(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115777021 A
(43)申请公布日 2023.03.10

(21)申请号 202180035697.4
(22)申请日 2021.03.17
(30)优先权数据
62/991,406 2020.03.18 US
63/071,115 2020.08.27 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/022748 2021.03.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/188661 EN 2021.09.23
(71)申请人 马萨诸塞大学
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 阿纳斯塔西娅·赫沃罗娃
尚塔尔·弗格森 萨拉·戴维斯
凯瑟琳·莫诺波利
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 韩晓帆
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)

权利要求书19页 说明书124页 附图12页

(54)发明名称

用于SNCA调节的寡核苷酸

(57)摘要

本公开涉及新型SNCA靶向序列。还提供了用于治疗神经退行性疾病的新型SNCA靶向寡核苷酸。

CN 115777021 A

1.一种包含有义链和反义链的双链RNA(dsRNA)分子，

其中所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

2.如权利要求1所述的dsRNA，其中所述反义链包含与SEQ ID NO:14-28中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

3.如权利要求1所述的dsRNA，其包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至少10、11、12或13个连续核苷酸的互补性。

4.如权利要求1或3所述的dsRNA，其包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至多3个错配。

5.如权利要求1所述的dsRNA，其包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的完全互补性。

6.如权利要求1-5中任一项所述的dsRNA，其中所述反义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

7.如权利要求1-6中任一项所述的dsRNA，其中所述有义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

8.如权利要求1-7中任一项所述的dsRNA，其中所述反义链为20个核苷酸的长度。

9.如权利要求1-7中任一项所述的dsRNA，其中所述反义链为21个核苷酸的长度。

10.如权利要求1-7中任一项所述的dsRNA，其中所述反义链为22个核苷酸的长度。

11.如权利要求1-10中任一项所述的dsRNA，其中所述有义链为15个核苷酸的长度。

12.如权利要求1-10中任一项所述的dsRNA，其中所述有义链为16个核苷酸的长度。

13.如权利要求1-10中任一项所述的dsRNA，其中所述有义链为18个核苷酸的长度。

14.如权利要求1-10中任一项所述的dsRNA，其中所述有义链为20个核苷酸的长度。

15.如权利要求1-14中任一项所述的dsRNA，其包含15个碱基对至20个碱基对的双链区域。

16.如权利要求1-15中任一项所述的dsRNA，其包含15个碱基对的双链区域。

17.如权利要求1-15中任一项所述的dsRNA，其包含16个碱基对的双链区域。

18.如权利要求1-15中任一项所述的dsRNA，其包含18个碱基对的双链区域。

19.如权利要求1-15中任一项所述的dsRNA，其包含20个碱基对的双链区域。

20.如权利要求1-19中任一项所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含平末端。

21.如权利要求1-20中任一项所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含至少一个单链核苷酸突出端。

22.如权利要求21所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含约2个核苷酸至5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

23.如权利要求21所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含2个核苷酸的单链核苷酸突出端。

24.如权利要求21所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

25.如权利要求1-24中任一项所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含天然存在的核苷酸。

26.如权利要求1-24中任一项所述的dsRNA，其中所述dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸。

27.如权利要求26所述的dsRNA，其中所述修饰的核苷酸包括2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨

基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸或其混合物。

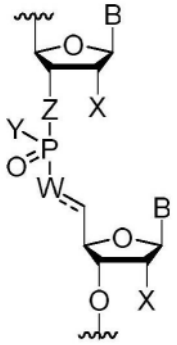
28.如权利要求1-27中任一项所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一个修饰的核苷酸间键。

29.如权利要求28所述的dsRNA,其中所述修饰的核苷酸间键包含硫代磷酸酯核苷酸间键。

30.如权利要求1-29中任一项所述的dsRNA,其包含4-16个硫代磷酸酯核苷酸间键。

31.如权利要求1-29中任一项所述的dsRNA,其包含8-13个硫代磷酸酯核苷酸间键。

32.如权利要求1-28中任一项所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一种式I修饰的核苷酸间键:



(I);

其中:

B是碱基配对部分;

W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2和CH组成的组;

X选自由卤代基、羟基和C_{1-6}烷氧基组成的组;

Y选自由O^-、OH、OR、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组;

Z选自由O和CH_2组成的组;

R是保护基;并且

---是任选的双键。

33.如权利要求1-32中任一项所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少80%的化学修饰的核苷酸。

34.如权利要求1-33中任一项所述的dsRNA,其中所述dsRNA是完全化学修饰的。

35.如权利要求1-33中任一项所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

36.如权利要求1-33中任一项所述的dsRNA,其中所述反义链包含至少70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

37.如权利要求36所述的dsRNA,其中所述反义链包含约70%至90%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

38.如权利要求1-33中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链包含至少65%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

39.如权利要求38所述的dsRNA,其中所述有义链包含100%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

40.如权利要求1-39中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链包含所述反义链和所述有义链之间的一个或多个核苷酸错配。

41.如权利要求40所述的dsRNA,其中所述一个或多个核苷酸错配存在于所述有义链的5'端的位置2、6和12处。

42.如权利要求40所述的dsRNA,其中所述核苷酸错配存在于所述有义链的5'端的位置2、6和12处。

43.如权利要求1-42中任一项所述的dsRNA,其中所述反义链包含5'磷酸酯、5'-烷基膦酸酯、5'亚烷基膦酸酯或5'烯基膦酸酯。

44.如权利要求43所述的dsRNA,其中所述反义链包含5'乙烯基膦酸酯。

45.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸;

(3)所述反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

46.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少70%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含至少70%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

47.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少85%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

48.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

49.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置2、4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

50.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置2、6、14和16处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含至少65%的2'-O-甲基修饰;

(7)所述有义链3'端的位置7、9、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;和

(8)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

51.如权利要求1所述的dsRNA,所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(7)所述有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;和

(8)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

52.如权利要求1-51中任一项所述的dsRNA,其中功能部分连接到所述反义链的5'端和/或3'端。

53.如权利要求1-51中任一项所述的dsRNA,其中功能部分连接到所述有义链的5'端和/或3'端。

54.如权利要求1-51中任一项所述的dsRNA,其中功能部分连接到所述有义链的3'端。

55.如权利要求52-54中任一项所述的dsRNA,其中所述功能部分包括疏水部分。

56.如权利要求55所述的dsRNA,其中所述疏水部分选自由以下组成的组:脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物、内源性大麻素、维生素及其混合物。

57.如权利要求56所述的dsRNA,其中所述类固醇选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组。

58.如权利要求56所述的dsRNA,其中所述脂肪酸选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳烯酸(DCA)组成的组。

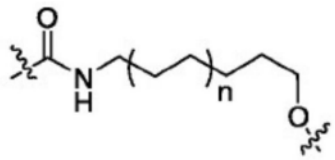
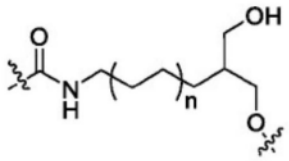
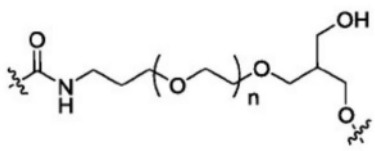
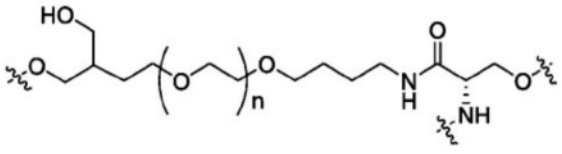
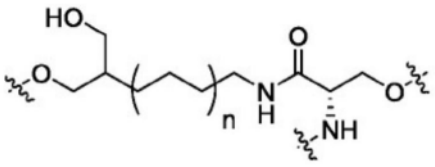
59.如权利要求56所述的dsRNA,其中所述维生素选自由胆碱、维生素A、维生素E及其衍生物或代谢物组成的组。

60.如权利要求59所述的dsRNA,其中所述维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

61.如权利要求54-60中任一项所述的dsRNA,其中所述功能部分通过连接子来连接至所述反义链和/或有义链。

62.如权利要求61所述的dsRNA,其中所述连接子包括二价或三价连接子。

63.如权利要求62所述的dsRNA,其中所述二价或三价连接子选自由以下组成的组:


;

;

;

; 和

,

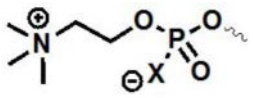
其中n为1、2、3、4或5。

64.如权利要求61或62所述的dsRNA,其中所述连接子包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

65.如权利要求62或63所述的dsRNA,其中当所述连接子为三价连接子时,所述连接子

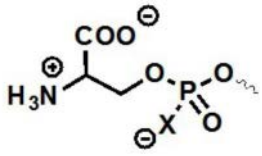
进一步连接磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。

66.如权利要求65所述的dsRNA,其中所述磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组:



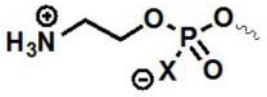
;

(Zc1);



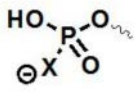
;

(Zc2);



;和

(Zc3)



;

(Zc4)

其中X是O、S或BH_3。

67.如权利要求1-66中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链3'端的位置1和2处的核苷酸,以及所述反义链5'端的位置1和2处的核苷酸,通过硫代磷酸酯键与相邻的核糖核苷酸连接。

68.一种用于抑制生物体中突触核蛋白(SNCA)基因表达的药物组合物,其包含如权利要求1-67中任一项所述的dsRNA和药学上可接受的载体。

69.如权利要求68所述的药物组合物,其中所述dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50%。

70.如权利要求68所述的药物组合物,其中所述dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80%。

71.一种用于抑制细胞中SNCA基因表达的方法,所述方法包括:

(a)将如权利要求1-67中任一项所述的双链核糖核酸(dsRNA)引入所述细胞中;和

(b)将步骤(a)中产生的所述细胞保持足够的时间以获得所述SNCA基因的mRNA转录物的降解,从而抑制所述细胞中所述SNCA基因的表达。

72.一种治疗或控制神经退行性疾病的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的如权利要求1-67中任一项所述的所述dsRNA。

73.如权利要求72所述的方法,其中将所述dsRNA施用于所述患者的大脑。

74.如权利要求72所述的方法,其中所述dsRNA通过脑室内(ICV)注射、纹状体内(IS)注射、静脉内(IV)注射、皮下(SQ)注射或其组合施用。

75.如权利要求72所述的方法,其中施用所述dsRNA导致海马、纹状体、皮质、小脑、丘脑、下丘脑和脊髓中的一个或多个中的SNCA基因mRNA减少。

76.如权利要求71-75中任一项所述的方法,其中所述dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50%。

77.如权利要求71-75中任一项所述的方法,其中所述dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80%。

78.一种包含可操作地连接至编码dsRNA分子的核苷酸序列的调控序列的载体,所述dsRNA分子与SEQ ID NO:1-13的SNCA核酸序列基本上互补。

79.如权利要求78所述的载体,其中所述RNA分子将所述SNCA基因的表达抑制至少30%。

80.如权利要求78所述的载体,其中所述RNA分子将所述SNCA基因的表达抑制至少50%。

81.如权利要求78所述的载体,其中所述RNA分子将所述SNCA基因的表达抑制至少80%。

82.如权利要求78所述的载体,其中所述dsRNA包含有义链和反义链,其中所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

83.一种包含如权利要求78-82中任一项所述的载体的细胞。

84.一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含如权利要求78-82中任一项所述的载体和AAV衣壳。

85.一种分支RNA化合物,其包含彼此共价结合的如权利要求1-67中任一项所述的dsRNA分子中的两种或更多种。

86.如权利要求85所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA分子通过连接子、间隔子或分支点彼此共价结合。

87.一种分支RNA化合物,其包括:

两个或多个RNA分子,其具有15至35个核苷酸的长度,和

与SNCA mRNA基本上互补的序列,

其中所述两个RNA分子通过一个或多个独立地选自连接子、间隔子和分支点的部分相互连接。

88.如权利要求87所述的分支RNA化合物,其包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

89.如权利要求87所述的分支RNA化合物,其包含与SEQ ID NO:14-28中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

90.如权利要求87-89中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述RNA分子包含ssRNA和dsRNA中的一种或两种。

91.如权利要求87-90中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述RNA分子包含反义寡核苷酸。

92.如权利要求87-91中任一项所述的分支RNA化合物,其中每个RNA分子包含15至25个核苷酸的长度。

93.如权利要求87-90中任一项所述的分支RNA化合物,其中每个RNA分子包括包含有义链和反义链的dsRNA,其中每个反义链独立地包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

94.如权利要求93所述的分支RNA化合物,其包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至少10、11、12或13个连续核苷酸的互补性。

95.如权利要求93所述的分支RNA化合物,其中每个RNA分子包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的不多于3个错配。

96.如权利要求93所述的分支RNA化合物,其包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的完全互补性。

97.如权利要求93-96中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述反义链包含具有SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列的部分。

98.如权利要求93-97中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述反义链和/或有义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

99.如权利要求93-98中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述反义链为20个核苷酸的长度。

100.如权利要求93-98中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述反义链为21个核苷酸的长度。

101.如权利要求93-98中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述反义链为22个核苷酸的长度。

102.如权利要求93-101中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述有义链为15个核苷酸的长度。

103.如权利要求93-101中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述有义链为16个核苷酸的长度。

104.如权利要求93-101中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述有义链为18个核苷酸的长度。

105.如权利要求93-101中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述有义链为20个核苷酸的长度。

106.如权利要求90-105中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含15个碱基对至20个碱基对的双链区域。

107.如权利要求90-106中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含15个碱基对的双链区域。

108.如权利要求90-106中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含16个碱基对的双链区域。

109.如权利要求90-106中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含18个碱基对的双链区域。

110.如权利要求90-106中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含20个碱基对的双链区域。

111.如权利要求90-110中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含平末端。

112.如权利要求90-110中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含至少一个单链核苷酸突出端。

113.如权利要求90-112中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含2个核苷酸至5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

114.如权利要求90-113中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含天然存在的核苷酸。

115.如权利要求90-114中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸。

116.如权利要求115所述的分支RNA化合物，其中所述修饰的核苷酸包括2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯或包含非天然碱基的核苷酸。

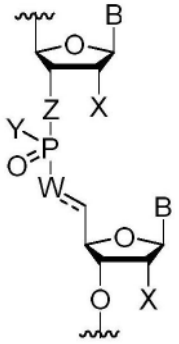
117.如权利要求90-116中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含至少一个修饰的核苷酸间键。

118.如权利要求117所述的分支RNA化合物，其中所述修饰的核苷酸间键包含硫代磷酸酯核苷酸间键。

119.如权利要求90-118中任一项所述的分支RNA化合物，其包含4-16个硫代磷酸酯核苷酸间键。

120.如权利要求90-118中任一项所述的分支RNA化合物，其包含8-13个硫代磷酸酯核苷酸间键。

121.如权利要求90-117中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含至少一种式I修饰的核苷酸间键：



(I)；

其中：

B是碱基配对部分；

W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2和CH组成的组；

X选自由卤代基、羟基和C_{1-6}烷氧基组成的组；

Y选自由O^-、OH、OR、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

Z选自由O和CH_2组成的组；

R是保护基；并且

===是任选的双键。

122.如权利要求90-121中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含至少80％的化学修饰的核苷酸。

123.如权利要求90-121中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA是完全化学修饰的。

124.如权利要求90-121中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含至少70％的2'-O-甲基核苷酸修饰。

125.如权利要求90-124中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述反义链包含至少70％的2'-O-甲基核苷酸修饰。

126.如权利要求125所述的分支RNA化合物，其中所述反义链包含约70％至90％的2'-O-甲基核苷酸修饰。

127.如权利要求90-124中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述有义链包含至少65％的2'-O-甲基核苷酸修饰。

128.如权利要求127所述的分支RNA化合物，其中所述有义链包含100％的2'-O-甲基核苷酸修饰。

129.如权利要求93-128中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述有义链包含所述反义链和所述有义链之间的一个或多个核苷酸错配。

130.如权利要求129所述的分支RNA化合物，其中所述一个或多个核苷酸错配存在于所述有义链的5'端的位置2、6和12处。

131.如权利要求129所述的分支RNA化合物，其中所述核苷酸错配存在于所述有义链的5'端的位置2、6和12处。

132.如权利要求93-131中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述反义链包含5'磷酸酯、5'-烷基膦酸酯、5'亚烷基膦酸酯、5'烯基膦酸酯或其混合物。

133.如权利要求121329所述的分支RNA化合物，其中所述反义链包含5'乙烯基膦酸酯。

134.如权利要求90所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'端和3'端，其中：

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列；

(2)所述反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸；

(3)所述反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补；

(6)所述有义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸；和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

135.如权利要求90所述的分支RNA化合物，其中所述dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'端和3'端，其中：

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少70%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端位置14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含至少70%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

136.如权利要求90所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少85%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

137.如权利要求90所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

138.如权利要求90所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端的位置2、4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

(7)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

139.如权利要求90所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端位置2、6、14和16处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含至少65%的2'-O-甲基修饰;

(7)所述有义链3'端的位置7、9、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;和

(8)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

140.如权利要求90所述的分支RNA化合物,其中所述dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'端和3'端,其中:

(1)所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

(2)所述反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(3)所述反义链5'端位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

(4)所述反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

(5)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(6)所述有义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

(7)所述有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;和

(8)所述有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

141.如权利要求93-140中任一项所述的分支RNA化合物,其中功能部分连接到所述反义链的5'端和/或3'端。

142.如权利要求93-140中任一项所述的分支RNA化合物,其中功能部分连接到所述有义链的5'端和/或3'端。

143.如权利要求93-140中任一项所述的分支RNA化合物,其中功能部分连接到所述有义链的3'端。

144.如权利要求141-143中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述功能部分包括疏水部分。

145.如权利要求144所述的分支RNA化合物,其中所述疏水部分选自由以下组成的组:脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物、内源性大麻素、维生素及其混合物。

146.如权利要求145所述的分支RNA化合物,其中所述类固醇选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组。

147.如权利要求145所述的分支RNA化合物,其中所述脂肪酸选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳烯酸(DCA)组成的组。

148.如权利要求145所述的分支RNA化合物,其中所述维生素选自由胆碱、维生素A、维生素E、其衍生物及其代谢物组成的组。

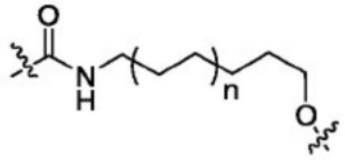
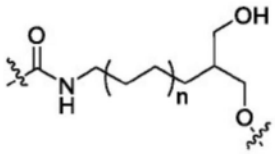
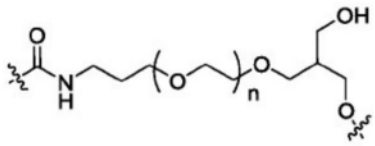
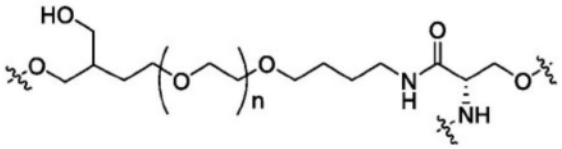
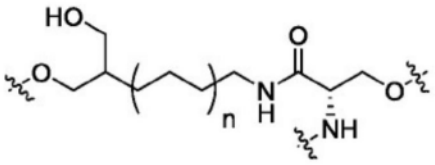
149.如权利要求145所述的分支RNA化合物,其中所述维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

150.如权利要求141-149中任一项所述的分支RNA化合物,其中所述功能部分通过连接子来连接至所述反义链和/或有义链。

151.如权利要求150所述的分支RNA化合物,其中所述连接子包括二价或三价连接子。

152.如权利要求151所述的分支RNA化合物,其中所述二价或三价连接子选自由以下组

成的组：

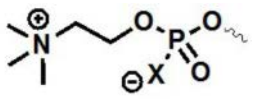

；

；

；

；和

，

其中n为1、2、3、4或5。

153.如权利要求150或152所述的分支RNA化合物，其中所述连接子包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

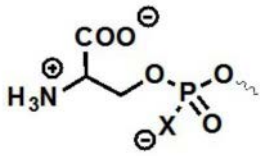
154.如权利要求151所述的分支RNA化合物，其中当所述连接子为三价连接子时，所述连接子进一步连接磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。

155.如权利要求151所述的分支RNA化合物，其中所述磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：



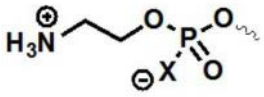
;

(Zc1);



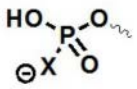
;

(Zc2);



；和

(Zc3)



;

(Zc4)

其中X是O、S或BH_3。

156.如权利要求93-155中任一项所述的分支RNA化合物，其中所述有义链3'端的位置1和2处的核苷酸，以及所述反义链5'端的位置1和2处的核苷酸，通过硫代磷酸酯键与相邻的核糖核苷酸连接。

157.一种式(I)化合物：

$L-(N)_n$

(I)

其中：

L包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑或其组合，并且其中式(I)任选地进一步包含一个或多个分支点B，以及一个或多个间隔子S，其中

B在每次出现时独立地是多价有机物质或其衍生物；

S在每次出现时独立地包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑或其组合；和

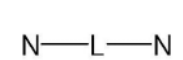
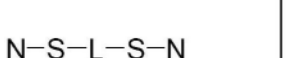
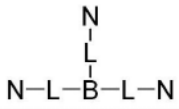
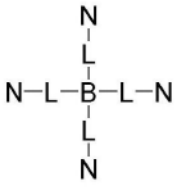
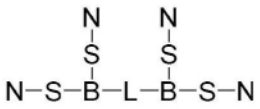
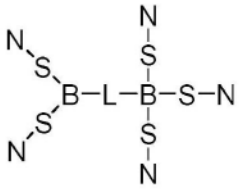
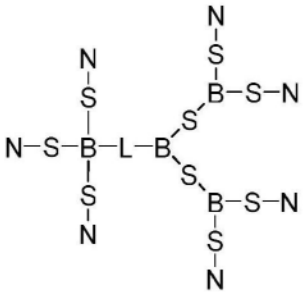
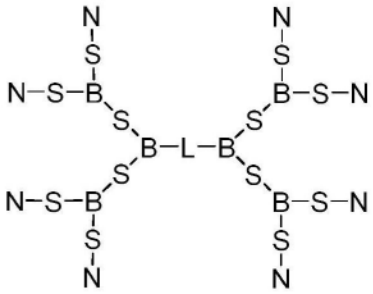
N是包含15至35个碱基长度的双链核酸，包含有义链和反义链；其中

所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列；

其中所述有义链和反义链各自独立地包含一种或多种化学修饰;并且

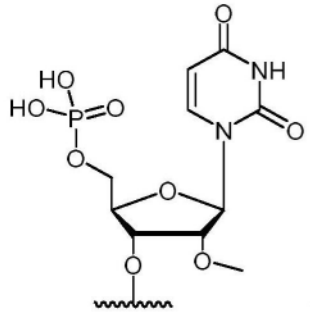
其中n是2、3、4、5、6、7或8。

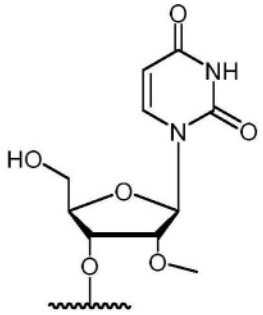
158.如权利要求157所述的化合物,其具有选自式(I-1)-(I-9)的结构:

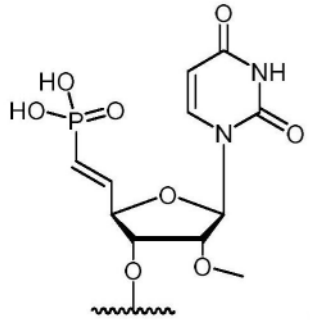
		
(I-1)	(I-2)	(I-3)
		
(I-4)	(I-5)	(I-6)
		
(I-7)	(I-8)	(I-9)

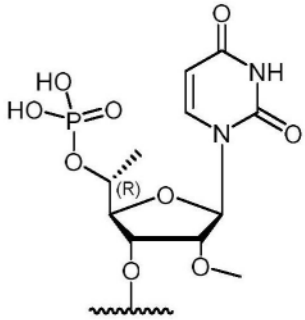
。

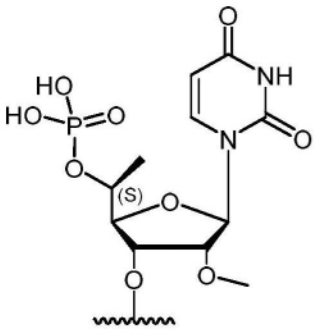
159.如权利要求157所述的化合物,其中所述反义链包含选自由以下组成的组的5'末端基团R:

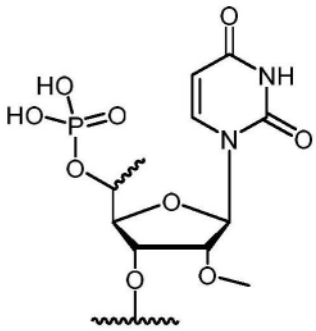

R1 ,

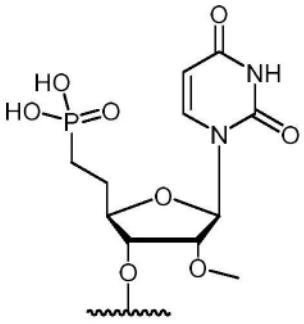

R2 ,

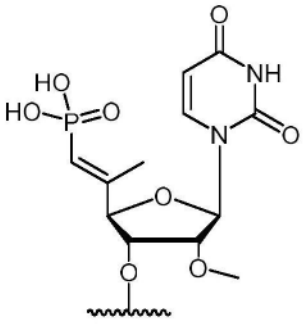

R3 ,


R4 ,

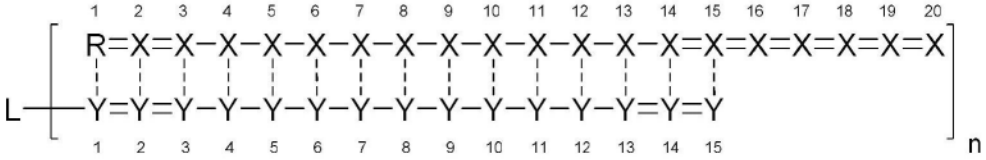

R5 ,


R6 ,


R7 , 和


R8 。

160.如权利要求157所述的化合物,其具有式(II)的结构:



(II)

其中：

X,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

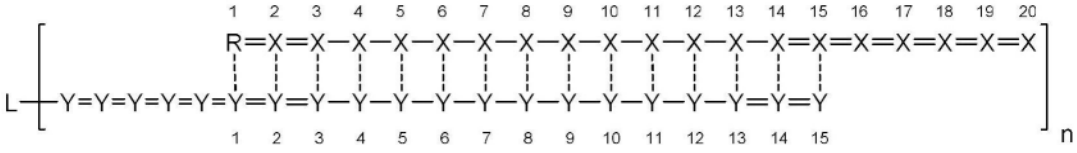
Y,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

-代表磷酸二酯核苷间键；

＝代表硫代磷酸酯核苷间键;和

---每次出现时独立代表碱基配对相互作用或错配。

161.如权利要求157所述的化合物,其具有式(IV)的结构：



(IV)

其中：

X,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

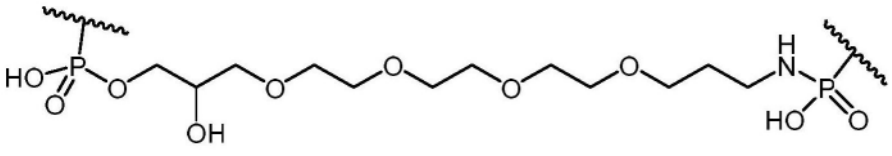
Y,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

-代表磷酸二酯核苷间键；

＝代表硫代磷酸酯核苷间键;和

---每次出现时独立代表碱基配对相互作用或错配。

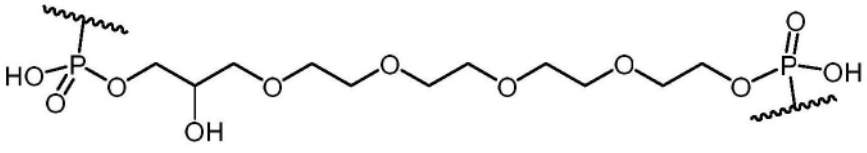
162.如权利要求157-161中任一项所述的化合物,其中L是结构L1：



(L1)。

163.如权利要求162所述的化合物,其中R是R^3并且n是2。

164.如权利要求157-161中任一项所述的化合物,其中L是结构L2：



(L2)。

165.如权利要求164所述的化合物,其中R是R^3并且n是2。

166.一种具有式(VI)结构的治疗性核酸的递送系统：

$L-(cNA)_n$

(VI)

其中：

L包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑或其组合，其中式(VI)任选地进一步包含一个或多个分支点B，以及一个或多个间隔子S，其中

B在每次出现时独立地包含多价有机物质或其衍生物；

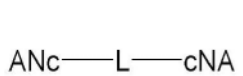
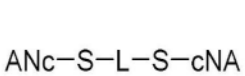
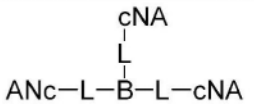
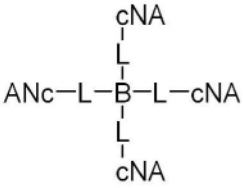
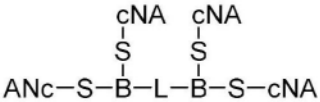
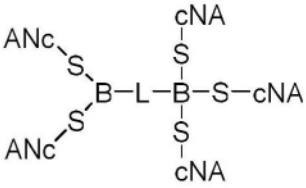
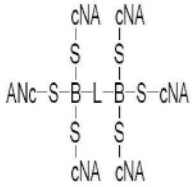
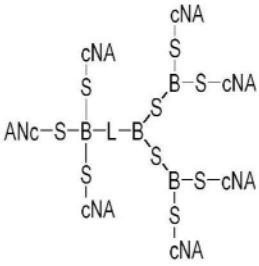
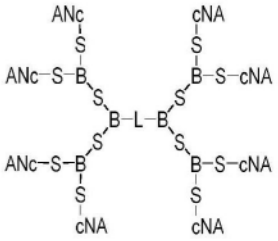
S在每次出现时独立地包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑或其组合；

每个cNA独立地是包含一种或多种化学修饰的载体核酸；

每个cNA独立地包含SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至少15个连续核苷酸；和

n是2、3、4、5、6、7或8。

167.如权利要求166所述的递送系统，其具有选自式(VI-1)-(VI-9)的结构：

		
(VI-1)	(VI-2)	(VI-3)
		
(VI-4)	(VI-5)	(VI-6)
		
(VI-7)	(VI-8)	(VI-9)

168.如权利要求166所述的递送系统，其中每个cNA独立地包含化学修饰的核苷酸。

169.如权利要求166所述的递送系统，其还包括n个治疗性核酸(NA)，其中每个NA与至少一个cNA杂交。

170.如权利要求169所述的递送系统，其中每个NA独立地包含至少16个连续核苷酸。

171.如权利要求170所述的递送系统，其中每个NA独立地包含16-20个连续核苷酸。

172.如权利要求169所述的递送系统，其中每个NA包含至少2个核苷酸的未配对突出端。

173.如权利要求172所述的递送系统，其中所述突出端的核苷酸通过硫代磷酸酯键连接。

174.如权利要求169所述的递送系统，其中每个NA独立地选自由以下组成的组：DNA、siRNA、miRNA拮抗剂、miRNA、间隙体、混合物和指导RNA。

175.如权利要求169所述的递送系统,其中每个NA与SEQ IDNO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补。

176.一种用于抑制生物体内SNCA基因表达的药物组合物,其包含如权利要求85-165中任一项所述的化合物或如权利要求166-175中任一项所述的系统,以及药学上可接受的载体。

177.如权利要求176所述的药物组合物,其中所述化合物或系统将所述SNCA基因的表达抑制至少50%。

178.如权利要求176所述的药物组合物,其中所述化合物或系统将所述SNCA基因的表达抑制至少80%。

179.一种用于抑制细胞中SNCA基因表达的方法,所述方法包括:

(a)将如权利要求85-165中任一项所述的化合物或如权利要求166-175中任一项所述的系统引入所述细胞中;和

(b)将步骤(a)中产生的所述细胞保持足够的时间以获得所述SNCA基因的mRNA转录物的降解,从而抑制所述细胞中所述SNCA基因的表达。

180.一种治疗或控制神经退行性疾病的方法,其包括向需要这种治疗或控制的患者施用治疗有效量的如权利要求85-165中任一项所述的化合物或如权利要求166-175中任一项所述的系统。

181.如权利要求180所述的方法,其中将所述dsRNA施用于所述患者的大脑。

182.如权利要求180所述的方法,其中所述dsRNA通过脑室内(ICV)注射、纹状体内(IS)注射、静脉内(IV)注射、皮下(SQ)注射或其组合施用。

183.如权利要求180所述的方法,其中施用dsRNA导致海马、纹状体、皮质、小脑、丘脑、下丘脑和脊髓中的一个或多个中的SNCA基因mRNA减少。

184.如权利要求179-183中任一项所述的方法,其中所述dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50%。

185.如权利要求179-183中任一项所述的方法,其中所述dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80%。

用于SNCA调节的寡核苷酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年3月18日提交的美国临时申请序列号62/991,406和2020年8月27日提交的美国临时申请序列号63/071,115的权益,其全部公开内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本公开涉及新型SNCA靶向序列、新型分支寡核苷酸以及用于治疗和预防SNCA相关的神经变性的新方法。

背景技术

[0004] 帕金森病(Parkinson's disease)是西方世界第二大流行的神经退行性病症。在全球范围内,帕金森病影响了大约600万人,或超过65岁的人群的2-3%。所述疾病在临床上表现为震颤、运动迟缓和肌肉僵硬以及姿势和步态受损。所述症状与大脑黑质中多巴胺能神经元的丧失有关,多巴胺能神经元的丧失会导致纹状体多巴胺缺乏。神经元细胞死亡是由蛋白质α突触核蛋白的聚集体的包含和积累引起的。

[0005] α突触核蛋白由SNCA基因编码。SNCA主要在脑、心脏、肌肉和肺中表达。还未充分了解SNCA的功能,但它参与突触传递和DNA修复。在病理条件下,SNCA聚集形成被称为路易体(Lewy Body)的不溶性纤维。路易体是神经退行性病症(包括帕金森病、路易体痴呆和多系统萎缩,其统称为突触核蛋白病)的特征性标志。SNCA基因中的许多突变可以导致神经退行性疾病,并且野生型和突变型SNCA的过表达导致聚集体的沉积。

[0006] 目前可用的用于帕金森病的疗法主要包括多巴胺能激动剂(即,左旋多巴(levodopa))形式的药理学方法或非药理学方法,诸如运动和言语疗法。使用目前的方法,不可能阻止或治愈帕金森病。因此,迫切需要开发用于治疗所有突触核蛋白病的新疗法。鉴于SNCA参与疾病发病机制,需要有效且有力地使SNCA mRNA表达沉默,这在本申请中得到解决。

发明内容

[0007] 在第一方面,本公开提供了一种RNA分子,其具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列。在一些实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:1的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:2的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:3的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:4的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:5的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:6的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:7的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:8的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:9的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:10的SNCA核酸序列。在一些实施方案中,核酸

序列与SEQ ID NO:11的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:12的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:13的SNCA核酸序列基本上互补。

[0008] 在另一方面,本公开提供了一种RNA,其具有与SEQ ID NO:14-28中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:14的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:15的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:16的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:17的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:18的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:19的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:20的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:21的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:22的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:23的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:24的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:25的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:26的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:27的SNCA核酸序列基本上互补。在一些实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:28的SNCA核酸序列基本上互补。

[0009] 在另一个方面,本公开提供了一种RNA分子,其核酸序列与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:29的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:30的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:31的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:32的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:33的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:34的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:35的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:36的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:37的核酸序列至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:38的核酸序列至少85%(例如,86%、

87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:39的核酸序列至少85％(例如,86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:40的核酸序列至少85％(例如,86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:41的核酸序列至少85％(例如,86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:42的核酸序列至少85％(例如,86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一的核酸序列。在一些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:43的核酸序列至少85％(例如,86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一的核酸序列。

[0010] 在一个方面,本公开提供了一种长度为约8个核苷酸至约80个核苷酸的RNA分子;和与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列。在某些实施方案中,RNA分子的长度为8个核苷酸至80个核苷酸(例如,8个核苷酸、9个核苷酸、10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸、31个核苷酸、32个核苷酸、33个核苷酸、34个核苷酸、35个核苷酸、36个核苷酸、37个核苷酸、38个核苷酸、39个核苷酸、40个核苷酸、41个核苷酸、42个核苷酸、43个核苷酸、44个核苷酸、45个核苷酸、46个核苷酸、47个核苷酸、48个核苷酸、49个核苷酸、50个核苷酸、51个核苷酸、52个核苷酸、53个核苷酸、54个核苷酸、55个核苷酸、56个核苷酸、57个核苷酸、58个核苷酸、59个核苷酸、60个核苷酸、61个核苷酸、62个核苷酸、63个核苷酸、64个核苷酸、65个核苷酸、66个核苷酸、67个核苷酸、68个核苷酸、69个核苷酸、70个核苷酸、71个核苷酸、72个核苷酸、73个核苷酸、74个核苷酸、75个核苷酸、76个核苷酸、77个核苷酸、78个核苷酸、79个核苷酸或80个核苷酸长度)。

[0011] 在某些实施方案中,RNA分子的长度为10至50个核苷酸(例如,10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸、31个核苷酸、32个核苷酸、33个核苷酸、34个核苷酸、35个核苷酸、36个核苷酸、37个核苷酸、38个核苷酸、39个核苷酸、40个核苷酸、41个核苷酸、42个核苷酸、43个核苷酸、44个核苷酸、45个核苷酸、46个核苷酸、47个核苷酸、48个核苷酸、49个核苷酸或50个核苷酸)。

[0012] 在某些实施方案中,RNA分子包含约15个核苷酸至约25个核苷酸长度。在某些实施方案中,RNA分子的长度为15至25个核苷酸(例如,15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸长度)。

[0013] 在某些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:14-28中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列。

[0014] 在某些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少85%同一(例如,与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。在某些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少90%同一(例如,与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。在某些实施方案中,RNA分子具有与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少95%同一(例如,与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。在某些实施方案中,RNA分子具有SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列。

[0015] 在某些实施方案中,RNA分子包含单链(ss)RNA或双链(ds)RNA。

[0016] 在某些实施方案中,RNA分子是包含有义链和反义链的dsRNA。反义链可以包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列。例如,在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:1的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ IDNO:2的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:3的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:4的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:5的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:6的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:7的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:8的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:9的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:10的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:11的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:12的核酸序列基本上互补。在某些实施方案中,反义序列与SEQ ID NO:13的核酸序列基本上互补。

[0017] 在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至少10、11、12或13个连续核苷酸具有互补性的反义链。例如,在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段(例如,SEQ ID NO:1的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:2的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:3的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:4的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:5的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:6的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:7的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:8的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:9的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:10的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:11的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:12的核酸序列的10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段，或SEQ ID NO:13的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段)具有互补性的反义链。

[0018] 在某些实施方案中，dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的核酸序列的15至35个连续核苷酸的区段具有互补性的反义链。例如，反义链可与SEQ ID NO:1的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:2的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:3的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:4的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:5的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:6的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:7的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷

酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:8的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:9的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:10的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:11的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:12的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:13的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。

[0019] 在某些实施方案中，dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列具有至多3个错配的反义链。例如，相对于SEQ ID NO:1的核酸序列，反义链可具有0-3个错配(例如，0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:2的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:3的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:4的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:5的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案

中,反义链相对于SEQ ID NO:6的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:7的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:8的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:9的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:10的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:11的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:12的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:13的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。

[0020] 在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列完全互补的反义链。

[0021] 在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少85%同一(例如与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的反义链。在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少90%同一(例如与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的反义链。在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少95%同一(例如与SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的反义链。在某些实施方案中,dsRNA包含具有SEQ ID NO:29-43中任一个的核酸序列的反义链。

[0022] 在某些实施方案中,反义链和/或有义链包含约13个核苷酸至35个核苷酸长度。例如,在某些实施方案中,反义链和/或有义链是13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸长度。

[0023] 在任一前述方面的一些实施方案中,反义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为19个核苷酸。在某些实施方案中,反义链长度为20个核苷酸。在某些实施方案中,反义链长度为21个核苷酸。在某些实施方案中,反义链长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为30个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为31个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为32个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为33个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为34个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为35个核苷酸。

[0024] 在某些实施方案中,有义链长度为13个核苷酸。在某些实施方案中,有义链长度为14个核苷酸。在某些实施方案中,有义链长度为15个核苷酸。在某些实施方案中,有义链长

度为16个核苷酸。在某些实施方案中，有义链长度为18个核苷酸。在某些实施方案中，有义链长度为20个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为21个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为22个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为23个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为24个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为25个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为26个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为27个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为29个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为30个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为31个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为32个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为33个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为34个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为35个核苷酸。

[0025] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0026] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0027] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0028] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0029] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0030] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0031] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0032] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0033] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0034] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0035] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为19个核苷酸。

[0036] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0037] 在某些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸或16个核苷酸。

[0038] 在某些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸或16个核苷酸。

[0039] 在某些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸或21个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0040] 在某些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸或21个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0041] 在某些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0042] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0043] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0044] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0045] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为19个核苷酸。

[0046] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为20个核苷酸。

[0047] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0048] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0049] 在某些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0050] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0051] 在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0052] 在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0053] 在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0054] 在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0055] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0056] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0057] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0058] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0059] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0060] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0061] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0062] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0063] 在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0064] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0065] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0066] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0067] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0068] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0069] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0070] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0071] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0072] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0073] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0074] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0075] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0076] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0077] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0078] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0079] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0080] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0081] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0082] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0083] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0084] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0085] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0086] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0087] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0088] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0089] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0090] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0091] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0092] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0093] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0094] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0095] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0096] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0097] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0098] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0099] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0100] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0101] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0102] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0103] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0104] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0105] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0106] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0107] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0108] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0109] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0110] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0111] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0112] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0113] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0114] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0115] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0116] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0117] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0118] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0119] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0120] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0121] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0122] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0123] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0124] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0125] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0126] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0127] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0128] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0129] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0130] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0131] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0132] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0133] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0134] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0135] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0136] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0137] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0138] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为28个核苷酸。

[0139] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0140] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0141] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0142] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0143] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0144] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0145] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0146] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0147] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0148] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0149] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0150] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0151] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0152] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0153] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为28个核苷酸。

[0154] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为29个核苷酸。

[0155] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0156] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0157] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0158] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0159] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0160] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0161] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0162] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0163] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0164] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0165] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0166] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0167] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0168] 在一些实施方案中，反义链的长度为30个核苷酸，而有义链的长度为27个核苷酸。

[0169] 在一些实施方案中，反义链的长度为30个核苷酸，而有义链的长度为28个核苷酸。

[0170] 在一些实施方案中，反义链的长度为30个核苷酸，而有义链的长度为29个核苷酸。

[0171] 在一些实施方案中，反义链的长度为30个核苷酸，而有义链的长度为30个核苷酸。

[0172] 在某些实施方案中，dsRNA包含14个碱基对至35个碱基对(例如14个碱基对、15个碱基对、16个碱基对、17个碱基对、18个碱基对、19个碱基对、20个碱基对、21个碱基对、22个碱基对、23个碱基对、24个碱基对、25个碱基对、26个碱基对、27个碱基对、28个碱基对、29个碱基对或30个碱基对)的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含14个碱基对的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含15个碱基对的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含16个碱基对的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含17个碱基对的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含18个碱基对的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含19个碱基对的双链区。在某些实施方案中，dsRNA包含20个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含21个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含22个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含23个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含24个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含25个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含26个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含27个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含28个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含29个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含30个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含31个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含32个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含33个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含34个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含35个碱基对的双链区。

[0173] 在某些实施方案中，dsRNA包含平末端。在某些实施方案中，dsRNA包含至少一个单链核苷酸突出端。在某些实施方案中，dsRNA包含约2个核苷酸至5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

[0174] 在某些实施方案中，dsRNA包含天然存在的核苷酸。

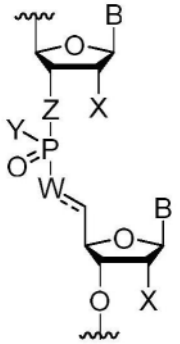
[0175] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸。

[0176] 在某些实施方案中，修饰的核苷酸包括2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸或其混合物。

[0177] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸间键。

[0178] 在某些实施方案中，修饰的核苷酸间键包含硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中，dsRNA包含4-16个硫代磷酸酯核苷酸间键(例如，4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个硫代磷酸酯键联)。在某些实施方案中，dsRNA包含8-13个硫代磷酸酯核苷酸间键(例如，9、10、11、12或13个硫代磷酸酯键联)。

[0179] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一种式I修饰的核苷酸间键：

[0180] 

(I);

[0181] 其中：

[0182] B是碱基配对部分；

[0183] W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2和CH组成的组；

[0184] X选自由卤代基、羟基和C_{1-6}烷氧基组成的组；

[0185] Y选自由O^-、OH、OR、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

[0186] Z选自由O和CH_2组成的组；

[0187] R是保护基；并且

[0188] ═是任选的双键。

[0189] 在某些实施方案中，当W为CH时，═为双键。

[0190] 在某些实施方案中，当W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2组成的组时，═为单键。

[0191] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少70％的化学修饰核苷酸(例如，70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％化学修饰的核苷酸)。

[0192] 在某些实施方案中，dsRNA为完全化学修饰的。在某些实施方案中，dsRNA包含至少60％的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如，60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％2'-O-甲基修饰)。

[0193] 在某些实施方案中，dsRNA包含约70％至约90％的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如，约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％或90％2'-O-甲基核苷酸修饰)。在某些实施方案中，dsRNA包含约83％至约86％的2'-O-甲基修饰(例如，约83％、84％、85％或86％2'-O-甲基修饰)。

[0194] 在某些实施方案中，dsRNA包含约70％至约80％的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如，约70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％或80％2'-O-甲基核苷酸修饰)。在某些实施方案中，dsRNA包含约75％至约78％的2'-O-甲基修饰(例如，约75％、76％、77％或78％2'-O-甲基修饰)。

[0195] 在任一前述方面的一些实施方案中，dsRNA包含约60％至约70％的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如，约60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％或70％2'-O-甲

基核苷酸修饰)。在一些实施方案中,dsRNA包含约60%至约65%的2'-O-甲基修饰(例如,约60%、61%、62%或63%2'-O-甲基修饰)。

[0196] 在某些实施方案中,反义链包含至少70%的化学修饰核苷酸(例如,70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%化学修饰的核苷酸)。

[0197] 在某些实施方案中,反义链是完全化学修饰的。在某些实施方案中,反义链包含至少55%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%2'-O-甲基修饰)。

[0198] 在某些实施方案中,反义链包含约55%至90%的2′-O-甲基核苷酸修饰(例如,55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%2'-O-甲基修饰)。

[0199] 在某些实施方案中,反义链包含约70%至90%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%2'-O-甲基修饰)。在某些实施方案中,反义链包含约85%至约90%的2′-O-甲基修饰(例如,约85%、86%、87%、88%、89%或90%2'-O-甲基修饰)。

[0200] 在某些实施方案中,反义链包含约75%至约85%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%或85%2'-O-甲基核苷酸修饰)。在某些实施方案中,反义链包含约76%至约80%的2'-O-甲基修饰(例如,约76%、77%、78%、79%或80%2'-O-甲基修饰)。

[0201] 在某些实施方案中,有义链包含至少70%的化学修饰核苷酸(例如,70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%化学修饰的核苷酸)。

[0202] 在某些实施方案中,有义链是完全化学修饰的。在某些实施方案中,有义链包含至少55%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%2'-O-甲基修饰)。在某些实施方案中,有义链包含100%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

[0203] 在任一前述方面的一些实施方案中,有义链包含约55%至约65%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,约55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%或65%2'-O-甲基核苷酸修饰)。

[0204] 在某些实施方案中,有义链包含约70%至85%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%或

85%2′-O-甲基核苷酸修饰)。在某些实施方案中,有义链包含约75%至约80%的2′-O-甲基核苷酸修饰(例如,约75%、76%、77%、78%、79%或80%2′-O-甲基核苷酸修饰)。

[0205] 在某些实施方案中,有义链包含约65%至约75%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,约65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%或75%2'-O-甲基核苷酸修饰)。在某些实施方案中,有义链包含约67%至约73%的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如,约67%、68%、69%、70%、71%、72%或73%2'-O-甲基核苷酸修饰)。

[0206] 在某些实施方案中,有义链包含反义链和有义链之间的一个或多个核苷酸错配。在某些实施方案中,一种或多种核苷酸错配存在于有义链5'端的位置2、6和12。在某些实施方案中,核苷酸错配存在于有义链5'端的位置2、6和12。

[0207] 在某些实施方案中,反义链包含5'磷酸酯、5'-烷基膦酸酯、5'亚烷基膦酸酯或5'烯基膦酸酯。

[0208] 在某些实施方案中,反义链包含5'乙烯基膦酸酯。

[0209] 在某些实施方案中,dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'末端和3'末端,其中:(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列;(2)反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸;(3)反义链5'端的位置2和14处核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;(4)反义链3'端位置1-2至1-7处核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;(6)有义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸;(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0210] 在某些实施方案中,dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'末端和3'末端,其中:(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列;(2)反义链包含至少55%的2'-O-甲基修饰(例如,55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%2′-O-甲基修饰);(3)反义链5'端的14位置处核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;(4)反义链3'端1-2至1-7位核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;(6)有义链包含至少55%的2'-O-甲基修饰(例如,55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%2'-O-甲基修饰);(7)有义链5'端的1-2位置处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0211] 在某些实施方案中,dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'末端和3'末端,其中:(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列;(2)反义链包含至少85%的2'-O-甲基修饰;(3)反义链5'端的第2和14位核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;(4)反义链3′端1-2至1-7位核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;(6)有义链包含100%的2′-O-甲基修饰;(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0212] 在某些实施方案中,dsRNA包含反义链和有义链,每条链具有5'末端和3'末端,其

中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰；(3)反义链5'端的位置4、5、6和14处核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含100％的2'-O-甲基修饰；和(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0213] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少85％的2'-O-甲基修饰(例如，约85％至约90％的2'-O-甲基修饰)；(3)反义链5'端位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，反义链5'端位置2和14处的核苷酸可以是2'-氟核苷酸)；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰(例如，约75％至约80％的2'-O-甲基修饰)；(7)有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸是2'-氟核苷酸)；和(8)有义链5′端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0214] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰(例如，约75％至约80％的2'-O-甲基修饰)；(3)反义链5'端的2、4、5、6和14位置处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，反义链5'端的2、6、14和16位置处的核苷酸可以是2'-氟核苷酸)；(4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含100％的2'-O-甲基修饰；和(7)反义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0215] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰(例如，约75％至约80％的2′-O-甲基修饰)；(3)反义链5'端位置2、6、14和16处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，反义链5'端位置2、6、14和16处的核苷酸可以是2'-氟核苷酸)；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少65％的2'-O-甲基修饰(例如，约65％至约75％的2'-O-甲基修饰)；(7)有义链3'端的位置7、9、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，有义链3'端的位置7、9、10和11处的核苷酸是2'-氟核苷酸)；和(8)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0216] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13的SNCA核酸序列基本上互补的序列；(2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰；(3)反义链5'端位置2、6、和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少80％的2'-O-甲基修饰；(7)有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；和(8)有义链5'端

的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0217] 在某些实施方案中，功能部分连接到反义链的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到有义链的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到有义链的3'端。

[0218] 在某些实施方案中，功能部分包含疏水部分。

[0219] 在某些实施方案中，疏水部分选自由以下组成的组：脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物、内源性大麻素、维生素及其混合物。

[0220] 在某些实施方案中，类固醇选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组。

[0221] 在某些实施方案中，脂肪酸选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳烯酸(DCA)组成的组。

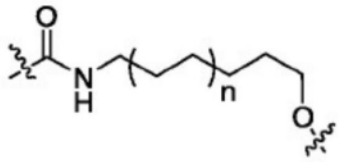
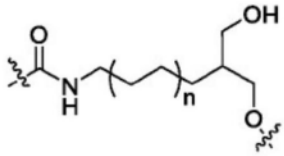
[0222] 在某些实施方案中，维生素选自由胆碱、维生素A、维生素E及其衍生物或代谢物组成的组。

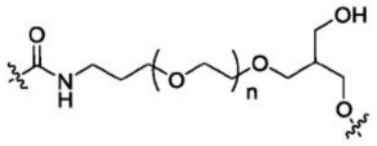
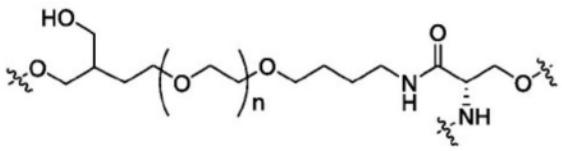
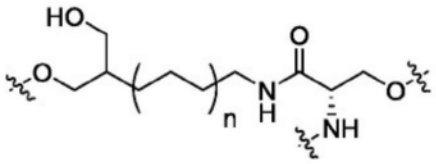
[0223] 在某些实施方案中，维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

[0224] 在某些实施方案中，功能部分通过连接子与反义链和/或有义链连接。

[0225] 在某些实施方案中，连接子包含二价或三价连接子。

[0226] 在某些实施方案中，二价或三价连接子选自由以下组成的组：


；

；

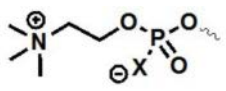
[0227]

；

；和

，

[0228] 其中n为1、2、3、4或5。

[0229] 在某些实施方案中，连接子包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

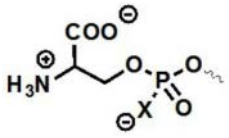
[0230] 在某些实施方案中，当连接子是三价连接子时，连接子进一步连接磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。

[0231] 在某些实施方案中，磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：



;

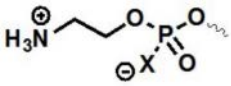
(Zc1);



;

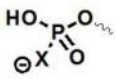
(Zc2);

[0232]



；和

(Zc3)



;

(Zc4)

[0233] 其中X是O、S或BH_3。

[0234] 在某些实施方案中，有义链3'端的位置1和2的核苷酸，以及反义链5'端的位置1和2的核苷酸，通过硫代磷酸酯键与相邻的核糖核苷酸连接。

[0235] 在一个方面，本发明提供了一种用于抑制生物体中突触核蛋白(SNCA)基因表达的药物组合物，其包含上述dsRNA和药学上可接受的载体。

[0236] 在某些实施方案中，dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50％。在某些实施方案中，dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80％。

[0237] 在一个方面，本公开提供了一种用于抑制细胞中SNCA基因表达的方法，该方法包括：(a)将上述双链核糖核酸(dsRNA)引入细胞中；和(b)将步骤(a)中产生的细胞维持足够长的时间，以使SNCA基因的mRNA转录物降解，从而抑制细胞中SNCA基因的表达。

[0238] 在一个方面，本公开提供了一种治疗或控制神经退行性疾病的方法，包括向需要这种治疗或控制的患者施用治疗有效量的上述dsRNA。

[0239] 在某些实施方案中，将所述dsRNA施用于患者的大脑。

[0240] 在某些实施方案中，dsRNA通过脑室内(ICV)注射、纹状体内(IS)注射、静脉内(IV)注射、皮下(SQ)注射或其组合施用。

[0241] 在某些实施方案中，施用dsRNA导致海马、纹状体、皮质、小脑、丘脑、下丘脑和脊髓中的一个或多个中的SNCA基因mRNA减少。

[0242] 在某些实施方案中，dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50％。在某些实施方案中，dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80％。

[0243] 在一个方面,本公开提供了包含调控序列的载体,该调控序列与编码RNA分子的核苷酸序列可操作地连接,所述RNA分子与SEQ ID NO:1-13的SNCA核酸序列基本上互补。

[0244] 在某些实施方案中,RNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50%。在某些实施方案中,RNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80%。

[0245] 在某些实施方案中,RNA分子包含ssRNA或dsRNA。

[0246] 在某些实施方案中,dsRNA包含有义链和反义链,其中反义链包含与SEQ ID NO:1-13的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

[0247] 在一个方面,本公开提供了一种包含上述载体的细胞。

[0248] 在一个方面,本公开提供了一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含上述载体和AAV衣壳。

[0249] 在一个方面,本公开提供了包含两个或更多个RNA分子的分支RNA化合物,例如两个或更多个RNA分子,其各自包含15至40个核苷酸长度(例如,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸长度),其中每个RNA分子包含具有与SNCA mRNA区段基本上互补的核酸序列的部分。两个RNA分子可以通过一个或多个独立地选自连接子、间隔子和分支点的部分相互连接。

[0250] 在某些实施方案中,分支RNA分子包含ssRNA和dsRNA中的一种或两种。

[0251] 在某些实施方案中,分支RNA分子包含反义寡核苷酸。

[0252] 在某些实施方案中,每个RNA分子包含含有有义链和反义链的dsRNA,其中每个反义链独立地包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。

[0253] 在某些实施方案中,分支RNA化合物包含彼此共价结合(例如,通过连接子、间隔子或分支点)的本公开的任何上述方面或实施方案的RNA分子的两个或更多个拷贝。

[0254] 在某些实施方案中,分支RNA化合物包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列的部分。例如,分支的RNA化合物可以包含两个或多个彼此共价结合的dsRNA分子(例如,通过连接子、间隔子或分支点)并且各自包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至少10、11、12或13个连续核苷酸具有互补性的反义链。例如,在某些实施方案中,dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的核酸序列的10至25个连续核苷酸的区段(例如,SEQ ID NO:1的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:2的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:3的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:4的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:5的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:6的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:7的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:8的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:9的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:10的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段,SEQ ID NO:11的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个

连续核苷酸的区段，SEQ ID NO:12的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段，或SEQ ID NO:13的核酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸的区段)具有互补性的反义链。

[0255] 在某些实施方案中，分支RNA化合物中的每个dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的核酸序列的15至35个连续核苷酸的区段互补的反义链。例如，反义链可与SEQ ID NO:1的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:2的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:3的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:4的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:5的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:6的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:7的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸

或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:8的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:9的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:10的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:11的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:12的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。在某些实施方案中，反义链与SEQ ID NO:13的核酸序列的15个连续核苷酸、16个连续核苷酸、17个连续核苷酸、18个连续核苷酸、19个连续核苷酸、20个连续核苷酸、21个连续核苷酸、22个连续核苷酸、23个连续核苷酸、24个连续核苷酸、25个连续核苷酸、26个连续核苷酸、27个连续核苷酸、28个连续核苷酸、29个连续核苷酸、30个连续核苷酸、31个连续核苷酸、32个连续核苷酸、33个连续核苷酸、34个连续核苷酸或35个连续核苷酸的区段具有互补性。

[0256] 在某些实施方案中，分支RNA化合物中的每个dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列具有至多3个错配的反义链。例如，相对于SEQ ID NO:1的核酸序列，反义链可具有0-3个错配(例如，0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:2的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:3的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:4的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中，反义链相对于SEQ ID NO:5的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错

配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:6的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:7的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:8的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:9的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:10的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:11的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:12的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。在某些实施方案中,反义链相对于SEQ ID NO:13的核酸序列具有0-3个错配(例如0个错配、1个错配、2个错配或3个错配)。

[0257] 在某些实施方案中,分支RNA化合物中的每个dsRNA包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列完全互补的反义链。

[0258] 在某些实施方案中,分支RNA化合物包含具有与SEQ ID NO:14-28中任一个的SNCA核酸序列中的一个或多个基本上互补的核酸序列的部分。

[0259] 在某些实施方案中,RNA分子包含反义寡核苷酸。

[0260] 在某些实施方案中,每个RNA分子包含13至35个个核苷酸长度。

[0261] 在某些实施方案中,反义链和/或有义链包含约13个核苷酸至35个核苷酸长度。例如,在某些实施方案中,反义链和/或有义链为13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸长度。

[0262] 在任一前述方面的一些实施方案中,反义链长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为19个核苷酸。在任一前述方面的一些实施方案中,反义链长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为30个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为31个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为32个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为33个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为34个核苷酸。在一些实施方案中,反义链长度为35个核苷酸。

[0263] 在一些实施方案中,有义链长度为13个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链长度为27个核苷酸。在一些

实施方案中，有义链长度为29个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为30个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为31个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为32个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为33个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为34个核苷酸。在一些实施方案中，有义链长度为35个核苷酸。

[0264] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0265] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0266] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0267] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0268] 在一些实施方案中，反义链的长度为18个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0269] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0270] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0271] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0272] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0273] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0274] 在一些实施方案中，反义链的长度为19个核苷酸，而有义链的长度为19个核苷酸。

[0275] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0276] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0277] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0278] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0279] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为19个核苷酸。

[0280] 在一些实施方案中，反义链的长度为20个核苷酸，而有义链的长度为20个核苷酸。

[0281] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0282] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0283] 在任一前述方面的一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0284] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0285] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0286] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为19个核苷酸。

[0287] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为20个核苷酸。

[0288] 在一些实施方案中，反义链的长度为21个核苷酸，而有义链的长度为21个核苷酸。

[0289] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为14个核苷酸。

[0290] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为15个核苷酸。

[0291] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为16个核苷酸。

[0292] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为17个核苷酸。

[0293] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为18个核苷酸。

[0294] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为19个核苷酸。

[0295] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为20个核苷酸。

[0296] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为21个核苷酸。

[0297] 在一些实施方案中，反义链的长度为22个核苷酸，而有义链的长度为22个核苷酸。

[0298] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0299] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0300] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0301] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0302] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0303] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0304] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0305] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0306] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0307] 在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0308] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0309] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0310] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0311] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0312] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0313] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0314] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0315] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0316] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0317] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0318] 在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0319] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0320] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0321] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0322] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0323] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0324] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0325] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0326] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0327] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0328] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0329] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0330] 在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0331] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0332] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0333] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0334] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0335] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0336] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0337] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0338] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0339] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0340] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0341] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0342] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0343] 在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0344] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0345] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0346] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0347] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0348] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0349] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0350] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0351] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0352] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0353] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0354] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0355] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0356] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0357] 在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0358] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0359] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0360] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0361] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0362] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0363] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0364] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0365] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0366] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0367] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0368] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0369] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0370] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0371] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0372] 在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸,而有义链的长度为28个核苷酸。

[0373] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0374] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0375] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0376] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0377] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0378] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0379] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0380] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0381] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0382] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0383] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0384] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0385] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0386] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0387] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为28个核苷酸。

[0388] 在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸,而有义链的长度为29个核苷酸。

[0389] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为14个核苷酸。

[0390] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为15个核苷酸。

[0391] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为16个核苷酸。

[0392] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为17个核苷酸。

[0393] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为18个核苷酸。

[0394] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为19个核苷酸。

[0395] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为20个核苷酸。

[0396] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为21个核苷酸。

[0397] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为22个核苷酸。

[0398] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为23个核苷酸。

[0399] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为24个核苷酸。

[0400] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为25个核苷酸。

[0401] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为26个核苷酸。

[0402] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为27个核苷酸。

[0403] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为28个核苷酸。

[0404] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为29个核苷酸。

[0405] 在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸,而有义链的长度为30个核苷酸。

[0406] 在任一前述方面的一些实施方案中,dsRNA包含14个碱基对至35个碱基对(例如,14个碱基对、15个碱基对、16个碱基对、17个碱基对、18个碱基对、19个碱基对、20个碱基对、21个碱基对、22个碱基对、23个碱基对、24个碱基对、25个碱基对、26个碱基对、27个碱基对、28个碱基对、29个碱基对或30个碱基对)的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含14个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含15个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含16个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含17个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含18个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含20个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含19个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含20个碱基对的双链区。在一些实施方案中,dsRNA包含21个碱基对的双链区。在一些实

施方案中，dsRNA包含22个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含23个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含24个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含25个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含26个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含27个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含28个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含29个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含30个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含31个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含32个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含33个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含34个碱基对的双链区。在一些实施方案中，dsRNA包含35个碱基对的双链区。

[0407] 在某些实施方案中，dsRNA包含平末端。

[0408] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一个单链核苷酸突出端。在某些实施方案中，dsRNA包含2个核苷酸至5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

[0409] 在某些实施方案中，dsRNA包含天然存在的核苷酸。

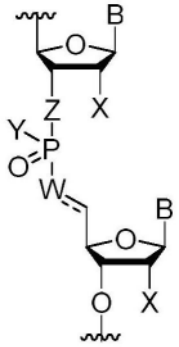
[0410] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸。

[0411] 在某些实施方案中，修饰的核苷酸包括2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-脱氧-2’-氟修饰的核苷酸、2′-脱氧-修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2′-氨基修饰的核苷酸、2’-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯或包含非天然碱基的核苷酸。

[0412] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸间键。

[0413] 在某些实施方案中，修饰的核苷酸间键包含硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中，分支RNA化合物包含4-16个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中，分支RNA化合物包含8-13个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0414] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少一种式I修饰的核苷酸间键：

[0415] 

(I)；

[0416] 其中：

[0417] B是碱基配对部分；

[0418] W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2和CH组成的组；

[0419] X选自由卤代基、羟基和C_{1-6}烷氧基组成的组；

[0420] Y选自由O^-、OH、OR、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

[0421] Z选自由O和CH_2组成的组；

[0422] R是保护基；并且

[0423] ═══是任选的双键。

[0424] 在某些实施方案中，当W为CH时，═══为双键。

[0425] 在某些实施方案中，当W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2组成的组时，═══为单键。

[0426] 在某些实施方案中，dsRNA包含至少80％的化学修饰核苷酸(例如，80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％化学修饰的核苷酸)。在某些实施方案中，dsRNA为完全化学修饰的。在某些实施方案中，dsRNA包含至少70％的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如，70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％2'-O-甲基修饰)。

[0427] 在某些实施方案中，反义链包含至少80％的化学修饰核苷酸。

[0428] 在某些实施方案中，反义链是完全化学修饰的。

[0429] 在某些实施方案中，反义链包含至少70％的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中，反义链包含约70％至90％的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中，反义链包含约85％至约90％的2'-O-甲基修饰(例如，约85％、86％、87％、88％、89％或90％2'-O-甲基修饰)。

[0430] 在某些实施方案中，反义链包含约75％至约85％的2'-O-甲基核苷酸修饰(例如，约75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％或85％2'-O-甲基核苷酸修饰)。在某些实施方案中，反义链包含约76％至约80％的2'-O-甲基修饰(例如，约76％、77％、78％、79％或80％2′-O-甲基修饰)。

[0431] 在某些实施方案中，有义链包含至少80％的化学修饰核苷酸。在某些实施方案中，有义链是完全化学修饰的。在某些实施方案中，有义链包含至少65％的2′-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中，有义链包含100％的2′-O-甲基核苷酸修饰。

[0432] 在某些实施方案中，有义链包含反义链和有义链之间的一个或多个核苷酸错配。在某些实施方案中，一种或多种核苷酸错配存在于有义链5'端的位置2、6和12。在某些实施方案中，核苷酸错配存在于有义链5′端的位置2、6和12。

[0433] 在某些实施方案中，反义链包含5'磷酸酯、5'-烷基膦酸酯、5'亚烷基膦酸酯、5'烯基膦酸酯或其混合物。

[0434] 在某些实施方案中，反义链包含5′乙烯基膦酸酯。

[0435] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5′末端和3′末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸；(3)反义链5'端的2和14位核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸；和(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0436] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少55％的2'-O-甲基修饰(例如55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、

62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的2'-O-甲基修饰)；(3)反义链5'端位置14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少55%的2'-O-甲基修饰(例如55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的2'-O-甲基修饰)；和(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0437] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少85%的2'-O-甲基修饰；(3)反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含100%的2'-O-甲基修饰；和(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0438] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰；(3)反义链5'端的位置4、5、6和14处核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含100%的2'-O-甲基修饰；和(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0439] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少85%的2'-O-甲基修饰(例如，约85%至约90%的2'-O-甲基修饰)；(3)反义链5′端位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，反义链5'端位置2和14处的核苷酸可以是2'-氟核苷酸)；(4)反义链3′端位置1-2至1-7处核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰(例如，约75%至约80%的2'-O-甲基修饰)；(7)有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸是2'-氟核苷酸)；和(8)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0440] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰(例如约75%至约80%2'-O-甲基修饰)；(3)反义链5′端位置2、4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如反义链5'端位置2、4、5、6、14和16处的核苷酸可以是2'-氟核苷酸)；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含100%的2'-O-甲基修饰；和(7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯

核苷酸间键相互连接。

[0441] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链具有与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰(例如，约75％至约80％的2'-O-甲基修饰)；(3)反义链5'端位置2、6、14和16处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸(例如，反义链5'端位置2、6、14和16处的核苷酸可以是2'-氟核苷酸)；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少65％的2'-O-甲基修饰(例如，约65％至约75％的2'-O-甲基修饰)；(7)有义链3'端的位置7、9、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；和(8)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0442] 在某些实施方案中，dsRNA包含反义链和有义链，每条链具有5'末端和3'末端，其中：(1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的核酸序列；(2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰；(3)反义链5′端位置2、6、和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；(4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；(5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；(6)有义链包含至少80％的2'-O-甲基修饰；(7)有义链3'端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；和(8)有义链5'端位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0443] 在某些实施方案中，功能部分连接到反义链的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到有义链的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到有义链的3'末端。

[0444] 在某些实施方案中，功能部分包含疏水部分。

[0445] 在某些实施方案中，疏水部分选自由以下组成的组：脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物、内源性大麻素、维生素及其混合物。

[0446] 在某些实施方案中，类固醇选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组。

[0447] 在某些实施方案中，脂肪酸选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳烯酸(DCA)组成的组。

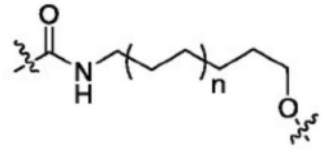
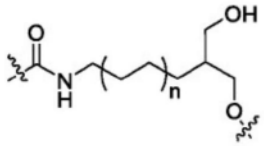
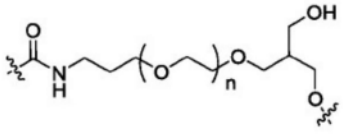
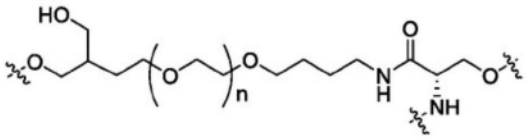
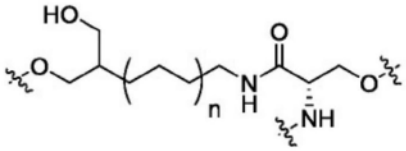
[0448] 在某些实施方案中，维生素选自由胆碱、维生素A、维生素E、其衍生物和其代谢物组成的组。

[0449] 在某些实施方案中，维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

[0450] 在某些实施方案中，功能部分通过连接子与反义链和/或有义链连接。

[0451] 在某些实施方案中，连接子包含二价或三价连接子。

[0452] 在某些实施方案中，二价或三价连接子选自由以下组成的组：

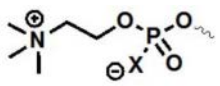
[0453] 
；

；

；

；和

，

[0454] 其中n为1、2、3、4或5。

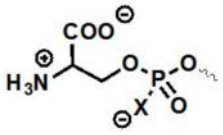
[0455] 在某些实施方案中，连接子包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

[0456] 在某些实施方案中，当连接子是三价连接子时，连接子进一步连接磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。

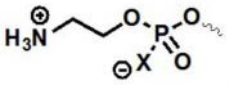
[0457] 在某些实施方案中，磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：


；

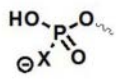
(Zc1)；


；

(Zc2)；

[0458] 
；和

(Zc3)

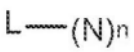

；

(Zc4)

[0459] 其中X是O、S或BH_3。

[0460] 在某些实施方案中，有义链3′端的位置1和2的核苷酸，以及反义链5′端的位置1和2的核苷酸，通过硫代磷酸酯键与相邻的核糖核苷酸连接。

[0461] 在一方面，本公开提供式(I)的化合物：



[0462]

(I)

[0463] 其中：

[0464] L包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸盐、酯、酰胺、三唑或其组合，任选其中式(I)进一步包含一个或多个分支点B，以及一个或多个间隔子S，其中：

[0465] B在每次出现时独立地是多价有机物质或其衍生物；

[0466] S在每次出现时独立地包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑或其组合；

[0467] n是2、3、4、5、6、7或8；和

[0468] N是双链核酸，例如本公开的任何上述方面或实施方案的dsRNA分子。在某些实施方案中，每个N的长度为15至40个碱基。

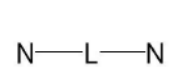
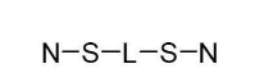
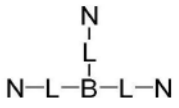
[0469] 在某些实施方案中，每个N包含有义链和反义链；其中：

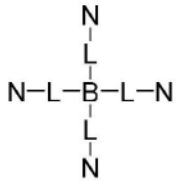
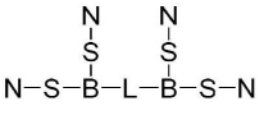
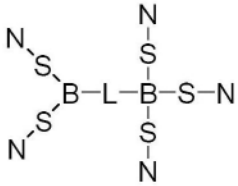
[0470] 所述反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列；和

[0471] 其中有义链和反义链各自独立地包含一种或多种化学修饰。

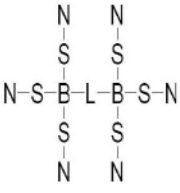
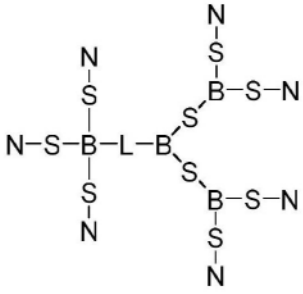
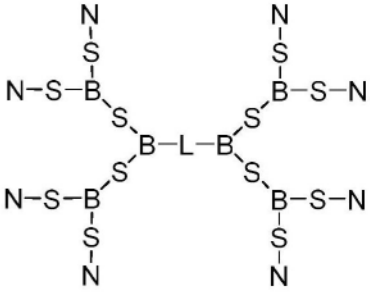
[0472] 在某些实施方案中，化合物包含选自式(I-1)-(I-9)的结构：

[0473]

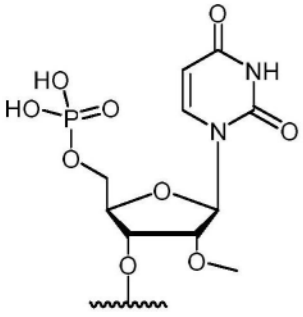
		
(I-1)	(I-2)	(I-3)

		
(I-4)	(I-5)	(I-6)

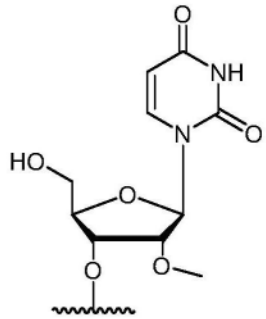
[0474]

		
(I-7)	(I-8)	(I-9)

[0475] 在某些实施方案中，反义链包含5'末端基团R，其选自由以下组成的组：

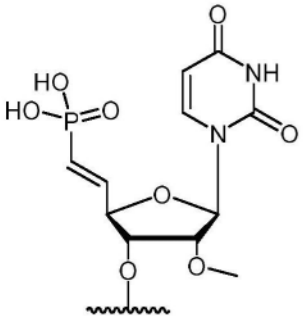


R1 ,

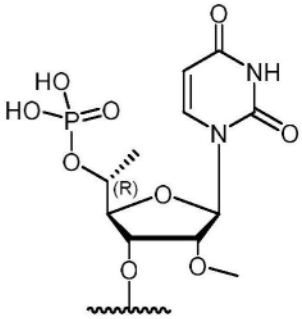


R2 ,

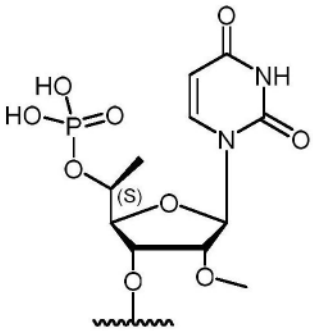
[0476]



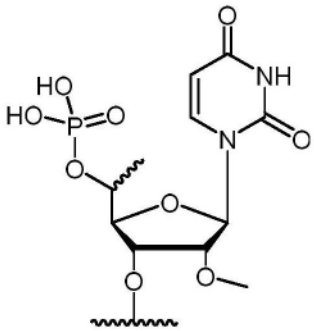
R3 ,



R4 ,

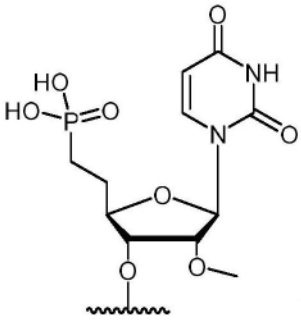


R5 ,

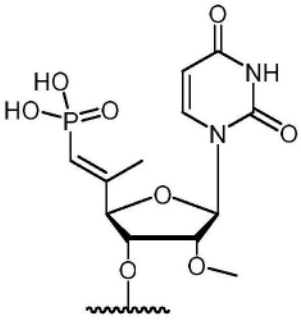


R6 ,

[0477]

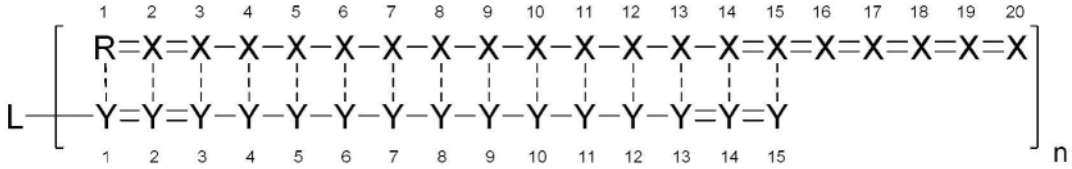


R7 和



R8 。

[0478] 在某些实施方案中,所述化合物包含式(II)的结构:

[0479] 

(II)

[0480] 其中：

[0481] X,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

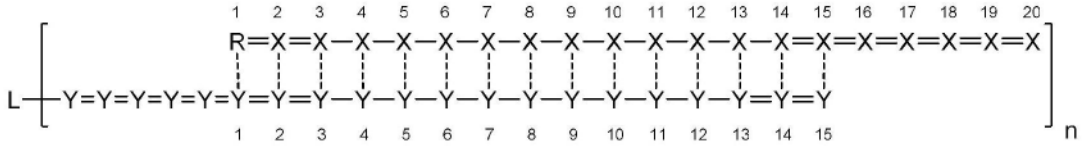
[0482] Y,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

[0483] -代表磷酸二酯核苷间键；

[0484] ＝代表硫代磷酸酯核苷间键;和

[0485] ---每次出现时独立代表碱基配对相互作用或错配。

[0486] 在某些实施方案中,所述化合物包含式(IV)的结构：

[0487] 

(IV)

[0488] 其中：

[0489] X,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

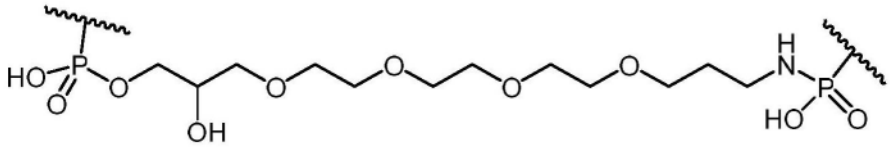
[0490] Y,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物；

[0491] -代表磷酸二酯核苷间键；

[0492] ＝代表硫代磷酸酯核苷间键;和

[0493] ---每次出现时独立代表碱基配对相互作用或错配。

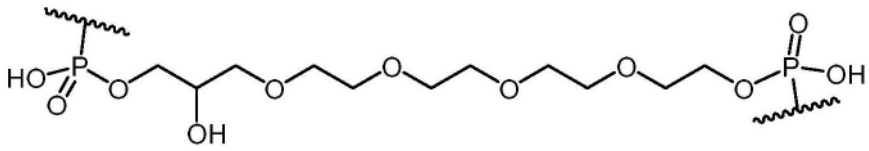
[0494] 在某些实施方案中,L是结构L1：

[0495] 

(L1)。

[0496] 在某些实施方案中,R是R^3并且n是2。

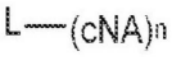
[0497] 在某些实施方案中,L是结构L2：

[0498] 

(L2)。

[0499] 在某些实施方案中,R是R^3并且n是2。

[0500] 在一个方面,本公开提供了一种用于具有式(VI)结构的治疗性核酸的递送系统：



[0501]

(VI)

[0502] 其中：

[0503] L包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸盐、酯、酰胺、三唑或其组合，任选其中式(VI)进一步包含一个或多个分支点B，以及一个或多个间隔子S，其中：

[0504] B在每次出现时独立地包括多价有机物质或其衍生物；

[0505] S在每次出现时独立地包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑或其组合；

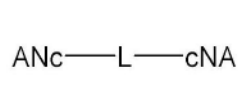
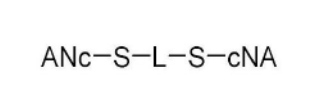
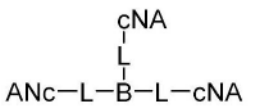
[0506] 每个cNA独立地是包含一种或多种化学修饰的载体核酸；

[0507] 每个cNA独立地包含SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列的至少15个连续核苷酸；和

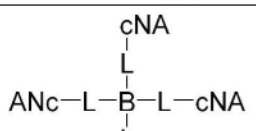
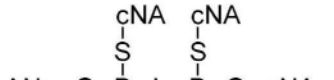
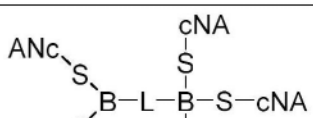
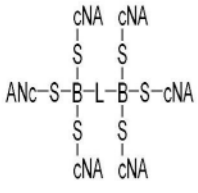
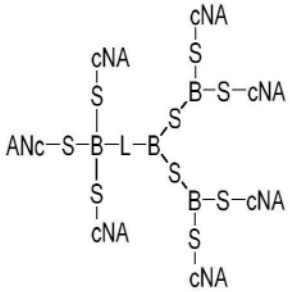
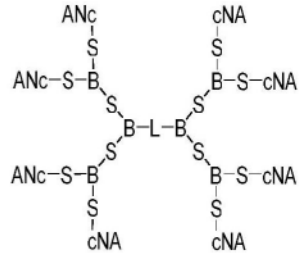
[0508] n是2、3、4、5、6、7或8。

[0509] 在某些实施方案中，递送系统包含选自式(VI-1)-(VI-9)的结构：

[0510]

		
(VI-1)	(VI-2)	(VI-3)

[0511]

		
(VI-4)	(VI-5)	(VI-6)
		
(VI-7)	(VI-8)	(VI-9)

[0512] 在某些实施方案中，每个cNA独立地包含化学修饰的核苷酸。

[0513] 在某些实施方案中，递送系统还包含n个治疗性核酸(NA)，其中每个NA与至少一个cNA杂交。

[0514] 在某些实施方案中，每个NA独立地包含至少14个连续核苷酸(例如，至少14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或更多个连续核苷酸)。

[0515] 在某些实施方案中，每个NA独立地包含14-35个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含14个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含15个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含16个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含17个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含18个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含19个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含20个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含21个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含22个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含23个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含24个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含25个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含26个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含27个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含28个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含29个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含30个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含31个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含32个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含33个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含34个连续核苷酸。在一些实施方案中，每个NA独立地包含35个连续核苷酸。

[0516] 在某些实施方案中，每个NA包含至少2个核苷酸的未配对突出端。

[0517] 在某些实施方案中，突出端的核苷酸通过硫代磷酸酯键连接。

[0518] 在某些实施方案中，每个NA独立地选自由以下组成的组：DNA、siRNA、miRNA拮抗剂、miRNA、间隙体、混合体和指导RNA。

[0519] 在某些实施方案中，每个NA与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补。

[0520] 在一方面，本公开提供抑制生物体中的SNCA基因的表达的药物组合物，包含上述化合物或上述系统和药学上可接受的载体。

[0521] 在某些实施方案中，该化合物或系统将SNCA基因的表达抑制至少50％。在某些实施方案中，该化合物或系统将SNCA基因的表达抑制至少80％。

[0522] 在一个方面，本公开提供了一种用于抑制细胞中SNCA基因表达的方法，该方法包括：(a)将上述化合物或上述系统引入细胞中；和(b)将步骤(a)中产生的细胞维持足够长的时间，以使SNCA基因的mRNA转录物降解，从而抑制细胞中SNCA基因的表达。

[0523] 在一个方面，本公开提供了一种治疗或控制神经退行性疾病的方法，包括向需要这种治疗或控制的患者施用治疗有效量的上述化合物或上述系统。

[0524] 在某些实施方案中，将所述dsRNA施用于患者的大脑。

[0525] 在某些实施方案中，dsRNA通过脑室内(ICV)注射、纹状体内(IS)注射、静脉内(IV)注射、皮下(SQ)注射或其组合施用。

[0526] 在某些实施方案中，施用dsRNA导致海马、纹状体、皮质、小脑、丘脑、下丘脑和脊髓中的一个或多个中的SNCA基因mRNA减少。

[0527] 在某些实施方案中，dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少50％。在某些实施方案

中,dsRNA将所述SNCA基因的表达抑制至少80％。

附图说明

[0528] 根据结合附图进行的说明性实施方案的以下详细描述,本公开的上述和其它特征和优势将变得更加完全清楚明白。专利或申请文件包含至少一幅彩色绘图。专利局将根据请求和支付必要的费用提供本专利或专利申请出版物的彩色附图副本。

[0529] 图1A-1F描绘了靶向SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中的人SNCA mRNA序列的siRNA筛选。图1A,十二个序列的筛选将SNCA919、SNCA 1133、SNCA 258、SNCA 1054和SNCA 1175识别为有效靶向区域;图1B-1E,使用SNCA 919(B)、SNCA 1133(C)、SNCA258(D)、SNCA 1054(E)和SNCA 1175(F)siRNA获得的8点剂量响应曲线。

[0530] 图2描绘了靶向SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中的人和小鼠SNCA mRNA序列的siRNA筛选。十一个序列的筛选将SNCA 270、SNCA 753、SNCA 963和SNCA 1094识别为有效靶向区域。

[0531] 图3描绘了图4A-4C中的针对SNCA评估的siRNA化学支架。

[0532] 图4A-4C描绘了针对SNCA的48个序列的筛选,其中应用了3中不同的化学支架。命中序列以黄色显示。图4A,P3平支架;图4B,P3不对称支架;图4C,富含2'-O-甲基的不对称支架。

[0533] 图5描绘了靶向SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中SNCA mRNA序列的siRNA筛选。

[0534] 图6描绘了用siRNA SNCA 270、SNCA 753、SNCA 963和SNCA1094获得的8点剂量响应曲线。结果在SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中获得。

[0535] 图7A-图7B描绘了在脑室内(ICV)注射后1个月在几个小鼠大脑区域中的归一化的SNCA mRNA(图7A)和蛋白质(图7B)表达水平。使用靶向被指定为SNCA 963的SNCA靶位点的10μl注射体积中的siRNA的10nmol剂量。

具体实施方式

[0536] 提供了新型SNCA靶序列。还提供了靶向例如本公开的一种或多种靶序列的SNCA mRNA的新型RNA分子,例如siRNA和含有其的分支RNA化合物。

[0537] 除非另有规定,本文所述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学以及杂交相关使用的命名法是本领域众所周知的和常用的。除非另有规定,否则本文提供的方法和技术是根据本领域公知并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法进行的,除非另有说明。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书、如本领域通常完成或如本文所述来进行。除非提供确切的定义,否则结合本文所描述的分析化学、合成有机化学和医药化学所使用的命名法和这些化学领域的实验室程序和技术为本领域熟知和常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、递送和患者治疗。

[0538] 除非本文另有定义,否则本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义,此处提供的定义优先于任何字典或外部定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。除非另外说明,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括(including)”以及诸如“包括(includes)”和

“包括(included)”的其它形式的使用不是限制性的。

[0539] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。

[0540] 术语“核苷”是指具有与核糖或脱氧核糖共价连接的嘌呤或嘧啶碱基的分子。示例性核苷包括腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷和胸苷。其他示例性核苷包括肌苷、1-甲基肌苷、假尿苷、5,6-二氢尿苷、核胸苷、2N-甲基鸟苷和N2,N2-二甲基鸟苷(也称为“稀有”核苷)。术语“核苷酸”是指具有以酯键连接到糖部分的一个或多个磷酸基团的核苷。示例性核苷酸包括核苷一磷酸、二磷酸和三磷酸。术语“多核苷酸”和“核酸分子”在本文中可互换使用,是指通过5’和3’碳原子之间的磷酸二酯或硫代磷酸酯键连接在一起的核苷酸聚合物。

[0541] 术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸(例如,2、3、4、5、10、15、20、25、30或更多个核糖核苷酸)的聚合物。术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA和RNA可以自然合成(例如,分别通过DNA复制或DNA转录)。RNA可以进行转录后修饰。DNA和RNA也可以化学合成。DNA和RNA可以是单链的(即,分别为ssRNA和ssDNA)或多链的(例如,双链,即分别为dsRNA和dsDNA)。“mRNA”或“信使RNA”是指定一条或多条多肽链的氨基酸序列的单链RNA。在蛋白质合成过程中,当核糖体与mRNA结合时,该信息被翻译。

[0542] 如本文所用,术语“小干扰RNA”(“siRNA”)(在本领域中也称为“短干扰RNA”)是指包含约10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA(或RNA类似物),它能够指导或介导RNA干扰。在某些实施方案中,siRNA包含约15-30个核苷酸或核苷酸类似物,或约16-25个核苷酸(或核苷酸类似物),或约18-23个核苷酸(或核苷酸类似物),或约19-22个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸或核苷酸类似物)。术语“短”siRNA是指包含约21个核苷酸(或核苷酸类似物),例如19、20、21或22个核苷酸的siRNA。术语“长”siRNA是指包含约24-25个核苷酸,例如23、24、25或26个核苷酸的siRNA。在一些情况下,短siRNA可以包括少于19个核苷酸,例如16、17或18个核苷酸,只要较短的siRNA保留介导RNAi的能力。同样,在一些情况下,长siRNA可以包括超过26个核苷酸,只要在没有进一步加工(例如酶促加工)至短siRNA的情况下,更长的siRNA保留介导RNAi的能力。

[0543] 术语“核苷酸类似物”或“改变的核苷酸”或“修饰的核苷酸”是指非标准核苷酸,包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性核苷酸类似物在任何位置被修饰以改变核苷酸的某些化学性质,但仍保留核苷酸类似物执行其预期功能的能力。可以衍生的核苷酸位置的实例包括:5位,例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷、5-丙炔尿苷、5-丙烯基尿苷等;6位,例如6-(2-氨基)丙基尿苷;和腺苷和/或鸟苷的8位,例如8-溴鸟苷、8-氯鸟苷、8-氟鸟苷等。核苷酸类似物还包括脱氮核苷酸,例如7-脱氮腺苷;O-和N-修饰的(例如,烷基化的,例如,N6-甲基腺苷,或如本领域中已知的)核苷酸;和其他杂环修饰的核苷酸类似物,例如Herdewijn,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.,2000年8月10(4):297-310中描述的那些。

[0544] 核苷酸类似物还可以包含对核苷酸糖部分的修饰。例如,2’OH-基团可以被选自H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2或COOR的基团取代,其中R是取代或未取代的C_1-C_6烷基、烯基、炔基、芳基等。其他可能修饰包括美国专利第5,858,988和6,291,438号描述的那些。

[0545] 也可以修饰核苷酸的磷酸基团,例如,通过用硫(例如,硫代磷酸酯)取代磷酸基团

的一个或多个氧，或通过进行允许核苷酸执行其预期功能的其他取代，例如如在例如Eckstein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2000年4月10(2):117-21,Rusckowski等人Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2000年10月10(5):333-45,Stein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2001年10月11(5):317-25,Vorobjev等人Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2001年4月11(2):77-85和美国专利第5,684,143号所描述。某些上述修饰(例如磷酸基团修饰)降低例如包含所述类似物的多核苷酸在体内或体外的水解速率。

[0546] 术语“寡核苷酸”是指核苷酸和/或核苷酸类似物的短聚合物。

[0547] 术语“RNA类似物”是指与相应的未改变或未修饰的RNA相比具有至少一个改变或修饰的核苷酸，但保留与相应的未改变或未修饰的RNA相同或相似的性质或功能的多核苷酸(例如，化学合成的多核苷酸)。如上所述，寡核苷酸可以通过键连接，与具有磷酸二酯键的RNA分子相比，这导致RNA类似物的水解速率较低。例如，类似物的核苷酸可以包含亚甲基二醇、乙二醇、氧甲硫基、氧乙硫基、氧羰基氧基、磷酰二胺、磷酰胺、和/或硫代磷酸酯键。一些RNA类似物包括糖和/或骨架修饰的核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸。此类改变或修饰可进一步包括添加非核苷酸材料，例如添加至RNA的末端或内部(在RNA的一个或多个核苷酸处)。RNA类似物只需要与天然RNA足够相似，以至于它具有介导RNA干扰的能力。

[0548] 如本文所用，术语“RNA干扰”(“RNAi”)是指RNA的选择性细胞内降解。RNAi在细胞中自然发生以去除外源RNA(例如病毒RNA)。天然RNAi通过从游离dsRNA上切割下来的片段进行，这些片段将降解机制引导至其他类似的RNA序列。或者，RNAi可以由人工启动，例如，使靶基因的表达沉默。

[0549] 具有“与靶mRNA序列充分互补以指导靶特异性RNA干扰(RNAi)”的链的RNAi剂，例如RNA沉默剂，是指该链具有足以通过RNAi机制或过程触发靶mRNA破坏的序列。

[0550] 本文中使用的术语“分离RNA”(例如“分离siRNA”或“分离siRNA前体”)表示基本上没有通过重组技术产生时的其它细胞物质或培养介质，或基本上没有化学合成时的化学前体或其它化合物的RNA分子。

[0551] 如本文所用，术语“RNA沉默”是指由RNA分子介导的一组序列特异性调控机制(例如RNA干扰(RNAi)、转录基因沉默(TGS)、转录后基因沉默(PTGS)、压制、共抑制、和翻译抑制)，导致相应蛋白质编码基因表达的抑制或“沉默”。已经在许多类型的生物体中观察到RNA沉默，包括植物、动物和真菌。

[0552] 术语“区分性RNA沉默”是指RNA分子实质上抑制“第一”或“靶”多核苷酸序列的表达而不实质上抑制“第二”或“非靶”多核苷酸序列的表达的能力，例如，当两个多核苷酸序列存在于同一细胞中时。在某些实施方案中，靶多核苷酸序列对应于靶基因，而非靶多核苷酸序列对应于非靶基因。在某些实施方案中，靶多核苷酸序列对应于靶等位基因，而非靶多核苷酸序列对应于非靶等位基因。在某些实施方案中，靶多核苷酸序列是编码靶基因的调节区(例如启动子或增强子元件)的DNA序列。在其他实施方案中，靶多核苷酸序列是由靶基因编码的靶mRNA。

[0553] 术语“体外”具有其本领域公认的含义，例如，涉及纯化的试剂或提取物，例如细胞提取物。术语“体内”也具有其本领域公认的含义，例如，涉及活细胞，例如永生化细胞、原代细胞、细胞系、和/或生物体内的细胞。

[0554] 如本文所用，术语“转基因”是指任何核酸分子，其通过人为插入细胞中，并成为从

细胞发育而来的生物体基因组的一部分。这种转基因可以包括与转基因生物部分或完全异源(即外源)的基因,或者可以代表与生物的内源基因同源的基因。术语“转基因”还意指一种核酸分子,其包括一种或多种选定的核酸序列例如DNA,所述序列编码将在转基因生物体例如动物中表达的一种或多种工程化RNA前体,所述序列与转基因动物部分地或完全异源的,即外源的,或与转基因动物的内源基因同源的,但被设计成插入动物基因组中与天然基因不同的位置。转基因包括表达所选核酸序列所必需的一个或多个启动子和任何其他DNA例如内含子,所有这些DNA都可操作地连接到所选序列,并且可以包括增强子序列。

[0555] “涉及”疾病或病症的基因包括如下基因,所述基因的正常或异常表达或功能影响或导致疾病或病症或所述疾病或病症的至少一种症状。

[0556] 如本文所用,术语“功能获得性突变”是指基因中的任何突变,其中由所述基因编码的蛋白质(即突变蛋白质)获得通常不与该蛋白质(即野生型蛋白质)相关的功能并导致或促成疾病或病症。功能获得性突变可以是基因中一个或多个核苷酸的缺失、添加或替换,这导致编码蛋白质的功能发生变化。在一个实施方案中,功能获得性突变改变突变蛋白质的功能或引起与其他蛋白质的相互作用。在另一个实施方案中,功能获得性突变导致正常野生型蛋白质的减少或去除,例如,通过改变的突变蛋白质与所述正常野生型蛋白质的相互作用。

[0557] 如本文所用,术语“靶基因”是其表达将被基本上抑制或“沉默”的基因。这种沉默可以通过RNA沉默来实现,例如通过切割靶基因的mRNA或靶基因的翻译抑制。术语“非靶基因”是其表达基本上不会被沉默的基因。在一个实施方案中,靶基因和非靶基因的多核苷酸序列(例如,由靶基因和非靶基因编码的mRNA)可以相差一个或多个核苷酸。在另一个实施方案中,靶基因和非靶基因可以因一种或多种多态性(例如,单核苷酸多态性或SNP)而不同。在另一个实施方案中,靶基因和非靶基因可以共享小于100%的序列同一性。在另一个实施方案中,非靶基因可以是靶基因的同源物(例如直向同源物或旁系同源物)。

[0558] “靶等位基因”是其表达将被选择性抑制或“沉默”的等位基因(例如,SNP等位基因)。这种沉默可以通过RNA沉默来实现,例如,通过siRNA切割靶基因或靶等位基因的mRNA。术语“非靶等位基因”是其表达基本上不被沉默的等位基因。在某些实施方案中,靶和非靶等位基因可以对应于相同的靶基因。在其他实施方案中,靶等位基因对应于或与靶基因相关,并且非靶等位基因对应于或与非靶基因相关。在一个实施方案中,靶和非靶等位基因的多核苷酸序列可以相差一个或多个核苷酸。在另一个实施方案中,靶和非靶等位基因可以通过一个或多个等位基因多态性(例如,一个或多个SNP)而不同。在另一个实施方案中,靶等位基因和非靶等位基因可以共享小于100%的序列同一性。

[0559] 如本文所用,术语“多态性”是指当对来自不同来源或受试者(但来自相同有机体)的相同基因序列进行比较时,鉴定或检测到的基因序列中的变化(例如,一或多个缺失、插入或取代)。例如,当比较来自不同受试者的相同基因序列时,可以鉴定出多态性。这种多态性的鉴定在本领域中是常规的,该方法类似于用于检测例如乳腺癌点突变的那些。例如,可以从受试者的淋巴细胞中提取的DNA进行鉴定,然后使用针对所述多态性区域的特异性引物扩增多态性区域。或者,当比较同一基因的两个等位基因时,可以鉴定多态性。在某些实施方案中,多态性是单核苷酸多态性(SNP)。

[0560] 生物体内相同基因的两个等位基因之间的序列变异在本文中称为“等位基因多态

性”。在某些实施方案中，等位基因多态性对应于SNP等位基因。例如，等位基因多态性可以包含SNP的两个等位基因之间的单核苷酸变异。多态性可以在编码区内的核苷酸处，但由于遗传密码的简并性，编码的氨基酸序列没有变化。或者，多态性序列可以在特定位置编码不同的氨基酸，但氨基酸的变化不会影响蛋白质功能。多态性区域也可以在基因的非编码区域中找到。在示例性实施方案中，在基因的编码区或基因的非翻译区(例如，5′UTR或3′UTR)中发现多态性。

[0561] 如本文所用，术语“等位基因频率”是个体群体中单个基因座处等位基因(例如，SNP等位基因)的相对频率的量度(例如，比例或百分比)。例如，如果个体群体在他们的每个体细胞中携带特定染色体基因座的n个基因座(以及占据该基因座的基因)，那么等位基因的等位基因频率是在所述群体内，等位基因占据的基因座的分数或百分比。在某些实施方案中，等位基因(例如，SNP等位基因)的等位基因频率在样本群体中为至少10％(例如，至少15％、20％、25％、30％、35％、40％或更多)。

[0562] 如本文所用，术语“样本群体”是指包括统计学上显著数量的个体的个体群体。例如，样本群体可以包括50、75、100、200、500、1000或更多个体。在某些实施方案中，样本群体可以包括个体，这些个体至少具有共同的疾病表型(例如，功能获得性病症)或突变(例如，功能获得性突变)。

[0563] 如本文所用，术语“杂合性”是指群体中在特定基因座(例如，在SNP处)杂合(例如，包含两个或更多个不同等位基因)的个体的分数。可以使用本领域技术人员熟知的方法计算样本群体的杂合性。

[0564] 如本文所用，术语“聚谷氨酰胺结构域”是指由与肽键连接的连续谷氨酰胺残基组成的蛋白质区段或结构域。在一个实施方案中，连续区域包括至少5个谷氨酰胺残基。

[0565] 如本文所述，术语SNCA是指编码蛋白质α突触核蛋白或α突触核蛋白的基因。SNCA基因位于染色体4q22.1上。SNCA是一种丰富的14kDa蛋白质，由140个氨基酸组成，并且包含三个不同的结构域：(1)N-末端脂质结合α螺旋结构域；(2)非淀粉样蛋白组分(NAC)；和(3)酸性C末端结构域。SNCA的N末端结构域涵盖7个11残基重复序列，每个重复序列都包含高度保守的KTKEGV基序。中央区域，即NAC结构域，形成β折叠并由高度疏水的氨基酸组成，这有助于形成聚集体的倾向。SNCA的主要非结构化构象增加了SNCA对翻译后修饰(诸如磷酸化)的敏感性。单体SNCA没有毒性，但SNCA寡聚物和原纤维与神经元毒性相关。SNCA的过表达或三倍体足以引发SNCA聚集，这会导致多巴胺能神经元死亡。

[0566] 如本文所述，术语突触核蛋白病是指一系列神经退行性疾病，包括帕金森病、帕金森病痴呆、路易体痴呆、多系统萎缩和其他一些特征不太明显的神经轴索营养不良。α突触核蛋白病的重叠特征是存在含有α突触核蛋白聚集体的蛋白质体。这些蛋白质体在不同的α突触核蛋白病中外观不同，在帕金森病和痴呆中被称为路易体，在多系统萎缩中被称为胶质细胞质内含物，在神经轴索营养不良中被称为轴突球体。最近的证据表明，亨廷顿病(Huntington’s disease)患者可能表现出的脑部SNCA聚集增加。此外，由于突触核蛋白和tau蛋白之间的潜在相互作用，突触核蛋白病可能与tau蛋白病(诸如阿尔茨海默病(Alzheimer’s disease))重叠。

[0567] 如本文所用，术语“扩展的聚谷氨酰胺结构域”或“扩展的聚谷氨酰胺区段”是指包括通过肽键连接的至少35个连续谷氨酰胺残基的蛋白质区段或结构域。无论受试者是否表

现出症状,在患有如本文所述的聚谷氨酰胺疾病的受试者中都发现了这种扩展区段。

[0568] 如本文所用,术语“三核苷酸重复”或“三核苷酸重复区”是指由特定三核苷酸序列的连续重复组成的核酸序列区段。在一个实施方案中,三核苷酸重复包括至少5个连续的三核苷酸序列。示例性三核苷酸序列包括但不限于CAG、CGG、GCC、GAA、CTG和/或CGG。

[0569] 如本文所用,术语“三核苷酸重复疾病”是指以位于基因内的扩展的三核苷酸重复区为特征的任何疾病或病症,扩展的三核苷酸重复区是疾病或病症的病因。三核苷酸重复疾病的实例包括但不限于亨廷顿病(HD)、12型脊髓-小脑共济失调、8型脊髓-小脑共济失调、脆性X综合征、脆性XE智力低下、弗里德赖希共济失调和强直性营养不良。用于根据本公开治疗的示例性三核苷酸重复疾病是由在基因编码区的5’端扩展的三核苷酸重复区表征或引起的那些疾病,该基因编码突变蛋白,其引起或是疾病或病症的病因。其中突变与编码区不相关的某些三核苷酸疾病,例如脆性X综合征,可能不适合根据本公开的方法进行治疗,因为没有合适的mRNA可被RNAi靶向。相比之下,诸如弗里德赖希共济失调之类的疾病可能适合根据本公开的方法进行治疗,因为尽管致病突变不在编码区内(即,位于内含子内),但该突变可能在例如mRNA前体(例如,预剪接的mRNA前体)内。

[0570] 短语“检查细胞或生物体中基因的功能”是指检查或研究由此产生的表达、活性、功能或表型。

[0571] 如本文所用,术语“RNA沉默剂”是指能够抑制或“沉默”靶基因表达的RNA。在某些实施方案中,RNA沉默剂能够通过转录后沉默机制来阻止mRNA分子的完全加工(例如,完全翻译和/或表达)。RNA沉默剂包括小(<50b.p.)、非编码RNA分子,例如包含成对链的RNA双链体,以及可以从中产生这种小的非编码RNA的前体RNA。示例性的RNA沉默剂包括siRNA、miRNA、siRNA样双链体、反义寡核苷酸、GAPMER分子和双功能寡核苷酸,以及它们的前体。在一个实施方案中,RNA沉默剂能够诱导RNA干扰。在另一个实施方案中,RNA沉默剂能够介导翻译抑制。

[0572] 如本文所用,术语“稀有核苷酸”是指不经常出现的天然存在的核苷酸,包括不经常出现的天然存在的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,例如不是鸟苷、腺苷、胞嘧啶或尿苷的天然存在的核糖核苷酸。稀有核苷酸的实例包括但不限于肌苷、1-甲基肌苷、假尿苷、5,6-二氢尿苷、核胸苷、2N-甲基鸟苷和2,2N,N-二甲基鸟苷。

[0573] 如工程化RNA前体或工程化核酸分子中的术语“工程化”表示前体或分子在自然界中不存在,因为前体或分子的全部或部分核酸序列由人产生或选择。一旦产生或选择该序列,就可以通过细胞内的机制复制、翻译、转录或以其他方式处理该序列。因此,在细胞内由包括工程化核酸分子的转基因产生的RNA前体是工程化RNA前体。

[0574] 如本文所用,术语“微小RNA”(“miRNA”),在本领域中也称为“时序调节小RNA”(“stRNA”),是指遗传编码(例如,通过病毒、哺乳动物或植物基因组),并且能够指导或介导RNA沉默的小(10-50个核苷酸)RNA。“miRNA病症”应指以miRNA的异常表达或活性为特征的疾病或病症。

[0575] 如本文所用,术语“双功能寡核苷酸”是指具有式T-L-μ的RNA沉默剂,其中T是mRNA靶向部分,L是连接部分,μ是miRNA募集部分。如本文所用,术语“mRNA靶向部分”、“靶向部分”、“mRNA靶向部分”或“靶向部分”是指双功能寡核苷酸的结构域、部分或区域,该双功能寡核苷酸的结构域、部分或区域具有足够的大小和与选择或靶向用于沉默的mRNA部分或区

域的足够互补性(即,该部分具有足以捕获靶mRNA的序列)。

[0576] 如本文所用,术语“连接部分(linking moiety)”或“连接部分(linking portion)”是指共价连结或连接mRNA的RNA沉默剂的结构域、部分或区域。

[0577] 如本文所用,术语RNA沉默剂例如siRNA或RNA沉默剂的“反义链”是指与靶向用于沉默的基因的mRNA的约10-50个核苷酸例如约15-30、16-25、18-23或19-22个核苷酸的部分基本上互补的链。反义链或第一链具有与所需靶mRNA序列充分互补以指导靶特异性沉默的序列,例如足以触发RNAi机制或过程(RNAi干扰)破坏所需靶mRNA的互补性或足以触发所需靶mRNA的翻译抑制的互补性。

[0578] RNA沉默剂例如siRNA或RNA沉默剂的术语“有义链”或“第二链”是指与反义链或第一链互补的链。反义和有义链也可以称为第一或第二链,第一或第二链与靶序列具有互补性,相应的第二或第一链与所述第一或第二链具有互补性。miRNA双链体中间体或siRNA样双链体包括与靶向沉默基因的mRNA的约10-50个核苷酸的部分具有足够互补性的miRNA链和具有足够互补性以与miRNA形成双链体的miRNA*链。

[0579] 如本文所用,术语“引导链”是指RNA沉默剂的链,例如siRNA双链体或siRNA序列的反义链,其进入RISC复合物并指导靶mRNA的切割。

[0580] 如本文所用,术语“不对称”,如在RNA沉默剂的双链体区域(例如,shRNA的茎)的不对称中,是指RNA沉默剂末端之间的键强度或碱基配对强度的不平等(例如,在第一链或茎部分上的末端核苷酸与相对的第二链或茎部分上的末端核苷酸之间),使得与互补链的5′末端相比,双链体的一条链的5′末端更频繁地处于瞬时未配对状态,例如,单链状态。这种结构差异决定了双链体的一条链优先掺入RISC复合物中。5′末端与互补链配对较不紧密的链将优先掺入RISC并介导RNAi。

[0581] 如本文所用,术语“键强度”或“碱基对强度”是指寡核苷酸双链体(例如,siRNA双链体)的相对链上的成对核苷酸(或核苷酸类似物)之间相互作用的强度,主要由于所述核苷酸(或核苷酸类似物)之间的氢键、范德华相互作用等。

[0582] 如本文所用,如反义链5′末端中的“5′末端”是指在反义链5′末端的5’末端核苷酸,例如1个至约5个核苷酸之间。如本文所用,如在有义链的3’末端中的“3′末端”是指与互补反义链5′末端的核苷酸互补的区域,例如1至约5个核苷酸的区域。

[0583] 如本文所用,术语“去稳定化核苷酸”是指能够与第二核苷酸或核苷酸类似物形成碱基对的第一核苷酸或核苷酸类似物,使得该碱基对的键强度低于常规碱基对(即Watson-Crick碱基对)。在某些实施方案中,去稳定核苷酸能够与第二核苷酸形成错配碱基对。在其他实施方案中,去稳定核苷酸能够与第二核苷酸形成摆动碱基对。在其他实施方案中,去稳定核苷酸能够与第二核苷酸形成模糊碱基对。

[0584] 如本文所用,术语“碱基对”是指寡核苷酸双链体(例如,由RNA沉默剂的链和靶mRNA序列形成的双链体)的相对链上的成对核苷酸(或核苷酸类似物)之间的相互作用,主要是由于所述核苷酸(或核苷酸类似物)之间的氢键、范德华相互作用等。如本文所用,术语“键强度”或“碱基对强度”是指碱基对的强度。

[0585] 如本文所用,术语“错配碱基对”是指由非互补或非Watson-Crick碱基对组成的碱基对,例如,非正常互补G:C、A:T或者A:U碱基对。如本文所用,术语“模糊碱基对”(也称为非区分碱基对)是指由通用核苷酸形成的碱基对。

[0586] 如本文所用，术语“通用核苷酸”(也称为“中性核苷酸”)包括如下核苷酸(例如某些去稳定核苷酸)，所述核苷酸具有在形成碱基对时不显著区分互补多核苷酸上碱基的碱基(“通用碱基”或“中性碱基”)。通用核苷酸主要是疏水性分子，由于堆叠相互作用，它们可以有效地组装成反平行双链核酸(例如，双链DNA或RNA)。通用核苷酸的碱基部分通常包含含氮芳族杂环部分。

[0587] 如本文所用，术语“足够的互补性”或“足够程度的互补性”是指RNA沉默剂具有足以相应地结合所需靶RNA并且触发靶mRNA的RNA沉默的序列(例如，在反义链、mRNA靶向部分或miRNA募集部分中)。

[0588] 如本文所用，术语“翻译抑制”是指对mRNA翻译的选择性抑制。自然的翻译抑制通过从shRNA前体上切割下来的miRNA进行。RNAi和翻译抑制均由RISC介导。RNAi和翻译抑制都是自然发生的，或可以由人工启动，例如，使靶基因的表达沉默。

[0589] 本公开的各种方法包括涉及将值、水平、特征、特性、性质等与在本文中可互换地称为“适当对照”的“合适对照”进行比较的步骤。“合适对照”或“适当对照”是本领域普通技术人员熟悉的用于比较目的的任何对照或标准。在一个实施方案中，“合适对照”或“适当对照”是在执行如本文所述RNAi方法之前确定的值、水平、特征、特性、性质等。例如，可以在将本公开的RNA沉默剂引入细胞或生物体之前确定转录速率、mRNA水平、翻译速率、蛋白质水平、生物活性、细胞特征或性质、基因型、表型等。在另一个实施方案中，“合适对照”或“适当对照”是在显示例如正常特征的细胞或生物体(例如对照或正常细胞或生物体)中确定的值、水平、特征、特性、性质等。在又一个实施方案中，“合适对照”或“适当对照”是预定义的值、水平、特征、特性、性质等。

[0590] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料可于本公开的实践或测试中，但以下描述适合的方法和材料。本文引用的所有专利、专利申请和其他参考文献通过引用以其整体并入本文。在冲突的情况下，以本说明书(包括定义)为准。另外，所述材料、方法和示例仅是说明性的而不是旨在限制。

[0591] 在以下小节中更详细地描述了本公开的各个方面。

[0592] I.新型靶序列

[0593] 在某些示例性实施方案中，本公开内容的RNA沉默剂能够靶向SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列，如表4-6中所述。在某些示例性实施方案中，本公开内容的RNA沉默剂能够靶向一种或多种选自由SEQ ID NO:14-28组成的组的SNCA核酸序列，如表7-8中所述。

[0594] 每个靶序列的基因组序列可以在例如由NCBI维护的公开数据库中找到。

[0595] II.siRNA设计

[0596] 在一些实施方案中，siRNA设计如下。首先，选择一部分靶基因(例如SNCA基因)，例如表4-6中列出的一个或多个靶序列。在这些位点切割mRNA应消除相应蛋白质的翻译。基于靶序列设计反义链并且设计有义链以与反义链互补。反义链和有义链的杂交形成siRNA双链体。反义链包括约19至25个核苷酸，例如19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在其他实施方案中，反义链包括20、21、22或23个核苷酸。有义链包括约14至25个核苷酸，例如，14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在其他实施方案中，有义链是15个核苷酸。在

其他实施方案中，有义链是18个核苷酸。在其他实施方案中，有义链是20个核苷酸。然而，本领域技术人员将理解，长度小于19个核苷酸或大于25个核苷酸的siRNA也可以起到介导RNAi的作用。因此，这种长度的siRNA也在本公开的范围内，只要它们保留介导RNAi的能力。更长的RNAi试剂已被证明会在某些哺乳动物细胞中引发干扰素或PKR响应，这可能是不希望的。在某些实施方案中，本公开内容的RNAi试剂不引发PKR响应(即，具有足够短的长度)。然而，较长的RNAi试剂可能有用，例如，在不能产生PKR响应的细胞类型中，或在PKR响应已被替代方法下调或抑制的情况下。

[0597] 可以设计有义链序列，使得靶序列基本上位于链的中间。在某些情况下，将靶序列移动到偏离中心的位置会降低siRNA的切割效率。如果检测到野生型mRNA的关闭沉默，则可能需要使用此类组合物，即效率较低的组合物。

[0598] 反义链可以与有义链长度相同并且包括互补核苷酸。在一个实施方案中，链是完全互补的，即，链在对齐或退火时是平端的。在另一个实施方案中，链对齐或退火使得产生1、2、3、4、5、6、7或8核苷酸突出端，即有义链的3′末端比反义链的5′末端延伸1、2、3、4、5、6、7或8个核苷酸和/或反义链的3′末端比有义链的5’末端延伸1、2、3、4、5、6、7或8个核苷酸。突出端可以包含对应于靶基因序列(或其互补序列)的核苷酸(或由其组成)。或者，突出端可包含脱氧核糖核苷酸，例如dT，或核苷酸类似物，或其他合适的非核苷酸材料(或由其组成)。

[0599] 为了促进反义链进入RISC(从而增加或提高靶标切割和沉默的效率)，有义链5′端和反义链3′端之间的碱基对强度可以改变，例如，减弱或减少，如在标题为“Methods and Compositions for Controlling Efficacy of RNA Silencing”的美国专利号7,459,547、7,772,203和7,732,593(2003年6月2日提交)和标题为“Methods and Compositions for Enhancing the Efficacy and Specificity of RNAi”的美国专利号8,309,704、7,750,144、8,304,530、8,329,892和8,309,705(2003年6月2日提交)中详细描述的，其内容通过引用整体并入。在本公开的这些方面的一个实施方案中，由于与在第一或反义链的3′端与第二或有义链的5’端之间的G:C碱基对相比，在第一或反义链的5′端与第二或有义链的3’端之间的G:C碱基对更少，因此碱基对强度较小。在另一个实施方案中，碱基对强度较低是由于第一或反义链的5′端与第二或有义链的3′端之间至少有一个错配碱基对。在某些示例性实施方案中，错配碱基对选自下组：G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C和U:U。在另一个实施方案中，碱基对强度由于在第一或反义链的5′端和第二或有义链的3′端之间的至少一个摆动碱基对例如G:U而较小。在另一个实施方案中，碱基对强度较低是由于至少一个碱基对包含稀有核苷酸，例如肌苷(I)。在某些示例性实施方案中，碱基对选自由以下组成的组：I:A、I:U和I:C。在又一个实施方案中，碱基对强度较低是由于至少一个碱基对包含修饰的核苷酸。在某些示例性实施方案中，修饰的核苷酸选自由2-氨基-G、2-氨基-A、2,6-二氨基-G和2,6-二氨基-A组成的组。

[0600] 下文详细描述了适合靶向表4-6中所列SNCA靶序列的siRNA的设计。siRNA可以根据上述示例性教导，针对在SNCA基因中发现的任何其他靶序列来设计。此外，该技术适用于靶向任何其他靶序列，例如非致病靶序列。

[0601] 为了验证siRNA破坏mRNA(例如，SNCA mRNA)的有效性，可以在基于果蝇的体外mRNA表达系统中将siRNA与cDNA(例如，SNCA cDNA)一起温育。用^{32}P放射性标记的新合成的

mRNA(例如SNCA mRNA)在琼脂糖凝胶上通过放射自显影检测到。切割的mRNA的存在表明mRNA核酸酶活性。合适的对照包括省略siRNA。或者,选择具有与所选siRNA相同的核苷酸组成,但与适当靶基因没有显著序列互补性的对照siRNA。这种阴性对照可以通过随机打乱所选siRNA的核苷酸序列来设计;可以进行同源性搜索以确保阴性对照与适当基因组中的任何其他基因缺乏同源性。此外,可以通过将一个或多个碱基错配引入序列来设计阴性对照siRNA。选择导致最佳mRNA特异性和最大mRNA切割的siRNA-mRNA互补位点。

[0602] III.RNAi试剂

[0603] 本公开内容包括RNAi分子,例如如上所述设计的siRNA分子。本公开内容的siRNA分子可以化学合成,或可以从DNA模板体外转录,或从例如shRNA体内转录,或通过使用重组人DICER酶,将体外转录的dsRNA模板切割成介导RNAi的20、21或23bp双链RNA的池。可以使用本领域已知的任何方法设计siRNA分子。

[0604] 在一个方面,RNAi试剂不是干扰核糖核酸,例如如上所述的si RNA或shRNA,而是RNAi试剂可以编码干扰核糖核酸,例如如上所述的shRNA。换言之,RNAi试剂可以是干扰核糖核酸的转录模板。因此,本公开的RNAi试剂还可以包括小发夹RNA(shRNA),和工程化以表达shRNA的表达构建体。shRNA的转录起始于聚合酶III(pol III)启动子,并被认为终止于4-5-胸腺嘧啶转录终止位点的第2位。表达后,shRNA被认为折叠成具有3′UU突出端的茎环结构;随后,这些shRNA的末端被加工,将shRNA转化为大约21-23个核苷酸的siRNA样分子(Brummelkamp等人,2002;Lee等人,2002,同上);Miyagishi等人,2002;Paddison等人,2002,同上;Paul等人,2002,同上;Sui等人,2002同上;Yu等人,2002,同上。有关shRN A设计和使用的更多信息可以在Internet上的以下地址找到:katandi n.cshl.org:9331/RNAi/docs/BseRI-BamHI_Strategy.pdf和katandin.cshl.org:9331/RNAi/docs/Web_version_of_PCR_strategy1.pdf)。

[0605] 本公开的表达构建体包括适用于适当表达系统的任何构建体,并且包括但不限于本领域已知的逆转录病毒载体、线性表达盒、质粒和病毒或病毒衍生的载体。此类表达构建体可包括一种或多种诱导型启动子、RNA Pol III启动子系统,例如U6 snRNA启动子或H1 RNA聚合酶III启动子,或本领域已知的其他启动子。构建体可以包括一条或两条siRNA链。表达两条链的表达构建体还可以包括连接两条链的环结构,或者每条链可以从同一构建体中的不同启动子分别转录。每条链也可以从单独的表达构建体转录。(Tuschl,T.,2002,同上)。

[0606] 可以通过本领域已知的方法将合成的siRNA递送到细胞中,包括阳离子脂质体转染和电穿孔。为了获得对靶基因(例如,SNCA基因)的长期抑制并在某些情况下促进递送,可以在细胞内从重组DNA构建体中表达一种或多种siRNA。此类用于在细胞内从重组DNA构建体表达siRNA双链体以允许在细胞中长期抑制靶基因的方法是本领域已知的,包括哺乳动物Pol III启动子系统(例如,能够表达功能性双链siRNA的H1或U6/snRNA启动子系统(Tuschl,T.,2002,同上);(Bagella等人,1998;Lee等人,2002,同上;Miyagishi等人,2002,同上;Paul等人,2002,同上;Yu等人,2002,同上;Sui等人,2002,同上)。RNA Pol III的转录终止在DNA模板中四个连续的T残基的运行中发生,提供了一种在特定序列处结束siRNA转录物的机制。siRNA与靶基因序列在5′-3′和3′-5′方向互补,siRNA的两条链可以在同一个构建体中表达,也可以在不同的构建体中表达。由H1或U6snRNA启动子驱动并在细胞中表达

的发夹siRNA可抑制靶基因表达(Bagella等人,1998;Lee等人,2002,同上;Miyagishi等人,2002,同上;Paul等人,2002,同上;Yu等人,2002),同上;Sui等人,2002,同上)。当与表达T7 RNA聚合酶的载体共转染到细胞中时,包含T7启动子控制下的siRNA序列的构建体也产生功能性siRNA(Jacque等人,2002,同上)。单个构建体可能包含编码靶向同一基因或多个基因的siRNA的多个序列,例如编码SNCA的基因的多个区域,并且可以由例如单独的Pol III启动子位点驱动。

[0607] 动物细胞表达被称为微RNA(miRNA)的一系列约22个核苷酸的非编码RNA,可在动物发育过程中调节转录后或翻译水平的基因表达。miRNA的一个共同特征是它们都从大约70个核苷酸的前体RNA茎环中切除,可能是由一种RNA酶III型酶Dicer或其同源物切除的。通过用与靶mRNA互补的序列替换miRNA前体的茎序列,表达工程化前体的载体构建体可用于产生siRNA,以启动针对哺乳动物细胞中特定mRNA靶的RNAi(Zeng等人,2002,同上)。当由含有聚合酶III启动子的DNA载体表达时,微RNA设计的发夹可以使基因表达沉默(McManus等人,2002,同上)。在没有siRNA介导的基因沉默的情况下,靶向多态性的微小RNA也可用于阻断突变蛋白的翻译。此类应用在某些情况下可能很有用,例如,设计的siRNA导致野生型蛋白质的脱靶沉默。

[0608] 病毒介导的递送机制也可用于通过siRNA的表达来诱导靶基因的特异性沉默,例如,通过在RNA Pol II启动子转录控制下产生含有siRNA的重组腺病毒(Xia等人,2002,同上)。这些重组腺病毒感染HeLa细胞可以减少内源性靶基因的表达。将重组腺病毒载体注射到表达siRNA靶基因的转基因小鼠中导致体内靶基因表达降低。同上。在动物模型中,全胚胎电穿孔可以有效地将合成的siRNA输送到植入后的小鼠胚胎中(Calegari等人,2002)。在成年小鼠中,siRNA的有效递送可以通过“高压”递送技术实现,即通过尾静脉将大量含有siRNA的溶液快速(在5秒内)注射到动物体内(Liu等人,1999,同上;McCaffrey等人,2002,同上;Lewis等人,2002。纳米颗粒和脂质体也可用于将siRNA输送到动物体内。在某些示例性实施方案中,重组腺相关病毒(rAAV)及其相关载体可用于将一种或多种siRNA递送到细胞中,例如神经细胞(例如脑细胞)(美国专利申请2014/0296486、2010/0186103、2008/0269149、2006/0078542和2005/0220766)。

[0609] 本公开的核酸组合物包括未修饰的siRNA和修饰的siRNA,例如交联的siRNA衍生物或具有连接到例如它们的3′或5′末端的非核苷酸部分的衍生物。与相应的siRNA相比,以这种方式修饰siRNA衍生物可以改善所得siRNA衍生物的细胞吸收或增强细胞靶向活性,并且可用于追踪细胞中的siRNA衍生物,或与相应的siRNA相比,提高siRNA衍生物的稳定性。

[0610] 如本文所述引入细胞或整个生物体中的工程化RNA前体将导致所需siRNA分子的产生。然后,这样的siRNA分子将与RNAi途径的内源性蛋白质成分结合,以结合并靶向特定的mRNA序列以进行切割和破坏。以这种方式,将由工程化RNA前体产生的siRNA靶向的mRNA将从细胞或生物体中耗尽,导致细胞或生物体中由该mRNA编码的蛋白质浓度降低。RNA前体通常是单独编码dsRNA的一条链或编码RNA发夹环结构的整个核苷酸序列的核酸分子。

[0611] 本公开的核酸组合物可以是未缀合的或可以缀合至另一部分,例如纳米颗粒,以增强组合物的性质,例如药代动力学参数,例如吸收、功效、生物利用度和/或半衰期。缀合可以通过本领域已知的方法完成,例如使用以下方法:Lambert等人,Drug Deliv.Rev.:47(1),99-112(2001)(描述了加载到聚氰基丙烯酸烷基酯(PACA)纳米颗粒上的核酸);Fattal

等人,J.Control Release 53(1-3):137-43(1998)(描述与纳米颗粒结合的核酸);Schwab等人,Ann.Oncol.5增刊4:55-8(1994)(描述了与嵌入剂、疏水基团、聚阳离子或PACA纳米颗粒连接的核酸);和Godard等人,Eur.J.Biochem.232(2):404-10(1995)(描述了与纳米颗粒连接的核酸)。

[0612] 本公开的核酸分子也可以使用本领域已知的任何方法进行标记。例如,核酸组合物可以用荧光团标记,例如Cy3、荧光素或罗丹明。可以使用试剂盒进行标记,例如SILENCER™siRNA标记试剂盒(Ambion)。此外,siRNA可以被放射性标记,例如,使用^{3}H、^{32}P或另一种合适的同位素。

[0613] 此外,因为据信RNAi通过至少一种单链RNA中间体进行,本领域技术人员将理解ss-siRNA(例如,ds-siRNA的反义链)也可以被设计(例如,用于化学合成),产生(例如,酶促产生)或如本文所述来表达(例如,从载体或质粒)和根据要求保护的方法来使用。此外,在无脊椎动物中,RNAi可以通过充当RNAi的效应物的长dsRNA(例如,长度约100-1000个核苷酸,例如约200-500,例如,长度约250、300、350、400或450个核苷酸的dsRNA)有效触发。(Brondani等人,Proc Natl Acad Sci USA.2001年12月4日;98(25):14428-33.Epub 2001年11月27日)

[0614] IV.抗SNCA RNA沉默剂

[0615] 在某些实施方案中,本公开提供新的抗SNCA RNA沉默剂(例如,siRNA、shRNA和反义寡核苷酸)、制备所述RNA沉默剂的方法和使用所述改进的RNA沉默剂(或其部分)进行SNCA蛋白的RNA沉默的方法(例如,研究和/或治疗方法)。RNA沉默剂包含反义链(或其部分),其中反义链与靶SNCA mRNA具有足够的互补性以介导RNA介导的沉默机制(例如RNAi)。

[0616] 在某些实施方案中,提供的siRNA化合物具有以下特性中的一种或任意组合:(1)完全化学稳定的(即,没有未修饰的2'-OH残基);(2)不对称;(3)11-20个碱基对双链体;(4)大于50%的2'-甲氧基修饰,如70%-100%2'-甲氧基修饰,尽管化学修饰的核苷酸的交替模式(例如,2'-氟和2'-甲氧基修饰)也在考虑之列;(5)5-8个碱基的单链、完全硫代磷酸酯化尾。在某些实施方案中,硫代磷酸酯修饰的总数从4到16不等。在某些实施方案中,硫代磷酸酯修饰的总数从8到13不等。

[0617] 在某些实施方案中,本文所述的siRNA化合物可以与多种靶向剂缀合,包括但不限于胆固醇、二十二碳六烯酸(DHA)、苯托烷、皮质醇、维生素A、维生素D、N-乙酰半乳糖胺(GalNac)和神经节苷脂。在广泛范围的细胞类型(例如,HeLa细胞、神经元、肝细胞、滋养细胞)中,与以前使用的化学稳定性模式(例如,其中所有嘌呤而不是嘧啶得以修饰)比较,胆固醇修饰型式在体外展示5-10倍功效改善。

[0618] 具有上文和本文所述的结构特性的本公开的某些化合物可称为"hsiRNA-ASP"(具有先进的稳定模式的疏水修饰的小干扰RNA)。此外,这种hsiRNA-ASP模式显示出在大脑、脊髓、肝脏、胎盘、肾脏、脾脏和其他几个组织中的分布显著改善,使其可用于治疗干预。

[0619] 本公开的化合物可以在以下方面和实施方案中进行描述。

[0620] 在第一个方面,本文提供了包含反义链和有义链的双链RNA(dsRNA),每条链包含至少14个具有5'末端和3'末端的连续核苷酸,其中:

[0621] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

[0622] (2)反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸;

[0623] (3)反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

[0624] (4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

[0625] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;

[0626] (6)有义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸;和

[0627] (7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0628] 在第二个方面,本文提供了包含反义链和有义链的dsRNA,每条链包含至少14个具有5'末端和3'末端的连续核苷酸,其中:

[0629] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

[0630] (2)反义链包含至少70%的2'-O-甲基修饰;

[0631] (3)反义链5'端的位置14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

[0632] (4)反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

[0633] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;

[0634] (6)有义链包含至少70%的2'-O-甲基修饰;和

[0635] (7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0636] 在第三个方面,本文提供了包含反义链和有义链的dsRNA,每条链包含至少14个具有5'末端和3'末端的连续核苷酸,其中:

[0637] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

[0638] (2)反义链包含至少85%的2'-O-甲基修饰;

[0639] (3)反义链5'端的位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

[0640] (4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

[0641] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;

[0642] (6)有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

[0643] (7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0644] 在第四个方面,本文提供了包含反义链和有义链的dsRNA,每条链包含至少14个具有5'末端和3'末端的连续核苷酸,其中:

[0645] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

[0646] (2)反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

[0647] (3)反义链5'端的位置4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;

[0648] (4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接;

[0649] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补;

[0650] (6)有义链包含100%的2'-O-甲基修饰;和

[0651] (7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0652] 在第五个方面,本文提供了包含反义链和有义链的dsRNA,每条链包含至少14个具有5'末端和3′末端的连续核苷酸,其中:

[0653] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列;

[0654] (2)反义链包含至少75%的2'-O-甲基修饰;

[0655] (3)反义链5'端的位置2、4、5、6和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；

[0656] (4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；

[0657] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；

[0658] (6)有义链包含100％的2'-O-甲基修饰;和

[0659] (7)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0660] 在第六个方面,本文提供了包含反义链和有义链的dsRNA,每条链包含至少14个具有5′末端和3′末端的连续核苷酸,其中：

[0661] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列；

[0662] (2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰；

[0663] (3)反义链5′端的位置2、6、14和16处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；

[0664] (4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；

[0665] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；

[0666] (6)有义链包含至少70％的2'-O-甲基修饰；

[0667] (7)有义链3'端的位置7、9、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;和

[0668] (8)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0669] 在第七个方面,本文提供了包含反义链和有义链的dsRNA,每条链包含至少14个具有5'末端和3′末端的连续核苷酸,其中：

[0670] (1)反义链包含与SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列；

[0671] (2)反义链包含至少75％的2'-O-甲基修饰；

[0672] (3)反义链5'端2、6、和14位的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸；

[0673] (4)反义链3'端的位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接；

[0674] (5)反义链的一部分与有义链的一部分互补；

[0675] (6)有义链包含至少80％的2'-O-甲基修饰；

[0676] (7)有义链3′端的位置7、10和11处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;和

[0677] (8)有义链5'端的位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

[0678] a)抗SNCA siRNA分子的设计

[0679] 本申请的siRNA分子是由有义链和互补反义链构成的双链体,该反义链与SNCA mRNA具有足够的互补性以介导RNAi。在某些实施方案中,siRNA分子具有约10-50个或更多个核苷酸的长度,即每条链包含10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)。在其他实施方案中,siRNA分子在每条链中具有约15-30,例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸的长度,其中一条链与靶区域充分互补。在某些实施方案中,将链对齐以使得链末端有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基不对齐(即,在相对链中不出现针对所述碱基的互补碱基),这样当链退火时,在双链体的一端或两端会出现1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基的突出端。

[0680] 通常,可以通过使用本领域已知的任何方法来设计siRNA,例如,通过使用以下方案：

[0681] 1.siRNA应该对靶序列是特异性的，例如实施例中列出的靶序列。第一条链应与靶序列互补，而另一条链与第一条链基本上互补。(关于示例性有义链和反义链，参见实施例。)示例性靶序列选自导致有效基因沉默的靶基因的任何区域。靶基因的区域包括但不限于靶基因的5'非翻译区(5′-UTR)、靶基因的3'非翻译区(3'-UTR)、靶基因的外显子或靶基因的内含子。在这些位点处切割mRNA应消除相应SNCA蛋白质的翻译。SNCA基因其他区域的靶序列也适用于靶向。基于靶序列设计有义链。

[0682] 2.siRNA的有义链是根据所选靶位点的序列设计的。在某些实施方案中，有义链包括约15至25个核苷酸，例如，15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在某些实施方案中，有义链包括15、16、17、18、19或20个核苷酸。在某些实施方案中，有义链长度为15个核苷酸。在某些实施方案中，有义链长度为18个核苷酸。在某些实施方案中，有义链长度为20个核苷酸。然而，本领域技术人员将理解，长度小于15个核苷酸或大于25个核苷酸的siRNA也可以起到介导RNAi的作用。因此，这种长度的siRNA也在本公开的范围内，只要它们保留介导RNAi的能力。更长的RNAi沉默剂已被证明会在某些哺乳动物细胞中引发干扰素或蛋白激酶R(PKR)响应，这可能是不希望的。在某些实施方案中，本公开的RNA沉默剂不引发PKR响应(即，具有足够短的长度)。然而，较长的RNA沉默剂可能有用，例如，在不能产生PKR响应的细胞类型中，或在PKR响应已被替代方法下调或抑制的情况下。

[0683] 本发明的siRNA分子与靶序列具有足够的互补性，使得siRNA可以介导RNAi。一般而言，包含与靶基因的靶序列部分充分互补以实现RISC介导的靶基因切割的核苷酸序列的siRNA是被考虑的。因此，在某个实施方案中，siRNA的反义链被设计成具有与靶的一部分充分互补的序列。例如，反义链可能与靶位点具有100％的互补性。但是，不需要100％的互补性。考虑了反义链和靶RNA序列之间的大于80％的同一性，例如，80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或甚至100％的互补性。本申请具有能够容忍某些序列变异以提高RNAi的效率和特异性的优点。在一个实施方案中，反义链与靶区域具有4、3、2、1或0个错配核苷酸，例如在野生型和突变等位基因之间相差至少一个碱基对的靶区域，例如，包含功能获得性突变的靶区域，并且另一条链与第一条链同一或基本同一。此外，具有1个或2个核苷酸的小插入或缺失的siRNA序列也可能对介导RNAi有效。或者，具有核苷酸类似物取代或插入的siRNA序列可有效抑制。

[0684] 序列同一性可以通过本领域已知的序列比较和比对算法来确定。为了确定两个核酸序列(或两个氨基酸序列)的百分比同一性，为了最佳比较目的比对序列(例如，可以在第一序列或第二序列中引入空位以实现最佳比对)。然后比较相应核苷酸(或氨基酸)位置的核苷酸(或氨基酸残基)。当第一个序列中的一个位置被与第二个序列中相应位置相同的残基占据时，则分子在该位置是同一的。两个序列之间的同一性百分比是序列共享的同一位置数量的函数(即，％同源性＝同一位置的数量/位置总数x100)，任选择对引入的空位数量和/或引入的空位长度进行罚分。

[0685] 可以使用数学算法完成序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定。在一个实施方案中，在具有足够同一性的所比对序列的特定部分上，但不是在具有低同一性程度的部分上产生比对(即，局部比对)。用于序列比较的局部比对算法的非限制性实例是Karlin和Altschul(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68，修改为Karlin和

Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77。这种算法被纳入Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的BLAST程序(2.0版)中。

[0686] 在另一个实施方案中,通过引入适当的空位来优化比对并且在比对序列的长度上确定同一性百分比(即,空位比对)。为了获得有空位的比对以进行比较,可以使用Gapped BLAST,如Altschul等人(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所描述。在另一个实施方案中,通过引入适当的空位来优化比对并且在比对序列的整个长度上确定同一性百分比(即,全局比对)。用于序列全局比较的数学算法的一个非限制性实例是Myers和Miller,CABIOS(1989)的算法。这种算法被合并到ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120重量残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。

[0687] 3.siRNA的反义链或引导链通常与有义链长度相同,并且包括互补核苷酸。在一个实施方案中,引导链和有义链是完全互补的,即,链在对齐或退火时是平端的。在另一个实施方案中,siRNA的链可以以具有1至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)或1至4个,例如,2、3或4个核苷酸的3′突出端的方式配对。突出端可以包含对应于靶基因序列(或其互补序列)的核苷酸(或由其组成)。或者,突出端可以包含脱氧核糖核苷酸,例如dT,或核苷酸类似物,或其他合适的非核苷酸材料(或由其组成)。因此,在另一个实施方案中,核酸分子可以具有2个核苷酸的3'突出端,例如TT。突出的核苷酸可以是RNA或DNA。如上所述,希望选择一个靶区域,其中突变:野生型错配是嘌呤:嘌呤错配。

[0688] 4.使用本领域已知的任何方法,将潜在靶标与适当的基因组数据库(人、小鼠、大鼠等)进行比较,并从考虑中排除与其他编码序列具有显著同源性的任何靶标序列。用于此类序列同源性搜索的一种此类方法称为BLAST,可在国家生物技术信息中心网站获得。

[0689] 5.选择一个或多个符合评估标准的序列。

[0690] 有关siRNA的设计和使用的更多一般信息可以在Max-Plank-Institut fur Biophysikalische Chemie网站上的“The siRNA User Guide”中找到。

[0691] 或者,siRNA可以在功能上定义为能够与靶序列杂交的核苷酸序列(或寡核苷酸序列)(例如,400mM NaCl,40mM PIPES pH 6.4,1mM EDTA,50℃或70℃杂交12-16小时;然后洗涤)。额外的杂交条件包括70℃在1xSSC中或50℃在1xSSC,50%甲酰胺中的杂交,然后在70℃在0.3xSSC中洗涤或在70℃在4xSSC或50℃在4xSSC,50%甲酰胺中的杂交,然后67℃在1xSSC中洗涤。预计长度小于50个碱基对的杂交体的杂交温度应比杂交体的解链温度(T_m)低5-10℃,其中T_m根据以下等式确定。对于长度小于18个碱基对的杂交体,T_m(℃)=2(A+T碱基的#)+4(G+C碱基的#)。对于长度在18到49个碱基对之间的杂交体,T_m(℃)=81.5+16.6(log 10[Na+])+0.41(%G+C)-(600/N),其中N是杂交体中的碱基数,并且[Na+]是杂交缓冲液中钠离子的浓度(1xSSC的[Na^+]=0.165M)。Sambrook,J.,E.F.Fritsch和T.Maniatis,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,第9和11章和Current Protocols in Molecular Biology,1995,F.M.Ausubel等人编,John Wiley&Sons,Inc.,第2.10和6.3-6.4节提供了多核苷酸杂交的严格条件的其他实例,所述文献通过引用并入本文。

[0692] 阴性对照siRNA应与选定的siRNA具有相同的核苷酸组成,但与适当的基因组没有显著的序列互补性。这种阴性对照可以通过随机打乱所选siRNA的核苷酸序列来设计。可以

进行同源性搜索以确保阴性对照与适当基因组中的任何其他基因缺乏同源性。此外，可以通过将一个或多个碱基错配引入序列来设计阴性对照siRNA。

[0693] 6.为了验证siRNA破坏靶mRNA(例如，野生型或突变SNCA mRNA)的有效性，可以在基于果蝇的体外mRNA表达系统中将siRNA与cDNA(例如，SNCA cDNA)一起温育。用^{32}P放射性标记的新合成的靶mRNA(例如SNCA mRNA)在琼脂糖凝胶上通过放射自显影检测到。切割的靶mRNA的存在表明mRNA核酸酶活性。合适的对照包括省略siRNA和使用非靶cDNA。或者，选择具有与所选siRNA相同的核苷酸组成，但与适当靶基因没有显著序列互补性的对照siRNA。这种阴性对照可以通过随机打乱所选siRNA的核苷酸序列来设计。可以进行同源性搜索以确保阴性对照与适当基因组中的任何其他基因缺乏同源性。此外，可以通过将一个或多个碱基错配引入序列来设计阴性对照siRNA。

[0694] 可以设计抗SNCA siRNA以靶向上文描述的任何靶序列。所述siRNA包含反义链，其与靶序列充分互补以介导靶序列的沉默。在某些实施方案中，RNA沉默剂是siRNA。

[0695] 在某些实施方案中，siRNA包含包含表7和表8中所列序列的有义链，以及包含表7和表8中所列序列的反义链。

[0696] 选择导致最佳mRNA特异性和最大mRNA切割的siRNA-mRNA互补位点。

[0697] b)siRNA样分子

[0698] 本公开的siRNA样分子具有与SNCA mRNA的靶序列“充分互补”的序列(即，具有具备序列的链)以通过RNAi或翻译抑制来指导基因沉默。siRNA样分子的设计方式与siRNA分子相同，但有义链和靶RNA之间的序列同一性程度接近miRNA与其靶标之间观察到的程度。一般来说，随着miRNA序列和相应靶基因序列之间序列同一性程度的降低，通过翻译抑制而不是RNAi介导转录后基因沉默的趋势会增加。因此，在另一个实施方案中，在需要通过靶基因的翻译抑制来进行转录后基因沉默的情况下，miRNA序列与靶基因序列具有部分互补性。在某些实施方案中，miRNA序列与分散在靶mRNA内(例如在靶mRNA的3’-UTR内)的一个或多个短序列(互补位点)具有部分互补性(Hutvagner和Zamore，Science，2002；Zeng等人，Mol.Cell，2002；Zeng等人，RNA，2003；Doench等人，Genes&Dev.，2003)。由于翻译抑制机制是合作的，因此在某些实施方案中可以靶向多个互补位点(例如，2、3、4、5或6)。

[0699] siRNA样双链体介导RNAi或翻译抑制的能力可以通过靶基因序列和沉默剂的核苷酸序列之间的不同核苷酸在互补位点处的分布来预测。在一个实施方案中，在需要通过翻译抑制进行基因沉默的情况下，互补位点的中心部分存在至少一个不同一的核苷酸，使得由miRNA引导链和靶mRNA形成的双链体包含中心“凸起”(Doench J G等人，Genes&Dev.，2003)。在另一个实施方案中，引入了2、3、4、5或6个连续或不连续的不同核苷酸。可以选择不同一的核苷酸以使其形成摆动碱基对(例如，G:U)或不匹配的碱基对(G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C、U:U)。在进一步的实施方案中，“凸起”位于miRNA分子的5’端的核苷酸位置12和13处。

[0700] c)短发夹RNA(shRNA)分子

[0701] 在某些特征实施方案中，本公开提供了能够以增强的选择性介导SNCA靶序列的RNA沉默的shRNA。与siRNA相比，shRNA模仿微小RNA(miRNA)的天然前体并进入基因沉默途径的顶端。出于这个原因，人们认为shRNA可以通过整个天然基因沉默途径更有效地介导基因沉默。

[0702] miRNA是大约22个核苷酸的非编码RNA,可在植物和动物发育过程中调节转录后或翻译水平的基因表达。miRNA的一个共同特征是它们都从被称为前miRNA的大约70个核苷酸的前体RNA茎环中切除,可能是由一种RNA酶III型酶Dicer或其同源物切除的。天然存在的miRNA前体(前miRNA)具有形成双链体茎的单链,所述双链体茎包括通常互补的两个部分,以及连接茎的两个部分的环。在典型的前miRNA中,茎包括一个或多个凸起,例如在茎的一部分中产生单个核苷酸“环”的额外核苷酸,和/或一个或多个未配对的核苷酸,它们在茎的两个部分相互杂交时产生空位。本申请的短发夹RNA或工程化RNA前体是基于这些天然存在的前miRNA的人工构建体,但其被工程化以递送所需的RNA沉默剂(例如,本公开的siRNA)。通过用与靶mRNA互补的序列替换前miRNA的茎序列,形成shRNA。shRNA通过细胞的整个基因沉默途径进行加工,从而有效地介导RNAi。

[0703] shRNA分子的必需元件包括第一部分和第二部分,它们具有足够的互补性以退火或杂交以形成双链体或双链茎部分。这两个部分不需要完全或完美地互补。第一和第二“茎”部分由具有序列的部分连接,该序列的序列互补性不足以与shRNA的其他部分退火或杂交。后一部分被称为shRNA分子中的“环”部分。shRNA分子被加工以产生siRNA。shRNA还可以包括一个或多个凸起,即在茎的一部分中产生小核苷酸“环”的额外核苷酸,例如一、二或三核苷酸环。茎部分可以是相同的长度,或者一个部分可以包括例如1-5个核苷酸的突出端。突出核苷酸可以包括例如尿嘧啶(U),例如所有U。此类U尤其是由shRNA编码DNA中的胸苷(T)编码,它发出转录终止的信号。

[0704] 在本公开的shRNA(或工程化的前体RNA)中,双链体茎的一部分是与SNCA靶序列互补(或反义)的核酸序列。在某些实施方案中,shRNA的茎部分的一条链与靶RNA(例如mRNA)序列充分互补(例如反义)以通过RNA干扰(RNAi)介导所述靶RNA的降解或切割。因此,工程化的RNA前体包括具有两个部分的双链体茎和连接两个茎部分的环。反义部分可以在茎的5’或3’端。shRNA的茎部分长约15至约50个核苷酸。在某些实施方案中,两个茎部分的长度为约18或19至约21、22、23、24、25、30、35、37、38、39或40个或更多个核苷酸。在某些实施方案中,茎部分的长度应为21个核苷酸或更大。当用于哺乳动物细胞时,茎部分的长度应小于约30个核苷酸,以避免引起干扰素途径等非特异性响应。在非哺乳动物细胞中,茎可以长于30个核苷酸。事实上,茎可以包括与靶mRNA互补的更大的部分(直到并包括整个mRNA)。事实上,茎部分可以包括与靶mRNA互补的更大的部分(直到并包括整个mRNA)。

[0705] 双链体茎的两个部分必须充分互补才能杂交形成双链体茎。因此,这两个部分可以但是不需要完全或完美地互补。此外,两个茎部分可以具有相同的长度,或者一个部分可以包括1、2、3或4个核苷酸的突出端。突出核苷酸可以包括例如尿嘧啶(U),例如所有U。shRNA或工程化RNA前体中的环可以通过修饰环序列以增加或减少配对核苷酸的数量,或用四环或其他环序列替换环序列的全部或部分来不同于天然的前miRNA序列。因此,shRNA或工程化RNA前体中的环长度可以是2、3、4、5、6、7、8、9或更多个,例如15或20或更多个核苷酸。

[0706] shRNA或工程化RNA前体中的环可以通过修饰环序列以增加或减少配对核苷酸的数量,或用四环或其他环序列替换环序列的全部或部分来不同于天然的前miRNA序列。因此,shRNA中的环部分的长度可为约2至约20个核苷酸,即约2、3、4、5、6、7、8、9或更多,例如15或20或更多核苷酸长度。在某些实施方案中,环由“四环”序列组成或包含“四环”序列。示

例性四环序列包括但不限于序列GNRA、GGGG和UUUU,其中N是任何核苷酸并且R是嘌呤核苷酸。

[0707] 在某些实施方案中,本申请的shRNA包括上文描述的所需siRNA分子的序列。在其他实施方案中,shRNA的反义部分的序列可以基本上如上所述设计,或者通常通过从靶RNA(例如,SNCA mRNA)中,例如,从翻译开始上游或下游的100到200或300个核苷酸的区域选择18、19、20、21个核苷酸或更长的序列来设计。通常,该序列可以选自靶RNA(例如,mRNA)的任何部分,包括5'UTR(非翻译区)、编码序列或3'UTR。该序列可以任选地紧跟在包含两个相邻AA核苷酸的靶基因区域之后。核苷酸序列的最后两个核苷酸可以选择为UU。这21个左右的核苷酸序列用于产生shRNA中的双链体茎的一个部分。该序列可以例如酶促地替代野生型前miRNA序列的茎部分,或包含在合成的完整序列中。例如,可以合成DNA寡核苷酸,所述寡核苷酸编码整个茎环工程化RNA前体,或仅编码要插入前体双链体茎中的部分,并使用限制性内切酶,例如从野生型前miRNA来构建工程化RNA前体构建体。

[0708] 在双链体茎中,工程化的RNA前体包括希望在体内产生的siRNA或siRNA样双链体的21-22个左右的核苷酸序列。因此,工程化RNA前体的茎部分包括至少18或19个核苷酸对,对应于其表达将被降低或抑制的基因的外显子部分的序列。选择位于茎的该区域两侧的两个3'核苷酸,以便最大限度地从工程RNA前体产生siRNA,并最大限度地提高所得siRNA在体内和体外靶向相应mRNA以便进行翻译抑制或通过RNAi来破坏的功效。

[0709] 在某些实施方案中,本公开的shRNA包括miRNA序列,任选末端修饰的miRNA序列,以增强进入RISC。miRNA序列可以与任何天然存在的miRNA的序列相似或同一(参见例如The miRNA Registry;Griffiths-Jones S,Nuc.Acids Res.,2004)。迄今为止,已鉴定出超过一千种天然miRNA,它们一起被认为包括约1%基因组中所有预测的基因。许多天然miRNA在前mRNA的内含子中聚集在一起,可以使用基于同源性的搜索在计算机上进行鉴定(Pasquinelli等人,2000;Lagos-Quintana等人,2001;Lau等人,2001;Lee和Ambros,2001)或计算机算法(例如MiRScan、MiRSeeker)预测候选miRNA基因形成初级mRNA的茎环结构的能力(Grad等人,Mol.Cell.,2003;Lim等人,Genes Dev.,2003;Lim等人,Science,2003;Lai E C等人,Genome Bio.,2003)。在线注册提供了所有已发表的miRNA序列的可搜索数据库(Sanger研究所网站上的miRNA Registry;Griffiths-Jones S,Nuc.Acids Res.,2004)。示例性的天然miRNA包括lin-4、let-7、miR-10、mirR-15、miR-16、miR-168、miR-175、miR-196及其同源物,以及来自人类和某些模式生物的其他天然miRNA,包括黑腹果蝇、秀丽隐杆线虫、斑马鱼、拟南芥、小家鼠和褐家鼠,如国际PCT公开第WO 03/029459号中所述。

[0710] 天然存在的miRNA在体内由内源基因表达,并通过Dicer或其他RNA酶从发夹或茎环前体(前miRNA或初级miRNA)加工(Lagos-Quintana等人,Science,2001;Lau等人,Science,2001;Lee和Ambros,Science,2001;Lagos-Quintana等人,Curr.Biol.,2002;Mourelatos等人,Genes Dev.,2002;Reinhart等人,Science,2002;Ambros等人,Curr.Biol.,2003;Brennecke等人,2003;Lagos-Quintana等人,RNA,2003;Lim等人,Genes Dev.,2003;Lim等人,Science,2003)。miRNA可以作为双链的双链体在体内瞬时存在,但只有一条链被RISC复合物吸收以指导基因沉默。某些miRNA,例如植物miRNA,与其靶mRNA具有完美或接近完美的互补性,因此直接切割靶mRNA。其他miRNA与其靶mRNA不完全互补,因此直接翻译抑制靶mRNA。认为miRNA与其靶mRNA之间的互补程度决定了其作用机制。例如,

miRNA与其靶mRNA之间的完美或接近完美的互补性预示着一种切割机制(Yekta等人,Science,2004),而非完美的互补性预示着一种翻译抑制机制。在某些实施方案中,miRNA序列是天然存在的miRNA序列的序列,其异常表达或活性与miRNA病症相关。

[0711] d)双功能寡核苷酸系链

[0712] 在其他实施方案中,本公开的RNA沉默剂包括可用于细胞间募集miRNA的双功能寡核苷酸系链。动物细胞表达一系列miRNA,即约22个核苷酸的非编码RNA,可在动物发育过程中调节转录后或翻译水平的基因表达。通过结合与RISC结合的miRNA并将其募集到靶mRNA,双功能寡核苷酸系链可以抑制涉及例如动脉硬化过程的基因的表达。与抑制特定基因的表达的现有技术相比,寡核苷酸系链的使用提供了几个优势。首先,本文所述的方法允许内源性分子(通常大量存在)miRNA来介导RNA沉默。因此,本文所述的方法消除了引入外源分子(例如,siRNA)以介导RNA沉默的需要。其次,可以使RNA沉默剂和连接部分(例如,诸如2'-O-甲基寡核苷酸的寡核苷酸)稳定并且对核酸酶活性具有抗性。因此,本公开的系链可以设计用于直接递送,消除了对设计成在细胞内制造所需试剂的前体分子或质粒的间接递送(例如病毒)的需要。第三,系链及其各自的部分可以设计为符合特定的mRNA位点和特定的miRNA。设计可以是细胞和基因产品特异性的。第四,本文公开的方法使mRNA保持完整,允许本领域技术人员使用细胞自身的机制在短脉冲中阻断蛋白质合成。因此,这些RNA沉默方法是高度可调节的。

[0713] 本公开的双功能寡核苷酸系链("系链")被设计成使得它们将miRNA(例如,内源性细胞miRNA)募集到靶mRNA上,从而诱导所关注的基因的调节。在某些实施方案中,系链具有式T-L-μ,其中T是mRNA靶向部分,L是连接部分,并且μ是miRNA募集部分。任何一个或多个部分可以是双链的。在某些实施方案中,每个部分是单链的。

[0714] 系链内的部分可以排列或连接(在5'到3'方向),如式T-L-μ所示(即,靶向部分的3'端连接到连接部分的5'端,并且连接部分的3'端与miRNA募集部分的5'端相连)。或者,这些部分可以如下排列或连接在系链中:μ-T-L(即,miRNA募集部分的3'端连接到连接部分的5'端,并且连接部分的3'端连接到靶向部分的5'端)。

[0715] 如上所述,mRNA靶向部分能够捕获特定的靶mRNA。根据本公开,靶mRNA的表达是不期望的,因此,mRNA的翻译抑制是期望的。mRNA靶向部分的大小应足以有效结合靶mRNA。靶向部分的长度变化很大,部分取决于靶mRNA的长度以及靶mRNA和靶向部分之间的互补程度。在各种实施方案中,靶向部分小于约200、100、50、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6,或5个核苷酸长度。在某个实施方案中,靶向部分的长度为约15至约25个核苷酸。

[0716] 如上所述,miRNA募集部分能够与miRNA结合。根据本申请,miRNA可以是任何能够抑制靶mRNA的miRNA。据报道,哺乳动物有超过250种内源性miRNA(Lagos-Quintana等人(2002)Current Biol.12:735-739;Lagos-Quintana等人(2001)Science 294:858-862;和Lim等人(2003)Science 299:1540)。在各种实施方案中,miRNA可以是任何本领域公认的miRNA。

[0717] 连接部分是能够连接靶向部分从而维持靶向部分的活性的任何试剂。连接部分可以是包含足够数量的核苷酸的寡核苷酸部分,使得靶向剂可以与它们各自的靶充分相互作用。连接部分与细胞mRNA或miRNA序列几乎没有序列同源性或没有序列同源性。示例性连接

部分包括一种或多种2'-O-甲基核苷酸,例如2'-β-甲基腺苷、2'-O-甲基胸苷、2'-O-甲基鸟苷或2'-O-甲基尿苷。

[0718] e)基因沉默寡核苷酸

[0719] 在某些示例性实施方案中,可以使用基于寡核苷酸的化合物调节基因表达(即,SNCA基因表达),所述化合物包含两个或更多个单链反义寡核苷酸,这些单链反义寡核苷酸通过它们的5'-末端连接,允许存在两个或更多个可接近的3′-末端有效抑制或降低SNCA基因表达。这种连接的寡核苷酸也称为基因沉默寡核苷酸(GSO)。(参见,例如,转让给Idera Pharmaceuticals,Inc.的US 8,431,544,出于所有目的通过引用将其全部并入本文。)

[0720] GSO 5'端的连接独立于其他寡核苷酸连接,可以直接通过5'、3'或2'羟基,或间接通过非核苷酸连接子或核苷,所述核苷利用核苷的2'或3'羟基位置。连接也可以利用5'末端核苷酸的功能化糖或核碱基。

[0721] GSO可以包含两个同一或不同的序列,在它们的5'-5'末端通过磷酸二酯、硫代磷酸酯或非核苷连接子缀合。此类化合物可包含15至27个核苷酸,这些核苷酸与所关注的mRNA靶标的特定部分互补,用于基因产物的反义下调。包含同一序列的GSO可以通过Watson-Crick氢键相互作用与特定的mRNA结合并抑制蛋白质表达。包含不同序列的GSO能够结合一个或多个mRNA靶标的两个或多个不同区域并抑制蛋白质表达。此类化合物由与靶mRNA互补的异核苷酸序列组成,并通过Watson-Crick氢键形成稳定的双链结构。在某些条件下,含有两个游离3'-末端(5'-5'反义连接)的GSO可能比那些含有单个游离3'-末端或没有游离3'-末端的GSO更有效地抑制基因表达。

[0722] 在一些实施方案中,非核苷酸连接子是式HO--$(CH_2)_o$--CH(OH)--$(CH_2)_p$--OH的甘油或甘油同源物,其中o和p独立地是整数1至约6、1至约4或1至约3。在一些其他实施方案中,非核苷酸连接子是1,3-二氨基-2-羟基丙烷的衍生物。一些这样的衍生物具有分子式HO--(CH_2)m--C(O)NH--CH_2--CH(OH)--CH_2--NHC(O)--$(CH_2)_m$--OH,其中m是0至约10、0至约6、2至约6或2至约4的整数。

[0723] 一些非核苷酸连接子允许连接两个以上的GSO组分。例如,非核苷酸连接子甘油具有三个羟基,GSO组分可以共价连接到这些羟基上。因此,本公开的一些基于寡核苷酸的化合物包含连接到核苷酸或非核苷酸连接子的两个或更多个寡核苷酸。根据本公开的此类寡核苷酸被称为“分支的”。

[0724] 在某些实施方案中,GSO的长度至少为14个核苷酸。在某些示例性实施方案中,GSO的长度为15至40个核苷酸或20至30个核苷酸。因此,GSO的组分寡核苷酸可以独立地为14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸长度。

[0725] 这些寡核苷酸可以通过本领域公认的方法制备,例如氨基磷酸酯或H-膦酸化学,其可以手动或通过自动合成仪进行。这些寡核苷酸也可以通过多种方式进行修饰,而不会损害它们与mRNA杂交的能力。此类修饰可包括寡核苷酸的至少一个核苷酸间键,其为烷基膦酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸羟基、乙酰胺酯、羧甲基酯,或在一个核苷酸的5′端和另一个核苷酸的3′端之间的这些和其他核苷酸间键的组合,其中5′核苷酸磷酸二酯键已被任意数量的化学基团取代。

[0726] V.修饰的抗SNCA RNA沉默剂

[0727] 在本公开的某些方面,如上文所述,本申请的RNA沉默剂(或其任何部分)可以被修饰,从而进一步提高该试剂的活性。例如,上文第II部分中描述的RNA沉默剂可以用下文描述的任何修饰来修饰。修饰可以部分地用于进一步增强靶标区分、增强试剂的稳定性(例如,防止降解)、促进细胞吸收、提高靶标效率、提高结合(例如,与靶标的结合)的功效、提高患者对药物的耐受性,和/或减少毒性。

[0728] 1)增强靶识别的修饰

[0729] 在某些实施方案中,本申请的RNA沉默剂可以用去稳定核苷酸替代以增强单核苷酸靶标辨别力(参见2007年1月25日提交的美国申请号11/698,689和2006年1月25日提交的美国临时申请号60/762,225,两者均以引用方式并入本文)。这种修饰可能足以消除RNA沉默剂对非靶mRNA(例如野生型mRNA)的特异性,而不会明显影响RNA沉默剂对靶mRNA(例如功能获得性突变体mRNA)的特异性。

[0730] 在某些实施方案中,本申请的RNA沉默剂通过在其反义链中引入至少一种通用核苷酸来修饰。通用核苷酸包含能够与四种常规核苷酸碱基(例如A、G、C、U)中的任何一种进行碱基配对的碱基部分。考虑了通用核苷酸,因为它对RNA双链体或由RNA沉默剂的引导链和靶mRNA形成的双链体的稳定性具有相对较小的影响。示例性的通用核苷酸包括具有肌苷碱基部分或肌苷类似物碱基部分的那些,所述肌苷碱基部分或肌苷类似物碱基部分选自由以下组成的组:脱氧肌苷(例如2'-脱氧肌苷)、7-脱氮杂-2'-脱氧肌苷、2'-氮杂-2'-脱氧肌苷、PNA-肌苷、吗啉代-肌苷、LNA-肌苷、氨基磷酸酯-肌苷、2'-O-甲氧基乙基-肌苷和2'-OMe-肌苷。在某些实施方案中,通用核苷酸是肌苷残基或其天然存在的类似物。

[0731] 在某些实施方案中,本公开的RNA沉默剂通过在距特异性决定核苷酸(即,识别疾病相关多态性的核苷酸)5个核苷酸内引入至少一个去稳定核苷酸来修饰。例如,去稳定化核苷酸可以在距特异性决定核苷酸5、4、3、2或1个核苷酸以内的位置引入。在示例性实施方案中,去稳定核苷酸在距特异性决定核苷酸3个核苷酸的位置处引入(即,使得在去稳定核苷酸和特异性决定核苷酸之间存在2个稳定核苷酸)。在具有两条链或链部分的RNA沉默剂(例如siRNA和shRNA)中,去稳定化核苷酸可被引入不包含特异性决定核苷酸的链或链部分中。在某些实施方案中,去稳定核苷酸被引入包含特异性决定核苷酸的相同链或链部分中。

[0732] 2)提高疗效和特异性的修饰

[0733] 在某些实施方案中,根据不对称设计规则,可以改变本公开的RNA沉默剂以促进增强介导RNAi的功效和特异性(参见美国专利号8,309,704、7,750,144、8,304,530、8,329,892和8,309,705)。这种改变有利于siRNA(例如,使用本申请的方法设计的siRNA或由shRNA产生的siRNA)的反义链进入RISC,有利于有义链,使得反义链优先引导靶mRNA的切割或翻译抑制,从而增加或提高靶切割和沉默的效率。在某些实施方案中,通过相对于所述RNA沉默剂的反义链3'端(AS 3')和有义链5'端(S'5)之间的键强度或碱基对强度,降低RNA沉默剂的反义链5'端(AS 5')和有义链3'端(S 3')之间的碱基对强度来增强RNA沉默剂的不对称性。

[0734] 在一个实施方案中,可以增强本申请的RNA沉默剂的不对称性,从而与第一或反义链的3'端与有义链部分的5'端之间相比,在第一或反义链的5'端与有义链部分的3'端之间存在较少G:C碱基对。在另一个实施方案中,可以增强本公开的RNA沉默剂的不对称性,使得

在第一或反义链的5'端与有义链部分的3'端之间存在至少一个错配碱基对。在某些实施方案中，错配碱基对选自下组：G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C和U:U。在另一个实施方案中，可以增强本公开的RNA沉默剂的不对称性，使得在第一条或反义链的5'端和有义链部分的3'端之间，存在至少一个摆动碱基对，例如，G:U。在另一个实施方案中，可以增强本公开的RNA沉默剂的不对称性，使得至少一个碱基对包含稀有核苷酸，例如肌苷(I)。在某些实施方案中，碱基对选自由以下组成的组：I:A、I:U和I:C。在又一个实施方案中，可以增强本公开的RNA沉默剂的不对称性，使得至少有一个碱基对包含修饰的核苷酸。在某些实施方案中，修饰的核苷酸选自由2-氨基-G、2-氨基-A、2,6-二氨基-G和2,6-二氨基-A组成的组。

[0735] 3)具有增强稳定性的RNA沉默剂

[0736] 本申请的RNA沉默剂可以被修饰以提高在血清或细胞培养生长培养基中的稳定性。为了增强稳定性，可以稳定3'-残基以防止降解，例如，可以选择它们使得它们由嘌呤核苷酸组成，例如腺苷或鸟苷核苷酸。或者，用修饰的类似物取代嘧啶核苷酸，例如用2'-脱氧胸苷取代尿苷是可以接受的，并且不影响RNA干扰的效率。

[0737] 在一个方面，本申请的特征在于包括第一和第二链的RNA沉默剂，其中第二链和/或第一链通过用修饰的核苷酸取代内部核苷酸来修饰，使得与相应的未修饰的RNA沉默剂相比，增强了体内稳定性。如本文所定义，“内部”核苷酸是指存在于除核酸分子、多核苷酸或寡核苷酸的5'末端或3'末端之外的任何位置的核苷酸。内部核苷酸可以在单链分子内或在双链体或双链分子的链内。在一个实施方案中，有义链和/或反义链通过替换至少一个内部核苷酸来修饰。在另一个实施方案中，有义链和/或反义链通过至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个内部核苷酸的取代来修饰。在另一个实施方案中，有义链和/或反义链通过至少取代5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更多的内部核苷酸来修饰。在又一个实施方案中，有义链和/或反义链通过替换所有内部核苷酸而被修饰。

[0738] 在一个方面，本申请的特征在于至少80％化学修饰的RNA沉默剂。在某些实施方案中，RNA沉默剂可以被完全化学修饰，即100％的核苷酸被化学修饰。另一方面，本申请的特征在于包含至少80％化学修饰的2'-OH核糖基团的RNA沉默剂。在某些实施方案中，RNA沉默剂包含约80％、85％、90％、95％或100％化学修饰的2'-OH核糖基团。

[0739] 在某些实施方案中，RNA沉默剂可以包含至少一种修饰的核苷酸类似物。核苷酸类似物可以位于靶特异性沉默活性(例如，RNAi介导活性或翻译抑制活性)基本上不受影响的位置，例如，在siRNA分子的5'-末端和/或3′-末端的区域中。此外，可以通过掺入修饰的核苷酸类似物来稳定末端。

[0740] 示例性核苷酸类似物包括糖和/或骨架修饰的核糖核苷酸(即包括对磷酸糖骨架的修饰)。例如，可以修饰天然RNA的磷酸二酯键以包括氮或硫杂原子中的至少一种。在示例性的骨架修饰的核糖核苷酸中，连接到相邻核糖核苷酸的磷酸酯基团被修饰的基团(例如硫代磷酸酯基团)替代。在示例性的糖修饰的核糖核苷酸中，2′-OH-基团可被选自H、OR、R、卤代基、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2或ON的基团代替，其中R为C_1-C_6烷基、烯基或炔基并且卤代基为F、Cl、Br或I。

[0741] 在某些实施方案中，修饰是2'-氟、2'-氨基和/或2'-硫修饰。修饰包括2′-氟-胞

苷、2′-氟-尿苷、2′-氟-腺苷、2′-氟-鸟苷、2′-氨基-胞苷、2′-氨基-尿苷、2′-氨基-腺苷、2′-氨基鸟苷、2,6-二氨基嘌呤、4-硫代尿苷，和/或5-氨基烯丙基尿苷。在某个实施方案中，2'-氟核糖核苷酸是每个尿苷和胞苷。其他示例性修饰包括5-溴-尿苷、5-碘-尿苷、5-甲基-胞苷、核糖-胸苷、2-氨基嘌呤、2'-氨基-丁酰基-苤-尿苷、5-氟-胞苷和5-氟尿苷。2'-脱氧核苷酸和2'-Ome核苷酸也可用于本公开的修饰的RNA-沉默剂部分。其他修饰残基包括脱氧无碱基、肌苷、N3-甲基-尿苷、N6,N6-二甲基-腺苷、假尿苷、嘌呤核糖核苷和利巴韦林。在某个实施方案中，2′部分是甲基，使得连接部分是2'-O-甲基寡核苷酸。

[0742] 在某个实施方案中，本申请的RNA沉默剂包含锁核酸(LNA)。LNA包含抗核酸酶活性(高度稳定)并具有对mRNA的单核苷酸区分的糖修饰核苷酸(Elmen等人，Nucleic Acids Res.,(2005),33(1):439-447;Braasch等人(2003)Biochemistry 42:7967-7975,Petersen等人(2003)Trends Biotechnol 21:74-81)。这些分子具有2'-O,4'-C-乙烯桥连的核酸，并具有可能的修饰，例如2'-脱氧-2"-氟尿苷。此外，LNA通过将糖部分限制在3'-内构象中来增加寡核苷酸的特异性，从而预先组织核苷酸以进行碱基配对，并将寡核苷酸的解链温度提高多达10℃/碱基。

[0743] 在另一个示例性实施方案中，本申请的RNA沉默剂包括肽核酸(PNA)。PNA包含修饰的核苷酸，其中核苷酸的糖磷酸部分被中性2-氨基乙基甘氨酸部分取代，该部分能够形成聚酰胺骨架，其对核酸酶消化具有高度抗性，并赋予分子更高的结合特异性(Nielsen等人，Science,(2001),254:1497-1500)。

[0744] 还考虑了核碱基修饰的核糖核苷酸，即含有至少一种非天然存在的核碱基而不是天然存在的核碱基的核糖核苷酸。可以修饰碱基以阻断腺苷脱氨酶的活性。示例性修饰的核碱基包括但不限于5-位修饰的尿苷和/或胞苷，例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷；在8位修饰的腺苷和/或鸟苷，例如8-溴鸟苷；脱氮核苷酸，例如7-脱氮-腺苷；O-和N-烷基化核苷酸，例如N6-甲基腺苷是合适的。应当注意，上述修饰可以组合。

[0745] 在其他实施方案中，可以使用交联来改变RNA沉默剂的药代动力学，例如，增加体内的半衰期。因此，本申请包括具有两条互补核酸链的RNA沉默剂，其中两条链是交联的。本申请还包括与另一部分(例如非核酸部分如肽)、有机化合物(例如染料)或类似物缀合或未缀合的RNA沉默剂(例如在其3'末端处)。与相应的siRNA相比，以这种方式修饰siRNA衍生物可以改善所得siRNA衍生物的细胞吸收或增强细胞靶向活性，可用于追踪细胞中的siRNA衍生物，或与相应的siRNA相比，提高siRNA衍生物的稳定性。

[0746] 其他示例性修饰包括：(a)2'修饰，例如在有义链或反义链上，但尤其是在有义链上提供2'OMe部分，或在3'突出端中提供2'OMe部分，例如在3'末端(3'末端是指在分子的3'原子或在最3'部分，例如，如上下文所指示的最3'P或2'位置)；(b)修饰磷酸骨架中的骨架，例如用S替换O，例如在U或A或两者上，特别是在反义链上提供硫代磷酸酯修饰；例如，将O替换为S；(c)用C5氨基连接子替换U；(d)用G替换A(在某些实施方案中，序列变化可以位于有义链上而不是反义链上)；(d)在2'、6'、7'或8'位置进行修饰。示例性实施方案是其中一种或多种这些修饰存在于有义链但不存在于反义链上的那些，或其中反义链具有较少此类修饰的实施方案。其他示例性修饰包括在3'突出端，例如在3'末端使用甲基化P；2'修饰例如提供2'O Me部分和例如用S替换O的主链的修饰，例如提供硫代磷酸酯修饰，或在3'突出端，例如在3'末端使用甲基化P的组合；用3'烷基修饰；在3'突出端，例如在3'末端用脱碱基吡

咯烷酮进行修饰;用萘普生、布洛芬或其他抑制3'末端降解的部分进行修饰。

[0747] 重度修饰的RNA沉默剂

[0748] 在某些实施方案中,RNA沉默剂包含至少80%的化学修饰核苷酸。在某些实施方案中,RNA沉默剂被完全化学修饰,即100%的核苷酸被化学修饰。

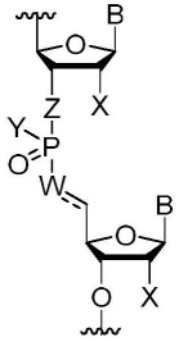
[0749] 在某些实施方案中,RNA沉默剂富含2'-O-甲基,即包含大于50%的2'-O-甲基含量。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%2'-O-甲基核苷酸含量。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含至少约70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含约70%与约90%之间的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,RNA沉默剂是包含反义链和有义链的dsRNA。在某些实施方案中,反义链包含至少约70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,反义链包含约70%与约90%之间的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,有义链包含至少约70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,有义链包含约70%与约90%之间的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,有义链包含100%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

[0750] U.S.S.N.16/550,076(2019年8月23日提交)和U.S.S.N.62/891,185(2019年8月23日提交)中进一步描述了富含2'-O-甲基的RNA沉默剂和特定的化学修饰模式,每一个都以引用的方式并入本文。

[0751] 核苷酸间键修饰

[0752] 在某些实施方案中,至少一个核苷酸间键、亚基间键或核苷酸骨架在RNA沉默剂中被修饰。在某些实施方案中,RNA沉默剂中的所有核苷酸间键都被修饰。在某些实施方案中,修饰的核苷酸间键包含硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,寡核苷酸包含4-16个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,寡核苷酸包含8-13个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,RNA沉默剂是包含反义链和有义链的dsRNA,各自包含5'末端和3'末端。在某些实施方案中,有义链5'端的位置1和2的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。在某些实施方案中,来自有义链3'末端的位置1和2的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键与相邻的核糖核苷酸连接。在某些实施方案中,来自反义链5'末端的位置1和2的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键与相邻的核糖核苷酸连接。在某些实施方案中,来自反义链3'末端的位置1-2至1-8的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键与相邻的核糖核苷酸连接。在某些实施方案中,来自反义链3'末端的位置1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7或1-8的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键与相邻的核糖核苷酸连接。在某些实施方案中,来自反义链3'末端的位置1-2至1-7的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键与相邻的核糖核苷酸连接。

[0753] 在一个方面,本公开提供了一种与靶互补的修饰的寡核苷酸,所述寡核苷酸具有5'端、3'端,其中所述寡核苷酸包含有义链和反义链,以及至少一个修饰的式(I)亚基间键:

[0754] 

[0755] **(I)**;

[0756] 其中：

[0757] B是碱基配对部分；

[0758] W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2和CH组成的组；

[0759] X选自由卤代基、羟基和C_{1-6}烷氧基组成的组；

[0760] Y选自由O^-、OH、OR、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

[0761] Z选自由O和CH_2组成的组；

[0762] R是保护基；并且

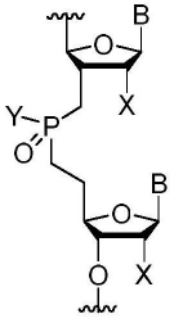
[0763] ═是任选的双键。

[0764] 在式(I)的一个实施方案中，当W为CH时，═为双键。

[0765] 在式(I)的一个实施方案中，当W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2组成的组时，═为单键。

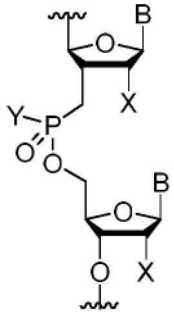
[0766] 在式(I)的一个实施方案中，当Y是O^-时，Z或W不是O。

[0767] 在式(I)的一个实施方案中，Z是CH_2并且W是CH_2。在另一个实施方案中，式(I)的修饰的亚基间键是式(II)的修饰的亚基间键：

[0768] 

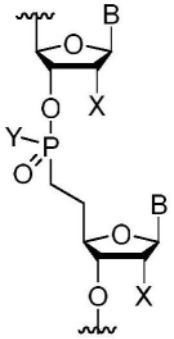
(II)。

[0769] 在式(I)的一个实施方案中，Z是CH_2并且W是O。在另一个实施方案中，其中式(I)的修饰的亚基间键是式(III)的修饰的亚基间键：

[0770] 

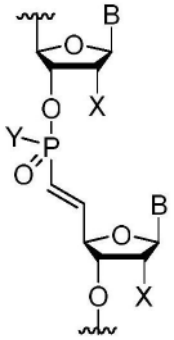
(III)。

[0771] 在式(I)的一个实施方案中,Z是O并且W是CH_2。在另一个实施方案中,式(I)的修饰的亚基间键是式(IV)的修饰的亚基间键:

[0772] 

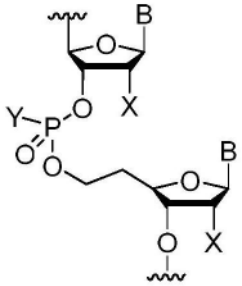
(IV)。

[0773] 在式(I)的一个实施方案中,Z是O并且W是CH。在另一个实施方案中,式(I)的修饰的亚基间键是式V的修饰的亚基间键:

[0774] 

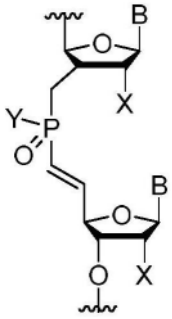
(V)。

[0775] 在式(I)的一个实施方案中,Z是O并且W是OCH_2。在另一个实施方案中,式(I)的修饰的亚基间键是式VI的修饰的亚基间键:

[0776] 

(VI)。

[0777] 在式(I)的一个实施方案中，Z是CH_2并且W是CH。在另一个实施方案中，式(I)的修饰的亚基间键是式VII的修饰的亚基间键：

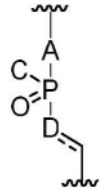
[0778] 

(VII)。

[0779] 在式(I)的一个实施方案中，碱基配对部分B选自由腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶组成的组。

[0780] 在一个实施方案中，将修饰的寡核苷酸并入与靶互补的siRNA中，所述修饰的siRNA具有5'端、3'端，其中siRNA包含有义链和反义链，以及式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)或式(VII)中的任意一种或多种的至少一个修饰的亚基间键。

[0781] 在一个实施方案中，将修饰的寡核苷酸并入siRNA，所述修饰的siRNA具有5'端、3'端，其与靶标互补并包含有义和反义链，其中所述siRNA包含至少一个式VIII的修饰的亚基间键：

[0782] 

(VIII)；

[0783] 其中：

[0784] D选自由O、OCH_2、OCH、CH2和CH组成的组；

[0785] C选自由O^-、OH、OR^1、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

[0786] A选自由O和CH_2组成的组；

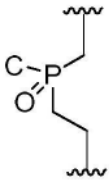
[0787] R^1是保护基；

[0788] ---是任选的双键;并且

[0789] 亚基间桥接两个任选修饰的核苷。

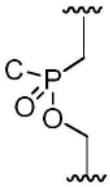
[0790] 在一个实施方案中,当C是O^-时,A或D不是O。

[0791] 在一个实施方案中,D是CH_2。在另一个实施方案中,式VIII的修饰的亚基间键是式(IX)的修饰的亚基间键:

[0792] 

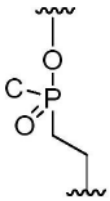
(IX)。

[0793] 在一个实施方案中,D是O。在另一个实施方案中,式VIII的修饰的亚基间键是式(X)的修饰的亚基间键:

[0794] 

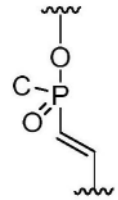
(X)。

[0795] 在一个实施方案中,D是CH_2。在另一个实施方案中,式(VIII)的修饰的亚基间键是式(XI)的修饰的亚基间键:

[0796] 

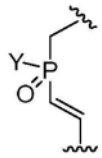
(XI)。

[0797] 在一个实施方案中,D是CH。在另一个实施方案中,式VIII的修饰的亚基间键是式(XII)的修饰的亚基间键:

[0798] 

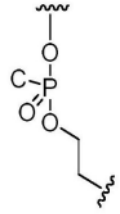
(XII)。

[0799] 在另一个实施方案中,式(VII)的修饰的亚基间键是式(XIV)的修饰的亚基间键:

[0800] 

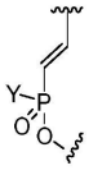
(XIV)。

[0801] 在一个实施方案中,D是OCH_2。在另一个实施方案中,式(VII)的修饰的亚基间键是式(XIII)的修饰的亚基间键:

[0802] 

(XIII)。

[0803] 在另一个实施方案中,式(VII)的修饰的亚基间键是式(XXa)的修饰的亚基间键:

[0804] 

(XXa)。

[0805] 在修饰的siRNA键的一个实施方案中,每个任选修饰的核苷在每次出现时独立地选自由腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷组成的组。

[0806] 在式(I)的某些示例性实施方案中,W是O。在另一个实施方案中,W是CH_2。在又一个实施方案中,W是CH。

[0807] 在式(I)的某些示例性实施方案中,X是OH。在另一个实施方案中,X是OCH_3。在又一个实施方案中,X是卤代基。

[0808] 在式(I)的某个实施方案中,修饰的siRNA不包含2'-氟取代基。

[0809] 在式(I)的一个实施方案中,Y为O^-。在另一个实施方案中,Y是OH。在又一个实施方案中,Y是OR。在又一个实施方案中,Y是NH^-。在一个实施方案中,Y为NH_2。在另一个实施方案中,Y是S^-。在又一个实施方案中,Y是SH。

[0810] 在式(I)的一个实施方案中,Z是O。在另一个实施方案中,Z是CH_2。

[0811] 在一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置1-2。在另一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置6-7。在又一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置10-11。在另一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置19-20。在一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置5-6和18-19。

[0812] 在式(VIII)的修饰的siRNA键的一个示例性实施方案中,C是O^-。在另一个实施方案中,C是OH。在另一个实施方案中,C是OR^1。在另一个实施方案中,C是NH^-。在一个实施方案中,C是NH_2。在另一个实施方案中,C是S^-。在又一个实施方案中,C是SH。

[0813] 在式(VIII)的修饰的siRNA键的一个示例性实施方案中,A是O。在另一个实施方案中,A是CH_2。在又一个实施方案中,C是OR^1。在另一个实施方案中,C是NH^-。在一个实施方案中,C是NH_2。在另一个实施方案中,C是S^-。在又一个实施方案中,C是SH。

[0814] 在式(VIII)的修饰的siRNA键的某个实施方案中,任选修饰的核苷是腺苷。在式(VIII)的修饰的siRNA键的另一个实施方案中,任选修饰的核苷是鸟苷。在式(VIII)的修饰的siRNA键的另一个实施方案中,任选修饰的核苷是胞苷。在式(VIII)的修饰的siRNA键的另一个实施方案中,任选修饰的核苷是尿苷。

[0815] 在修饰的siRNA键的一个实施方案中,其中该键插入反义链的位置1-2。在另一个实施方案中,该键插入反义链的位置6-7。在又一个实施方案中,该键插入反义链的位置10-11。在另一个实施方案中,该键插入反义链的位置19-20。在一个实施方案中,该键插入反义链的位置5-6和18-19。

[0816] 在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是腺嘌呤。在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是鸟嘌呤。在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是胞嘧啶。在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是尿嘧啶。

[0817] 在式(I)的一个实施方案中,W是O。在式(I)的一个实施方案中,W是CH_2。在式(I)的一个实施方案中,W是CH。

[0818] 在式(I)的一个实施方案中,X是OH。在式(I)的一个实施方案中,X是OCH_3。在式(I)的一个实施方案中,X为卤代基。

[0819] 在式(I)的示例性实施方案中,修饰的寡核苷酸不包含2'-氟取代基。

[0820] 在式(I)的一个实施方案中,Y为O^-。在式(I)的一个实施方案中,Y为OH。在式(I)的一个实施方案中,Y为OR。在式(I)的一个实施方案中,Y为NH^-。在式(I)的一个实施方案中,Y为NH_2。在式(I)的一个实施方案中,Y为S^-。在式(I)的一个实施方案中,Y为SH。

[0821] 在式(I)的一个实施方案中,Z为O。在式(I)的一个实施方案中,Z为CH_2。

[0822] 在式(I)的一个实施方案中,该键插入反义链的1-2位。在式(I)的另一个实施方案中,该键插入反义链的6-7位。在式(I)的另一个实施方案中,该键插入反义链的10-11位。在式(I)的另一个实施方案中,该键插入反义链的19-20位。在式(I)的一个实施方案中,该键插入反义链的5-6和18-19位。

[0823] U.S.S.N.62/824,136(2019年3月26日提交)、U.S.S.N.62/826,454(2019年3月29日提交)和U.S.S.N.62/864,792(2019年6月21日提交)中进一步描述了修饰的亚基间键,每一个都以引用的方式并入本文。

[0824] 4)缀合功能部分

[0825] 在其他实施方案中,可以用一种或多种功能部分修饰RNA沉默剂。功能部分是赋予RNA沉默剂一种或多种额外活性的分子。在某些实施方案中,功能性部分增强靶细胞(例如神经元细胞)的细胞吸收。因此,本公开包括与另一部分(例如非核酸部分如肽)、有机化合物(例如染料)或类似物缀合或未缀合的RNA沉默剂(例如在其5'和/或3'末端处)。缀合可以通过本领域已知的方法完成,例如使用以下方法:Lambert等人,Drug Deliv.Rev.:47(1),99-112(2001)(描述了加载到聚氰基丙烯酸烷基酯(PACA)纳米颗粒上的核酸);Fattal等人,J.Control Release 53(1-3):137-43(1998)(描述与纳米颗粒结合的核酸);Schwab等人,Ann.Oncol.5增刊4:55-8(1994)(描述了与嵌入剂、疏水基团、聚阳离子或PACA纳米颗粒

连接的核酸)；和Godard等人,Eur.J.Biochem.232(2):404-10(1995)(描述了与纳米颗粒连接的核酸)。

[0826] 在某个实施方案中,功能部分为疏水部分。在某个实施方案中,疏水部分选自由以下组成的组:脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂和核苷类似物、内源性大麻素和维生素。在某个实施方案中,类固醇选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组。在某个实施方案中,脂肪酸选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳烯酸(DCA)组成的组。在某个实施方案中,维生素选自由胆碱、维生素A、维生素E及其衍生物或代谢物组成的组。在某个实施方案中,维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

[0827] 在某个实施方案中,本公开的RNA沉默剂与亲脂部分缀合。在一个实施方案中,亲脂部分是包括阳离子基团的配体。在另一个实施方案中,亲脂部分连接至siRNA的一条或两条链。在一个示例性实施方案中,亲脂部分连接到siRNA有义链的一端。在另一个示例性实施方案中,亲脂部分连接到有义链的3'端。在某些实施方案中,亲脂部分选自由以下组成的组:胆固醇、维生素E、维生素K、维生素A、叶酸、阳离子染料(例如Cy3)。在一个示例性实施方案中,亲脂部分是胆固醇。其他亲脂性部分包括胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆酸、二甲氧基三苯甲基或吩恶嗪。

[0828] 在某些实施方案中,功能部分可包含一种或多种配体,其与RNA沉默剂连接以提高稳定性、与靶核酸的杂交热力学、靶向特定组织或细胞类型或细胞渗透性,例如通过内吞作用依赖性或无关的机制。配体和相关修饰也可以增加序列特异性,从而减少异位靶向。栓系配体可包括一种或多种可用作嵌入剂的修饰碱基或糖。这些可以位于内部区域,例如在RNA沉默剂/靶双链体的凸起中。嵌入剂可以是芳族化合物,例如多环芳族化合物或杂环芳族化合物。多环嵌入剂可以具有堆叠能力,并且可以包括具有2、3或4个稠环的系统。本文所述的通用碱基可以包含在配体上。在一个实施方案中,配体可以包括一个切割基团,其有助于通过切割靶核酸来抑制靶基因。切割基团可以是例如博来霉素(例如博来霉素-A5、博来霉素-A2或博来霉素-B2)、芘、菲咯啉(例如O-菲咯啉)、聚胺、三肽(例如lys-tyr-lys三肽),或金属离子螯合基团。金属离子螯合基团可以包括例如Lu(III)或EU(III)大环络合物、Zn(II)2,9-二甲基菲咯啉衍生物、Cu(II)三联吡啶或吖啶,它们可以促进游离金属离子(如Lu(III))在凸起部位选择性切割靶RNA。在一些实施方案中,肽配体可以与RNA沉默剂连接以促进靶RNA的切割,例如在凸起区域。例如,1,8-二甲基-1,3,6,8,10,13-六氮杂环十四烷(cyclam)可以与肽(例如通过氨基酸衍生物)缀合以促进靶RNA切割。栓系配体可以是氨基糖苷配体,其可以使RNA沉默剂具有改进的杂交特性或改进的序列特异性。示例性氨基糖苷类包括糖基化聚赖氨酸、半乳糖基化聚赖氨酸、新霉素B、妥布霉素、卡那霉素A和氨基糖苷类的吖啶缀合物,例如新-N-吖啶、新-S-吖啶、新-C-吖啶、Tobra-N-吖啶和KanaA-N-吖啶。使用吖啶类似物可以增加序列特异性。例如,与DNA相比,新霉素B对RNA的亲和力高,但序列特异性低。吖啶类似物新-5-吖啶对HIV Rev响应元件(RRE)的亲和力增加。在一些实施方案中,氨基糖苷配体的胍类似物(胍基糖苷)被栓系至RNA沉默剂。在胍基糖苷中,氨基酸上的胺基被胍基交换。胍类似物的附接可以增强RNA沉默剂的细胞渗透性。栓系配体可以是聚精氨酸肽、类肽或拟肽,其可以增强寡核苷酸试剂的细胞吸收。

[0829] 示例性的配体通过插入的系链直接或间接地与配体缀合的载体偶联。在某些实施方案中，偶联是通过共价键进行的。在某些实施方案中，配体通过介入系链连接至载体。在某些实施方案中，配体改变其所掺入的RNA沉默剂的分布、靶向或寿命。在某些实施方案中，例如与没有这种配体的物种相比，配体提供对选定靶标的增强的亲和力，例如分子、细胞或细胞类型、隔室，例如细胞或器官隔室、组织、器官或身体区域。

[0830] 示例性配体可以改善转运、杂交和特异性性质，并且还可以改善所得天然或修饰的RNA沉默剂或包含本文所述单体和/或天然或修饰的核糖核苷酸的任何组合的聚合物分子的核酸酶抗性。配体一般可以包括治疗性修饰剂，例如用于增强吸收；诊断化合物或报告基团，例如，用于监测分布；交联剂；核酸酶抗性赋予部分；和天然或不寻常的核碱基。一般实例包括亲脂性物质、脂质、类固醇(例如，乌发醇、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元)、萜烯(例如，三萜，例如菝葜皂苷元、无羁萜、表无羁萜醇衍生的石胆酸)、维生素(例如，叶酸、维生素A、生物素、吡哆醛)、碳水化合物、蛋白质、蛋白质结合剂、整合素靶向分子、聚阳离子、肽、多胺和肽模拟物。配体可以包括天然存在的物质(例如，人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白)；碳水化合物(例如，葡聚糖、支链淀粉、甲壳素、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸)；氨基酸或脂质。配体也可以是重组或合成分子，例如合成聚合物，例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸是聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的实例包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或α螺旋肽。

[0831] 配体还可以包括结合特定细胞类型如肾细胞的靶向基团，例如细胞或组织靶向剂，例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质，例如抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺(GalNAc)或其衍生物、N-乙酰基-葡糖胺、多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、二膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素或RGD肽或RGD肽模拟物。配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吖啶和取代的吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、Sapphyrin)、多环芳烃(例如吩嗪、二氢吩嗪、菲咯啉、芘)、lys-tyr-lys三肽、氨基糖苷类、胍氨基糖苷、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子例如胆固醇(及其硫代类似物)、胆酸、胆烷酸、石胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、甘油(例如，酯(例如，单、双或三脂肪酸酯，例如，C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}或C_{20}脂肪酸)及其醚类，例如C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}或C_{20}烷基；例如，1,3-双-O(十六烷基)甘油、1,3-双-O(十八烷基)甘油)、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、硬脂酸(例如，二硬脂酸甘油酯)、油酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰)石胆酸、O3-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩恶嗪)和肽缀合物(例如，触足肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如，PEG-40K)、MPEG、[MPEG]2、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标记、酶、半抗原(例如生物素)，转运/吸收促进剂(如阿司匹林、萘普生、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(如咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑偶联物、四氮杂大环的Eu^{3+}络合

物)、二硝基苯基、HRP或AP。在某些实施方案中,配体是GalNAc或其衍生物。

[0832] 配体可以是蛋白质,例如糖蛋白,或肽,例如对共配体具有特定亲和力的分子,或抗体例如与特定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体还可能包括激素和激素受体。它们还可以包括非肽类物质,例如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38MAP激酶的激活剂或NF-kB的激活剂。

[0833] 配体可以是可以例如通过破坏细胞的细胞骨架,例如通过破坏细胞的微管、微丝、和/或中间丝来增加RNA沉默剂吸收至细胞中的物质,例如药物。所述药物可以是例如分类群、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑、japlakinolide、拉春库林A(latrunculin A)、鬼笔环肽、swinholide A、茚满新碱(indanocine)或myoservin。例如,配体可以通过激活炎症响应来增加RNA沉默剂吸收至细胞中。具有这种作用的示例性配体包括肿瘤坏死因子α(TNFα)、白细胞介素1β或γ干扰素。在一个方面,配体是脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子可以结合血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)。HSA结合配体允许将缀合物分布到靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。其他可以结合HSA的分子也可以用作配体。例如,可以使用奈普洛辛或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加对缀合物降解的抗性,(b)增加靶向或转运到靶细胞或细胞膜中,和/或(c)可用于调节与血清蛋白例如HSA的结合。基于脂质的配体可用于调节例如控制缀合物与靶组织的结合。例如,与HSA结合更强的脂质或基于脂质的配体将不太可能靶向肾脏,因此不太可能从体内清除。与HSA结合较弱的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向肾脏。在某个实施方案中,基于脂质的配体结合HSA。基于脂质的配体可以以足够的亲和力结合HSA,使得缀合物将分布到非肾组织。然而,预期亲和力不会强到不能逆转HSA-配体结合。在另一个实施方案中,基于脂质的配体弱结合或根本不结合HSA,使得缀合物将分布到肾脏。靶向肾细胞的其他部分也可用于代替或补充基于脂质的配体。

[0834] 在另一个方面,配体是被靶细胞例如增殖细胞吸收的部分,例如维生素。这些可用于治疗以不希望的细胞增殖为特征的疾病,例如恶性或非恶性类型的细胞,例如癌细胞。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括B族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或癌细胞吸收的其他维生素或营养素。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

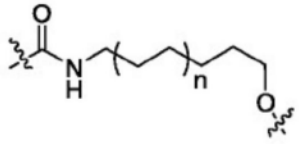
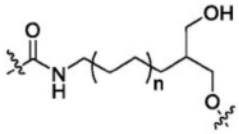
[0835] 在另一个方面,配体是细胞渗透剂,例如螺旋细胞渗透剂。在某些实施方案中,试剂是两亲性的。示例性试剂是肽,例如tat或触足。如果试剂是肽,它可以被修饰,包括肽模拟物、转化体、非肽或假肽键,以及使用D-氨基酸。螺旋剂可以是α-螺旋剂,其可以具有亲脂相和疏脂相。

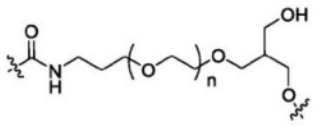
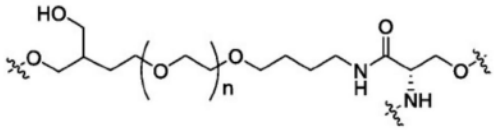
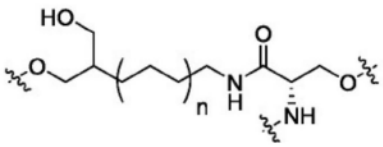
[0836] 配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(本文也称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的确定的三维结构的分子。肽和肽模拟物与寡核苷酸试剂的连接可以影响RNA沉默剂的药代动力学分布,例如通过增强细胞识别和吸收。肽或肽模拟部分可以是约5-50个氨基酸长,例如,约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。肽部分可以是L-肽或D-肽。在另一个备选方案中,肽部分可以包括疏水膜易位序列(MTS)。肽或肽模拟物可由DNA的随机序列编码,例如从噬菌体展示文库或单珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam等人,Nature 354:82-84,1991)。在示

例性实施方案中，通过掺入的单体单元与RNA沉默剂连接的肽或肽模拟物是细胞靶向肽，例如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度范围可以从约5个氨基酸到约40个氨基酸。肽部分可以具有结构修饰，例如以增加稳定性或直接构象特性。可以使用下面描述的任何结构修改。

[0837] 在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的5′端和/或3′端。在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的反义链的5'端和/或3′端。在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的有义链的5'端和/或3′端。在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的有义链的3′端。

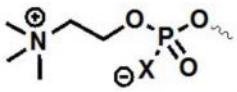
[0838] 在某些实施方案中，功能部分通过连接子与RNA沉默剂连接。在某些实施方案中，功能部分通过连接子与反义链和/或有义链连接。在某些实施方案中，功能部分通过连接子与有义链的3′端连接。在某些实施方案中，连接子包含二价或三价连接子。在某些实施方案中，连接子包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。在某些实施方案中，二价或三价连接子选自：


；

；

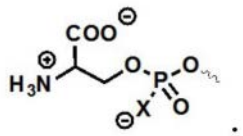
[0839]

；

；或


[0840] 其中n为1、2、3、4或5。

[0841] 在某些实施方案中，连接子还包含磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。在某些实施方案中，磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：

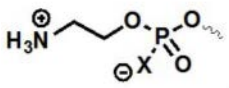
[0842]

；

(Zc1);



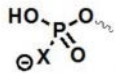
;

(Zc2);

[0843] 

; 和

(Zc3)



;

(Zc4)

[0844] 其中X是O、S或BH_3。

[0845] 本公开的各种功能部分以及将它们与RNA沉默剂缀合的方法在WO2017/030973A1和WO2018/031933A2中进一步详细地描述,所述文献通过引用并入本文。

[0846] VI.分支寡核苷酸

[0847] 如上文公开的两种或更多种RNA沉默剂,例如寡核苷酸构建体,例如抗SNCA siRNA,可以通过一个或多个独立地选自连接子、间隔子和分支点的部分相互连接,以形成分支寡核苷酸RNA沉默剂。在某些实施方案中,分支寡核苷酸RNA沉默剂由两个siRNA组成以形成用于递送两个siRNA的双分支siRNA(“双siRNA”)支架。在代表性实施方案中,分支寡核苷酸的核酸各自包含反义链(或其部分),其中反义链与靶mRNA(例如SNCA mRNA)具有足够的互补性以介导RNA介导的沉默机制(例如RNAi)。

[0848] 在示例性实施方案中,分支寡核苷酸可以具有通过连接子连接的二至八种RNA沉默剂。连接子可以是疏水的。在一个实施方案中,本申请的分支寡核苷酸具有二至三个寡核苷酸。在一个实施方案中,寡核苷酸独立地具有显著的化学稳定性(例如,至少40%的组成碱基是化学修饰的)。在一个示例性实施方案中,寡核苷酸具有完全的化学稳定性(即,所有组成碱基都经过化学修饰)。在一些实施方案中,分支寡核苷酸包含一个或多个单链硫代磷酸酯化尾,每一个独立地具有二至二十个核苷酸。在一个非限制性实施方案中,每个单链尾具有二至十个核苷酸。

[0849] 在某些实施方案中,分支寡核苷酸的特征在于三个特性:(1)分支结构,(2)完全代谢稳定性,和(3)包含硫代磷酸酯连接子的单链尾的存在。在某些实施方案中,分支寡核苷酸具有2或3个分支。相信增加的支化结构的总尺寸促进增加的吸收。此外,不受特定活动理论的约束,多个相邻分支(例如,2个或3个)被认为允许每个分支协同行动,从而显著提高内化、转运和释放的速度。

[0850] 在各种结构不同的实施方案中提供了分支寡核苷酸。在一些实施方案中,在分支

点处连接的核酸是单链或双链的并且由miRNA抑制剂、间隙体、混合体、SSO、PMO或PNA组成。这些单链可以在它们的3′或5′端处连接。siRNA和单链寡核苷酸的组合也可用于双重功能。在另一个实施方案中，与间隙体、混合体、miRNA抑制剂、SSO、PMO和PNA互补的短核酸用于携带这些活性单链核酸并增强分布和细胞内化。短的双链区具有较低的解链温度(Tm～37℃)用于在将分支结构内化到细胞中时快速解离。

[0851] 双siRNA分支寡核苷酸可包含化学上多样化的缀合物，例如上述功能部分。缀合的生物活性配体可用于增强细胞特异性并促进膜结合、内化和血清蛋白结合。用于缀合的生物活性部分的实例包括DHA、GalNAc和胆固醇。这些部分可以通过连接连接子或间隔子连接到Di-siRNA，或通过连接到另一个游离siRNA末端的附加连接子或间隔子添加。

[0852] 与具有相同化学成分的非分支化合物相比，分支结构的存在将大脑中的组织保留水平提高了100倍以上，这表明了一种新的细胞保留和分布机制。分支寡核苷酸出人意料地均匀分布在整个脊髓和大脑中。此外，分支寡核苷酸表现出出人意料的高效全身递送至多种组织，以及非常高水平的组织积累。

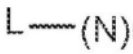
[0853] 分支寡核苷酸包含多种治疗性核酸，包括siRNA、ASO、miRNA、miRNA抑制剂、剪接转换、PMO、PNA。在一些实施方案中，分支寡核苷酸进一步包含缀合的疏水部分并且在体外和体内表现出前所未有的沉默和功效。

[0854] 连接子

[0855] 在分支寡核苷酸的一个实施方案中，每个连接子独立地选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑及其组合；其中连接子的任何碳或氧原子任选地被氮原子取代，带有羟基取代基，或带有氧代取代基。在一个实施方案中，每个连接子是乙二醇链。在另一个实施方案中，每个连接子是烷基链。在另一个实施方案中，每个连接子是肽。在另一个实施方案中，每个连接子是RNA。在另一个实施方案中，每个连接子是DNA。在另一个实施方案中，每个连接子是磷酸盐。在另一个实施方案中，每个连接子是膦酸盐。在另一个实施方案中，每个连接子是氨基磷酸酯。在另一个实施方案中，每个连接子是酯。在另一个实施方案中，每个连接子是酰胺。在另一个实施方案中，每个连接子是三唑。

[0856] VII.式(I)化合物

[0857] 在另一个方面，本文提供了式(I)的分支寡核苷酸化合物：

[0858] 

[0859] (I)

[0860] 其中L选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑及其组合，其中式(I)任选地进一步包含一个或多个分支点B，以及一个或多个间隔子S；其中B在每次出现时独立地是多价有机物质或其衍生物；对于每次出现，S独立地选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑及其组合。

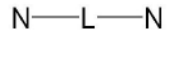
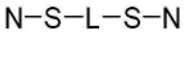
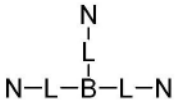
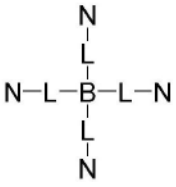
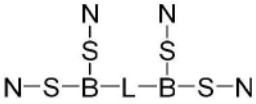
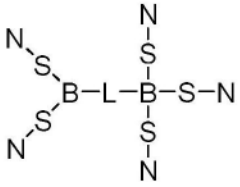
[0861] N部分是包含有义链和反义链的RNA双链体；n为2、3、4、5、6、7或8。在一个实施方案中，N的反义链包含与表4-6中列举的SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。在进一步的实施方案中，N包括能够靶向选自由表7-8中列举的SEQ ID NO:14-28组成的组的SNCA核酸序列中的一个或多个的链。有义链和反义链可各自独立地包含一或多个

化学修饰。

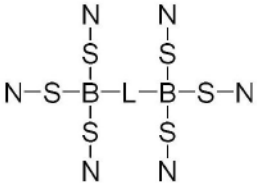
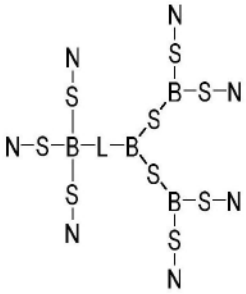
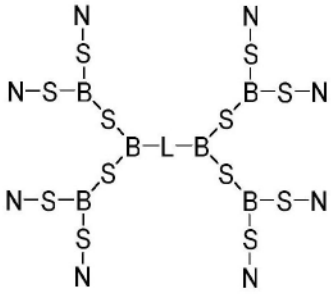
[0862] 在一个实施方案中,式(I)化合物具有选自表1的式(I-1)-(I-9)的结构。

[0863] 表1

[0864]

 (I-1)	 (I-2)	 (I-3)
 (I-4)	 (I-5)	 (I-6)

[0865]

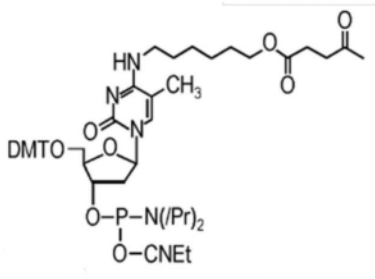
 (I-7)	 (I-8)	 (I-9)

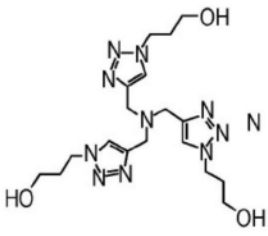
[0866] 在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-1)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-2)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-3)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-4)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-5)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-6)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-7)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-8)化合物。在一个实施方案中,式(I)化合物为式(I-9)化合物。

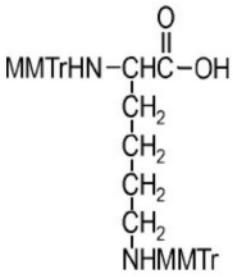
[0867] 在式(I)化合物的一个实施方案中,每个连接子独立地选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑及其组合;其中连接子的任何碳或氧原子任选地被氮原子取代,带有羟基取代基,或带有氧代取代基。在式(I)化合物的一个实施方案中,每个连接子是乙二醇链。在另一个实施方案中,每个连接子是烷基链。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是肽。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是RNA。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是DNA。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是磷酸盐。在另一个实施方案中,每个连接子是膦酸盐。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是氨基磷酸酯。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是酯。在式(I)化合物的另一个实施方案中,每个连接子是酰胺。在式(I)化

合物的另一个实施方案中,每个连接子是三唑。

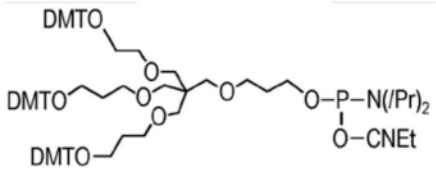
[0868] 在式(I)化合物的一个实施方案中,B是多价有机物质。在式(I)化合物的另一个实施方案中,B是多价有机物质的衍生物。在式(I)化合物的一个实施方案中,B是三醇或四醇衍生物。在另一个实施方案中,B是三羧酸或四羧酸衍生物。在另一个实施方案中,B是胺衍生物。在另一个实施方案中,B是三胺或四胺衍生物。在另一个实施方案中,B是氨基酸衍生物。在式(I)化合物的另一个实施方案中,B选自下式:

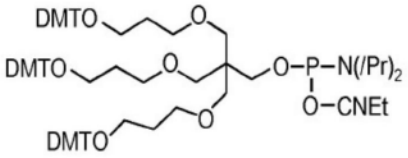


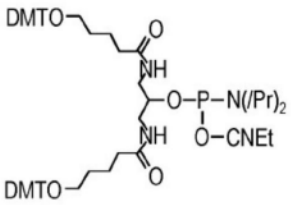
;


;


;

[0869]


;


; 或


。

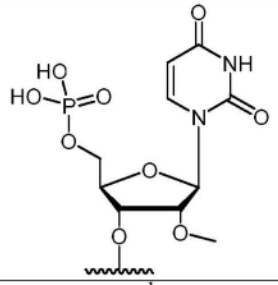
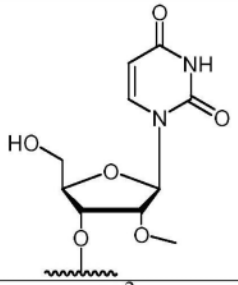
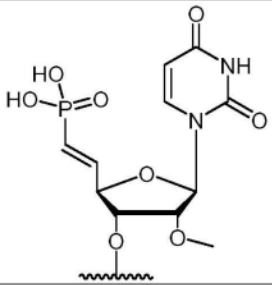
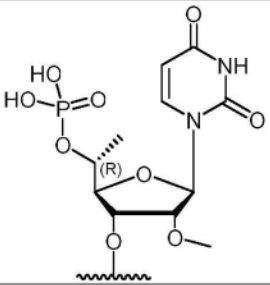
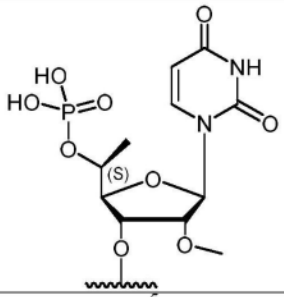
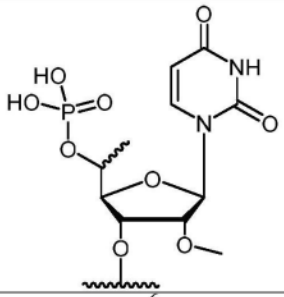
[0870] 多价有机物质是包含碳和三个或更多个化合价的部分(即,与如上定义的S、L或N等部分的连接点)。多价有机物质的非限制性实例包括三醇(例如甘油、间苯三酚等)、四醇(例如核糖、季戊四醇、1,2,3,5-四羟基苯等)、三羧酸(例如柠檬酸、1,3,5-环己烷三羧酸、均苯三酸等)、四羧酸(例如乙二胺四乙酸、均苯四酸等)、叔胺(例如三炔丙基胺、三乙醇胺等)、三胺(例如二亚乙基三胺等)、四胺和包含羟基、硫醇、氨基和/或羧基部分的组合的物质(例如氨基酸,例如赖氨酸、丝氨酸、半胱氨酸等)。

[0871] 在式(I)化合物的一个实施方案中,每个核酸包含一个或多个化学修饰的核苷酸。在式(I)化合物的一个实施方案中,每个核酸由化学修饰的核苷酸组成。在式(I)化合物的某些实施方案中,>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或者>50%每种核酸包括化学修饰的核苷酸。

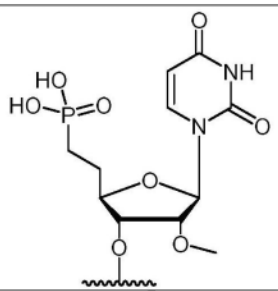
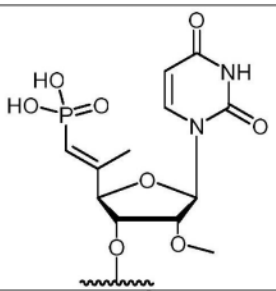
[0872] 在一个实施方案中,每条反义链独立地包含选自表2的组的5'末端基团R。

[0873] 表2

[0874]

	
R^1	R^2
	
R^3	R^4
	
R^5	R^6

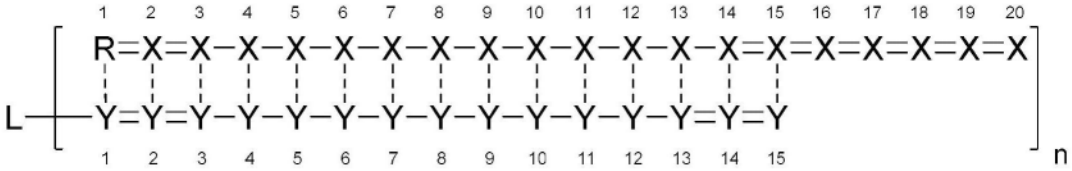
[0875]

	
R^7	R^8

[0876] 在一个实施方案中,R是R_1。在另一个实施方案中,R是R_2。在另一个实施方案中,R是R_3。在另一个实施方案中,R是R_4。在另一个实施方案中,R是R_5。在另一个实施方案中,R是R_6。在另一个实施方案中,R是R_7。在另一个实施方案中,R是R_8。

[0877] 式(II)的结构

[0878] 在一个实施方案中,式(I)化合物具有式(II)的结构:

[0879] 

(II)

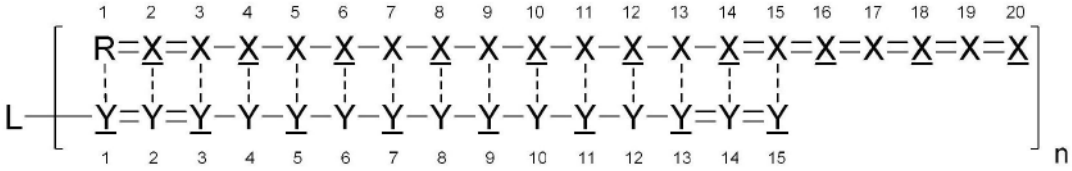
[0880] 其中X,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷和其化学修饰的衍生物;Y,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物;-代表磷酸二酯核苷间键;=代表硫代磷酸酯核苷间键;并且---每次出现时分别代表碱基配对相互作用或错配。

[0881] 在某些实施方案中,式(II)的结构不包含错配。在一个实施方案中,式(II)的结构包含1个错配。在另一个实施方案中,式(II)化合物包含2个错配。在另一个实施方案中,式(II)化合物包含3个错配。在另一个实施方案中,式(II)化合物包含4个错配。在一个实施方案中,每个核酸由化学修饰的核苷酸组成。

[0882] 在某些实施方案中,式(II)结构的>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或者>50%的X'是化学修饰的核苷酸。在其他实施方案中,式(II)结构的>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或者>50%的X'是化学修饰的核苷酸。

[0883] 式(III)的结构

[0884] 在一个实施方案中,式(I)化合物具有式(III)的结构:

[0885] 

(III)

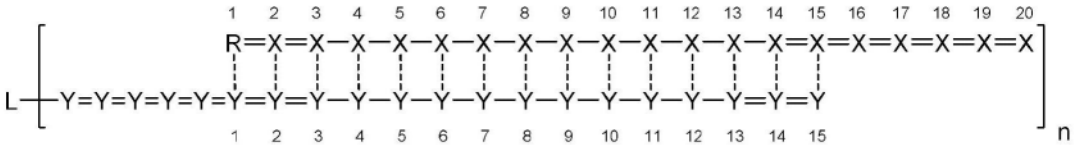
[0886] 其中X,对于每次出现,独立地是包含2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸;X,对于每次出现,独立地是包含2'-O-甲基修饰的核苷酸;Y,对于每次出现,独立地是包含2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸;Y,对于每次出现,独立地是包含2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0887] 在一个实施方案中,X选自由2'-脱氧-2'-氟修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。在一个实施方案中,X选自由2'-O-甲基修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。在一个实施方案中,Y选自由2'-脱氧-2'-氟修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。在一个实施方案中,Y选自由2'-O-甲基修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。

[0888] 在某些实施方案中,式(III)的结构不包含错配。在一个实施方案中,式(III)的结构包含1个错配。在另一个实施方案中,式(III)化合物包含2个错配。在另一个实施方案中,式(III)化合物包含3个错配。在另一个实施方案中,式(III)化合物包含4个错配。

[0889] 式(IV)的结构

[0890] 在一个实施方案中,式(I)化合物具有式(IV)的结构:

[0891] 

(IV)

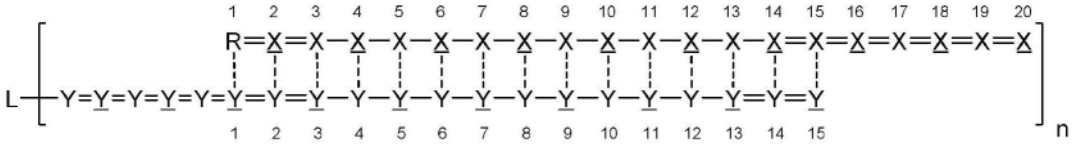
[0892] 其中X,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷和它们的化学修饰的衍生物;Y,对于每次出现,独立地选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及其化学修饰的衍生物;-代表磷酸二酯核苷间键;=代表硫代磷酸酯核苷间键;并且---每次出现时分别代表碱基配对相互作用或错配。

[0893] 在某些实施方案中,式(IV)的结构不包含错配。在一个实施方案中,式(IV)的结构包含1个错配。在另一个实施方案中,式(IV)化合物包含2个错配。在另一个实施方案中,式(IV)化合物包含3个错配。在另一个实施方案中,式(IV)化合物包含4个错配。在一个实施方案中,每个核酸由化学修饰的核苷酸组成。

[0894] 在某些实施方案中,式(IV)结构的>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或者>50%的X'是化学修饰的核苷酸。在其他实施方案中,式(IV)结构的>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或者>50%的X'是化学修饰的核苷酸。

[0895] 式(V)的结构

[0896] 在一个实施方案中,式(I)化合物具有式(V)的结构:

[0897] 

(V)

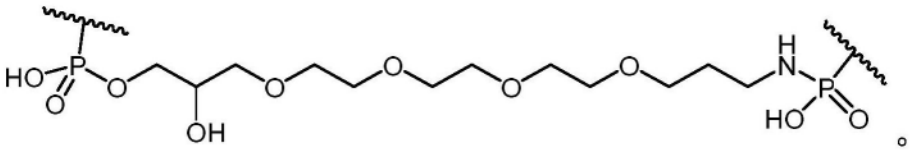
[0898] 其中X,对于每次出现,独立地是包含2'-脱氧-2′-氟修饰的核苷酸;X,对于每次出现,独立地是包含2′-O-甲基修饰的核苷酸;Y,对于每次出现,独立地是包含2'-脱氧-2′-氟修饰的核苷酸;Y,对于每次出现,独立地是包含2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0899] 在某些实施方案中,X选自由2'-脱氧-2'-氟修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。在一个实施方案中,X选自由2'-O-甲基修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。在一个实施方案中,Y选自由2'-脱氧-2'-氟修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。在一个实施方案中,Y选自由2'-O-甲基修饰的腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷组成的组。

[0900] 在某些实施方案中,式(V)的结构不包含错配。在一个实施方案中,式(V)的结构包含1个错配。在另一个实施方案中,式(V)化合物包含2个错配。在另一个实施方案中,式(V)化合物包含3个错配。在另一个实施方案中,式(V)化合物包含4个错配。

[0901] 可变连接子

[0902] 在式(I)化合物的一个实施方案中,L具有L1的结构:

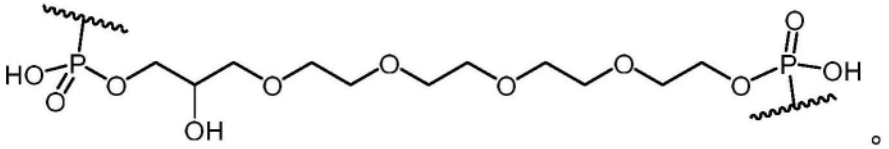
[0903] 

(L1)

[0904] 在L1的一个实施方案中,R是R^3并且n是2。

[0905] 在式(II)的结构的一个实施方案中,L具有L1的结构。在式(III)的结构的一个实施方案中,L具有L1的结构。在式(IV)的结构的一个实施方案中,L具有L1的结构。在式(V)的结构的一个实施方案中,L具有L1的结构。在式(VI)的结构的一个实施方案中,L具有L1的结构。在式(VI)的结构的一个实施方案中,L具有L1的结构。

[0906] 在式(I)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构:

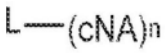
[0907] 

(L2)

[0908] 在L2的一个实施方案中,R是R3并且n是2。在式(II)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构。在式(III)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构。在式(IV)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构。在式(V)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构。在式(VI)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构。在式(VI)的结构的一个实施方案中,L具有L2的结构。

[0909] 递送系统

[0910] 在第三方面,本文提供了具有式(VI)结构的治疗性核酸的递送系统:



[0911]

(VI)

[0912] 其中L选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸盐、酯、酰胺、三唑及其组合,其中式(VI)任选进一步包含一个或多个分支点B,以及一个或多个间隔子S;其中B在每次出现时独立地是多价有机物质或其衍生物;S在每次出现时独立地选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸盐、膦酸盐、氨基磷酸酯、酯、酰胺、三唑及其组合;每个cNA独立地是包含一种或多种化学修饰的载体核酸;n是2、3、4、5、6、7或8。

[0913] 在递送系统的一个实施方案中,L是乙二醇链。在递送系统的另一个实施方案中,L是烷基链。在递送系统的另一个实施方案中,L是肽。在递送系统的另一个实施方案中,L是RNA。在递送系统的另一个实施方案中,L是DNA。在递送系统的另一个实施方案中,L是磷酸盐。在递送系统的另一个实施方案中,L是膦酸盐。在递送系统的另一个实施方案中,L是氨基磷酸酯。在递送系统的另一个实施方案中,L是酯。在递送系统的另一个实施方案中,L是酰胺。在递送系统的另一个实施方案中,L是三唑。

[0914] 在递送系统的一个实施方案中,S是乙二醇链。在另一个实施方案中,S是烷基链。在递送系统的另一个实施方案中,S是肽。在另一个实施方案中,S是RNA。在递送系统的另一个实施方案中,S是DNA。在递送系统的另一个实施方案中,S是磷酸盐。在递送系统的另一个实施方案中,S是膦酸盐。在递送系统的另一个实施方案中,S是氨基磷酸酯。在递送系统的另一个实施方案中,S是酯。在另一个实施方案中,S是酰胺。在另一个实施方案中,S是三唑。

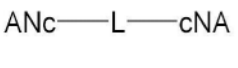
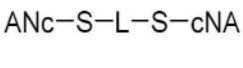
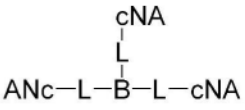
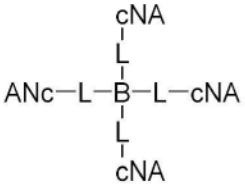
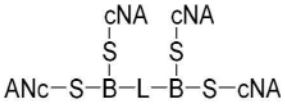
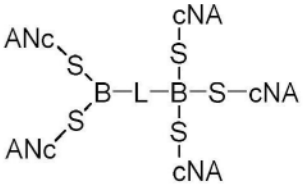
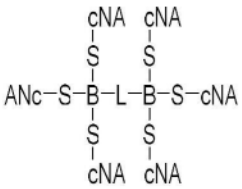
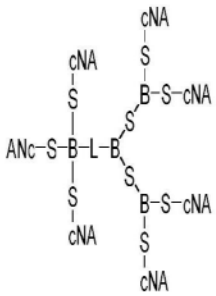
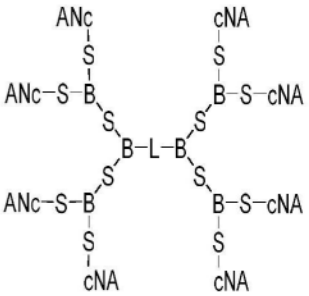
[0915] 在递送系统的一个实施方案中,n是2。在递送系统的另一个实施方案中,n是3。在递送系统的另一个实施方案中,n是4。在递送系统的另一个实施方案中,n是5。在递送系统的另一个实施方案中,n是6。在递送系统的另一个实施方案中,n是7。在递送系统的另一个实施方案中,n是8。

[0916] 在某些实施方案中,每个cNA包含>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或者>50%化学修饰的核苷酸。

[0917] 在一个实施方案中,式(VI)化合物具有选自表3的式(VI-1)-(VI-9)的结构:

[0918] 表3

[0919]

 (VI-1)	 (VI-2)	 (VI-3)
 (VI-4)	 (VI-5)	 (VI-6)
 (VI-7)	 (VI-8)	 (VI-9)

[0920] 在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-1)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-2)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-3)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-4)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-5)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-6)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-7)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-8)的结构。在一个实施方案中,式(VI)化合物具有式(VI-9)的结构。

[0921] 在一个实施方案中,式(VI)的化合物(包括例如式(VI-1)-(VI-9),每个cNA独立地包含至少15个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个cNA独立地由化学修饰的核苷酸组成。

[0922] 在一个实施方案中,递送系统进一步包含n个治疗性核酸(NA),其中每个NA包含与如在表4-6中所述的SEQ ID NO:1-13中任一个的SNCA核酸序列基本上互补的序列。在进一步的实施方案中,NA包括能够靶向选自由表6-8中列举的SEQ ID NO:14-28组成的组的SNCA核酸序列中的一个或多个的链。

[0923] 此外,每个NA都与至少一个cNA杂交。在一个实施方案中,递送系统由2个NA组成。在另一个实施方案中,递送系统由3个NA组成。在另一个实施方案中,递送系统由4个NA组成。在另一个实施方案中,递送系统由5个NA组成。在另一个实施方案中,递送系统由6个NA组成。在另一个实施方案中,递送系统由7个NA组成。在另一个实施方案中,递送系统由8个NA组成。

[0924] 在一个实施方案中,每个NA独立地包含至少15个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含15-25个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含15个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含16个连续核苷酸。在另一个实施方案中,每个NA独立地包含17个连续核苷酸。在另一个实施方案中,每个NA独立地包含18个连续核苷酸。在另一个实施方案中,每个NA独立地包含19个连续核苷酸。在另一个实施方案中,每个NA独立地包含20个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含21个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含22个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含23个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含24个连续核苷酸。在一个实施方案中,每个NA独立地包含25个连续核苷酸。

[0925] 在一个实施方案中,每个NA包含至少2个核苷酸的未配对突出端。在另一个实施方案中,每个NA包含至少3个核苷酸的未配对突出端。在另一个实施方案中,每个NA包含至少4个核苷酸的未配对突出端。在另一个实施方案中,每个NA包含至少5个核苷酸的未配对突出端。在另一个实施方案中,每个NA包含至少6个核苷酸的未配对突出端。在一个实施方案中,突出端的核苷酸通过硫代磷酸酯键连接。

[0926] 在一个实施方案中,每个NA独立地选自由以下组成的组:DNA、siRNA、miRNA拮抗剂、miRNA、间隙体、混合体或指导RNA。在一个实施方案中,每个NA独立地是DNA。在另一个实施方案中,每个NA独立地是siRNA。在另一个实施方案中,每个NA独立地是miRNA拮抗剂。在另一个实施方案中,每个NA独立地是miRNA。在另一个实施方案中,每个NA独立地是间隙体。在另一个实施方案中,每个NA独立地是混合体。在另一个实施方案中,每个NA独立地是指导RNA。在一个实施方案中,每个NA是相同的。在一个实施方案中,每个NA是不相同的。

[0927] 在一个实施方案中,进一步包含n个治疗性核酸(NA)的递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构。在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一步包含2个治疗性核酸(NA)。在另一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一步包含3个治疗性核酸(NA)。在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一步包含4个治疗性核酸(NA)。在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一

步包含5个治疗性核酸(NA)。在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一步包含6个治疗性核酸(NA)。在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一步包含7个治疗性核酸(NA)。在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及其在本文中描述的实施方案的结构,进一步包含8个治疗性核酸(NA)。

[0928] 在一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)的结构,进一步包含结构L1或L2的连接子,其中R是R^3并且n是2。在另一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)的结构,进一步包含结构L1的连接子其中R是R^3并且n是2。在另一个实施方案中,递送系统具有选自式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)的结构,进一步包含结构L2的连接子,其中R是R^3并且n是2。

[0929] 在递送系统的一个实施方案中,递送靶选自由以下组成的组:脑、肝、皮肤、肾、脾、胰腺、结肠、脂肪、肺、肌肉和胸腺。在一个实施方案中,递送的靶是大脑。在另一个实施方案中,递送的靶是大脑的纹状体。在另一个实施方案中,递送的靶是大脑的皮质。在另一个实施方案中,递送的靶是大脑的纹状体。在一个实施方案中,递送的靶是肝。在一个实施方案中,递送的靶是皮肤。在一个实施方案中,递送的靶是肾。在一个实施方案中,递送的靶是脾。在一个实施方案中,递送的靶是胰腺。在一个实施方案中,递送的靶是结肠。在一个实施方案中,递送的靶是脂肪。在一个实施方案中,递送的靶是肺。在一个实施方案中,递送的靶是肌肉。在一个实施方案中,递送的靶是胸腺。在一个实施方案中,递送的靶是脊髓。

[0930] 在某些实施方案中,本公开的化合物的特征在于以下特性:(1)两个或更多个分支寡核苷酸,例如,其中存在不相等数量的3'和5'末端;(2)基本上化学稳定的,例如,其中多于40%,最佳100%的寡核苷酸被化学修饰(例如,没有RNA并且任选地没有DNA);(3)含有至少3个硫代磷酸键的硫代磷酸单寡核苷酸。在某些实施方案中,硫代磷酸单寡核苷酸含有4-20个硫代磷酸键。

[0931] 应理解,本公开所描述的方法不限于本文公开的具体方法和实验条件,因为所述方法和条件可以变化。还将理解,本文所使用的术语仅是用于描述特定实施方案的目的,并且不意图具限制性。

[0932] 此外,除非另有说明,本文所述的实验使用本领域技术范围内的常规分子和细胞生物学和免疫学技术。这样的技术对于技术人员来说是众所周知的,并且在文献中有充分的解释。参见例如Ausubel等人编辑的Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,NY(1987-2008),包括所有增刊,MR Green和J.Sambrook的Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第四版)和Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,Chapter 14,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor(2013,第2版)。

[0933] 分支寡核苷酸,包括合成和使用方法,更详细地描述于WO2017/132669,其通过引用并入本文。

[0934] 引入核酸、载体和宿主细胞的方法

[0935] 本发明的RNA沉默剂可以直接引入细胞(例如神经细胞)中(即细胞内);或细胞外引入空腔、间质空间、生物体循环中、口服引入,或可通过将细胞或生物体浸入含有核酸的

溶液中而引入。血管或血管外循环、血液或淋巴系统以及脑脊液是可以引入核酸的部位。

[0936] 可以使用本领域已知的核酸递送方法引入本公开的RNA沉默剂，包括注射含有核酸的溶液、用被核酸覆盖的粒子轰击、将细胞或生物体浸泡在核酸溶液中，或在核酸存在下对细胞膜进行电穿孔。可以使用本领域已知的用于将核酸引入细胞的其他方法，例如脂质介导的载体转运、化学介导的转运和阳离子脂质体转染，例如磷酸钙等。可以将核酸与执行以下一种或多种活性的其他组分一起引入：增强细胞对核酸的吸收或以其他方式增加对靶基因的抑制。

[0937] 引入核酸的物理方法包括注射含有RNA的溶液，用被RNA覆盖的粒子轰击，将细胞或生物体浸泡在RNA溶液中，或在RNA存在下对细胞膜进行电穿孔。包装到病毒颗粒中的病毒构建体将实现将表达构建体有效引入细胞和转录由表达构建体编码的RNA。可以使用本领域已知的用于将核酸引入细胞的其他方法，例如脂质介导的载体转运、化学介导的转运例如磷酸钙等。因此，可以将RNA与执行以下一种或多种活性的成分一起引入：增强细胞对RNA的吸收、抑制单链退火、稳定单链或以其他方式增加对靶基因的抑制。

[0938] RNA可以直接引入细胞中(即细胞内)；或细胞外引入空腔、间质空间、生物体循环中、口服引入，或可通过将细胞或生物体浸入含有RNA的溶液中而引入。血管或血管外循环、血液或淋巴系统以及脑脊液是可以引入RNA的部位。

[0939] 具有靶基因的细胞可以来自种系或体细胞、全能或多能、分裂或非分裂、实质或上皮、永生化或转化等。细胞可以是干细胞或分化细胞。分化的细胞类型包括脂肪细胞、成纤维细胞、肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、神经元、神经胶质细胞、血细胞、巨核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、白细胞、粒细胞、角质形成细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、肝细胞和内分泌或外分泌腺细胞。

[0940] 根据特定的靶基因和递送的双链RNA材料的剂量，该过程可能会导致靶基因部分或完全丧失功能。至少在50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％或更多的靶细胞中减少或损失基因表达是示例性的。基因表达的抑制是指来自靶基因的蛋白质和/或mRNA产物水平的缺失(或可观察到的降低)。特异性是指抑制靶基因而不对细胞的其他基因产生明显影响的能力。抑制的后果可以通过检查细胞或生物体的外在特性(如下面的实施例中所示)或通过生化技术(例如RNA溶液杂交、核酸酶保护、Northern杂交、逆转录、使用微阵列的基因表达监测、抗体结合、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)、其他免疫测定和荧光激活细胞分选(FACS))来确认。

[0941] 对于细胞系或整个生物体中的RNA介导的抑制，基因表达可通过使用其蛋白质产物易于测定的报告基因或药物抗性基因方便地测定。此类报告基因包括乙酰羟酸合酶(AHAS)、碱性磷酸酶(AP)、β半乳糖苷酶(LacZ)、β葡萄糖醛酸酶(GUS)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白(GFP)、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素酶(Luc)、胭脂碱合酶(NOS)、章鱼碱合酶(OCS)及其衍生物。有多种任选择的标记物可赋予对氨苄青霉素、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林可霉素、甲氨蝶呤、膦丝菌素、嘌呤霉素和四环素的抗性。根据测定，基因表达量的定量允许人们与未根据本公开处理的细胞相比，确定大于10％、33％、50％、90％、95％或99％的抑制程度。较低剂量的注射材料和RNAi试剂给药后的较长时间可能会导致较小部分的细胞受到抑制(例如，至少10％、20％、50％、75％、90％或95％的靶细胞)。细胞中基因表达的量化可能在靶mRNA的积累或靶蛋白的翻译水平上显示

出相似的抑制量。例如，抑制效率可以通过评估细胞中基因产物的量来确定；mRNA可以用具有用于抑制性双链RNA的区域之外的核苷酸序列的杂交探针检测，或者翻译的多肽可以用针对该区域的多肽序列产生的抗体检测。

[0942] 可以以允许每个细胞递送至少一个拷贝的量引入RNA。更高剂量(例如，每个细胞至少5、10、100、500或1000个拷贝)的材料可以产生更有效的抑制作用；较低剂量也可能对特定应用有用。

[0943] 在一个示例性方面，测试本公开的RNAi试剂(例如靶向SNCA靶序列的siRNA)的功效，以确定其在细胞中，例如中枢神经系统中的细胞中特异性降解突变mRNA(例如SNCA mRNA和/或SNCA蛋白的产生)的能力。在某些实施方案中，中枢神经系统中的细胞包括但不限于神经元(例如纹状体或皮质神经元克隆系和/或原代神经元)、神经胶质细胞和星形胶质细胞。其他可容易转染的细胞也适用于基于细胞的验证分析，例如HeLa细胞或COS细胞。用人野生型或突变cDNA(例如，人野生型或突变SNCA cDNA)转染细胞。共转染标准siRNA、修饰的siRNA或能够从U环mRNA产生siRNA的载体。测量靶mRNA(例如，SNCA mRNA)和/或靶蛋白(例如，SNCA蛋白)的选择性减少。可以将靶mRNA或蛋白质的减少与不存在RNAi试剂或存在不靶向SNCA mRNA的RNAi试剂的情况下靶mRNA或蛋白质的水平进行比较。出于比较目的，可以分析外源引入的mRNA或蛋白质(或内源mRNA或蛋白质)。当使用已知对标准转染技术有一定抵抗力的神经元细胞时，可能需要通过被动吸收引入RNAi试剂(例如，siRNA)。

[0944] 重组腺相关病毒和载体

[0945] 在某些示例性实施方案中，重组腺相关病毒(rAAV)及其相关载体可用于将一种或多种siRNA递送到细胞例如神经细胞(例如脑细胞)中。AAV能够感染许多不同的细胞类型，尽管感染效率因血清型而异，而血清型由衣壳蛋白的序列决定。已经鉴定了几种天然AAV血清型，其中血清型1-9是最常用于重组AAV的。AAV-2是研究和发表最充分的血清型。AAV-DJ系统包括血清型AAV-DJ和AAV-DJ/8。这些血清型是通过多种AAV血清型的DNA改组产生的，以产生具有在各种细胞和组织中提高体外(AAV-DJ)和体内(AAV-DJ/8)转导效率的混合衣壳的AAV。

[0946] 在某些实施方案中，广泛的中枢神经系统(CNS)递送可以通过血管内递送重组腺相关病毒7(rAAV7)、RAAV9和rAAV10或其他合适的rAAV(Zhang等人(2011)Mol.Ther.19(8):1440-8.doi:10.1038/mt.2011.98.Epub 2011年5月24日)来实现。rAAVs及其相关载体在本领域中是众所周知的并且在美国专利申请2014/0296486、2010/0186103、2008/0269149、2006/0078542和2005/0220766中有所描述，出于所有目的，它们中的每一个都通过引用整体并入本文。

[0947] rAAV可以根据本领域已知的任何合适方法以组合物形式递送至受试者。rAAV可以悬浮在生理相容的载体中(即，在组合物中)，并且可以施用于受试者，即宿主动物，例如人、小鼠、大鼠、猫、狗、羊、兔、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡、非人类灵长类动物(例如猕猴)等。在某些实施方案中，宿主动物为非人宿主动物。

[0948] 可以将一种或多种rAAV递送至哺乳动物受试者，例如，通过肌内注射或通过施用到哺乳动物受试者的血流中。可以通过注射到静脉、动脉或任何其他血管导管中来施用到血流中。在某些实施方案中，一种或多种rAAV通过分离的肢体灌注被施用到血流中，这是外科领域中众所周知的技术，该方法基本上使技术人员能够在施用rAAV病毒粒子之前从体循

环中分离出肢体。描述于美国专利号6,177,403中的分离肢体灌注技术的一种变体也可以由技术人员用来将病毒粒子施用于分离肢体的脉管系统,以潜在地增强向肌肉细胞或组织的转导。此外,在某些情况下,可能需要将病毒粒子递送至受试者的中枢神经系统(CNS)。"CNS"是指脊椎动物的脑和脊髓的所有细胞和组织。因此,该术语包括但不限于神经元细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、脑脊液(CSF)、间质空间、骨、软骨等。重组AAV可通过使用本领域已知的神经外科技术,例如通过立体定向注射(参见例如Stein等人,J Virol 73:3424-3429,1999;Davidson等人,PNAS 97:3428-3432,2000;Davidson等人,Nat.Genet.3:219-223,1993;和Alisky和Davidson,Hum.Gene Ther.11:2315-2329,2000),用针、导管或相关装置,注射到例如脑室区域以及纹状体(例如,纹状体的尾状核或壳核)、脊髓和神经肌肉接头或小脑小叶,从而直接递送至CNS或大脑。

[0949] 本公开的组合物可以单独包含rAAV,或与一种或多种其他病毒组合(例如,具有一种或多种不同转基因的第二rAAV编码)。在某些实施方案中,组合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的rAAV,每种具有一种或更多种不同的转基因。

[0950] rAAV的有效量是足以靶向感染动物、靶向所需组织的量。在一些实施方案中,rAAV的有效量是足以产生稳定的体细胞转基因动物模型的量。有效量将主要取决于物种、年龄、体重、受试者的健康状况和要靶向的组织等因素,因此可能因动物和组织而异。例如,一种或多种rAAV的有效量通常在约1ml至约100ml的溶液范围内,该溶液含有约10^9至10^{16}个基因组拷贝。在某些情况下,大约10^{11}到10^{12}个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在某些实施方案中,10^{12}rAAV基因组拷贝对靶向心脏、肝脏和胰腺组织是有效的。在某些情况下,稳定的转基因动物是由多剂量的rAAV产生的。

[0951] 在一些实施方案中,配制rAAV组合物以减少组合物中AAV颗粒的聚集,特别是在存在高rAAV浓度的情况下(例如,约10^{13}基因组拷贝/mL或者更多)。用于减少rAAV聚集的方法在本领域中是众所周知的,并且包括例如添加表面活性剂、调节pH值、调节盐浓度等(参见例如Wright等人(2005)Molecular Therapy 12:171-178,其内容通过引用并入本文。)

[0952] "重组AAV(rAAV)载体"至少包含转基因及其调控序列,以及5'和3'AAV反向末端重复序列(ITR)。正是这种重组AAV载体被包装到衣壳蛋白中并被递送至选定的靶细胞。在一些实施方案中,转基因是与载体序列异源的核酸序列,其编码所关注的多肽、蛋白质、功能性RNA分子(例如,siRNA)或其他基因产物。核酸编码序列以允许转基因转录、翻译、和/或在靶组织的细胞中表达的方式可操作地连接至调控组分。

[0953] 载体的AAV序列通常包含顺式作用的5'和3'反向末端重复(ITR)序列(参见,例如,B.J.Carter,in"Handbook of Parvoviruses",P.Tijsser编辑,CRC Press,第155 168页(1990))。ITR序列的长度通常约为145个碱基对。在某些实施方案中,编码ITR的基本上完整的序列用于分子中,尽管允许对这些序列进行某种程度的微小修饰。修饰这些ITR序列的能力在本领域的技术范围内。(参见,例如,Sambrook等人,"Molecular Cloning.A Laboratory Manual",第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1989);和K.Fisher等人,J Virol.,70:520 532(1996))。本公开中使用的这种分子的一个实例是含有转基因的"顺式作用"质粒,其中选择的转基因序列和相关的调控元件侧接5'和3'AAV ITR序列。AAV ITR序列可获自任何已知的AAV,包括本文进一步描述的哺乳动物AAV类型。

[0954] VIII.治疗方法

[0955] 在一个方面，本公开提供了治疗处于(或易患)在脑中形成不溶性聚集体的风险中的受试者的预防性和治疗性方法，所述不溶性聚集体包含SNCA。在一个实施方案中，该疾病或病症使得中枢神经系统(CNS)中的SNCA水平被发现可预测神经变性进展。在另一个实施方案中，疾病或病症是以错误折叠的蛋白质聚集为特征的蛋白质病。在某个实施方案中，CNS中SNCA减少的疾病或病症减少在神经退行性疾病如阿尔茨海默病、帕金森病或亨廷顿病中所见的临床表现。

[0956] 如本文所用，“治疗(Treatment)”或“治疗(treating)”定义为向患者应用或施用治疗剂(例如，RNA剂或载体或编码它们的转基因)，或向来自患有疾病或病症、疾病或病症的症状或对疾病或病症的易感性的患者的分离组织或细胞系应用或施用治疗剂，目的是治愈、医治、减轻、缓解、改变、补救、改良、改善或影响疾病或病症、疾病或病症的症状或疾病倾向。

[0957] 在一个方面，本公开提供了一种用于通过向受试者施用治疗剂(例如，RNAi剂或载体或编码它们的转基因)，在受试者中预防如上所述的疾病或病症的方法。可以通过例如本文所述的任何诊断或预后测定或其组合来鉴定处于疾病风险中的受试者。预防剂的施用可以在疾病或病症的特征性症状表现之前发生，从而预防疾病或病症，或者延迟其进展。

[0958] 本公开的另一方面涉及治疗性地治疗受试者的方法，即改变疾病或病症的症状的发作。在一个示例性实施方案中，本公开的调节方法包括使表达SNCA的CNS细胞与对基因内的靶序列(例如，表4-6的SNCA靶序列)的治疗剂(如RNAi剂或载体或编码其的转基因)接触，从而实现对基因的序列特异性干扰。这些方法可以在体外进行(例如，通过用试剂培养细胞)，或者，在体内(例如，通过向受试者施用试剂)。

[0959] IX.药物组合物和施用方法

[0960] 本公开涉及上述试剂用于如下所述的预防性和/或治疗性治疗的用途。因此，本公开的调节剂(例如，RNAi剂)可以掺入适合施用的药物组合物中。此类组合物通常包含核酸分子、蛋白质、抗体或调节化合物和药学上可接受的载体。如本文所用，短语“药学上可接受的载体”是指可与医药施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。用于药学活性物质的此类介质和试剂的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，预期将其用于组合物中。补充性有效化合物也可并入组合物中。

[0961] 本公开的药物组合物被配制成与其预期的给药途径相容。给药途径的实例包括肠胃外给药，例如静脉内、皮内、皮下、腹膜内、肌肉内、口服(例如吸入)、经皮(局部)和经粘膜给药。在某些示例性实施方案中，本公开的药物组合物通过静脉内给药并且能够穿过血脑屏障进入中枢神经系统。在某些示例性实施方案中，本公开的药物组合物通过给药途径递送至脑脊液(CSF)，所述给药途径包括但不限于纹状体内(IS)给药、脑室内(ICV)给药和鞘内(IT)给药(例如，通过泵、输液等)。

[0962] 本公开的核酸分子可以插入表达构建体，例如病毒载体、逆转录病毒载体、表达盒或质粒病毒载体，例如使用本领域已知的方法，包括但不限于Xia等人(2002)，同上描述的那些。表达构建体可以通过例如吸入、口服、静脉内注射、局部给药(参见美国专利号5,328,470)或通过立体定向注射(参见例如Chen等人(1994)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91,3054-3057)递送至受试者。递送载体的药物制剂可以包括在可接受的稀释剂中的载体，或者可以

包括嵌入递送载体的缓释基质。或者，当完整的递送载体可以从重组细胞(例如逆转录病毒载体)完整地产生时，药物制剂可以包括一种或多种产生基因递送系统的细胞。

[0963] 本公开的核酸分子还可以包括小发夹RNA(shRNA)，以及工程化以表达shRNA的表达构建体。shRNA的转录起始于聚合酶III(Pol III)启动子，并被认为终止于4-5-胸腺嘧啶转录终止位点的第2位。表达后，shRNA被认为折叠成具有3'UU突出端的茎环结构；随后，这些shRNA的末端被加工，将shRNA转化为大约21个核苷酸的siRNA样分子。Brummelkamp等人(2002)，Science，296，550-553；Lee等人(2002)同上；Miyagishi和Taira(2002)，Nature Biotechnol.，20，497-500；Paddison等人(2002)，同上；Paul(2002)，同上；Sui(2002)同上；Yu等人(2002)，同上。

[0964] 表达构建体可为适用于适当表达系统的任何构建体，并且包括但不限于本领域已知的逆转录病毒载体、线性表达盒、质粒和病毒或病毒衍生的载体。此类表达构建体可包括一种或多种诱导型启动子、RNA Pol III启动子系统，例如U6 snRNA启动子或H1 RNA聚合酶III启动子，或本领域已知的其他启动子。构建体可以包括一条或两条siRNA链。表达两条链的表达构建体还可以包括连接两条链的环结构，或者每条链可以从同一构建体中的不同启动子分别转录。每条链也可以从单独的表达构建体转录，Tuschl(2002)，同上。

[0965] 在某些实施方案中，包含本公开的化合物的组合物可以通过多种途径递送至受试者的神经系统。示例性途径包括鞘内、实质(例如，在脑中)、鼻和眼递送。该组合物也可以全身递送，例如通过静脉内、皮下或肌肉内注射。一种递送途径是直接到大脑，例如大脑的脑室或下丘脑，或大脑的外侧或背侧区域。用于神经细胞递送的化合物可以掺入适合施用的药物组合物中。

[0966] 例如，组合物可以包括一种或多种本公开的化合物和药学上可接受的载体。本公开的药物组合物可以多种方式施用，这取决于是否需要局部或全身治疗以及取决于待治疗的区域。施用可以是局部(包括眼部、鼻内、透皮)、口服或肠胃外施用。肠胃外施用包括静脉滴注、皮下、腹膜内或肌肉内注射、鞘内或室内(例如，脑室内)施用。在某些示例性实施方案中，使用本文所述的多种合适的组合物和方法，将本公开的RNA沉默剂递送穿过血脑屏障(BBB)。

[0967] 递送途径可取决于患者的病症。例如，诊断患有神经退行性疾病的受试者可以将本公开的抗SNCA化合物直接施用到大脑中(例如，进入基底神经节的苍白球或纹状体中，并且在纹状体的中型多棘神经元附近)。除了本公开的化合物之外，可以向患者施用第二疗法，例如姑息疗法和/或疾病特异性治疗。二级疗法可以是例如对症治疗(例如，用于缓解症状)、神经保护性治疗(例如，用于减缓或停止疾病进展)或恢复性治疗(例如，用于逆转疾病过程)。其他疗法可以包括心理疗法、物理疗法、言语疗法、交流和记忆辅助、社会支持服务和饮食建议。

[0968] 本公开的化合物可以被递送至大脑的神经细胞。在某些实施方案中，本公开的化合物可被递送至大脑而无需直接施用至中枢神经系统，即化合物可经静脉内递送并穿过血脑屏障进入大脑。可以使用不需要组合物穿过血脑屏障的递送方法。例如，含有本公开化合物的药物组合物可以通过直接注射到含有受疾病影响的细胞的区域中而递送给患者。例如，药物组合物可以通过直接注射递送到大脑中。注射可以通过立体定向注射到大脑的特定区域(例如，黑质、皮质、海马、纹状体或苍白球)。该化合物可以被递送到中枢神经系统的

多个区域(例如,大脑的多个区域,和/或进入脊髓)。该化合物可以被递送到大脑的扩散区域(例如,向大脑皮层的扩散递送)。

[0969] 在一个实施方案中,化合物可以通过插管或其他递送装置递送,该递送装置的一端植入组织,例如脑,例如脑的黑质、皮质、海马、纹状体或苍白球。插管可以连接到含有化合物的储存器。流动或递送可以由泵(例如渗透泵或微型泵,例如Alzet泵(Durect,Cupertino,CA))介导。在一个实施方案中,将泵和储存器植入远离组织的区域,例如在腹部,并且通过从泵或储存器通向释放部位的导管实现递送。用于输送到大脑的装置例如在美国专利号6,093,180和5,814,014中有所描述。

[0970] 对于本领域的技术人员来说,在不脱离本文所公开的实施方案的范围的情况下,可以使用合适的等效物对本文所述的方法进行其他合适的修改和调适,这将是显而易见的。现已详细描述某些实施方案,通过参考以下实施例将使实施方案得到更清楚的理解,所述实施例包括在本文中只是为了说明目的而不旨在限制本发明。

[0971] 实施例

[0972] 实施例1.SNCA靶向序列的体外鉴定

[0973] SNCA基因被用作mRNA敲低的靶标。开发了一组靶向人和小鼠SNCA mRNA几个不同序列的siRNA,并在体外在SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中进行筛选,并与未经处理的对照细胞进行比较。SiRNA经设计靶向开放阅读框(ORF)和3'非翻译区(3'UTR)。siRNA均以1.5μM的浓度进行测试,并在72小时的时间点用QuantiGene基因表达测定(ThermoFisher,Waltham,MA)评价mRNA。图1报告了针对人SNCA mRNA的筛选结果并且图2报告了在SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中筛选人和小鼠靶向siRNA的结果。

[0974] 下面的表4和表6列举了人类SNCA靶序列,这些序列相对于%未经处理的对照,表明SNCA mRNA表达减少。下面的表5列举了跨物种和小鼠SNCA靶序列,这些序列相对于%未经处理的对照,表明SNCA mRNA表达减少。在人和小鼠SNCA mRNA中都发现了跨物种靶标,并且可能在体内比较研究中有用。总体而言,在测试的一组siRNA靶位点中,确定了相对于%未处理的对照产生SNCA mRNA的有力和有效沉默的13个(表4-6)。下面的表7和表8列举了导致SNCA mRNA有力和有效沉默的13种siRNA的反义链和有义链。反义链包含5'尿嘧啶以增强负载到RISC中。在某些情况下,SNCA靶标中相应的互补腺苷不存在,导致反义链和靶标之间的5'错配。如图1、图2和图4数据所示,这不会对沉默功效产生负面影响。此外,一些反义链包含与SNCA靶标的3'末端错配,以进一步增强RISC负载,这也不会对沉默功效产生负面影响。下面的表8列举了另外的反义链和有义链。图4总结了对具有三种不同支架的所评价的每个siRNA获得的结果(参见图3中各种化学支架的图示):P3平支架(图4A)、P3不对称支架(图4B)和富含2'-O-甲基(OM)e的不对称支架(图4C)。表9列出了在其他实施方案中列举的SNCA mRNA序列。表10列出了通过计算机筛选鉴定的SNCA靶标,这些靶标是开发新型siRNA的候选物。

[0975] 表4-人SNCA mRNA靶序列

[0976]

序列 ID	45 聚体_基因_区域
SNCA_919	GTGTGCTGTGGATTTTGTGGCTTCAATCTACGATGTTAAAACAAA (SEQ ID NO: 1)
SNCA_1133	AATACTTAAAAATATGTGAGCATGAAACTATGCACCTATAAATAC (SEQ ID NO: 2)
SNCA_258	GTGTAAAGGAATTCATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTT (SEQ ID NO: 3)
SNCA_1054	TATATTATAAGATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGA (SEQ ID NO: 4)

[0977] 表5-跨物种和小鼠SNCA mRNA靶序列.

[0978]

序列 ID	45 聚体_基因_区域
SNCA_270	TCATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAG (SEQ ID NO: 5)
SNCA_753	TGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCTCA (SEQ ID NO: 6)
SNCA_963	ATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACT (SEQ ID NO: 7)
SNCA_1094	TAAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACT (SEQ ID NO: 8)

[0979] 表6-SNCA mRNA序列-另外的实施方案

[0980]

序列 ID	45 聚体基因区域
SNCA_680	AGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTC (SEQ ID NO: 9)
SNCA_732	CTGCTGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGT (SEQ ID NO: 10)
SNCA_783	TCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCC (SEQ ID NO: 11)
SNCA_1014	TTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATATAT (SEQ ID NO: 12)
SNCA_1064	GATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGT (SEQ ID NO: 13)

[0981] 表7-图1和图2的筛选中使用的SNCA反义和有义链siRNA序列.

[0982]

序列 ID	反义序列 (5'-3')	有义序列 (5'-3')
SNCA_919	UAUCGUAGAUUGAAGCCACA(SEQ ID NO: 29)	CUUCAAUCUACGAUA(SEQ ID NO: 14)
SNCA_1133*	UUGCAUAGUUUCAUGCUCAC(SEQ ID NO: 30)	CAUGAAACUAUGCAA(SEQ ID NO: 15)
SNCA_1133_ms	UUGCAUAGUCUCAUGCUCAC(SEQ ID NO: 31)	CAUGAGACUAUGCAA (SEQ ID NO: 16)
SNCA_258*	UUGAAUACAUCCAUGGCUAA(SEQ ID NO: 32)	CAUGGAUGUAUUCAA(SEQ ID NO: 17)
SNCA_258_ms	UUGAACACAUCCAUGGCUAA(SEQ ID NO: 33)	CAUGGAUGUGUUCAA(SEQ ID NO: 18)
SNCA_1054	UAUCAUUAAAAGACACCUAA(SEQ ID NO: 34)	UGUCUUUUAAUGAUA(SEQ ID NO: 19)
SNCA_270	GAAAGUCCUUUCAUGAAUAC(SEQ ID NO: 35)	CAUGAAAGGACUUUC(SEQ ID NO: 20)
SNCA_753	CAUGACUGGGCACAUUGGAA(SEQ ID NO: 36)	AUGUGCCCAGUCAUG(SEQ ID NO: 21)
SNCA_963	UAGAAAUAAGUGGUAGUCAC(SEQ ID NO: 37)	UACCACUUAUUUCUA(SEQ ID NO: 22)
SNCA_1094	AUAUUAACAAAUUUCACAAU(SEQ ID NO: 38)	GAAAUUUGUUAAUAU(SEQ ID NO: 23)

[0983] *与小鼠miRNA具有95%同源性

[0984] 表8-图4的筛选中使用的SNCA反义和有义链siRNA序列.

[0985]

序列 ID	反义序列 (5'-3')	有义序列(不对称) (5'-3')
SNCA_680	UCAAAGAUAUUUCUUAGGCU(SEQ ID NO: 39)	AGCCUAAGAAAUAUCUUUGA(SEQ ID NO: 24)
SNCA_732	UGAGCACUUGUACAGGAUGG(SEQ ID NO: 40)	CCAUCCUGUACAAGUGCUCA(SEQ ID NO: 25)
SNCA_783	UAGAUACACUGUAAAAACUU(SEQ ID NO: 41)	AAGUUUUUACAGUGUAUCUA(SEQ ID NO: 26)
SNCA_1014	UCAAAUCACUAACAACUUCU(SEQ ID NO: 42)	AGAAGUUGUUAGUGAUUUGA(SEQ ID NO: 27)
SNCA_1064	UCUUAGACAGUAUCAUUAAA(SEQ ID NO: 43)	UUUAAUGAUACUGUCUAAGA(SEQ ID NO: 28)

[0986] 表9-SNCA mRNA序列-另外的实施方案

[0987]

序 列 ID	位置	45 聚体_基因_区域	靶序列
SNCA_252	5UTR_ORF	AGTGTGGTGTAAAGGAATTCATTAGCCATGGATGTATTCATGAAA (SEQ ID NO: 44)	AAUUCAUUAGCCAUGGAUGU (SEQ ID NO: 101)
SNCA_315	ORF	GAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCA (SEQ ID NO: 45)	GCUGCUGAGAAAACCAAACA (SEQ ID NO: 102)
SNCA_376	ORF	CAAAAGAGGGTGTTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAG (SEQ ID NO: 46)	UCUAUGUAGGCUCCAAAACC (SEQ ID NO: 103)
SNCA_447	ORF	GAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTG (SEQ ID NO: 47)	CAAGUGACAAAUGUUGGAGG (SEQ ID NO: 104)
SNCA_557	ORF	CTTTGTCAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCC (SEQ ID NO: 48)	CCAGUUGGGCAAGAAUGAAG (SEQ ID NO: 105)
SNC	ORF	CTGTGGATCCTGACAATGAGGC	AUGAGGCUU

[0988]

A_628		TTATGAAATGCCTTCTGAGGAAG (SEQ ID NO: 49)	AUGAAAUGCCU (SEQ ID NO: 106)
SNCA_680	ORF	AGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTC (SEQ ID NO: 9)	AGCCUAAGAAAUAUCUUUGC (SEQ ID NO: 107)
SNCA_732	3UTR	CTGCTGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGT (SEQ ID NO: 10)	CCAUCCUGUACAAGUGCUCA (SEQ ID NO: 108)
SNCA_783	3UTR	TCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCC (SEQ ID NO: 11)	AAGUUUUUACAGUGUAUCUC (SEQ ID NO: 109)
SNCA_852	3UTR	ACCTGCCCCCACTCAGCATTTCGGTGCTTCCCTTTCACTGAAGTG (SEQ ID NO: 50)	GCAUUUCGGUGCUUCCCUUU (SEQ ID NO: 110)
SNCA_903	3UTR	TGGTAGCAGGGTCTTTGTGTGCTGTGGATTTTGTGGCTTCAATCT (SEQ ID NO: 51)	UGUGUGCUGUGGAUUUUGUG (SEQ ID NO:111)
SNCA_958	3UTR	AACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCC (SEQ ID NO: 52)	CCUAAGUGACUACCACUUAU (SEQ ID NO: 112)
SNCA_1014	3UTR	TTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATATAT (SEQ ID NO: 12)	AGAAGUUGUUAGUGAUUUGC (SEQ ID NO: 113)
SNCA_1064	3UTR	GATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGT (SEQ ID NO: 13)	UUUAAUGAUACUGUCUAAGA (SEQ ID NO: 114)
SNCA_1171	3UTR	TAAATACTAAATATGAAATTTTACCATTTTGCGATGTGTTTTATT (SEQ ID NO: 53)	AAAUUUUACCAUUUUGCGAU (SEQ ID NO: 115)
SNCA_1227	3UTR	GTATATAAATGGTGAGAATTAAAATAAAACGTTATCTCATTGCAA (SEQ ID NO: 54)	GAAUUAAAAUAAAACGUUAU (SEQ ID

[0989]

			NO: 116)
SNCA_1287	3UTR	ATCCCATCTCACTTTAATAATAAAAATCATGCTTATAAGCAACAT (SEQ ID NO: 55)	AAUAAUAAAAAUCAUGCUUA (SEQ ID NO: 117)
SNCA_1339	3UTR	GAACTGACACAAAGGACAAAAATATAAAGTTATTAATAGCCATTT (SEQ ID NO: 56)	ACAAAAAUAUAAAGUUAUUA (SEQ ID NO: 118)
SNCA_1397	3UTR	TTTTAGAAGAGGTAGAGAAAATGGAACATTAACCCTACACTCGGA (SEQ ID NO: 57)	AGAAAAUGGAACAUUAACCC (SEQ ID NO: 119)
SNCA_1450	3UTR	AAGCAACACTGCCAGAAGTGTGTTTTGGTATGCACTGGTTCCTTA (SEQ ID NO: 58)	AAGUGUGUUUUGGUAUGCAC (SEQ ID NO: 120)
SNCA_1531	3UTR	AGACCCCAACTACTATTGTAGAGTGGTCTATTTCTCCCTTCAATC (SEQ ID NO: 59)	UUGUAGAGUGGUCUAUUUCU (SEQ ID NO: 121)
SNCA_1602	3UTR	GGGGAACTGTTGTTTGATGTGTATGTGTTTATAATTGTTATACAT (SEQ ID NO: 60)	GAUGUGUAUGUGUUUAUAAU (SEQ ID NO: 122)
SNCA_1657	3UTR	GCCTTTTATTAACATATATTGTTATTTTTGTCTCGAAATAATTTT (SEQ ID NO: 61)	AUAUUGUUAUUUUUGUCUCG (SEQ ID NO: 123)
SNCA_1733	3UTR	GTGAATGCTGTACCTTTCTGACAATAAATAATATTCGACCATGAA (SEQ ID NO: 62)	UUCUGACAAUAAAUAAUAUU (SEQ ID NO: 124)
SNCA_1749	3UTR	TCTGACAATAAATAATATTCGACCATGAATAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 63)	UAUUCGACCAUGAAUAAAAA (SEQ ID NO: 125)
SNCA_1769	3UTR	GACCATGAATAAAAAAAAAAAAAAGTGGGTTCCCGGGAACTAAG (SEQ ID NO: 64)	AAAAAAAAAAGUGGGUUCCC (SEQ ID NO: 126)
SNC	3UT	GATTTTGACTACACCCTCCTTAG	CUCCUUAGA

[0990]

A_1827	R	AGAGCCATAAGACACATTAGCA (SEQ ID NO: 65)	GAGCCAUAAGA (SEQ ID NO: 127)
SNCA_1878	3UTR	AGCACATTCAAGGCTCTGAGAGAATGTGGTTAACTTTGTTTAACT (SEQ ID NO: 66)	CUGAGAGAAUGUGGUUAACU (SEQ ID NO: 128)
SNCA_1957	3UTR	AATTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTTCTCTCGCTCTCTTTTTTTT (SEQ ID NO: 67)	UCUCUCUUUUUCUCUCGCUC (SEQ ID NO: 129)
SNCA_2033	3UTR	GTTGGAACTACCAGAGTCACCTTAAAGGAGATCAATTCTCTAGAC (SEQ ID NO: 68)	GUCACCUUAAAGGAGAUCAA (SEQ ID NO: 130)
SNCA_2083	3UTR	AAAATTTCATGGCCTCCTTTAAATGTTGCCAAATATATGAATTCT (SEQ ID NO: 69)	CCUUUAAAUGUUGCCAAAUA (SEQ ID NO: 131)
SNCA_2134	3UTR	TTTCCTTAGGAAAGGTTTTTCTCTTTCAGGGAAGATCTATTAACT (SEQ ID NO: 70)	UUUUUCUCUUUCAGGGAAGA (SEQ ID NO: 132)
SNCA_2168	3UTR	ATCTATTAACTCCCCATGGGTGCTGAAAATAAACTTGATGGTGAA (SEQ ID NO: 71)	AUGGGUGCUGAAAAUAAACU (SEQ ID NO: 133)
SNCA_2277	3UTR	CATTTCTAAAAGTCACTAGTAGAAAGTATAATTTCAAGACAGAAT (SEQ ID NO: 72)	CUAGUAGAAAGUAUAAUUUC (SEQ ID NO: 134)
SNCA_2329	3UTR	ACATGCTAGCAGTTTATATGTATTCATGAGTAATGTGATATATAT (SEQ ID NO: 73)	AUAUGUAUUCAUGAGUAAUG (SEQ ID NO: 135)
SNCA_2396	3UTR	GAGGAATGAGTGACTATAAGGATGGTTACCATAGAAACTTCCTTT (SEQ ID NO: 74)	AUAAGGAUGGUUACCAUAGA (SEQ ID NO: 136)
SNCA_2448	3UTR	AATTGAAGAGAGACTACTACAGAGTGCTAAGCTGCATGTGTCATC (SEQ ID NO: 75)	ACUACAGAGUGCUAAGCUGC (SEQ ID

[0991]

			NO: 137)
SNCA_2503	3UTR	GAGAAATGGTAAGTTTCTTGTTTTATTTAAGTTATGTTTAAGCAA (SEQ ID NO: 76)	UCUUGUUUUAUUUAAGUUAU (SEQ ID NO: 138)
SNCA_2556	3UTR	TTTGTTATTGAACAGTATATTTCAGGAAGGTTAGAAAGTGGCGGT (SEQ ID NO: 77)	UAUAUUUCAGGAAGGUUAGA (SEQ ID NO: 139)
SNCA_2610	3UTR	TTTTAAATCTACCTAAAGCAGCATATTTTAAAAATTTAAAAGTAT (SEQ ID NO: 78)	AAGCAGCAUAUUUUAAAAAU (SEQ ID NO: 140)
SNCA_2726	3UTR	AAGTTGTGACCATGAATTTAAGGATTTATGTGGATACAAATTCTC (SEQ ID NO: 79)	AUUUAAGGAUUUAUGUGGAU (SEQ ID NO: 141)
SNCA_2777	3UTR	AGTGTTTCTTCCCTTAATATTTATCTGACGGTAATTTTTGAGCAG (SEQ ID NO: 80)	AAUAUUUAUCUGACGGUAAU (SEQ ID NO: 142)
SNCA_2828	3UTR	ACTTTATATATCTTAATAGTTTATTTGGGACCAAACACTTAAACA (SEQ ID NO: 81)	AUAGUUUAUUUGGGACCAAA (SEQ ID NO: 143)
SNCA_2879	3UTR	TCTTTAAGTCATATAAGCCTTTTCAGGAAGCTTGTCTCATATTCA (SEQ ID NO: 82)	AGCCUUUUCAGGAAGCUUGU (SEQ ID NO: 144)
SNCA_2941	3UTR	TGCCAAGTGGCCTGAGGATCAATCCAGTCCTAGGTTTATTTTGCA (SEQ ID NO: 83)	GGAUCAAUCCAGUCCUAGGU (SEQ ID NO: 145)
SNCA_2992	3UTR	CATTCTCCCAAGTTATTCAGCCTCATATGACTCCACGGTCGGCTT (SEQ ID NO: 84)	UUCAGCCUCAUAUGACUCCA (SEQ ID NO: 146)
SNCA_3046	3UTR	AGTTCAGAGTGCACTTTGGCACACAATTGGGAACAGAACAATCTA (SEQ ID NO: 85)	UUGGCACACAAUUGGGAACA (SEQ ID NO: 147)
SNC	3UT	CTTTCTGGCTTATCCAGTATGTA	AGUAUGUAG

[0992]

A_3168	R	GCTATTTGTGACATAATAAATA (SEQ ID NO: 86)	CUAUUUGUGAC (SEQ ID NO: 148)
SNCA_258	5UTR_ORF	GTGTAAAGGAATTCATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTT (SEQ ID NO: 3)	UUAGCCAUGGAUGUAUUCAU (SEQ ID NO: 149)
SNCA_270	ORF	TCATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAG (SEQ ID NO: 5)	GUAUUCAUGAAAGGACUUUC (SEQ ID NO: 150)
SNCA_443	ORF	GGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGT (SEQ ID NO: 87)	AGAGCAAGUGACAAAUGUUG (SEQ ID NO: 151)
SNCA_753	3UTR	TGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCTCA (SEQ ID NO: 6)	UUCCAAUGUGCCCAGUCAUG (SEQ ID NO: 152)
SNCA_919	3UTR	GTGTGCTGTGGATTTTGTGGCTTCAATCTACGATGTTAAAACAAA (SEQ ID NO: 1)	UGUGGCUUCAAUCUACGAUG (SEQ ID NO: 153)
SNCA_959	3UTR	ACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCT (SEQ ID NO: 88)	CUAAGUGACUACCACUUAUU (SEQ ID NO: 154)
SNCA_960	3UTR	CAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTC (SEQ ID NO: 89)	UAAGUGACUACCACUUAUUU (SEQ ID NO: 155)
SNCA_963	3UTR	ATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACT (SEQ ID NO: 7)	GUGACUACCACUUAUUUCUA (SEQ ID NO: 156)
SNCA_1054	3UTR	TATATTATAAGATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGA (SEQ ID NO: 4)	UUAGGUGUCUUUUAAUGAUA (SEQ ID NO: 157)
SNCA_1094	3UTR	TAAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACT (SEQ ID NO: 8)	AUUGUGAAAUUUGUUAAUAU (SEQ ID

[0993]

			NO: 158)
SNCA_1095	3UTR	AAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTT (SEQ ID NO: 90)	UUGUGAAAUUUGUUAAUAUA (SEQ ID NO: 159)
SNCA_1096	3UTR	AGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTTA (SEQ ID NO: 91)	UGUGAAAUUUGUUAAUAUAU (SEQ ID NO: 160)
SNCA_1098	3UTR	AATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTTAAA (SEQ ID NO: 92)	UGAAAUUUGUUAAUAUAUAU (SEQ ID NO: 161)
SNCA_1133	3UTR	AATACTTAAAAATATGTGAGCATGAAACTATGCACCTATAAATAC (SEQ ID NO: 2)	GUGAGCAUGAAACUAUGCAC (SEQ ID NO: 162)
SNCA_1175	3UTR	TACTAAATATGAAATTTTACCATTTTGCGATGTGTTTTATTCACT (SEQ ID NO: 93)	UUUACCAUUUUGCGAUGUGU (SEQ ID NO: 163)
SNCA_1206	3UTR	GTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTAAAA (SEQ ID NO: 94)	GUGUUUGUAUAUAAAUGGUG (SEQ ID NO: 164)
SNCA_1207	3UTR	TGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTAAAAT (SEQ ID NO: 95)	UGUUUGUAUAUAAAUGGUGA (SEQ ID NO: 165)
SNCA_1367	3UTR	GTTATTAATAGCCATTTGAAGAAGGAGGAATTTTAGAAGAGGTAG (SEQ ID NO: 96)	UUGAAGAAGGAGGAAUUUUA (SEQ ID NO: 166)
SNCA_2094	3UTR	GCCTCCTTTAAATGTTGCCAAATATATGAATTCTAGGATTTTTCC (SEQ ID NO: 97)	UGCCAAAUAUAUGAAUUCUA (SEQ ID NO: 167)
SNCA_2407	3UTR	GACTATAAGGATGGTTACCATAGAAACTTCCTTTTTTACCTAATT (SEQ ID NO: 98)	UACCAUAGAAACUUCCUUUU (SEQ ID NO: 168)
SNC	3UT	GCATATTTTAAAAATTTAAAAG	UUAAAAGUA

[0994]

A_2630	R	TATTGGTATTAAATTAAGAAATA (SEQ ID NO: 99)	UUGGUAUUAAAA (SEQ ID NO: 169)
SNCA_2700	3UTR	TGACCTAGAACAATTTGAGATTAGGAAAGTTGTGACCATGAATTT (SEQ ID NO: 100)	UGAGAUUAGGAAAGUUGUGA (SEQ ID NO: 170)

[0995] 表9-续-SNCA反义和有义序列-另外的实施方案

[0996]

序列 ID	反义序列	有义序列(20 个核苷酸)	P3 不对称_靶标_mRNA_表达(%相对于对照)	P5_不对称_靶标_mRNA_表达(%相对于对照)
SNCA_252	UCAUCCAUGGCUAAUGAAUU (SEQ ID NO: 230)	AAUUCAUUAGCCAUGGAUGA (SEQ ID NO: 171)	80	
SNCA_315	UGUUUGGUUUUCUCAGCAGC (SEQ ID NO: 231)	GCUGCUGAGAAAACCAAACA (SEQ ID NO: 172)	78	
SNCA_376	UGUUUUGGAGCCUACAUAGA (SEQ ID NO: 232)	UCUAUGUAGGCUCCAAAACA (SEQ ID NO: 173)	85	
SNCA_447	UCUCCAACAUUUGUCACUUG (SEQ ID NO: 233)	CAAGUGACAAAUGUUGGAGA (SEQ ID NO: 174)	63	
SNCA_557	UUUCAUUCUUGCCCAACUGG (SEQ ID NO: 234)	CCAGUUGGGCAAGAAUGAAA (SEQ ID NO: 175)	78	
SNCA_628	UGGCAUUUCAUAAGCCUCAU (SEQ ID NO: 235)	AUGAGGCUUAUGAAAUGCCA (SEQ ID NO: 176)	100	
SNCA_680	UCAAAGAUAUUUCUUAGG	AGCCUAAGAAAUAUCUUUGA	31	

[0997]

	CU (SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 24)		
SNCA_732	UGAGCACUUGUACAGGAUGG (SEQ ID NO: 40)	CCAUCCUGUACAAGUGCUCA (SEQ ID NO: 25)	19	
SNCA_783	UAGAUACACUGUAAAAACUU (SEQ ID NO: 41)	AAGUUUUUACAGUGUAUCUA (SEQ ID NO: 26)	15	
SNCA_852	UAAGGGAAGCACCGAAAUGC (SEQ ID NO: 236)	GCAUUUCGGUGCUUCCCUUA (SEQ ID NO: 177)	58	
SNCA_903	UACAAAAUCCACAGCACACA (SEQ ID NO: 237)	UGUGUGCUGUGGAUUUUGUA (SEQ ID NO: 178)	41	
SNCA_958	UUAAGUGGUAGUCACUUAGG (SEQ ID NO: 238)	CCUAAGUGACUACCACUUAA (SEQ ID NO: 179)	89	
SNCA_1014	UCAAAUCACUAACAACUUCU (SEQ ID NO: 42)	AGAAGUUGUUAGUGAUUUGA (SEQ ID NO: 27)	20	
SNCA_1064	UCUUAGACAGUAUCAUUAAA (SEQ ID NO: 43)	UUUAAUGAUACUGUCUAAGA (SEQ ID NO: 28)	32	
SNCA_1171	UUCGCAAAAUGGUAAAAUUU (SEQ ID NO: 239)	AAAUUUUACCAUUUUGCGAA (SEQ ID NO: 180)	90	
SNCA_1227	UUAACGUUUUAUUUUAAUUC (SEQ ID NO: 240)	GAAUUAAAAUAAAACGUUAA (SEQ ID NO: 181)	72	
SNCA_1287	UAAGCAUGAUUUUUAUUAUU (SEQ ID NO: 241)	AAUAAUAAAAAUCAUGCUUA (SEQ ID NO: 182)	87	

[0998]

SNCA_1339	UAAUAACUUUAUAUUUUUGU (SEQ ID NO: 242)	ACAAAAAUAUAAAGUUAUUA (SEQ ID NO: 183)		
SNCA_1397	UGGUUAAUGUUCCAUUUUCU (SEQ ID NO: 243)	AGAAAAUGGAACAUUAACCA (SEQ ID NO: 184)	86	
SNCA_1450	UUGCAUACCAAAACACACUU (SEQ ID NO: 244)	AAGUGUGUUUUGGUAUGCAA (SEQ ID NO: 185)	79	
SNCA_1531	UGAAAUAGACCACUCUACAA (SEQ ID NO: 245)	UUGUAGAGUGGUCUAUUUCA (SEQ ID NO: 186)	73	
SNCA_1602	UUUAUAAACACAUACACAUC (SEQ ID NO: 246)	GAUGUGUAUGUGUUUAUAAA (SEQ ID NO: 187)	82	
SNCA_1657	UGAGACAAAAAUAACAAUAU (SEQ ID NO: 247)	AUAUUGUUAUUUUUGUCUCA (SEQ ID NO:188)	93	
SNCA_1733	UAUAUUAUUUAUUGUCAGAA (SEQ ID NO: 248)	UUCUGACAAUAAAUAAUAUA (SEQ ID NO: 189)		
SNCA_1749	UUUUUAUUCAUGGUCGAAUA (SEQ ID NO: 249)	UAUUCGACCAUGAAUAAAAA (SEQ ID NO:190)	102	
SNCA_1769	UGGAACCCACUUUUUUUUUU (SEQ ID NO: 250)	AAAAAAAAAAGUGGGUUCCA (SEQ ID NO: 191)	100	
SNCA_1827	UCUUAUGGCUCUCUAAGGAG (SEQ ID NO: 251)	CUCCUUAGAGAGCCAUAAGA (SEQ ID NO: 192)	88	
SNCA_1878	UGUUAACCACAUUCUCUC	CUGAGAGAAUGUGGUUAACA	105	

[0999]

	AG (SEQ ID NO: 252)	(SEQ ID NO: 193)		
SNCA_1957	UAGCGAGAGAAAAAGAGAGA (SEQ ID NO: 253)	UCUCUCUUUUUCUCUCGCUA (SEQ ID NO: 194)	111	
SNCA_2033	UUGAUCUCCUUUAAGGUGAC (SEQ ID NO: 254)	GUCACCUUAAAGGAGAUCAA (SEQ ID NO: 195)	113	
SNCA_2083	UAUUUGGCAACAUUUAAAGG (SEQ ID NO: 255)	CCUUUAAAUGUUGCCAAAUA (SEQ ID NO: 196)	88	
SNCA_2134	UCUUCCCUGAAAGAGAAAAA (SEQ ID NO: 256)	UUUUUCUCUUUCAGGGAAGA (SEQ ID NO: 197)	96	
SNCA_2168	UGUUUAUUUUCAGCACCCAU (SEQ ID NO: 257)	AUGGGUGCUGAAAAUAAACA (SEQ ID NO: 198)	100	
SNCA_2277	UAAAUUAUACUUUCUACUAG (SEQ ID NO: 258)	CUAGUAGAAAGUAUAAUUUA (SEQ ID NO: 199)	79	
SNCA_2329	UAUUACUCAUGAAUACAUAU (SEQ ID NO: 259)	AUAUGUAUUCAUGAGUAAUA (SEQ ID NO: 200)	88	
SNCA_2396	UCUAUGGUAACCAUCCUUAU (SEQ ID NO: 260)	AUAAGGAUGGUUACCAUAGA (SEQ ID NO: 201)	105	
SNCA_2448	UCAGCUUAGCACUCUGUAGU (SEQ ID NO: 261)	ACUACAGAGUGCUAAGCUGA (SEQ ID NO: 202)	93	
SNCA_2503	UUAACUUAAAUAAAACAAGA (SEQ ID NO: 262)	UCUUGUUUUAUUUAAGUUAA (SEQ ID NO: 203)		

[1000]

SNCA_2556	UCUAACCUUCCUGAAAUAUA (SEQ ID NO: 263)	UAUAUUUCAGGAAGGUUAGA (SEQ ID NO:204)	77	
SNCA_2610	UUUUUUAAAAUAUGCUGCUU (SEQ ID NO: 264)	AAGCAGCAUAUUUUAAAAAA (SEQ ID NO: 205)		
SNCA_2726	UUCCACAUAAAUCCUUAAAU (SEQ ID NO: 265)	AUUUAAGGAUUUAUGUGGAA (SEQ ID NO: 206)	125	
SNCA_2777	UUUACCGUCAGAUAAAUAUU (SEQ ID NO: 266)	AAUAUUUAUCUGACGGUAAA (SEQ ID NO: 207)	96	
SNCA_2828	UUUGGUCCCAAAUAAACUAU (SEQ ID NO: 267)	AUAGUUUAUUUGGGACCAAA (SEQ ID NO: 208)	145	
SNCA_2879	UCAAGCUUCCUGAAAAGGCU (SEQ ID NO: 268)	AGCCUUUUCAGGAAGCUUGA (SEQ ID NO: 209)	110	
SNCA_2941	UCCUAGGACUGGAUUGAUCC (SEQ ID NO: 269)	GGAUCAAUCCAGUCCUAGGA (SEQ ID NO: 210)	136	
SNCA_2992	UGGAGUCAUAUGAGGCUGAA (SEQ ID NO: 270)	UUCAGCCUCAUAUGACUCCA (SEQ ID NO: 211)	117	
SNCA_3046	UGUUCCCAAUUGUGUGCCAA (SEQ ID NO: 271)	UUGGCACACAAUUGGGAACA (SEQ ID NO: 212)	110	
SNCA_3168	UUCACAAAUAGCUACAUACU (SEQ ID NO: 272)	AGUAUGUAGCUAUUUGUGAA (SEQ ID NO: 213)	76	
SNCA_258	UUGAAUACAUCCAUGGCU	CAUGGAUGUAUUCAA (SEQ		25

[1001]

	AA (SEQ ID NO: 32)	ID NO: 17)		
SNCA_270U**	UAAAGUCCUUUCAUGAAUAC (SEQ ID NO: 273)	CAUGAAAGGACUUUA (SEQ ID NO: 214)		46
SNCA_443	UAACAUUUGUCACUUGCUCU (SEQ ID NO: 274)	AAGUGACAAAUGUUA (SEQ ID NO: 215)		82
SNCA_753U**	UAUGACUGGGCACAUUGGAA (SEQ ID NO: 275)	AUGUGCCCAGUCAUA (SEQ ID NO: 216)		52
SNCA_919	UAUCGUAGAUUGAAGCCACA (SEQ ID NO: 29)	CUUCAAUCUACGAUA (SEQ ID NO: 14)		19
SNCA_959	UAUAAGUGGUAGUCACUUAG (SEQ ID NO: 276)	UGACUACCACUUAUA (SEQ ID NO: 217)		98
SNCA_960	UAAUAAGUGGUAGUCACUUA (SEQ ID NO: 277)	GACUACCACUUAUUA (SEQ ID NO: 218)		72
SNCA_963	UAGAAAUAAGUGGUAGUCAC (SEQ ID NO: 37)	UACCACUUAUUUCUA (SEQ ID NO: 22)		36
SNCA_1054	UAUCAUUAAAAGACACCUAA (SEQ ID NO: 34)	UGUCUUUUAAUGAUA (SEQ ID NO: 19)		34
SNCA_1094	UUAUUAACAAAUUUCACAAU (SEQ ID NO: 38)	GAAAUUUGUUAAUAA (SEQ ID NO: 23)		50
SNCA_1095	UAUAUUAACAAAUUUCACAA (SEQ ID NO: 278)	AAAUUUGUUAAUAUA (SEQ ID NO: 219)		121

[1002]

SNCA_1096	UUAUAUUAACAAAUUUCACA (SEQ ID NO: 279)	AAUUUGUUAAUAUAA (SEQ ID NO: 220)		62
SNCA_1098	UUAUAUAUUAACAAAUUUCA (SEQ ID NO: 280)	UUUGUUAAUAUAUAA (SEQ ID NO: 221)		86
SNCA_1133	UUGCAUAGUUUCAUGCUCAC (SEQ ID NO: 30)	CAUGAAACUAUGCAA (SEQ ID NO: 15)		33
SNCA_1175	UCACAUCGCAAAAUGGUAAA (SEQ ID NO: 281)	CAUUUUGCGAUGUGA (SEQ ID NO: 222)		50
SNCA_1206	UACCAUUUAUAUACAAACAC (SEQ ID NO: 282)	UGUAUAUAAAUGGUA (SEQ ID NO: 223)		172
SNCA_1207	UCACCAUUUAUAUACAAACA (SEQ ID NO: 283)	GUAUAUAAAUGGUGA (SEQ ID NO: 224)		156
SNCA_1367	UAAAAUUCCUCCUUCUUCAA (SEQ ID NO: 284)	GAAGGAGGAAUUUUA (SEQ ID NO: 225)		67
SNCA_2094	UAGAAUUCAUAUAUUUGGCA (SEQ ID NO: 285)	AAUAUAUGAAUUCUA (SEQ ID NO: 226)		82
SNCA_2407	UAAAGGAAGUUUCUAUGGUA (SEQ ID NO: 286)	UAGAAACUUCCCUUUA (SEQ ID NO: 227)		73
SNCA_2630	UUUAAUACCAAUACUUUUAA (SEQ ID NO: 287)	AGUAUUGGUAUUAAA (SEQ ID NO: 228)		123
SNCA_2700	UCACAACUUUCCUAAUCU	UUAGGAAAGUUGUGA (SEQ		101

[1003]

	CA (SEQ ID NO: 288)	ID NO: 229)		

[1004] 表10-通过计算机筛选确定的SNCA靶标

序列ID	位置	45聚体_基因_区域	Target Sequence
SNCA_270	ORF	TCATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAG (SEQ ID NO:)	GUAUUCAUGAAAGGACUUUC (SEQ ID NO:)
SNCA_271	ORF	CATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGG (SEQ ID NO:)	UAUUCAUGAAAGGACUUUCA (SEQ ID NO:)
SNCA_272	ORF	ATTAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGA (SEQ ID NO:)	AUUCAUGAAAGGACUUUCAA (SEQ ID NO:)
SNCA_274	ORF	TAGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGG (SEQ ID NO:)	UCAUGAAAGGACUUUCAAAG (SEQ ID NO:)
SNCA_275	ORF	AGCCATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGG (SEQ ID NO:)	CAUGAAAGGACUUUCAAAGG (SEQ ID NO:)
SNCA_278	ORF	CATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGT (SEQ ID NO:)	GAAAGGACUUUCAAAGGCCA (SEQ ID NO:)
SNCA_279	ORF	ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTT (SEQ ID NO:)	AAAGGACUUUCAAAGGCCAA (SEQ ID NO:)
SNCA_280	ORF	TGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTG (SEQ ID NO:)	AAGGACUUUCAAAGGCCAAG (SEQ ID NO:)
SNCA_281	ORF	GGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGT (SEQ ID NO:)	AGGACUUUCAAAGGCCAAGG (SEQ ID NO:)
SNCA_284	ORF	TGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGC (SEQ ID NO:)	ACUUUCAAAGGCCAAGGAGG (SEQ ID NO:)
SNCA_285	ORF	GTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCT (SEQ ID NO:)	CUUUCAAAGGCCAAGGAGGG (SEQ ID NO:)
SNCA_28	ORF	TATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTG	UUUCAAAGGCCAAGGAGGGA

[1005]

[1006]

6		(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_287	ORF	ATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGC (SEQ ID NO:)	UUCAAAGGCCAAGGAGGGAG (SEQ ID NO:)
SNCA_288	ORF	TTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCT (SEQ ID NO:)	UCAAAGGCCAAGGAGGGAGU (SEQ ID NO:)
SNCA_291	ORF	ATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCT (SEQ ID NO:)	AAGGCCAAGGAGGGAGUUGU (SEQ ID NO:)
SNCA_292	ORF	TGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTG (SEQ ID NO:)	AGGCCAAGGAGGGAGUUGUG (SEQ ID NO:)
SNCA_295	ORF	AAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGA (SEQ ID NO:)	CCAAGGAGGGAGUUGUGGCU (SEQ ID NO:)
SNCA_296	ORF	AGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAA (SEQ ID NO:)	CAAGGAGGGAGUUGUGGCUG (SEQ ID NO:)
SNCA_297	ORF	GGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAA (SEQ ID NO:)	AAGGAGGGAGUUGUGGCUGC (SEQ ID NO:)
SNCA_298	ORF	GACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAA (SEQ ID NO:)	AGGAGGGAGUUGUGGCUGCU (SEQ ID NO:)
SNCA_299	ORF	ACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAAC (SEQ ID NO:)	GGAGGGAGUUGUGGCUGCUG (SEQ ID NO:)
SNCA_300	ORF	CTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACC (SEQ ID NO:)	GAGGGAGUUGUGGCUGCUGC (SEQ ID NO:)
SNCA_301	ORF	TTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCA (SEQ ID NO:)	AGGGAGUUGUGGCUGCUGCU (SEQ ID NO:)
SNCA_302	ORF	TTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAA (SEQ ID NO:)	GGGAGUUGUGGCUGCUGCUG (SEQ ID NO:)
SNCA_303	ORF	TCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAA (SEQ ID NO:)	GGAGUUGUGGCUGCUGCUGA (SEQ ID NO:)
SNCA_30	ORF	AAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAACA	AGUUGUGGCUGCUGCUGAGA

[1007]

5		(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_308	ORF	GGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAACAGGG (SEQ ID NO:)	UGUGGCUGCUGCUGAGAAAA (SEQ ID NO:)
SNCA_309	ORF	GCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAACAGGGT (SEQ ID NO:)	GUGGCUGCUGCUGAGAAAAC (SEQ ID NO:)
SNCA_311	ORF	CAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAACAGGGTGT (SEQ ID NO:)	GGCUGCUGCUGAGAAAACCA (SEQ ID NO:)
SNCA_312	ORF	AAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAAACAGGGTGTG (SEQ ID NO:)	GCUGCUGCUGAGAAAACCAA (SEQ ID NO:)
SNCA_351	ORF	GGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTTCTCTAT (SEQ ID NO:)	GCAGGAAAGACAAAAGAGGG (SEQ ID NO:)
SNCA_352	ORF	GTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTTCTCTATG (SEQ ID NO:)	CAGGAAAGACAAAAGAGGGU (SEQ ID NO:)
SNCA_419	ORF	AGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCA (SEQ ID NO:)	GGCAACAGUGGCUGAGAAGA (SEQ ID NO:)
SNCA_420	ORF	GTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAA (SEQ ID NO:)	GCAACAGUGGCUGAGAAGAC (SEQ ID NO:)
SNCA_422	ORF	GGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGT (SEQ ID NO:)	AACAGUGGCUGAGAAGACCA (SEQ ID NO:)
SNCA_425	ORF	GCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGAC (SEQ ID NO:)	AGUGGCUGAGAAGACCAAAG (SEQ ID NO:)
SNCA_426	ORF	CATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACA (SEQ ID NO:)	GUGGCUGAGAAGACCAAAGA (SEQ ID NO:)
SNCA_427	ORF	ATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAA (SEQ ID NO:)	UGGCUGAGAAGACCAAAGAG (SEQ ID NO:)
SNCA_428	ORF	TGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAA (SEQ ID NO:)	GGCUGAGAAGACCAAAGAGC (SEQ ID NO:)
SNCA_42	ORF	GGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAAT	GCUGAGAAGACCAAAGAGCA

[1008]

9		(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_430	ORF	GTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATG (SEQ ID NO:)	CUGAGAAGACCAAAGAGCAA (SEQ ID NO:)
SNCA_431	ORF	TGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGT (SEQ ID NO:)	UGAGAAGACCAAAGAGCAAG (SEQ ID NO:)
SNCA_432	ORF	GTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTT (SEQ ID NO:)	GAGAAGACCAAAGAGCAAGU (SEQ ID NO:)
SNCA_434	ORF	GGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGG (SEQ ID NO:)	GAAGACCAAAGAGCAAGUGA (SEQ ID NO:)
SNCA_435	ORF	GCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGA (SEQ ID NO:)	AAGACCAAAGAGCAAGUGAC (SEQ ID NO:)
SNCA_437	ORF	AACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGG (SEQ ID NO:)	GACCAAAGAGCAAGUGACAA (SEQ ID NO:)
SNCA_441	ORF	GTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCA (SEQ ID NO:)	AAAGAGCAAGUGACAAAUGU (SEQ ID NO:)
SNCA_442	ORF	TGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAG (SEQ ID NO:)	AAGAGCAAGUGACAAAUGUU (SEQ ID NO:)
SNCA_443	ORF	GGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGT (SEQ ID NO:)	AGAGCAAGUGACAAAUGUUG (SEQ ID NO:)
SNCA_444	ORF	GCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTG (SEQ ID NO:)	GAGCAAGUGACAAAUGUUGG (SEQ ID NO:)
SNCA_445	ORF	CTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGG (SEQ ID NO:)	AGCAAGUGACAAAUGUUGGA (SEQ ID NO:)
SNCA_449	ORF	GAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGAC (SEQ ID NO:)	AGUGACAAAUGUUGGAGGAG (SEQ ID NO:)
SNCA_450	ORF	AAGACCAAAGAGCAAGTGACAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACG (SEQ ID NO:)	GUGACAAAUGUUGGAGGAGC (SEQ ID NO:)
SNCA_45	ORF	AGACCAAAGAGCAAGTGACAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGG	UGACAAAUGUUGGAGGAGCA

[1009]

1		(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_496	ORF	GTGTGACAGCAGTAGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCA (SEQ ID NO:)	CCCAGAAGACAGUGGAGGGA (SEQ ID NO:)
SNCA_497	ORF	TGTGACAGCAGTAGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCAT (SEQ ID NO:)	CCAGAAGACAGUGGAGGGAG (SEQ ID NO:)
SNCA_498	ORF	GTGACAGCAGTAGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATT (SEQ ID NO:)	CAGAAGACAGUGGAGGGAGC (SEQ ID NO:)
SNCA_626	ORF	GCCTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGA (SEQ ID NO:)	CAAUGAGGCUUAUGAAAUGC (SEQ ID NO:)
SNCA_627	ORF	CCTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAA (SEQ ID NO:)	AAUGAGGCUUAUGAAAUGCC (SEQ ID NO:)
SNCA_628	ORF	CTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAG (SEQ ID NO:)	AUGAGGCUUAUGAAAUGCCU (SEQ ID NO:)
SNCA_629	ORF	TGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGG (SEQ ID NO:)	UGAGGCUUAUGAAAUGCCUU (SEQ ID NO:)
SNCA_630	ORF	GTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGG (SEQ ID NO:)	GAGGCUUAUGAAAUGCCUUC (SEQ ID NO:)
SNCA_631	ORF	TGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGT (SEQ ID NO:)	AGGCUUAUGAAAUGCCUUCU (SEQ ID NO:)
SNCA_736	3UTR	TGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCC (SEQ ID NO:)	CCUGUACAAGUGCUCAGUUC (SEQ ID NO:)
SNCA_737	3UTR	GACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCA (SEQ ID NO:)	CUGUACAAGUGCUCAGUUCC (SEQ ID NO:)
SNCA_738	3UTR	ACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAG (SEQ ID NO:)	UGUACAAGUGCUCAGUUCCA (SEQ ID NO:)
SNCA_740	3UTR	AGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTC (SEQ ID NO:)	UACAAGUGCUCAGUUCCAAU (SEQ ID NO:)
SNCA_74	3UT	TGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATG	AAGUGCUCAGUUCCAAUGUG

[1010]

3	R	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_744	3UTR	GTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGA (SEQ ID NO:)	AGUGCUCAGUUCCAAUGUGC (SEQ ID NO:)
SNCA_745	3UTR	TTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGAC (SEQ ID NO:)	GUGCUCAGUUCCAAUGUGCC (SEQ ID NO:)
SNCA_746	3UTR	TCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACA (SEQ ID NO:)	UGCUCAGUUCCAAUGUGCCC (SEQ ID NO:)
SNCA_747	3UTR	CCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACAT (SEQ ID NO:)	GCUCAGUUCCAAUGUGCCCA (SEQ ID NO:)
SNCA_748	3UTR	CATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATT (SEQ ID NO:)	CUCAGUUCCAAUGUGCCCAG (SEQ ID NO:)
SNCA_749	3UTR	ATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTT (SEQ ID NO:)	UCAGUUCCAAUGUGCCCAGU (SEQ ID NO:)
SNCA_751	3UTR	CCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCT (SEQ ID NO:)	AGUUCCAAUGUGCCCAGUCA (SEQ ID NO:)
SNCA_752	3UTR	CTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCTC (SEQ ID NO:)	GUUCCAAUGUGCCCAGUCAU (SEQ ID NO:)
SNCA_753	3UTR	TGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCTCA (SEQ ID NO:)	UUCCAAUGUGCCCAGUCAUG (SEQ ID NO:)
SNCA_754	3UTR	GTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCTCAA (SEQ ID NO:)	UCCAAUGUGCCCAGUCAUGA (SEQ ID NO:)
SNCA_755	3UTR	TACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCATGACATTTCTCAAA (SEQ ID NO:)	CCAAUGUGCCCAGUCAUGAC (SEQ ID NO:)
SNCA_801	3UTR	TTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCAGCAGTGATTGAAGT (SEQ ID NO:)	UCGAAGUCUUCCAUCAGCAG (SEQ ID NO:)
SNCA_802	3UTR	TTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCAGCAGTGATTGAAGTA (SEQ ID NO:)	CGAAGUCUUCCAUCAGCAGU (SEQ ID NO:)
SNCA_80	3UT	TTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCAGCAGTGATTGAAGTAT	GAAGUCUUCCAUCAGCAGUG

[1011]

3	R	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_806	3UTR	ACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCAGCAGTGATTGAAGTATCTG (SEQ ID NO:)	GUCUUCCAUCAGCAGUGAUU (SEQ ID NO:)
SNCA_949	3UTR	CGATGTTAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATT (SEQ ID NO:)	UUAAAAACACCUAAGUGACU (SEQ ID NO:)
SNCA_950	3UTR	GATGTTAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTT (SEQ ID NO:)	UAAAAACACCUAAGUGACUA (SEQ ID NO:)
SNCA_951	3UTR	ATGTTAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTC (SEQ ID NO:)	AAAAACACCUAAGUGACUAC (SEQ ID NO:)
SNCA_952	3UTR	TGTTAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCT (SEQ ID NO:)	AAAACACCUAAGUGACUACC (SEQ ID NO:)
SNCA_953	3UTR	GTTAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTA (SEQ ID NO:)	AAACACCUAAGUGACUACCA (SEQ ID NO:)
SNCA_954	3UTR	TTAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAA (SEQ ID NO:)	AACACCUAAGUGACUACCAC (SEQ ID NO:)
SNCA_955	3UTR	TAAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAA (SEQ ID NO:)	ACACCUAAGUGACUACCACU (SEQ ID NO:)
SNCA_956	3UTR	AAAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAAT (SEQ ID NO:)	CACCUAAGUGACUACCACUU (SEQ ID NO:)
SNCA_957	3UTR	AAACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATC (SEQ ID NO:)	ACCUAAGUGACUACCACUUA (SEQ ID NO:)
SNCA_958	3UTR	AACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCC (SEQ ID NO:)	CCUAAGUGACUACCACUUAU (SEQ ID NO:)
SNCA_959	3UTR	ACAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCT (SEQ ID NO:)	CUAAGUGACUACCACUUAUU (SEQ ID NO:)
SNCA_960	3UTR	CAAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTC (SEQ ID NO:)	UAAGUGACUACCACUUAUUU (SEQ ID NO:)
SNCA_96	3UT	AAATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCA	AAGUGACUACCACUUAUUUC

[1012]

1	R	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_962	3UTR	AATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCAC (SEQ ID NO:)	AGUGACUACCACUUAUUUCU (SEQ ID NO:)
SNCA_963	3UTR	ATTAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACT (SEQ ID NO: 7)	GUGACUACCACUUAUUUCUA (SEQ ID NO:)
SNCA_965	3UTR	TAAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACTAT (SEQ ID NO:)	GACUACCACUUAUUUCUAAA (SEQ ID NO:)
SNCA_966	3UTR	AAAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACTATT (SEQ ID NO:)	ACUACCACUUAUUUCUAAAU (SEQ ID NO:)
SNCA_967	3UTR	AAAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACTATTT (SEQ ID NO:)	CUACCACUUAUUUCUAAAUC (SEQ ID NO:)
SNCA_968	3UTR	AAACACCTAAGTGACTACCACTTATTTCTAAATCCTCACTATTTT (SEQ ID NO:)	UACCACUUAUUUCUAAAUCC (SEQ ID NO:)
SNCA_1092	3UTR	TCTAAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATA (SEQ ID NO:)	GUAUUGUGAAAUUUGUUAAU (SEQ ID NO:)
SNCA_1093	3UTR	CTAAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATAC (SEQ ID NO:)	UAUUGUGAAAUUUGUUAAUA (SEQ ID NO:)
SNCA_1094	3UTR	TAAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACT (SEQ ID NO:)	AUUGUGAAAUUUGUUAAUAU (SEQ ID NO:)
SNCA_1095	3UTR	AAGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTT (SEQ ID NO:)	UUGUGAAAUUUGUUAAUAUA (SEQ ID NO:)
SNCA_1096	3UTR	AGAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTTA (SEQ ID NO:)	UGUGAAAUUUGUUAAUAUAU (SEQ ID NO:)
SNCA_1097	3UTR	GAATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTTAA (SEQ ID NO:)	GUGAAAUUUGUUAAUAUAUA (SEQ ID NO:)
SNCA_1098	3UTR	AATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTTAAA (SEQ ID NO:)	UGAAAUUUGUUAAUAUAUAU (SEQ ID NO:)
SNCA_10	3UT	ATAATGACGTATTGTGAAATTTGTTAATATATATAATACTTAAAA	GAAAUUUGUUAAUAUAUAUA

[1013]

99	R	(SEQ ID NO:)	(SEQ ID NO:)
SNCA_1141	3UTR	AAAATATGTGAGCATGAAACTATGCACCTATAAATACTAAATATG (SEQ ID NO:)	GAAACUAUGCACCUAUAAAU (SEQ ID NO:)
SNCA_1142	3UTR	AAATATGTGAGCATGAAACTATGCACCTATAAATACTAAATATGA (SEQ ID NO:)	AAACUAUGCACCUAUAAAUA (SEQ ID NO:)
SNCA_1199	3UTR	TTGCGATGTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGA (SEQ ID NO:)	UUCACUUGUGUUUGUAUAUA (SEQ ID NO:)
SNCA_1200	3UTR	TGCGATGTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAA (SEQ ID NO:)	UCACUUGUGUUUGUAUAUAA (SEQ ID NO:)
SNCA_1202	3UTR	CGATGTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATT (SEQ ID NO:)	ACUUGUGUUUGUAUAUAAAU (SEQ ID NO:)
SNCA_1203	3UTR	GATGTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTA (SEQ ID NO:)	CUUGUGUUUGUAUAUAAAUG (SEQ ID NO:)
SNCA_1204	3UTR	ATGTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTAA (SEQ ID NO:)	UUGUGUUUGUAUAUAAAUGG (SEQ ID NO:)
SNCA_1205	3UTR	TGTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTAAA (SEQ ID NO:)	UGUGUUUGUAUAUAAAUGGU (SEQ ID NO:)
SNCA_1206	3UTR	GTGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTAAAA (SEQ ID NO:)	GUGUUUGUAUAUAAAUGGUG (SEQ ID NO:)
SNCA_1207	3UTR	TGTTTTATTCACTTGTGTTTGTATATAAATGGTGAGAATTAAAAT (SEQ ID NO:)	UGUUUGUAUAUAAAUGGUGA (SEQ ID NO:)
SNCA_1761	3UTR	TAATATTCGACCATGAATAAAAAAAAAAAAAAAGTGGGTTCCCGG (SEQ ID NO:)	AAUAAAAAAAAAAAAAAGU (SEQ ID NO:)

[1014] 进行第二次体外筛选以鉴定可有效沉默SNCA mRNA的其他siRNA。如上所述进行筛选。筛选的结果如图5所描绘。测试的siRNA是P3不对称设计，如图5所描绘。第二次筛选的结果确定了几个能够有效沉默SNCA mRNA的额外siRNA，包括几个将SNCA mRNA水平降低到低于40％。SNCA基因和mRNA靶序列，以及第二次筛选中使用的siRNA组在下表11和表12中列出。

[1015] 表12.图5的筛选中使用的SNCA基因和mRNA靶序列。

[1016]

ID	45 聚体_基因_区域	靶序列
SNCA_670	AAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGC	ACGAACCUGAAGCCUAAGAA
SNCA_672	GGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTC	GAACCUGAAGCCUAAGAAAU
SNCA_674	GTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCC	ACCUGAAGCCUAAGAAAUAU
SNCA_676	ATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAG	CUGAAGCCUAAGAAAUAUCU
SNCA_678	CAAGACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTT	GAAGCCUAAGAAAUAUCUUU
SNCA_682	ACTACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTCTT	CCUAAGAAAUAUCUUUGCUC
SNCA_684	TACGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTCTTGA	UAAGAAAUAUCUUUGCUCCC
SNCA_686	CGAACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTCTTGAGA	AGAAAUAUCUUUGCUCCCAG
SNCA_688	AACCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTCTTGAGATC	AAAUAUCUUUGCUCCCAGUU
SNCA_690	CCTGAAGCCTAAGAAATATCTTTGCTCCCAGTTTCTTGAGATCTG	AUAUCUUUGCUCCCAGUUUC
SNCA_722	TTCTTGAGATCTGCTGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCA	GACAGAUGUUCCAUCCUGUA
SNCA_726	TGAGATCTGCTGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTC	GAUGUUCCAUCCUGUACAAG
SNCA	AGATCTGCTGACAGATGTTCC	UGUUCCAUCCUG

[1017]

_728	ATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCA	UACAAGUG
SNCA_730	ATCTGCTGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAAT	UUCCAUCCUGUACAAGUGCU
SNCA_734	GCTGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGC	AUCCUGUACAAGUGCUCAGU
SNCA_736	TGACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCC	CCUGUACAAGUGCUCAGUUC
SNCA_738	ACAGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAG	UGUACAAGUGCUCAGUUCCA
SNCA_740	AGATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTC	UACAAGUGCUCAGUUCCAAU
SNCA_742	ATGTTCCATCCTGTACAAGTGCTCAGTTCCAATGTGCCCAGTCAT	CAAGUGCUCAGUUCCAAUGU
SNCA_773	ATGTGCCCAGTCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTC	ACAUUUCUCAAAGUUUUUAC
SNCA_775	GTGCCCAGTCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGA	AUUUCUCAAAGUUUUUACAG
SNCA_777	GCCCAGTCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAG	UUCUCAAAGUUUUUACAGUG
SNCA_779	CCAGTCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTC	CUCAAAGUUUUUACAGUGUA
SNCA_781	AGTCATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTT	CAAAGUUUUUACAGUGUAUC
SNCA_785	ATGACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCAT	GUUUUUACAGUGUAUCUCGA
SNCA_787	GACATTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCA	UUUUACAGUGUAUCUCGAAG
SNCA	CATTTCTCAAAGTTTTTACAGT	UUACAGUGUAUC

[1018]

_789	GTATCTCGAAGTCTTCCATCAGC	UCGAAGUC
SNCA_791	TTTCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCAGCAG	ACAGUGUAUCUCGAAGUCUU
SNCA_793	TCTCAAAGTTTTTACAGTGTATCTCGAAGTCTTCCATCAGCAGTG	AGUGUAUCUCGAAGUCUUCC
SNCA_1004	CACTATTTTTTTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGC	GCUGUUGUUCAGAAGUUGUU
SNCA_1006	CTATTTTTTTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTA	UGUUGUUCAGAAGUUGUUAG
SNCA_1008	ATTTTTTTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATC	UUGUUCAGAAGUUGUUAGUG
SNCA_1010	TTTTTTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCAT	GUUCAGAAGUUGUUAGUGAU
SNCA_1012	TTTTGTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATAT	UCAGAAGUUGUUAGUGAUUU
SNCA_1016	GTTGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATATATTA	AAGUUGUUAGUGAUUUGCUA
SNCA_1018	TGCTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATATATTATA	GUUGUUAGUGAUUUGCUAUC
SNCA_1020	CTGTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATATATTATAAG	UGUUAGUGAUUUGCUAUCAU
SNCA_1022	GTTGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTTGCTATCATATATTATAAGAT	UUAGUGAUUUGCUAUCAUAU
SNCA_1024	TGTTCAGAAGTTGTTAGTGATTGCTATCATATATTATAAGATTT	AGUGAUUUGCUAUCAUAUAU
SNCA_1054	TATATTATAAGATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGA	UUAGGUGUCUUUUAAUGAUA
SNCA	TATTATAAGATTTTTAGGTGTC	AGGUGUCUUUUA

[1019]

_1056	TTTTAATGATACTGTCTAAGAAT	AUGAUACU
SNCA_1058	TTATAAGATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAA	GUGUCUUUUAAUGAUACUGU
SNCA_1060	ATAAGATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATG	GUCUUUUAAUGAUACUGUCU
SNCA_1062	AAGATTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGAC	CUUUUAAUGAUACUGUCUAA
SNCA_1066	TTTTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGTAT	UAAUGAUACUGUCUAAGAAU
SNCA_1068	TTTAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGTATTG	AUGAUACUGUCUAAGAAUAA
SNCA_1070	TAGGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGTATTGTG	GAUACUGUCUAAGAAUAAUG
SNCA_1072	GGTGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGTATTGTGAA	UACUGUCUAAGAAUAAUGAC
SNCA_1074	TGTCTTTTAATGATACTGTCTAAGAATAATGACGTATTGTGAAAT	CUGUCUAAGAAUAAUGACGU

[1020] 表12.图5的筛选中使用的SNCA反义和有义链siRNA序列。

[1021]

ID	AS 修饰的	S 修饰的
SNCA_670	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(fU)(fA)(mG)(fG)(mC)(fU)(mU)(fC)(mA)#(fG)#(mG)#(fU)#(mU)#(mC)#(mG)#(fU)	(mC)#(mC)#(fU)(mG)(fA)(mA)(fG)(mC)(fC)(mU)(mA)(mA)(fG)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_672	P(mU)#(fU)#(mU)(fU)(fC)(fU)(mU)(fA)(mG)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mA)#(fG)#(mG)#(mU)#(mU)#(fC)	(mU)#(mG)#(fA)(mA)(fG)(mC)(fC)(mU)(fA)(mA)(mG)(mA)(fA)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_674	P(mU)#(fU)#(mA)(fU)(fU)(fU)(mC)(fU)(mU)(fA)(mG)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mA)#(mG)#(mG)#(fU)	(mA)#(mA)#(fG)(mC)(fC)(mU)(fA)(mA)(fG)(mA)(mA)(mA)(fU)#(mA)#(mA)-TegChol

[1022]

SNCA_676	P(mU)#(fG)#(mA)(fU)(fA)(fU)(mU)(fU)(mC)(fU)(mU)(fA)(mG)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(mC)#(mA)#(fG)	(mG)#(mC)#(fC)(mU)(fA)(mA)(fG)(mA)(fA)(mA)(mU)(mA)(fU)#(mC)#(mA)-TegChol
SNCA_678	P(mU)#(fA)#(mA)(fG)(fA)(fU)(mA)(fU)(mU)(fU)(mC)(fU)(mU)#(fA)#(mG)#(fG)#(mC)#(mU)#(mU)#(fC)	(mC)#(mU)#(fA)(mA)(fG)(mA)(fA)(mA)(fU)(mA)(mU)(mC)(fU)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_682	P(mU)#(fA)#(mG)(fC)(fA)(fA)(mA)(fG)(mA)(fU)(mA)(fU)(mU)#(fU)#(mC)#(fU)#(mU)#(mA)#(mG)#(fG)	(mG)#(mA)#(fA)(mA)(fU)(mA)(fU)(mC)(fU)(mU)(mU)(mG)(fC)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_684	P(mU)#(fG)#(mG)(fA)(fG)(fC)(mA)(fA)(mA)(fG)(mA)(fU)(mA)#(fU)#(mU)#(fU)#(mC)#(mU)#(mU)#(fA)	(mA)#(mA)#(fU)(mA)(fU)(mC)(fU)(mU)(fU)(mG)(mC)(mU)(fC)#(mC)#(mA)-TegChol
SNCA_686	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(fG)(fA)(mG)(fC)(mA)(fA)(mA)(fG)(mA)#(fU)#(mA)#(fU)#(mU)#(mU)#(mC)#(fU)	(mU)#(mA)#(fU)(mC)(fU)(mU)(fU)(mG)(fC)(mU)(mC)(mC)(fC)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_688	P(mU)#(fA)#(mC)(fU)(fG)(fG)(mG)(fA)(mG)(fC)(mA)(fA)(mA)#(fG)#(mA)#(fU)#(mA)#(mU)#(mU)#(fU)	(mU)#(mC)#(fU)(mU)(fU)(mG)(fC)(mU)(fC)(mC)(mC)(mA)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_690	P(mU)#(fA)#(mA)(fA)(fC)(fU)(mG)(fG)(mG)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fA)#(mA)#(fG)#(mA)#(mU)#(mA)#(fU)	(mU)#(mU)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fC)(mC)(fC)(mA)(mG)(mU)(fU)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_722	P(mU)#(fA)#(mC)(fA)(fG)(fG)(mA)(fU)(mG)(fG)(mA)(fA)(mC)#(fA)#(mU)#(fC)#(mU)#(mG)#(mU)#(fC)	(mA)#(mU)#(fG)(mU)(fU)(mC)(fC)(mA)(fU)(mC)(mC)(mU)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_726	P(mU)#(fU)#(mU)(fG)(fU)(fA)(mC)(fA)(mG)(fG)(mA)(fU)(mG)#(fG)#(mA)#(fA)#(mC)#(mA)#(mU)#(fC)	(mU)#(mC)#(fC)(mA)(fU)(mC)(fC)(mU)(fG)(mU)(mA)(mC)(fA)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_728	P(mU)#(fA)#(mC)(fU)(fU)(fG)(mU)(fA)(mC)(fA)(mG)(fG)(mA)#(fU)#(mG)#(fG)#(mA)#(mA)#(mC)#(fA)	(mC)#(mA)#(fU)(mC)(fC)(mU)(fG)(mU)(fA)(mC)(mA)(mA)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_73	P(mU)#(fG)#(mC)(fA)(fC)(fU)(mU)(fG)(mU)(fA)(mC)(fA)(mG)#(fG)#(mA)#(fU)#(mG)#(mG)#(mA)#(f	(mU)#(mC)#(fC)(mU)(fG)(mU)(fA)(mC)(fA)(mA)(mG)(mU)(fG)#(mC)#(mA)-TegC

[1023]

0	A)	hol
SNCA_734	P(mU)#(fC)#(mU)(fG)(fA)(fG)(mC)(fA)(mC)(fU)(mU)(fG)(mU)#(fA)#(mC)#(fA)#(mG)#(mG)#(mA)#(fU)	(mG)#(mU)#(fA)(mC)(fA)(mA)(fG)(mU)(fG)(mC)(mU)(mC)(fA)#(mG)#(mA)-TegChol
SNCA_736	P(mU)#(fA)#(mA)(fC)(fU)(fG)(mA)(fG)(mC)(fA)(mC)(fU)(mU)#(fG)#(mU)#(fA)#(mC)#(mA)#(mG)#(fG)	(mA)#(mC)#(fA)(mA)(fG)(mU)(fG)(mC)(fU)(mC)(mA)(mG)(fU)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_738	P(mU)#(fG)#(mG)(fA)(fA)(fC)(mU)(fG)(mA)(fG)(mC)(fA)(mC)#(fU)#(mU)#(fG)#(mU)#(mA)#(mC)#(fA)	(mA)#(mA)#(fG)(mU)(fG)(mC)(fU)(mC)(fA)(mG)(mU)(mU)(fC)#(mC)#(mA)-TegChol
SNCA_740	P(mU)#(fU)#(mU)(fG)(fG)(fA)(mA)(fC)(mU)(fG)(mA)(fG)(mC)#(fA)#(mC)#(fU)#(mU)#(mG)#(mU)#(fA)	(mG)#(mU)#(fG)(mC)(fU)(mC)(fA)(mG)(fU)(mU)(mC)(mC)(fA)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_742	P(mU)#(fC)#(mA)(fU)(fU)(fG)(mG)(fA)(mA)(fC)(mU)(fG)(mA)#(fG)#(mC)#(fA)#(mC)#(mU)#(mU)#(fG)	(mG)#(mC)#(fU)(mC)(fA)(mG)(fU)(mU)(fC)(mC)(mA)(mA)(fU)#(mG)#(mA)-TegChol
SNCA_773	P(mU)#(fU)#(mA)(fA)(fA)(fA)(mA)(fC)(mU)(fU)(mU)(fG)(mA)#(fG)#(mA)#(fA)#(mA)#(mU)#(mG)#(fU)	(mU)#(mC)#(fU)(mC)(fA)(mA)(fA)(mG)(fU)(mU)(mU)(mU)(fU)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_775	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(fA)(fA)(mA)(fA)(mA)(fC)(mU)(fU)(mU)#(fG)#(mA)#(fG)#(mA)#(mA)#(mA)#(fU)	(mU)#(mC)#(fA)(mA)(fA)(mG)(fU)(mU)(fU)(mU)(mU)(mA)(fC)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_777	P(mU)#(fA)#(mC)(fU)(fG)(fU)(mA)(fA)(mA)(fA)(mA)(fC)(mU)#(fU)#(mU)#(fG)#(mA)#(mG)#(mA)#(fA)	(mA)#(mA)#(fA)(mG)(fU)(mU)(fU)(mU)(fU)(mA)(mC)(mA)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_779	P(mU)#(fA)#(mC)(fA)(fC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fA)(mA)(fA)(mA)#(fC)#(mU)#(fU)#(mU)#(mG)#(mA)#(fG)	(mA)#(mG)#(fU)(mU)(fU)(mU)(fU)(mA)(fC)(mA)(mG)(mU)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_781	P(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fC)(fA)(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fA)(mA)#(fA)#(mA)#(fC)#(mU)#(mU)#(mU)#(fG)	(mU)#(mU)#(fU)(mU)(fU)(mA)(fC)(mA)(fG)(mU)(mG)(mU)(fA)#(mU)#(mA)-TegChol
SN	P(mU)#(fC)#(mG)(fA)(fG)(fA)(m	(mU)#(mA)#(fC)(mA)(fG)(

[1024]

CA_785	U)(fA)(mC)(fA)(mC)(fU)(mG)#(fU)#(mA)#(fA)#(mA)#(mA)#(fC)	mU)(fG)(mU)(fA)(mU)(mC)(mU)(fC)#(mG)#(mA)-TegChol
SNCA_787	P(mU)#(fU)#(mU)(fC)(fG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fA)(mC)(fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fU)#(mA)#(mA)#(mA)#(fA)	(mC)#(mA)#(fG)(mU)(fG)(mU)(fA)(mU)(fC)(mU)(mC)(mG)(fA)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_789	P(mU)#(fA)#(mC)(fU)(fU)(fC)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fA)(mC)#(fA)#(mC)#(fU)#(mG)#(mU)#(mA)#(fA)	(mG)#(mU)#(fG)(mU)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mG)(mA)(mA)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_791	P(mU)#(fA)#(mG)(fA)(fC)(fU)(mU)(fC)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)#(fA)#(mC)#(fA)#(mC)#(mU)#(mG)#(fU)	(mG)#(mU)#(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mG)(fA)(mA)(mG)(mU)(fC)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_793	P(mU)#(fG)#(mA)(fA)(fG)(fA)(mC)(fU)(mU)(fC)(mG)(fA)(mG)#(fA)#(mU)#(fA)#(mC)#(mA)#(mC)#(fU)	(mA)#(mU)#(fC)(mU)(fC)(mG)(fA)(mA)(fG)(mU)(mC)(mU)(fU)#(mC)#(mA)-TegChol
SNCA_1004	P(mU)#(fA)#(mC)(fA)(fA)(fC)(mU)(fU)(mC)(fU)(mG)(fA)(mA)#(fC)#(mA)#(fA)#(mC)#(mA)#(mG)#(fC)	(mU)#(mG)#(fU)(mU)(fC)(mA)(fG)(mA)(fA)(mG)(mU)(mU)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_1006	P(mU)#(fU)#(mA)(fA)(fC)(fA)(mA)(fC)(mU)(fU)(mC)(fU)(mG)#(fA)#(mA)#(fC)#(mA)#(mA)#(mC)#(fA)	(mU)#(mU)#(fC)(mA)(fG)(mA)(fA)(mG)(fU)(mU)(mG)(mU)(fU)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1008	P(mU)#(fA)#(mC)(fU)(fA)(fA)(mC)(fA)(mA)(fC)(mU)(fU)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)#(mA)#(mC)#(mA)#(fA)	(mC)#(mA)#(fG)(mA)(fA)(mG)(fU)(mU)(fG)(mU)(mU)(mA)(fG)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_1010	P(mU)#(fU)#(mC)(fA)(fC)(fU)(mA)(fA)(mC)(fA)(mA)(fC)(mU)#(fU)#(mC)#(fU)#(mG)#(mA)#(mA)#(fC)	(mG)#(mA)#(fA)(mG)(fU)(mU)(fG)(mU)(fU)(mA)(mG)(mU)(fG)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1012	P(mU)#(fA)#(mA)(fU)(fC)(fA)(mC)(fU)(mA)(fA)(mC)(fA)(mA)#(fC)#(mU)#(fU)#(mC)#(mU)#(mG)#(fA)	(mA)#(mG)#(fU)(mU)(fG)(mU)(fU)(mA)(fG)(mU)(mG)(mA)(fU)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_1016	P(mU)#(fA)#(mG)(fC)(fA)(fA)(mA)(fU)(mC)(fA)(mC)(fU)(mA)#(fA)#(mC)#(fA)#(mA)#(mC)#(mU)#(fU)	(mG)#(mU)#(fU)(mA)(fG)(mU)(fG)(mA)(fU)(mU)(mU)(mG)(fC)#(mU)#(mA)-TegChol

[1025]

SNCA_1018	P(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fG)(fC)(mA)(fA)(mA)(fU)(mC)(fA)(mC)#(fU)#(mA)#(fA)#(mC)#(mA)#(mA)#(fC)	(mU)#(mA)#(fG)(mU)(fG)(mA)(fU)(mU)(fU)(mG)(mC)(mU)(fA)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_1020	P(mU)#(fU)#(mG)(fA)(fU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fA)(mA)(fU)(mC)#(fA)#(mC)#(fU)#(mA)#(mA)#(mC)#(fA)	(mG)#(mU)#(fG)(mA)(fU)(mU)(fU)(mG)(fC)(mU)(mA)(mU)(fC)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1022	P(mU)#(fU)#(mA)(fU)(fG)(fA)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fA)(mA)#(fU)#(mC)#(fA)#(mC)#(mU)#(mA)#(fA)	(mG)#(mA)#(fU)(mU)(fU)(mG)(fC)(mU)(fA)(mU)(mC)(mA)(fU)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1024	P(mU)#(fU)#(mA)(fU)(fA)(fU)(mG)(fA)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fA)#(mA)#(fU)#(mC)#(mA)#(mC)#(fU)	(mU)#(mU)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fA)(mU)(fC)(mA)(mU)(mA)(fU)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1054	P(mU)#(fA)#(mU)(fC)(fA)(fU)(mU)(fA)(mA)(fA)(mA)(fG)(mA)#(fC)#(mA)#(fC)#(mC)#(mU)#(mA)#(fA)	(mU)#(mG)#(fU)(mC)(fU)(mU)(fU)(mU)(fA)(mA)(mU)(mG)(fA)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_1056	P(mU)#(fG)#(mU)(fA)(fU)(fC)(mA)(fU)(mU)(fA)(mA)(fA)(mA)#(fG)#(mA)#(fC)#(mA)#(mC)#(mC)#(fU)	(mU)#(mC)#(fU)(mU)(fU)(mU)(fA)(mA)(fU)(mG)(mA)(mU)(fA)#(mC)#(mA)-TegChol
SNCA_1058	P(mU)#(fC)#(mA)(fG)(fU)(fA)(mU)(fC)(mA)(fU)(mU)(fA)(mA)#(fA)#(mA)#(fG)#(mA)#(mC)#(mA)#(fC)	(mU)#(mU)#(fU)(mU)(fA)(mA)(fU)(mG)(fA)(mU)(mA)(mC)(fU)#(mG)#(mA)-TegChol
SNCA_1060	P(mU)#(fG)#(mA)(fC)(fA)(fG)(mU)(fA)(mU)(fC)(mA)(fU)(mU)#(fA)#(mA)#(fA)#(mA)#(mG)#(mA)#(fC)	(mU)#(mU)#(fA)(mA)(fU)(mG)(fA)(mU)(fA)(mC)(mU)(mG)(fU)#(mC)#(mA)-TegChol
SNCA_1062	P(mU)#(fU)#(mA)(fG)(fA)(fC)(mA)(fG)(mU)(fA)(mU)(fC)(mA)#(fU)#(mU)#(fA)#(mA)#(mA)#(mA)#(fG)	(mA)#(mA)#(fU)(mG)(fA)(mU)(fA)(mC)(fU)(mG)(mU)(mC)(fU)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1066	P(mU)#(fU)#(mU)(fC)(fU)(fU)(mA)(fG)(mA)(fC)(mA)(fG)(mU)#(fA)#(mU)#(fC)#(mA)#(mU)#(mU)#(fA)	(mA)#(mU)#(fA)(mC)(fU)(mG)(fU)(mC)(fU)(mA)(mA)(mG)(fA)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_10	P(mU)#(fU)#(mA)(fU)(fU)(fC)(mU)(fU)(mA)(fG)(mA)(fC)(mA)#(fG)#(mU)#(fA)#(mU)#(mC)#(mA)#	(mA)#(mC)#(fU)(mG)(fU)(mC)(fU)(mA)(fA)(mG)(mA)(mA)(fU)#(mA)#(mA)-TegC

[1026]

68	(fU)	hol
SNCA_1070	P(mU)#(fA)#(mU)(fU)(fA)(fU)(mU)(fC)(mU)(fU)(mA)(fG)(mA)#(fC)#(mA)#(fG)#(mU)#(mA)#(mU)#(fC)	(mU)#(mG)#(fU)(mC)(fU)(mA)(fA)(mG)(fA)(mA)(mU)(mA)(fA)#(mU)#(mA)-TegChol
SNCA_1072	P(mU)#(fU)#(mC)(fA)(fU)(fU)(mA)(fU)(mU)(fC)(mU)(fU)(mA)#(fG)#(mA)#(fC)#(mA)#(mG)#(mU)#(fA)	(mU)#(mC)#(fU)(mA)(fA)(mG)(fA)(mA)(fU)(mA)(mA)(mU)(fG)#(mA)#(mA)-TegChol
SNCA_1074	P(mU)#(fC)#(mG)(fU)(fC)(fA)(mU)(fU)(mA)(fU)(mU)(fC)(mU)#(fU)#(mA)#(fG)#(mA)#(mC)#(mA)#(fG)	(mU)#(mA)#(fA)(mG)(fA)(mA)(fU)(mA)(fA)(mU)(mG)(mA)(fC)#(mG)#(mA)-TegChol

[1027] 实施例2.小鼠大脑中SNCA的体内沉默

[1028] 在体内环境中测试siRNA之前,用选择的靶向SNCA的siRNA制备另一个剂量响应曲线。在SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞中在8种不同浓度下测试了SNCA siRNA靶向位点SNCA 270、SNCA 753、SNCA 963和SNCA 1094,并且将它们与未处理的对照细胞比较。细胞与siRNA一起孵育72小时,然后测量SNCA mRNA水平(图6)。靶向SNCA的siRNA中的若干种表现出稳健地使SNCA mRNA沉默,其IC50值在约10和11nM之间。

[1029] 基于此处的结果和在实施例1中进行的筛选,选择被指定为SNCA 963的SNCA靶位点在小鼠大脑中进行进一步研究。向小鼠给予通过脑室内(ICV)途径施用的10μl体积中10nmol剂量的siRNA。没有治疗对照小鼠用于比较(每组5只小鼠)。在一个月的孵育期后,处死小鼠并测定SNCA mRNA(图7A)和蛋白质(图7B)水平。mRNA水平用QuantiGene基因表达测定(ThermoFisher,Waltham,MA)测定,并且蛋白质表达用Protein Simple蛋白质印迹系统测定。本体内研究采用以下siRNA化学修饰模式:

[1030] 反义链,从5'到3'(长度为21个核苷酸):

[1031] VP(mX)#(fX)#(mX)(fX)(fX)(fX)(mX)(fX)(mX)(fX)(mX)(fX)(mX)(fX)#(mX)#(fX)#(mX)#(mX)#(mX)#(fX)#(mX)

[1032] 有义链,从5'到3'(长度为16个核苷酸):

[1033] (mX)#(mX)#(mX)(fX)(mX)(fX)(mX)(fX)(mX)(fX)(mX)(mX)(mX)(fX)#(mX)#(mX)

[1034] "m"对应于2'-O-甲基修饰;"f"对应于2'-氟修饰;"X"对应于A、U、G或C的任何核苷酸;"#"对应于硫代磷酸酯核苷酸间键;并且"VP"对应于5'乙烯基膦酸酯修饰。

[1035] 靶向被指定为SNCA 963的靶位点的具有上述化学修饰模式的siRNA在下文列出:

[1036] 反义链,从5'至3'(长度为21个核苷酸):

[1037] VP(mU)#(fA)#(mG)(fA)(fA)(fA)(mU)(fA)(mA)(fG)(mU)(fG)(mG)(fU)#(mA)#(fG)#(mU)#(mC)#(mA)#(fC)#(mU)

[1038] 有义链,从5'至3'(长度为16个核苷酸):

[1039] (mC)#(mU)#(mA)(fC)(mC)(fA)(mC)(fU)(mU)(fA)(mU)(mU)(mU)(fC)#(mU)#(mA)

[1040] "m"对应于2'-O-甲基修饰;"f"对应于2'-氟修饰;"#"对应于硫代磷酸酯核苷酸间键;并且"VP"对应于5'乙烯基膦酸酯修饰。

[1041] 靶向SNCA 963靶位点的siRNA导致测试的几个小鼠中枢神经系统区域中有效沉默,包括额叶皮层、内侧皮层、海马、丘脑、纹状体和脊髓。与未处理对照相比,mRNA和蛋白质水平远低于50%。

[1042] 通过引用并入

[1043] 整个本申请中所引用的所有文献(包括参考文献、专利、专利申请以及网站)的内容特此以引用的方式明确并入,特别是对于本文引用的参考文献来说。除非另有说明,否则本公开将采用本领域熟知的免疫学、分子生物学和细胞生物学的常规技术。

[1044] 本公开还通过引用整体并入分子生物学和药物递送领域中众所周知的技术。这些技术包括但不限于以下出版物中描述的技术:

[1045] Atwell等人J.Mol.Biol.1997,270:26-35;

[1046] Ausubel等人(编),CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley& Sons,NY(1993);

[1047] Ausubel,F.M.等人编,SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(第4版1999)John Wiley&Sons,NY.(ISBN 0-471-32938-X);

[1048] CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY,DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE,Smolen和Ball(编),Wiley,New York(1984);

[1049] Giege,R.和Ducruix,A.Barrett,CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS,a Practical Approach,第2版,第20 1-16页,Oxford University Press,New York,New York,(1999);

[1050] Goodson,in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE,第2卷,第115-138页(1984);

[1051] Hammerling等人,in:MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681(Elsevier,N.Y.,1981;

[1052] Harlow等人,ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);

[1053] Kabat等人,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)和(1991);

[1054] Kabat,E.A.,等人(1991)SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;

[1055] Kontermann和Dubel编,ANTIBODY ENGINEERING(2001)Springer-Verlag.New York.第790页(ISBN 3-540-41354-5).

[1056] Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);

[1057] Lu和Weiner编,CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS(2001)BioTechniques Press.Westborough,MA.第298页(ISBN 1-881299-21-X).

[1058] MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE,Langer和Wise(编),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.(1974);

[1059] Old,R.W.&S.B.Primrose,PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION:AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING(第3版1985)Blackwell Scientific Publications,

Boston.Studies in Microbiology;V.2:第409页(ISBN 0-632-01318-4).

[1060] Sambrook,J.等人编,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL(第2版1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY.第1-3页.(ISBN 0-87969-309-6).

[1061] SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS,J.R.Robinson编,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978

[1062] Winnacker,E.L.FROM GENES TO CLONES:INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY(1987)VCH Publishers,NY(translated by Horst Ibelgaufts).第634页(ISBN 0-89573-614-4).

[1063] 等效方案

[1064] 本公开可以通过其它特定形式来实施而不会脱离其精神或基本特性。因此,上述实施方案应在所有方面均被视为说明性的,而非是对本发明的限制。本公开的范围因此由所附权利要求而非由前面的描述来指示,且因而在权利要求的含义和等效范围内的所有变化被涵盖在权利要求中。

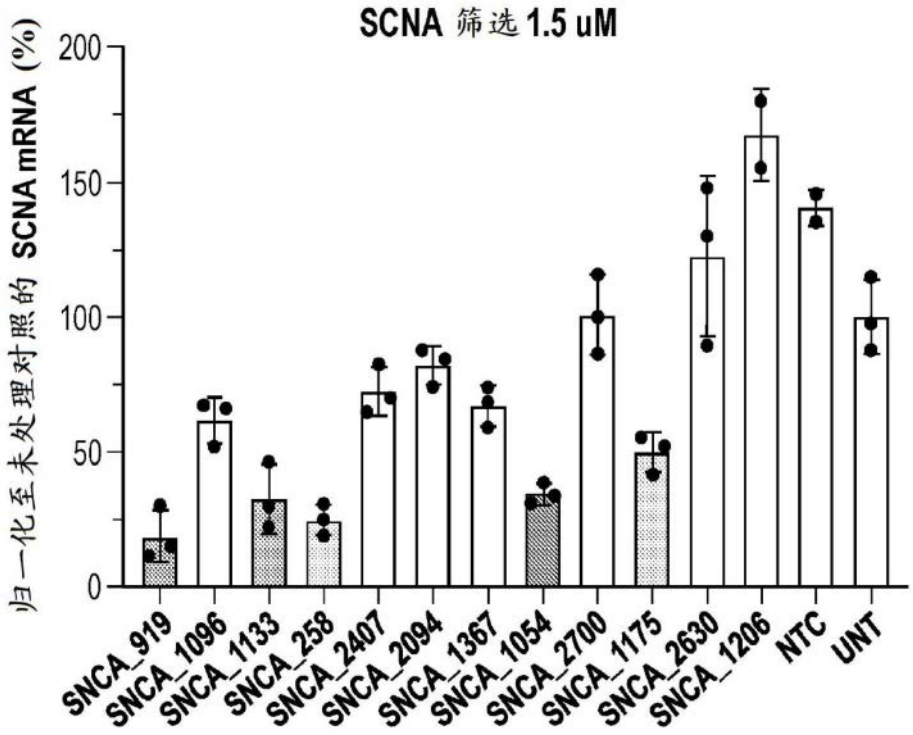

SCNA 筛选 1.5 uM
归一化至未处理对照的 SCNA mRNA (%)
200
150
100
50
0
SNCA_919
SNCA_1096
SNCA_1133
SNCA_258
SNCA_2407
SNCA_2094
SNCA_1367
SNCA_1054
SNCA_2700
SNCA_1175
SNCA_2630
SNCA_1206
NTC
UNT

图1A

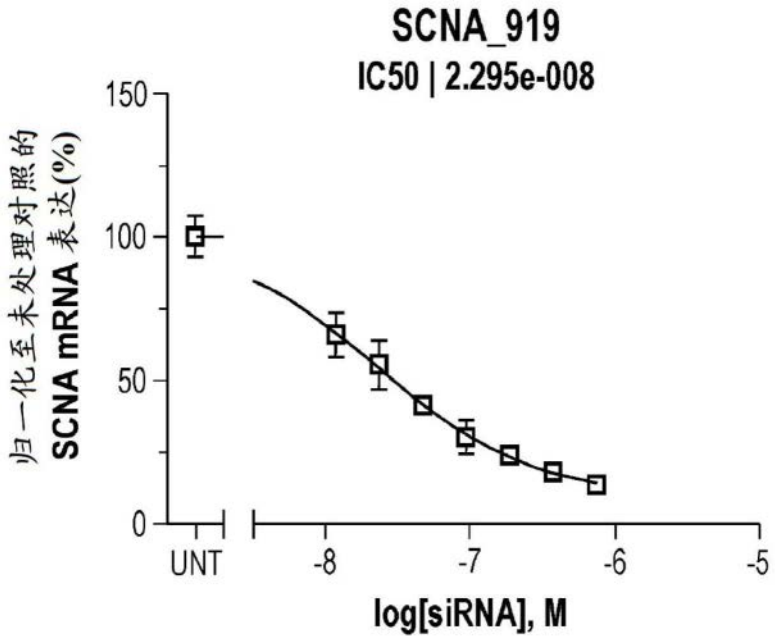

SCNA_919
IC50 | 2.295e-008
归一化至未处理对照的
SCNA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
UNT
-8
-7
-6
-5
log[siRNA], M

图1B

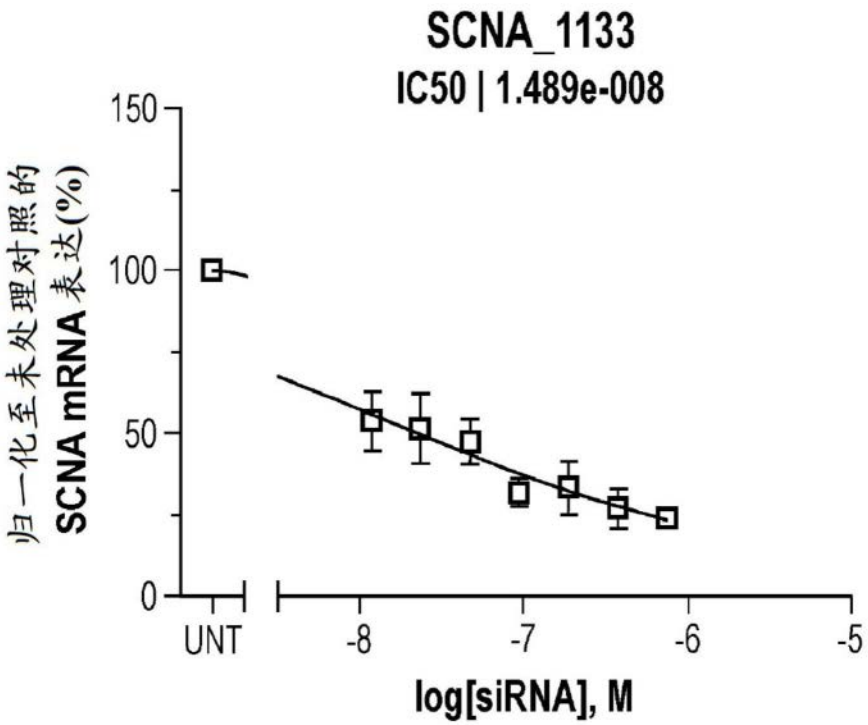

SCNA_1133
IC50 | 1.489e-008
归一化至未处理对照的
SCNA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
UNT
-8
-7
-6
-5
log[siRNA], M

图1C

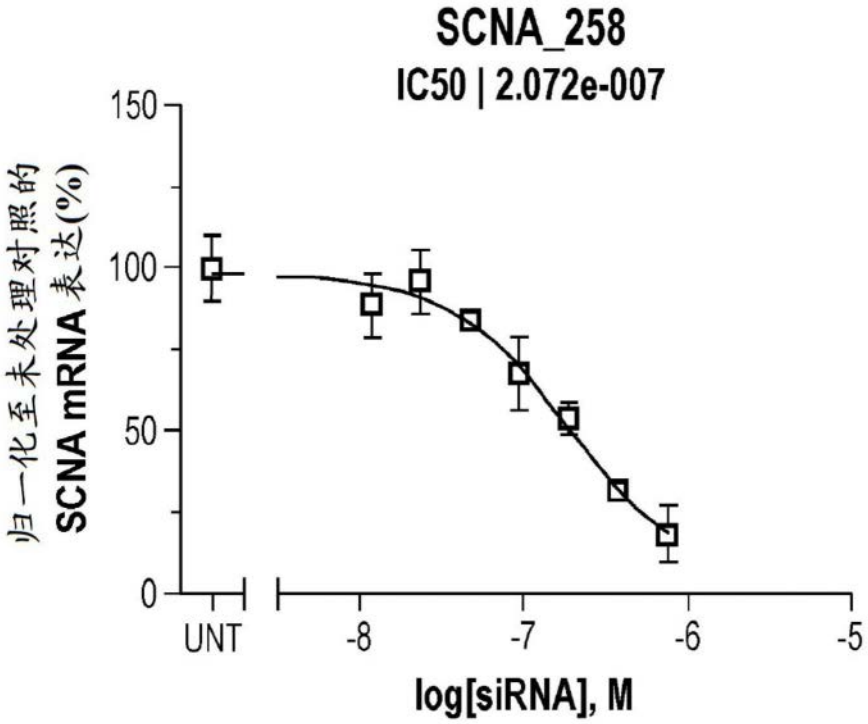

SCNA_258
IC50 | 2.072e-007
归一化至未处理对照的
SCNA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
UNT
-8
-7
-6
-5
log[siRNA], M

图1D

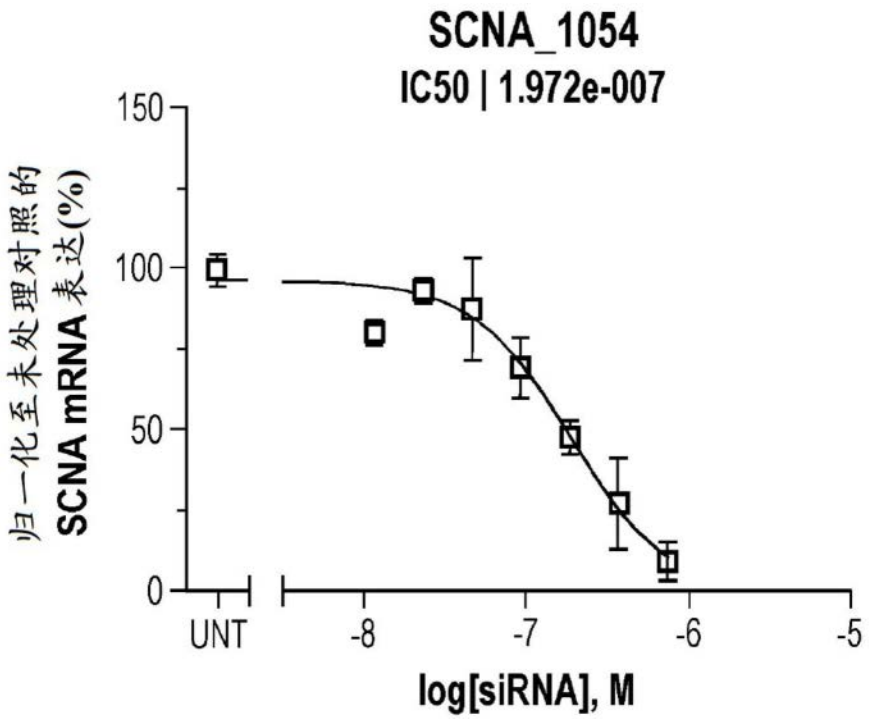

SCNA_1054
IC50 | 1.972e-007
归一化至未处理对照的
SCNA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
UNT
-8
-7
-6
-5
log[siRNA], M

图1E

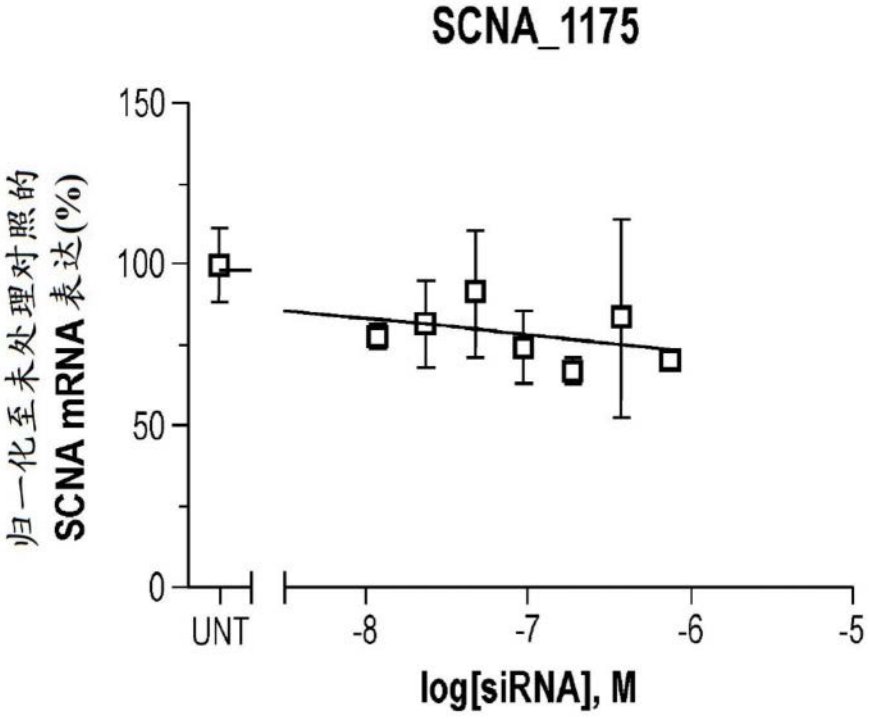

SCNA_1175
归一化至未处理对照的
SCNA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
UNT
-8
-7
-6
-5
log[siRNA], M

图1F

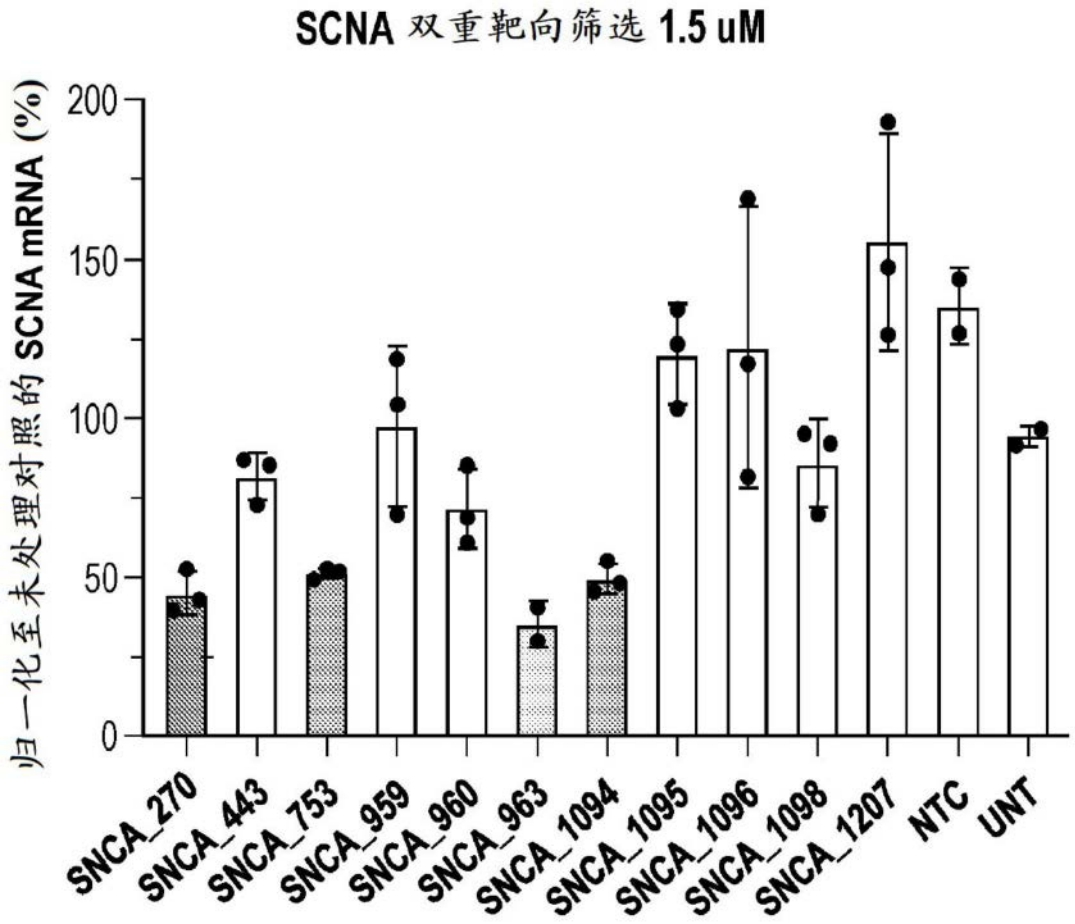

SCNA 双重靶向筛选 1.5 uM
归一化至未处理对照的 SCNA mRNA (%)
200
150
100
50
0
SNCA_270
SNCA_443
SNCA_753
SNCA_959
SNCA_960
SNCA_963
SNCA_1094
SNCA_1095
SNCA_1096
SNCA_1098
SNCA_1207
NTC
UNT

图2

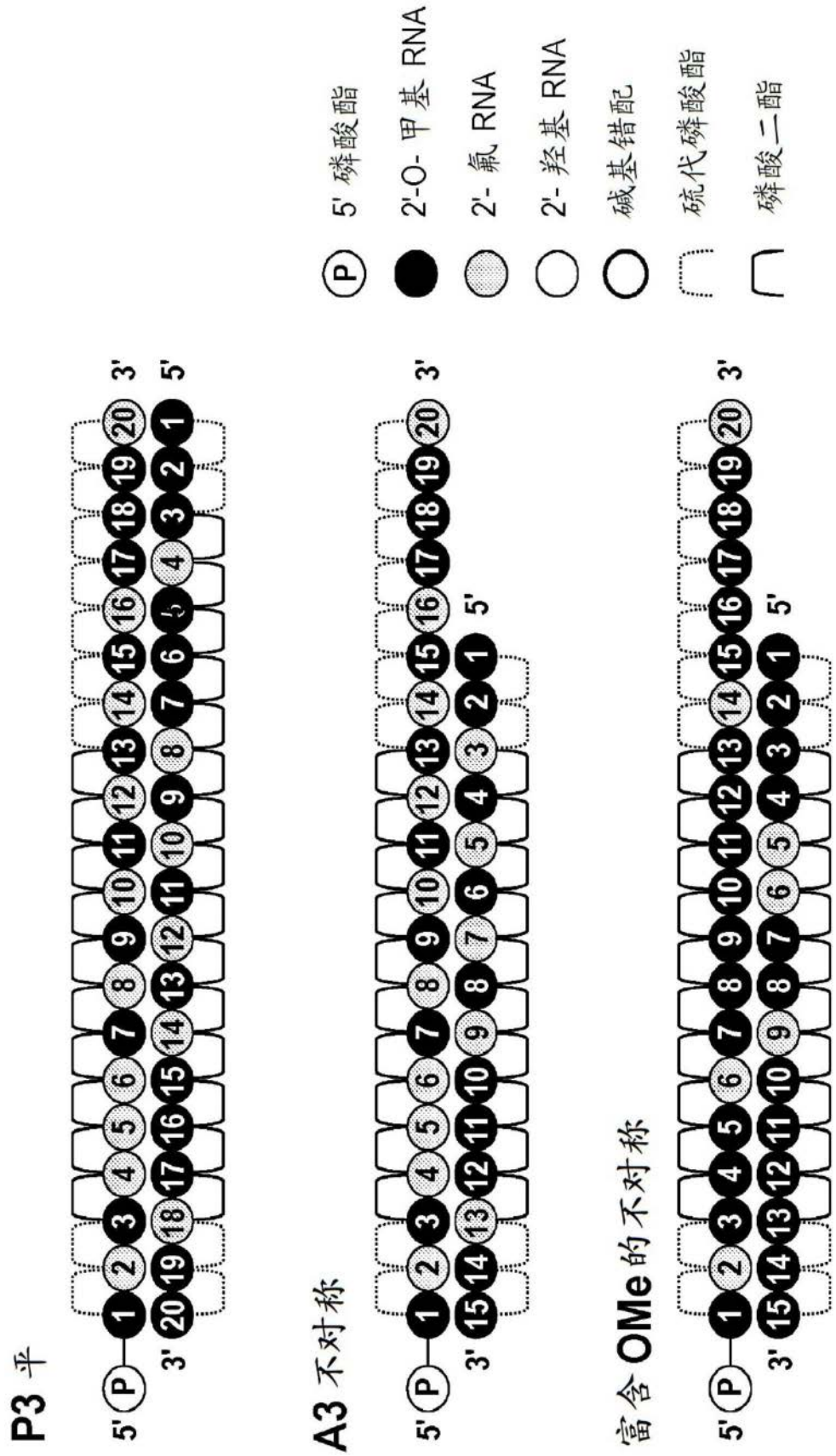

5' 磷酸酯
2'-O- 甲基 RNA
2'- 氟 RNA
2'- 羟基 RNA
碱基错配
硫代磷酸酯
磷酸二酯
P3 平
A3 不对称
富含 OMe 的不对称

图3

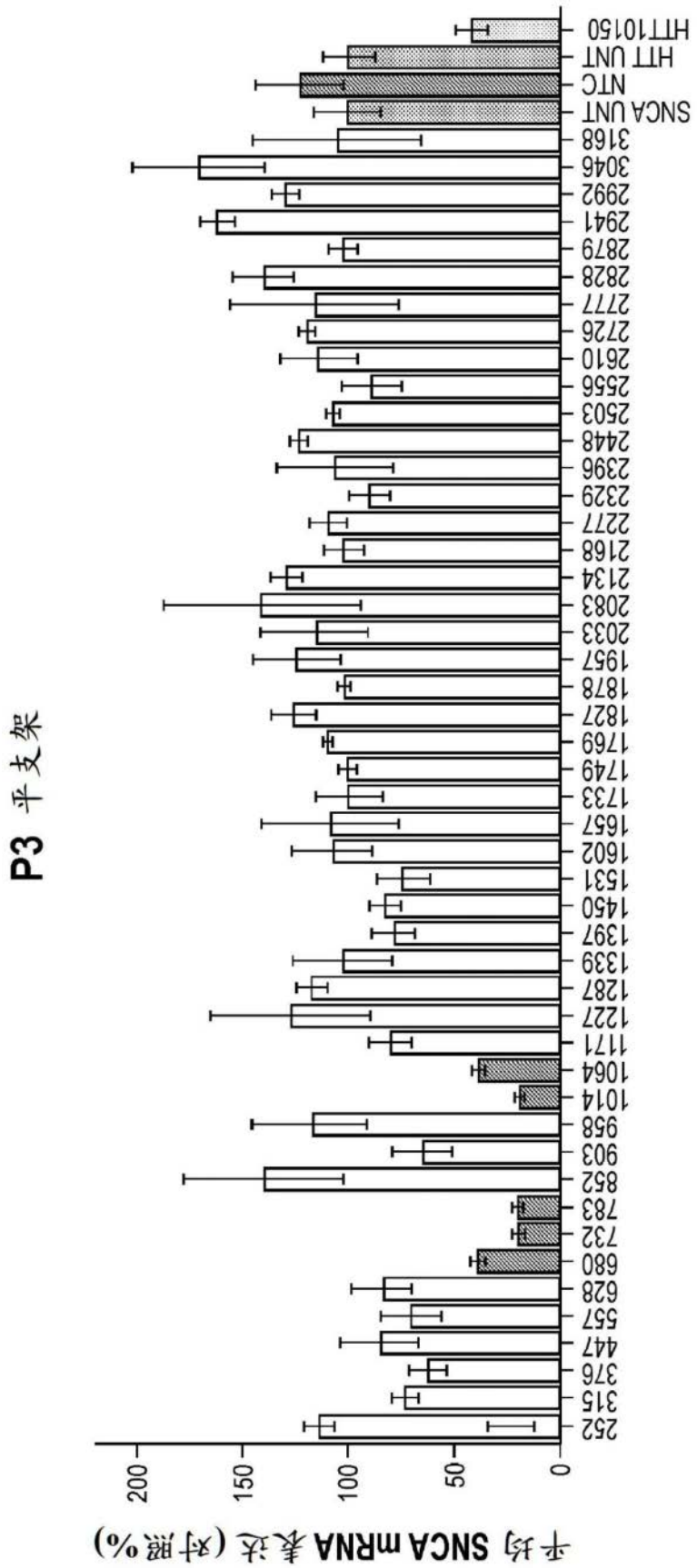

P3 平支架
平均 SNCA mRNA 表达 (对照%)
0
50
100
150
200
252
315
376
447
557
628
680
732
783
852
903
958
1014
1064
1171
1227
1287
1339
1397
1450
1531
1602
1657
1733
1749
1769
1827
1878
1957
2033
2083
2134
2168
2277
2329
2396
2448
2503
2556
2610
2726
2777
2828
2879
2941
2992
3046
3168
SNCA UNT
NTC
HTT UNT
HTT10150

图4A

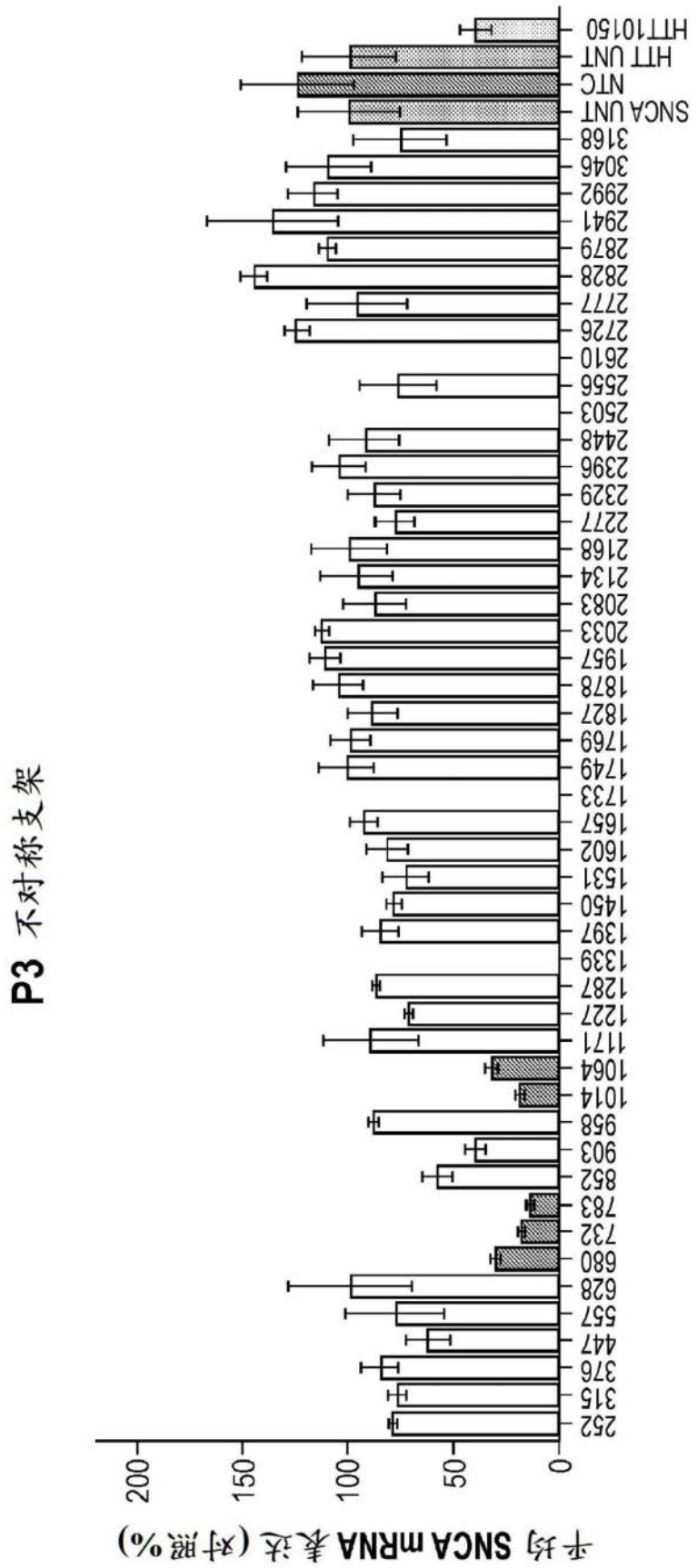

P3 不对称支架
平均 SNCA mRNA 表达 (对照%)
0
50
100
150
200
252
315
376
447
557
628
680
732
783
852
903
958
1014
1064
1171
1227
1287
1339
1397
1450
1531
1602
1657
1733
1749
1769
1827
1878
1957
2033
2083
2134
2168
2227
2329
2396
2448
2503
2556
2610
2726
2777
2828
2879
2941
2992
3046
3168
SNCA UNT
NTC
HTT UNT
HTT10150

图4B

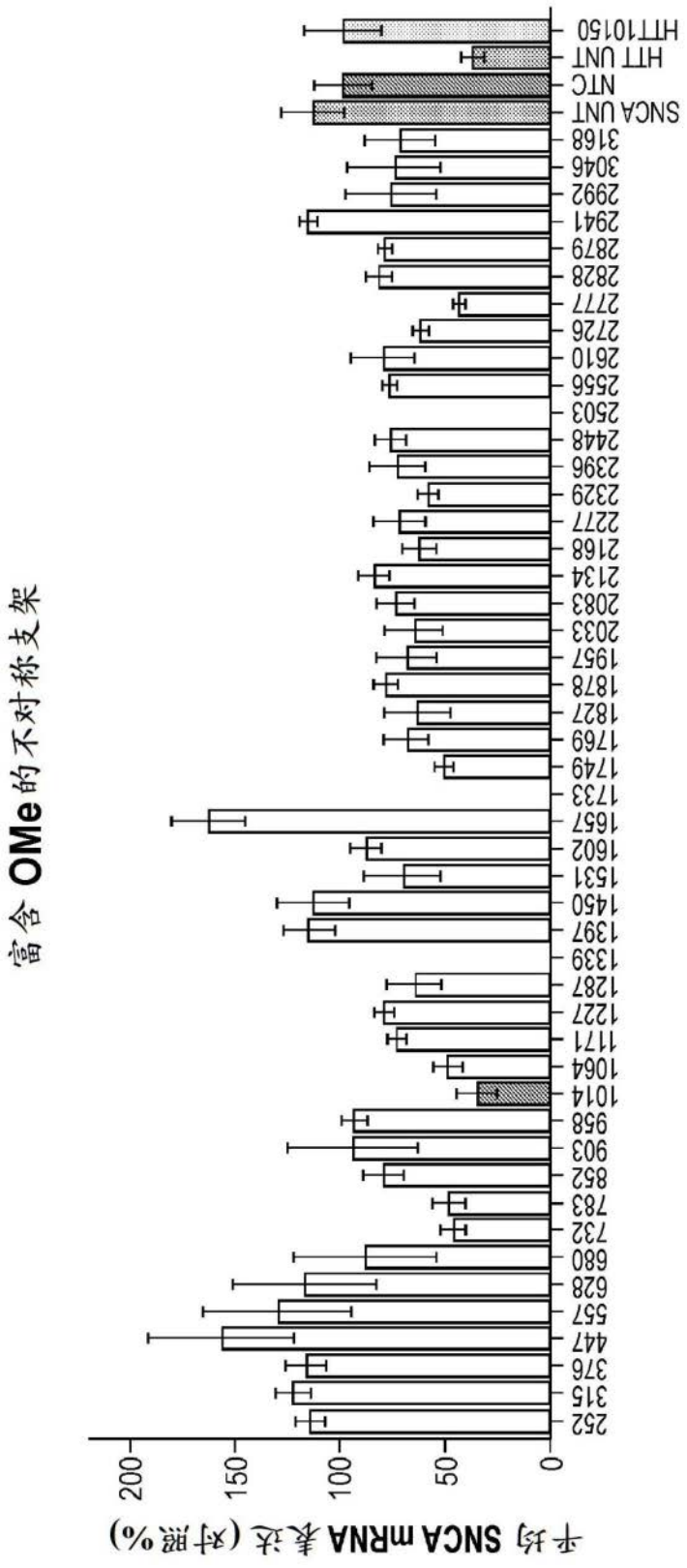

平均 SNCA mRNA 表达 (对照%)
0
50
100
150
200
252
315
376
447
557
628
680
732
783
852
903
958
1014
1064
1171
1227
1287
1339
1397
1450
1531
1602
1657
1733
1749
1769
1827
1878
1957
2033
2083
2134
2168
2227
2329
2396
2448
2503
2556
2610
2726
2777
2828
2879
2941
2992
3046
3168
SNCA UNT
NTC
HTT UNT
HTT10150
富含 OMe 的不对称支架

图4C

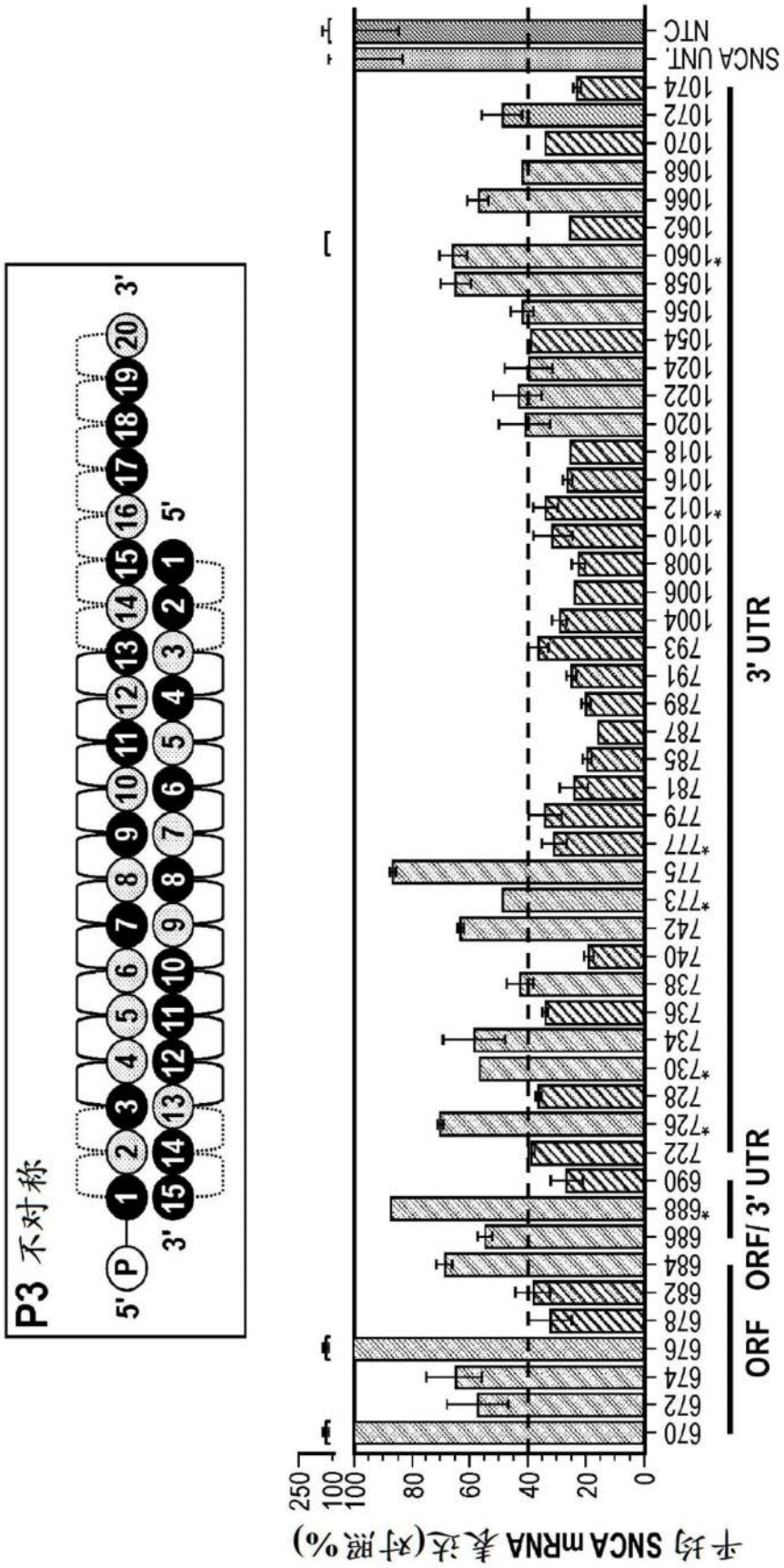
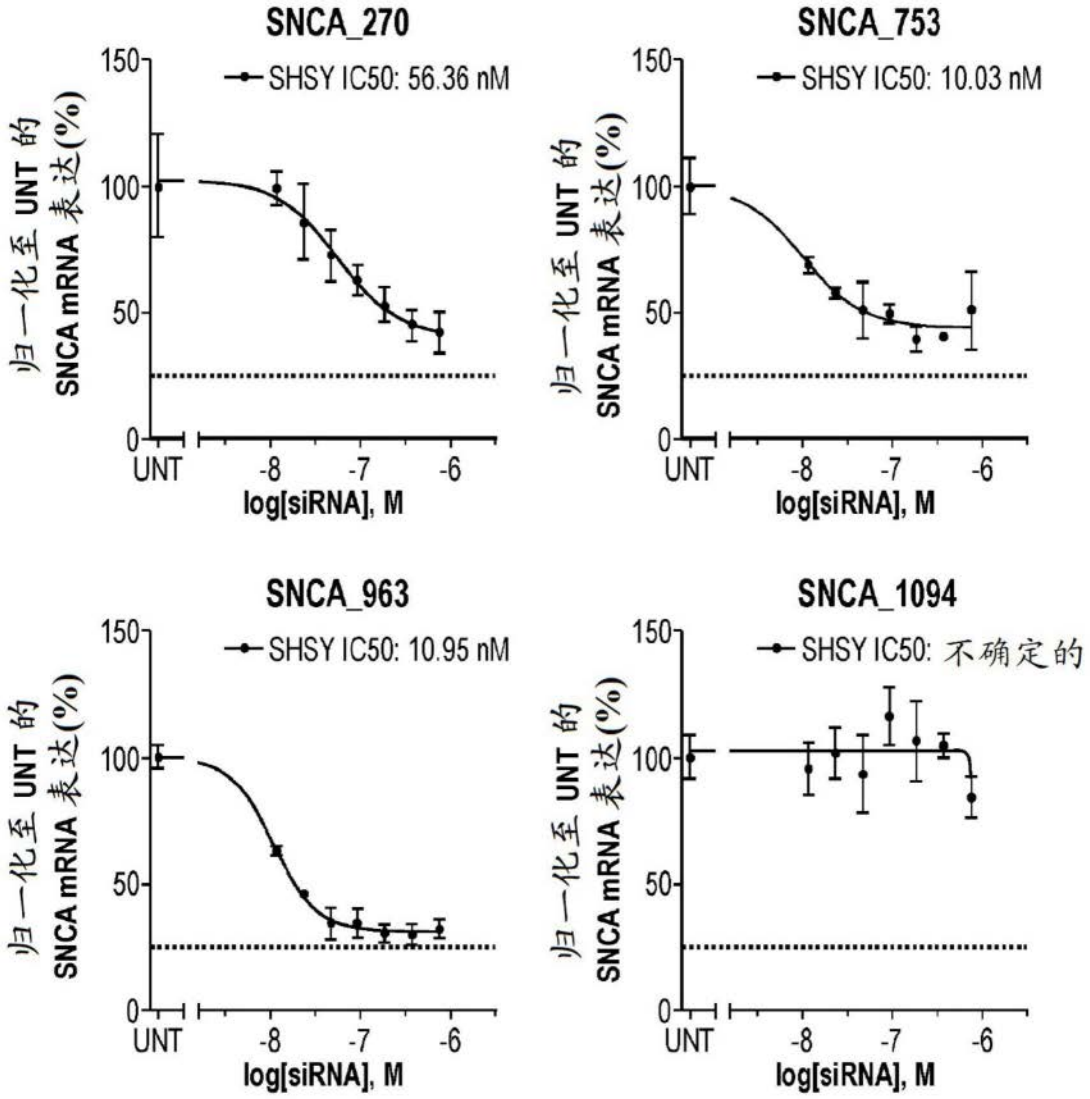

P3 不对称
5'
P
3'
3'
5'
平均 SNCA mRNA 表达(对照%)
250
100
100
80
60
40
20
0
NTC
SNCA UNT.
ORF
ORF/3' UTR
3' UTR

图5


SNCA_270
SHSY IC50: 56.36 nM
SNCA_753
SHSY IC50: 10.03 nM
SNCA_963
SHSY IC50: 10.95 nM
SNCA_1094
SHSY IC50: 不确定的
归一化至 UNT 的 SNCA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
UNT
-8
-7
-6
log[siRNA], M

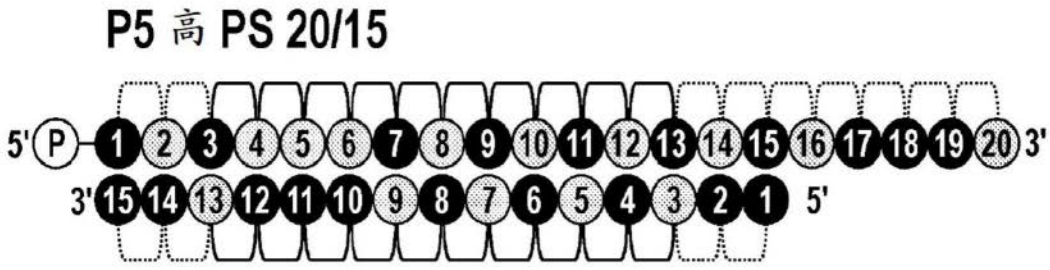

P5 高 PS 20/15
5'
P
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
3'
3'
15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
5'

图6

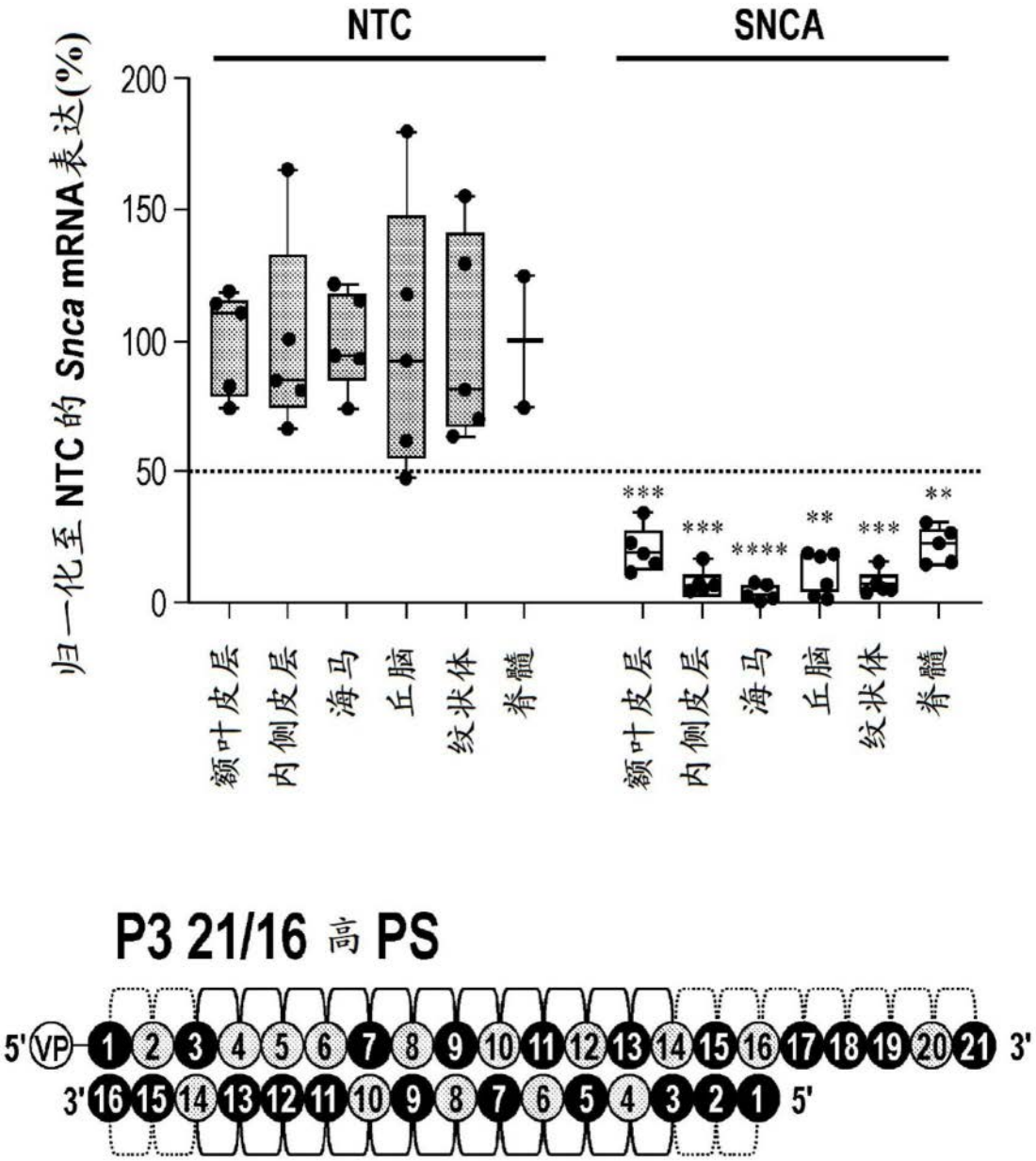
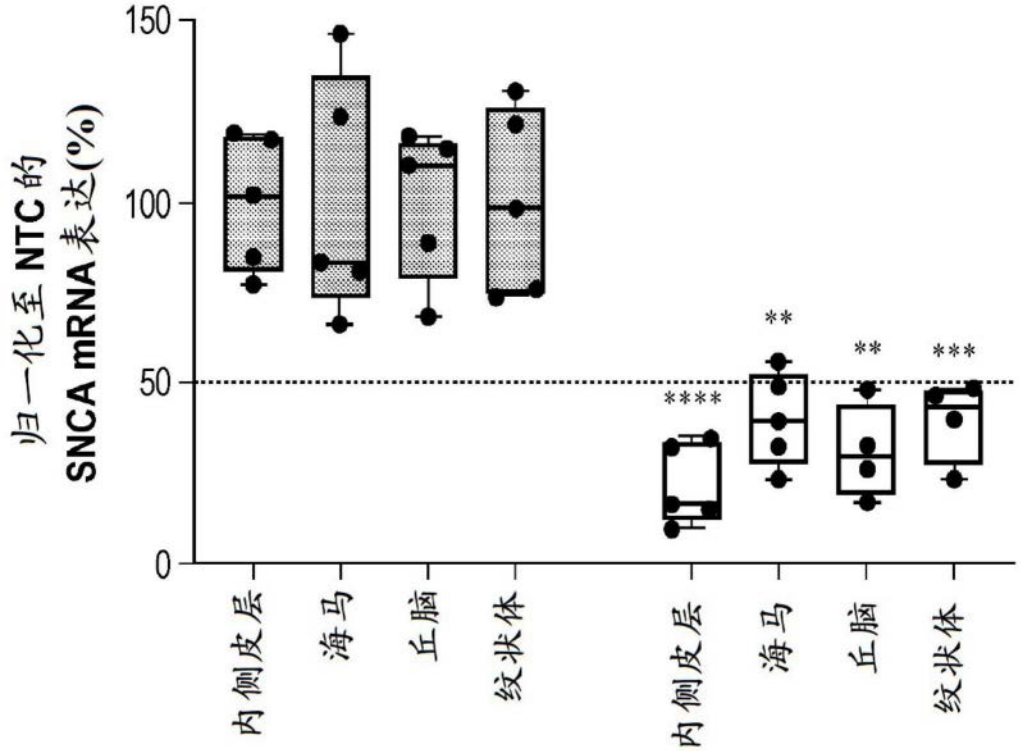

NTC
SNCA
归一化至 NTC 的 Snca mRNA表达(%)
200
150
100
50
0
额叶皮层
内侧皮层
海马
丘脑
纹状体
脊髓
额叶皮层
内侧皮层
海马
丘脑
纹状体
脊髓
P3 21/16 到 PS
5'
VP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
3'
3'
16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
5'

图7A


归一化至 NTC 的
SNCA mRNA 表达(%)
150
100
50
0
内侧皮层
海马
丘脑
纹状体
内侧皮层
海马
丘脑
纹状体
****
**
**
***

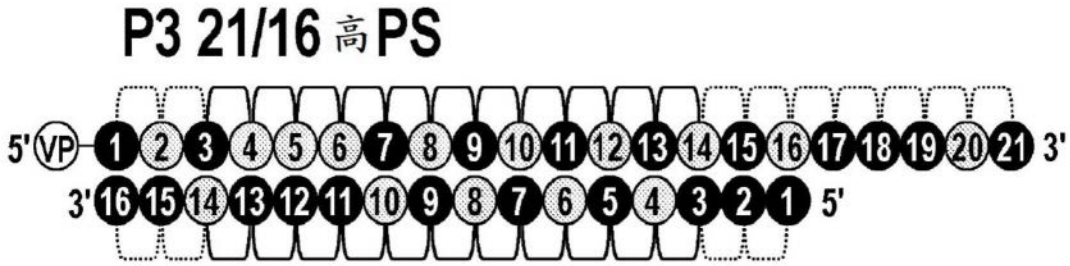

P3 21/16 对 PS
5'
VP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
3'
3'
16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
5'

图7B