
	活化素A受体I型（ACVR1）	R206H
肿瘤	KRAS	G12V, G12D, G13D
肿瘤	磷脂酰肌醇-3-激酶,催化亚基，α多肽（PIOK3CA）（PIK3CA）	G1633A, A3140G
脊髓小脑性共济失调1型	Ataxin-1（ATXN1）	与扩大的CAG相重复关联的SNP
脊髓小脑性共济失调7型（SCA7）	Ataxin-7（ATXN7）	与扩大的CAG相重复关联的SNP
脊髓小脑性共济失调3型/马-约病（MJD/SCA3）	Ataxin-3（ATXN3）	与扩大的CAG相重复关联的SNP
帕金森病	富含亮氨酸的重复激酶2（LRRK2）	R1441G, R1441C
	富含亮氨酸的重复激酶2（LRRK2）	G20195S
	α-突触核蛋白（SNCA）	A30P, A53T, E46K
亨廷顿病	亨廷顿（HTT）	与扩大的CAG相重复关联的SNP

[1219]

疾病	靶基因	靶变异
亨廷顿病样 2	JPH3	与扩大的CTG相重复关联的SNP
弗里德赖希氏共济失调	FXN	与扩大的GAA相重复关联的SNP
脆性 X 智力迟滞综合征/脆性 X 震颤共济失调综合征	FMR1	与扩大的CGG相重复关联的SNP
强直性营养不良（DM1）	DMPK	与扩大的CTG相重复关联的SNP
强直性营养不良（DM2）	ZNF9	与扩大的CTG相重复关联的SNP
脊髓-延髓肌萎缩	AR	与扩大的CAG相重复关联的SNP
肥厚性心肌病	MHY7	R403Q

[1220] 在一些实施方案中，靶亨廷顿位点(Huntingtin site)选自:rs9993542_C、rs362310_C、rs362303_C、rs10488840_G、rs363125_C、rs363072_A、rs7694687_C、rs363064_C、rs363099_C、rs363088_A、rs34315806_C、rs2298967_T、rs362272_G、rs362275_C、rs362306_G、rs3775061_A、rs1006798_A、rs16843804_C、rs3121419_C、rs362271_G、rs362273_A、rs7659144_C、rs3129322_T、rs3121417_G、rs3095074_G、rs362296_C、rs108850_C、rs2024115_A、rs916171_C、rs7685686_A、rs6844859_T、rs4690073_G、rs2285086_A、rs362331_T、rs363092_C、rs3856973_G、rs4690072_T、rs7691627_G、rs2298969_A、rs2857936_C、rs6446723_T、rs762855_A、rs1263309_T、rs2798296_G、rs363096_T、rs10015979_G、rs11731237_T、rs363080_C、rs2798235_G和rs362307_T。在一些实施方案中，靶亨廷顿位点选自:rs34315806_C、rs362273_A、rs362331_T、rs363099_C、rs7685686_A、rs362306_G、rs363064_C、rs363075_G、rs2276881_G、rs362271_G、rs362303_C、rs362322_A、rs363088_A、rs6844859_T、rs3025838_C、rs363081_G、rs3025849_A、rs3121419_C、rs2298967_T、rs2298969_A、rs16843804_C、rs4690072_T、rs362310_C、rs3856973_G和rs2285086_A。在一些实施方案中，靶亨廷顿位点选自:rs362331_T、rs7685686_A、rs6844859_T、rs2298969_A、rs4690072_T、rs2024115_A、rs3856973_G、rs2285086_A、rs363092_C、rs7691627_G、rs10015979_G、rs916171_C、rs6446723_T、rs11731237_T、rs362272_G、rs4690073_G和rs363096_T。在一些实施方案中，

靶亨廷顿位点选自:rS362267、rs6844859、rs1065746、rs7685686、rs362331、rs362336、rs2024115、rs362275、rs362273、rs362272、rs3025805、rs3025806、rs35892913、rs363125、rs17781557、rs4690072、rs4690074、rs1557210、rs363088、rs362268、rs362308、rs362307、rs362306、rs362305、rs362304、rs362303、rs362302、rs363075和rs2298969。在一些实施方案中,靶亨廷顿位点选自:

[1221]

亨廷顿mRNA中24个SNP位点的杂合性频率			
mRNA中的位置(位置,nt)	参考号	百分比杂合性	
		对照	HD患者
ORF,外显子20 (2822)	rs363075	G/A, 10.3% (G/G, 89.7%)	G/A, 12.8% (G/G, 86.2%; A/A, 0.9%)
ORF,外显子25 (3335)	rs35892913	G/A, 10.3% (G/G, 89.7%)	G/A, 13.0% (G/G, 86.1%; A/A, 0.9%)
ORF,外显子25 (3389)	rs1065746	G/C, 0% (G/G, 100%)	G/C, 0.9% (G/G, 99.1%)
ORF,外显子25 (3418)	rs17781557	T/G, 12.9% (T/T, 87.1%)	T/G, 1.9% (T/T, 98.1%)
ORF,外显子29 (3946)	rs4690074	C/T, 37.9% (C/C, 50.9%; T/T, 11.2)	C/T, 35.8% (C/C, 59.6%; T/T, 4.6%)
ORF,外显子39 (5304)	rs363125	C/A, 17.5% (C/C, 79.0%; A/A, 3.5%)	C/A, 11.0% (C/C, 87.2%; A/A, 1.8%)
ORF,外显子44 (6150)	外显子44	G/A, 0% (G/G, 100%)	G/A, 2.8% (G/G, 97.2%)
ORF,外显子48 (6736)	rs362336	G/A, 38.7% (G/G, 49.6%; A/A, 11.7%)	G/A, 37.4% (G/G, 57.9%; A/A, 4.7%)
ORF,外显子50 (7070)	rs362331	T/C, 45.7% (T/T, 31.0%; C/C, 23.3%)	T/C, 39.4% (T/T, 49.5%; C/C, 11.0%)
ORF,外显子57 (7942)	rs362273	A/G, 40.3% (A/A, 48.2%; G/G, 11.4%)	A/G, 35.2% (A/A, 60.2%; G/G, 4.6%)
ORF,外显子61 (8501)	rs362272	G/A, 37.1% (G/G, 51.7%; A/A, 11.2%)	G/A, 36.1% (G/G, 59.3%; A/A, 4.6%)
ORF,外显子65 (9053)	rs3025806	A/T, 0% (C/C, 100%)	A/T, 0% (C/C, 100%)
ORF,外显子65 (9175)	外显子65	G/A, 2.3% (G/G, 97.7%)	G/A, 0% (G/G, 100%)
ORF,外显子67 (9523)	rs362308	T/C, 0% (T/T, 100%)	T/C, 0% (T/T, 100%)
3′UTR,外显子67 (9633)	rs362307	C/T, 13.0% (C/C, 87.0%)	C/T, 48.6% (C/C, 49.5%; T/T, 1.9%)
3′UTR,外显子67 (9888)	rs362306	G/A, 36.0% (G/G, 52.6%; A/A, 11.4%)	G/A, 35.8% (G/G, 59.6%; A/A, 4.6%)
3′UTR,外显子67 (9936)	rs362268	C/G, 36.8% (C/C, 50.0%; G/G 13.2%)	C/G, 35.8% (C/C, 59.6%; G/G, 4.6%)
3′UTR,外显子67 (9948)	rs362305	C/G, 20.2% (C/C, 78.1%; G/G 1.8%)	C/G, 11.9% (C/C, 85.3%; G/G, 2.8%)
3′UTR,外显子67	rs362304	C/A, 22.8% (C/C, 73.7%;	C/A, 11.9% (C/C, 85.3%;

[1222]

(10060)		A/A, 3.5%)	AA, 2.8%)
3′UTR,外显子67 (10095)	rs362303	C/T, 18.4% (C/C, 79.8%; T/T, 1.8%)	C/A, 11.9% (C/C, 85.3%; T/T, 2.8%)
3′UTR,外显子67 (10704)	rs1557210	C/T, 0% (C/C, 100%)	C/T, 0% (C/C, 100%)
3′UTR,外显子67 (10708)	rs362302	C/T, 4.3% (C/C, 95.7%)	C/T, 0% (C/C, 100%)
3′UTR,外显子67 (10796)	rs3025805	G/T, 0% (G/G, 100%)	G/T, 0% (G/G, 100%)
3′UTR,外显子67 (11006)	rs362267	C/T, 36.2% (C/C, 52.6%; T/T, 11.2%)	C/T, 35.5% (C/C, 59.8%; T/T, 4.7%)

[1223] 在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物靶向两个或更多个位点。

[1224] 在一些实施方案中,靶向的两个或更多个位点选自本文列出的位点。

[1225] 本领域一般技术人员了解,提供的方法适用于任何含错配的类似靶标。在一些实施方案中,错配在母源基因和父源基因之间。用于抑制和/或敲减,包括等位基因而一些抑制和/或敲减的另外的示例性靶标可以是与任何疾病有关的任何遗传异常,例如突变。在一些实施方案中,靶标或靶标组选自疾病的遗传定子,例如在Xiong等,The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease.Science第347卷,第6218期DOI:10.1126/science.1254806中公开的。在一些实施方案中,错配在突变体和野生型之间。

[1226] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物和方法用于选择性抑制疾病中具有突变的寡核苷酸。一些实施方案中,疾病是癌症。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物和方法用于选择性抑制癌症中具有突变的转录物。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物和方法用于抑制KRAS的转录物。示例性靶KRAS位点包括G12V=GGU->GUU位置227G->U,G12D=GGU->GAU位置227G->A和G13D=GGC->GAC位置230G->A。

[1227] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物和方法提供了对生物体中转录物的等位基因特异性抑制。在一些实施方案中,生物体包含存在两个或更多个等位基因的靶基因。例如,对象在其正常组织中具有野生型基因,而在疾病组织如在肿瘤中同一基因是突变的。在一些实施方案中,本发明提供了选择性抑制一个等位基因(例如,具有突变或SNP的一个等位基因)的手性控制的寡核苷酸组合物和方法。在一些实施方案中,本发明提供了具有更高效力和/或低毒性和/或本申请所述的其他益处的治疗。

[1228] 在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含一种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含仅一种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物具有仅一种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含两种或更多种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,使用这样的组合物,提供的方法可以靶向超过一个靶标。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物包含靶向两个或更多个靶标的两种或更多种寡核苷酸类型。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物包含靶向两个或更多个错配的两种或更多种寡核苷酸类型。在一些实施方案中,单一寡核苷酸类型靶向两个或更多个靶标,例如突变。在一些实施方案中,一种寡核苷酸类型的寡核苷酸的靶区域包含两个或更多个“靶位点”,例如两个突变或SNP。

[1229] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸任选地包含经修饰碱基或糖。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何经修饰碱基或糖。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何经修饰碱基。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸包含经修饰碱基和糖。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸包含经修饰碱基。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸包含经修饰糖。寡核苷酸的经修饰碱基和糖是本领域中公知的，包括但不限于本公开内容中所述的那些。在一些实施方案中，经修饰碱基是5-mC。在一些实施方案中，经修饰糖是2′-修饰的糖。寡核苷酸糖的合适的2'-修饰是本领域一般技术人员公知的。在一些实施方案中，2'-修饰包括但不限于2'-OR^1，其中R^1不是氢。在一些实施方案中，2'-修饰是2'-OR^1，其中R^1是任选地经取代的C_{1-6}脂族。在一些实施方案中，2'-修饰是2'-MOE。在一些实施方案中，修饰是2'-卤素。在一些实施方案中，修饰是2'-F。在一些实施方案中，经修饰碱基或糖可以进一步提高手性控制的寡核苷酸组合物地活性、稳定和/或选择性，所述组合物的共同骨架手性中心样式提供了出人意料的活性、稳定性和/或选择性。

[1230] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何经修饰糖。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何2′-修饰的糖。在一些实施方案中，本发明出人意料地发现通过使用手性控制的寡核苷酸组合物，经修饰糖不是稳定性、活性和/或控制切割样式必要的。另外，在一些实施方案中，本发明出人意料地发现，不具有经修饰糖的寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物在稳定性、活性、周转和/或控制切割样式方面具有更好的特性。例如，在一些实施方案中，出人意料地发现，与具有经修饰糖的寡核苷酸的组合物相比，不具有经修饰糖的寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物从切割产物中解离得更快，并且提供了显著提高的周转。

[1231] 在一些实施方案中，可用于提供的方法的提供的手性控制的寡核苷酸组合物的寡核苷酸具有本公开内容中广泛描述的结构。在一些实施方案中，寡核苷酸具有所述的翼区-核心-翼区结构。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Sp)mRp。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含$(Sp)_2Rp$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Sp)m(Rp)n。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述Rp(Sp)m。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含$Rp(Sp)_2$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Sp)m(Rp)n(Sp)t。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Sp)mRp(Sp)t。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Sp)t(Rp)n(Sp)m。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含所述(Sp)tRp(Sp)m。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含SpRpSpSp。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含$(Sp)_2Rp(Sp)_2$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含$(Sp)_3Rp(Sp)_3$。在一些实

施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含(Sp)$_4$Rp(Sp)$_4$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含(Sp)tRp(Sp)$_5$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含SpRp(Sp)$_5$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含(Sp)$_2$Rp(Sp)$_5$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含(Sp)$_3$Rp(Sp)$_5$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含(Sp)$_4$Rp(Sp)$_5$。在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含(Sp)$_5$Rp(Sp)$_5$。在一些实施方案中，共同骨架手性中心样式具有仅一个Rp，并且每个其他核苷酸间键联是Sp。在一些实施方案中，如本公开内容所述，共同碱基长度大于10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、35、40、45或50。在一些实施方案中，共同碱基长度大于10。在一些实施方案中，共同碱基长度大于11。在一些实施方案中，共同碱基长度大于12。在一些实施方案中，共同碱基长度大于13。在一些实施方案中，共同碱基长度大于14。在一些实施方案中，共同碱基长度大于15。在一些实施方案中，共同碱基长度大于16。在一些实施方案中，共同碱基长度大于17。在一些实施方案中，共同碱基长度大于18。在一些实施方案中，共同碱基长度大于19。在一些实施方案中，共同碱基长度大于20。在一些实施方案中，共同碱基长度大于21。在一些实施方案中，共同碱基长度大于22。在一些实施方案中，共同碱基长度大于23。在一些实施方案中，共同碱基长度大于24。在一些实施方案中，共同碱基长度大于25。在一些实施方案中，共同碱基长度大于26。在一些实施方案中，共同碱基长度大于27。在一些实施方案中，共同碱基长度大于28。在一些实施方案中，共同碱基长度大于29。在一些实施方案中，共同碱基长度大于30。在一些实施方案中，共同碱基长度大于31。在一些实施方案中，共同碱基长度大于32。在一些实施方案中，共同碱基长度大于33。在一些实施方案中，共同碱基长度大于34。在一些实施方案中，共同碱基长度大于35。

[1232] 在一些实施方案中，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提供了更高周转。在一些实施方案中，与从参照寡核苷酸组合物(例如手性未控制的寡核苷酸组合物)的寡核苷酸解离相比，来自核酸聚合物的切割产物以更快的速率从提供的手性控制的寡核苷酸组合物的寡核苷酸解离。在一些实施方案中，与手性未控制的寡核苷酸组合物相比，提供的手性控制的寡核苷酸组合物可以以更低单位剂量和/或总剂量和/或更少剂量施用。

[1233] 在一些实施方案中，当与参照寡核苷酸组合物相比时，手性控制的寡核苷酸组合物在与其共同碱基序列互补的核酸聚合物的序列中或者在其共同碱基序列中的序列中提供了更少切割位点。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物在与其共同碱基序列互补的核酸聚合物的序列中提供了更少切割位点。在一些实施方案中，核酸聚合物在与手性控制的寡核苷酸组合物的共同碱基序列互补的序列中或者在手性控制的寡核苷酸组合物的共同碱基序列中的单一位点选择性切割。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物在与手性控制的寡核苷酸组合物的共同碱基序列互补的序列中或者在手性控制的寡核苷酸组合物的共同碱基序列中的切割位点提供了更高切割百分比。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物在与手性控制的寡核苷酸组合物的共同碱基序列互补的序列中的切割位点提供开了更高切割百分比。在一些实施方案中，具有更高切割百分比的位点是当使用参照寡核苷酸组合物时的切割位点。在一些实施方案中，具有更高切割百分比的

位点是当使用参照寡核苷酸时不存在的切割位点。

[1234] 出人意料地发现，随着互补序列中切割位点数目的降低，切割速率可以出人意料地提高和/或可以取得更高切割百分比。如在本公开内容中证明的，提供的在靶核酸聚合物的互补序列中产生较少切割位点的手性控制的寡核苷酸组合物(尤其是提供单一位点切割那些)提供了更高的切割速率和更低水平的剩余的未切割核酸聚合物。该结果与追求更多切割位点以提高切割速率的本领域中的一般教导形成鲜明对比。

[1235] 在一些实施方案中，与参照寡核苷酸组合物相比，手性控制的寡核苷酸组合物使切割速率提高1.5倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少2倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少3倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少4倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少5倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少6倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少7倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少8倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少9倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少10倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少11倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少12倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少13倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少14倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少15倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少20倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少30倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少40倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少50倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少60倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少70倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少80倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少90倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少100倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少200倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少300倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少400倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少500倍。在一些实施方案中，切割速率提高至少大于500倍。

[1236] 在一些实施方案中，与参照寡核苷酸组合物相比，手性控制的寡核苷酸组合物提供了更低水平的剩余的未切割核酸聚合物。在一些实施方案中，低1.5倍。在一些实施方案中，低至少2倍。在一些实施方案中，低至少3倍。在一些实施方案中，低至少4倍。在一些实施方案中，低至少5倍。在一些实施方案中，低至少6倍。在一些实施方案中，低至少7倍。在一些实施方案中，低至少8倍。在一些实施方案中，低至少9倍。在一些实施方案中，低至少10倍。在一些实施方案中，低至少11倍。在一些实施方案中，低至少12倍。在一些实施方案中，低至少13倍。在一些实施方案中，低至少14倍。在一些实施方案中，低至少15倍。在一些实施方案中，低至少20倍。在一些实施方案中，低至少30倍。在一些实施方案中，低至少40倍。在一些实施方案中，低至少50倍。在一些实施方案中，低至少60倍。在一些实施方案中，低至少70倍。在一些实施方案中，低至少80倍。在一些实施方案中，低至少90倍。在一些实施方案中，低至少100倍。在一些实施方案中，低至少200倍。在一些实施方案中，低至少300倍。在一些实施方案中，低至少400倍。在一些实施方案中，低至少500倍。在一些实施方案中，低至少1000倍。

[1237] 如本文详细讨论的，本发明尤其提供了手性控制的寡核苷酸组合物，这是指所述组合物含有至少一种类型的多个寡核苷酸。特定“类型”的各寡核苷酸分子包含预先选择的(例如预定的)关于以下的结构元件：(1)碱基序列；(2)骨架键联样式；(3)骨架手性中心样式；和(4)骨架P修饰部分样式。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸组合物含有在单一合成

过程中制备的寡核苷酸。在一些实施方案中，提供的组合物含有在单一寡核苷酸分子内具有超过一种手性构型的寡核苷酸(例如其中沿寡核苷酸的不同残基具有不同立体化学)；在一些所述实施方案中，所述寡核苷酸可在单一合成过程中获得，而无需次级缀合步骤来产生具有超过一种手性构型的个体寡核苷酸分子。

[1238] 如本文提供的寡核苷酸组合物可用作用于调节许多细胞过程和机构，包括但不限于转录、翻译、免疫应答、表观遗传等的试剂。此外，如本文提供的寡核苷酸组合物可出于研究和/或诊断目的用作试剂。本领域普通技术人员将易于认识到本文中的本发明公开内容不限于特定用途，而是可适用于其中期望使用合成寡核苷酸的任何情况。提供的组合物尤其可用于多种治疗、诊断、农业和/或研究应用中。

[1239] 在一些实施方案中，提供的寡核苷酸组合物包含一种或更多种如本文详述的结构修饰的寡核苷酸和/或其残基。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸组合物包含含有一种或更多种核酸类似物的寡核苷酸。在一些实施方案中，提供的寡核苷酸组合物包含含有一种或更多种包括但不限于以下的人工核酸或残基的寡核苷酸：肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)、吗啉代寡核苷酸和锁定核酸(locked nucleic acid,LNA)、糖基核酸(glycon nucleic acid,GNA)、苏糖核酸(threose nucleic acid,TNA)、异核酸(Xeno nucleic acid,ZNA)及其任何组合。

[1240] 在任何实施方案中，本发明可用于基于寡核苷酸来调节基因表达、免疫应答等。因此，本发明的含有预定类型的寡核苷酸(即其是手性控制的，并且任选地是手性纯的)的立体确定的寡核苷酸组合物可替代常规立构无规或手性不纯对应物加以使用。在一些实施方案中，提供的组合物显示增强的预定作用和/或降低的不期望的副作用。以下明确讨论本发明的生物和临床/治疗应用的某些实施方案。

[1241] 多种给药方案可用于施用提供的手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，施用多个相隔各种时期的单位剂量。在一些实施方案中，给定组合物具有推荐的给药方案，其可涉及一个或更多个剂量。在一些实施方案中，给药方案包括多个剂量，其各自彼此相隔时长相同的时期；在一些实施方案中，给药方案包括多个剂量，并且各剂量相隔至少两种不同时期。在一些实施方案中，给药方案内的所有剂量都具有相同单位给药量。在一些实施方案中，给药方案内的不同剂量具有不同量。在一些实施方案中，给药方案包括以第一给药量施用的第一剂量，继之以一个或更多个以不同于所述第一给药量的第二给药量施用的其他剂量。在一些实施方案中，给药方案包括以第一给药量施用的第一剂量，继之以一个或更多个以与所述第一给药(或另一先前给药)量相同或不同的第二(或随后)给药量施用的其他剂量。在一些实施方案中，给药方案包括施用至少一个单位剂量至少一天。在一些实施方案中，给药方案包括经过至少一天，并且有时超过一天的时期施用超过一个剂量。在一些实施方案中，给药方案包括经过至少一周的时期施用多个剂量。在一些实施方案中，时期是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、2324、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40周或更久(例如约45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100周或更久)。在一些实施方案中，给药方案包括每周施用一个剂量，持续超过一周。在一些实施方案中，给药方案包括每周施用一个剂量，持续2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、2324、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40周或更久(例如约45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100周或更久)。在一些实

施方案中，给药方案包括每两周施用一个剂量，持续超过两周时期。在一些实施方案中，给药方案包括每两周施用一个剂量，经过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、2324、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40周或更久(例如约45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100周或更久)的时期。在一些实施方案中，给药方案包括每个月施用一个剂量，持续一个月。在一些实施方案中，给药方案包括每个月施用一个剂量，持续超过一个月。在一些实施方案中，给药方案包括每个月施用一个剂量，持续2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更久。在一些实施方案中，给药方案包括每周施用一个剂量，持续约10周。在一些实施方案中，给药方案包括每周施用一个剂量，持续约20周。在一些实施方案中，给药方案包括每周施用一个剂量，持续约30周。在一些实施方案中，给药方案包括每周施用一个剂量，持续26周。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是根据不同于用于具有相同序列的手性未控制的(例如立构无规的)寡核苷酸组合物和/或具有相同序列的不同手性控制的寡核苷酸组合物的给药方案的给药方案施用。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是根据相较于具有相同序列的手性未控制的(例如立构无规的)寡核苷酸组合物的给药方案减量的给药方案施用，其中其经过给定时间单位达到较低总暴露水平，涉及一个或更多个较低单位剂量，和/或经过给定时间单位包括较小数目的剂量。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是根据延续的时期长于具有相同序列的手性未控制的(例如立构无规的)寡核苷酸组合物的给药方案所延续的时期的给药方案施用。不希望受到理论的限制，申请人注意到在一些实施方案中，较短给药方案和/或各剂量之间的较长时期可归因于手性控制的寡核苷酸组合物的稳定性、生物利用度和/或功效改进。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物相较于相应手性未控制的寡核苷酸组合物具有较长给药方案。在一些实施方案中，相较于相应手性未控制的寡核苷酸组合物，手性控制的寡核苷酸组合物在至少两个剂量之间的时期较短。不希望受到理论的限制，申请人注意到在一些实施方案中，较长给药方案和/或各剂量之间的较短时期可归因于手性控制的寡核苷酸组合物的安全性改进。

[1242] 单次剂量可含有如由应用所需的合适的各种量的某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约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、300mg或300mg以上(例如约350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg或1000mg以上)某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约1mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约5mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约10mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约15mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约20mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约50mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约100mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约150mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约200mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约250mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，单次剂量含有约300mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是以单次剂量和/或以总剂量在低于手性未控制的寡核苷酸的量下施

用。在一些实施方案中，由于功效改进，手性控制的寡核苷酸是以单次剂量和/或以总剂量在低于手性未控制的寡核苷酸的量下施用。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸是以单次剂量和/或以总剂量在高于手性未控制的寡核苷酸的量下施用。在一些实施方案中，归因于安全性改进，手性控制的寡核苷酸是以单次剂量和/或以总剂量在高于手性未控制的寡核苷酸的量下施用。

[1243] 生物活性寡核苷酸

[1244] 本文中使用的提供的寡核苷酸组合物可包含单链和/或多链寡核苷酸。在一些实施方案中，单链寡核苷酸含有可在相关条件下杂交以使如所用，甚至单链寡核苷酸也可具有至少部分双链特征的自身互补部分。在一些实施方案中，提供的组合物中包括的寡核苷酸是单链、双链或三链。在一些实施方案中，提供的组合物中包括的寡核苷酸在寡核苷酸内包含单链部分和多链部分。在一些实施方案中，如上所指示，各单链寡核苷酸可具有双链区域和单链区域。

[1245] 在一些实施方案中，提供的组合物包含一种或更多种完全或部分互补于以下的链的寡核苷酸：结构基因、基因控制和/或终止区域、和/或自我复制系统，例如病毒或质粒DNA。在一些实施方案中，提供的组合物包括一种或更多种是或充当以下的寡核苷酸：siRNA或其他RNA干扰试剂(RNAi剂或iRNA剂)、shRNA、反义寡核苷酸、自我切割RNA、核酶、其片段和/或其变体(如肽基转移酶23S rRNA、RNA酶P、I组和II组内含子、GIR1分支核酶、先导酶、发夹核酶、锤头核酶、HDV核酶、哺乳动物CPEB3核酶、VS核酶、glmS核酶、CoTC核酶等)、微小RNA、微小RNA模拟物、超级微小RNA、适体、反义微小RNA、微小RNA拮抗剂、U1衔接头、成三链体寡核苷酸、RNA活化剂、长非编码RNA、短非编码RNA(例如piRNA)、免疫调节性寡核苷酸(如免疫刺激性寡核苷酸、免疫抑制性寡核苷酸)、GNA、LNA、ENA、PNA、TNA、吗啉代寡核苷酸、G四链体(RNA和DNA)、抗病毒寡核苷酸和诱饵寡核苷酸。

[1246] 在一些实施方案中，提供的组合物包含一种或更多种杂交(例如嵌合)寡核苷酸。在本公开的背景下，术语“杂交物”广泛指代寡核苷酸的混合结构组分。杂交寡核苷酸可指例如(1)在单一分子内具有混合类别的核苷酸例如部分DNA和部分RNA的寡核苷酸分子(例如DNA-RNA)；(2)不同类别的核酸的互补对，以使DNA:RNA碱基配对发生在分子内或分子间；或两者；(3)具有两个或更多个种类的骨架或核苷酸间键联的寡核苷酸。

[1247] 在一些实施方案中，提供的组合物包含一种或更多种在单一分子内包含多于一种类别的核酸残基的寡核苷酸。例如，在本文中所述的任何实施方案中，寡核苷酸可包含DNA部分和RNA部分。在一些实施方案中，寡核苷酸可包含未经修饰部分和经修饰部分。

[1248] 提供的寡核苷酸组合物可包含含有例如如本文中所述的多种修饰中的任一种的寡核苷酸。在一些实施方案中，例如根据预定用途来选择特定修饰。在一些实施方案中，期望的是修饰双链寡核苷酸(或单链寡核苷酸的双链部分)的一个或两个链。在一些实施方案中，两个链(或部分)包括不同修饰。在一些实施方案中，两个链包括相同修饰。本领域技术人员将了解由本发明方法所能够达到的修饰程度和类型允许进行众多修饰排列。本文描述示例性所述修饰，并且不旨在具有限制性。

[1249] 本文中使用的短语“反义链”是指基本上或100％互补于目标靶标序列的寡核苷酸。短语“反义链”包括由两个单独链形成的两个寡核苷酸的反义区域，以及能够形成发夹或哑铃型结构的单分子寡核苷酸。术语“反义链”与“引导链”在本文中可互换使用。

[1250] 短语“有义链”是指完全或部分与如信使RNA或DNA序列的靶标序列具有相同核苷序列的寡核苷酸。术语“有义链”与“过客链”在本文中可互换使用。

[1251] “靶标序列”是指表达或活性待调节的任何核酸序列。靶标核酸可以是DNA或RNA，例如内源性DNA或RNA、病毒DNA或病毒RNA，或由基因、病毒、细菌、真菌、哺乳动物或植物编码的其他RNA。在一些实施方案中，靶标序列与疾病或障碍相关。

[1252] “可特异性杂交”和“互补”是指核酸可通过传统沃森-克里克(Watson-Crick)类型或其他非传统类型与另一核酸序列形成一个或更多个氢键。关于本发明的核酸分子，核酸分子与它的互补序列的结合自由能足以使核酸的相关功能发生，例如RNAi活性。测定核酸分子的结合自由能是本领域中公知的(参见例如Turner等，1987，CSH Symp.Quant.Biol.LIT第123-133页;Frier等，1986，Proc.Nat.Acad.Sci.USA83:9373-9377;Turner等，1987，/.Ain.Chem.Soc.109:3783-3785)。

[1253] 互补性百分比指示核酸分子中可与第二核酸序列形成氢键(例如沃森-克里克碱基配对)的连续残基的百分比(例如10个中的5、6、7、8、9、10个是50％、60％、70％、80％、90％和100％互补的)。“完全互补”或100％互补性是指核酸序列的所有连续残基都将与第二核酸序列中的相同数目的连续残基进行氢键结。小于完全互补性是指其中两个链的一些而非所有核苷单元可彼此进行氢键结的情形。“基本上互补性”是指将多核苷酸链的被选择以是非互补性的区域，如突出部分除外，多核苷酸链表现90％或90％以上互补性。特异性结合需要足够互补性程度以避免寡聚化合物与非靶标序列在需要特异性结合所处的条件下，例如在体内测定或治疗性治疗的情况下的生理条件下，或在体外测定的情况下在进行测定所处的条件下，进行非特异性结合。在一些实施方案中，非靶标序列与相应靶标序列有至少5个核苷酸不同。

[1254] 当用作治疗剂时，提供的寡核苷酸是作为药物组合物施用。在一些实施方案中，药物组合物包含治疗有效量的提供的寡核苷酸或其可药用盐以及至少一种选自可药用稀释剂、可药用赋形剂和可药用载体的可药用非活性成分。在另一实施方案中，药物组合物被配制来用于静脉内注射、经口施用、经颊施用、吸入、经鼻施用、表面施用、经眼施用或经耳施用。在另一些实施方案中，药物组合物是片剂、丸剂、胶囊、液体、吸入剂、鼻喷雾溶液、栓剂、混悬剂、凝胶剂、胶体、分散剂、混悬剂、溶液剂、乳剂、软膏剂、洗剂、滴眼剂或滴耳剂。

[1255] 药物组合物

[1256] 当用作治疗剂时，本文中所述的提供的寡核苷酸或寡核苷酸组合物作为药物组合物施用。在一些实施方案中，药物组合物包含治疗有效量的提供的寡核苷酸或其可药用盐以及至少一种选自可药用稀释剂、可药用赋形剂和可药用载体的可药用非活性成分。在一些实施方案中，药物组合物被配制来用于静脉内注射、经口施用、经颊施用、吸入、经鼻施用、表面施用、经眼施用或经耳施用。在一些实施方案中，药物组合物是片剂、丸剂、胶囊、液体、吸入剂、鼻喷雾溶液、栓剂、混悬剂、凝胶剂、胶体、分散剂、混悬剂、溶液剂、乳剂、软膏剂、洗剂、滴眼剂或滴耳剂。

[1257] 在一些实施方案中，本发明提供了药物组合物，其包含与可药用赋形剂混合的手性控制的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含上述手性控制的寡核苷酸的可药用盐或其组合物。

[1258] 多种超分子纳米载体可用于递送核酸。示例性纳米载体包括但不限于脂质体、阳

离子聚合物复合物和多种聚合物。核酸与多种聚阳离子复合是用于细胞内递送的另一种方法;这包括使用PEG化聚阳离子、聚乙烯胺(polyethyleneamine,PEI)复合物、阳离子嵌段共聚物和树枝状聚合物。包括PEI和聚酰氨基胺树枝状聚合物的若干阳离子纳米载体有助于自内体释放内含物。其他方法包括使用聚合纳米粒子、聚合物胶束、量子点和脂质复合物(lipoplex)。

[1259] 除本文中所述的示例性递送策略之外,另一些核酸递送策略也是已知的。

[1260] 在治疗和/或诊断应用中,本发明化合物可配制成多种施用模式,包括全身性和表面或局部施用。技术和制剂通常可见于Remington,The Science and Practice of Pharmacy,(第20版2000)中。

[1261] 提供的寡核苷酸及其组合物在广泛剂量范围内有效。例如,在治疗成人时,每天约0.01至约1000mg、约0.5至约100mg、约1至约50mg和约5至约100mg的剂量是可使用的剂量的实例。精确剂量将取决于施用途径、所施用化合物所采用的形式、待治疗的对象、待治疗的对象的体重以及主治医师的偏好和经验。

[1262] 可药用盐通常为本领域普通技术人员公知的,并且可例如包括但不限于: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、依地酸钙、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、对羟乙酰胺基苯胂酸盐(glycollylarsanilate)、己基间苯二酚盐(hexylresorcinate)、哈胺(hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、杏仁酸盐(mandelate)、甲磺酸盐、黏酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、扑酸盐(双羟萘酸盐)、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐或茶氯酸盐。其他可药用盐可见于例如Remington,The Science and Practice of Pharmacy(第20版2000)中。优选可药用盐包括例如乙酸盐、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、扑酸盐(双羟萘酸盐)、磷酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐或酒石酸盐。

[1263] 根据所治疗的特定病症,所述药剂可配制成液体或固体剂型,并且全身性或局部施用。药剂可例如以本领域技术人员所知的定时或持续低释放形式递送。用于配制和施用的技术可在Remington,The Science and Practice of Pharmacy(第20版2000)中找到。合适的途径可包括经口、经颊、通过吸入喷雾剂、舌下、经直肠、经皮、经阴道、经黏膜、经鼻或经肠施用;胃肠外递送,包括肌肉内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接室内、静脉内、关节内、胸骨内、滑膜内、肝内、病变内、颅内、腹膜内、鼻内或眼内注射或其他递送模式。

[1264] 对于注射,本发明的药剂可于水溶液中,如于生理可相容缓冲液,如汉克液(Hank′s solution)、林格液(Ringer′s solution)或生理盐水缓冲液中配制和稀释。对于所述经黏膜施用,适合于待渗透的屏障的渗透剂用于制剂中。所述渗透剂通常是本领域中已知的。

[1265] 使用可药用惰性载体来将本文中公开的用于实施本发明的化合物配制成适于全身性施用的剂量在本发明的范围内。在适当选择载体和适合制造规范下,可胃肠外施用(例如通过静脉内注射)来施用本发明的组合物,特别是配制成溶液的那些。

[1266] 使用本领域中公知的可药用载体,可易于将化合物配制成适于经口施用的剂量。这样的载体使得本发明化合物能够被配制成供待治疗的对象(例如患者)经口摄取的片剂、

丸剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、浆液、混悬剂等。

[1267] 对于经鼻或吸入递送，本发明的药剂也可通过为本领域技术人员所知的方法来配制，并且可包括例如但不限于溶解、稀释或分散物质(例如盐水、防腐剂(如苯甲醇)、吸收促进剂和氟碳化合物)的实例。

[1268] 适用于本发明中的药物组合物包括其中以有效量包含活性成分以实现其预定目的的组合物。确定有效量完全在本领域技术人员的能力范围内，尤其鉴于本文中提供的详细公开内容。

[1269] 除活性成分之外，这些药物组合物可含有有助于将活性化合物加工成可在药学上使用的制剂的合适的可药用载体，包括赋形剂和助剂。被配制来供经口施用的制剂可呈片剂、糖衣丸剂、胶囊剂或溶液剂的形式。

[1270] 供经口使用的药物制剂可通过以下方式来获得：将活性化合物与固体赋形剂组合，任选地研磨所得混合物，以及必要时在添加适合助剂之后加工颗粒混合物，以获得片剂或糖衣丸核心。合适的赋形剂特别是填充剂，如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇；纤维素制剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、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)。必要时，可添加崩解剂，如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐，如藻酸钠。

[1271] 糖衣丸核心具有合适的包衣。出于这个目的，可使用浓缩糖溶液，其可任选地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶(carbopolgel)、聚乙二醇(PEG)和/或二氧化钛、漆溶液和适合有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可添加至片剂或糖衣片包衣中以鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合。

[1272] 可经口使用的药物制剂包括由明胶制得的推入-配合型胶囊以及由明胶和塑化剂(如甘油或山梨糖醇)制得的软质密封胶囊。推入-配合型胶囊可含有与填充剂(如乳糖)、黏合剂(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，活性化合物可溶解或混悬于适合液体，如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇(PEG)中。此外，可添加稳定剂。

[1273] 根据待治疗或预防的特定病症或疾病病况，通常被施用来治疗或预防该病症的其他治疗剂可与本发明的寡核苷酸一起施用。例如，化学治疗剂或其他抗增殖剂(anti-proliferative agent)可与本发明的寡核苷酸组合来治疗增殖性疾病和癌症。已知化学治疗剂的实例包括但不限于：阿霉素、地塞米松、长春新碱、环磷酰胺、氟尿嘧啶、拓扑替康、泰素、干扰素和铂衍生物。

[1274] 根据下述实施例，将更充分了解本发明的这些和其他实施方案的功能和优势。以下实施例旨在举例说明本发明的益处，但不例示本发明的完全范围。

[1275] 在一些实施方案中，本发明提供了以下示例性实施方案。

[1276] E1.一种手性控制的寡核苷酸组合物，其包含通过具有以下来定义的寡核苷酸：

[1277] 1)共同碱基序列和长度；

[1278] 2)共同骨架键联样式；和

[1279] 3)共同骨架手性中心样式，所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物，其中所述组合物中至少约10％的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1280] E2.实例E1所述的组合物,其中一个或更多个碱基是修饰的。

[1281] E3.实例E1所述的组合物,其中没有碱基是修饰的。

[1282] E4.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述共同碱基序列具有至少8个碱基。

[1283] E5.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述共同碱基序列具有至少10个碱基。

[1284] E6.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述共同碱基序列具有至少15个碱基。

[1285] E7.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约20%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1286] E8.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约50%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1287] E9.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约80%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1288] E10.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约85%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1289] E11.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约90%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1290] E12.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约95%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1291] E13.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约97%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1292] E14.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约98%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1293] E15.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述组合物中至少约99%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式。

[1294] E16.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸包含一个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。

[1295] E17.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸具有翼区-核心-翼区结构。

[1296] E18.前述实例中任一项所述的组合物,其中每个翼区任选地包含手性核苷酸间键联。

[1297] E19.前述实例中任一项所述的组合物,其中每个翼区中的手性核苷酸间键联独立

地具有相同立体化学。

[1298] E20.前述实例中任一项所述的组合物,其中两个翼区中的手性核苷酸间键联独立地具有相同立体化学。

[1299] E21.前述实例中任一项所述的组合物,其中每个翼区中的手性核苷酸间键联独立地具有相同立体化学,并且第一翼区的立体化学与第二翼区的立体化学不同。

[1300] E22.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第一翼区独立地具有一个或更多个碱基的长度。

[1301] E23.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第一翼区独立地具有两个或更多个碱基的长度。

[1302] E24.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第一翼区独立地具有三个或更多个碱基的长度。

[1303] E25.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第一翼区独立地具有四个或更多个碱基的长度。

[1304] E26.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第一翼区独立地具有五个或更多个碱基的长度。

[1305] E27.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第一翼区独立地具有小于八个碱基的长度。

[1306] E28.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第二翼区独立地具有一个或更多个碱基的长度。

[1307] E29.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第二翼区独立地具有两个或更多个碱基的长度。

[1308] E30.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第二翼区独立地具有三个或更多个碱基的长度。

[1309] E31.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第二翼区独立地具有四个或更多个碱基的长度。

[1310] E32.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第二翼区独立地具有五个或更多个碱基的长度。

[1311] E33.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述第二翼区独立地具有小于八个碱基的长度。

[1312] E34.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有五个或更多个碱基的长度。

[1313] E36.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有六个或更多个碱基的长度。

[1314] E37.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有七个或更多个碱基的长度。

[1315] E38.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有八个或更多个碱基的长度。

[1316] E39.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有九个或更多个碱基的长度。

[1317] E40.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有10个或更多个碱基的长度。

[1318] E41.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有15个或更多个碱基的长度。

[1319] E42.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域具有核苷酸间键联立体化学的重复样式。

[1320] E43.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核苷酸间键联立体化学的重复样式是(Sp)m(Rp)n或(Rp)n(Sp)m,其中m和n独立地是1、2、3、4、5、6、7或8。

[1321] E44.实例E43的组合物,其中m>n。

[1322] E45.实例E43或E44的组合物,其中n是1。

[1323] E46.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区包含(Sp)m(Rp)n或(Rp)n(Sp)m的核苷酸间键联立体化学样式,其中m和n独立地是2、3、4、5、6、7或8。

[1324] E47.实例E46的组合物,其中m>n。

[1325] E48.实例E47的组合物,其中n是1。

[1326] E49.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域的50%百分比或更多的手性核苷酸间键联具有Sp构型。

[1327] E50.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域的60%百分比或更多的手性核苷酸间键联具有Sp构型。

[1328] E51.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域包含至少2个Rp核苷酸间键联。

[1329] E52.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域包含至少3个Rp核苷酸间键联。

[1330] E53.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域包含至少4个Rp核苷酸间键联。

[1331] E54.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心区域包含至少5个Rp核苷酸间键联。

[1332] E55.前述实例中任一项所述的组合物,其中至少5个骨架核苷酸间键联是手性的。

[1333] E56.前述实例中任一项所述的组合物,其中每个骨架核苷酸间键联是手性的。

[1334] E57.实例E1至E55中任一项所述的组合物,其中至少一个骨架核苷酸间键联是磷酸酯键联。

[1335] E58.实例E1至E16中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸包含这样的区域,其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少一个是手性的。

[1336] E59.实例E58所述的组合物,其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少两个是手性的。

[1337] E60.实例E58至E59中任一项所述的组合物,其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少三个是手性的。

[1338] E61.实例E58至E60中任一项所述的组合物,其中第一个、第二个、第三个、第五个、第七个、第十八个、第十九个和第二十个核苷酸间键联中的至少四个是手性的。

[1339] E62.实例E58至E61中任一项所述的组合物,其中所述区域中至少一个核苷酸间键联是手性的。

[1340] E63.实例E58至E62中任一项所述的组合物,其中所述区域中至少一个核苷酸间键联是磷酸酯键联。

[1341] E64.实例E58至E63中任一项所述的组合物,其中所述区域中至少10%的核苷酸间键联是磷酸酯键联。

[1342] E65.实例E58至E64中任一项所述的组合物,其中第一个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1343] E66.实例E58至E64中任一项所述的组合物,其中第一个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1344] E67.实例E58至E66中任一项所述的组合物,其中第二个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1345] E68.实例E58至E66中任一项所述的组合物,其中第二个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1346] E69.实例E58至E68中任一项所述的组合物,其中第三个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1347] E70.实例E58至E68中任一项所述的组合物,其中第三个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1348] E71.实例E58至E70中任一项所述的组合物,其中第五个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1349] E72.实例E58至E70中任一项所述的组合物,其中第五个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1350] E73.实例E58至E72中任一项所述的组合物,其中第七个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1351] E74.实例E58至E72中任一项所述的组合物,其中第七个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1352] E75.实例E58至E74中任一项所述的组合物,其中第十八个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1353] E76.实例E58至E74中任一项所述的组合物,其中第十八个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1354] E77.实例E58至E76中任一项所述的组合物,其中第十九个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1355] E78.实例E58至E76中任一项所述的组合物,其中第十九个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1356] E79.实例E58至E78中任一项所述的组合物,其中第二十个核苷酸间键联是Sp修饰的核苷酸间键联。

[1357] E80.实例E58至E78中任一项所述的组合物,其中第二十个核苷酸间键联是Rp修饰的核苷酸间键联。

[1358] E81.实例E58至E80中任一项所述的组合物,其中所述区域具有21个碱基的长度。

[1359] E82.实例E58至E81中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸具有21个碱基的长度。

[1360] E83.实例E58至E82中任一项所述的组合物,其中所述手性核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[1361] E84.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述手性核苷酸间键联具有式I的结构。

[1362] E85.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸在糖部分上不具有2'-OR^1。

[1363] E86.前述实例中任一项所述的组合物,其中每个糖部分不具有2'-MOE。

[1364] E87.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸不是(Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Np,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1TS1Ts15mCs1G],或(Rp,Rp,Rp,Rp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Rp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5R-(SSR)3-5R),其中具有下划线的核苷酸是2'-O-MOE修饰的。

[1365] E88.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述单一寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:

[1366]

ONT-106	(Rp)-uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9有义
ONT-107	(Sp)-uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9有义
ONT-108	(Rp)-AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT	PCSK9反义
ONT-109	(Sp)-AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT	PCSK9反义
ONT-110	(Rp,Rp)-asAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT	PCSK9反义
ONT-111	(Sp,Rp)-asGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT	PCSK9反义
ONT-112	(Sp,Sp)-asGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT	PCSK9反义
ONT-113	(Rp,Sp)-asGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT	PCSK9反义

[1367] 其中小写字母表示2'OMe RNA残基;大写字母表示2'OH RNA残基;并且粗体和"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[1368]

PCSK9 (1)	(全 (*S*p))- ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (2)	(全 (*R*p))- ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (3)	(全 (*S*p))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT
PCSK9 (4)	(全 (*R*p))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT
PCSK9 (5)	(*R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p)-ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (6)	(*S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p)-ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT

[1369] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;并且"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[1370]

PCSK9 (7)	(全(*Rp*))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (8)	(全(*Sp*))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (9)	(全(*Rp*))- AsAGcAAAAcsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (10)	(全(*Sp*))- AsAGcAAAAcsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (11)	(全(*Rp*))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (12)	(全(*Sp*))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (13)	(全(*Rp*))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (14)	(全(*Sp*))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (15)	(全(*Rp*))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (16)	(全(*Sp*))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (17)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (18)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

[1371] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[1372]

PCSK9 (19)	(全(*Rp*))- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (20)	(全(*Sp*))- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (21)	(全(*Rp*))- UfsuCfsuAfsgAfscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (22)	(全(*Sp*))- UfsuCfsuAfsgAfscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (23)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (24)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT

[1373] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示2'-F RNA残基;d=2'-脱氧残基;并且"S"部分表示硫代磷酸酯部分;以及

[1374]

PCSK9 (25)	(全 (*R*p))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (26)	(全 (*S*p))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (27)	(全 (*R*p))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (28)	(全 (*S*p))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (29)	(全 (*R*p))- asAfsgCfsaAfsaAfscAfsgGfsuCfsuAfsgAfsadTsdT
PCSK9 (30)	(全 (*S*p))- asAfsgCfsaAfsaAfscAfsgGfsuCfsuAfsgAfsadTsdT
PCSK9 (31)	(*R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (32)	(*S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p, *S*p, *R*p)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT

[1375] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示2'-F RNA残基;d=2'-脱氧残基;并且"s"部分表示硫代磷酸酯部分。

[1376] E89.前述实例中任一项所述的组合物,其中至少约50%的所述核苷酸间键联是Sp构型。

[1377] E90.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心部分包含至少约5个核苷酸。

[1378] E91.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心部分包含至少约10个核苷酸。

[1379] E92.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心部分包含至少约15个核苷酸。

[1380] E93.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心部分包含至少约20个核苷酸。

[1381] E94.前述实例中任一项所述的组合物,其中所述核心部分包含至少约25个核苷酸。

[1382] E95.前述实例中任一项所述的组合物,其中(Sp)m(Rp)n或(Rp)n(Sp)m是SSR。

[1383] E96.实例E1至E95中任一项所述的组合物,其中(Sp)m(Rp)n或(Rp)n(Sp)m是RRS。

[1384] E97.前述实例中任一项所述的组合物,其中重复样式是包含至少约20%Sp构型的骨架手性中心的基序。

[1385] E98.前述实例中任一项所述的组合物,其中重复样式是包含至少约50%Sp构型的骨架手性中心的基序。

[1386] E99.前述实例中任一项所述的组合物,其中重复样式是包含至少约66%Sp构型的骨架手性中心的基序。

[1387] E100.前述实例中任一项所述的组合物,其中重复样式是包含至少约75%Sp构型的骨架手性中心的基序。

[1388] E101.前述实例中任一项所述的组合物,其中重复样式是包含至少约80%Sp构型的骨架手性中心的基序。

[1389] E102.一种手性控制的寡核苷酸组合物,其包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[1390] 1)共同碱基序列和长度;

[1391] 2)共同骨架键联样式;和

[1392] 3)共同骨架手性中心样式;

[1393] 所述组合物是手性控制的,其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[1394] E103.实例E102的组合物,其中所述共同碱基序列是或包含与靶序列互补的序列,其中当与包含所述靶序列的核酸聚合物接触时,手性控制的寡核苷酸组合物提供了与来自参照寡核苷酸组合物的参照切割样式相比改变的切割样式。

[1395] E104.实例E103的组合物,其中所述核酸聚合物是RNA,并且参照寡核苷酸组合物是共有所述共同序列和长度的寡核苷酸组合物的基本上外消旋的制备物。

[1396] E105.实例E103的组合物,其中所述核酸聚合物是RNA,并且参照寡核苷酸组合物是共有所述共同序列和长度的寡核苷酸组合物的手性未控制的寡核苷酸。

[1397] E106.实例E103至105中任一项所述的组合物,其中所述改变的切割样式具有比参照切割样式更少的切割位点。

[1398] E107.实例E103至106中任一项所述的组合物,其中所述改变的切割样式在所述靶序列中具有仅一个切割位点,并且所述参照切割样式在所述靶序列中具有两个或更多个切割位点。

[1399] E108.实例E102的组合物,其中所述单一寡核苷酸类型的寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与相对于群体中存在的同一靶基因的其他等位基因限定靶基因的特定等位基因的特征序列元件互补的序列,所述组合物的特征在于,当使其与表达靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时,所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1400] E109.实例E102的组合物,其中所述单一寡核苷酸类型的寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与相对于群体中存在的同一靶基因的其他等位基因限定靶基因的特定等位基因的特征序列元件互补的序列,所述组合物的特征在于,当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时,所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平:

[1401] a)为至少2倍,其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍;

[1402] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍;或

[1403] c)既为至少2倍,其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍;又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1404] E110.实例E102至109中任一项所述的组合物,其中所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸包含经修饰碱基。

[1405] E111.实例E102至110中任一项所述的组合物,其中所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸包含经修饰糖。

[1406] E112.实例E111的组合物,其中所述经修饰糖包含2'-修饰。

[1407] E113.实例E112的组合物,其中所述2'-修饰是2'OR^1。

[1408] E114.实例E113的组合物,其中所述2'-修饰是2'-MOE。

[1409] E115.实例E102至109中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸不具有经修饰碱基或经修饰糖。

[1410] E116.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含(Sp)m(Rp)n，其中m是2、3、4、5、6、7或8，并且n是1、2、3、4、5、6、7或8。

[1411] E117.实例E102至116中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含(Sp)mRp，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1412] E118.实例E102至117中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含$(Sp)_2Rp$。

[1413] E119.实例E102至118中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含重复(Sp)m(Rp)n，其中m是2、3、4、5、6、7或8，并且n是1、2、3、4、5、6、7或8。

[1414] E120.实例E102至119中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含重复(Sp)mRp，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1415] E121.实例E102至120中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含重复$(Sp)_2Rp$。

[1416] E122.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含(Rp)n(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8，并且n是1、2、3、4、5、6、7或8。

[1417] E123.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1418] E124.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含$Rp(Sp)_2$。

[1419] E125.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含重复(Rp)n(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8，并且n是1、2、3、4、5、6、7或8。

[1420] E126.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含重复Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1421] E127.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含重复$Rp(Sp)_2$。

[1422] E128.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含(Np)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，m是2、3、4、5、6、7或8，并且Np各自独立地是Rp或Sp。

[1423] E129.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含(Sp)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，并且m是2、3、4、5、6、7或8。

[1424] E130.实例E128或E129所述的组合物，其中n是1。

[1425] E131.实例E128至130中任一项所述的组合物，其中t是2、3、4、5、6、7或8。

[1426] E132.实例E128至131中任一项所述的组合物，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1427] E133.实例E128至131中任一项所述的组合物，其中t和m中的至少一个大于5。

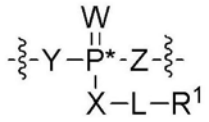
[1428] E134.实例E102至115中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架手性中心样式包含SpSpRpSpSp。

[1429] E135.实例E102至134中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的骨架

手性中心样式具有仅一个Rp，并且每个其他核苷酸间键联是Sp。

[1430] E136.实例E102至135中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的所述共同碱基长度大于10。

[1431] E137.实例E102至136中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸中的每个手性核苷酸间键联具有式I的结构

[1432] 

(I)

[1433] E138.实例E137的组合物，其中X是S，并且Y和Z是O。

[1434] R139.实例E137或E138的组合物，其中-L-R^1不是-H。

[1435] E140.实例E137或E138的组合物，其中式I的结构是硫代磷酸二酯键联。

[1436] E141.实例E102至140中任一项所述的组合物，其中所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸是反义寡核苷酸、微小RNA拮抗剂、微小RNA、前微小RNA、反义微小RNA、超微小RNA、核酶、U1衔接头、RNA活化剂、RNAi剂、诱饵寡核苷酸、成三链体寡核苷酸、适体或佐剂。

[1437] E142.一种用于控制切割核酸聚合物的方法，所述方法包括以下步骤：

[1438] 使核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1439] 1)共同碱基序列和长度，其中所述共同碱基序列是或包含与存在于所述核酸聚合物中的靶序列互补的序列；

[1440] 2)共同骨架键联样式；和

[1441] 3)共同骨架手性中心样式；

[1442] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有该特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[1443] E143.实例E142所述的方法，其中在发生所述核酸聚合物的切割的条件下进行所述接触。

[1444] E144.实例E142至143中任一项所述的方法，其中所述切割以与当在相当的条件下使所述核酸聚合物与参照寡核苷酸组合物相接触时所观察到的参照切割样式不同的切割样式发生。

[1445] E145.一种用于改变当其核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与参照寡核苷酸组合物相接触时所观察到的切割样式的方法，所述参照寡核苷酸组合物包含具有特定碱基序列和长度的寡核苷酸，所述特定碱基序列是或包含与所述靶序列互补的序列，所述方法包括：

[1446] 使所述核酸聚合物与具有所述特定碱基序列和长度的寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述组合物是手性控制的，其中相对于具有所述特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1447] 1)所述特定碱基序列和长度；

[1448] 2)特定骨架键联样式；和

[1449] 3)特定骨架手性中心样式。

[1450] E146.实例E145的方法,其中在发生所述核酸聚合物的切割的条件下进行所述接触。

[1451] E147.实例E144至E146中任一项所述的方法,其中所述参照寡核苷酸组合物是共有所述共同序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物。

[1452] E148.实例E144至E146中任一项所述的方法,其中所述参照寡核苷酸组合物是共有所述共同序列和长度的寡核苷酸的手性未控制的寡核苷酸组合物。

[1453] E149.实例E144至E148中任一项所述的方法,其中由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式与参照切割样式的差异在于,与所述参照切割样式相比,所述由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式在存在于所述核酸聚合物中的所述靶序列中具有更少的切割位点。

[1454] E150.实例149所述的方法,其中与所述参照切割样式相比,由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式在存在于所述核酸聚合物中的所述靶序列中具有单一切割位点。

[1455] E151.实例150所述的方法,其中所述单一切割位点是所述参照切割样式中的切割位点。

[1456] E152.实例E150所述的方法,其中所述单一切割位点是所述参照切割样式以外的切割位点。

[1457] E153.实例E144至E148中任一项所述的方法,其中由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式与参照切割样式的差异在于,所述由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式使切割位点处的切割百分比提高。

[1458] E154.实例E153所述的方法,其中具有提高的切割百分比的所述切割位点是所述参照切割样式中的切割位点。

[1459] E155.实例E153所述的方法,其中具有提高的切割百分比的所述切割位点是所述参照切割样式以外的切割位点。

[1460] E156.实例E142至E155中任一项所述的方法,其中与参照寡核苷酸组合物相比,所述手性控制的寡核苷酸组合物提供更高的靶核酸聚合物切割速率。

[1461] E157.实例E142至E156中任一项所述的方法,其中所述切割速率高至少5倍。

[1462] E158.实例E142至E157中任一项所述的方法,其中与参照寡核苷酸组合物相比,所述手性控制的寡核苷酸组合物提供更低水平的剩余的未切割靶核酸聚合物。

[1463] E159.实例E142至E158中任一项所述的方法,其中所述剩余的未切割靶核酸聚合物低至少5倍。

[1464] E160.实例E142至E159中任一项所述的方法,其中与从所述参照寡核苷酸组合物的寡核苷酸解离相比,来自所述核酸聚合物的切割产物从所述手性控制的寡核苷酸组合物中的所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸中更快解离。

[1465] E161.一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法,所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因,每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件,所述方法包括以下步骤:

[1466] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触,所

述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[1467] 1)共同碱基序列和长度;

[1468] 2)共同骨架键联样式;

[1469] 3)共同骨架手性中心样式;

[1470] 所述组合物是手性控制的,其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸;

[1471] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列,所述组合物的特征在于,当使其与包含靶等位基因和同一核酸序列的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时,所述特定等位基因之转录物的抑制水平大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。

[1472] E162.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法,所述靶基因在群体中存在多个等位基因,每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件,所述方法包括以下步骤:

[1473] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触,所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[1474] 1)共同碱基序列和长度;

[1475] 2)共同骨架键联样式;

[1476] 3)共同骨架手性中心样式;

[1477] 所述组合物是手性控制的,其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸;

[1478] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列,所述组合物的特征在于,当使其与包含靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时,所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1479] E163.实例E161或E162所述的方法,所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之转录物的条件下进行。

[1480] E164.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法,所述靶基因在群体中存在多个等位基因,每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件,所述方法包括以下步骤:

[1481] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触,所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[1482] 1)共同碱基序列和长度;

[1483] 2)共同骨架键联样式;

[1484] 3)共同骨架手性中心样式;

[1485] 所述组合物是手性控制的,其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸;

[1486] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列,所述组合物的特征在于,当使其与表达靶等

位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1487] E165.实例E164所述的方法，其中所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因的表达的条件下进行。

[1488] E166.实例E161至E165中任一项所述的方法，其中所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少5、10、20、50、100、200或500倍。

[1489] E167.一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1490] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1491] 1)共同碱基序列和长度；

[1492] 2)共同骨架键联样式；

[1493] 3)共同骨架手性中心样式；

[1494] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1495] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含同一靶核酸序列之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物的以下抑制水平：

[1496] a)大于当所述组合物不存在时的抑制水平；

[1497] b)大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平；或

[1498] c)既大于当所述组合物不存在时的抑制水平，又大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。

[1499] E168.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1500] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1501] 1)共同碱基序列和长度；

[1502] 2)共同骨架键联样式；

[1503] 3)共同骨架手性中心样式；

[1504] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1505] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的

以下抑制水平：

[1506] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1507] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1508] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1509] E169.实例E167或E168的方法，所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因的表达的条件下进行。

[1510] E170.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1511] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1512] 1)共同碱基序列和长度；

[1513] 2)共同骨架键联样式；

[1514] 3)共同骨架手性中心样式；

[1515] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1516] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平：

[1517] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1518] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1519] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1520] E171.实例E170的方法，其中所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因的表达的条件下进行。

[1521] E172.实例E167至E171中任一项所述的方法，其中所述特定等位基因之转录物的抑制水平为至少5、10、20、50、100、200或500倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍。

[1522] E173.实例E167至E172中任一项所述的方法，其中所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少5、10、20、50、100、200或500倍。

[1523] E174.实例E161至E173中任一项所述的方法，其中所述体系是体外体系或体内体系。

[1524] E175.实例E161至E174中任一项所述的方法,其中所述体系包含一个或更多个细胞、组织或器官。

[1525] E176.实例E161至E174中任一项所述的方法,其中所述体系包含一个或更多个生物体。

[1526] E177.实例E161至E174中任一项所述的方法,其中所述体系包含一个或更多个对象。

[1527] E178.实例E161至E177中任一项所述的方法,其中切割所述特定等位基因之转录物。

[1528] E179.实例E161至E178中任一项所述的方法,其中所述特异性核苷酸特征序列元件存在于所述靶核酸序列或基因的内含子中。

[1529] E180.实例E161至E178中任一项所述的方法,其中所述特异性核苷酸特征序列元件存在于所述靶核酸序列或基因的外显子中。

[1530] E181.实例E161至E178中任一项所述的方法,其中所述特异性核苷酸特征序列元件跨越所述靶核酸序列或基因的外显子和内含子。

[1531] E182.实例E161至E181中任一项所述的方法,其中所述特异性核苷酸特征序列元件包含突变。

[1532] E183.实例E161至E181中任一项所述的方法,其中所述特异性核苷酸特征序列元件包含SNP。

[1533] E184.实例E142至E183中任一项所述的方法,其中向对象施用所述手性控制的寡核苷酸组合物。

[1534] E185.实例E142至E184中任一项所述的方法,其中所述靶核酸聚合物或转录物是寡核苷酸。

[1535] E186.实例E142至E185中任一项所述的方法,其中所述靶核酸聚合物或转录物是RNA。

[1536] E187.实例E142至E186中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸组合物中的所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸与所述核酸聚合物或转录物形成双链体。

[1537] E188.实例E142至E187中任一项所述的方法,其中所述通过酶切割所述核酸聚合物或转录物。

[1538] E189.实例E142至E188中任一项所述的方法,其中所述酶是RNase H。

[1539] E190.实例E142至E188中任一项所述的方法,其中所述酶是Argonaute蛋白或在RNA诱导的沉默复合物(RISC)中。

[1540] E191.实例E102至141中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸类型不是(Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]或(Rp,Rp,Rp,Rp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Rp,Rp,Rp,Rp,Rn)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5R-(SSR 3-5R),其中具有下划线的核苷酸是2'-O-MOE修饰的。

[1541] E192.实例E102至141中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸具有翼区-核心-翼区结构,其中所述核心区域的所述骨架手性中心样式包含(Np)t(Rp)n(Sp)m,其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8,m是2、3、4、5、6、7或8,并且Np各自独立地是Rp或Sp。

[1542] E193.实例E102至141中任一项所述的组合物，其中所述寡核苷酸具有翼区-核心-翼区结构，其中所述核心区域的骨架手性中心样式包含(Sp)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，并且m是2、3、4、5、6、7或8。

[1543] E194.实例E192或E193中任一项所述的组合物，其中n是1。

[1544] E195.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是2。

[1545] E196.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是3、4、5、6、7或8。

[1546] E197.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是4、5、6、7或8。

[1547] E198.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是5、6、7或8。

[1548] E199.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是6、7或8。

[1549] E200.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是7或8。

[1550] E201.实例E192或E194中任一项所述的组合物，其中m是8。

[1551] E202.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是1。

[1552] E203.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是2、3、4、5、6、7或8。

[1553] E204.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是3、4、5、6、7或8。

[1554] E205.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是4、5、6、7或8。

[1555] E206.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是5、6、7或8。

[1556] E207.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是6、7或8。

[1557] E208.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是7或8。

[1558] E209.实例E192或E201中任一项所述的组合物，其中t是8。

[1559] E210.实例E192或E209中任一项所述的组合物，其中每个翼区独立地具有两个或更多个碱基的长度。

[1560] E211.实例E192或E210中任一项所述的组合物，其中所有核苷酸间键联是手性的经修饰磷酸酯键联。

[1561] E212.实例E192或E211中任一项所述的组合物，其中所述核心区域具有11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或更多个碱基的长度。

[1562] E213.实例E102至E141以及E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少18个碱基。

[1563] E214.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1564] E215.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1565] E216.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1566] E217.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1567] E218.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1568] E219.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物，其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1569] E220.实例E102至E141和E192至E212中任一项所述的组合物,其中所述共同碱基序列具有至少19个碱基。

[1570] E221.实例E102至E141和E192或E220中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:(Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]或(Rp,Rp,Rp,Rp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Rp,Rp,Rp,Rp,Rp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5R-(SSR)3-5R),其中具有下划线的核苷酸是2'-O-MOE修饰的。

[1571] E222.实例E102至E141以及E192或E221中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:

[1572]

ONT-106	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuudT*s*dT	PCSK9有义
ONT-107	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuudT*s*dT	PCSK9有义
ONT-108	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdT*s*dT	PCSK9反义
ONT-109	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdT*s*dT	PCSK9反义
ONT-110	(*Rp*, *Rp*)- a*s*AGcAAAAcAGGUCuAGAAdT*s*dT	PCSK9反义
ONT-111	(*Sp*, *Rp*)- a*s*GcAAAAcAGGUCuAGAAdT*s*dT	PCSK9反义
ONT-112	(*Sp*, *Sp*)- a*s*GcAAAAcAGGUCuAGAAdT*s*dT	PCSK9反义
ONT-113	(*Rp*, *Sp*)- a*s*GcAAAAcAGGUCuAGAAdT*s*dT	PCSK9反义

[1573] 其中小写字母表示2'OMe RNA残基;大写字母表示2'OH RNA残基;并且粗体和"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[1574]

PCSK9 (1)	(全 (*Sp*))- ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (2)	(全 (*Rp*))- ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (3)	(全 (*Sp*))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT
PCSK9 (4)	(全 (*Rp*))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT
PCSK9 (5)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT
PCSK9 (6)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-ususcsusAsGsAscscsusGsususususGscsususdTsdT

[1575] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;并且"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[1576]

PCSK9 (7)	(全 (*Rp*))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (8)	(全 (*Sp*))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (9)	(全 (*Rp*))- AsAGcAAAAcsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (10)	(全 (*Sp*))- AsAGcAAAAcsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (11)	(全 (*Rp*))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (12)	(全 (*Sp*))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (13)	(全 (*Rp*))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (14)	(全 (*Sp*))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (15)	(全 (*Rp*))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (16)	(全 (*Sp*))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (17)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (18)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

[1577] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;"s"表示硫代磷酸酯部分;以及

[1578]

PCSK9 (19)	(全 (*Rp*))- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (20)	(全 (*Sp*))- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (21)	(全 (*Rp*))- UfsuCfsuAfsgAfscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (22)	(全 (*Sp*))- UfsuCfsuAfsgAfscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (23)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (24)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)- UfsusCfsusAfsgsAfscsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT

[1579] 其中小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示2'-F RNA残基;d=2'-脱氧残基;并且"s"部分表示硫代磷酸酯部分;以及

[1580]

PCSK9 (25)	(全 (*Rp*))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (26)	(全 (*Sp*))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (27)	(全 (*Rp*))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (28)	(全 (*Sp*))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (29)	(全 (*Rp*))- asAfsgCfsaAfsaAfscAfsgGfsuCfsuAfsgAfsadTsdT
PCSK9 (30)	(全 (*Sp*))- asAfsgCfsaAfsaAfscAfsgGfsuCfsuAfsgAfsadTsdT
PCSK9 (31)	(*Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (32)	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT

。

[1581] E223.实例E1至E141和E192至E222中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:d[$A_RC_SA_RC_SA_RC_SA_RC_SA_RC$]、d[$C_SC_SC_SC_RC_RC_SC_SC_SC_SC$]、d[$C_SC_SC_SC_SC_SC_SC_RC_RC_SC$]和d[$C_SC_SC_SC_SC_SC_RC_RC_SC_SC$],其中R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联。

[1582] E224.实例E1至E141和E192至E223中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:$GGA_RT_SG_RT_ST_R{}^mC_STCGA$、$GGA_RT_RG_ST_ST_R{}^mC_RTCGA$、$GGA_ST_SG_RT_RT_S{}^mC_STCGA$,其中R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联,所有其他键联是PO,并且每个^mC是5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸。

[1583] E225.实例E1至E141和E192至E224中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:$T_kT_k{}^mC_kAGT{}^mCATGA{}^mCT_kT{}^mC_k{}^mC_k$,其中每个带有下标"k"的核苷表示(S)-cEt修饰,R是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联,每个^mC是5-甲基胞嘧啶修饰核苷,并且所有核苷酸间键联还具有选自以下的立体化学样式的硫代磷酸酯(PS):RSSSRSRRRS、RSSSSSSSSS、SRRSRSSSSR、SRSRSSRSSR、RRRSSSRSSS、RRRSRSSRSR、RRSSSRSRSR、SRSSSRSSSS、SSRRSSRSRS、SSSSSSRRSS、RRRSSRRRSR、RRRRSSSSRS、SRRSRRRRRR、RSSRSSRRRR、RSRRSRRSRR、RRSRSSRSRS、SSRRRRSRRR、RSRRSRSSSR、RRSSRSRRRR、RRSRSRRSSS、RRSRSSSRRR、RSRRRRSRSR、SSRSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSSRSS、RRRSSRRSRS、SRRSSRRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRRRRSR、RRRRRRRRRR和SSSSSSSSSS。

[1584] E226.实例E1至E141和E192至E225中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸不是选自以下的寡核苷酸:$T_kT_k{}^mC_kAGT{}^mCATGA{}^mCTT_k{}^mC_k{}^mC_k$,其中每个带有下标"k"的核苷表示(S)-cEt修饰,RR是Rp硫代磷酸酯键联,S是Sp硫代磷酸酯键联,每个^mC是5-甲基胞嘧啶修饰,并且所有核苷酸间键联还具有选自以下的立体化学样式的硫代磷酸酯(PS):RSSSRSRRRS、RSSSSSSSSS、SRRSRSSSSR、SRSRSSRSSR、RRRSSSRSSS、RRRSRSSRSR、RRSSSRSRSR、SRSSSRSSSS、SSRRSSRSRS、SSSSSSRRSS、RRRSSRRRSR、RRRRSSSSRS、SRRSRRRRRR、RSSRSSRRRR、RSRRSRRSRR、RRSRSSRSRS、SSRRRRSRRR、RSRRSRSSSR、RRSSRSRRRR、RRSRSRRSSS、RRSRSSSRRR、RSRRRRSRSR、SSRSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSSRSS、RRRSSRRSRS、SRRSSRRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRRRRSR、RRRRRRRRRR和SSSSSSSSSS。

[1585] E227.实例E1至E141和E192至E226中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含预定水平的以共同碱基序列、共同骨架键联样式、共同骨架手性中心样式和共同骨架磷修

饰样式为特征的寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[1586] E228.实例E1至E141和E192至E226中任一项所述的组合物,其中所述同骨架手性中心样式包含至少约20%的Sp构象的骨架手性中心。

[1587] E229.实例E1至E141和E192至E226中任一项所述的组合物,其中所述同骨架手性中心样式包含至少约50%的Sp构象的骨架手性中心。

[1588] E230.实例E1至E141和E192至E226中任一项所述的组合物,其中所述同骨架手性中心样式包含至少约66%的Sp构象的骨架手性中心。

[1589] E231.实例E1至E141和E192至E226中任一项所述的组合物,其中所述同骨架手性中心样式包含至少约75%的Sp构象的骨架手性中心。

[1590] E232.实例E1至E141以及E192至E226中任一项所述的组合物,其中所述同骨架手性中心样式包含至少约80%的Sp构象的骨架手性中心。

[1591] E233.一种药物组合物,其包含权利要求E1至E141和E192至E232中任一项所述的组合物。

[1592] E234.实例E142至E190中任一项所述的方法,其中所述手性控制的寡核苷酸组合物是实例E1至E101中任一项的组合物。

[1593] E235.实例E142至E190中任一项所述的方法,其中所述手性控制的寡核苷酸组合物是实例E102至E141和E191中任一项的组合物。

[1594] E236.实例E142至E190中任一项所述的方法,其中所述手性控制的寡核苷酸组合物是实例E102至E141和E191至E233中任一项的组合物。

[1595] 范例

[1596] 前述是对本发明的某些非限制性实施方案的描述。因此,应了解本文中所述的本发明的一些实施方案仅举例说明本发明原理的应用。本文中提及举例说明的实施方案的细节不旨在限制权利要求的范围。

[1597] 实施例1.人Chiromersen在预孵育大鼠全肝匀浆物中的体外代谢稳定性

[1598] 本实施例描述了米泊美生(立体化学混合物)与米泊美生的手性控制的寡核苷酸组合物(“chiromersen”)的体外全大鼠肝匀浆物稳定性的比较。所述方法尤其可用于筛选化学物以预测体内半衰期。

[1599] 如本领域中已知的,米泊美生(先前为ISIS 301012,以商品名Kynamro销售)是一种20聚体寡核苷酸,其碱基序列反义于载脂蛋白B基因的一部分。推测米泊美生通过靶向mRNA来抑制载脂蛋白B基因表达。米泊美生具有以下结构:

[1600] G*-C*-C*-U*-C*-dA-dG-dT-dC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G*-C*-A*-C*-C*

[1601] [d=2'-脱氧,*=2'-O-(2-甲氧基乙基)]

[1602] 具有3'→5'硫代磷酸酯键联。因此,米泊美生在两端具有2'-O-甲氧基乙基修饰的核糖残基,在中间具有脱氧核糖残基。

[1603] 本实施例中所述测试的手性纯米泊美生类似物包含3'→5'硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,测试的类似物包含一个或更多个2'-O-(2-甲氧基乙基)-修饰的残基;在一些实施方案中,测试的类似物包含仅2'-脱氧残基。特别测试的类似物具有下表3和4中给出的结构。

[1604] 方案:我们使用由Geary等报道的方案(Oligonucleotides,Volume 20,Number 6,2010)并且进行了一些修改。

[1605] 测试系统:六只雄性Sprague-Dawley大鼠(褐家鼠(Rattus norvegicus))由Charles River Laboratories,Inc.,(Hollister,CA)提供,并且在SNBL USA接收。

[1606] 组织收集:在组织收集之前使动物适应研究室两天。在组织收集时,用腹膜内(IP)注射戊巴比妥钠溶液来麻醉动物。使用500mL冷冻盐水/动物,通过肝门静脉施用来进行肝灌注。在灌注之后,将肝解剖,并且维持在冰上。将肝切碎成小碎片,接着称重。

[1607] 肝匀浆物制备:将肝组织的切碎碎片转移至去皮重的50mL离心管中并称重。向各管添加冷冻均质化缓冲液(100mM Tris(pH 8.0)、1mM乙酸镁,具有抗生素-抗霉菌剂),以使管含有每克组织5mL缓冲液。使用QIAGEN TissueRuptor组织均质器,在将管维持在冰上的情况下使肝/缓冲液混合物均质化。使用Pierce BCA蛋白质测定来测定肝匀浆物库的蛋白质浓度。将肝匀浆物分成5mL等分试样,转移至合适尺寸的具有标签的冷冻小瓶(cryovial)中,并且储存在-60℃下。

[1608] 孵育条件:将5mL冷冻肝匀浆物的等分试样(蛋白质浓度=22.48mg/mL)解冻并且在37℃下孵育24小时。对于表1中的每种寡聚体,取六个eppendorf管(2mL)并且向各管中添加450μL匀浆物。向各管添加50μL ASO(200μM)。在混合之后立刻向一个管中添加125μL(5×)终止缓冲液(2.5%IGEPAL、0.5M NaCI、5mM EDTA、50mM Tris,pH=8.0)和12.5μL 20mg/mL蛋白酶K(Ambion,#AM2546),作为0小时时间点。在37℃下,在VWR孵育微板振荡器上于400rpm下振荡下孵育剩余的反应混合物。在孵育指定的时期(1、2、3、4和5天)之后,各混合物用125μL(5×)终止缓冲液(2.5%IGEPAL、0.5M NaCl、5mM EDTA、50mM Tris,pH=8.0)和12.5μL 20mg/mL蛋白酶K(Ambion,#AM2546)处理。

[1609] 处理(work up)和生物分析:使用ISIS 355868(5′-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT-3′)(一种27聚体寡核苷酸)(具有下划线的碱基是MOE修饰的)作为用于定量非对映体纯寡核苷酸的内标物。向每个管添加50μl内标物(200μM),随后添加250μL30%氢氧化铵、800μl苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)。在混合并且在600rpm下离心之后,在speed vac上将水层蒸发至100μl,并且装载于Sep Pak柱(C18,1g,WAT 036905)上。Sep pak柱的所有水性洗涤物都用快速离子交换方法测试以确保其中不存在产物。使用50%ACN(3.5ml)评估寡核苷酸和代谢物,并且用70%CAN(3.5)进一步洗涤柱以确保柱上未留下东西。每个序列收集5个级分。使用Visiprep系统(Sigma,产品型号:57031-U)进行水洗涤1、2、3、ACN1和2。

[1610] 离子交换方法

[1611]

	时间	流量 (ml/分钟)	%A	%B	曲线
	时间	1.0	95	5	
1	2	1.0	95	5	1
2	3	1.0	75	25	6
3	10	1.0	35	65	6
4	10.1	1.0	95	5	6
5	12.5	1.0	95	5	1

[1612] 缓冲液A＝10mM Tris HCl,50％ACN,pH＝8.0

[1613] 缓冲液B＝A+800mM NaClO4

[1614] 柱＝DNA pac 100

[1615] 柱温60℃

[1616] 使用与上述相同的缓冲液和缓冲线C中的50:50(甲醇:水),在每次运行(描述于M9-Exp21)后使用洗涤方法。

[1617]

	时间	流量(ml/分钟)	%A	%B	%C	曲线
	时间	1.0	0	0	100	
1	5.5	1.0	0	0	100	1
2	5.6	1.0	100	0	0	6
3	7.5	1.0	100	0	0	6
4	7.6	1.0	95	5	0	6
5	12.5	1.0	95	5	0	1

[1618] 将乙腈洗出液浓缩至干并且溶解在100μL水中以使用RPHPIPC进行分析。

[1619] 洗脱剂A＝10mM乙酸三丁铵,pH＝7.0

[1620] 洗脱剂B＝ACN(HPLC级,B&J)

[1621] 柱＝XTerra MS C18,3.5μm,4.6×50mm,产品型号:186000432

[1622] 保护柱来自Phenomenex,产品型号:KJ0-4282

[1623] 柱温60℃

[1624] HPLC梯度:

[1625]

	时间	流量(ml/分钟)	%A	%B	曲线
1		1.0	65	35	
2	5.0	1.0	65	35	1
3	30.0	1.0	40	60	6
4	35.0	1.0	5	90	6
5	36.0	1.0	65	35	6
6	40.0	1.0	65	35	1

[1626] 对于分析型RP HPLC,将10μl这种储备溶液添加到40μl水中并且进样40μl。

[1627] 表3.

[1628]

序列号	序列	描述
ONT-41	Gs5mCs5mCs Ts5mCsAs GsTs5mCs TsGs5mCs TsTs5mCs Gs5mCsAs 5mCs5mC	米泊美生
ONT-87	Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC	MOE-翼区-核心-翼区设计－(人) RNAse H底物1 5R-(SSR)$_3$-5R
ONT-154	Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC	全脱氧，(5S-(SSR)$_3$-5S)
ONT-70	Gs5mCsGsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5mCsTsTsGs5mCGsTsTsTsTsT	ISIS 355868用于量化米泊美生的内标物

[1629] 讨论：与野生型DNA和siRN相比，预期反义和siRNA中的2’修饰使这些分子稳定并且提高其在血浆和组织中的持久性。

[1630] 米泊美生中的2’-MOE翼区-核心-翼区设计。首次反义临床试验中使用的第一代反义寡核苷酸具有2’-脱氧核糖核苷酸残基和硫代磷酸酯核苷酸间键联。随后，开发了第二代反义寡核苷酸，其通常具有本文中称为“5-10-52’-MOE翼区-核心-翼区设计”的结构，其中每一端的5个残基是2’-O-甲氧基乙基(2’-MOE)修饰的残基，并且中间的10个残基是2’-脱氧核糖核苷酸；这样的寡核苷酸的核苷酸间键联是硫代磷酸酯。相对于第一代(PCT/US2005/033837)，这种“5-10-52’-MOE翼区-核心-翼区”寡核苷酸在效力上表现出显著的改善。设计了类似的翼区-核心-翼区基序如2-16-2、3-14-3、4-12-4或5-10-5以改善寡核苷酸对核酸酶的稳定性，同时保持用于RNA酶活性的足够DNA结构。

[1631] 手性纯寡核苷酸。本发明提供了手性纯寡核苷酸，并且尤其证明其内的或其本身的立体化学的选择可以改善寡核苷酸稳定性(即，不依赖于残基修饰，如2’MOE修饰)。事实上，本发明证明，与相应2’-修饰的立构无规硫代磷酸酯化合物相比，手性纯硫代磷酸酯寡核苷酸可以提供相同的或更好的稳定性。

[1632] 在一些实施方案中，测试的手性纯寡核苷酸在立体化学方面具有通式结构X-Y-X，其中，其包含在核心“Y”(其中立体化学可变)的侧翼的翼区“X”区域(通常长度为约1至10个残基，其中所有残基具有相同的立体化学)。在许多实施方案中，在测试的所述寡核苷酸中约20-50％的核苷酸类似物不是RNase H的底物。控制DNA中硫代磷酸酯的立体化学的能力使我们能够保护寡聚体不被核酸酶降解，同时保持RNase活性位点。这些设计中的一种是ONT-154，其中寡核苷酸的翼区通过Sp硫代磷酸酯化学而稳定，并且保留了少量Rp硫代磷酸酯，其为RNase H的更好的底物(Molecular Cell，2007)。与DNA/RNA双链体复合的人RNase H的结晶结构表明，酶的磷酸酯结合口袋与DNA的四个连续磷酸酯接触。前三个接触似乎比

第四个更强，并且其偏好这三个磷酸酯中每一个的Pro-R/Pro-R/Pro-S氧原子。来自Sp立体化学的稳定性优点与RNase H活性位点结合，可以设计多种序列以竞争和/或改善2'-修饰。从来自比较米泊美生(ONT-41)与具有和不具有2'-修饰的我们的合理(手性控制)设计(ONT-87和ONT-154)的大鼠肝匀浆物稳定性实验(表1和图1)，明显的是通过移除2'-修饰以及利用Rp和Sp磷酸酯的仔细手性控制，我们可以改善这些寡核苷酸的稳定性，其随后影响体内效力。

[1633] 表4.用于大鼠全肝匀浆物稳定性的Hu chiromersen研究

序列	描述	靶标	Tm (°C)
ONT-41	Gs5mCs5mCs Ts5mCsAs GsTs5mCs TsGs5mCs TsTs5mCs Gs5mCsAs 5mCs5mC	Hu ApoB	80.7

[1634]

ONT-75	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	85.0
ONT-77	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	79.9
ONT-80	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	75.8
ONT-81	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	80.7
ONT-87	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	82.4
ONT-88	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	78.9
ONT-89	**Gs5mCs5mCsTs5mC**sAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs**Gs5mCsAs5mCs5mC**	Hu ApoB	80.9
ONT-70	Gs5mCsGsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5mCsTsTsGs5mCGsTsTsTsTsTsT	ISIS 355868 内标物	

[1635] 表5.用于大鼠全肝匀浆物稳定性的小鼠chiromersen研究

[1636]

序列	描述	靶标
ONT-83	**GsTs5mCs5mCs5mCs**TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs**AsAsTsGs5mC**	小鼠 ApoB
ONT-82	**GsTs5mCs5mCs5mCs**TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs**AsAsTsGs5mC**	小鼠 ApoB
ONT-84	**GsTs5mCs5mCs5mCs**TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs**AsAsTsGs5mC**	小鼠 ApoB
ONT-85	**GsTs5mCs5mCs5mCs**TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs**AsAsTsGs5mC**	小鼠 ApoB
ONT-86	**GsTs5mCs5mCs5mCs**TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs**AsAsTsGs5mC**	小鼠 ApoB

[1637] 实施例2.示例性的手性控制的siRNA分子

[1638] 表1.与h-Ago-2和h-Ago-1的磷酸二酯极性相互作用的总结

[1639]

Science 2012 hAgo-2

磷酸酯*	残基	长度/Å	构型
2	Asn551	2.7	Pro(S)
	Gln548	2.9	Pro(S)
3	Lys566	3.1	Pro(R)
	Arg792	3.4	Pro(R)
4	Tyr790	2.6	Pro(R)
	Arg792	3.0	Pro(R)
		2.8	Pro(R)
		3.4	Pro(S)
5	Ser798	2.7	Pro(R)
		2.9	Pro(R)
	Tyr804	2.8	Pro(S)
6	Lys709	3.0	Pro(S)
	Arg761	2.9	Pro(R)
	His753	2.8	Pro(R)
7	Arg714	2.9	Pro(R)
		3.0	Pro(R)
	Arg761	3.0	Pro(S)

*从S' 端的磷酸酯编号

Cell 2012 hAgo-2

磷酸酯	残基	长度/Å	构型
2	Asn551	2.7	Pro(S)
	Gln548	3.1	Pro(S)
	Gln548	2.9	Pro(R)
3	Lys566	2.9	Pro(R)
	Arg792	3.3	Pro(R)
4	Tyr790	2.8	Pro(R)
	Arg792	2.8	Pro(R)
5	Ser798	2.6	Pro(R)
		2.9	Pro(R)
	Tyr804	2.5	Pro(S)
6	Lys709	3.2	Pro(S)
	Arg761	2.8	Pro(R)
	His753	3.0	Pro(R)
7	Arg714	2.8	Pro(R)
		3.1	Pro(R)
	Arg761	2.8	Pro(S)
8	Arg761	2.4	Pro(S)
	Ala221	3.5	Pro(R)
9	Arg351	2.2	Pro(R)
10	Arg710	2.5	Pro(R)
18	无接触		
19	Tyr311	3.1	Pro(R)
	Arg315	2.8	Pro(R)
20	His271	3.1	Pro(R)
	His319	3.4	Pro(S)
	Tyr311	2.2	Pro(S)

Cell Rep 2013, h-Ago-1†

磷酸酯	残基	长度/Å	构型
2	Asn549	2.7	Pro(S)
	Gln546	2.9	Pro(S)
		2.8	Pro(R)
2	Lys564	2.9	Pro(R)
	Arg790	3.4	Pro(R)
		3.3	Pro(R)
4	Try788	2.7	Pro(R)
	Arg790	3.3	Pro(R)
5	Ser796	2.5	Pro(R)
		2.8	Pro(R)
	Tyr802	2.6	Pro(S)
6	Lys707	2.8	Pro(S)
	Arg759	2.7	Pro(R)
	His751	3.0	Pro(R)
7	Arg712	3.1	Pro(S)
		3.3	Pro(S)
	Arg373	3.4	Pro(R)
	Thr757	2.9	Pro(R)
	Arg759	2.2	Pro(S)
8	His710	3.4	Pro(R)
	Ser218	2.7	Pro(R)
9	Arg349	3.5	Pro(R)
	Arg708	2.9	Pro(S)
10	Arg708	3.2	Pro(R)
		2.9	Pro(R)
21	Tyr309	2.6	Pro(S)
	Tyr314	2.6	Pro(S)
	His269	3.0	Pro(R)

†与h-let-7 22聚体复合

[1640] 尽管本领域中教导了相反情况,但是本发明认识到,核苷酸间键联的立体化学可用于通过手性控制的寡核苷酸组合物来提高寡核苷酸的稳定性和活性。如本公开内容中证明的,这样的手性控制的寡核苷酸组合可提供比手性未控制的寡核苷酸更好的结果。

[1641] 与人Argonaute-2蛋白(hAg02)复合的RNA具有两种报道的结晶结构:The Crystal Structure of Human Argonaute-2,Science,2012(PDB-4ei3);和The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a Cell,2012 PDB-4f3t)。另外,与人Argonaute-1蛋白(hAgo-1)复合的Let-7 RNA具有一种报道的结晶结构:The Making of a Slicer:Activation of Human Argonaute-1,Cell Rep.2013(PDB-4krf)。

[1642] 基于这些出版物中包含的信息,如果磷酸二酯键被替换成硫代磷酸酯键,预期可以判断核苷酸间磷酸酯键联处的立体化学的有利偏好。这些优点可涉及显著改善的效力、

稳定性和其他药理性质。考虑到这些，使用计算机程序Pymol来定位蛋白质与所有三种结构的结晶RNA的核苷酸间磷酸二酯键联之间的所有极性相互作用。忽略在超过3.5Å距离处的极性相互作用。

[1643] 该分析的结果总结在表1中。基于以下假设将来自RNA上磷酸二酯骨架的特定磷原子指定为Pro(R)或Pro(S)构型：在硫代磷酸二酯类似物中，可以在氨基酸残基上的极性基团和友好(respectful)的磷酸酯氧原子之间的产生非常类似的键。因此，硫取代(而不是非桥氧)可以在基序内的磷原子上赋予独特的立体化学((Sp)或(Rp)绝对构型)。

[1644] 已知在与RNA的复合物中，hAgo-2的两种结构之间极好吻合。另外，在与RNA的复合物中，hAgo-I与hAgo-2的结构极好吻合，表明RNA分子采用的构象在这两种蛋白质之间是高度保守的。基于该分析结果形成的任何结论和规则可能对于这两种蛋白质分子都有效。

[1645] 可以看到，除了磷酸酯位置9和10的磷酸二酯和hAgo-2(Cell 2012)之间的那些分别通过与Arg351和Arg710键合而采用了唯一Pro(Rp)偏好之外，在任意一个磷酸二酯键基团上通常具有超过一个极性相互作用。

[1646] 但是，较短的距离(对应于较强相互作用)以及每个氧的键的数目可以提示Pro(Rp)或Pro(Sp)氧的主要相互作用：因此导致主要是一种或另一种立体化学类型的多种相互作用。该组中是在磷酸酯位置2(Sp)、3(Rp)、4(Rp)、6(Rp)、8(Sp)、19(Rp)、20(Sp)和21(Sp)处的磷酸二酯之间的相互作用。

[1647] 在其余的相互作用中，似乎没有出现对于待采用的一种特定立体化学相对于另一种的偏好性，因此优选的立体化学可以是(Sp)或(Rp)。

[1648] 在这一类中是在磷酸酯位置5(Rp或Sp)和7(Rp或Sp)处的磷酸二酯之间形成的相互作用。

[1649] 对于在其他磷酸酯骨架处的相互作用，没有结晶结构信息，所以在实验数据表明相反情况之前这些位置的立体化学可以类似地为(Rp)或(Sp)。

[1650] 为此，表6包含了多种非限制性的示例性siRNA通式结构，其可以设想为在独立硫代磷酸二酯基序处利用了对于立体化学的这种偏好。

[1651] 表6.示例性通式siRNA构建体

[1652]

PS*	手性控制的反义链构建体					
2	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)
3	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)
4	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
5	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
6	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
7	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
8	(Sp)	(Rp)	PO	PO	(Sp)	(Rp)
9	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
10	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
11	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
12	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
13	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
14	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
15	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
16	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
17	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
18	(Rp)或(Sp)	(Sp)或(Rp)	PO	PO	PO	PO
19	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
20	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)
21	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)

[1653] ＊数字表示从siRNA的反义链的5’端开始的磷酸酯位置(例如,#2是核苷酸1和2之间的位置,#21是核苷酸20和21之间的位置)。(Sp)和(Rp)表示在所指出位置的硫代磷酸(PS)二酯核苷酸间键联上的磷原子的立体化学。PO表示所指出位置的磷酸二酯核苷酸间键联。

[1654] 示例性siRNA包括但不限于对于siRNA复合物的反义链3’端和5’端的手性硫代磷酸酯具有Sp构型的siRNA,其赋予了在人血清或生物学流体中空前提高的稳定性。对于siRNA双链体的反义链3’端和5’端的手性硫代磷酸酯的相同Sp构型赋予了空前提高的生物学效力,其由导致RISC RNAi沉默复合物中的活性提高的对于Ago2蛋白提高的亲和力引起。

[1655] 在一个实施方案中,在沿着siRNA分子的反义链或有义链的每一个位置处独立引入单个手性硫代磷酸酯。对于21聚体,这提供了80个独特的序列,其具有(Sp)或(Rp)手性控制的硫代磷酸酯基团。当分别形成双链体时,制备了1600种独特的siRNA组合。

[1656] 手性siRNA分子的siRNA转染

[1657] 在96孔板中以2.0×10^4个细胞/孔的密度反转染Hep3B或HeLa细胞。利用lipofectamine RNAiMax(Life Technologies,cat.No.13778-150)使用制造商的方案进行siRNA的转染,只是Lipofectamine RNAiMax的降低量为0.2μl/孔。从1μM开始,产生十二种1:3siRNA双链体稀释。然后将10μl 10×siRNA双链体与制备的每孔9.8μl无血清培养基和

0.2μl Lipofectamine RNAiMax的混合物脂质复合(lipoplexed)。孵育10-15分钟后,添加80μl EMEM细胞生长培养基(ATCC,30-2003)中的2.0×10^4个细胞以达到每孔100μl的最终体积。每个剂量进行两次独立的转染事件。

[1658] 转染24小时后,将Hep3B或HeLa细胞裂解并且使用MagMAX™-96总RNA分离试剂盒(Life Technologies,AMI 830)纯化siRNA靶向的mRNA;利用具有RNA酶抑制剂的大容量cDNA逆转录试剂盒(Life Technologies,4374967)合成15μl cDNA。使用Probes Master Mix(Roche,04 707 494 001)根据制造商方案,通过实时PCR在Lightcycler 480(Roche)上评价基因表达。

[1659] IC50和数据分析

[1660] 使用Δ ΔCt法计算值。将样品相对于hGAPDH归一化并且校准以模拟经转染的和未处理的样品。使用立构无规分子作为对照。数据使用Graphpad Prism表示为两个生物学重复的平均值。将四参数线性回归曲线拟合于数据,并且底部和顶部分别限制为0和100常数以计算相对IC50。

[1661] 本实施例证明了使用包含本文中所述的手性控制的寡核苷酸的siRNA剂成功抑制靶基因的表达。特别地,本实施例描述了通过本文中所述手性控制的合成制备的个体寡核苷酸链的杂交,从而提供了双链手性控制的siRNA寡核苷酸组合物。本实施例还证明,这样的试剂成功转染细胞,而且成功抑制靶基因表达。

[1662] 具有立体控制的硫代磷酸二酯键联的人PCSK9 siRNA双链体在人血清中的体外代谢稳定性

[1663] 在37℃下将10μM SiRNA双链体在90%人血清(50μL,Sigma,H4522)中孵育24小时。制备0分钟时间点(50μL)和PBS对照孵育时间点(50μL),此时在37℃下将10μM SiRNA双链体在90%1×PBS(50μL)中孵育24小时。在孵育结束后,向每个时间点添加10μL终止溶液(0.5M NaCl,50mM TRIS,5mM EDTA,2.5%IGEPAL),接着3.2μL蛋白酶K(20mg/mL,Ambion)。将样品在60℃下孵育20分钟,然后以2000rpm离心15分钟。最终的反应混合物在变性IEX HPLC(进样体积50μL)中直接分析。使用24小时和0分钟的整合面积确定每种siRNA降解的%。

[1664] 观察到siRNA反义链和有义链二者的位置21(3'端)处的单个硫代磷酸酯的立体化学构型对在人血清中孵育的双链体的稳定性具有重要影响(图1)。如图1中所示以及如按照降解样式的整合比例确定的,(gp,Rp)siRNA双链体在24小时后表现出显著的55.0%的降解。立构无规siRNA中硫代磷酸酯的立构无规混合物在24小时后表现出25.2%的降解。(Sp/Sp)siRNA在24小时后仅表现出小的7.3%的降解。这说明了硫代磷酸酯立体化学赋予治疗性siRNA的显著影响。图2、图3、图4和图5中示出了额外的示例性数据。

[1665] 观察到,根据硫代磷酸酯基序沿着骨架的位置,每一种立体纯构建体表型出不同的效力(IC50值)。还观察到,根据任意单个位置的硫代磷酸酯基序是(Sp)还是(Rp)获得了不同IC50值。使用上述人血清或人肝细胞液提取物或蛇毒磷酸二酯酶或者分离的内切酶或分离的外切酶,立体化学对稳定性的影响同样清楚和不同。

[1666] 可以基于上述实施例中获得的数据阐述某些设计规则。如下文中示例的,这些设计信息可应用于在siRNA的反义链和/或有义链中引入多个手性硫代磷酸酯键联。本发明认识到,siRNA的反义链和/或有义链中在正确位置引入并且具有正确立体化学构型的提高量的手性硫代磷酸酯导致在效力和体外代谢稳定性方面极大改善的siRNA构建体——转化成

药理学上极大增强的治疗性siRNA。

[1667] 靶向PCSK9的示例性手性控制的siRNA寡核苷酸

[1668] 前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶(proprotein convertase subtilisin)/kexin类型9(PCSK9)是参与胆固醇代谢的酶。PCSK9与低密度脂蛋白(LDL)的受体结合,引发其降解。尽管破坏受体时与受体缔合的LDL也被消除,PCSK9结合的净效应实际上提高了LDL水平,因为受体可以其他方式循环回到细胞表面并且移除更多胆固醇。

[1669] 多个公司在开发靶向PCSK9的治疗剂。与本公开内容特别相关的是,Isis Pharmaceuticals、Santaris Pharma和Alnylam Pharmaceuticals各自开发抑制PCSK9的核酸剂。已经示出Isis Pharmaceuticals产品(一种反义寡核苷酸)在小鼠中提高LDLR的表达并且降低循环总胆固醇水平(Graham等"Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice".J.Lipid Res.48(4):763-7,April 2007)。利用Alnylam Pharmaceuticals产品ALN-PCS进行的最初临床试验表明,RNA干扰提供了用于抑制PCSK9的有效机制(Frank-Kamenetsky等"Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates".Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.105(33):11915-20,2008年8月)。

[1670] 在一些实施方案中,尽管已知结果相反,本发明认识到,可合理设计一种或另一种立体化学构象的硫代磷酸酯基序以利用手性控制的寡核苷酸组合物的提高的效力、稳定性和其他药理学品质。为了强化该理念,基于靶向PCSK9信使RNA的siRNA序列,表3包含示例性的立体化学纯的构建体。

[1671] 在该示例性实施方案中,在沿着siRNA分子的反义链或有义链的每个位置独立引入单个手性硫代磷酸酯基序。对于21聚体,这提供了80种不同序列,其具有(Sp)或(Rp)手性控制的硫代磷酸酯基团。当独立形成双链体时,制备了1600种独特的siRNA组合。

[1672] 在另一些示例性实施方案中,在沿着siRNA分子的反义链或有义链的每个位置处独立引入单个手性硫代磷酸酯基序,同时3'-(Sp)硫代磷酸酯键联是保守的。对于21聚体,这提供了另外80种独特的序列,其具有(Sp)或(Rp)手性控制的硫代磷酸酯基团。当独立形成双链体时,制备了1600种独特的siRNA组合。

[1673] 在另一些实施方案中,根据表7中所述的编码在沿着siRNA分子的反义链或有义链的多个位置独立引入多个手性硫代磷酸酯基序,同时3'-(Sp)硫代磷酸酯键联是保守的。

[1674] 表7.PCSK-9有义和反义RNA的实例

	PCSK9 siRNA有义链
PCSK9 (1)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuudT*s*dT
PCSK9 (2)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuudT*s*dT
PCSK9 (3)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuusdTdT

[1675]

PCSK9 (4)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGcuusdTdT
PCSK9 (5)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGcusudTdT
PCSK9 (6)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGcusudTdT
PCSK9 (7)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGcsuudTdT
PCSK9 (8)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGcsuudTdT
PCSK9 (9)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuuGscuudTdT
PCSK9 (10)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuuGscuudTdT
PCSK9 (11)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuuusGcuudTdT
PCSK9 (12)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuuusGcuudTdT
PCSK9 (13)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuuusuGcuudTdT
PCSK9 (14)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuuusuGcuudTdT
PCSK9 (15)	(*Rp*)- uucuAGAccuGuusuuGcuudTdT
PCSK9 (16)	(*Sp*)- uucuAGAccuGuusuuGcuudTdT
PCSK9 (17)	(*Rp*)- uucuAGAccuGusuuuGcuudTdT
PCSK9 (18)	(*Sp*)- uucuAGAccuGusuuuGcuudTdT
PCSK9 (19)	(*Rp*)- uucuAGAccuGsuuuuGcuudTdT
PCSK9 (20)	(*Sp*)- uucuAGAccuGsuuuuGcuudTdT
PCSK9 (21)	(*Rp*)- uucuAGAccusGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (22)	(*Sp*)- uucuAGAccusGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (23)	(*Rp*)- uucuAGAccsuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (24)	(*Sp*)- uucuAGAccsuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (25)	(*Rp*)- uucuAGAcscuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (26)	(*Sp*)- uucuAGAcscuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (27)	(*Rp*)- uucuAGAsccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (28)	(*Sp*)- uucuAGAsccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (29)	(*Rp*)- uucuAGsAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (30)	(*Sp*)- uucuAGsAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (31)	(*Rp*)- uucuAsGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (32)	(*Sp*)- uucuAsGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (33)	(*Rp*)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT

[1676]

PCSK9 (34)	(*Sp*)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (35)	(*Rp*)- uucsuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (36)	(*Sp*)- uucsuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (37)	(*Rp*)- uuscuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (38)	(*Sp*)- uuscuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (38)	(*Rp*)- usucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (40)	(*Sp*)- usucuAGAccuGuuuuGcuudTdT

[1677] 注:小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;"s"表示硫代磷酸酯部分。

[1678] 具有多个手性硫代磷酸酯核苷酸间键联和完全手性硫代磷酸酯核苷酸间键联的人PCSK9 siRNA反义链的合成实例。

[1679]

	人**PCSK9 siRNA**反义链
PCSK9 (41)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (42)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (43)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAsdTdT
PCSK9 (44)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAsdTdT
PCSK9 (45)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAsAdTdT
PCSK9 (46)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAsAdTdT
PCSK9 (47)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGsAAdTdT
PCSK9 (48)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGsAAdTdT
PCSK9 (49)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAsGAAdTdT
PCSK9 (50)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAsGAAdTdT
PCSK9 (51)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCusAGAAdTdT
PCSK9 (52)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCusAGAAdTdT
PCSK9 (53)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUCsuAGAAdTdT
PCSK9 (54)	(*Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCsuAGAAdTdT
PCSK9 (55)	(*Rp*)- AAGcAAAAcAGGUsCuAGAAdTdT

[1680]

PCSK9 (56)	(*S*p)- AAGcAAAAcAGGUsCuAGAAdTdT
PCSK9 (57)	(*R*p)- AAGcAAAAcAGGsUCuAGAAdTdT
PCSK9 (58)	(*S*p)- AAGcAAAAcAGGsUCuAGAAdTdT
PCSK9 (59)	(*R*p)- AAGcAAAAcAGsGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (60)	(*S*p)- AAGcAAAAcAGsGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (61)	(*R*p)- AAGcAAAAcAsGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (62)	(*S*p)- AAGcAAAAcAsGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (63)	(*R*p)- AAGcAAAAcsAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (64)	(*S*p)- AAGcAAAAcsAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (65)	(*R*p)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (66)	(*S*p)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (67)	(*R*p)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (68)	(*S*p)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (69)	(*R*p)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (70)	(*S*p)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (71)	(*R*p)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (72)	(*S*p)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (73)	(*R*p)- AAGcsAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (74)	(*S*p)- AAGcsAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (75)	(*R*p)- AAGscAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (76)	(*S*p)- AAGscAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (77)	(*R*p)- AAsGcAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (78)	(*S*p)- AAsGcAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (77)	(*R*p)- AsAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (78)	(*S*p)- AsAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTdT
PCSK9 (79)	(*R*p, *S*p)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAsdTsdT
PCSK9 (80)	(*S*p, *S*p)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAsdTsdT
PCSK9 (81)	(*R*p, *S*p)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAsAdTsdT
PCSK9 (82)	(*S*p, *S*p)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAsAdTsdT
PCSK9 (83)	(*R*p, *S*p)- AAGcAAAAcAGGUCuAGsAAdTsdT

[1681]

PCSK9 (84)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAGsAAdTsdT
PCSK9 (85)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAsGAAdTsdT
PCSK9 (86)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCuAsGAAdTsdT
PCSK9 (87)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCusAGAAdTsdT
PCSK9 (88)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCusAGAAdTsdT
PCSK9 (89)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCsuAGAAdTsdT
PCSK9 (90)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUCsuAGAAdTsdT
PCSK9 (91)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUsCuAGAAdTsdT
PCSK9 (92)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGUsCuAGAAdTsdT
PCSK9 (93)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGsUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (94)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGGsUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (95)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGsGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (96)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAGsGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (97)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAsGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (98)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcAsGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (99)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAcsAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (100)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAcsAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (101)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (102)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (103)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (104)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (105)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (106)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (107)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (108)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (109)	(*Rp*, *Sp*)- AAGcsAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (110)	(*Sp*, *Sp*)- AAGcsAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (111)	(*Rp*, *Sp*)- AAGscAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (112)	(*Sp*, *Sp*)- AAGscAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (113)	(*Rp*, *Sp*)- AAsGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT

[1682]

PCSK9 (114)	(*Sp*, *Sp*)- AAsGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (115)	(*Rp*, *Sp*)- AsAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (116)	(*Sp*, *Sp*)- AsAGcAAAAcAGGUCuAGAAdTsdT
PCSK9 (117)	(*Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*)- AsAsGscAsAAsAscsAGGUCuAGAsAsdTsdT
PCSK9 (118)	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*)- AsAsGscAsAAsAscsAGGUCuAGAsAsdTsdT

[1683] 注:小写字母表示2'-OMe RNA残基;大写字母表示RNA残基;d=2'-脱氧残基;"s"表示硫代磷酸酯部分。

[1684] 实施例3.立体纯FOXO-1反义类似物

[1685] 合理设计——手性控制的反义寡核苷酸组合物

[1686] 在体内和Sp手性核苷酸间键联的全大鼠肝匀浆物模型中确定的空前的核酸酶稳定性应用于新型RNaseH底物间隔聚体的新设计中,借此使外部侧翼由未经修饰DNA构成,并且内部间隔核心被2'化学修饰(2'OMe、2'MOE、2'LNA、2'F等)所修饰。最终这种设计延伸至完全未修饰的DNA治疗性寡聚体,其中硫代硫酸酯骨架的仔细的手性控制赋予RNaseH治疗性寡聚体以期望的药理学特性。

[1687] 在研究人RNaseH的结晶结构后,还应用了设计的三联体磷酸酯重复基序。RNaseH的结晶结构之前已经公开(Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid:Insight into HIV Reverse Transcription,Nowotny等,Molecular Cell,第28卷,第2期,264-276,2007,pdb文件:2qkb)。尤其地,本发明认识了寡核苷酸的核苷酸间键联立体化学的重要性,例如在本文中的环境中。在使用程序Pymol对该结构进行计算机模拟分析(in silico analysis)之后,申请人发现,人RNase H1的磷酸酯结合口袋与复合的DNA的三个连续磷酸酯极性接触,并且优先与这三个磷酸酯中每一个的Pro-R/Pro-R/Pro-S(或与Pro-S/Pro-S/Pro-R)各氧原子相互作用。基于该观察,我们设计了具有重复(RRS)和(SSR)三联体硫代磷酸酯基序的两种手性结构作为设计的RNase H底物。申请人还设计了其他核苷酸间键联立体化学样式。如通过本文中提供的示例性结果证明的,提供的包含某些骨架核苷酸间键联样式(样式骨架手性中心)寡核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物提供了显著提高的活性和/或动力学。尤其,5'-RSS-3'骨架手性中心的序列特别可用并且导致了本公开内容中所述的出人意料的结果。

[1688] 提高的Sp手性骨架(对于酶稳定性和其他药理学有利的特性)和(RRS)或(SSR)重复三联体手性骨架基序(用于增强作为RNase H底物的特性)的组合也用于该新设计;"S"表示Sp-硫代磷酸酯键联,"R"表示Rp-硫代磷酸酯键联。

[1689] 另一种替代设计是基于延伸的重复基序中提高量的Sp手性硫代磷酸酯骨架,例如:

[1690] (SSSR)n,SR(SSSR)n,SSR(SSSR)n,SSR(SSSR)n;

[1691] (SSSSR)n,SR(SSSSR)n,SSR(SSSSR)n,SSR(SSSSR)n,SSSR(SSSSR)n;

[1692] (SSSSSR)n;SR(SSSSSR)n,SSR(SSSSSR)n,SSR(SSSSSR)n,SSSR(SSSSSR)n,SSSSR(SSSSSR)n;等,其中根据各自核苷酸间键联的数目,n=0-50;"S"表示Sp-硫代磷酸酯键联,"R"表示Rp-硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,n是0。在一些实施方案中,R是1-50。在一些实施方案中,R是1。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含本文中所述的基序。在一些实施方案中,基序在核心区域中。在一些实施方案中,n是0。在一些实施方案中,R是1-50。在一些实施方案中,R是1。在一些实施方案中,n是2。在一些实施方案中,n是3。在一些实施方案中,n是4。在一些实施方案中,n是5。

[1693] 另一种替代设计是基于立体骨架的"反转"结构设计("立体反转聚体")。这些由手性硫代磷酸酯以反转方式定位造成,暴露出寡核苷酸的5'和3'端末端的一些富含Sp的基序以及寡核苷酸的中间部分,并且在两侧具有反转成像方式定位的重复立体化学基序,例如:

[1694] SS(SSR)n(SSS)(RSS)nSS;

[1695] SS(SSR)n(SRS)(RSS)nSS;

[1696] SS(SSR)n(SSR)(RSS)nSS;

[1697] SS(SSR)n(RSS)(RSS)nSS;

[1698] SS(RSS)n(SSS)(SSR)nSS;

[1699] SS(RSS)n(SRS)(SSR)nSS;

[1700] SS(RSS)n(SSR)(SSR)nSS;

[1701] SS(RSS)n(RSS)(SSR)nSS;等

[1702] 其中根据各自核苷酸间键联的数目,n=0-50;“S”表示Sp-硫代磷酸酯键联,“R”表示Rp硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式包含本文中所述的基序。在一些实施方案中,基序在核心区域中。在一些实施方案中,n是0。在一些实施方案中,n是1。在一些实施方案中,n是1-50。在一些实施方案中,n是2。在一些实施方案中,n是3。在一些实施方案中,n是4。在一些实施方案中,n是5。

[1703] 初筛

[1704] 合成:DNA/RNA合成仪MerMade-12上的寡核苷酸合成的总结(2’-脱氧和2’-OMe循环)

[1705]

步骤	反应	试剂	递送体积（mL）	等待时间（秒）
1	脱三苯甲基化	DCM 中 3% TCA	4×1	N. A.
2	偶联	ACN 中的 0.15 M 亚磷酰胺+ ACN 中的 0.45 M ETT	2×0.5 mL	60 + 60（DNA），300 + 300（2’-OMe RNA）
3	加帽	THF/2,6-卢剔啶中的 5% Pac_2O+ THF 中的 16% NMI	1	60
4	氧化	水/吡啶中的 0.02 碘	1	240

[1706] 具有DNA-2’-OMe-DNA(7-6-7)设计的立构无规PS寡核苷酸:

ONT-141	d(CsCsCsTsCsTsGs)gsaststsgsasd(GsCsAsTsCsCsA)
ONT-142	d(AsAsGsCsTsTsTs)gsgststsgsgsd(GsCsAsAsCsAsC)
ONT-143	d(AsGsTsCsAsCsTs)tsgsgsgsasgsd(CsTsTsCsTsCsC)
ONT-144	d(CsAsCsTsTsGsGs)gsasgscststsd(CsTsCsCsTsGsG)
ONT-145	d(AsTsAsGsCsCsAs)tstsgscsasgsd(CsTsGsCsTsCsA)
ONT-146	d(TsGsGsAsTsTsGs)asgscsastscsd(CsAsCsCsAsAsG)
ONT-147	d(CsCsAsTsAsGsCs)csaststsgscsd(AsGsCsTsGsCsT)
ONT-148	d(GsTsCsAsCsTsTs)gsgsgsasgscsd(TsTsCsTsCsCsT)
ONT-149	d(CsCsAsGsGsGsCs)ascstscsastsd(CsTsGsCsAsTsG)
ONT-150	d(GsCsCsAsTsCsCs)asasgstscsasd(CsTsTsGsGsGsA)
ONT-151	d(GsAsAsGsCsTsTs)tsgsgststsgsd(GsGsCsAsAsCsA)
ONT-152	d(CsTsGsGsAsTsTs)gsasgscsastsd(CsCsAsCsCsAsA)
ONT-183	d(CsAsAsGsTsCsAs)cststsgsgsgsd(AsGsCsTsTsCsT)
ONT-184	d(AsTsGsCsCsAsTs)cscsasasgstsd(CsAsCsTsTsGsG)
ONT-185	d(AsTsGsAsGsAsTs)gscscstsgsgsd(CsTsGsCsCsAsT)
ONT-186	d(TsTsGsGsGsAsGs)cststscstscsd(CsTsGsGsTsGsG)
ONT-187	d(TsGsGsGsAsGsCs)tstscstscscsd(TsGsGsTsGsGsA)
ONT-188	d(TsTsAsTsGsAsGs)astsgscscstsd(GsGsCsTsGsCsC)
ONT-189	d(GsTsTsAsTsGsAs)gsastsgscscsd(TsGsGsCsTsGsC)
ONT-190	d(CsCsAsAsGsTsCs)ascststsgsgsd(GsAsGsCsTsTsC)
ONT-191	d(AsGsCsTsTsTsGs)gststsgsgsgsd(CsAsAsCsAsCsA)
ONT-192	d(TsAsTsGsAsGsAs)tsgscscstsgsd(GsCsTsGsCsCsA)
ONT-193	d(TsGsTsTsAsTsGs)asgsastsgscsd(CsTsGsGsCsTsG)
ONT-194	d(AsTsCsCsAsAsGs)tscsascststsd(GsGsGsAsGsCsT)
ONT-195	d(GsGsGsAsAsGsCs)tststsgsgstsd(TsGsGsGsCsAsA)
ONT-196	d(CsTsCsCsAsTsCs)csastsgsasgsd(GsTsCsAsTsTsC)
ONT-197	d(AsAsGsTsCsAsCs)tstsgsgsgsasd(GsCsTsTsCsTsC)
ONT-198	d(CsCsAsTsCsCsAs)asgstscsascsd(TsTsGsGsGsAsG)
ONT-199	d(TsCsCsAsAsGsTs)csascststsgsd(GsGsAsGsCsTsT)
ONT-200	d(CsCsTsCsTsGsGs)aststsgsasgsd(CsAsTsCsCsAsC)
ONT-201	d(AsCsTsTsGsGsGs)asgscststscsd(TsCsCsTsGsGsT)
ONT-202	d(CsTsTsGsGsGsAs)gscststscstsd(CsCsTsGsGsTsG)
ONT-203	d(CsAsTsGsCsCsAs)tscscsasasgsd(TsCsAsCsTsTsG)
ONT-204	d(TsGsCsCsAsTsCs)csasasgstscsd(AsCsTsTsGsGsG)
ONT-205	d(TsCsCsAsTsCsCs)astsgsasgsgsd(TsCsAsTsTsCsC)
ONT-206	d(AsGsGsGsCsAsCs)tscsastscstsd(GsCsAsTsGsGsG)
ONT-207	d(CsCsAsGsTsTsCs)cststscsastsd(TsCsTsGsCsAsC)
ONT-208	d(CsAsTsAsGsCsCs)aststsgscsasd(GsCsTsGsCsTsC)
ONT-209	d(TsCsTsGsGsAsTs)tsgsasgscsasd(TsCsCsAsCsCsA)
ONT-210	d(GsGsAsTsTsGsAs)gscsastscscsd(AsCsCsAsAsGsA)

[1707]

[1708] 初始DNA-2'-OMe-DNA(7-6-7)设计在HepG2细胞中的生物学体外数据:(d大写字母)=DNA;小写字母=2'-OMe:s=硫代磷酸酯。

FOXO1

[1709]

	20nM的水平 (%)	SD
ONT-141	89	6
ONT-142	45	1
ONT-143	98	2
ONT-144	89	1
ONT-145	46	5
ONT-146	99	1
ONT-147	66	6
ONT-148	101	2
ONT-149	95	6
ONT-150	58	4
ONT-151	41	5
ONT-152	84	5
ONT-183	95	2
ONT-184	58	4
ONT-185	42	2
ONT-186	96	4
ONT-187	92	3
ONT-188	47	5
ONT-189	63	5
ONT-190	83	2
ONT-191	58	4
ONT-192	46	2
ONT-193	58	2
ONT-194	76	1
ONT-195	66	0
ONT-196	77	2
ONT-197	90	6
ONT-198	42	4
ONT-199	68	1
ONT-200	89	6
ONT-201	91	2
ONT-202	94	2
ONT-203	86	1
ONT-204	58	2
ONT-205	75	3
ONT-206	94	5
ONT-207	96	0
ONT-208	54	0
ONT-209	87	4
ONT-210	92	4

[1710]

FOXO1		
	200nM的水平 (%)	SD
ONT-141	37	4
ONT-142	45	4
ONT-143	46	2
ONT-144	42	5
ONT-145	53	4
ONT-146	31	2
ONT-147	28	8
ONT-148	45	4
ONT-149	29	5
ONT-150	32	6
ONT-151	38	4
ONT-152	30	5
ONT-183	60	5
ONT-184	34	2
ONT-185	50	2
ONT-186	86	3
ONT-187	76	6
ONT-188	50	5
ONT-189	38	2
ONT-190	51	1
ONT-191	43	5
ONT-192	54	7
ONT-193	41	6
ONT-194	50	1
ONT-195	43	6
ONT-196	33	7
ONT-197	57	4
ONT-198	40	5
ONT-199	50	5
ONT-200	28	9
ONT-201	46	6
ONT-202	57	9
ONT-203	27	7
ONT-204	36	6
ONT-205	29	5
ONT-206	81	0
ONT-207	37	4
ONT-208	43	3
ONT-209	35	4
ONT-210	40	4

[1711] 具有2'-OMe-DNA-2'OMe(3-14-3)设计立构无规的PS寡核苷酸:(d大写字母)=DNA;小写字母=2'-OMe:s=硫代磷酸酯。

ONT-129	cscscsd(TsCsTsGsGsAsTsTsGsAsGsCsAsTs)cscsa
ONT-130	asasgsd(CsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAs)csasc
ONT-131	asgstsd(CsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTsTsCs)tscsc
ONT-132	csascsd(TsTsGsGsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCs)tsgsg
ONT-133	astsasd(GsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCs)tscsa
ONT-134	tsgsgsd(AsTsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAsCsCs)asasg
ONT-135	cscsasd(TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTs)gscst
ONT-136	gstscsd(AsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTsTsCsTs)cscst
ONT-137	cscsasd(GsGsGsCsAsCsTsCsAsTsCsTsGsCs)astsg
ONT-138	gscscsd(AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGs)gsgsa
ONT-139	gsasasd(GsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAs)ascsa
ONT-140	cstsgsd(GsAsTsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAsCs)csasa
ONT-155	csasasd(GsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTs)tscst
ONT-156	astsgsd(CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTs)tsgsg
ONT-157	astsgsd(AsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCs)csast
ONT-158	tstsgsd(GsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTsGsGs)tsgsg
ONT-159	tsgsgsd(GsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTsGsGsTs)gsgsa
ONT-160	tstsasd(TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTs)gscsc
ONT-161	gststsd(AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCs)tsgsc
ONT-162	cscsasd(AsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCs)tstsc
ONT-163	asgscsd(TsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCs)ascsa
ONT-164	tsastsd(GsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGs)cscsa
ONT-165	tsgstsd(TsAsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGs)cstsg
ONT-166	astscsd(CsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAs)gscst
ONT-167	gsgsgsd(AsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGs)csasa
ONT-168	cstscsd(CsAsTsCsCsAsTsGsAsGsGsTsCsAs)tstsc
ONT-169	asasgsd(TsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTsTs)cstsc
ONT-170	cscsasd(TsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGs)gsasg
ONT-171	tscscsd(AsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGs)cstst
ONT-172	cscstsd(CsTsGsGsAsTsTsGsAsGsCsAsTsCs)csasc
ONT-173	ascstsd(TsGsGsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTs)gsgst
ONT-174	cststsd(GsGsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTsGs)gstsg
ONT-175	csastsd(GsCsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCs)tstsg
ONT-176	tsgscsd(CsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTs)gsgsg
ONT-177	tscscsd(AsTsCsCsAsTsGsAsGsGsTsCsAsTs)tscsc
ONT-178	asgsgsd(GsCsAsCsTsCsAsTsCsTsGsCsAsTs)gsgsg
ONT-179	cscsasd(GsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTsGs)csasc
ONT-180	csastsd(AsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGs)cstsc
ONT-181	tscstsd(GsGsAsTsTsGsAsGsGsCsAsTsCsCsAs)cscsa
ONT-182	gsgsasd(TsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAsCsCsAs)asgsa

[1712]

[1713] 2'-OMe-DNA-2'OMe(3-14-3)设计在HepG2细胞中的生物学体外数据：

FOXO1

	20nM的水平(%)	SD
ONT-129	82	5
ONT-130	49	4
ONT-131	92	3
ONT-132	91	2
ONT-133	58	3
ONT-134	73	2
ONT-135	65	5
ONT-136	92	2
ONT-137	94	2
ONT-138	78	1
ONT-139	61	1
ONT-140	82	4
ONT-155	95	2
ONT-156	74	1
ONT-157	56	2
ONT-158	93	1
ONT-159	94	1
[1714] ONT-160	71	1
ONT-161	67	1
ONT-162	89	1
ONT-163	55	7
ONT-164	68	4
ONT-165	70	1
ONT-166	89	4
ONT-167	81	0
ONT-168	81	0
ONT-169	94	0
ONT-170	88	1
ONT-171	92	4
ONT-172	86	2
ONT-173	90	1
ONT-174	93	2
ONT-175	84	1
ONT-176	80	2
ONT-177	83	2
ONT-178	95	2
ONT-179	93	8
ONT-180	68	7
ONT-181	85	5
ONT-182	80	5

[1715]

	FOXO1	
	200nM的水平(%)	SD
ONT-129	27	1
ONT-130	46	4
ONT-131	53	9
ONT-132	53	2
ONT-133	48	6
ONT-134	35	9
ONT-135	45	15
ONT-136	40	7
ONT-137	50	4
ONT-138	80	3
ONT-139	40	3
ONT-140	33	13
ONT-155	52	2
ONT-156	35	4
ONT-157	39	2
ONT-158	87	6
ONT-159	89	5
ONT-160	33	10
ONT-161	40	11
ONT-162	60	7
ONT-163	42	8
ONT-164	34	10
ONT-165	38	1
ONT-166	62	9
ONT-167	64	1
ONT-168	38	2
ONT-169	67	3
ONT-170	74	8
ONT-171	65	5
ONT-172	33	18
ONT-173	72	15
ONT-174	65	15
ONT-175	38	21
ONT-176	48	8
ONT-177	28	5
ONT-178	97	11
ONT-179	47	6
ONT-180	56	12
ONT-181	45	26
ONT-182	33	17

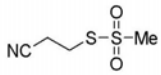
[1716] 命中选择：

	ONT-151	d(GsAsAsGsCsTsTs)tsgsgststsgsd(GsGsCsAsAsCsA)
	ONT-198	d(CsCsAsTsCsCsAs)asgstscsascsd(TsTsGsGsGsAsG)
	ONT-185	d(AsTsGsAsGsAsTs)gscscstsgsgsd(CsTsGsCsCsAsT)
[1717]	ONT-142	d(AsAsGsCsTsTsTs)gsgststsgsgsd(GsCsAsAsCsAsC)
	ONT-145	d(AsTsAsGsCsCsAs)tstsgscsasgsd(CsTsGsCsTsCsA)
	ONT-192	d(TsAsTsGsAsGsAs)tsgscscstsgsd(GsCsTsGsCsCsA)
	ONT-188	d(TsTsAsTsGsAsGs)astsgscscstsd(GsGsCsTsGsCsC)

[1718] 二次筛选.化学和立体化学筛选

[1719] 在DNA/RNA合成仪MerMade-12上的寡核苷酸合成的总结(立体限定的硫代磷酸酯2'-脱氧和2'-OMe循环)

[1720]

步骤	反应	试剂	递送体积（mL）	等待时间（秒）
1	脱三苯甲基	DCM 中 3% TCA	4×1	N. A.
2	偶联	ACN 中的 0.15M 手性亚磷酰胺 +ACN 中的 2 M CMPT	2×0.5	2×450（2'-OMe RNA） 2×300（DNA）
3	偶联 1	THF/2,6-卢剔啶中的 5% Pac_2O	1	60
4	偶联 2	THF/2,6-卢剔啶中的 5% Pac_2O+ THF 中的 16% NMI	1	60
5	硫化	ACN/BSTFA 中的 0.3 M *S*-(2-氰基乙基)甲基硫代磺酸酯 	1	600

[1721] 应用于FOXO1命中序列的实例

[1722] 实例包括蛋白限于：

[1723] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1724] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1725] (Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp)d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA]

[1726] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1727] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1728] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA]

[1729] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1730] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1731] (Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1732] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1733] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Rp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA]

[1734] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAs](AsGsTsCsAsCs)$_{OMe}$d[TsTsGsGsGsAsG]

[1735] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTs](GsCsCsTsGsGs)$_{OMe}$d[CsTsGsCsCsAsT]

[1736] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAs](AsGsTsCsAsCs)$_{LNA}$d[TsTsGsGsGsAsG]

[1737] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTs](GsCsCsTsGsGs)$_{LNA}$d[CsTsGsCsCsAsT]

[1738] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAs](AsGsTsCsAsCs)$_{MOE}$d[TsTsGsGsGsAsG]

[1739] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTs](GsCsCsTsGsGs)$_{MOE}$d[CsTsGsCsCsAsT]

[1740] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp) (CsCsAs)$_{OMe}$d[TsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGs] (GsAsG)$_{OMe}$

[1741] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp) (AsTsGs)$_{MOE}$d[AsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCs] (CsAsT)$_{MOE}$

[1742] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp) (CsCsAs)$_{LNA}$d[TsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGs] (GsAsG)$_{LNA}$

[1743] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp) (AsTsGs)$_{OMe}$d[AsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCs] (CsAsT)$_{OMe}$

[1744] (Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1745] (Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1746] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA]

[1747] (Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp)d[AsTsGsAs

GsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1748] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1749] (Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1750] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp)d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA]

[1751] (Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1752] (Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1753] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1754] (Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT]

[1755] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1756] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1757] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1758] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1759] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1760] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG]

[1761] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp) $(\underline{CsCs})_{OMe}$d[AsTsCsCsAsAs] $(\underline{GsTsCs})_{OMe}$d[AsCsTsTsGsGsGs] $(\underline{AsG})_{OMe}$

[1762] (Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp) $(\underline{CsCs})_{LNA}$d[AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs] $(\underline{AsG})_{LNA}$

[1763] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp) $(\underline{CsCs})_{MOE}$d[AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs] $(\underline{AsG})_{MOE}$

[1764] (Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp,Rp,Sp,Sp) $(\underline{CsCs})_{OMe}$d[AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs] $(\underline{AsG})_{OMe}$

[1765] 实施例4.核酸聚合物的抑制

[1766] 本发明尤其提供了手性控制的寡核苷酸组合物及其方法,当其例如用于抑制核酸聚合物(在一些情况下,通过切割这样的核酸聚合物)时,导致出人意料的结果。实例包括但不限于本文给出的那些。

[1767] RNase H测定

[1768] 核酸酶对核酸聚合物(例如RNase H对RNA)的切割速率对于寡核苷酸在治疗技术(例如反义技术)中的应用很重要。使用我们的测定,当特定寡核苷酸类型的寡核苷酸与互补RNA结合时,我们研究了切割速率并且分析了特定寡核苷酸类型(P-非对映体)的手性控制的寡核苷酸组合的代谢物。下面的结果也说明了本发明认识的切割样式的重要性。

[1769] 本文中使用的RNase H是一种广泛表达的水解RNA/DNA杂合体的RNA链的内切酶。其在反义寡核苷酸的作用方式中具有重要作用。在一些实施方案中,当构建RNA底物时,RNase H切割速率显著降低(Lima,W.F.,Venkatraman,M.,Crooke,S.T.The Influence of Antisense Oligonucleotide-induced RNA Structure on Escherichia coli RNase HI Activity The Journal Of Biological Chemistry 272,第29期,18191-18199,(1997))。另外,2'-MOE间隔聚体设计(5-10-5)对RNA靶标提供了更高亲和力,导致反义链最小的周转。翼区中2'-MOE修饰的存在也降低了RNase H切割位点的数目。

[1770] 为了研究RNA切割速率,本发明提供了在用RNase H孵育后量化剩余RNA长度的简单测定。提供的方法尤其提供了RNase H对于以下的相对切割速率:用于不同靶标的多种寡聚体的立构无规2'-修饰的间隔聚体、立构无规DNA寡核苷酸组合物和手性纯P-非对映体(相应寡核苷酸类型的手性控制的寡核苷酸组合物)。改变2'-修饰区域和DNA核心的立体化学提供了关于这些区域中的立体化学如何影响RNase H与其底物的相互作用的信息。通过LCMS分析不同时间点的RNase H反应混合物以确定切割样式。本发明尤其提供了对于设计具有最佳活性(例如,反义活性)的立体化学核酸结构很关键的核酸聚合物(例如,RNA)、切割速率和切割样式(图)。

[1771] 设备:

[1772] Alliance HPLC,2489-TUV,2695E-配备有自动进样器

[1773] Cary 100(Agilent Technologies)

[1774] 方法:

[1775] DNA/RNA双链体制备:通过在260nm测量水中的吸光度来确定寡核苷酸浓度。通过将等摩尔的溶液寡核苷酸混合来制备DNA/RNA双链体,每条链浓度为10μM。将混合物在水浴中于90℃加热2分钟,然后经过数小时缓慢冷却。

[1776] 人RNase H蛋白表达和纯化:人RNase HC克隆获自NIH Bethesda的Wei Yang教授实验室。已经描述了获得这种人RNase HC(残基136-286)的方案(Nowotny,M.等.Structure Of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid:Insight into HIV Reverse Transcription.Molecular Cell 28,264-276,(2007)。根据报道的方案进行蛋白质表达,只是所得蛋白质具有N末端His6标签。LB培养基中的BL21(DE3)大肠杆菌细胞用于蛋白质表达。细胞培养在37℃下,直到OD600达到约0.7。然后冷却培养物并且添加0.4mM IPTG以在16℃下诱导蛋白质表达过夜。通过在添加有蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich)的缓冲液A(40mM NaH_2PO_4(pH 7.0),1M NaCl,5%甘油,2.8mM β-巯基乙醇和10mM咪唑)中超声处理来制备大肠杆菌提取物。使用缓冲液A加上60mM咪唑通过Ni亲和柱来纯化提取物。用60至300mM咪唑的线性梯度洗脱蛋白质。收集蛋白质峰并且在Mono S柱(GE Healthcare)上用缓冲液B中的100mM-500mM NaCl梯度进一步纯化。将含有RNase HC的级分在储存缓冲液(20mM HEPES(pH 7.0)、100mM NaCl,5%甘油、0.5mM EDTA、2mM DTT)中浓缩至0.3mg/ml并且储存在-20℃。基

于报道的消光系数(32095$cm^{-1}M^{-1}$)和MW(18963.3Da单位),0.3mg/ml酶浓度对应于17.4μM。

[1777] RNase H测定:在96孔板中,向25μL DNA/RNA双链体(10μM)中添加5μL 10× RNase H缓冲液,然后添加15μL水。将混合物在37℃下孵育数分钟然后添加5μL 0.1μM酶的储备溶液,以得到50μL总体积和最终底物/酶浓度5μM/0.01μM(500∶1),并且在37℃下进一步孵育。使用这些条件研究了多种DNA/RNA双链体:RNase H蛋白比例,以寻找最佳比例来研究动力学。在不同时间点使用10μL 500mM EDTA二钠水溶液来淬灭反应。对于0分钟时间点,在添加酶之前向反应混合物中添加EDTA。进行对照以确认EDTA能够成功地完全抑制酶活性。在所有反应淬灭后,将10μL的每种反应混合物进样到分析型HPLC柱(XBridge C18,3.5μm,4.6×150mm,Waters Part#186003034)上。可以通过若干方法测量Kcat/Km,例如使用双标记RNA并且通过SpectraMax监测的FRET(荧光共振能量转移)依赖性RNase H测定。

[1778] 用于LCMS的样品制备的固相萃取方案:在进行LCMS之前使用96孔板(Waters part#186002321)来清洁RNase H反应混合物。在轻度真空下借助多歧管(Millipore part# MSV MHTSOO)用500μL乙腈然后水来平衡板。采取预防措施以使板不干燥。在轻度真空下向每个孔装载约50-100μL RNase H反应混合物然后通过水洗涤(2mL)。使用2×500 70%ACN/水回收样品。回收的样品转移到2mL离心管中并且在speed vac中浓缩至干。每份干燥样品在100μL水中重构,并且10μL进样到Acquity UPLC@OST C18 1.7μm,2.1×50mm(part# 186003949)上用于LCMS分析。

[1779] 对于质谱分析,淬灭后使用C_{18}96孔板(Waters)来清洁反应混合物。寡聚体在70%乙腈/水中洗脱。使用speedvac蒸发乙腈并且所得残余物在水中重构用于进样。

[1780] 洗脱剂A=50mM乙酸三乙铵

[1781] 洗脱剂B=乙腈

[1782] 柱温=60℃

[1783] 在254nm和280nm记录UV

[1784] RP-HPLC梯度法

[1785]

	时间(分钟)	流量(ml/分钟)	%A	%B	曲线
1	0.0	1.00	95.0	5.0	
2	2.00	1.00	95.0	5.0	1
3	22.00	1.00	80.0	20.0	6
4	25.00	1.00	5.0	95.0	6
5	25.5	1.00	95.0	5.0	1
6	30	1.00	95.0	5.0	1

[1786] 在HPLC图谱上,对对应于全长RNA寡聚体(ONT-28)的峰面积进行积分,使用DNA峰归一化并且相对于时间作图(图8)。与其他产物候选物和米泊美生相比,ONT-87在双链体形式中表现出对于互补RNA的优秀的切割。由于该图中的所有非对映体具有不活化RNase H酶的2'-MOE修饰的翼区,不旨在受到理论的约束,申请人注意到活性可能由DNA核心中的立体化学指示。在反义链中与ONT-77和ONT-81(包括米泊美生)的异源双链体表现出非常类似的RNA切割速率。在测试条件下,具有交替Sp/Rp立体化学的ONT-89在测试时间框表现出最低活性。与其余异源双链体相比,在测试的具有MOE修饰的寡核苷酸中,反义链中的ONT-87和ONT-88单元表现出提高的活性。特别地,ONT-87提供了惊人地高切割速率和出人意料的低

水平的剩余靶RNA。图6和图24中示出了额外的示例性数据。

[1787] 体外寡核苷酸转染测定:转染测定是本领域一般技术人员公知和广泛实践的。本文中描述了示例性方案。使用制造商的方案,在96孔板中18×10^3个细胞/孔的密度下用Lipofectamine 2000(Life Technologies,Cat.No.11668-019)对Hep3B细胞逆转染。对于剂量响应曲线,使用从60-100nM开始8个1/3连续稀释。每孔将25 μL 6×寡核苷酸浓度与0.4μL Lipofectamine 2000和25μL无血清培养基Opti-MEM培养基(Gibco,Cat.No.31985-062)的制备的混合物混合。孵育20分钟后,添加100μL DMEM细胞培养基(Gibco,Cat.No.11965-092)中的悬浮在10%FBS中的180×10^3个细胞/ml以得到150μL每孔的最终体积。转染24-48小时后,使用QuantiGene Sample Processing Kit for Cultured Cells(Affymetrix,Cat.No.QS0103)通过添加具有0.5mg/ml蛋白酶K的75μL裂解混合物来裂解Hep3B细胞。使用Affymetrix QuantiGene 2.0 Assay Kit(Cat.No.QS0011)根据制造商的方案测量细胞裂解物中靶mRNA和GAPDH mRNA表达水平。将靶mRNA表达相对于来自同一样品的GAPDH mRNA表达归一化;相对靶标/GAPDH水平与仅使用Lipofectamine 2000(无寡核苷酸)的对照的转染相比较。使用非线性回归log(抑制剂)相对于以可变斜率拟合的响应曲线(4参数)产生的剂量响应曲线。对于示例性结果,参见图24、图27和图29。

[1788] 实施例5.提供好的比较和方法提供了切割样式的对照

[1789] 本发明惊奇地发现,核苷酸间键联立体化学样式对核酸聚合物的切割样式具有出人意料的影响。通过改变手性控制的寡核苷酸组合物的共同骨架手性中心样式,可以独立地或组合地出人意料地改变切割位点的数目、切割位点的切割百分比和/或切割位点的位置。如本文中实施例中所述,提供的组合物和方法可以提供对核酸聚合物的切割样式的控制。

[1790] 使用类似测定条件,测试了不同寡核苷酸类型的多种手性控制的寡核苷酸组合物。图9中示出了靶RNA序列的示例性切割样式。某些骨架手性中心样式,例如ONT-87和ONT-154中的那些,在靶序列中出人意料地产生仅一个切割位点。此外,出人意料地发现,提供单一切割位点的寡核苷酸(例如ONT-87和ONT-154)提供了出人意料的高切割速率和低水平的剩余靶核酸聚合物。还参见图8、图10和图11。

[1791] 实施例6.FOXO1 mRNA的示例性切割

[1792] 在上述切割测定中测试靶向FOXO1 mRNA的不同区域的寡核苷酸组合物。在每种情况下,相对于共有相同的共同碱基序列和长度的手性未控制的寡核苷酸组合物的参照切割样式,手性控制的寡核苷酸组合物表现为能够提供改变的切割样式。对于示例性结果,参见图10和图11。如图12中所示,当与参照手性未控制的寡核苷酸组合物相比时,示例性手性控制的寡核苷酸组合物提供了显著提高的切割速率和出人意料的低水平的剩余底物二者。在一些实施方案中,如图11中所示,切割位点与RpSpSp骨架手性中心序列有关。在一些实施方案中,切割位点是RpSpSp上游两个碱基对。

[1793] 下文列出了示例性的寡核苷酸组合物。

[1794]

寡聚体	序列	描述	Tm (°C)
ONT-366	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCsdAsdTsdA	全部DNA	66.5
ONT-389	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCsdAsdTsdA	$S_7RSSRSSRS_5$	64.3
ONT-390	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCsdAsdTsdA	$S_6RSSRSSRS_6$	64.6
ONT-391	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCsdAsdTsdA	$S_5RSSRSSRS_7$	64.3
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA	互补 RNA	
ONT-367	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	All DNA	62.9
ONT-392	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	$S_7RSSRSSRS_5$	59.5
ONT-393	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	$S_6RSSRSSRS_6$	60
ONT-394	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	$S_5RSSRSSRS_7$	59.5
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA	互补 RNA	

[1795] 实例7.示例性手性控制的寡核苷酸组合物提供了更高的周转

[1796] 在寡核苷酸切割的核酸聚合物片段(例如,RNA片段)的Tm大于生理温度的情况下,可抑制产物解离,寡核苷酸可无法解离并且找到其他靶链以形成双链体并造成靶链被切割。互补RNA的ONT-316(5-10-52'-MOE间隔聚体)的Tm是76℃。在与寡核苷酸互补的RNA序列中进行一次切割或数次切割之后,2'-MOE片段可能保持与RNA结合,因此使得其他靶分子不能被切割。当与RNA形成双链体时,DNA链的热解链温度通常低得多,例如ONT-367(63℃)和ONT-392(60℃)。另外,与2'-MOE修饰的寡核苷酸相比,DNA序列的热稳定性通常相对均匀地分布。在一些实施方案中,提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸不包含2'-修饰,例如2'-MOE。在一些实施方案中,与具有2'-修饰(例如2'-MOE)的寡核苷酸相比,提供的手性控制的寡核苷酸组合物中不包含2'-修饰(例如2'-MOE)的寡核苷酸更容易从核酸聚合物切割片段解离并且具有更高周转。在一些实施方案中,本发明提供了其中寡核苷酸不具有2'-修饰的全部DNA设计。在一些实施方案中,其中寡核苷酸不具有2'-修饰的手性控制的寡核苷酸组合物提供了更高的的核酸酶(例如,RNase H)的周转。在一些实施方案中,切割之后,RNase H更容易从RNA和提供的手性控制的寡核苷酸组合物的寡核苷酸形成的双链体上解离。使用与上述类似的方案,与参照手性未控制的寡核苷组合物相比,寡核苷酸类型ONT-367和ONT-392的两种示例性性控制的寡核苷酸组合物的周转确实表现出更高的周转速率(参见图13)。

[1797] 实施例8.FOXO1 mRNA的示例性切割

[1798] 如图14中示例的,本公开内容中的手性控制的寡核苷酸组合物及其方法可以提供核酸聚合物的控制的切割。在一些实施方案中,本发明的手性控制的寡核苷酸组合物产生了在切割位点的数目、切割位点的位置和/或切割位点的相对切割百分比方面改变的切割

样式。在一些实施方案中，如通过ONT-401和ONT-406示例的，手性控制的寡核苷酸组合物提供了单一位点切割。

[1799] 在一些实施方案中，仅检出了来自RNA切割的一种组分。并未旨在受理论的限制，申请人注意到，该观察结果可能是由于在同一双链体上进行多次切割的RNA酶的处理性质(processive nature)，导致更短的5'-OH 3'-OH片段。

[1800] 进一步测试了另外的手性控制的寡核苷酸组合物。如上所述，提供的手性控制的寡核苷酸组合物提供了出人意料的结果，例如，在切割速率和DNA/RNA双链体中％剩余RNA方面。参见图15-17。图18-20示出了示例性分析数据。不旨在受理论的限制，申请人注意到，在一些实施方案中，切割可以如图21中所述发生。在图17中，应注意观察到ONT-406引起双链体RNA的切割，其切割速率稍微超过具有相同碱基序列和长度的天然DNA寡核苷酸ONT-415的切割速率。申请人注意到，本公开内容中提供的手性控制的寡核苷酸组合物ONT-406和其他手性控制的寡核苷酸组合物具有例如更好的体外和/或体内稳定性曲线。图25中示出了另外的示例性数据。另外，本领域技术人员将理解，图26和图27中示出的示例性数据证实，提供的示例性手性控制的寡核苷酸组合物，尤其是当这样设计旨在通过骨架手性中心样式控制切割样式时，产生了比参照寡核苷酸组合物(例如，立构无规寡核苷酸组合物)远远更好的结果。如图26中所示，控制的骨架手性中心样式尤其可以选择性提高和/或降低当使用DNA寡核苷酸时的现有切割位点的切割，或者产生当使用DNA寡核苷酸时不存在的全新切割位点(参见图25，ONT-415)。在一些实施方案中，来自DNA寡核苷酸的切割位点指示RNase H的内源切割偏好。如图27证实的，提供的手性控制的寡核苷酸组合物能够调节靶切割速率。在一些实施方案中，细胞活性约75％的变化的原因是切割速率的差异，其可以通过骨架手性中心样式控制。如本申请中提供的，进一步的结构特征(例如碱基修饰及其样式、糖修饰及其样式、核苷酸间键联修饰及其样式和/或其任意组合)可与骨架手性中心样式组合以提供期望的寡核苷酸特性。

[1801] 实施例9.示例性等位基因特异性mHTT抑制

[1802] 在一些实施方案中，本发明提供了手性控制的寡核苷酸组合物及其方法，用于相对于其他等位基因选择性地、等位基因特异性抑制来自一个特定等位基因的转录物。在一些实施方案中，本发明提供了等位基因特异性mHTT抑制。

[1803] 图22示出了特异性抑制来自一个等位基因的转录物而不抑制来自其他等位基因的转录物的示例性手性控制的寡核苷酸组合物。使用上述生化测定利用来自两种示例的等位基因的转录物测试寡核苷酸451和452。还使用了以下中所述的类似操作在细胞和动物模型中测试了等位基因特异性抑制:Hohioh,Pharmaceuticals 2013,6,522-535;美国专利申请公开US 2013/0197061;和Østergaard等,Nucleic Acids Research,2013,41(21),9634-9650。在所有情况下，相对于来自其他等位基因的那些，选择性抑制来自靶等位基因的转录物。如本领域技术人员将理解的，图22中示出的示例性数据证实，提供的示例性手性控制的寡核苷酸组合物，尤其是在设计为通过立体化学控制切割样式时，产生了比参照寡核苷酸(在这种情况下，立构无规寡核苷酸组合物)远远更好的结果。如图22确认的，骨架手性中心样式可以显著改变切割样式(图22的C-E)，立体化学样式可用于将切割位点定位在错配位点(如图22的C-E)，和/或可显著改善突变体和野生型之间的选择性(图22的G-H)。在一些实施方案中，用靶标的wtRNA和muRNA孵育手性控制的寡核苷酸组合物并且用RNase H

孵育这两种双链体。

[1804] 亨廷顿等位基因Tm

[1805]

突变体亨廷顿等位基因 ONT-453/ONT-451	38.8℃
野生型亨廷顿等位基因 ONT-454/ONT-451	37.3℃
突变体亨廷顿等位基因 ONT-453/ONT-452	38.8℃
野生型亨廷顿等位基因 ONT-454/ONT-452	36.5℃

[1806]

突变体亨廷顿等位基因 ONT-453/ONT-450	40.3℃
野生型亨廷顿等位基因 ONT-454/ONT-450	38.8℃

[1807] 实施例10.示例性等位基因特异性FOXO1抑制

[1808] 在一些实施方案中,本发明提供了等位基因特异性FOXO1抑制。

[1809] 图23示出了特异性抑制来自一个等位基因的转录物而不抑制来自其他等位基因的转录物的示例性手性控制的寡核苷酸组合物。使用上述生化测定利用来自两种示例的等位基因的转录物测试寡核苷酸ONT-400、ONT-402和ONT-406。还使用了以下中所述的类似操作在细胞和动物模型中测试了等位基因特异性抑制:Hohjoh,Pharmaceuticals 2013,6,522-535;美国专利申请公开US 2013/0197061;Østergaard等,Nucleic Acids Research,2013,41(21),9634-9650;和Jiang等,Science 2013,342,111-114。相对于来自其他等位基因的那些,选择性抑制来自靶等位基因的转录物。在一些情况下,由ONT-388合成具有错配的两种RNA ONT-442(A/G,第7位)和ONT-443(A/G,第13位)并且与ONT-396至ONT-414形成双链体。进行RNase H测定以获得切割速率和切割图。

[1810] 实施例11.某些示例性寡核苷酸和寡核苷酸组合物

[1811] 具有靶向FOXO1 mRNA的三个不同区域的不同2'取代化学的立构无规寡核苷酸,当与互补RNA形成双链体时具有热溶解温度。每条链的浓度为1×PBS缓冲液中1μM。

[1812]

寡聚体	序列	描述	Tm(°C)
ONT-316	TeosAeosGeos5mCeos5mCeosdAsdTsdTsdGs5mdCsdAsdGs5mdCsdTsdGs5mCeosTeos5mCeosAeos5mCeo	5-10-5 (2'-MOE缺口聚体)	76.7
ONT-355	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTstsgscsasgscsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	7-6-7 (DNA-2'-OMe-DNA)缺口聚体	71.2
ONT-361	tsasgsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTscsascs	3-14-3 (2'-OMe-DNA-2'-OMe)缺口聚体	65.8
ONT-367	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	全 DNA	62.9
ONT-373	tsasgscscsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGscstscsasc	5-10-5 (2'-OMe缺口聚体)	71.8
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA	互补RNA	
ONT-302	Teos5mCeos5mCeosAeosGeosdTsdTs5mdCs5mdCsdTsdTs5mdCsdAsdTsdTs5mCeosTeosGeos5mCeosAeo	5-10-5 (2'-MOE缺口聚体)	72.5
ONT-352	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTscscststscsasdTsdTsdCsdTsdGsdCsdA	7-6-7 (DNA-2'-OMe-DNA)缺口聚体	65.4
ONT-358	tscscsdAsdGsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCsdTsgscsas	3-14-3 (2'-OMe-DNA-2'-OMe)缺口聚体	62.6
ONT-364	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCsdTsdGsdCsdA	全 DNA	58.4

[1813]

寡聚体	序列	描述	Tm(°C)
ONT-370	tscscsasgsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTscstsgscsa	5-10-5 (2'-OMe缺口聚体)	68
ONT-386	rUrGrCrArGrArArUrGrArArGrGrArArCrUrGrGrA	互补RNA	
ONT-315	TeosGeosAeosGeosAeosdTsdGs5mdCs5mdCsdTsdGsdGs5mdCsdTsdGs5mCeos5mCeosAeosTeosAeo	5-10-5 (2'-MOE缺口聚体)	77.5
ONT-354	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGscscstsgsgscsdTsdGsdCsdCsdAsdTsdA	7-6-7 (DNA-2'-OMe-DNA)缺口聚体	75.5
ONT-360	tsgsasdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCsastsas	3-14-3 (2'-OMe-DNA-2'-OMe)缺口聚体	69
ONT-366	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCsdAsdTsdA	全 DNA	66.5
ONT-372	tsgsasgsasdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGscscsastsa	5-10-5 (2'-OMe缺口聚体)	74.4
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA	互补RNA	

[1814] 下面列出了另一些示例性立构无规寡核苷酸组合物。

[1815]

寡聚体	序列 (5′至 3′)
ONT-41	(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$
ONT-70	(Gs5mCs)$_{MOE}$d[GsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs](5mCsTsTsGs5mCGs)$_{MOE}$d[TsTsTsTs](TsT)$_{MOE}$
ONT-83	(GsTs5mCs5mCs5mCs)$_{MOE}$d(TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs](AsAsTsGs5mC)$_{MOE}$
ONT-302	(Ts5mCs5mCsAsGs)$_{MOE}$d[TsTs5mCs5mCsTsTs5mCsAsTsTs](5mCsTsGs5mCsA)$_{MOE}$
ONT-315	(TsGsAsGsAs)$_{MOE}$d[TsGs5mCs5mCsTsGsGs5mCsTsGs](5mCs5mCsAsTsA)$_{MOE}$
ONT-316	(TsAsGs5mCs5mCs)$_{MOE}$d[AsTsTsGs5mCsAsGs5mCsTsGs5m](CsTs5mCsAs5mC)$_{MOE}$
ONT-352	[TsCsCsAsGsTsTs](cscststscsas)$_{OMe}$d[TsTsCsTsGsCsA]
ONT-354	[TsGsAsGsAsTsGs](CsCsTsGsGsCs)$_{OMe}$d[TsGsCsCsAsTsA]
ONT-355	[TsAsGsCsCsAsTs](TsGsCsAsGsCs)$_{OMe}$d[TsGsCsTsCsAsC]
ONT-358	(TsCsCs)$_{OMe}$d[AsGsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTs](GsCsA)$_{OMe}$
ONT-360	(TsGsAs)$_{OMe}$d[GsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCs](AsTsA)$_{OMe}$
ONT-361	(TsAsGs)$_{OMe}$d[CsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTs](CsAsC)$_{OMe}$

[1816]

寡聚体	序列(5′至3′)
ONT-364	[TsCsCsAsGsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTsGsCsA]
ONT-366	[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]
ONT-367	[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]
ONT-370	(TsCsCsAsGs)$_{OMe}$d[TsTsCsCsTsTsCsAsTsTs](CsTsGsCsA)$_{OMe}$
ONT-372	(TsGsAsGsAs)$_{OMe}$d[TsGsCsCsTsGsGsCsTsGs](CsCsAsTsA)$_{OMe}$
ONT-373	(TsAsGsCsCs)$_{OMe}$d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGs](CsTsCsAsC)$_{OMe}$
ONT-440	(UsAsGsCsCs)Fd[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]
ONT-441	(UsAsGsCsCs)$_{F}$d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsC]
ONT-460	(TsAsGsCsCs)$_{OMe}$d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]
ONT-450	[AsTsTsAsAsTsAsAsAsTsTsGsTsCsAsTsCsAsCsC]

[1817] 以下列出了示例性RNA和DNA寡核苷酸

[1818]

寡聚体	序列(5′至3′)
ONT-28	rGrGrUrGrCrGrArArGrCrArGrArCrUrGrArGrGrC
ONT-386	rUrGrCrArGrArArUrGrArArGrGrArArCrUrGrGrA
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA
ONT-415	d[TAGCCATTGCAGCTGCTCAC]
ONT-442	rGrUrGrArGrCrGrGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA
ONT-443	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrGrArUrGrGrCrUrA
ONT-453	rGrGrUrGrArUrGrArCrArArUrUrUrArUrUrArArU
ONT-454	rGrGrUrGrArUrGrGrCrArArUrUrUrArUrUrArArU

[1819] 以下示出了示例性手性纯寡核苷酸。在一些实施方案中，本发提供了以下示例性寡核苷酸各自相应的手性控制的寡核苷酸组合物。

[1820]

寡聚体	立体化学/序列 (5′至3′)	描述
ONT-389	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	7S-(RSS)$_3$-3S
ONT-390	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	6S-(RSS)$_3$-4S
ONT-391	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	5S-(RSS)$_3$-5S
ONT-392	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	7S-(RSS)$_3$-3S
ONT-393	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	6S-(RSS)$_3$-4S

[1821]

寡聚体	立体化学/序列 (5′至3′)	描述
ONT-394	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	5S-(RSS)$_3$-5S
ONT-396	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	18S-1R
ONT-397	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	17S-RS
ONT-398	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	16S-(RSS)
ONT-399	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	15S-(RSS)-1S
ONT-400	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	14S-(RSS)-2S
ONT-401	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	13S-(RSS)-3S
ONT-402	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	12S-(RSS)-4S
ONT-403	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	11S-(RSS)-5S
ONT-404	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	10S-(RSS)-6S
ONT-405	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	9S-(RSS)-7S
ONT-406	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	8S-(RSS)-8S
ONT-407	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	7S-(RSS)-9S
ONT-408	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	6S-(RSS)-10S
ONT-409	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	5S-(RSS)-11S
ONT-410	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	4S-(RSS)-12S
ONT-411	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	3S-(RSS)-13S
ONT-412	(*Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	2S-(RSS)-14S
ONT-413	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	S-(RSS)-15S
ONT-414	(*Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	(RSS)-16S
ONT-421	全-(*Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	全S
ONT-422	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-C6-amino-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	8S-(RSS)-3S-(RSS)-2S
ONT-455	全-(*Rp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	全R

[1822]

寡聚体	立体化学/序列 (5′至3′)	描述
ONT-451	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[AsTsTsAsAsTsAsAsAsTsTsGsTsCsAsTsCsAsCsC]	13S-(RSS)-3S
ONT-452	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[AsTsTsAsAsTsAsAsAsTsTsGsTsCsAsTsCsAsCsC]	14S-(RSS)-2S
ONT-75	全-(*Rp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs 5mCsTsTs5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	全R
ONT-76	(*Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCs TsTs5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	SRRSR-11S-RSR
ONT-77	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTs Ts5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	5R-10S-4R
ONT-80	全-(*Sp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTs Ts5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	全S
ONT-81	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCs TsTs5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	5S-10R-4S
ONT-82	全-(*Rp*)-(GsTs5mCs5mCs5mCs)$_{MOE}$d[TsGsAsAsGsAsTsGsTs 5mCs](AsAsTsGs5mC)$_{MOE}$	全R
ONT-84	全-(*Sp*)-(GsTs5mCs5mCs5mCs)$_{MOE}$d[TsGsAsAsGsAsTsGsTs 5mCs](AsAsTsGs5mC)$_{MOE}$	全S
ONT-85	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-(GsTs5mCs5mCs5mCs)$_{MOE}$d[TsGsAsAsGsAsTsGsTs 5mCs](AsAsTsGs5mC)$_{MOE}$	5R-10S-4R
ONT-86	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-(GsTs5mCs5mCs5mCs)$_{MOE}$d[TsGsAsAsGsAsTsGsTs 5mCs](AsAsTsGs5mC)$_{MOE}$	5S-10R-4S
ONT-87	(*Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*, *Rp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCs TsTs5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	5R-2S-(RSS)$_2$-6R
ONT-88	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTs Ts5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	5S-(RRS)$_3$-5S
ONT-89	(*Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCs TsTs5mCs](Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	(SR)$_9$S
ONT-154	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs 5mCsGs5mCsAs5mCs5mC]	7S-(RSS)$_3$-3S
ONT-75	全-(*Rp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCs TsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	全-R
ONT-80	全-(*Sp*)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs)$_{MOE}$d[AsGsTs5mCsTsGs5mCs TsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC)$_{MOE}$	全-S

[1823] 以下示出了靶向FOXO1的另一些示例性寡核苷酸及其Tm。在一些实施方案中，本发明提供了以下示例性寡核苷酸各自相应的手性控制的寡核苷酸组合物。

[1824]

寡聚体	序列 (5'至 3')	Tm (°C)
ONT-439	[UsAsGs]$_F$d[CsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTs][CsAsC]$_F$	68.3
ONT-440	[UsAsGsCsCs]$_F$d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	70.0
ONT-441	[UsAsGsCsCs]$_F$d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsC]	65.5
ONT-455	全-(*Rp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	66.8
ONT-316	[TsAsGs5mCs5mCs]$_{MOE}$d[AsTsTsGs5mCsAsGs5mCsTsGs][5mCsTs5mCsAs5mC]$_{MOE}$	76.9
ONT-367	d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	62.8
ONT-415	d[TAGCCATTGCAGCTGCTCAC]	72.6
ONT-416	[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCs]$_{OMe}$d[TsGsCsTsCsAsC]	78.4
ONT-421	全-(*Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	59.2
ONT-394	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	60.0
ONT-406	(*Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Rp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*, *Sp*)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	58.5

[1825] 实施例12.通过提供的手性控制的寡核苷酸组合物的示例性的另外的控制切割

[1826] 本领域技术人员将理解,图26中示出的示例性数据证实,与参照组合物如立构无规寡核苷酸组合物相比,提供的手性控制的寡核苷酸组合物及其方法提供了出人意料的结果。手性控制的寡核苷酸组合物尤其可以产生受控的切割样式,包括但不限于切割位点的位置、切割位点的数目和切割位点的相对切割百分比的控制。还参见图27中示出的示例性数据。

[1827] 实施例13.手性控制的寡核苷酸组合物的稳定性

[1828] 本领域技术人员将理解,图26中示出的示例性数据证实,可以通过改变骨架手性中心样式调节提供的手性控制的寡核苷酸组合物的稳定性。对于示例性数据,参见图7和图28。以下描述了用于进行血清稳定性实验的示例性方案。

[1829] 方案:在大鼠血清(Sigma,R9759)中孵育P-立体化学纯PS DNA(ONT-396-ONT-414(从3'端至5'端单Rp行进))、立构无规PS DNA(ONT-367)、全-Sp PS DNA(ONT-421)和全-RD PS DNA(ONT-455)(0h和48h)并且通过IEX-HPLC分析。

[1830] 孵育方法:5μL 250μM的每种DNA溶液和45μL大鼠血清混合并且在37℃孵育每个时间点(0h和48h)。在每个时间点,通过添加25μL 150mM EDTA溶液、30μL裂解缓冲液(erpicentre,MTC096H)和3μL蛋白酶K溶液(20mg/mL)终止反义。将混合物在60℃下孵育20分钟,然后将20μL混合物进样到IEX-HPLC中并进行分析。

[1831] 孵育对照样品:制备5μL 250μM的每种DNA溶液和103μL 1×PBS缓冲液的混合物并且通过IEX-HPLC分析20μL混合物作为对照以检查绝对定量。

[1832] 示例性分析方法:

[1833] IEx-HPLC

[1834] A:10mM TrisHCl,50%ACN(pH 8.0)

[1835] B:10mM TrisHCl,800mM NaCl,50%ACN(pH 8.0)

[1836] C:水-ACN(1:1,v/v)

[1837] 温度:60℃

[1838] 柱:DIONEX DNAPac PA-100,250×4mm

[1839] 梯度:

[1840]

	时间	流量	%A	%B	%C	%D	曲线
1	0.00	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	6
2	1.00	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	1
3	2.00	1.00	75.0	25.0	0.0	0.0	6
4	10.00	1.00	5.0	95.0	0.0	0.0	6
5	10.10	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	6
6	12.50	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	1

[1841] 洗涤:

[1842]

	时间	流量	%A	%B	%C	%D	曲线
1	0.01	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0	6
2	5.50	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0	1
3	5.60	1.00	0.0	100.0	0.0	0.0	6
4	7.50	1.00	0.0	100.0	0.0	0.0	1
5	7.60	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	6
6	12.50	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	1

[1843] 柱温:60℃

[1844] 每次跑样后进行洗涤。

[1845] 使用HPLC色谱图的积分面积通过分析0h至48h的比例来计算剩余PS DNA的百分比。

[1846] 实施例14.示例性分析结果(图19)

[1847] 图19的峰归属(上图,M12-Exp11 B10,ONT-354,30分钟)

[1848]

保留时间(分钟)	$(M-2)^{2-}$	$(M-3)^{3-}$	$(M-4)^{4-}$	$(M-5)^{5-}$	$(M-6)^{6-}$
2.34	1100.6	733.7			
11.91		1390.6	1042.6		
13.07		1500.08	1125.5		750.73
		1805.29	1354.19		
13.58		1603.39	1202.2	961.35	801.15
14.80			1589.9	1271.4	1059.5
18.59			1653.3	1323.3	1101.6

[1849]

保留时间(分钟)	观察到的MW	基于质量匹配的归属		
		5'-p-RNA片段	3'-OH 和 5'-OH, RNA	DNA
2.34	2203.2		7聚体	
11.91	4176	13聚体		
13.07	4505.7	14聚体		
	5418.87		17聚体	
13.58	4812.8	15聚体		
14.80	6362.5		20聚体, ONT-387	
18.59	6615.4			ONT-354

[1850] 图19的峰归属(下图,M12-Exp11 A10,ONT-315,30分钟)

[1851]

保留时间(分钟)	$(M-2)^{2-}$	$(M-3)^{3-}$	$(M-4)^{4-}$	$(M-5)^{5-}$	$(M-6)^{6-}$
4.01	1425.33	950.15			
4.4	1100.83	733.69			
4.94	1578.34	1051.54			
6.21	1741.91	1161.89	870.37		
	1445.42	963.31	722.97		
8.48	1610	1073.3			
9.15		1391.2	1043.1		
9.93	1763.4	1174.7			
11.8		1602.3	1201.7		
14.82					
20.73			1809.94	1447.82	1205.9

[1852]

保留时间(分钟)	观察到的MW	基于质量匹配的归属		
		5'-p-RNA片段	3'-OH 和 5'-OH, RNA	DNA
4.01	2853.45		9聚体	
4.4	2203.66	7聚体		
4.94	3158.47		10聚体	
6.21	3487.52		11聚体	
	2892.84	9聚体		
8.48	3220.94	10聚体		
9.15	4177		13聚体	
9.93	3528.88	11聚体		
11.8	4810		15聚体	
14.82			20聚体, ONT-387	
20.73	7244.3			ONT-315

[1853] 实施例15.示例性分析结果(图30)

[1854] 图30的峰归属(上图,M12-Exp11 D2,ONT-367,30分钟)

[1855]

保留时间(分钟)	$(M-2)^{2-}$	$(M-3)^{3-}$	$(M-4)^{4-}$	$(M-5)^{5-}$	$(M-6)^{6-}$
2.36	1120.28	746.25			
3.15	1292.41	861.32			
4.04	975.92				
4.49	1140.6	759.78			
5.83	1305.21	869.65	652.31		
6.88	1923.23	1281.69	961.28		
9.32		1390.76	1043.29	833.72	
9.96	1783.85	1187.98	891.6	712.94	
11.01	1936.14	1289.93			
		1501.52	1125.4	899.89	
11.93		1405.25	1053.78	842.84	
13.15		1514.72	1135.72		
14.81			1609.95	1287.53	1072.58
18.33			1587.9	1270.2	1058.3

[1856]

保留时间(分钟)	观察到的MW	基于质量匹配的归属		
		5'-p-RNA片段	3'-OH 和 5'-OH, RNA	DNA
2.36	2242.56		7聚体	
3.15	2586.82		8聚体	
4.04	1953.84	6聚体		
4.49	2283.2	7聚体		
5.83	2612.42	8聚体		
6.88	3849.14		12聚体	
9.32	4175.28		13聚体	
9.96	3569.7	11聚体		
11.01	3874.28	12聚体		
	4507.56		14聚体	
11.93	4218.75	13聚体		
13.15	4547.16	14聚体		
14.81	6441.8		20聚体，ONT-388	
18.33	6355.6			ONT-367

[1857] 图30的峰归属(下图，M12-Exp21 NM板1(汇集)F11，ONT-40630分钟)

[1858]

保留时间(分钟)	$(M-2)^{2-}$	$(M-3)^{3-}$	$(M-4)^{4-}$	$(M-5)^{5-}$	$(M-6)^{6-}$
4.72	1140.6	759.78			
9.46		1390.76	1043.29	833.72	
16.45			1609.95	1287.53	1072.58
19.48			1588.1	1270.4	1058.4

[1859]

保留时间(分钟)	观察到的MW	基于质量匹配的归属		
		5'-p-RNA片段	3'-OH 和 5'-OH, RNA	DNA
4.72	2203.2	2283.2	7聚体	
9.46	4176	4175.28		13聚体
16.45	6362.5	6441.8		20聚体, ONT-388
19.48	6615.4	6355.9		

[1860] 等价方案

[1861] 已描述了本发明的一些举例说明性实施方案,本领域技术人员应理解的是,前述内容仅是举例说明性的而非限制性的,仅通过举例的方式呈现。许多修改和其他举例说明性实施方案在本领域普通技术人员的能力范围内,并且预期落入本发明的范围内。特别地,尽管本文中呈现的许多实例涉及方法动作或系统要素的特定组合,但应理解那些动作和那些要素可以其他方式组合以实现相同目标。仅结合一个实施方案讨论的动作、要素和特征不旨在排除在其他实施方案中的类似作用。此外,对于所附权利要求中叙述的一个或更多个手段加功能限制,手段不旨在限于本文公开的用于执行所记载功能的手段,而是旨在在范围方面涵盖目前已知或稍后开发的用于执行所记载功能的任何手段。

[1862] 在权利要求中使用顺序术语,如“第一”、“第二”、“第三”等来修饰权利要求要素时本身并不意味一个权利要求要素相对于另一个的任何优先、居先或次序或执行方法的动作所依的时序,而是仅用作标记来区分具有某名称的一个权利要求要素与具有相同名称的另一要素(如果不使用顺序术语)以区分所述权利要求要素。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。

[1863] 前述书面说明书被认为足以使得本领域技术人员能够实施本发明。本发明在范围方面不受提供的实施例限制,因为实施例旨在作为对本发明的一个方面的单一说明,并且其他功能等价实施方案也在本发明的范围内。除本文中所示和所述的那些修改之外,根据先前描述,本发明的多种修改对于本领域技术人员是明显的,并且落入所附权利要求的范围内。本发明的优势和目标未必被本发明的各实施方案所涵盖。

[1864] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[1865] 1.一种手性控制的寡核苷酸组合物,其包含通过具有以下来定义的寡核苷酸:

[1866] 1)共同碱基序列和长度;

[1867] 2)共同骨架键联样式;和

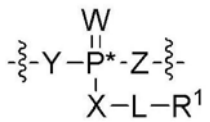
[1868] 3)共同骨架手性中心样式,

[1869] 所述组合物是单一寡核苷酸的基本上纯的制备物,其中所述组合物中至少约10%的所述寡核苷酸具有所述共同碱基序列和长度、所述共同骨架键联样式和所述共同骨架手性中心样式;其中:

[1870] 所述共同碱基序列具有至少17个碱基;或

[1871] 所述单一寡核苷酸包含11个或更多个手性的经修饰磷酸酯键联。

[1872] 2.项1所述的组合物,其中每个手性的经修饰磷酸酯键联独立地具有式I的结构:

[1873] 

(I)

[1874] 其中：

[1875] P＊是不对称磷原子，并且是Rp或Sp；

[1876] W是O、S或Se；

[1877] X、Y和Z各自独立地是-O-、-S-、-N(-L-R^1)-或L；

[1878] L是共价键或任选地经取代的直链或支链C_1-C_{10}亚烷基，其中L的一个或更多个亚甲基单元任选地且独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[1879] R^1是卤素、R或任选地经取代的C_1-C_{50}脂族，其中一个或更多个亚甲基单元任选地且独立地被以下替换：任选地经取代的C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-或-C(O)O-；

[1880] R′各自独立地是-R、-C(O)R、-CO_2R或-SO_2R，或：

[1881] 同一氮上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的杂环或杂芳环，或

[1882] 同一碳上的两个R′与其间插原子一起形成任选地经取代的芳环、碳环、杂环或杂芳环；

[1883] -Cy-是选自亚苯基、亚碳环基、亚芳基、亚杂芳基或亚杂环基的任选地经取代的二价环；

[1884] R各自独立地是氢或选自C_1-C_6脂族、苯基、碳环基、芳基、杂芳基或杂环基的任选地经取代的基团；并且

[1885] -§-各自独立地表示与核苷的连接。

[1886] 3.项2所述的组合物，其中每个手性的经修饰磷酸酯键联是硫代磷酸酯键联。

[1887] 4.项2所述的组合物，其中X是-S-并且-L-R^1不是氢。

[1888] 5.项1至4中任一项所述的组合物，其中所述共同骨架手性中心样式从5’至3’包含(Rp)n(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8，并且n是1、2、3、4、5、6、7或8。

[1889] 6.项1至4中任一项所述的组合物，其中所述共同骨架手性中心样式从5’至3’包含Rp(Sp)m，其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1890] 7.项1至4中任一项所述的组合物，其中所述共同骨架手性中心样式从5’至3’包含Rp(Sp)$_2$。

[1891] 8.项1至4中任一项所述的组合物，其中所述骨架手性中心样式从5’至3’包含(Np)t(Rp)n(Sp)m，其中n和t各自独立地是1、2、3、4、5、6、7或8，m是2、3、4、5、6、7或8，并且Np各自独立地是Rp或Sp。

[1892] 9.项8所述的组合物,其中n是1。

[1893] 10.项9所述的组合物,其中t是2、3、4、5、6、7或8。

[1894] 11.项10所述的组合物,其中m是2、3、4、5、6、7或8。

[1895] 12.项8所述的组合物,其中t和m中的至少一个大于5。

[1896] 13.项1至12中任一项所述的组合物,其中特定寡核苷酸类型的寡核苷酸是反义寡核苷酸、微小RNA拮抗剂、微小RNA、前微小RNA、反义微小RNA、超微小RNA、核酶、U1衔接头、RNA活化剂、RNAi剂、诱饵寡核苷酸、成三链体寡核苷酸、适体或佐剂。

[1897] 14.一种用于控制切割核酸聚合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[1898] 使核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与手性控制的寡核苷酸组合物相接触,所述组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[1899] 1)共同碱基序列和长度,其中所述共同碱基序列是或包含与存在于所述核酸聚合物中的靶序列互补的序列;

[1900] 2)共同骨架键联样式;和

[1901] 3)共同骨架手性中心样式;

[1902] 所述组合物是手性控制的,其中相对于具有该特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[1903] 15.项14所述的方法,其中所述切割以与当在相当的条件下使所述核酸聚合物与参照寡核苷酸组合物相接触时所观察到的参照切割样式不同的切割样式发生。

[1904] 16.一种用于改变当其核苷酸序列包含靶序列的核酸聚合物与参照寡核苷酸组合物相接触时所观察到的切割样式的方法,所述参照寡核苷酸组合物包含具有特定碱基序列和长度的寡核苷酸,所述特定碱基序列是或包含与所述靶序列互补的序列,所述方法包括:

[1905] 使所述核酸聚合物与具有所述特定碱基序列和长度的寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物相接触,所述组合物是手性控制的,其中相对于具有所述特定碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物,所述组合物富含单一寡核苷酸类型的寡核苷酸,所述寡核苷酸的特征在于:

[1906] 1)所述特定碱基序列和长度;

[1907] 2)特定骨架键联样式;和

[1908] 3)特定骨架手性中心样式。

[1909] 17.项15或16所述的方法,其中所述参照寡核苷酸组合物是共有所述共同序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物。

[1910] 18.项15至17中任一项所述的方法,其中由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式与参照切割样式的差异在于,与所述参照切割样式相比,所述由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式在存在于所述核酸聚合物中的所述靶序列中具有更少的切割位点。

[1911] 19.项18所述的方法,其中由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式在存在于所述核酸聚合物中的所述靶序列中具有单一切割位点。

[1912] 20.项14至19中任一项所述的方法,其中由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式与参照切割样式的差异在于,所述由所述手性控制的寡核苷酸组合物提供的切割样式使切割位点处的切割百分比提高。

[1913] 21.项14至20中任一项所述的方法，其中与参照寡核苷酸组合物相比，所述手性控制的寡核苷酸组合物提供更高的靶核酸聚合物切割速率。

[1914] 22.项14至21中任一项所述的方法，其中与参照寡核苷酸组合物相比，所述手性控制的寡核苷酸组合物提供更低水平的剩余的未切割靶核酸聚合物。

[1915] 23.一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1916] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1917] 1)共同碱基序列和长度；

[1918] 2)共同骨架键联样式；

[1919] 3)共同骨架手性中心样式；

[1920] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1921] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含靶等位基因和同一核酸序列的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。

[1922] 24.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1923] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1924] 1)共同碱基序列和长度；

[1925] 2)共同骨架键联样式；

[1926] 3)共同骨架手性中心样式；

[1927] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1928] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1929] 25.项23或24所述的方法，所述接触在确定允许所述组合物抑制所述特定等位基因之转录物的条件下进行。

[1930] 26.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1931] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手

性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1932] 1)共同碱基序列和长度；

[1933] 2)共同骨架键联样式；

[1934] 3)共同骨架手性中心样式；

[1935] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1936] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达靶等位基因和同一基因的另一等位基因二者之转录物的体系相接触时，所述特定等位基因之转录物的抑制水平比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1937] 27.一种用于等位基因特异性抑制来自靶核酸序列之转录物的方法，所述靶核酸序列在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶核酸序列的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1938] 使包含所述靶核酸序列之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1939] 1)共同碱基序列和长度；

[1940] 2)共同骨架键联样式；

[1941] 3)共同骨架手性中心样式；

[1942] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1943] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与包含同一靶核酸序列之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物的以下抑制水平：

[1944] a)大于当所述组合物不存在时的抑制水平；

[1945] b)大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平；或

[1946] c)既大于当所述组合物不存在时的抑制水平，又大于对于同一核酸序列的另一等位基因所观察到的抑制水平。

[1947] 28.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1948] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1949] 1)共同碱基序列和长度；

[1950] 2)共同骨架键联样式；

[1951] 3)共同骨架手性中心样式；

[1952] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1953] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平：

[1954] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1955] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1956] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1957] 29.一种用于等位基因特异性抑制来自靶基因之转录物的方法，所述靶基因在群体中存在多个等位基因，每个所述等位基因包含相对于同一靶基因的其他等位基因限定该等位基因的特异性核苷酸特征序列元件，所述方法包括以下步骤：

[1958] 使包含所述靶基因之转录物的样品与手性控制的寡核苷酸组合物相接触，所述手性控制的寡核苷酸组合物包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，所述寡核苷酸的特征在于：

[1959] 1)共同碱基序列和长度；

[1960] 2)共同骨架键联样式；

[1961] 3)共同骨架手性中心样式；

[1962] 所述组合物是手性控制的，其中相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制备物，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸；

[1963] 其中所述特定寡核苷酸类型的所述寡核苷酸的所述共同碱基序列是或包含与限定特定等位基因的特征序列元件互补的序列，所述组合物的特征在于，当使其与表达所述靶基因之转录物的体系相接触时，所述组合物显示出对所述特定等位基因之转录物表达的以下抑制水平：

[1964] a)为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；

[1965] b)比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍；或

[1966] c)既为至少2倍，其中检测到来自所述特定等位基因之转录物的量在所述组合物存在时比其不存在时低2倍；又比对于同一基因的另一等位基因所观察到的抑制水平高至少2倍。

[1967] 30.项23至29中任一项所述的方法，其中所述特异性核苷酸特征序列元件存在于所述靶核酸序列或基因的内含子中。

[1968] 31.项23至29中任一项所述的方法，其中所述特异性核苷酸特征序列元件存在于所述靶核酸序列或基因的外显子中。

[1969] 32.项23至29中任一项所述的方法，其中所述特异性核苷酸特征序列元件跨越所述靶核酸序列或基因的外显子和内含子。

[1970] 33.项23至29中任一项所述的方法，其中所述特异性核苷酸特征序列元件包含突变。

[1971] 34.项23至29中任一项所述的方法，其中所述特异性核苷酸特征序列元件包含

SNP。

[1972] 35.项14至34中任一项所述的方法,其中所述手性控制的寡核苷酸组合物是项8所述的组合物。

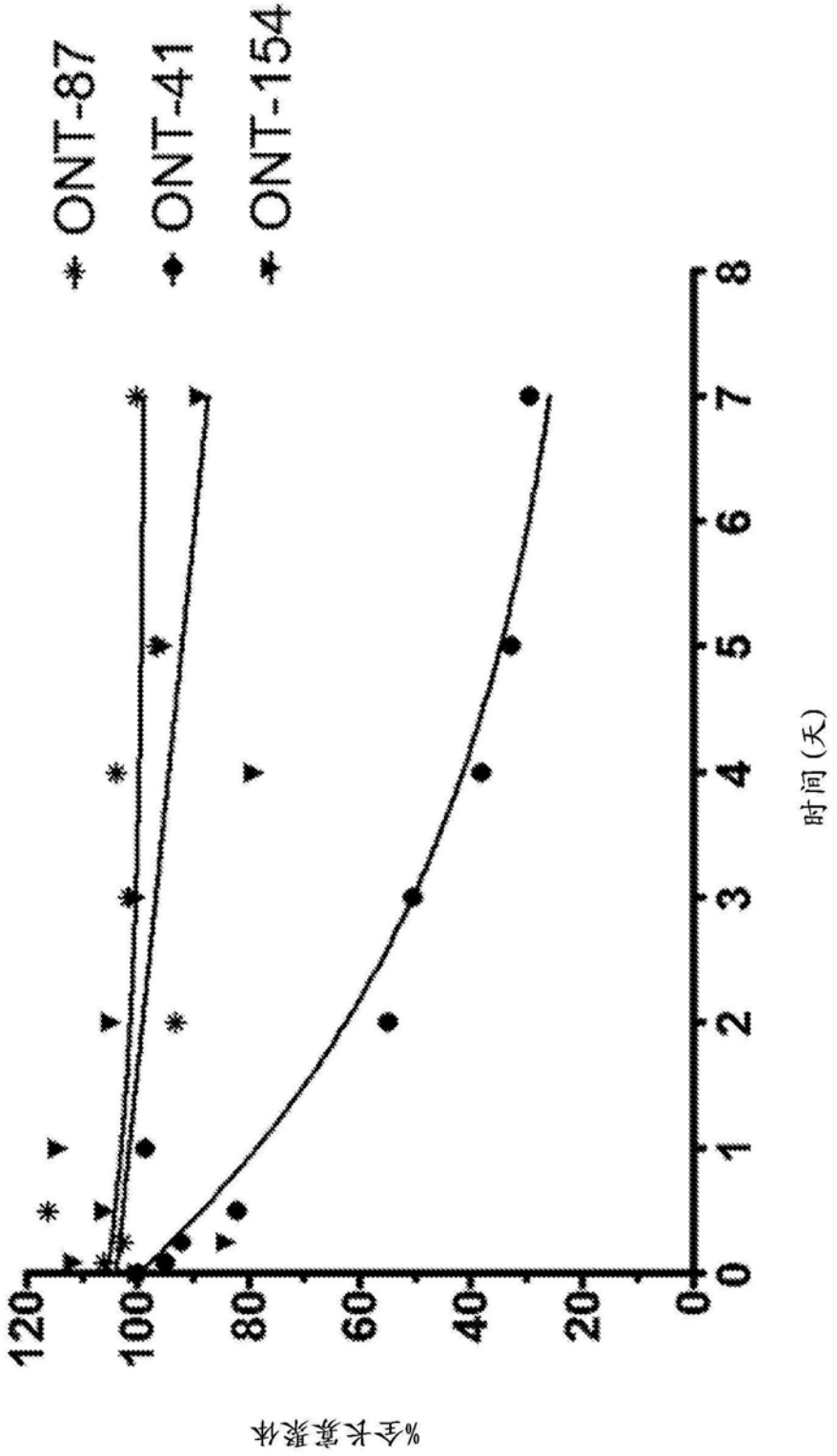


图1

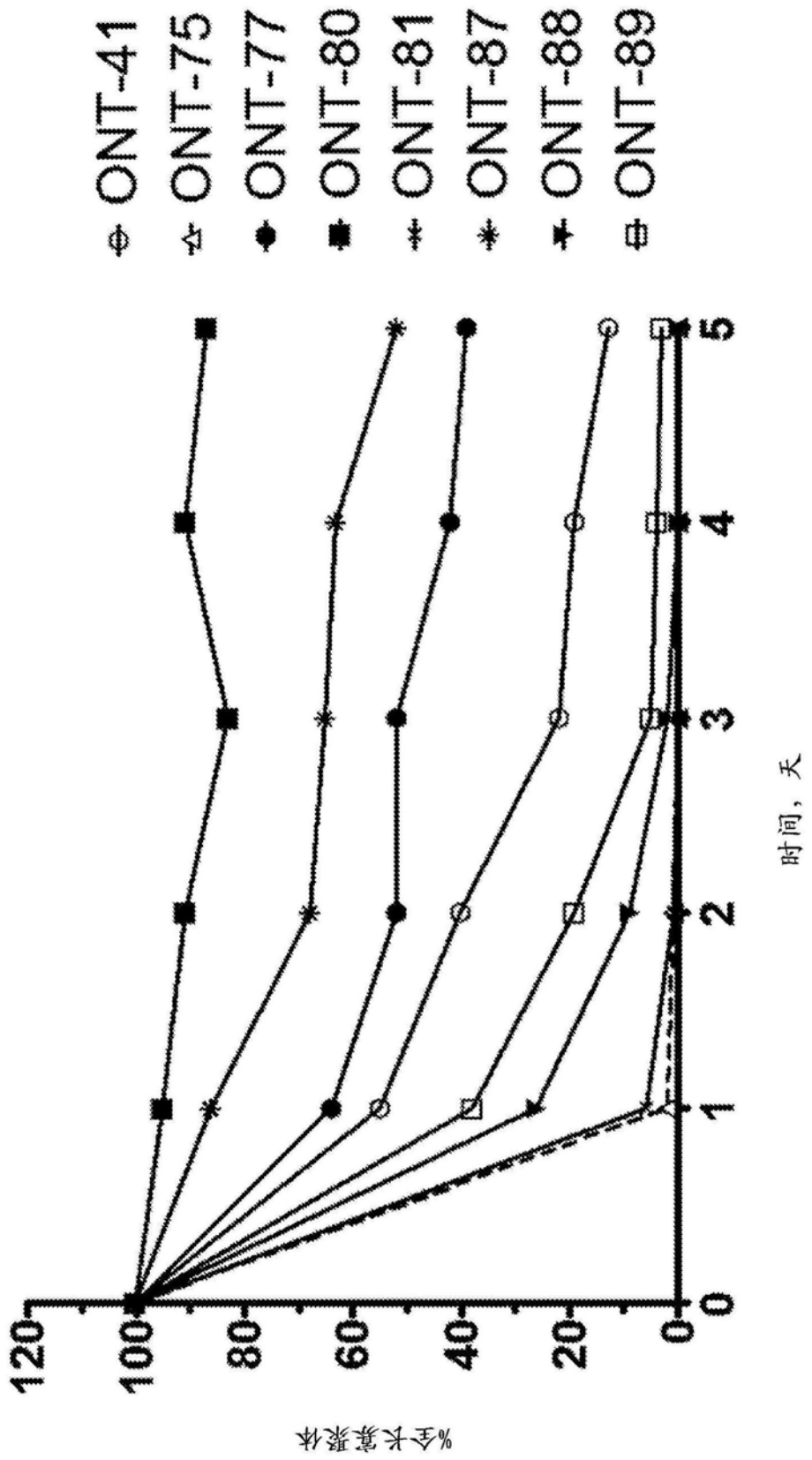

ONT-41
ONT-75
ONT-77
ONT-80
ONT-81
ONT-87
ONT-88
ONT-89
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
时间，天
%全长聚集体

图2

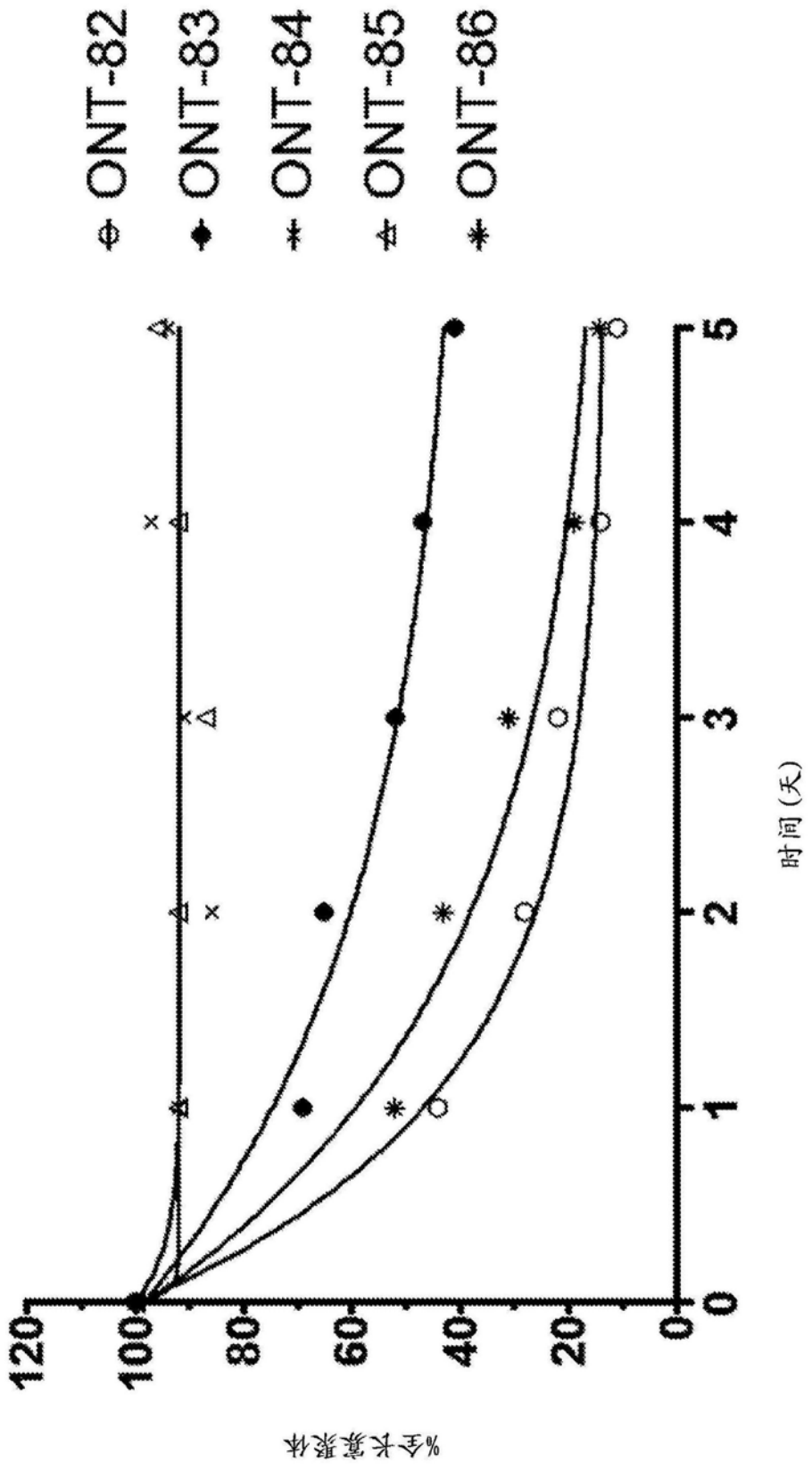

ONT-82
ONT-83
ONT-84
ONT-85
ONT-86
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
时间(天)
%全长聚聚体

图3

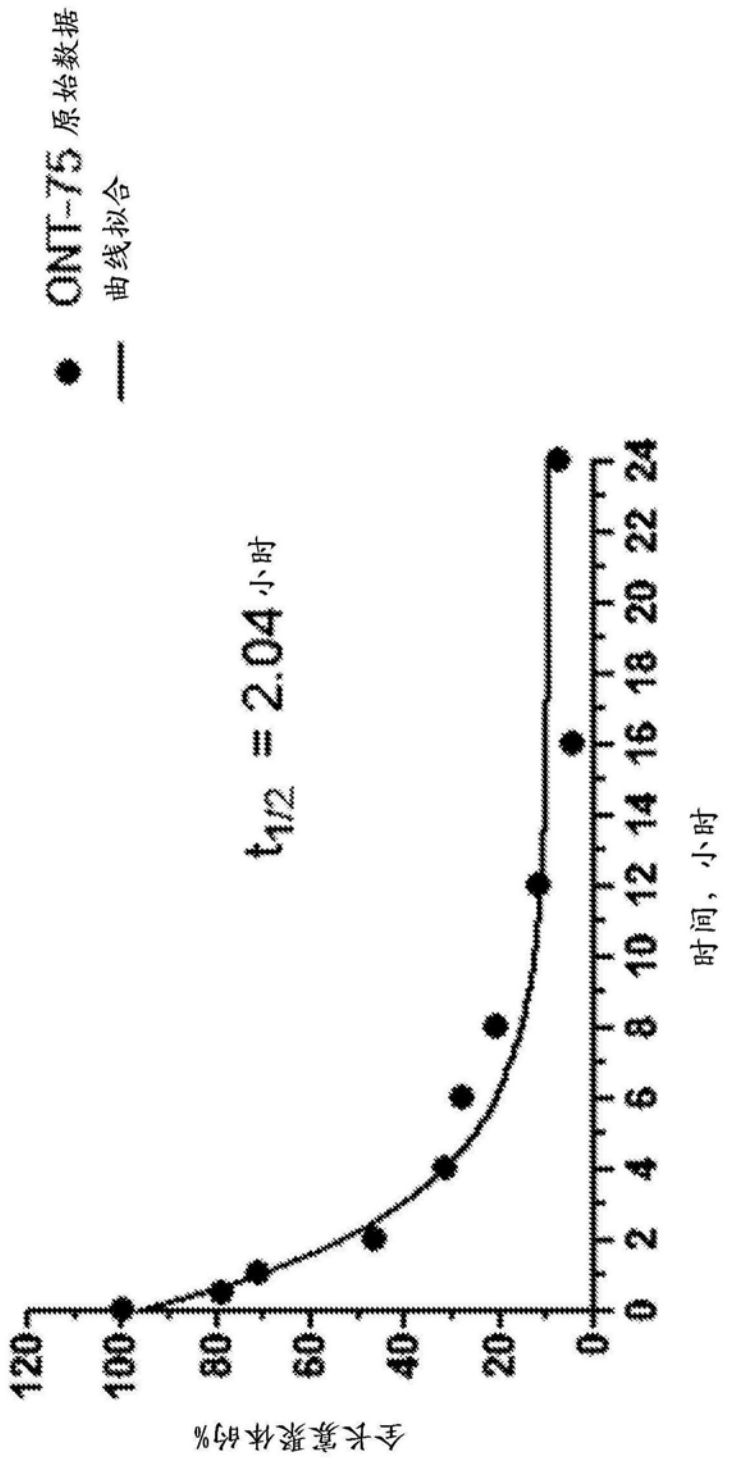

ONT-75 原始数据
曲线拟合
$t_{1/2}$ = 2.04 小时
全长聚集体的%
时间，小时
120
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24

图4

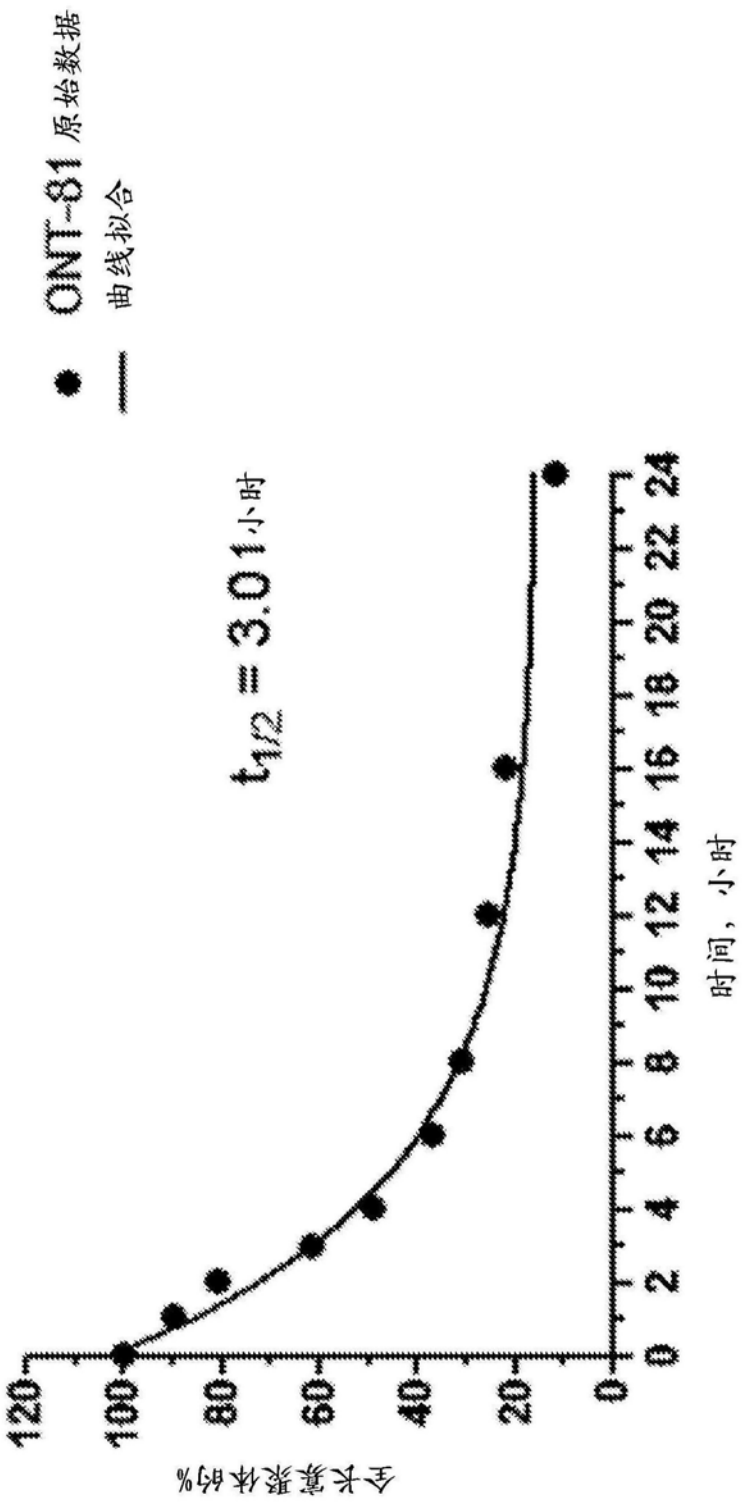

ONT-81 原始数据
曲线拟合
$t_{1/2}$ = 3.01小时
全长聚体的%
120
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
时间，小时

图5

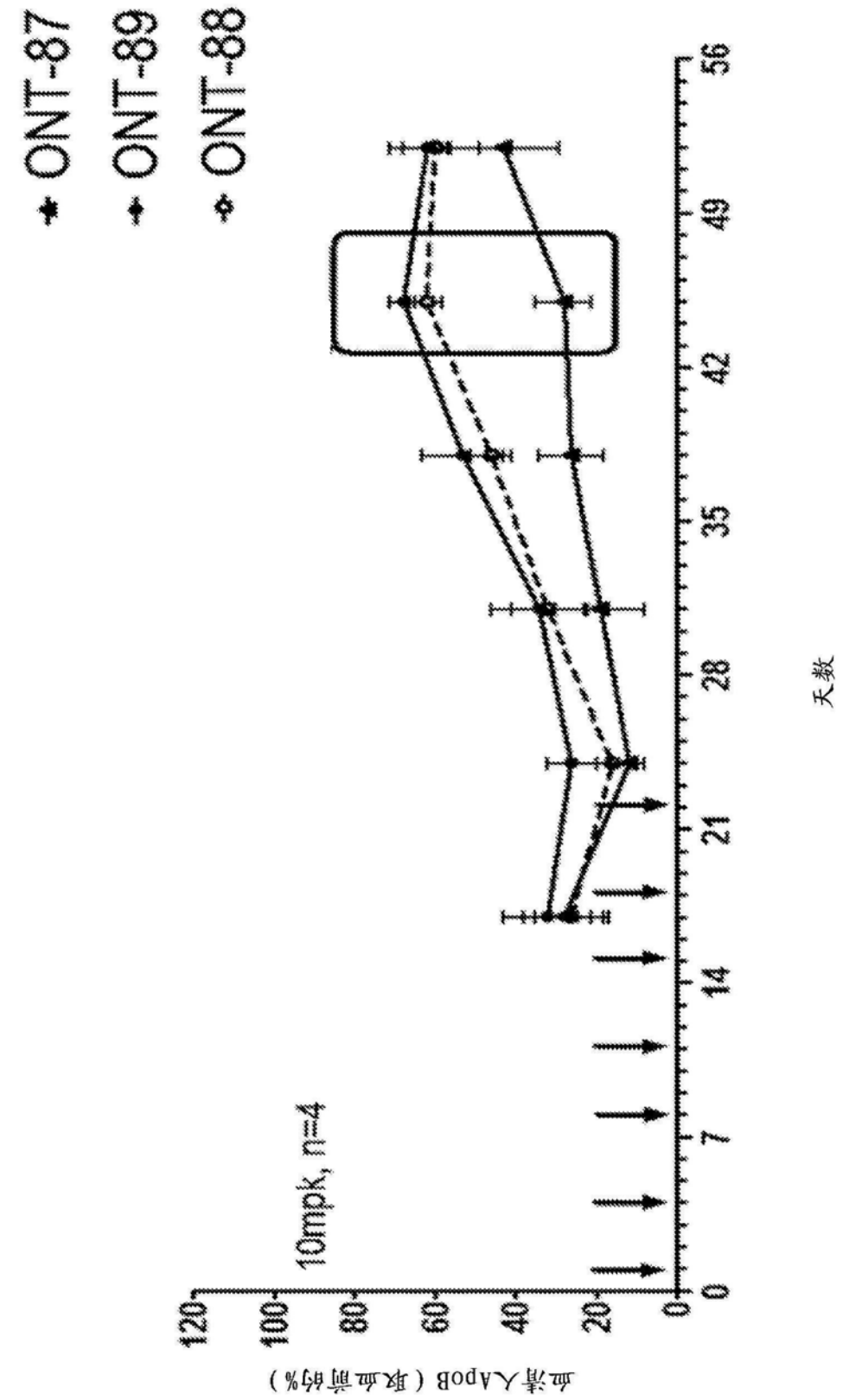

ONT-87
ONT-89
ONT-88
10mpk, n=4
血清ApoB（取血前的%）
120
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
天数

图6

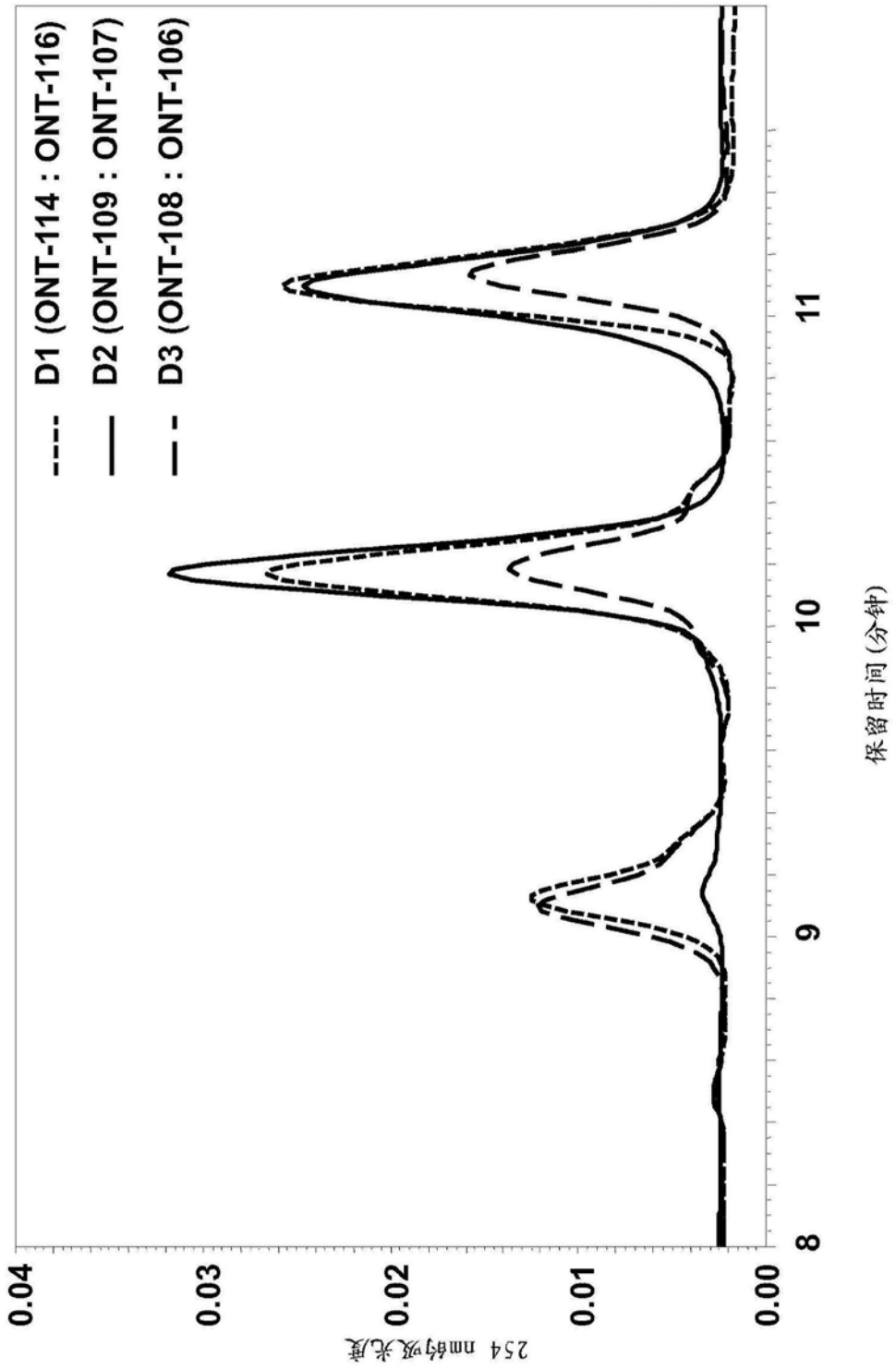

D1 (ONT-114 : ONT-116)
D2 (ONT-109 : ONT-107)
D3 (ONT-108 : ONT-106)
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
254 nm的吸光度
8
9
10
11
保留时间(分钟)

图7

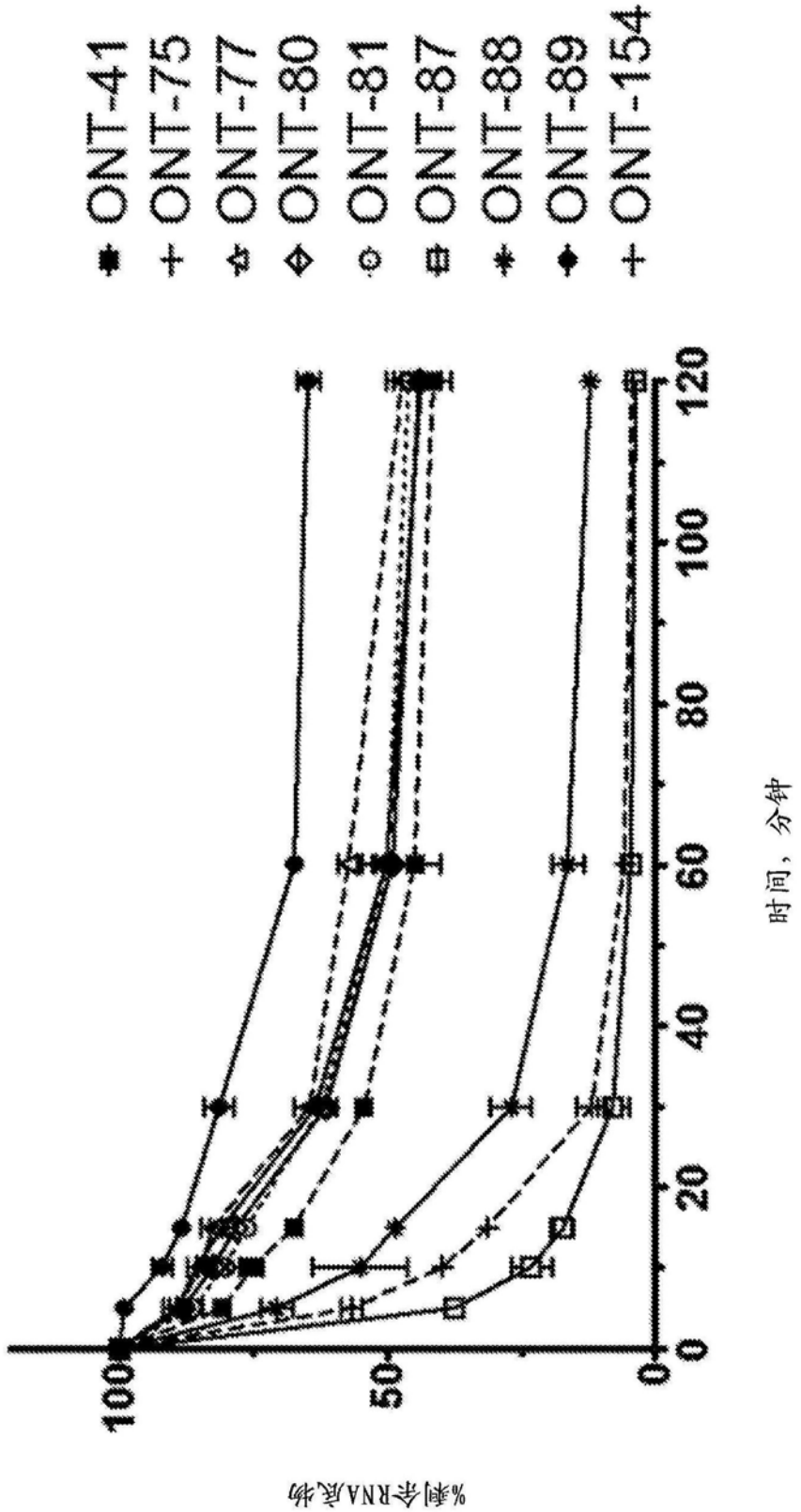

ONT-41
ONT-75
ONT-77
ONT-80
ONT-81
ONT-87
ONT-88
ONT-89
ONT-154
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
时间，分钟
%剩余RNA底物

图8

2'-MOE
2'-F
2'-H
2'-OMe
2'-H 5- 甲基 C
2'-MOE 5- 甲基 C
立构无规硫代磷酸酯
Rp 硫代磷酸酯
Sp 硫代磷酸酯
N/A PO
排列的切割位点，仅找到5' P片段
排列的切割位点，5' P和3' OH二者
排列的切割位点，仅找到3' OH片段
未排列的切割产物位点，未进行片段分析

（图A）

图9

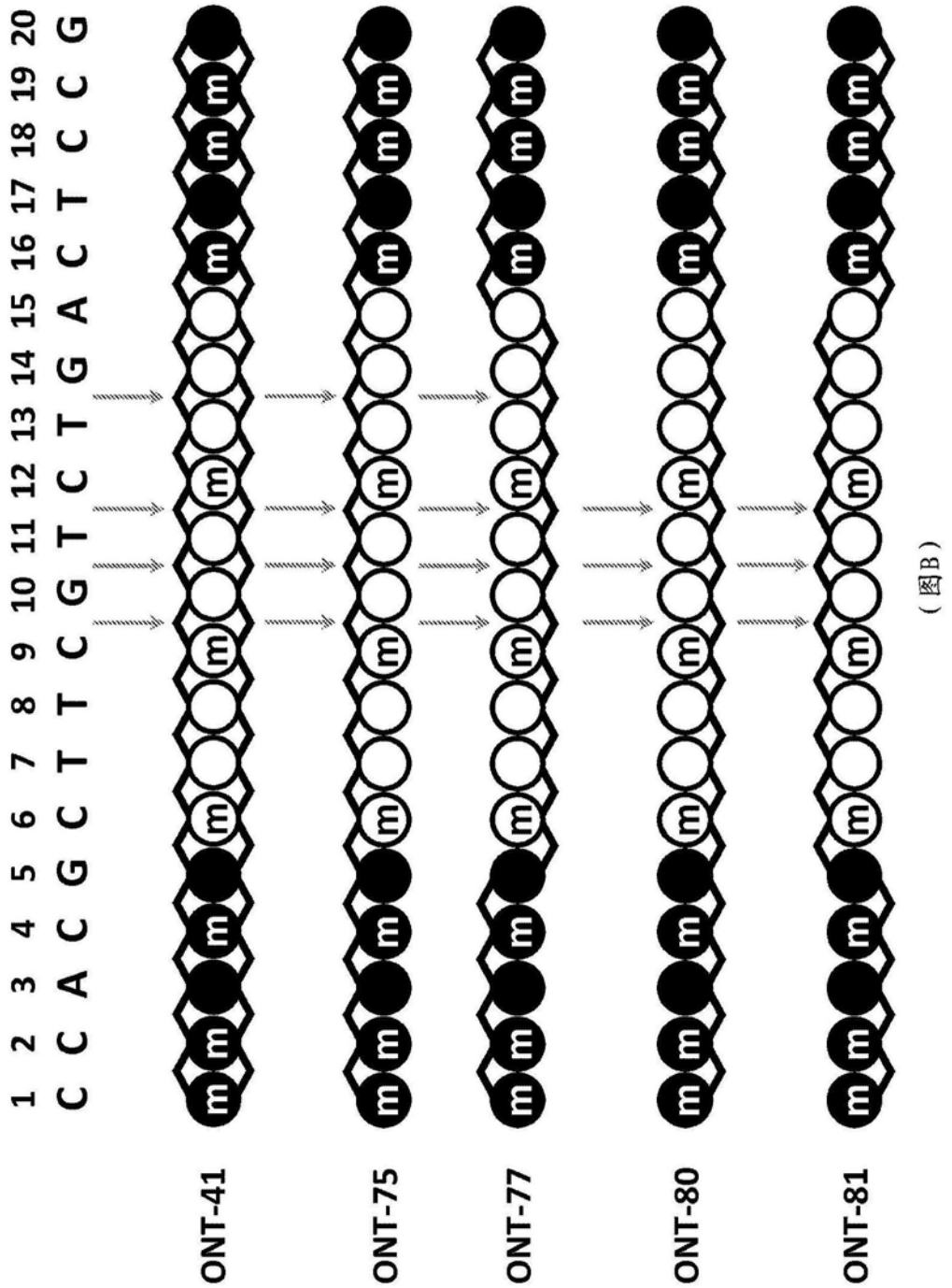

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C C A C G C T T C G T C T G A C T C C G
ONT-41
ONT-75
ONT-77
ONT-80
ONT-81
(图B)

图9(续)

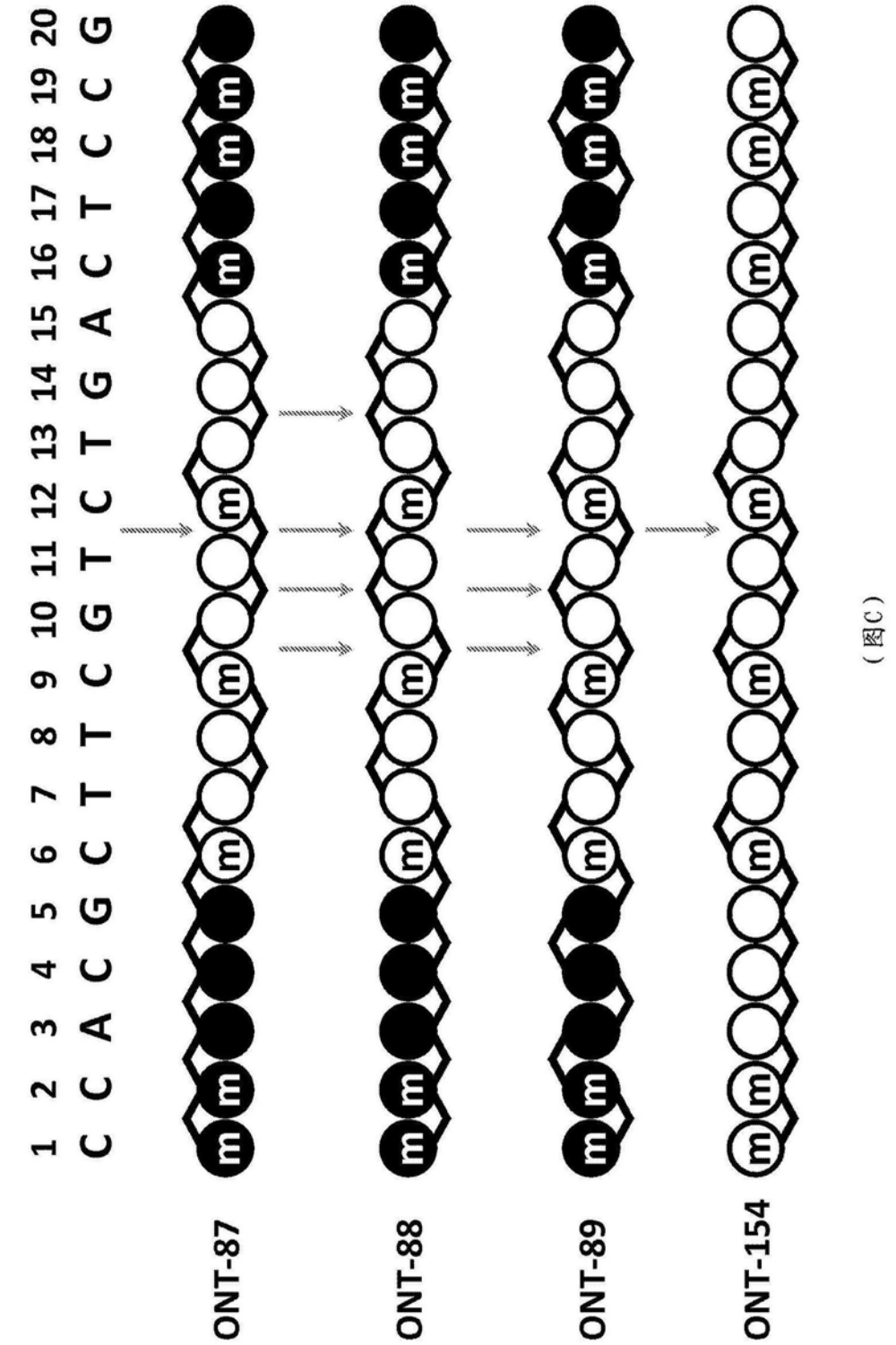

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C C A C G C T T C G T C T G A C T C C G
ONT-87
ONT-88
ONT-89
ONT-154
(图C)

图9(续)

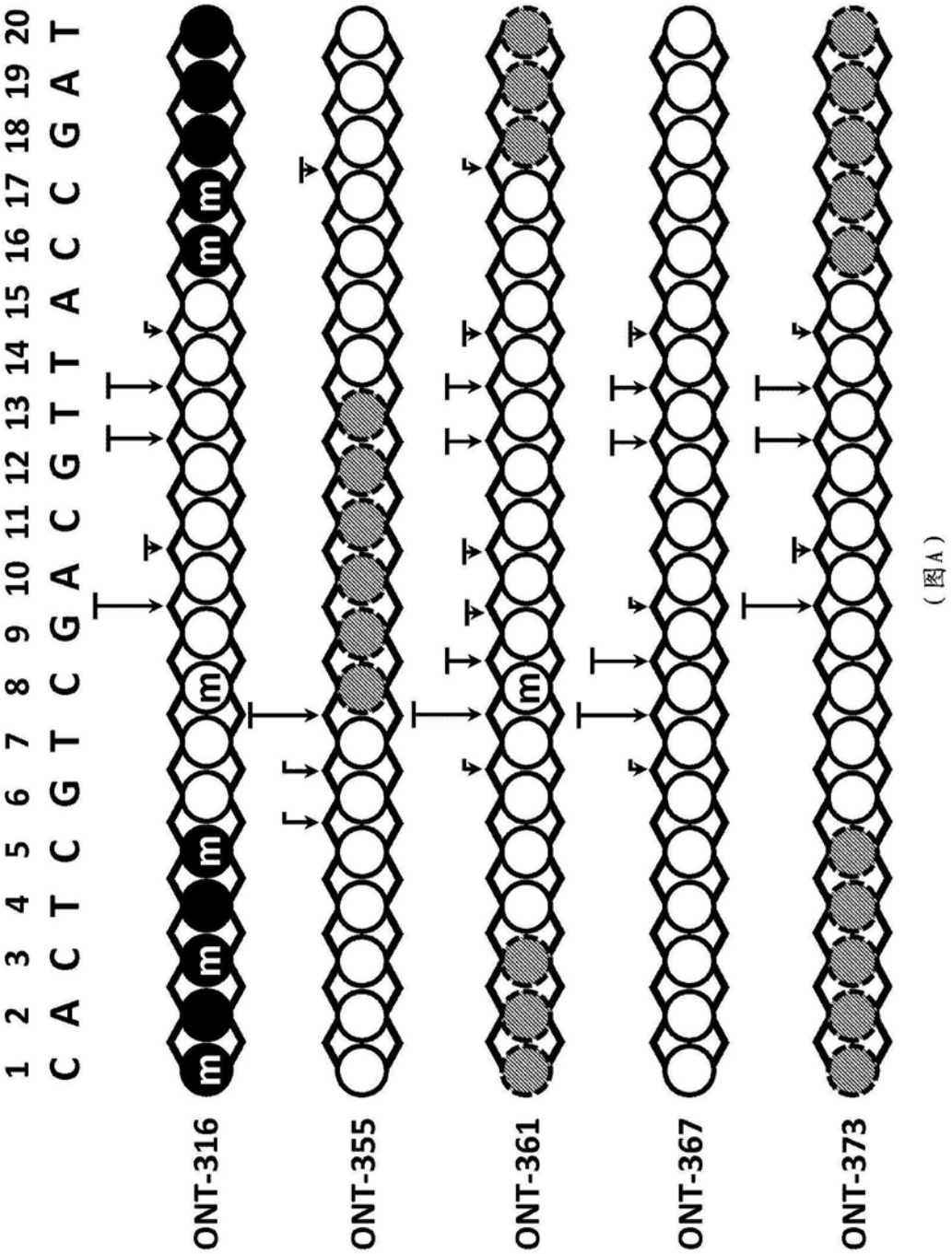

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T
ONT-316
ONT-355
ONT-361
ONT-367
ONT-373
(图A)

图10

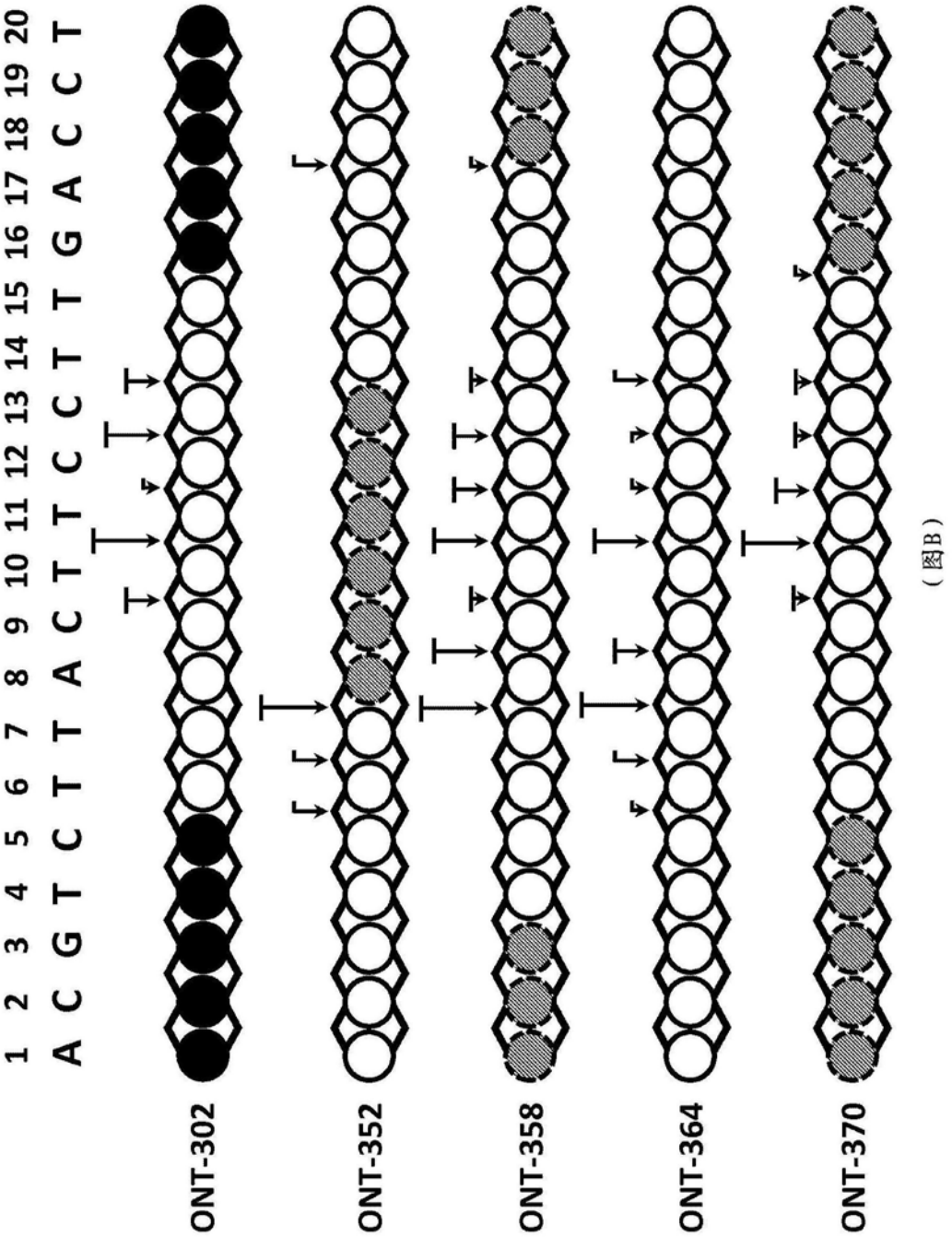

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A C G T C T T A C T T C C T T G A C C T
ONT-302
ONT-352
ONT-358
ONT-364
ONT-370
(图B)

图10(续)

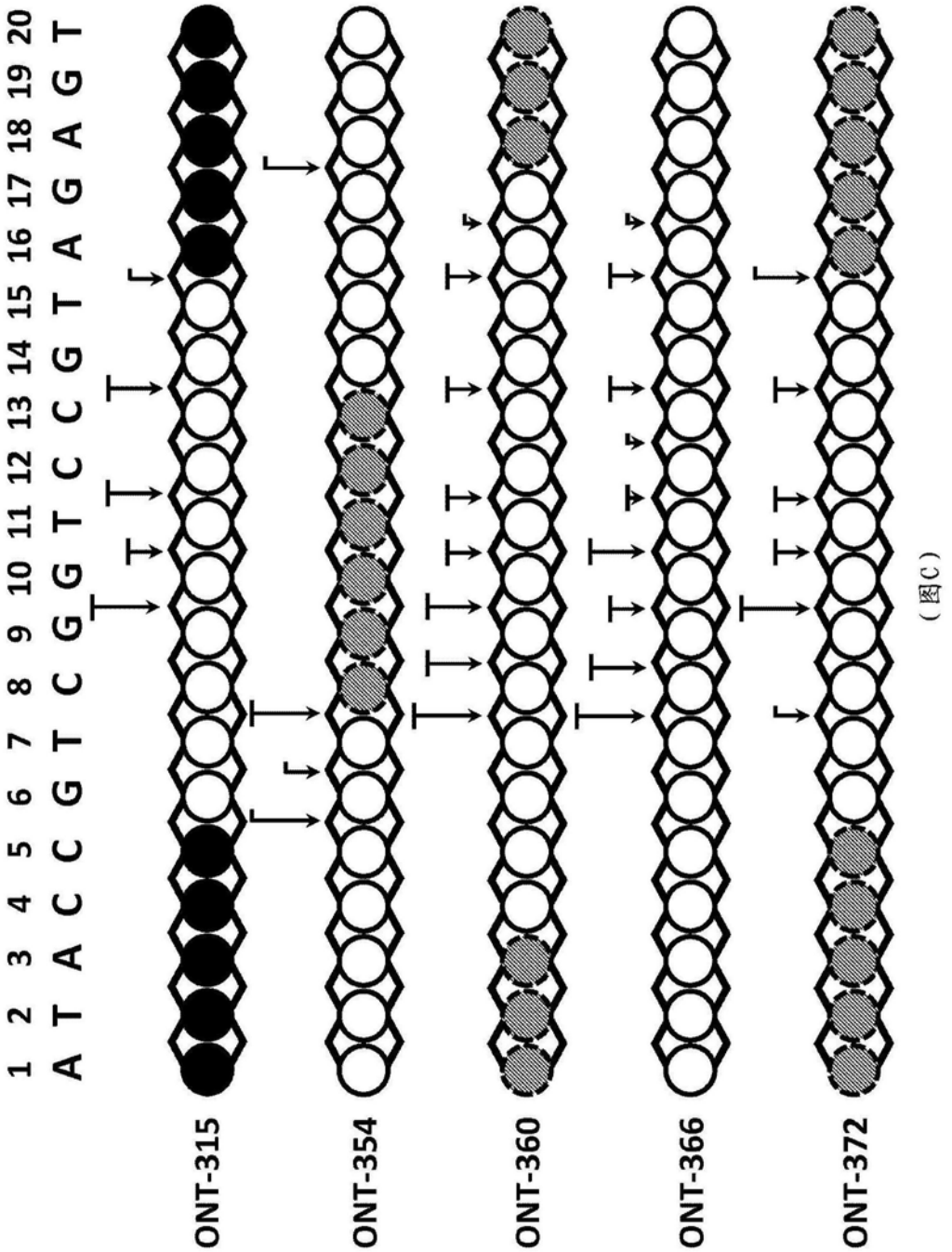

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A T A C C G T C G G T C C G T A G A G T
ONT-315
ONT-354
ONT-360
ONT-366
ONT-372
(图C)

图10(续)

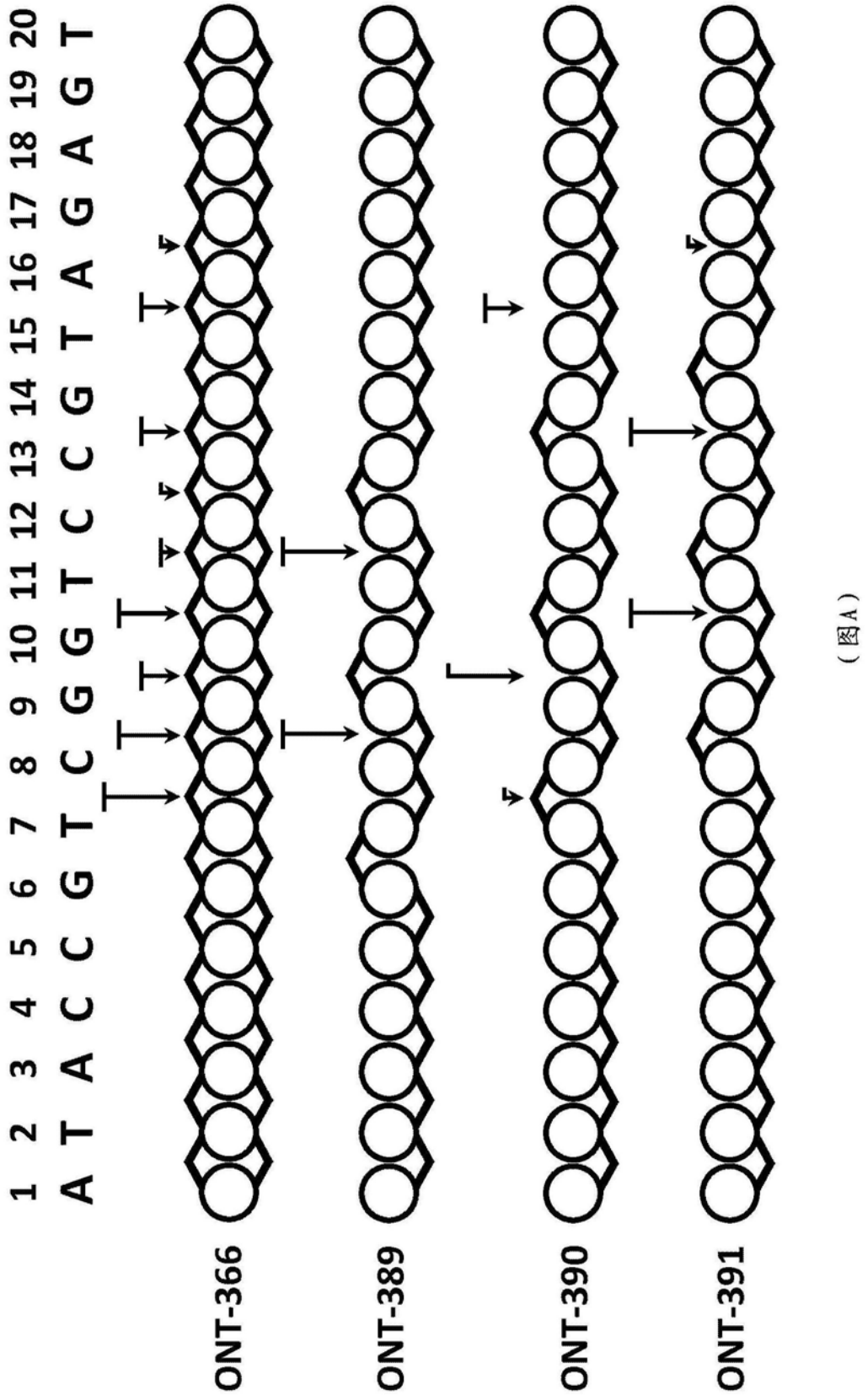

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A T A C C G T C G G G T T C C G T A G A G T
ONT-366
ONT-389
ONT-390
ONT-391
（图A）

图11

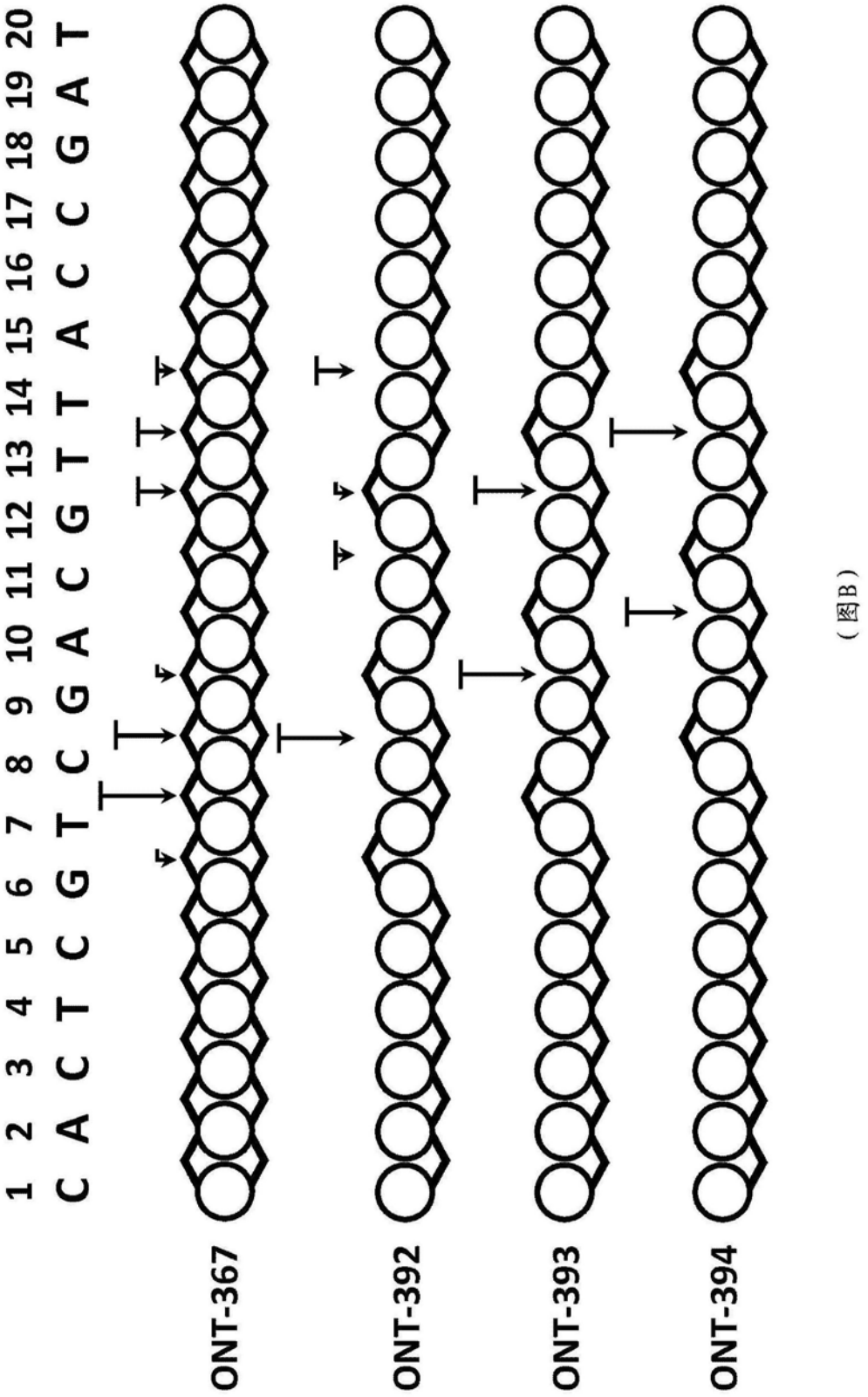

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T
ONT-367
ONT-392
ONT-393
ONT-394
(图B)

图11(续)

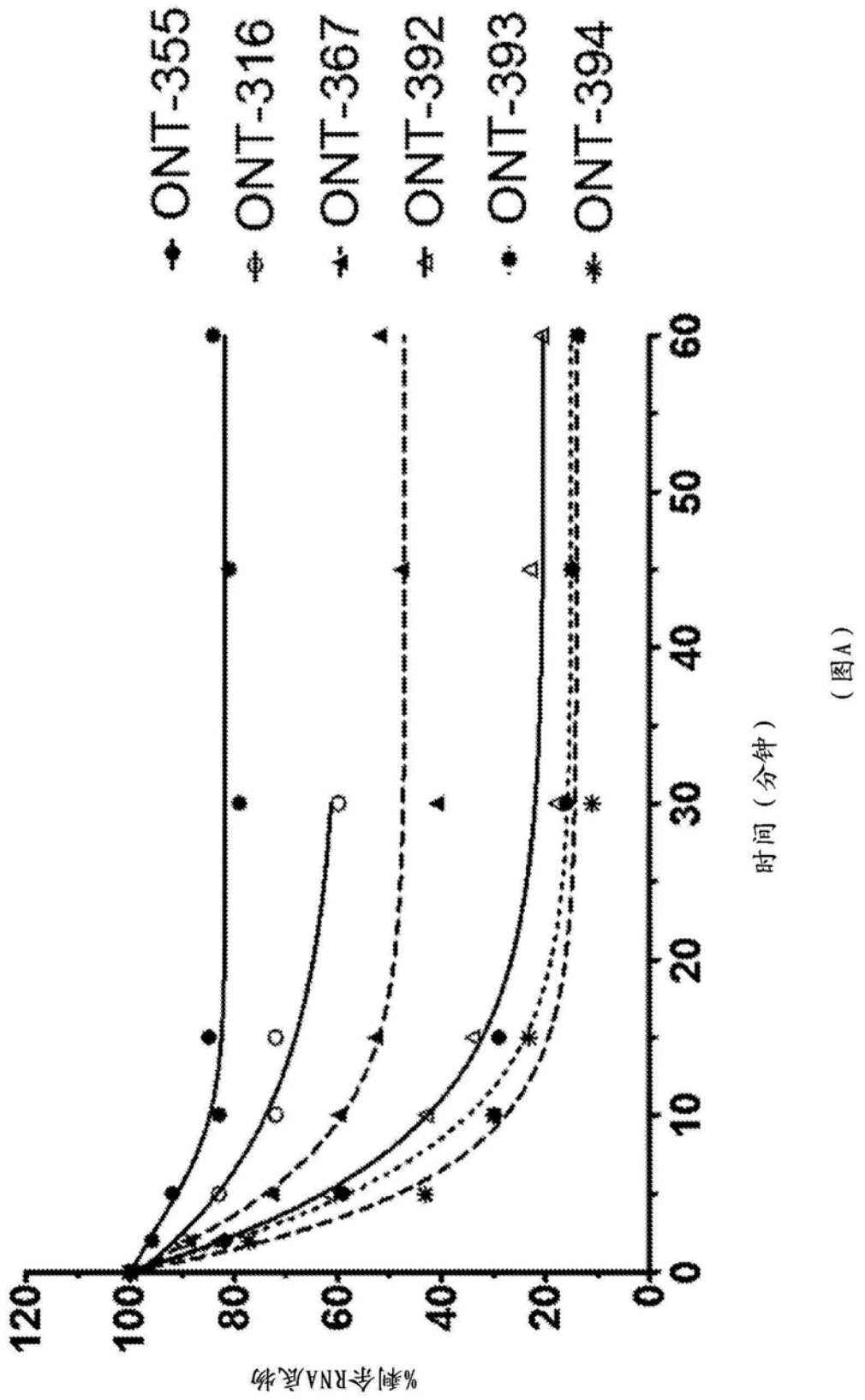

ONT-355
ONT-316
ONT-367
ONT-392
ONT-393
ONT-394
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
时间（分钟）
（图A）

图12

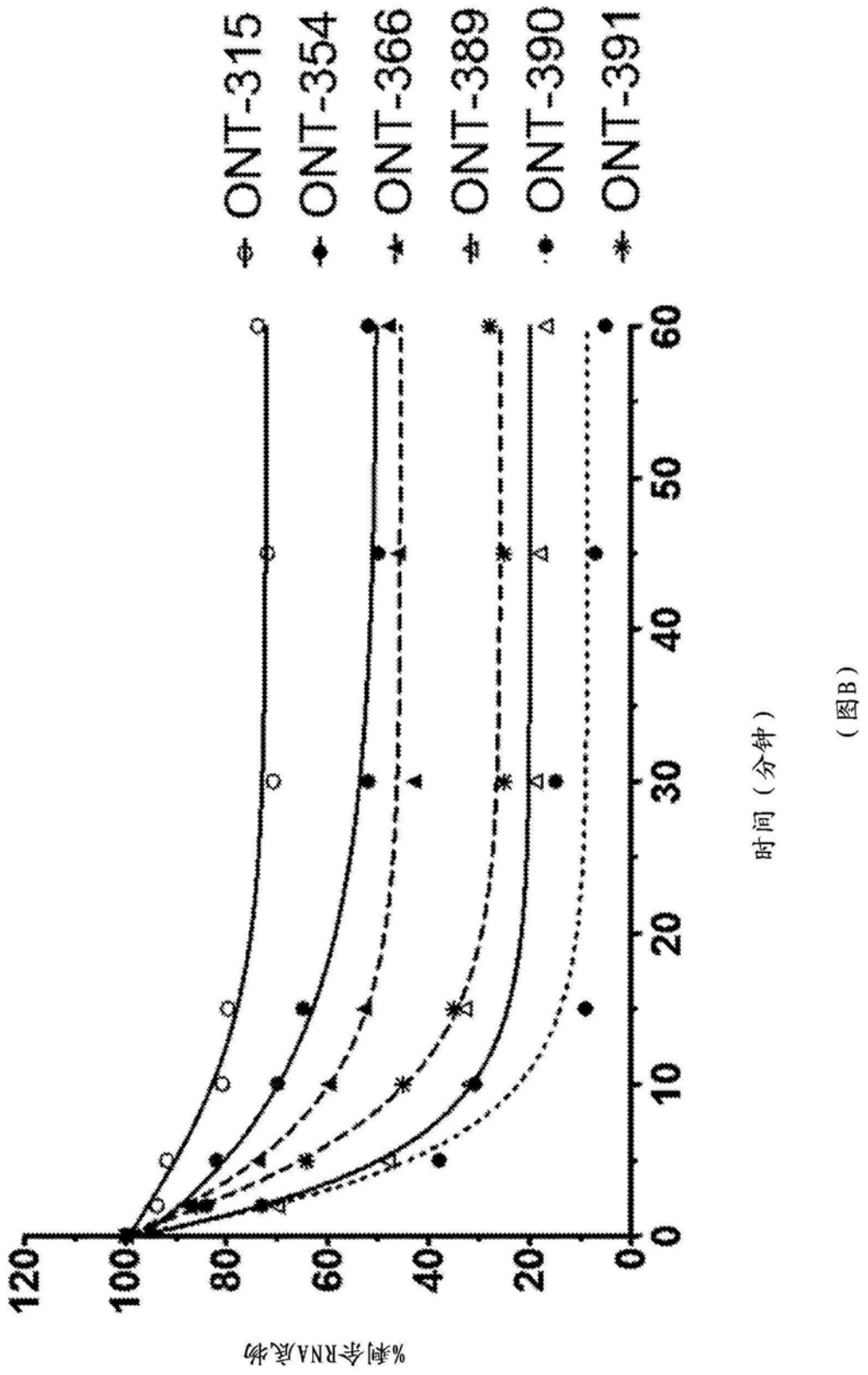

ONT-315
ONT-354
ONT-366
ONT-389
ONT-390
ONT-391
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
时间（分钟）
（图B）

图12(续)

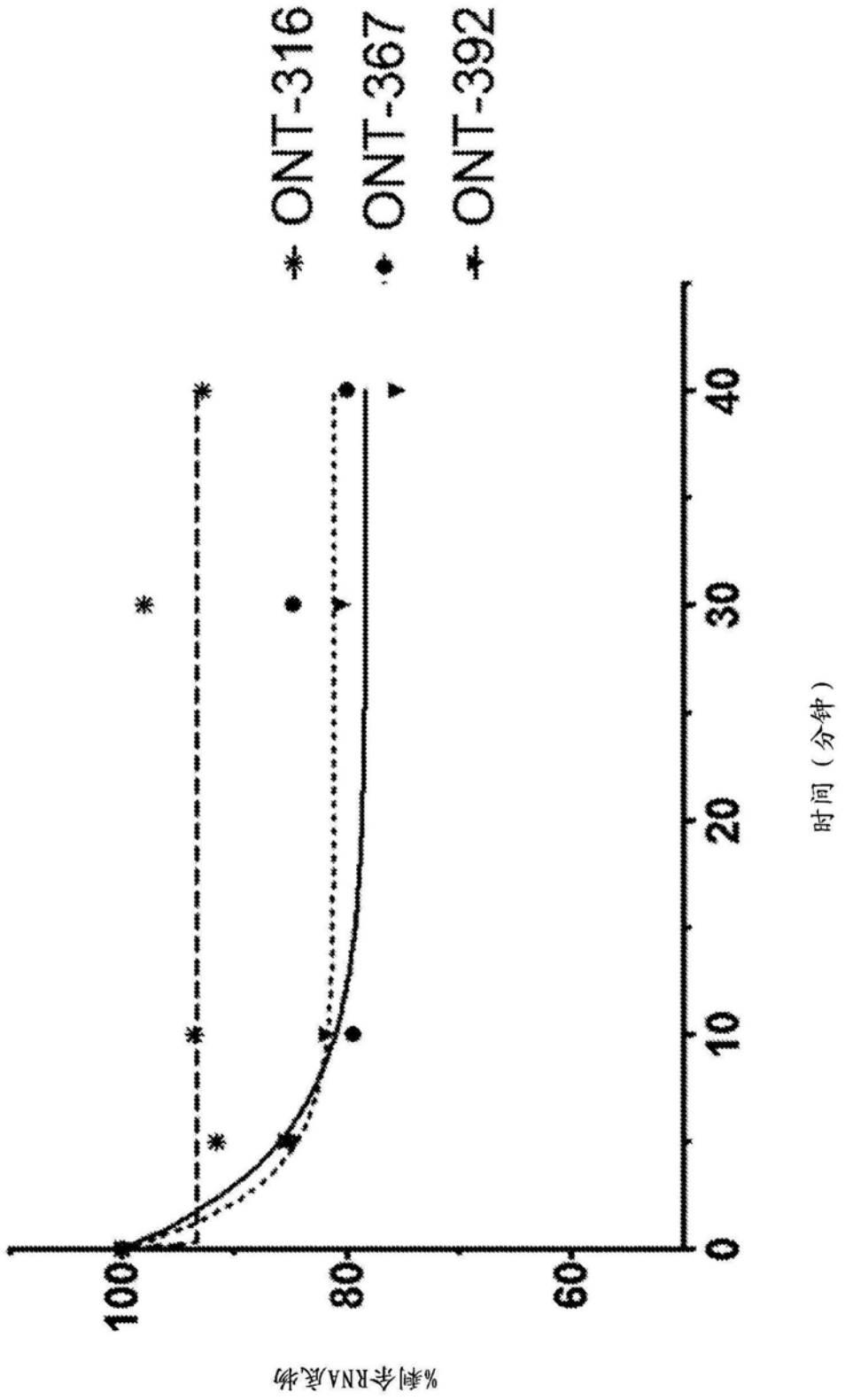


图13

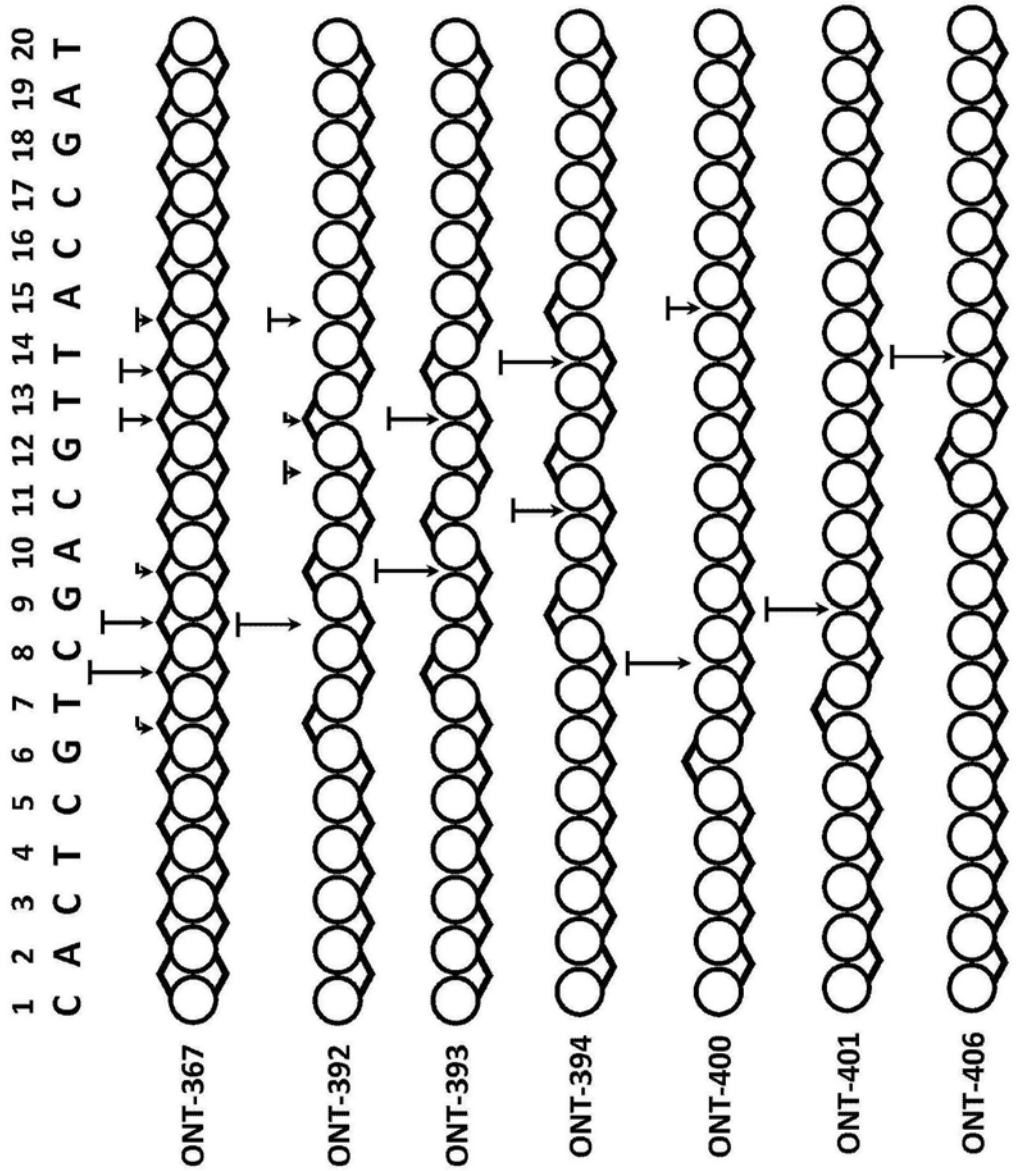

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T
ONT-367
ONT-392
ONT-393
ONT-394
ONT-400
ONT-401
ONT-406

图14

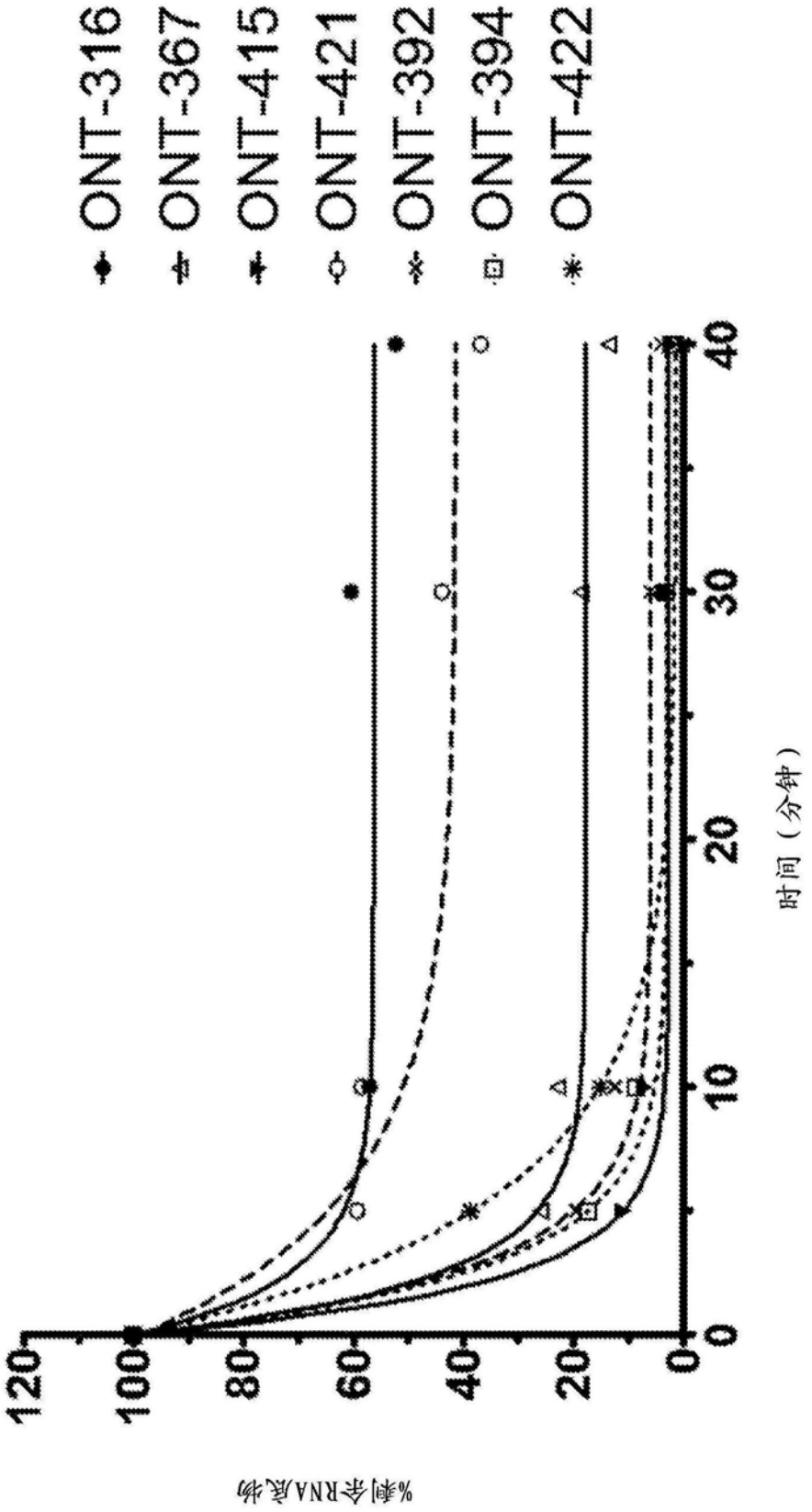

ONT-316
ONT-367
ONT-415
ONT-421
ONT-392
ONT-394
ONT-422
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
时间（分钟）
%剩余RNA底物

图15

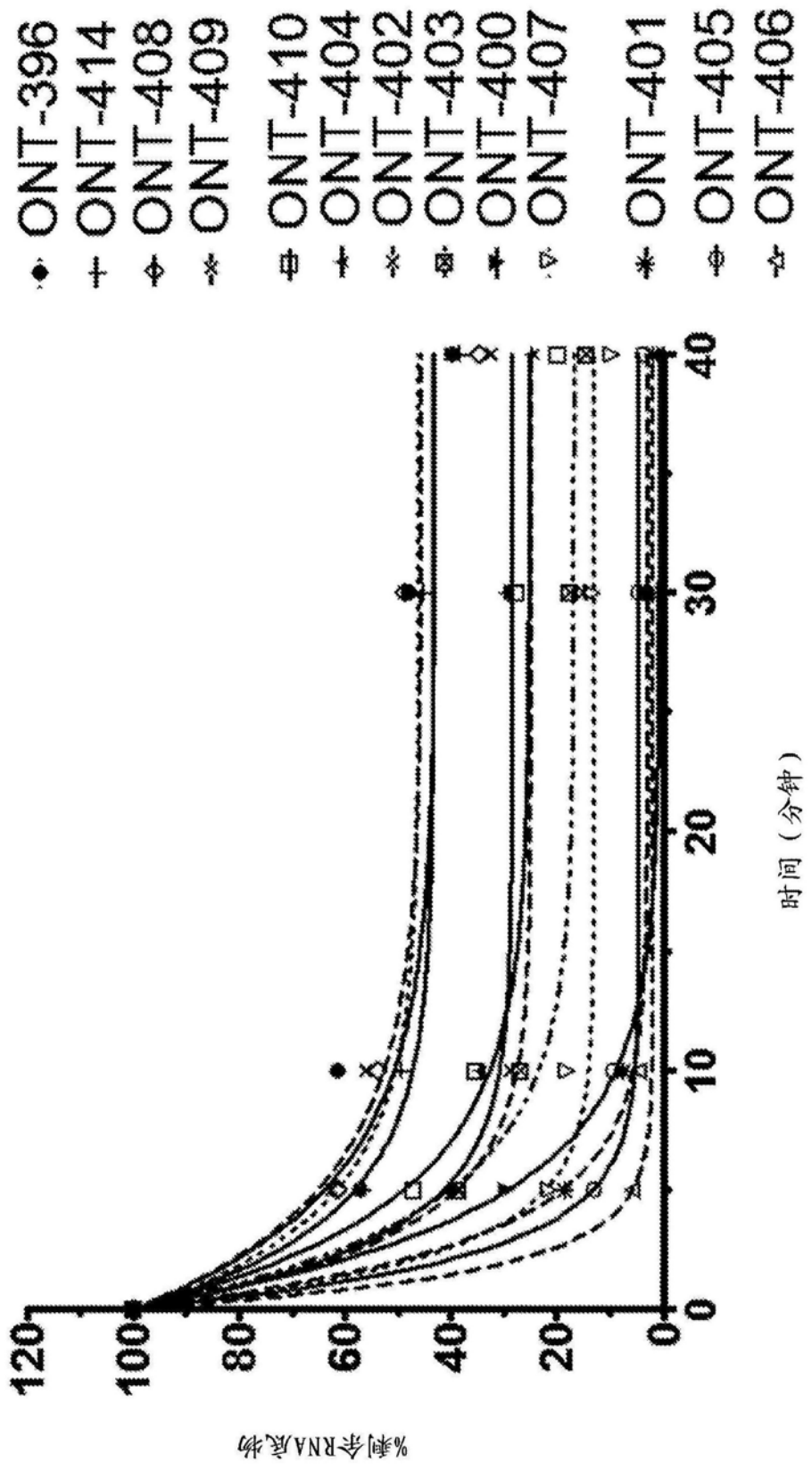

ONT-396
ONT-414
ONT-408
ONT-409
ONT-410
ONT-404
ONT-402
ONT-403
ONT-400
ONT-407
ONT-401
ONT-405
ONT-406
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
时间（分钟）
%剩余RNA底物

图16

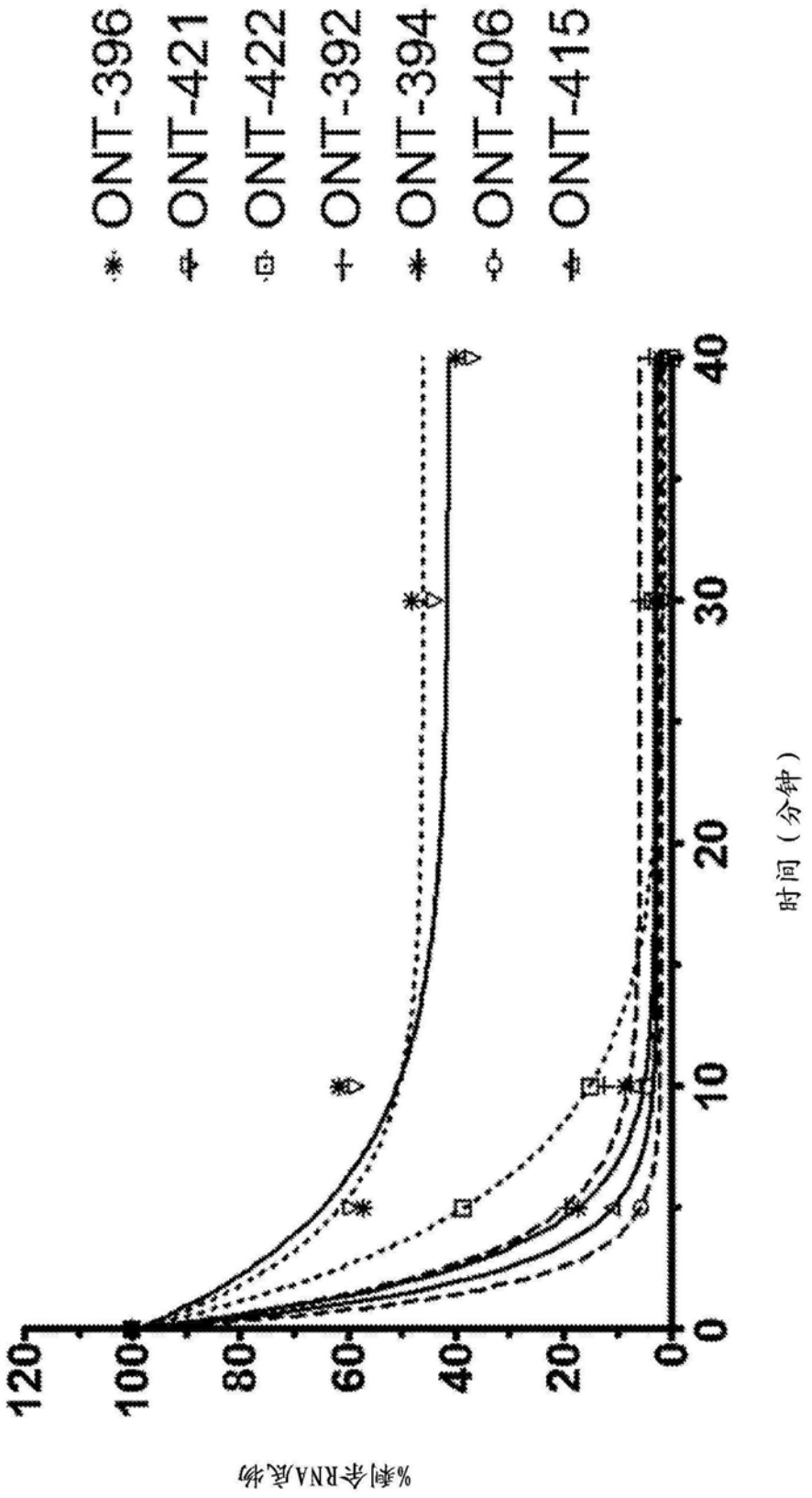

ONT-396
ONT-421
ONT-422
ONT-392
ONT-394
ONT-406
ONT-415
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
时间（分钟）
%剩余RNA底物

图17

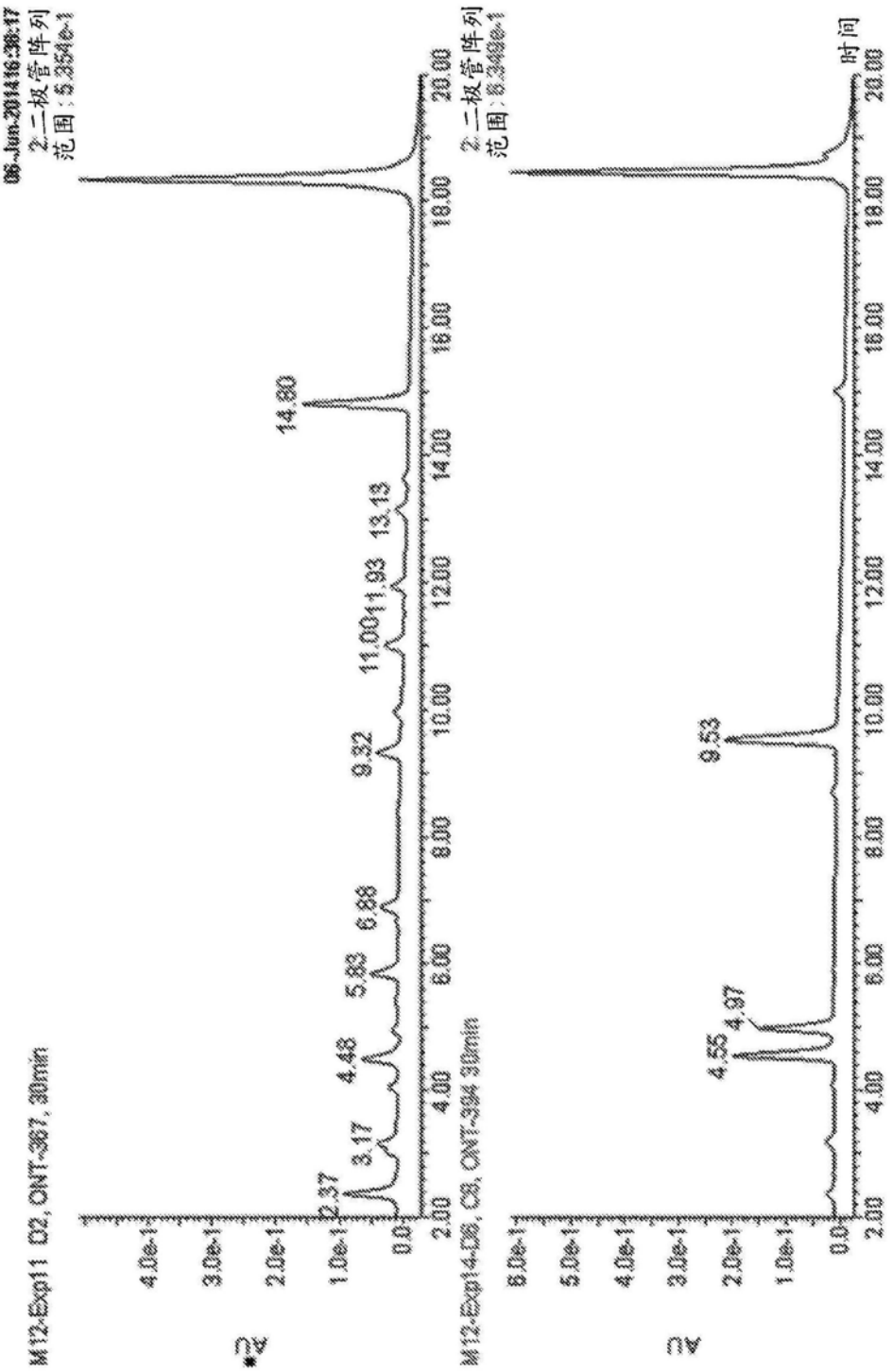

06-Jun-2014 16:38:17
2:二极管阵列
范围: 5.354e-1
14.80
13.13
11.93
11.00
9.32
6.88
5.83
4.48
3.17
2.37
M12-Exp11 O2, CNT-3867, 30min
mAU
2:二极管阵列
范围: 8.349e-1
9.53
4.97
4.55
M12-Exp14-38, C8, CNT-394 30min
mAU
时间

图18

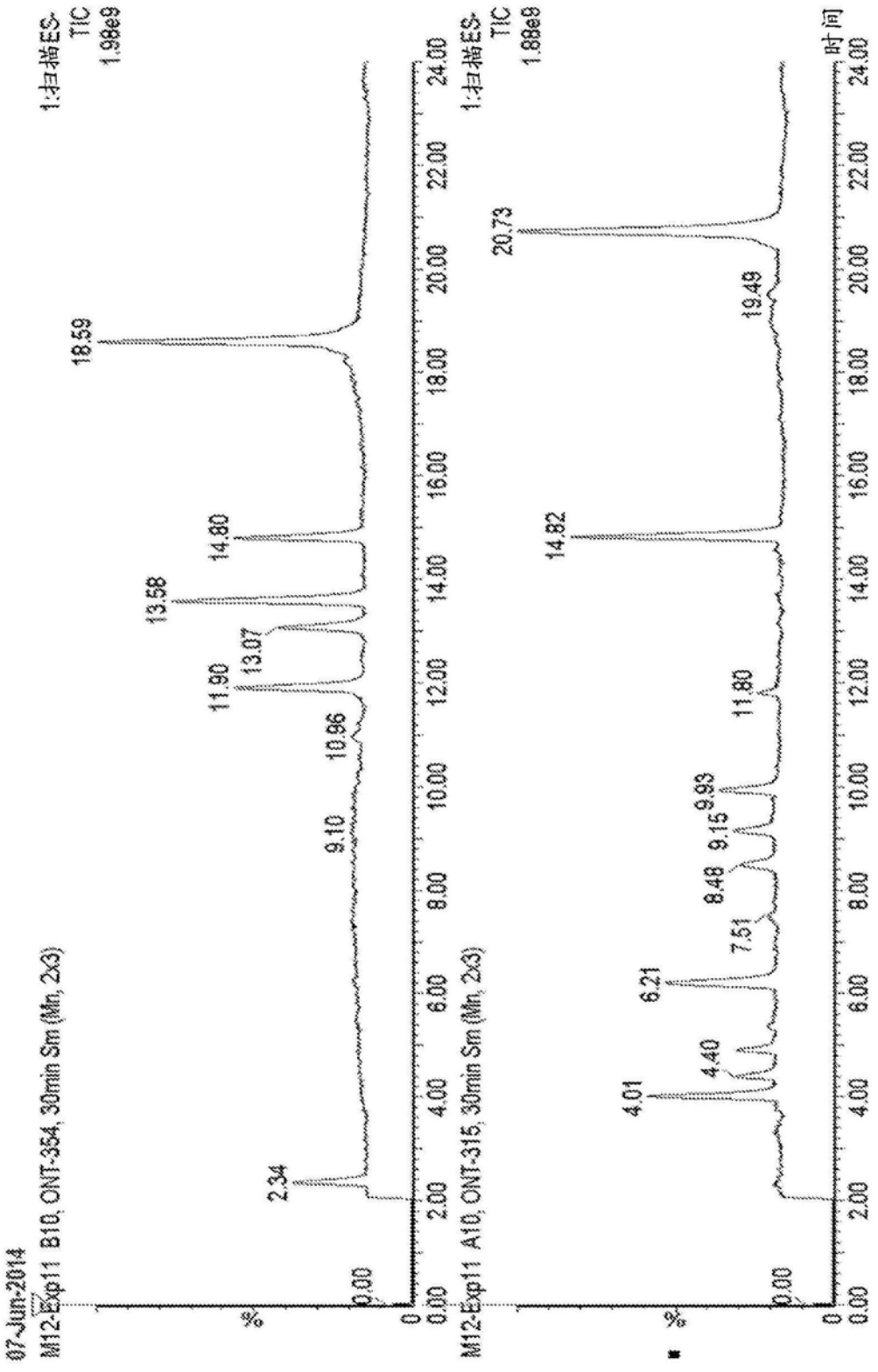

07-Jun-2014
M12-Exp11 B10, ONT-354, 30min Sm (Mn, 2x3)
1:扫描ES-
TIC
1.98e9
18.59
14.80
13.58
13.07
11.90
10.96
9.10
2.34
%
0.00
M12-Exp11 A10, ONT-315, 30min Sm (Mn, 2x3)
1:扫描ES-
TIC
1.88e9
20.73
14.82
19.49
11.80
9.93
9.15
8.48
7.51
6.21
4.40
4.01
%
0.00
0.00 2.00 4.00 6.00 8.00 10.00 12.00 14.00 16.00 18.00 20.00 22.00 24.00
时间

图19

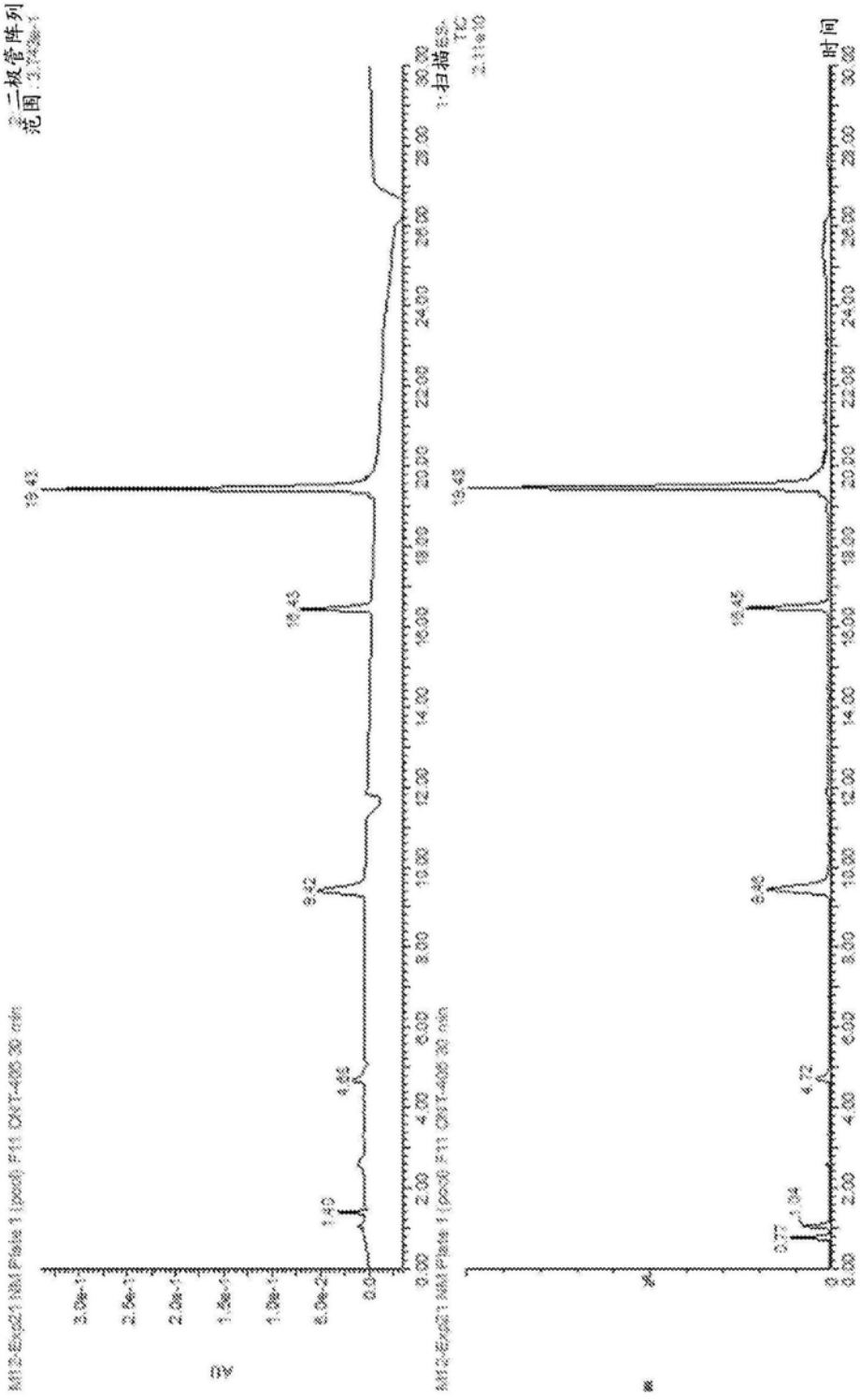

二极管阵列
范围
扫描 ES-
TIC
时间
19.43
16.45
9.42
4.65
1.40
19.43
16.45
9.46
4.72
1.84
0.77

图20

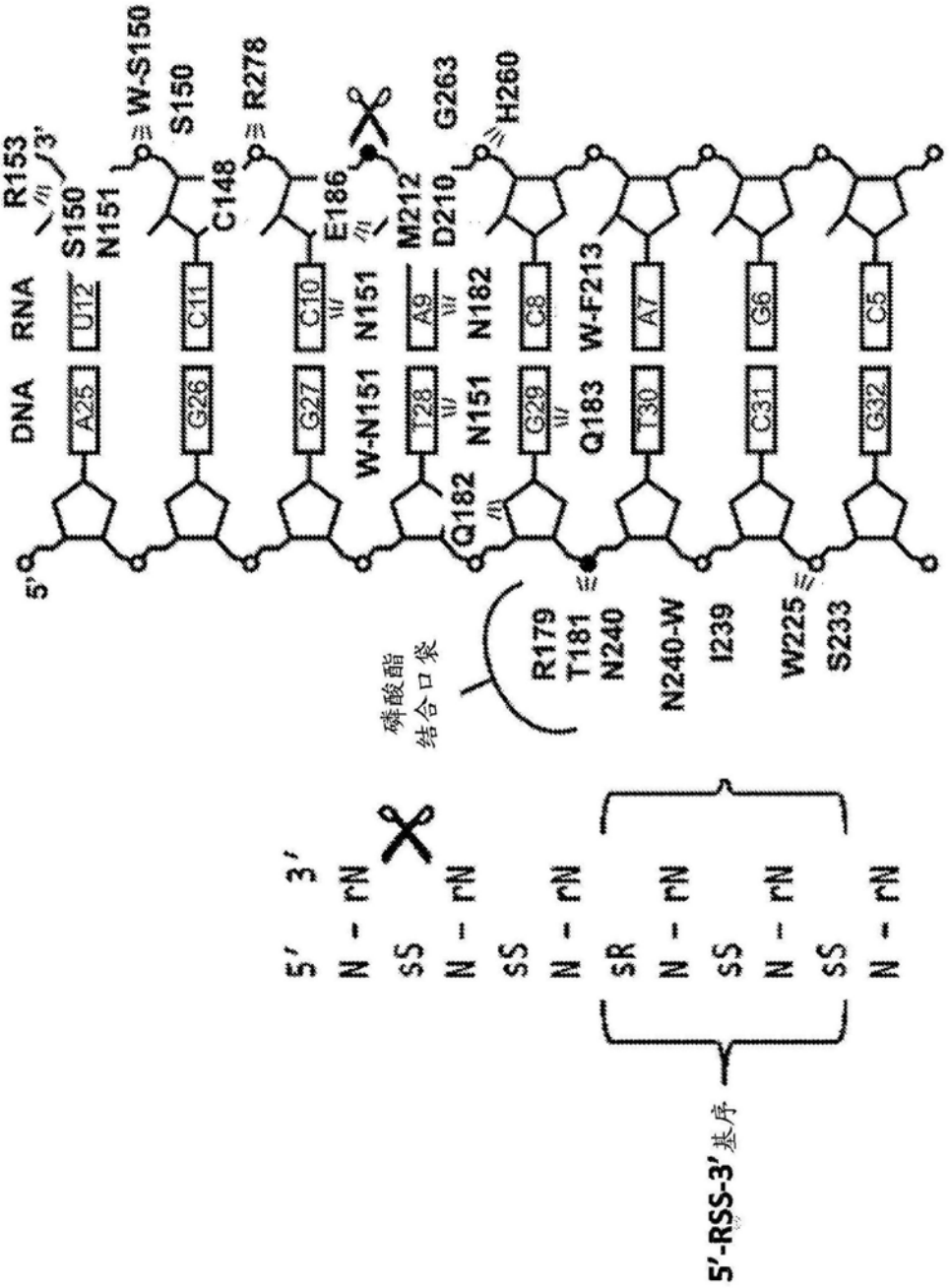
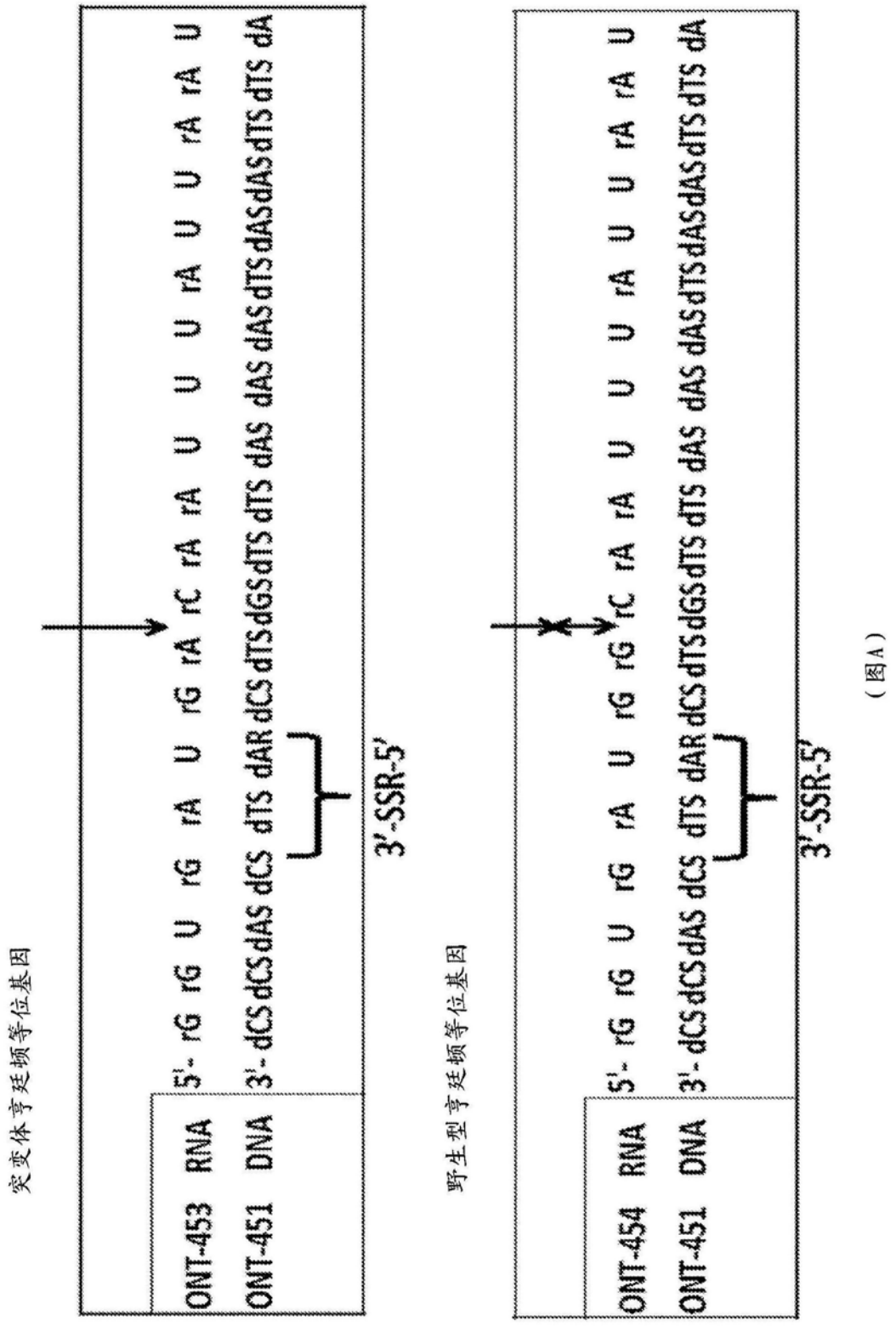
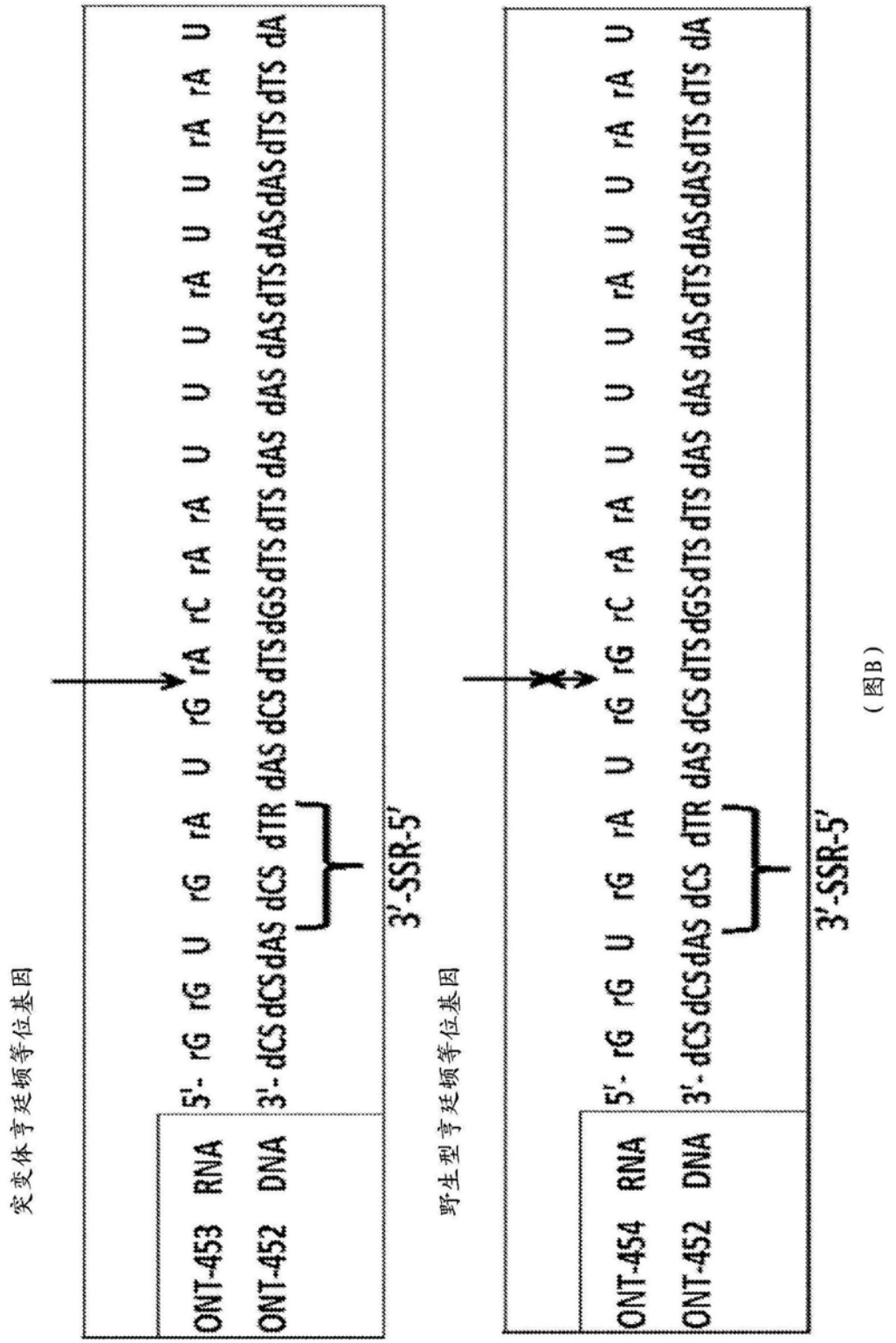

R153
3'
S150
N151
W-S150
S150
C148
R278
E186
M212
D210
G263
H260
RNA
U12
C11
C10
N151
A9
N182
C8
W-F213
A7
G6
C5
DNA
A25
G26
G27
W-N151
T28
N151
G29
Q183
T30
C31
G32
5'
Q182
磷酸酯
结合口袋
R179
T181
N240
N240-W
I239
W225
S233
5' 3'
N - rN
sS
N - rN
sS
N - rN
sR
N - rN
sS
N - rN
sS
N - rN
5'-RSS-3'基序

图21


突变体亨廷顿等位基因
ONT-453 RNA 5'- rG rG U rG rA U rG rA rC rA rA U U U U rA U U rA rA U
ONT-451 DNA 3'- dCS dCS dAS dCS dTS dAR dCS dTS dGS dTS dTS dAS dAS dAS dAS dTS dTS dTS dA
3'-SSR-5'
野生型亨廷顿等位基因
ONT-454 RNA 5'- rG rG U rG rA U rG rG rC rA rA U U U U rA U U rA rA U
ONT-451 DNA 3'- dCS dCS dAS dCS dTS dAR dCS dTS dGS dTS dTS dAS dAS dAS dAS dTS dTS dTS dA
3'-SSR-5'

（图A）

图22


突变体亨廷顿等位基因
ONT-453 RNA
ONT-452 DNA
5'- rG rG U rG rA U rG rA rC rA rA U U U U rA U U U rA rA U
3'- dCS dCS dAS dCS dTR dAS dCS dTS dGS dTS dTS dAS dAS dAS dAS dTS dTS dTS dA
3'-SSR-5'
野生型亨廷顿等位基因
ONT-454 RNA
ONT-452 DNA
5'- rG rG U rG rA U rG rG rC rA rA U U U U rA U U U rA rA U
3'- dCS dCS dAS dCS dTR dAS dCS dTS dGS dTS dTS dAS dAS dAS dAS dTS dTS dTS dA
3'-SSR-5'

（图B）

图22(续)

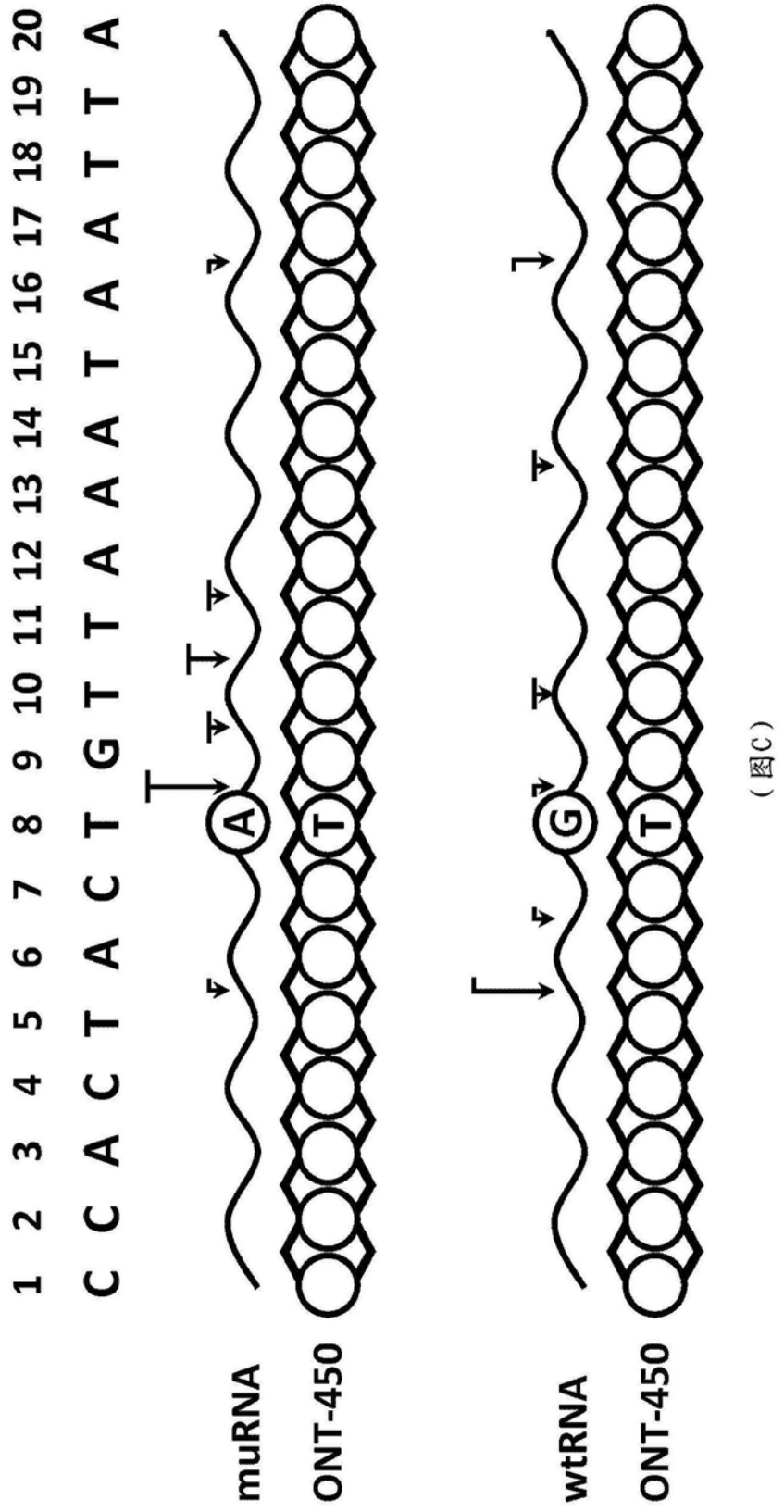

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C C A C T A C T G T T A A A T A A T T A
A
T
muRNA
ONT-450
G
T
wtRNA
ONT-450
(图C)

图22(续)

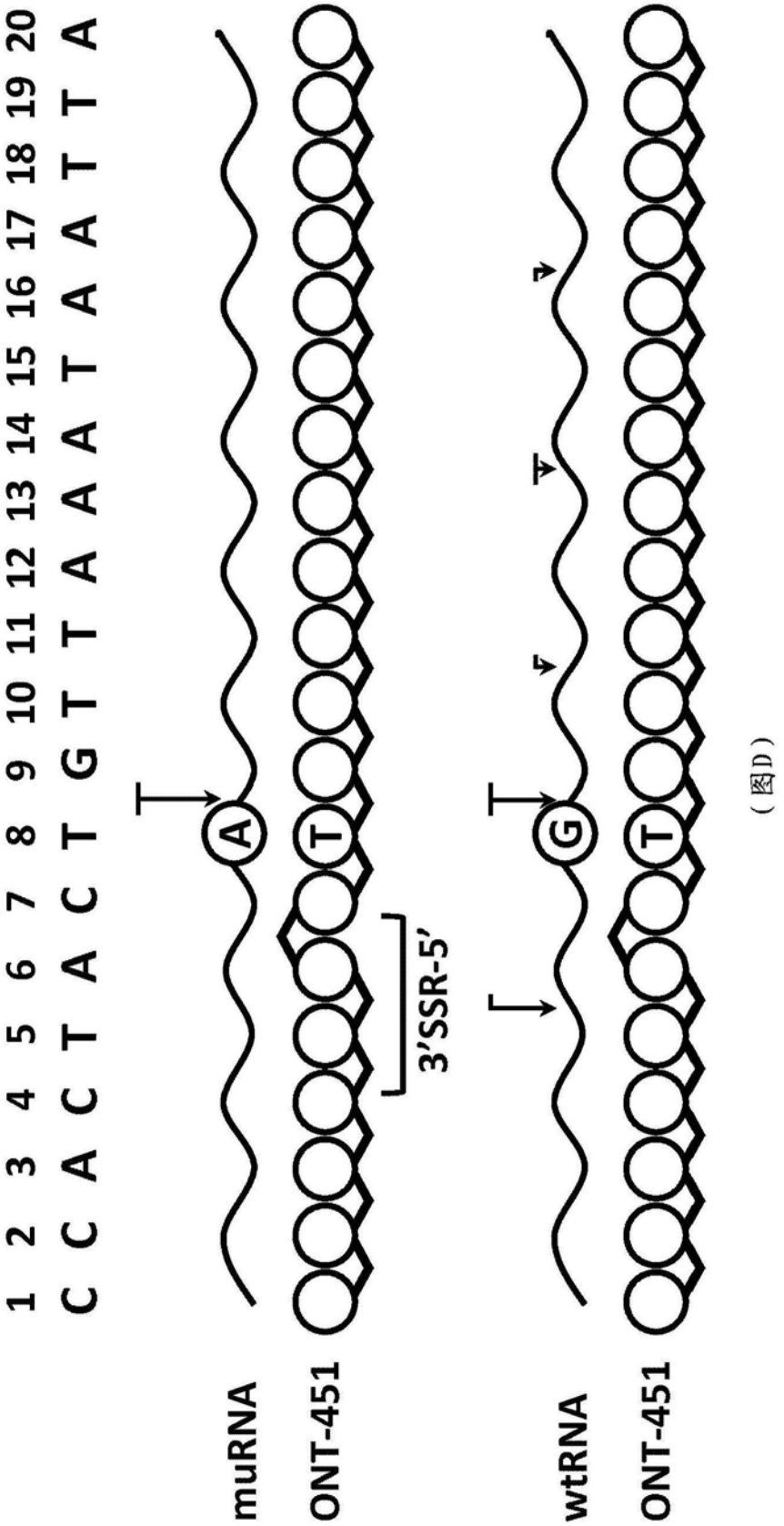
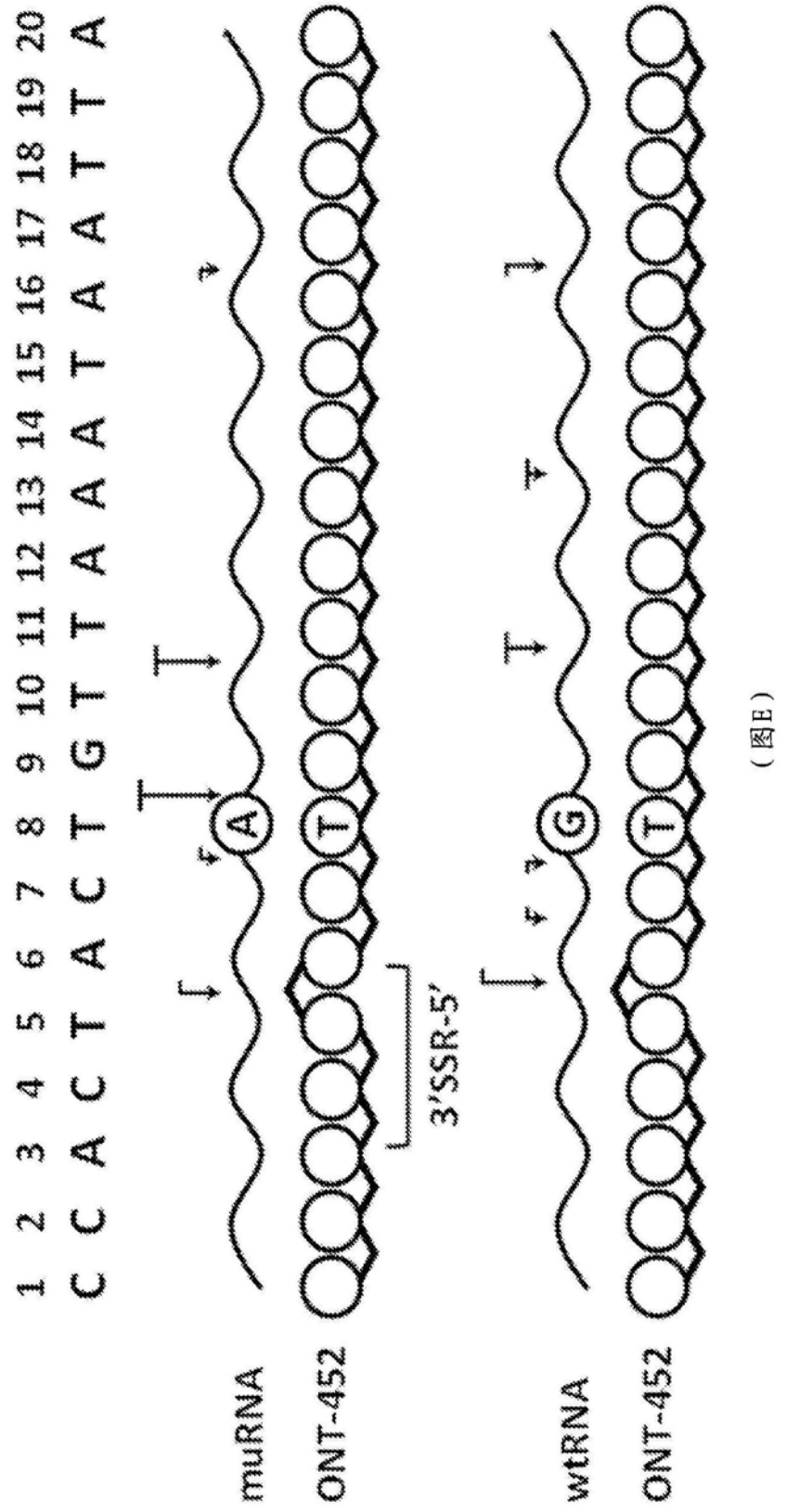

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C C A C T A C T G T T A A A A T A A T T A
A
T
3'SSR-5'
muRNA
ONT-451
G
T
wtRNA
ONT-451
(图D)

图22(续)


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C C A C T A C T G T T A A A T A A T T A
muRNA
ONT-452
3'SSR-5'
wtRNA
ONT-452
A
T
G
T

(图E)

图22(续)

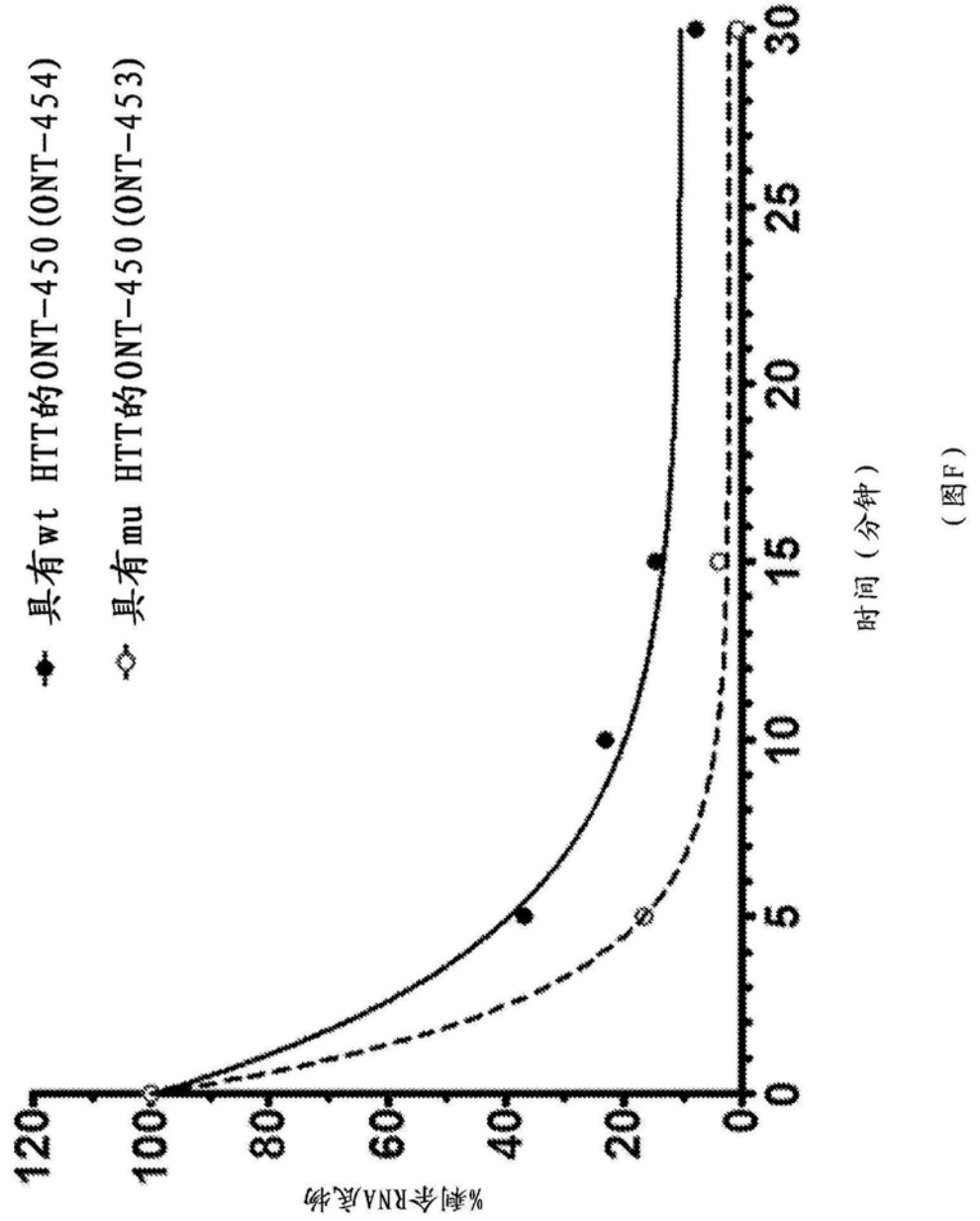

具有wt HTT的ONT-450(ONT-454)
具有mu HTT的ONT-450(ONT-453)
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（分钟）
（图F）

图22(续)

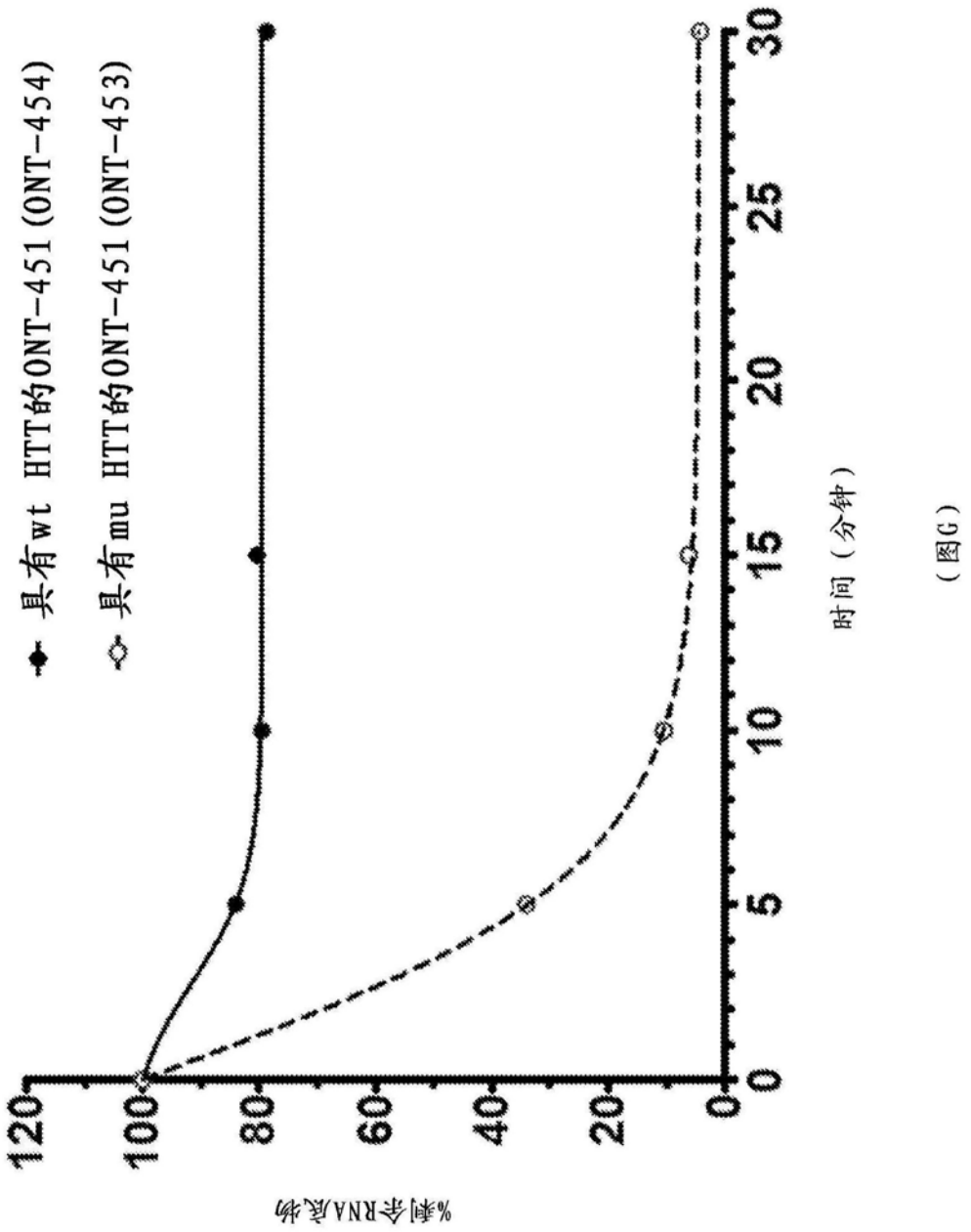

具有wt HTT的ONT-451 (ONT-454)
具有mu HTT的ONT-451 (ONT-453)
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（分钟）
（图G）

图22(续)

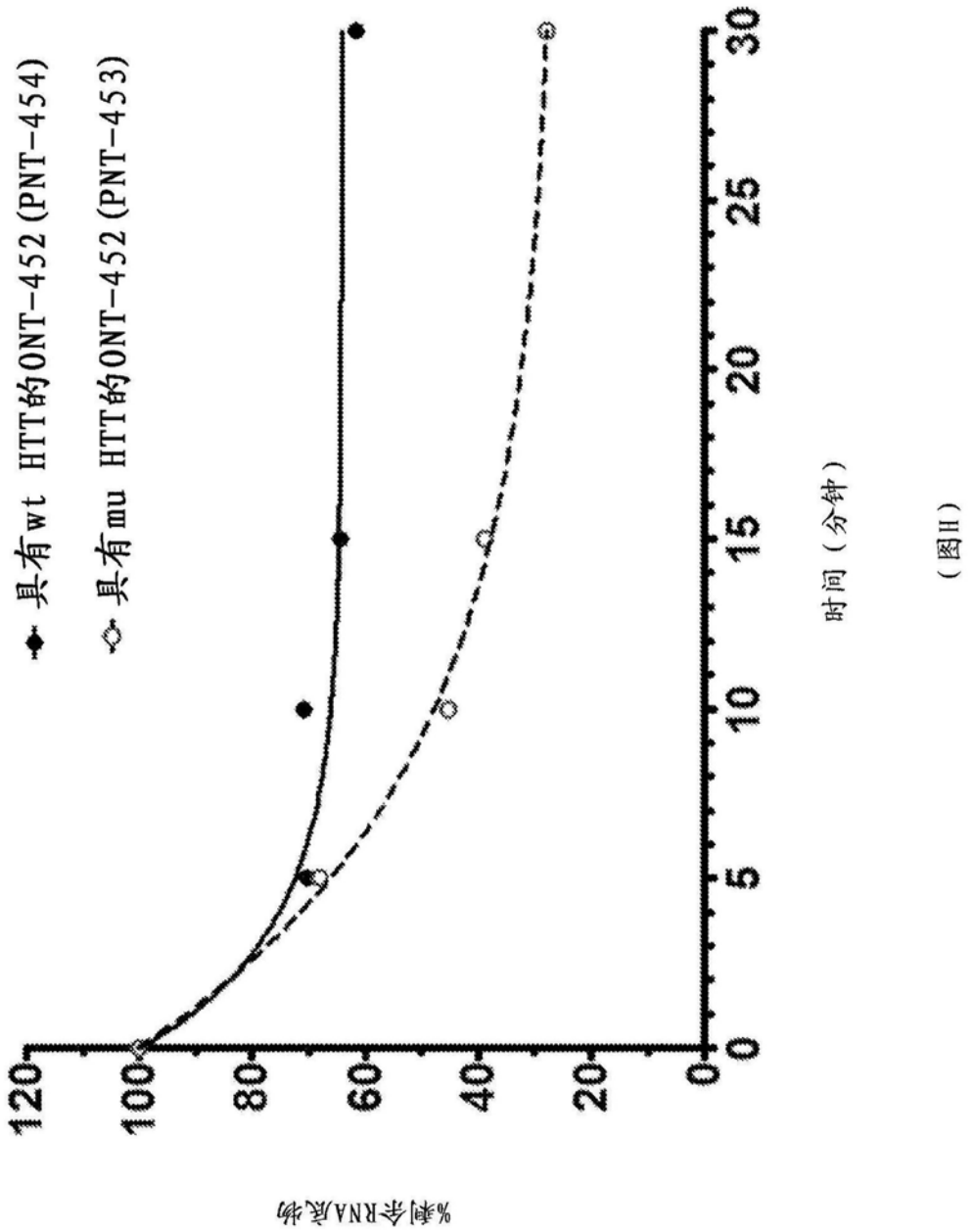

具有wt HTT的ONT-452 (PNT-454)
具有mu HTT的ONT-452 (PNT-453)
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（分钟）
（图II）

图22(续)

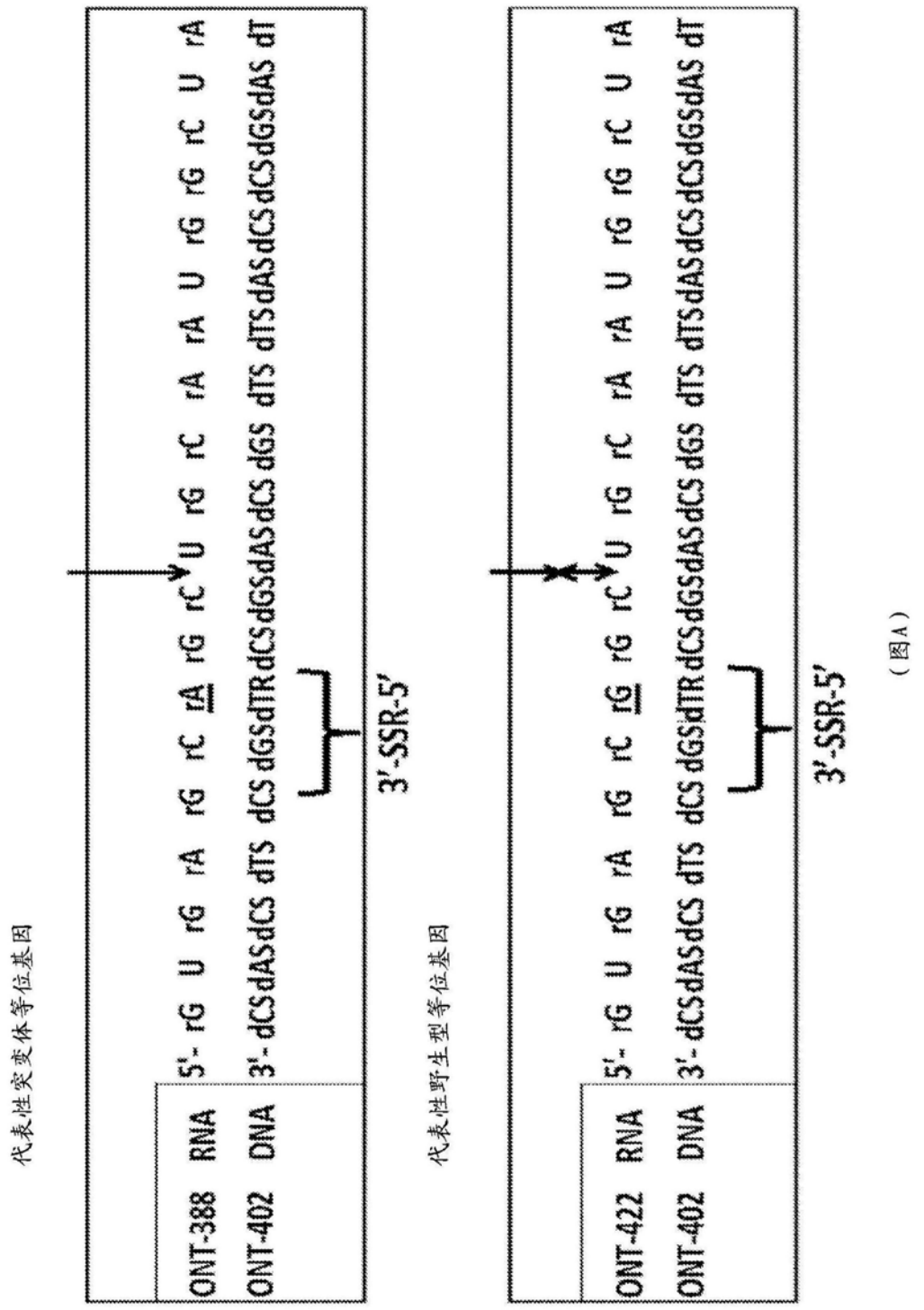
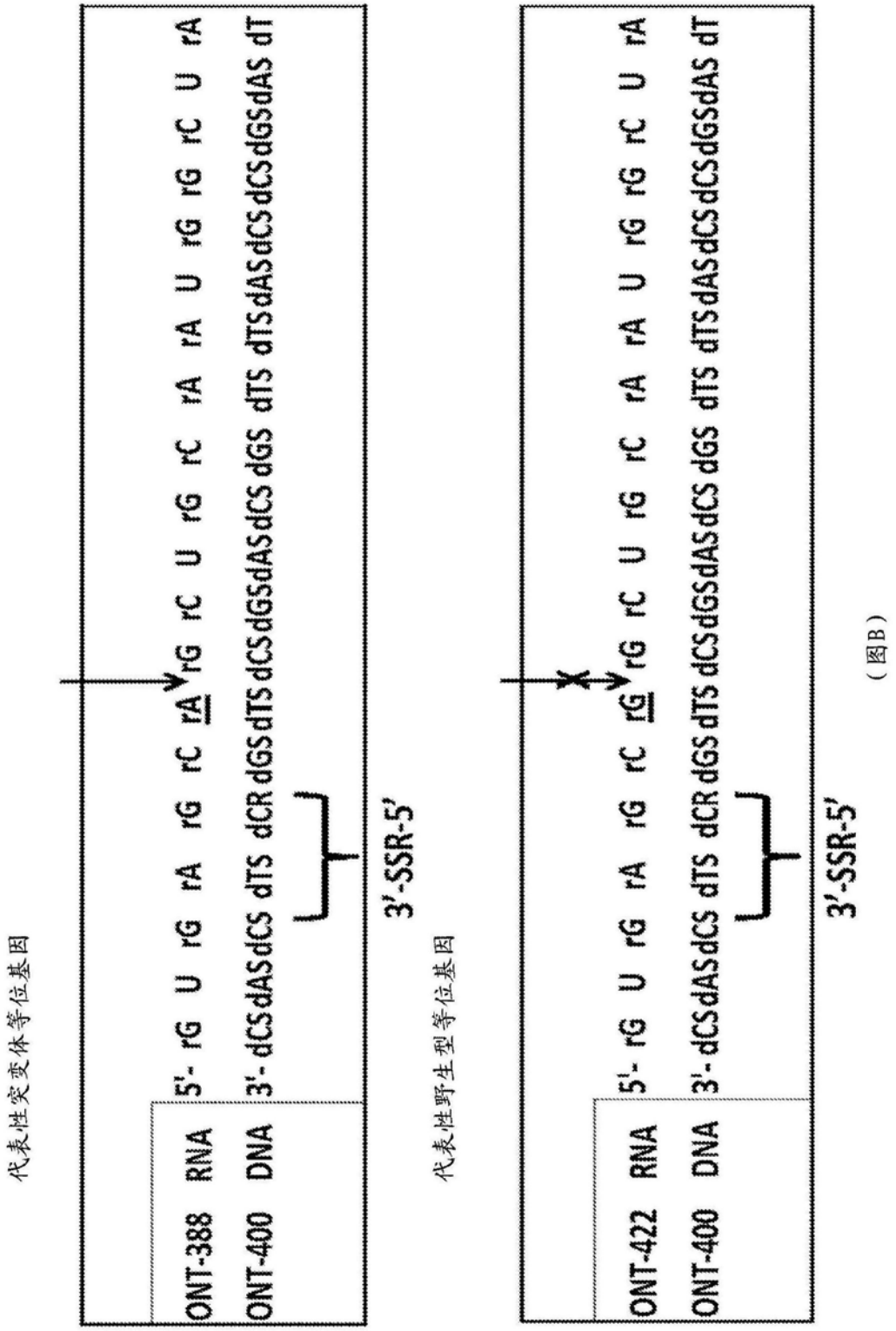
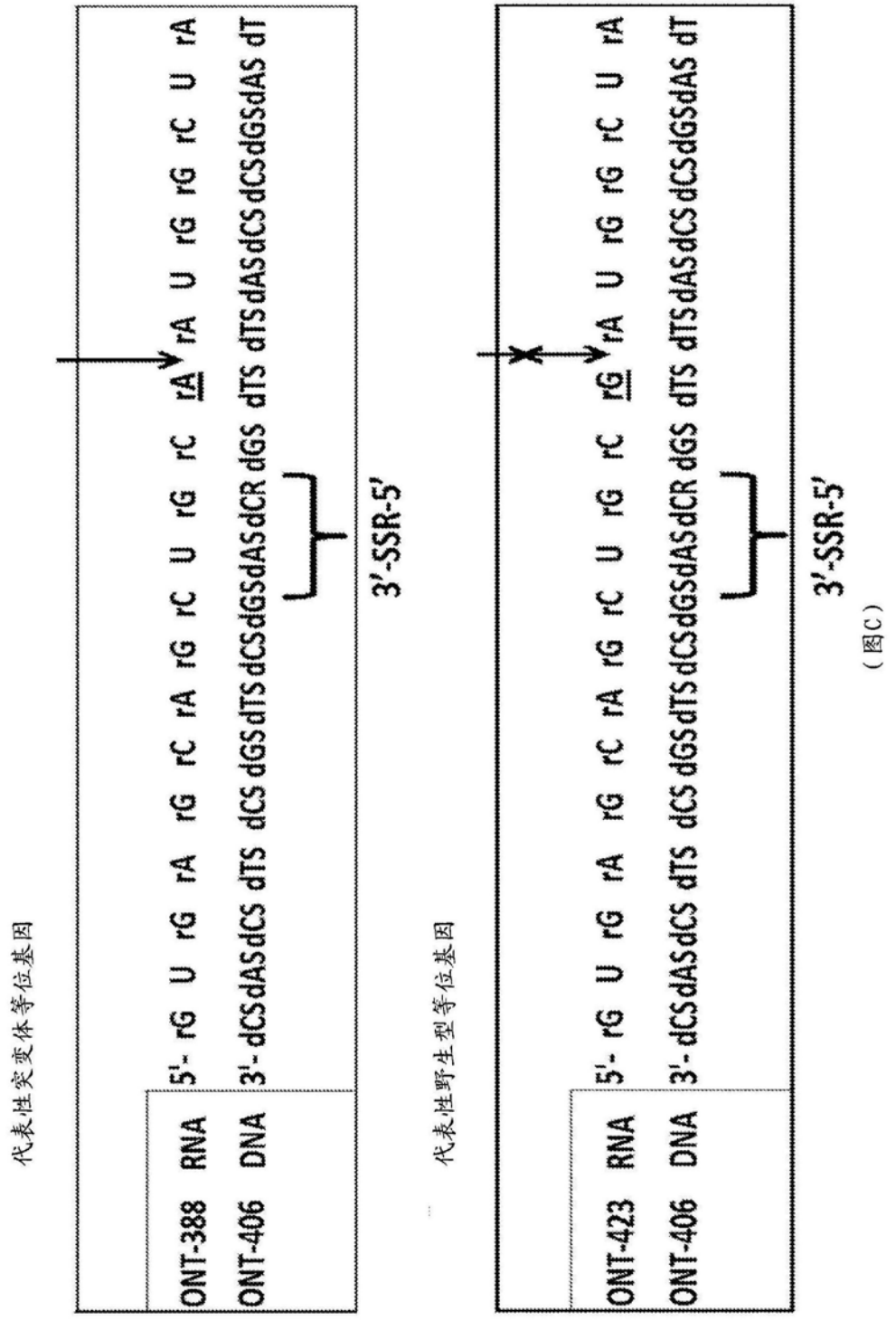

代表性突变体等位基因
ONT-388 RNA 5'- rG U rG rA rG rC rA rG rC U rG rC rA rA U rG rG rC U rA
ONT-402 DNA 3'- dCS dAS dCS dTS dCS dGS dTR dCS dGS dAS dCS dGS dTS dTS dAS dCS dCS dGS dAS dT
3'-SSR-5'
代表性野生型等位基因
ONT-422 RNA 5'- rG U rG rA rG rC rG rG rC U rG rC rA rA U rG rG rC U rA
ONT-402 DNA 3'- dCS dAS dCS dTS dCS dGS dTR dCS dGS dAS dCS dGS dTS dTS dAS dCS dCS dGS dAS dT
3'-SSR-5'
(图A)

图23


代表性突变体等位基因
ONT-388 RNA 5'- rG U rG rA rG rC rA rG rC U rG rC rA rA U rG rG rC U rA
ONT-400 DNA 3'- dCS dAS dCS dTS dCR dGS dTS dCS dGS dAS dCS dAS dCS dGS dTS dTS dAS dCS dCS dGS dAS dT
3'-SSR-5'
代表性野生型等位基因
ONT-422 RNA 5'- rG U rG rA rG rC rG rG rC U rG rC rA rA U rG rG rC U rA
ONT-400 DNA 3'- dCS dAS dCS dTS dCR dGS dTS dCS dGS dAS dCS dAS dCS dGS dTS dTS dAS dCS dCS dGS dAS dT
3'-SSR-5'

（图B）

图23(续)


代表性突变体等位基因
ONT-388 RNA 5'- rG U rG rA rG rC rA rG rC U rG rC rA rA U rG rG rC U rA
ONT-406 DNA 3'- dCS dAS dCS dTS dCS dGS dTS dCS dGS dAS dCR dGS dTS dTS dAS dCS dCS dGS dAS dT
3'-SSR-5'
代表性野生型等位基因
ONT-423 RNA 5'- rG U rG rA rG rC rA rG rC U rG rC rG rA U rG rG rC U rA
ONT-406 DNA 3'- dCS dAS dCS dTS dCS dGS dTS dCS dGS dAS dCR dGS dTS dTS dAS dCS dCS dGS dAS dT
3'-SSR-5'

（图C）

图23(续)

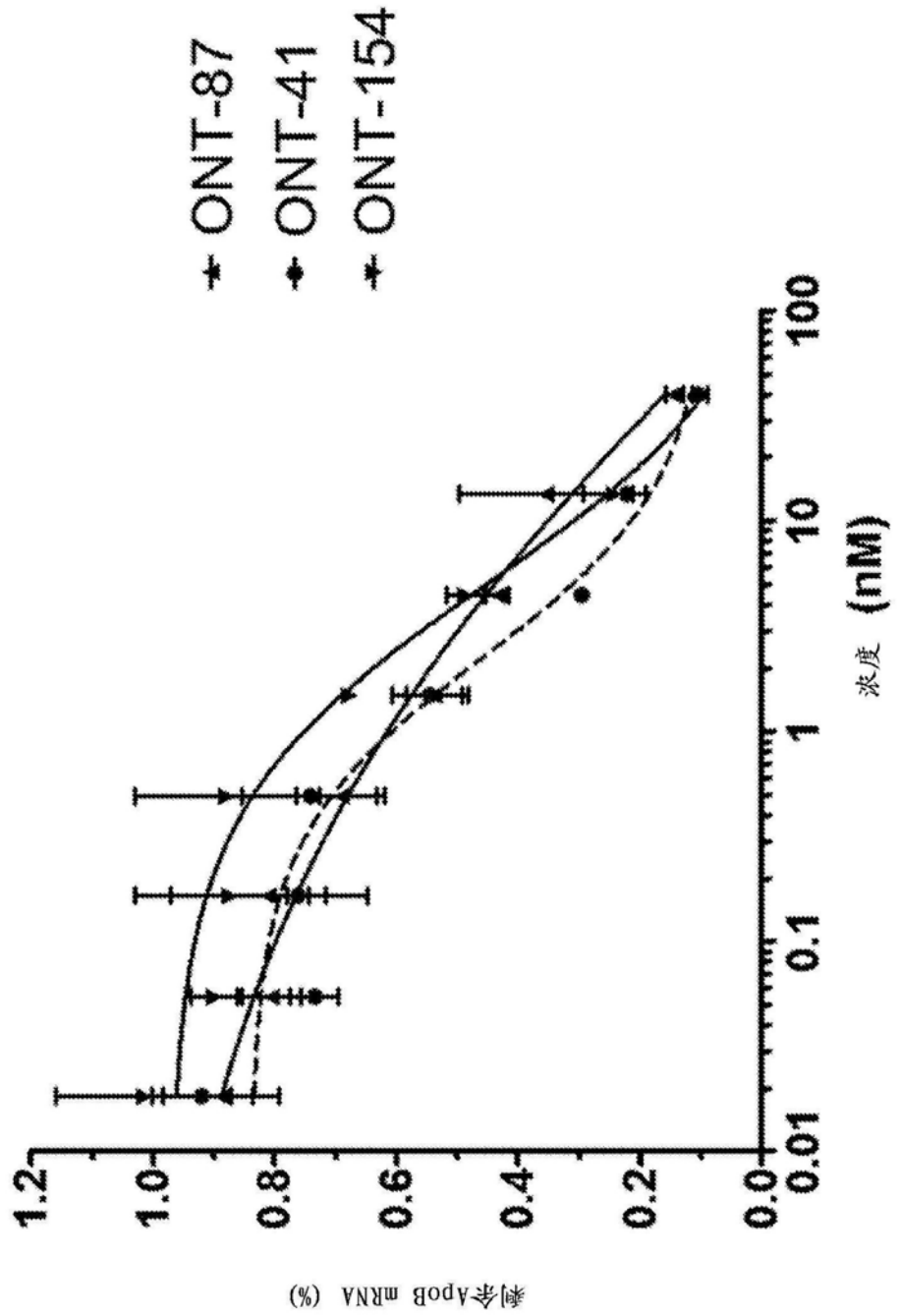

ONT-87
ONT-41
ONT-154
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (nM)
剩余ApoB mRNA (%)

图24

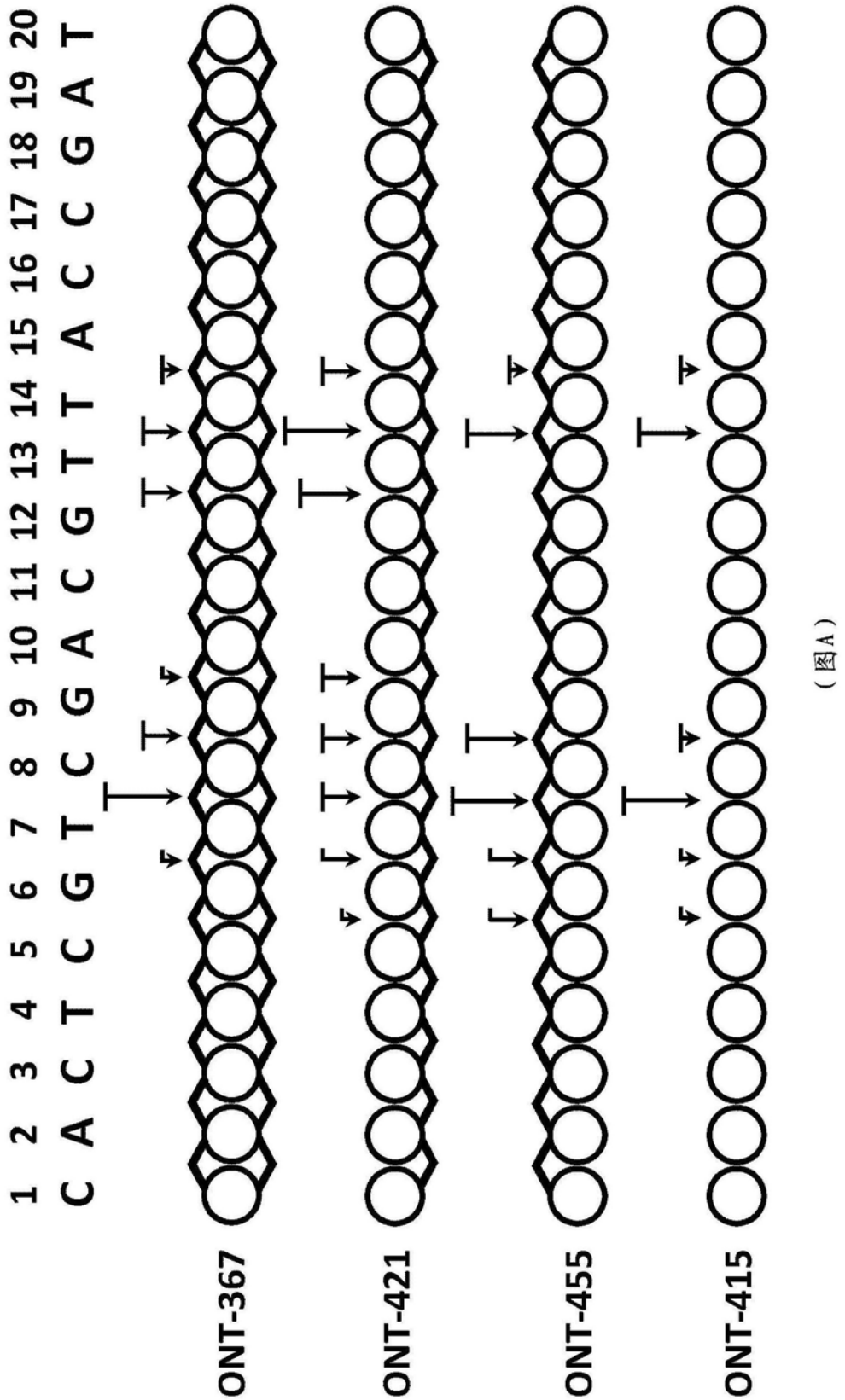

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T
ONT-367
ONT-421
ONT-455
ONT-415
(图A)

图25

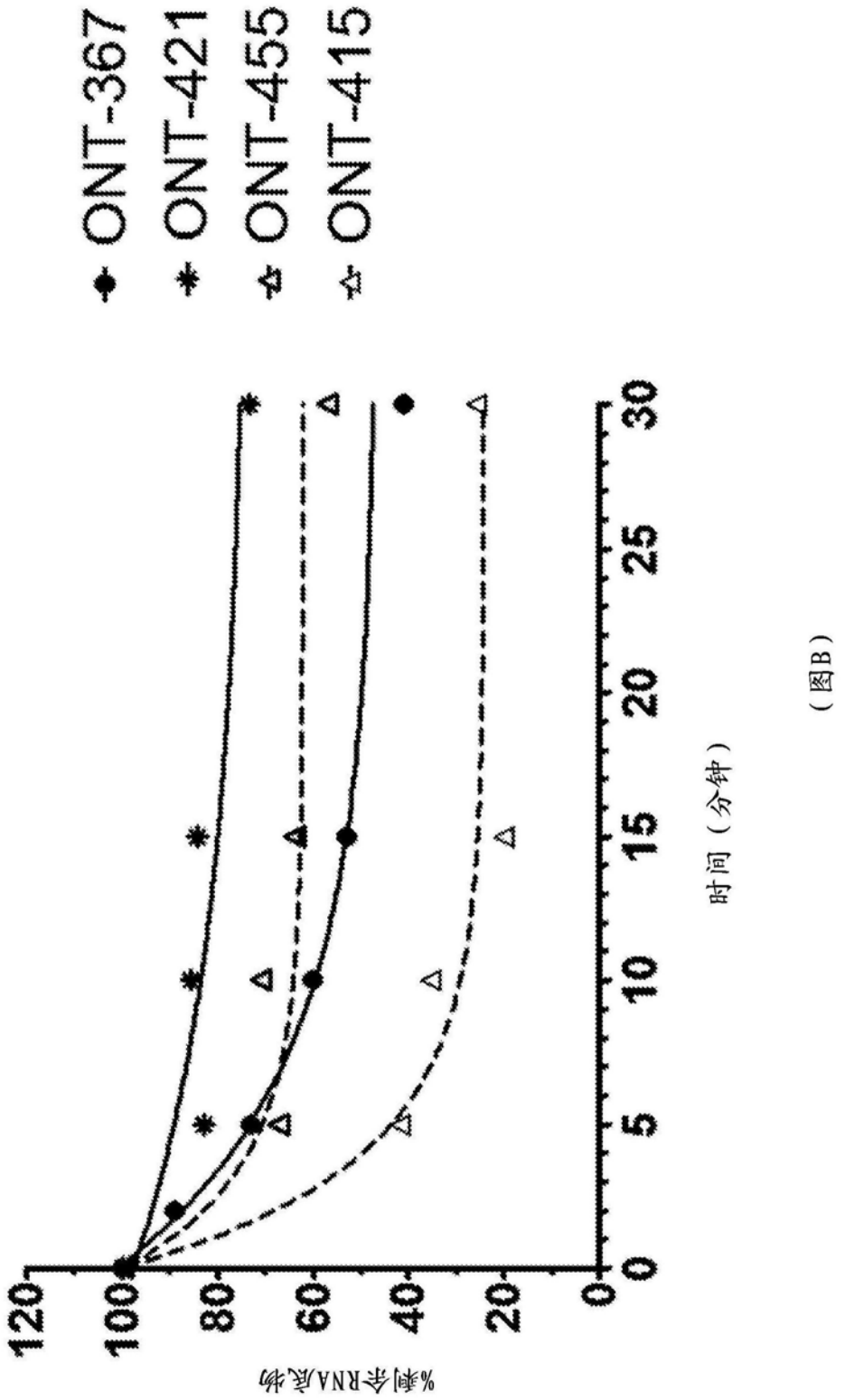

ONT-367
ONT-421
ONT-455
ONT-415
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（分钟）
（图B）

图25(续)

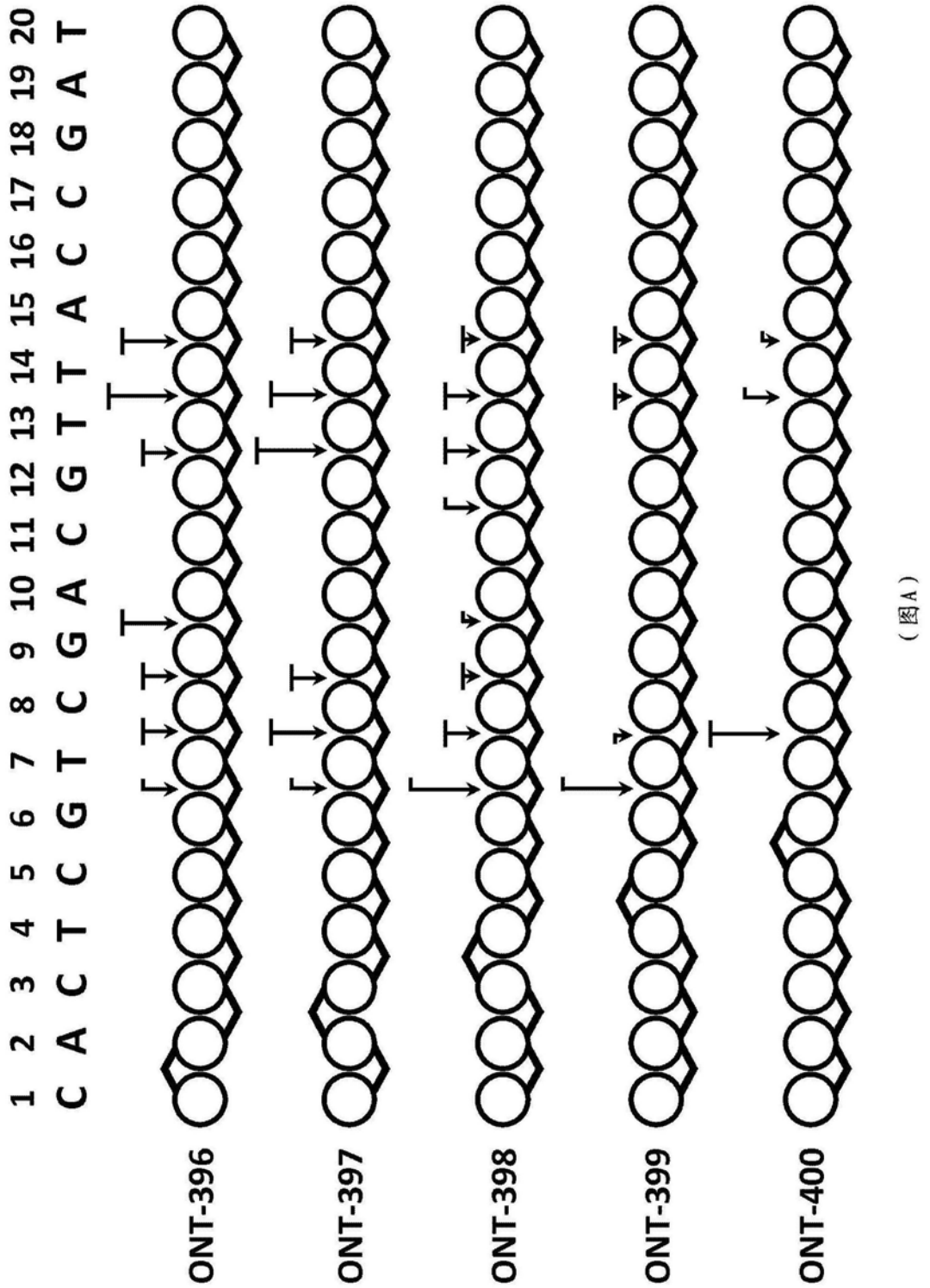

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G G A C G T T A C C G A T
ONT-396
ONT-397
ONT-398
ONT-399
ONT-400
(图A)

图26

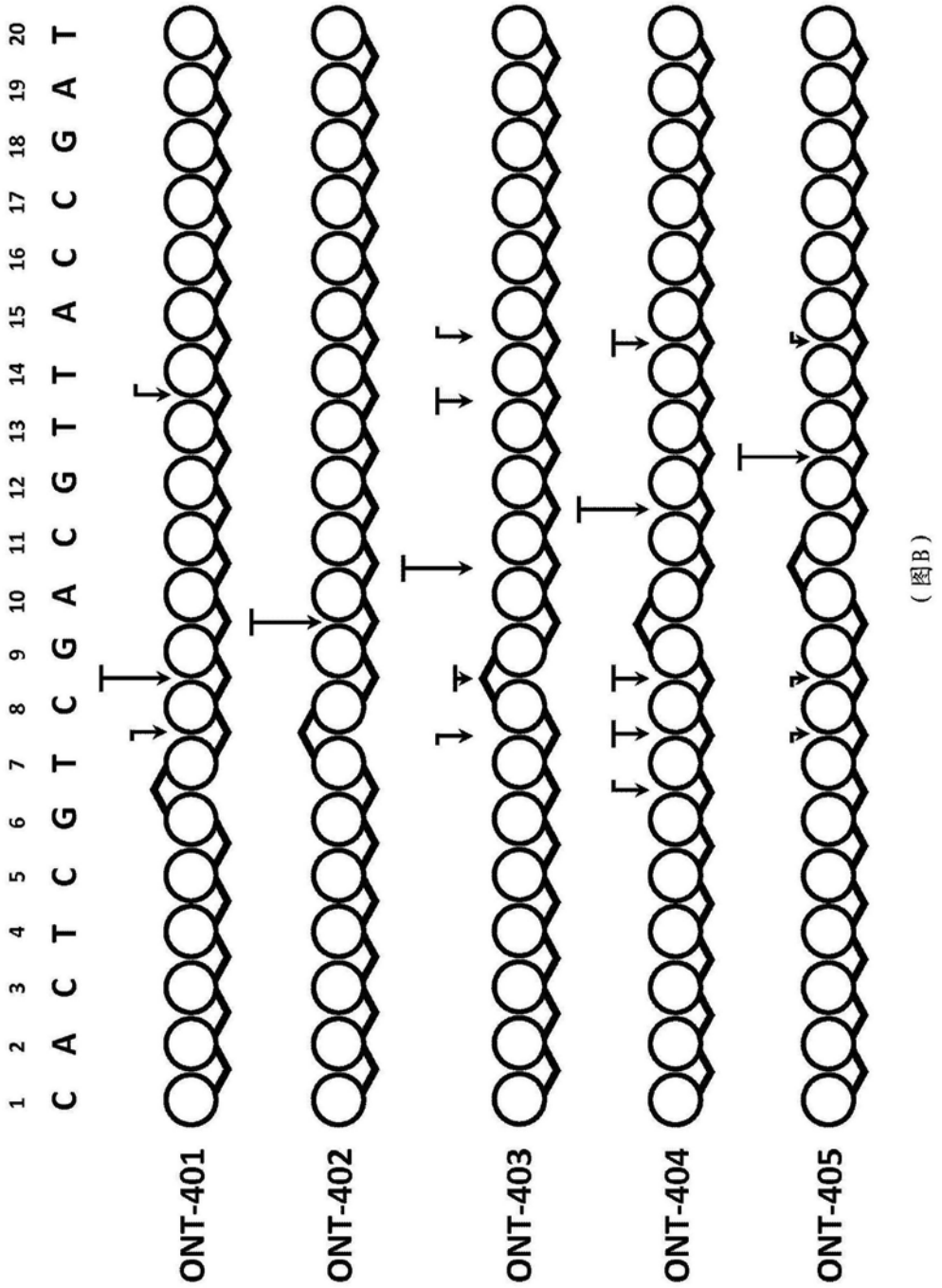

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G G A C G T T A C C G A T
ONT-401
ONT-402
ONT-403
ONT-404
ONT-405
(图B)

图26(续)

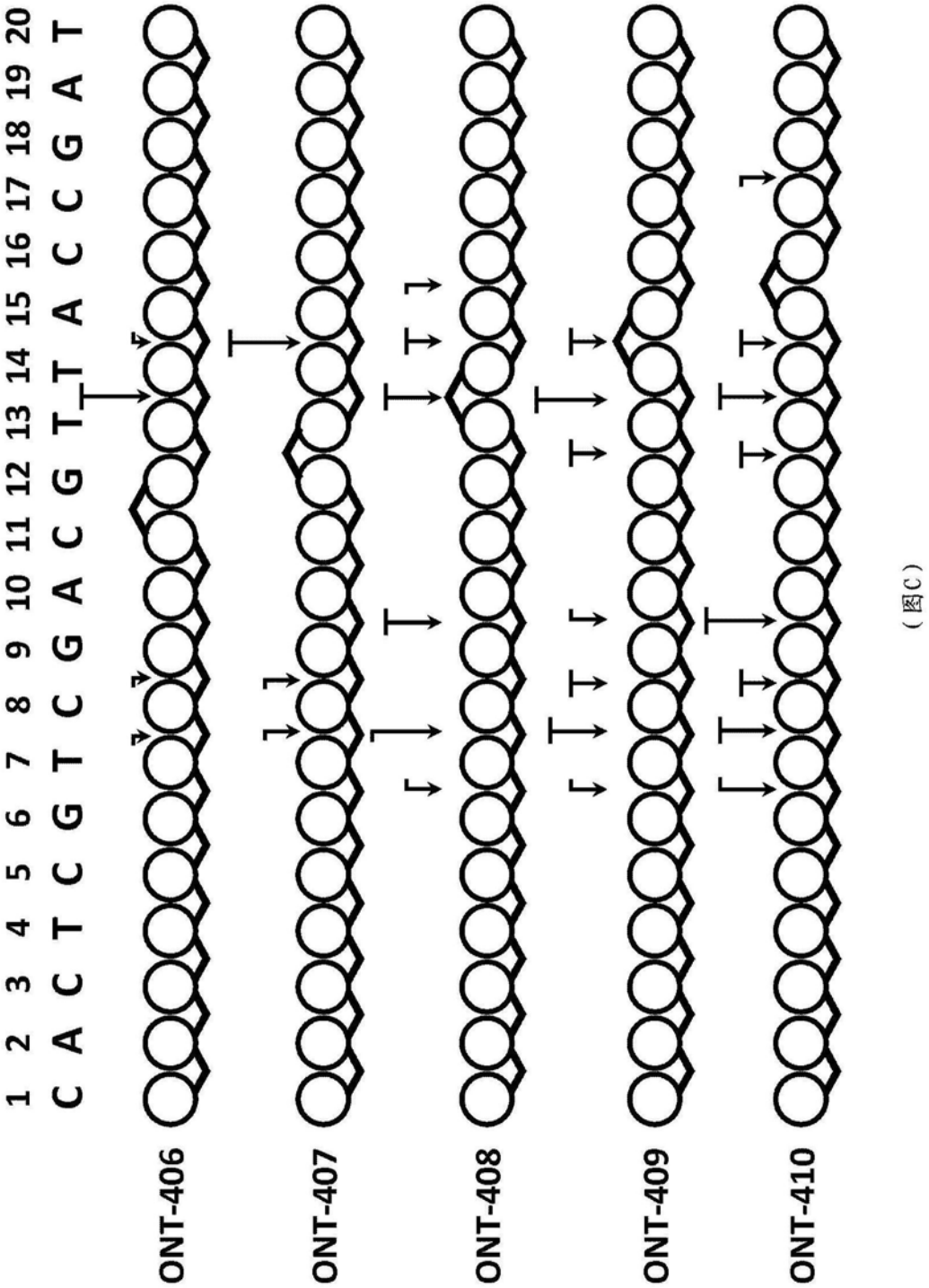

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G G A C G T T A C C G A T
ONT-406
ONT-407
ONT-408
ONT-409
ONT-410
(图C)

图26(续)

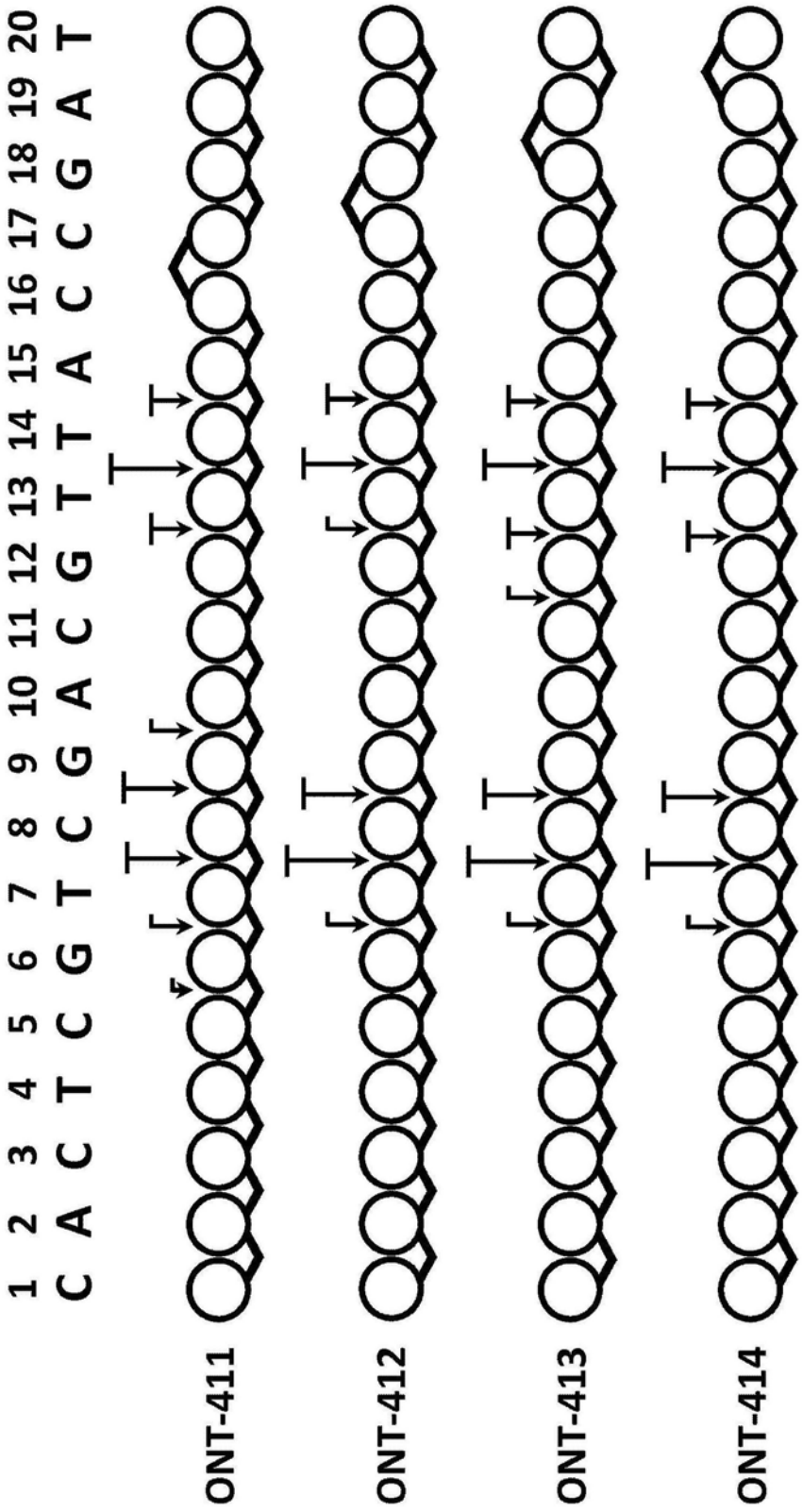

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T
ONT-411
ONT-412
ONT-413
ONT-414
(图D)

图26(续)

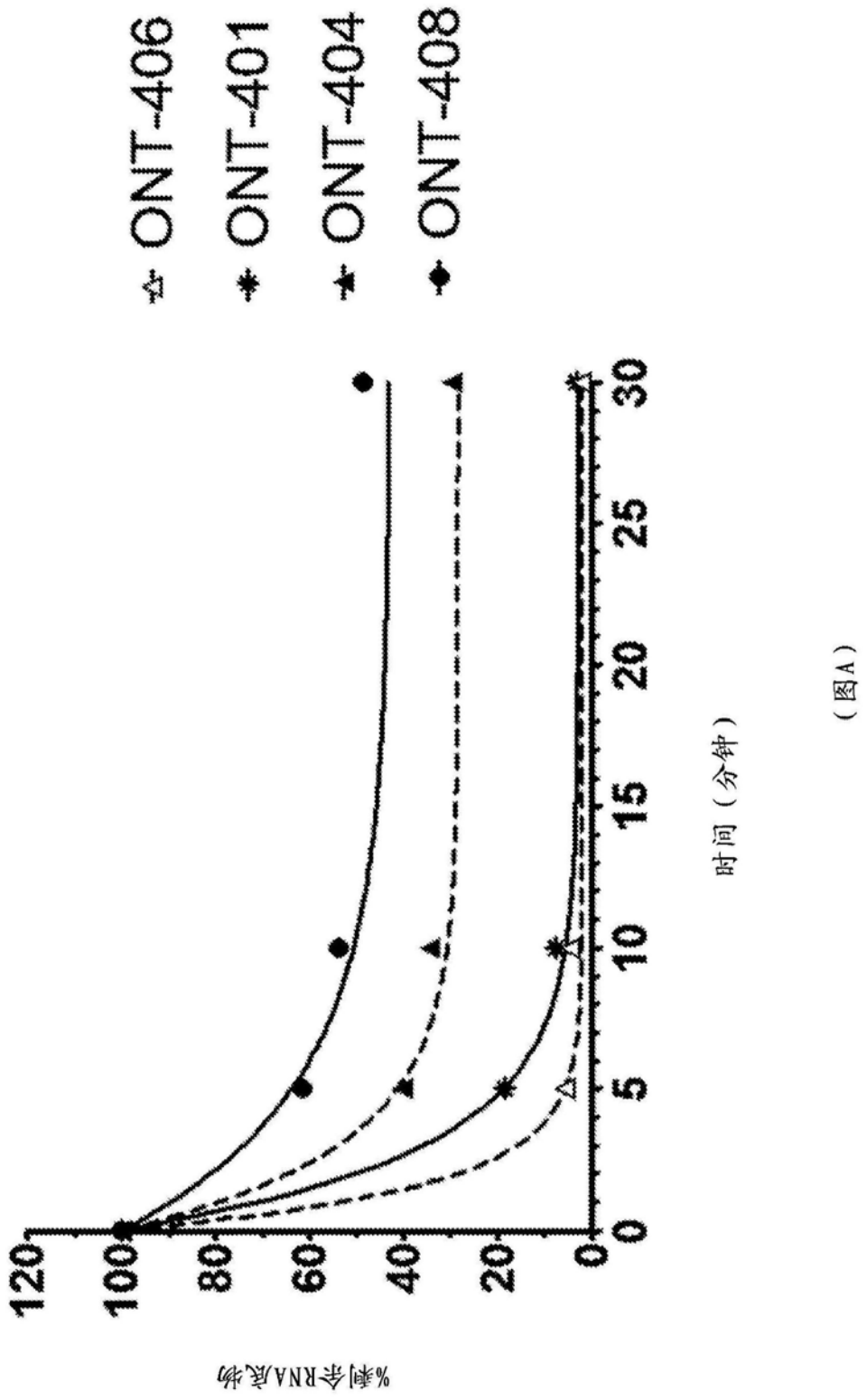
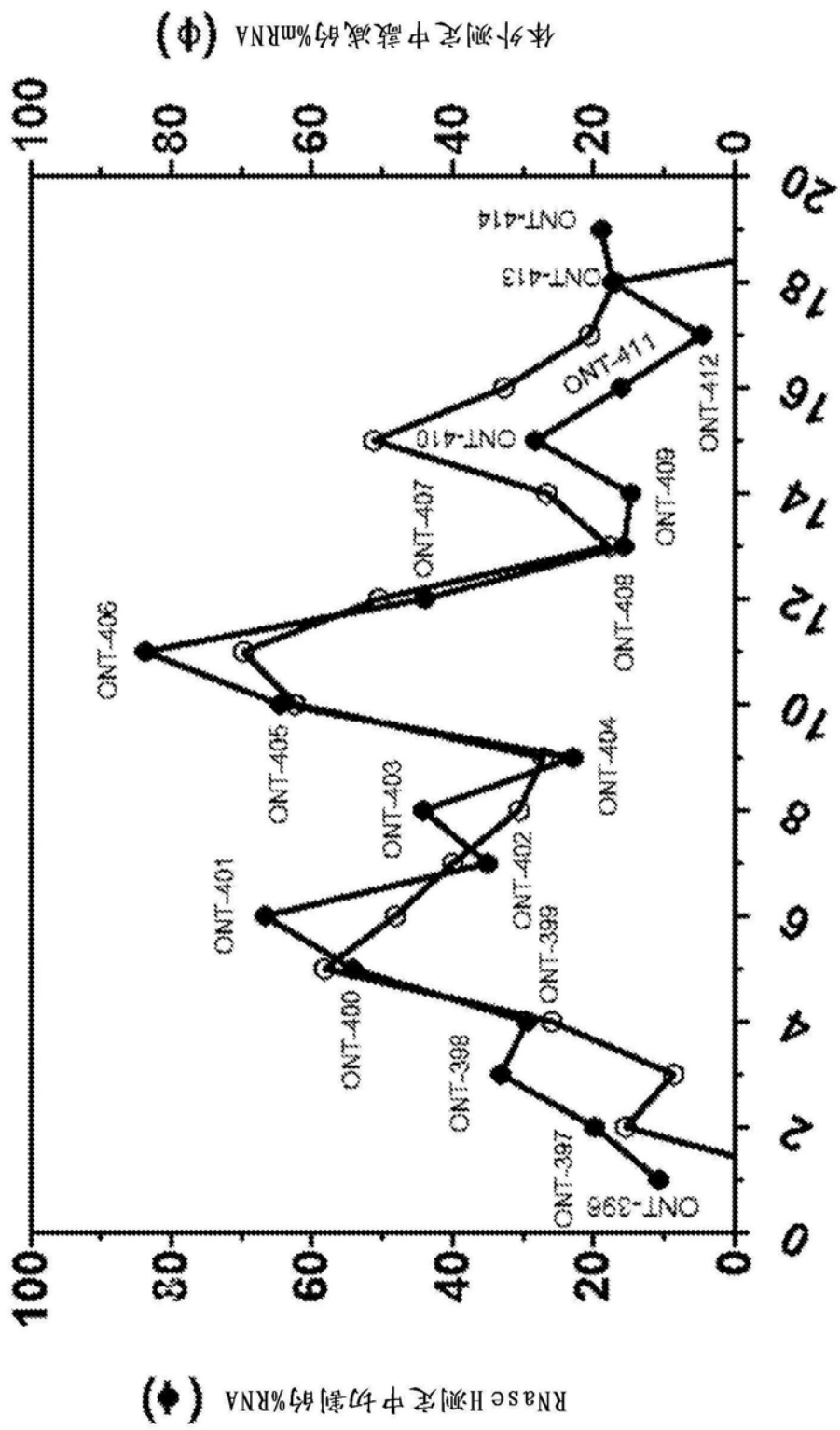

ONT-406
ONT-401
ONT-404
ONT-408
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
%剩余RNA底物
时间（分钟）
（图A）

图27


体外测定中裂解的%mRNA (♦)
RNase H测定中切割的%RNA (♦)
从DNA 3'-端的Rp的位置
ONT-398
ONT-397
ONT-399
ONT-400
ONT-398
ONT-401
ONT-402
ONT-403
ONT-404
ONT-405
ONT-406
ONT-407
ONT-408
ONT-409
ONT-410
ONT-411
ONT-412
ONT-413
ONT-414

（图B）

图27(续)

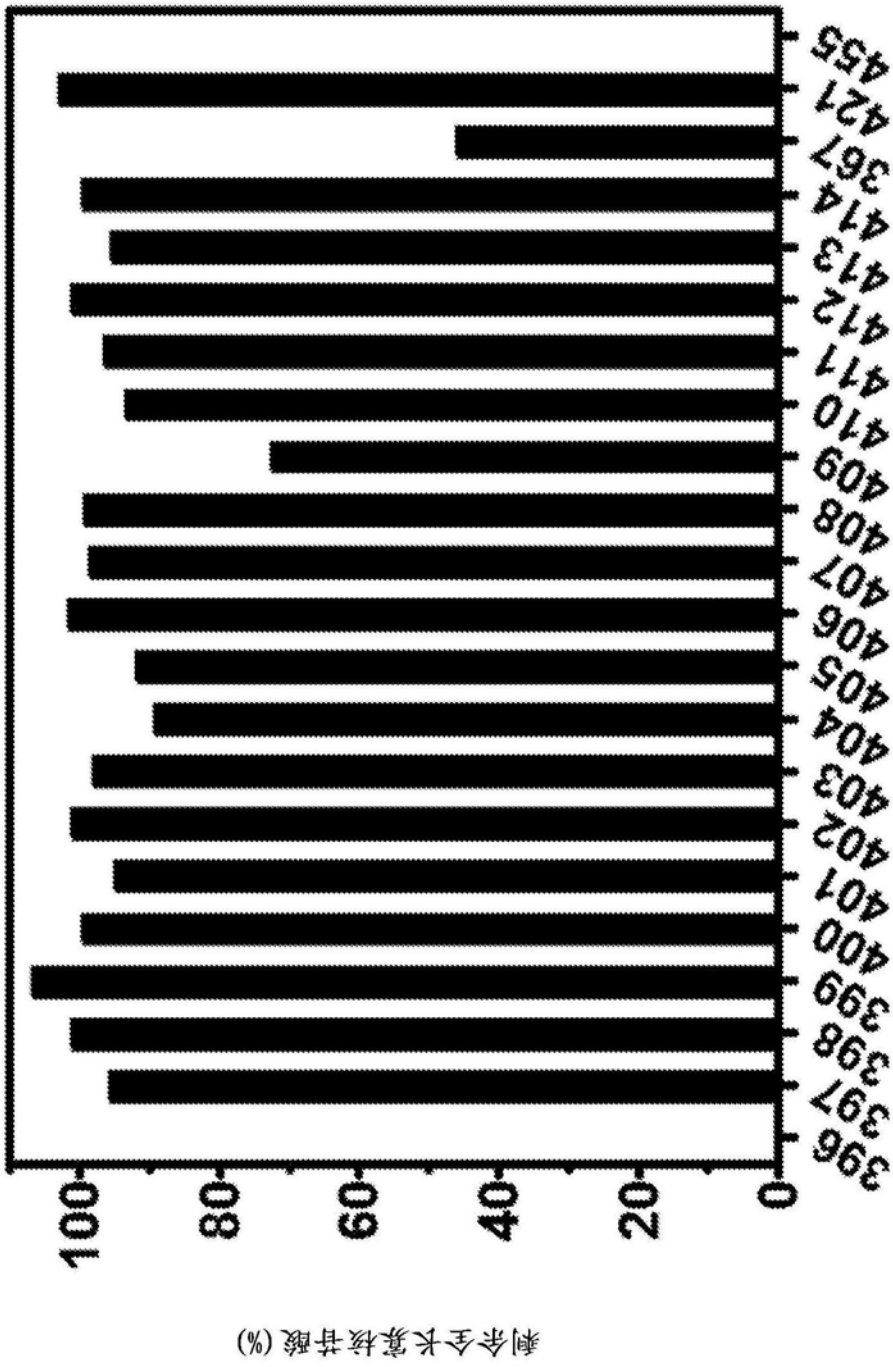

剩余全长聚核苷酸(%)
100
80
60
40
20
0
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
367
421
455

图28

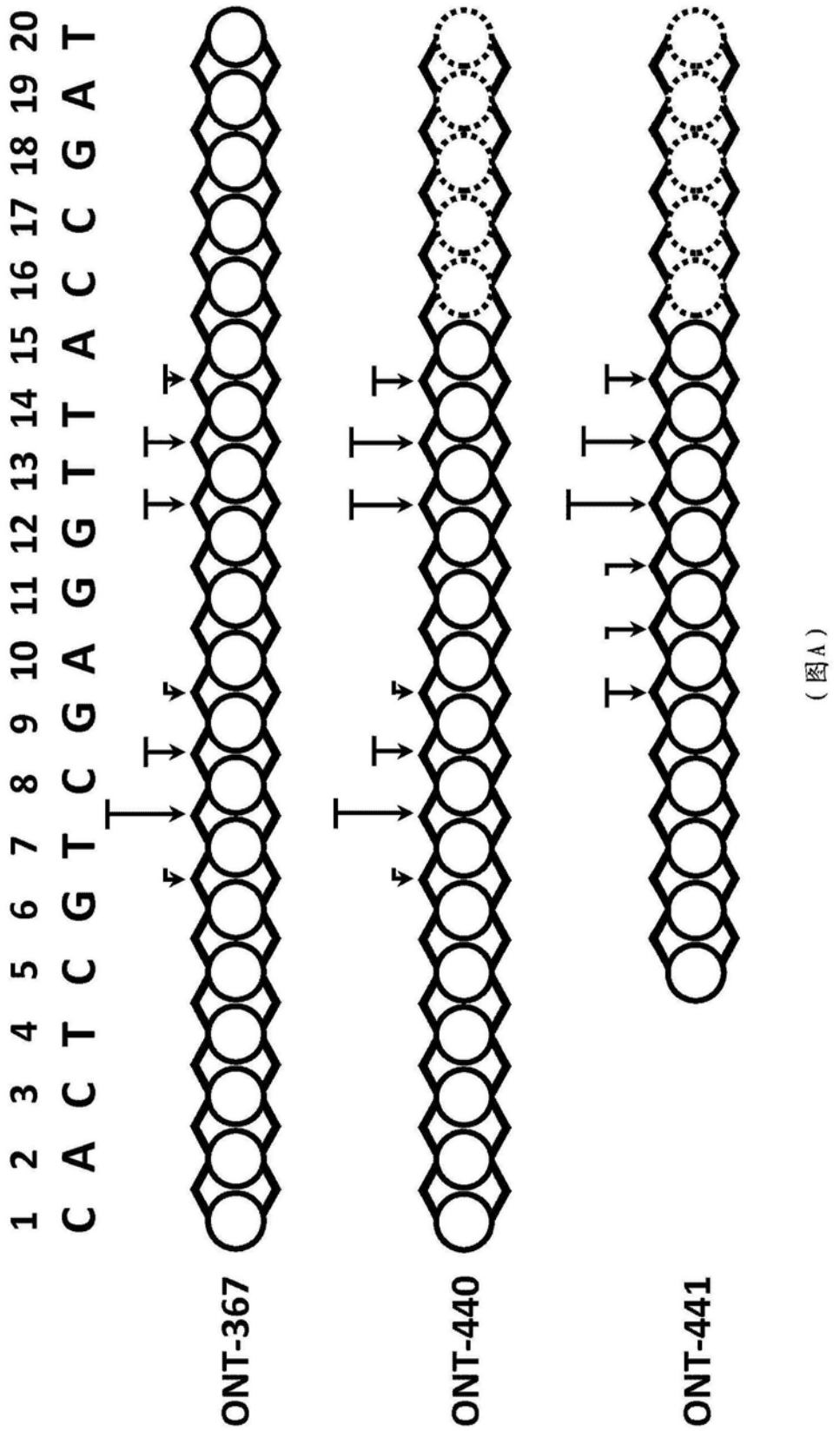

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C A C T C G T C G A G G T T A C C G A T
ONT-367
ONT-440
ONT-441
（图A）

图29

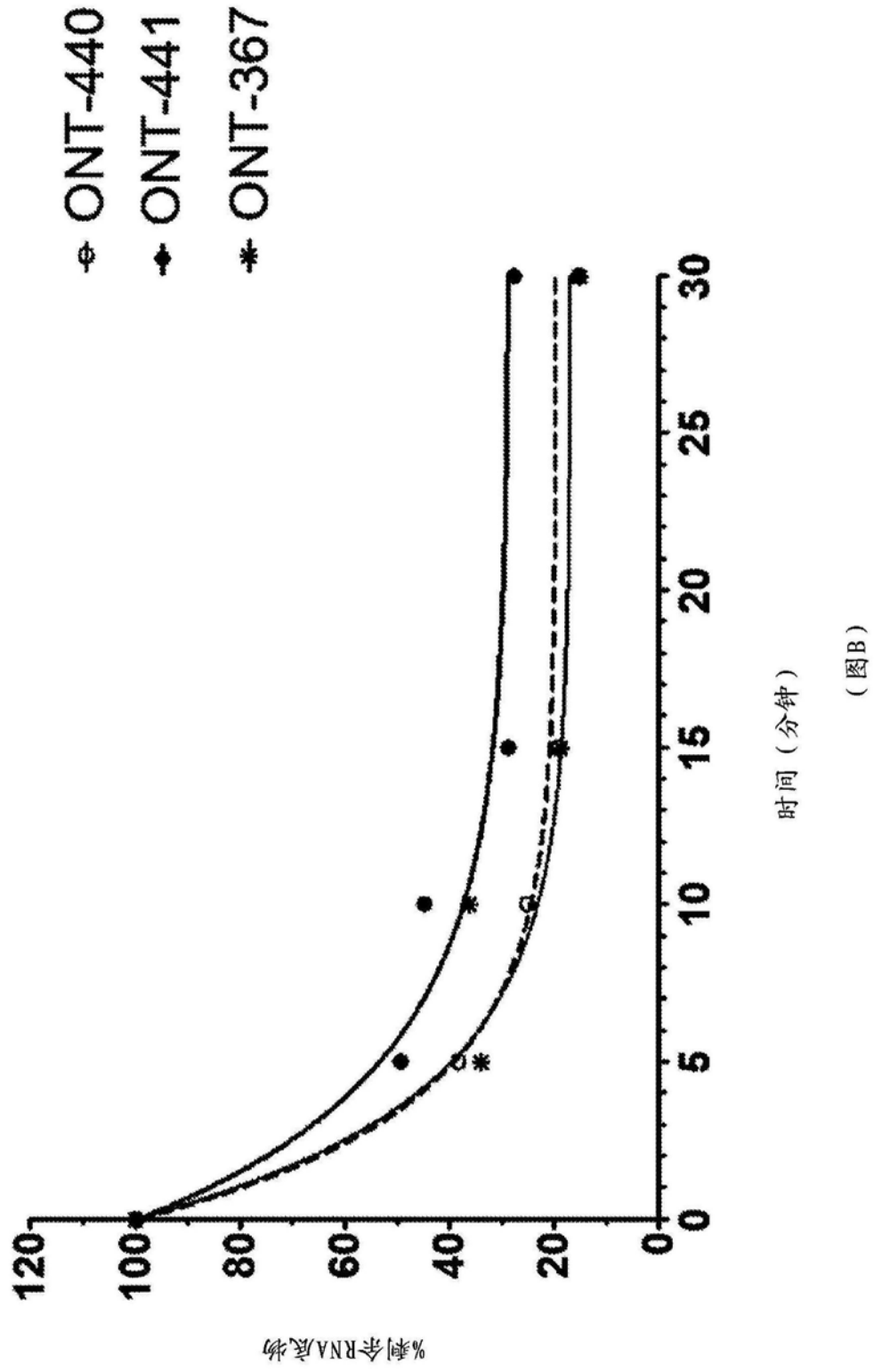

ONT-440
ONT-441
ONT-367
%剩余RNA底物
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（分钟）
（图B）

图29(续)

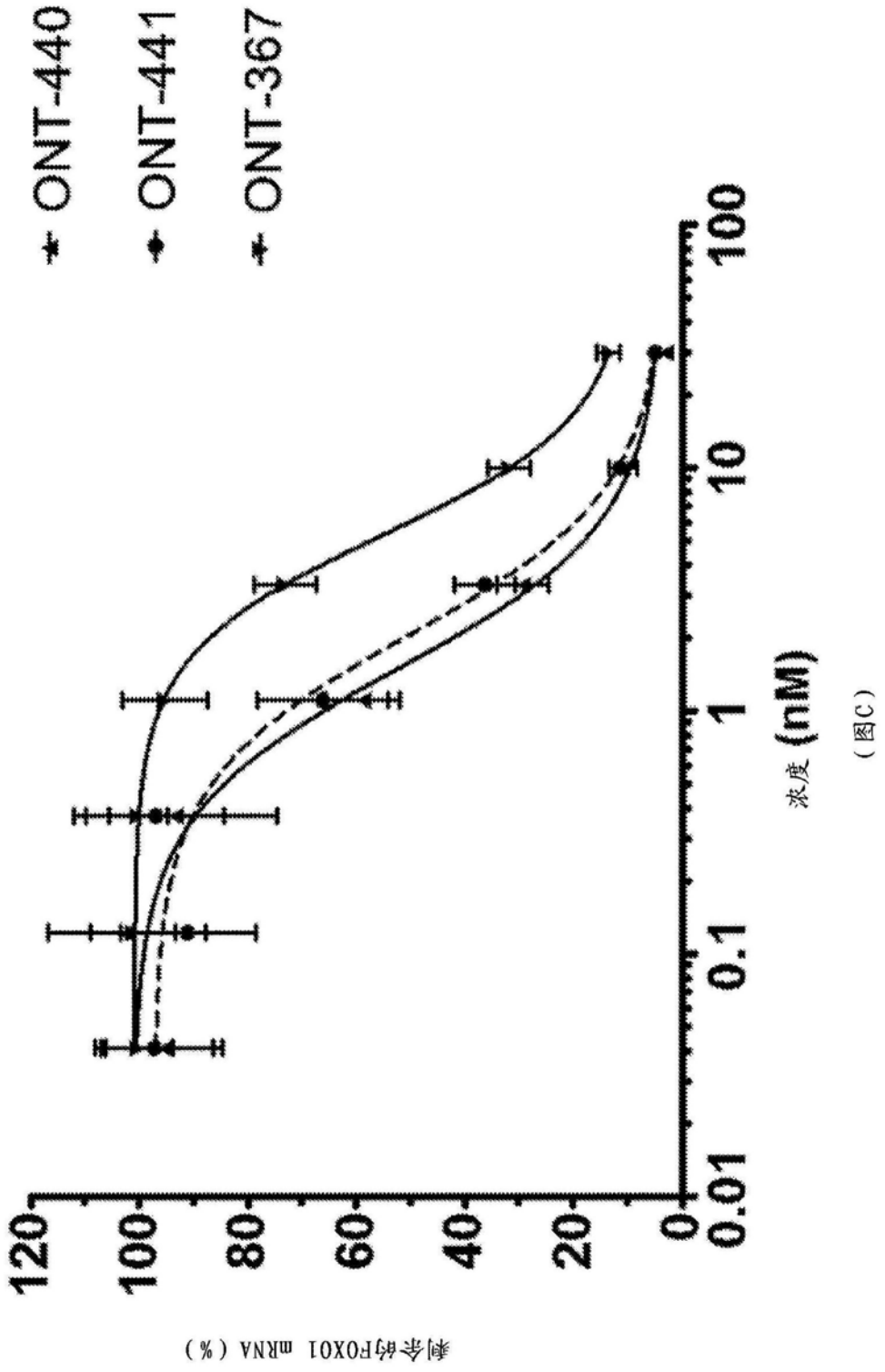

ONT-440
ONT-441
ONT-367
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (nM)
(图C)
剩余的FOXO1 mRNA (%)

图29(续)

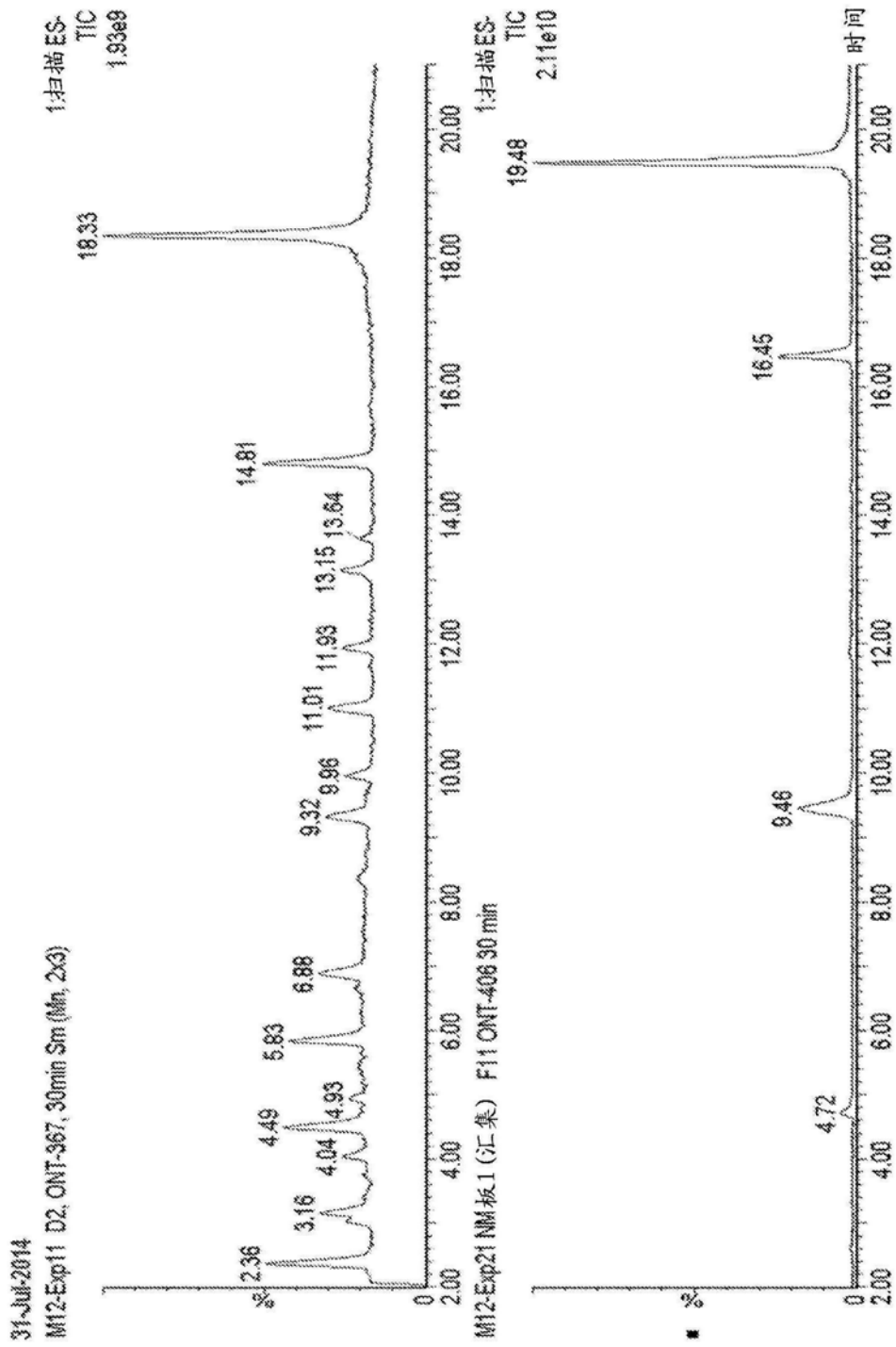

31-Jul-2014
M12-Exp11 D2, ONT-367, 30min Sm (Mn, 2x3)
1:扫描 ES-
TIC
1.93e9
18.33
14.81
13.64
13.15
11.93
11.01
9.96
9.32
6.88
5.83
4.93
4.49
4.04
3.16
2.36
%
0
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
M12-Exp21 NM板1 (汇集) F11 ONT-406 30 min
1:扫描 ES-
TIC
2.11e10
19.48
16.45
9.46
4.72
%
0
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
时间

图30