



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112805382 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(21) 申请号 201980063972.6

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22) 申请日 2019.08.02

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

62/714,616 2018.08.03 US

C12N 15/113 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/044924 2019.08.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/028816 EN 2020.02.06

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 B·埃尔默 B·理查兹

M·拉塔·马希欧 M·G·奥比努

权利要求书6页 说明书44页

V·陶平 V·布兰查德

序列表17页 附图9页

(54) 发明名称

针对 $\alpha$ -突触核蛋白的变体RNAi

(57) 摘要

本文提供了治疗神经变性突触核蛋白病的RNAi分子。在一些实施方案中，所述RNAi分子靶向 $\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)的表达。本文还提供了含有所述RNAi的表达构建体、载体(例如，rAAV)、细胞、病毒粒子和药物组合物。本文还提供了与使用所述RNAi例如以治疗神经变性突触核蛋白病相关的方法和试剂盒，所述神经变性突触核蛋白病包括帕金森病、多系统萎缩症和路易体痴呆。

1. 一种RNAi，其包含第一链和第二链，其中
  - a) 所述第一链与所述第二链形成双链体；
  - b) 所述第一链包含指导区，其中所述指导区包含与序列5' - UGCUCUUUGGUUCUUCAGCC-3' (SEQ ID N0:24) 具有至少约90%同一性或与序列5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID N0:8) 具有至少约90%同一性的核酸；并且
  - c) 所述第二链包含非指导区。
2. 根据权利要求1的RNAi，其中所述指导区包含核酸序列5' - UGCUCUUUGGUUCUUCAGCC-3' (SEQ ID N0:24)，而所述非指导区包含序列5' - GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID N0:53)。
3. 根据权利要求1的RNAi，其中所述第一链包含与SEQ ID N0:24具有约90%同一性或与SEQ ID N0:53具有约90%同一性的核酸序列。
4. 根据权利要求1的RNAi，其中所述指导区包含核酸序列5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID N0:8)，而所述非指导区包含序列5' - UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID N0:37)。
5. 根据权利要求1的RNAi，其中所述第二链包含与SEQ ID N0:37具有约90%同一性或与SEQ ID N0:37具有约90%同一性的核酸序列。
6. 根据权利要求1-5中任一项的RNAi，其中所述第一链与所述第二链借助能够形成环结构的RNA接头连接。
7. 根据权利要求6的RNAi，其中所述RNA接头包含4至50个核苷酸。
8. 根据权利要求6或7的RNAi，其中所述环结构包含4至20个核苷酸。
9. 根据权利要求6-8中任一项的RNAi，其中所述RNAi从5' 到3' 包含所述第二链、所述RNA接头和所述第一链。
10. 根据权利要求6-8中任一项的RNAi，其中所述RNAi从5' 到3' 包含所述第一链、所述RNA接头和所述第二链。
11. 根据权利要求10的RNAi，其中所述RNAi包含SEQ ID N0:61或SEQ ID N0:63的核酸序列。
12. 根据权利要求11的RNAi，其中所述RNAi包含与SEQ ID N0:61或SEQ ID N0:63的核苷酸序列约90%相同的核苷酸序列。
13. 根据权利要求1-12中任一项的RNAi，其中所述RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。
14. 根据权利要求1-13中任一项的RNAi，其中所述RNAi靶向对与神经变性突触核蛋白病相关的多肽进行编码的RNA。
15. 根据权利要求14的RNAi，其中所述多肽是α-突触核蛋白 (SNCA)。
16. 根据权利要求15的RNAi，其中所述α突触核蛋白是人α-突触核蛋白。
17. 根据权利要求14-16中任一项的RNAi，其中所述神经变性突触核蛋白病是帕金森病 (PD)、多系统萎缩症 (MSA)、或路易体痴呆 (DLB)。
18. 一种表达构建体，其包含编码权利要求1至17中任一项的RNAi的核酸。
19. 根据权利要求18的表达构建体，其中编码所述RNAi的核酸包含miRNA支架。
20. 根据权利要求18或19的表达构建体，其中编码所述RNAi的核酸可操作地连接至启

动子。

21. 根据权利要求20的表达构建体,其中所述启动子选自巨细胞病毒(CMV)即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子;巨细胞病毒增强子/鸡β-肌动蛋白/兔β-球蛋白启动子(CAG)启动子、延长因子1-α启动子(EF1-α)启动子、人β-葡糖醛酸酶启动子、鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子、逆转录劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子、二氢叶酸还原酶启动子和13-肌动蛋白启动子。

22. 根据权利要求18-21中任一项的表达构建体,其中所述表达构建体还包含内含子。

23. 根据权利要求22的表达构建体,其中所述内含子是CBA内含子或hEF1α内含子。

24. 根据权利要求22的表达构建体,其中所述内含子是嵌合内含子。

25. 根据权利要求22的表达构建体,其中所述表达载体是自身互补的载体,且所述内含子是8嵌合内含子。

26. 根据权利要求18-25中任一项的表达构建体,其中所述表达构建体还包含多腺苷酸化信号。

27. 根据权利要求26的表达构建体,其中所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号、SV40多腺苷酸化信号或HSV TK多腺苷酸化信号。

28. 一种载体,其包含根据权利要求18-27中任一项的表达构建体。

29. 根据权利要求28的载体,其中所述载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。

30. 根据权利要求29的rAAV载体,其中所述表达构建体侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。

31. 根据权利要求30的rAAV载体,其中所述表达构建体的侧翼是两个AAVITR。

32. 根据权利要求30或31的rAAV载体,其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

33. 根据权利要求30-32中任一项的rAAV载体,其中所述AAV ITR是AAV2 ITR。

34. 根据权利要求30-33中任一项的rAAV载体,其中所述载体还包含填充核酸。

35. 根据权利要求34的rAAV载体,其中所述填充核酸位于编码所述RNAi的核酸的上游或下游。

36. 根据权利要求30-35中任一项的rAAV载体,其中所述载体是自身互补的rAAV载体。

37. 根据权利要求36的rAAV载体,其中所述载体包含编码所述RNAi的第一核酸序列和编码所述RNAi的互补体的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。

38. 根据权利要求37的rAAV载体,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITR连接,其中所述突变的AAV ITR包含D区的缺失并且包含末端解析序列的突变。

39. 一种细胞,其包含根据权利要求29-38中任一项的rAAV载体。

40. 一种重组AAV粒子,其包含根据权利要求29-38中任一项的rAAV载体。

41. 根据权利要求40的rAAV粒子,其中所述AAV病毒粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、

AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBK0、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

42. 根据权利要求40或41的rAAV粒子，其中所述ITR和rAAV病毒粒子的衣壳源自相同的AAV血清型。

43. 根据权利要求40或41的rAAV粒子，其中所述ITR和rAAV病毒粒子的衣壳源自不同的AAV血清型。

44. 根据权利要求43的rAAV粒子，其中所述ITR源自AAV2，而所述rAAV粒子的衣壳源自AAV1。

45. 一种组合物，其包含根据权利要求40-44中任一项的rAAV粒子。

46. 根据权利要求45的组合物，其中所述组合物还包含药学上可接受的载体。

47. 一种试剂盒，其包含根据权利要求1-17中任一项的RNAi。

48. 一种试剂盒，其包含根据权利要求40-44中任一项的AAV粒子。

49. 一种试剂盒，其包含根据权利要求45或46的组合物。

50. 根据权利要求47-49中任一项的试剂盒，其还包含使用说明书。

51. 一种治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法，其包括向所述哺乳动物给予RNAi，所述RNAi包含：含有与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链或含有与序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链，以及含有第二核酸的第二链。

52. 根据权利要求51的方法，其中所述第二核酸包含与序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的核酸或与序列5' -E1过客-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的核酸。

53. 一种治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法，其包括向所述哺乳动物给予RNAi，所述RNAi包含：含有与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链，或含有与序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链。

54. 一种抑制患有神经变性疾病的哺乳动物中的 $\alpha$ -突触核蛋白表达的方法，其包括向所述哺乳动物给予RNAi，所述RNAi包含：含有与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链或含有与序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的核酸的第一链，以及含有第二核酸的第二链。

55. 根据权利要求54的方法，其中所述第二核酸包含与序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的核酸或与序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的核酸。

56. 一种抑制患有神经变性疾病的哺乳动物中的 $\alpha$ -突触核蛋白表达的方法，其包括向所述哺乳动物给予RNAi，所述RNAi包含：含有与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ

ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链,或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链。

57. 根据权利要求51-56中任一项的方法,其中所述第一链包含具有SEQ ID NO:24序列的核酸序列或具有SEQ ID NO:8序列的核酸。

58. 根据权利要求52、53、55、或56中任一项的方法,其中所述第二链包含具有SEQ ID NO:53序列的核酸或具有SEQ ID NO:37序列的核酸。

59. 根据权利要求51-58中任一项的方法,其中所述第一链与所述第二链借助能够形成环结构的RNA接头连接。

60. 根据权利要求59的方法,其中所述RNA接头包含4至50个核苷酸。

61. 根据权利要求59或60的方法,其中所述环结构包含4至20个核苷酸。

62. 根据权利要求59-61中任一项的方法,其中所述RNAi从5'到3'包含所述第二链、所述RNA接头和所述第一链。

63. 根据权利要求59-61中任一项的方法,其中所述RNAi从5'到3'包含所述第一链、所述RNA接头和所述第二链。

64. 根据权利要求63的方法,其中所述RNAi包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核酸序列。

65. 根据权利要求64的方法,其中所述RNAi包含与SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核苷酸序列约90%相同的核苷酸序列。

66. 根据权利要求51-65中任一项的方法,其中所述RNAi被编码于表达构建体上。

67. 根据权利要求51-66中任一项的方法,其中编码所述RNAi的核酸包含miRNA支架。

68. 根据权利要求51-67中任一项的方法,其中编码所述RNAi的核酸可操作地连接至启动子。

69. 根据权利要求68的方法,其中所述启动子能够在哺乳动物的脑中表达所述RNAi。

70. 根据权利要求69的方法,其中所述启动子选自巨细胞病毒(CMV)即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子;巨细胞病毒增强子/鸡β-肌动蛋白/兔β-球蛋白(CAG)启动子、延长因子1-α启动子(EF1-α)启动子和人β-葡糖醛酸酶启动子。

71. 根据权利要求68-70中任一项的方法,其中所述启动子是包含CMV增强子和鸡β-肌动蛋白启动子的杂合鸡β-肌动蛋白启动子(CBA)。

72. 根据权利要求66-71中任一项的方法,其中所述表达构建体还包含内含子。

73. 根据权利要求72的方法,其中所述内含子是CBA内含子。

74. 根据权利要求72的方法,其中所述内含子是嵌合内含子。

75. 根据权利要求74的方法,其中所述表达构建体是自身互补的载体,且所述内含子是δ嵌合内含子。

76. 根据权利要求66-75中任一项的方法,其中所述核酸还包含多腺苷酸化信号。
77. 根据权利要求76的方法,其中所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号。
78. 根据权利要求66-77中任一项的方法,其中所述表达构建体由载体编码。
79. 根据权利要求78的方法,其中所述载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。
80. 根据权利要求79的方法,其中所述表达构建体侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITS)序列。
81. 根据权利要求80的方法,其中所述表达构建体的侧翼是两个AAV ITS。
82. 根据权利要求80或81的方法,其中所述AAV ITS是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITS。
83. 根据权利要求80-82中任一项的方法,其中所述AAV ITS是AAV2 ITS。
84. 根据权利要求83的方法,其中所述rAAV载体从5'到3'包含AAV2 ITS、启动子、内含子、编码所述RNAi的核酸、多腺苷酸化信号和AAV2 ITS。
85. 根据权利要求84的方法,其中所述启动子是CBA启动子。
86. 根据权利要求84的方法,其中所述内含子是嵌合内含子、δ嵌合内含子或简短嵌合内含子嵌合体。
87. 根据权利要求86的方法,其中所述嵌合内含子是CBA+兔β球蛋白内含子。
88. 根据权利要求84-87中任一项的方法,其中所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号。
89. 根据权利要求83的方法,其中所述rAAV载体从5'到3'包含AAV2 ITS、CBA启动子、嵌合内含子、编码所述RNAi的核酸、牛生长激素多腺苷酸化信号和AAV2 ITS。
90. 根据权利要求89的方法,其中所述载体还包含填充核酸。
91. 根据权利要求90的方法,其中所述填充核酸包含人A1AT基因的内含子1。
92. 根据权利要求79-91中任一项的方法,其中所述载体是自身互补的载体。
93. 根据权利要求92的方法,其中所述载体包含编码所述RNAi的第一核酸序列和编码所述RNAi的互补体的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。
94. 根据权利要求93的方法,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变的AAV ITS连接,其中所述突变的AAV ITS包含D区的缺失并且包含末端解析序列的突变。
95. 根据权利要求79-94中任一项的方法,其中所述载体被包衣壳于rAAV粒子中。
96. 根据权利要求95的方法,其中所述AAV病毒粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV2 V708K、AAV2-HBK0、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV、小鼠AAV、或rAAV2/HBoV1血清型衣壳。
97. 根据权利要求95或96的方法,其中所述ITS和rAAV病毒粒子的衣壳源自相同的AAV血清型。
98. 根据权利要求95或96的方法,其中所述ITS和rAAV病毒粒子的衣壳源自不同的AAV血清型。

99. 根据权利要求95-98中任一项的方法,其中所述rAAV病毒粒子包含AAV2衣壳。
100. 根据权利要求99的方法,其中所述rAAV病毒粒子包含AAV1衣壳,且其中所述载体包含AAV2 ITR。
101. 根据权利要求51-100中任一项的方法,其中根据权利要求95-100中任一项的rAAV粒子是在组合物中。
102. 根据权利要求101的方法,其中所述组合物还包含药学上可接受的载体。

## 针对 $\alpha$ -突触核蛋白的变体RNAi

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年8月3日提交的美国临时申请号62/714,616的优先权权益,将其通过引用以其全文特此并入。

[0003] ASCII文本文件序列表的提交

[0004] 将以下提交的ASCII文本文件的内容通过引用以其全文并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:159792016540SEQLIST.TXT,记录日期:2019年7月31日,大小:19KB)。

### 技术领域

[0005] 本公开文本涉及变体RNAi分子。在一些方面,本公开文本涉及针对 $\alpha$ -突触核蛋白的变体RNAi。

### 背景技术

[0006] 长期神经保护疗法对于治疗神经变性突触核蛋白病如帕金森病或多系统萎缩症 (MSA) 具有相当大的意义。RNA干扰 (RNAi) 是通过引入与靶标互补的RNA (siRNA) 来减少靶 mRNA 的机制。还可以将所述 siRNA 序列插入人工 miRNA 支架 (“shmiRNA”) 中, 这允许基于聚合酶 II 的组成型表达, 同时还消除与脑中 siRNA 或 shRNA 的引入相关的神经毒性 (1)。

[0007] 临床开发 RNAi 的阻碍是脱靶沉默的可能性, 其中 RNAi 的种子区 (通常是核苷酸 1-7 或 1'-8) 与 3' 非翻译区 (UTR) 中非靶 mRNA 中的序列配对, 导致转录物不稳定。减少脱靶沉默的尝试包括使用算法鉴定具有针对靶 mRNA 的高特异性且具有最小脱靶可能的候选种子序列 (Boudreau RL 等人, (2012) Nucl. Acids Res. 41 (1) :e9), 以及将内部凸起放置在 RNAi 的指导区域中 (Terasawa 等人, (2011) Journal of nucleic acids 2011:131579)。

[0008] 多个证据证实,  $\alpha$ -突触核蛋白 (SNCA) 水平的升高具有神经毒性, 而降低具有神经保护作用 (2-9)。因此, 降低 SNCA 水平的治疗策略可能潜在地阻止神经变性疾病的进展并减轻症状。仍然需要利用 RNAi 机制的这种治疗策略。

[0009] 本申请通过提供针对 SNCA 的变体 RNAi 分子以及使用其治疗和预防神经变性疾病的方法满足了这种需要。本申请还提供了筛选或鉴定针对 SNCA 的 RNAi 分子的方法和用于制备这些 RNAi 分子的构建体。

### 发明内容

[0010] 在一些方面, 本发明提供了包含第一链和第二链的 RNAi, 其中 a) 第一链和第二链形成双链体; b) 第一链包含指导区, 其中所述指导区包含与序列 5' - UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC - 3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约 90% 同一性或与序列 5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA - 3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约 90% 同一性的核酸; 以及 c) 第二链包括非指导区。在一些实施方案中, 所述指导区包含核酸序列 5' - UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC - 3' (SEQ ID NO:24), 而所述非指导区包含序列 5' - GGCUGAGAACCAAAGAGUA - 3' (SEQ ID NO:

53)。在一些实施方案中,所述第一链包含与SEQ ID NO:24具有约90%同一性或与SEQ ID NO:53具有约90%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导区包含核酸序列5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA -3' (SEQ ID NO:8),而所述非指导区包含序列5' - UGCUCAGUCAAUGUGCCUA -3' (SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,所述第二链包含与SEQ ID NO:37具有约90%同一性或与SEQ ID NO:37具有约90%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,第一链与第二链借助能够形成环结构的RNA接头连接。在一些实施方案中,所述RNA接头包含4至50个核苷酸。在一些实施方案中,所述环结构包含4至20个核苷酸。在一些实施方案中,所述RNAi从5' 到3' 包含所述第二链、所述RNA接头和所述第一链。在一些实施方案中,所述RNAi从5' 到3' 包含所述第一链、所述RNA接头和所述第二链。在一些实施方案中,所述RNAi包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核酸序列。在一些实施方案中,所述RNAi包含与SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核苷酸序列约90%相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。

[0011] 在上述方面和实施方案的一些实施方案中,所述RNAi靶向对与神经变性突触核蛋白病相关的多肽进行编码的RNA。在一些实施方案中,所述多肽是 $\alpha$ -突触核蛋白 (SNCA)。在一些实施方案中,所述 $\alpha$ 突触核蛋白是人 $\alpha$ -突触核蛋白。在一些实施方案中,所述神经变性突触核蛋白病是帕金森病 (PD)、多系统萎缩症 (MSA)、或路易体痴呆 (DLB)。

[0012] 在以上方面和实施方案的一些实施方案中,本发明提供了包含编码本文所述的RNAi的核酸的表达构建体。在一些实施方案中,编码所述RNAi的核酸包含miRNA支架。在一些实施方案中,编码所述RNAi的核酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,所述启动子选自巨细胞病毒 (CMV) 即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子;巨细胞病毒增强子/鸡 $\beta$ -肌动蛋白/兔 $\beta$ -球蛋白启动子 (CAG) 启动子、延长因子1- $\alpha$ 启动子 (EF1- $\alpha$ ) 启动子、人 $\beta$ -葡糖醛酸酶启动子、鸡 $\beta$ -肌动蛋白 (CBA) 启动子、逆转录劳斯肉瘤病毒 (RSV) LTR启动子、二氢叶酸还原酶启动子和13-肌动蛋白启动子。在一些实施方案中,所述表达构建体还包含内含子。在一些实施方案中,所述内含子是CBA内含子或hEF1 $\alpha$ 内含子。在一些实施方案中,所述内含子是嵌合内含子。在一些实施方案中,所述表达载体是自身互补的载体,且所述内含子是 $\delta$ 嵌合内含子。在一些实施方案中,所述表达构建体还包含多腺苷酸化信号。在一些实施方案中,所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号、SV40多腺苷酸化信号或HSV TK多腺苷酸化信号。

[0013] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何表达构建体的载体。在一些实施方案中,所述载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体。在一些实施方案中,表达构建体侧翼是一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。在一些实施方案中,所述表达构建体的侧翼是两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,所述载体还包含填充 (stuffer) 核酸。在一些实施方案中,所述填充核酸位于编码RNAi的核酸的上游或下游。在一些实施方案中,所述载体是自身互补的rAAV载体。在一些实施方案中,所述载体包含编码RNAi的第一核酸序列和编码RNAi的互补体的第二核酸序列,其中所

述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。在一些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变AAV ITR连接,其中所述突变AAV ITR包含D区的缺失,且包含末端解析(resolution)序列的突变。

[0014] 在一些实施方案中,本发明提供了包含如本文所述的任何rAAV载体的细胞。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供了包含如本文所述的任何rAAV载体的重组AAV粒子。在一些实施方案中,所述AAV病毒粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,ITR和rAAV病毒粒子的衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,ITR和rAAV病毒粒子的衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,ITR源自AAV2,而rAAV粒子的衣壳源自AAV1。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何rAAV粒子的组合物。在一些实施方案中,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0017] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何RNAi的试剂盒。在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何AAV粒子的试剂盒。在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何组合物的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含使用说明书。

[0018] 在一些方面,本发明提供了治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5'-UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3'(SEQ ID NO:24)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3'(SEQ ID NO:8)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链,以及含有第二核酸的第二链。在一些实施方案中,第二核酸包含与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3'(SEQ ID NO:53)具有至少约90%同一性的核酸或与序列5'-E1过客-3'(SEQ ID NO:37)具有至少约90%同一性的核酸。

[0019] 在一些方面,本发明提供了治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5'-UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3'(SEQ ID NO:24)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3'(SEQ ID NO:53)具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链,或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3'(SEQ ID NO:8)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3'(SEQ ID NO:37)具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链。

[0020] 在一些方面,本发明提供了用于抑制患有神经变性疾病的哺乳动物中的 $\alpha$ -突触核蛋白表达的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5'-UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3'(SEQ ID NO:24)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3'(SEQ ID NO:8)具有至少约90%同一性的核酸的第一链,以及含有第二核酸的第二链。在一些实施方案中,第二核酸包含与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3'(SEQ ID NO:53)具有至少约90%同一性的核酸或与序列5'-UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3'(SEQ ID NO:37)具有至少约90%同一性的核酸。

[0021] 在一些方面,本发明提供了用于抑制患有神经变性疾病的哺乳动物中的 $\alpha$ -突触核蛋白表达的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5'-UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链,或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链。

[0022] 在上述方法的一些实施方案中,第一链包含具有SEQ ID NO:24序列的核酸序列或具有SEQ ID NO:8序列的核酸。在一些实施方案中,第二链包含具有SEQ ID NO:53序列的核酸或具有SEQ ID NO:37序列的核酸。在一些实施方案中,第一链与第二链借助能够形成环结构的RNA接头连接。在一些实施方案中,所述RNA接头包含4至50个核苷酸。在一些实施方案中,所述环结构包含4至20个核苷酸。在一些实施方案中,所述RNAi从5'到3'包含所述第二链、所述RNA接头和所述第一链。在一些实施方案中,所述RNAi从5'到3'包含所述第一链、所述RNA接头和所述第二链。在一些实施方案中,所述RNAi包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核酸序列。在一些实施方案中,所述RNAi包含与SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核苷酸序列约90%相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。

[0023] 在上述方法的一些实施方案中,所述RNAi靶向对与神经变性突触核蛋白病相关的多肽进行编码的RNA。在一些实施方案中,所述多肽是 $\alpha$ -突触核蛋白 (SNCA)。在一些实施方案中,所述 $\alpha$ 突触核蛋白是人 $\alpha$ -突触核蛋白。在一些实施方案中,所述神经变性突触核蛋白病是帕金森病 (PD)、多系统萎缩症 (MSA)、或路易体痴呆 (DLB)。

[0024] 在以上方法的一些实施方案中,本发明提供了包含编码本文所述的RNAi的核酸的表达构建体。在一些实施方案中,编码所述RNAi的核酸包含miRNA支架。在一些实施方案中,编码所述RNAi的核酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,所述启动子选自巨细胞病毒 (CMV) 即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子;巨细胞病毒增强子/鸡 $\beta$ -肌动蛋白/兔 $\beta$ -球蛋白启动子 (CAG) 启动子、延长因子1- $\alpha$ 启动子 (EF1- $\alpha$ ) 启动子、人 $\beta$ -葡糖醛酸酶启动子、鸡 $\beta$ -肌动蛋白 (CBA) 启动子、逆转录劳斯肉瘤病毒 (RSV) LTR启动子、二氢叶酸还原酶启动子和13-肌动蛋白启动子。在一些实施方案中,所述表达构建体还包含内含子。在一些实施方案中,所述内含子是CBA内含子或hEF1 $\alpha$ 内含子。在一些实施方案中,所述内含子是嵌合内含子。在一些实施方案中,所述表达载体是自身互补的载体,且所述内含子是 $\delta$ 嵌合内含子。在一些实施方案中,所述表达构建体还包含多腺苷酸化信号。在一些实施方案中,所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号、SV40多腺苷酸化信号或HSV TK多腺苷酸化信号。

[0025] 在上述方法的一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何表达构建体的载体。在一些实施方案中,所述载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体。在一些实施方案中,表达构建体侧翼是一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。在一些实施方案中,所述表达构建体的侧翼是两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、

AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。在一些实施方案中，AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中，所述载体还包含填充(stuffer)核酸。在一些实施方案中，所述填充核酸位于编码RNAi的核酸的上游或下游。在一些实施方案中，所述载体是自身互补的rAAV载体。在一些实施方案中，所述载体包含编码RNAi的第一核酸序列和编码RNAi的互补体的第二核酸序列，其中所述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。在一些实施方案中，所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变AAV ITR连接，其中所述突变AAV ITR包含D区的缺失，且包含末端解析(resolution)序列的突变。

[0026] 在以上方法的一些实施方案中，本发明提供了包含如本文所述的任何rAAV载体的重组AAV粒子。在一些实施方案中，所述AAV病毒粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBK0、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中，ITR和rAAV病毒粒子的衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中，ITR和rAAV病毒粒子的衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中，ITR源自AAV2，而rAAV粒子的衣壳源自AAV1。在一些实施方案中，rAAV粒子是在组合物中。在一些实施方案中，所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0027] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)均通过引用以其全文而并入。

## 附图说明

[0028] 图1A示出D1 shmiRNA (SEQ ID NO:61) 的结构，并且图1B示出E1 shmiRNA (SEQ ID NO:63) 的结构。

[0029] 图2示出在体外RNAi介导的人SNCA的减少。用编码shmiRNA形式的指定RNAi序列和人SNCA cDNA的质粒转染后72小时HEK293T细胞的全细胞提取物中SNCA的定量。将SNCA水平针对GAPDH加载对照归一化，并针对对照(非靶向对照RNAi) 归一化以计算敲低百分比。

[0030] 图3示出在体外RNAi介导的小鼠SNCA的减少。用编码miRNA形式的指定RNAi序列和小鼠SNCA cDNA的质粒转染后72小时HEK293T细胞的全细胞提取物中SNCA的定量。将SNCA水平针对GAPDH加载对照归一化，并针对对照(非靶向对照RNAi) 归一化以计算敲低百分比。

[0031] 图4A-D示出在体外RNAi介导的小鼠或人 $\alpha$ -突触核蛋白的减少。用编码siRNA形式的指定RNAi序列和人SNCA cDNA(图4A) 或小鼠SNCA cDNA(图4B) 的质粒转染后72小时HEK293T细胞的全细胞提取物中SNCA的定量分析图。将SNCA蛋白质水平归一化为 $\beta$ 微管蛋白，并针对对照(非靶向对照RNAi) 归一化以计算敲低百分比，如人SNCA(图4C) 和小鼠SNCA(图4D) 的蛋白质印迹图像所示。

[0032] 图5A-B示出转染的LUHMES细胞中指定的RNAi序列的毒性。将LUHMES细胞用miRNA形式的指定RNAi序列转染，并且然后用鱼藤酮处理以诱导细胞毒性。(图5A) 在鱼藤酮处理后48小时通过Cell Titer Blue<sup>®</sup>测定测量的细胞活力，并且证明D1和E1 RNAi序列的显著神经保护作用(分别为38%和40%)，但对照RNAi序列并非如此。平均神经保护作用%被计算为与对照相比的%变化。(图5B) 作为鱼藤酮诱导的毒性的额外读数测量的活性氧类。

[0033] 图6示出SNCA敲低与神经保护的正相关。将来自图5的神经保护百分比(作为细胞

活力)与每个相应实验中来自D1或E1的敲低水平作图。两种RNAi序列均显示敲低百分比与鱼藤酮处理的LUHMES细胞中的神经保护水平呈显著正相关(Pearson相关)。

[0034] 图7示出在体内miRNA形式的指示RNAi造成靶mRNA敲低。条形指示平均值+/-SEM。圆圈代表个体动物。通过单因素方差分析和多重比较来评估显著性。

[0035] 图8示出注射AAV-D1载体后小鼠的中脑中SNCA mRNA的减少。对小鼠单侧注射1e10 GC对照或D1病毒。将组织收集，并加工以用于在1个月后进行原位杂交。SNCA反义探针清楚地示出相对于对侧半球在吻侧至尾部的三个不同解剖水平的靶标减少。相对于未注射的半球，对照RNAi病毒未示出SNCA mRNA的任何降低。

[0036] 图9示出通过SNc免疫组织化学和原位杂交减少小鼠中的SNCA蛋白和mRNA。

[0037] 图10示出在递送AAV.rh10-E1载体后通过SNc免疫组织化学和原位杂交减少小鼠中SNCA蛋白和mRNA。

[0038] 图11示出每个样品组的单独生物学重复中的 $\alpha$ -突触核蛋白归一化表达；EV代表“空载体”。

## 具体实施方式

[0039] 在一些方面，本公开文本提供了用于治疗神经变性突触核蛋白病的RNAi。在一些实施方案中，所述神经变性突触核蛋白病是帕金森病或多系统萎缩症(MSA)。在一些实施方案中，所述RNAi靶向 $\alpha$ -突触核蛋白。在一些实施方案中，所述RNAi降低 $\alpha$ -突触核蛋白的表达。在一些实施方案中，所述RNAi包含第一链，所述第一链包含含有序列5' - UGCUCUUUGGUUCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24)的第一核酸。在一些实施方案中，所述RNAi包含第一链和第二链，所述第一链包含含有序列5' - UGCUCUUUGGUUCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24)的第一核酸，所述第二链包含含有序列5' - GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53)的第二核酸。在一些实施方案中，所述RNAi包含第一链，所述第一链包含含有序列5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8)的第一核酸。在一些实施方案中，RNAi包含第一链和第二链，所述第一链包含含有序列5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8)的第一核酸，所述第二链包含含有序列5' - UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37)的第二核酸。在一些方面，本公开文本提供了包含本公开文本的RNAi的表达构建体、载体(例如，重组AAV载体)、细胞、病毒粒子(例如，AAV粒子)和药物组合物。在另外的方面，本公开文本提供了用于治疗神经变性突触核蛋白病、抑制SNCA表达、和抑制哺乳动物中细胞中SNCA累积的方法，其包括向所述哺乳动物给予包含本公开文本的RNAi的药物组合物。在再另外的方面，本公开文本提供了包含本公开文本的RNAi的药物组合物治疗神经变性突触核蛋白病(例如改善神经变性突触核蛋白病的症状)、抑制SNCA表达或抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中细胞中SNCA累积的用途。在一些实施方案中，所述突触核蛋白病是帕金森病、多系统萎缩症、或路易体痴呆。

[0040] I.通用技术

[0041] 本领域技术人员通常很好地理解并且通常使用常规方法来采用本文描述或引用的技术和程序，例如像描述在以下文献中的广泛使用的方法：Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook等人，第4版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等

人编辑,2003);系列丛书Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑,1995);Antibodies,A Laboratory Manual(Harlow和Lane编辑,1988);Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications(R.I.Freshney,第6版,J.Wiley and Sons,2010);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Human Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,Academic Press,1998);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press,1998);Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,J.Wiley and Sons,1993-8);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1996);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编辑,J.Wiley and Sons,2002);Immunobiology(C.A.Janeway等人,2004);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995);和Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编辑,J.B.Lippincott Company,2011)。

[0042] II. 定义

[0043] 如本文所用的“载体”是指包含有待在体外或在体内递送至宿主细胞中的核酸的重组质粒或病毒。

[0044] 如本文所用的术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA,基因组DNA,cDNA,DNA-RNA杂合体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的骨架可包含糖和磷酸基团(如通常可在RNA或DNA中发现的)、或经修饰或经取代的糖或磷酸基团。可替代地,多核苷酸的骨架可包含合成亚基(如氨基磷酸酯)的聚合物,并因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯( $P-NH_2$ )或混合的氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。此外,双链多核苷酸可以从化学合成的单链多核苷酸产物,通过合成互补链并在适当的条件下使这些链退火或者是通过使用DNA聚合酶用适当的引物从头合成互补链来获得。

[0045] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。氨基酸残基的此类聚合物可含有天然或非天然氨基酸残基,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。所述定义涵盖了全长蛋白质及其片段两者。所述术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外,用于本公开文本的目的,“多肽”是指相对于天然序列包括修饰(如缺失、添加和取代)的蛋白质(通常在本质上是保守的),只要所述蛋白质保持所需活性即可。这些修饰可能是故意的(如通

过定点诱变),或者可能是偶然的(如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增引起的错误)。

[0046] “重组病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即,不是病毒来源的核酸序列)的重组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况下,重组核酸的侧翼是至少一个,且在一些实施方案中是两个反向末端重复序列(ITR)。

[0047] “重组AAV载体(rAAV载体)”是指包含一个或多个侧翼是至少一个,且在实施方案中是两个反向末端重复序列(ITR)的异源序列(即,不是来源于AAV的核酸序列)的多核苷酸载体。当此类rAAV载体存在于已感染合适的辅助病毒(或表达合适的辅助功能)并且表达AAV rep和cap基因产物(即AAV rep和cap蛋白)的宿主细胞中时,它们可以被复制并包装在感染性病毒粒子中。当将rAAV载体掺入较大多核苷酸(例如,在用于克隆或感染的染色体或另一种载体如质粒中)中时,则rAAV载体可以被称为“前载体”,其可以通过在AAV包装功能和合适辅助功能的存在下复制和衣壳化被“挽救”。rAAV载体可以呈多种形式中的任何一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合、被包封在脂质体内、和被包衣壳于病毒粒子(特别是AAV粒子)中。rAAV载体可以被包装在AAV病毒衣壳中,以产生“重组腺相关病毒粒子(rAAV粒子)”。

[0048] “异源的”意指衍生自基因型不同于其所比较或其所引入或掺入的实体的剩余部分的实体。例如,通过基因工程技术引入不同细胞类型中的多核苷酸是异源多核苷酸(且在表达时可编码异源多肽)。类似地,掺入病毒载体中的细胞序列(例如,基因或其部分)就该载体而言是异源核苷酸序列。

[0049] 术语“转基因”是指引入细胞中并且能够转录成RNA并且任选地在适当条件下翻译和/或表达的多核苷酸。在多个方面,它赋予其所引入的细胞所需的特性,或以其他方式产生所需的治疗或诊断结果。在另一方面,它可以转录成介导RNA干扰的分子,例如miRNA、siRNA或shRNA。

[0050] “鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子”是指源自鸡 $\beta$ -肌动蛋白基因(例如,原鸡(Gallus gallus) $\beta$ 肌动蛋白,以GenBank Entrez Gene ID 396526表示)的多核苷酸序列。如本文所用,“鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子”可以指含有巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件、鸡 $\beta$ -肌动蛋白基因的启动子和第一外显子和内含子、和兔 $\beta$ -球蛋白基因的剪接受体的启动子,诸如Miyazaki,J.等人(1989)Gene 79(2):269-77中所述序列。如本文所用,术语“CAG启动子”可以互换使用。如本文所用,术语“CMV早期增强子/鸡 $\beta$ 肌动蛋白(CAG)启动子”可以互换使用。

[0051] 如关于病毒滴度使用的术语“基因组粒子(gp)”、“基因组等同物”或“基因组拷贝”是指含重组AAV DNA基因组的病毒粒子的数量,与感染性或功能性无关。特定载体制剂中的基因组粒子的数量可以通过诸如本文实施例中或例如Clark等人(1999)Hum.Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk等人(2002)Mol.Ther., 6:272-278中所述的程序测量。

[0052] 如本文所用的术语“载体基因组(vg)”可以指包含一组载体(例如,病毒载体)的多核苷酸序列的一种或多种多核苷酸。载体基因组可以被包衣壳于病毒粒子中。根据特定的病毒载体,载体基因组可以包含单链DNA、双链DNA或单链RNA或双链RNA。载体基因组可以包括与特定病毒载体相关的内源序列和/或通过重组技术插入特定病毒载体的任何异源序列。例如,重组AAV载体基因组可以包括位于启动子侧翼的至少一个ITR序列、填充片段、感兴趣序列(例如RNAi)和多腺苷酸化序列。完整的载体基因组可包括一组完整的载体多核苷

酸序列。在一些实施方案中，病毒载体的核酸滴度可以按vg/mL衡量。适用于测量此滴度的方法在本领域中是已知的(例如,定量PCR)。

[0053] 如本文所用,术语“抑制”可以指阻断、减少、消除或以其他方式拮抗特定靶标的存在或活性的行为。抑制可以指部分抑制或完全抑制。例如,抑制基因的表达可以指导致基因表达阻断、减少、消除或任何其他拮抗作用的任何行为,包括mRNA丰度的减少(例如使mRNA转录沉默)、mRNA的降解、mRNA翻译的抑制等。在一些实施方案中,抑制SNCA表达可以指SNCA表达的阻断、减少、消除或任何其他拮抗作用,包括SNCA mRNA丰度的减少(例如,使SNCA mRNA转录沉默)、SNCA mRNA的降解、SNCA mRNA翻译的抑制等。作为另一例子,抑制蛋白在细胞中累积可以指导致所述蛋白表达阻断、减少、消除或其他拮抗作用的任何行为,包括mRNA丰度的减少(例如,使mRNA转录沉默)、mRNA的降解、mRNA翻译的抑制、所述蛋白的降解等。在一些实施方案中,抑制SNCA蛋白在细胞中累积是指细胞中的SNCA蛋白表达的阻断、减少、消除或其他拮抗作用,包括SNCA mRNA丰度的减少(例如,使SNCA mRNA沉默)、SNCA mRNA的降解、SNCA mRNA翻译的抑制、SNCA蛋白的降解等。

[0054] 如关于病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染性粒子”或“复制单位”是指感染性和复制型重组AAV载体粒子的数量,如通过感染中心测定(也称为复制中心测定)测量的,如例如McLaughlin等人(1988) J.Virol.,62:1963-1973中所述。

[0055] 如关于病毒滴度使用的术语“转导单位(tu)”是指导致产生功能转基因产物的感染性重组AAV载体粒子的数量,如在功能测定中测量的,如本文实施例中或例如Xiao等人(1997) Exp.Neurobiol.,144:113-124中;或Fisher等人(1996) J.Virol.,70:520-532(LFU测定)中所述。

[0056] “反向末端重复”或“ITR”序列是本领域中熟知的术语,并且是指在病毒基因组末端发现的相对较短的序列,它们的方向相反。

[0057] “AAV反向末端重复(ITR)”序列为本领域中熟知的术语,是存在于天然单链AAV基因组的两端的大约145个核苷酸的序列。ITR的最外侧的125个核苷酸能以两个替代方向中的任何一个存在,导致不同AAV基因组之间以及单个AAV基因组两端之间的异质性。最外侧的125个核苷酸也含有几个较短的自身互补的区域(指定为A、A'、B、B'、C、C' 和D区),允许在ITR的这个部分内发生链内碱基配对。

[0058] “末端解析序列”或“trs”是AAV ITR的D区中的序列,其在病毒DNA复制期间被AAV rep蛋白切割。突变型末端解析序列难以被AAV rep蛋白切割。

[0059] “AAV辅助功能”是指允许AAV被宿主细胞复制和包装的功能。AAV辅助功能可以多种形式中的任何一种提供,包括但不限于协助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能在本领域中是已知的,如基因毒性剂。

[0060] AAV的“辅助病毒”是指允许AAV(其是缺陷型细小病毒)被宿主细胞复制和包装的病毒。辅助病毒提供允许AAV复制的“辅助功能”。已经鉴定了多种这类辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒如牛痘和杆状病毒。腺病毒涵盖多种不同子群,但子群C的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人类、非人类哺乳动物和鸟类来源的许多腺病毒是已知的,并且可从诸如ATCC等保藏机构获得。也可从诸如ATCC等保藏机构获得的疱疹家族病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)和假狂犬病病毒(PRV)。用于复制AAV的腺病毒辅助功能的例子包括E1A功能、E1B功能、E2A功能、VA功能和

E4orf6功能。可从保藏机构获得的杆状病毒包括苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒。

[0061] 如果感染性AAV粒子与感染性辅助病毒粒子的比例是至少约 $10^2:1$ ;至少约 $10^4:1$ 、至少约 $10^6:1$ ;或至少约 $10^8:1$ 或更多,rAAV的制剂被称为是“基本上不含”辅助病毒。在一些实施方案中,制剂也不含等效量的辅助病毒蛋白(即,如果上述辅助病毒粒子杂质以受破坏形式存在,将由于这一水平的辅助病毒而存在蛋白质)。病毒和/或细胞蛋白污染通常可以在SDS凝胶上存在考马斯染色条带而观察到(例如,出现不同于对应于AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3的那些条带的条带)。

[0062] 将就参考多肽或核酸序列而言的“序列同一性百分比(%)”定义为在用以实现最大百分比序列同一性并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)后,候选序列中与参考多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸相同的氨基酸残基或核苷酸的百分比。用于确定氨基酸或核酸序列同一性百分比的目的的比对可以按在本领域技术范围内的多种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件程序,例如 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑,1987),增刊30,第7.7.18章,表7.7.1中描述的那些,并且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。优选的比对程序是ALIGN Plus (科学教育软件 (Scientific and Educational Software),宾夕法尼亚州 (Pennsylvania))。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括为了在被比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。用于本文的目的,给定氨基酸序列A对、与或相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性% (可替代地这可以用短语表示为对、与或相对于给定氨基酸序列B具有或包含某一氨基酸序列同一性%的给定氨基酸序列A) 计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是在A和B的程序比对中通过序列比对程序评定为完全匹配的氨基酸残基的数量,且其中Y是B中氨基酸残基的总数量。应理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。就本文的目的而言,给定核酸序列C对/与/相对于给定核酸序列D的核酸序列同一性% (其可替代地表述为对/与/相对于给定核酸序列D具有或包含某一核酸序列同一性%的给定核酸序列C) 计算如下:100乘以分数W/Z,其中W是在C和D的程序比对中通过序列比对程序评定为完全匹配的核苷酸的数量,且其中Z是D中核苷酸的总数量。应理解,当核酸序列C的长度不等于核酸序列D的长度时,C与D的核酸序列同一性%将不等于D与C的核酸序列同一性%。

[0063] “分离的”分子(例如,核酸或蛋白质)或细胞意指已经从其天然环境的组分中鉴别并分离和/或回收。

[0064] “有效量”是足以产生有益或期望结果的量,包括临床结果(例如,症状的改善,临床终点的实现等)。有效量能以一次或多次给药来给予。就疾病状态而言,有效量是足以改善、稳定或延迟疾病发展的量。

[0065] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人类和非人灵长类动物如猴)、兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,所述个体或受试者是人类。

[0066] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益的或期望临床结果的途径。出于本公开文本的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于以下:缓解症状、减小疾病的程度、稳定疾

病状态(例如不恶化)、防止疾病扩散(例如,转移)、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态、以及缓解(无论是部分或是全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可能意味着,与如果不接受治疗预期的存活相比延长存活。

[0067] 如本文所用,术语“预防性治疗”是指这样的治疗,其中已知或疑似个体患有或有障碍风险,但未展示出所述障碍的症状或展示出所述障碍的最小症状。可在症状发作之前治疗经历预防性治疗的个体。

[0068] 如本文所用,术语“神经变性突触核蛋白病”是指神经变性障碍,其特征在于中枢和外周神经系统中选择性神经元和神经胶质群体的细胞质中 $\alpha$ -突触核蛋白的纤维聚集体。例子包括但不限于帕金森病(PD)、多系统萎缩症(MSA-P和MSA-C)、路易体痴呆(DLB)、纯自主神经衰竭(PAF)、阿尔茨海默病的路易体变体(LBVA)、路易体吞咽困难和偶然的路易体病。

[0069] 如本文所用,“RNAi”可以指在细胞中诱导RNA干扰的任何RNA分子。RNAi的例子包括但不限于小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和小发夹RNA(shRNA)。

[0070] “miRNA支架”可以指含有以下的多核苷酸:(i)靶向通过RNAi敲除的兴趣基因的双链序列,和(ii)形成类似于内源性miRNA的茎-环结构的其他序列。靶向RNAi的兴趣基因的序列(例如,约20-nt的短序列)可以连接至产生miRNA-样茎环的序列和与兴趣序列碱基配对的序列,从而在多核苷酸组装成miRNA-样二级结构时,形成双链体。如本文所述,这个双链体可以不完美地杂交,例如,它可以包含一个或多个未排队或错配碱基。在通过Dicer切割这个多核苷酸后,这个含有靶向兴趣基因的序列的双链体可以展开并掺入RISC复合物中。miRNA支架可以指miRNA本身或编码所述miRNA的DNA多核苷酸。miRNA支架的例子是miR-155序列(Lagos-Quintana,M.等人(2002)Curr.Biol.12:735-9)。可商购获得用于将序列克隆到miRNA支架中的试剂盒在本领域内是已知的(例如,Invitrogen™BLOCK-iT™Pol II miR RNAi表达载体试剂盒,来自生命技术公司(Life Technologies),赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific);沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州(MA))。

[0071] 如本文所用,“凸起”是指核酸中与在双链体核酸中相对的核酸不互补的区域。例如,凸起可以指与双链体核酸中相对的核酸不互补的核酸序列,其中所述凸起的侧翼是核酸中与双链体核酸中核酸互补的区域。在一些例子中,所述凸起的长度可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或超过10个碱基中的任一个。在一些例子中,所述凸起可以是错配(例如,相对链含有不互补的碱基)的结果,或所述凸起可以是不配对(例如,相对链包含与在所述凸起侧翼的核酸互补的核酸,但所述相对链在所述凸起的对侧不含核酸)的结果。

[0072] 如本文所用,术语“有义”核酸是包含编码转基因的全部或一部分的序列的核酸。在一些例子中,转基因的mRNA是有义核酸。

[0073] 如本文所用,“反义”核酸是与“有义”核酸互补的核酸的序列。例如,反义核酸可以与编码转基因的mRNA互补。

[0074] 如本文所用,RNAi的“指导区”是RNAi中通常基于互补性结合靶mRNA的链。互补区可涵盖指导区的全部或一部分。通常,互补区至少包括种子区。在许多情况下,RNAi的反义区是指导区。

[0075] 如本文所用,本文互换使用的RNAi的“过客区”或“非指导区”是RNAi中与指导区互补的区域。在许多情况下,RNAi的有义区是过客区。

[0076] 如本文所用,RNAi的“种子区”(例如,miRNA)是微小RNA的约1-8个核苷酸个长度的

区域。在一些例子中，种子区和其靶mRNA的3'-UTR可以是RNAi识别中的关键决定因素。

[0077] 如本文所用，“脱靶基因沉默”是指RNAi的种子区与非期望mRNA的3'-UTR配对，并引导那些转录物翻译抑制和去稳定化(例如，减少非期望mRNA的表达)。

[0078] 本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如，涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0079] 除非另外说明，否则如本文所用，冠词的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物。

[0080] 应理解的是，本文描述的本公开文本的方面和实施方案包括“包含(comprising)”、“组成为(consisting)”和/或“基本上组成为(consisting essentially of)”方面和实施方案。

### [0081] III.RNAi

[0082] 在一些方面，本公开文本提供了改进的RNAi。在一些实施方案中，所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。小抑制性或干扰性RNA(siRNA)在本领域中被称为长度约19-25(例如，19-23)个碱基对的双链RNA分子，其在细胞中诱导RNAi。在一些实施方案中，所述siRNA序列也可以插入人工miRNA支架(“shmiRNA”)中。小发夹RNA(shRNA)在本领域中称为包含通过短环(例如，约4-11个核苷酸)连接的双链RNA的约19-25(例如，19-23)个碱基对的RNA分子，其在细胞中诱导RNAi。

[0083] 微小RNA(miRNA)在本领域中称为在细胞中诱导RNAi的RNA分子，其包含通过环连接的双链RNA的短(例如，19-25个碱基对)序列，且包含含一个或多个凸起(例如，错配或未配对碱基对)的双链RNA的一个或多个另外的序列。如本文所用，术语“miRNA”涵盖内源miRNA以及外源或异源miRNA。在一些实施方案中，“miRNA”可以指初级miRNA(pri-miRNA)或前miRNA(pre-miRNA)。在miRNA处理期间，产生初级miRNA转录物。通过Drosha-DGCR8加工初级RNA，以通过切除一个或多个序列产生前miRNA，留下具有以下项的初级miRNA：5'侧翼区、指导链、环区、非指导链和3'侧翼区；或5'侧翼区、非指导链、环区、指导链和3'侧翼区。然后将前miRNA导出到细胞质中，并通过Dicer加工，以产生具有指导链和非指导(或过客)链的siRNA。然后，RISC复合物使用指导链催化基因沉默，例如，通过识别与指导链互补的靶RNA序列。miRNA的进一步描述可在例如WO2008/150897中找到。miRNA识别靶序列主要通过靶与miRNA种子序列，例如指导链的核苷酸1-8(5'到3')之间的配对来确定(参见，例如Boudreau,R.L.等人(2013)Nucleic Acids Res.41:e9)。

[0084] 在初级/前miRNA结构中，双链体中指导链：非指导链界面部分是通过互补碱基配对(例如，Watson-Crick碱基配对)形成。然而，在一些实施方案中，这种互补碱基配对不会延及整个双链体。在一些实施方案中，界面中的凸起可存在于一个或多个核苷酸位置上。如本文所用，术语“凸起”可以指核酸中与在双链体中相对的核酸不互补的区域。在一些实施方案中，当互补核酸的区域彼此结合时形成凸起，而中心非互补区域的区域不结合。在一些实施方案中，当位于两个互补区域之间的两条核酸链具有不同长度时形成凸起。如下所述，凸起可以是1个或多个核苷酸。在一些实施方案中，所述miRNA包含通过从miRNA-碱基9-10的过客链中缺失2个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。

[0085] 在另一个方面，本公开文本中描述的RNAi抑制 $\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)。在一些实施方案中，SNCA是小鼠SNCA。在一些实施方案中，SNCA是人SNCA。在一些实施方案中，所述RNAi

靶向编码SNCA的RNA。在一些实施方案中,所述RNAi抑制受试者中SNCA的表达。在一些实施方案中,所述RNAi抑制受试者中SNCA的累积。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0086] 基于RNAi的疗法的安全性可能受到小抑制性RNA (siRNA) 结合至非期望mRNA并减少其表达的能力(称为脱靶基因沉默的效应)阻碍。脱靶主要在种子区(小RNA的核苷酸2-8)与非期望mRNA的3'-UTR中的序列配对并引导那些转录物翻译抑制和去稳定化时发生。可以通过取代指导序列和非指导序列内的碱基来设计减少的脱靶RNAi;例如通过产生CpG基序。可利用SiSPOTR算法评估可导致脱靶得分显著下降的潜在取代,所述算法是一种专注特异性的siRNA设计算法,识别具有最小脱靶可能性和强力沉默能力的候选序列(Boudreau等人,Nucleic Acids Res.2013年1月;41 (1) e9。SiSPOTR得分降低预示着与母体RNAi分子相比具有较少数量的潜在人脱靶的序列。在本公开文本的一些实施方案中, RNAi经改进以减少脱靶基因沉默。在一些实施方案中, RNAi包含一个或多个CpG基序。在一些实施方案中, RNAi在种子区包含一个或多个CpG基序。

[0087] 在一些实施方案中,第一链和第二链通过能够形成环结构的RNA(例如, RNA接头)连接。如本领域内众所周知的,当RNA分子包含碱基配对在一起但被未碱基配对在一起的一个RNA序列分开的两个RNA序列时,会形成RNA环结构(例如,茎-环或发夹)。例如,如果序列A和序列C互补或部分互补,使得它们碱基配对在一起,但序列B中的碱基未碱基配对在一起,那么RNA分子A-B-C中可形成环结构。在一些实施方案中,所述环序列是DNA形式的5' - GTTTGGCCACTGACTGAC-3' (SEQ ID NO:59) 或RNA形式的5' -GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0088] 在一些实施方案中,能够形成环结构的RNA包含4至50个核苷酸。在某些实施方案中,能够形成环结构的RNA包含13个核苷酸。在一些实施方案中,能够形成环的RNA中核苷酸的数量是4至50个核苷酸,或其间的任何整数。在一些实施方案中,环的0-50%可与所述环的另一部分互补。如本文所用,术语“环结构”是连接两个互补的核酸链的序列。在一些实施方案中,环结构1-3个核苷酸与互补的核酸链邻接,且可与环结构远侧部分的1-3个核苷酸互补。例如,环结构5'末端的三个核苷酸可与环结构3'末端的三个核苷酸互补。

[0089] 在一些实施方案中,编码本公开文本的RNAi的核酸包含异源miRNA支架。在一些实施方案中,使用异源miRNA支架是用于调节miRNA表达;例如,增加miRNA表达或减少miRNA表达。可使用本领域内已知的任何miRNA支架。在一些实施方案中,miRNA支架来源于miR-155支架(参见,例如Lagos-Quintana, M. 等人(2002) Curr. Biol. 12: 735-9以及Invitrogen<sup>TM</sup>BLOCK-iT<sup>TM</sup>Pol II miR RNAi表达载体试剂盒,来自生命技术公司(Life Technologies),赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific);沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州(MA))。

[0090] 在一些实施方案中, RNAi选自表1。

[0091] 在一些实施方案中,第一链包含与任何指导序列具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性的核酸序列。在一些实施方案中,第一链包含与任何指导序列具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性但保留CpG基序的核酸序列。在一些实施方案中,第二链包含与相应的过客序列具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性

的核酸序列。在一些实施方案中，第二链包含与相应的过客序列具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性但保留CpG基序的核酸序列。

[0092] 表1

SEQ ID.	指导序列 (第一链)	SEQ ID.	过客序列 (第二链)	物种同源 性	人类脱 靶预测
1	CAUCGGAACUGAGCACUUGUA	30	UACAAGUGCAGUUCCGAUG	hs, mq, ms	562
2	AGGUUCGUAGUCUUGAUACCU	31	AAGGUUAGAAUGGCCGGUUA	hs	518
3	uUAACCGCCACUUUCUAACCU	32	AAGGUUAGAAUGGCCGGUUA	hs	530
4	ACGUUGGAACUGAGCACUUGU	33	ACAAGUGCAGUCCAACGU	hs, mq, ms	882
5	uUCCAACAUUUGUCACUUGC	34	AGCAAGUGAAAUGUUGGAA	hs, mq, ms	4016
6	UCGUCCAACAUUUGUCACUUG	35	CAAGUGACAUGUUGGACGA	hs, mq, ms	1190
7	UGGGCGCAUUGGAACUGAGCA	36	UGCUCAGUCAAUGC GCCUA	hs, mq, ms	1662
8	UGGGCACAUUGGAACUGAGCA	37	UGCUCAGUCAAUGUGCCUA	hs, mq, ms	4335
9	GUCGUCGAAUGGCCACUCCA	38	UGGGAGUGCAUUCGACGAU	hs, mq	nd
10	GGUUCGUAGCUUUGAUACCUU	39	AAGGGUAUCAACUACGAACC	hs	564
11	uAGCAGCAGCCACAACUCCU	40	AGGGAGUUGGCUGCUGCUA	hs, mq, ms	6390
12	uUCGAACAUUUGUCACUUGC	41	AGCAAGUGAAAUGUUCGAA	hs, mq, ms	852
13	uAGCCGCCACAACUCCCUCU	42	AGGAGGGAUGUGGCCGGCUA	hs, mq, ms	1253
14	UGCGCUUUGGUUCUUCAGCC	43	GGCUGAGAACCAAAGCGUA	hs, mq, ms	798
15	uAGCCGCAGCCACAACUCCU	44	AGGGAGUUGGCUGCUGCCUA	hs, mq, ms	1253
16	uAGCAGCCACAACUCCCUCU	45	AGGAGGGAUGUGGCCUGCUA	hs, mq, ms	6390
17	UCGGCACAUUGGAACUGAGCA	46	UGCUCAGUCAAUGUGCCGA	hs, mq, ms	1249
18	AUGACGGGCACAUUGGAACU	47	AGUUCCAAUGCCCCGUCAU	hs, mq, ms	1071
19	AUGACUGGGCACAUUGGAACU	48	AGUUCCAAUGCCCCAGUCAU	hs, mq, ms	4604
20	UAAGUCGUAGUCACUUAGGUG	49	CACCUAAGACUACGACUUA	hs, mq, ms	866
21	CUCCGCAGCAGCCACAACUCC	50	GGAGUUGUCUGCUGCGGAG	hs, mq, ms	995
22	UCAUGACUGGGCACAUUGGAA	51	UUCCAAUGCCCAGUCAUGA	hs, mq, ms	3588
23	AAAUAACGUGGUAGUCACUUAG	52	CUAAGUGAACCAACGUUUU	hs, mq, ms	1152
24	UGCUCUUUGGUUCUUCAGCC	53	GGCUGAGAACCAAAGAGUA	hs, mq, ms	4560
25	AACGUUUGUCACUUGCUCUU	54	AAAGAGCAUGACAAACGUU	hs, mq, ms	1990
26	AAAUAAGUGGUAGUCACUUAG	55	CUAAGUGAACCAACUUUUU	hs, mq, ms	5638
27	UUAGAAAUAAGUGGUAGUCAC	56	GUGACUACCUUAAUCUAA	hs, mq, ms	7503
28	AAUACGUGGUAGUCACUUAGG	57	CCUAAGUGAACCAACGUUU	hs, mq, ms	1149

[0093]

[0094]	29	ACUGCGCACAUUGGAACUGAG	58	CUCAGUUCAUGUGCGCAGU	hs, mq, ms	1355
--------	----	-----------------------	----	---------------------	------------	------

[0095] 图注:序列为从5'到3'。小写字母指示与靶标有义链的错配,以降低在指导链的5'末端经加工的双链体的稳定性。Hs=人;mq=恒河猴,ms=小鼠。从siSPOTR算法(万维网<https://sispotr.icts.uiowa.edu/sispotr/tools.html>)计算人脱靶预测,并且所述人脱靶预测代表被预测的脱靶转录物与miRNA的种子序列的碱基互补性。

[0096] IV. 神经变性突触核蛋白病

[0097] 神经变性突触核蛋白病是神经变性疾病,其特征在于神经元、神经纤维或神经胶质细胞中 $\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)蛋白水平增加。神经变性突触核蛋白病的主要类型包括路易体痴呆(DLB)、帕金森病和多系统萎缩症(MSA)。

[0098] 神经变性突触核蛋白病的例子包括但不限于帕金森病(PD)、多系统萎缩症(MSA-P和MSA-C)、路易体痴呆(DLB)、纯自主神经衰竭(PAF)、阿尔茨海默病的路易体变体(LBVA)、路易体吞咽困难和偶然的路易体病。

[0099] 多个证据证实, $\alpha$ -突触核蛋白水平的升高具有神经毒性,而降低具有神经保护作用(Dauer, 2002; Drolet, 2004; Alvarez-Fischer, 2008; Klivenyi, 2005; Mittal, 2017; Javed, 2015; Cole, 2017; Ubhi, 2010; Lim, 2011)。本公开文本提供了针对SNCA的RNAi。

[0100] V. 治疗神经变性突触核蛋白病的方法

[0101] 在一些方面,本公开文本提供了治疗哺乳动物中神经变性突触核蛋白病的方法和组合物,其包括向所述哺乳动物给予本公开文本的药物组合物(例如,包含本公开文本的病毒粒子的药物组合物)。在一些方面,本公开文本提供了抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中SNCA表达的方法和组合物,其包括向所述哺乳动物给予本公开文本的药物组合物(例如,包含本公开文本的病毒粒子的药物组合物)。在一些方面,本公开文本提供了抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物的细胞中SNCA累积的方法和组合物,其包括向所述哺乳动物给予本公开文本的药物组合物(例如,包含本公开文本的病毒粒子的药物组合物)。

[0102] 在一些方面,本公开文本提供了改善神经变性突触核蛋白病症状的方法和组合物,其包括向哺乳动物神经系统给予有效量的重组病毒粒子,这些重组病毒粒子包含编码本公开文本的RNAi的载体。在一些实施方案中,神经变性突触核蛋白病的症状包括但不限于帕金森症、认知障碍、睡眠障碍、幻视、言语障碍、便秘、锥体或小脑体征、嗅觉缺失、自主神经功能障碍如直立性低血压、出汗减少、勃起功能障碍、尿潴留或尿失禁、和瞳孔功能障碍。

[0103] 在一些方面,本公开文本提供了预防或延迟神经变性突触核蛋白病进展的方法。像PD这样的突触核蛋白病通常是通过震颤、运动迟缓、僵硬和姿势不稳定的存在来临床诊断。通过检查诸如直立性低血压、锥体体征、认知改变或幻觉的其他体征来典型地进行与PD的区分。另外,一些突触核蛋白病可以通过脑成像来诊断,例如通过寻找脑区域中的异常,所述脑区域例如为MSA中的脑桥、小脑、壳核。一些突触核蛋白病可以通过针对常见突变(不一定局限于SNCA基因)的基因分型直接鉴定。延迟或预防疾病进展可通过以下任何症状的改善来定义:运动功能(运动迟缓、运动障碍、肌张力障碍、姿势不稳定、弯腰姿势、震颤、肌阵挛等)、认知、睡眠障碍、幻视、言语、便秘、锥体体征、嗅觉缺失、自主神经功能障碍如直立

性低血压、出汗减少、勃起功能障碍、尿潴留或尿失禁、和瞳孔功能障碍。

[0104] 在本公开文本的一些方面,使用所述方法和组合物治疗患有神经变性突触核蛋白病的人类。在一些方面,本公开文本提供了改进的RNAi,其靶向患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中的SNCA mRNA。在一些实施方案中, RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGCUCUUUGGUUCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 的第二核酸,其中第一链和第二链形成双链体,并且其中第二链的SEQ ID NO:53的残基19处的A残基不与第一链中的残基形成碱基对。在一些实施方案中,所述miRNA包含通过从miRNA-碱基9-10的过客链中缺失2个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中,第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中,环序列是5' -GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0105] 在一些实施方案中, RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 的第二核酸,其中第一链和第二链形成双链体,并且其中第二链的SEQ ID NO:37的A残基19不与第一链中的残基形成碱基对。在一些实施方案中,所述miRNA包含通过从miRNA-碱基9-10的过客链中缺失2个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中,第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中,环序列是5' -GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0106] 在一些实施方案中, RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGCGCUUUGGUUCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:14) 的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -GGCUGAGAACCAAAGCGUA-3' (SEQ ID NO:43) 的第二核酸,其中第一链和第二链形成双链体,并且其中第二链的SEQ ID NO:43的残基19处的A残基不与第一链中的残基形成碱基对。在一些实施方案中,所述miRNA包含通过从miRNA-碱基9-10的过客链中缺失2个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中,第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中,环序列是5' -GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0107] 在一些实施方案中, RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGGGCGCAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:7) 的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -UGCUCAGUCAAUGCGCCUA-3' (SEQ ID NO:36) 的第二核酸,其中第一链和第二链形成双链体,并且其中第二链的SEQ ID NO:36的残基19处的A残基不与第一链中的残基形成碱基对。在一些实施方案中,所述miRNA包含通过从miRNA-碱基9-10的过客链中缺失2个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中,第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中,环序列是5' -GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0108] 在一些实施方案中, RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -uUCCAACAUUUGUCACUUGCU-3' (SEQ ID NO:5) 的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -AGCAAUGAAAUGUUCGAA-3' (SEQ ID NO:34) 的第二核酸,其中第一链和第二链形成双链体,并且其中第二链的SEQ ID NO:34的残基18处或残基19处的A残基不与第一链中的残基形成碱基对。在一些实施方案中,所述miRNA包含通过从miRNA-碱基9-10的过客链中缺失2个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中,第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中,环序列是5' -GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:

60)。

[0109] 在本公开文本的一些实施方案中, RNAi 经改进以减少脱靶基因沉默。在一些实施方案中, RNAi 包含一个或多个 CpG 基序。在一些实施方案中, RNAi 在种子区包含一个或多个 CpG 基序。

[0110] 在一些实施方案中, 本公开文本提供了治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法, 其包括向哺乳动物给予 RNAi, 所述 RNAi 包含第一链和第二链, 所述第一链包含含有序列 5' - UGCUCUUUGGUCCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 的第一核酸, 所述第二链包含含有序列 5' - GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 的第二核酸, 其中第一链和第二链形成双链体。在一些实施方案中, 所述 miRNA 包含通过从 miRNA- 碱基 9-10 的过客链中缺失 2 个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中, 本公开文本提供了用于抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中 SNCA 表达的方法, 所述方法包括向哺乳动物给予 RNAi, 所述 RNAi 包含第一链和第二链, 所述第一链包含含有序列 5' - UGCUCUUUGGUCCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 的第一核酸, 所述第二链包含含有序列 5' - GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 的第二核酸, 其中第一链和第二链形成双链体。在一些实施方案中, 本公开文本提供了用于抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物的细胞中 SNCA 累积的方法, 其包括向哺乳动物给予 RNAi, 所述 RNAi 包含第一链和第二链, 所述第一链包含含有序列 5' - UGCUCUUUGGUCCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 的第一核酸, 所述第二链包含含有序列 5' - GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 的第二核酸, 其中第一链和第二链形成双链体。在一些实施方案中, 所述 miRNA 包含通过从 miRNA- 碱基 9-10 的过客链中缺失 2 个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内部凸起。在一些实施方案中, 第一链包含与 SEQ ID NO:24 具有超过约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 中任一个的同一性的核酸序列。在一些实施方案中, 第二链包含与 SEQ ID NO:24 具有超过约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 中任一个的同一性但保留 CpG 基序的核酸序列。在一些实施方案中, 第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中, 环序列是 5' - GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0111] 在一些实施方案中, 本公开文本提供了治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法, 其包括向哺乳动物给予 RNAi, 所述 RNAi 包含第一链和第二链, 所述第一链包含含有序列 5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 的第一核酸, 所述第二链包含含有序列 5' - UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 的第二核酸, 其中第一链和第二链形成双链体。在一些实施方案中, 本公开文本提供了用于抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中 SNCA 表达的方法, 所述方法包括向哺乳动物给予 RNAi, 所述 RNAi 包含第一链和第二链, 所述第一链包含含有序列 5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 的第一核酸, 所述第二链包含含有序列 5' - UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 的第二核酸, 其中第一链和第二链形成双链体。在一些实施方案中, 本公开文本提供了用于抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物的细胞中 SNCA 累积的方法, 其包括向哺乳动物给予 RNAi, 所述 RNAi 包含第一链和第二链, 所述第一链包含含有序列 5' - 5' - UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' - 3' (SEQ ID NO:8) 的第一核酸, 所述第二链包含含有序列 5' - UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 的第二核酸, 其中第一链和第二链形成双链体。在一些实施方案中, 所述 miRNA 包含通过从 miRNA- 碱基 9-10 的过客链中缺失 2 个碱基(从过客链的起点开始计数)而产生的内

部凸起。在一些实施方案中,第一链包含与SEQ ID NO:8具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性的核酸序列。在一些实施方案中,第二链包含与SEQ ID NO:37具有超过约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性的核酸序列。在一些实施方案中,第一链和第二链通过环序列连接。在一些实施方案中,环序列是5'-GUUUUGGCCACUGACUGAC-3' (SEQ ID NO:60)。

[0112] 在一些实施方案中,所述RNAi是小抑制性RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或小发夹RNA (shRNA)。小抑制性或干扰性RNA (siRNA) 在本领域中被称为长度约19-25 (例如,19-23) 个碱基对的双链RNA分子,其在细胞中诱导RNAi。小发夹RNA (shRNA) 在本领域中称为包含通过短环(例如约4-11个核苷酸)连接的双链RNA的约19-25 (例如19-23) 个碱基对的RNA分子,其在细胞中诱导RNAi。

[0113] 在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:24约90%相同的指导序列。在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:24具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中任一个的同一性的指导序列。

[0114] 在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:24约90%相同的非指导序列。在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:53具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中任一个的同一性的非指导序列。本文所述任何RNAi (例如,作为rAAV载体的一部分) 尤其可用于治疗神经变性突触核蛋白病。另一方面,表1中描述的任何RNAi可用于治疗神经变性突触核蛋白病。

[0115] 在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:8约90%相同的指导序列。在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:8具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中任一个的同一性的指导序列。

[0116] 在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:37约90%相同的非指导序列。在一些实施方案中,miRNA包含与SEQ ID NO:37具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中任一个的同一性的非指导序列。本文所述任何RNAi (例如,作为rAAV载体的一部分) 尤其可用于治疗神经变性突触核蛋白病。另一方面,表1中描述的任何RNAi可用于治疗神经变性突触核蛋白病。

[0117] 在一些实施方案中,第一链与第二链借助能够形成环结构的RNA连接。如本领域内众所周知的,当RNA分子包含碱基配对在一起但被未碱基配对在一起的一个RNA序列分开的两个RNA序列时,会形成RNA环结构(例如,茎-环或发夹)。例如,如果序列A和序列C互补或部分互补,使得它们碱基配对在一起,但序列B中的碱基未碱基配对在一起,那么RNA分子A-B-C中可形成环结构。

[0118] 在一些实施方案中,能够形成环结构的RNA包含4至50个核苷酸。在某些实施方案中,能够形成环结构的RNA包含13个核苷酸。在某些实施方案中,能够形成环结构的RNA包含SEQ ID NO:60的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体基因组包含与SEQ ID NO:60的序列具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的同一性的核苷酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,通过注射病毒粒子将重组病毒粒子递送至脑。在一些实施方案中,通过注射病毒粒子将重组病毒粒子递送至纹状体。纹状体内给药将重组病毒粒子递送至脑中受神经变性突触核蛋白病严重影响的区域,即纹状体(包括壳核和尾状核)。此外,

且不希望受理论束缚,认为注射至纹状体中的重组病毒粒子(例如rAAV粒子)也可以分散(例如通过逆向运输)至脑的其他区域,包括但不限于投射区(例如皮质或黑质)。在一些实施方案中,通过对流增强递送(convective enhanced delivery)来递送重组病毒粒子(例如,对流增强递送至纹状体)。

[0120] 在一些方面,本公开文本提供了治疗哺乳动物中神经变性突触核蛋白病的方法,其包括向所述哺乳动物给予本公开文本的药物组合物。在一些方面,本公开文本提供了抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物的细胞中SNCA累积的方法,其包括向所述哺乳动物给予本公开文本的药物组合物。在一些方面,本公开文本提供了抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中SNCA表达的方法,其包括向所述哺乳动物给予本公开文本的药物组合物。在一些实施方案中,所述SNCA是突变SNCA(例如,人SNCA突变,包括A53T、E46K、A30P、G51D、H50Q、A53E、A29S、A18T中的一种或多种,以及基因座的重复和三次重复)。在一些实施方案中,野生型SNCA的表达和/或累积也受到抑制。如本文所述,且不希望受理论束缚,认为抑制患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物中突变体SNCA表达和/或累积是非常有益的,但抑制相同哺乳动物中野生型SNCA表达和/或累积作为副作用(例如,本公开文本的RNAi的)可以具有良好耐受性(例如,产生极少或不产生非期望副作用)。

[0121] 在一些实施方案中,细胞包含载体(例如,包含编码本公开文本的RNAi的表达构建体的载体)。在一些实施方案中,所述载体是rAAV载体。在一些实施方案中,所述载体是重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒(HSV)载体。在一些实施方案中,所述细胞是中枢神经系统(CNS)细胞。在一些实施方案中,所述细胞是HEK293细胞。

[0122] 在一些实施方案中,给予有效量的包含编码本公开文本的RNAi的载体的重组病毒粒子在给药部位或附近转导神经元(例如,纹状体神经元,诸如棘神经元)。在一些实施方案中,转导超过约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或100%中任一个百分比的神经元。在一些实施方案中,转导约5%至约100%、约10%至约50%、约10%至约30%、约25%至约75%、约25%至约50%或约30%至约50%的神经元。鉴定用表达miRNA的重组病毒粒子转导的神经元的方法是本领域已知的;例如,可使用免疫组织化学、RNA检测(例如qPCR、Northern印迹、RNA-seq、原位杂交等)或使用共表达标记(例如增强型绿色荧光蛋白)来检测表达。

[0123] 在本公开文本的一些实施方案中,所述方法包括向哺乳动物的脑给予有效量的含编码本公开文本的RNAi的载体的重组病毒粒子,以治疗患有神经变性突触核蛋白病的哺乳动物,例如人类。在一些实施方案中,将组合物注射至脑中的一个或多个位置,以允许至少在神经元中表达本公开文本的RNAi。在一些实施方案中,将组合物注射至以下任一者:脑中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或超过十个位置。在一些实施方案中,将组合物注射至纹状体中。在一些实施方案中,将组合物注射至背侧纹状体中。在一些实施方案中,将组合物注射至壳核中。在一些实施方案中,将组合物注射至尾状核中。在一些实施方案中,将组合物注射至壳核和尾状核中。在一些实施方案中,给药途径可包括通过脑室内、小脑延髓池或鞘内注射的CSF递送。在一些实施方案中,给药还可包括静脉内递送病毒载体。

[0124] 在一些实施方案中,将重组病毒粒子给予至一个脑半球。在一些实施方案中,将重组病毒粒子给予至两个脑半球。

[0125] 在一些实施方案中,将重组病毒粒子同时或依次给予至超过一个位置。在一些实施方案中,多次注射重组病毒粒子间隔不超过一个小时、两个小时、三个小时、四个小时、五个小时、六个小时、九个小时、十二个小时或24个小时。

[0126] 在一些实施方案中,本公开文本提供了一种通过给予有效量的包含本公开文本的RNAi的重组病毒载体的药物组合物抑制突变体SNCA的活性来治疗患有神经变性突触核蛋白病的人类的方法。在一些实施方案中,药物组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0127] 在一些实施方案中,所述方法包括给予有效量的含编码本公开文本的RNAi的重组病毒载体的药物组合物,以抑制突变体SNCA的活性。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:至少约 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12}$ 或 $50 \times 10^{12}$ 个基因组拷贝/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:至少约 $5 \times 10^{12}$ 至 $6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 至 $7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 至 $8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 至 $9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 至 $10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 至 $11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12}$ 至 $15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12}$ 至 $20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12}$ 至 $25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12}$ 至 $30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12}$ 至 $50 \times 10^{12}$ 或 $50 \times 10^{12}$ 至 $100 \times 10^{12}$ 个基因组拷贝/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:约 $5 \times 10^{12}$ 至 $10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 至 $25 \times 10^{12}$ 或 $25 \times 10^{12}$ 至 $50 \times 10^{12}$ 个基因组拷贝/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:至少约 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9$ 或 $50 \times 10^9$ 个转导单位/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:约 $5 \times 10^9$ 至 $6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 至 $7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 至 $8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 至 $9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 至 $10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 至 $11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9$ 至 $15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 至 $20 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9$ 至 $25 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9$ 至 $30 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9$ 至 $50 \times 10^9$ 或 $50 \times 10^9$ 至 $100 \times 10^9$ 个转导单位/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:约 $5 \times 10^9$ 至 $10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 至 $15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 至 $25 \times 10^9$ 或 $25 \times 10^9$ 至 $50 \times 10^9$ 个转导单位/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:至少约 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10}$ 或 $50 \times 10^{10}$ 个感染单位/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下任一者:至少约 $5 \times 10^{10}$ 至 $6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 至 $7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 至 $8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 至 $9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 至 $10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 至 $11 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10}$ 至 $15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 至 $20 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10}$ 至 $25 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10}$ 至 $30 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10}$ 至 $40 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10}$ 至 $50 \times 10^{10}$ 或 $50 \times 10^{10}$ 至 $100 \times 10^{10}$ 个感染单位/mL。在一些实施方案中,病毒粒子(例如,rAAV粒子)的病毒滴度是以下至少一者:约 $5 \times 10^{10}$ 至 $10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 至 $15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 至 $25 \times 10^{10}$ 或 $25 \times 10^{10}$ 至 $50 \times 10^{10}$ 个感染单位/mL。

[0128] 在一些实施方案中,给予至个体的病毒粒子的剂量是以下任一者:至少约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{13}$ 个基因组拷贝/kg体重。在一些实施方案中,给予至个体的病毒粒子的剂量是以下任一者:约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{13}$ 个基因组拷贝/kg体重。

[0129] 在一些实施方案中,给予至个体的病毒粒子的总量是以下任一者:至少约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 个基因组拷贝。在一些实施方案中,给予至个体的病毒粒子的总量是以下任一者:约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 个基因组拷贝。

[0130] 在本公开文本的一些实施方案中,注射至纹状体的组合物的体积是以下任一者:超过约1μl、2μl、3μl、4μl、5μl、6μl、7μl、8μl、9μl、10μl、15μl、20μl、25μl、50μl、75μl、100μl、200μl、300μl、400μl、500μl、600μl、700μl、800μl、900μl或1mL、或其间任一量。

[0131] 在一些实施方案中,将第一体积的组合物注射至脑的第一区域,并将第二体积的组合物注射至脑的第二区域。例如,在一些实施方案中,将第一体积的组合物注射至尾状核,并将第二体积的组合物注射至壳核。在一些实施方案中,将1X体积的组合物注射至尾状核,并将1.5X、2X、2.5X、3X、3.5X、或4X体积的组合物注射至壳核,其中X是超过以下任一者的体积:超过约1μl、2μl、3μl、4μl、5μl、6μl、7μl、8μl、9μl、10μl、15μl、20μl、25μl、50μl、75μl、100μl、200μl、300μl、400μl、500μl、600μl、700μl、800μl、900μl或1mL、或其间的任何量。

[0132] 本公开文本的组合物(例如,包含编码本公开文本的RNAi的载体的重组病毒粒子)可单独使用或与用于治疗神经变性突触核蛋白病的一种或多种另外的治疗剂组合使用。依次给予之间的间隔可以是按至少(或,可替代地,少于)分钟、小时或天计算。

[0133] 本公开文本中描述的任何RNAi、表达构建体、载体或细胞可以用于上述任何方法。在一些实施方案中,表1中公开的任何RNAi,包含表1中的RNAi的表达构建体、载体或细胞可用于上述任何方法中。

[0134] V.RNAi表达构建体和载体

[0135] 本公开文本提供了表达本文所述RNAi的表达构建体、载体和病毒粒子。

[0136] 在一些实施方案中,编码本公开文本的RNAi的核酸包含异源miRNA支架。在一些实施方案中,使用异源miRNA支架是用于调节miRNA表达;例如,增加miRNA表达或减少miRNA表达。可使用本领域内已知的任何miRNA支架。在一些实施方案中,miRNA支架来源于miR-155支架(参见,例如Lagos-Quintana, M. 等人(2002) Curr. Biol. 12:735-9以及Invitrogen<sup>TM</sup>BLOCK-iT<sup>TM</sup>Pol II miR RNAi表达载体试剂盒,来自生命技术公司(Life Technologies),赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific);沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州(MA))。在一些实施方案中,编码本公开文本的RNAi的核酸包含miRNA支架。在一些实施方案中,miRNA支架包含序列ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgcaggacacaaggcctgttactagcac  
tcacatggaacaaatggc (SEQ ID NO:67),其中miRNA插入在粗体gc残基之间。

[0137] 在一些实施方案中,支架中的miRNA包含序列

ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgtacgatctaatacgctc**gttttggc**

**cactgac**tgacgagcgatatgatcgtacgacaggacacaaggcctgttactagc

actcacatggaacaaatggc (SEQ ID NO:68),其中带下划线的常规文本代表5'侧翼,斜体文本代表指导序列,粗体文本代表环,带下划线的斜体代表非指导序列以及常规文本代表3'侧翼。

[0138] 在一些实施方案中,所述RNAi靶向对与神经变性突触核蛋白病相关的多肽进行编码的RNA。在一些实施方案中,所述多肽是α-突触核蛋白。不希望受理论束缚,认为可使用RNAi减少或消除多肽的表达和/或活性,所述多肽的功能获得与神经变性突触核蛋白病相关联。可以通过本公开文本的治疗性多肽或治疗性核酸治疗的本公开文本的神经变性突触核蛋白病的非限制性例子(可以针对每种障碍在括号中提供可以靶向或提供的示例性基因)包括帕金森病(SNCA)、多系统萎缩症或MSA(SNCA)和路易体痴呆(SNCA)。

[0139] 在一些实施方案中,转基因(例如,本公开文本的RNAi)可操作地连接至启动子。示例性启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子和CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡β-肌动蛋白/兔β-球蛋白启动子(CAG启动子;Niwa等人, Gene, 1991, 108 (2) :193-9)和延长因子1-α启动子(EF1-α)启动子(Kim等人, Gene, 1990, 91 (2) :217-23和Guo等人, Gene Ther., 1996, 3 (9) :802-10)。在一些实施方案中,启动子包含人β-葡糖醛酸酶启动子或连接至鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子的巨细胞病毒增强子。启动子可以是组成型、诱导型或阻抑型启动子。在一些实施方案中,本公开文本提供了包含编码与CBA启动子可操作地连接的本公开文本的异源转基因的核酸的重组载体。示例性启动子和描述可见于例如美国专利授予前公开案20140335054。在一些实施方案中,启动子是CBA启动子、最低CBA启动子、CMV启动子或GUSB启动子。在一些实施方案中,启动子是hEF1a启动子。

[0140] 组成型启动子的例子包括但不限于逆转录劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地具有CMV增强子)[参见例如,Boshart等人,Cell,41:521-530(1985)]、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、13-肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1a启动子[Invitrogen]。

[0141] 诱导型启动子允许调节基因表达,并且可以通过外源提供的化合物、环境因子(如温度)或存在特定生理状态(例如,急性期)、细胞的特定分化状态或在仅复制细胞时进行调节。诱导型启动子和诱导型系统可从多种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。已经描述了许多其他系统,并且可以由本领域技术人员容易地选择。通过外源提供的启动子调节的诱导型启动子的例子包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)-诱导型小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93:3346-3351(1996))、四环素阻抑型系统(Gossen等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:5547-5551(1992))、四环素阻抑型系统(Gossen等人, Science, 268:1766-1769(1995),还参见Harvey等人, Curr.Opin.Chem.Biol., 2:512-518(1998))、RU486-诱导型系统(Wang等人, Nat.Biotech., 15:239-243(1997)和Wang等人, Gene Ther., 4:432-441(1997))和雷帕霉素诱导型系统(Magari等人, J.Clin.Invest., 100:2865-2872(1997))。在这种背景下可使用的仍其他类型的诱导型启动子是通过特定生理状态(例如,温度、急性期)、细胞的特定分化状态或在仅复制细胞时调节的那些。

[0142] 在另一个实施方案中,将使用用于转基因的天然启动子或其片段。当期望转基因的表达应模拟天然表达时,天然启动子是优选的。当必须暂时或发展地或以组织特异性方式、或响应特定转录刺激物调节转基因的表达时,可使用天然启动子。在另一实施方案中,也可以使用其他天然表达控制元件,如增强子元件、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列模拟天然表达。

[0143] 在一些实施方案中,调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调节序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。本领域中熟知此类组织特异性调节序列(例如,启动子、增强子等)。示例性组织特异性调节序列包括但不限

于以下组织特异性启动子：神经元型，诸如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人,Cell.Mol.Neurobiol.,13:503-15(1993))、神经丝轻链基因启动子(Piccioli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:5611-5(1991))和神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等人,Neuron,15:373-84(1995))。在一些实施方案中，组织特异性启动子是选自以下的基因的启动子：神经元核(NeuN)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、腺瘤性结肠息肉病(APC)和离子钙结合衔接子分子1(Iba-1)。其他合适的组织特异性启动子对技术人员将是清楚的。在一些实施方案中，启动子是鸡β-肌动蛋白启动子。

[0144] 在一些实施方案中，启动子在CNS的细胞中表达异源核酸。因此，在一些实施方案中，本公开文本的治疗多肽或治疗核酸可用于治疗CNS的障碍。在一些实施方案中，启动子在脑细胞中表达异源核酸。脑细胞可以指本领域中已知的任何脑细胞，包括但不限于神经元(诸如感觉神经元、运动神经元、中间神经元、多巴胺能神经元、中型多棘神经元、胆碱能神经元、GABA能神经元、锥体神经元等)、胶质细胞(诸如小胶质细胞、大胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、放射状胶质细胞等)、脑实质细胞、小胶质细胞、室管膜细胞和/或浦肯野细胞。在一些实施方案中，所述启动子在神经元和/或胶质细胞中表达异源核酸。在一些实施方案中，所述神经元是尾状核的中型多棘神经元、壳核的中型多棘神经元、皮质层IV的神经元和/或皮质层V的神经元。

[0145] 在CNS细胞、脑细胞、神经元和胶质细胞中表达转录物(例如，异源转基因)的各种启动子是本领域内已知的且描述在本文中。此类启动子可包含通常与所选基因或异源控制序列相关的控制序列。通常，有用的异源控制序列包括源自编码哺乳动物或病毒基因的序列的那些。例子包括但不限于SV40早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒LTR启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)、单纯疱疹病毒(HSV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(诸如CMV即时早期启动子区(CMVIE))、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、合成启动子、杂合启动子等。另外，也可以使用源自非病毒基因(如鼠金属硫蛋白基因)的序列。此类启动子序列可从例如Stratagene(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA))商购获得。可使用CNS-特异性启动子和诱导型启动子。CNS特异性启动子的例子包括但不限于从诸如髓鞘碱性蛋白(MBP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元特异性烯醇酶(NSE)的CNS特异性基因分离的那些。诱导型启动子的例子尤其包括蜕皮激素、四环素、金属硫蛋白和缺氧的DNA响应元件。

[0146] 本公开文本考虑使用重组病毒基因组将一个或多个编码本文所述RNAi的核酸序列引入或包装到AAV病毒粒子中。重组病毒基因组可包括任何元件来建立RNAi的表达，所述元件例如为启动子、异源核酸、ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记、内含子、多聚A信号和/或复制起点。在一些实施方案中，rAAV载体包含以下中的一者或多者：增强子、剪接供体/剪接受体对、基质附着位点或多腺苷酸化信号。

[0147] 在一些实施方案中，给予有效量的包含编码RNAi的载体的rAAV粒子在给药部位或附近(例如纹状体和/或皮质)或更远离给药部位转导细胞(例如CNS细胞、脑细胞、神经元和/或胶质细胞)。在一些实施方案中，转导超过约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或100%中任一个百分比的神经元。在一些实施方案中，转导约5%至约100%、约10%至约50%、约10%至约30%、约25%至约75%、约25%至约50%或约30%至约50%的神经元。鉴定用表达miRNA的重组病毒粒子转导的神经元的方法是本领域已知的；例如，可使用免疫组织化学、RNA检测(例如qPCR、Northern印迹、

RNA-seq、原位杂交等)或使用共表达标记(例如增强型绿色荧光蛋白)来检测表达。

[0148] 在一些方面,本公开文本提供了包含重组自身互补的基因组(例如,自身互补的rAAV载体)的病毒粒子。具有自身互补的载体基因组的AAV病毒粒子和使用自身互补的AAV基因组的方法描述在美国专利号6,596,535;7,125,717;7,465,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054;和8,361,457;以及Wang Z.等人,(2003)Gene Ther 10:2105-2111中,将其各自通过引用以其全文并入本文。包含自身互补的基因组的rAAV将借助其部分互补的序列(例如,异源核酸的互补编码链和非编码链)迅速形成双链DNA。在一些实施方案中,载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码所述核酸的互补体的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。

[0149] 在一些实施方案中,编码RNAi的第一异源核酸序列和编码所述RNAi的互补体的第二异源核酸序列通过突变ITR(例如正确的ITR)连接。在一些实施方案中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCA AAGGTCGCCACGCCGGGCTT TGCCCCGGCG-3' (SEQ ID NO:69)。突变的ITR包含含末端解析序列的D区的缺失。因此,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,以5'至3'顺序包含以下的重组病毒基因组将被包装在病毒衣壳中:AAV ITR、包括调节序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸反向的第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。

[0150] VI. 病毒粒子和产生病毒粒子的方法

[0151] 本公开文本尤其提供了包含编码本公开文本的RNAi的核酸的重组病毒粒子及其用于治疗哺乳动物中疾病或障碍例如神经变性突触核蛋白病的方法。

[0152] 病毒粒子

[0153] 本公开文本提供了包含如本文公开的RNAi的病毒粒子。在一些实施方案中,本公开文本提供了用于递送如本文公开的本公开文本的RNAi的病毒粒子。例如,本公开文本提供了利用重组病毒粒子递送RNAi来治疗哺乳动物中疾病或障碍的方法;例如用包含RNAi的rAAV粒子治疗神经变性突触核蛋白病。在一些实施方案中,重组病毒粒子是重组AAV粒子。在一些实施方案中,病毒粒子是包含核酸的重组AAV粒子,所述核酸包含侧翼为一个或两个ITR的序列,即本公开文本的RNAi。所述核酸被包衣壳于AAV粒子中。AAV粒子还包含衣壳蛋白。在一些实施方案中,所述核酸包含在转录方向上可操作连接组分的一个或多个感兴趣的编码序列(例如,核酸,即本公开文本的RNAi)、控制序列(包括转录起始序列和终止序列),从而形成表达构建体。表达构建体的5'和3'末端侧接至少一个功能AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意指旨在用于挽救、复制和包装AAV病毒粒子的ITR序列功能。参见Davidson等人,PNAS,2000,97 (7) 3428-32;Passini等人,J.Viro.,2003,77 (12) :7034-40;和Pechan等人,Gene Ther.,2009,16:10-16,将所有这些文献通过引用以其全文并入本文。为了实施本公开文本的一些方面,重组载体包含至少所有为衣壳化所必需的AAV序列和用于由rAAV感染的物理结构。用于本公开文本的载体的AAV ITR无需具有野生型核苷酸序列(例如,如Kotin,Hum.Gene Ther.,1994,5:793-801中所述),并且可以通过插入、缺失或取代核苷酸而改变,或者AAV ITR可以衍生自几种AAV血清型中的任何一种。目前已知超过40种AAV血清型,并且不断鉴定出新的血清型和现有血清型的变体。参见Gao等人,PNAS,2002,99 (18) :11854-6;Gao等人,PNAS,2003,100 (10) :6081-6;和Bossis等人,J.Viro.,2003,77

(12) :6799-810。使用任何AAV血清型都被认为在本公开文本的范围之内。在一些实施方案中,rAAV载体是源自AAV血清型的载体,包括但不限于,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型等。在一些实施方案中,AAV中的核酸包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型等的ITR。在一些实施方案中,AAV中的核酸还编码如本文所述的RNAi。在一些实施方案中,rAAV粒子包含AAV1、AAV2HBK0衣壳(例如,如WO 2015168666中所述),AAV9衣壳,PHP.B衣壳,PHP.eB衣壳或01ig001衣壳。

[0154] 例如,AAV中的核酸可以包含本文考虑的任何AAV血清型的至少一种ITR,并且可以进一步编码包含第一链和第二链的RNAi,其中a)第一链和第二链形成双链体;b)第一链包含指导区,和c)第二链包含非指导区,其中非指导区在碱基9和10处包含两个核苷酸缺失以在指导链中产生凸起。在一些实施方案中,rAAV可包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24)的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53)的第二核酸。在一些实施方案中,rAAV可包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8)的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37)的第二核酸。在一些实施方案中,AAV中的核酸从5' 到3' 包含编码以下项的核酸:ITR(例如AAV2 ITR)、启动子、编码如本文公开的RNAi的核酸、多腺苷酸化信号和AAV ITR(例如AAV2 ITR)。在一些实施方案中,AAV中的核酸从5' 到3' 包含编码以下项的核酸:ITR(例如AAV2 ITR);启动子;编码RNAi的核酸,所述RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24)的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53)的第二核酸;多腺苷酸化信号以及AAV ITR(例如AAV2 ITR)。在一些实施方案中,AAV中的核酸从5' 到3' 包含编码以下项的核酸:ITR(例如AAV2 ITR);启动子;编码RNAi的核酸,所述RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8)的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37)的第二核酸;多腺苷酸化信号以及AAV ITR(例如AAV2 ITR)。在一些实施方案中,AAV中的核酸从5' 到3' 包含编码以下项的核酸:ITR(例如AAV2 ITR)、CBA启动子、编码如本文公开的RNAi的核酸、多腺苷酸化信号(例如牛生长激素多聚A)和AAV ITR(例如AAV2 ITR)。在一些实施方案中,RNAi选自表1。在一些实施方案中,AAV中的核酸从5' 到3' 包含编码以下项的核酸:ITR(例如AAV2 ITR);CBA启动子;编码RNAi的核酸,所述RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24)的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53)的第二核酸;多腺苷酸化信号(例如牛生长激素多聚A)和AAV ITR(例如AAV2 ITR)。在一些实施方案中,AAV中的核酸从5' 到3' 包含编码以下项的核酸:ITR(例如AAV2 ITR);CBA启动子;编码RNAi的核酸,所述RNAi包含第一链和第二链,所述第一链包含含有序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8)的第一核酸,所述第二链包含含有序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37)的第二核酸;多腺苷酸化信号(例如牛生长激素多聚A)和AAV ITR(例如AAV2 ITR)。在一些实施方案中,第一

链和第二链选自表1。

[0155] 在一些实施方案中,载体可包括填充核酸。在一些实施方案中,填充核酸可以编码绿色荧光蛋白。在一些实施方案中,所述填充核酸可位于所述启动子与编码RNAi的核酸之间。在一些实施方案中,填充核酸是A1AT填充核酸。

[0156] 在一些实施方案中,AAV中的核酸包含SEQ ID NO:65的核酸。在一些实施方案中,AAV中的核酸包含与SEQ ID NO:65至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同的核酸。在另外的实施方案中,rAAV粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11、AAV12的衣壳蛋白或这些衣壳蛋白的突变体。在一些实施方案中,突变型衣壳蛋白保留形成AAV衣壳的能力。在一些实施方案中,rAAV粒子包含AAV5酪氨酸突变体衣壳 (Zhong L. 等人, (2008) Proc Natl Acad Sci U S A 105 (22) :7827-7832。在另外的实施方案中,rAAV粒子包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白 (Gao等人, J. Virol. 2004, 78 (12) :6381)。

[0157] 使用不同的AAV血清型优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,病变组织)内的特定细胞类型。rAAV粒子可以包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。例如,在一些实施方案中,rAAV粒子可包含AAV1衣壳蛋白和至少一种AAV2 ITR,或其可包含AAV2衣壳蛋白和至少一种AAV1 ITR。本文提供了生产rAAV粒子的AAV血清型的任何组合,如同每个组合都已在本文中明确说明一样。在一些实施方案中,本发明提供了rAAV粒子,其包含AAV1衣壳和侧翼为至少一个AAV2 ITR的本公开文本的rAAV载体(例如包含编码本公开文本的RNAi的核酸的表达构建体)。在一些实施方案中,本发明提供了包含AAV2衣壳的rAAV粒子。在一些实施方案中,rAAV粒子包含AAV1、AAV2HBK0衣壳(例如,如W02015168666中所述),AAV9衣壳,PHP.B衣壳,PHP.eB衣壳或01ig001。

[0158] 在一些方面,本发明提供了包含重组自身互补的基因组的病毒粒子。具有自身互补的基因组的AAV病毒粒子和使用自身互补的AAV基因组的方法描述在美国专利号6,596,535;7,125,717;7,465,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054;和8,361,457;和Wang Z.,等人, (2003) Gene Ther 10:2105-2111中,将其各自通过引用以其全文并入本文。包含自身互补基因组的rAAV将借助其部分互补的序列(例如,转基因的互补编码链和非编码链)迅速形成双链DNA。在一些实施方案中,本发明提供了包含AAV基因组的AAV病毒粒子,其中所述rAAV基因组包含第一异源多核苷酸序列(例如,本公开文本的RNAi)和第二异源多核苷酸序列(例如,本公开文本的RNAi的反义链),其中所述第一异源多核苷酸序列可与所述第二多核苷酸序列沿着其大部分或全部长度形成链内碱基对。在一些实施方案中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过促进链内碱基配对的序列连接;例如发夹DNA结构。发夹结构在本领域中是已知的,例如在miRNA或siRNA分子中。在一些实施方案中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过突变ITR(例如,正确的ITR)连接。在一些实施方案中,ITR包含多核苷酸序列5'-ttggccactccctctcgcgctcgctca ctgaggccgcggcaaagccggcgctggcgacc ttggcgccccgcctcagtgagcgagcgac gaggaggatggccaactccatcactagggttcct-3' (SEQ ID NO:70)。突变的ITR包含含末端解析序列的D区的缺失。因此,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,以5'至3'顺序包含以下的重组病毒基因组将被包装在病毒衣壳中:AAV ITR、包括调节序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸反向的

第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。在一些实施方案中,本发明提供了包含重组病毒基因组的AAV病毒粒子,所述重组病毒基因组包含:功能AAV2 ITR、编码本公开文本的RNAi的第一多核苷酸序列、包含D区缺失且缺少功能末端解析序列的突变AAV2 ITR、包含与第一多核苷酸序列的编码本公开文本的RNAi的序列互补的序列的第二多核苷酸序列、和功能AAV2 ITR。

[0159] 生产病毒粒子

[0160] 可使用本领域中已知的方法生产rAAV粒子。参见,例如,美国专利号6,566,118;6,989,264;和6,995,006。在实施本发明时,用于生产rAAV粒子的宿主细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、微生物和酵母。宿主细胞也可以是AAV rep和cap基因稳定地保留在宿主细胞中的包装细胞或者稳定保留AAV载体基因组的生产细胞。示例性包装细胞和生产细胞源自293、A549或HeLa细胞。纯化AAV载体,并利用本领域中已知的标准技术配制。

[0161] 本领域中已知用于生产rAAV载体的方法,包括但不限于转染、稳定细胞系生产和包括腺病毒-AAV杂合体、疱疹病毒-AAV杂合体(Conway, JE等人, (1997) *J. Virology* 71 (11):8780-8789)和杆状病毒-AAV杂合体的感染性杂合病毒生产系统。用于生产rAAV病毒粒子的rAAV生产培养物全部要求:1)合适的宿主细胞,包括例如人源细胞系(诸如HeLa、A549或293细胞)或在杆状病毒生产系统的情况下为昆虫源细胞系(诸如SF-9);2)由野生型或突变腺病毒(诸如温度敏感型腺病毒)、疱疹病毒、杆状病毒或者提供辅助功能的质粒构建体提供的合适辅助病毒功能;3)AAV rep和cap基因和基因产物;4)侧翼是至少一个AAV ITR序列的核酸(诸如治疗核酸);和5)支持rAAV生产的合适培养基和培养基组分。在一些实施方案中,AAV rep和cap基因产物可以来自任何AAV血清型。通常但不是必须的,AAV rep基因产物与rAAV载体基因组的ITR具有相同血清型,只要rep基因产物可以发挥复制和包装rAAV基因组的作用即可。本领域中已知的合适的培养基可以用于产生rAAV载体。这些培养基包括但不限于Hyclone Laboratories和JRH生产的培养基,包括改良伊格尔培养基(MEM);达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM);定制配制品,如美国专利号6,566,118描述的那些;以及如美国专利号6,723,551中描述的Sf-900 II SFM培养基,将每个专利(特别是关于用于产生重组AAV载体的定制培养基制剂)均通过引用以其全文并入本文。在一些实施方案中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施方案中,AAV辅助功能由杆状病毒提供,并且宿主细胞是昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 细胞)。

[0162] 在一些实施方案中,rAAV粒子可通过三重转染方法生产,诸如下文提供的示例性三重转染方法。简而言之,可以将含rep基因和衣壳基因的质粒连同辅助腺病毒质粒转染(例如,利用磷酸钙法)到细胞系(例如,HEK-293细胞)中,并且可以收集并任选地纯化病毒。因此,在一些实施方案中,通过将编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸以及编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染到宿主细胞中来产生rAAV粒子,其中核酸向宿主细胞的转染产生能够产生rAAV粒子的宿主细胞。

[0163] 在一些实施方案中,rAAV粒子可通过生产细胞系方法生产,诸如下文提供的示例性生产细胞系方法(还可参见(Martin等人, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269中引用的)。简而言之,细胞系(例如,HeLa细胞系)可稳定地用含rep基因、衣壳基因和启动子-异源核酸序列的质粒转染。可筛选细胞系,以选择用于rAAV生产的前导克隆(lead clone),然后可将其扩增至生产反应器,并用腺病毒(例如野生型腺病毒)作为辅助者转染,

以启动rAAV生产。随后可收获病毒,可使腺病毒失活(例如通过加热)和/或移除,并可纯化rAAV粒子。因此,在一些实施方案中,通过包含编码rAAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸中的一者或者者的生产细胞系生产rAAV粒子。

[0164] 在一些方面,提供一种用于生产本文公开文本的任何rAAV粒子的方法,其包括(a)在产生rAAV粒子的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含(i)一种或多种AAV包装基因,其中每种所述AAV包装基因编码AAV复制蛋白和/或衣壳化蛋白;(ii)rAAV前载体,其包含编码如本文所述的本公开文本RNAi的、侧翼为至少一个AAV ITR的核酸,和(iii)AAV辅助功能;和(b)回收由宿主细胞生产的rAAV粒子。在一些实施方案中,所述RNAi包含SEQ ID NO:61(图1A)或SEQ ID NO:63(图1B)的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述至少一个AAV ITR选自:AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR等。在一些实施方案中,所述衣壳蛋白选自:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例如,如美国授予前公开案2012/0164106中所述的野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳,诸如ShH10)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例如,如美国授予前公开案2013/0323226中所述的野生型AAV9衣壳或经修饰的AAV9衣壳)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、酪氨酸衣壳突变体、肝素结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVAAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳(例如,AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳、或美国授予前公开案2012/0066783中所述任何其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或者美国专利号8,283,151或国际公开号WO/2003/042397中所述AAV衣壳。在一些实施方案中,AAV衣壳是如WO 2015168666中所述的AAV2HBK0衣壳。在一些实施方案中,AAV衣壳是AAV9衣壳。在一些实施方案中,AAV衣壳是PHP.B、PHP.eB或Olig001衣壳。在一些实施方案中,突变型衣壳蛋白保留形成AAV衣壳的能力。在一些实施方案中,衣壳蛋白是AAV5酪氨酸突变衣壳蛋白。在另外的实施方案中,rAAV粒子包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV粒子包含AAV1衣壳以及重组基因组,所述重组基因组包含AAV2 ITR和编码本公开文本的RNAi的核酸。在另一实施方案中,rAAV粒子被纯化。如本文所用的术语“纯化的”包括rAAV粒子的制剂,其缺少至少一些也可存在于rAAV粒子天然存在或最初所制备的地方的其他组分。因此,例如,分离的rAAV粒子可以利用纯化技术使其从源混合物(诸如培养裂解物或生产培养上清液)富集而制备。可以各种方式测量富集情况,例如像,根据溶液中存在的DNase-抗性粒子(DRP)或基因组拷贝(gc)的比例,或根据感染性;或者可根据源混合物中存在的第二潜在干扰物质(诸如污染物,包括生产培养污染物或进程内污染物,包括辅助病毒、培养基组分等)来测量。

[0165] 本领域内已知许多生产腺病毒载体粒子的方法。例如,对于内部破坏的腺病毒载体,可将腺病毒载体基因组和辅助腺病毒基因组转染至包装细胞系(例如,293细胞系)。在一些实施方案中,辅助腺病毒基因组可包含在其包装信号侧翼的重组位点,且可将两个基因组转染到表达重组酶的包装细胞系(例如,可使用Cre/loxP系统),使得感兴趣的腺病毒载体的包装效率高于辅助腺病毒(参见,例如Alba,R.等人(2005)Gene Ther.12增刊1:S18-27)。可以使用标准方法收获和纯化腺病毒载体,诸如本文所述的那些。

[0166] 本领域内已知许多生产慢病毒载体粒子的方法。例如,对于第三代慢病毒载体,含

有带gag和pol基因的兴趣慢病毒基因组的载体可与含rev基因的载体共同转染到包装细胞系(例如,293细胞系)。感兴趣的慢病毒基因组还包含促进在不存在Tat的情况下转录的嵌合LTR(参见Dull,T.等人(1998)J.Virol.72:8463-71)。可以使用本文所述的方法(例如,Segura MM,等人,(2013)Expert Opin Biol Ther.13 (7) :987-1011)收获并纯化慢病毒载体。

[0167] 本领域内已知许多生产HSV粒子的方法。可以使用标准方法收获和纯化HSV载体,诸如本文所述的那些。例如,对于复制缺陷型HSV载体,可将缺少所有即时早期(IE)基因的兴趣HSV基因组转染到提供生产病毒所需基因(诸如ICP4、ICP27和ICP0)的补充细胞系(参见,例如Samaniego,L.A.等人(1998)J.Virol.72:3307-20)。可以使用所描述的方法收获并纯化HSV载体(例如,Goins,WF等人,(2014)Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology 1144:63-79)。

[0168] 本文还提供了药物组合物,其包含含编码本公开文本的RNAi的转基因的重组病毒粒子以及药学上可接受的载体。药物组合物可适用于本文所述任何给药方式。可将包含编码本公开文本的RNAi的核酸的重组病毒粒子的药物组合物引入脑中。例如,可以在纹状体内给予包含编码本公开文本的RNAi的核酸的重组病毒粒子。可以使用本公开文本的任何重组病毒粒子,包括rAAV、腺病毒、慢病毒和HSV粒子。

[0169] 在一些实施方案中,包含含编码本文所述的本公开文本的RNAi的核酸的重组病毒粒子以及药学上可接受的载体的药物组合物适合给予至人类。此类载体在本领域中是众所周知的(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,第1035-1038页和第1570-1580页)。在一些实施方案中,包含本文所述rAAV和药学上可接受的载体的药物组合物适合注入哺乳动物脑中(例如,纹状体内给药)。在一些实施方案中,包含本文所述重组慢病毒粒子和药学上可接受的载体的药物组合物适合注入哺乳动物脑中(例如,纹状体内给药)。在一些实施方案中,包含本文所述重组腺病毒粒子和药学上可接受的载体的药物组合物适合注入哺乳动物脑中(例如,纹状体内给药)。在一些实施方案中,包含本文所述重组HSV粒子和药学上可接受的载体的药物组合物适合注入哺乳动物脑中(例如,纹状体内给药)。

[0170] 此类药学上可接受的载体可以是无菌液体,如水和油,所述油包括石油、动物、植物或合成源的那些油,如花生油、大豆油、矿物油等。盐水溶液和右旋糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于可注射溶液。药物组合物还可以包含另外的成分,例如防腐剂、缓冲剂、张力剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增粘剂等。本文所述的药物组合物可以按单一单位剂量或按多剂量形式包装。通常将组合物配制成无菌且基本上等渗的溶液。

[0171] VII. 制品和试剂盒

[0172] 还提供了用于在本文所述的方法中使用的试剂盒或制品。在一些方面,试剂盒包括处于合适包装中的本文所述组合物(例如,本公开文本的重组病毒粒子,诸如包含编码本公开文本的RNAi的核酸的rAAV粒子)。本文所述的用于组合物(例如纹状体内组合物)的合适包装在本领域中是已知的,并且包括例如小瓶(例如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶子、广口瓶、柔性包装(例如,密封的聚酯薄膜或塑料袋)等。可进一步将这些制品灭菌和/或密封。

[0173] 本发明还提供了包含本文所述组合物的试剂盒,并且还可以包括关于使用所述组

合物的方法(如本文所述的用途)的一个或多个说明书。本文所述的试剂盒可以进一步包括从商业和用户角度所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有用于实施本文所述任何方法的说明的包装说明书。例如,在一些实施方案中,试剂盒包括组合物,所述组合物包含用于将至少 $1 \times 10^9$ 个基因组拷贝递送至如本文所述哺乳动物(例如通过纹状体内给药)至灵长类动物的含编码文本RNAi的转基因的重组病毒粒子、适合注射至灵长类动物脑中的药学上可接受的载体、以及以下中的一者或者:缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和带有关于注射至灵长类动物脑中(例如纹状体内给药)的指示的包装说明书。在一些实施方案中,试剂盒包括用于以本文所述的重组病毒粒子治疗神经变性突触核蛋白病的说明书。在一些实施方案中,试剂盒包括根据本文所述任一方法使用本文所述的重组病毒粒子的说明书。

[0174] VIII.示例性实施方案

[0175] 1.一种包含第一链和第二链的RNAi,其中a)第一链和第二链形成双链体;b)第一链包含指导区,其中所述指导区包含与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO: 24)具有至少约90%同一性或与序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8)具有至少约90%同一性的核酸;以及c)第二链包括非指导区。

[0176] 2.实施方案1的RNAi,其中所述指导区包含核酸序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24),且所述非指导区包含序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO: 53)。

[0177] 3.实施方案1的RNAi,其中所述第一链包含与SEQ ID NO:24具有约90%同一性或与SEQ ID NO:53具有约90%同一性的核酸序列。

[0178] 4.实施方案1的RNAi,其中所述指导区包含核酸序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8),而所述非指导区包含序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA -3' (SEQ ID NO: 37)。

[0179] 5.实施方案1的RNAi,其中所述第二链包含与SEQ ID NO:37具有约90%同一性或与SEQ ID NO:37具有约90%同一性的核酸序列。

[0180] 6.实施方案1至5中任一项的RNAi,其中所述第一链与所述第二链借助能够形成环结构的RNA接头连接。

[0181] 7.实施方案6的RNAi,其中所述RNA接头包含4至50个核苷酸。

[0182] 8.实施方案6或7的RNAi,其中所述环结构包含4至20个核苷酸。

[0183] 9.实施方案6至8中任一项的RNAi,其中所述RNAi从5' 到3' 包含所述第二链、所述RNA接头和所述第一链。

[0184] 10.实施方案6至8中任一项的RNAi,其中所述RNAi从5' 到3' 包含所述第一链、所述RNA接头和所述第二链。

[0185] 11.实施方案10的RNAi,其中所述RNAi包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核酸序列。

[0186] 12.实施方案11的RNAi,其中所述RNAi包含与SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核苷酸序列约90%相同的核苷酸序列。

[0187] 13.实施方案1至12中任一项的RNAi,其中所述RNAi是小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

- [0188] 14. 实施方案1至13中任一项的RNAi，其中所述RNAi靶向编码与神经变性突触核蛋白病相关的多肽的RNA。
- [0189] 15. 实施方案14的RNAi，其中所述多肽是 $\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)。
- [0190] 16. 实施方案15的RNAi，其中 $\alpha$ 突触核蛋白是人 $\alpha$ -突触核蛋白。
- [0191] 17. 实施方案14至16中任一项的RNAi，其中所述神经变性突触核蛋白病是帕金森病(PD)、多系统萎缩症(MSA)、或路易体痴呆(DLB)。
- [0192] 18. 一种表达构建体，其包含编码实施方案1至17中任一项的RNAi的核酸。
- [0193] 19. 实施方案18的表达构建体，其中编码所述RNAi的所述核酸包含miRNA支架。
- [0194] 20. 实施方案18或19的表达构建体，其中编码所述RNAi的所述核酸可操作地连接至启动子。
- [0195] 21. 实施方案20的表达构建体，其中所述启动子选自巨细胞病毒(CMV)即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子；巨细胞病毒增强子/鸡 $\beta$ -肌动蛋白/兔 $\beta$ -球蛋白启动子(CAG)启动子、延长因子1- $\alpha$ 启动子(EF1- $\alpha$ )启动子、人 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶启动子、鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子、逆转录劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子、二氢叶酸还原酶启动子和13-肌动蛋白启动子。
- [0196] 22. 实施方案18至21中任一项的表达构建体，其中所述表达构建体还包含内含子。
- [0197] 23. 实施方案22的表达构建体，其中所述内含子是CBA内含子或hEF1 $\alpha$ 内含子。
- [0198] 24. 实施方案22的表达构建体，其中所述内含子是嵌合内含子。
- [0199] 25. 实施方案22的表达构建体，其中所述表达载体是自身互补的载体，并且所述内含子是8嵌合内含子。
- [0200] 26. 实施方案18至25中任一项的表达构建体，其中所述表达构建体还包含多腺苷酸化信号。
- [0201] 27. 实施方案26的表达构建体，其中所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号、SV40多腺苷酸化信号或HSV TK多腺苷酸化信号。
- [0202] 28. 一种载体，其包含实施方案18至27中任一项的表达构建体。
- [0203] 29. 实施方案28的载体，其中所述载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。
- [0204] 30. 实施方案29的rAAV载体，其中所述表达构建体的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITS)序列。
- [0205] 31. 实施方案30的rAAV载体，其中所述表达构建体的侧翼是两个AAV ITS。
- [0206] 32. 实施方案30或31的rAAV载体，其中所述AAV ITS是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITS。
- [0207] 33. 实施方案30至32中任一项的rAAV载体，其中所述AAV ITS是AAV2ITS。
- [0208] 34. 实施方案30至33中任一项的rAAV载体，其中所述载体还包含填充核酸。
- [0209] 35. 实施方案34的rAAV载体，其中所述填充核酸位于编码所述RNAi的所述核酸的上游或下游。
- [0210] 36. 实施方案30至35中任一项的rAAV载体，其中所述载体是自身互补的rAAV载体。

[0211] 37. 实施方案36的rAAV载体,其中所述载体包含编码所述RNAi的第一核酸序列和编码所述RNAi的互补体的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。

[0212] 38. 实施方案37的rAAV载体,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变AAV ITR连接,其中所述突变AAV ITR包含D区的缺失,且包含末端解析序列的突变。

[0213] 39. 一种细胞,其包含实施方案29至38中任一项的rAAV载体。

[0214] 40. 一种重组AAV粒子,其包含实施方案29至38中任一项的rAAV载体。

[0215] 41. 实施方案40的rAAV粒子,其中所述AAV病毒粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、AAV2-HBK0、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

[0216] 42. 根据实施方案40或41的rAAV粒子,其中所述ITR和所述rAAV病毒粒子的衣壳源自相同的AAV血清型。

[0217] 43. 根据实施方案40或41的rAAV粒子,其中所述ITR和所述rAAV病毒粒子的衣壳源自不同的AAV血清型。

[0218] 44. 根据实施方案43的rAAV粒子,其中所述ITR源自AAV2,且所述rAAV粒子的衣壳源自AAV1。

[0219] 45. 一种组合物,其包含实施方案40至44中任一项的rAAV粒子。

[0220] 46. 实施方案45的组合物,其中所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0221] 47. 一种试剂盒,其包含实施方案1至17中任一项的RNAi。

[0222] 48. 一种试剂盒,其包含实施方案40至44中任一项的AAV粒子。

[0223] 49. 一种试剂盒,其包含实施方案45或46的组合物。

[0224] 50. 实施方案47至49中任一项的试剂盒,其还包含使用说明书。

[0225] 51. 一种治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链或含有与序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链,以及含有第二核酸的第二链。

[0226] 52. 实施方案51的方法,其中第二核酸包含与序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的核酸或与序列5' -E1过客-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的核酸。

[0227] 53. 一种治疗哺乳动物的神经变性突触核蛋白病的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5' -UGCUCUUUGGUCUUCUCAGCC-3' (SEQ ID NO:24) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5' -GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3' (SEQ ID NO:53) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链,或含有与序列5' -UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3' (SEQ ID NO:8) 具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5' -UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3' (SEQ ID NO:37) 具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链。

[0228] 54. 一种抑制患有神经变性疾病的哺乳动物中的 $\alpha$ -突触核蛋白表达的方法,其包

括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5'-UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3'(SEQ ID NO:24)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3'(SEQ ID NO:8)具有至少约90%同一性的核酸的第一链,以及含有第二核酸的第二链。

[0229] 55.实施方案54的方法,其中第二核酸包含与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3'(SEQ ID NO:53)具有至少约90%同一性的核酸或与序列5'-UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3'(SEQ ID NO:37)具有至少约90%同一性的核酸。

[0230] 56.一种抑制患有神经变性疾病的哺乳动物中的 $\alpha$ -突触核蛋白表达的方法,其包括向所述哺乳动物给予RNAi,所述RNAi包含:含有与序列5'-UGCUCUUUGGUCUUCAGCC-3'(SEQ ID NO:24)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-GGCUGAGAACCAAAGAGUA-3'(SEQ ID NO:53)具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链,或含有与序列5'-UGGGCACAUUGGAACUGAGCA-3'(SEQ ID NO:8)具有至少约90%同一性的第一核酸的第一链以及含有与序列5'-UGCUCAGUCAAUGUGCCUA-3'(SEQ ID NO:37)具有至少约90%同一性的第二核酸的第二链。

[0231] 57.实施方案51至56中任一项的方法,其中第一链包含具有SEQ ID NO:24序列的核酸序列或具有SEQ ID NO:8序列的核酸。

[0232] 58.实施方案52、53、55或56中任一项的方法,其中第二链包含具有SEQ ID NO:53序列的核酸或具有SEQ ID NO:37序列的核酸。

[0233] 59.实施方案51至58中任一项的方法,其中所述第一链与所述第二链借助能够形成环结构的RNA接头连接。

[0234] 60.实施方案59的方法,其中所述RNA接头包含4至50个核苷酸。

[0235] 61.实施方案59或60的方法,其中所述环结构包含4至20个核苷酸。

[0236] 62.实施方案59至61中任一项的方法,其中所述RNAi从5'到3'包含所述第二链、所述RNA接头和所述第一链。

[0237] 63.实施方案59至61中任一项的方法,其中所述RNAi从5'到3'包含所述第一链、所述RNA接头和所述第二链。

[0238] 64.实施方案63的方法,其中所述RNAi包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核酸序列。

[0239] 65.实施方案64的方法,其中所述RNAi包含与SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63的核苷酸序列约90%相同的核苷酸序列。

[0240] 66.实施方案51至65中任一项的方法,其中所述RNAi在表达构建体上编码。

[0241] 67.实施方案51至66中任一项的方法,其中编码所述RNAi的所述核酸包含miRNA支架。

[0242] 68.实施方案51至67中任一项的方法,其中编码所述RNAi的所述核酸可操作地连接至启动子。

[0243] 69.实施方案68的方法,其中所述启动子能够在哺乳动物脑中表达所述RNAi。

[0244] 70.实施方案69的方法,其中所述启动子选自巨细胞病毒(CMV)即时早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT

启动子、LSP启动子、嵌合肝脏特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子；巨细胞病毒增强子/鸡β-肌动蛋白/兔β-球蛋白(CAG)启动子、延长因子1-α启动子(EF1-α)启动子和人β-葡糖醛酸酶启动子。

[0245] 71.实施方案68至70中任一项的方法，其中所述启动子是包含CMV增强子和鸡β-肌动蛋白启动子的杂合鸡β-肌动蛋白启动子(CBA)。

[0246] 72.实施方案66至71中任一项的方法，其中所述表达构建体还包含内含子。

[0247] 73.实施方案72的方法，其中所述内含子是CBA内含子。

[0248] 74.实施方案72的方法，其中所述内含子是嵌合内含子。

[0249] 75.实施方案74的方法，其中所述表达构建体是自身互补的载体，且所述内含子是δ嵌合内含子。

[0250] 76.实施方案66至75中任一项的方法，其中所述核酸还包含多腺苷酸化信号。

[0251] 77.实施方案76的方法，其中所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号。

[0252] 78.实施方案66至77中任一项的方法，其中所述表达构建体是由载体编码。

[0253] 79.实施方案78的方法，其中所述载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体。

[0254] 80.实施方案79的方法，其中所述表达构建体的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。

[0255] 81.实施方案80的方法，其中所述表达构建体的侧翼是两个AAV ITR。

[0256] 82.实施方案80或81的方法，其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV血清型ITR。

[0257] 83.实施方案80至82中任一项的方法，其中所述AAV ITR是AAV2 ITR。

[0258] 84.实施方案83的方法，其中所述rAAV载体从5'到3'包含AAV2 ITR、启动子、内含子、编码所述RNAi的核酸、多腺苷酸化信号和AAV2 ITR。

[0259] 85.实施方案84的方法，其中所述启动子是CBA启动子。

[0260] 86.实施方案84的方法，其中所述内含子是嵌合内含子、δ嵌合内含子或简短嵌合内含子嵌合体。

[0261] 87.实施方案86的方法，其中所述嵌合内含子是CBA+兔β球蛋白内含子。

[0262] 88.实施方案84至87中任一项的方法，其中所述多腺苷酸化信号是牛生长激素多腺苷酸化信号。

[0263] 89.实施方案83的方法，其中所述rAAV载体从5'到3'包含AAV2 ITR、CBA启动子、嵌合内含子、编码RNAi的核酸、牛生长激素多腺苷酸化信号和AAV2 ITR。

[0264] 90.实施方案89的方法，其中所述载体还包含填充核酸。

[0265] 91.实施方案90的方法，其中所述填充核酸包含人A1AT基因的内含子1。

[0266] 92.实施方案79至91中任一项的方法，其中所述载体是自身互补的载体。

[0267] 93.实施方案92的方法，其中所述载体包含编码所述RNAi的第一核酸序列和编码所述RNAi的互补体的第二核酸序列，其中所述第一核酸序列可与所述第二核酸序列沿着其大部分或所有长度形成链内碱基对。

[0268] 94.实施方案93的方法，其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列通过突变AAV ITR连接，其中所述突变AAV ITR包含D区的缺失，且包含末端解析序列的突变。

- [0269] 95. 实施方案79-94中任一项的方法,其中载体被包衣壳于rAAV粒子中。
- [0270] 96. 实实施方案95的方法,其中所述AAV病毒粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV2 V708K、AAV2-HBKO、AAVDJ8、AAVPHP.B、AAVPHP.eB、AAVBR1、AAVHSC15、AAVHSC17、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV、小鼠AAV或rAAV2/HBoV1血清型衣壳。
- [0271] 97. 根据实施方案95或96的方法,其中所述ITR和所述rAAV病毒粒子的衣壳源自相同的AAV血清型。
- [0272] 98. 根据实施方案95或96的方法,其中所述ITR和所述rAAV病毒粒子的衣壳源自不同的AAV血清型。
- [0273] 99. 实实施方案95至98中任一项的方法,其中所述rAAV病毒粒子包含AAV2衣壳。
- [0274] 100. 实实施方案99的方法,其中所述rAAV病毒粒子包含AAV1衣壳,且其中所述载体包含AAV2 ITR。
- [0275] 101. 实实施方案51至100中任一项的方法,其中实施方案95至100中任一项的rAAV粒子是在组合物中。
- [0276] 102. 实实施方案101的方法,其中所述组合物还包含药学上可接受的载体。
- [0277] **实施例**
- [0278] 通过参考以下实施例将更全面地理解本公开文本。然而,它们不应被解读为限制本公开文本的范围。应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且根据它们进行的各种修改或改变将为本领域技术人员知晓,并且应包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求的范围内。
- [0279] **实施例1:shmiRNA在体外减少人SNCA靶标。**
- [0280] 为了证明体外SNCA表达的减少,用编码候选RNAi序列的质粒和编码人SNCA cDNA A (NM\_000345.3) 的质粒(在巨细胞病毒增强子和hEF1a启动子/内含子的控制下,并且上述编码序列之后为Tbgh多聚A序列) 转染HEK293T细胞。共转染SNCA cDNA和miRNA质粒。
- [0281] **方法**
- [0282] **siRNA和质粒**
- [0283] 内部设计RNAi序列为与人/恒河猴/小鼠SNCA具有最大同源性,同时其与低脱靶潜力平衡。常规siRNA由Sigma合成。使用siSPOTR算法预测人转录组中的脱靶基因(万维网 <https://sispotr.icts.uiowa.edu/sispotr/tools.html>)。
- [0284] 将表达靶向SNCA的RNAi序列的质粒嵌入由巨细胞病毒增强子和hEF1a启动子/内含子驱动的鼠mir155支架内。RNAi序列可以在表1中找到。
- [0285] **体外细胞培养和转染**
- [0286] 使HEK293T细胞在DMEM+10%FBS+pen/strep中生长至约70%-90%汇合率。用Lipfectamine 2000(对于miRNA形式质粒)或RNAiMAX(对于siRNA形式)转染细胞。转染后三天,用磷酸盐缓冲盐水冲洗细胞,通过在还原型Laemmli缓冲液中使细胞裂解来制备全细胞提取物,并煮沸5分钟,然后在-20°C下储存。
- [0287] **蛋白质印迹和光密度测定法**
- [0288] 将细胞裂解物在4%-12%SDS-PAGE(Bio-Rad TGX<sup>TM</sup>)上运行。将蛋白质转移至硝

酸纤维素(Bio-Rad Transblot<sup>®</sup>)，在5%脱脂乳中封闭，并在4℃下与一抗孵育过夜。将一抗洗掉，用HRP标记的二抗孵育，并使用Femto ECL底物(Bio-Rad)检测HRP活性，并在Bio-Rad GelDoc<sup>™</sup>成像仪上成像。使用ImageJ软件(NIH)对条带进行定量。将α-突触核蛋白水平针对GAPDH或β-微管蛋白归一化以控制蛋白质上样。使用的抗体：α-突触核蛋白(BD610787)、GAPDH(Sigma G8795)、微管蛋白(BioLegend MMS-435P-100)。HRP-山羊抗小鼠或兔(CST 7076)。

[0289] 结果

[0290] 如图2所示，shmiRNA在体外降低人SNCA蛋白水平。19/27序列显示蛋白质水平降低超过50%。

[0291] 实施例2：shmiRNA在体外减少小鼠SNCA靶标。

[0292] 在此实验中使用与实施例1类似的方法，除了用编码指定的RNAi序列和小鼠SNCA cDNA的质粒转染HEK293T细胞。

[0293] 结果

[0294] 如图3所示，所指示的miRNA在体外降低了小鼠SNCA蛋白水平，其中14/27序列显示蛋白质水平降低超过50%。

[0295] 实施例3：siRNA在体外减少人和小鼠SNCA靶标。

[0296] 针对A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1、D2、E1和E2进行了使用siRNA形式的另外的实验，以提供关于靶标减少的另外的数据，因为这些siRNA形式被设计为具有附加特征，所述附加特征为具有与大鼠SNCA完全或显著的同源性，这使得实现灵活地选择可需要大鼠SNCA减少的神经变性的未来动物模型。

[0297] 方法

[0298] 体外细胞培养和转染

[0299] 使HEK293T细胞在DMEM+10%FBS+pen/strep中生长至约70%-90%汇合率。用Lipfectamine 2000(对于miRNA形式质粒)或RNAiMAX(对于siRNA形式)转染细胞。转染后三天，用磷酸盐缓冲盐水冲洗细胞，通过在还原型Laemmli缓冲液中使细胞裂解来制备全细胞提取物，并煮沸5分钟，然后在-20℃下储存。

[0300] 蛋白质印迹和光密度测定法

[0301] 将细胞裂解物在4%-12%SDS-PAGE(Bio-Rad TGX<sup>™</sup>)上运行。将蛋白质转移到硝酸纤维素(Bio-Rad Transblot<sup>®</sup>)中，在5%脱脂乳中封闭，并在4℃下与一抗孵育过夜。将一抗洗掉，与HRP标记的二级孵育，并使用Femto ECL底物(Bio-Rad)检测HRP活性，并在Bio-Rad GelDoc<sup>™</sup>成像仪上成像。使用ImageJ软件(NIH)对条带进行定量。将α-突触核蛋白水平针对GAPDH或β-微管蛋白归一化以控制蛋白质上样。使用的抗体：α-突触核蛋白(BD610787)、GAPDH(Sigma G8795)、微管蛋白(BioLegend MMS-435P-100)。HRP-山羊抗小鼠或兔(CST 7076)。

[0302] 结果

[0303] 如图4A-4D所示，所指示的siRNA在体外降低了人和小鼠SNCA水平，这是基于它们在miRNA形式中的表现所预期的。

[0304] 实施例4：所指示的RNAi的毒性和神经保护特性。

[0305] 使用分化为成熟多巴胺样神经元的Lund人中脑(LUHMES)细胞评价候选shmiRNA的

毒性和神经保护特性(10)。

[0306] 方法

[0307] 体外细胞培养和转染

[0308] 如(10)所述使LUHMES细胞(ATCC CRL-2927)生长并进行分化，并进行一些修饰以允许质粒DNA的电穿孔。简而言之，将LUHMES细胞在涂有聚-L-鸟氨酸和纤连蛋白的烧瓶上的增殖培养基(10)中传代培养。通过添加分化培养基(10)启动向多巴胺能细胞的分化。2天后将细胞解离，用所需DNA电穿孔(LONZA 4D Nucleofector<sup>TM</sup> X系统，根据制造商的说明书)，并在回收培养基中的96孔板中重新铺板，以使电穿孔毒性最小化。转染后4小时，将培养基更换回分化培养基。在转染后的指定天数处理和收集细胞以用于特定实验。

[0309] 体外神经保护测定

[0310] 在分化的第6天(转染的第4天)用指定浓度的鱼藤酮处理如上制备的LUHMES细胞。在用鱼藤酮处理后48小时，根据制造商的说明书(Promega)使用Cell TiterBlue<sup>®</sup>测定来测量细胞活力。在处理后24小时通过DCFDA试剂盒(Abcam)测量活性氧类(ROS)产生。将值针对未处理的对照转染细胞归一化。

[0311] 统计分析

[0312] 汇编来自细胞活力实验的数据，以对使用D1和E1序列的SNCA mRNA敲低%与针对鱼藤酮诱导毒性的神经保护%进行排序。如使用GraphpadPrism<sup>®</sup>(v6)计算的，SNCA敲低百分比与神经保护程度显著相关。

[0313] 结果

[0314] 如图5A和5B所示，SNCA敲低本身无毒，并且显著地防止细胞死亡(图5A)并降低鱼藤酮依赖性ROS产生(图5B)。对照、D1和E1序列本身不改变细胞活力。对照转染细胞的鱼藤酮处理导致约75%的细胞死亡，但用SNCA敲低载体转染显著地防止受到此毒性影响。

[0315] 如图6中所示，汇编来自细胞活力实验的数据，以对使用D1和E1序列的SNCA mRNA敲低%与针对鱼藤酮诱导毒性的神经保护百分比进行排序。SNCA敲低的程度与神经保护程度呈显著正相关，证明使用D1和E1序列减少SNCA mRNA是有效的神经保护策略。

[0316] 实施例5:D1和E1载体造成的体内靶标敲低

[0317] 为了确定SNCA的体内敲低，将编码D1、E1或对照RNAi序列的AAV载体注射到野生型小鼠的SNC中。注射后1个月收集SNC组织。将RNA分离并通过Taqman qPCR定量SNCA mRNA水平。将转录物的相对水平针对GAPDH归一化。

[0318] 方法

[0319] 病毒载体

[0320] 为了产生用于体内测试的rAAV病毒，将mir155盒克隆到含有1.6kb CAG启动子的AAV2 ITR质粒中，以便使用修饰的AAV2HBK0衣壳产生AAV病毒(WO 2015168666 A2)。通过三重转染方法在293细胞中产生所有病毒载体，并如(11)所述纯化。滴度通过qPCR来确定，并且表示为基因组拷贝(GC)/mL或总载体基因组(vg)

[0321] 动物

[0322] 雄性C57BL/6J小鼠(10-12周龄)购自法国Charles River Laboratories。在每个笼子中将动物圈养，四个一组，可自由获取食物和水，室温、湿度受到控制，处于12:12小时

光/暗循环下。

[0323] 立体定位注射

[0324] 通过腹膜内注射混合物(体积10mL/Kg)：氯胺酮(100mg/kg; Imalgene<sup>®</sup>; Merial, 法国)和甲苯噻嗪(10mg/Kg; Rompun; Bayer, 法国)来深度麻醉小鼠。在将动物置于立体定位框架(Kopf Instruments, 美国)之前, 将小鼠头皮剥离并用Vetidine(Vetoquinol<sup>®</sup>, 法国)消毒, 将局部麻醉剂布比卡因(2mg/kg, 体积为5ml/kg; Aguettant, 法国)皮下注射到头骨皮肤上, 并将Emla(Lidocaïne, Astrazeneca)应用于耳朵。在手术过程中, 通过维生素A Dulcis保护眼睛免受光照, 并且通过加热毯将体温保持恒定在37°C。

[0325] 在注射坐标上方的颅骨中形成一个小孔。将33规格套管(OD 0.254mm; Phymep)经柔性塑料管件连接至25μL的注射器, 所述注射器又连接至微灌注泵, 将所述套管根据Paxinos和Watson的小鼠位置集(2008)按以下坐标单侧插入左侧黑质致密部(SNpc)中: AP = 距前囟-2.92mm; ML=1.25mm; DV: 距硬膜-4.5mm。随机化后, 向小鼠(n=10/组)注射AAV。以0.2μL/min的速率进行输注, 并且注射1μL的最终体积。

[0326] 在最后一次注射后, 将套管在SNpc中维持另外5min以避免回流。然后将其从小鼠脑中缓慢移出, 并通过缝合闭合头皮。每天监测小鼠, 并且在手术后向它们皮下注射卡洛芬(5mg/kg sc; 体积5ml/kg; Rimadyl<sup>®</sup>, Zoetis)并腹膜内注射约200μL无菌盐水以防止脱水。然后将动物放入MediHeat<sup>®</sup>保温柜中, 直到它们完全清醒。注射后一个月, 用4%异氟烷麻醉动物, 并处理脑以用于免疫组织化学和生化分析。所有的实验都是盲法进行的。

[0327] 统计分析

[0328] 使用Prism软件(版本6, Graphpad<sup>®</sup>)使用单因素方差分析进行统计, 并在适用时进行多重比较(Dunnett检验)。

[0329] 结果

[0330] 如图7中所示, 相对于对照RNAi, D1和E1载体分别示出55%和66%的SNCA mRNA敲低, 证实使用AAV介导的对SNCA靶向miRNA的递送在体内靶结构中的显著靶mRNA敲低。

[0331] 如图8中所示, SNCA反义探针清楚地示出相对于对侧半球在吻侧至尾部的三个不同解剖水平的靶标减少。相对于未注射的半球, 对照RNAi病毒未示出SNCA mRNA的任何降低, 证实了效应的特异性。如图9中所示, VTA中的α-突触核蛋白信号需要被饱和以观察到体细胞的突触核蛋白表达, 从而排除了该脑区域中SNCA减少的任何确定。

[0332] 实施例6: 通过SNc免疫组织化学显示AAV-D1载体降低小鼠中的SNCA mRNA

[0333] 如实施例5中所述, 用对照或D1 AAV载体的1e9个GC单侧注射小鼠。将组织收集并在一个月后处理冠状切片以用于免疫组织化学(IHC), 以评估黑质致密部中的α-突触核蛋白水平。

[0334] 另外的方法

[0335] 免疫组织化学和ISH

[0336] 在4°C下将脑在4%甲醛中浸没固定至少2天, 并在30%蔗糖溶液中冷冻保存, 然后冷冻。将冷冻的脑沿着黑质(sn)的整个前后轴切成连续的冠状切片。将切片置于PBS-0.4%叠氮化钠中并在4°C下储存。

[0337] 随机选择的一系列20 $\mu\text{m}$ 厚的自由浮动切片用于用针对 $\alpha$ -syn的小鼠单克隆抗体(小鼠单克隆,1:2000,克隆42,BD transductions laboratories)进行免疫标记。此抗体可以检测小鼠 $\alpha$ -syn蛋白的内源性水平,所述 $\alpha$ -syn蛋白主要是在突触膜上定位,但也在腹侧被盖区(VTA)和SN的da神经元细胞体中定位。

[0338] 将切片在0.1m pbs-0.15% triton、来自牛皮肤的0.2%明胶(Sigma,G9391)溶液中冲洗3次并在封闭缓冲液(即,0.1m PBS-10%来自牛血清的白蛋白,Sigma,A8022)中预处理30分钟。然后在室温下将它们与0.1m PBS中的一抗溶液孵育过夜。在0.1m PBS-0.15% triton、0.2%明胶中冲洗后,缀合荧光色素的抗体(山羊抗小鼠647,Abcam 150119)用作二抗(在0.1m PBS中1:400,在黑暗中孵育90min,室温)。将切片在0.1m PBS-0.2%明胶溶液中冲洗2次,在PBS 0.1m中冲洗1次并固定(柔性载玻片,Dako)。将切片用延长的金抗褪色试剂(Invitrogen p36931)盖上盖玻片。

[0339] 荧光免疫标记的定性图像分析是在载玻片扫描仪系统(配备有具有荧光能力的BX61显微镜的Olympus DotSlide系统)上进行。

#### [0340] 结果

[0341] 如图9所示,与相同动物或对照注射动物的对侧SNc相比,细胞体中的SNCA蛋白明显由D1减少。来自相邻脑切片的ISH图像(下图,按照实施例5处理)示出D1 RNAi载体而非对照载体平行地减少了SNCA mRNA。这些数据证实靶向SNCA的miRNA的AAV递送示出在期望的脑区域中持久的mRNA敲低。

#### [0342] 实施例7:在载体AAVrh.10中的E1造成的体内靶标敲低

[0343] 为了确定SNCA的体内敲低并证实SNCA的敲低不依赖于AAV血清型,将编码E1或对照RNAi序列的AAV.rh10载体注射到野生型小鼠的SNc中。如前所述,用对照或AAV.rh10 E1载体的10e9个GC单侧注射小鼠。注射后1个月收集SNc组织。通过原位杂交定量SNCA mRNA表达,并通过免疫组织化学检测SNCA蛋白

#### [0344] 方法

##### [0345] 病毒载体

[0346] 为了产生用于体内测试的rAAV病毒,将mir155盒克隆到含有1.6kb CAG启动子的AAV2 ITR质粒中,以便使用AAV的rh.10血清型的衣壳产生AAV病毒(Gao,G.P.等人.,2002,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:11854-11859.)。通过三重转染方法在293细胞中产生所有病毒载体,并如(11)所述纯化。滴度通过qPCR来确定,并且表示为基因组拷贝(GC)/mL或总载体基因组(vg)。

##### [0347] 动物

[0348] 雄性C57BL/6J小鼠(10-12周龄)购自法国Charles River Laboratories。在每个笼子中将动物圈养,四个一组,可自由获取食物和水,室温、湿度受到控制,处于12:12小时光/暗循环下。立体定位注射

[0349] 通过腹膜内注射混合物(体积10mL/Kg):氯胺酮(100mg/kg;Imalgene<sup>®</sup>;Merial,法国)和甲苯噻嗪(10mg/Kg;Rompun;Bayer,法国)来深度麻醉小鼠。在将动物置于立体定位框架(Kopf Instruments,美国)之前,将小鼠头皮剥离并用Vetidine(Vetoquinol<sup>®</sup>,法国)消毒,将局部麻醉剂布比卡因(2mg/kg,体积为5ml/kg;Aguettant,法国)皮下注射到头骨皮

肤上，并将Emla (Lidocaïne,Astrazeneca) 应用于耳朵。在手术过程中，通过维生素ADulcis保护眼睛免受光照，并且通过加热毯将体温保持恒定在37°C。

[0350] 在注射坐标上方的颅骨中形成一个小孔。将33规格套管 (OD 0.254mm; Phymep) 经柔性塑料管件 (Tygon 0.254\*0.762, ref. AAD04091) 连接至25μL的注射器 (Exmire, ref. MS\* GF25) , 所述注射器又连接至微灌注泵 (CMA4004) , 将所述套管根据Paxinos和Watson的小鼠位置集 (2008) 按以下坐标单侧插入左侧黑质致密部 (SNpc) 中 : AP = 距前囟 -2.92mm ; ML = 1.25mm ; DV : 距硬膜 -4.5mm 。随机化后，向小鼠 (n=10/组) 注射AAV。以0.2μL/min的速率进行输注，并且注射1μL的最终体积。在最后一次注射后，将套管在SNpc中维持另外5min以避免回流。然后将其从小鼠脑中缓慢移出，并通过缝合闭合头皮。每天监测小鼠，并且在手术后向它们皮下注射卡洛芬 (5mg/kg sc; 体积5ml/kg; Rimadyl, Zoetis) 并腹膜内注射约200μL无菌盐水以防止脱水。然后将动物放入MediHeat®保温柜 (Peco services) 中，直到它们完全清醒。注射后一个月，用4% 异氟烷麻醉动物，并处理脑以用于免疫组织化学和生化分析。所有的实验都是盲法进行的。

#### [0351] 免疫组织化学和ISH

[0352] 在4°C下将脑在4%甲醛中浸没固定至少2天，并在30%蔗糖溶液中冷冻保存，然后冷冻。将冷冻的脑沿着黑质 (SN) 的整个前后轴切成连续的冠状切片。将切片置于PBS-0.4% 叠氮化钠中并在4°C下储存。

[0353] 随机选择的一系列20μm厚的自由浮动切片用于用针对α-Syn的小鼠单克隆抗体 (小鼠单克隆, 1:2000, 克隆42, BD Transductions laboratories) 进行免疫标记。此抗体可以检测小鼠α-Syn蛋白的内源性水平，所述α-Syn蛋白主要是在突触膜上定位，但也在腹侧被盖区 (VTA) 和SN的DA神经元细胞体中定位。

[0354] 对于α-syn IHC的酶促揭露，在一抗溶液中孵育后，将切片在室温下与生物素化的小鼠 IgG (BA 9200Vector Lot S0913, 稀释度1/400) 一起孵育90min，并且然后与过氧化物酶偶联的抗生物素蛋白复合物 (Vectastain®ABC试剂盒Elite, Vector PK 6100, 稀释度1/200) 一起孵育30分钟。将切片在过氧化物酶底物溶液 (0.1M PBS中含有0.003% 过氧化氢、0.05% 二氨基联苯胺四盐酸盐) 中短暂孵育，最后在NaCl 0.9% 溶液中冲洗。最后将切片固定在载玻片上，并在室温下干燥、脱水并用Eukitt盖上盖玻片。

[0355] 对于α-syn ISH研究，在固定于载玻片上的20μm厚的低温恒温器切片上的全自动RNAscope测定 (通过扩增靶标特异性信号而不是来自非特异性杂交的背景噪声来改善RNA ISH的信噪比) 是在Roche Ventana Medical Systems DISCOVERY XT (VS) 自动机上进行。将RNAscope 2.5VS反义探针-Hs-SNCA (目录号313289) 和对照有义探针 (目录号511079) 在43 °C杂交2h，然后使用VS检测试剂进行RNAscope扩增和红色色原体检测。如特此描述的设计RNAscope探针。使用40X物镜，用VS120 Olympus系统扫描染色的载玻片。

#### [0356] 统计分析

[0357] 使用Prism软件 (版本6, Graphpad®) 使用单因素方差分析进行统计，并在适用时进行多重比较 (Dunnett检验) 。

#### [0358] 结果

[0359] 如图10所示，与相同动物或对照注射动物的对侧SNc相比，细胞体中的SNCA蛋白明

显由AAVrh.10衣壳中的构建体E1减少(上图)。来自相邻脑切片的ISH图像(下图)示出AAVrh.10造成SNCA mRNA的平行靶标减少,但在对侧半球中没有减少。相对于未注射的半球,对照RNAi病毒未示出SNCA mRNA的任何降低,证实了效应的特异性。本文证实,至少在载体的黑质内注射后,E1对SNCA的敲低效率不依赖于衣壳的血清型。

[0360] 实施例8:D1和E1的潜在脱靶基因

[0361] 使Lund人中脑(LUHMES)细胞在培养物中分化,然后在优化的鼠内源miR-155支架(ThermoFisher)上表达D1、E1或CTL3(对照)微小RNA的质粒转染。使用miRNeasy<sup>®</sup>试剂盒(Qiagen)从细胞中分离总RNA,并使用TruSeq成链总RNA文库制备试剂盒(TruSeq stranded Total RNA Library Prep kit,Illumina)制备下一代测序文库,然后在Illumina HiSeq仪器(Genewiz,Plainfield NJ)上测序。

[0362] 使用Array Studio(Omicsoft,A Qiagen Company)在Sanofi的基因组学小组中进行测序分析。除去低质量读段,并且将剩余的读段定位于人类基因组,然后进行单因素方差分析以确定处理组中显著差异表达的基因(DEG)。由D1和E1二者对比CTL3下调(p值小于0.05)的基因被认为是敲低α-突触核蛋白的结果,并且下调至少1.2倍(p值<0.05)的其余基因被归类为潜在的脱靶基因。D1将α-突触核蛋白敲低22%,E1降低30%,其中各个数据点如下图11所示。D1和E1的潜在脱靶基因列于表2和表3中。D1列表中的TNFRSF6B仅是NCKU数据库中的预测肿瘤抑制因子,并且E1列表中的基因在NCKU或TSGene数据库中均未被预测为肿瘤抑制因子。潜在脱靶基因的D1和E1列表都与使用miRanda、siSPOTR和TargetRank(数据未包括)算法鉴定的针对D1和E1微小RNA的预测靶标重叠。

[0363] 表2.潜在的D1脱靶基因

基因名称	基因描述	D1_CTL3_倍数	p值
AC005943.1	新的转录物, UQCR11与MBD3之间通读	0.51	0.0478
LRRC4B	含有4B的富亮氨酸重复序列	0.74	0.0139
NPIPA7	核孔复合物相互作用蛋白家族成员A7	0.74	0.003
SNURF	SNRPN上游阅读框	0.75	0.0106
ZNF580	锌指蛋白580	0.77	0.0239
CBWD3	包含3的COBW结构域	0.77	0.0072
AC092647.5	新型锌指蛋白713(ZNF713)和线粒体核糖体蛋白S17(MRPS17)蛋白	0.78	0.0068
FAM71F2	具有序列相似性的家族71成员F2	0.78	0.0157
HIST4H4	组蛋白簇4 H4	0.79	0.0028
RTEL1-TNFRSF6B	RTEL1-TNFRSF6B通读(NMD候选者)	0.80	0.0028
PDF	肽脱甲酰酶(线粒体)	0.80	0.0423
HAGHL	羟基酰基谷胱甘肽水解酶样	0.82	0.0426
KISS1R	KISS1受体	0.82	0.0203

[0365] 表3.潜在的e1脱靶基因

基因名称	基因描述	E1_CTL3_倍数	p值
AC010616.2	新蛋白,ATP1A3-RABAC1通读	-2.21	0.0014
AC117378.1	新蛋白	-1.43	0.0362
AL662899.2	新蛋白	-1.28	0.0099

NUCD2	包曾2的Nudc结构域	-1.24	0.0106
SYNJ2BP-COX16	SYNJ2BP-COX16通读	-1.23	0.0231
AL109811.4	新蛋白	-1.22	0.0104

[0367] 参考文献

[0368] 1.S.T.Baek et al.,Off-target effect of doublecortin family shRNA on neuronal migration associated with endogenous microRNA dysregulation.Neuron 82,1255-1262 (2014) .

[0369] 2.W.Dauer et al.,Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99,14524-14529 (2002) .

[0370] 3.R.E.Drolet,B.Behrouz,K.J.Lookingland,J.L.Goudreau,Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration.Neurotoxicology 25,761-769 (2004) .

[0371] 4.D.Alvarez-Fischer et al.,Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice.Experimental neurology 210,182-193 (2008) .

[0372] 5.P.Klivenyi et al.,Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins.Neurobiology of disease 21,541-548 (2006) .

[0373] 6.S.Mittal et al.,beta2-Adrenoreceptor is a regulator of the alpha-synuclein gene driving risk of Parkinson's disease.Science 357,891-898 (2017) .

[0374] 7.H.Javed et al.,Development of Nonviral Vectors Targeting the Brain as a Therapeutic Approach For Parkinson's Disease and Other Brain Disorders.Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 24,746-758 (2016) .

[0375] 8.K.Ubhi et al.,Alpha-synuclein deficient mice are resistant to toxin-induced multiple system atrophy.Neuroreport 21,457-462 (2010) .

[0376] 9.Y.Lim et al.,alpha-Syn suppression reverses synaptic and memory defects in a mouse model of dementia with Lewy bodies.The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience 31,10076-10087 (2011) .

[0377] 10.S.Schildknecht et al.,Generation of genetically-modified human differentiated cells for toxicological tests and the study of neurodegenerative diseases.Altex 30,427-444 (2013) .

[0378] 11.X.Xiao,J.Li,R.J.Samulski,Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus.Journal of virology 72,2224-2232 (1998) .

[0379] 序列

[0380] 除非另有说明,否则所有多肽序列均以N-末端到C-末端呈现。除非另有说明,否则所有核酸序列均以5' 到3' 呈现。



TCTCAGCGTTGGCCACTGACTGACGGCTGAGAACCAAAGAGTACAGGACACAAGGCCTGTTACTGCACTCAC  
ATGGAACAAATGGCCCAGATCTGGCCGACTCGAGATATCGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTAGTT  
GCCAGCCATCTGTTGCCCTCCCCGTGCCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTTCATA  
ATAAAATGAGGAATTGCATCGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGC  
AAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGAGCTAGAGTCGACCGGACGGTGGAAAGTCCTCTCC  
TCGGTGCCTTGACTTCAAAGGGTCTCTCCATTGCCTGGAGAGAGGGAAAGGTGGCATCACCAGGGTGAGTG  
AAGGTTGGAAGAGTGTAGCAGAATAAGAAACCATGAGTCCCCTCCCTGAGAAGCCCTGAGCCCCCTGACGACAC  
ACATCCCTCGAGGCTCAGCTCATCTGTAAAAGGTGCTGAAACTGACCATCCAAGCTGCCAAAAAGATTGTG  
TGGGATAATTCAAAACTAGAGGAAGATGCAGAATTCTACATCGTGGCATGTCAGGCTAAGAGATGCCATCGTG  
GCTGTGCATTATTGGAATCATATGTTATTGAGGGTGTCTGGATATTACAATAAAATGTTGGAGCAGTCAG  
GCATATTGGTACCTCTGCTAAGGCTCCCTGCCCTGTTAATTGGCAGCTCAGTTATTCCAGGGCAAACA  
TTCTGCTTACTATTCTGAGAGCTTCCTCATCCTCTAGATTGGCAGGGAAATGCAGATGCCCTGAGCAGCCTCCC  
CTCTGCCATACCAACAGAGCTTCACCATCGAGGCATGCAGAGTGGACAGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCT  
TTCTCATTGGACAGAAGGAGGAGCTGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCACTAAGGCCACAGCAGGCCAGGA  
CTTAGCTGTGCTGACTGCAGCCTGGCTGCCACTGCCCTCCTTGCTCAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTG  
GAGGAAGCAGCCCCTGCCCTGCCCTCCACCTCCCCTATGCTGTTCCCTGGGACAGTGGAGCTGGCTTA  
GAATGCCCTGGGCCCCCAGGACCCCTGGCATTTAACCCCTCAGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATAACAGAAGAGT  
CCATCACCTGCTGTATGCCACACACCACAGTCGACATTAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGCC  
ACTCCCTCTCGCGCTCGCTCGACTGAGGCCGCCGGCAAAGGCCGGCTCGGCGACCTTGGCGC  
CGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCAA (SEQ ID NO:65)。

[0391] A1AT填充核酸

[0392] ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGG  
GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGAGCTAGAGTCGACCGGACCCGTGGAAGTCCTCTCCTCGGTGCTCTGACT  
TCAAAGGTCTCTCCATTGCCTGGAGAGAGGGAAAGGTGGCATCACCAGGGTGAGTGAGTTGGAAGAGT  
GTAGCAGAATAAGAAACCATGAGTCCCCTCCCTGAGAAGCCCTGAGCCCCCTGACGACACACATCCCTCGAGGCT  
CAGCTTCATCATCTGTAAAAGGTGCTGAAACTGACCATCCAAGCTGCCAAAAAGATTGTGTTGGATAATTCAA  
ACTAGAGGAAGATGCAGAATTCTACATCGTGGCATGTCAGGCTAAGAGATGCCATCGTGGCTGTGATT  
TGAATCATATGTTATTGAGGGTGTCTGGATATTACAATAAAATGTTGGAGCATCAGGCATATTGGTACCT  
TCTGTCTAAGGCTCCCTGCCCTGTTAATTGGCAGCTCAGTTATTCCAGGGCAAACATTCTGCTTACTATT  
CTGAGAGCTTCATCCTAGATTGGCAGGGAAATGCAGATGCCTGAGCAGCCTCCCTGCCATACCAAC  
AGAGCTTCACCATCGAGGCATGCAGAGTGGACAGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCAGCTTCTCATTGGACAGA  
AGGAGGAGACTGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCACTAAGGCCACAGCAGGCCAGGACTTAGCTGTGCTGA  
CTGCAGCCTGGCTGCCACTGCCCTCCTTGCCCTAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCT  
GGCCTTGCCCTCCACCTCCCCTATGCTGTTCCCTGGGACAGTGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGCC  
CCCAGGACCCCTGGCATTAAACCCCTCAGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATAACAGAAGAGTCACACCTGCTGTA  
TGCCACACACCACAGTCGACATTAAATT (seq Id NO:66)

## 序列表

<110> 建新公司 (Genzyme Corporation)

<120> 针对α-突触核蛋白的变体RNAi

<130> 15979-20165.40

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> US 62/714,616

<151> 2018-08-03

<160> 70

<170> Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

caucggAACU gagcacUUGU a 21

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

aggUUCGUAG UCUUGAUACC CU 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

uuAACCgCCA CUUUCUAACC uu 22

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 4

acguuggaac ugagcacuug u 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

uuccaaacauu ugucacuugc u 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

ucguccaaca uuugucacuu g 21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

ugggcgcauu ggaacugagc a 21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

ugggcacauu ggaacugagc a 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

gucguugaaau ggccacuccc a 21

<210> 10

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

gguucguagu cuugauaccc uu 22

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

uagcagcagc cacaacuccc u 21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

uucgaacauu ugucacuugc u 21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

uagccgcccc aacuccuccc u 21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 14  
ugcgcuuugg ucuucucagc c 21  
<210> 15  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 15  
uagccgcagc cacaacuccc u 21  
<210> 16  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 16  
uagcagccac aacuccucc u 21  
<210> 17  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 17  
ucggcacauu ggaacugagc a 21  
<210> 18  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 18  
augacggggc acauuggaac u 21  
<210> 19

<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 19  
augacugggc acauuggaac u 21  
<210> 20  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 20  
uaagucguag ucacuuagg g 21  
<210> 21  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 21  
cuccgcagca gccacaacuc c 21  
<210> 22  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 22  
ucaugacugg gcacauugg a 21  
<210> 23  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 23  
aaauacgugg uagucacuua g 21

<210> 24  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 24  
ugcucuuugg ucuucucagc c 21  
<210> 25  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 25  
aacguuuguc acuugcucuu u 21  
<210> 26  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 26  
aaauaaagugg uagucacuuua g 21  
<210> 27  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 27  
uuagaaaaaa gugguaguca c 21  
<210> 28  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 28

aauacguggu agucacuuag g 21  
<210> 29  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 29

acugcgcaca uuggaacuga g 21  
<210> 30  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 30

uacaagugca guuccgaug 19  
<210> 31  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 31

aagguaugaa uggcgguuua 20  
<210> 32  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 32

aagguaugaa uggcgguuua 20  
<210> 33  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体

<400> 33  
acaagugcag uuccaacgu 19  
<210> 34  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 34  
agcaagugaa auguuggaa 19  
<210> 35  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 35  
caagugacau guuggacga 19  
<210> 36  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 36  
ugcucaguca augcgccua 19  
<210> 37  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 37  
ugcucaguca augugccua 19  
<210> 38  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>

<223> 合成构建体  
<400> 38  
ugggagugca uucgacgau 19  
<210> 39  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 39  
aaggguauca acuacgaacc 20  
<210> 40  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 40  
agggaguugg cugcugcua 19  
<210> 41  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 41  
agcaagugaa auguucgaa 19  
<210> 42  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 42  
aggagggaug uggcgccua 19  
<210> 43  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 43  
ggcugagaac caaagcgua 19  
<210> 44  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 44  
agggaguugg cugcggcua 19  
<210> 45  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 45  
aggagggaug uggcugcua 19  
<210> 46  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 46  
ugcucaguca augugccga 19  
<210> 47  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 47  
aguuccaaug ccccguaau 19  
<210> 48  
<211> 19  
<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 48

aguuccaaug cccagucau 19

<210> 49

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

caccuaagac uacgacuu 19

<210> 50

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50

ggaguugucu gcugcggag 19

<210> 51

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

uuccaaugcc cagucauga 19

<210> 52

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

cuaagugaac cacguauuu 19

<210> 53

<211> 19

<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 53  
ggcugagaac caaagagua 19  
<210> 54  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 54  
aaagagcaug acaaacgguu 19  
<210> 55  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 55  
cuaagugaac cacuuauuu 19  
<210> 56  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 56  
gugacuaccu uauuucuaa 19  
<210> 57  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 57  
ccuaagugua ccacguauu 19  
<210> 58

<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 58  
cucaguucau gugcgcagu 19  
<210> 59  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 59  
gttttggcca ctgactgac 19  
<210> 60  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 60  
guuuuuggcca cugacugac 19  
<210> 61  
<211> 59  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 61  
ugcucuuugg ucuucucagc cguuuuggcc acugacugac ggcugagaac caaagagua 59  
<210> 62  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 62  
tgctcttgg tcttctcagc cgaaaaaaggcc actgactgac ggctgagaac caaagagta 59

<210> 63  
<211> 59  
<212> RNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 63  
ugggcacauu ggaacugagc aguuuuggcc acugacugac ugcucaguca augugccua 59  
<210> 64  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 64  
tgggcacatt ggaactgagc agtttggcc actgactgac tgctcagtca atgtgccta 59  
<210> 65  
<211> 3455  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 65  
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgcccggc aaagcccg 60  
cgtcgccgca cctttggctcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgac agagggagt 120  
gccaactcca tcactaggg ttccttacgt acaattggta tcccgaccg tcgacattga 180  
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggcat tagttcatag cccatatatg 240  
gagttcccg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc 300  
cgccccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat 360  
tgacgtcaat gggtgagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat 420  
catatgcca gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat 480  
gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcata 540  
gctattacca tggcgtgg gagccccacg ttctgcttca ctctccccat ctcccccccc 600  
tccccacccc caattttgtt tttattttt ttttaattat tttgtgcagc gatggggcg 660  
gggggggggg gggggcgccg gccaggcg gcggggcg gcgaggggcg gggcgccg 720  
aggcggagag gtgcggcg agccaatcag agcggcg tccgaaagtt tcctttatg 780  
gchgaggcg ggcggcg gcccataaa aagcgaagcg cgccgg gggagtcg 840  
tgcgacgctg cttcgcccc gtgcggcg ccggccgc ctcgcgc ccggccggc 900  
tctgactgac cgcttactc ccacaggtga gcgccgg cggcccttct cctccggc 960

gtaattagcg ctgggtttaa tgacggcttg tttctttct gtggctgcgt gaaagcctg 1020  
 aggggctccg ggagggccct ttgtgcgggg ggagcggc tcgcgtgtg 1080  
 tgtgcgtggg gagcgccgca tgccgctccg cgctgccgg cggctgtgag cgctgcggc 1140  
 gcggcgccgg gctttgtgcg ctccgcagtgc tgccgcaggg gagcgccggc gggggcggtg 1200  
 ccccgcggc tgcgaggga acaaaggctg cgtgcgggt gtgtgcgtgg 1260  
 ggggtgagc aggggtgtg ggcgcgtcgg tcgggctgca accccccctg cacccccctc 1320  
 cccgagttgc tgagcacggc ccggcttcgg gtgcgggct ccgtacggg cgtggcgcgg 1380  
 ggctcgccgt gccggcgccgg gggtggcggc aggtgggggt gccggcgccgg gcggggccgc 1440  
 ctcggccgg ggagggctcg ggggaggggc gcggcgccccc ccggagcgcgc ggcggctgtc 1500  
 gagggcgcggc gagccgcagc cattgcctt tatgtaatc gtgcgagagg ggcgcaggac 1560  
 ttccttgc ccaaatactgt gcggagccga aatctggag gcccgcgc accccctcta 1620  
 gcgggcgcgg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 1680  
 gtgcgtcgcc gcgcgcgcgt cccctctcc ctctccagcc tcgggctgt ccgcgggggg 1740  
 acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1800  
 gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ctttcttctt tttcctacag ctcctggca 1860  
 acgtgttgtt tattgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attttcgaa agatctgcta 1920  
 gccttagactg gaggcttgct gaaggctgta tgctgtgctc tttggcttc tcagccgtt 1980  
 tggccactga ctgacggctg agaaccaaag agtacaggac acaaggcctg ttactagcac 2040  
 tcacatggaa caaatggccc agatctggcc gcactcgaga tatcgagctc gctgatcagc 2100  
 ctcgactgtc ccttctagtt gccagccatc tgggtttgc ccctcccccg tgccttcctt 2160  
 gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 2220  
 ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggaa 2280  
 ggattggaa gacaatagca ggcatgctgg ggagctagag tcgaccggac cggtgtggaa 2340  
 cctcttcctc ggtgtccttgc acttcaaagg gtctctccca tttgcctgga gagaggggaa 2400  
 ggtggccatc accaggggtg agtgaagggtt tggaagagtg tagcagaata agaaaccatg 2460  
 agtcccttcctc ctgagaagcc ctgagcccc ttgacgacac acatccctcg aggctcagct 2520  
 tcatcatctg taaaaggtgc tgaaactgac catccaagct gccaaaaaag attgtgtggg 2580  
 gataattcaa aactagagga agatcgagaa tttctacatc gtggcgatgt caggctaaga 2640  
 gatgccatcg tggctgtgca ttttattgg aatcatatgt ttatttgagg gtgtcttgaa 2700  
 tattacaat aaaatgtgg agcatcaggc atatttgta cttctgtct aaggctccct 2760  
 gcccctgtt aattggcagc tcagttattc atccaggca aacattctgc ttactattcc 2820  
 tgagagctt cctcatcctc tagattggca gggaaatgc agatgcctga gcagcctccc 2880  
 ctctggccata ccaacagagc ttccacatcg aggcatgcag agtggacagg ggcctcagg 2940  
 acccctgatc ccagcttct cattggacag aaggaggaga ctggggctgg agagggacct 3000  
 gggcccccac taaggccaca gcagagccag gacttagct gtgtcgactg cagcctggct 3060  
 tgcctccact gccccttgc cctcaagag caagggagcc tcagagtggaa ggaagcagcc 3120  
 cctggccttgc cctccacccat cccctccct atgctgttt cttggacag tggagctgg 3180  
 cttagaatgc cttggggccc ccaggaccct ggcattttaa cccctcagg gcaggaaggc 3240  
 agcctgagat acagaagagt ccatcacctg ctgtatgcca cacaccatcc ccacagtcga 3300

catttaaatt aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg 3360  
 ctcactgagg cgcggccggc aaagcccggg cgtcgccgca cctttggcgtc cccggcctca 3420  
 gtgagcgagc gagcgccgac agagggagtg gccaa 3455  
 <210> 66  
 <211> 1091  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <400> 66  
 attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt gggcaggac agcaaggggg 60  
 aggattggga agacaatagc aggcatgctg gggagctaga gtcgaccgga ccgggtgaaag 120  
 tcctcttcctt cggtgtcctt gacttcaaag ggtctctccc atttgcctgg agagagggga 180  
 aggtgggcat caccagggtt gagtgaaggt ttgaaagagt gtagcagaat aagaaaccat 240  
 gagtccttc cctgagaagc cctgagcccc cttgacgaca cacatccctc gaggctcagc 300  
 ttcatcatct gtaaaagggtt ctgaaactga ccatccaagc tgccgaaaaa gattgtgtgg 360  
 ggataattca aaactagagg aagatgcaga atttctacat cgtggcgatg tcaggctaag 420  
 agatgccatc gtggctgtgc attttattt gaatcatatg tttatggag ggtgtcttgg 480  
 atattacaaa taaaatgttg gagcatcagg catatttgtt acttctgtc taaggctccc 540  
 tgcccttgtt taattggcag ctcagtttattt catccaggc aaacattctg cttactattc 600  
 ctgagagctt tcctcatctt ctagattggc agggaaatg cagatgcctg agcagcctcc 660  
 cctctgccat accaacagag cttcaccatc gaggcatgca gagtggacag gggcctcagg 720  
 gacccctgtt cccagcttcc tcattggaca gaaggaggag actggggctg gagagggacc 780  
 tgggccccca ctaaggccac agcagagccaa ggacttttagc tgtgctgact gcagcctggc 840  
 ttgcctccac tgccctcctt tgcctcaaga gcaagggagc ctcagagtgg aggaaggcagc 900  
 ccctggcctt gcctcccacc tcccccccc tatgctgttt tcctggaca gtgggagctg 960  
 gcttagaatg ccctggggcc cccaggaccc tggcattta acccctcagg ggcaggaagg 1020  
 cagcctgaga tacagaagag tccatcacct gctgtatgcc acacaccatc cccacagtcg 1080  
 acatttaat t 1091  
 <210> 67  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <400> 67  
 ctggaggcctt gctgaaggct gtatgctgca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat 60  
 ggaacaaatg gc 72  
 <210> 68

<211> 128  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 68  
ctggaggcgt gctgaaggct gtatgctgta cgatctaata tcgctcgaaa tggccactga 60  
ctgacgagcg atatgatcg acgacaggac acaaggcctg ttactagcac tcacatggaa 120  
caaatggc 128  
<210> 69  
<211> 145  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<210> 69  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 69  
cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60  
ccgggcttg cccgggcfg 78  
<210> 70  
<211> 145  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 70  
ttggccactc cctctctgctcg cgctcgctcg ctcactgagg ccggccgggc aaagccggg 60  
cgtcgggcga cctttggctcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgac agagggagtg 120  
gccaactcca tcactagggg ttcct 145

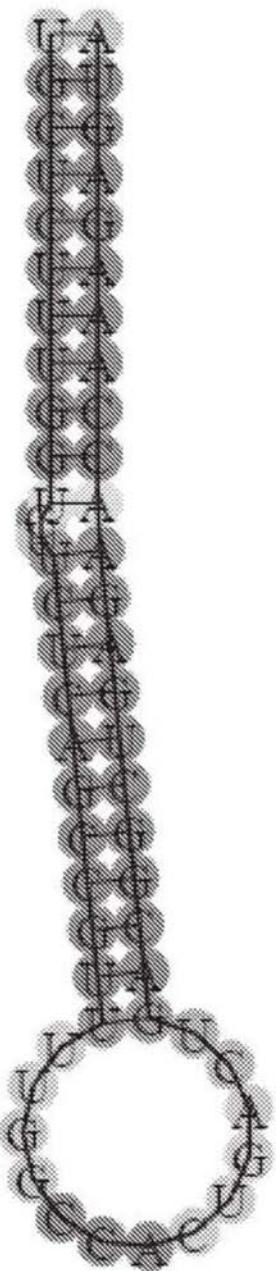


FIG.1A



FIG. 1B

人 SNCA

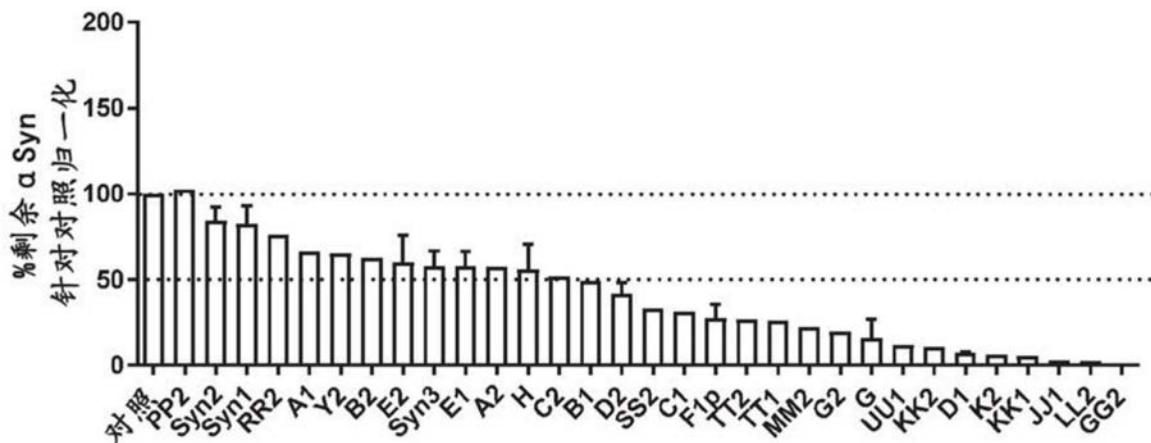


FIG. 2

小鼠 SNCA

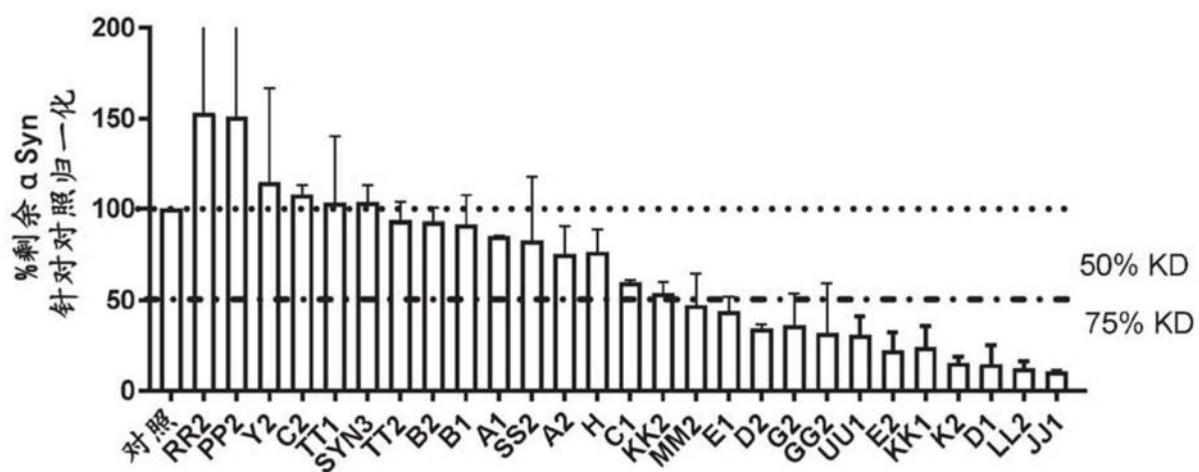


FIG. 3

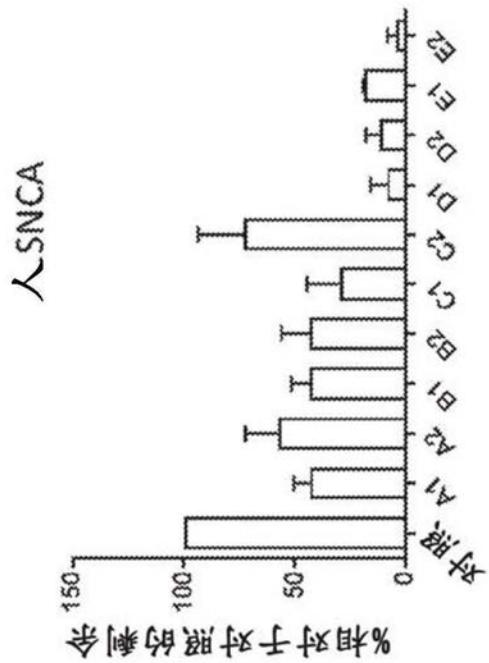


FIG. 4A

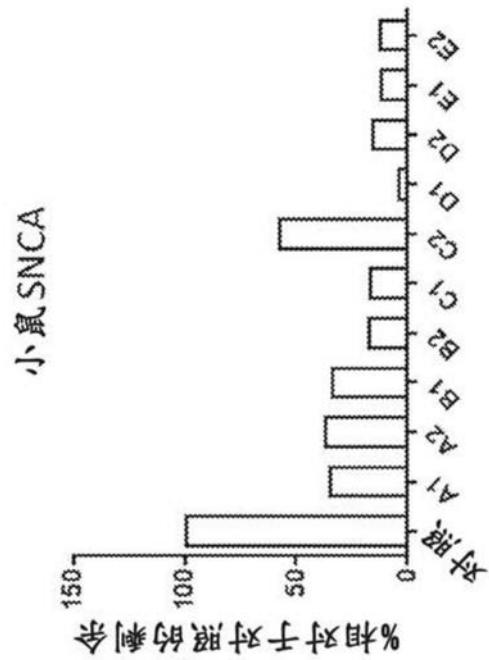


FIG. 4B



FIG. 4C

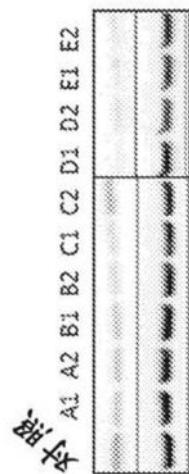


FIG. 4D

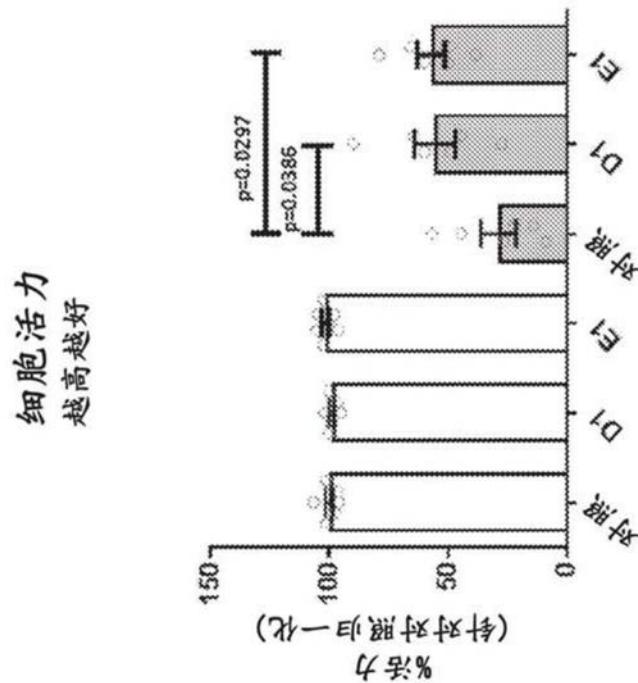


FIG.5A

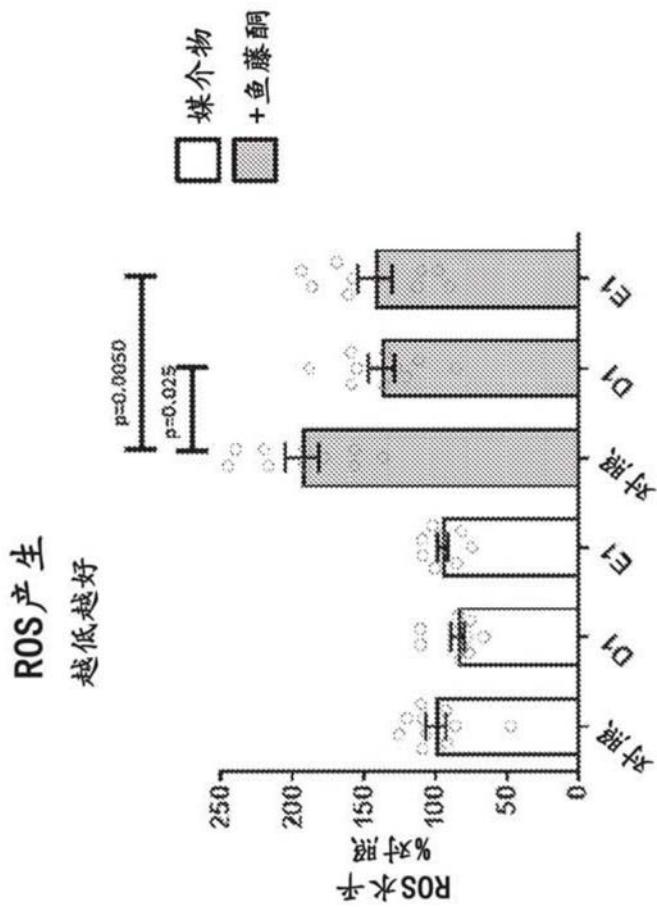
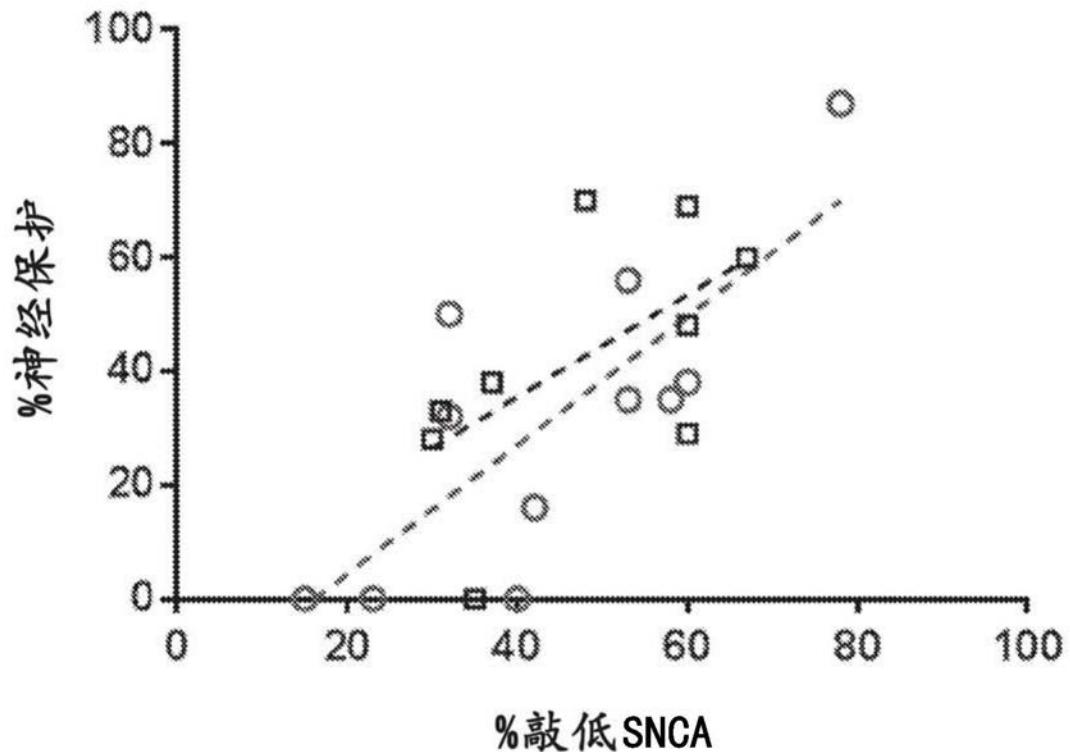


FIG.5B



◎D1相关: Pearson相关系数= 0.7044, p=0.0189 \*\*  
 □E1相关: Pearson相关系数= 0.6420, p=0.0498 \*

FIG.6

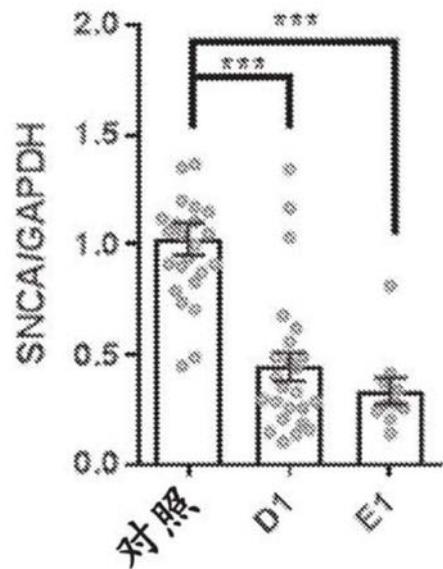


FIG.7

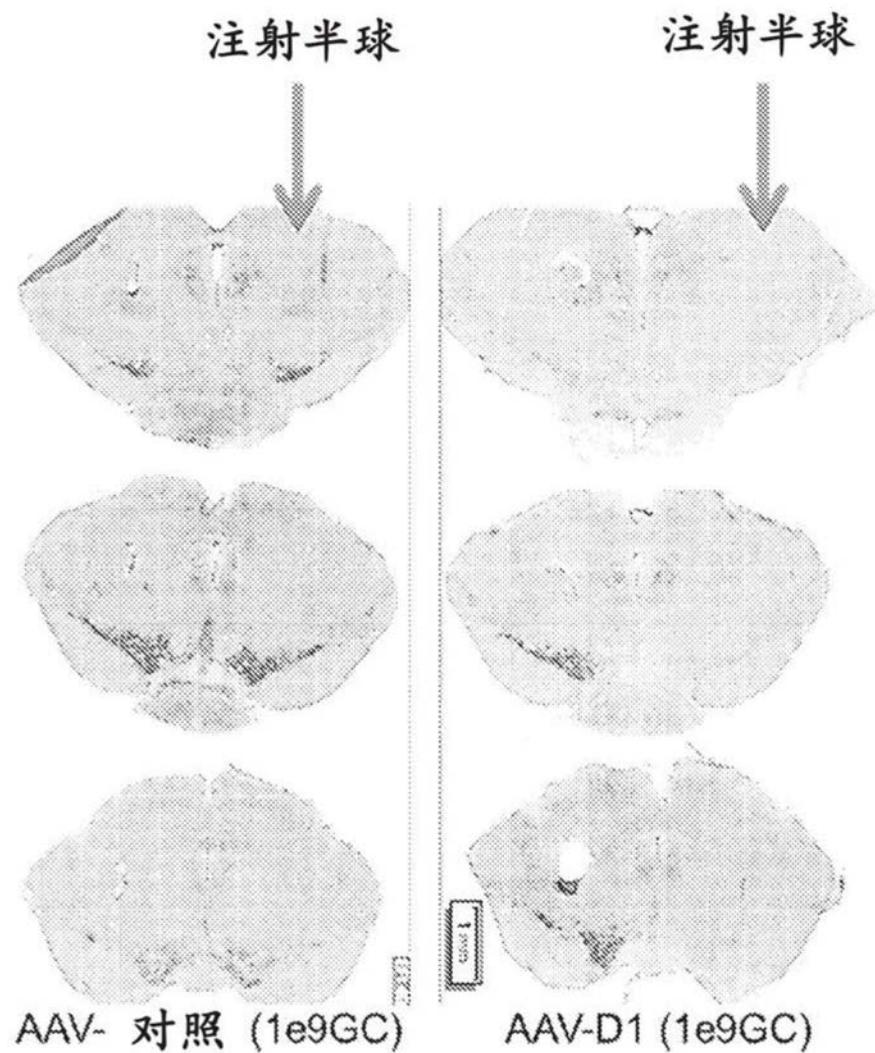


FIG.8

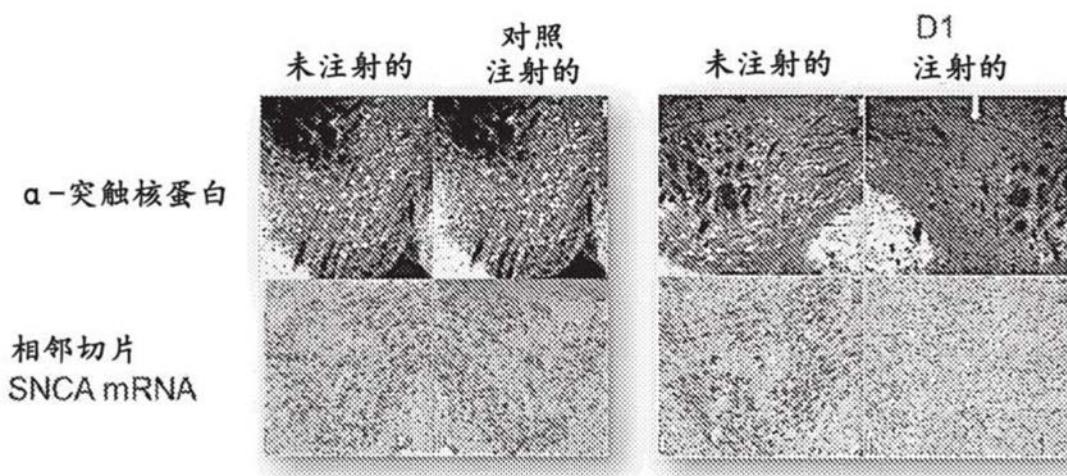


FIG.9

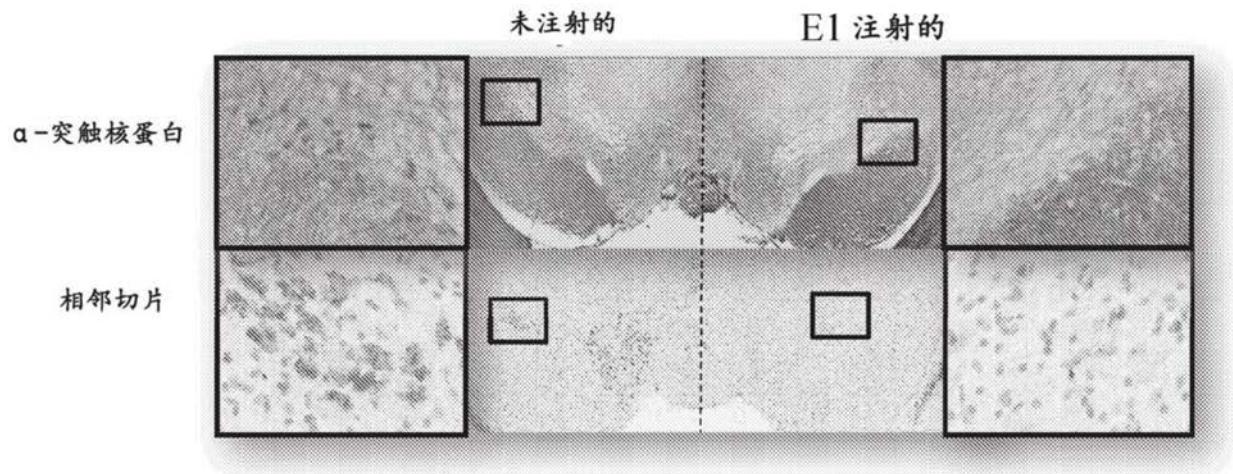


FIG.10

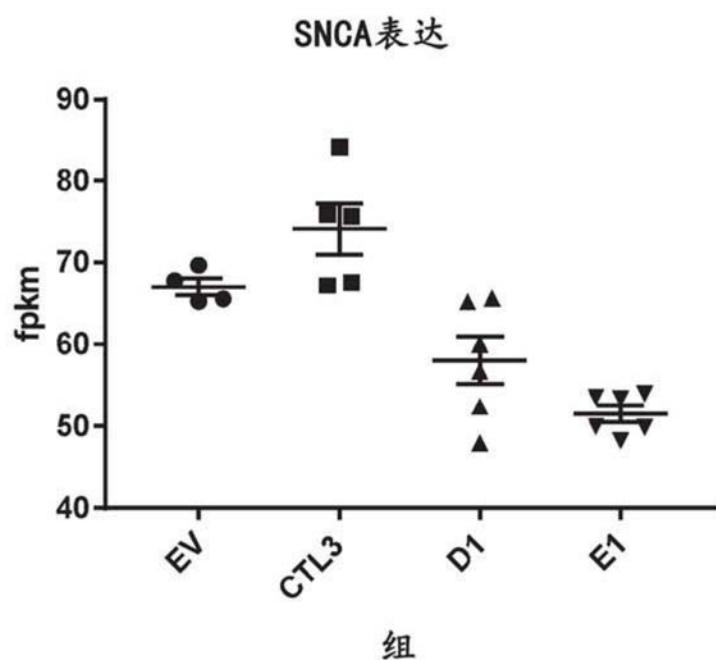


FIG.11