



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119156448 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 17

(21) 申请号 202380038419.3

K · 苏

(22) 申请日 2023.03.31

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30) 优先权数据

专利代理师 陈文平 徐志明

63/326,770 2022.04.01 US

63/326,813 2022.04.02 US

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065196 2023.03.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/192977 EN 2023.10.05

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 L · T · 黄 · 党 M · K · 施莱格尔

J · 巴里 T · 阮 A · 卡斯托雷诺

权利要求书7页 说明书126页

序列表(电子公布) 附图36页

(54) 发明名称

用于治疗SNCA相关疾病的SNCA-靶向siRNA
组合物

(57) 摘要

本公开涉及靶向SNCA基因(特别地,CNS组织中)的双链核糖核酸(dsRNAi)剂和组合物,以及抑制SNCA基因的表达的方法和使用此类dsRNAi剂和组合物治疗患有SNCA相关神经退化性疾病或病症(例如帕金森氏病(PD)、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)及其他突触核蛋白病)的受试者的方法。

1. 一种用于抑制SNCA的表达的双链核酸(dsRNA)剂,其中所述dsRNA剂包含具有5'-末端和3'-末端的有义链以及具有5'-末端和3'-末端的反义链,其中所述有义链和所述反义链形成双链区,其中:

所述有义链包含选自表3的SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:164及SEQ ID NO:142-149、151-156、158-163和165-184的核苷酸序列,具有0或1个错配;

所述dsRNA剂的有义链包含附接于自所述有义链的5'-末端计数的位置6或16的亲脂性部分;

所述反义链包含选自表3的SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:207及SEQ ID NO:185-192、194-199、201-206和208-227的核苷酸序列,具有0或1个错配;

所述dsRNA剂不包含GalNAc修饰;以及

所述dsRNA剂包含八个位于所述dsRNA剂的有义链和反义链各自的相应3'-末端和5'-末端的倒数第二和最后一个核苷酸间键处的硫代磷酸酯核苷酸间键。

2. 如权利要求1所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分为脂族、脂环族或多脂环族化合物。

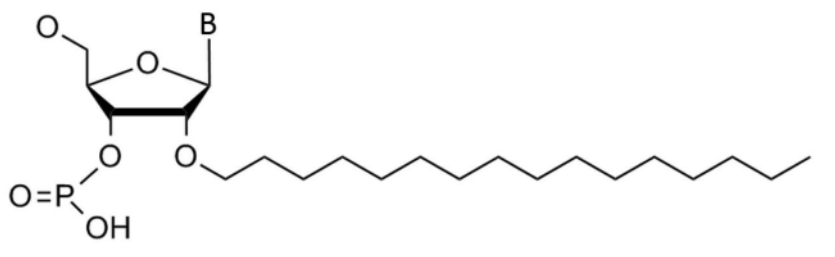
3. 如权利要求1或权利要求2所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分为脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-茈丁酸、二氢睾酮、1,3-双-(十六烷基)甘油、香叶氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪。

4. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C₄-C₃₀烃链及选自羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮化物和炔的任选官能团。

5. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C₆-C₁₈烃链。

6. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C₁₆烃链。

7. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分为



其中B为核苷酸碱基或核苷酸碱基类似物,任选地其中B选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

8. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分经由接头或载体附接。

9. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分经由替代所述有义链的位置6或16的核苷酸的载体缀合。

10. 如权利要求9所述的dsRNA剂,其中所述载体是选自以下的环状基团:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧杂环戊烷基、噁唑烷基、

异噻唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基；或为基于丝胺醇主链或二乙醇胺主链的非环状部分。

11. 如权利要求1至8中任一项所述的dsRNA剂，其中所述亲脂性部分经由含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来亚酰胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺连接、点击反应的产物或氨基甲酸酯的接头缀合于所述dsRNA剂。

12. 如权利要求1至8和11中任一项所述的dsRNA剂，其中所述亲脂性部分经由选自以下的生物可裂解接头缀合于所述dsRNA剂：DNA，RNA，二硫化物，酰胺，半乳糖胺、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖的官能化的单糖或寡糖，及其组合。

13. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其中所述有义链的基本上全部核苷酸为修饰的核苷酸。

14. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其中所述反义链的基本上全部核苷酸为修饰的核苷酸。

15. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其中所述有义链的全部核苷酸为修饰的核苷酸。

16. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其中所述反义链的全部核苷酸为修饰的核苷酸。

17. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其中所述有义链的全部核苷酸和所述反义链的全部核苷酸为修饰的核苷酸。

18. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其具有一个或多个修饰的核苷酸，且其中所述一个或多个修饰的核苷酸中的至少一个选自脱氧核苷酸、3'-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制的核苷酸、约束的乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯或5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、包含乙烯基磷酸酯的核苷酸、包含腺苷-二醇核糖(GNA)的核苷酸、包含胸苷-二醇核糖(GNA) S-异构体的核苷酸、包含2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包含2'-脱氧胸苷-3'-磷酸的核苷酸、包含2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸的核苷酸及连接至胆固醇基衍生物和十二烷酸双癸基酰胺基团的末端核苷酸。

19. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其中所述dsRNA剂包含选自以下的至少一个修饰的核苷酸：2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-C16(2'-O-十六烷基)修饰的核苷酸和包含乙烯基磷酸酯的核苷酸，任选地其中所述dsRNA剂包含以下各修饰中的至少一个：2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-C16(2'-O-十六烷基)修饰的核苷酸和包含乙烯基磷酸酯的核苷酸。

20. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，还包含在所述反义链的5'-端的磷酸酯或磷酸酯模拟物。

21. 如权利要求20所述的dsRNA剂，其中所述磷酸酯模拟物为5'-乙烯基磷酸酯(VP)。

22. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂，其包含如表2中所示的修饰核苷酸的模

式(其中2'-C16、2'-O-甲基、2'-脱氧、GNA、硫代磷酸酯、乙烯基膦酸酯和2'-氟修饰的位置如表2中所显示,而与所显示的dsRNA剂的单个核苷酸碱基序列无关)。

23. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其具有选自以下的单一双链体的有义链核苷酸序列和反义链核苷酸序列:AD-1804698、AD-1804699、AD-1747575、AD-1747576、AD-1804700、AD-1747577、AD-1747578、AD-1747579、AD-1747580、AD-1747581、AD-1804701、AD-1747582、AD-1804702、AD-1804703、AD-1804704、AD-1747583、AD-1804705、AD-1804706、AD-1804707、AD-1804708、AD-1804709、AD-1747591、AD-1747585、AD-1804710、AD-1804711、AD-1747586、AD-1804712、AD-1747587、AD-1804713、AD-1804714、AD-1747588、AD-1804715、AD-1804716、AD-1804717、AD-1804718、AD-1804719、AD-1804720、AD-1804721、AD-1804722、AD-1804723、AD-1804724、AD-1804725和AD-1804726,任选地具有选自AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585的单一双链体的有义链核苷酸序列和反义链核苷酸序列。

24. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述dsRNA剂的有义链具有选自5'-nsnsnnn(Nhd)NfnNfNfNfnnnnnnnnsnsn-3'和5'-nsnsnnnnnnNfnNfNfnnnn(Nhd)nnnsnsn-3'的修饰模式,其中n为2'-O-甲基核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟核苷酸,以及(Nhd)为2'-O-十六烷基核苷酸。

25. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其中所述dsRNA剂的反义链具有选自5'-VPnsdNsnnndNndNnnnnndNnNfnnnnnnnnsnsn-3'和5'-VPnsNfsnnndNn(Ngn)nnnnnnNfnNfnnnnnnsnsn-3'的修饰模式,其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,dN为2'-脱氧核苷酸,Nf为2'-氟核苷酸,以及(Ngn)为二醇核酸S-异构体。

26. 一种用于抑制SNCA的表达的双链核酸(dsRNA)剂,其中所述dsRNA剂包含具有5'-末端和3'-末端的有义链以及具有5'-末端和3'-末端的反义链,其中所述有义链和所述反义链形成双链区,其中:

所述有义链包含表2(SEQ ID NO:13至55)的核苷酸序列和修饰,具有0或1个错配;以及所述反义链包含表2(SEQ ID NO:56至98)的核苷酸序列和修饰,具有0或1个错配。

27. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其具有选自以下的有义链核苷酸序列:5'-asasgug(Chd)ucAfGfUfuccaaugusgsa-3'(SEQ ID NO:35)、5'-uscsuuugcuCfCfCfagu(Uhd)cuusgsa-3'(SEQ ID NO:28)、5'-gsasgca(Ahd)guGfAfCfaaanguugsgsa-3'(SEQ ID NO:21)、5'-gsusaca(Ahd)GfuGfCfUfcaguuccasasa-3'(SEQ ID NO:34)、5'-cscsauc(Ahd)gcAfGfUfgauugaagsusa-3'(SEQ ID NO:43)、5'-uscscag(Uhd)uUfCfUfugagaucusgsa-3'(SEQ ID NO:261)和5'-uscсаug(Ahd)aaGfGfAfcuucaaasgsa-3'(SEQ ID NO:19),其中a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,(Ahd)为2'-O-十六烷基腺苷-3'-磷酸,(Uhd)为2'-O-十六烷基尿苷-3'-磷酸,以及(Chd)为2'-O-十六烷基胞苷-3'-磷酸。

28. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其具有选自以下的反义链核苷酸序列:5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3'(SEQ ID NO:78)、5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAfgcaaagasusa-3'(SEQ ID NO:71)、5'-VPusdCscadAcdAuugdTcAfcuugcucsusu-3'

(SEQ ID NO:64)、5'-VPusUfsugdGa (Agn) cugagcAfcUfuguacsasg-3' (SEQ ID NO:77)、5'-VPusdAscudTcdAaucadCuGfcugauggsasa-3' (SEQ ID NO:86)、5'-VPusdCsagdAudCucaadGa Afacugggasgsc-3' (SEQ ID NO:262) 和 5'-VPusdCsuudTgdAagudCcUfuucaugasasu-3' (SEQ ID NO:62), 其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dG为2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,以及(Agn)为腺苷-二醇核酸(GNA)S-异构体。

29. 如前述权利要求中任一项所述的dsRNA剂,其具有选自以下的双链体核苷酸序列:
(i) 有义链:5'-asasgug (Chd) ucAfGfUfuccaaugusgsa-3' (SEQ ID NO:35) 和反义链:5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3' (SEQ ID NO:78);
(ii) 有义链:5'-uscsuugcuCfCfCfagu (Uhd) cuusgsa-3' (SEQ ID NO:28) 和反义链:5'-VPusdCsaadGadAa cugdGgAfgcaaagasusa-3' (SEQ ID NO:71);
(iii) 有义链:5'-gsasgca (Ahd) guGfAfCfaaanguusgsa-3' (SEQ ID NO:21) 和反义链:5'-VPusdCscadAcdaauugdTcAfcuug cucsusu-3' (SEQ ID NO:64);
(iv) 有义链:5'-gsusaca (Ahd) GfuGfCfUfcaguuccasasa-3' (SEQ ID NO:34) 和反义链:5'-VPusUfsugdGa (Agn) cugagcAfcUfuguacsasg-3' (SEQ ID NO:77);
(v) 有义链:5'-cscsauc (Ahd) gcAfGfUfgauugaagsusa-3' (SEQ ID NO:43) 和反义链:5'-VPusdAscudTcdAaucadCuGfcugauggsasa-3' (SEQ ID NO:86);
(vi) 有义链:5'-uscscag (Uhd) uUfCfUfugagaucusgsa-3' (SEQ ID NO:261) 和反义链:5'-VPusdCsagdAudCucaadGa Afacugggasgsc-3' (SEQ ID NO:262);
以及(vii) 有义链:5'-uscsaug (Ahd) aaGfGfAfcuucaaasgsa-3' (SEQ ID NO:19) 和反义链:5'-VPusdCsuudTgdAagudCcUfuuca ugasasu-3' (SEQ ID NO:62), 其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dG为2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,(Agn)为腺苷-二醇核酸(GNA)S-异构体,(Ahd)为2'-0-十六烷基腺苷-3'-磷酸,(Uhd)为2'-0-十六烷基尿苷-3'-磷酸,以及(Chd)为2'-0-十六烷基胞苷-3'-磷酸。

30. 一种用于抑制SNCA的表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其具有有义链序列5'-asasgug (Chd) ucAfGfUfuccaaugusgsa-3' (SEQ ID NO:35) 和反义链序列5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3' (SEQ ID NO:78), 其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,以及(Chd)为2'-0-十六烷基胞苷-3'-磷酸。

31. 一种用于抑制SNCA的表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其具有有义链序列5'-uscsuugcuCfCfCfagu (Uhd) cuusgsa-3' (SEQ ID NO:28) 和反义链序列5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAfgcaaagasusa-3' (SEQ ID NO:71), 其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞

苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dG为2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸,以及(Uhd)为2'-O-十六烷基尿苷-3'-磷酸。

32.一种用于抑制SNCA的表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其具有有义链序列5'-gsasgca(Ahd)guGfAfCfaaanguugsgsa-3'(SEQ ID NO:21)和反义链序列5'-VPusdCscadAc dAuugdTcAfcuugcucsusu-3'(SEQ ID NO:64),其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,以及(Ahd)为2'-O-十六烷基腺苷-3'-磷酸。

33.一种细胞,其含有如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂。

34.一种用于抑制 α -突触核蛋白的表达的药物组合物,其包含如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂。

35.如权利要求34所述的药物组合物,其中所述dsRNA剂于非缓冲溶液中施用。

36.如权利要求35所述的药物组合物,其中所述非缓冲溶液为盐水或水。

37.如权利要求34所述的药物组合物,其中所述dsRNA剂用缓冲溶液施用。

38.如权利要求37所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其任何组合。

39.如权利要求37所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

40.一种药物组合物,其包含如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂及脂质制剂。

41.如权利要求40所述的药物组合物,其中所述脂质制剂包括LNP。

42.一种抑制细胞中 α -突触核蛋白(SNCA)基因的表达和/或预防细胞或受试者中 α -突触核蛋白聚集体的形成的方法,该方法包括:

(a)使所述细胞或受试者与如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂或如权利要求34至41中任一项所述的药物组合物接触;以及

(b)将步骤(a)中产生的所述细胞或受试者维持足以获得SNCA基因的mRNA转录物降解的时间,从而抑制所述细胞中的SNCA基因的表达和/或预防所述细胞或受试者中 α -突触核蛋白聚集体的形成。

43.如权利要求42所述的方法,其中所述细胞在受试者体内。

44.如权利要求43所述的方法,其中所述受试者为人类。

45.如权利要求43所述的方法,其中所述受试者选自恒河猴、食蟹猴、小鼠和大鼠。

46.如权利要求44所述的方法,其中所述人类受试者患有SNCA相关疾病。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述SNCA相关疾病为突触核蛋白病,任性地选自以下的疾病:PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

48. 如权利要求42至47中任一项所述的方法,其中与对照细胞或对照受试者相比,所述细胞或所述受试者中的SNCA表达被所述dsRNA剂抑制至少约50%、至少约40%、至少约30%、至少约20%或至少约10%。

49. 一种治疗诊断为患有SNCA相关神经退化性疾病的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂或如权利要求34至42中任一项所述的药物组合物,任选地其中所述受试者重新给药治疗有效量的如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂或如权利要求34至42中任一项所述的药物组合物.,从而治疗所述受试者。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述受试者为人类。

51. 如权利要求49或权利要求50所述的方法,其中治疗包括所述SNCA相关神经退化性疾病的至少一种体征或症状的改善。

52. 如权利要求49至51中任一项所述的方法,其中治疗包括预防所述疾病的进展。

53. 如权利要求49至52中任一项所述的方法,其中所述SNCA相关神经退化性疾病特征在于选自以下的一种或多种症状:震颤、缓慢动作(动作迟缓)、肌肉僵硬、姿势和平衡受损、自发运动的损失、语音变化、字迹变化、幻视、幻听、幻嗅、幻触、身体机能(自主神经系统)调节不良如晕眩、跌倒和肠问题、认知问题如意识模糊、注意力不集中、视空间问题和记忆力损失、睡眠困难如快速眼动(REM)睡眠行为障碍(其中梦在睡眠时以身体表现出来)、注意力波动(包括嗜睡发作、长时间凝视空处、白天长时间小睡或言语紊乱)、抑郁和冷漠、直立性低血压(当人站起时发生的血压突然下降,从而导致人感觉晕眩和头晕,以及需要坐、蹲或躺下以便防止昏迷)、动作笨拙或不协调、膀胱控制问题、手或四肢的挛缩(关节周围的肌肉或肌腱的慢性缩短,其阻止关节自由动作)、Pisa综合征(其中身体表现为向一侧倾斜的异常姿势)、颈项前屈(其中颈部向前弯曲且头部下垂)以及无意识的和不可控的叹息或喘息。

54. 如权利要求49至53中任一项所述的方法,其中所述SNCA相关神经退化性疾病选自突触核蛋白病如PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒疾病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

55. 如权利要求49至54中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量施用于所述受试者。

56. 如权利要求49至55中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂鞘内施用于所述受试者。

57. 如权利要求49至56中任一项所述的方法,还包括向所述受试者施用适用于治疗或预防SNCA相关神经退化性疾病或病症的另外的药剂或疗法。

58. 如权利要求49至57中任一项所述的方法,其中所述SNCA相关神经退化性疾病为帕金森氏病(PD)。

59. 如权利要求49至58中任一项所述的方法,其中所述SNCA相关神经退化性疾病选自路易氏体痴呆(LBD)和多系统萎缩(MSA)。

60. 如权利要求49至59中任一项所述的方法,其中所述SNCA表达被抑制至少约30%。
61. 如权利要求49至60中任一项所述的方法,还包括向所述受试者施用另外的治疗剂。
62. 如权利要求49至61中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂鞘内施用于所述受试者。
63. 如权利要求62所述的方法,其中所述方法降低脑或脊髓组织中的SNCA表达。
64. 如权利要求63所述的方法,其中所述脑或脊髓组织选自脑皮层、小脑、基底节、海马、杏仁核、丘脑、脑干、颈部脊髓、腰部脊髓和胸部脊髓。
65. 一种抑制受试者的SNCA表达的方法,该方法包括:
向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂或如权利要求34至41中任一项所述的药物组合物,从而抑制所述受试者中的SNCA表达。
66. 一种用于治疗或预防受试者的SNCA相关疾病的方法,该方法包括:
向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至32中任一项所述的dsRNA剂或如权利要求34至41中任一项所述的药物组合物,从而治疗或预防所述受试者的SNCA相关疾病。
67. 如权利要求66所述的方法,其中所述SNCA相关疾病选自突触核蛋白病如PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytic-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒疾病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。
68. 如权利要求66所述的方法,其中所述施用步骤在所述受试者的一个或多个组织中产生SNCA mRNA或 α -突触核蛋白的至少60%敲低,任选地其中所述受试者的一个或多个组织选自CSF、前额叶皮质、中脑、胸椎、海马、髓质脑桥、纹状体尾状核和小脑。
69. 一种用于进行如权利要求42至67中任一项所述的方法的试剂盒,其包含
- a) 所述dsRNA剂,
 - b) 使用说明,以及
 - c) 任选地,用于向受试者施用所述dsRNA剂的装置。

用于治疗SNCA相关疾病的SNCA-靶向siRNA组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 基于35U.S.C.§119(e),本申请涉及并且要求于2022年4月2日提交的题为“SNCA-Targeting siRNA Compositions for Treating SNCA-Associated Disease”的美国临时专利申请第63/326,813号及于2022年4月1日提交的题为“SNCA-Targeting siRNA Compositions for Treating SNCA-Associated Disease”的美国临时专利申请第63/326,770号的优先权。前述专利申请的整体内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开一般地涉及SNCA-靶向RNAi剂及方法。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,其以可扩展标示语言(XML)格式提交电子,且通过引用以其整体并入本文。该XML副本于2023年3月29日创建,名为ALN-461W0.xml,大小为3242KB。

背景技术

[0006] SNCA基因编码突触前神经元蛋白质, α -突触核蛋白(本文中亦称为alpha-突触核蛋白或突触核蛋白- α),其在遗传学上及神经病理学上与帕金森氏病(PD)关联(Stefanis, L.Cold Spring Harb Perspect Med.2:a009399)。 α -突触核蛋白被认为以多种方式造成PD发病机制,但通常认为 α -突触核蛋白的异常的可溶性寡聚体构形(称为原纤丝)是毒性物质,其通过对各种细胞内靶标(包括突触功能)的效应来介导细胞内稳态的破坏及神经元死亡。此外,据信分泌的 α -突触核蛋白对于邻近细胞发挥有害效应,因此可能造成疾病扩散。尽管 α -突触核蛋白牵涉到PD的全部病例中的程度尚不明确,但靶向在该蛋白失调时由该蛋白所赋予的毒性功能呈现潜在有价值的治疗策略,不仅是对于PD,而且对于称为突触核蛋白病的其他神经退化性病症,其全部由于 α -突触核蛋白累积而表现常见的神经病理学印记,称为路易氏体(LB)及路易氏神经突(LN)。除PD之外,这些证明或疑似的SNCA相关突触核蛋白病包括而不限于,多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

[0007] PD、LBD和MSA是具有SNCA脑病理学的神经退化性病症的三种最普遍的实例。PD为最常见的运动障碍,并且以僵直、运动减退、震颤和姿势不稳为特征。据信PD在全世界范围内影响大约400至600万人。LBD占到了全部痴呆的5-15%。除了健忘及经常波动的其他痴呆症状之外,LBD患者通常患有反复跌倒和视觉幻觉。MSA为一种快速进展的孤儿病症,其在几年内导致受影响的受试者的严重运动障碍。据报导,MSA的发病率在每100,000人3.4-4.9例之间。

[0008] 除了在 α -突触核蛋白病中观察到的神经病理学变化之外,在受影响的脑区中 α -突触核蛋白的水平通常也提高(Klucken et al.,2006)。

[0009] α -突触核蛋白单体、四聚体和纤维状聚集体为具有脑铁蓄积的神经退化中的路易氏体(LB)样神经元内包涵体、神经胶质细胞包涵体及轴突球体的主要组分。主要由 α -突触核蛋白组成的路易氏相关病理学(LRP)存在于大多数阿尔兹海默症活检中,并且患者中的较高 α -突触核蛋白水平与认知能力下降关联(Twohig et al.(2019)Molecular Neurodegeneration)。SNCA基因中的常染色体显性突变,特别地包括A53T、A30P、E46K和H50Q(Zarranz et al.(2004)Ann.Neurol.55,164-173,Choi et al.(2004)FEBS Lett.576,363-368,及Tsigelny et al.(2015)ACS Chem.Neurosci.6,403-416)、A53T(Polymeropoulos et al.(1997)Science),以及三重和双重,鉴定为在患有相关神经退化性疾病的家庭中运行。前述指明,不仅SNCA中的致病性突变,而且 α -突触核蛋白的增加也影响疾病结果。

[0010] SNCA突变在疾病发作中的作用尚未充分理解;但是,有证据指向正常 α -突触核蛋白超出特定水平(Stefanis et al.(2012)Cold Spring Harb Perspect Med.)和/或与细胞脂质和囊泡异常相互作用(Kiechler et al.(2020)Front.Cell Dev.Biol中综述)时,正常 α -突触核蛋白固有的功能获得性毒性。显然与此一致,与转基因过表达者相反,SNCA无效小鼠显示无明显的神经病理学或行为表型(Abeliovich et al.(2000)Neuron)。SNCA的转录后调节还显示通过结合基因的3'端的内源性microRNA发生(Junn et al.(2009)PNAS106:13052-13057;Doxakis(2010),JBC)。此外,对SNCA中的家族性点突变的研究表明受抑制的表达,尤其是在具有延长的疾病发作的情况中(Markopoulou et al.(1999)Ann Neurol.46(3):374-81及Kobayashi et al.(2003)Brain 126(Pt 1):32-42)。类似地,Voutsinas等人(2010)Hum Mutat.31(6):685-91)发现,即便野生型SNCA信使RNA(mRNA)的过表达也为疾病发作的原因。这些数据表明,总SNCA水平的抑制会降低 α -突触核蛋白诱导的毒性。

[0011] 对于突触核蛋白病,包括PD、多系统萎缩及路易氏体痴呆,没有疾病改善的治疗,并且治疗选项有限,例如,仅缓和性的。举例而言,目前,仅对症治疗可用于PD患者(通过替代脑中活性多巴胺的损失)及AD患者(即,胆碱酯酶抑制剂)。用于 α -突触核蛋白病的现有治疗策略无一针对基础疾病过程。

[0012] 因此,注意到在数种神经退化性病症(突触核蛋白病)中所描述的SNCA的参与,但对于药剂(鉴于 α -突触核蛋白在CNS组织中的所描述的功能性,特别地针对中枢神经系统(CNS)的药剂)仍存在需求,该药剂可使用细胞自身的RNAi机制来选择性地且有效地沉默SNCA基因(例如,消除或降低毒性 α -突触核蛋白物质的效应),其具有高生物学活性和体内稳定性,并且可有效地抑制靶SNCA基因的表达。

发明内容

[0013] 本公开提供RNAi剂组合物,其实现突触核蛋白 α (SNCA)基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体(RISC)介导的切割。SNCA基因可处于细胞内,例如受试者如人类体内的细胞内。在某些实施方案中,RNAi剂被设计且针对CNS的细胞和/或组织中SNCA的敲低。本公开还提供使用本公开的RNAi剂组合物用于抑制SNCA基因的表达或用于治疗将受益于抑制或降

低SNCA基因的表达的受试者的方法,例如,罹患或易患SNCA相关神经退化性疾病或病症的受试者,该疾病或病症为,例如,PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒疾病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病和亨廷顿病。

[0014] 因此,在一个方面,本公开提供一种用于抑制SNCA的表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包括具有5'-末端和3'-末端的有义链以及具有5'-末端和3'-末端的反义链,其中该有义链和反义链形成双链区,其中有义链包括表3的SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:164或SEQ ID NO:142-149、151-156、158-163或165-184的核苷酸序列,具有0或1个错配;dsRNA剂的有义链包括附接于自有义链的5'-末端计数的位置6或16处的亲脂性部分;反义链包括表3的SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:207或SEQ ID NO:185-192、194-199、201-206或208-227的核苷酸序列,具有0或1个错配;该dsRNA剂不包括GalNAc修饰;并且该dsRNA剂包括位于dsRNA剂的有义链和反义链各自的相应3'-末端和5'-末端倒数第二个及最后一个核苷酸间键处的八个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0015] 因此,在一个方面,本公开提供一种用于抑制SNCA的表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包括具有5'-末端和3'-末端的有义链以及具有5'-末端和3'-末端的反义链,其中该有义链和反义链形成双链区,其中:该有义链包括表3(SEQ ID NO:142-184)的核苷酸序列,具有0或1个错配;该dsRNA剂的有义链包括附接于自有义链的5'-末端计数的位置6或16处的亲脂性部分;该反义链包括表3(SEQ ID NO:185-227)的核苷酸序列,具有0或1个错配;该dsRNA剂不包括GalNAc修饰;并且该dsRNA剂包括六个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该六个硫代磷酸酯核苷酸间键位于反义链的5'端和3'端的倒数第二个和最后一个核苷酸间键处以及有义链的5'端的倒数第二个和最后一个核苷酸间键处。

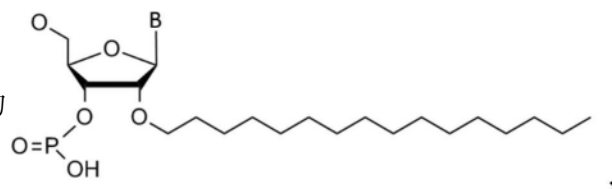
[0016] 在某些实施方案中,该亲脂性部分为脂肪族、脂环族或多脂环族化合物。

[0017] 在一些实施方案中,该亲脂性部分为脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-苾丁酸、二氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪。

[0018] 在一个实施方案中,该亲脂性部分含有饱和或不饱和 C_4 - C_{30} 烃链及由羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮化物或炔组成的任选官能团。

[0019] 在一些实施方案中,该亲脂性部分含有饱和或不饱和 C_6 - C_{18} 烃链。任选地,该亲脂性部分含有饱和或不饱和 C_{16} 烃链。

[0020] 在一个实施方案中,该亲脂性部分为



其中B为核苷酸碱基或核苷酸碱基类似物。任选地,B为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0021] 在某些实施方案中,该亲脂性部分经由接头或载体附接。任选地,该亲脂性部分经

由替代有义链的位置6或16处(自该有义链的5'-末端核苷酸作为位置1计数)的核苷酸的载体缀合。在相关实施方案中,载体为环状基团(例如,吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧杂环戊烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基或十氢萘基)或为基于丝胺醇主链或二乙醇胺主链的非环状部分。

[0022] 在一些实施方案中,该亲脂性部分经由包含醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来亚酰胺-硫醚、二硫醚、磷酸二酯、磺酰胺连接、点击反应的产物或氨基甲酸酯的接头缀合于dsRNA剂。

[0023] 在一个实施方案中,该亲脂性部分经由生物可裂解接头缀合于dsRNA剂,该接头为DNA、RNA、二硫醚、酰胺、半乳糖胺、葡萄糖胺、半乳糖和/或甘露糖官能化的单糖或寡糖,或其组合。

[0024] 在某些实施方案中,该有义链或该反义链或两者的基本上全部的核苷酸为修饰的核苷酸。

[0025] 在一个实施方案中,该有义链的全部核苷酸为修饰的核苷酸。

[0026] 在另一实施方案中,该反义链的全部核苷酸为修饰的核苷酸。

[0027] 在另外的实施方案中,该有义链的全部核苷酸和该反义链的全部核苷酸是修饰的核苷酸。

[0028] 在某些实施方案中,该dsRNA剂具有一个或多个修饰的核苷酸,其中该一个或多个修饰的核苷酸中的至少一个为脱氧核苷酸、3'-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、解锁核苷酸、构象限制的核苷酸、约束的乙基核苷酸、无碱基的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物的核苷酸、包含乙烯基磷酸酯的核苷酸、包含腺苷-二醇核苷酸(GNA)的核苷酸、包含胸苷-二醇核苷酸(GNA)S-异构体的核苷酸、包含2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包含2'-脱氧胸苷-3'-磷酸的核苷酸、包含2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸的核苷酸或连接至胆固醇基衍生物和十二烷酸双癸基酰胺基团的末端核苷酸。

[0029] 在另一实施方案中,该dsRNA剂包括至少一个修饰的核苷酸,该修饰的核苷酸为2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-C16(2'-O-十六烷基)修饰的核苷酸或包括乙烯基磷酸酯的核苷酸。任选地,该dsRNA剂包括下列各修饰中的至少一个:2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-C16(2'-O-十六烷基)修饰的核苷酸和包括乙烯基磷酸酯的核苷酸。

[0030] 在某些实施方案中,dsRNA剂还包括在反义链的5'-端的磷酸酯或磷酸酯模拟物。任选地,该磷酸酯模拟物为5'-乙烯基磷酸酯(VP)。

[0031] 在一些实施方案中,dsRNA剂包括如表2中所示的修饰核苷酸的模式(其中2'-C16、2'-O-甲基、2'-脱氧、GNA、硫代磷酸酯、乙烯基磷酸酯和2'-氟修饰的位置如表2中所显示,而与所显示的dsRNA剂的单个核苷酸碱基序列无关)。

[0032] 在一个实施方案中,该dsRNA剂具有AD-1804698、AD-1804699、AD-1747575、AD-1747576、AD-1804700、AD-1747577、AD-1747578、AD-1747579、AD-1747580、AD-1747581、AD-1804701、AD-1747582、AD-1804702、AD-1804703、AD-1804704、AD-1747583、AD-1804705、AD-1804706、AD-1804707、AD-1804708、AD-1804709、AD-1747591、AD-1747585、AD-1804710、AD-1804711、AD-1747586、AD-1804712、AD-1747587、AD-1804713、AD-1804714、AD-1747588、AD-1804715、AD-1804716、AD-1804717、AD-1804718、AD-1804719、AD-1804720、AD-1804721、AD-1804722、AD-1804723、AD-1804724、AD-1804725或AD-1804726的有义链核苷酸序列。任选地,该dsRNA剂具有AD-1747580、AD-1747583或AD-1747585的有义链核苷酸序列。

[0033] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链具有下列修饰模式中的一种:5'-nsnsnnn(Nhd)NfnNfNfNfnnnnnnnnnsnsn-3'、5'-nsnsnnnnnnNfNfNfnnnn(Nhd)nnnsnsn-3'或5'-nsnsnnn(Nhd)nnNfNfNfnnnnnnnnnsnsn-3',其中n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,并且(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸。

[0034] 在实施方案中,该dsRNA剂的有义链具有下列修饰模式:5'-(L1)(inv)snnnnnnnnnNfNfNfnnnnnnnnnnns(inv)(L2)-3',其中各(inv)为反向核苷酸(例如,反向无碱基核苷酸,如反向无碱基核糖核苷酸),以及(L1)和(L2)中的至少一个为包含亲脂性基团的配体(例如,包含C16烷基或C16烯基),并且(L1)和(L2)中的另一个不存在或为氢。

[0035] 在一些实施方案中,该dsRNA剂的反义链具有下列修饰模式中的一种:5'-VPnsdNsnndNndNnnnnndNnNfnnnnnnnnsnsn-3'、5'-VPnsNfsndNn(Ngn)nnnnnnNfnNfnnnnnnsnsn-3'或5'-VPnsNfsndNn(N2p)nnnnnnNfnNfnnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基-磷酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,dN为2'-脱氧-核苷酸,Nf为2'-氟-核苷酸,并且(Ngn)为二醇核酸S-异构体,并且N2p为2'-磷酸酯核苷酸。

[0036] 在实施方案中,该dsRNA剂的反义链具有下列修饰模式中的一种:5'-ZnsdNsnnndNndNnnnndNnNfnnnnsnsn-3'、5'-ZnsNfsnndNn(Ngn)nnnnnnNfnNfnnsnsn-3'、5'-ZnsNfsnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfnsNfsn-3'、5'-ZnsNfsnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfsn-3'、5'-ZnsNfsnNfnNfnnnnnNfnNfnNfnNfnsNfsn-3'、5'-ZnsNfsnsNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfsn-3'、5'-ZnsNfsnsNfnNfnnnnnNfnNfnNfnNfsn-3'或5'-ZnsNfsnsNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfnNfsn-3',其中Z为5'-磷酸酯模拟物,如5'-环丙基磷酸酯(5'-CP)。(如

本文中所用,5'-CP的结构为 )

[0037] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnn(Nhd)NfnNfnNfnnnnnnnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsdNsnnndNdnNnnndNnNfnnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,并且(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸。

[0038] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnn(Nhd)NfnNfNfNfnnnnnnnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsNfsnndNn(Ngn)nnnnnnNfnNfnnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,并且(Ngn)为二羟核酸S-异构体。

[0039] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnn(Nhd)NfnNfNfNfnnnnnnnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsNfsnndNn(N2p)nnnnnnNfnNfnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,(Ngn)为二醇核酸S-异构体,并且N2p为2'-磷酸酯核苷酸。

[0040] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnnnnnNfnNfNfnnnn(Nhd)nnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsdNsnnNndNnnndNnNfnnnnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,并且(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸。

[0041] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnnnnnNfnNfNfnnnn(Nhd)nnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsNfsnndNn(Ngn)nnnnnnNfnNfnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,并且(Ngn)为二醇核酸S-异构体。

[0042] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnnnnnNfnNfNfnnnn(Nhd)nnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsNfsnndNn(N2p)nnnnnnNfnNfnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,(Ngn)为二醇核酸S-异构体,并且N2p为2'-磷酸酯核苷酸。

[0043] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnn(Nhd)nnNfNfNfnnnnnnnnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsdNsnnNndNnnnnndNnNfnnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,并且(Ngn)为二醇核酸S-异构体。

[0044] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnn(Nhd)nnNfNfNfnnnnnnnnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsNfsnndNn(Ngn)nnnnnnNfnNfnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,并且(Ngn)为二醇核酸S-异构体。

[0045] 在某些实施方案中,该dsRNA剂的有义链包含修饰模式:5'-nsnsnnn(Nhd)nnNfNfNfnnnnnnnnnsnsn-3';并且反义链包含修饰模式:5'-VPnsNfsnndNn(N2p)nnnnnnNfnNfnnnnnsnsn-3',其中VP为乙烯基膦酸酯,n为2'-O-甲基-核苷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Nf为2'-氟-核苷酸,dN为2'-脱氧-核苷酸,(Nhd)为2'-O-十六烷基-核苷酸,(Ngn)为二醇核酸S-异构体,并且N2p为2'-磷酸酯核苷酸。

[0046] 本公开的另一面提供一种用于抑制SNCA的表达的dsRNA剂,其中该dsRNA剂包括具有5'-末端和3'-末端的有义链以及具有5'-末端和3'-末端的反义链,其中该有义链和反义链形成双链区,其中:该有义链包括表2(SEQ ID NO:13至55)的核苷酸序列及修饰,具有0或1个错配;并且反义链包括表2(SEQ ID NO:56至98)的核苷酸序列及修饰,具有0或1个错

配。

[0047] 在一个实施方案中,该dsRNA剂具有下列有义链核苷酸序列中的一个:5'-asasgug (Chd) ucAfGfUfuccaaugusgsa-3' (SEQ ID NO:35)、5'-uscsuuugcuCfCfCfaguu (Uhd) cuusgsa-3' (SEQ ID NO:28)、5'-gsasgca (Ahd) guGfAfCfaaanguugsgsa-3' (SEQ ID NO:21)、5'-gsusaca (Ahd) GfuGfCfUfcaguuccasasa-3' (SEQ ID NO:34)、5'-cscsauc (Ahd) gcAfGfUfgauugaagsusa-3' (SEQ ID NO:43)、5'-uscscag (Uhd) uUfCfUfugagaucusgsa-3' (SEQ ID NO:261) 或5'-uscсаug (Ahd) aaGfGfAfcuuucaaasgsa-3' (SEQ ID NO:19),其中a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,(Ahd)为2'-0-十六烷基腺苷-3'-磷酸,(Uhd)为2'-0-十六烷基尿苷-3'-磷酸,并且(Chd)为2'-0-十六烷基胞苷-3'-磷酸。

[0048] 在另一实施方案中,该dsRNA剂具有下列反义链核苷酸序列中的一个:5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3' (SEQ ID NO:78)、5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAfgcaa agasusa-3' (SEQ ID NO:71)、5'-VPusdCscadAcdaauugdTcAfcuugcucsusu-3' (SEQ ID NO:64)、5'-VPusUfsugdGa (Agn) cugagcAfcUfuguacsasg-3' (SEQ ID NO:77)、5'-VPusdAscudTcdAaucadCuGfcugauggsasa-3' (SEQ ID NO:86)、5'-VPusdCsagdAudCucaadGaAfacugggasc-3' (SEQ ID NO:262) 或5'-VPusdCsuudTgdAaagudCcUfuucaugasasu-3' (SEQ ID NO:62),其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dG为2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,并且(Agn)为腺苷-二醇核糖(GNA)S-异构体。

[0049] 在进一步的实施方案中,该dsRNA剂具有下列核苷酸序列的双链体对中的一种:
(i) 有义链:5'-asasgug (Chd) ucAfGfUfuccaaugusgsa-3' (SEQ ID NO:35) 和反义链:5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3' (SEQ ID NO:78);
(ii) 有义链:5'-uscsuuugcuCfCfCfaguu (Uhd) cuusgsa-3' (SEQ ID NO:28) 和反义链:5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAfgcaa agasusa-3' (SEQ ID NO:71);
(iii) 有义链:5'-gsasgca (Ahd) guGfAfCfaaanguugsgsa-3' (SEQ ID NO:21) 和反义链:5'-VPusdCscadAcdaauugdTcAfcuugcucsusu-3' (SEQ ID NO:64);
(iv) 有义链:5'-gsusaca (Ahd) GfuGfCfUfcaguuccasasa-3' (SEQ ID NO:34) 和反义链:5'-VPusUfsugdGa (Agn) cugagcAfcUfuguacsasg-3' (SEQ ID NO:77);
(v) 有义链:5'-cscsauc (Ahd) gcAfGfUfgauugaagsusa-3' (SEQ ID NO:43) 和反义链:5'-VPusdAscudTcdAaucadCuGfcugauggsasa-3' (SEQ ID NO:86);
(vi) 有义链:5'-uscscag (Uhd) uUfCfUfugagaucusgsa-3' (SEQ ID NO:261) 和反义链:5'-VPusdCsagdAudCucaadGaAfacugggasc-3' (SEQ ID NO:262); 或
(vii) 有义链:5'-uscсаug (Ahd) aaGfGfAfcuuucaaasgsa-3' (SEQ ID NO:19) 和反义链:5'-VPusdCsuudTgdAaagudCcUfuucaugasasu-3' (SEQ ID NO:62),其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-

3'-磷酸,Cf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dG为2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,(Agn)为腺苷-二核苷酸(GNA) S-异构体,(Ahd)为2'-O-十六烷基腺苷-3'-磷酸,(Uhd)为2'-O-十六烷基尿苷-3'-磷酸,并且(Chd)为2'-O-十六烷基胞苷-3'-磷酸。

[0050] 本公开的另外的方面提供一种用于抑制SNCA的表达的dsRNA剂,该dsRNA剂具有有义链序列5'-asasgug(Chd)ucAfGfUfuccaaugusgsa-3'(SEQ ID NO:35)和反义链序列5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3'(SEQ ID NO:78),其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,并且(Chd)为2'-O-十六烷基胞苷-3'-磷酸。

[0051] 本公开的另一方面提供一种用于抑制SNCA的表达的dsRNA剂,该dsRNA剂具有有义链序列5'-uscsuuugcuCfCfCfagu(Uhd)cuusgsa-3'(SEQ ID NO:28)和反义链序列5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAfgcaaagasusa-3'(SEQ ID NO:71),其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dG为2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸,并且(Uhd)为2'-O-十六烷基尿苷-3'-磷酸。

[0052] 本公开的进一步方面提供一种用于抑制SNCA的表达的dsRNA剂,该dsRNA剂具有有义链序列5'-gsasgca(Ahd)guGfAfCfaaanguugsgsa-3'(SEQ ID NO:21)和反义链序列5'-VPusdCscadAcdaUuugdTcAfcuugcucsusu-3'(SEQ ID NO:64),其中VP为乙烯基膦酸酯,a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸,u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸,g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸,c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸,s为硫代磷酸酯核苷酸间键,Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸,Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸,Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸,dA为2'-脱氧腺苷-3'-磷酸,dC为2'-脱氧胞苷-3'-磷酸,dT为2'-脱氧胸苷-3'-磷酸,并且(Ahd)为2'-O-十六烷基腺苷-3'-磷酸。

[0053] 在另一实施方案中,该RNAi剂为其药学上可接受的盐。本文的各RNAi剂的“药学上可接受的盐”包括但不限于,钠盐、钙盐、锂盐、钾盐、铵盐、镁盐及其混合物。本领域技术人员将理解,RNAi剂可作为多阳离子盐提供,其具有任选地修饰的磷酸二酯主链和/或任何其他酸性修饰的每个游离酸基团(例如,5'-末端磷酸酯基团)的一个阳离子。例如,“n”个核苷酸长度的寡核苷酸含有n-1个任选地修饰的磷酸二酯,使得21nt长度的寡核苷酸可提供为具有至多20个阳离子(例如,20个钠阳离子)的盐。类似地,具有21nt长度的有义链和23nt长度的反义链的RNAi剂可提供为具有至多42个阳离子(例如,42个钠离子)的盐。在前述实例中,在该RNAi剂还包括5'-末端磷酸酯或5'-末端乙烯基膦酸酯基团的情况下,该RNAi剂可提供为具有至多44个阳离子(例如,44个钠阳离子)的盐。

[0054] 本公开的另一方面提供含有本文所公开的dsRNA剂的细胞。

[0055] 本公开的另外的方面提供一种用于抑制 α -突触核蛋白的表达的药物组合物,该药物组合物包括本文所公开的dsRNA剂。

[0056] 在某些实施方案中,该dsRNA剂和/或药物组合物在非缓冲溶液中施用。任选地,非缓冲溶液为盐水或水。

[0057] 在一些实施方案中,该dsRNA剂与缓冲溶液一起施用。任选地,缓冲溶液包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其组合。在某些实施方案中,缓冲溶液为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0058] 本公开的进一步方面提供一种药物组合物,其包括本文所公开的dsRNA剂及脂质制剂。

[0059] 在一个实施方案中,该脂质制剂包括或者为脂质纳米颗粒(LNP)。

[0060] 本公开的另一方面提供一种抑制细胞中 α -突触核蛋白(SNCA)基因的表达和/或预防细胞或受试者中 α -突触核蛋白聚集体的形成的方法,该方法包括:(a)使细胞或受试者与本文所公开的dsRNA剂或药物组合物接触;以及(b)将步骤(a)中产生的细胞或受试者维持足以获得SNCA基因的mRNA转录物降解的时间,从而抑制该细胞中SNCA基因的表达和/或预防细胞或受试者中 α -突触核蛋白聚集体的形成。

[0061] 在一个实施方案中,细胞处于受试者体内。任选地,受试者为人类。或者,受试者为恒河猴、食蟹猴、小鼠或大鼠。

[0062] 在某些实施方案中,人类受试者罹患SNCA相关疾病。任选地,SNCA相关疾病为突触核蛋白病。任选地,该突触核蛋白病为PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytic-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒疾病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和/或克雅氏病。

[0063] 在一些实施方案中,与对照细胞或对照受试者相比,该细胞或受试者中的SNCA表达被dsRNA剂抑制至少约50%、至少约40%、至少约30%、至少约20%或至少约10%。

[0064] 本公开的另外的方面提供一种治疗被诊断为患有SNCA相关神经退化性疾病的受试者的方法,该方法涉及向该受试者施用治疗有效量的本文所公开的dsRNA剂或药物组合物,任选地其中该受试者用治疗有效量的本文所公开的dsRNA剂或药物组合物重新给药,从而治疗该受试者。

[0065] 在某些实施方案中,治疗包括SNCA相关神经退化性疾病的至少一种体征或症状的改善。

[0066] 在一些实施方案中,治疗包括预防疾病的进展。

[0067] 在一个实施方案中,SNCA相关神经退化性疾病的特征为下列症状中的一种或多种:震颤、缓慢运动(动作迟缓)、肌肉僵硬、姿势和平衡受损、自发运动的损失、语音变化、字迹变化、幻视、幻听、幻嗅、幻触、身体机能(自主神经系统)调节不良如晕眩、跌倒和肠问题、认知问题如意识模糊、注意力不集中、视空间问题及记忆力损失、睡眠困难如快速眼动(REM)睡眠行为障碍(其中梦在睡眠时以身体表现出来)、注意力波动(包括嗜睡发作、长时间凝视空处、白天长时间小睡或言语紊乱、抑郁及冷漠)、直立性低血压(当人站起时发生血压的突然下降,导致人感觉晕眩和头晕,并且需要坐、蹲或躺下以便防止昏迷)、动作笨拙或不协调、膀胱控制问题、手或肢的挛缩(关节周围的肌肉或肌腱的慢性缩短,其阻止关节自由动作)、Pisa综合征(其中身体表现为向一侧倾斜的异常姿势)、颈项前屈(其中颈部向前弯曲且头部下垂)以及不由自主且不可控制的叹息或喘息。

- [0068] 在某些实施方案中,该dsRNA剂以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量向受试者施用。
- [0069] 在一些实施方案中,该dsRNA剂或药物组合物向受试者鞘内施用。
- [0070] 在一个实施方案中,该方法还涉及向受试者施用适用于治疗或预防SNCA相关神经退化性疾病或病症的另外的药剂或疗法。
- [0071] 在某些实施方案中,该SNCA相关神经退化性疾病为帕金森氏病(PD)。
- [0072] 在一个实施方案中,该SNCA相关神经退化性疾病为路易氏体痴呆(LBD)或多系统萎缩(MSA)。
- [0073] 在一些实施方案中,SNCA表达被抑制至少约30%。
- [0074] 在另一实施方案中,该方法还涉及向受试者施用另外的治疗剂。
- [0075] 在某些实施方案中,该方法降低脑或脊髓组织中的SNCA的表达。任选地,该脑或脊髓组织为脑皮层、小脑、基底节、海马、杏仁核、丘脑、脑干、颈部脊髓、腰部脊髓和/或胸部脊髓。
- [0076] 本公开的另一方面提供一种抑制受试者中SNCA的表达的方法,该方法涉及向该受试者施用治疗有效量的本文所公开的dsRNA剂或药物组合物,从而抑制该受试者中的SNCA的表达。
- [0077] 本公开的另外的方面提供一种用于治疗或预防受试者的SNCA相关疾病的方法,该方法涉及向受试者施用治疗有效量的本文所公开的dsRNA剂或药物组合物,从而治疗或预防受试者的SNCA相关疾病。
- [0078] 在某些实施方案中,施用步骤在受试者的一个或多个组织中产生SNCA mRNA或 α -突触核蛋白的至少60%敲低。任选地,该受试者的一个或多个组织包括CSF、前额叶皮质、中脑、胸椎、海马、髓质脑桥、纹状体尾状核和/或小脑。
- [0079] 本公开的进一步方面提供一种用于进行本文所公开的方法的试剂盒,该试剂盒包括本文所公开的dsRNA剂及其使用说明。任选地,该试剂盒还包括用于向受试者施用该dsRNA剂的装置。
- [0080] 定义
- [0081] 为了更容易地理解本公开,首先定义某些术语。此外,应注意,无论何时陈述参数的数值或数值范围,处于所述的值中间的值和范围也旨在作为本公开的部分。
- [0082] 在此使用冠词“一个”和“一”是指一个或多于一个(即,至少一个)该冠词的语法对象。通过举例,“一个元件”意指一个元件或多于一个元件,例如多个元件。
- [0083] 在此使用术语“包括”意指短语“包括但不限于”,并且可与该短语互换使用。
- [0084] 在此使用术语“或”意指术语“和/或”,并且可与该术语互换使用,除非上下文清楚地另外指明。
- [0085] 术语“约”在本文中用于指在本领域的典型公差范围内。例如,“约”可以被理解为平均值的约2个标准偏差。在某些实施方案中,“约”意指 $\pm 10\%$ 。在某些实施方案中,“约”意指 $\pm 5\%$ 。当“约”存在于一系列数字或范围之前时,应当理解“约”可以修饰所述系列或范围中的数字中的每个数字。
- [0086] 在数字或一系列数字之前的术语“至少”应理解为包括与术语“至少”相邻的数字,以及逻辑上可包括的所有后续数字或整数,如从上下文清楚的。例如,核酸分子中的核苷酸数目必须是整数。例如,“21个核苷酸的核酸分子的至少18个核苷酸”是指18、19、20或21个

核苷酸具有指定的性质。当“至少”存在于一系列数字或范围之前时,应理解“至少”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0087] 如本文使用的,“不大于”或“小于”被理解为与该短语相邻的值以及逻辑上较低的值或整数,如从上下文的逻辑理解的,直至零。例如,具有“不超过2个核苷酸”的突出端的双链体具有2、1或0个核苷酸的突出端。当在一系列数字或范围之前存在“不多于”时,应理解“不多于”可以修饰该系列或范围中的每个数字。如本文所使用的,范围包括上限和下限两者。

[0088] 如本文所使用的,检测方法可包括确定存在的分析物的量低于该方法的检测水平。

[0089] 在所示靶位点与有义或反义链的核苷酸序列之间冲突的情况下,所示序列优先。

[0090] 在化学结构与化学名称之间冲突的情况下,以化学结构为准。

[0091] 术语“SNCA”、“ α -突触核蛋白”、“突触核蛋白 α ”或“alpha-突触核蛋白”指与称为“突触核蛋白病”的神经退化性疾病相关的基因以及由该基因编码的蛋白质。人类SNCA基因区域覆盖大约114kb。SNCA转录物含有13个外显子,且15种mRNA亚型已鉴定或以其他方式预测为产生的。SNCA的核苷酸和氨基酸序列可见于,例如,GenBank登录号NM_007308.3(人类(*Homo sapiens*) SNCA,SEQ ID NO:1,反向互补序列SEQ ID NO:2);GenBank登录号:XM_005555421(食蟹猴(*Macaca fascicularis*) SNCA,SEQ ID NO:3,反向互补序列SEQ ID NO:4);GenBank登录号:NM_009221(小鼠(*Mus musculus*) SNCA,SEQ ID NO:5,反向互补序列SEQ ID NO:6);GenBank登录号NM_019169.2(大鼠(*Rattus norvegicus*) SNCA,SEQ ID NO:7,反向互补序列SEQ ID NO:8)及GenBank登录号:XM_535656.7(家犬(*Canis lupus familiaris*) SNCA,SEQ ID NO:228,反向互补序列SEQ ID NO:229)。

[0092] 如本文所用,术语“SNCA”也指SNCA基因的变型,包括所提供的天然存在的序列变体,例如,亚型1转录物NM_000345.4(SEQ ID NO:232),其编码多肽NP_000336.1;亚型2转录物NM_001146054.2(SEQ ID NO:230),其编码多肽NP_001139526.1;亚型3转录物NM_001146055.2(SEQ ID NO:231),其编码多肽NP_001139527.1;如上文所述的亚型4转录物NM_007308.3(SEQ ID NO:1),其编码多肽NP_009292.1;亚型5转录物NM_001375285.1(SEQ ID NO:233),其编码多肽NP_001362214.1;亚型6转录物NM_001375286.1(SEQ ID NO:234),其编码多肽NP_001362215.1;亚型7转录物NM_001375287.1(SEQ ID NO:235),其编码多肽NP_001362216.1;亚型8转录物NM_001375288.1(SEQ ID NO:236),其编码多肽NP_001362217.1;亚型9转录物NM_001375290.1(SEQ ID NO:237),其编码多肽NP_001362219.1;以及预测的亚型X1转录物XM_011532203.1(SEQ ID NO:238),其编码多肽XP_011530505.1;预测的亚型X2转录物XM_011532204.3(SEQ ID NO:239),其编码多肽XP_011530506.1;预测的亚型X3转录物XM_011532205.2(SEQ ID NO:240),其编码多肽XP_011530507.1;预测的亚型X4转录物XM_011532206.1(SEQ ID NO:241),其编码多肽XP_011530508.1;预测的亚型X5转录物XM_011532207.1(SEQ ID NO:242),其编码多肽XP_011530509.1;及预测的亚型X8转录物XM_017008563.1(SEQ ID NO:243),其编码多肽XP_016864052.1(与前述各登录号相关的独特序列通过引用以其在本申请提交日时可获得的形式并入本文)。SNCA序列的额外实例可见于公开可得的数据库,例如,GenBank、OMIM、UniProt、NCBI dbSNP(参见,例如,www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622)及Macaca基因组项

目网址 (macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp)。关于SNCA的额外信息可见于,例如,www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622。至本申请提交之日,前述各GenBank登录号及基因数据库编号的整体内容通过引用并入本文。

[0093] α -突触核蛋白的三种蛋白质异形体描述于UniProt中。最长的 α -突触核蛋白异形体为大约14kDa的蛋白质(异形体1UniProt,140个氨基酸的P37840)。UniProt中的其他 α -突触核蛋白异形体包括:异形体2-4,112个氨基酸的P37840-2;及异形体2-5,126个氨基酸的P37840-3。140个氨基酸的 α -突触核蛋白由映射至染色体位点4q21.3-q22的5个外显子对编码。 α -突触核蛋白具有由不完全KXKEGV(SEQ ID NO:244)基序构成的N末端区域、极度疏水的NAC结构域和高酸性C末端结构域。在生理条件下,据信SNCA为固有无序的单体或螺旋折叠的四聚体。 α -突触核蛋白占脑细胞的细胞溶质中所有蛋白质的1%,并且主要在新皮质、海马、黑质、丘脑和小脑中表达。 α -突触核蛋白也以较低量在心脏、骨骼肌、胰腺、淋巴及血细胞中表达。尽管尚未充分理解SNCA的功能,但有证据表明,其在维持突触前末梢中突触囊泡的充足供应中发挥重要作用。通过调节p53表达和促凋亡基因的反式激活两者的抑制, α -突触蛋白涉及多巴胺释放和转运的调节、微管相关蛋白tau的原纤维化及非多巴胺能神经元中神经保护表型的调节,从而导致减少的半胱天冬酶-3激活。 α -突触核蛋白通过其诱导神经退化性疾病如帕金森氏病、路易氏体痴呆和多系统萎缩的主要机制表现为 α -突触核蛋白的水平升高,从而产生 α -突触核蛋白原纤维聚集体。

[0094] 如本文中所用,“靶序列”是指在SNCA基因的转录过程中形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括作为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。在一个实施方案中,序列的靶标部分至少足够长以用作在SNCA基因的转录过程中形成的mRNA分子的核苷酸序列的该部分处或附近RNAi指导切割的底物。在一个实施方案中,靶序列在SNCA基因的蛋白质编码区域内。在另一实施方案中,靶序列在SNCA基因的3'-UTR内。

[0095] 靶序列可为约9至36个核苷酸的长度,例如,约15至30个核苷酸的长度。例如,靶序列可为约15至30个核苷酸的长度,如15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个核苷酸的长度。在一些实施方案中,靶序列为约19至约30个核苷酸的长度。在其他实施方案中,靶序列为约19至约25个核苷酸的长度。在再其他的实施方案中,靶序列为约19至约23个核苷酸的长度。在一些实施方案中,靶序列为约21至约23个核苷酸的长度。上文述及的范围和长度中间的范围和长度也考虑为本公开的部分。

[0096] 如本文所使用的,术语“包含序列的链”是指包含核苷酸的链的寡核苷酸,该核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法提到的顺序来描述。

[0097] 在修饰或未修饰的核苷酸的情况中,“G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常代表分别含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,将理解的是,术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可以指如下进一步详细描述 of 修饰的核苷酸、或代理替代部分(参见,例如表1)。技术人员应很好地认识到,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶可以被其他部分替代而基本上不改变包含携带这种替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配

对特性。例如而非限制性地,包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸进行碱基配对。因此,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本公开中所述的dsRNA的核苷酸序列中由含有例如肌苷的核苷酸替代。在另一个实例中,寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别地由鸟嘌呤和尿嘧啶替换,以形成与靶mRNA的G-U摇摆碱基配对。含有这类替代部分的序列适用于在本公开中所述的组合物和方法。

[0098] 如在此可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi剂”、“iRNA剂”、“RNA干扰剂”是指含有如该术语在此定义的RNA的试剂,并且其通过RNA诱导沉默复合体(RISC)途径介导RNA转录物的靶向切割。RNA干扰(RNAi)是指导mRNA的序列特异性降解的过程。RNAi调节(例如抑制)细胞(例如受试者如哺乳动物受试者体内的细胞)中SNCA的表达。

[0099] 在一个实施方案中,本公开的RNAi剂包括单链RNAi,其与靶RNA序列例如SNCA靶mRNA序列相互作用以指导靶RNA的切割。不希望受限于理论,据信引入细胞内的长双链RNA通过被称为Dicer的III型核酸内切酶降解为包含有义链和反义链的双链短干扰RNA(siRNA)(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer(核糖核酸酶III样酶)使这些dsRNA加工成具有特征性的两个碱基的3'突出端的19-23个碱基对短干扰RNA(Bernstein等(2001) Nature 409:363)。然后将这些siRNA并入RNA诱导沉默复合体(RISC)中,其中一种或多种解旋酶使siRNA双链体展开,从而使互补反义链能够指导靶标识别(Nykanen等(2001) Cell 107:309)。当结合至适当的靶mRNA时,RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶标以诱导沉默(Elbashir等(2001) Genes Dev. 15:188)。因此,在一个方面中,本公开涉及在细胞内产生的单链RNA(ssRNA)(siRNA双链体的反义链)并且该单链RNA促进RISC复合体的形成以实现靶基因(即SNCA基因)的沉默。因此,术语“siRNA”在本文中还可用于指如上所述的RNAi。

[0100] 在另一实施方案中,RNAi剂可以是引入到细胞或生物体中以抑制靶mRNA的单链RNA。单链RNAi剂结合RISC核酸内切酶(Argonaute 2),然后其切割靶mRNA。单链siRNA通常是15-30个核苷酸并且是化学修饰的。单链RNA的设计和测试被描述于美国专利号8,101,348和Lima等(2012) Cell 150:883-894中,这些参考文献中每一个的全部内容特此通过引用结合在此。本文描述的任何反义核苷酸序列可以被用作如本文所描述或如通过描述于Lima等(2012) Cell 150:883-894中的方法化学修饰的单链siRNA。

[0101] 在另一实施方案中,用于本公开的组合物和方法中的“RNAi剂”是双链RNA,并且在此称为“双链RNAi剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”是指核糖核酸分子的复合体,其具有包含两个反平行和基本上互补的核酸链的双链体结构,称为相对于靶RNA(即SNCA基因)具有“有义”和“反义”取向。在本公开的一些实施方案中,双链RNA(dsRNA)通过在此称为RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机制来引发靶RNA(例如mRNA)的降解。

[0102] 通常,dsRNA分子可包括核糖核苷酸,但如本文中所详述的,各链或两条链也可包括一个或多个非核糖核苷酸,例如,脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。此外,如本说明书中所用,“RNAi剂”可包括具有化学修饰的核糖核苷酸;RNAi剂可包括多个核苷酸处的实质性修饰。

[0103] 如本文所使用的,术语“修饰的核苷酸”是指独立地具有修饰的糖部分、修饰的核苷酸间键或修饰的核碱基的核苷酸。因此,术语“修饰的核苷酸”涵盖对核苷间键、糖部分或核碱基的例如官能团或原子的置换、添加或去除。适用于本公开的药剂的修饰包括本文公

开的或本领域已知的所有类型的修饰。出于本说明书和权利要求书的目的,“RNAi剂”涵盖在siRNA型分子中使用的任何此类修饰。

[0104] 在本公开的某些实施方案中,如果存在于RNAi剂内,包含脱氧核苷酸(其被公认为核苷酸的天然存在形式)可以被认为构成修饰的核苷酸。

[0105] 双链体区域可为允许所需的靶RNA通过RISC途径的特异性降解的任意长度,且可以为约9至36个碱基对的长度范围,例如约15至30个碱基对的长度,例如,约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或36个碱基对的长度,如约15至30、15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个碱基对的长度。上文所述的范围和长度中间的范围和长度也考虑为本发明的部分。

[0106] 形成双链体结构的两条链可为一个较大RNA分子的不同部分,或它们可为独立的RNA分子。在两条链为一个较大分子的部分,且因此通过形成双链体结构的一条链的3'-端与相应的另一条链的5'-端之间的不间断核苷酸链连接的情况中,连接RNA链称为“发夹环”。发夹环可以包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实施方案中,发夹环可包含至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少20、至少23个或更多个未配对的核苷酸或不指向dsRNA的靶位点的核苷酸。在一些实施方案中,发夹环可以是10个或更少的核苷酸。在一些实施方案中,发夹环可以是8个或更少的未配对核苷酸。在一些实施方案中,发夹环可以是4-10个未配对的核苷酸。在一些实施方案中,发夹环可以是4-8个核苷酸。

[0107] 在某些实施方案中,双链寡聚化物的两条链可以连接在一起。两条链可在两端或仅仅在一端彼此连接。在一端连接是指第一链的5'-端连接至第二链的3'-端或第一链的3'-端连接至第二链的5'-端。当两条链在两端彼此连接时,第一链的5'-端连接至第二链的3'-端并且第一链的3'-端连接至第二链的5'-端。两条链可以通过寡核苷酸接头连接在一起,其包括但不限于(N)_n;其中N独立地是修饰的或未修饰的核苷酸并且n是3-23。在一些实施方案中,n为3-10,例如3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,寡核苷酸接头选自GNRA、(G)₄、(U)₄和(dT)₄,其中N是修饰的或未修饰的核苷酸,且R是修饰的或未修饰的嘌呤核苷酸。接头中的一些核苷酸可参与与接头中的其它核苷酸的碱基配对相互作用。两条链也可以通过非核苷接头,例如本文所述的接头连接在一起。本领域技术人员将理解,本文描述的任何寡核苷酸化学修饰或变异可用于寡核苷酸接头中。

[0108] 发夹和哑铃型寡聚化合物具有等于或至少14、15、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24或25个核苷酸对的双链体区域。双链体区域的长度可以等于或小于200、100或50。在一些实施方案中,双链体区域的长度范围为15-30、17-23、19-23和19-21个核苷酸对。

[0109] 发夹寡聚化合物可具有单链突出端或末端未配对区域,在一些实施方案中在3'侧,并且在一些实施方案中,在发夹的反义侧上。在一些实施方案中,突出端长度为1-4个,更通常2-3个核苷酸。可诱导RNA干扰的发夹寡聚化合物在本文中也称为“shRNA”。

[0110] 当dsRNA的两条基本上互补的链由单独的RNA分子组成时,这些分子不是必须,而

是可以共价连接。当两条链通过除了形成双链体结构的一条链的3'-端与对应的另一条链的5'-端之间的不间断核苷酸链以外的方式共价连接时,连接结构称为“接头”。RNA链可以具有相同或不同数目的核苷酸。碱基对的最大数目是dsRNA的最短链中的核苷酸数目减去存在于双链体中的任何突出端。除了双链体结构外,RNAi可包含一个或多个核苷酸突出端。

[0111] 在一个实施方案中,本公开的RNAi剂为其中每一条链为24至30个核苷酸的长度的dsRNA,其与靶RNA序列(例如SNCA靶mRNA序列)相互作用以指导靶RNA的切割。不希望受限于理论,引入细胞中的长双链RNA通过称为Dicer的III型核酸内切酶而降解为siRNA(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer,一种核酸酶III样酶,将dsRNA加工为19至23个碱基对的短干扰RNA,其具有特征性的两个碱基的3'突出端(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。随后,siRNA并入RNA诱导沉默复合体(RISC)中,其中一种或多种解旋酶使siRNA双链体展开,使得互补反义链能够指导靶标识别(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。当与适宜的靶mRNA结合时,RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶标以诱导沉默(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。在一个实施方案中,本公开的RNAi剂为24至30个核苷酸的dsRNA剂,其与SNCA RNA序列相互作用以指导靶RNA的切割。

[0112] 在一个实施方案中,本公开的RNAi剂为其中各链包含19至23个核苷酸的dsRNA剂,其与SNCA RNA序列相互作用以指导靶RNA的切割。不希望受限于理论,引入细胞中的长双链RNA通过称为Dicer的III型核酸内切酶降解为siRNA(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer,一种核酸酶III样酶,将dsRNA加工为19至23个碱基对的短干扰RNA,其具有特征性的两个碱基的3'突出端(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。随后,siRNA并入RNA诱导沉默复合体(RISC)中,其中一种或多种解旋酶使siRNA双链体展开,使得互补反义链能够指导靶标识别(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。当与适宜的靶mRNA结合时,RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶标以诱导沉默(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。在一个实施方案中,本公开的RNAi剂为19至23个核苷酸的dsRNA,其与SNCA RNA序列相互作用以指导靶RNA的切割。

[0113] 如本文所使用的,术语“核苷酸突出端”是指从RNAi剂(例如,dsRNA)的双链体结构突出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA的一条链的3'端延伸超过另一条链的5'端,或反之,存在核苷酸突出端。dsRNA可以包含具有至少一个核苷酸的突出端;替代地,突出端可以包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多。核苷酸突出端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。突出端可以处于有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5'-端、3'-端或两端上。

[0114] 在dsRNA的一个实施方案中,至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端。在另一个实施方案中,至少一条链包含至少2个核苷酸,例如2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸的3'突出端。在其他实施方案中,RNAi剂的至少一条链包含至少1个核苷酸的5'突出端。在某些实施方案中,至少一条链包含至少2个核苷酸,例如2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸的5'突出端。还在其他实施方案中,RNAi剂的一条链的3'端和5'端都包含至少1个核苷酸的突出端。

[0115] 在一个实施方案中,dsRNA的反义链具有3'端、5'端、两端或任一端的1至10个核苷酸,例如,0至3、1至3、2至4、2至5、4至10、5至10个,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸

的突出端。在一个实施方案中,dsRNA的有义链具有3'端、5'端、两端或任一端的1至10个核苷酸,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸的突出端。在另一实施方案中,突出端中的一个或多个核苷酸用核苷硫代磷酸酯替换。

[0116] 在某些实施方案中,有义链或反义链或两者上的突出端可包括长于10个核苷酸的延伸的长度,例如1至30个核苷酸、2至30个核苷酸、10至30个核苷酸或10至15个核苷酸的长度。在某些实施方案中,延伸的突出端在双链体的有义链上。在某些实施方案中,延伸的突出端存在于双链体的有义链的3'端。在某些实施方案中,延伸的突出端存在于双链体的有义链的5'端。在某些实施方案中,延伸的突出端在双链体的反义链上。在某些实施方案中,延伸的突出端存在于双链体反义链的3'端。在某些实施方案中,延伸的突出端存在于双链体反义链的5'端。在某些实施方案中,突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸替代。在某些实施方案中,突出端包括自身互补部分,使得突出端能够形成在生理条件下稳定的发夹结构。

[0117] 如本文中所用,涉及dsRNA的术语“钝端”或“平端”意指在dsRNA的给定末端不存在未配对的核苷酸或核苷酸类似物,即,无核苷酸突出端。dsRNA的一端或两端可为钝端。在dsRNA的两端为钝端的情况中,dsRNA被称为钝端的。为清楚起见,“钝端的”dsRNA为两端均为钝端的dsRNA,即,在分子的任一端无核苷酸突出端。最通常这种分子在其整个长度上为双链的。

[0118] 在一些实施方案中,dsRNA包含3'突出端。在一些实施方案中,dsRNA包含1个核苷酸的3'突出端。在一些实施方案中,dsRNA包含2个核苷酸的3'突出端。在一些实施方案中,dsRNA包含5'突出端。在一些实施方案中,dsRNA包含1个核苷酸的5'突出端。在一些实施方案中,dsRNA包含2个核苷酸的5'突出端。

[0119] 在一些实施方案中,dsRNA的一端具有突出端和另一端具有钝端。突出端可以为有义链3'突出端、有义链5'突出端、反义链3'突出端或反义链5'突出端。在一些实施方案中,突出端为1个核苷酸的突出端。在一些实施方案中,突出端为2个核苷酸的突出端。在一些实施方案中,dsRNA具有两个钝端。在一些实施方案中,dsRNA在两端具有突出端。在各端的突出端独立地为有义链3'突出端、有义链5'突出端、反义链3'突出或反义链5'突出端。在一些实施方案中,突出端为1个核苷酸的突出端。在一些实施方案中,突出端为2个核苷酸的突出端。一个或多个突出端核苷酸可是修饰的核苷酸、反向核苷酸、无碱基核苷酸或反向无碱基核苷酸。反向核苷酸可经由3'-3'磷酸二酯键连接。

[0120] 在一些实施方案中,有义链为23个核苷酸的长度,且反义链为21个核苷酸的长度。在一些实施方案中,有义链为23个核苷酸的长度,且反义链为21个核苷酸的长度,其中有义链的3'和5'末端核苷酸位置为反向无碱基残基。有义链3'和5'末端反向无碱基残基可以为突出端。

[0121] 在一些实施方案中,有义链为21个核苷酸的长度,且反义链为23个核苷酸的长度,其中反义链含有2个核碱基的3'突出端。

[0122] 术语“反义链”或“引导链”是指RNAi剂(例如,dsRNA)的链,其包含与靶序列(例如SNCA mRNA)基本上互补的区域。

[0123] 如本文所使用的,术语“互补区”是指反义链上与如本文所定义的序列(例如靶序列,例如SNCA核苷酸序列)基本上互补的区域。在互补区与靶序列不完全互补的情况下,错

配可以处于分子的内部或末端区域中。通常,最耐受的错配在末端区域中,例如在RNAi剂的5'-或3'-末端的5个、4个、3个或2个核苷酸内。

[0124] 在一些实施方案中,本公开的双链RNA剂包括反义链中的核苷酸错配。

[0125] 在一些实施方案中,本公开的双链RNA剂的反义链包含与靶mRNA的不超过4个错配,例如,反义链包含与靶mRNA的4个、3个、2个、1个或0个错配。在一些实施方案中,本公开的双链RNA剂的反义链包含与有义链的不超过4个错配,例如,反义链包含与有义链的4个、3个、2个、1个或0个错配。在一些实施方案中,本公开的双链RNA剂包含有义链中的核苷酸错配。在一些实施方案中,本发明的双链RNA剂的有义链包含与反义链的不超过4个错配,例如,有义链包含与反义链的4个、3个、2个、1个或0个错配。在一些实施方案中,核苷酸错配在例如iRNA的3'端的5个、4个、3个核苷酸内。在另一个实施方案中,核苷酸错配在例如iRNA剂的3'-末端核苷酸中。在一些实施方案中,错配不在种子区中。

[0126] 因此,如本文所描述的RNAi剂可以含有与靶序列的一个或多个错配。在一个实施方案中,如本文所描述的RNAi剂含有不超过3个错配(即,3个、2个、1个或0个错配)。在一个实施方案中,如本文所描述的RNAi剂含有不超过2个错配。在一个实施方案中,如本文所描述的RNAi剂含有不超过1个错配。在一个实施方案中,如本文所描述的RNAi剂含有0个错配。在某些实施方案中,如果RNAi剂的反义链含有与靶序列的错配,则错配可以任选地限制在互补区的5'-或3'-端的最后5个核苷酸内。例如,在此类实施方案中,对于23个核苷酸的RNAi剂,与SNCA基因的区域互补的链通常在中心13个核苷酸内不含任何错配。本文所描述的方法或本领域已知的方法可以用于确定含有与靶序列的错配的RNAi剂是否有效抑制SNCA基因的表达。考虑具有错配的RNAi剂在抑制SNCA基因表达方面的功效是重要的,特别是如果已知SNCA基因中的特定互补区在群体内具有多态性序列变异。

[0127] 如本文所使用的,术语“有义链”或“随从链”是指包含与如本文中该术语所定义的反义链的区域基本上互补的区域的RNAi剂的链。

[0128] 如本文所使用的,“基本上所有核苷酸是修饰的”在很大程度上但不是完全为修饰的,并且可以包括不超过5个、4个、3个、2个或1个未修饰的核苷酸。

[0129] 如本文所使用的,术语“切割区”是指紧邻切割位点的区域。切割位点是靶标上切割发生的位点。在一些实施方案中,切割区在切割位点的任一端上并紧邻切割位点包括三个碱基。在一些实施方案中,切割区在切割位点的任一端上并紧邻切割位点包括两个碱基。在一些实施方案中,切割位点特别地出现在反义链的核苷酸10和11结合的位点处,并且切割区包含核苷酸11、12和13。

[0130] 如本文所使用的,并且除非另外指明,术语“互补”当用于相对于第二核苷酸序列描述第一核苷酸序列时,是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在特定条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力,如技术人员理解的。例如,此类条件可以是严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl,40mM PIPES,pH 6.4,1mM EDTA,50°C或70°C,12小时至16小时,然后洗涤(参见例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。可以应用其它条件,如生物体内部可能遇到的生理学相关的条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用确定最适合于两个序列的互补性测试的条件集合。

[0131] 如本文所描述的RNAi剂内(例如,dsRNA内)的互补序列包括包含第一核苷酸序列

的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的全长上的碱基配对。此类序列在本文中可以被彼此“完全互补”。然而,当第一序列在本文中被称为相对于第二序列“基本上互补”时,这两个序列可以是完全互补的,或对于至多30个碱基对的双链体,其可以形成一个或多个,但通常不超过5个、4个、3个或2个杂交时错配的碱基对,同时保留在与其最终应用最相关的条件下杂交的能力,例如通过RISC途径抑制基因表达。然而,在两个寡核苷酸被设计为在杂交时形成一个或多个单链突出端的情况下,此类突出端不应视为对于互补性的确定的错配。例如,包含长度为21个核苷酸的一个寡核苷酸和长度为23个核苷酸的另一个寡核苷酸的dsRNA,其中较长的寡核苷酸包含与较短的寡核苷酸完全互补的21个核苷酸的序列,仍可以被用于本文所描述的目的的“完全互补”。

[0132] 如本文所使用的,“互补”序列还可以包含非沃森-克里克碱基对或由非天然的和修饰的核苷酸形成的碱基对,或者完全由其形成,只要满足关于其杂交能力的以上要求即可。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摆动碱基配对或Hoogsteen碱基配对。

[0133] 本文中的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可以相对于dsRNA的有义链和反义链之间的碱基匹配,或RNAi剂的反义链和靶序列之间的碱基匹配来使用,如根据其使用的上下文所理解的。

[0134] 如本文所使用的,与信使RNA (mRNA) 的“至少部分基本上互补”的多核苷酸是指与所关注的mRNA (例如,编码SNCA的mRNA) 的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果序列与编码SNCA的mRNA的不间断部分基本上互补,则多核苷酸与SNCA mRNA的至少一部分互补。

[0135] 因此,在一些实施方案中,本文公开的反义链多核苷酸与靶SNCA序列完全互补。

[0136] 在某些实施方案中,本文中公开的反义链多核苷酸与靶SNCA序列基本上互补且包含在整个长度上与SEQ ID NO:1、3、5、7或228 (对于SNCA) 或者SEQ ID NO:1、3、5、7或228的片段的核苷酸序列的等同区域至少约80%互补的连续核苷酸序列,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0137] 在其他实施方案中,本文所公开的反义多核苷酸与靶SNCA序列基本上互补且包含在其整个长度上与表2或3中任一有义链核苷酸序列或表2或3中任一有义链核苷酸序列的片段至少约80%互补的连续核苷酸序列,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0138] 在一个实施方案中,本公开的RNAi剂包括与反义多核苷酸基本上互补的有义链,该反义多核苷酸又与靶SNCA序列相同,并且其中有义链多核苷酸包含在其整个长度上与SEQ ID NO:2、4、6、8或229的核苷酸序列或者SEQ ID NO:2、4、6、8或229任一片段的核苷酸序列的等同区域至少约80%互补的连续核苷酸序列,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0139] 在一些实施方案中,本公开的iRNA包括与反义多核苷酸基本上互补的有义链,该反义多核苷酸又与靶SNCA序列互补,并且其中有义链多核苷酸包含在其整个长度上与表2或3中的任一反义链核苷酸序列或者表2或3中的任一反义链核苷酸序列的片段至少约80%互补的连续核苷酸序列,如约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约

96%、约97%、约98%、约99%或100%互补。

[0140] 在一些实施方案中,双链iRNA剂的双链区长度为等于或至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个核苷酸对。

[0141] 在一些实施方案中,双链iRNA剂的反义链的长度为等于或至少14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0142] 在一些实施方案中,双链iRNA剂的有义链的长度为等于或至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0143] 在一个实施方案中,双链iRNA剂的有义和反义链长度各自为15至30个核苷酸。

[0144] 在一个实施方案中,双链iRNA剂的有义和反义链各自为19至25个核苷酸的长度。

[0145] 在一个实施方案中,双链iRNA剂的有义和反义链各自为21至23个核苷酸的长度。

[0146] 在一个实施方案中,双链iRNA剂的有义和反义链分别为21至23个核苷酸的长度。

[0147] 在一个实施方案中,双链iRNA剂的有义和反义链分别为23至21个核苷酸的长度。

[0148] 在一个实施方案中,iRNA剂的有义链为21个核苷酸的长度,且反义链为23个核苷酸的长度,其中该链形成21个连续碱基对的双链区,其具有在3'端的2个核苷酸长的单链突出端。

[0149] 在一个实施方案中,iRNA剂的有义链为23个核苷酸的长度,且反义链为21个核苷酸的长度,其中该链形成21个连续碱基对的双链区,其具有在3'和5'端的1个核苷酸长的单链突出端。

[0150] 在一些实施方案中,各链的大多数核苷酸为核糖核苷酸,但如本文中所详述的,各链或两条链也可包括一个或多个非核糖核苷酸,例如,脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。此外,“iRNA”可包括具有化学修饰的核糖核苷酸。此类修饰可包括本文所公开或本领域中已知的所有类型的修饰。对于本说明书和权利要求的目的,任何此类修饰,如在iRNA分子中使用的,被“iRNA”涵盖。

[0151] 在本公开的一个方面,用于本公开的方法和组合物中的药剂为单链反义核酸分子,其经由反义抑制机制来抑制靶mRNA。单链反义RNA分子与靶mRNA内的序列互补。单链反义寡核苷酸可通过与mRNA碱基配对并物理阻碍翻译机制而以化学计量方式抑制翻译,参见Dias,N.et al.,(2002)Mol Cancer Ther 1:347-355。单链反义RNA分子可为约15至约30个核苷酸的长度,且具有与靶序列互补的序列。例如,单链反义RNA分子可包含作为来自本文所述任一反义序列的至少约14、15、16、17、18、19、20个或更多个连续核苷酸的序列。

[0152] 在一个实施方案中,对SNCA基因表达的至少部分抑制通过可以从其中SNCA被转录且被处理以使得SNCA基因的表达被抑制的第一细胞或细胞组分离或检测的SNCA mRNA量的减少来评估,如与基本上与该第一细胞或细胞组相同但未如此处理的第二细胞或细胞组(对照细胞)相比的。抑制的程度可以如下式表示:

$$[0153] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{经处理的细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \bullet 100\%$$

[0154] 如本文所使用的,短语“使细胞与RNAi剂(如dsRNA)接触”包括通过任何可能的方式接触细胞。使细胞与RNAi剂接触包括使细胞在体外与RNAi剂接触或使细胞在体内与RNAi剂接触。接触可以直接或间接地进行。因此,例如,可以通过执行所述方法的个体使RNAi剂与细胞物理接触,或可替代地,可以使RNAi剂处于允许或使其随后与细胞接触的情况中。

[0155] 体外接触细胞例如可通过使细胞与RNAi剂一起温育进行。体内接触细胞例如可通过将RNAi剂注射至细胞所处的组织内或附近,或通过任选地经由鞘内、玻璃体内或其他注射将RNAi剂注射至另一区域(例如中枢神经系统(CNS)),或注射至血流或皮下空间以使得该药剂后续到达其中待接触的细胞所处的组织来进行。例如,RNAi剂可含有或偶联至配体,例如下文所述且进一步详述于例如通过引用并入本文的PCT/US2019/031170中的一个或多个亲脂性部分,该部分将RNAi剂引导至目标位点例如CNS或者以其他方式在目标位点处稳定。在一些实施方案中,RNAi剂可含有或偶联至一个或多个亲脂性部分,任选地在GalNAc衍生物不存在的情况下。体外和体内接触方法的组合也是可能的。例如,细胞可在体外与RNAi剂接触,并随后移植到受试者体内。

[0156] 在一个实施方案中,细胞与RNAi剂接触包括通过促进或实现至细胞中的摄取或吸收而将“RNAi剂引入或递送至细胞中”。RNAi剂的吸收或摄取可通过无辅助的扩散或主动细胞过程进行,或通过辅助剂或装置进行。将RNAi剂引入细胞中可以是体外和/或体内的。例如,对于体内引入,可将RNAi剂注射至组织部位中或全身性施用。体外引入细胞中包括本领域已知的方法,如电穿孔和脂质转染。进一步的途径描述于下文中和/或是本领域中已知的。

[0157] 术语“亲脂性”或“亲脂性部分”广泛地指对脂质具有亲和力的任何化合物或化学部分。用于表征亲脂性部分的亲脂性的一种方式是通过辛醇-水分配系数 $\log K_{ow}$,其中 K_{ow} 是处于平衡状态的两相系统的辛醇相中化学品的浓度与其在水相中的浓度的比率。辛醇-水分配系数是实验室测量的物质特性。然而,其也可以通过使用归因于化学品的结构成分的系数来预测,所述系数是使用第一性原则或经验方法计算的(参见例如,Tetko等人,J.Chem.Inf.Comput.Sci.41:1407-21(2001),其通过引用整体并入本文)。其提供了物质偏好非水性或油性环境而不是水的倾向的热力学量度(即其亲水/亲油平衡)。原则上,当化学物质的 $\log K_{ow}$ 超过0时,其为亲脂性的。通常,亲脂性部分具有超过1、超过1.5、超过2、超过3、超过4、超过5或超过10的 $\log K_{ow}$ 。例如,6-氨基己醇的 $\log K_{ow}$ 预测为大约0.7。使用相同的方法,N-(己-6-醇)氨基甲酸胆固醇酯的 $\log K_{ow}$ 预测为10.7。

[0158] 分子的亲脂性可根据其携带的官能团而改变。例如,将羟基或胺基添加到亲脂性部分的末端可以增加或降低亲脂性部分的分配系数(例如, $\log K_{ow}$)值。

[0159] 可选地,与一个或多个亲脂性部分缀合的双链RNAi剂的疏水性可通过其蛋白质结合特征来测量。例如,在某些实施方案中,双链RNAi剂的血浆蛋白结合测定中的未结合分数可以被确定为与双链RNAi剂的相对疏水性正相关,其可能与双链RNAi剂的沉默活性正相关。

[0160] 在一个实施方案中,所确定的血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率变动测定(EMSA)。此结合测定的示例性方案在例如PCT/US2019/031170中详细说明。通过结合测定中未结合的siRNA的分数测量的双链RNAi剂的疏水性超过0.15、超过0.2、超过0.25、超过0.3、超过0.35、超过0.4、超过0.45或超过0.5以用于siRNA的增强的体内递送。

[0161] 因此,将亲脂性部分缀合于双链RNAi剂的内部位置对于siRNA的增强的体内递送提供了最佳的疏水性。

[0162] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是指包含脂质层的囊泡,所述脂质层包封药物活性分子,如核酸分子,例如,RNAi剂或RNAi剂从其转录的质粒。LNP在例如美国专利第6,858,

225号、第6,815,432号、第8,158,601号和第8,058,069号中进行了描述,其全部内容在此通过引用并入本文。

[0163] 如本文所使用的,“受试者”是动物,如哺乳动物,包括灵长类动物(如人、非人类灵长动物,例如猴子和黑猩猩)或非灵长类动物(如大鼠或小鼠)。在优选的实施方案中,受试者是人,如正在治疗或评估受益于SNCA的表达减少的疾病、病症或病状的人;处于受益于SNCA的表达减少的疾病、病症或病状的风险中的人;患有受益于SNCA的表达减少的疾病、病症或病状的人;或正在治疗受益于SNCA的表达减少的疾病、病症或病状的人,如本文所描述的。

[0164] 如本文所用,术语“治疗”或“处理”指在患有神经退化性疾病的受试者中有益或希望的结果,包括但不限于与SNCA基因表达或SNCA蛋白质产生相关的一种或多种体征或症状的缓解或改善,例如,SNCA相关神经退化性疾病,例如突触核蛋白病,如PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytic-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒疾病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病;在增加的神经元功能障碍或死亡的区域中降低的SNCA表达或活性。“治疗”也可指相比于在不存在治疗的情况下预期的存活而延长存活期。

[0165] 在受试者中的SNCA水平或者疾病标志物或症状的上下文中,术语“降低”是指这种水平的统计学显著的降低。降低可以是例如至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在某些实施方案中,降低为至少20%。在某些实施方案中,降低为疾病标志物(例如,蛋白质或基因表达水平)的至少50%的降低。在受试者的SNCA水平的情况中的“降低”是任选地降低到公认为在没有此类病症的个体的正常范围内的水平。在某些实施方案中,“降低”是患有疾病的受试者的标志物或症状的水平与公认在个体的正常范围内的水平之间的差异的降低,例如,在患有帕金森氏症的个体与未患帕金森氏症或具有处于正常范围内的症状的个体中的运动速度降低的水平(运动迟缓)和调节姿势和平衡的能力。

[0166] 如本文所用,当用于提及受益于SNCA基因表达或SNCA蛋白产生的减少的疾病或病症时,例如,在由于例如遗传因素或年龄而易患SNCA相关病症的受试者中,“预防”或“防止”是指,其中该受试者尚不符合SNCA相关病症的诊断标准。如本文所用,预防可理解为向尚不符合SNCA相关病症的诊断标准的受试者施用药剂以延迟或降低受试者将发生SNCA相关病症的可能性。由于该药剂为药用试剂,应理解施用通常处于能够将尚不符合SNCA相关病症的诊断标准的受试者鉴定为易发生SNCA相关病症的健康护理专业人士的指导下。

[0167] 术语“突触核蛋白病”指以 α -突触核蛋白的原纤维聚集体为特征的一组神经退化性病症,该聚集体倾向于在选择性的神经元和神经胶质细胞群体的胞质中累积。因此,突触核蛋白病为一类SNCA相关神经退化性疾病和病症,其包括帕金森氏病(PD)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)和多系统萎缩(MSA),以及其它神经退化性疾病。临床上,突触核蛋白病以运动、认知、行为和自主功能的慢性和进行性下降为特征,这取决于脑中病变的分布。因为临床上的重叠,差异性诊断有时非常困难。帕金森氏症为PD的主要症状,但

其可能难以与LBD和MSA的帕金森氏症区分开来。自主神经功能障碍(其为在PAF中的孤立发现)可能存在于PD和LBD中,但在MSA中通常更为突出且出现得更早。LBD可为与PD相同的疾病,但具有广泛的皮质病理学状态,从而导致痴呆、认知波动和特征性的幻视。

[0168] 发生突触核蛋白病(例如PD、LBD等)的可能性降低,例如,当具有对于PD或LBD(或其他突触核蛋白病)的风险因子的个体未发生PD或LBD(或其他突触核蛋白病)或者发生PD或LBD(或其他突触核蛋白病)而相对于具有相同风险因子且未接受本文所述治疗的群体具有较低严重程度。不发生SNCA相关病症,例如PD或LBD(或其他突触核蛋白病),或者发生PD或LBD(或其他突触核蛋白病)的时间延迟数月或数年被视为有效预防。预防可能需要施用超过一个剂量的iRNA剂。提供合适的方法以鉴定受试者处于发生任何上述SNCA相关疾病的风险下,本文所提供的iRNA剂可作为用于或在预防SNCA相关疾病的方法中使用的药用试剂使用。对于各种SNCA相关疾病的风险因子在本文中讨论。

[0169] 如本文所用,术语“帕金森氏病”或“PD”指一种影响运动的进行性神经系统病症。PD的主要病理学特征为大脑基底节中的细胞死亡(到生命终结时,影响黑质致密部中高达70%的多巴胺分泌神经元)和路易氏体(SNCA编码的 α -突触核蛋白的累积)在许多剩余神经元中的存在。症状逐渐开始,有时伴有恰一只手的几乎不明显的震颤或者僵硬或运动迟缓。其他早期症状包括缺少面部表情,在行走时缺少手臂运动以及言语不清。帕金森氏病症状随时间恶化。PD的平均发作年龄为60岁,并且晚期发作与更高的症状严重程度相关。临床特征包括但不限于,更严重的震颤、运动缓慢(动作迟缓)、肌肉僵直、姿势和平衡受损、自主运动的损失、言语变化及最终地痴呆、幻觉和囿于轮椅。

[0170] 如本文所用,“路易氏体痴呆(LBD)”指由于 α -突触核蛋白在患病脑神经元中的累积(称为路易氏体和路易氏神经突)而导致思维、推理和独立功能的下降的一种类型的进行性痴呆。 α -突触核蛋白的聚集体导致受影响的神经元的次优功能性及最终死亡。症状包括视觉、听觉、嗅觉或触觉的幻觉;帕金森氏病的体征(帕金森氏病样征兆);身体机能(自主神经系统)调节不良如意识模糊、跌倒和肠问题;认知问题如精神错乱、注意力不集中、视觉-空间问题及记忆力损失;睡眠困难如快速眼动(REM)睡眠行为障碍(其中梦在睡眠时以身体表现出来);注意力波动,包括嗜睡发作、长时间凝视空处、白天长时间小睡或言语紊乱、抑郁和冷漠。

[0171] 如本文所用,术语“多系统萎缩(MSA)”指一种罕见的退化性神经病症,其影响受试者的无意识(自主神经)功能,包括血压、呼吸、膀胱功能和运动控制。先前称为Shy-Drager综合征、橄榄体桥脑小脑萎缩或纹状黑质退化,MSA共有许多帕金森氏病样症状,如动作迟缓、肌肉僵直和平衡不良。MSA治疗包括用药和改变生活习惯以帮助管理症状,但无法治愈。MSA造成调节内部身体机能、消化和运动控制的脑部分(小脑、基底节和脑干)的劣化和收缩(萎缩)。MSA受试者的受损脑组织显示含有异常量的 α -突触核蛋白的神经细胞(神经元)。MSA受试者通常在MSA症状首次出现后生存约7至10年。但是,患MSA的存活率变化很大。偶尔,MSA受试者可带病存活15年或更长。死亡通常是由于呼吸问题。MSA逐步进展并最终导致死亡。影响身体的很多部分。MSA症状典型地在成人期发生,往往在五十几岁或六十几岁。MSA以两种类型分类:帕金森氏病型和小脑型。类型取决于在诊断时观察到的症状。帕金森氏病型MSA为最常见的MSA类型,其体征和症状类似于帕金森氏病的那些,如肌肉僵直、手臂和腿弯曲困难、缓慢运动(动作迟缓)、震颤(与经典帕金森氏病相比,在MSA中罕见)以及姿

势和平衡的问题。小脑型MSA体征和症状包括肌肉协调的问题(共济失调),也可能包括运动和协调受损,如步态不稳和失去平衡、口齿不清、言语迟缓或音量低(口吃)、视觉障碍如视线模糊或复视以及眼睛聚焦困难、难以吞咽(吞咽困难)或咀嚼困难,以及一般体征和症状。此外,多系统萎缩的主要征兆为姿势性(直立性)低血压,一种低血压形式,其中当受试者从坐姿或卧姿站立时使得受试者感觉眩晕或头晕,或甚至昏迷。MSA受试者也可发生在躺下时危险地高的血压水平(仰卧位高血压)。与MSA相关的其他困难包括无意识(自主神经)身体功能,如尿道和肠道功能障碍、便秘、膀胱或肠道控制的损失(失禁)、出汗异常、减少的汗液、泪液和唾液产生、由于出汗减少导致的热不耐受、体温控制受损(往往造成手脚冰冷)、睡眠障碍、由于“表演”梦境导致的烦躁不安的睡眠、夜间呼吸异常、性功能障碍、无法实现或维持勃起(阳痿)、性欲丧失、心血管问题、由于血液淤积导致的手脚颜色变化、手脚冰冷、精神问题和难以控制情绪,如不适当的哭或笑。MSA的可能并发症包括睡眠期间呼吸异常;由于平衡不佳或昏迷导致的跌倒的损伤;进行性不动症,其可能导致继发性问题如皮肤破裂、在日常活动中失去自我照护能力、导致言语和呼吸困难的声带麻痹及增加的吞咽困难。

[0172] 在一个实施方案中,SNCA相关疾病或病症(突触核蛋白病)为帕金森氏病、路易氏体痴呆、多系统萎缩(MSA)和单纯性自主神经衰竭(PAF)之一。

[0173] 如本文所使用的,“治疗有效量”旨在包括当向患有SNCA相关疾病的受试者施用,足以影响疾病的治疗(例如,通过减少、改善或维持现有疾病或一种或多种疾病症状)的RNAi剂的量。“治疗有效量”可根据RNAi剂、药剂如何施用、疾病和其严重程度以及待治疗受试者的病史、年龄、体重、家族史、遗传组成、先前或伴随治疗的类型(如果有的话)以及其它个体特征而变化。

[0174] 如本文所使用的,“预防有效量”旨在包括当向患有SNCA相关病症的受试者施用,足以预防或改善疾病或疾病的一种或多种症状的RNAi剂的量。改善疾病包括减缓疾病的进程或降低后期发生疾病的严重程度。“预防有效量”可根据RNAi剂、药剂如何施用、疾病的风险程度以及病史、年龄、体重、家族史、遗传组成、先前或伴随治疗的类型(如果有的话)以及待治疗患者的其它个体特征而变化。

[0175] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括以适用于任何治疗的合理收益/风险比产生一些期望的局部或全身性效应的RNAi剂的量。本公开的方法中采用的RNAi剂可以以足够的量施用,以产生适用于此类治疗的合理益处/风险比。

[0176] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理医学判断的范围内适合用于与人类受试者和动物受试者的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物或剂型。

[0177] 如本文所使用的,短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如,润滑剂、滑石镁、钙或锌硬脂酸盐或者硬脂酸)、或溶剂包封材料,其涉及将主题化合物从身体的一个器官或部分携带或运送到身体的另一个器官或部分。在与制剂的其它成分相容并且对被治疗的受试者无害的意义上,每种载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素以及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如

花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，如丙二醇；(11) 多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH缓冲溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯或聚酸酐；(22) 增量剂，如多肽和氨基酸；(23) 血清组分，如血清白蛋白、HDL和LDL；以及(22) 药物制剂中所用的其它非毒性相容物质。

[0178] 如本文所使用的，术语“样品”包含从受试者分离的类似流体、细胞或组织的集合，以及受试者体内存在的流体、细胞或组织。生物流体的实例包括血液、血清和浆膜流体、血浆、脑脊液、眼流体、淋巴、尿液、唾液等。组织样品可以包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如，样品可以源自特定的器官、器官的部分或这些器官内的流体或细胞。在某些实施方案中，样品可以源自脑（例如，全脑或脑的某些区段，例如纹状体，或脑中的某些类型的细胞，例如神经元和神经胶质细胞（星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞））。在其他实施方案中，“源自受试者的样品”指的是从受试者抽取的血液或由其衍生的血浆或血清。在进一步的实施方案中，“源自受试者的样品”是指源自受试者的脑组织（或其子组分）或视网膜组织（或其子组分）。

[0179] 应理解，尽管表2中的序列描述为修饰或缀合的序列，但在某些实施方案中，本公开的RNAi剂（例如，本公开的dsRNA）的RNA可包含表2或3中示出的任一序列，其与表中所述不同地修饰或缀合。亲脂性配体可包括在本申请中提供的任何位置中，除非在指明具体位置/定位的情况下。

附图说明

[0180] 图1A和图1B显示所选择的SNCA-靶向RNAi剂对于人类BE(2)-C神经母细胞瘤细胞、COS-7非洲绿猴纤维母细胞样细胞中的双重荧光素酶报告系统中及过表达人类SNCA-AAV的小鼠中的SNCA水平的影响。图1A显示对于SNCA-靶向RNAi剂AD-464778、AD-464782、AD-464694、AD-464634、AD-464779、AD-464314、AD-464313、AD-464590、AD-464585、AD-464229、AD-464586和AD-464592（携带三触角GalNAc修饰的“亲本”siRNA，相对于本公开的本CNS定向siRNA）在BE(2)-C细胞中，且使用COS-7细胞中的双重荧光素酶报告系统分别针对各siRNA获得的SNCA mRNA敲低结果。图1B显示所指示的双链体在过表达人类SNCA-AAV的小鼠中的体内肝SNCA敲低结果。为了鉴定RNAi化合物在小鼠中的RNA体内功效，全长人类SNCA首先通过AAV转导。在AAV施用后7天，递送下列选择的双链体：靶向人类SNCA的3'UTR的双链体AD-464778、AD-464782、AD-464694、AD-464634、AD-464779；以及靶向SNCA的编码序列的双链体AD-464314、AD-464313、AD-464590、AD-464585、AD-464229、AD-464586和AD-464592。数据针对PBS处理的样品标准化。

[0181] 图2显示在对总计达360种双链体进行的组合热点和结构活性关系(SAR)评估中，四十种最强效的SNCA-靶向siRNA（肝脏靶向双链体）的SNCA敲低结果。四十种指示的siRNA显示在0.1nM双链体浓度下的最高SNCA敲低结果并且表现清晰的线性剂量-反应。

[0182] 图3显示示例性AD-1549290双链体的示意图解，其具备有义链序列5'-uscscga(Ghd)uuUfCfUfugagaucugaL96-3' (SEQ ID NO:245) 和反义链序列5'-VPusdCsagdAudCucaadGaAfacugggasgsc-3' (SEQ ID NO:246)。

[0183] 图4显示体内AAV滴定研究的结果,其中AAV用于将人类SNCA施用于小鼠肝脏,随后评估递送和表达的程度。在左侧,当使用AAV施用人类SNCA时,用于评价小鼠肝脏中的人类SNCA表达的PCR介导的人类SNCA检测的循环阈值显示为以剂量-反应性方式下降。在右侧,当以3mg/kg (mpk) 或10mpk水平向huSNCA-表达小鼠施用,先前表征的SNCA-靶向siRNA AD-464634 (靶向SNCA 3'UTR序列) 和AD-464314 (靶向SNCA编码序列) 表明在小鼠肝脏中对SNCA表达的强劲体内抑制。

[0184] 图5A和图5B显示在体内AAV研究中评价的全部17种SNCA-靶向siRNA在小鼠肝脏中的体内SNCA敲低结果,以及双链体序列修饰模式的示意图解。图5A显示在经由AAV施用人类SNCA的小鼠中观察到的体内人类SNCA敲低结果。17种指示的新评价的SNCA-靶向siRNA与先前鉴定的SNCA-靶向双链体AD-464634.2且与PBS对照比较。图5B显示强效的肝脏靶向双链体AD-1549333 (有义链:5'-asasgug (Chd) ucAfGfUfuccaAugugaL96-3' SEQ ID NO:247;反义链:5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcacuusgsu-3' SEQ ID NO:248)、AD-1746465 (有义链:5'-uscsuuugcuCfCfCfaguU (Uhd) cuugaL96-3' SEQ ID NO:249;反义链:5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAfgcaaagasusa-3' SEQ ID NO:250)、AD-1571188 (有义链:5'-gsusaca (Ahd) GfuGfCfUfcaguuccaaaL96-3' SEQ ID NO:251;反义链:5'-VPusUfsugdGa (Agn) cugagcAfcUfuguacsasg-3' SEQ ID NO:252)、AD-1549401 (有义链:5'-cscsauc (Ahd) gcAfGfUfgauugaaguaL96-3' SEQ ID NO:253;反义链:5'-VPusdAscudTcdAaucadCuGfcugauggsasa-3' SEQ ID NO:254)、AD-1549054 (有义链:5'-gsasgca (Ahd) guGfAfCfaaanguuggaL96-3' SEQ ID NO:255;反义链:5'-VPusdCscadAcdaauugdTcAfcuugcucsusu-3' SEQ ID NO:256)、AD-1746466 (有义链:5'-uscscag (Uhd) uUfCfUfugagaucugaL96-3' SEQ ID NO:257;反义链:5'-VPusdCsagdAudCucaadGaAfacuggg asgsc-3' SEQ ID NO:258) 及AD-1548886 (有义链:5'-uscsaug (Ahd) aaGfGfAfcuucaagaL96-3' SEQ ID NO:259;反义链:5'-VPusdCsuudTgdAaagudCcUfuucaugasasu-3' SEQ ID NO:260) 的序列和修饰模式的示意图解,该双链体经选择以潜在地作为用于非人类灵长动物 (NHP) 研究的亲本siRNA。

[0185] 图6A至图6C显示在如上鉴定的七种SNCA-靶向siRNA中鼠体内敲低、体外敲低和位置信息的比较,其获得三种先导候选亲本siRNA用于NHP研究,也显示了结构。图6A显示在如上鉴定的七种SNCA-靶向siRNA AD-1549333、AD-1746465、AD-1571188、AD-1549401、AD-1549054、AD-1746466和AD-1548886的鼠体内敲低和体外敲低的比较。图6B显示候选先导亲本siRNA AD-1549333、AD-1746465、AD-1571188、AD-1549401、AD-1549054、AD-1746466和AD-1548886各自的靶SNCA mRNA位置。图6C自上而下显示所选择的先导候选亲本双链体AD-1549333 (有义链:SEQ ID NO:247;反义链:SEQ ID NO:248)、AD-1746465 (有义链:SEQ ID NO:249;反义链:SEQ ID NO:250) 和AD-1549054 (有义链:SEQ ID NO:255;反义链:SEQ ID NO:256) 的序列和修饰模式。这些亲本双链体相应地适应以产生先导SNCA-靶向双链体AD-1747585、AD-1747583和AD-1747580,其具有如表2中所示的序列和修饰模式,用于NHP研究中的CNS施用。

[0186] 图7呈现的示意图显示三种选择用于NHP研究的双链体:AD-1747585 (具有有义链SEQ ID NO:35和反义链SEQ ID NO:78)、AD-1747583 (具有有义链SEQ ID NO:28和反义链SEQ ID NO:71) 和AD-1747580 (具有有义链SEQ ID NO:21和反义链SEQ ID NO:64)。

[0187] 图8A和图8B显示推进至非人灵长类 (NHP) 动物中的测试的三种候选先导双链体的初始选择和药物动力学分布。图8A显示选择为进行NHP动物研究的三种候选先导双链体的初始体内功效结果和ED₅₀值。图8B显示经由鞘内注射单一60mg剂量的siRNA而给药于非人灵长类 (NHP) 动物的三种候选先导SNCA-靶向双链体各自在注射后的最初24小时期间在所给药动物中显示的类似的药代动力学。

[0188] 图9A和图9B显示在经由鞘内注射施用的三种候选先导SNCA-靶向双链体的NHP动物研究获得的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 数据。图9A显示, 在注射后第29天 (“D29”), 三种测试的SNCA-靶向双链体各自表现前额叶皮质和中脑两者的NHP组织中SNCA mRNA的高效力降低 (左图, PD结果)。在整个测试的NHP前额叶皮质和中脑组织中观察到组织PK (所测试的双链体的组织浓度) 与组织SNCA mRNA PD之间的强相关性 (右图, PK/PD结果), 其中三种测试的双链体各自显示类似的效力 (基于mRNA敲低结果, 在第29天三种先导物之间没有观察到统计学显著的差异)。名义上, 在第29天于NHP中观察到下列IC₅₀排序: AD-1747583 (0.532μg/g) < AD-1747580 (1.050μg/g) < AD-1747585 (1.300μg/g)。图9B显示在注射后第29天 (“D29”), 接受鞘内剂量的SNCA-靶向双链体的NHP的脑和脊髓中α-突触核蛋白水平降低, 并且在三种测试的候选先导试剂之间观察到微小差异化。

[0189] 图10显示第29天NHP数据的总结。

[0190] 图11显示在鞘内施用SNCA-靶向双链体或对照分子后第84天 (“D84”), 所测试的全部3种候选先导双链体中, 在前额叶皮质和中脑组织两者中观察到显著水平的SNCA mRNA敲低 (左图)。于以上在施用后第29天观察到的结果一致, 第84天样品表现出组织PK与组织mRNA PD之间的良好相关性, 具有与针对所检查的三种候选先导双链体中的每一种观察到的类似效力 (右图)。值得注意的是, 施用AD-1747585的群组仅有一只动物符合给药标准, 这导致施用AD-1747585的群组的剩余者重新给药。

[0191] 图12A至图12E显示在施用后第84天, 不同脑区域中的SNCA mRNA水平和α-突触核蛋白水平两者降低, 其中在所测试的三种候选先导物 (AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585双链体) 之间几乎没有观察到差异, 并且也显示SNCA mRNA/α-突触核蛋白相关性及重新给药数据。图12A显示, 在经由鞘内路径施用60mg的双链体剂后第84天, NHP中的SNCA mRNA降低。图12B显示, 在第84天, 脑和脊髓 (全部所检查的区域) 中的α-突触核蛋白水平也降低, 再次在三种候选先导双链体之间几乎没有观察到差异。图12C显示, 在施用后第84天, 所检查的不同大脑区域中α-突触核蛋白水平表现与SNCA mRNA水平的高相关性。图12D显示, 在初始施用时确认为误给药的某些NHP中, 重新给药和在超过第84天检查脑和脊髓组织表明, 各种脑区域中SNCA NHP组织蛋白药效学 (PD) 表现出强劲的敲低, 特别地在AD-1747580重新给药的NHP中。图12E显示, 在延长的时程中 (包括对某些初始误给药的NHP重新给药和在超过第84天的时间点的监测) 脑脊液 (CSF) 中的α-突触核蛋白水平。在此类重新给药的NHP动物中, 对于用双链体AD-1747585 (重新) 给药的动物, CSFα-突触核蛋白水平表现出至多75%的降低, 而对于用双链体AD-1747580和AD-1747583 (重新) 给药的动物, CSFα-突触核蛋白水平表现出至多50%的降低。

[0192] 图13显示, 在双链体施用后第84天, 对于用双链体AD-1747580和AD-1747583给药的动物, 观察到的NHP CSF中α-突触核蛋白水平为至多90%降低 (PD效应)。同时, 双链体AD-1747585显示约75% CSFα-突触核蛋白敲低, 而值得注意的是, 双链体AD-1747585也表现出

可变的CSF α -突触核蛋白敲低,可能是由于血液污染,因为SNCA在血细胞中高表达。

[0193] 图14A至图14D显示,在第29天(作为“早期”时间点),在相同组织中观察到的敲低的组织SNCA mRNA水平与敲低的 α -突触核蛋白水平之间的分异,并且这种差异在第84天时间点消退,表明此类效应可归因于 α -突触核蛋白在所检查的组织中的长半衰期。图14A显示,在施用后第29天,对于所测试的全部三种先导双链体,治疗的NHP的皮质和中脑中 α -突触核蛋白(双链体的PD效应)仅表现出适度的(<60%)敲低(左图)。皮质和中脑中 α -突触核蛋白的这种适度降低指示 α -突触核蛋白在此类组织中延长的半衰期。对于全部三种测试的双链体,观察到组织蛋白PK/PD是散布的(中图);但是,组织 α -突触核蛋白水平与组织SNCA mRNA水平高度相关(右图)。图14B显示,在施用后第29天,CSF中的 α -突触核蛋白敲低与皮质(左图)和纹状体(中图) α -突触核蛋白敲低相关。相反,在施用后第29天,中脑组织 α -突触核蛋白敲低不与CSF α -突触核蛋白敲低良好相关(右图)。图14C显示,尽管在施用(此处,SNCA-靶向双链体AD-1747580)后第29天,前额叶皮质和中脑组织中的SNCA mRNA水平降低,但 α -突触核蛋白水平仅适度降低,其指示 α -突触核蛋白的长蛋白质半衰期很可能解释该分异。图14D显示,在施用后第84天,对于全部3种先导双链体,治疗的NHP动物的皮质和中脑组织中的 α -突触核蛋白水平显示强劲的敲低(PD效应,左图)。在第84天皮质和中脑NHP组织中观察到的强劲 α -突触核蛋白敲低证实了 α -突触核蛋白的长蛋白质半衰期。对于全部三种双链体,组织蛋白PK/PD曲线显示类似的分布(中图;AD-1747585群组标注为仅有一只动物符合给药标准,而该群组的剩余者重新给药)。 α -突触核蛋白水平系与皮质和中脑组织两者中的mRNA水平高度相关(右图)。

[0194] 图15显示,还观察到在双链体施用后第84天,NHP动物的CSF中 α -突触核蛋白敲低与前额叶皮质和中脑 α -突触核蛋白敲低相关。

[0195] 图16显示,在双链体施用后第84天,NHP动物的各种测试脑区域的siRNA组织暴露。除少数例外,siRNA剂的组织渗透良好,即使最大暴露于siRNA双链体的组织(例如,前额叶皮质)也不一定显示最大观察水平的SNCA mRNA和/或 α -突触核蛋白敲低。

[0196] 图17显示,在施用后第2天或第84天,与仅用媒介剂平行给药的对照NHP动物相比,向NHP动物施用的三种候选先导双链体无一表现出对体重的任何显著效应。

[0197] 图18显示当检测给药候选先导双链体的NHP动物群组的CSF中的神经丝轻链(NfL)时获得的结果,如与仅施用人造CSF(aCSF)的对照NHP动物相比的。尽管对于全部三种双链体在给药后观察到NfL的瞬时急升,此类NfL急升大多未持续超过施用后第29天,这指示三种SNCA-靶向候选先导双链体不表现为具有表明双链体毒性的NfL分布。

[0198] 图19A至图19D显示所检查的三种候选先导双链体中每一种的RNA-Seq数据。图19A显示AD-1747580双链体(有义链:SEQ ID NO:21;反义链SEQ ID NO:64)的示意图解,其中RNA-Seq数据指示与适当的对照相比,在施用AD-1747580双链体并经历RNA-Seq分析的细胞中实现SNCA的93%敲低,同时在AD-1747580双链体的存在下基因组上没有其他基因座显示超过50%的敲低(或强劲和显著的升高)。图19B显示候选先导双链体AD-1747580的效力匹配的RNA-Seq谱,其中还显示亲本双链体AD-1549054的RNA-Seq结果。在左侧,显示了GalNAc修饰的AD-1549054亲本双链体(有义链:5'-gsasgca(Ahd)guGfAfCfaaauguuggaL96-3' SEQ ID NO:255;反义链:5'-VPusdCscadAcdAuugdTcAfcuugcucsusu-3' SEQ ID NO:256)的示意图解,下方为该双链体的RNA-Seq数据,其表明在处理的细胞(施用10nM剂量的AD-1549054

亲本双链体)中的大约74% SNCA敲低。中间和右侧为AD-1747580双链体(有义链:SEQ ID NO:21;反义链:SEQ ID NO:64)的示意图解,下方为该双链体在相应的1nM(中间,显示大约78% SNCA敲低)和10nM(右侧,显示大约93% SNCA敲低)剂量下的RNA-Seq结果。图19C显示候选先导双链体AD-1747583的效力匹配的RNA-Seq谱,其中还显示亲本双链体AD-1549283的RNA-Seq结果。在左侧,显示了GalNAc修饰的AD-1549283亲本双链体(有义链:5'-uscsuuu (Ghd) cuCfCfCfaguucugaL96-3' SEQ ID NO:268;反义链:5'-VPusdCsaadGadAacugdGgAf gcaagasusa-3' SEQ ID NO:269)的示意图解,下方为该双链体的RNA-Seq数据,其表明在处理的细胞(施用10nM剂量的AD-1549283亲本双链体)中的大约79% SNCA敲低。中间和右侧为AD-1747583双链体(有义链:SEQ ID NO:28;反义链:SEQ ID NO:71)的示意图解,下方为该双链体在相应的1nM(中间,显示大约67% SNCA敲低)和10nM(右侧,显示大约92% SNCA敲低)剂量下的RNA-Seq结果。值得注意的是,三个脱靶基因座鉴定为受到给药AD-1747583双链体的显著影响(>50%降低):PYGB、NREP和LCLAT1。图19D显示候选先导双链体AD-1747585的效力匹配的RNA-Seq谱,其中还显示亲本双链体AD-1549333的RNA-Seq结果。在左侧,显示了GalNAc修饰的AD-1549333亲本双链体(有义链:5'-asasgug (Chd) ucAfGfUfuccaaugugaL96-3' SEQ ID NO:247;反义链:5'-VPusdCsacdAudTggaadCuGfagcac uusgsu-3' SEQ ID NO:248)的示意图解,下方为该双链体的RNA-Seq数据,其表明在处理的细胞(施用10nM剂量的AD-1549333亲本双链体)中的大约81% SNCA敲低。中间和右侧为AD-1747586双链体(有义链:SEQ ID NO:35;反义链:SEQ ID NO:78)的示意图解,下方为该双链体在相应的0.1nM(左中,显示大约68% SNCA敲低)、1nM(右中图,显示大约93% SNCA敲低)和10nM(右侧,显示大约96% SNCA敲低)剂量下的RNA-Seq结果。值得注意的是,一个脱靶基因座鉴定为受到AD-1747585双链体给药的显著影响(>50%降低):HMGB2。

[0199] 图20显示的表格总结向NHP动物施用的全部三种候选先导SNCA-靶向双链体的敲低和RNA-Seq数据。

[0200] 在整个附图中,术语“2-C16”指2'-O-十六烷基修饰。本发明进一步通过下列详细说明进行阐明。

具体实施方式

[0201] 本公开提供RNAi组合物,其实现SNCA基因的RNA转录物的RNA诱导沉默化复合体(RISC)介导的切割。SNCA基因可处于细胞内,例如受试者如人类体内的细胞。本公开还提供使用本公开的RNAi组合物用于抑制SNCA基因的表达或用于治疗患有将受益于SNCA基因表达的抑制或降低的病症的受试者的方法,例如SNCA相关疾病,例如,突触核蛋白病,如PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

[0202] 本发明的RNAi剂包括具有约30个核苷酸或更短长度的区域的RNA链(反义链),如15至30、15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、

18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个核苷酸的长度,该区域与SNCA基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补。在某些实施方案中,本公开的RNAi剂包括具有约21至23个核苷酸长度的区域的RNA链(反义链),该区域与SNCA基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补。

[0203] 在某些实施方案中,本公开的RNAi剂包括可包括更长的长度的RNA链(反义链),例如,至多66个核苷酸,例如,36至66、26至36、25至36、31至60、22至43、27至53个核苷酸的长度,其具有与SNCA基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补的至少19个连续核苷酸的区域。这些具有较长长度的反义链的RNAi剂任选地包括长度为20至60个核苷酸的第二RNA链(有义链),其中有义链与该反义链形成18至30个连续核苷酸的双链体。

[0204] 这些RNAi剂的使用使得哺乳动物的SNCA基因的mRNA能够靶向降解。因此,包括这些RNAi剂的方法和组合物可用于治疗将受益于SNCA蛋白的水平或活性降低的受试者,如患有SNCA相关神经退化性疾病的受试者,例如突触核蛋白病,如PD、多系统萎缩、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytic-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

[0205] α -突触核蛋白的神经元内累积描述为导致路易氏体(圆形嗜酸性球透明10-20 μ m大包涵体)或路易氏神经突(延长的线状营养不良轴突和树突)的形成。不希望受理论约束,在PD脑中,路易氏体和路易氏神经突的沉积是广泛的,尽管对于此类沉积最易受影响的区域据信为黑质。病理学是广泛的,因为PD具有运动(基于黑质)和非运动(脑的其他部位,例如,皮质等)症状。黑质细胞对于执行运动和姿势功能至关重要,解释了PD运动症状的特性,而对其他细胞类型的影响解释了PD非运动症状如痴呆、情绪变化和抑郁。在LBD脑中,路易氏体和路易氏神经突的广泛沉积见于中脑和皮质区域两者中。

[0206] α -突触核蛋白为主要见于神经元内的蛋白质。在神经元内, α -突触核蛋白主要定位于突触前,并且因此推测其在突触活动的调节中发挥作用。鉴定了 α -突触核蛋白的三种主要亚型,其中最长且最常见的形式包含140个氨基酸。

[0207] 氧化应激涉及大量以误折叠的 α -突触核蛋白的病理性累积为特征的神经退化性病症。各种反应性氧物质可诱导脂质如细胞膜或脂蛋白的过氧化,并且也导致由多不饱和脂肪酸生成高反应性醛(Yoritaka et al., 1996)。

[0208] 指示阿尔兹海默病(AD)的脑病理学,即,淀粉样蛋白斑块和神经纤维缠结,见于大约50%的LBD病例中。尚不清楚平行病理学的存在是否意味着两种不同疾病,或仅代表各相应病症的变型。有时,具有共病理学的案例描述为具有AD的路易氏体变型(Hansen et al., 1990)。

[0209] 研究也涉及SNCA在AD和唐氏综合征中的作用,因为 α -突触核蛋白表明在这些病症中累积于边缘区域中(Crews et al., 2009)。

[0210] 罕见的显性遗传形式的PD和LBD可由SNCA基因的点突变或重复导致。致病性突变

A30P和A53T (Kruger et al.,1998) (Polymeropoulos et al.,1998) 以及基因的重复 (Chartier-Harlin et al.,2004) 描述为导致家族性PD,而一种其他 α -突触核蛋白突变E46K (Zarranz et al.,2004) 以及 α -突触核蛋白基因的三倍重复 (Singleton et al.,2003) 报告为导致PD或LBD。

[0211] α -突触核蛋白突变的病理性后果仅部分地了解。但是,体外数据显示,A30P和A53T突变增加聚集的速率 (Conway et al.,2000)。大量的差异组成的 α -突触核蛋白物质(单体、二聚体、寡聚体,包括原纤维)牵涉到聚集过程中,其全部可具有不同的毒性特性。哪些分子物质在脑中发挥毒性效应尚不明确。但是,研究指示, α -突触核蛋白的寡聚体形式特别具有神经毒性。对于寡聚体的作用的额外证据通过引起遗传性帕金森氏症的某些 α -突触核蛋白突变(A30P和A53T)导致寡聚化速率增加的观察结果给出。

[0212] α -突触核蛋白聚集级联如何开始尚不完全知道。可能的是,单体 α -突触核蛋白的改变的构象启动二聚体和三聚体的形成,其继续形成更高可溶性的寡聚体,包括原纤维,然后这些中等尺寸的物质沉积为路易氏体中的不溶性原纤维。还可想象, α -突触核蛋白寡聚体一旦形成,其可结合 α -突触核蛋白的新单体和/或较小的多聚体,并因此加速原纤维形成过程。此类接种效应也可在细胞外空间中可能地发生,因为一些证据表明, α -突触核蛋白病理可能在患病脑中在神经元之间传播。

[0213] 以下详细说明公开如何制备和使用含有RNAi剂以抑制SNCA基因的表达的组合物,以及用于治疗患有将受益于基因表达的抑制或减少的疾病和病症的受试者的组合物和方法。

[0214] I. 本公开的RNAi剂

[0215] 本文描述了抑制SNCA基因的表达的RNAi剂。在一个实施方案中, RNAi剂包括双链核糖核酸(dsRNA)分子,其用于抑制细胞(如受试者体内的细胞)中SNCA基因的表达,该受试者例如哺乳动物,如患有SNCA相关神经退化性疾病的人类,例如突触核蛋白病,如PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytic-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。dsRNA包括具有与在SNCA基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补的互补区的反义链。在实施方案中,互补区是约15至30个核苷酸或更短的长度。当与表达SNCA基因的细胞接触时, RNAi剂将SNCA基因(例如,人类基因、灵长动物基因、非灵长动物基因)的表达抑制至少50%,如通过例如PCR或基于分支DNA(bDNA)的方法,或通过基于蛋白质的方法,如通过使用例如蛋白质印迹术的免疫荧光分析或流式细胞分析技术测定的。

[0216] dsRNA包含两条互补并且在使用dsRNA的条件下杂交以形成双链体结构的RNA链。dsRNA的一条链(反义链)包含与靶序列基本上互补且通常完全互补的互补区。靶序列可源自SNCA基因表达期间形成的mRNA的序列。另一条链(有义链)包含与反义链互补的区域,使得两条链在适当条件下组合时杂交并形成双链体结构。如本文中其它地方所描述且如本领域已知的,dsRNA的互补序列也可作为单一核酸分子的自身互补区被包含,与位于独立寡核苷酸上相反。

[0217] 通常,双链体结构为15至30个碱基对的长度,例如,15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个碱基对的长度。在某些优选实施方案中,双链体结构为18至25个碱基对的长度,例如,18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至25、21至24、21至23、21至22、22至25、22至24、22至23、23至25、23至24或24至25个碱基对的长度,例如,19至21个碱基对的长度。上文述及的范围和长度中间的范围和长度也视为本公开的部分。

[0218] 类似地,与靶序列的互补区为15至30个核苷酸的长度,例如,15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个核苷酸的长度,例如,19至23个核苷酸的长度或21至23个核苷酸的长度。上文所述的范围和长度中间的范围和长度也视为本公开的部分。

[0219] 在一些实施方案中,dsRNA为15至23个核苷酸的长度或24至30个核苷酸的长度(任选地,25至30个核苷酸的长度)。通常,dsRNA可以足够长以用作Dicer酶的底物。例如,本领域中公知,长度超过约21至23个核苷酸的dsRNA可用作Dicer酶的底物。如本领域普通技术人员也公认的,被靶向切割的RNA的区域最通常是较大RNA分子(通常mRNA分子)的部分。在相关的情况下,mRNA靶的“部分”是mRNA靶的连续序列,其长度足以使其成为RNAi指导切割(即通过RISC途径的切割)的底物。

[0220] 本领域技术人员也公认,双链体区域为dsRNA的主要功能性部分,例如,约15至36个碱基对,例如,15至36、15至35、15至34、15至33、15至32、15至31、15至30、15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24、20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个碱基对,例如,19至21个碱基对的双链体区域。因此,在一个实施方案中,在其被加工成靶向所需RNA进行切割的例如15-30个碱基对的功能性双链体的程度上,具有大于30个碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此,普通技术人员将认识到,在一个实施方案中,miRNA是dsRNA。在另一个实施方案中,dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施方案中,可用于靶向SNCA表达的RNAi剂不是通过切割较大的dsRNA在靶细胞中产生的。

[0221] 如本文所描述的dsRNA可进一步包含一个或多个单链核苷酸突出端,例如,1个、2个、3个或4个核苷酸。核苷酸突出端可包含以下或由以下组成:核苷酸/核苷类似物,包括脱

氧核苷酸/核苷。突出端可在有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可存在于dsRNA的反义链或有义链的5'端、3'端或两端上。在某些实施方案中,较长的、延伸的突出是可能的。

[0222] 如下文进一步讨论的,dsRNA可通过本领域中已知的标准方法合成,例如,通过使用自动DNA合成仪,如可自例如Biosearch、Applied Biosystems, Inc. 商购的。

[0223] 本公开的iRNA化合物可以使用两步程序制备。首先,单独制备双链RNA分子的单个链。然后,对组分链进行退火。siRNA化合物的单个链可使用溶液相或固相有机合成或两者制备。有机合成提供的优点是可容易地制备包含非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸链。本公开的单链寡核苷酸可使用溶液相或固相有机合成或两者制备。

[0224] siRNA可通过多种方法例如以整体产生。示例性方法包括:有机合成和RNA切割,例如,体外切割。

[0225] siRNA可通过独立地合成单链RNA分子或双链RNA分子的各相应链,之后可将组分链退火。

[0226] 大的生物反应器,例如,来自Pharmacia Biotec AB (Uppsala Sweden) 的OligoPilot II,可用于为给定siRNA产生大量的特定RNA链。OligoPilot II反应器可使用仅1.5摩尔过量的亚磷酰胺核苷酸来有效地偶联核苷酸。为制备RNA链,使用核糖核苷酸亚酰胺化物。可使用单体加成的标准循环来合成用于siRNA的21至23个核苷酸。典型地,独立地产生两个互补链,然后退火,例如,在从固体载体释放和去保护之后。

[0227] 有机合成可用于产生离散的siRNA物质。该物质与SNCA基因的互补性可精确地指定。例如,该物质可与包括多态性(例如,单核苷酸多态性)的区域互补。此外,多态性的位置可精确地定义。在一些实施方案中,多态性位于内部区域中,例如,一个或两个末端的至少4、5、7或9个核苷酸。

[0228] 在一个实施方案中,生成的RNA小心地纯化以去除端部。iRNA体外切割为siRNA,例如,使用Dicer酶或相当的基于RNase III的活性。例如,dsiRNA可在来自果蝇的体外提取物中或使用纯化的组分(例如,纯化的RNase或RISC (RNA诱导沉默化复合物))进行孵育。参见,例如,Ketting et al. Genes Dev 2001 Oct 15;15(20):2654-9和Hammond Science 2001 Aug 10;293(5532):1146-50。

[0229] dsiRNA切割通常产生多种siRNA物质,各自为源dsiRNA分子的特定21或23nt片段。例如,可存在包括与源dsiRNA分子的重叠区域和相邻区域互补的序列的siRNA。

[0230] 无论合成方法如何,siRNA制备物可在适于配制的溶液(例如,水溶液或有机溶液)中制备。例如,siRNA制备物可沉淀和再溶解于纯双蒸水中,并冻干。干燥的siRNA然后可重悬于适于预期配制过程的溶液中。

[0231] 在一个方面,本公开的dsRNA包含至少两个核苷酸序列,有义序列和反义序列。SNCA的有义链序列可以选自表2或3中提供的序列组,并且有义链的反义链的对应核苷酸序列可以选自表2或3的序列组。在这一方面,两个序列中的一个与两个序列中的另一个互补,其中所述序列之一与在SNCA基因表达中产生的mRNA序列基本上互补。因此,在这一方面,dsRNA包含两个寡核苷酸,其中一个寡核苷酸在表2或3中被描述为有义链(随从链),并且第二寡核苷酸在表7或8中被描述为有义链的对应反义链(引导链)。

[0232] 在一个实施方案中,dsRNA的基本上互补的序列包含在独立寡核苷酸上。在另一实

施方案中,dsRNA的基本上互补的序列包含在单一寡核苷酸上。

[0233] 应理解,例如,尽管本文所提供的序列描述为修饰或缀合的序列,但本公开的RNAi剂(例如,本公开的dsRNA)的RNA可包含表2或3中所示的任一序列,其与表中所描述不同地修饰或缀合。一个或多个亲脂性配体可包括在本申请提供的RNAi剂的任何位置。

[0234] 本领域技术人员充分了解,具有约20-23个碱基对(例如,21个碱基对)的双链体结构的dsRNA已被誉为在诱导RNA干扰方面特别有效(Elbashir等人,(2001)EMBO J.,20:6877-6888)。然而,其它人已经发现,较短或较长的RNA双链体结构也可以是有效的(Chu和Rana(2007)RNA 14:1714-1719;Kim等人,(2005)Nat Biotech 23:222-226)。在上述实施方案中,由于本文所提供的寡核苷酸序列的性质,本文所描述的dsRNA可包含至少一条长度为最少21个核苷酸的链。可以合理地预期,与上述dsRNA相比,在一端或两端仅减去几个核苷酸的较短的双链体可以类似地有效。因此,具有源自本文所提供的序列之一的至少15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个连续核苷酸的序列,并且其抑制SNCA基因的表达的能力与包含全序列的dsRNA相差不超过10%、15%、20%、25%或30%的抑制(使用本文实施例中提供的利用Be(2)-C细胞和10nM浓度的RNA剂的体外测定和PCR测定)的dsRNA被认为在本公开的范围內。

[0235] SNCA抑制的一种基准测定涉及使人类Be(2)-C细胞与本文所公开的dsRNA剂接触,其中如果与适宜的对照(例如,不与SNCA靶向的dsRNA接触的细胞)相比,观察到SNCA转录物或蛋白质的至少5%降低、至少10%降低、至少15%降低、至少20%降低、至少25%降低、至少30%降低、至少35%降低、至少40%降低、至少45%降低、至少50%降低、至少55%降低、至少60%降低、至少65%降低、至少70%降低、至少75%降低、至少80%降低、至少85%降低、至少90%降低、至少95%降低、至少97%降低、至少98%降低、至少99%降低或更多,则鉴定为足够或有效的SNCA抑制。任选地,本公开的dsRNA剂以10nM浓度施用,且PCR测定如本文实施例(例如,下文实施例2)中所提供的进行。

[0236] 另外,本文所描述的RNA鉴定了SNCA转录物中对RISC介导的切割敏感的位点。如此,本公开进一步以靶向此位点内的RNAi剂为特征。如本文所使用的,如果RNAi剂促进转录物在该特定位置内任何位置的切割,则RNAi剂被称为靶向RNA转录物的特定位置内。此类RNAi剂通常包含来自本文所提供的序列之一的至少约15个连续核苷酸,任选地至少19个核苷酸,其与取自SNCA基因中的所选序列邻接的区域的另外的核苷酸序列偶联。

[0237] 本文所述的RNAi剂可含有一个或多个与靶序列的错配。在一个实施方案中,本文所述的RNAi剂含有不超过3个错配(即,3、2、1或0个错配)。在一个实施方案中,本文所述的RNAi剂含有不超过2个错配。在一个实施方案中,本文所述的RNAi剂含有不超过1个错配。在一个实施方案中,本文所述的RNAi剂含有0个错配。在某些实施方案中,如果RNAi剂的反义链含有与靶序列的错配,则错配可任选地被限制在互补区的5'端或3'端的最后5个核苷酸内。例如,在此类实施方案中,对于23个核苷酸的RNAi剂,与SNCA基因的区域互补的链通常不含位于中心13个核苷酸内的错配。本文所述的方法或本领域中已知的方法可用以确定含有与靶序列的错配的RNAi剂在抑制SNCA基因的表达中是否有效。考虑具有错配的RNAi剂在抑制SNCA基因的表达中的功效是重要的,尤其是如果SNCA基因中的特定互补区已知在群体内具有多态性序列变异。

[0238] II. 本公开的修饰的RNAi剂

[0239] 在优选实施方案中,本公开的RNAi剂(例如dsRNA)的RNA被化学修饰以增强稳定性或其它有益特征。在本公开的某些实施方案中,本公开的RNAi剂的基本上所有核苷酸是修饰的。在本公开的其它实施方案中,本公开的RNAi剂的所有核苷酸是修饰的。其中“基本所有核苷酸是修饰的”的本公开的RNAi剂在很大程度上但不是完全地为修饰的,并且可以包括不超过5个、4个、3个、2个或1个未修饰的核苷酸。在本公开的再其它实施方案中,本公开的RNAi剂可包括不超过5个、4个、3个、2个或1个修饰的核苷酸。

[0240] 本公开所述的核酸可通过本领域公认的方法合成或修饰,例如“Current protocols in nucleic acid chemistry”,Beaucage,S.L等人(编辑),John Wiley&Sons, Inc.,New York,NY,USA中描述的那些方法,其在此通过引用并入本文。修饰包括例如端修饰,例如5'-端修饰(磷酸化、缀合、反向连接等)或3'-端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);碱基修饰,例如,用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的伴体库碱基配对的碱基替换、碱基去除(无碱基核苷酸)或缀合的碱基;糖修饰(例如,在2'-位或4'-位)或糖的替换;或主链修饰,包含磷酸二酯键的修饰或替换。可用于本文所描述的实施方案的RNAi剂的具体实例包括但不限于含有修饰的主链或不含天然核苷间键的RNA。具有修饰的主链的RNA特别地包括在主链中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的,并且如本领域中有时提及的,在其核苷间主链中不具有磷原子的修饰的RNA也可被视为寡核苷。在一些实施方案中,修饰的RNAi剂在其核苷间主链中具有磷原子。

[0241] 修饰的RNA主链包含例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰基氨基磷酸酯(thionophosphoramidate)、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯,这些的2'-5'连接的类似物,以及具有反向极性的那些,其中相邻的核苷单元对3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接。也包括各种盐,例如钠盐、混合盐类和游离酸形式。

[0242] 教导制备上述含磷键的代表性美国专利包括但不限于以下美国专利:第3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029号;以及美国专利RE39464,其每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0243] 其中不包含磷原子的修饰的RNA主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的主链。这些包括具有吗啉代连接(部分地由核苷的糖部分形成)的那些主链;硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰乙酰基(formacetyl)和硫代甲酰乙酰基主链;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链;磺酸酯和磺酰胺主链;酰胺主链;和其它具有混合的N、O、S和CH₂组分部分的主链。

[0244] 教导上述寡核苷的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第5,034,506;

5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439号,其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0245] 在其它实施方案中,合适的RNA模拟物被考虑用于RNAi剂,其中核苷酸单元的糖和核苷间键(即主链)被新基团替换。维持碱基单元以与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物(已证明具有优异杂交特性的RNA模拟物)被称作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖主链被含酰胺的主链替代,尤其是氨基乙基甘氨酸主链。核碱基被保留并且直接或间接地与主链的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第5,539,082号;第5,714,331号;以及第5,719,262号,其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。适用于本公开的RNAi剂的另外的PNA化合物在例如Nielsen等人,Science,1991,254,1497-1500中进行了描述。

[0246] 本公开所述的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷,且特别是上文引用的美国专利第5,489,677号的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [其中天然磷酸二酯主链表示为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$],以及上文引用的美国专利第5,602,240号的酰胺主链。在一些实施方案中,本文所述的RNA具有上文引用的US专利5,034,506号的吗啉代主链结构。

[0247] 修饰的RNA还可含有一个或多个取代的糖部分。本文所述的RNAi剂(例如dsRNA)在2'-位可包含以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基和炔基。示例性的合适修饰包括 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$,其中n和m为1至约10。在其它实施方案中,dsRNA在2'-位包括以下之一: C_1 至 C_{10} 低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、 SCH_3 、OCN、Cl、Br、CN、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善RNAi剂的药代动力学特性的基团或用于改善RNAi剂的药效学特性的基团,以及具有类似特性的其它取代基。在一些实施方案中,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$),也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE(Martin等人,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),即烷氧基-烷氧基基团。另一示例性修饰是2'-二甲氨基氧基乙氧基,即 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团,也称为2'-DMAOE,如下文实例中描述的,以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O- $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)_2$ 。另外的示例性修饰包括:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(这三个家族中的R和S异构体两者);2'-烷氧基烷基;以及2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0248] 其它修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-O-十六烷基和2'-氟(2'-F)。类似修饰也可在RNAi剂的RNA上的其它位置进行,特别地3'-末端核苷酸或2'-5'连接的dsRNA上糖的3'位以及5'-末端核苷酸的5'位。RNAi剂还可具有糖模拟物,如替代呋喃戊糖基糖的环丁基部分。教导制备此类修饰的糖结构的代表性美国专利包括但不限于以下美国专利第4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,

446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;和5,700,920号,所述美国专利中的某些与本申请共同拥有。上述各项的全部内容特此通过引用并入本文。

[0249] 本公开的RNAi剂还可包含核碱基(在本领域中通常被简称为“碱基”)修饰或取代。如本文所使用的,“未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其它合成和天然核碱基,如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基,具体地5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。进一步的核碱基包括美国专利第3,687,808号中公开的那些,在Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. 编辑, Wiley-VCH, 2008中公开的那些;在The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 第858-859页, Kroschwitz, J.L 编辑, John Wiley & Sons, 1990中公开的那些, Englisch等人, (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613中公开的那些, 以及Sanghvi, Y.S., 第15章, dsRNA Research and Applications, 第289-302页, Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编辑, CRC Press, 1993中公开的那些。这些核碱基中的某些核碱基对提高本公开所述的寡聚化合物的结合亲和力特别有用。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经证明5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性提高0.6°C至1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编辑, dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 第276-278页), 并且是示例性碱基取代, 甚至更具体地在与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0250] 教导制备某些上述修饰的核碱基以及其它修饰的核碱基的代表性美国专利包括但不限于上述美国专利第3,687,808, 4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121, 5,596,091;5,614,617;5,681,941;5,750,692;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672;和7,495,088号, 其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0251] 本公开的RNAi剂还可修饰以包含一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有修饰的核糖部分的核苷酸, 其中核糖部分包括连接2'和4'碳的额外桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在3'-内结构构象中。向siRNA添加锁核酸已被证明可提高在血清中的siRNA稳定性, 和减少脱靶效应(Elmen, J. 等人, (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. 等人, (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. 等人, (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。

[0252] 本公开的RNAi剂也可以被修饰以包含一个或多个双环糖部分。“双环糖”是由两个

原子桥接修饰的呋喃糖基环。“双环核苷” (“BNA”) 是一种具有包含连接糖环的两个碳原子的桥的糖部分的核苷, 由此形成双环的环系统。在某些实施方案中, 桥连接糖环的4' 碳和2' - 碳。因此, 在一些实施方案中, 本公开的药剂可以包含一个或多个锁核酸 (LNA)。锁核酸是具有修饰的核糖部分的核苷酸, 其中核糖部分包含连接2' 和4' 碳的额外桥。换言之, LNA 是包含双环糖部分的核苷酸, 其包含4' -CH₂-O-2' 桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在3' - 内结构构象中。向siRNA添加锁核酸已被证明提高血清中的siRNA稳定性, 并且减少脱靶效应 (Elmen, J. 等人, (2005) *Nucleic Acids Research* 33 (1): 439-447; Mook, OR. 等人, (2007) *Mol Canc Ther* 6 (3): 833-843; Grunweller, A. 等人, (2003) *Nucleic Acids Research* 31 (12): 3185-3193)。用于本公开的多核苷酸的双环核苷的实例包括但不限于包含4' 和2' 核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施方案中, 本公开的反义多核苷酸药剂包含一个或多个含4' 至2' 桥的双环核苷。此类4' 至2' 桥接双环核苷的实例包括但不限于4' - (CH₂) -O-2' (LNA); 4' - (CH₂) -S-2'; 4' - (CH₂)₂-O-2' (ENA); 4' -CH(CH₃) -O-2' (也称为“约束乙基”或“cEt”) 和4' -CH(CH₂OCH₃) -O-2' (和其类似物; 参见例如, 美国专利第7, 399, 845号); 4' -C(CH₃)(CH₃) -O-2' (和其类似物; 参见例如, 美国专利第8, 278, 283号); 4' -CH₂-N(OCH₃) -2' (和其类似物; 参见例如, 美国专利第8, 278, 425号); 4' -CH₂-O-N(CH₃) -2' (参见例如, 美国专利公开第2004/0171570号); 4' -CH₂-N(R) -O-2', 其中R是H、C1-C12烷基或保护基团 (参见例如, 美国专利第7, 427, 672号); 4' -CH₂-C(H)(CH₃) -2' (参见例如 Chattopadhyaya 等人, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); 以及4' -CH₂-C(-CH₂) -2' (和其类似物; 参见例如, 美国专利第8, 278, 426号)。上述各项的全部内容特此通过引用并入本文。

[0253] 教导制备锁核酸核苷酸的其它代表性美国专利和美国专利公开包括但不限于以下: 美国专利第6, 268, 490; 6, 525, 191; 6, 670, 461; 6, 770, 748; 6, 794, 499; 6, 998, 484; 7, 053, 207; 7, 034, 133; 7, 084, 125; 7, 399, 845; 7, 427, 672; 7, 569, 686; 7, 741, 457; 8, 022, 193; 8, 030, 467; 8, 278, 425; 8, 278, 426; 8, 278, 283号; US2008/0039618以及US2009/0012281号, 其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0254] 可以制备具有一种或多种立体化学糖构型的任何前述双环核苷, 包括例如 α -L-呋喃核糖和 β -D-呋喃核糖 (参见WO 99/14226)。

[0255] 本公开的RNAi剂也可被修饰以包括一个或多个约束乙基核苷酸。如本文所使用的, “约束乙基核苷酸”或“cEt”为包括包含4' -CH(CH₃) -O-2' 桥的双环糖部分的锁核酸。在一个实施方案中, 约束乙基核苷酸处于本文中称为“S-cEt”的S构象中。

[0256] 本公开的RNAi剂还可以包含一个或多个“构象限制核苷酸” (“CRN”)。CRN是具有连接核糖的C2' 和C4' 碳或核糖的C3' 和C5' 碳的接头的核苷酸类似物。CRN将核糖环锁定为稳定的构象, 并且增加对mRNA的杂交亲和力。接头具有足够的长度以将氧置于对于稳定性和亲和力最佳的位置, 从而导致较少的核糖环褶皱。

[0257] 教导上述某些CRN的制备的代表性公开包括但不限于US 2013/0190383; 以及WO 2013/036868, 其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0258] 在一些实施方案中, 本公开的RNAi剂包含一种或多种为UNA (解锁核酸) 核苷酸的单体。UNA是解锁无环核酸, 其中糖的任何键已被去除, 从而形成解锁“糖”残基。在一个实例中, UNA还涵盖C1' -C4' 之间的键已被去除的单体 (即C1' 与C4' 碳之间的共价碳-氧-碳键)。在另一个实例中, 糖的C2' -C3' 键 (即C2' 与C3' 碳之间的共价碳-碳键) 已被去除 (参见

Nuc.Acids Symp.Series,52,133-134 (2008) 和Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039,特此通过引用并入)。

[0259] 教导UNA的制备的代表性美国公开包括但不限于US8,314,227;以及美国专利公开第2013/0096289号;第2013/0011922号;和第2011/0313020号,其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0260] 对RNA分子末端的潜在稳定化修饰可包括N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸)(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸)(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二酰基-尿苷-3'-磷酸、反向2'-脱氧-修饰核糖核苷酸如反向dT(idT)、反向dA(idA)和反向无碱基2'-脱氧核糖核苷酸(iAb)等。该修饰的公开可见于WO 2011/005861中。

[0261] 在一个实例中,寡核苷酸的3'或5'末端连接至反向2'-脱氧-修饰的核糖核苷酸,如反向dT(idT)、反向dA(idA)或反向无碱基2'-脱氧核糖核苷酸(iAb)。在一个特定实例中,反向2'-脱氧-修饰的核糖核苷酸连接至寡核苷酸的3'端,如本文所述的有义链的3'端,其中连接经由3'-3'磷酸二酯键或3'-3'-硫代磷酸酯键。

[0262] 在另一实例中,有义链的3'端经由3'-3'-硫代磷酸酯键连接至反向无碱基核糖核苷酸(iAb)。在另一实例中,有义链的3'端经由3'-3'-硫代磷酸酯键连接至反向dA(idA)。

[0263] 在一个特定实例中,反向2'-脱氧-修饰的核糖核苷酸连接至寡核苷酸的3'端,如本文所述的有义链的3'端,其中连接经由3'-3'磷酸二酯键或3'-3'-硫代磷酸酯键。

[0264] 在另一实例中,有义链的3'末端核苷酸为反向dA(idA)且经由3'-3'-键(例如,3'-3'-硫代磷酸酯键)连接至在先核苷酸。

[0265] 本公开的RNAi剂的其它修饰包括5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物,例如,RNAi剂的反义链上的5'-末端磷酸酯或磷酸酯模拟物。合适的磷酸酯模拟物公开于例如US2012/0157511中,其全部内容通过引用并入本文。

[0266] A. 包含本公开的基序的修饰的RNAi剂

[0267] 在本公开的某些方面,本公开的双链RNAi剂包括具有化学修饰的药剂,如在例如WO 2013/075035中公开的,其全部内容通过引用并入本文。如本文和WO 2013/075035中所示,通过将一个或多个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序引入RNAi剂的有义链或反义链中,特别是在切割位点处或附近,可以获得优异的结果。在一些实施方案中,RNAi剂的有义链和反义链可以以其它方式完全修饰。这些基序的引入中断了有义或反义链的修饰模式(如果存在的话)。RNAi剂可以任选地与亲脂性配体缀合,例如C16配体,例如在有义链上。RNAi剂可以任选地用(S)-二醇核酸(GNA)修饰来进行修饰,例如在反义链的一个或多个残基上。所得的RNAi剂呈现出优异的基因沉默活性。

[0268] 因此,本公开提供了能够在体内抑制靶基因(即SNCA基因)的表达的双链RNAi剂。RNAi剂包括有义链和反义链。RNAi剂的每条链可以是长度为15-30个核苷酸。例如,每条链可以是长度为16-30个核苷酸、长度为17-30个核苷酸、长度为25-30个核苷酸、长度为27-30个核苷酸、长度为17-23个核苷酸、长度为17-21个核苷酸、长度为17-19个核苷酸、长度为19-25个核苷酸、长度为19-23个核苷酸、长度为19-21个核苷酸、长度为21-25个核苷酸或长度为21-23个核苷酸。在某些实施方案中,每条链的长度为19-23个核苷酸。

[0269] 有义链和反义链通常形成双链体双链RNA("dsRNA"),本文也称为"RNAi剂"。RNAi

剂的双链体区的长度可以是15-30个核苷酸对。例如,双链体区可以是长度16-30个核苷酸对、长度17-30个核苷酸对、长度27-30个核苷酸对、长度17-23个核苷酸对、长度17-21个核苷酸对、长度17-19个核苷酸对、长度19-25个核苷酸对、长度19-23个核苷酸对、长度19-21个核苷酸对、长度21-25个核苷酸对或长度21-23个核苷酸对。在另一实例中,双链体区的长度选自15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个和27个核苷酸。在优选实施方案中,双链体区的长度为19-21个核苷酸对。

[0270] 在一个实施方案中, RNAi 剂可以在一条或两条链的3'-端、5'-端或两端含有一个或多个突出端区域或封端基团。突出端的长度可以为1-6个核苷酸,例如长度为2-6个核苷酸、长度为1-5个核苷酸、长度为2-5个核苷酸、长度为1-4个核苷酸、长度为2-4个核苷酸、长度为1-3个核苷酸、长度为2-3个核苷酸或长度为1-2个核苷酸。在优选实施方案中,核苷酸突出端区域的长度为2个核苷酸。突出端是一条链比另一条链长的结果,或是两条相同长度的链交错的结果。突出端可以与靶mRNA形成错配,或其可以与被靶向的基因序列互补,或是另一序列。第一链和第二链也可以接合,例如通过另外的碱基以形成发夹,或通过其它非碱基接头。

[0271] 在一个实施方案中, RNAi 剂的突出端区域中的核苷酸可以各自独立地是修饰的或未修饰的核苷酸,包括但不限于2'-糖修饰的,如2-F、2'-O-甲基、胸苷(T)及其任何组合。

[0272] 例如, TT 可以是任一条链上任一端的突出端序列。突出端可以与靶mRNA形成错配,或其可以与被靶向的基因序列互补,或可以是另一序列。

[0273] RNAi 剂的有义链、反义链或两条链上的5'-或3'-突出端可以被磷酸化。在一些实施方案中,突出端区域含有在两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯的两个核苷酸,其中两个核苷酸可以相同或不同。在一个实施方案中,突出端存在于有义链、反义链或两条链的3'-端处。在一个实施方案中,这种3'-突出端存在于反义链中。在一个实施方案中,这种3'-突出端存在于有义链中。

[0274] RNAi 剂可能只含有单个突出端,这可以增强RNAi的干扰活性,而不影响其整体稳定性。例如,单链突出端可以位于有义链的3'-末端处,或可选地,位于反义链的3'-末端处。RNAi也可能具有钝端,位于反义链的5'-端(或有义链的3'-端)处,反之亦然。通常, RNAi 的反义链在3'-端处具有核苷酸突出端,并且5'-端是钝端。虽然不希望受理论的束缚,但反义链5'-端的不对称钝端和反义链3'-端突出端有利于引导链加载到RISC过程中。

[0275] 在一个实施方案中, RNAi 剂是19个核苷酸长度的双端钝聚体(bluntmer),其中有义链含有至少一个在从5'-端的位置7、8、9处的三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序。反义链含有至少一个在5'-端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0276] 在另一实施方案中, RNAi 剂是20个核苷酸长度的双端钝聚体,其中有义链含有至少一个在5'-端的位置8、9、10处的三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序。反义链含有至少一个在5'-端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0277] 还在另一实施方案中, RNAi 剂是21个核苷酸长度的双端钝聚体,其中有义链含有至少一个在5'-端的位置9、10、11处的三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序。反义链含有至少一个在5'-端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0278] 在一个实施方案中, RNAi 剂包括21个核苷酸的有义链和23个核苷酸的反义链,其

中有义链含有至少一个在5'-端的位置9、10、11处的三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序;反义链含有至少一个在5'-端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序,其中RNAi剂的一端是钝端的,而另一端包括2核苷酸的突出端。任选地,2核苷酸突出端位于反义链的3'-端处。当2核苷酸突出端位于反义链的3'-端处时,在末端三个核苷酸之间可能存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三核苷酸是紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。在一个实施方案中,RNAi剂在有义链的5'-端和反义链的5'-端两者的末端三个核苷酸之间另外具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施方案中,RNAi剂的有义链和反义链中的每个核苷酸(包括作为基序的部分的核苷酸)是修饰的核苷酸。在一个实施方案中,每个残基用2'-O-甲基或3'-氟独立地修饰,例如在交替基序中。任选地,RNAi剂进一步包含配体(例如,亲脂性配体,任选地C16配体)。

[0279] 在一个实施方案中,RNAi剂包括有义链和反义链,其中有义链的长度为25-30个核苷酸残基,其中从5'-末端核苷酸(位置1)位置1开始,第一链的位置1-23包括至少8个核糖核苷酸;反义链的长度为36-66个核苷酸残基,并且从3'-末端核苷酸开始,包括在与有义链的位置1-23配对以形成双链体的位置中的至少8个核糖核苷酸;其中至少反义链的3'-末端核苷酸与有义链不配对,并且至多6个连续3'-末端核苷酸与有义链不配对,由此形成1-6个核苷酸的3'-单链突出端;其中反义链的5'-末端包括10-30个与有义链不配对的连续核苷酸,由此形成10-30个核苷酸的单链5'-突出端;其中当有义链和反义链对准以获得最大互补性时,至少有义链5'-末端和3'-末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,由此在有义链与反义链之间形成基本上双链的区域;并且反义链沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸与靶RNA充分互补,以在将双链核酸引入哺乳动物细胞中时减少靶基因表达;并且其中有义链含有至少一个在三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序,其中至少一个所述基序出现在切割位点处或附近。反义链在切割位点处或其附近含有至少一个在三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0280] 在一个实施方案中,RNAi剂包括有义链和反义链,其中RNAi剂包括长度为至少25个和最多29个核苷酸的第一链和长度为最多30个核苷酸的第二链,具有至少一个在5'端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序;其中第一链的3'-端和第二链的5'-端形成钝端,并且第二链在其3'-端处比第一链长1-4个核苷酸,其中双链体区的长度为至少25个核苷酸,并且第二链沿着第二链长度的至少19个核苷酸与靶mRNA充分互补,以在将RNAi剂引入哺乳动物细胞中时减少靶基因表达,并且其中RNAi剂的dicer切割优先地产生包含第二链的3'-端的siRNA,由此减少靶基因在哺乳动物中的表达。任选地,RNAi剂进一步包含配体。

[0281] 在一个实施方案中,RNAi剂的有义链含有至少一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序,其中一个基序出现在有义链中的切割位点处。

[0282] 在一个实施方案中,RNAi剂的反义链也可含有至少一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序,其中一个基序出现在反义链中的切割位点处或附近。

[0283] 对于具有长度为17-23个核苷酸的双链体区的RNAi剂,反义链的切割位点通常在5'-端的10、11和12位附近。因此,三个相同修饰的基序可以出现在反义链的9、10、11位;10、11、12位;11、12、13位;12、13、14位;或13、14、15位,计数从反义链的5'-端的第1核苷酸开

始,或计数从双链体区内反义链的5'-端的第1配对核苷酸开始。反义链中的切割位点也可以根据RNAi的双链体区从5'端开始的长度而改变。

[0284] RNAi剂的有义链可以在链的切割位点处含有至少一个三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序;并且反义链可以在链的切割位点处或附近具有至少一个三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序。当有义链和反义链形成dsRNA双链体时,有义链与反义链可以对准以使得有义链上三个核苷酸的一个基序与反义链上三个核苷酸的一个基序具有至少一个核苷酸重叠,即,有义链中基序的三个核苷酸中的至少一个与反义链中基序的三个核苷酸中的至少一个形成碱基对。可选地,至少两个核苷酸可以重叠,或所有三个核苷酸可以重叠。

[0285] 在一个实施方案中,RNAi剂的有义链可以含有多于一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序。第一基序可以出现在链的切割位点处或附近,并且其它基序可以是翼修饰。本文中的术语“翼修饰”是指出现在链的另一部分处的基序,其与在同一链的切割位点处或附近的基序分离。翼修饰与第一基序相邻,或被至少一个或多个核苷酸分隔。当基序彼此紧邻时,基序的化学性彼此不同,并且当基序被一个或多个核苷酸分隔时,化学性可以相同或不同。可能存在两个或更多个翼修饰。例如,当存在两个翼修饰时,每个翼修饰可以出现在相对于位于切割位点处或附近或在前一基序的任一侧的第一基序的一端。

[0286] 与有义链一样,RNAi剂的反义链可以含有多于一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序,其中至少一个基序出现在链的切割位点处或附近。该反义链还可以含有与可能存在于有义链上的翼修饰相似地排列的一个或多个翼修饰。

[0287] 在一个实施方案中,RNAi剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包含链的3'-端、5'-端或两端处的前一个或两个末端核苷酸。

[0288] 在另一实施方案中,RNAi剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包含链的3'-端、5'-端或两端处双链体区内的前一个或两个配对核苷酸。

[0289] 当RNAi剂的有义链和反义链各自含有至少一个翼修饰时,翼修饰可以落在双链体区的同一端上,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0290] 当RNAi剂的有义链和反义链各自含有至少两个翼修饰时,有义链和反义链可以对准以使得各自来自一条链的两个修饰落在双链体区的一端上,具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;各自来自一条链的两个修饰落在双链体区的另一端上,具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;一条链的两个修饰落在前一基序的每一侧,在双链体区中具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0291] 在一个实施方案中,RNAi剂包含与靶标的错配、在双链体内或其组合。错配可能存在于突出端区域或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或解链的倾向进行排序(例如,根据特定配对的缔合或解离的自由能,最简单的方式是在单个配对的基础上检查配对,尽管也可以使用近邻或类似分析)。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C(I=肌苷)优于G:C。错配,例如非规范或规范外配对(如本文其它地方所述)优于规范(A:T、A:U、G:C)配对;并且包含通用碱基的配对优于规范配对。

[0292] 在一个实施方案中,RNAi剂包括在双链体区内反义链的5'-端的前1个、2个、3个、4个或5个碱基对中的至少一个,其独立地选自:A:U、G:U、I:C和错配对,例如非规范或规范外配对或者包含通用碱基的配对,以促进双链体的5'-端处反义链的解离。

[0293] 在一个实施方案中,双链体区内反义链的5'-端的1位处的核苷酸选自:A、dA、dU、U

和dT。可选地,双链体区内反义链的5'-端的前1个、2个或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,双链体区内反义链5'-端的第一碱基对是AU碱基对。

[0294] 在另一个实施方案中,有义链3'-端处的核苷酸是脱氧胸苷(dT)。在另一个实施方案中,反义链3'-端处的核苷酸是脱氧胸苷(dT)。在一个实施方案中,存在脱氧胸腺嘧啶核苷酸的短序列,例如,在有义链或反义链的3'-端上的两个dT核苷酸。

[0295] 在一个实施方案中,有义链序列可通过式(I)表示:

[0296] $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3' \text{ (I)}$

[0297] 其中:

[0298] i和j各自独立地为0或1;

[0299] p和q各自独立地为0至6;

[0300] 每个 N_a 独立地表示包括0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0301] 每个 N_b 独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0302] 每个 n_p 和 n_q 独立地表示突出端核苷酸;

[0303] 其中 N_b 和Y不具有相同的修饰;并且

[0304] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。任选地,YYY全部是2'-F修饰的核苷酸。

[0305] 在一个实施方案中, N_a 或 N_b 包含交替模式的修饰。

[0306] 在一个实施方案中,YYY基序出现在有义链的切割位点处或附近。例如,当RNAi剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区时,YYY基序可以出现在-有义链的切割位点处或附近(例如,可以出现在位置6、7、8;7、8、9;8、9、10;9、10、11;10、11、12或11、12、13处),计数从5'-端的第1核苷酸开始;或任选地,计数从双链体区内5'-端的第1配对核苷酸开始。

[0307] 在一个实施方案中,i是1并且j是0,或i是0并且j是1,或i和j两者都是1。因此,有义链可以由下式表示:

[0308] $5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3' \text{ (Ib)}$;

[0309] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3' \text{ (Ic)}$;或

[0310] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3' \text{ (Id)}$ 。

[0311] 当有义链由式(Ib)表示时, N_b 表示包括0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0312] 每个 N_a 可以独立地表示包括2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0313] 当有义链表示为式(Ic)时, N_b 表示包括0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 可以独立地表示包括2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0314] 当有义链表示为式(Id)时,每个 N_b 独立地表示包括0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。任选地, N_b 为0、1、2、3、4、5或6。每个 N_a 可以独立地表示包括2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0315] X、Y和Z中的每一个可以彼此相同或不同。

[0316] 在其它实施方案中,i是0并且j是0,并且有义链可以由下式表示:

[0317] $5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q3'$ (Ia)。

[0318] 当有义链由式 (Ia) 表示时,每个 N_a 可以独立地表示包括2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0319] 在一个实施方案中,RNAi的反义链序列可以由式 (II) 表示:

[0320] $5'n_q-N_a'-(Z'Z'Z')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(X'X'X')_l-N_a'-n_p'3'$ (II)

[0321] 其中:

[0322] k 和 l 各自独立地为0或1;

[0323] p' 和 q' 各自独立地为0至6;

[0324] 每个 N_a' 独立地表示包括0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0325] 每个 N_b' 独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0326] 每个 n_p' 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸;

[0327] 其中 N_b' 和 Y' 不具有相同的修饰;

[0328] 并且 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示在三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0329] 在一个实施方案中, N_a' 或 N_b' 包括交替模式的修饰。

[0330] $Y'Y'Y'$ 基序出现在反义链的切割位点处或附近。例如,当RNAi剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区时, $Y'Y'Y'$ 基序可以出现在反义链的位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15处,计数从5'端的第1核苷酸开始;或任选地,计数从双链体区内5'端的第1配对核苷酸开始。任选地, $Y'Y'Y'$ 基序出现在位置11、12、13处。

[0331] 在一个实施方案中, $Y'Y'Y'$ 基序全部为2'-OMe修饰的核苷酸。

[0332] 在一个实施方案中, k 是1并且 l 是0,或 k 是0并且 l 是1,或 k 和 l 两者都是1。

[0333] 因此,反义链可以由下式表示:

[0334] $5'n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p'3'$ (IIb);

[0335] $5'n_q-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p'3'$ (IIc);或

[0336] $5'n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p'3'$ (IId)。

[0337] 当反义链由式 (IIb) 表示时, N_b' 表示包括0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包括2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0338] 当反义链表示为式 (IIc) 时, N_b' 表示包括0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包括2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0339] 当反义链表示为式 (IId) 时,每个 N_b' 独立地表示包括0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包括2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。任选地, N_b' 为0、1、2、3、4、5或6。

[0340] 在其他实施方案中, k 为0且 l 为0,且反义链可由下式表示:

[0341] $5'n_p-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'3'$ (Ia)。

[0342] 当反义链表示为式 (IIa) 时,每个 N_a' 独立地表示包括2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0343] X'、Y'及Z'各自可以彼此相同或不同。

[0344] 有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地用LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-甲基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟进行修饰。例如,有义链和反义链的每个核苷酸独立地用2'-0-甲基或2'-氟修饰。特别地,每个X、Y、Z、X'、Y'和Z'可以表示2'-0-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0345] 在一个实施方案中,当双链体区为21nt时,RNAi剂的有义链可以含有出现在链的9、10和11位处的YYY基序,计数从5'端的第1核苷酸开始,或任选地,计数从双链体区内5'端的第1配对核苷酸开始;并且Y表示2'-F修饰。有义链可以另外含有XXX基序或ZZZ基序作为在双链体区的相对端处的翼修饰;并且XXX和ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0346] 在一个实施方案中,反义链可以含有出现在链的位置11、12、13处的Y'Y'Y'基序,计数从5'端的第1核苷酸开始,或任选地,计数从双链体区内5'端的第1配对核苷酸开始;并且Y'表示2'-0-甲基修饰。反义链可以另外含有X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为在双链体区的相对端处的翼修饰;并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0347] 由上述式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中任一表示的有义链分别与由式(IIa)、(IIb)、(IIc)和(IId)中任一表示的反义链形成双链体。

[0348] 因此,用于本公开的方法中的RNAi剂可包含有义链和反义链,各链具有14至30个核苷酸,RNAi双链体由式(III)表示:

[0349] 有义: $5'n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q-3'$

[0350] 反义: $3'n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'-5'$

[0351] (III)

[0352] 其中:

[0353] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0354] p、p'、q和q'各自独立地为0至6;

[0355] 每个 N_a 和 N_a' 独立地表示包括0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0356] 每个 N_b 和 N_b' 独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0357] 其中

[0358] 各自可能存在或不存在的 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q 的每一个独立地表示突出端核苷酸;并且

[0359] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0360] 在一个实施方案中,i是0并且j是0;或i是1并且j是0;或i是0并且j是1;或i和j两者都是0;或i和j两者都是1。在另一个实施方案中,k是0并且l是0;或k是1并且l是0;k是0并且l是1;或k和l两者都是0;或k和l两者都是1。

[0361] 形成RNAi双链体的有义链和反义链的示例性组合包括下式:

[0362] $5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q-3'$

[0363] $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'-5'$

[0364] (IIIa)

[0365] $5'n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q-3'$

[0366] $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'n_q'5'$

[0367] (IIIb)

[0368] $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q3'$

[0369] $3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5'$

[0370] (IIIc)

[0371] $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'$

[0372] $3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q'5'$

[0373] (IIId)

[0374] 当RNAi剂由式(IIIa)表示时,各 N_a 独立地表示包含2至20、2至15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0375] 当RNAi剂由式(IIIb)表示时,各 N_b 独立地表示包含1至10、1至7、1至5或1-4个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 独立地表示包含2至20、2至15或2至10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0376] 当RNAi剂表示为式(IIIc)时,各 N_b 、 N_b' 独立地表示包含0至10、0至7、0至10、0至7、0至5、0至4、0至2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 独立地表示包含2至20、2至15或2至10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0377] 当RNAi剂表示为式(IIId)时,各 N_b 、 N_b' 独立地表示包含0至10、0至7、0至10、0至7、0至5、0至4、0至2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 独立地表示包含2至20、2至15或2至10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。 N_a 、 N_a' 、 N_b 和 N_b' 各自独立地包含交替模式的修饰。

[0378] 在一个实施方案中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。在另一实施方案中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰,且 $n_p'>0$,和至少一个 n_p' 经由硫代磷酸酯键连接至相邻核苷酸。还在另一实施方案中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰, $n_p'>0$,且至少一个 n_p' 经由硫代磷酸酯键连接至相邻核苷酸,以及有义链缀合于通过二价或三价分支接头(下文所述)附接的一个或多个C16(或相关)部分。在另一实施方案中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰, $n_p'>0$,且至少一个 n_p' 经由硫代磷酸酯键连接至相邻核苷酸,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键,以及有义链缀合于任选地通过接头附接的一个或多个亲脂性,例如C16(或相关)部分。

[0379] 在一个实施方案中,当RNAi剂由式(IIIa)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰, $n_p'>0$,且至少一个 n_p' 经由硫代磷酸酯键连接至相邻核苷酸,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键,以及有义链缀合于通过接头附接的一个或多个亲脂性,例如C16(或相关)部分。

[0380] 在一个实施方案中, RNAi剂为含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚物,其中双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地,多聚体进一步包含配体。每个双链体可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每个双链体可以在两个不同的靶位点处靶向相同的基因。

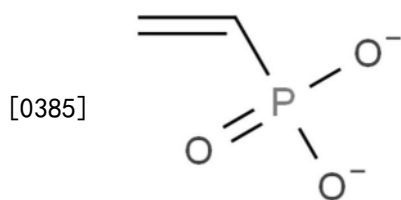
[0381] 在一个实施方案中, RNAi剂为含有3、4、5、6或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚物,其中双链体通过接头连接。接头可以是可切割的

或不可切割的。任选地,多聚体进一步包含配体。每个双链体可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每个双链体可以在两个不同的靶位点处靶向相同的基因。

[0382] 在一个实施方案中,两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的RNAi剂在5'端及一个或两个3'端彼此连接,且任选地缀合于配体。每种药剂可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每种药剂可以在两个不同的靶位点处靶向相同的基因。

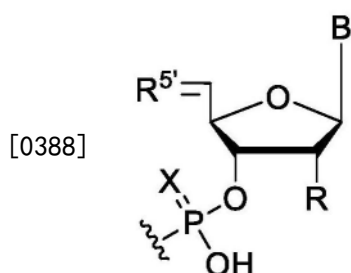
[0383] 各种公开出版物描述了可以用于本公开的方法的多聚RNAi剂。此类公开包括W02007/091269、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887和W02011/031520;以及US 7858769,其每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0384] 在某些实施方案中,本公开的组合物及方法包括如本文所述的RNAi剂的5'-磷酸酯模拟物诸如乙烯基磷酸酯(VP)修饰。于示例性实施方案中,本公开的经乙烯基磷酸酯具有以下结构:



[0386] 本公开的乙烯基磷酸酯可以附接到本公开的dsRNA的反义链或有义链。在某些优选的实施方案中,本公开的乙烯基磷酸酯附接至dsRNA的反义链,任选地dsRNA的反义链的5'-端。

[0387] 在示例性实施方案中,本公开的5'乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸具有结构:



[0389] 其中X是O或S;

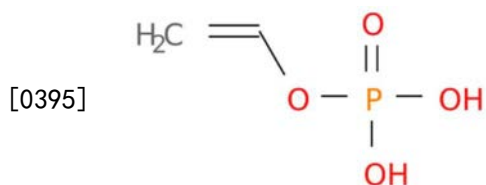
[0390] R是氢、羟基、氟或C₁₋₂₀烷氧基(例如,甲氧基或正十六烷氧基);

[0391] R^{5'}为=C(H)-P(O)(OH)₂,并且C5'碳与R^{5'}之间的双键处于E或Z取向(例如,E取向);并且

[0392] B是核碱基或修饰的核碱基,任选地其中B是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0393] 在一个实施方案中,R^{5'}是=C(H)-P(O)(OH)₂,并且C5'碳与R^{5'}之间的双键处于E取向。在另一个实施方案中,R是甲氧基并且R^{5'}是=C(H)-P(O)(OH)₂,并且C5'碳与R^{5'}之间的双键处于E取向。在另一个实施方案中,X是S,R是甲氧基和R^{5'}是=C(H)-P(O)(OH)₂,并且C5'碳与R^{5'}之间的双键处于E取向。

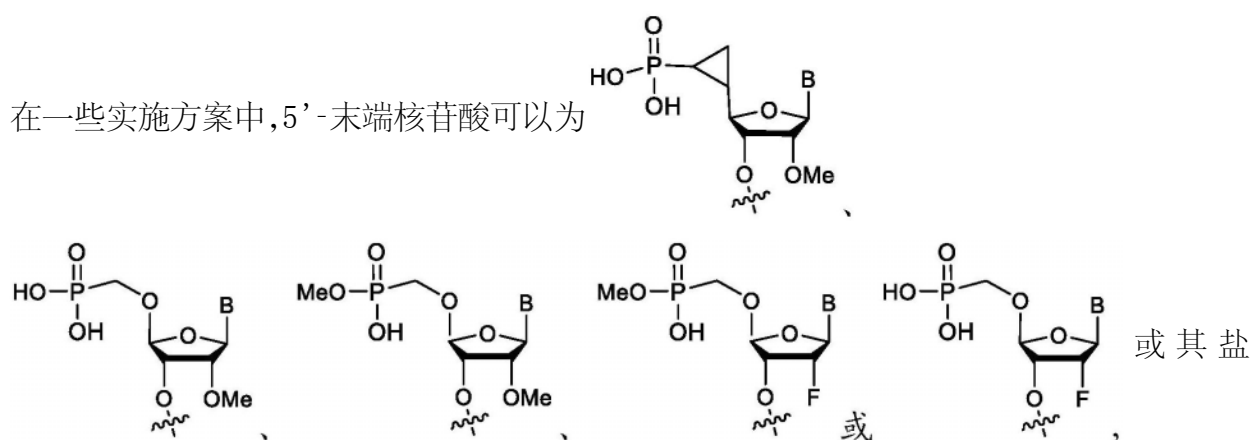
[0394] 乙烯基磷酸酯修饰也设想用于本公开的组合物和方法。示例性的乙烯基磷酸酯结构为:



[0396] 另外的示例性乙烯基磷酸酯结构包括先前结构,其中R5'为 $=C(H)-OP(O)(OH)_2$,并且C5'碳与R5'之间的双键处于E或Z取向(例如,E取向)。

[0397] 在一些实施方案中,5-磷酸酯模拟物选自

或其盐(例如,钠盐),其中断裂的键为与5'-末端核苷酸的4'-碳的共价键。



(例如,钠盐),其中B为修饰或未修饰的核碱基(例如,尿嘧啶或5-甲基尿嘧啶)。

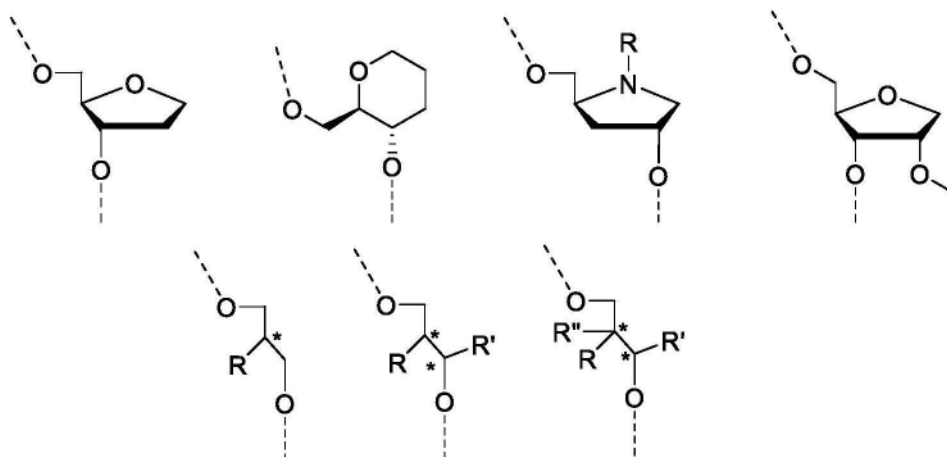
[0398] B. 热去稳定修饰

[0399] 在某些实施方案中,dsRNA分子可以通过在反义链的种子区(即反义链5'-端的位置2至9)掺入热去稳定修饰来优化RNA干扰,以减少或抑制脱靶基因沉默。已经发现,具有反义链(包含从5'端计数反义链的前9个核苷酸位置内的双链体的至少一个热去稳定修饰)的dsRNA具有降低的脱靶基因沉默活性。因此,在一些实施方案中,反义链包含在反义链的5'区的前9个核苷酸位置内双链体的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)热去稳定修饰。在一些实施方案中,双链体的一个或多个热去稳定修饰位于从反义链5'-端的位置2至9处,或任选地位置4至8。在一些另外的实施方案中,双链体的热去稳定修饰位于从反义链的5'端的位置6、7或8处。还在一些另外的实施方案中,双链体的热去稳定修饰位于从反义链5'端的位置7处。术语“热去稳定修饰”包括导致dsRNA的较低总体熔融温度(T_m) (任选地,低于没有此类修饰的dsRNA的 T_m 一度、两度、三度或四度的 T_m)的修饰。在一些实施方案中,双链体的热去稳定修饰位于从反义链5'端的位置2、3、4、5或9处。

[0400] 热去稳定修饰可以包括但不限于无碱基修饰;与相对链中的相对核苷酸的错配;以及糖修饰,如2'-脱氧修饰,无环核苷酸,例如,解锁核酸(UNA)或二醇核酸(GNA);及2'-5'-连接的核糖核苷酸(“3'-RNA”)。

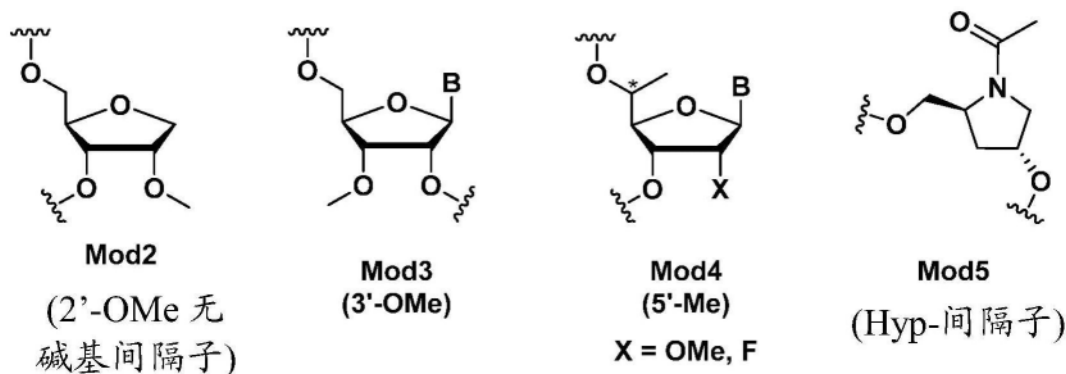
[0401] 示例的无碱基修饰包括但不限于下列:

[0402]



[0403] 其中R=H、Me、Et或OMe; R'=H、Me、Et或OMe; R''=H、Me、Et或OMe

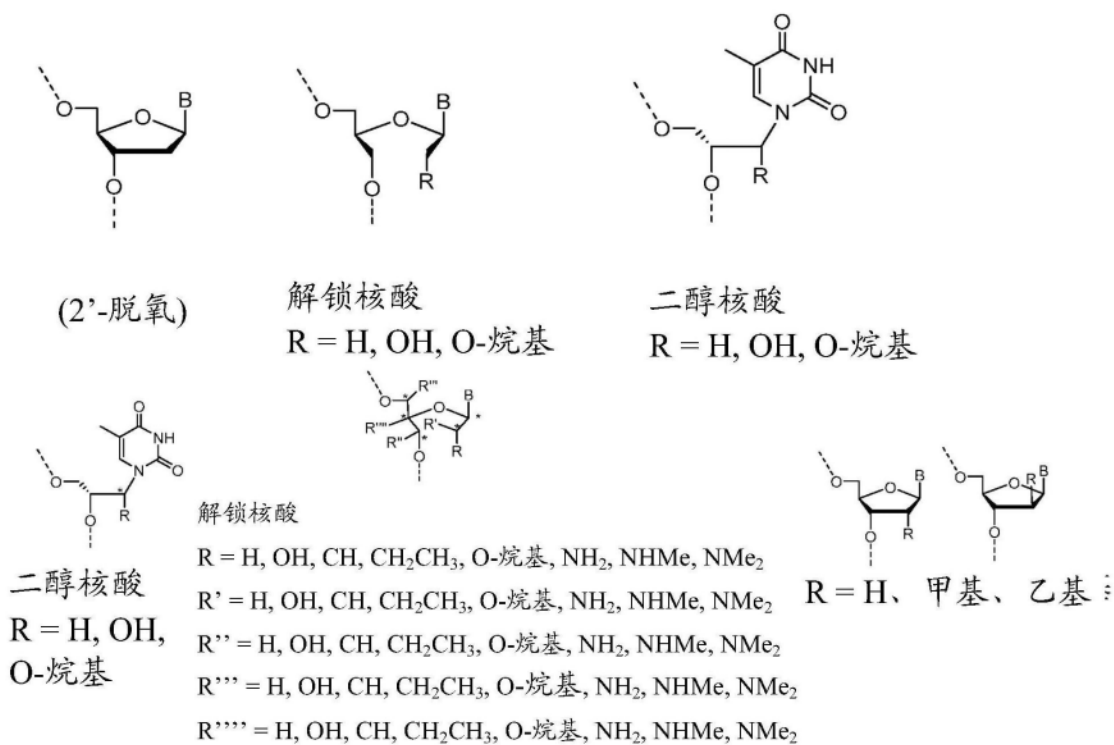
[0404]



[0405] 其中B为修饰或未修饰的核碱基。

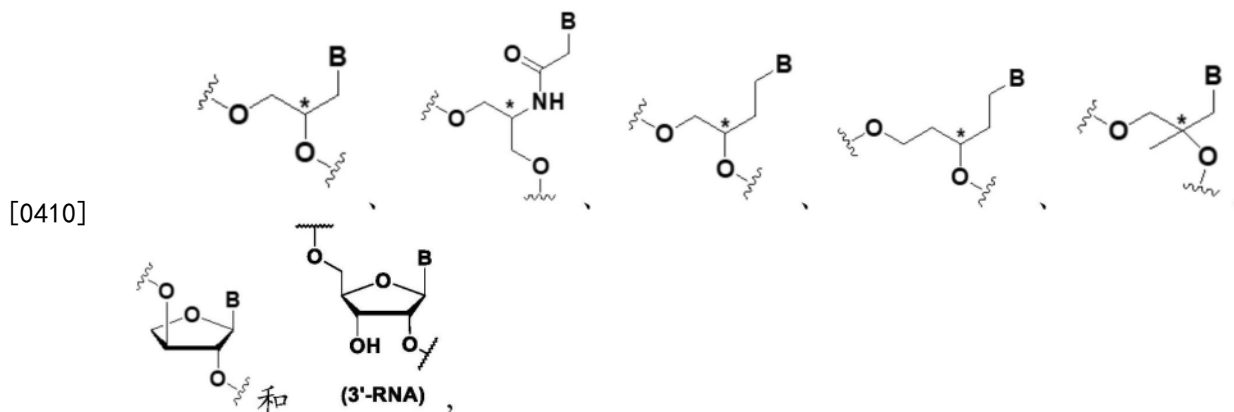
[0406] 示例的糖修饰包括但不限于下列:

[0407]



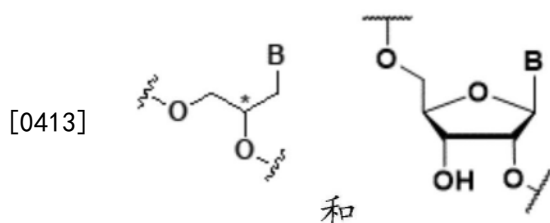
[0408] 其中B为修饰或未修饰的核碱基。

[0409] 在一些实施方案中,双链体的热去稳定修饰选自下组:



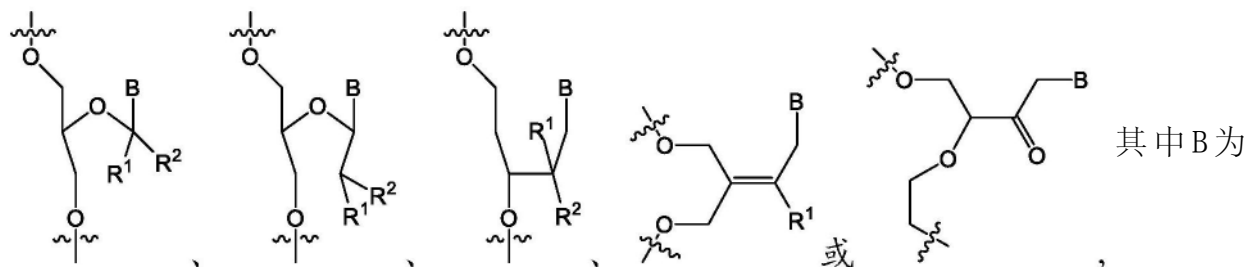
[0411] 其中B为修饰或未修饰的核碱基,且各结构上的星号表示R、S或外消旋的。

[0412] 在一些实施方案中,双链体的热去稳定修饰选自下组:



[0414] 其中B为修饰或未修饰的核碱基,且星号表示R、S或外消旋的(例如S)。

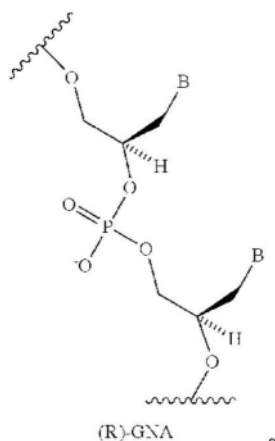
[0415] 术语“无环核苷酸”是指具有无环核糖的任何核苷酸,例如其中核糖碳之间的任何键(例如,C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'或C1'-O4')不存在或者核糖碳或氧中的至少一个(例如,C1'、C2'、C3'、C4'或O4')独立地或组合地不存在于核苷酸中。在一些实施方案中,无环核苷酸是



修饰或未修饰的核碱基, R^1 和 R^2 独立地为H、卤素、 OR_3 或烷基;且 R_3 为H、烷基、环烷基、芳基、杂芳基或糖。术语“UNA”指解锁的无环核酸,其中糖的任意键被移除,从而形成解锁的“糖”残基。在一个实例中,UNA也涵盖其C1'-C4'之间的键(即,C1'与C4'碳之间的碳-氧-碳共价键)被移除的单体。在另一实例中,糖的C2'-C3'键(即,C2'与C3'碳之间的碳-碳共价键)被移除(参见,Mikhailov et.al.,Tetrahedron Letters,26(17):2059(1985)及Fluiter et al.,Mol.Biosyst.,10:1039(2009),通过引用以其整体并入本文)。无环衍生物提供更大的主链柔性而不影响Watson-Crick配对。无环核苷酸可经由2'-5'或3'-5'键连接。

[0416] 术语“GNA”是指二醇核酸,其是一种类似于DNA或RNA的聚合物,但其“主链”的组成不同,因为其由磷酸二酯键连接的重复甘油单元组成:

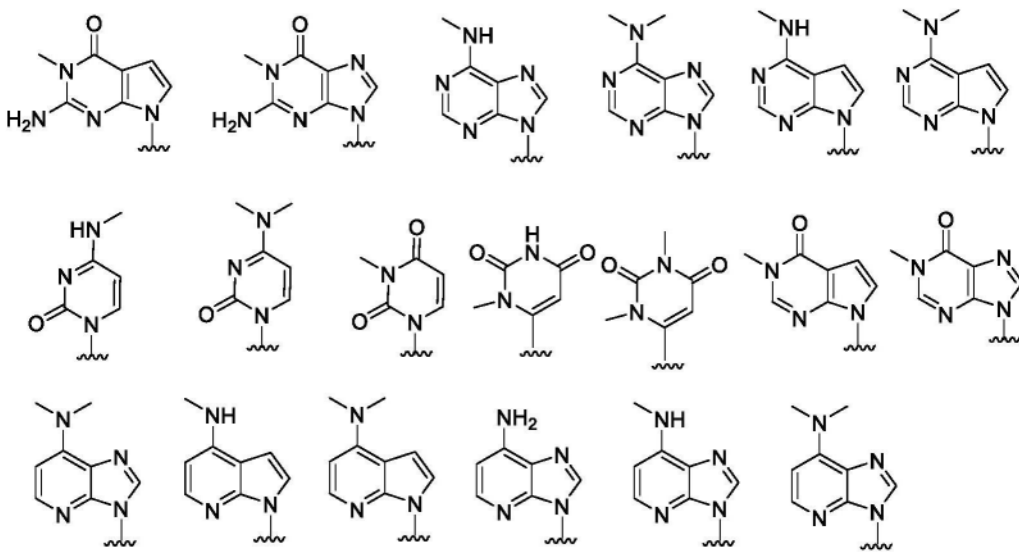
[0417]



[0418] 双链体的热去稳定修饰可以是热去稳定核苷酸与dsRNA双链体内相对链中的相对核苷酸之间的错配(即非互补碱基对)。示例性错配碱基对包含G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T、U:T或其组合。本领域已知的其它错配碱基配对也适用于本公开。错配可以存在于核苷酸(天然存在的核苷酸或修饰的核苷酸)之间,即,错配碱基配对可以存在于来自相应的核苷酸的核碱基之间,而与核苷酸的核糖上的修饰无关。在某些实施方案中,dsRNA分子含有错配配对中的至少一个核碱基,其为2'-脱氧核碱基;例如,2'-脱氧核碱基在有义链中。

[0419] 在一些实施方案中,反义链的种子区中的双链体的热去稳定修饰包含与靶mRNA上的互补碱基具有受损的W-C-H-键合的核苷酸,如:

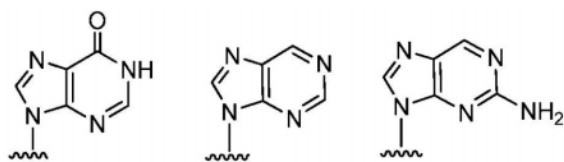
[0420]



[0421] 在W0 2011/133876中详细描述了无碱基核苷酸、无环核苷酸修饰(包括UNA和GNA)和错配修饰的更多实例,所述文献通过引用整体并入本文。

[0422] 热去稳定修饰还可以包含具有减少的或消除的与相对碱基形成氢键的能力的通用碱基和磷酸酯修饰。

[0423] 在一些实施方案中,双链体的热去稳定修饰包括具有非规范碱基的核苷酸,例如但不限于具有受损的或完全消除的与相对链中的碱基形成氢键的能力的核碱基修饰。评估了这些核碱基修饰用于dsRNA双链体的中心区域的去稳定,如W0 2010/0011895中所描述的,其通过引用整体并入本文。示例性核碱基修饰是:

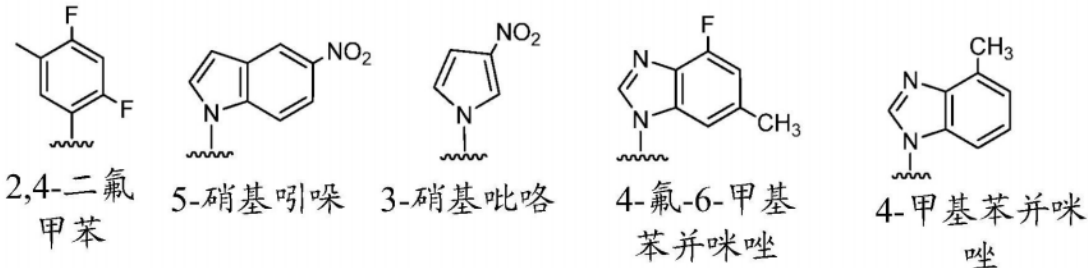


肌苷

水粉菴素

2-氨基嘌呤

[0424]

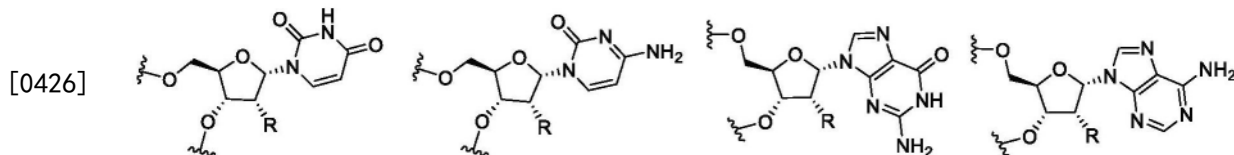
2,4-二氟
甲苯

5-硝基吲哚

3-硝基吡咯

4-氟-6-甲基
苯并咪唑4-甲基苯并咪
唑

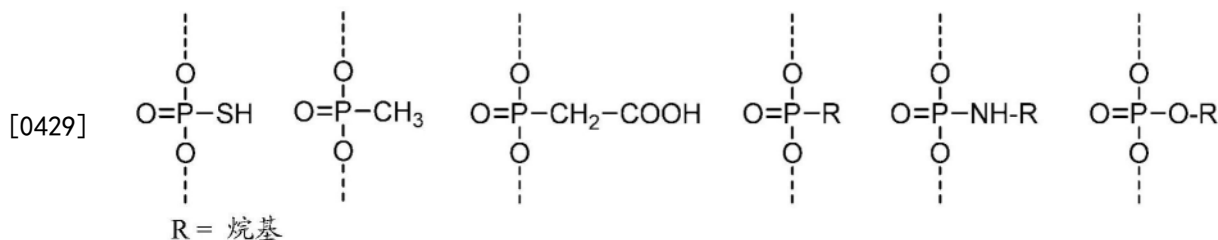
[0425] 在一些实施方案中,反义链的种子区中的双链体的热去稳定修饰包括与靶mRNA上的碱基互补的一个或多个 α -核苷酸,如:



[0426]

[0427] 其中R为H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂或O-烷基。

[0428] 已知与天然磷酸二酯键相比降低dsRNA双链体的热稳定性的示例性磷酸酯修饰为:



[0429]

R = 烷基

[0430] R基团的烷基可以是C₁-C₆烷基。R基团的具体烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基和己基。

[0431] 如本领域技术人员认识到的,鉴于核碱基的功能性作用是定义本公开的RNAi剂的特异性,而核碱基修饰可以以如本文所描述的各种方式进行,例如将去稳定修饰引入本公开的RNAi剂中,例如为了相对于脱靶效应增强中靶效应的目的,对于非核碱基修饰,例如对多核糖核苷酸的糖基或磷酸酯主链的修饰,可用的和通常存在于本公开的RNAi剂上的修饰的范围往往要大得多。此类修饰在本公开的其它部分中进行了更详细的描述,并且明确考虑用于本公开的RNAi剂,其具有如上或本文其它地方所述的天然核碱基或修饰的核碱基。

[0432] 除了包括热去稳定修饰的反义链外,dsRNA还可以包括一个或多个稳定修饰。例如,dsRNA可以包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)稳定修饰。非限制地,稳定修饰可以全部存在于一条链中。在一些实施方案中,有义链和反义链两者均包括至少两个稳定修饰。稳定修饰可以存在于有义链或反义链的任何核苷酸上。例如,稳定修饰可以存在于有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个稳定修饰可以在有义链或反义链上以交替模式存在;或有义链或反义链均包括交替模式的稳定修饰。有

义链上的稳定修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上稳定修饰的交替模式可以相对于反义链上稳定修饰的交替模式具有偏移。

[0433] 在一些实施方案中,反义链包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)稳定修饰。非限制地,反义链中的稳定修饰可以存在于任何位置处。在一些实施方案中,反义链包含5'端的位置2、6、8、9、14和16处的稳定修饰。还在一些其它实施方案中,反义链包含5'端的位置2、6、14和16处的稳定修饰。还在一些其它实施方案中,反义链包含5'端的位置2、14和16处的稳定修饰。

[0434] 在一些实施方案中,反义链包含与去稳定修饰相邻的至少一个稳定修饰。例如,稳定修饰可以是不稳定修饰的5'-端或3'-端的核苷酸,即,不稳定修饰的位置的-1或+1位置处。在一些实施方案中,反义链包含不稳定修饰的5'-端和3'-端的每一个处的稳定修饰,即,不稳定修饰位置的-1和+1位。

[0435] 在一些实施方案中,反义链包含不稳定修饰的3'-端的至少两个稳定修饰,即,不稳定修饰位置的+1或+2位。

[0436] 在一些实施方案中,有义链包含至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)稳定修饰。非限制地,有义链中的稳定修饰可以存在于任何位置处。在一些实施方案中,有义链包含5'-端的位置7、10和11处的稳定修饰。在一些其它实施方案中,有义链包含5'端的位置7、9、10和11处的稳定修饰。在一些实施方案中,有义链包含从反义链的5'端计数,与反义链的位置11、12和15相对或互补的位置处的稳定修饰。在一些其它实施方案中,有义链包含从反义链的5'端计数,与反义链的位置11、12、13和15相对或互补的位置处的稳定修饰。在一些实施方案中,有义链包含两个、三个或四个稳定修饰的区块。

[0437] 在一些实施方案中,有义链不包含与反义链中的双链体的热去稳定修饰相对或互补的位置的稳定修饰。

[0438] 示例性的热稳定修饰包括但不限于2'-氟修饰。其它热稳定修饰包括但不限于LNA。

[0439] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA包含至少四个(例如,四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)2'-氟核苷酸。非限制地,2'-氟核苷酸可以全部存在于一条链中。在一些实施方案中,有义链和反义链两者包含至少两个2'-氟核苷酸。2'-氟修饰可以存在于有义链或反义链的任何核苷酸上。例如,2'-氟修饰可以存在于有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个2'-氟修饰可以在有义链或反义链上以交替模式存在;或有义链或反义链均包含交替模式的2'-氟修饰。有义链上的2'-氟修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上2'-氟修饰的交替模式可以相对于反义链上2'-氟修饰的交替模式具有偏移。

[0440] 在一些实施方案中,反义链包含至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)2'-氟核苷酸。非限制地,反义链中的2'-氟修饰可以存在于任何位置。在一些实施方案中,反义链包含5'端的位置2、6、8、9、14和16处的2'-氟核苷酸。还在一些其它实施方案中,反义链包含5'端的位置2、6、14和16处的2'-氟核苷酸。还在一些其它实施方案中,反义链包含5'端的位置2、14和16处的2'-氟核苷酸。

[0441] 在一些实施方案中,反义链包含与去稳定修饰相邻的至少一个2'-氟核苷酸。例

如,2'-氟核苷酸可以是去稳定修饰的5'端或3'端处的核苷酸,即,去稳定修饰位置的-1或+1位处。在一些实施方案中,反义链包含去稳定修饰的5'端和3'端中每一个处的2'-氟核苷酸,即,去稳定修饰位置的-1和+1位。

[0442] 在一些实施方案中,反义链包含去稳定修饰3'端处的至少两个2'-氟核苷酸,即,去稳定修饰位置的+1或+2位处。

[0443] 在一些实施方案中,有义链包含至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)2'-氟核苷酸。非限制地,有义链中的2'-氟修饰可以存在于任何位置处。在一些实施方案中,反义链包含5'端的位置7、10和11处的2'-氟核苷酸。在一些其它实施方案中,有义链包含5'端的位置7、9、10和11处的2'-氟核苷酸。在一些实施方案中,有义链包含从反义链的5'端计数,与反义链的位置11、12和15相对或互补的位置处的2'-氟核苷酸。在一些其它实施方案中,有义链包含从反义链的5'端计数,与反义链的位置11、12、13和15相对或互补的位置处的2'-氟核苷酸。在一些实施方案中,有义链包含两个、三个或四个2'-氟核苷酸的区块。

[0444] 在一些实施方案中,有义链不包含与反义链中双链体的热去稳定修饰相对或互补的位置的2'-氟核苷酸。

[0445] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包括21个核苷酸(nt)的有义链和23个核苷酸(nt)的反义链,其中反义链含有至少一个热去稳定核苷酸,其中所述至少一个热去稳定核苷酸出现在反义链的种子区(即反义链的5'端的位置2至9处),其中dsRNA的一端是钝端,而另一端包括2nt突出端,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个):(i)反义链包含2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)反义链包含1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(iii)有义链与配体缀合;(iv)有义链包含2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(v)有义链包含1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(vi)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰;以及(vii)dsRNA在反义链5'端包含钝端。任选地,2nt突出端位于反义的3'端。

[0446] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包括有义链和反义链,其中:有义链的长度为25-30个核苷酸残基,其中从5'-末端核苷酸(位置1)开始,所述有义链的位置1至位置23包括至少8个核糖核苷酸;反义链的长度为36-66个核苷酸残基,以及从3'末端核苷酸开始,在与有义链的位置1至23配对以形成双链体的位置中的至少8个核糖核苷酸;其中至少反义链的3'-末端核苷酸与有义链不配对,并且至多6个连续的3'-末端核苷酸与有义链不配对,由此形成1-6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'-末端包括10-30个与有义链不配对的连续核苷酸,由此形成10-30个核苷酸的单链5'突出端;其中当有义链和反义链对准以获得最大互补性时,至少有义链5'-末端和3'-末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,由此在有义链与反义链之间形成基本上双链的区域;并且反义链沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸与靶RNA充分互补,以在将所述双链核酸引入哺乳动物细胞中时减少靶基因表达;并且其中反义链含有至少一个热去稳定核苷酸,其中至少一个热去稳定核苷酸在反义链的种子区(即反义链5'-端的位置2至9)中。例如,热去稳定核苷酸出现在与有义链5'-端的位置14至17相对或互补的位置之间,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个):(i)反义链包含2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)反义链包含1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;

(iii) 有义链与配体缀合; (iv) 有义链包含2个、3个、4个或5个2'-氟修饰; (v) 有义链包含1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; 和 (vi) dsRNA 包含至少四个2'-氟修饰; 以及 (vii) dsRNA 包含长度为12-30个核苷酸对的双链体区。

[0447] 在一些实施方案中, 本公开的dsRNA分子包括有义链和反义链, 其中所述dsRNA分子包括长度为至少25个且最多29个核苷酸的有义链和长度为最多30个核苷酸的反义链, 其中有义链包括在5'端的位置11处易受酶降解的修饰的核苷酸, 其中所述有义链的3'-端和所述反义链的5'-端形成钝端, 并且所述反义链在其3'-端比有义链长1-4个核苷酸, 其中长度为至少25个核苷酸的双链体区, 和所述反义链沿着所述反义链长度的至少19nt与靶mRNA充分互补以在将所述dsRNA分子引入哺乳动物细胞中时降低靶基因表达, 并且其中所述dsRNA的dicer切割优先地产生包括所述反义链的所述3'-端的siRNA, 由此减少哺乳动物中靶基因的表达, 其中反义链含有至少一个热去稳定核苷酸, 其中所述至少一个热去稳定核苷酸在反义链的种子区(即反义链5'端的位置2至9)中, 并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如, 一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个): (i) 反义包含2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰; (ii) 反义包含1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; (iii) 有义链与配体缀合; (iv) 有义链包含2个、3个、4个或5个2'-氟修饰; (v) 有义链包含1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; 和 (vi) dsRNA 包含至少四个2'-氟修饰; 以及 (vii) dsRNA 具有长度为12-29个核苷酸对的双链体区。

[0448] 在一些实施方案中, dsRNA分子的有义链和反义链中的每个核苷酸可以是修饰的。每个核苷酸可以用相同或不同的修饰进行修饰, 其可以包括非连接磷酸酯氧之一或两者或者连接磷酸酯氧的一个或多个中的一种或多种改变; 核糖成分的改变, 例如, 核糖上2'羟基的改变; 用“去磷酸”接头大批量替代磷酸酯部分; 天然存在的碱基的修饰或替换; 以及核糖-磷酸酯主链的替代或修饰。

[0449] 由于核酸是亚单元的聚合物, 许多修饰存在于核酸内重复的位置, 例如碱基的修饰, 或磷酸酯部分, 或磷酸酯部分的非连接O。在一些情况下, 修饰存在于核酸中的所有所述位置, 但在许多情况下其不是。举例来说, 修饰可以仅存在于3'或5'末端位置, 可以仅存在于末端区域中, 例如, 在末端核苷酸上的位置或在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中。修饰可以存在于双链区、单链区或两者中。修饰可以只存在于RNA的双链区中, 或可以仅存在于RNA的单链区中。例如, 非连接O位置处的硫代磷酸酯修饰可以仅存在于一个或两个末端处, 可以仅存在于末端区域中, 例如, 在末端核苷酸上的位置处或在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中, 或可以存在于双链和单链区中, 特别是在末端处。一个或多个5'-端可以被磷酸化。

[0450] 例如, 为增强稳定性, 可以在突出端中包含特定的碱基, 或在单链突出端中, 例如在5'或3'突出端中或在两者中包含修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如, 在突出端中包含嘌呤核苷酸可能是期望的。在一些实施方案中, 3'或5'突出端中的所有或一些碱基可以被修饰, 例如, 通过本文所描述的修饰。修饰可以包含, 例如使用本领域已知的修饰在核糖的2'位置处的修饰, 例如, 用脱氧核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基修饰代替核碱基的核糖, 以及磷酸酯基团的修饰, 例如硫代磷酸酯修饰。突出端不需要与靶序列同源。

[0451] 在一些实施方案中, 有义链和反义链的每一残基独立地用LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧或2'-氟修饰。链可以含有多于一

个修饰。在一些实施方案中,有义链和反义链的每个残基独立地用2'-O-甲基或2'-氟进行修饰。应理解,这些修饰是在反义链中存在的双链体的至少一个热去稳定修饰之外的。

[0452] 在有义链和反义链上通常存在至少两种不同的修饰。这两种修饰可以是2'-脱氧、2'-O-甲基或2'-氟修饰、无环核苷酸或其它修饰。在一些实施方案中,有义链和反义链各自包含选自2'-O-甲基或2'-脱氧的两种不同修饰的核苷酸。在一些实施方案中,有义链和反义链的每个残基独立地用2'-O-甲基核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核苷酸、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)核苷酸、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAE)核苷酸、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)核苷酸或2'-ara-F核苷酸进行修饰。同样,应理解,这些修饰是在反义链中存在的双链体的至少一个热去稳定修饰之外的。

[0453] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含交替模式的修饰,特别是在B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4'区域中。如本文所使用的,术语“交替基序”或“交替模式”是指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰存在于一条链的交替核苷酸上。交替核苷酸可以指每隔一个核苷酸一个或每三个核苷酸一个,或为类似的模式。例如,如果A、B和C各自表示对核苷酸的一种类型的修饰,则交替基序可以是“ABABABABABAB...”、“AABBAABBAABB...”、“AABAABAABAAB...”、“AAABAAABAAAB...”、“AAABBBAAABBB...”或“ABCABCABCABC...”等。

[0454] 包含在交替基序中的修饰的类型可以是相同的或不同的。例如,如果A、B、C、D各自表示核苷酸上的一种修饰类型,则交替模式(即每隔一个核苷酸上的修饰)可以是相同的,但有义链或反义链各自可以选自交替基序内的若干种修饰可能性,如“ABABAB...”、“ACACAC...”、“BDBDBD...”或“CDCDCD...”等。

[0455] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含相对于反义链上的交替基序的修饰模式,有义链上交替基序的修饰模式是偏移的。偏移可以使得有义链的核苷酸的修饰基团对应于反义链的核苷酸的不同修饰的基团,反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双链体中的反义链配对时,有义链中的交替基序可以从链的5'-3'以“ABABAB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区域内从链的3'-5'以“BABABA”开始。作为另一个实例,有义链中的交替基序可以从链的5'-3'以“AABBAABB”开始,并且反义链中的交替基序在双链体区域内可以从链的3'-5'以“BBAABBAA”开始,因此在有义链与反义链之间存在修饰模式的完全或部分转移。

[0456] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序从链的5'-3'为“ABABAB”,其中各A为未修饰的核糖核苷酸且各B为2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0457] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序从链的5'-3'为“ABABAB”,其中各A为2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸且各B为2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0458] 在另一特定实例中,反义链中的交替基序从链的3'-5'为“BABABA”,其中各A为2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸且各B为2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0459] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序从链的5'-3'为“ABABAB”且反义链中的交替基序从链的3'-5'为“BABABA”,其中各A为未修饰的核糖核苷酸且各B为2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0460] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序从链的5'-3'为“ABABAB”且反义链的交替基序从链的3'-5'为“BABABA”,其中各A为2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸且各B为2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0461] 本公开的dsRNA分子可以进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰可以于链的任何位置中存在于有义链或反义链或两条链的任何核苷酸上。例如,核苷酸间键修饰可以存在于有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个核苷酸间键修饰可以在有义链或反义链上以交替模式存在;或有义链或反义链以交替模式包含两种或更多种核苷酸间键修饰。有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上核苷酸间键修饰的交替模式可以相对于反义链上核苷酸间键修饰的交替模式具有偏移。

[0462] 在一些实施方案中,dsRNA分子包含突出端区域中的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,突出端区域包括两个核苷酸,所述两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。还可以进行核苷酸间键修饰以将突出端核苷酸与双链体区内的末端配对核苷酸连接。例如,至少2个、3个、4个或所有突出端核苷酸可以通过硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接,并且任选地,可以存在将突出端核苷酸与紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸连接的另外的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。例如,在末端三个核苷酸之间可能存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中该三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个是与突出端核苷酸相邻的配对核苷酸。任选地,这些末端三个核苷酸可以位于反义链的3'-端处。

[0463] 在一些实施方案中,dsRNA分子的有义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个磷酸酯核苷酸间键分隔的两个至十个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的1-10个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述有义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0464] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个或18个磷酸酯核苷酸间键分隔的两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0465] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个磷酸酯核苷酸间键分隔的三个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0466] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个或14个磷酸酯核苷酸间键分隔的四个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0467] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个磷酸酯核苷酸间键分隔的五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0468] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个磷酸酯核苷酸间键分隔的六个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0469] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个磷酸酯核苷酸间键分隔的七个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0470] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个、4个、5个或6个磷酸酯核苷酸间键分隔的八个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0471] 在一些实施方案中,dsRNA分子的反义链包含由1个、2个、3个或4个磷酸酯核苷酸间键分隔的九个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个区块,其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0472] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子进一步包含有义或反义链的末端位置1至10内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸可以通过有义或反义链的一端或两端处的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接。

[0473] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义或反义链各自的双链体内部区域的1至10内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸可以通过从有义链的5'-端计数的双链体区的位置8至16处的硫代磷酸酯甲基膦酸酯核苷酸间键连接;dsRNA分子可以任选地进一步包含末端位置的1至10内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。

[0474] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子进一步包含有义链的位置1至5内的一至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰(从5'-端计数),以及反义链的位置1和2处的一至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一至五个(从5'-端计数)。

[0475] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子进一步包含有义链的位置1至5内的一个

硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及反义链的位置1或2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0476] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含反义链的5'端的第1与第2核苷酸之间及第2与第3核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含反义链的3'端的第1与第2核苷酸之间及第2与第3核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含反义链的5'端和3'端的第1与第2核苷酸之间及第2与第3核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0477] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含反义链的5'端的第1与第2核苷酸之间及第2与第3核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0478] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含有义链的5'端的第1与第2核苷酸之间及第2与第3核苷酸之间,以及反义链的5'端和3'端的第1与第2核苷酸之间及第2与第3核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0479] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含反义链的5'端的第1与第2核苷酸之间、第2与第3核苷酸之间及第3与第4核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,反义链的3'端的第1与第2核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及有义链的5'端和3'端的第1与第2核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0480] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0481] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0482] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0483] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0484] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0485] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷

酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0486] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0487] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0488] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0489] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0490] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置20和21的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0491] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置20和21的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0492] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21和22的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0493] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21和22的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0494] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置22和23的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0495] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子还包含在有义链的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置21的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端计数),以及在反义链的位置1和2的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰及在位置23和23的两个硫代磷酸酯核

核苷酸间键修饰(从5'端计数)。

[0496] 在一些实施方案中,本公开的化合物包括主链手性中心的模式。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少5个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少6个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少7个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少8个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少9个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少10个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少11个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少12个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少13个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少14个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少15个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少16个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少17个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少18个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少19个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过8个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过7个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过6个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过5个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过4个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过3个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过2个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Rp构型的不超过1个核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过8个非手性的核苷酸间键(作为非限制性实例,磷酸二酯)。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过7个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过5个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过4个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过3个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过2个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括不超过1个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少10个核苷酸间键和不超过8个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少11个核苷酸间键和不超过7个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少12个核苷酸间键和不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少13个核苷酸间键和不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少14个核苷酸间键和不超过5个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,主链手性中心的常见模式包括Sp构型的至少15个核苷酸间键和不超过4个非手性的核苷酸间键。在一些实施方案中,Sp构型的核苷酸间键任选地

是连续的或不连续的。在一些实施方案中,Rp构型的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。在一些实施方案中,非手性的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。

[0497] 在一些实施方案中,本公开的化合物包含作为立体化学区块的区块。在一些实施方案中,区块是Rp区块,其中区块的每个核苷酸间键是Rp。在一些实施方案中,5'-区块是Rp区块。在一些实施方案中,3'-区块是Rp区块。在一些实施方案中,区块是Sp区块,其中区块的每个核苷酸间键是Sp。在一些实施方案中,5'-区块是Sp区块。在一些实施方案中,3'-区块是Sp区块。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包括Rp和Sp区块两者。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包括一个或多个Rp区块但不包括Sp区块。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包括一个或多个Sp区块但不包括Rp区块。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包括一个或多个P0区块,其中每个核苷酸间键是天然磷酸酯键。

[0498] 在一些实施方案中,本公开的化合物包括作为Sp区块的5'-区块,其中每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施方案中,5'-区块是Sp区块,其中每个核苷酸间键是修饰的核苷酸间键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施方案中,5'-区块是Sp区块,其中每个核苷酸间键是硫代磷酸酯键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施方案中,5'-区块包括4个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,5'-区块包括5个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,5'-区块包括6个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,5'-区块包括7个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,3'-区块是Sp区块,其中每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施方案中,3'-区块是Sp区块,其中每个核苷酸间键是修饰的核苷酸间键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施方案中,3'-区块是Sp区块,其中每个核苷酸间键是硫代磷酸酯键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施方案中,3'-区块包括4个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,3'-区块包括5个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,3'-区块包括6个或更多个核苷单元。在一些实施方案中,3'-区块包括7个或更多个核苷单元。

[0499] 在一些实施方案中,本公开的化合物在一个区域中包括一种类型的核苷,或寡核苷酸之后是特定类型的核苷酸间键,例如天然磷酸酯键、修饰的核苷酸间键、Rp手性核苷酸间键、Sp手性核苷酸间键等。在一些实施方案中,A之后是Sp。在一些实施方案中,A之后是Rp。在一些实施方案中,A之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施方案中,U之后是Sp。在一些实施方案中,U之后是Rp。在一些实施方案中,U之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施方案中,C之后是Sp。在一些实施方案中,C之后是Rp。在一些实施方案中,C之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施方案中,G之后是Sp。在一些实施方案中,G之后是Rp。在一些实施方案中,G之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施方案中,C和U之后是Sp。在一些实施方案中,C和U之后是Rp。在一些实施方案中,C和U之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施方案中,A和G之后是Sp。在一些实施方案中,A和G之后是Rp。

[0500] 在一些实施方案中,反义链包括核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链5'端的位置2至9)中的双链体的至少一个热去稳定修饰,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部八个):(i)反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)反义包括3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(iii)有义链与配体缀合;(iv)有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(v)有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(vi)dsRNA包括至少四个2'-氟修饰;(vii)dsRNA

包括长度为12-40个核苷酸对的双链体区;以及(viii)dsRNA在反义链的5'端具有钝端。

[0501] 在一些实施方案中,反义链包括核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链5'端的位置2至9)中的双链体的至少一个热去稳定修饰,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部八个):(i)反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)有义链与配体和/或亲脂性部分缀合;(iii)有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(iv)有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(v)dsRNA包括至少四个2'-氟修饰;(vi)dsRNA包括长度为12-40个核苷酸对的双链体区;(vii)dsRNA包括长度为12-40个核苷酸对的双链体区;以及(viii)dsRNA在反义链的5'端具有钝端。

[0502] 在一些实施方案中,有义链包括核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链5'端的位置2至9)中的双链体的至少一个热去稳定修饰,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部八个):(i)反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)反义包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(iii)有义链与配体和/或亲脂性部分缀合;(iv)有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(v)有义链包括3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(vi)dsRNA包括至少四个2'-氟修饰;(vii)dsRNA包括长度为12-40个核苷酸对的双链体区;以及(viii)dsRNA在反义链的5'端具有钝端。

[0503] 在一些实施方案中,有义链包括核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,反义链包括核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链5'端的位置2至9)中的双链体的至少一个热去稳定修饰,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个):(i)反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)有义链与配体和/或亲脂性部分缀合;(iii)有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(iv)述有义链包括3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(v)dsRNA包括至少四个2'-氟修饰;(vi)dsRNA包括长度为12-40个核苷酸对的双链体区;以及(vii)dsRNA在反义链的5'端具有钝端。

[0504] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包含与靶标、在双链体内或其组合的错配。错配可以存在于突出端区域或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或解链的倾向进行排序(例如,根据特定配对的缔合或解离的自由能,最简单的方法是单个对地检查配对,尽管也可以使用近邻或类似分析)。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C优于G:C(I=肌苷)。错配,例如非规范或规范外配对(如本文其它地方所述)优于规范(A:T、A:U、G:C)配对;并且包含通用碱基的配对优于规范配对。

[0505] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子包括从反义链的5'端的双链体区内前1个、2个、3个、4个或5个碱基对中的至少一个,其可以独立地选自:A:U、G:U、I:C和错配对,例如非规范或规范外配对或包含通用碱基的配对,以促进双链体5'端处反义链的解离。

[0506] 在一些实施方案中,反义链中从5'端的双链体区内1位的核苷酸选自A、dA、dU、U和dT。可选地,反义链5'端的双链体区内前1个、2个或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例

如,反义链5'端的双链体区内的第一碱基对是AU碱基对。

[0507] 发现了在单链或双链寡核苷酸的任何位置,将4'-修饰的或5'-修饰的核苷酸引入二核苷酸的磷酸二酯(P0)、硫代磷酸酯(PS)或二硫代磷酸酯(PS2)键的3'-端可以对核苷酸间键施加空间效应,并且因此保护或稳定其免受核酸酶的作用。

[0508] 在一些实施方案中,5'-修饰的核苷在单链或双链siRNA的任何位置处二核苷酸的3'端引入。例如,可以在单链或双链siRNA的任何位置处二核苷酸的3'端引入5'-烷基化核苷。核糖的5'位置处的烷基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。示例性5'-烷基化核苷是5'-甲基核苷。5'-甲基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。

[0509] 在一些实施方案中,在单链或双链siRNA的任何位置处二核苷酸的3'端引入4'-修饰的核苷。例如,可以在单链或双链siRNA的任何位置处二核苷酸的3'端引入4'-烷基化核苷。核糖的4'位置处的烷基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。示例性4'-烷基化核苷是4'-甲基核苷。4'-甲基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。可选地,可以在单链或双链siRNA的任何位置处二核苷酸的3'端引入4'-O-烷基化核苷。核糖的4'-O-烷基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。示例性4'-O-烷基化核苷是4'-O-甲基核苷。4'-O-甲基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。

[0510] 在一些实施方案中,在dsRNA的有义链或反义链上的任何位置处引入5'-烷基化核苷,并且此类修饰维持或提高dsRNA的效力。5'-烷基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。示例性5'-烷基化核苷是5'-甲基核苷。5'-甲基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。

[0511] 在一些实施方案中,在dsRNA的有义链或反义链上的任何位置处引入4'-烷基化核苷,并且此类修饰维持或提高dsRNA的效力。4'-烷基可以是外消旋的或手性纯R或S异构体。示例性4'-烷基化核苷是4'-甲基核苷。4'-甲基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。

[0512] 在一些实施方案中,在dsRNA的有义链或反义链上的任何位置处引入4'-O-烷基化核苷,并且此类修饰维持或提高dsRNA的效力。5'-烷基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。示例性4'-O-烷基化核苷是4'-O-甲基核苷。4'-O-甲基可以是外消旋的或者手性纯R或S异构体。

[0513] 在一些实施方案中,本公开的dsRNA分子可以包括2'-5'键(具有2'-H、2'-OH和2'-OMe,并且具有P=O或P=S)。例如,2'-5'键修饰可以用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合,或可以用于有义链的5'端以避免通过RISC的有义链激活。

[0514] 在另一个实施方案中,本公开的dsRNA分子可以包括L糖(例如,具有2'-H、2'-OH和2'-OMe的L-核糖、L-阿拉伯糖)。例如,这些L糖修饰可以用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合,或可以用于有义链的5'端以避免通过RISC的有义链激活。

[0515] 各种公开描述了多聚体siRNA,其都可以用于本公开的dsRNA。此类公开包含W02007/091269、US 7858769、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887和W02011/031520,其特此通过引用整体并入。

[0516] 配体和/或亲脂性部分可经由载体附接至多核苷酸。示例性载体包括(i)至少一个“主链附接点”,优选地两个“主链附接点”以及(ii)至少一个“系链附接点”。如本文所使用的,“主链附接点”是指官能团,例如羟基,或通常是可用于并适合将载体并入到主链中的键,例如核糖核酸的磷酸酯或修饰的磷酸酯(例如,含硫)主链。在一些实施方案中,“系链附

接点”(TAP)是指连接所选部分的环状载体的组成环原子,例如碳原子或杂原子(不同于提供主链附接点的原子)。该部分可以是例如亲脂性烷基基团,任选地C16亲脂性部分。任选地,选择的部分通过插入系链与环状载体连接。因此,环状载体可包括官能团,例如氨基,或通常提供适合于并入或系留另一个化学实体(例如,至组成环的配体和/或亲脂性部分)的键。

[0517] RNAi剂可以通过载体与配体和/或亲脂性部分缀合,其中载体可以是环状基团或无环基团。任选地,环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。任选地,无环基团选自丝氨酸主链或二乙醇胺主链。

[0518] 在某些具体实施方案中,用于本公开的方法中的RNAi剂为选自表2或3所列试剂的药剂。这些试剂可还包含配体,如一个或多个亲脂性部分。

[0519] III. 与配体缀合的iRNA

[0520] 本公开iRNA的RNA的另一种修饰涉及将一种或多种配体、部分或缀合物与iRNA化学连接,所述配体、部分或缀合物增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取(例如,到细胞中)。此类部分包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acid.Sci.USA,1989,86:6553-6556),胆酸(Manoharan等人,Biorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053-1060),硫醚,例如,己基(beryl)-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306-309;Manoharan等人,Biorg.Med.Chem.Lett.,1993,3:2765-2770),硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20:533-538),脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO J,1991,10:1111-1118;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259:327-330;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75:49-54),磷脂,例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基-铵1,2-二-0-十六烷基-rac-甘油-3-磷酸酯(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777-3783),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969-973)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654),棕榈基部分(Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229-237),或十八烷基胺或己基氨基-羧基胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923-937)。

[0521] 在某些实施方案中,配体改变其并入的iRNA剂的分布、靶向或寿命。在一些实施方案中,例如,与不存在此类配体的种类相比,配体为选择的靶标(例如,分子、细胞或细胞类型)、区室(例如,细胞或器官区室、组织、器官或身体区域)提供增强的亲和力。典型的配体不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0522] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,右旋糖酐、支链淀粉、几丁质、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸);或脂质。配体也可以是重组或合成分子,如合成聚合物,例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括作为聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷腈的聚氨基酸。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、

精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0523] 配体还可以包含靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质(例如,抗体),其与指定细胞类型(如肾细胞)结合。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白糖、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化多氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双磷酸酯、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素或者RGD肽或RGD肽模拟物。在某些实施方案中,配体是多价半乳糖,例如,N-乙酰基-半乳糖胺。

[0524] 配体的其它实例包括染料、嵌入剂(例如,吖啶)、交联剂(例如,补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨卟啉(texaphyrin)、Sapphyrin)、多环芳香族烃(例如,吩噻、二氢吩噻)、人工核酸内切酶(例如,EDTA)、亲脂性分子(例如,胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪,及肽缀合物(例如,触足肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射标记的标志物、酶、半抗原(例如,生物素)、转运/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环化合物的Eu³⁺络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0525] 配体可以是蛋白质(例如,糖蛋白)或肽(例如,对共配体具有特异性亲和力的分子)或抗体(例如,与特定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体)。配体还可以包括激素和激素受体。配体还可以包括非肽物质,如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38 MAP激酶的激活剂或NF- κ B的激活剂。

[0526] 配体可以是例如通过破坏细胞的细胞骨架,例如通过破坏细胞的微管、微丝或中间丝来增加iRNA剂摄取到细胞中的物质,例如药物。药物可以是例如紫杉醇(taxol)、长春新碱、长春花碱、细胞松弛素、诺考达唑、杰斯内酯(japlakinolide)、拉春库林A、毒伞素、斯文赫利A(swinholide A)、印丹诺辛(indanocine)或麦司文(myoservin)。

[0527] 在一些实施方案中,与如本文所描述的iRNA连接的配体用作药代动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲脂体、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬、维生素E、生物素。还已知包含多个硫代磷酸酯键的寡核苷酸与血清蛋白结合,因此在主链中包含多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸(例如,具有约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸)也适于本公开作为配体(例如,作为PK调节配体)。另外,结合血清组分(例如,血清蛋白)的适体也适合用作本文所描述的实施方案中的PK调节配体。

[0528] 本公开的配体缀合的iRNA可以通过使用携带侧接反应性官能团的寡核苷酸来合成,如源自连接分子连接到寡核苷酸上的寡核苷酸(如下文所描述的)。这种反应性寡核苷酸可以直接与可商购的配体、合成的带有多种保护基团中的任一种的配体或具有与其连接

的连接部分的配体反应。

[0529] 本公开的缀合物中使用的寡核苷酸可以通过众所周知的固相合成技术方便且常规地制备。用于此类合成的设备由几个供应商销售,例如,包括Applied Biosystems® (Foster City, Calif.)。可以另外或可选地采用本领域已知的用于此类合成的任何其它方式。使用类似技术来制备其它寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化的衍生物)也是已知的。

[0530] 在本公开的配体缀合的寡核苷酸和带有序列特异性连接的核苷的配体-分子中,寡核苷酸和寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体或已经带有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体、已带有配体分子的配体-核苷酸或核苷缀合物前体或带有非核苷配体的构建块在合适的DNA合成仪上组装。

[0531] 当使用已带有连接部分的核苷酸缀合物前体时,通常完成序列特异性连接核苷的合成,并且然后配体分子与连接部分反应以形成配体缀合的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸或连接的核苷使用源自配体-核苷缀合物的亚磷酰胺以及可商购的和常规用于寡核苷酸合成的标准亚磷酰胺和非标准亚磷酰胺通过自动合成仪合成。

[0532] A. 脂质缀合物

[0533] 在某些实施方案中,配体或缀合物是脂质或基于脂质的分子。此类脂质或基于脂质的分子通常可以与血清蛋白,如人血清白蛋白(HSA)结合。HSA结合配体允许缀合物分布到靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是CNS的组织,例如脑的组织。可以结合HSA的其它分子也可以用作配体。例如,可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加对缀合物降解的抗性,(b)增加靶向或转运到靶细胞或细胞膜中,或(c)可以用于调节与血清蛋白,例如HSA的结合。

[0534] 基于脂质的配体可以用于调节,例如控制(例如,抑制)缀合物与靶组织的结合。例如,更强烈地结合HSA的脂质或基于脂质的配体较不可能被靶向到肾脏,并且因此较不可能从身体清除。较不强烈地与HSA结合的脂质或基于脂质的配体可以用于将缀合物靶向到肾脏。

[0535] 在某些实施方案中,基于脂质的配体与HSA结合。例如,配体可以以足够的亲和力与HSA结合,使得增强缀合物在非肾组织中的分布。然而,亲和力通常不会强到HSA配体结合不能被逆转。

[0536] 在某些实施方案中,基于脂质的配体与HSA微弱地结合或根本不结合,使得增强缀合物在肾脏中的分布。靶向到肾细胞的其它部分也可以代替基于脂质的配体或在其之外使用。

[0537] 在另一方面,配体是被靶细胞(例如,增殖细胞)摄取的部分,例如维生素。这些对于治疗以不期望的细胞增殖为特征的疾病特别有用,例如恶性或非恶性类型的,例如癌细胞。示例性维生素包括维生素A、E和K。包括的其它示例性维生素是B族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或其它维生素或被癌细胞摄取的营养素。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0538] B. 细胞渗透剂

[0539] 在另一方面,配体是细胞渗透剂,如螺旋细胞渗透剂。在某些实施方案中,药剂为两亲性的。示例性药剂为肽,如tat或触足肽。如果药剂为肽,其可以被修饰,包括肽基模拟物、反演体、非肽或假肽连接和使用D-氨基酸。螺旋剂通常是 α -螺旋剂,并且可以具有亲脂

性和疏脂性相。

[0540] 配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的所定义三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA剂的连接可能影响iRNA的药代动力学分布,如通过增强细胞识别和吸收。肽或肽模拟物部分的长度可以为约5-50个氨基酸长,例如约5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸长。

[0541] 肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲性肽或疏水肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状体肽、约束肽或交联肽。在另一个替代方案中,肽部分可以包含疏水性膜易位序列(MTS)。示例性疏水性含MTS肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:9)的RFGF。含疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:10))也可以是靶向部分。肽部分可以是“递送”肽,其可以携带包括肽、寡核苷酸和蛋白质的跨细胞膜的大极性分子。例如,来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:11))和果蝇触足蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:12))的序列已被发现能够起到递送肽的作用。肽或肽模拟物可以由DNA的随机序列编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam等人,Nature,354:82-84,1991)。通常,通过掺入的单体单元栓系至dsRNA剂的肽或肽模拟物是细胞靶向肽,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可以在约5个氨基酸至约40个氨基酸的范围内。肽部分可以具有结构修饰,如提高稳定性或指导构象特性。可以使用下面描述的任何结构修饰。

[0542] 用于本公开的组合物和方法的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如糖基化或甲基化,以促进靶向特定组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包含D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD外,还可以使用靶向整合素配体的其它部分。此配体的优选的缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

[0543] RGD肽部分可以用于靶向特定细胞类型,例如肿瘤细胞,如内皮肿瘤细胞或乳腺癌肿瘤细胞(Zitzmann等人,Cancer Res.,62:5139-43,2002)。RGD肽可以促进dsRNA剂靶向多种其它组织的肿瘤,包括肺、肾、脾或肝(Aoki等人,Cancer Gene Therapy 8:783-787,2001)。通常,RGD肽促进iRNA剂靶向肾。RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如糖基化或甲基化,以促进靶向特定组织。例如,糖基化RGD肽可以将iRNA剂递送到表达 $\alpha_v\beta_3$ 的肿瘤细胞(Haubner等人,Jour.Nucl.Med.,42:326-336,2001)。

[0544] “细胞渗透肽”能够渗透细胞,例如微生物细胞(如细菌或真菌细胞)或哺乳动物细胞(如人细胞)。微生物细胞渗透肽可以是例如 α -螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如, α -防御素、 β -防御素或牛抗菌肽(bactenecin))或仅含有一种或两种主要氨基酸的肽(例如,PR-39或吲哚西丁(indolicidin))。细胞渗透肽还可以包含核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二分两亲性肽,如MPG,其源自HIV-1gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS(Simeoni等人,Nucl.Acids Res.31:2717-2724,2003)。

[0545] C. 接头

[0546] 在一些实施方案中,本文所描述的缀合物或配体可以使用各种可以是可切割的或不可切割的接头与iRNA寡核苷酸连接。

[0547] 术语“接头”或“连接基团”意指连接化合物的两个部分的有机部分,例如,共价连接化合物的两个部分。接头通常包括直接键或原子,如氧或硫;单元,如NR₈、C(O)、C(O)NH、

S₀、S₀₂、S₀₂NH或原子链,例如但不限于取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基、取代的或未取代的炔基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳烷基、烷基芳烯基、烷基芳炔基、烯基芳烷基、烯基芳烯基、烯基芳炔基、炔基芳烷基、炔基芳烯基、炔基芳炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环烷基、烷基杂环基烯基、烷基杂环基炔基、烯基杂环基烷基、烯基杂环基烯基、烯基杂环基炔基、炔基杂环基烷基、炔基杂环基烯基、炔基杂环基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基,该一个或多个亚甲基可以被以下中断或封端:O、S、S(O)、S₀₂、N(R₈)、C(O)、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的杂芳基、取代的或未取代的杂环基;其中R₈是氢、酰基、脂肪族或取代的脂肪族。在某些实施方案中,接头介于约1-24个原子、2-24个、3-24个、4-24个、5-24个、6-24个、6-18个、7-18个、8-18个原子、7-17个、8-17个、6-16个、7-16个或8-16个原子的长度。

[0548] 可切割连接基团是在细胞外部充分稳定的连接基团,但其在进入靶细胞之后切割以释放接头将其保持在一起的两个部分。在优选实施方案中,可切割连接基团在靶细胞中或在第一参考条件(其可以例如被选择以模拟或代表细胞内条件)下的切割比在受试者的血液中或在第二参考条件(其可以例如被选择以模拟或代表在血液或血清中发现的条件)下的切割速度快至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少约100倍。

[0549] 可切割连接基团易受切割剂(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)影响。一般来说,切割剂在细胞内部比在血清或血液中更普遍,或以更高的水平或活性找到。此类降解剂的实例包括:针对特定底物选择的或不具有底物特异性的氧化还原剂,包括例如存在于细胞中的氧化或还原酶或还原剂,如硫醇,其可以通过还原降解氧化还原可切割连接基团;酯酶;可以产生酸性环境的核内体或试剂,例如,产生pH为五或更低的那些;可以通过充当广义酸来水解或降解酸可切割连接基团的酶、肽酶(其可以是底物特异性的)和磷酸酶。

[0550] 可切割键基团,如二硫键可能对pH敏感。人血清的pH为7.4,而平均细胞内pH略低,范围为约7.1-7.3。核内体具有更酸性的pH,范围为5.5-6.0,并且溶酶体具有甚至更酸性的pH,为约5.0。一些接头具有可切割连接基团,其在优选的pH下切割,由此从细胞内的配体释放阳离子脂质,或释放到细胞的期望的区室中。

[0551] 接头可以包含可由特定酶切割的可切割连接基团。并入到接头中的可切割连接基团的类型可以取决于待靶向的细胞。

[0552] 一般而言,可以通过测试降解剂(或条件)切割候选连接基团的能力来评价候选可切割连接基团的适合性。还希望的是也测试候选可切割连接基团抵抗在血液、脑脊液(CSF)中或当与其它非靶组织接触时切割的能力。因此,可以确定在第一条件与第二条件之间对切割的相对易感性,其中选择第一条件以指示靶细胞中的切割,并且选择第二条件以指示其它组织或生物流体,例如血液或血清中的切割。评价可以在无细胞系统、在细胞、在细胞培养物、在器官或组织培养物或在整只动物中进行。在无细胞或培养条件下进行初始评价并且通过在整只动物中进一步评价来确认可能是有用的。在优选实施方案中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的切割比在CSF、血液或血

液中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)的切割速度快至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。

[0553] i. 氧化还原可切割连接基团

[0554] 在某些实施方案中,可切割连接基团是在还原或氧化时切割的氧化还原可切割连接基团。可还原切割连接基团的实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定候选可切割连接基团是否是合适的“可还原切割连接基团”,或例如是否适合与特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以参考本文所描述的方法。例如,可以通过使用本领域已知的试剂与二硫苏糖醇(DTT)或其它还原剂一起温育来评估候选物,这模拟在细胞(例如,靶细胞)中观察到的切割速率。候选物还可以在被选择以模拟血液或血清条件的条件下评价。在一个实施方案中,候选化合物在血液中被切割至多约10%。在其它实施方案中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的降解比在血液中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)的切割速度的至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。候选化合物的切割速率可以使用标准酶动力学测定在被选择以模拟细胞内介质的条件下确定并且与被选择以模拟细胞外介质的条件进行比较。

[0555] ii. 基于磷酸酯的可切割连接基团

[0556] 在某些实施方案中,可切割接头包括基于磷酸酯的可切割连接基团。基于磷酸酯的可切割连接基团被降解或水解磷酸酯基团的试剂切割。在细胞中切割磷酸酯基团的试剂的实例为细胞中的酶,如磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例为-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-。优选实施方案是-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-。优选实施方案是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

[0557] iii. 酸可切割连接基团

[0558] 在某些实施方案中,可切割接头包括酸可切割连接基团。酸可切割连接基团是在酸性条件下被切割的连接基团。在优选实施方案中,酸可切割连接基团在pH为约6.5或更低(例如,约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的酸性环境中或通过可以充当广义酸的试剂(如酶)切割。在细胞中,特定低pH细胞器,如核内体和溶酶体可以提供用于酸可切割连接基团的切割环境。酸可切割连接基团的实例包括但不限于脞、酯和氨基酸的酯。酸可切割基团可以具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。优选实施方案是与酯的氧连接的碳(烷氧基)为芳基、取代的烷基或叔烷基如二甲基戊基或叔丁基的情况。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

[0559] iv. 基于酯的可切割连接基团

[0560] 在某些实施方案中,可切割接头包括基于酯的可切割连接基团。基于酯的可切割连接基团通过细胞中的酶如酯酶和酰胺酶切割。基于酯的可切割连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基和亚炔基的酯。酯可切割连接基团具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

[0561] v. 基于肽的可切割连接基团

[0562] 在又一个实施方案中,可切割接头包括基于肽的可切割连接基团。基于肽的可切割连接基团通过细胞中的酶如肽酶和蛋白酶切割。基于肽的可切割连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可切割基团不包含酰胺基(-C(O)NH-)。酰胺基可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽和蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽的切割基团通常限于在产生肽和蛋白质的氨基酸之间形成的肽键(即酰胺键)而不包括整个酰胺官能团。基于肽的可切割连接基团具有通式-NHCH₂RA-C(O)NHCH₂RB-C(O)-,其中RA和RB为两个相邻氨基酸的R基团。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

[0563] 在本公开的上下文中,“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”是iRNA化合物,任选地dsRNA剂,其含有两个或更多个化学上不同的区域,每个区域由至少一个单体单元构成,即在dsRNA化合物的情况下的核苷酸。这些iRNA通常含有至少一个区,其中RNA被修饰以赋予iRNA对核酸酶降解的增加的抗性、增加的细胞摄取或增加的对靶核酸的结合亲和力。iRNA的另外的区可以用作能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂合体的酶的底物。举例来说,RNase H是细胞核酸内切酶,其切割RNA:DNA双链体的RNA链。因此,RNase H的激活导致RNA靶标的切割,由此大大增强基因表达的iRNA抑制的效率。因此,与杂交于同一靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,当使用嵌合dsRNA时,使用更短的iRNA通常可以获得相当的结果。可以通过凝胶电泳和必要时本领域已知的相关核酸杂交技术常规地检测RNA靶标的切割。

[0564] 在某些情况下,iRNA的RNA可以被非配体基团修饰。多个非配体分子与iRNA缀合以增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且进行此类缀合的程序可在科学文献中获得。此类非配体部分包含脂质部分,如胆固醇(Kubo,T.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2007,365(1):54-61;Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:6553),胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053),硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3:2765),硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20:533),脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO J.,1991,10:111;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259:327;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75:49),磷脂,例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-rac-甘油-3-H-磷酸酯(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651),棕榈基部分(Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229),或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923)。上面列出了教导制备此类RNA缀合物的代表性美国专利。典型的缀合方案涉及合成在序列的一个或多个位置处带有氨基接头的RNA。随后使用适当偶联或激活试剂使氨基与所缀合的分子反应。缀合反应可以在RNA仍与固相载体结合的情况下或在RNA切割之后在溶液相中进行。通过HPLC纯化RNA缀合物通常产生纯缀合物。

[0565] IV. SNCA敲低的体内测试

[0566] 多种 α -突触核蛋白PD动物模型可获得(Gómez-Benito et al.Front

Pharmacol.11:356)。大量PD啮齿动物PD模型依赖于脑内或全身性施用 α -突触核蛋白预形成原纤丝(PFF)或含有源自展现 α -突触核蛋白病理学的PD患者或转基因小鼠的路易氏体和 α -突触核蛋白的脑提取物。与SNCA RNAi剂的评估更相关,已经制成PD的遗传模型。过表达SNCA基因的重组腺相关病毒载体(rAAV)用于PD建模:利用rAAV过表达野生型 α -突触核蛋白或PD-相关突变体(A53T或A30P α -突触核蛋白)描述为导致黑质致密带(SNc)中多巴胺能神经元的进行性损失、纹状体中多巴胺末梢的损失(Koprach et al.Mol Neurodegener.5:43;Koprach et al.PLoS One.6:e17698;Oliveras-Salv   et al.Mol Neurodegener.8:44;Bourdenx et al.Acta Neuropathol Commun.3:46;Caudal et al.Exp Neurol.273:243-52;Lu et al.Biochem Biophys Res Commun.464:988-993;Ip et al.Biochem Biophys Res Commun.464:988-993)及纹状体多巴胺含量的降低(Koprach et al.PLoS One.6:e17698;Ip et al.)。但是,用rAAV模型获得的神经退化程度在不同研究之间可变。测试了数种血清型、促进剂、 α -突触核蛋白物质、剂量和注射后时程,并且全部这些因素影响所实现的帕金森氏症表型。

[0567] 生成了表达E46K α -突触核蛋白的数种转基因小鼠品系(Emmer et al.J Biol Chem.286:35104-18;Nuber et al.Neuron.100:75-90.e5),同时使用病毒载体在小鼠中过表达E46K人类 α -突触核蛋白。在rAAV- α -突触核蛋白模型中, α -突触核蛋白包涵体在黑质纹状体系统中的存在伴随有黑质多巴胺能神经元的显著损失及纹状体中酪氨酸水解酶免疫反应性的减少。野生型或A53T人类 α -突触核蛋白的过表达诱导随时间的SN中多巴胺能神经元的进行性损失(Oliveras-Salv   et al.Mol Neurodegener.8:44)。

[0568] 一些研究显示,rAAV- α -突触核蛋白表达造成运动改变的发展,如增加的阿朴吗啡或安非他明诱导的旋转、踏步测试中的缺陷或滚筒测试中增加的前爪不对称性(Kirik et al.J Neurosci.22:2780-91;Decressac et al.Brain.134(Pt 8):2302-11;Koprach et al.PLoS One.6:e17698;Decressac et al.Neurobiol Dis.45:939-53;Gaugler et al.Acta Neuropathol.123:653-69;Gombash et al.PLoS One.8:e81426;Oliveras-Salv   et al.Mol Neurodegener.8:44;Bourdenx et al.Acta Neuropathol Commun.3:46;Caudal et al.Exp Neurol.273:243-52;Ip et al.Biochem Biophys Res Commun.464:988-993)。这些运动缺陷在注射数周后在具有多巴胺能神经元的显著损失的动物中出现。

[0569] 这些模型业于开发和评估旨在降低 α -突触核蛋白的集聚及预防由 α -突触核蛋白诱导的神经退化的潜在疗法(Decressac et al.Proc Natl Acad Sci U S A.110:E1817-26;Xilouri et al.Autophagy.9:2166-8;Rocha et al.Neurobiol Dis.82:495-503),并且可还用于证明本文提供的RNAi剂的体内功效。在一些包含致病性突变的情况下,此类模型可含有例如人类或大鼠SNCA的组成型或诱导型表达,例如,过表达。本文使用的过表达模型的实例包括AAV诱导的全长人类(Homo sapiens)SNCA转录物s00240906_m1和3'UTR的表达,以及AAV诱导的全长大鼠(Rattus norvegicus)SNCA转录物NM_019169.2和3'UTR的表达。

[0570] V.本公开的RNAi剂的递送

[0571] 将本公开的RNAi剂递送到细胞,例如受试者如人类受试者(例如,有需要的受试者,如患有SNCA相关病症,例如PD、多系统萎缩、路易氏体痴呆(LBD)等的受试者)体内的细胞可以通过多种不同方式实现。例如,可以通过在体外或体内使细胞与本公开的RNAi剂接

触来进行递送。还可以通过向受试者施用包含RNAi剂(例如,dsRNA)的组合物直接进行体内递送。可选地,体内递送可以通过施用一种或多种编码和指导RNAi剂的表达的载体间接进行。下文将进一步讨论这些替代方案。

[0572] 通常,任何递送核酸分子的方法(体外或体内)可以适于与本公开的RNAi剂一起使用(参见例如,Akhtar S.和Julian RL.,(1992)Trends Cell.Biol.2(5):139-144和W094/02595,其通过引用整体并入本文)。对于体内递送,考虑用于递送RNAi剂的因素包括例如,递送的药剂的生物稳定性、非特异性效应的预防以及递送的药剂在靶组织中的积累。可以通过局部施用,例如通过直接注射或植入到组织中或局部施用制备物来最小化RNAi剂的非特异性效应。对治疗位点的局部施用使药剂的局部浓度最大化,限制药剂对全身组织的暴露,否则全身组织可能被药剂伤害或可能降解药剂,并允许施用较低总剂量的RNAi剂。若干研究表明,当局部施用RNAi剂时基因产物的成功敲低。例如,在食蟹猴中通过玻璃体内注射(Tolentino,MJ.等人,(2004)Retina 24:132-138)和在小鼠中通过视网膜下注射(Reich,SJ.等人,(2003)Mol.Vis.9:210-216)眼内递送VEGF dsRNA均证明在年龄相关性黄斑变性的实验模型中预防新生血管形成。另外,在小鼠中直接瘤内注射dsRNA减小了肿瘤体积(Pille,J.等人,(2005)Mol.Ther.11:267-274),并且可以延长荷瘤小鼠的存活期(Kim,WJ.等人,(2006)Mol.Ther.14:343-350;Li,S.等人,(2007)Mol.Ther.15:515-523)。RNA干扰也显示出通过直接注射局部递送到CNS的成功(Dorn,G.等人,(2004)Nucleic Acids 32:e49;Tan,PH.等人,(2005)Gene Ther.12:59-66;Makimura,H.等人,(2002)BMC Neurosci.3:18;Shishkina,GT等人,(2004)Neuroscience 129:521-528;Thakker,ER.等人,(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:17270-17275;Akaneya,Y.等人,(2005)J.Neurophysiol.93:594-602),并且通过鼻内施用到肺部(Howard,KA.等人,(2006)Mol.Ther.14:476-484;Zhang,X.等人,(2004)J.Biol.Chem.279:10677-10684;Bitko,V.等人,(2005)Nat.Med.11:50-55)。为了全身性和/或鞘内施用RNAi剂以治疗疾病,可以修饰RNA或可选地使用药物递送系统递送;这两种方法都用于防止dsRNA在体内被内切和外切核酸酶快速降解。RNA或药用载体的修饰也可以允许RNAi剂靶向靶组织,并且避免不期望的脱靶效应(例如,不希望受理论束缚,本文所描述的GNA的使用已被鉴定为使dsRNA的种子区去稳定,从而导致相对于脱靶效应,此类dsRNA对中靶有效性的偏好增强,因为此类脱靶效应被此类种子区去稳定而显著减弱)。RNAi剂可以通过与亲脂性基团(如胆固醇)的化学缀合进行修饰,以增强细胞摄取并防止降解。例如,将针对与亲脂性胆固醇部分缀合的ApoB的RNAi剂系统地注射到小鼠体内,并且导致肝脏和空肠两者中apoB mRNA的敲低(Soutschek,J.等人,(2004)Nature432:173-178)。在前列腺癌的小鼠模型中,RNAi剂与适体的缀合已被证明抑制肿瘤生长并介导肿瘤消退(McNamara,JO.等人,(2006)Nat.Biotechnol.24:1005-1015)。在替代性实施方案中,可以使用药物递送系统(如纳米颗粒、树状聚合物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统)递送RNAi剂。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的)分子RNAi剂的结合,并且还在带负电荷的细胞膜处增强相互作用以允许细胞高效地摄取RNAi剂。阳离子脂质、树状聚合物或聚合物可以与RNAi剂结合或被诱导以形成包裹RNAi剂的囊泡或胶束(参见例如Kim SH.等人,(2008)Journal of Controlled Release 129(2):107-116)。当系统性施用时,囊泡或胶束的形成进一步防止RNAi剂的降解。用于制备和施用阳离子-RNAi剂复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(参见例如,Sorensen,DR等

人, (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma, UN. 等人, (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS 等人, (2007) J. Hypertens. 25:197-205, 所述文献通过引用整体并入本文)。可用于 RNAi 剂的系统性递送的药物递送系统的一些非限制性实例包括 DOTAP (Sorensen, DR. 等人, (2003), 同上; Verma, UN. 等人, (2003), 同上), Oligofectamine, “固体核酸脂质颗粒” (Zimmermann, TS. 等人, (2006) Nature 441:111-114), 心磷脂 (Chien, PY. 等人, (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A. 等人, (2005) Int. J. Oncol. 26:1087-1091)、聚乙烯亚胺 (Bonnet ME. 等人 (2008) Pharm. Res. 8月16日提出电子出版; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 7:1659), Arg-Gly-Asp (RGD) 肽 (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487) 以及聚酰胺胺 (Tomalia, DA. 等人 (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H. 等人 (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804)。在一些实施方案中, RNAi 剂与环糊精形成用于系统性施用的复合物。施用方法以及 RNAi 剂和环糊精的药物组合物可以在美国专利第 7,427,605 号中找到, 其通过引用整体并入本文。

[0573] 本公开的某些方面涉及降低细胞中 SNCA 靶基因的表达的方法, 包括使所述细胞与本公开的双链 RNAi 剂接触。在一个实施方案中, 细胞为 CNS 细胞。

[0574] 本公开的另一方面涉及降低受试者的 SNCA 靶基因的表达的方法, 其包括向受试者施用本公开的双链 RNAi 剂。

[0575] 本公开的另一方面涉及治疗患有 SNCA 相关病症的受试者的方法, 其包括向受试者施用治疗有效量的本公开的双链 RNAi 剂, 从而治疗受试者。可通过本公开的方法治疗的示例性 CNS 病症包括突触核蛋白病, 如 PD、多系统萎缩、路易氏体痴呆 (LBD)、单纯性自主神经衰竭 (PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体 17 关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig 氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz 病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

[0576] 在一个实施方案中, 双链 RNAi 剂鞘内施用。通过双链 RNAi 剂的鞘内施用, 该方法可降低 SNCA 靶基因在脑 (例如, 纹状体) 或脊髓组织, 例如皮质、小脑、颈椎、腰椎及胸椎中的表达。

[0577] 为了便于说明, 本部分中主要关于修饰的 siRNA 化合物讨论了制剂、组合物和方法。然而可以理解, 这些制剂、组合物和方法可以用其它 siRNA 化合物, 例如未修饰的 siRNA 化合物实施, 并且此类实施在本公开范围内。包含 RNAi 剂的组合物可以通过多种途径向受试者递送。示例性途径包括: 鞘内、静脉内、局部、直肠、肛门、阴道、鼻腔、肺部和眼部。

[0578] 本公开的 RNAi 剂可以掺入适合施用的药物组合物中。此类组合物通常包括一个或多个 RNAi 剂物质和药学上可接受的载体。如本文所使用的, 词语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。此类用于药物活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容的情况之外, 设想其在组合物中的使用。补充的活性化合物也可以掺入组合物中。

[0579] 根据是否期望局部或全身治疗以及根据待治疗的区域, 可以以许多方式施用本公开的药物组合物。施用可以是局部 (包括眼科、阴道、直肠、鼻内、透皮)、口服或肠胃外。肠胃

外施用包括静脉滴注、皮下、腹膜内或肌肉注射,或鞘内或脑室内施用。

[0580] 可选择施用途径和位点以增强靶向性。例如,为了靶向脑和其他CNS细胞,鞘内注射将是合乎逻辑的选择。

[0581] 用于局部施用的制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必要的或期望的。带涂层的避孕套、手套等也可能是有用的。

[0582] 用于口服施用的组合物包括粉末或微粒、在水、糖浆、酏剂或非水性介质中的悬浮液或溶液、片剂、胶囊、糖锭或锭剂。在片剂的情况下,可以使用的载体包括乳糖、柠檬酸钠和磷酸的盐。片剂中通常使用各种崩解剂,如淀粉,以及润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂是乳糖和高分子量聚乙二醇。当需要水性悬浮液用于口服使用时,核酸组合物可以与乳化和悬浮剂组合。如果期望,可以添加某些甜味剂或调味剂。

[0583] 用于鞘内或心室内施用的组合物可以包含无菌水溶液,其还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂。

[0584] 用于肠胃外施用的制剂可以包含无菌水溶液,其还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂。鞘内注射可以通过鞘内导管来促进,例如,与储器连接。对于鞘内使用,可以控制溶质的总浓度以使制备物等渗。

[0585] 在一个实施方案中,siRNA化合物(例如,双链siRNA化合物或ssiRNA化合物)、组合物的施用是肠胃外的,例如,鞘内、静脉内(例如,作为浓注或扩散输注)、皮内、腹膜内、肌肉内、心室内、颅内、皮下、经粘膜、口腔、舌下、内窥镜、直肠、口服、阴道、局部、肺部、鼻内、尿道或眼部。施用可以由受试者提供,或可以由另一个人提供,例如,医疗保健提供者。药物可以以测定的剂量提供,或在递送计量剂量的分配器中提供。下文将更详细地讨论选定的递送模式。

[0586] 鞘内施用

[0587] 在某些实施方案中,双链RNAi剂通过鞘内注射(即,注射到浸浴脑和脊髓组织的脊髓液中)递送。将RNAi剂鞘内注射到脊髓液中可以以浓注的方式进行,或通过可以植入皮肤下的微型泵进行,从而向脊髓液中提供siRNA的定期和恒定递送。脊髓液从产生其的脉络丛循环向下到脊髓和背根神经节周围,和随后向上经过小脑和皮质上以到达蛛网膜颗粒,在那里流体可以离开CNS,取决于注射的化合物的大小、稳定性和溶解性,鞘内递送的分子可以达到整个CNS的靶标。

[0588] 在一些实施方案中,鞘内施用是通过泵进行的。泵可以是手术植入的渗透泵。在一个实施方案中,渗透泵植入椎管的蛛网膜下腔中以促进鞘内施用。

[0589] 在一些实施方案中,鞘内施用是通过用于药物的鞘内递送系统,包括含有一定体积药剂的储器和被配置成递送储器中包含的药剂的一部分的泵。关于这种鞘内递送系统的更多细节可以在WO 2015/116658中找到,所述文献通过引用整体并入。

[0590] 鞘内注射的RNAi剂的量可能在一个靶基因与另一个靶基因之间变化,并且必须针对每个靶基因单独地确定必须应用的适当量。通常,此量的范围为10 μ g至2mg,任选地50 μ g至1500 μ g,更任选地100 μ g至1000 μ g。

[0591] 编码本公开的RNAi剂的载体

[0592] 靶向SNCA基因的RNAi剂可以从插入DNA或RNA载体中的转录单元表达(参见例如, Couture, A等人, TIG. (1996), 12:5-10; WO 00/22113、WO 00/22114和US 6,054,299)。表达优选地是持续的(数月或更长时间),这取决于所使用的特定构建体和靶组织或细胞类型。这些转基因可以作为线性构建体、环状质粒或病毒载体引入,其可以是整合或非整合载体。还可以构建转基因以允许其作为染色体外质粒遗传(Gassmann等人,(1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:1292)。

[0593] RNAi剂的一条或多条单独的链可以从表达载体上的启动子转录。在待表达两条单独的链以产生例如dsRNA的情况下,可以将两个单独的表达载体共同引入(例如,通过转染或感染)到靶细胞中。可选地,dsRNA的每个单独的链可以通过两者位于同一表达质粒上的启动子转录。在一个实施方案中,dsRNA被表达为通过接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸,使得dsRNA具有茎和环结构。

[0594] RNAi剂表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体,任选地与脊椎动物细胞相容的那些表达载体,可以用于产生用于表达如本文所述的RNAi剂的重组构建体。RNAi剂表达载体向CNS的递送(如通过鞘内施用)可以是全身性的,如通过静脉内或肌肉施用,通过施用于从患者移植的靶细胞和然后重新引入患者体内,或通过允许引入期望的靶细胞的任何其它方式。

[0595] 可以与本文所描述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括但不限于(a)腺病毒载体;(b)逆转录病毒载体,包括但不限于慢病毒载体、莫罗尼鼠白血病毒等;(c)腺相关病毒(AAV)载体;(d)单纯性疱疹病毒载体;(e)SV 40载体;(f)多瘤病毒载体;(g)乳头瘤病毒载体;(h)小核糖核酸病毒载体;(i)痘病毒载体,如正痘(例如,牛痘)病毒载体或禽痘(例如,金丝雀痘或鸡痘);以及(j)辅助依赖性或非腺病毒。复制缺陷型病毒也可能是有利的。如果需要,不同的载体整合或不会整合到细胞的基因组中。构建体可以包含用于转染的病毒序列。可选地,构建体可以被整合到能够附加型复制的载体中,例如EPV和EBV载体。用于重组表达RNAi剂的构建体通常需要调控元件,例如启动子、增强子等,以确保RNAi剂在靶细胞中的表达。对于载体和构建体需要考虑的其它方面是本领域已知的。

[0596] VI. 本发明的药物组合物

[0597] 本公开还包括药物组合物和制剂,其包含本公开的RNAi剂。在一个实施方案中,本文提供了含有如本文所描述的RNAi剂以及药学上可接受的载体的药物组合物。含有RNAi剂的药物组合物可用于治疗与SNCA的表达或活性相关的疾病或病症,例如SNCA相关神经退行性疾病,如突触核蛋白病,诸如PD、多系统萎缩(MSA)、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytico-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

[0598] 这些药物组合物基于递送模式配制。一个实例为配制为用于直接递送至CNS的组合物,例如,通过鞘内或玻璃体内注射途径,任选地通过输注至脑(例如,纹状体)中,如通过连续泵输注。

[0599] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物是无热原的或非热原的。

[0600] 本公开的药物组合物可以以足以抑制SNCA基因的表达的剂量施用。通常,本公开的RNAi剂的合适剂量的范围为约0.001至约200.0毫克/千克接受者体重/天,通常范围为约1至50毫克/千克体重/天。

[0601] 重复剂量方案可以包括定期施用治疗量的RNAi剂,如每月至每六个月一次。在某些实施方案中,RNAi剂约每季施用一次(即约每三个月施用一次)至约每年施用两次。

[0602] 在初始治疗方案(例如,负荷剂量)之后,可以以较低频率施用治疗。

[0603] 在其它实施方案中,单剂量的药物组合物可以是持久的,使得后续剂量以不超过1个月、2个月、3个月或4个月或更长的间隔施用。在本公开的一些实施方案中,单剂量的本公开的药物组合物每月施用一次。在本公开的其它实施方案中,单剂量的本公开的药物组合物每季度施用一次至每年施用两次。

[0604] 本领域技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时机,包括但不限于疾病或病症的严重性、之前的治疗、受试者的总体健康或年龄以及存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的组合物对受试者的治疗可以包括单次治疗或系列治疗。

[0605] 小鼠遗传学的进步已经产生了用于研究受益于SNCA表达的减少的SNCA相关疾病的小鼠模型。此类模型可以用于RNAi剂的体内测试,以及用于确定治疗有效剂量。合适的小鼠模型是本领域已知的,并且包括例如在本文中另外描述的小鼠模型。

[0606] 取决于是否期望局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域,可以以许多方式施用本公开的药物组合物。在某些实施方案中,施用是鞘内的。但是,在某些实施方案中,施用可以是局部的(例如,通过透皮贴剂)、肺部的(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器);气管内的、鼻内的、表皮和透皮的、口服的或肠胃外的。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;皮下(例如,通过植入的装置);或颅内(例如,通过实质内、鞘内或脑室内)施用。

[0607] RNAi剂可以以靶向特定组织的方式递送,如CNS(例如,脑的神经元、神经胶质或血管组织)。

[0608] 用于局部施用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必要的或期望的。涂层的避孕套、手套等也可以是有用的。合适的局部制剂包括其中本公开所述的RNAi剂与局部递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些制剂。合适的脂质和脂质体包括中性的(例如,二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、负性的(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子的(例如,二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本公开所述的RNAi剂可以被包封在脂质体中或可以与其形成复合物,具体地与阳离子脂质体。可选地,RNAi剂可以与脂质复合,具体地与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、二十烷酸、月桂酸、辛酸、癩酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸、三癩酸、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癩酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或C₁₋₂₀烷基酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯IPM)、甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。局部制剂详细描述于US 6,747,014中,其通过引用并入本文。

[0609] A. 包含膜分子组装的RNAi剂制剂

[0610] 用于本公开的组合物和方法的RNAi剂可以被配制用于以膜性分子组装(例如,脂质体或胶束)递送。如本文所使用的,术语“脂质体”是指由排列在至少一个双层中(例如,一个双层或多个双层)的两亲性脂质组成的囊泡。脂质体包括具有由亲脂性材料形成的膜和水性内部的单层和多层囊泡。水性部分含有RNAi剂组合物。亲脂性材料将水性内部与水性外部分隔,水性外部通常不包含RNAi剂组合物,尽管在一些实例中,其可以包含。脂质体可用于将活性成分转移和递送到作用位点。由于脂质体膜在结构上与生物膜相似,当脂质体应用于组织时,脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体和细胞融合的进展,包含RNAi剂的内部水性内容物被递送到细胞中,其中RNAi剂可以与靶RNA特异性结合并可以介导RNAi。在一些情况下,脂质体也被特异性靶向,例如将RNAi剂指导到特定的细胞类型。

[0611] 含有RNAi剂的脂质体可以通过多种方法制备。在一个实例中,脂质体的脂质组分溶解在洗涤剂中,使得与脂质组分形成胶束。例如,脂质组分可以是两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。洗涤剂可以具有高临界胶束浓度,并且可以是非离子的。示例性洗涤剂包含胆酸盐、CHAPS、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐和月桂酰肌氨酸。然后将RNAi剂制备物添加到包含脂质组分的胶束中。脂质上的阳离子基团与RNAi剂相互作用,并且在RNAi剂周围缩合以形成脂质体。缩合后,洗涤剂例如通过透析去除以产生RNAi剂的脂质体制备物。

[0612] 如果需要,可以在缩合反应期间,例如通过受控的添加来添加有助于缩合的载体化合物。例如,载体化合物可以是除核酸以外的聚合物(例如,精胺或亚精胺)。pH也可以调节以利于缩合。

[0613] 在例如W0 96/37194中进一步描述了用于产生稳定的多核苷酸递送媒介的方法,其合并了多核苷酸/阳离子脂质复合物作为递送媒介的结构组分,所述文献的全部内容通过引用并入本文。脂质体形成也可以包括以下中描述的示例性方法中的一个或多个方面: Felgner, P.L. 等人, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 7413-7417; 美国专利第4,897,355号; 美国专利第5,171,678号; Bangham 等人, (1965) M. Mol. Biol. 23: 238; Olson 等人, (1979) Biochim. Biophys. Acta 557: 9; Szoka 等人, (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194; Mayhew 等人, (1984) Biochim. Biophys. Acta 775: 169; Kim 等人, (1983) Biochim. Biophys. Acta 728: 339; 以及 Fukunaga 等人, (1984) Endocrinol. 115: 757。用于制备用作递送媒介的合适大小的脂质聚集体的常用技术包括超声处理和冻-融加挤出(参见,例如, Mayer 等人, (1986) Biochim. Biophys. Acta 858: 161)。当期望一致地较小(50nm至200nm)且相对均匀的聚集体时,可以使用微流化(Mayhew 等人, (1984) Biochim. Biophys. Acta 775: 169)。这些方法容易适应于将RNAi剂制备物包装到脂质体中。

[0614] 脂质体落入两个广泛的类别中。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的核酸分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电荷的核酸/脂质体复合物与带负电荷的细胞表面结合并且内化到内体中。由于内体中的酸性pH,脂质体破裂,从而将其内容物释放到细胞质中(Wang 等人, (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147: 980-985)。

[0615] pH敏感的或带负电荷的脂质体包埋核酸而不是与其复合。由于核酸和脂质两者均带有类似的电荷,出现排斥而非复合物形成。然而,一些核酸包埋于这些脂质体的水性内部内。pH敏感性脂质体用于将编码胸苷激酶基因的核酸递送到培养中的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou 等人, (1992) Journal of Controlled Release, 19: 269-274)。

[0616] 一种主要类型的脂质体组合物包含天然来源的磷脂酰胆碱之外的磷脂。中性脂质体组合物例如可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 或二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 形成。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成, 而阴离子融合脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 形成。另一种类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱 (PC) 形成, 例如大豆 PC 和鸡蛋 PC。另一种类型由磷脂或磷脂酰胆碱或胆固醇的混合物形成。

[0617] 在体外和体内将脂质体引入细胞中的其它方法的实例包括美国专利第 5,283,185 号; 美国专利第 5,171,678 号; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, (1994) J. Biol. Chem. 269:2550; Nabel, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307; Nabel, (1992) Human Gene Ther. 3:649; Gershon, (1993) Biochem 32:7143; 以及 Strauss, (1992) EMBO J. 11:417。

[0618] 还对非离子脂质体系统进行了检查以确定其在向皮肤递送药物中的效用, 特别是包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包含 Novasome™ I (二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚) 和 Novasome™ II (二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚) 的非离子脂质体制剂将环孢菌素 A 递送到小鼠皮肤的真皮中。结果表明, 此类非离子脂质体系统在促进环孢菌素 A 沉积到皮肤的不同层中是有效的 (Hu 等人, (1994) S.T.P. Pharma. Sci., 4(6):466)。

[0619] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体, 如本文所使用是指包含一种或多种专门脂质的脂质体, 当掺入脂质体中时, 其相对于缺乏此类专门脂质的脂质体导致提高的循环寿命。空间稳定的脂质体的实例是其中脂质体的囊泡形成脂质部分的部分 (A) 包含一种或多种糖脂, 如单唾液酸神经节苷脂 G_{M1} , 或 (B) 用一种或多种亲水性聚合物衍生, 如聚乙二醇 (PEG) 部分。尽管不希望受到任何特定理论的限制, 但本领域认为, 至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或 PEG 衍生的脂质的空间稳定的脂质体, 这些空间稳定的脂质体的增强的循环半衰期源自网状内皮系统 (RES) 的细胞中减少的摄取 (Allen 等人, (1987) FEBS Letters, 223:42; Wu 等人, (1993) Cancer Research, 53:3765)。

[0620] 包含一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos 等人 (Ann. N.Y. Acad. Sci., (1987), 507:64) 报道了单唾液酸神经节苷脂 G_{M1} 、硫酸半乳糖脑苷酯和磷脂酰肌醇改善脂质体血液半衰期的能力。这些发现在以下中进行了阐述: Gabizon 等人, (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85:6949)。Allen 等人的美国专利第 4,837,028 号和 WO 88/04924 两者中公开了脂质体, 其包含 (1) 鞘磷脂和 (2) 神经节苷脂 G_{M1} 或硫酸半乳糖脑苷酯。美国专利第 5,543,152 号 (Webb 等人) 公开了包含鞘磷脂的脂质体。WO 97/13499 (Lim 等人) 中公开了包含 1,2-sn-二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质体。

[0621] 在一个实施方案中, 使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够与细胞膜融合的优点。非阳离子脂质体尽管不能如此与质膜有效融合, 但在体内被巨噬细胞摄取, 并且可以用于向巨噬细胞递送 RNAi 剂。

[0622] 脂质体的另外的优点包括: 从天然磷脂获得的脂质体是生物相容的和可生物降解的; 脂质体可以掺合广泛的水溶性和脂溶性药物; 脂质体可以保护其内部区室中包封的 RNAi 剂免受代谢和降解 (Rosoff, “Pharmaceutical Dosage Forms”, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 第 1 卷, 第 245 页)。制备脂质体制剂的重要考虑因素是脂质表面电荷、囊泡大小和脂质体的水性体积。

[0623] 带正电的合成阳离子脂质N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)可以用于形成小脂质体,所述小脂质体与核酸自发相互作用以形成脂质-核酸复合物,所述复合物能够与组织培养细胞的细胞膜的带负电荷的脂质融合,从而导致RNAi剂的递送(参见例如,Felgner,P.L.等人,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 8:7413-7417,以及美国专利第4,897,355号中关于DOTMA以及其用于DNA的描述)。

[0624] DOTMA类似物,1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可以与磷脂组合使用,以形成DNA复合的囊泡。Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)是用于将高度阴离子的核酸递送到活组织培养细胞中的有效试剂,其包括带正电荷的DOTMA脂质体,所述脂质体与带负电荷的多核苷酸自发相互作用以形成复合物。当使用足够带正电荷的脂质体时,所得复合物上的净电荷也是正的。以这种方式制备的带正电荷的复合物自发地附接于带负电荷的细胞表面,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送到例如组织培养细胞中。另一种可商购获得的阳离子脂质,1,2-双(油酰基氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷(“DOTAP”)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana)与DOTMA的不同在于,油酰基部分通过酯而不是醚键连接。

[0625] 其它报道的阳离子脂质化合物包括与多种部分缀合的那些,包括例如与两种类型的脂质之一缀合的羧精胺,并且包括如5-羧基精胺基甘氨酸二-十八烷酰基酰胺(dioctaoleoylamide) (“DOGS”)(Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin)和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺5-羧基精酰基-酰胺(“DPPEs”)的化合物(参见例如,美国专利第5,171,678号)。

[0626] 另一种阳离子脂质缀合物包括脂质与胆固醇的衍生化(“DC-Chol”),其与DOPE组合配制成脂质体(参见,Gao,X.和Huang,L.,(1991)Biochim.Biophys.Res.Commun.179:280)。据报道,通过将聚赖氨酸与DOPE缀合制备的脂质聚赖氨酸(lipopolylysine)在血清存在下对转染有效(Zhou,X.等人,(1991)Biochim.Biophys.Acta 1065:8)。对于某些细胞系,这些含有缀合的阳离子脂质的脂质体据说表现出比含DOTMA的组合物更低的毒性并提供更高效的转染。其它可商购的阳离子脂质产品包括DMRIE和DMRIE-HP(Vical, La Jolla, California)和Lipofectamine(DOSPA)(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland)。WO 98/39359和WO 96/37194中描述了适用于递送寡核苷酸的其它阳离子脂质。

[0627] 脂质体制剂特别适合局部施用;脂质体呈现出优于其它制剂的几种优点。此类优点包括减少与施用的药物的高系统吸收相关的副作用,增加施用的药物在期望的靶标处的积聚,以及将RNAi剂施用到皮肤中的能力。在一些实施方式中,脂质体用于将RNAi剂递送到表皮细胞,并且还用于增强RNAi剂向真皮组织中的渗透,例如到皮肤中。例如,脂质体可以局部应用。已经证明了将配制为脂质体的药物局部递送到皮肤(参见例如,Weiner等人,(1992)Journal of Drug Targeting,第2卷,405-410和du Plessis等人,(1992)Antiviral Research,18:259-265;Mannino,R.J.和Fould-Fogerite,S.,(1998)Biotechniques 6:682-690;Itani,T.等人,(1987)Gene 56:267-276;Nicolau,C.等人,(1987)Meth.Enzymol.149:157-176;Straubinger,R.M.和Papahadjopoulos,D.(1983)Meth.Enzymol.101:512-527;Wang,C.Y.和Huang,L.,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7851-7855)。

[0628] 还对非离子脂质体系统进行了检查以确定其在向皮肤递送药物中的效用,特别是

包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包含Novasome I (二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚) 和Novasome II (二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚) 的非离子脂质体制剂将药物递送到小鼠皮肤的真皮中。具有RNAi剂的此类制剂可用于治疗皮肤病学病症。

[0629] 包含RNAi剂的脂质体可以被制成高度可变形的。此类可变形性可以使脂质体渗透穿过小于脂质体平均半径的孔隙。例如,传递体(高度可变形的聚集体,其对于药物递送媒介而言是有吸引力的候选物)为可变形脂质体的类型。传递体可描述为脂质液滴,其高度可变形的以使得它们能轻易地穿透小于该液滴的孔隙。传递体可适应其所使用的环境,例如,它们是自优化的(适应于皮肤中孔隙的形状)、自修复,通常到达其靶标而不碎裂,且通常是自加载的。传递体可通过将表面边缘活化剂,通常界面活性剂,加入标准脂质体组合物来制备。传递体已用于将血清白蛋白递送至皮肤。传递体介导的血清白蛋白的递送已显示与将含有血清白蛋白的溶液进行皮下注射同样有效。包含RNAi剂的传递体可以例如通过感染皮下递送,以便将RNAi剂递送到皮肤中的角质细胞。为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适当的透皮梯度的影响下穿过一系列各自直径小于50nm的细孔隙。另外,由于脂质特性,这些传递体可以自优化(适应例如皮肤中孔隙的形状)、自我修复,并且可以经常在不碎裂的情况下达到其靶标,并且经常自加载。

[0630] 适用于本公开的其它制剂在2008年1月2日提交的美国临时申请序列号61/018,616;2008年1月2日提交的61/018,611;2008年3月26日提交的61/039,748;2008年4月22日提交的61/047,087;以及2008年5月8日提交的61/051,528中进行了描述。2007年10月3日提交的PCT申请第PCT/US2007/080331号也描述了适用于本公开的制剂。

[0631] 表面活性剂广泛应用于本文所描述的那些制剂中,尤其是乳液(包含微乳液)和脂质体。对许多不同类型的表面活性剂(天然和合成两者)的特性进行分类和排序的最常见方式是通过使用亲水/亲脂平衡(HLB)。亲水基团(也称为“头部”)的性质为制剂中使用的不同表面活性剂的分类提供了最有力的方式(Rieger,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,第285页)。

[0632] 如果表面活性剂分子未离子化,则其归类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂在药物和化妆品中有着广泛的应用,并且可用于宽范围pH值。通常,根据其结构,其HLB值的范围为2至约18。非离子表面活性剂包括非离子酯,如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。非离子烷醇酰胺和醚,如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物也包含在此类别中。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类别中最普遍的成员。

[0633] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带有负电荷,则表面活性剂被分类为阴离子的。阴离子表面活性剂包括羧酸盐如皂类、酰基乳酸盐、氨基酸的酰基酰胺、硫酸盐如烷基硫酸盐和乙氧基化烷基硫酸盐、磺酸盐如烷基苯磺酸盐、酰基羟乙基磺酸盐、酰基牛磺酸盐和磺基琥珀酸盐,以及磷酸盐。阴离子表面活性剂类别中最重要的成员是烷基硫酸盐和皂类。

[0634] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带有正电荷,则表面活性剂被分类为阳离子的。阳离子表面活性剂包括季铵盐和乙氧基化胺。季铵盐是此类别中最多使用的成员。

[0635] 如果表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,则表面活性剂被归类为两性的。两性表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱和磷脂。

[0636] 表面活性剂在药物产品、制剂和乳液中的应用已经进行了综述(Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第285页)。

[0637] 用于本公开的方法中的RNAi剂也可以作为胶束制剂提供。“胶束”在本文中被定义为特定类型的分子组装,其中两亲性分子以球形结构排列,使得分子的所有疏水部分指向内,而使亲水部分与周围的水性相接触。如果环境是疏水的,则存在相反的排列。

[0638] 适合通过透皮膜递送的混合胶束制剂可以通过混合siRNA组合物的水溶液、碱金属C₈至C₂₂烷基硫酸盐和胶束形成化合物来制备。示例性胶束形成化合物包括卵磷脂、透明质酸、透明质酸的药学上可接受的盐、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、单油酸甘油酯、单油酸酯、单月桂酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基胆酸甘氨酸酯及其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚及其类似物、聚多卡醇烷基醚及其类似物、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸及其混合物。胶束形成化合物可以在添加碱金属烷基硫酸盐的同时或之后添加。基本上任何种类的成分混合都会形成混合的胶束,但为了提供更小大小的胶束而剧烈混合。

[0639] 在一种方法中,制备含有siRNA组合物和至少碱金属烷基硫酸盐的第一胶束组合物。然后将第一胶束组合物与至少三种胶束形成化合物混合以形成混合的胶束组合物。在另一种方法中,通过将siRNA组合物、碱金属烷基硫酸盐和至少一种胶束形成化合物混合,然后在剧烈混合的情况下添加剩余的胶束形成化合物来制备胶束组合物。

[0640] 苯酚或间甲酚可以添加到混合的胶束组合物中以稳定制剂并防止细菌生长。可选地,苯酚或间甲酚可以与胶束形成成分一起添加。在形成混合的胶束组合物之后,也可以添加等渗剂,如甘油。

[0641] 为了将胶束制剂作为喷雾递送,可以将制剂置于气溶胶分配器中,并且在分配器中装入推进剂。处于压力下的推进剂在分配器中呈液体形式。调节成分的比率,使得水性相和推进剂相成为一个相,即存在一个相。如果有两个相,则有必要在分配一部分内容物(例如通过计量阀)之前摇动分配器。分配的药剂的剂量以精细喷雾的形式从计量阀推进。

[0642] 推进剂可以包括含氢氯氟烃、含氢氟碳化合物、二甲醚和二乙醚。在某些实施方案中,可以使用HFA 134a(1,1,1,2-四氟乙烷)。

[0643] 基本成分的具体浓度可以通过相对直接的实验来确定。为了通过口腔吸收,通常期望增加通过注射或通过胃肠道施用的剂量,例如至少两倍或三倍。

[0644] 脂质颗粒

[0645] RNAi剂,例如本公开中的dsRNA可以完全包封在脂质制剂中,例如LNP或其它核酸脂质颗粒。

[0646] 如本文所使用的,术语“LNP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。LNP对于全身应用非常有用,因为其在静脉内(i.v.)注射后表现出延长的循环寿命并在远端位点(例如,与施用位点物理分离的位点)累积。LNP包括“pSPLP”,其包含W000/03683中所述的包封的缩合剂-核酸复合物。LNP配制的颗粒的平均直径通常为约50nm至约150nm、更通常地为约60nm至约130nm、更通常地为约70nm至约110nm、最通常地为约70nm至约90nm,并且基本上是无毒的。

另外,当存在于核酸-脂质颗粒中时,核酸在水性溶液中抵抗核酸酶的降解。核酸-脂质颗粒以及其制备方法在例如美国专利第5,976,567号;第5,981,501号;第6,534,484号;第6,586,410号;第6,815,432号;美国专利公开第2010/0324120号和W0 96/40964中公开。

[0647] 在一个实施方案中,脂质与药物比率(质量/质量比)(例如,脂质与dsRNA的比率)在约1:1至约50:1、约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1的范围内。上述范围中间的范围也被认为是本公开的部分。

[0648] 本领域已经描述了用于递送RNAi剂的某些特定LNP制剂,包括例如“LNP01”制剂,如例如在W0 2008/042973中描述的,所述文献特此通过引用并入。

[0649] 在以下图表1中鉴定了另外的示例性脂质-dsRNA制剂。

[0650]	可电离/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质 缓合物
		脂质:siRNA 比率
SNALP-1	1,2-二亚麻氧基-N,N-二甲基氨基 丙烷(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA 约 7:1

[0651]

2-XTC	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基 -[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA 约 7:1
LNP05	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基 -[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 约 6:1
LNP06	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基 -[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 约 11:1
LNP07	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基 -[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 约 6:1
LNP08	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基 -[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 约 11:1
LNP09	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基 -[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二 ((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四 氢-3aH-环戊并[d][1,3]二氧杂环 戊烯-5-胺(ALN100)	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷 -6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基 氨基)丁酸酯(MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二 烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷 基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮 烷二基)二-十二烷-2-醇(Tech G1)	Tech G1/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1

[0652]

LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1

[0653] DSPC:二硬脂酰基磷脂酰胆碱;

[0654] DPPC:二棕榈酰基磷脂酰胆碱;

[0655] PEG-DMG:PEG-二双肉豆蔻酰基甘油(C14-PEG或PEG-C14)(平均摩尔重量2000的PEG);

[0656] PEG-DSG:PEG-联苯乙烯基甘油(C18-PEG或PEG-C18)(平均摩尔重量2000的PEG);

[0657] PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻酰氧基丙胺(平均摩尔重量2000的PEG);

[0658] SNALP包含(1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的制剂在W0 2009/127060中描述,所述文献特此通过引用并入。

[0659] 包含XTC的制剂在W0 2010/088537中进行了描述,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0660] 例如,在美国专利公开第2010/0324120号中描述了包含MC3的制剂,所述文献的全部内容特此通过引用并入。

[0661] 包含ALNY-100的制剂在W0 2010/054406中进行了描述,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0662] 包含C12-200的制剂在W0 2010/129709中进行了描述,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0663] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微颗粒、纳米颗粒、在水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或微型片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是期望的。在一些实施方案中,口服制剂是其中本公开所述的dsRNA与一种或多种渗透增强剂表面活性剂和螯合剂结合施用的那些制剂。合适的表面活性剂包括脂肪酸或其酯或盐、胆汁酸或其盐。合适的胆汁酸/盐包括鹅脱氧胆酸(CDCA)和熊脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡胆酸、甘胆酸、甘脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺基-24,25-二氢-富西酸钠和甘二氢富西酸钠。合适的脂肪酸包括花

生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸、三癸酸、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如,钠)。在一些实施方案中,使用渗透增强剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。一种示例性组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。进一步的渗透增强剂包括聚氧乙烯-9-十二烷基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。本公开所述的dsRNA可以口服、以包含喷雾干燥颗粒的颗粒形式递送,或复合以形成微粒或纳米颗粒。dsRNA复合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸;聚烷基丙烯酸、聚氧乙烷、聚烷基氰基丙烯酸酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生的聚亚胺、支链淀粉、纤维素和淀粉。合适的复合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精蛋白、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如,对-氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异己基氰基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-右旋糖酐、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、藻酸和聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服制剂及其制备在美国专利6,887,906、U.S.2003/0027780和美国专利第6,747,014号中详细描述,其每一个通过引用并入本文。

[0664] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、心室内或肝内施用的组合物和制剂可以包括也可以含有缓冲液、稀释剂和其它合适的添加剂,如但不限于渗透增强剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体或赋形剂的无菌水溶液。

[0665] 本公开的药物组合物包括但不限于溶液、乳液和含脂质体的制剂。这些组合物可以由多种组分产生,其包括但不限于预成型液体、自乳化固体和自乳化半固体。特别优选的是在治疗SNCA相关疾病或病症时靶向脑的制剂。

[0666] 本公开的药物制剂(其可以方便地以单位剂型存在)可以根据制药工业中众所周知的常规技术制备。此类技术包括使活性成分与药物载体或赋形剂结合的步骤。一般而言,制剂通过使活性成分与液体载体或细分固体载体或两者均匀和紧密地结合和然后在必要时使产物成形来制备。

[0667] 本公开的组合物可以配制成许多可能的剂型中的任一种,例如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本公开的组合物也可以被配制成在水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步含有增加悬浮液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0668] 另外的制剂

[0669] i. 乳液

[0670] 本公开的组合物可以制备并配制成乳液。乳液通常是一种液体以液滴的形式分散在另一种液体中的非均相系统,通常直径超过0.1 μ m的液滴的形式(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和Ansel HC., 2004, Lippincott Williams&Wilkins(第8版), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger和Banker(编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms,

Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第245页; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第2卷, 第335页; Higuchi 等人, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, 第301页)。乳液通常是两相系统, 包含两个相互紧密混合和分散的不混溶液体相。通常, 乳液可以是油包水 (w/w) 或水包油 (w/w) 种类。当水性相被细分和分散为微小的液滴到本体油相中时, 所得到的组合物被称为油包水 (w/o) 乳液。可选地, 当油相被细分和分散为微小的液滴到本体水相中时, 所得到的组合物被称为水包油 (o/w) 乳液。除了分散相和活性药物之外, 乳液还可以含有另外的组分, 所述活性药物可以作为溶液存在于水相、油相或作为单独的相的其本身中。药物赋形剂如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂也可以根据需要存在于乳液中。药物乳液也可以是包含多于两个相的多种乳液, 例如在油包水包油 (o/w/o) 和水包油包水 (w/o/w) 乳液的情况下。此类复杂的制剂通常提供简单的二元乳液所没有的某些优点。其中 o/w 乳液的单个油滴包围小水滴的多重乳液构成 w/o/w 乳液。类似地, 包围在油状连续相中稳定的小水滴中的油滴系统提供 o/w/o 乳液。

[0671] 乳液的特征在于几乎没有或没有热力学稳定性。通常, 乳液的分散或不连续相良好地分散到外部或连续相中, 并且通过乳化剂或制剂的粘度维持在这种形式。乳液的任何一个相都可以是半固体或固体, 如同乳液型软膏基质和乳膏的情况一样。稳定乳液的其它方式需要使用可以掺入乳液任一相中的乳化剂。乳化剂可以大致分为四类: 合成表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和精细分散的固体 (参见例如, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版); Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。

[0672] 已发现合成表面活性剂 (也称为表面活性试剂) 在乳液配制中具有广泛的适用性, 并且已在文献中进行了综述 (参见例如, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第285页; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。表面活性剂通常是两亲性的, 并且包括亲水性和疏水性部分。表面活性剂的亲水性与疏水性性质的比率被称为亲水/亲脂平衡 (HLB), 并且是在制剂的制备中对表面活性剂进行分类和选择的有价值的工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质分为不同的类别: 非离子、阴离子、阳离子和两性的 (参见例如, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第285页)。

[0673] 乳液制剂中使用的天然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收基质具有亲水特性, 使得其可以吸收水以形成 w/o 乳液, 但仍保持其半固体稠度, 如

无水羊毛脂和亲水性矿脂。细分的固体也被用作良好的乳化剂,特别是与表面活性剂组合和在粘性制剂中使用。这些包括极性无机固体,如重金属氢氧化物,非溶胀粘土,如膨润土、绿坡缕石、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶体硅酸铝和胶体硅酸镁铝、颜料和非极性固体,如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0674] 很多种非乳化材料还包含在乳液制剂中,并且有助于乳液的特性。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、保湿剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger和Banker(编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第335页; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger和Banker(编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。

[0675] 亲水胶体或水胶体包括天然存在的树胶和合成聚合物,如多糖(例如,阿拉伯胶、琼脂、藻酸、角叉菜胶、瓜尔胶、卡拉牙胶和黄芪胶)、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)以及合成聚合物(例如,卡波姆、纤维素醚和羧乙烯基聚合物)。这些在水中分散或溶胀以形成胶体溶液,其通过在分散相液滴周围形成强界面膜并通过增加外部相的粘度来稳定乳液。

[0676] 由于乳液通常含有多种成分,如碳水化合物、蛋白质、甾醇和磷脂,其可以很容易地支持微生物的生长,因此这些制剂通常掺合防腐剂。乳液制剂中包含的常用的防腐剂包括尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。抗氧化剂通常也被添加到乳液制剂中以防止制剂变质。所使用的抗氧化剂可以是自由基清除剂,如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯或还原剂如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,以及抗氧化剂增效剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0677] 乳液制剂通过皮肤、口服和肠胃外途径的应用以及其制造方法已经在文献中进行了综述(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.和Ansel HC., 2004, Lippincott Williams&Wilkins(第8版), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger和Banker(编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。用于口服递送的乳液制剂由于易于配制以及从吸收和生物利用度角度来看的功效而被非常广泛地使用(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.和Ansel HC., 2004, Lippincott Williams&Wilkins(第8版), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger和Banker(编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第245页; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger和Banker(编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。矿物油基轻泻药、油溶性维生素和高脂肪营养制剂通常是作为o/w乳液口服施用的材料。

[0678] ii. 微乳液

[0679] 在本公开的一个实施方案中, RNAi剂和核酸的组合物被配制为微乳液。微乳液可以定义为水、油和两亲物的系统,其是单一的光学各向同性和热力学稳定的液体溶液(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.和Ansel HC., 2004, Lippincott Williams&Wilkins(第8版), New York, NY;

Rosoff, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第245页)。通常, 微乳液是通过首先将油分散在表面活性剂水溶液中, 并且然后添加足够量的第四组分 (通常是中链长度醇) 以形成透明体系而制备的系统。因此, 微乳液也被描述为两种不混溶液体的热力学稳定、各向同性透明的分散体, 所述两种不混溶液体通过表面活性分子的界面膜来稳定 (Leung 和 Shah, *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M. 编辑, 1989, VCH Publishers, New York, 第185-215页)。微乳液通常通过三种至五种组分的组合制备, 其包括油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质。微乳液是油包水 (w/o) 还是水包油 (o/w) 类型取决于所用的油和表面活性剂的特性, 以及表面活性剂分子的极性头部和烃尾部的结构和几何包装 (Schott, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, 第271页)。

[0680] 利用相图的现象学途径已经得到了广泛的研究, 并且为本领域技术人员提供了关于如何配制微乳液的全面知识 (参见例如, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rosoff, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第245页; Block, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第335页)。与传统乳液相比, 微乳液提供了将水不溶性药物溶解在自发形成的热力学稳定液滴的制剂中的优点。

[0681] 用于制备微乳液的表面活性剂包括但不限于离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油醚、聚甘油脂肪酸酯、单月桂酸四甘油酯 (ML310)、单油酸四甘油酯 (MO310)、单油酸六甘油酯 (PO310)、五油酸六甘油酯 (PO500)、单癸酸十甘油酯 (MCA750)、单油酸十甘油酯 (MO750)、连续油酸十甘油酯 (decaglycerol sequeioleate) (SO750)、十油酸十甘油酯 (DA0750), 单独或与助表面活性剂组合。助表面活性剂 (通常是短链醇, 如乙醇、1-丙醇和1-丁醇) 通过渗透到表面活性剂膜中并且由于表面活性剂分子之间产生的空隙空间而产生无序膜而用于增加界面流动性。然而, 可以在不使用助表面活性剂的情况下制备微乳液, 并且本领域已知无醇自乳化微乳液系统。水相通常可以是但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包括但不限于如 Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中链 (C8-C12) 单、二和三甘油酯、聚氧乙烯化甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚二醇化甘油酯、饱和聚二醇化 C8-C10 甘油酯、植物油和硅酮油的材料。

[0682] 从药物增溶和增强药物吸收的角度来看, 微乳液尤其引人关注。已经提出了基于脂质的微乳液 (o/w 和 w/o 两者) 来提高药物 (包括肽) 的口服生物利用度 (参见例如, 美国专利第6,191,105号; 第7,063,860号; 第7,070,802号; 第7,157,099号; Constantinides 等人, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205)。微乳液提供改善药物增溶、保护药物免受酶水解、由于表面活性剂诱导的膜流动性和渗透性的改变而可能增强药物吸收、易于制备、相对于固体剂型易于口服施用、提高临床效力以及降低的毒性的优点 (参见例如, 美国专利第6,191,105号; 第7,063,860号; 第7,070,802号; 第7,157,099号; Constantinides 等

人, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho等人, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143)。当微乳液的组分在环境温度下集合在一起时, 微乳液通常可以自发形成。这可能在配制不耐热药物、肽或RNAi剂时尤其有利。微乳液在化妆品和药物应用两者中对活性组分的透皮递送也很有效。预期本公开的微乳液组合物和制剂将促进RNAi剂和核酸从胃肠道的系统吸收增加, 以及改善RNAi剂和核酸的局部细胞摄取。

[0683] 本公开的微乳液还可以含有另外的组分和添加剂, 如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯 (Grill 3)、Labrasol和渗透增强剂, 以改善制剂的特性并增强本公开的RNAi剂和核酸的吸收。本公开的微乳液中使用的渗透增强剂可以分类为属于五大类之一——表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂 (Lee等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第92页)。这些类别中的每一个都已经在上文进行了讨论。

[0684] iii. 微粒

[0685] 本公开的RNAi剂可以掺入到颗粒中, 例如微颗粒中。微颗粒可以通过喷雾干燥产生, 但也可以通过其它方法产生, 包括冻干、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的组合。

[0686] iv. 渗透增强剂

[0687] 在一个实施方案中, 本公开使用各种渗透增强剂来实现核酸, 特别是RNAi剂到动物皮肤的高效递送。大多数药物以电离和非电离两种形式存在于溶液中。然而, 通常只有脂溶性或亲脂性药物容易跨过细胞膜。已经发现, 如果用渗透增强剂处理待跨过的膜, 即使是非亲脂性药物也可以跨过细胞膜。除了有助于非亲脂性药物跨细胞膜的扩散外, 渗透增强剂还可以增强亲脂性药物的渗透性。

[0688] 渗透增强剂可以分为属于五大类之一, 即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂 (参见例如, Malmsten, *M. Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第92页)。下面更详细地描述上述渗透增强剂种类的每一种。

[0689] 表面活性剂 (或“表面活性试剂”) 是化学实体, 当其溶解在水性溶液中时, 降低溶液的表面张力或水溶液与另一种液体之间的界面张力, 结果是增强RNAi剂通过粘膜的吸收。除了胆汁盐和脂肪酸之外, 这些渗透增强剂包括例如, 十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-十二烷基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡醚 (参见例如, Malmsten, *M. Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第92页); 以及全氟化学乳液, 如FC-43 (Takahashi等人, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252)。

[0690] 用作渗透增强剂的各种脂肪酸及其衍生物包括例如, 油酸、月桂酸、癩酸 (正癩酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸、三癩酸、单油酸甘油酯 (1-单油酰基-rac-甘油)、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸、1-单癩酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮, 酰基肉碱、酰基胆碱、其C₁₋₂₀烷基酯 (例如, 甲基、异丙基和叔丁基) 和其单甘油酯和二甘油酯 (即油酸酯、月桂酸酯、癩酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等) (参见例如, Touitou, E. 等人, *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第92

页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;El Hariri等人,J.Pharm.Pharmacol.,1992,44,651-654)。

[0691] 胆汁的生理作用包括促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Brunton,第38章:Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第9版,Hardman等人编辑,McGraw-Hill,New York,1996,第934-935页)。各种天然胆汁盐及其合成衍生物用作渗透增强剂。术语“胆汁盐”包括胆汁的任何天然存在的组分及其任何合成衍生物。合适的胆汁盐包括例如,胆酸(或其药学上可接受的钠盐,胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡胆酸(葡胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、甘脱氧胆酸(甘脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢-富西酸钠(STDHF)、甘二氢富西酸钠和聚氧乙烯-9-十二烷基醚(POE)(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Swinyard,第39章:Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Gennaro编辑,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990,第782-783页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Yamamoto等人,J.Pharm.Exp.Ther.,1992,263,25;Yamashita等人,J.Pharm.Sci.,1990,79,579-583)。

[0692] 如与本公开结合使用的螯合剂可以定义为通过与金属离子形成复合物而从溶液中去金属离子的化合物,结果是增强了RNAi剂通过粘膜的吸收。关于其在本公开中作为渗透增强剂的用途,螯合剂具有还用作DNase抑制剂的另外的优点,因为大多数表征的DNA核酸酶需要二价金属离子进行催化,并且因此被螯合剂抑制(Jarrett,J.Chromatogr.,1993,618,315-339)。合适的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)二钠、柠檬酸、水杨酸盐(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸盐和高香草酸盐)、胶原蛋白的N-酰基衍生物、 β -二酮的月桂醇聚醚-9和N-氨基酰基衍生物(烯胺)(参见例如,Katdare,A.等人,Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Buur等人,J.Control Rel.,1990,14,43-51)。

[0693] 如本文所使用的,非螯合非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为作为螯合剂或表面活性剂表现出不显著的活性,但仍然增强RNAi剂通过消化道粘膜的吸收的化合物(参见例如,Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33)。此类渗透增强剂包括例如,不饱和环脲、1-烷基-和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页);和非甾体抗炎剂,如双氯芬酸钠、吲哚美辛和苯基丁氮酮(Yamashita等人,J.Pharm.Pharmacol.,1987,39,621-626)。

[0694] 在细胞水平上增强RNAi剂的摄取的药剂也可以添加到本公开的药物和其它组合物中。例如,阳离子脂质,如lipofectin(Junichi等人,美国专利第5,705,188号)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子,如聚赖氨酸(WO 97/30731)也已知增强dsRNA的细胞摄取。

[0695] 其它药剂可以用于增强施用的核酸的渗透,包括二醇如乙二醇和丙二醇,吡咯如2-吡咯、氮酮和萜烯如柠檬烯和薄荷酮。

[0696] vi.赋形剂

[0697] 与载体化合物相比,“药物载体”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其它用于将一种或多种核酸递送到动物的药理学惰性媒剂。赋形剂可以是液体的或固体的并且在考虑计划的施用方式的情况下进行选择,以便在与核酸和给定药物组合物的其它组分组合时提供期望的体积、稠度等。典型的药物载体包括但不限于粘合剂(例如,预凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其它糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、硅石、胶体二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟乙酸淀粉钠等);以及润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。

[0698] 适合于非肠胃外施用的不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用于配制本公开的组合物。适合的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0699] 用于局部施用核酸的制剂可以包括无菌和非无菌水性溶液、普通溶剂(如醇)中的非水性溶液或核酸在液体或固体油基质中的溶液。溶液还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂。可以使用适于非肠胃外施用的不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0700] 适合的药学上可接受的赋形剂包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0701] vii.其他组分

[0702] 本公开的组合物可以另外含有在药物组合物中以其现有技术确定的使用水平常规存在的其它辅助组分。因此,例如,组合物可以含有另外的相容性药物活性材料,例如,止痒药、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或可以含有可用于物理配制本公开的组合物的各种剂型的另外的材料,如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,这类材料在添加时不应该不适当地干扰本公开的组合物的组分的生物活性。制剂可以进行灭菌,并且如果期望的话,可以与不与制剂的核酸有害地相互作用的助剂混合,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂或芳香物质。

[0703] 水性悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0704] 在一些实施方案中,本公开所述的药物组合物包括(a)一种或多种RNAi剂和(b)通过非RNAi机制发挥作用并且可用于治疗SNCA相关病症的一种或多种药剂。此类药剂的实例包括但不限于多巴胺激动剂和促进剂等,包括卡比多巴-左旋多巴、左旋多巴、恩他卡朋(entacapone)、托卡朋(tolcapone)、阿片哌酮(opicapone)、普拉克索(pramipexole)、罗匹尼罗(ropinirole)、阿朴吗啡、罗替戈汀(rotigotine)、司立吉林(selegiline)、雷沙吉兰(rasagiline)、沙芬酰胺(safinamide)、金刚烷胺、伊曲茶碱(istradefylline)、苯海索

(trihexyphenidyl)、苯脱品 (benztropine)、利斯的明 (rivastigmine)、多奈哌齐 (donepezil)、加兰他敏 (galantamine) 和美金刚。

[0705] 此类化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药物程序来确定,例如用于确定LD₅₀ (对50%群体致死的剂量)和ED₅₀ (在50%群体中治疗有效的剂量)。在毒性作用和治疗作用之间的剂量比为治疗指数,并且其可以表示为LD₅₀/ED₅₀比率。表现出高治疗指数的化合物是优选的。

[0706] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制在人类中使用的剂量范围。在本公开中本文所述的组合物的剂量通常落在包含ED₅₀的循环浓度范围内,而几乎没有或没有毒性。根据所采用的剂型和所利用的施用途径,剂量可以在此范围内变化。对于本公开所述的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以最初从细胞培养测定估计。剂量可以在动物模型中制定以达到化合物,或在适当的情况下,达到靶序列的多肽产物的循环血浆浓度范围 (例如,实现多肽浓度的降低),其包括如细胞培养物中确定的IC₅₀ (即,达到症状的一半最大抑制的测试化合物的浓度)。可以使用此类信息来更精确地确定人体中的有用剂量。可以例如通过高效液相色谱法来测量血浆中的水平。

[0707] 除了如上所讨论的其施用之外,本公开中所述的RNAi剂可以与有效治疗由核苷酸重复表达介导的病理过程的其它已知药剂组合施用。在任意情况下,主治医生可基于使用本领域中已知或本文所述的标准功效测量方法观察的结果来调整RNAi剂施用的量和时机。

[0708] VII. 试剂盒

[0709] 在某些方面,本公开提供了包括含有siRNA化合物 (例如,双链siRNA化合物或siRNA化合物 (例如,前体,例如可以加工成siRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物的DNA,例如双链siRNA化合物或siRNA化合物,或其前体))的药物制剂的合适容器的试剂盒。在某些实施方案中,药物制剂的单个组分可以提供在一个容器中。可选地,可能期望在两个或更多个容器中单独提供药物制剂的组分,例如,一个容器用于siRNA化合物制备物,并且至少另一个用于载体化合物。试剂盒可以以多个不同的配置包装,如单个盒子中的一个或多个容器。可以将不同的组分组合,例如,根据随试剂盒提供的说明书。这些组分可以根据本文所描述的方法进行组合,例如,以制备和施用药物组合物。试剂盒还可以包括递送装置。

[0710] VIII. 用于抑制SNCA表达的方法

[0711] 本公开还提供了抑制细胞中SNCA基因的表达的方法。所述方法包括将细胞与RNAi剂,例如,双链RNAi剂接触,其量有效地抑制细胞中SNCA的表达,由此抑制细胞中SNCA的表达。在本公开的某些实施方案中,SNCA优先地在CNS (例如,脑)细胞中抑制。

[0712] 细胞与RNAi剂,例如双链RNAi剂的接触可以在体外或体内进行。使细胞与RNAi剂体内接触包括使受试者 (例如,人受试者)体内的细胞或细胞组与RNAi剂接触。体外和体内接触细胞的方法的组合也是可能的。

[0713] 如上文所讨论的,接触细胞可以是直接的或间接的。此外,接触细胞可以通过靶向配体实现,包括本文所描述的或本领域已知的任何配体。

[0714] 如本文所使用的,术语“抑制”可与“减少”、“沉默”、“下调”、“抑止”和其它类似术语互换使用,并且包括任何水平的抑制。在某些实施方案中,可以在细胞培养条件下评估抑制水平,例如,对于本公开的RNAi剂,例如,其中细胞培养中的细胞通过Lipofectamine™介

导的转染以10nM或更低、1nM或更低等的细胞附近的浓度进行转染。给定RNAi剂的敲低可以通过比较细胞培养中的预处理水平与细胞培养中的后处理水平来确定,任选地还与用乱序或其它形式的对照RNAi剂平行处理的细胞进行比较。细胞培养物中例如任选地50%或更多的敲低可以由此被鉴定为指示已发生“抑制”或者“减少”、“下调”或“阻抑”等。明确设想,在本领域所描述的适当控制的条件下,也可以在体内系统中对本公开的RNAi剂评估靶向的mRNA或编码蛋白水平(以及因此由本公开的RNAi剂引起的“抑制”程度等)。

[0715] 如本文中所用,术语“抑制SNCA基因的表达”或“抑制SNCA的表达”包括抑制任意SNCA基因(例如,小鼠SNCA基因、大鼠SNCA基因、猴SNCA基因或人类SNCA基因)以及编码SNCA蛋白质的SNCA基因的变体或突变体的表达。因此,在遗传操纵的细胞、细胞组或生物体的情况下,SNCA基因可以为野生型SNCA基因、突变型SNCA基因或转基因SNCA基因。

[0716] “抑制SNCA基因的表达”包括对SNCA基因的任意抑制水平,例如SNCA基因表达的至少部分抑制,如至少20%的抑制。在某些实施方案中,抑制为至少30%、至少40%、任选地至少50%、至少约60%、至少70%、至少约80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%;或抑制到低于测定方法的检测水平。

[0717] SNCA基因的表达可基于任何与SNCA基因表达相关的变量的水平来测定,例如SNCA mRNA水平或SNCA蛋白水平,或例如,神经炎症的水平,例如,小神经胶质细胞和星形神经胶质细胞激活,以及与神经元细胞死亡相关的脑区域中的SNCA沉积和/或外泌体(神经元或其他的)内的SNCA mRNA/蛋白质的水平。

[0718] 可以通过与对照水平相比这些变量中的一个或多个的绝对或相对水平的降低来评估抑制。对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如,给药前基线水平,或从未处理或用对照(例如,仅缓冲液对照或无活性药剂对照)处理的类似受试者、细胞或样品确定的水平。

[0719] 在本公开的方法的一些实施方案中,SNCA基因的表达被抑制至少20%、30%、40%,任选地至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%,或被抑制到低于该测定的检测水平。在某些实施方案中,该方法包括对SNCA的表达的临床相关抑制,例如,如通过在用药剂治疗受试者以降低SNCA表达后的临床相关结果所表明的。

[0720] SNCA基因表达的抑制可以通过其中SNCA基因被转录并且已经被处理(例如,通过使一个或多个细胞与本公开的RNAi剂接触,或通过向所述细胞存在或曾经存在的受试者施用本公开的RNAi剂)的第一细胞或细胞组(例如,此类细胞可以存在于源自受试者的样品中)表达的mRNA的量的减少来表现,使得与基本上与第一细胞或细胞组相同但尚未如此处理的第二细胞或细胞组(未用RNAi剂处理或未用靶向所关注的基因的RNAi剂处理的对照细胞)相比,SNCA基因的表达受到抑制。抑制程度可以用以下方式表示:

$$[0721] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{处理细胞中的mRNA})}{\text{对照细胞中的mRNA}} \times 100\%$$

[0722] 在其它实施方案中,可以根据与SNCA基因的表达(例如SNCA蛋白表达)功能性关联的参数的降低来评估对SNCA亚型的表达的抑制。SNCA基因沉默可以在任何表达SNCA的细胞(无论与表达构建体是内源的还是异源的),并且通过本领域已知的任何测定确定。

[0723] 对于SNCA蛋白表达的抑制可体现为由细胞或细胞组表达的SNCA蛋白的水平(例

如,源自受试者的样品中表达的蛋白质水平)降低。如上所述,为了评估mRNA阻抑,经治疗的细胞或细胞群组中的蛋白质表现水平的抑制可类似地表现为相对于对照细胞或细胞群组内蛋白质含量的百分比。

[0724] 可以用于评估SNCA基因的表达抑制的对照细胞或细胞组包括尚未与本公开的RNAi剂接触的细胞或细胞组。例如,对照细胞或细胞组可以源自在用RNAi剂治疗受试者之前的个体受试者(例如,人类或动物受试者)。

[0725] 细胞或细胞组表达的SNCA mRNA的水平可以使用本领域已知的用于评估mRNA表达的任何方法来确定。在一个实施方案中,通过检测转录的多核苷酸或其部分,例如SNCA基因的mRNA来确定样品中SNCA的表达水平。可以使用RNA提取技术从细胞中提取RNA,包括例如使用酸酚/异硫氰酸胍提取(RNazol B;Biogenesis)、RNeasy™ RNA制备试剂盒(Qiagen®)或PAXgene (PreAnalytix,瑞士)。利用核糖核酸杂交的典型测定形式包括核连缀测定、RT-PCR、RNase保护测定、RNA印迹、原位杂交和微阵列分析。循环SNCA mRNA可以使用WO2012/177906中描述的方法来检测,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0726] 在一些实施方案中,使用核酸探针测定SNCA的表达水平。如本文所使用的,术语“探针”是指能够与特定SNCA核酸或蛋白质或其片段选择性地结合的任何分子。探针可以由本领域技术人员合成,或源自适当的生物制剂。探针可以专门设计成被标记。可以用作探针的分子的实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0727] 分离的mRNA可以用于杂交或扩增测定,包括但不限于DNA分析或RNA印迹分析、聚合酶链式反应(PCR)分析和探针阵列。一种用于确定mRNA水平的方法涉及将分离的mRNA与可以与SNCA mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。在一个实施方案中,mRNA被固定在固体表面上并与探针接触,例如通过在琼脂糖凝胶上运行分离的mRNA并将mRNA从凝胶转移到膜,如硝酸纤维素。在替代实施方案中,探针固定在固体表面上,并且mRNA与探针接触,例如,在Affymetrix®基因芯片阵列中。本领域技术人员可以容易地将已知的mRNA检测方法应用于确定SNCA mRNA的水平。

[0728] 用于确定样品中SNCA的表达水平的替代方法涉及样品中例如mRNA的核酸扩增或逆转录酶(以制备cDNA)的过程,例如通过RT-PCR(Mullis,1987,美国专利第4,683,202号中所述的实验实施方案)、连接酶链式反应(Barany(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193)、自持序列复制(Guatelli等人,(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi等人,(1988)Bio/Technology 6:1197)、滚环复制(Lizardi等人,美国专利第5,854,033号)或任何其它核酸扩增方法,然后使用本领域技术人员众所周知的技术检测扩增的分子。如果此类核酸分子以非常低的数量存在,则这些检测方案对于检测核酸分子特别有用。在本公开的特定方面,SNCA的表达水平通过定量荧光RT-PCR(即TaqMan™系统)、通过Dual-Glo®荧光素酶测定或通过用于测量SNCA的表达或mRNA水平的其它领域公认的方法来确定。

[0729] SNCA mRNA的表达水平可以使用膜印迹(如用于杂交分析,如RNA、DNA、斑点等)或微孔、样品管、凝胶、珠或纤维(或任何包括结合的核酸的固体载体)来监测。参见美国专利第5,770,722号、第5,874,219号、第5,744,305号、第5,677,195号和第5,445,934号,所述美

国专利通过引用并入本文。SNCA的表达水平的确定也可以包括在溶液中使用核酸探针。

[0730] 在一些实施方案中,使用支链DNA(bDNA)测定或实时PCR(qPCR)来评估mRNA表达的水平。此PCR方法的使用在本文给出的实施例进行了描述和例示。此类方法也可以用于检测SNCA核酸。

[0731] SNCA蛋白表达水平可以使用本领域已知的任何用于测量蛋白质水平的方法来确定。此类方法包括,例如,电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散(单或双)、免疫电泳、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、电化学发光测定等。此类测定也可以用于检测指示SNCA蛋白的存在或复制的蛋白质。

[0732] 在一些实施方案中,本公开的方法在治疗SNCA相关疾病中的功效通过SNCA mRNA水平的降低来评估(例如,通过评估CSF样品的SNCA水平,通过脑活检或其他方式)。

[0733] 在本公开的方法的一些实施方案中, RNAi剂向受试者施用,使得RNAi剂递送至受试者内的特定位点。SNCA表达的抑制可使用源自受试者体内特定位点(例如, CNS细胞)的样品中SNCA mRNA或SNCA蛋白的水平或水平变化的测量值来评估。在某些实施方案中,该方法包括对SNCA表达的临床相关抑制,例如,如通过在用药剂治疗受试者以降低SNCA表达后的临床相关结果所表明的。

[0734] 如本文所使用的,术语检测或测定分析物的水平被理解为意指执行步骤以确定材料(例如,蛋白质、RNA)是否存在。如本文所使用的,检测或测定的方法包括检测或确定低于所使用的方法的检测水平的分析物水平。

[0735] IX. 治疗或预防SNCA相关神经退化性疾病的方法

[0736] 本公开还提供了使用本公开的RNAi剂或含有本公开的RNAi剂的组合物来减少或抑制细胞中SNCA的表达的方法。所述方法包括使细胞与本公开的dsRNA接触,并且将细胞维持足够的时间以获得SNCA基因的mRNA转录物的降解,由此抑制SNCA基因在细胞中的表达。

[0737] 基因表达的降低可通过本领域中已知的任何方法评估。例如, SNCA表达的减少可以使用本领域普通技术人员常规的方法测定SNCA的mRNA表达水平来确定,例如RNA印迹、qRT-PCR;通过使用本领域普通技术人员常规的方法,如蛋白质印迹、免疫技术和质谱法测定SNCA的蛋白质水平来确定。

[0738] 在本公开的方法中,细胞可在体内或体外接触,即,细胞可处于受试者体内。

[0739] 适用于使用本公开的方法进行处理的细胞可以是表达SNCA基因的任何细胞。适用于本公开的方法的细胞可以是哺乳动物细胞,例如灵长类细胞(如人细胞或非人灵长类动物细胞,例如猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类动物细胞(如大鼠细胞或小鼠细胞)。在一个实施方案中,细胞是人细胞,例如人CNS细胞。

[0740] 在某些实施方案中,细胞中的SNCA表达被抑制至少30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或约100%,即,被抑制到低于检测水平。在优选的实施方案中, SNCA表达抑制至少50%。

[0741] 本公开的体内方法可包括向受试者施用含有RNAi剂的组合物,其中RNAi剂包括与待治疗的哺乳动物的SNCA基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。当待治疗的生物体是哺乳动物如人时,组合物可以通过本领域已知的任何方式施用,包括但不限于

CNS-定向和/或颅内(例如,脑室内、脑实质内和鞘内)、口服、腹膜内或其它肠胃外途径,包括静脉内、肌内、玻璃体内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、鼻内、直肠和局部(包括口腔和舌下)施用。在某些实施方案中,组合物通过鞘内输注或注射施用。

[0742] 在一些实施方案中,通过贮库注射进行施用。贮库注射可以在长时间段内以一致的方式释放RNAi剂。因此,贮库注射可以减少获得期望的效果(例如,SNCA的期望的抑制,或治疗或预防效果)所需的给药频率。贮库注射也可以提供更一致的血清浓度。贮库注射可以包括鞘内注射、皮下注射或肌内注射。

[0743] 在一些实施方案中,通过泵进行施用。泵可以是外部泵或外科植入的泵。在某些实施方案中,泵是皮下植入的渗透泵。在其它实施方案中,泵是输注泵。输注泵可以用于颅内、静脉内、皮下、动脉或硬膜外输注。在优选实施方案中,输注泵是外科手术植入的泵,其将RNAi剂递送到CNS。

[0744] 可以基于是否期望局部或全身治疗以及基于待治疗的区域来选择施用模式。可以选择施用的途径和位点来增强靶向。

[0745] 在一个方面,本公开还提供了用于抑制哺乳动物中SNCA基因的表达的方法。所述方法包含向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物细胞中的SNCA基因的dsRNA的组合物并将哺乳动物维持足以获得SNCA基因的mRNA转录物的降解的时间,由此抑制细胞中SNCA基因的表达。基因表达的减少可以通过本领域已知的任何方法和通过本文所描述的方法(例如,qRT-PCR)来评估。蛋白质产生的减少可以通过本领域已知的任何方法和通过本文所描述的方法(例如,ELISA)来评估。在一个实施方案中,CNS活检样品或脑脊液(CSF)样品用作组织材料,用于监测SNCA基因或蛋白质表达(或其代理物)的减少。

[0746] 本公开进一步提供了治疗有需要的受试者的方法。本公开的治疗方法包括以靶向SNCA基因的RNAi剂或包含靶向SNCA基因的RNAi剂的药物组合物的有效量向受试者(例如,受益于SNCA表达的抑制的受试者)施用本公开的RNAi剂。

[0747] 此外,本公开提供预防、治疗或抑制SNCA相关神经退化性疾病或病症的进展的方法,如突触核蛋白病,诸如PD、多系统萎缩、路易氏体痴呆(LBD)、单纯性自主神经衰竭(PAF)、皮克氏病、进行性核上性麻痹、拳击员痴呆、与染色体17关联的帕金森氏症、Lytic-Bodig氏病、缠结优势型痴呆、嗜银颗粒病、神经节神经胶质瘤、神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、Hallervorden-Spatz病、脂褐质沉积症、皮质基底节变性、额颞叶痴呆、额颞叶变性、阿尔兹海默病、亨廷顿病、唐氏综合征、精神错乱、精神分裂症和克雅氏病。

[0748] 该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的任意RNAi剂(例如,dsRNA剂)或药物组合物,从而预防、治疗或抑制受试者的SNCA相关神经退化性疾病的进展。

[0749] 本公开的RNAi剂可以作为“游离RNAi剂”施用。在不存在药物组合物的情况下施用游离RNAi剂。裸RNAi剂可以在合适的缓冲溶液中。缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。在一个实施方案中,缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调节含有RNAi剂的缓冲溶液的pH和渗透压,使得其适合向受试者施用。

[0750] 可选地,本公开的RNAi剂可以作为药物组合物,如dsRNA脂质体制剂施用。

[0751] 将会受益于SNCA基因表达的降低或抑制的受试者为患有SNCA相关神经退化性疾病的那些。

[0752] 本公开进一步提供了RNAi剂或其药物组合物用于例如治疗将受益于SNCA表达的减少或抑制的受试者(例如,患有SNCA相关神经退化性病症的受试者)的方法,其与其它药物或其它治疗方法组合,例如,与已知药物或已知治疗方法组合,例如目前用于治疗这些病症的那些药物或治疗方法。例如,在某些实施方案中,靶向SNCA的RNAi剂与例如本文其它地方描述的或本领域另外已知的可用于治疗SNCA相关神经退化性病症的药剂组合施用。例如,适用于治疗受益于SNCA表达减少的受试者(例如,患有SNCA相关神经退化性病症的受试者)的另外的药剂和治疗可以包括目前用于SNCA的症状的药剂。RNAi剂和另外的治疗剂可以同时或以相同的组合施用,例如鞘内,或另外的治疗剂可以作为单独的组合物的一部分或在单独的时间施用,或通过本领域已知或本文所描述的另一种方法施用。

[0753] 示例性的另外的治疗剂和治疗包括多巴胺调节剂等,例如,卡比多巴-左旋多巴、左旋多巴、恩他卡朋、托卡朋、阿片哌酮、普拉克索、罗匹尼罗、阿朴吗啡、罗替戈汀、司立吉林、雷沙吉兰、沙芬酰胺、金刚烷胺、伊曲茶碱、苯海索、苯脱品、利斯的明、多奈哌齐、加兰他敏和美金刚,以及物理、职业和言语疗法,包括心肺、耐力、柔韧性和步态与平衡训练的训练程序,以及涉及将电极植入脑的靶向区域中的深层脑刺激(DBS)。

[0754] 在一个实施方案中,该方法包括施用本文所述的组合物以使得靶SNCA基因的表达降低至少一个月。在某些实施方案中,表达降低至少2个月、3个月或6个月。

[0755] 任选地,可用于本文所述的方法和组合物的RNAi剂特异性靶向靶SNCA基因的RNA(初级或加工的)。使用RNAi剂抑制这些基因的表达的组合物和方法可以如本文所描述的制备和进行。

[0756] 根据本公开的方法施用dsRNA可以导致患有SNCA相关神经退化性病症的患者的此类疾病或病症的严重程度、体征、症状或标志物的降低。在此上下文中,“减少”意指这一水平统计学上显著或临床上显著的降低。减少可以是例如至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[0757] 可以例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减轻、生活质量、维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标志物水平或适用于正在治疗的给定疾病或以预防为目标的其他任何其它可测量参数来评估疾病的治疗或预防功效。通过测量此类参数中的任一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。例如,可以通过例如对受试者的认知、学习或记忆的定期监测来评估SNCA相关神经退化性病症的治疗功效。后期读数与初始读数的比较为医师提供了治疗是否有效的指示。通过测量此类参数中的任一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。关于靶向SNCA的RNAi剂或其药物组合物的施用,“有效对抗”SNCA相关神经退化性病症表明,以临床适当的方式施用对于至少对统计学上显著部分的患者产生有益效果,如症状的改善、治愈、疾病的减少、寿命的延长、生活质量的改善或熟悉治疗SNCA相关神经退化性病症和相关病因的医生通常认为是积极的其它效果。

[0758] 当疾病状态的一个或多个参数有统计上显著的改善时,或由于没有恶化或出现否则预期出现的症状,治疗或预防效果是明显的。例如,疾病的可测量参数的至少10%的有利变化,并且任选地至少20%、30%、40%、50%或更多的有利变化可以指示有效的治疗。也可以使用本领域已知的给定疾病的实验动物模型来判断给定RNAi剂药物或该药物的制剂的

功效。当使用实验动物模型时,当观察到标志物或症状的统计学上显著的减少时,证明了治疗的功效。

[0759] 可选地,功效可以通过由诊断领域的技术人员基于临床上接受的疾病严重程度分级标度确定的疾病严重性的降低来测量。任何导致例如使用适当标度测量的疾病严重程度减轻的积极变化表示使用本文所描述的RNAi剂或RNAi剂制剂的充分治疗。

[0760] 受试者可施用治疗量的dsRNA,如约0.01mg/kg至约200mg/kg。

[0761] RNAi剂可以定期地鞘内、通过玻璃体内注射或通过静脉内输注施用一段时间。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以以较低频率施用治疗。RNAi剂的施用可以降低例如患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其它区室中的SNCA水平至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多。在优选实施方案中,施用RNAi剂可使例如患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其它区室中的SNCA水平降低至少约50%。

[0762] 在施用全剂量的RNAi剂之前,可以向患者施用较小的剂量,如5%的输注反应,并且监测不良反应,如过敏反应。在另一个实例中,可以监测患者不期望的免疫刺激作用,如增加的细胞因子(例如,TNF- α 或INF- α)水平。

[0763] 一次或多次注射可以用于向受试者递送期望的,例如每月剂量的RNAi剂。注射可以在一个时间段内重复进行。施用可以定期重复。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以经较低频率施用治疗。重复剂量方案可以包括定期施用治疗量的RNAi剂,如每月或延长到每季度一次、每年两次、每年一次。在某些实施方案中,RNAi剂约每月施用一次至约每季度施用一次(即约每三个月施用一次)。

[0764] 除非另有定义,否则本文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管类似或等同于本文所描述的方法和材料的方法和材料可以用于实施或测试本发明所述的RNAi剂和方法,但下文描述了合适的方法和材料。本文所提及的所有公开、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,所述材料、方法和实施例仅是说明性的并且不旨在进行限制。

[0765] 非正式的序列列表也随本文提交,并形成所提交的说明书的一部分。

[0766] 实施例

[0767] 实施例1:材料及方法

[0768] 生物信息学

[0769] 一组靶向人类突触核蛋白 α 基因(SNCA;人类NCBI refseq ID NM_007308.3;NCBI GeneID:6622;SEQ ID NO:1)以及来自食蟹猴的毒理学物种SNCA(XM_005555422.2;SEQ ID NO:3)直系同源物的siRNA使用定制的R和Python脚本设计。全部siRNA设计为具有与人类SNCA转录物的完美匹配,且子集与食蟹猴直系同源物完美匹配或接近完美匹配。人类SNCA NM_007308REFSEQ mRNA,版本3(SEQ ID NO:1),具有3312个碱基的长度。用于该组siRNA设计的基本原理和方法如下。用对来自靶向多样化脊椎动物基因集合的数千种不同的siRNA设计的mRNA敲低的直接测量衍生的随机森林模型确定从位置10至末端的每一潜在23mer siRNA的预测功效。对于siRNA的每一条链,在蛮力搜索中使用定制的Python脚本来测量siRNA与人类转录组中全部潜在比对之间错配的数目和位置。对此处定义为反义寡核苷酸

的位置2至9的种子区域内以及此处定义为反义寡核苷酸的位置10至12的切割位点内的错配给出额外权重。对于种子错配、切割位点和直至反义链位置19的其它位置,错配的相对权重为2.8、1.2、1。忽略位于第一位的错配。通过将每一加权错配的值相加而计算每一条链的特异性评分。对于其在人类和食蟹猴中的反义评分 ≥ 2 且预测效率为 $\geq 50\%$ 敲低的siRNA给出优先性。

[0770] 体外筛选- *Dual-Glo*® 荧光素酶测定

[0771] 使Cos-7细胞(ATCC, Manassas, VA)在37°C下5% CO₂气氛中在补充有10% FBS的DMEM(ATCC)中生长至接近融合,之后通过胰蛋白酶化从平板释放。以10nM和0.1nM进行多剂量实验。用含有3'非翻译区(UTR)的质粒进行siRNA和psiCHECK2-SNCAs(人类NM_007308和小鼠NM_009221)质粒转染。转染通过下述进行:添加每孔5μL的siRNA双链体和5μL(5ng)的psiCHECK2质粒以及每孔4.9μL的Opti-MEM加0.1μL的Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, Carlsbad CA, cat#13778-150),然后于室温下温育15分钟。然后,将混合物添加至细胞中,其重悬在35μL的新鲜完全培养基中。转染的细胞于37°C下5% CO₂气氛中温育。

[0772] siRNA和psiCHECK2质粒转染后48小时,测量萤火虫荧光素酶(转染对照)和海肾(Renilla)荧光素酶(融合至SNCA靶序列)。首先,从细胞去除培养基。然后,通过向各孔添加20μL *Dual-Glo*® 荧光素酶试剂和20μL DMEM的混合物来测量萤火虫荧光素酶活性。将混合物在室温下温育30分钟,然后在Spectramax(Molecular Devices)上测量荧光(500nm)以检测萤火虫荧光素酶信号。通过向各孔添加20μL的室温 *Dual-Glo*® Stop & *Glo*® 缓冲液与0.1μL *Dual-Glo*® Stop & *Glo*® 底物的混合物,并将平板温育10至15分钟,然后再次测量荧光以确定海肾荧光素酶信号来测量海肾荧光素酶活性。*Dual-Glo*® Stop & *Glo*® 混合物淬灭萤火虫荧光素酶信号及海肾荧光素酶反应的持续荧光。通过将各孔内的海肾(SNCA)信号相对于萤火虫(对照)信号标准化来确定siRNA活性。然后,相对于用相同载体转染但未用siRNA处理或用非靶向siRNA处理的细胞评估siRNA活性的幅度。全部转染使用n=4进行。

[0773] 体外筛选-细胞培养和转染

[0774] 细胞通过下述转染:在384孔板中将每孔4.9μL的Opti-MEM加0.1μL的RNAiMAX(Invitrogen, Carlsbad CA, cat#13778-150)加至每孔5μL的siRNA双链体中,每一siRNA双链体具有4个重复,以及在室温下温育15分钟。随后,将含 $\sim 5 \times 10^3$ 个细胞的40μL培养基添加至siRNA混合物中。在RNA纯化之前,将细胞温育24小时。实验以10nM、1nM和0.1nM以及PBS对照进行。转染实验在具有EMEM(ATCC目录号30-2003)的人类肝细胞瘤Hep3B细胞(ATCC HB-8064)、具有EMEM培养基的小鼠神经母细胞瘤Neuro-2A细胞(ATCC CCL-131)以及人类神经母细胞瘤BE(2)-C细胞、HeLa和B16-F10细胞中进行。BE(2)-C细胞(ATCC CRL-2268)在EMEM:F12培养基(Gibco目录号11765054)中生长。HeLa细胞和B16-F10细胞根据标准方案生长。

[0775] 体外筛选-使用ABI高能力cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat#4368813)的cDNA合成

[0776] 将12μL含有1.2μL 10X缓冲液、0.48μL 25X dNTP、1.2μL 10x随机引物、0.6μL逆转录酶、0.6μL Rnase抑制剂和7.92μL H₂O/反应的主混合物添加至以上分离的RNA结合珠中。将板密封、混合并在电磁振荡器上于室温下温育10分钟,之后于37°C下温育2h。分支DNA测定也使用前述方案进行。

[0777] 体外筛选-实时PCR

[0778] 在384孔板(Roche目录号04887301001)中,将2 μ L的cDNA添加至每孔含0.5 μ L的人类或小鼠GAPDH TaqMan探针(ThermoFisher cat4352934E或4351309)及0.5 μ L的适宜SNCA探针(例如,Thermo Fisher Taqman人类:Hs00268077,小鼠:Mm00485946)的主混合物及5 μ LLightcycler 480探针主混合物(Roche Cat#04887301001)。实时PCR于LightCycler480实时PCR系统(Roche)中进行。每一双链体以N=4测试,且数据系相对于用非靶向对照siRNA转染的细胞标准化。为了计算相对倍数变化,使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法分析实时数据并针对使用以非靶向对照siRNA转染的细胞进行的测定标准化。

[0779] 实施例2:鉴定潜在候选siRNA以适应CNS定向用途

[0780] 先前进行活性SNCA-靶向siRNA(双链体)的体外和体内筛选,并且鉴定SNCA基因(mRNA靶标)中的大量敲低“热点”。356个双链体初始经历各种细胞类型(包括人类BE(2)-C神经母细胞瘤细胞、人类HeLa上皮细胞、B16-F10小鼠上皮细胞)上以及在COS-7非洲绿猴纤维母细胞样细胞中的双重荧光素酶报告系统中的体外筛选。示例性3'UTR SNCA-靶向RNAi剂AD-464778、AD-464782、AD-464694、AD-464634、AD-464779及编码序列(CD)SNCA-靶向RNAi剂AD-464314、AD-464313、AD-464590、AD-464585、AD-464229、AD-464586和AD-464592分别在BE(2)-C细胞和COS-7细胞双重荧光素酶报告系统中以10nM浓度评估(图1A),其中全部此类双链体在至少一种体外系统中显示显著的敲低(例如,>50% SNCA mRNA降低)。观察到针对SNCA敲低的大多数有效双链体在3'UTR区中出现。随后,针对肝脏SNCA敲低,在过表达人类SNCA-AAV的小鼠中测定12种指示的双链体(3'UTR-靶向siRNA:AD-464778、AD-464782、AD-464694、AD-464634、AD-464779;编码序列-靶向siRNA:AD-464314、AD-464313、AD-464590、AD-464585、AD-464229、AD-464586和AD-464592)。对于各种测试的siRNA,包括全部3'UTR-靶向双链体(AD-464778、AD-464782、AD-464694、AD-464634和AD-464779),并且特定地对于编码序列-靶向AD-464314和AD-464229双链体,观察到肝脏SNCA水平的强劲体内敲低(图1B)。观察到体外细胞系筛选与体内肝脏AAV小鼠肝脏数据良好相关。

[0781] 前40种最有效的SNCA-靶向siRNA从体外热点与结构活性关系(SAR)评估中鉴定,其针对每种测试的肝定向(GalNAc修饰的)双链体在0.1nM、1nM和10nM的浓度范围内进行,并且还对SNCA-靶向双链体进行RNAseq评估,以鉴定选定数目的SNCA-靶向siRNA而进行到进一步的体内评估和适应于CNS-靶向siRNA(包括本公开的siRNA)。具体地,当选择在0.1nM下展现最高敲低水平且显示明确的线性剂量反应的那些双链体时,SNCA-靶向siRNA AD-1548851.1、AD-1548854.1、AD-1548869.1、AD-1548870.1、AD-1548884.1、AD-1548886.1、AD-1549052.1、AD-1549054.1、AD-1549245.1、AD-1549266.1、AD-1549267.1、AD-1549269.1、AD-1549272.1、AD-1549283.1、AD-1549284.1、AD-1549285.1、AD-1549290.1、AD-1549333.1、AD-1549334.1、AD-1549351.1、AD-1549354.1、AD-1549357.1、AD-1549359.1、AD-1549397.1、AD-1549401.1、AD-1549403.1、AD-1549406.1、AD-1549407.1、AD-1549439.1、AD-1549518.1、AD-1549525.1、AD-1549628.1、AD-1549641.1、AD-1571164.1、AD-1571187.1、AD-1571188.1、AD-1571191.1、AD-1571193.1、AD-1571194.1和AD-1571262.1是鉴定为最有效的四十种双链体(图2)。

[0782] 仅两种测试的双链体(AD-1549525.1和AD-1549628.1)表现显著的脱靶效应,即,超越log2倍数变化的脱靶基因变化。

[0783] 基于以上结果,选择17种双链体用于体内用途的进一步评估(包括经由AAV向模型小鼠施用)。五种所选择的双链体(AD-1549052.1、AD1549054.1、AD-1548886.1、AD-1548884.1和AD-1549245.1)靶向SNCA中的编码序列(CD),而剩余12种选择的双链体(AD-1549359.1、AD-1549333.1、AD-1549407.1、AD-1548854.1、AD-1549283.1、AD-1549267.1、AD-1548869.1、AD-1571164.1、AD-1549354.1、AD-1571188.1、AD-1549401.1和AD-1549290.1)靶向SNCA中的UTR序列。选择的双链体中为UTR-靶向双链体AD-1549290.1(图3)。表4提供用于任何个别双链体的SNCA mRNA内的靶向位置(进一步注意:SNCA mRNA内的CD跨越核苷酸位置226至648,其中SNCA外显子1跨越SNCA mRNA核苷酸残基1至200,SNCA外显子2跨越SNCA mRNA核苷酸残基201至346,SNCA外显子3跨越SNCA mRNA核苷酸残基347至388,SNCA外显子4跨越SNCA mRNA核苷酸残基389至531,SNCA外显子5跨越SNCA mRNA核苷酸残基532至615,并且SNCA外显子6跨越SNCA mRNA核苷酸残基616至3177)。

[0784] 实施例3:候选SNCA-靶向RNAi剂的体内评估鉴定三种适应于CNS定向用途的候选先导化合物

[0785] 初始17种选择的双链体在体内研究中评估,其中人类SNCA经由腺相关病毒(AAV)施用且在小鼠中表现数天,然后施用SNCA-靶向siRNA。敲低在siRNA施用后7至14天评估(对于siRNA敲低,10天鉴定为最优的)。首次验证了通过AAV在小鼠肝脏中的人类SNCA表达(图4,左侧,其中循环阈值用于检测在第7、14和21天在小鼠肝脏中以剂量反应性方式的AAV介导的SNCA表达)。先前描述的SNCA-靶向双链体AD-464634(3'UTR-靶向)和AD-464314(编码序列-靶向)各自鉴定为以所评估的3mpk和10mpk的量,在7天和17天两个时间点展现强劲的SNCA敲低(图4,右侧)。随后对17种选择的双链体针对hSNCA AAV转染小鼠的肝脏组织中的体内SNCA敲低进行测试,并且大多数测试的双链体显露强劲的体内hSNCA敲低(图5A)。特别地,双链体AD-1549052.3(CD-靶向)、AD-1549359.3(UTR-靶向)、AD-1549054.3(CD-靶向)、AD-1549333.3(UTR-靶向)、AD-1746467.2(UTR-靶向),具有有义链寡核苷酸A-32277955'-gscsagugauUfGfAfagua(Uhd)cuguaL96-3'(SEQ ID NO:263)、反义链寡核苷酸A-28619915'-VPusdAscadGadTacuudCaAfucacugcsusg-3'(SEQ ID NO:264)、对应的未修饰的有义链寡核苷酸5'-GCAGUGAUUGAAGUAUCUGUA-3'(SEQ ID NO:265)和对应的未修饰的反义链寡核苷酸序列5'-UACAGATACUCAAUCACUGCUG-3'(SEQ ID NO:266),其中CNS定向的双链体具有有义链寡核苷酸5'-gscsagugauUfGfAfagua(Uhd)cugsusa-3'(SEQ ID NO:267)和反义链寡核苷酸SEQ ID NO:264)、AD-1746465.2(UTR-靶向)、AD-1571188.3(UTR-靶向)、AD-1549401.3(UTR-靶向)、AD-1548886.3(CD-靶向)和AD-1746466.2(UTR-靶向),各自在hSNCA AAV转染小鼠的肝脏组织中展现强力的hSNCA敲低。这些siRNA中的七种,AD-1549054.3、AD-1549333.3、AD-1746465.2、AD-1571188.3、AD-1549401.3、AD-1548886.3和AD-1746466.2,选择用于进一步评估。在肝脏测试的形式中,这些双链体中的每一种携带GalNAc和C16修饰两者(图5B);但是,设想去除GalNAc部分以使这些双链体适应CNS靶向。

[0786] 体内SNCA敲低、体外SNCA敲低和RNAseq结果的额外回顾导致选择优选的一组三种SNCA-靶向siRNA,即AD-1549333(3'UTR-靶向)、AD-1746465(3'UTR-靶向)和AD-1549054(CD-靶向),用于进一步体内评估,包括非人类灵长动物(NHP)研究(图6A)。该选择包括一种编码序列靶向的抗-SNCA siRNA及两种UTR-靶向siRNA(图6B),其各自于3mg/kg施用时表现出高体内敲低活性并且包括反义链的位置6或位置16的C16修饰(一种先前研究去风险的化

学方式;图6C)。这三种双链体,AD-1549333、AD-1746465和AD-1549054,通过从有义链去除3'末端三触角GalNAc且包含定位在有义链3'端的倒数第一和倒数第二核苷酸间键处的两个附加硫代磷酸酯修饰,分别适应于CNS定向递送,如表2中所示,分别对于所得先导双链体AD-1747585(具有亲本双链体AD-1549333)、AD-1747583(具有亲本双链体AD-1746465)和AD-1747580(具有亲本双链体AD-1549054)(图7)。

[0787] 实施例4:在非人类灵长动物(NHP)中候选先导化合物功效和安全性的评估

[0788] 在啮齿动物体内AAV筛选后鉴定为前三种先导候选CNS定向的SNCA-靶向siRNA,即AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585,选择用于在非人类灵长动物(NHP)中的药代动力学(PK)和药效学(PD)特性评估以及任何脱靶效应和毒性评估的评价(参照图8A关于所选择的双链体的初始啮齿动物体内敲低数据;所选择的双链体AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585各自标注为与食蟹猴(*Macaca fascicularis*)突触核蛋白 α (SNCA),转录物变体X2, mRNA(XM_005555422.3)交叉反应,靶向下列位置:AD-1747580靶向XM_005555422.3中的核苷酸257至279;AD-1747583靶向XM_005555422.3中的核苷酸506至528;并且AD-1747585靶向XM_005555422.3中的核苷酸556至578)。对于这三种SNCA-靶向siRNA的PK/PD研究,研究设计分配到在平行动物群组上进行的29天和84天疗程中。对于29天研究(设计为提供关于效能的信息并且可用于进一步的双链体选择和/或在较早时间点的潜在实验改进),三只对照动物给药人工脑脊液(aCSF),同时第二组动物(n=5)施用单一60mg剂量的第一先导候选siRNA(AD-1747580),第三组动物(n=5)施用单一60mg剂量的第二先导候选siRNA(AD-1747583),并且第四组动物(n=5)施用单一60mg剂量的第三先导候选siRNA(AD-1747585)。类似地,对于在第84天终止的平行研究(设计为评估持续时间),另一组(第5组)的三只对照动物用人工脑脊液(aCSF)给药,同时第六组动物(n=5)施用单一60mg剂量的第一先导候选siRNA(AD-1747580),第七组动物(n=5)施用单一60mg剂量的第二先导候选siRNA(AD-1747583),和第八组动物(n=5)施用单一60mg剂量的第三先导候选siRNA(AD-1747585)。

[0789] 从各组的NHP收集系列脑脊液(CSF)和血浆样品用于生物标志物分析(包括外泌体评估)。收集组织用于PK/PD研究,以评估下列各自的mRNA和蛋白质水平:CNS组织=皮质、中脑、纹状体、海马、小脑、脑桥和脊髓;肾脏;肝脏;和心脏。

[0790] 在第29天实验NHP动物群组的注射时间的初始观察中,其中每只NHP动物经由鞘内注射用单一60mg剂量的siRNA给药,检查的全部三种候选先导SNCA-靶向双链体在紧接给药后的24小时时间段内显示所给药动物上的类似药代动力学(图8B),与已经发生的可再现给药一致并且反映平台稳定性。

[0791] 当注射后第29天检查SNCA敲低时,对于检查的三种候选先导SNCA-靶向双链体中的每一种观察到前额叶皮质中SNCA mRNA水平的大于80%敲低以及中脑中SNCA mRNA水平的大于60%敲低的药效学(PD)效应(图9A,左图)。对于全部三种测试的双链体,观察到的对NHP中SNCA mRNA水平的PD效应与双链体在所检查组织中的药代动力学(PK)分布相关,如通过双链体组织浓度的测量所评估的。分别针对AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585双链体,计算1.050 μ g/g、0.532 μ g/g和1.300 μ g/g的双链体组织浓度(PK)“剂量”-组织SNCA mRNA(PD)反应曲线IC₅₀值(图9A,右图)。尽管这三种双链体之间IC₅₀值的计算差异非统计学显著的,靶SNCA mRNA敲低的双链体的IC₅₀值分级标注为AD-1747583<AD-1747580<AD-1747585。在施用候选先导双链体AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585的NHP的脑和脊髓组织中, α -

突触核蛋白水平也显著降低(图9B,左图)。在第29天,脊髓(胸部)和CSF中观察到最大的 α -突触核蛋白敲低(显示于下文图13中),与鞘内给药途径一致。在脑组织中,在纹状体中观察到较大的 α -突触核蛋白敲低,而对于全部三种候选先导双链体的组织蛋白PK/PD图(图9B,右图)比对于SNCA mRNA敲低的相应曲线图(图9A,右图)更高得多地分散。前述数据(包括图10总结)指示,测试的全部三种双链体(AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585)表现类似的 α -突触核蛋白敲低效力,与小鼠AAV体内筛选数据和NHP施用的mRNA PK/PD曲线两者一致。

[0792] 然后,各自施用三种候选先导化合物中的一种的NHP群组随后在注射后第84天评估。在第84天,对于测试的全部三种双链体(AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585)在前额叶皮质和中脑两者中观察到高效力SNCA mRNA敲低。具体地,在第84天全部三种双链体上,在前额叶皮质中观察到80%-90%或更多的SNCA mRNA的敲低(图11,左图)。与先前在施用后第29天观察到的结果一致,第84天样品表现出组织PK与mRNA PD之间的良好相关性,其具有对所检查的三种候选先导双链体中每一种观察到的类似效力(图11,右图)。对于双链体AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585分别测量0.985 μ g/g、0.239 μ g/g和1.40 μ g/g的计算IC₅₀值。值得注意地,施用AD-1747585的群组仅有一只动物符合给药标准,这导致施用AD-1747585群组的剩余者重新给药(该群组中总计六只动物重新给药,其中仅三只重新给药的动物最终观察良好给药)。

[0793] 在第84天对给药的NHP的不同脑区的密切检查表明在施用后第84天不同脑区中的SNCA mRNA(图12A)和 α -突触核蛋白(图12B)两者的显著降低,其中在测试的三种候选先导物(AD-1747580、AD-1747583和AD-1747585双链体)之间几乎没有观察到差异。在经由鞘内途径施用60mg的双链体后的第84天,NHP中的SNCA mRNA降低,并且在测试的三种双链体之间各个脑区(前额叶、中脑、海马、髓质脑桥、纹状体尾状核和小脑)中和脊髓(胸椎)中观察到类似的效力(图12A)。在第84天的最大mRNA敲低水平在前额叶皮质和海马中观察到,与在当前平台上经由鞘内途径施用所分布的双链体一致。具体地,在纹状体和中脑中观察到SNCA mRNA的>60%敲低,其中一些良好给药的动物显示这些较深脑区中的至多90%敲低(图12A)。在第84天,脑和脊髓中的 α -突触核蛋白水平也降低(其中下列区域全部显示 α -突触核蛋白水平的显著降低:前额叶皮质、中脑、胸椎、海马、髓质脑桥、纹状体尾状核和小脑;图12B),再次在这些三种候选先导双链体之间几乎没有观察到差异。值得注意地,在脊髓(胸部)、前额叶皮质、海马和中脑中观察到类似、强劲的 α -突触核蛋白降低(图12B)。对于全部三种分子,也在髓质脑桥和纹状体尾状核中观察到 α -突触核蛋白的至多75%降低。这些数据表明,全部3种先导物具备类似的效力以及类似的持久性。在第84天,在检查的不同脑区中 α -突触核蛋白水平表现与SNCA mRNA水平的高相关性(图12C),其中对于除髓质脑桥之外的全部脑/脊髓区域,R²值超出0.9,并且各脑区中的相关性达到高水平的统计学显著性。某些NHP鉴定为在初始施用双链体时误给药,特别地接受AD-1747585双链体的一些动物。此类动物重新给药并且监测超过第84天(图12D,上图和下图,其中下图省略与具有记载的误给药事件相关的数据)。具体地,在超过第84天检查的重新给药的NHP显示皮质和中脑组织中的强劲 α -突触核蛋白敲低,而最大幅度的 α -突触核蛋白敲低在纹状体(尾状核)中观察到,其中在重新给药的动物中检测到超过90%降低的敲低水平(图12D)。事实上,甚至在两个给药时间不符合成功给药标准(当在施用后24小时测量脑脊液(CSF)的水平时)的NHP动物在初始双链体施用时在纹状体尾状核中表现超过90%的敲低水平。值得注意地,对于全

部三种双链体,组织蛋白质药效学在所检查的各种CNS区域中表现类似的特征。当在延长的时间进程(其包括重新给药和在超过第84天的时间点监测)检查重新给药的NHP动物的脑脊液(CSF)中的 α -突触核蛋白水平时,对于用双链体AD-1747585(重新)给药的动物,CSF α -突触核蛋白水平表现至多75%降低,而对于用AD-1747580和AD-1747583(重新)给药的动物,CSF α -突触核蛋白水平表现至多50%降低(图12E)。

[0794] 还在施用双链体后第84天评估适当给药的NHP动物的CSF中的 α -突触核蛋白水平。对于用双链体AD-1747580和AD-1747583给药的动物,NHP CSF中 α -突触核蛋白的观察水平至多90%降低(PD效应)(图13)。用双链体AD-1747585给药的NHP动物显示CSF中约75%的 α -突触核蛋白敲低。双链体AD-1747585给药的动物也明显表现出可变的CSF α -突触核蛋白敲低,可能是由于血液污染,因为SNCA在血细胞中高度表达。血细胞计数数据可进行评估以验证血液污染是否确实发生。

[0795] 在双链体施用后第29天,对于测试的全部三种先导双链体,治疗的NHP的皮质和中脑中的 α -突触核蛋白仅显示适度(<60%)敲低(图14A,左图)。皮质和中脑中的 α -突触核蛋白水平的这种适度降低指示 α -突触核蛋白在此类组织中延长的半衰期。对于全部三种测试的双链体,观察到组织蛋白PK/PD是分散的(图14A,中图);但是,组织 α -突触核蛋白水平与组织SNCA mRNA水平高度相关(图14A,右图)。当也检查CSF中的水平时,在施用后第29天,CSF中的 α -突触核蛋白敲低与皮质(图14B,左图)和纹状体(图14B,中图) α -突触核蛋白敲低相关。事实上,皮质与CSF α -突触核蛋白敲低水平的相关性观察到类似于先前NHP中用靶向SNCA的反义寡核苷酸看到的。相反,在施用后第29天,中脑组织 α -突触核蛋白敲低不与CSF α -突触核蛋白敲低相关(图14B,右图)。尽管在施用(此处,SNCA-靶向双链体AD-1747580)后第29天,前额叶皮质和中脑组织中的SNCA mRNA水平降低,但 α -突触核蛋白水平仅适度降低,其指示 α -突触核蛋白的长蛋白质半衰期很可能解释该差异(图14C)。事实上,1型过氧化物歧化酶(SOD1)的蛋白质半衰期在组织中评估为约28天,并且很明显 α -突触核蛋白的类似半衰期可应用于皮质和中脑组织中。当获得施用后第84天数据时,进一步获得证明 α -突触核蛋白半衰期效应可能导致施用后第29天的SNCA mRNA与 α -突触核蛋白敲低结果之间不一致的证据。在这一第84天数据中,对于全部三种先导双链体,治疗的NHP动物的皮质和中脑组织中的 α -突触核蛋白水平表现强劲的敲低(PD效应,图14D,左图)。在第84天于皮质和中脑NHP组织中观察到的强劲的 α -突触核蛋白敲低证实了 α -突触核蛋白的长蛋白质半衰期。对于全部三种双链体,组织 α -突触核蛋白PK/PD曲线显示类似的特征(图14D,中图;AD-1747585群组注明为仅有一只动物符合给药标准,而该群组的剩余者重新给药)。在第84天, α -突触核蛋白水平与皮质和中脑组织两者中的mRNA水平高度相关(图14D,右图),与上述在施用后第29天观察到的那些相反。

[0796] 在双链体施用后第84天,前额叶皮质和中脑组织 α -突触核蛋白敲低水平也与 α -突触核蛋白CSF蛋白敲低良好相关(图15)。皮质与CSF α -突触核蛋白敲低水平的相关性($R^2=0.7246$, P 值=0.0004)甚至优于先前对于靶向NHP中SNCA的反义寡核苷酸所描述的($R^2=0.6$, P 值=0.0089)(Cole et al. JCI Insight (2021), 6 (5), e135633. doi:10.1172/jci.insight.135633)。

[0797] 在施用双链体后第84天,也在脑区上检查siRNA组织暴露。在大多数用此类双链体给药的动物中,全部三种候选双链体显示良好分布于所检查的全部靶组织中(图16)。有趣

的是,具有siRNA双链体的高暴露的组织(例如,小脑)不必然显示最高水平的SNCA mRNA和/或 α -突触核蛋白敲低。

[0798] 为了评估并且最终尝试减轻NHP动物给药候选先导双链体的任何潜在有害的影响,对响应于动物的双链体给药的给药动物体重和CSF中的神经丝轻链(NfL)水平作为此类动物的健康和所测试的双链体对此类动物的潜在毒性的初始指标进行监测,同时还使用RNA-seq在给药的NHP动物中进行对任何显著脱靶基因影响的基因组评估。与仅用媒剂平行给药的对照NHP动物相比,在施用后第29天或第84天,对于施用至NHP动物的三种候选先导双链体没有观察到对体重的影响(图17)。对于双链体给药的NHP动物的CSF中的NfL检测,尽管对于全部三种双链体在给药后观察到NfL的短暂急升,此类NfL急升大多并未持续超过施用后第29天,这指示三种SNCA-靶向候选先导双链体似乎不具有表明双链体毒性的NfL特征(图18)。也获得RNA-Seq数据并且针对用三种候选先导双链体的每一种给药的细胞进行评估,以鉴定用此类双链体各自给药导致的脱靶效应的程度。检查了三种候选先导双链体各自的RNA-Seq数据。对于AD-1747580双链体以及对于亲本双链体AD-1549054,SNCA敲低为始终强劲的,并且没有显著的脱靶效应(以>50%的失调脱靶基因)在效力匹配的RNA-Seq谱中鉴定(图19A和19B)。与对于AD-1747580双链体获得的明确RNA-Seq结果相反,对于AD-1747583双链体获得的RNA-Seq结果表明强劲的SNCA mRNA敲低,其伴随鉴定为以>50%失调的三种基因,PYGB、NREP和LCLAT1(图19C)。对于双链体AD-1747585,强劲的SNCA mRNA敲低伴随着鉴定为以>50%失调的一种基因,HMGB2(图19D)。从亲本双链体去除GalNAc鉴定为与中靶和脱靶两者的效力增加相关。

[0799] 因此,AD-1747580双链体经由RNA-Seq鉴定为具备所测试的三种候选先导双链体中的最有利选择性特征(AD-1747580表现93% SNCA敲低而没有检测的脱靶基因失调;AD-1747585表现96% SNCA敲低,具有单一失调的脱靶基因;并且AD-1747583表现92% SNCA敲低,但具有三种失调的脱靶基因)(图20)。

[0800] 实施例5:用于帕金森氏病疗法的SNCA-靶向双链体

[0801] 向受试者施用SNCA-靶向双链体以作为帕金森氏病(PD)疗法来敲低SNCA,特别地在具有GBA_{pp}突变(GBA编码溶酶体酶葡萄糖脑苷脂酶(GCase))或患有散发性PD的受试者中。进行评估以评定SNCA-靶向双链体施用至受试者构成针对以脑中的 α -突触核蛋白聚集体为特征的神经退化性疾病的疾病改善疗法的程度(如具有GBA_{pp}突变或散发性PD的受试者中的PD)。

[0802] 非正式序列列表及本文所列的某些“mRNA靶标”的“mRNA”序列可标注为引述胸腺嘧啶(T)残基而非尿嘧啶(U)残基。如对于本领域普通技术人员显而易见的,此类引述“T”残基而非“U”残基的序列可源自作为“mRNA”序列而列出直接对应于mRNA序列的DNA序列(非RNA序列)的NCBI登录记录。直接对应于mRNA的此类DNA序列技术上构成作为指示的mRNA的cDNA(互补DNA)的互补序列的DNA序列。因此,尽管mRNA靶序列事实上确实包括尿嘧啶(U)而非胸腺嘧啶(T),但源自NCBI记录的“mRNA”序列包括胸腺嘧啶(T)残基而非尿嘧啶(U)残基。

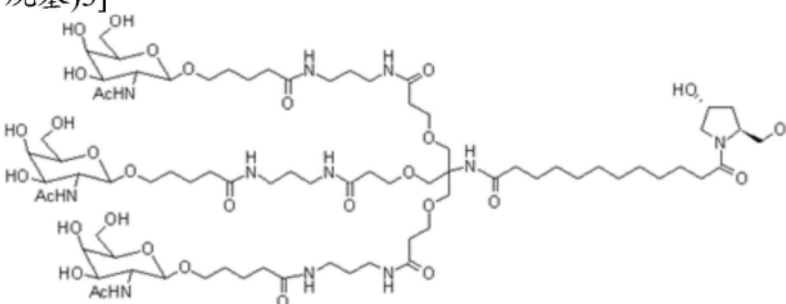
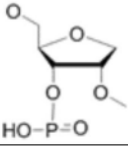
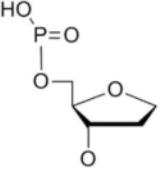
[0803] 表1.核苷酸序列表示中使用的核苷酸单体的缩写。应理解,当这些单体存在于寡核苷酸中,其通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接;且应理解,当核苷酸含有2'-氟修饰时,氟替代母体核苷酸中该位置的羟基(即,其是2'-脱氧-2'-氟核苷酸)。还应理解,当存在于3'末端位置时,缩写对应于省略3'-磷酸的核苷酸(即,其为3'-OH)。

[0804]

缩写	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸
Aam	2'-O-(N-甲基乙酰胺)腺苷-3'-磷酸
Aams	2'-O-(N-甲基乙酰胺)腺苷-3'-硫代磷酸酯
Ab	β -L-腺苷-3'-磷酸
Abs	β -L-腺苷-3'-硫代磷酸酯
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
Agn	腺苷-二醇核酸(GNA), S-异构体
Ahd	2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸
Ahds	2'-O-十六烷基-腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸
Cb	β -L-胞苷-3'-磷酸
Cbs	β -L-胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cgn	胞苷-二醇核酸(GNA), S-异构体
Chd	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸
Chds	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3'-磷酸
Gam	2'-O-(N-甲基乙酰胺)鸟苷-3'-磷酸
Gams	2'-O-(N-甲基乙酰胺)鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gb	β -L-鸟苷-3'-磷酸
Gbs	β -L-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Ggn	鸟苷-二醇核酸(GNA), S-异构体
Ghd	2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-磷酸
Ghds	2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tam	2'-O-(N-甲基乙酰胺)胸苷-3'-磷酸
Tams	2'-O-(N-甲基乙酰胺)胸苷-3'-硫代磷酸酯
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸

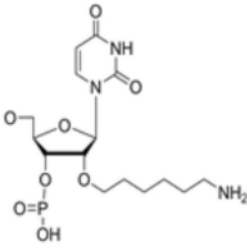
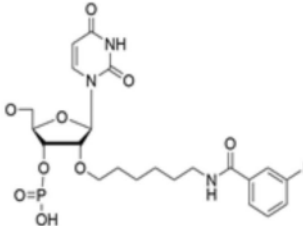
[0805]

Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
Tgn	胸苷-二醇核酸(GNA), S-异构体
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
U	尿苷-3'-磷酸
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯
Uhd	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸
Uhds	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
N	任意核苷酸(G、A、C、T 或 U), 修饰或未修饰
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯键
(C2p)	胞苷-2'-磷酸酯
(G2p)	鸟苷-2'-磷酸酯
(U2p)	尿苷-2'-磷酸酯
(A2p)	腺苷-2'-磷酸酯

L96	N-[三(GalNAc)-酰胺基-十二烷酰基]-4-羟基脯氨酸[Hyp-(GalNAc-烷基)3]  即, (2S,4R)-1-[29-[[2-(乙酰基氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-14,14-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰基氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-氧代戊基]氨基]丙基]氨基]-3-氧代丙氧基]甲基]-1,12,19,25-四氧代-16-氧杂-13,20,24-三氮杂二十九烷-1-基]-4-羟基-2-羟基甲基吡咯烷
Y34	2-羟基甲基-四氢呋喃-4-甲氧基-3-磷酸(无碱基 2'-OMe 呋喃糖) 
Y44	反向无碱基 DNA (2-羟基甲基-四氢呋喃-5-磷酸) 
dA	2'-脱氧腺苷-3'-磷酸
dAs	2'-脱氧腺苷-3'-硫代磷酸酯
dC	2'-脱氧胞苷-3'-磷酸
dCs	2'-脱氧胞苷-3'-硫代磷酸酯
dG	2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸
dGs	2'-脱氧鸟苷-3'-硫代磷酸酯
dT	2'-脱氧胸苷-3'-磷酸
dTs	2'-脱氧胸苷-3'-硫代磷酸酯
dU	2'-脱氧尿苷
dUs	2'-脱氧尿苷-3'-硫代磷酸酯
Aeo	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-磷酸
Aeos	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-硫代磷酸酯
Geo	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-磷酸
Geos	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-硫代磷酸酯

[0806]

[0807]

Teo	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
Teos	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
m5Ceo	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-磷酸
m5Ceos	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
A3m	3'-O-甲基腺苷-2'-磷酸
A3mx	3'-O-甲基-呋喃木糖基腺苷-2'-磷酸
G3m	3'-O-甲基鸟苷-2'-磷酸
G3mx	3'-O-甲基-呋喃木糖基鸟苷-2'-磷酸
C3m	3'-O-甲基胞苷-2'-磷酸
C3mx	3'-O-甲基-呋喃木糖基胞苷-2'-磷酸
U3m	3'-O-甲基尿苷-2'-磷酸
U3mx	3'-O-甲基-呋喃木糖基尿苷-2'-磷酸
m5Cam	2'-O-(N-甲基乙酰胺)-5-甲基胞苷-3'-磷酸
m5Cams	2'-O-(N-甲基乙酰胺)-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
P	磷酸
pshe	羟基乙基硫代磷酸酯
VP	乙烯基-膦酸酯
(Aah)	2'-O-(6-氨基己基)-腺苷-3'-磷酸
(Gah)	2'-O-(6-氨基己基)-鸟苷-3'-磷酸
(Cah)	2'-O-(6-氨基己基)-胞苷-3'-磷酸
(Uah)	2'-O-(6-氨基己基)-尿苷-3'-磷酸
	
Y196	2'-O-(6-氨基己基-间碘代苯甲酰基)-鸟苷-3'-磷酸(具有碘-苯甲酰基的 Uah)
	

[0808]

表 2. CNS-导向的 SNCA-靶向 siRNA 的修饰的有义和反义链序列

双链体名称	有义寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	反义寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列	SEQ ID NO:	亲本双链体名称
AD-18046 98	gsusgug(Ghd)UfgUfAfAfaggaauu csasa	13	VPusUfsgadAu(Tgn)ccuuaCfaCfcac acsug	56	CAGUGUGGUGUAAAAGGAAU UCAU	99	AD-15711 64
AD-18046 99	usgsugg(Uhd)guAfAfAfaggaauca susa	14	VPusdAsugdAadTuccudTuAfcaceaca scsu	57	AGUGUGGUGUAAAAGGAAU CAU	100	AD-15488 51
AD-17475 75	gsugsug(Uhd)aaGfGfAfaucuaa sgsa	15	VPusdCsuadAudGaaudCcUfuacac csasc	58	GUGUGUAAAAGGAAUUCAU UAGC	101	AD-15488 54
AD-17475 76	asusuag(CHd)caUfGfGfanguaauuc sasa	16	VPusdTsgadAudAcaudCaUfggcuua usgsa	59	UCAUAGCCCAUGGAUGUAU CAU	102	AD-15488 69
AD-18047 00	ususage(CHd)auGfGfAfguaucua susa	17	VPusdAsugdAadTcaudCcAfggcuua asug	60	CAUAGCCAUGGAUGUAUUC AUG	103	AD-15488 70
AD-17475 77	asusuca(Uhd)gaAfAfGfagcuuua sasa	18	VPusdTsgdAadAguccdTUfcaugaa usasc	61	GUUUCUAUGAAAAGGACUUUC AAA	104	AD-15488 84
AD-17475 78	uscsaug(CHd)aaGfGfAfcuuucaaas gsa	19	VPusdCsuadTgdAaangdCcUfuacug asasu	62	AUUCAUAAAAGGACUUUCAA AGG	105	AD-15488 86
AD-17475 79	asasgag(CHd)aaGfUfGfacaauus usa	20	VPusdAsacdAudTugucdAcUfugcuu usug	63	CAAGAGCAAGUGACAAAUG UUG	106	AD-15490 52
AD-17475 80	gsasgca(CHd)guGfAfCfaaanguug sgsa	21	VPusdCscadAcdAnuugdTcAfcuugcu csusu	64	AAGAGCAAGUGACAAAUGU UGGA	107	AD-15490 54
AD-17475 81	asasggg(Uhd)auCfAfAfagacuacgas asa	22	VPusdTsuadGndAgucudTgAfuaacuu uscsc	65	GGAAAGGUAUCAAGACUACG AAC	108	AD-15492 45
AD-18047 01	csusgaa(CHd)ccUfAfAfgaauaues usa	23	VPusdAsgadTadTuncudTaGfguuca gsgsu	66	ACCUGAAGCCUAAAGAAAUAU CUU	109	AD-15492 66
AD-17475 82	usgsaag(CHd)cuAfAfGfafaauaueus usa	24	VPusdAsagdAudAnuucdTUafggcuuc asggg	67	CCUGAAGCCUAAAGAAAUAUC UUU	110	AD-15492 67
AD-18047 02	asasggc(Uhd)aaGfAfAfauaucuuus gsa	25	VPusdCsaadAgdAuaudTcUfuagguu uscsc	68	UGAAGCCUAAAGAAAUAUCUU UGC	111	AD-15492 69
AD-18047 03	cscsuua(CHd)aaAfUfAfuucuuu scsa	26	VPusdGsgadCadAgaudAuUfucuuag gscsu	69	AGCCUAAAGAAAUAUCUUUGC UCC	112	AD-15492 72
AD-18047 04	uscsuuu(CHd)cuCfCfCfaguuuucuu sgsa	27	VPusdCsaadGadAacugdGgAfgecaag asusa	70	UAUCUUUGCUCCCAAGUUUCU UGA	113	AD-15492 83
AD-17475 83	uscsuuu(CHd)cuCfCfCfaguu(Uhd)cuu sgsa	28	VPusdCsaadGadAacugdGgAfgecaag asusa	71	UAUCUUUGCUCCCAAGUUUCU UGA	114	AD-17464 65
AD-18047 05	csusuug(CHd)ucCfCfCfaguuuucuu sasa	29	VPusdTscadAgdAaacudGgGfagcaaa gsasu	72	AUCUUUGCUCCCAAGUUUCU GAG	115	AD-15492 84

[0809]

AD-18047 06	ususgc(Uhd)ccCfAfGfuuuuuga sgsa	30	VPusdCsucdAadGaaacdTgGfgagcaaa sgsa	73	UCUUUGCUCCAGUUUCUUG AGA	116	AD-15492 85
AD-18047 07	uscscca(Ghd)uuUfCfUfugagauu sgsa	31	VPusdCsagdAudCuaadGaAfacuggg asgsc	74	GCUCCAGUUUCUUGAGAUUC UGC	117	AD-15492 90
AD-18047 08	csusgua(Chd)AfaGfUfGfucaguu cscsa	32	VPusGfsgadAc(Tgn)gagcacUfGfuac agsgsa	75	UCCUGUACAAGUGGUCUCAGUU CCA	118	AD-15711 87
AD-18047 09	usgsuac(Ahd)AfgUfGfCfucaguu csasa	33	VPusUfsggdAa(C2p)ugagcaCfuUfgu acasgsg	76	CCUGUACAAAGUGGUCUCAGUUUC CAA	119	AD-15712 62
AD-17475 91	gsusaca(Ahd)GfuGfCfUfCaguu asasa	34	VPusUfsggdGa(Agn)ugagcaAfcUfug uacsasg	77	CUGUACAAGUGGUCUCAGUUUC AAU	120	AD-15711 88
AD-17475 85	asasgug(Chd)ucAfGfUfucuaugu sgsa	35	VPusdCsacdAudTggadCuGfagcacu usgsu	78	ACAAGUGGUCUCAGUUCCAAUG UGC	121	AD-15493 33
AD-18047 10	asgsugc(Uhd)caGfUfUfCaaugug scsa	36	VPusdGscadCadTuggadAcUfagcac usug	79	CAAGUGGUCUCAGUUCCAAUGU GCC	122	AD-15493 34
AD-18047 11	usgsccc(Ahd)guCfAfUfCagaaunc susa	37	VPusdAsgadAadTgnacdTgAfcugggc ascsa	80	UGUGCCAGUCAGUACAUUUUC CUC	123	AD-15493 51
AD-17475 86	cscsagu(Chd)auGfAfCfauuucucas asa	38	VPusdTsgdAgdAaauTdTcAfuagacug gsgsc	81	GCCAGUCAGUACAUUUUCUC AAA	124	AD-15493 54
AD-18047 12	gsuscau(Ghd)acAfUfUfucuaaag susa	39	VPusdAscudTudGagaadAuGfucaga csug	82	CAGUCAUGACAUUUUCUCAAA GUU	125	AD-15493 57
AD-17475 87	csasuga(Chd)auUfUfCfucuaaunus usa	40	VPusdAaadCudTugagdAaAfuugacu gsasc	83	GUCAGACAUUUUCUCAAAAGU UUU	126	AD-15493 59
AD-18047 13	uscsuuc(Chd)auCfAfGfCfagugauu sgsa	41	VPusdCsaadTcdAeugdTgAfuuggaag ascsu	84	AGUCUUCCAUCAGCAGUGAU UGA	127	AD-15493 97
AD-18047 14	ususcca(Uhd)CfAfGfCfAfguaug asasa	42	VPusUfsuadAa(Tgn)caucgUfgAfug gaasgsa	85	UCUUCCAUCAGCAGUGAUUG AAG	128	AD-15711 91
AD-17475 88	cscsauc(Ahd)gcAfGfUfCfaguaag susa	43	VPusdAscudTcdAucadCuGfCfugaug gsasa	86	UCCAUCCAGCAGUGAUUGAA GUA	129	AD-15494 01
AD-18047 15	cscsauc(Ahd)GfCfAfGfUfCfaguaa gsusa	44	VPusAfsuadTc(Agn)aucacuGfCfugau ggsasa	87	UCCAUCCAGCAGUGAUUGAA GUA	130	AD-15711 92
AD-18047 16	asusca(Chd)agUfGfAfuuaagua susa	45	VPusdAsuadCudTcaudCaCfugcuga usgsg	88	CCAUCAGCAGUGAUUGAAGU AUC	131	AD-15494 03
AD-18047 17	asusca(Chd)AfgUfGfAfuuaagu asusa	46	VPusAfsuadCu(Tgn)caucaCfuGfug ausgsg	89	CCAUCAGCAGUGAUUGAAGU AUC	132	AD-15711 93
AD-18047 18	asgsca(Chd)gaUfUfGfCfaguauc sgsa	47	VPusdCsagdAudAcuudAaUfCaguc usgsa	90	UCAGCAGUGAUUGAAGUUC UGU	133	AD-15494 06
AD-18047 19	gscsagu(Chd)auUfGfAfuuaucug susa	48	VPusdAacdGadTacuudCaAfuacug csug	91	CAGCAGUGAUUGAAGUUCU GUA	134	AD-15494 07

[0810]

AD-18047 20	gsesagu(Ghd)AfuUfGfAfaaauau gsusa	49	VPusAfsadGa(Tgn)acuuaAfuCfacu gesug	92	CAGCAGUGAUUGAAGUAUCU GUA	135	AD-15711 94
AD-18047 21	ususcac(Uhd)gaAfGUfgaaauacu sgsa	50	VPusdCsaudGudAmucadCuUfcaguga asag	93	CUUUCACUGAAGUGAAUACA UGG	136	AD-15494 39
AD-18047 22	usasagu(Ghd)acUfAfCfcacuaauis usa	51	VPusdAasadTadAguggdTaaGfucacuu asgg	94	CCUAAAGUGACUACCCACUUAU UUC	137	AD-15495 18
AD-18047 23	csusacc(Ahd)cuUfAfUfucuaaais csa	52	VPusdGsaudTudAgaadTaaAfguggua gsuc	95	GACUACCACUUAUUUCUAAA UCC	138	AD-15495 25
AD-18047 24	csusacc(Ahd)CfuUfAfUfucuaaaa uscsa	53	VPusGfsaudTu(Agn)gaauaAfgUfgg uagsuc	96	GACUACCACUUAUUUCUAAA UCC	139	AD-15711 99
AD-18047 25	usasugu(Ghd)agCfAfUfgaaacuau sgsa	54	VPusdCsaudAgdTuncadTgCfucacaua susu	97	AAUAUGUGAGCAUGAAACU AUGC	140	AD-15496 28
AD-18047 26	asascua(Uhd)gcAfCfCfuaaauais csa	55	VPusdGsaudTudTaaagdGuGfcauagu usuc	98	GAAACUAUGCACCCUAUAAA ACU	141	AD-15496 41

[0811] 表3.CNS定向的SNCA-靶向siRNA的未修饰有义和反义链序列

[0812]

双链体 名称	有义寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	反义寡核苷酸序列	SEQ ID NO:
AD-1804 698	GUGUGGUGUAAAGGAA UUCAA	142	UUGAAUTCCUUUACACCA CACUG	185
AD-1804 699	UGUGGUGUAAAGGAAU UCAUA	143	UAUGAATUCCUTUACACC ACACU	186
AD-1747 575	GGUGUAAAGGAAUUCA UUAGA	144	UCUAAUGAAUCCUUUAC ACCAC	187
AD-1747 576	AUUAGCCAUGGAUGUA UUCAA	145	UTGAAUACAUGCAUGGCU AAUGA	188
AD-1804 700	UUAGCCAUGGAUGUAU UCAUA	146	UAUGAATACAUGCAUGGC UAAUG	189
AD-1747 577	AUUCAUGAAAGGACUU UCAA	147	UTUGAAAGUCCTUUCAUG AAUAC	190
AD-1747 578	UCAUGAAAGGACUUUC AAAGA	148	UCUUTGAAAGUCCUUUCA UGAAU	191
AD-1747 579	AAGAGCAAGUGACAAA UGUUA	149	UAACAUTUGUCACUUGCU CUUUG	192
AD-1747 580	GAGCAAGUGACAAAUG UUGGA	150	UCCAACAUUUGTCACUUG CUCUU	193
AD-1747 581	AAGGGUAUCAAGACUA CGAAA	151	UTUCGUAGUCUTGAUACC CUUCC	194
AD-1804 701	CUGAAGCCUAAGAAAU AUCUA	152	UAGATATUUCUTAGGCUUC AGGU	195
AD-1747 582	UGAAGCCUAAGAAAUA UCUUA	153	UAAGAUUUUUCTUAGGCU UCAGG	196
AD-1804 702	AAGCCUAAGAAAUAUC UUUGA	154	UCAAGAUUUUUTCUUAGG CUUCA	197
AD-1804 703	CCUAAGAAAUAUCUUU GCUCA	155	UGAGCAAAGAUUUUCUU AGGCU	198
AD-1804 704	UCUUUGCUCUCCAGUUU CUUGA	156	UCAAGAAACUGGGAGCAA AGAU	199
AD-1747 583	UCUUUGCUCUCCAGUUU CUUGA	157	UCAAGAAACUGGGAGCAA AGAU	200
AD-1804 705	CUUUGCUCUCCAGUUUC UUGAA	158	UTCAAGAAACUGGGAGCA AAGAU	201
AD-1804 706	UUUGCUCUCCAGUUUCU UGAGA	159	UCUCAAGAACTGGGAGC AAAGA	202
AD-1804 707	UCCAGUUUCUUGAGA UCUGA	160	UCAGAUCUCAAGAAACUG GGAGC	203
AD-1804 708	CUGUACAAGUGCUCAG UCCA	161	UGGAAGTGAACUUGUA CAGGA	204
AD-1804 709	UGUACAAGUGCUCAGU UCCA	162	UUGGAACUGAGCACUUGU ACAGG	205
AD-1747 591	GUACAAGUGCUCAGUU CCAAA	163	UUUGGAACUGAGCACUUG UACAG	206
AD-1747	AAGUGCUCAGUCCAA	164	UCACAUTGGAACUGAGCA	207

[0813]

585	UGUGA		CUUGU	
AD-1804 710	AGUGCUCAGUCCAAU GUGCA	165	UGCACATUGGAACUGAGC ACUUG	208
AD-1804 711	UGCCCAGUCAUGACAU UUCUA	166	UAGAAATGUCATGACUGG GCACA	209
AD-1747 586	CCAGUCAUGACAUUUC UCAA	167	UTUGAGAAAUGTCAUGAC UGGGC	210
AD-1804 712	GUCAUGACAUUUCUCA AAGUA	168	UACUTUGAGAAAUGUCAU GACUG	211
AD-1747 587	CAUGACAUUUCUCAA GUUUA	169	UAAACUTUGAGAAAUGUC AUGAC	212
AD-1804 713	UCUCCAUACAGCAGUG AUUGA	170	UCAATCACUGCTGAUGGA AGACU	213
AD-1804 714	UCCAUCAGCAGUGAU UGAAA	171	UUUCAATCACUGCUGAUG GAAGA	214
AD-1747 588	CCAUCAGCAGUGAUUG AAGUA	172	UACUTCAAUCACUGCUGA UGGAA	215
AD-1804 715	CCAUCAGCAGUGAUUG AAGUA	173	UACUTCAAUCACUGCUGA UGGAA	216
AD-1804 716	AUCAGCAGUGAUUGAA GUAUA	174	UAUACUTCAAUCACUGCU GAUGG	217
AD-1804 717	AUCAGCAGUGAUUGAA GUAUA	175	UAUACUTCAAUCACUGCU GAUGG	218
AD-1804 718	AGCAGUGAUUGAAGUA UCUGA	176	UCAGAUACUCAAUCACU GCUGA	219
AD-1804 719	GCAGUGAUUGAAGUAU CUGUA	177	UACAGATACUCAAUCAC UGCUG	220
AD-1804 720	GCAGUGAUUGAAGUAU CUGUA	178	UACAGATACUCAAUCAC UGCUG	221
AD-1804 721	UUCACUGAAGUGAAUA CAUGA	179	UCAUGUAUUCACUUCAGU GAAAG	222
AD-1804 722	UAAGUGACUACCACUU AUUUA	180	UAAATAAGUGGTAGUCAC UUAGG	223
AD-1804 723	CUACCACUUAUUUCUA AAUCA	181	UGAUTUAGAAATAAGUGG UAGUC	224
AD-1804 724	CUACCACUUAUUUCUA AAUCA	182	UGAUTUAGAAAUAAGUGG UAGUC	225
AD-1804 725	UAUGUGAGCAUGAAAC UAUGA	183	UCAUAGTUUCATGCUCAC AUAUU	226
AD-1804 726	AACUAUGCACCUAUA AUACA	184	UGUATUTAUAGGUGCAUA GUUUC	227

[0814] 表4. SNCA mRNA内的双链体靶位置

[0815]

序列名称	最小	最大	靶区域	类型
AD-1804698	198	220	外显子 1-2	5'UTR
AD-1804699	199	221	外显子 1-2	5'UTR
AD-1747575	202	224	外显子 2	5'UTR

[0816]

AD-1747576	217	239	外显子 2	5'UTR
AD-1804700	218	240	外显子 2	5'UTR
AD-1747577	232	254	外显子 2	CDS
AD-1747578	234	256	外显子 2	CDS
AD-1747579	402	424	外显子 4	CDS
AD-1747580	404	426	外显子 4	CDS
AD-1747581	615	637	外显子 5-6	CDS
AD-1804701	636	658	外显子 6	CDS-3'UTR
AD-1747582	637	659	外显子 6	CDS-3'UTR
AD-1804702	639	661	外显子 6	CDS-3'UTR
AD-1804703	642	664	外显子 6	CDS-3'UTR
AD-1747583	653	675	外显子 6	3'UTR
AD-1804704	653	675	外显子 6	3'UTR
AD-1804705	654	676	外显子 6	3'UTR
AD-1804706	655	677	外显子 6	3'UTR
AD-1804707	660	682	外显子 6	3'UTR
AD-1804708	697	719	外显子 6	3'UTR
AD-1804709	698	720	外显子 6	3'UTR
AD-1747591	699	721	外显子 6	3'UTR
AD-1747585	703	725	外显子 6	3'UTR
AD-1804710	704	726	外显子 6	3'UTR
AD-1804711	721	743	外显子 6	3'UTR
AD-1747586	724	746	外显子 6	3'UTR
AD-1804712	727	749	外显子 6	3'UTR
AD-1747587	729	751	外显子 6	3'UTR
AD-1804713	767	789	外显子 6	3'UTR
AD-1804714	769	791	外显子 6	3'UTR
AD-1804715	771	793	外显子 6	3'UTR
AD-1747588	771	793	外显子 6	3'UTR
AD-1804716	773	795	外显子 6	3'UTR
AD-1804717	773	795	外显子 6	3'UTR
AD-1804718	776	798	外显子 6	3'UTR
AD-1804719	777	799	外显子 6	3'UTR
AD-1804720	777	799	外显子 6	3'UTR
AD-1804721	830	852	外显子 6	3'UTR
AD-1804722	920	942	外显子 6	3'UTR
AD-1804724	927	949	外显子 6	3'UTR

[0817]

AD-1804723	927	949	外显子 6	3'UTR
AD-1804725	1090	1112	外显子 6	3'UTR
AD-1804726	1103	1125	外显子 6	3'UTR

[0818] 表5. 另外的SNCA-靶向双链体

双链体名称	有义序列	SEQ ID NO:	反义序列	SEQ ID NO:
AD-1548851	usgsugg(Uhd)guAfAfAfggaauucauaL96	270	VPusdAsugdAadTuccudTuAfcaccacasesu	325
AD-1548854	gsgsugu(Ahd)aaGfGfAfaauucauuaL96	271	VPusdCsudAudGaaudCcUfuacacacsasc	326
AD-1548869	asusug(Chd)caUfGfGfauuauucaL96	272	VPusdTsgadAudAcaudCaUfggcuaasgsa	327
AD-1548870	ususagc(Chd)auGfGfAfuauucauaL96	273	VPusdAsugdAadTacaudCcAfuugcuaasug	328
AD-1548884	asusuca(Uhd)gaAfAfGfgacuucuaaL96	274	VPusdTsgdAadAguccdTuUfcaugaasasc	329
AD-1548886	uscsaug(Ahd)aaGfGfAfcuuucaagaL96	275	VPusdCsudTgdAaagdCcUfuucaugasasu	330
AD-1549052	asasgag(Chd)aaGfUfGfacaauuguaL96	276	VPusdAsacdAudTugudAcUfugcucuuusg	331
AD-1549054	gsasgca(Ahd)guGfAfCfaaauuguaL96	277	VPusdCscadAcdAuugdTcAfcuugcucusu	332
AD-1549245	asasggg(Uhd)auCfAfAfgacuacgaalL96	278	VPusdTscudGudAgucudTgAfuacccuuscsc	333
AD-1549266	csusgaa(Ghd)ccUfAfAfgaaauucaL96	279	VPusdAsgdTadTuucudTaGfgcuucagsgu	334
AD-1549267	usgsaag(Chd)cuAfAfGfauaauucaL96	280	VPusdAsagdAudAuucudTuAfggcuaasgs	335
AD-1549269	asasgcc(Uhd)aaGfAfAfaauucauuaL96	281	VPusdCsadAgdAuauudTcUfuagcucusa	336
AD-1549272	csesuaa(Ghd)aaAfUfAfucuuugcuaL96	282	VPusdGsagdCadAagudAuUfucuuaggsu	337
AD-1549283	uscsuuu(Ghd)cuCfCfCfaguucuaL96	283	VPusdCsadGadAacudGgAfgcaagasusa	338
AD-1549284	csusung(Chd)ucCfCfCfaguucuaL96	284	VPusdTscadAgdAaacudGgGfagcaagasu	339
AD-1549285	ususugc(Uhd)ccCfAfGfuuucuaL96	285	VPusdCsudAadGaaadTgGfagcaagasu	340
AD-1549290	uscscca(Ghd)uuUfCfUfugagucuaL96	286	VPusdCsagdAudCucaadGaAfuagggagsgc	341
AD-1549333	asasgug(Chd)ucAfGfUfuccaauuguaL96	287	VPusdCsacdAudTggadCuGfagcucagsu	342
AD-1549334	asgsugc(Uhd)caGfUfUfccaauuguaL96	288	VPusdGscadCadTuggadAcUfagcucagsu	343
AD-1549351	usgsccc(Ahd)guCfAfUfagcauuucaL96	289	VPusdAsgdTadTgucadTgAfcugggcasc	344
AD-1549354	csesagu(Chd)auGfAfCfauuucuaaL96	290	VPusdTsgdTadAaagdTcAfuagcugsgsc	345
AD-1549357	gsuscau(Ghd)acAfUfUfucuaaaguaL96	291	VPusdAscudTudGagaadAuGfucagcagsu	346
AD-1549359	csasuga(Chd)auUfUfCfcaauuuaL96	292	VPusdAsaadCudTugadAaAfuugcagsasc	347
AD-1549397	uscsuuc(Chd)auCfAfGfaguuuuaL96	293	VPusdCsadTcdAcugdTgAfuaggaagsu	348
AD-1549401	csesauc(Ahd)gcAfGfUfgauuaguaL96	294	VPusdAscudTcdAaacudCuGfucagggasasa	349
AD-1549403	asuscag(Chd)agUfGfAfuugaauuaL96	295	VPusdAsuadCudTcaudCaCfucagcagsu	350
AD-1549406	asgsacg(Uhd)gaUfUfGfagauucuaL96	296	VPusdCsagdAudAauudAaUfucagcagsu	351
AD-1549407	gsesagu(Ghd)auUfGfAfuugaucuaL96	297	VPusdAscadGadTaduudCaAfuacagcagsu	352
AD-1549439	ususcac(Uhd)gaAfGfUfgauuacuaL96	298	VPusdCsadGudAuucadCuUfagcagagsu	353
AD-1549518	usasagu(Ghd)acUfAfCfcauuuuaL96	299	VPusdAsaadTadAagudTaGfucacuuasgs	354
AD-1549525	csusacc(Ahd)cuUfAfUfucuaaaucaL96	300	VPusdGsaudTudAgaadTaAfuugguagsu	355
AD-1549628	usasugu(Ghd)agCfAfUfgaaucuaL96	301	VPusdCsadAgdTucadTgCfucacuuasus	356
AD-1549641	asascua(Uhd)gcAfCfCfuaauaaucaL96	302	VPusdGsaudTudTaaudGfCfcauaguuusc	357
AD-1571164	gsusgug(Ghd)UfUfAfAfggaauucaL96	303	VPusUfsgadAu(Tgn)ccuuuaCfCfcaacagsu	358
AD-1571187	csusgua(Chd)AfaGfUfGfucaguucaL96	304	VPusGfsgadAc(Tgn)gagcacUfUfucagagsu	359
AD-1571188	gsusaca(Ahd)GfUfGfUfcauucaaaL96	305	VPusUfsgdTadAa(Tgn)gagcacUfUfucagagsu	360
AD-1571191	uscscca(Uhd)CfAfGfCfAfguuuuaaL96	306	VPusUfscudAa(Tgn)cacugcUfUfaggaagsu	361
AD-1571192	csesauc(Ahd)GfCfGfUfaguuuuaL96	307	VPusAfsudTc(Agn)aucacuGfUfaggaagsu	362
AD-1571193	asuscag(Chd)AfuUfGfAfuugaauuaL96	308	VPusAfsuadCu(Tgn)cauuaCfUfaggaagsu	363
AD-1571194	gsesagu(Ghd)AfuUfGfAfuugaucuaL96	309	VPusAfsuadCu(Tgn)cauuaCfUfaggaagsu	364
AD-1571199	csusacc(Ahd)CfUfAfUfucuaaaucaL96	310	VPusGfsaudTu(Agn)gaaauaAfgUfguagagsu	365
AD-1571262	usgsuac(Ahd)AfuUfGfCfucaguucaL96	311	VPusUfsgdTadAa(C2p)gagcacUfUfucagagsu	366
AD-1746465	uscsuugcUfCfCfCfagu(Uhd)cuugaL96	312	VPusdCsadGadAacudGgAfgcaagasusa	367
AD-464229	asusgaaGfGfAfCfUfucuaaaggaL96	313	VPusGfsccuUfUfAfAaguCfUfucagagsu	368
AD-464313	asasagagGfUfGfUfucuauguaL96	314	VPusAfscauAfgAfgaacaCfCfucuuusg	369
AD-464314	asasagagGfUfGfUfUfucuauguaL96	315	VPusUfsacaUfaGfAfgaacAfcCfucuuusg	370
AD-464585	asasgggUfUfCfAfAfgacuacgaalL96	316	VPusUfsucgUfaGfUfucuaAfcUfucagagsu	371
AD-464586	asgsuggUfUfAfAfGfucuaagaaL96	317	VPusGfsuucGfUfAfGfucuuGfUfaccuusc	372
AD-464590	usasucuaGfAfCfUfAfgaaccugaaL96	318	VPusUfscagGfUfUfCfugagUfUfugauasc	373
AD-464592	uscsaagaCfUfCfGfagcucagaL96	319	VPusCfsuucAfgGfUfucuaAfgUfucagasa	374
AD-464634	asgsuucUfUfGfAfGfucucuguaL96	320	VPusUfscagCfAfGfAfucuaAfgUfucagagsu	375
AD-464694	csesaguAfuGfAfCfauuucuaaL96	321	VPusUfsgaGfAfAfugcUfUfagcagagsu	376
AD-464778	ususcacUfGfAfAfGfugaauucaL96	322	VPusAfsuagUfUfCfCfucuaCfGfugaagsu	377
AD-464779	ususcacUfGfAfAfGfugaauucaL96	323	VPusCfsaugUfUfUfCfUfCfUfaggaagsu	378
AD-464782	ascsugaaGfUfGfAfAfuacauuguaL96	324	VPusUfsaccAfuGfUfauuacAfcUfucagagsu	379

[0821] 非正式序列表

[0822] SEQ ID NO:1

[0823] 基因座:NM_007308 3312bp mRNA线性PRI 31-AUG-2020,定义:智人(Homo

sapiens) 突触核蛋白 α (SNCA), 转录物变体4, mRNA。版本: NM_007308.3

```

1   ggcgacgacc agaagggggc caagagaggg ggcgagcgac cgagcgccgc gacgcggaag
61  tgagggtgct gcggtctgca ggcgagaccc cggccccggc cctccgagag cgtcctgggc
121 gctccctcac gccttgccct caagccttct gcctttccac cctcgtgagc ggagaactgg
181 gagtggccat tcgacgacag gttagcgggt ttgcctccca ctccccagc ctcgcgtcgc
241 cggctcacag cggcctctc tggggacagt ccccccggg tgccgcctcc gcccttcctg
301 tgcgtccctt ttccctcttc ttctctatta aatattattt gggaattgtt taaatttttt
361 ttttaaaaaa agagagaggg ggggaggagt cggagttgtg gagaagcaga gggactcagt
421 gtggtgtaaa ggaattcatt agccatggat gtattcatga aaggactttc aaaggccaag
481 gagggagttg tggctgctgc tgagaaaacc aaacaggggt tggcagaagc agcaggaaaag
541 acaaaagagg gtgttctcta tgtaggctcc aaaaccaagg agggagtgtg gcatggtgtg
601 gcaacagtgg ctgagaagac caaagagcaa gtgacaaatg ttggaggagc agtggtgacg
661 ggtgtgacag cagtagccca gaagacagtg gagggagcag ggagcattgc agcagccaat
721 ggctttgtca aaaaggacca gttgggcaag gaagggtatc aagactacga acctgaagcc
781 taagaaatat ctttgctccc agtttcttga gatctgctga cagatgttcc atcctgtaca
841 agtgctcagt tccaatgtgc ccagtcatga catttctcaa agtttttaca gtgtatctcg
901 aagtcttcca tcagcagtga ttgaagtatc tgtacctgcc cccactcagc atttcgggtg
961 ttccctttca ctgaagtga tacatggtag cagggtcttt gtgtgctgtg gattttgtgg
1021 cttcaatcta cgatgttaaa acaaattaaa aacacctaag tgactaccac ttatttctaa
1081 atcctcacta ttttttgggt gctgtgtgtc agaagttggt agtgatttgc tatcatatat
1141 tataagattt ttaggtgtct tttaatgata ctgtctaaga ataatgacgt attgtgaaat
1201 ttgttaatat atataatact taaaaatatg tgagcatgaa actatgcacc tataaatact
1261 aaatatgaaa ttttaccatt ttgcgagtgt ttttattcac ttgtgtttgt atataaatgg
[0824] 1321 ttgagaattaa aataaaacgt tatctcattg caaaaatatt ttatttttat cccatctcac
1381 ttttaataata aaaatcatgc ttataagcaa catgaattaa gaactgacac aaaggacaaa
1441 aatataaagt tattaatagc catttgaaga aggaggaatt ttagaagagg tagagaaaat
1501 ggaacattaa ccctacactc ggaattccct gaagcaacac tgccagaagt gtgttttggg
1561 atgcactggg tccttaagtg gctgtgatta attattgaaa gtgggggtgt gaagacccca
1621 actactattg tagagtgggc tatttctccc ttcaatcctg tcaatgtttg ctttacgtat
1681 tttggggaac tgttgtttga tgtgtatgtg tttataattg ttatacattt ttaattgagc
1741 cttttattaa catatatgtt tatttttgtc tcgaaataat tttttagtta aaatctattt
1801 tgtctgatat tgggtgtgat gctgtacctt tctgacaata aataatattc gaccatgaat
1861 aaaaaaaaaa aaaaagtggg ttcccgggaa ctaagcagtg tagaagatga ttttgactac
1921 accctcctta gagagccata agacacatta gcacatatta gcacattcaa ggctctgaga
1981 gaatgtgggt aactttgttt aactcagcat tctcactttt ttttttttaa tcatcagaaa
2041 ttctctctct ctctctctct ttttctctcg ctctcttttt tttttttttt ttacaggaaa
2101 tgccctttaa catcggttga actaccagag tcaccttaaa ggagatcaat tctctagact
2161 gataaaaaat tcatggcctc ctttaaatgt tgccaaatat atgaattcta ggatttttcc
2221 ttaggaaagg tttttctctt tcagggaaga tctattaact ccccatgggt gctgaaaata
2281 aacttgatgg tgaaaaactc tgtataaatt aatttataaa ttatttgggt tctcttttta
2341 attattctgg ggcatagtca tttctaaaag tcaactagtag aaagtataat ttcaagacag
2401 aatattctag acatgctagc agtttatatg tattcatgag taatgtgata tatattgggc
2461 gctgggtgag aaggaaggag gaatgagtga ctataaggat gggtaccata gaaacttctc
2521 tttttacctt attgaagaga gactactaca gagtgtctag ctgcatgtgt catcttacac
2581 tagagagaaa tggtaagtgt cttgttttat ttaagttatg ttttaagcaag gaaaggattt
2641 gttattgaac agtatatttc aggaagggtt gaaagtggcg gttaggatat attttaaatc

2701 tacctaaagc agcatatttt aaaaatttaa aagtattggt attaaattaa gaaatagagg
2761 acagaactag actgatagca gtgacctaga acaatttgag attaggaaag ttgtgacctt
2821 gaatttaagg atttatgtgg atacaaattc tcttttaaag tgtttcttcc cttaatattt
2881 atctgacggg aatttttgag cagtgaatta ctttatatat cttaatagtt tttttgggac
2941 caaacactta aacaaaaagt tctttaagtc atataagcct tttcaggaag cttgtctcat
[0825] 3001 attcactccc gagacattca cctgccaggt ggccctgagga tcaatccagt cctaggttta
3061 ttttgacagc ttacattctc ccaagttatt cagcctcata tgactccacg gtggccttta
3121 ccaaaacagt tcagagtgca ctttggcaca caattgggaa cagaacaatc taatgtgtgg
3181 tttggtattc caagtgggtt ctttttcaga atctctgcac tagtgtgaga tgcaaacatg
3241 tttcctcatc tttctggcct atccagtatg tagctatttg tgacataata aatatatata
3301 tatatgaaaa ta

```

[0826] SEQ ID NO:2

[0827] SEQ ID NO:1的反向互补序列

[0828]

tatattcatatatgtatatatttattatgtcacaaatagctacatactggataagccagaaagatgaggaacatgt
ttgcatctcacactagtgagagattctgaaaaagaccccacttggaataccaaaccacacattagattgttctgtt
cccaattgtgtgccaaagtgcactctgaactgttttggttaaagccgacgtggagtcatatgaggctgaataacttg
ggagaatgtaagtctgcaaaataaacctaggactggattgatcctcaggccacttggcaggtgaatgtctcgggagt
gaatatgagacaagcttctgaaaaggcttatatgacttaagaaacttttggtttaagtgtttgggtcccaataaac
tattaagatatataaagtaattcactgctcaaaaattaccgtcagataaatattaagggaagaaacacttttaaagga
gaatttgtatccacataaatccttaaatcatgggtcacaaactttcctaatactcaaattgttctaggtcactgctatc
agtctagttctgtcctctatatttcttaatttaataccaataacttttaaatttttaaataatgctgcttttaggtagatt
taaaatatatacctaaccgccaactttctaaccctctgaaatatactgttcaataacaaatcctttccttgccttaaac
ataacttaataaaaaacaagaaacttaccatttctctctagtgttaagatgacacatgcagcttagcactctgtagtag
tctctcttcaatttaggtaaaaaaggaagtttctatggtaaccatccttatagtcactcattcctccttccctcctca
ccagcgcccaatatatatcacattactcatgaatacatataaaactgctagcatgtctagaatattctgtccttgaaat
tatactttctactagtgacttttagaaatgactatgcccagaataattaaaaagagaaaccaaataatttttaaat
taatttatcacagagttttcaccatcaagtttattttcagcacccatgggaggttaatagatcttccctgaaagaga
aaaactttcctaaggaaaaatcctagaattcatatatattggcaacatttaaaggaggccatgaaatttttatcagt
ctagagaattgatctcctttaaggtgactctggtagttccaacgatgtttaaaggcatttctgtaaaaaataaaaa
aaaaagagagcgagagaaaaagagagagagagagagaatttctgatgattaaaaaataaagtgaggaaatgctga
gttaacaaaggttaaccacattctctcagagccttgaatgtgctaataatgtgctaattgtgtcttatggctctcaag
gaggtgtagtcaaaatcatcttctacactgcttagttcccggaacccacttttttttttttttttattcatggctg
aatattatttattgtcagaaaggtacagcattcacaccaatatcagacaaaatagattttaactaaaaaattatttc
gagacaaaaataacaatatatgttaataaaaggctcaattaaaaatgtataacaattataaacacatacacatcaaa
caacagttccccaaaaacgtaaaagcaaacattgacaggattgaagggaagaaatagaccactctacaatagtagttg
gggtcttcaacaccccactttcaataattaatcacagccacttaaggaaaccagtgcataccaaaacacacttctggc
agtgttgcttcagggaattccgagtgtaggggttaattgtccattttctcactccttctaaaaattcctccttcttca
aatggctattaataacttttatattttgtcctttgtgtcagttcttaattcatgttgcttataagcatgattttat
tattaaagtgagatgggataaaaaataaatatttttgcaatgagataacgtttttattttaattctcaccatttatat
acaaacacaagtgaataaaacacatcgcaaaatggtaaaatttcatatttagtatttataggtgcatagtttcatgc
tcacataatttttaagtatttatataattaacaaatttcaaatacgtcattattcttagacagtatcattaaagac
acctaaaaatcttataatatatgatagcaaatcactaacaacttctgaacaacagcaacaaaaaataatgtgaggatt
tagaaataagtggtagtcacttaggtgtttttaatttgttttaacatcgtagattgaagccacaaaatccacagcac
acaaagacctgctaccatgtattcacttcagtgaaagggaagcaccgaaatgctgagtgggggcaggtacagatac
ttcaatcactgctgatggaagacttcgagatacactgtaaaaactttgagaaatgtcatgactgggcacattggaac
tgagcacttgtagagatggaacatctgtcagcagatctcaagaaactgggagcaagatatattcttaggcttcagg
ttcgtagtttgatacccttccctgccaactggctcttttgacaaagccagtggtgctgcaatgctccctgctc
cctccactgtcttctgggctactgctgtcacacccgtcaccactgctcctccaacatttgcacttgctctttgggtc
ttctcagccactgttgccacaccatgcaccactccctccttggttttgaggactacatagagaacacctcttttgt
ctttcctgctgcttctgccacacctgtttgggttttctcagcagcagccacaactcctccttggcctttgaaagtc
ctttcatgaatacatccatggctaattgaattcctttacaccacactgagtcctctgcttctocacaactccgactc
ctccccgctctctcttttttttaaaaaaaaatttaacaaattcccaataatattttaataggaaagaagaaggaaa
aggagcgacaggaaggcgaggcgccacccgggggggactgtccccagaggaggccgctgtgagccggcgacgcg
aggctgggggagtgaggagcaaacccgctaacctgtcgtcgaaatggccactccagttctccgctcacgagggtgga
aaggcagaaggcttgaaggcaaggcgtgagggagcgcacaggacgctctcggaggggcccgggcccgggtcgcgctg
cagcccgacgcacctcacttccgcgtcgcggcgctcggtcgctcgccccctctcttgggcccctctgggtcgctgcg
c

[0829] SEQ ID NO:3

[0830] 基因座:XM_005555421 2955bp mRNA线性PRI 25-JAN-2016

[0831] 定义预测:食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 突触核蛋白 α (SNCA), 转录物变体X7, mRNA。

[0832] 版本:XM_005555421.2

[0833] 1 gccttgccgcg gccaggcagg cggttggaat tgggtggttca ccttgccgcc cctgccccat

61 ccccatccga gatagggaac gaagagcacg ctgcagggaa agcagcgagc gctgggaggg
 121 gagcgtggag aggcgctgac aaatcagcgg tgggggcgga gagccgagga gaaggagaag
 181 gaggaggacg agggaggagga ggacggcgac gaccagaagg ggcccagagag agggggcgag
 241 cgaccgagcg ccgcgacgcg ggagtgaagt tgggtgaaag gaattcatta gccatggatg
 301 tattcatgaa aggactttca aaggccaagg agggagtgtg ggctgctgct gagaaaacca
 361 aacaggggtg ggcagaagca gcaggaaaag caaaagaggg tgttctctat gtaggctcca
 421 aaaccaagga gggagtgggt cacggtgtgg caacagtggc tgagaagacc aaagagcaag
 481 tgacaaatgt tggaggagcg gtggtgacgg gtgtgacagc agtagcccag aagacagtgg
 541 agggagcagg gagcattgca gcagccactg gcttcatcaa aaaggaccag ttgggcaaga
 601 atgaagaagg agccccacag gaaggaattc tacaagatat gcctgtggat cctgacaatg
 661 aggcttatga aatgccttct gaggaagggt atcaagacta cgaacctgaa gcctaagaaa
 721 tatctttgct cccagtttct tgagatctgc tgacagacgt tccatcttgt acaagtgtct
 781 agttccaatg tgcccagtca tgacatttct caaagttttt acagtatatt ttgaagtctt
 841 ccatcagcag tgattgaagt atctgtacct gccccattc agcatttcgg tgcttccctt
 901 tcaactgaagt gaatacatgg tagcagggtc tttgtgtgct gtggattttg tggcttcaat
 961 ctatgatgtt aaaacaattt aaaaacacct aagtgactac cacttatttc taaatcctca
 1021 ctattttttt gttgctgttg ttcagaagtt gttagtgaat tgctatcgta tattataaga
 1081 ttttttaggtg tcttttaagt atactgtcta agaataatga tgtattgtga aatttggtta
 1141 tatatataat acttaaaagt atgtgagcat gaaactatgc acctataaat actaactatg
 1201 aaattttacc gttttgtgat gtgttttatt aacttgtgtt tgtatataaa tggtgagaat
 1261 taaaataaaa tgtcgtctca ttgcaaaca aaattttatt ttatcccatc tcactttaat
 1321 aataaaaaatc ttgcttataa gcaacatgca ttgagaactg acacaatgga cataaagtta
 1381 ttaataggca tttgaagaag gaggaatttt agaagaggta gagaaaatgg aacattaacc
 1441 ctacactggg aattccctga agcagcactg ccagaagtgt gttttgtggg gccttaagtg
 1501 gctgtgataa aaaaaaaaaa aagtgggctc caggggaacga agcagtgtaa aagatgattt
 [0834] 1561 tgactacatc ctcccttagag atccatgaga cacttttagca catattagca cattcaaggc
 1621 tctgagacaa tgtggttaac ttagtttaac tcagcagtc ccactaaaaa aaaaaaatc
 1681 atcaaaaatt ctctctctct attccttttt ctctcgtctc ccttttttcc aggaaatgcc
 1741 tttaaacacc tttgggaact atcaggatca ccttaaagaa gatcagttct ccagactgat
 1801 aaaaatttca tgatctcttt taaatgttgc caaatatatg aattctagga ttttcccttg
 1861 ggaaagggtt ttctctttca ggggaagatc attaaactcc catgggtgct gaaaataaac
 1921 ttgatgggtga aaaattctat ataaattaat ttaaaatttt tttggtttct ctttttaatt
 1981 attctggggc atagtcattt ttaaaagtca ctagtataaa gtataatttc aagacagaat
 2041 attctagaca tgctagcagt ttatatgtat tcatgagtaa tgtgatatat attgggcact
 2101 ggtgaggcag gaaggaggaa tgagtgacta taaggatggg taccatagaa acttcccttt
 2161 ttacctaatg gaaaagcgac tactacagag tgctaagctg catgtgtcat ctacactgg
 2221 agagaaatgg taagtttctt gttttattta agttatgttt aagcaaggaa aggatttttt
 2281 attgaacagt atatttcagg aaggttagaa aatagctgtt aggatataat ttaaatctac
 2341 ctaaagcagc atatttttaa aaattagaag tattggcatt aaatgaagaa atagaggaca
 2401 aaactagact gacagcaatg acccagaaca ttttgagatt agtaaagttg tgaccatgaa
 2461 tttagggtat tatgtggata caaattctcc tttaaagtgt ttcttccctt aatatttatc
 2521 tggtagttat ttatgagcag tgaattattt tgtagtattt atatcttaat agtttatttg
 2581 ggaccaagca cttacaacaa agttctataa gtcatagaag ccttttcagg aagcttgtct
 2641 cacattcatt cctgagactt tcacctgcca agtggcctga ggatcaatcc ggtcctaggt
 2701 ttatttttga gacatacatt ctcccaagtt attcagctc atatgactcc acagtgggct
 2761 ttaccaaacc agttcagagt gcactttggc acacaattgg gagcagaaca atctaattg
 2821 tggtttggtg ttccaagtgg ggtctttttc agaattctct cactagtgtg agatgcaaat
 2881 atgtttctct atttttctgg ctcatccagt atgtagcttt ttgtgacata ataaatatat
 2941 acatatatga aaata

[0835] SEQ ID NO:4

[0836] SEQ ID NO:3的反向互补序列

[0837] tattttcatatatgtatatatttattatgtcacaaaagctacatactggatgagccagaaaaatgag
gaaacatat

[0838] ttgcatctcacactagtggagagattctgaaaaagaccccacttgaataaccaaacacacattagat
tgttctgct

[0839] cccaattgtgtgccaaagtgcactctgaactgttttggtaaagcccactgtggagtcatatgaggctg
aataacttg

[0840] ggagaatgtatgtctgcaaaataaacctaggaccgattgatcctcaggccacttggcaggtgaaagt
ctcaggaat

[0841] gaatgtgagacaagcttcctgaaaaggcttctatgacttatagaactttttgttaagtgcttggtccc
aaataaact

[0842] attaatatataaactacaaaataattcactgctcataaataactaccagataaatattaagggaag
aaacacttt

[0843] aaaggagaattttgtatccacataaatccctaaattcatggtcacaactttactaatctcaaaatgttc
tgggtcatt

[0844] gctgtcagtcctagttttgtcctctattttcttcatttaatgccaaacttctaatttttttaaataatgc
tgcttttagg

[0845] tagattttaaatatatcctaacagctattttctaaccttcctgaaatatactgttcaataaaaaatcc
tttccttgc

[0846] ttaaacataacttaataaaaacaagaaacttaccattttctctccagtgtgaagatgacacatgcagctt
agcactctg

[0847] tagtagtcgcttttcaattaggtaaaaaaggaagtttctatggtaaccatccttatagtcactcattc
ctccttcc

[0848] gcctcaccagtgcccaatatatatcacattactcatgaatacatataaactgctagcatgtctagaat
attctgtct

[0849] tgaaattatactttctactagtgcattttaaaaatgactatgccccagaataattaaaaagagaaacc
aaaaaaatt

[0850] ttaaattaattttatatagaatttttcaccatcaagttttattttcagcacccatggggagttaatagat
cttcctga

[0851] aagagaaaaacctttcccaaggaaaaatcctagaattcatatatatttggaacatttaaaagagatcat
gaaattttt

[0852] atcagtcctggagaactgatcttctttaaggtgatcctgatagttcccaaagggtgttaaaaggcatttc
ctggaaaaa

[0853] aggggagcgagagaaaaaggaatagagagagagaatttttgatgatttttttttttttagtggggact
gctgagtta

[0854] aactaagttaaccacattgtctcagagccttgaatgtgctaataatgtgctaaagtgtctcatggatct
ctaaggagg

[0855] atgtagtcaaaatcatcttttacactgcttcgttccttgagagccacttttttttttttttatcacag
ccacttaag

[0856] gcaccacaaaacacacttctggcagtgtgcttcaggaattcccagtgtagggtaatgttccattt
tctctacct

[0857] cttctaaaattcctccttcttcaaagcctattaataactttatgtccattgtgtcagttctcaatgc
atgttgctt

[0858] ataagcaagattttttattattaaagtgaatgggataaaaaataaattttgtttgcaatgagacgaca
ttttatttt

[0859] aattctcaccattttatatacaaacacaagttaataaaacacatcacaaaacggtaaaatttcatagtt

agtatttat

[0860] aggtgcatagtttcatgctcacatacttttaagtattatatattaacaaatttcacaatacatcat
tattcttag

[0861] acagtatcattaaaagacacctaataatcttataatatacgatagcaaatcactaacaacttctgaac
aacagcaac

[0862] aaaaaaatagtgaggatttagaaataagtggtagtcacttaggtgttttaattgttttaacatcat
agattgaag

[0863] ccacaaaatccacagcacacaaagacctgctaccatgtattcacttcagtgaagggaagcaccgaa
atgctgaat

[0864] gggggcaggtacagatacttcaatcactgctgatggaagacttcaaaatatactgtaaaaactttgag
aatgtcat

[0865] gactgggcacattggaactgagcacttgtaacaagatggaacgtctgtcagcagatctcaagaaactgg
gagcaaaga

[0866] tatttcttaggcttcaggttcgtagcttggatacccttctcagaaggcatttcataagcctcattgt
caggatcca

[0867] caggcatatctttagaattccttctgtggggctccttcttcattcttgcccaactggtcctttttg
atgaagcca

[0868] gtggctgctgcaatgctccctgctccctccactgtcttctggtgctactgctgtcacaccgctcaccac
cgctcctcc

[0869] aacatttgtcacttgctctttggtcttctcagccactgttgccacaccgtgcaccactcctccttg
ttttggagc

[0870] ctacatagagaacaccctcttttgtctttcctgctgcttctgccacaccctgtttggttttctcagca
gcagccaca

[0871] actccctccttggcctttgaaagtcctttcatgaatacatccatggctaataatcctttacaccac
actcactcc

[0872] cgcgtcgcggcgctcggtcgctcgccccctctctcgggcccccttctggtcgtcgccgtcctcctcctc
ctcgtcctc

[0873] ctcttctccttctcctcggtctctcgccccaccgctgatttgtcagcgctctccacgtcccctc
ccagcgctc

[0874] gctgctttccctgcagcgctgctcttcgttccctatctcggtatggggatggggcagggggcgagggtg
aaccaccaa

[0875] ttccagccgctgcttgccgcgcaaggc

[0876] SEQ ID NO:5

[0877] 基因座:NM_009221 1208bp mRNA线性ROD 06-SEP-2020

[0878] 定义:小鼠(Mus musculus)突触核蛋白 α (Snca),转录物变体2,mRNA。版本:NM_009221.2

1 ggaggagctt ggcaactcaaa tccactctgc tataaaacag tggattctcg ctcatctcag
61 agagaagtgg gaacgtgtta agtaacacag aaattgtctc aaagcctgtg catctatctg
121 cgcgtgtgct tggattggaa gaagagtctg ttcgctggag ctccacgcag ccagaagtgc
181 gaaagtgtgg agcaaaaata catcttttagc catggatgtg ttcattgaaag gactttcaaa
241 ggccaaggag ggagttgtgg ctgctgctga gaaaaccaag caggtgtgtg cagaggcagc
301 tggaaagaca aaagaggag tccctctatgt aggttccaaa actaaggaaag gagtgggtca
361 tggagtgcac acagtggctg agaagaccaaa agagcaagtg acaaatgttg gaggagcagt
421 ggtgactggg gtgacagcag tgcctcagaa gacagtggag ggagctggga atatatgctgc
481 tgccactggc tttgtcaaga aggaccagat gggcaagggt gaggaggggt acccacagga
541 aggaatcctg gaagacatgc ctgtggatcc tggcagtga gcttatgaaa tgccttcaga
[0879] 601 ggaaggctac caagactatg agcctgaagc ctaagaatgt cattgcaccc aatctcctaa
661 gatctgccgg ctgctcttcc atggcgtaca agtgctcagt tccaatgtgc ccagtcatga
721 ccttttctca aagctgtaca gtgtgtttca aagtcttcca tcagcagtga tcggcgctct
781 gtacctgccc ctacagcatcc cgggtgctccc ctctcactac agtgaaaacc tggtagcagg
841 gtcttgtgtg ctgtggatat tgttgtggct tcacacttaa attgttagaa gaaacttaaa
901 acacctaagt gactaccact tatttctaaa tcttcacgt tttctttttg ttgctgttct
961 taagaagttg tgatttgctc caagagtttt aggtgtcctg aatgactctt tctgtctaag
1021 aatgatgtgt tgtgaaattt gttaatatat attttaaaat tatgtgagca tgagactatg
1081 cacctataaa tattaattta tgaattttac agttttgtga tgtgttttat taacttgtgt
1141 ttgtatataa atgggtgaaa ataaaataaa atattatcca ttgcaaaatc aaaaaaaaaa
1201 aaaaaaaaaa

[0880] SEQ ID NO:6

[0881] SEQ ID NO:5的反向互补序列

[0882] ttttttttttttttttttgattttgcaatggataatattttattttattttccaccatttatatacaa
acacaagtt

[0883] aataaaacacatcacaaaactgtaaaattcataaattaatatattataggtgcatagtctcatgtctcac
ataatttta

[0884] aaatatatattaacaaatttcacaacacatcattcttagacagaaagagtcattcaggacacctaana
ctcttgagg

[0885] caaatcacaacttcttaagaacagcaacaaaaagaaaacgatgaagatttagaaataagtggtagtca
cttagtgtt

[0886] ttttaagtttcttctaacaatttaagtgtgaagccacaacaatatccacagcacacaagaccctgctac
caggttttc

[0887] actgtagtgagaggggagcaccgggatgctgaggggcaggtacaggacgccgatcactgctgatggaa
gactttgaa

[0888] acacactgtacagctttgagaaaaggctcatgactgggcacattggaactgagcacttgtagccatgg
aagagcagc

[0889] cggcagatcttaggagattgggtgcaatgacattcttaggcttcaggctcatagtcttggtagccttc
ctctgaagg

[0890] catttcataagcctcactgccaggatccacaggcatgtcttccaggattccttcctgtgggtaccct
cctcacct

[0891] tgcccatctggctccttcttgacaaagccagtggcagcagctatatccagctccctccactgtcttc
tgagcgact

[0892] gctgtcacaccagtcaccactgtctctccaacatttgcacttgctctttgggtcttctcagccactgt
tgtcactcc

[0893] atgaaccactccttccttagttttggaacctacatagaggactccctcttttgtctttccagctgcct
ctgccacac

[0894] cctgcttggttttctcagcagcagccacaactccctccttggcctttgaaagtcctttcatgaacaca
tccatggct

[0895] aaagatgtatTTTTGCTCCACACTTTCGACTTCTGGCTGCGTGGAGCTCCAGCGAACAGACTCTTCT
tccaatcca

[0896] agcacacgcgcagatagatgcacaggctttgagacaatttctgtgttacttaacacgttcccacttct
ctctgagat

[0897] gagcagaataccactgttttatagcagagtggatttgagtgccaaagctcctcc

[0898] SEQ ID NO:7

[0899] 基因座:NM_019169 1176bp mRNA线性ROD 23-AUG-2020

[0900] 定义:大鼠(Rattus norvegicus)突触核蛋白 α (Snca), mRNA。

[0901] 版本:NM_019169.2

1 ccggcagcag acggcaggag accagcaggt gctccccctg cccttgcccc tcagcccaga
61 gcctttcacc cctcttgcac tgaaattaga ttgggggaaaa caggaggaat cagagttctg
121 cggaagccta gagagccgtg tggagcaaag atacatcttt agccatggat gtgttcatga
181 aaggactttc aaaggccaag gagggagttg tggctgctgc tgagaaaacc aagcaggggtg
241 tggcagaggc agctgggaag acaaaagagg gcgtcctcta tgtaggttcc aaaactaagg
301 agggagtcgt tcatggagtg acaacagtgg ctgagaagac caaagaacaa gtgacaaatg
361 ttggaggggc agtggtgact ggtgtgacag cagtcgctca gaagacagtg gagggagctg
421 ggaacattgc tgctgccact ggttttgtca agaaggacca gatgggcaag ggtgaagaag
481 ggtaccacca agaggggaac ctggaagaca tgctgtgga ccctagcagt gaggcttatg
[0902] 541 aaatgccttc agaggaaggc taccaagact atgagcctga agcctaagaa tgtcgttgta
601 ccactgtcc taagatctgc ccaggtgttc ttccatggcg tacaagtgc cagttccaac
661 gtgcccagtc atgacctttt ctcaaagctg tacagtgtat ttcaaagtct tccatcagca
721 gtgatcggag tctgtacct gccctcagc atcccgggtgc tcccctctca ctacagtga
781 tacatggtag caggctcttg tgtgctgtgg atattgttgt ggcttcaaac ctaaaatgtt
841 agaagaaact taaaacacct aagtgactac cacttatttc taactcttca ccgttttttg
901 ttgctgttct caagaagttg tgatttgcta taagactttt agatgtcctt aatgattcct
961 tctgtctaag aagaatgatg tgctgtgaaa tttgttaata tatattttta aatatgtgag
1021 catgagacta tgcacctata aatattaatt tatgaatttt acagttttgt gacgtgtttt
1081 attaaactgt gtttgtatat aaatggtgga aattaaaata aaataaaaca ttatctcatt
1141 gcaaaacctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagg

[0903] SEQ ID NO:8

[0904] SEQ ID NO:7的反向互补序列

[0905] ccttttttttttttttttttttttaaggttttgcattgagataatgttttattttattttaatttc
caccattta

[0906] tatacaaacacaagttaataaaacacgtcacaaaactgtaaaattcataaattaatatttataggtgc
atagtctca

[0907] tgctcacatatTTTAAATATATATTAACAAATTTACAGCACATCATTCTTCTTAGACAGAAAGAA
cattaagga

[0908] catctaaaagtcttatagcaaatcacaacttcttgagaacagcaacaaaaaacggtgaagagttagaa
ataagtgtt

[0909] agtcacttaggtgttttaagtttcttctaacttttaggtttgaagccacaacaatatccacagcaca
caagagcct

[0910] gctaccatgtattcactgtagtgagaggggagcaccgggatgctgaggggcaggtacaggactccgat
cactgctga

[0911] tggaagactttgaaatacactgtacagctttgagaaaaggcatgactgggcacgttgaactgagca
cttgtagcgc

[0912] catggaagaacacctgggcagatcttaggacagtgggtacaacgacattcttaggcttcaggctcata
gtcttggtta

[0913] gccttcctctgaaggcatttcataagcctcactgctagggccacaggcatgtcttcaggattccct
cttggtgggt

[0914] acccttcttcacccttgcccatctggtccttcttgacaaaaccagtggcagcagcaatgttcccagct
ccctccact

[0915] gtcttctgagcgactgctgtcacaccagtcaccactgccccctccaacatttgctacttggttctttggt
cttctcage

[0916] cactgttggtcactccatgaacgactccctccttagttttggaacctacatagaggacgccctcttttg
tcttcccag

[0917] ctgectctgccacaccctgcttggtttttctcagcagcagccacaactccctccttggtctttgaaagt
cctttcatg

[0918] aacacatccatggctaaagatgtatctttgctccacacggctctcttaggcttcgcagaactctgatt
cctcctggt

[0919] ttccccaatctaatttcaatgcaagaggggtgaaaggctctgggctgaggggcaagggcagggggagc
acctgctgg

[0920] tctcctgccgtctgctgccgg

[0921] SEQ ID NO:228

[0922] 基因座:XM_535656 1493bp mRNA线性MAM 06-JAN-2021

[0923] 定义预测:家犬(Canis lupus familiaris)突触核蛋白 α (SNCA),转录物变体X12,
mRNA。

[0924] 登录:XM_535656

[0925] 版本:XM_535656.7

[0926] 1 cggcgagagg ggggggagag gcgctgacaa atcagctgcg ggggcggtga gccgaggaga
61 aggaggagaa agaggaagg gagggaagacc acgacgactt gcaggggacc cgagagaggg
121 ggtgagagac cgagcgcggc agcgtggggg tgagtgtggt gtgaacgaat tcattagcca
181 tggatgtatt catgaaagga ctttcaaagg ccaaggaggg agtcgtggct gctgctgaaa
241 aaaccaaaca ggggtgtggc gaagcagcag gaaagacaaa agagggtgtc ctctatgtag
301 gctccaaaac caaggaagga gtggttcacg gtgtgacaa agtggtctgag aagaccaaag
361 agcaagtgc aaatgttggt gaggccgtgg tgacaggggt gacagcagta gcacaaaaga

421 cagtggaggg agcagggagc atcgcagctg ctactggctt tggcaaaaag gatcagttgg
481 gcaagagtga agaaggagg ccacaggaag gaattctgga agatatgcct gttgatcctg
541 acaatgaggc atatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactatgaa cccgaagcct
601 aagaaatact tttgctccca gtttcttgag acctactgac agatgttcca tctgtacaa
661 gtactcagtt ccaaaatgcc cagtcataac attttctcaa aatttttaca gtgtatttta
721 aactcttcca tcagcagtga ttgaagttat ctgtaccage ccctactcag catttcagt
781 cttccctctc actgaagtga ttatatggta gcagggtcct cccttggtgtg ctgtgtggat
841 attgtggctt caaatctaaa atgttaaatt aaagcaccta agtgactacc acttatttct
901 aaatcttcac tatttttttg ttgctggtat tgagaagttg tgatttacta tcatatatta
[0927] 961 taagatttct aggtgtcttt taatgattat ttctgtttta aaaataatga tgtgttgtga
1021 aatttggtta tatatacaat acttagaaac atgttagcat gaaactatgc acctataaat
1081 attaaactatg aaattttact gttttgtgat gtgttttatt aatttggtgt tatatataaa
1141 tgctgaaaaa taaaatgtta tctcattaca aaaatcttat ttttaattccc atctcacttt
1201 aataataaaa tcatgcttat aacaatatga actgagaact gacacaatta acttaaagct
1261 cttgacagcc atttgaagga gaaggaattt tagaagaatt aagcagacaa gatggaacat
1321 taatccttta ctctggaaat tcaactgaagc aacactaccc aaagtatcct gacatgcagt
1381 ggtgtcttaa gaggttatat ggaaaaaaa aaaaacgggt tccatggaat agtgagttta
1441 agaaattatt ttgactatgt ctgcttcaaa tattaataaa acatatttagc aca

[0928] SEQ ID NO:229

[0929] SEQ ID NO:228的反向互补序列

[0930] tgtgctaatatgttttattaatatattgaagcagacatagtcaaaataatttcttaaacactactattcc
atggaaccc

[0931] gttttttttttttccatataacctcttaagacaccactgcatgtcaggatactttgggtagtgttgc
ttcagtga

[0932] tttccagagtaaaggattaatgttccatcttgtctgcttaattcttctaaaaattccttctccttcaaa
tggctgtca

[0933] agagctttaagttaattgtgtcagttctcagttcatattgtttataagcatgattttattattaaagtg
agatgggat

[0934] taaaaataagatttttgtaatgagataacatttttaattttcagcatttatatataaacacaaattaat
aaaacacat

[0935] cacaaaacagtaaaatttcatagttaatatattataggtgcatagtttcatgctaacatgtttctaagt
attgtatat

[0936] attaacaatttcacaacacatcattattttttaaacagaaataatcattaaaagacacctagaaatc
ttataatat

[0937] atgatagtaaatacacaacttctcaataacagcaacaaaaaaatagtgaagatttagaaataagtggta
gtcacttag

[0938] gtgctttaatttaacatttttagatttgaagccacaatatccacacagcacacaaggaggaccctgct
accatataa

[0939] tcacttcagtgagaggaagcactgaaatgctgagtaggggctggtacagataacttcaatcactgct
gatggaaga

[0940] gtttaaaatacactgtaaaaattttgagaaaatgttatgactgggcattttggaactgagtacttgta
caggatgga

[0941] acatctgtcagtaggtctcaagaaactgggagcaaaagtatttcttaggccttcgggttcatagtcctg
atacccttc

[0942] ctcagaaggcatttcatatgcctcattgtcaggatcaacaggcatatcttccagaattccttcctgtg
ggcctcctt

[0943] cttcactcttgcccaactgatcctttttgccaaagccagtagcagctgcatgctccctgctccctcc
actgtcttt

[0944] tgtgctactgctgtcaccctgtcaccacggcctcaccaacatttgtcacttgctctttgggtcttctc
agccactgt

[0945] tgtcacaccatgaaccactccttccttggttttggagcctacatagaggacacctcttttgtctttc
ctgctgctt

[0946] ctgccacacctgttttggttttttcagcagcagccacgactccctccttggcctttgaaagtcctttc
atgaataca

[0947] tccatggctaataaattcgttcacaccacactcacccccacgctgccgcgctcggtctctcaccacct
ctctcgggt

[0948] cccctgcaagtcgtcgtggtcttctccttctcttcttctcctccttctcctcggtcacgcctccc
gcagctgat

[0949] ttgtcagcgcctctccccgccccctctgccg

[0950] 等同

[0951] 本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验确定等效于本文所述具体实施方案和方法的许多等同物。此类等同物旨在为以下权利要求的范围所涵盖。

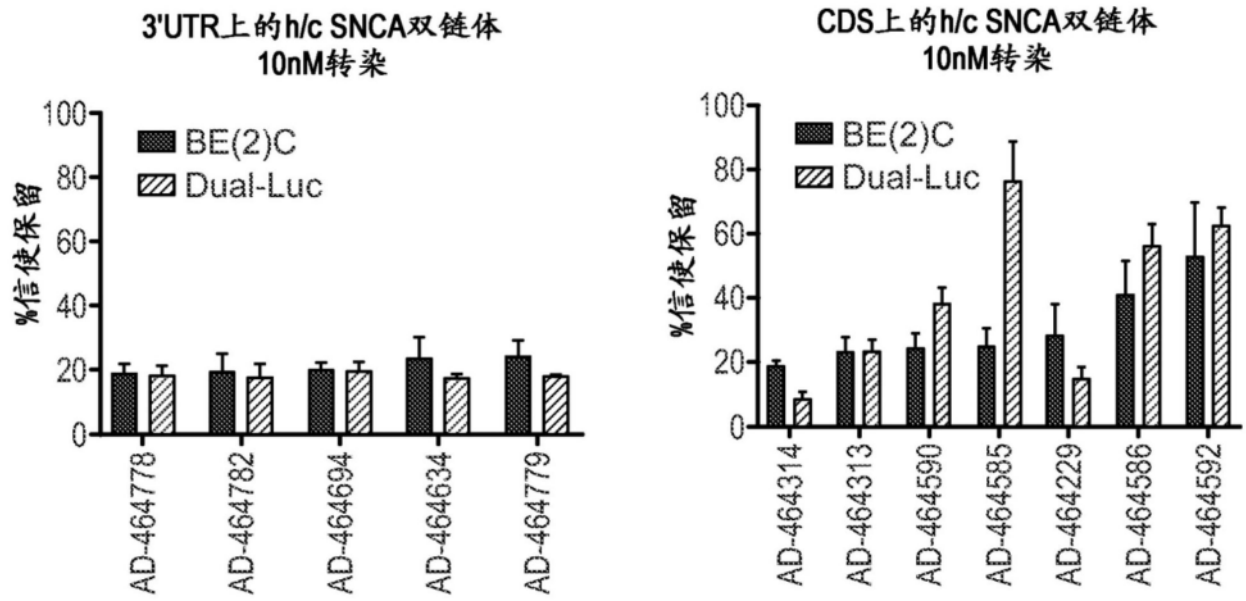


图1A

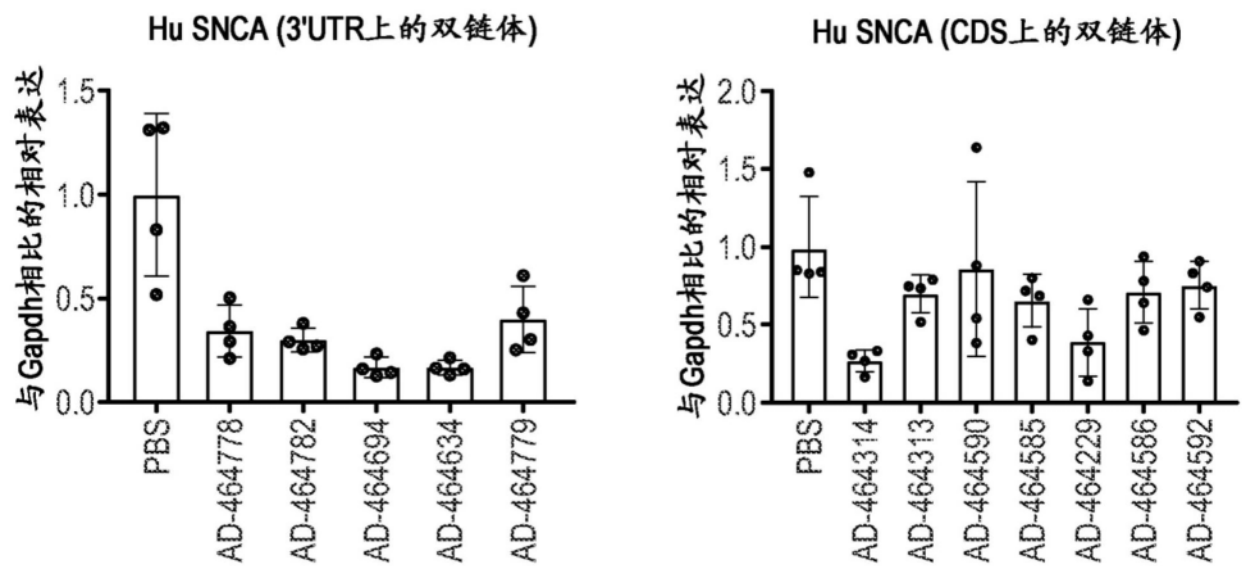


图1B

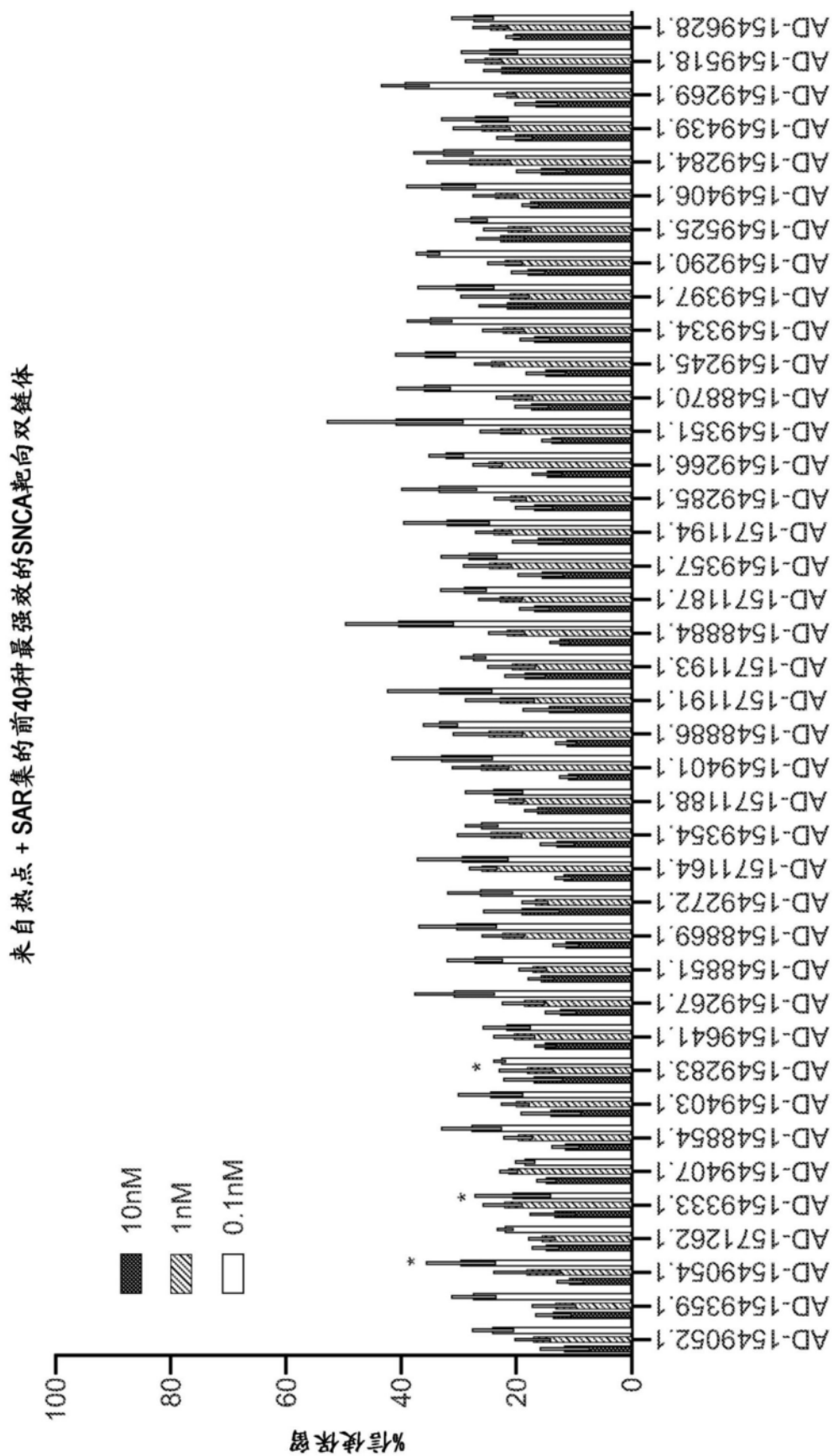


图2

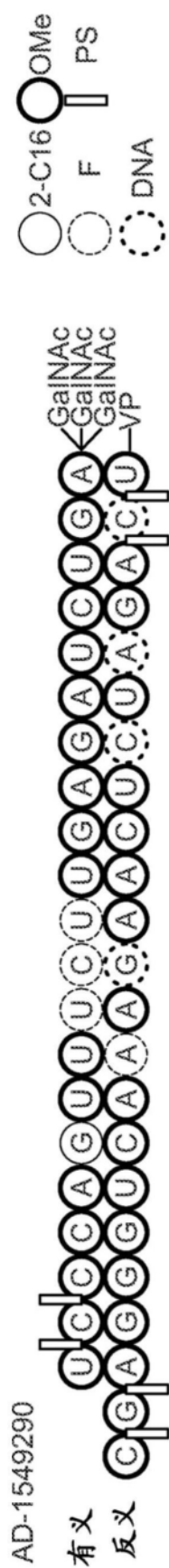


图3

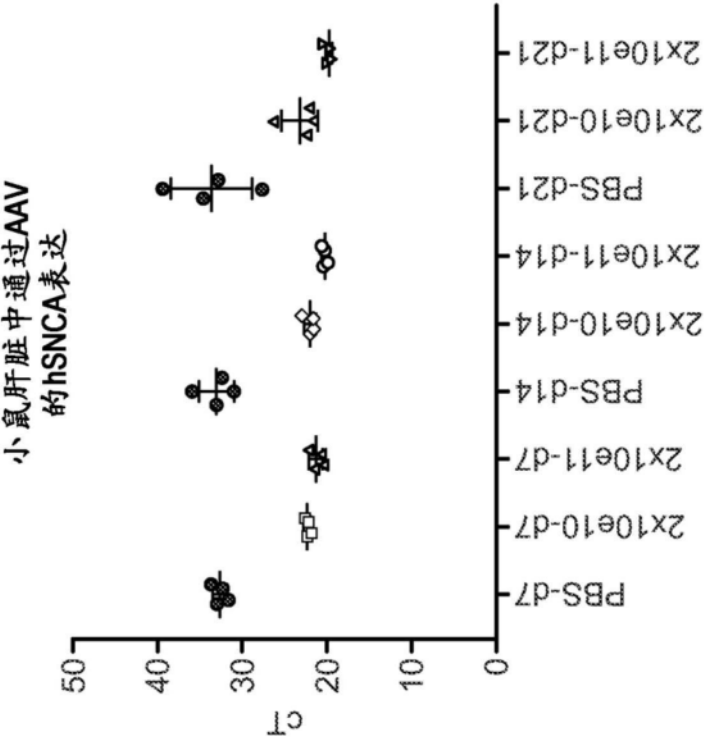
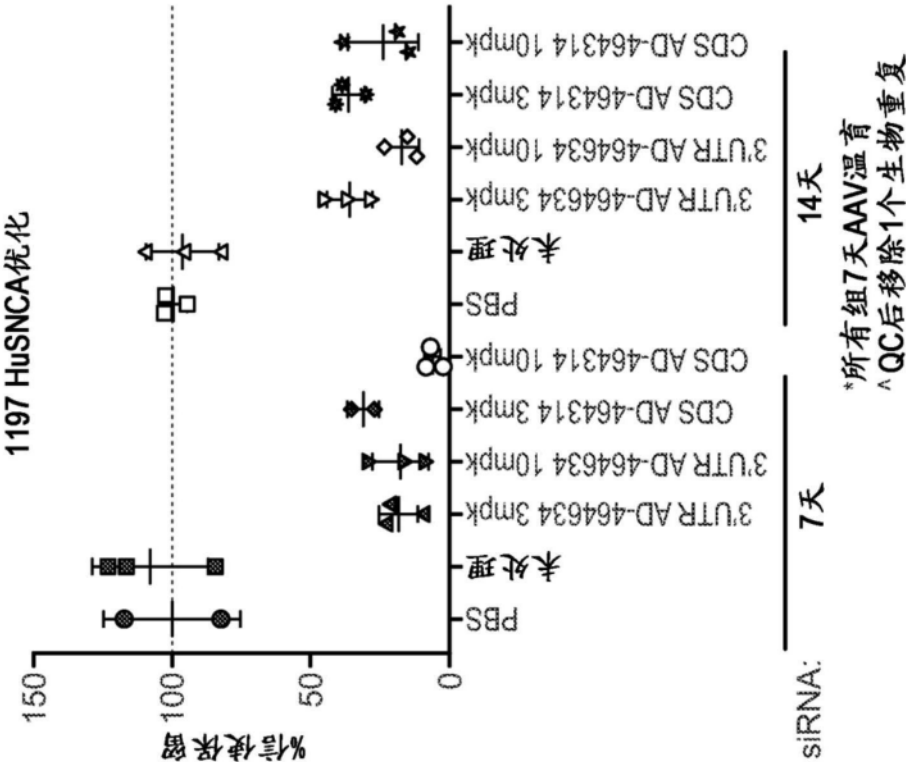


图4

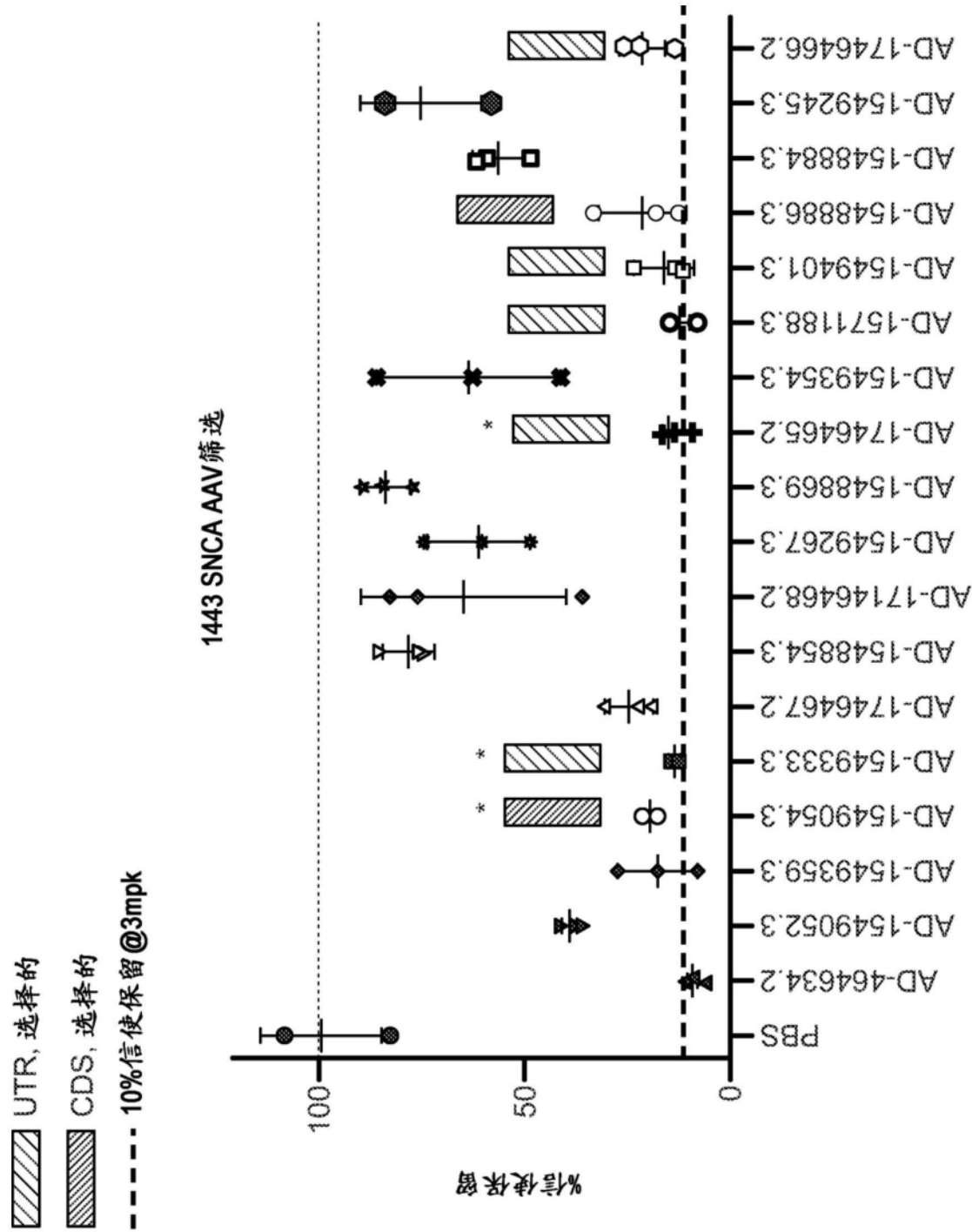


图5A

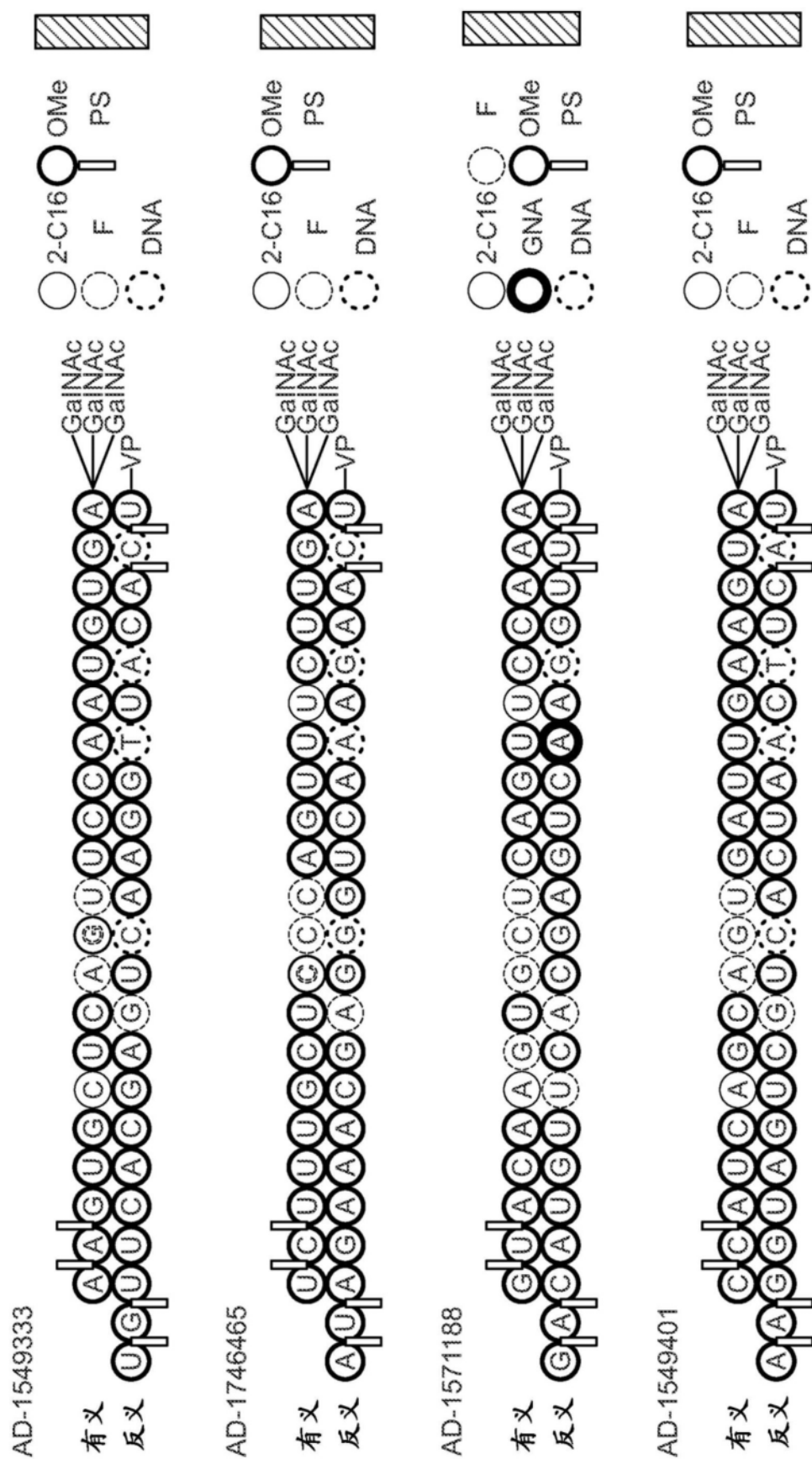


图5B

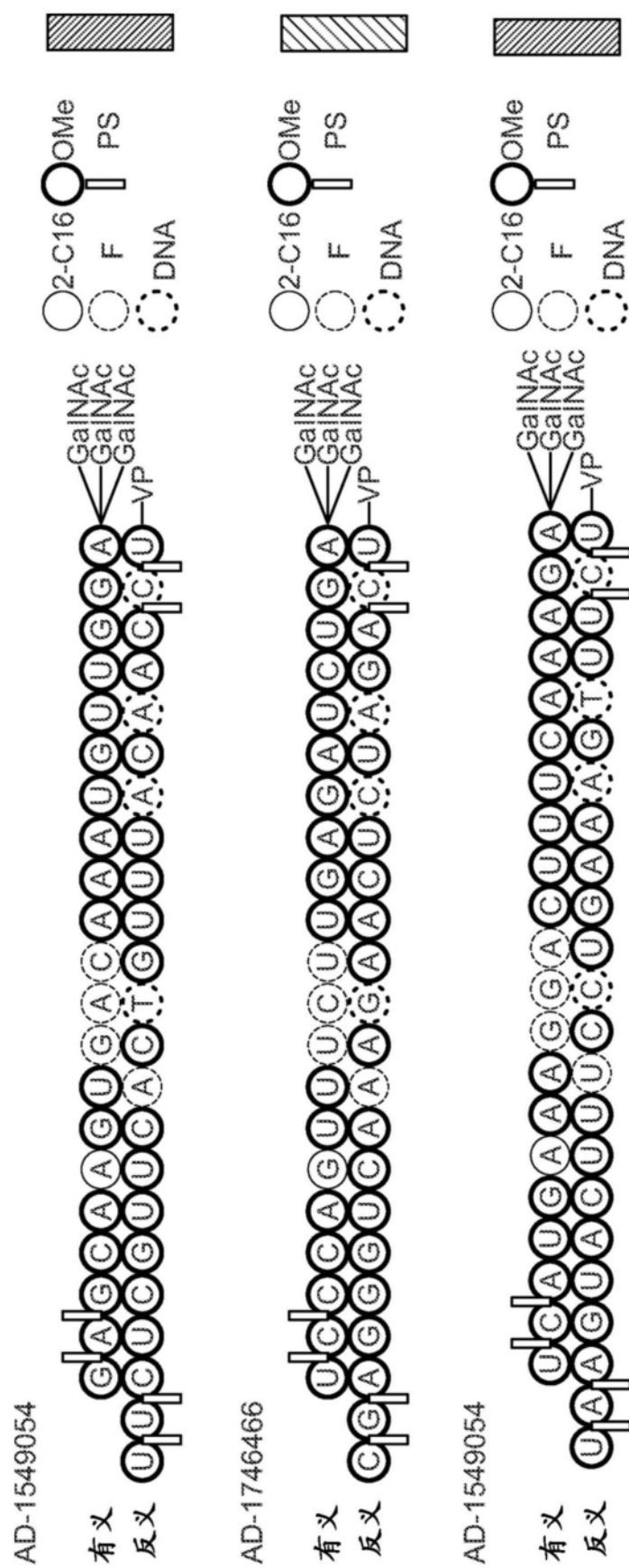


图5B (续)

识别符	位置	体内(%信使 保留@3mpk)	ED ₈₀ (nM)
AD-1549333	UTR	9.06	0.235
AD-1746465	UTR	13.43	0.405
AD-1571188	UTR	12.37	1.075
AD-1549401	UTR	16.03	1.216
AD-1549054	CDS	18.62	0.504
AD-1746466	UTR	21.41	2.871
AD-1548886	CDS	21.49	1.210

图6A

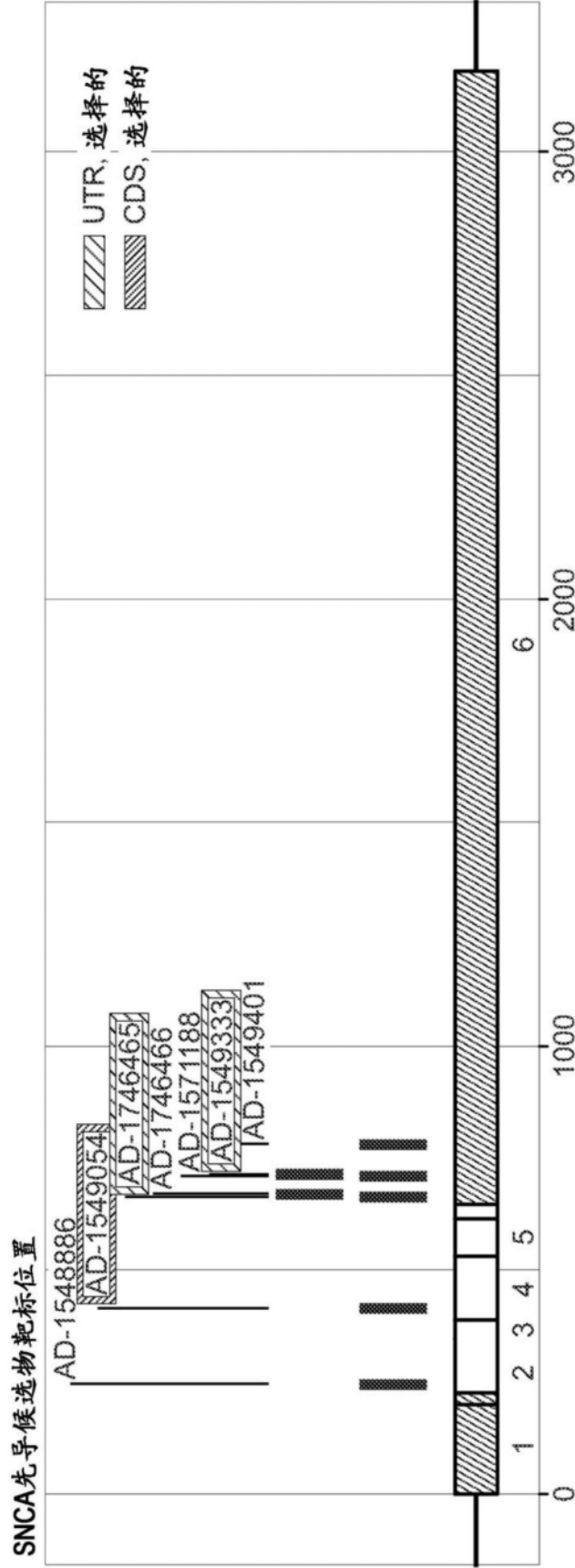


图6B

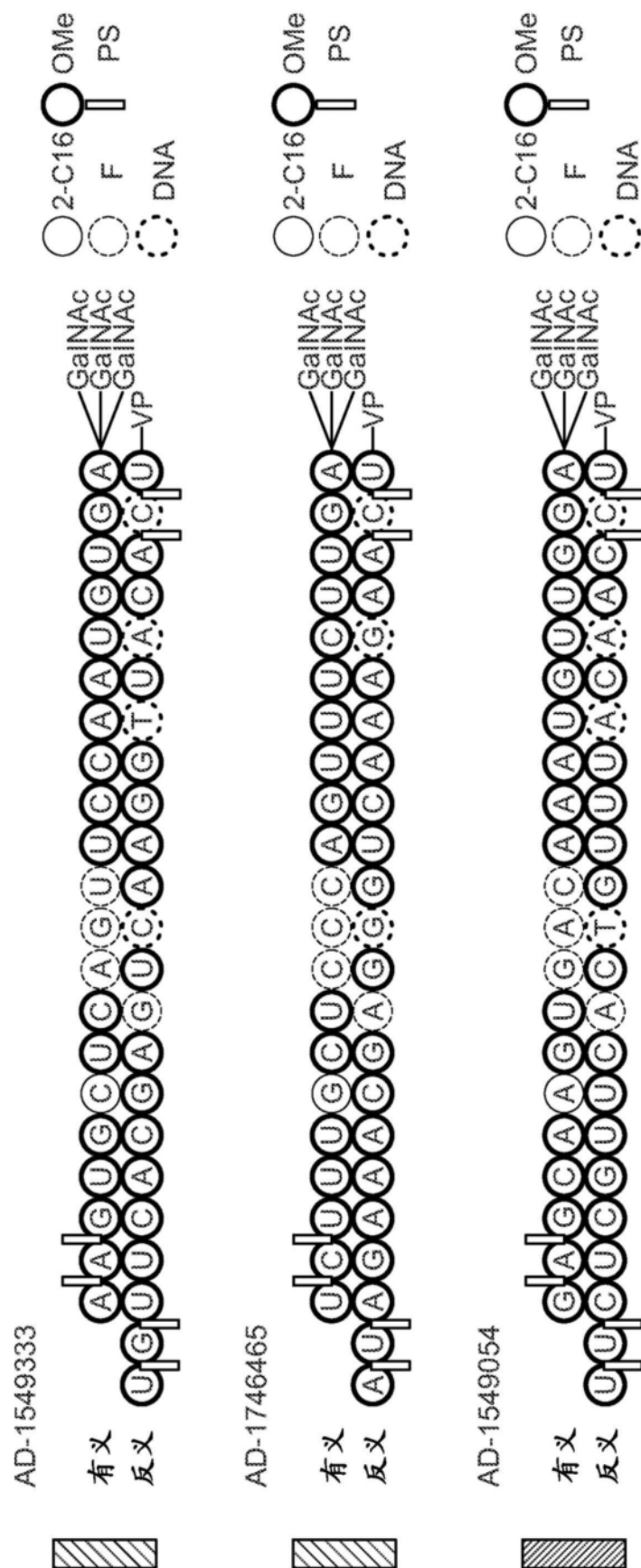


图6C

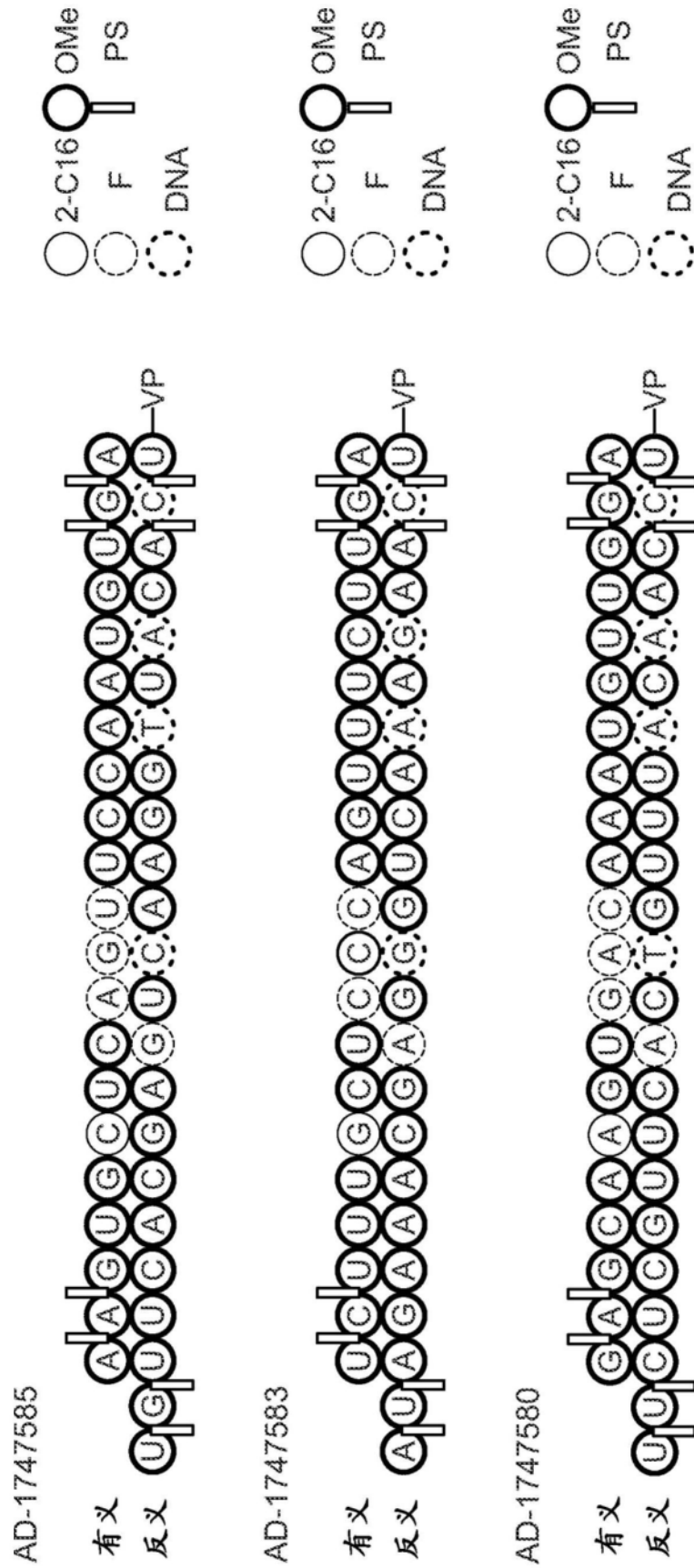


图7

识别符	位置	体内(%信使保留@3mpk)	ED ₈₀ (nM)
AD-1747585	UTR	9.06	0.235
AD-1747583	UTR	13.43	0.405
AD-1747580	CDS	18.62	0.504

图8A

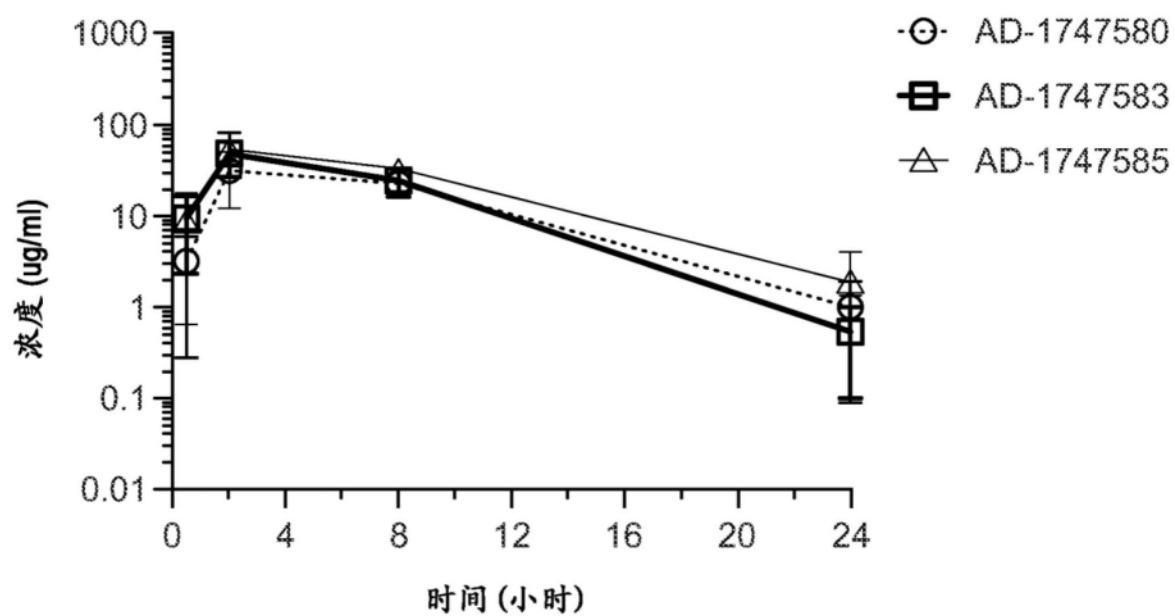


图8B

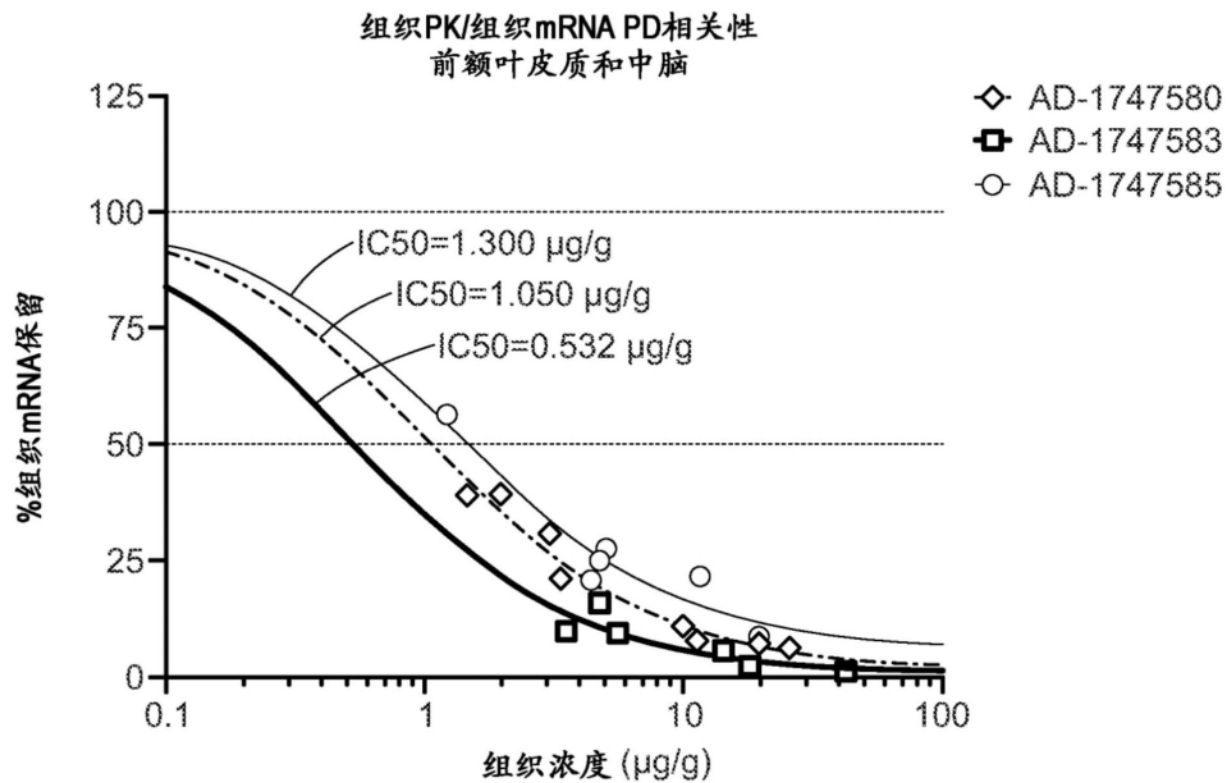
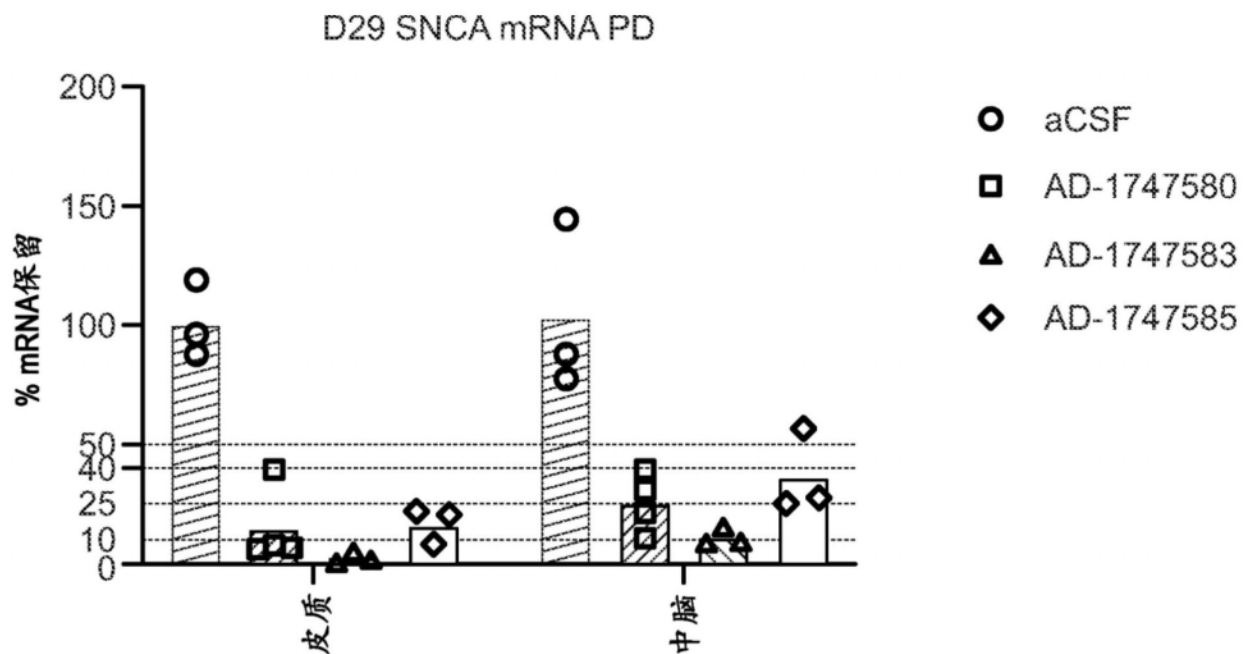


图9A

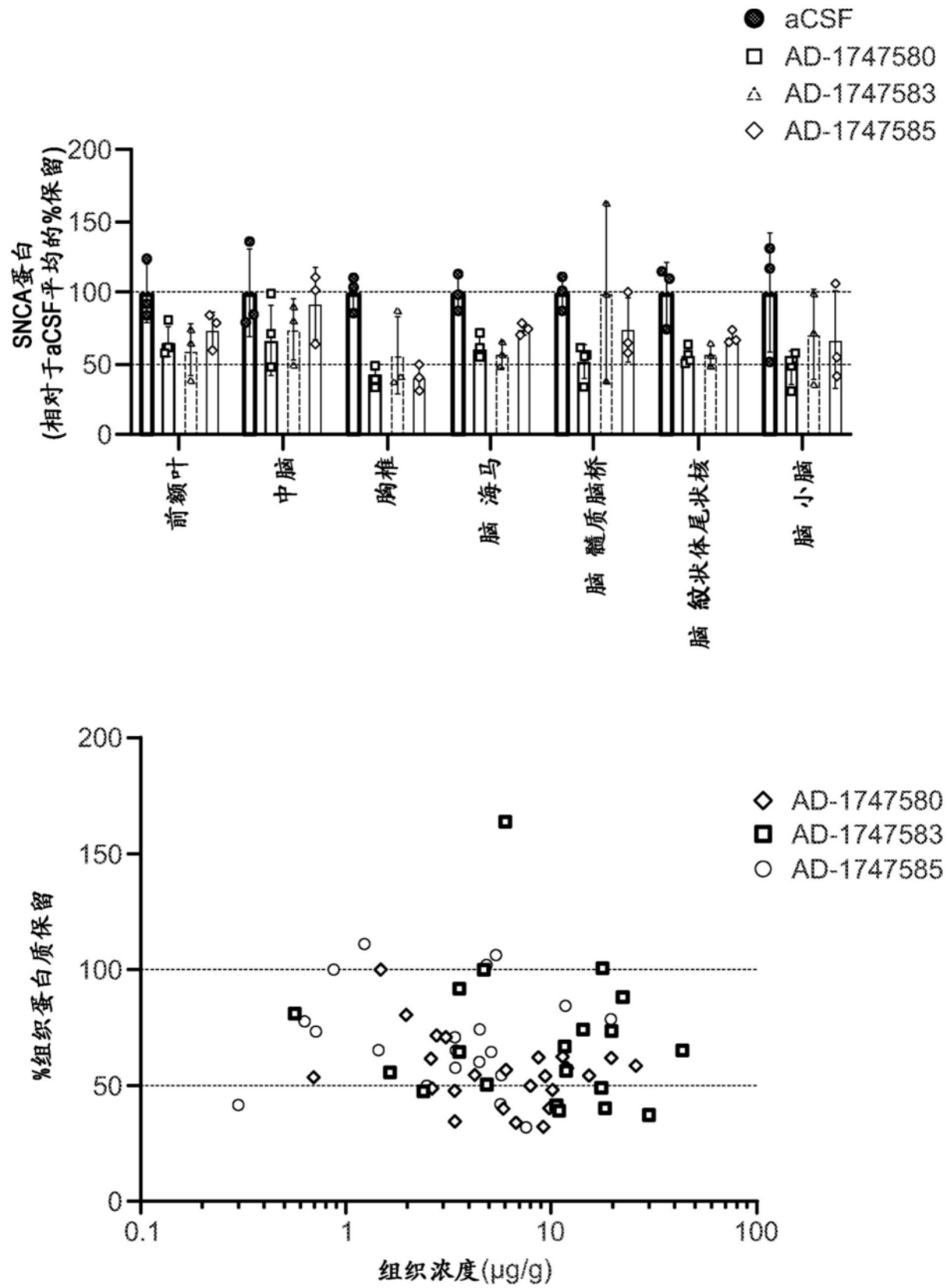
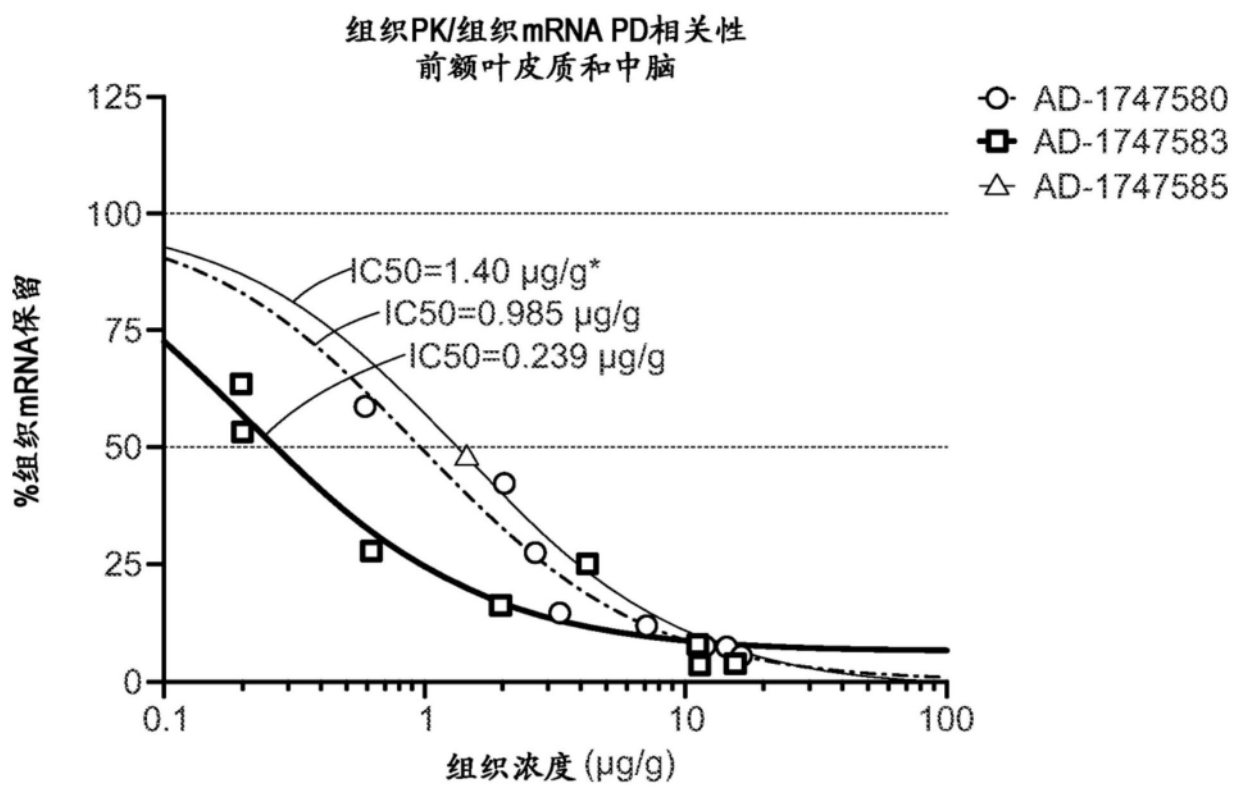
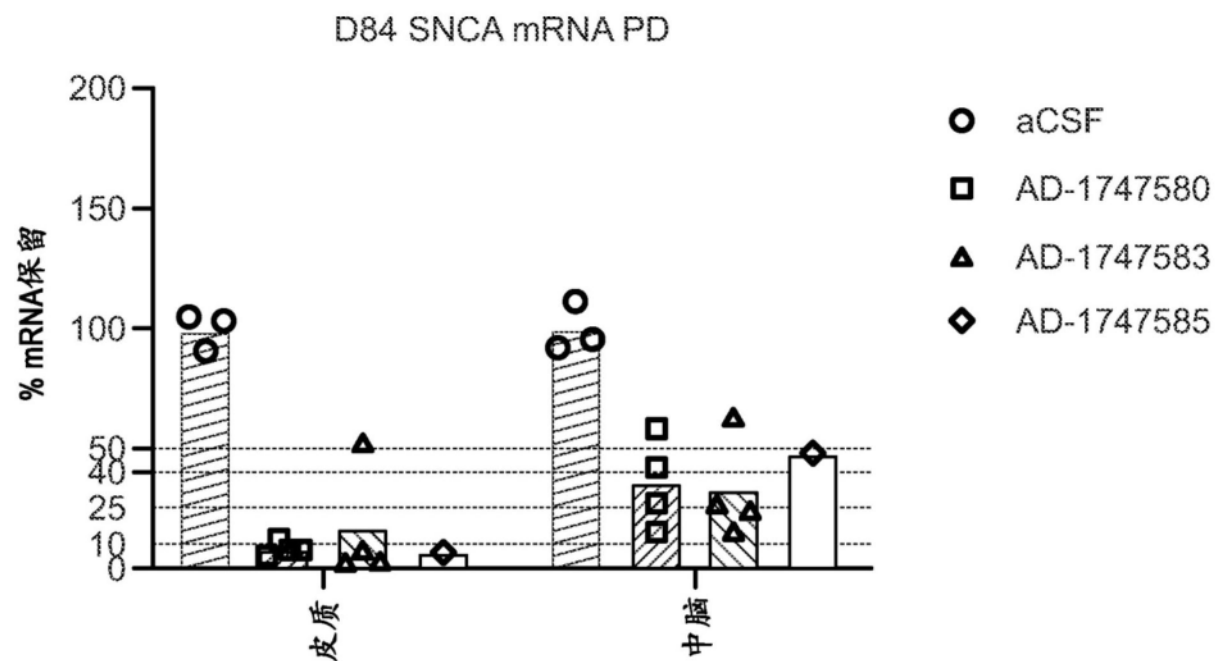


图9B

识别符	位置	皮质平均%NHP mRNA敲低	中脑平均%NHP mRNA敲低	D29平均 %NHP CSP 蛋白敲低	皮质平均%NHP 组织蛋白敲低	中脑平均%NHP 组织蛋白敲低
AD-1747585	UTR	83.1	63.80	N/A	25.73	7.67
AD-1747583	UTR	97.09	88.42	64.72	40.17	25.73
AD-1747580	CDS	84.98	74.57	67.08	34.25	33.3

图10



* 2个数据点

图11

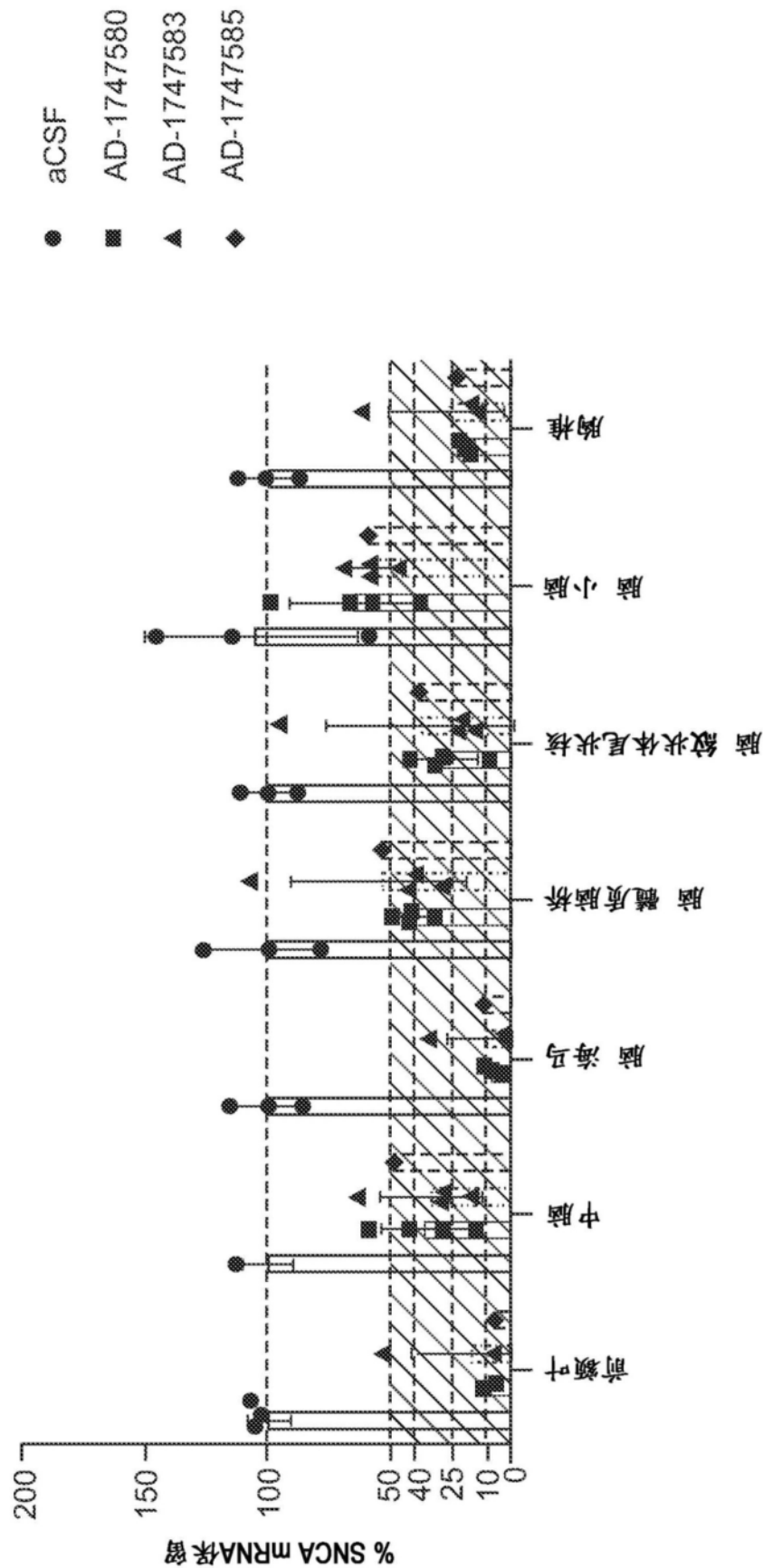


图12A

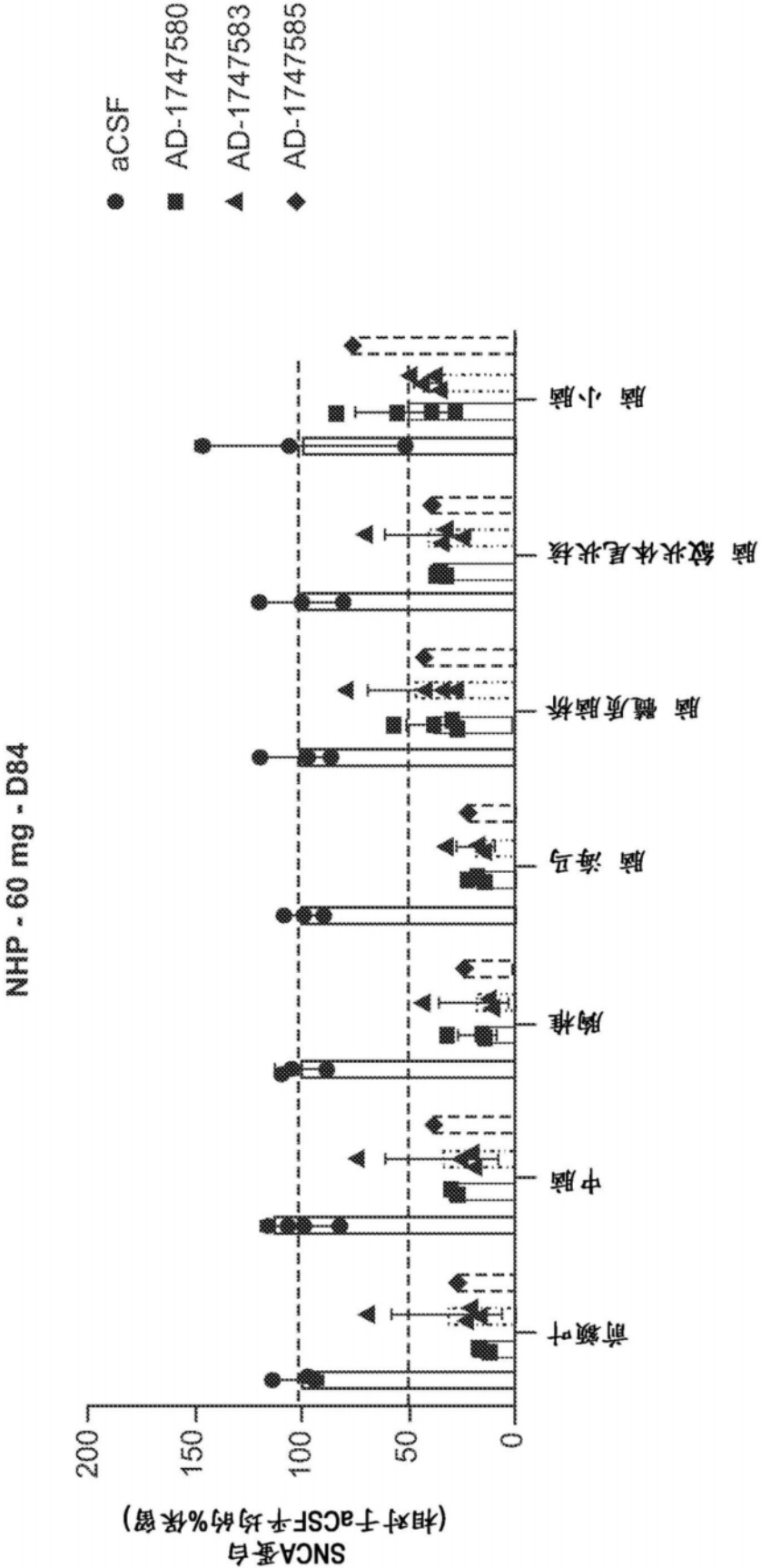


图12B

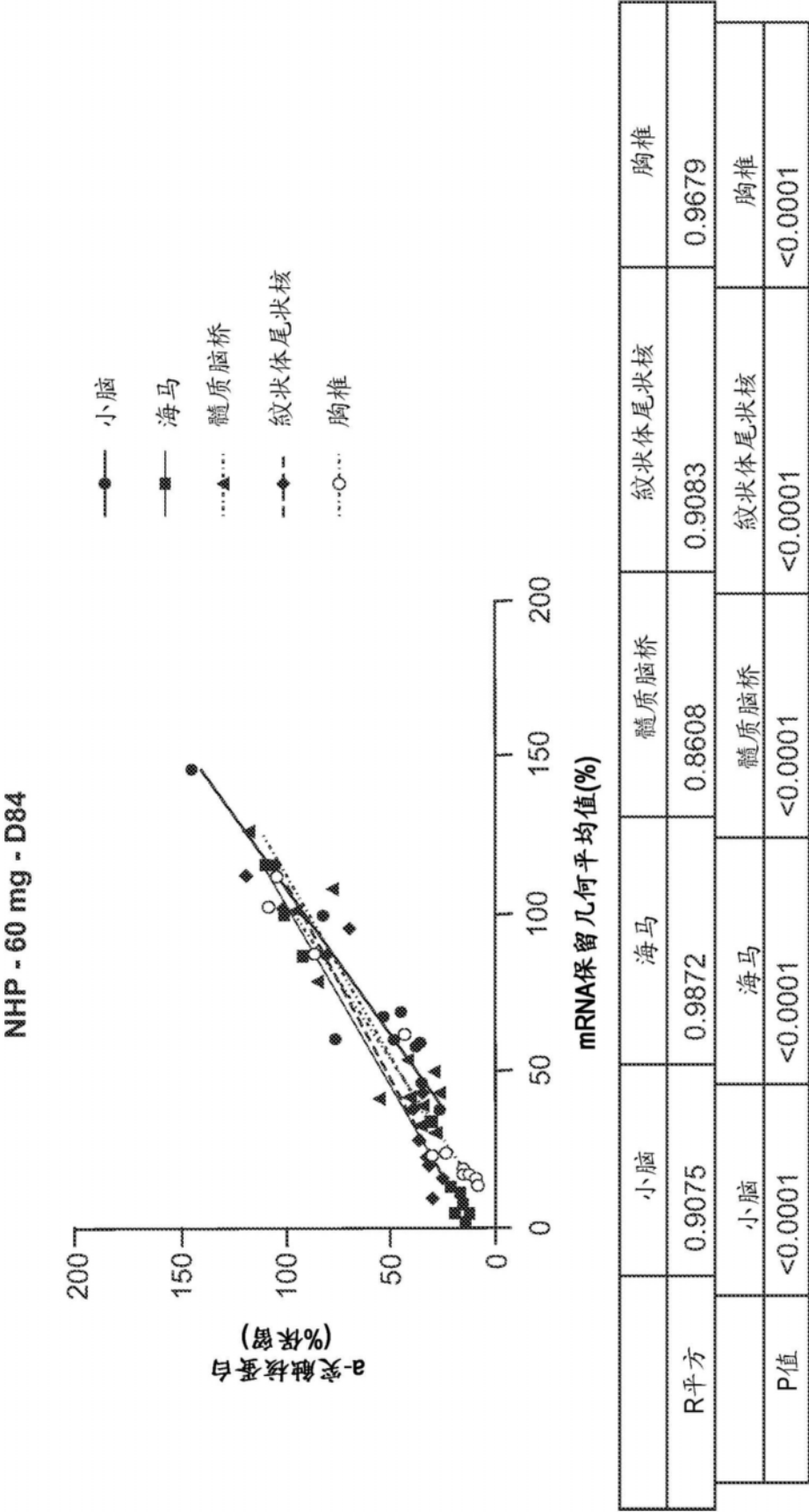


图12C

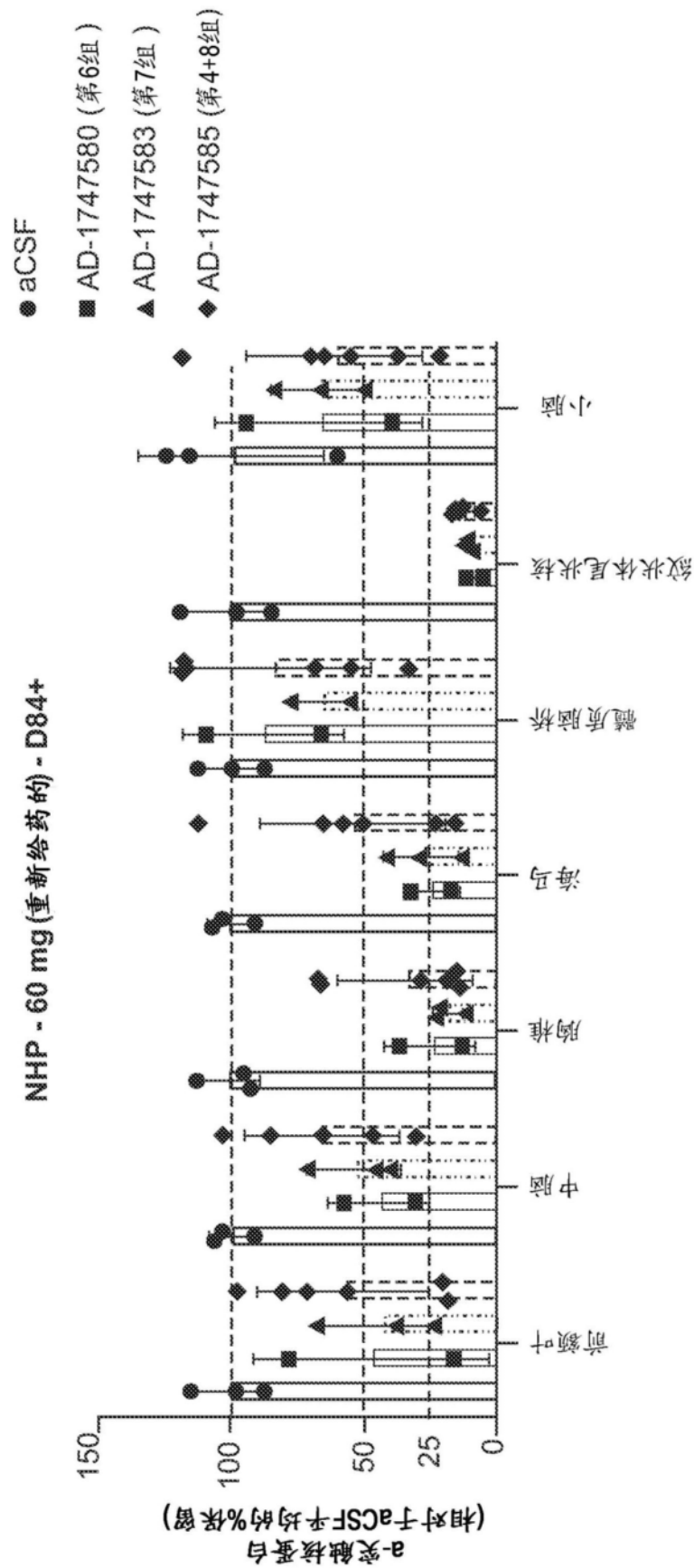


图12D

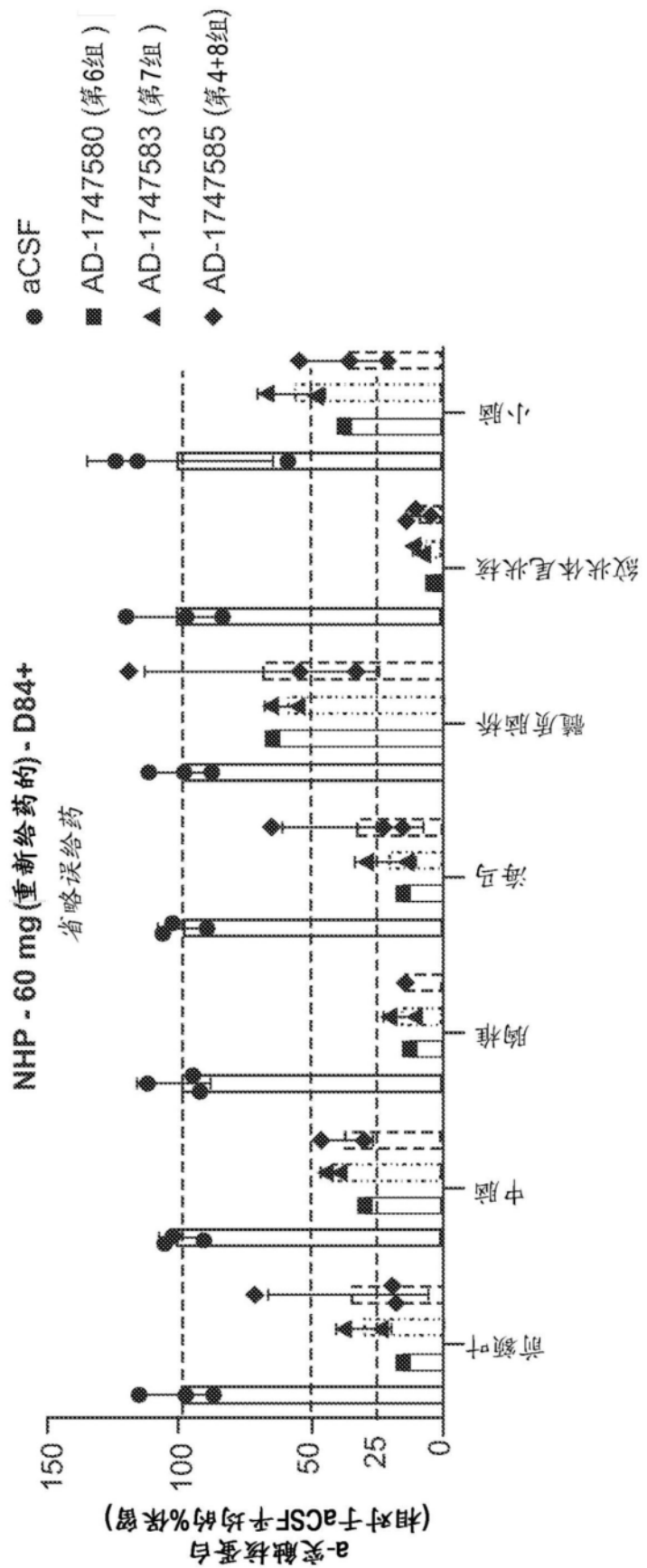


图12D(续)

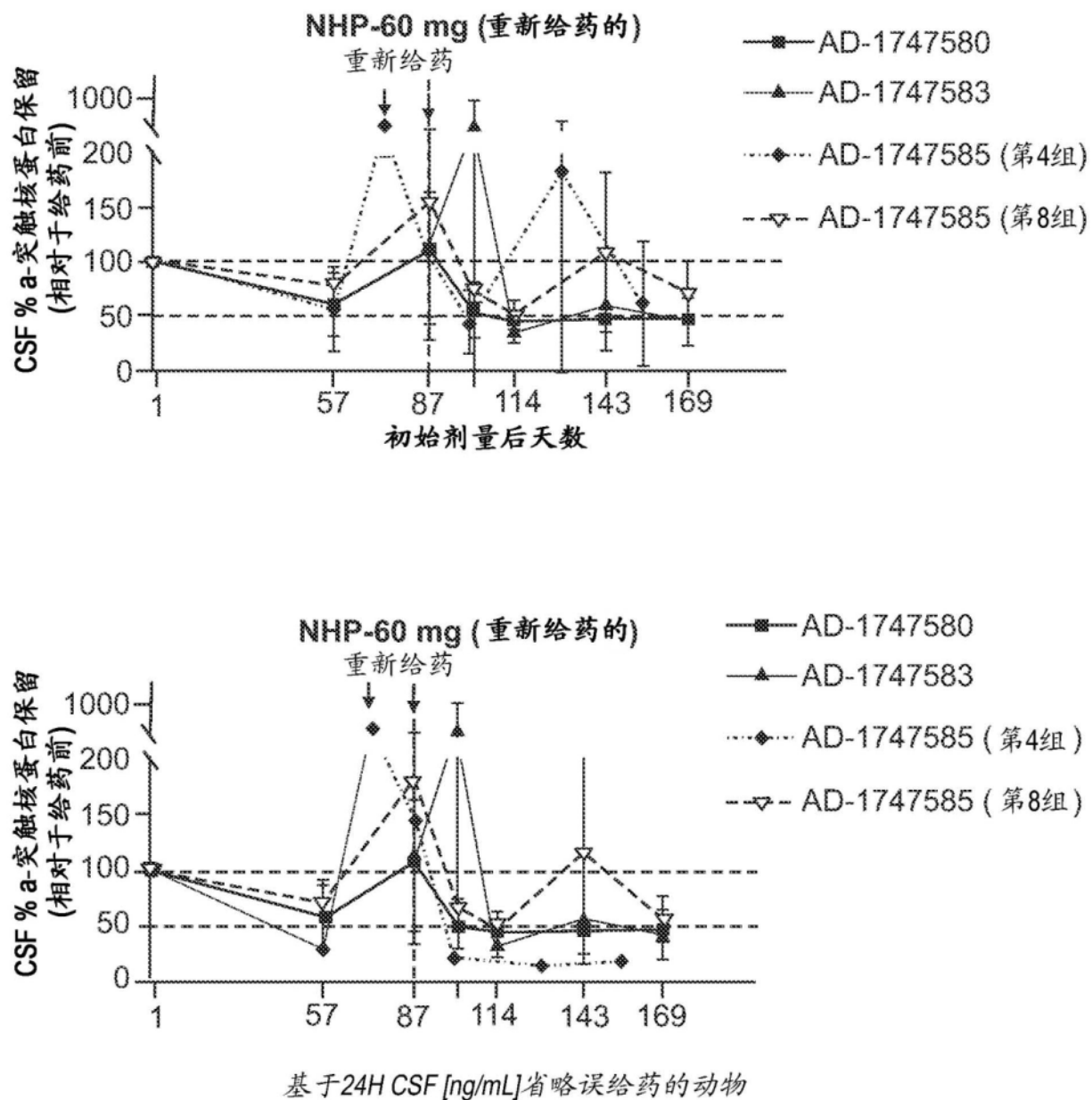


图12E

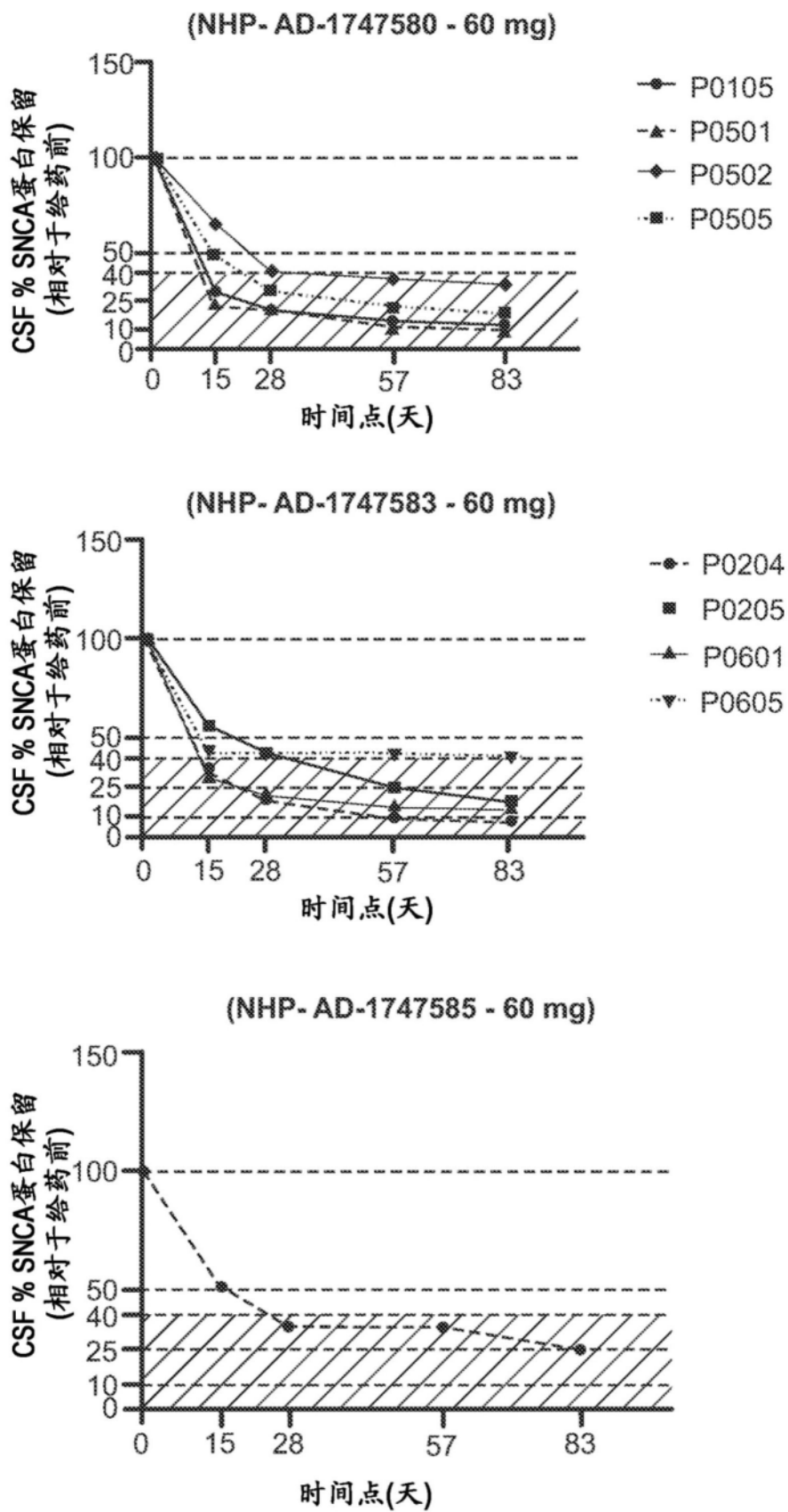


图13

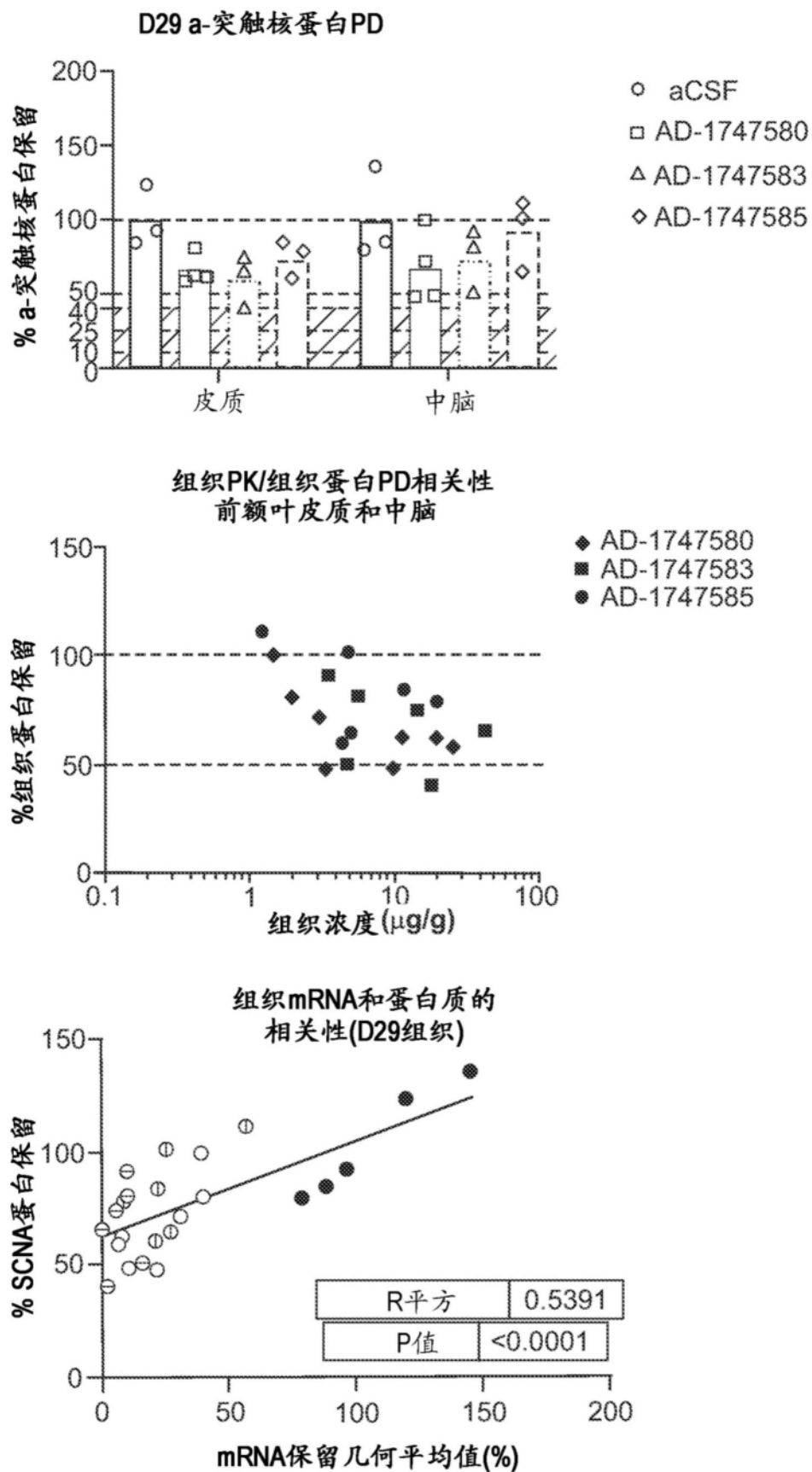


图14A

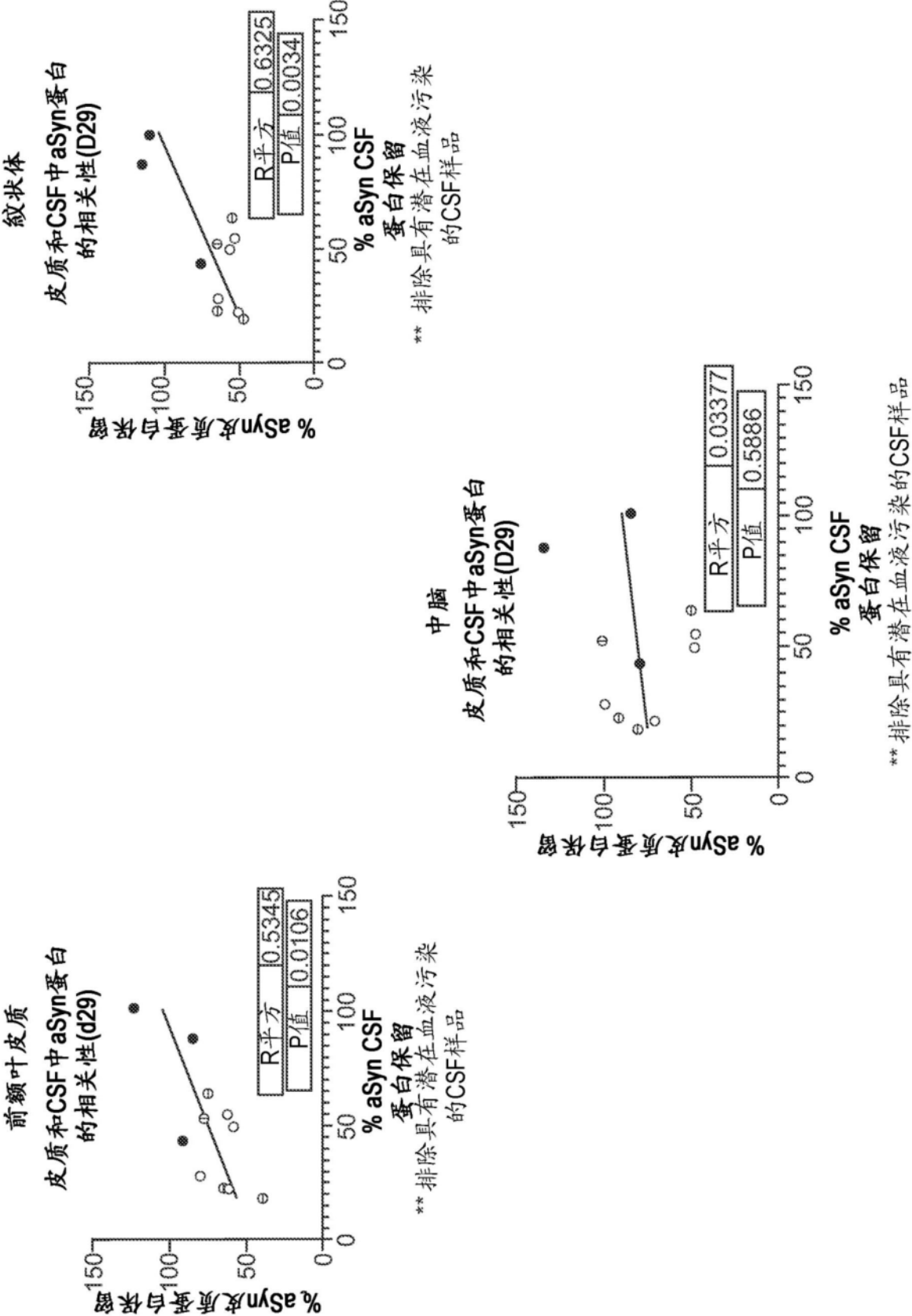


图14B

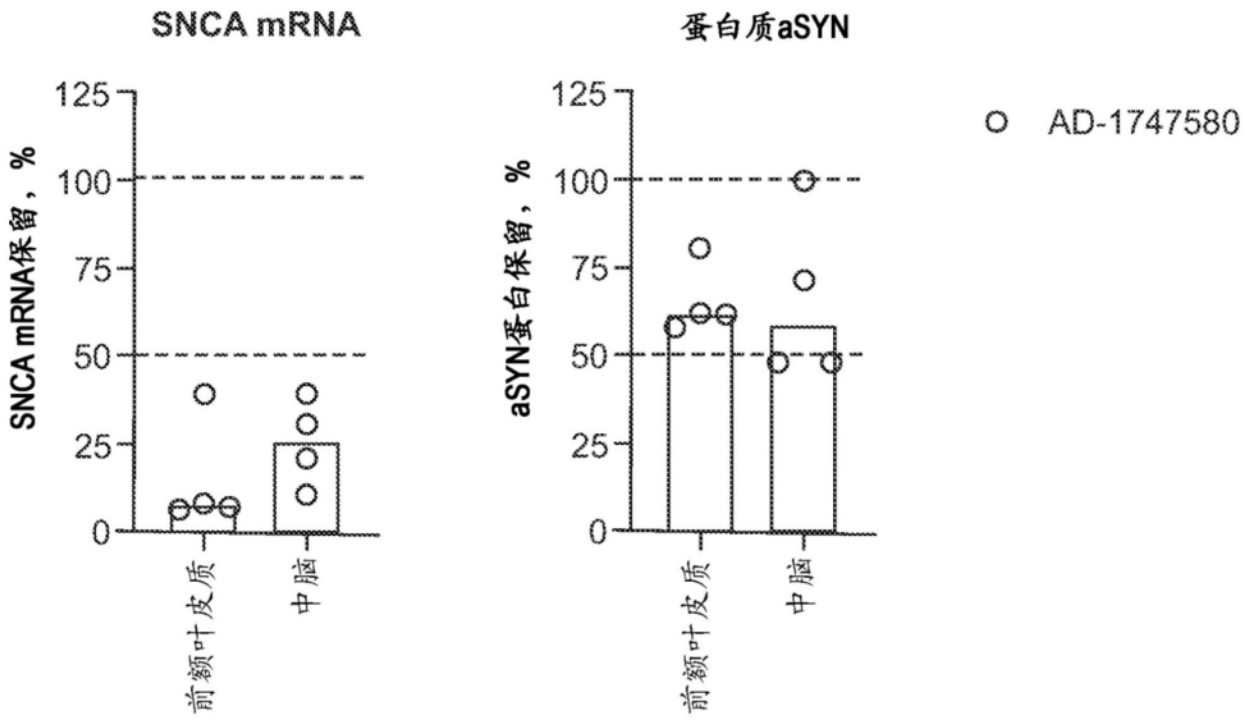


图14C

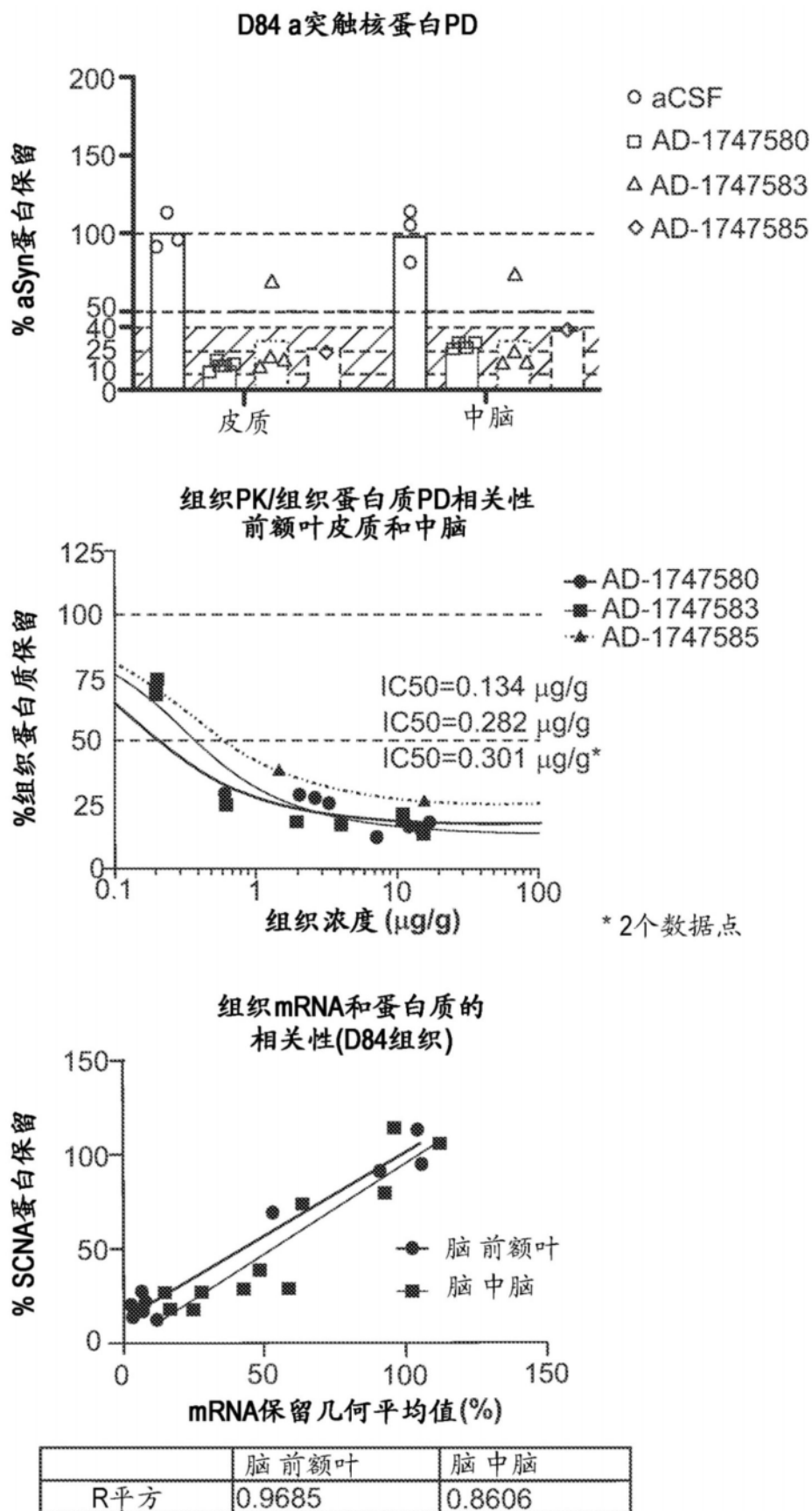


图14D

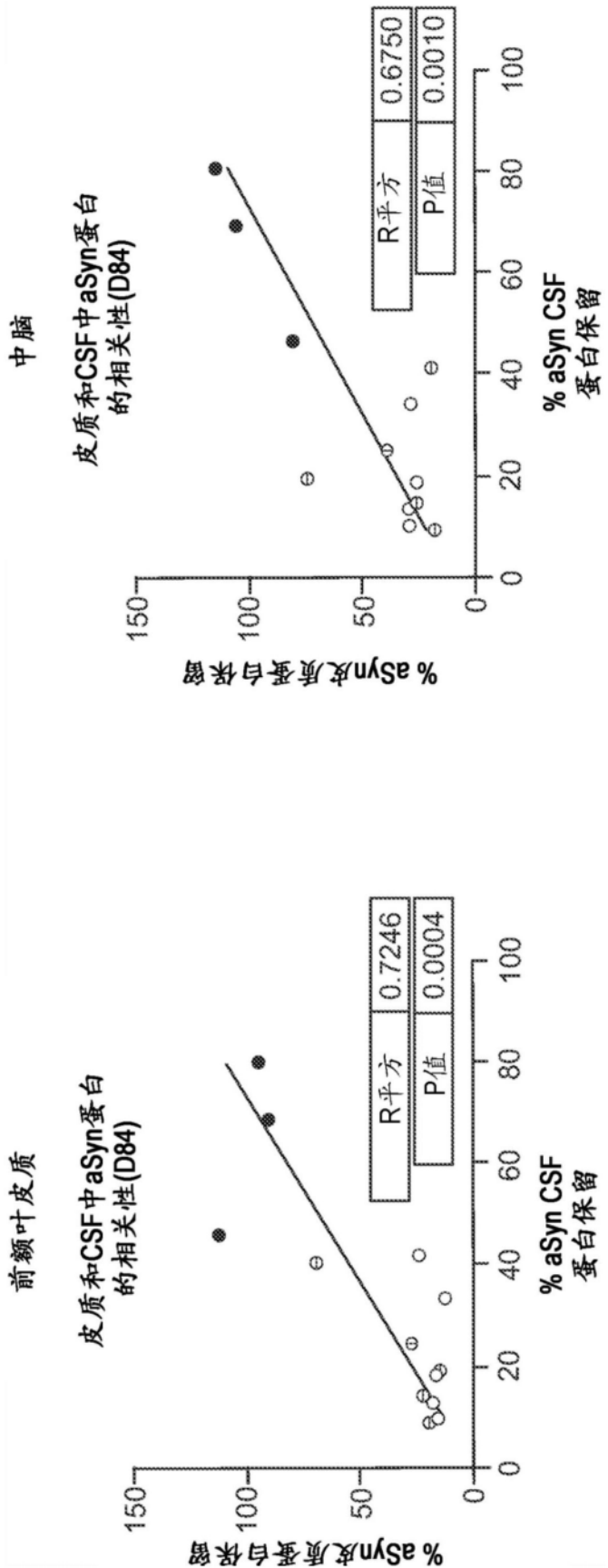


图15

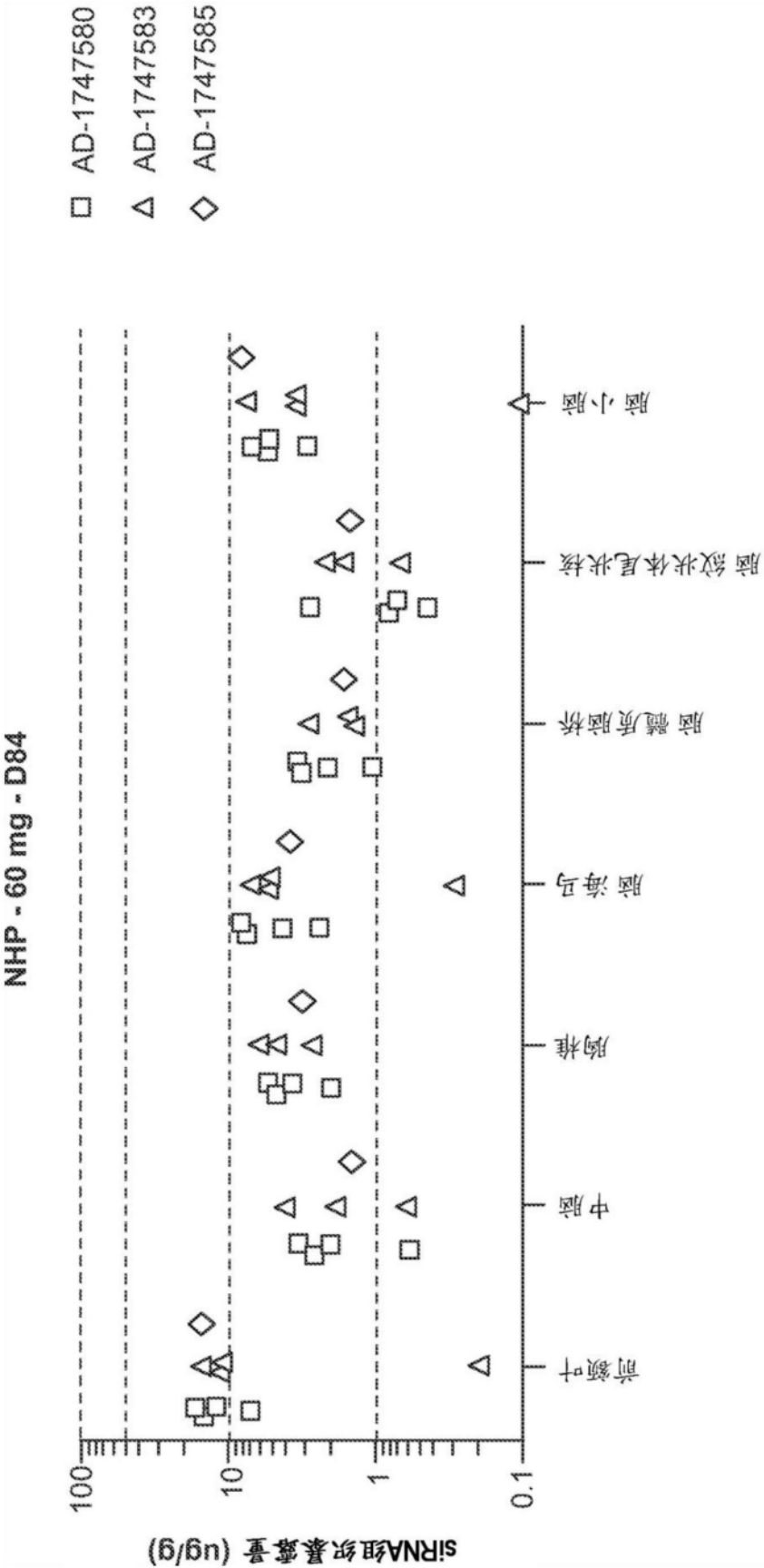


图16

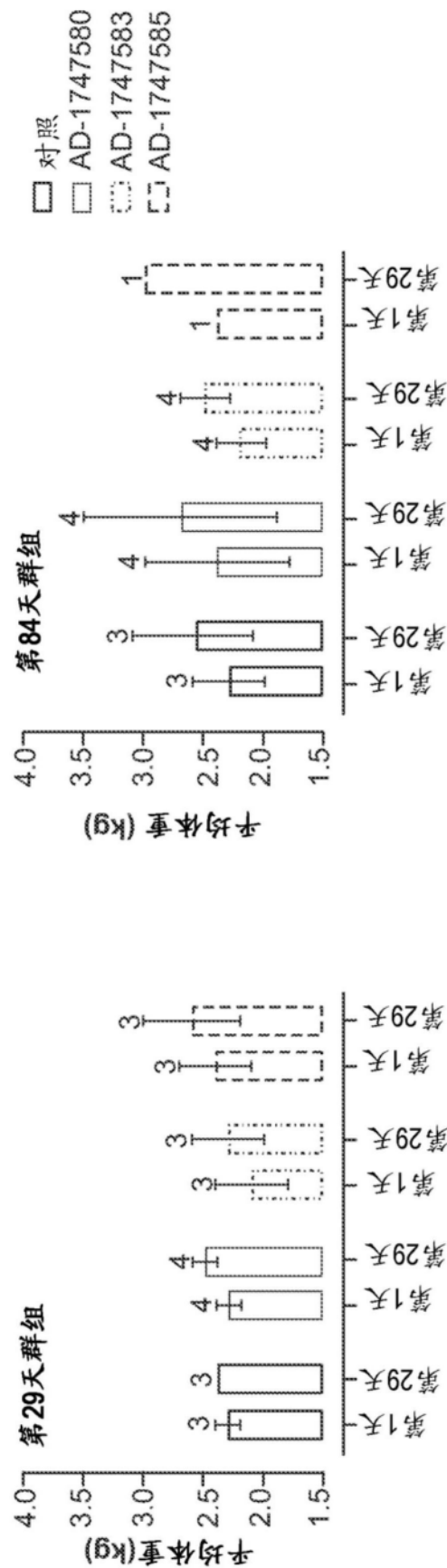


图17

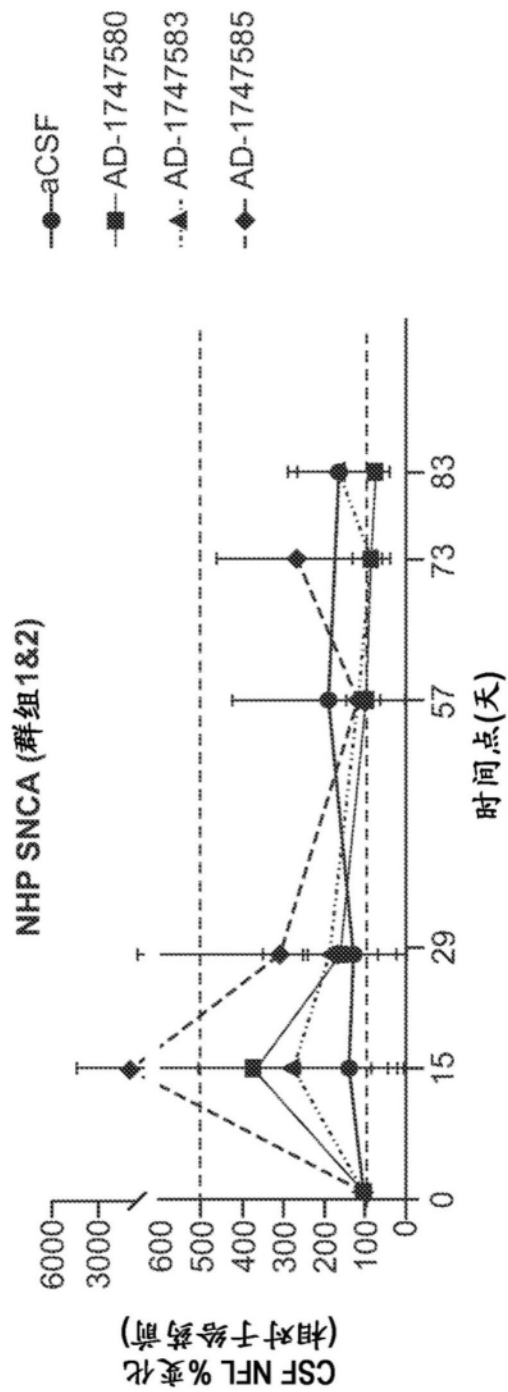


图18

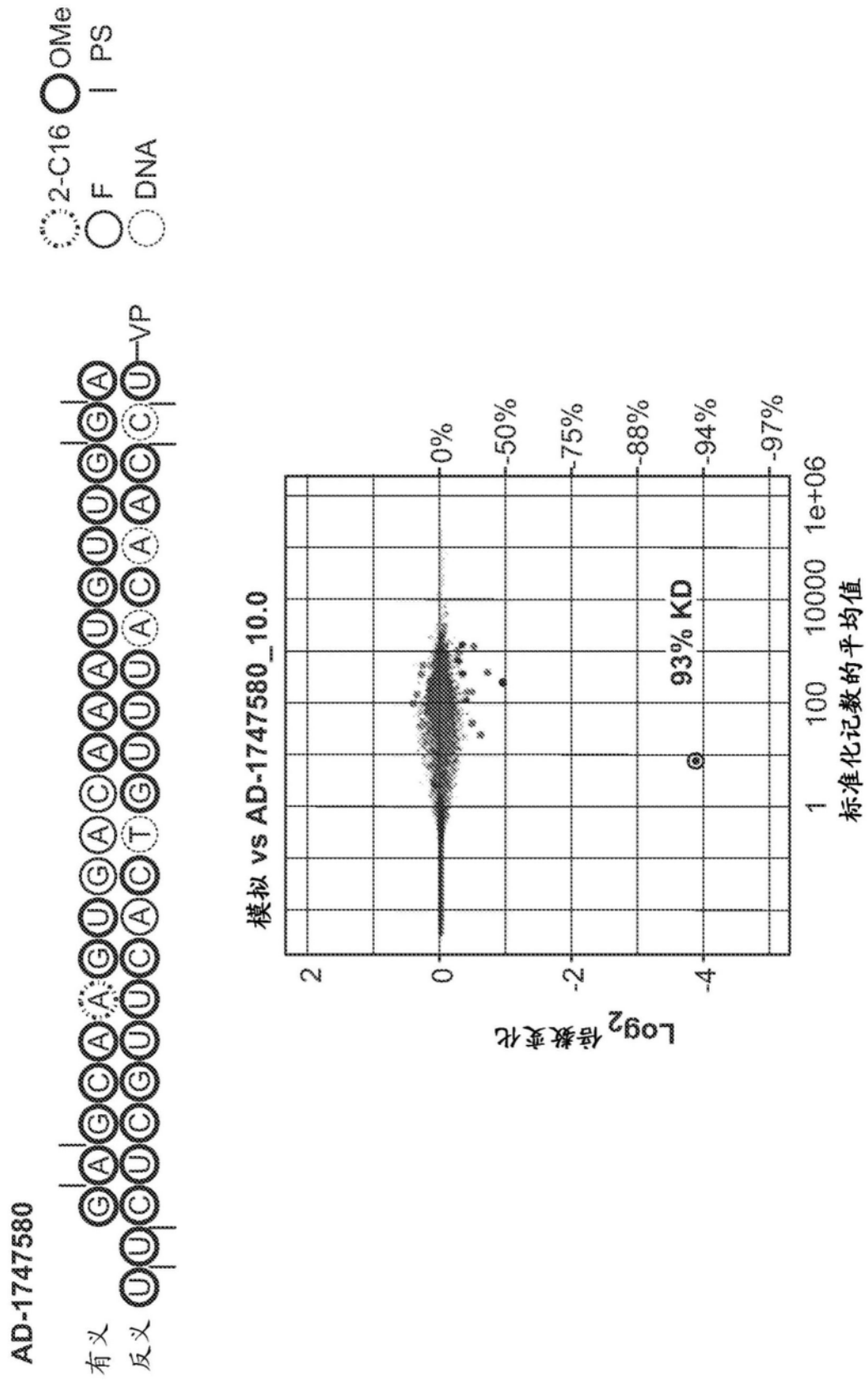


图19A

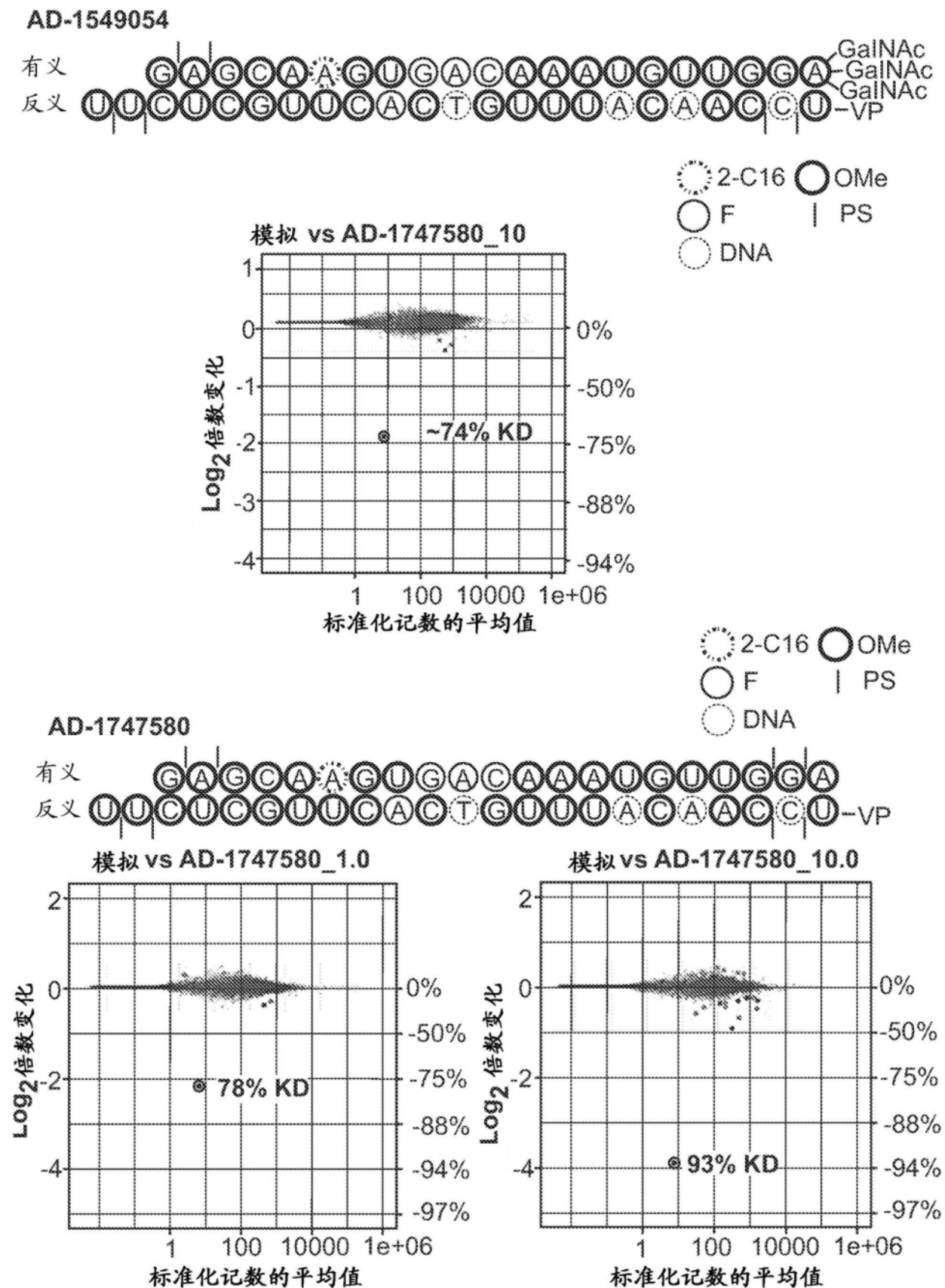


图19B

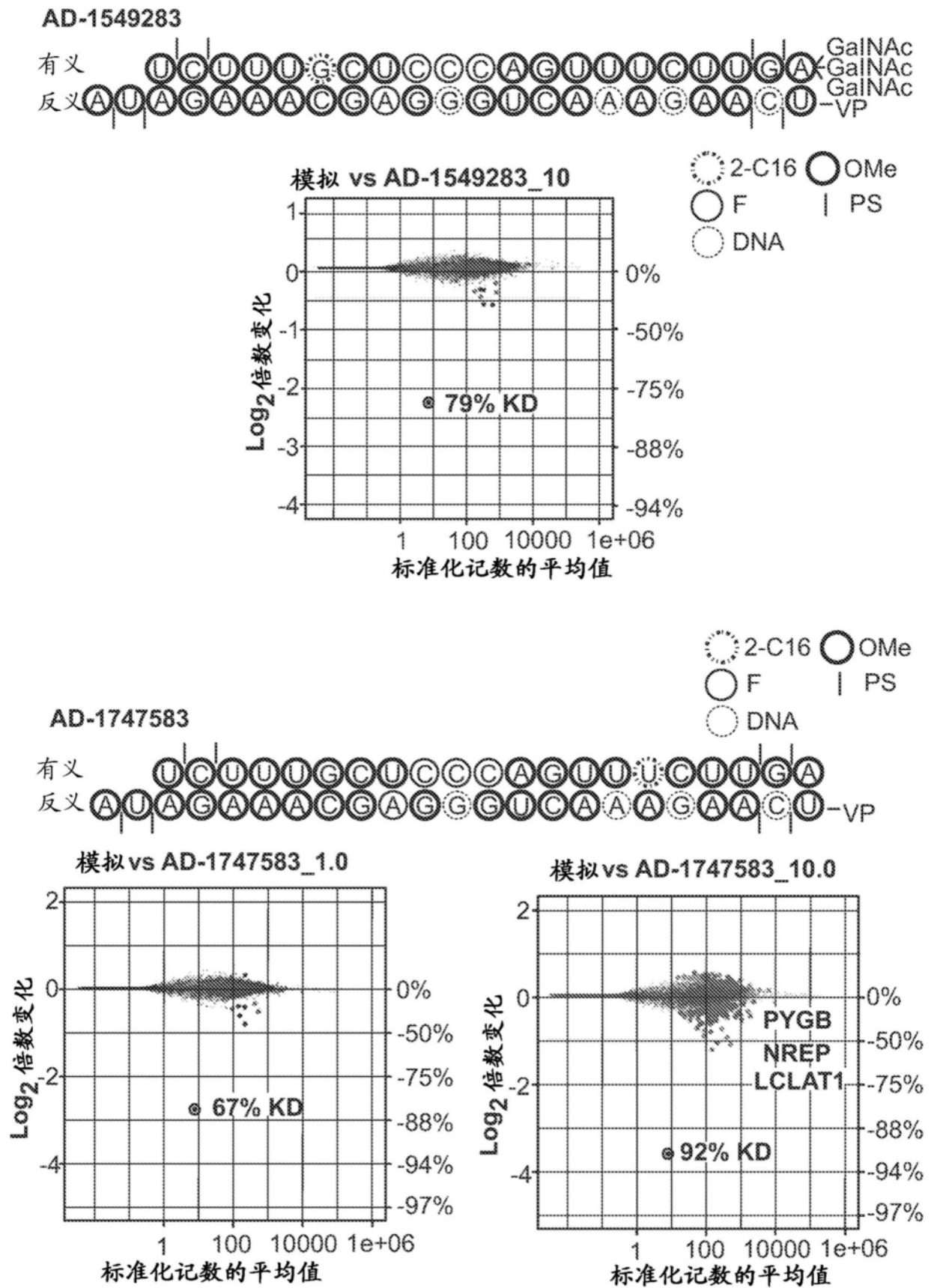


图19C

			mRNA			蛋白质			蛋白质 (重新给药的)		RNAseq	
			皮质 最大 % 敲低 D84	中脑 最大 % 敲低 D84	CSF 最大 %KD D83/D85	皮质 平均% KD D84	中脑 平均% KD D84	皮质 平均% KD" D85	中脑 平均 %KD" D85			失调的 基因 >50%
识别符												
AD-1747585	UTR	UTR	93.1	51.5	75.5	72.7	61.3	64.0	62.0			1
AD-1747583	UTR	UTR	96.6	83.7	91.2	98.5	66.0	70.0	57.3			3
AD-1747580	CDS		94.4	85.4	90.4	84.1	71.9	84.9	69.5			0

图20