

一种抑制 C5 基因表达的 dsRNA 分子及其应用

相关申请的交叉引用

本发明要求 2023 年 05 月 26 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 202310603955.5、发明名称为“一种抑制 C5 基因表达的 dsRNA 分子及其应用”的在先申请的优先权。该件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明属于分子生物学领域，涉及一种修饰的 dsRNA 分子及其应用，具体涉及一种抑制补体 C5 基因表达的 dsRNA 分子及其药物组合物，以及使用所述 dsRNA 分子或其药物组合物降低补体 C5 基因表达水平的方法。

背景技术

RNA 干扰(RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (dsRNA) 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象。RNAi 是真核生物中普遍存在的抵御病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达的监控机制。小干扰 RNA(small interfering RNA, dsRNA)是一类长度 19~30bp 的短双链 RNA 分子，是 RNAi 技术中重要的工具之一。自然机体内，在 dsRNA 进入细胞后会被 Dicer 酶特异性识别并切割成 21~23 个核苷酸长的小分子 RNA 的片段（即 dsRNA），切割产生的 dsRNA 片断解开变成单链，和某些蛋白质形成复合物（简称 RISC）。RISC 能结合到细胞内与 dsRNA 互补的 mRNA 上，并切割该 mRNA，使其被降解，造成蛋白质无法合成，产生基因“沉默”现象。工业生产中，人们更倾向于化学合成 dsRNA 并进行修饰，进一步提高 dsRNA 药物的稳定性和有效性。

补体(complement)是广泛存在于血清、组织液和细胞膜表面的一组不耐热的经活化后具有酶活性的蛋白质，包括 30 多种可溶性蛋白和膜结合蛋白，称补体系统。生理条件下，绝大多数补体成分以无活性酶前体形式存在，在不同激活物（细菌，抗原抗体复合物等）作用下发生一系列级联酶促反应被激活，表现出多种生物学活性，参与机体的特异性和非特异性免疫机制，表现为抗微生物防御反应，免疫调节及介导免疫病理的损伤性反应。补体系统的过度激活或抑制在多种类疾病的发病机制中扮演了重要角色，其影响范围之广，涵盖了从眼部疾病，牙周疾病等急性炎症，到癌症，自体免疫疾病，神经退行性疾病，肾脏疾病和慢性溶血性疾病等慢性病。已知的补体激活途径共三种，分别为经典途径（Classical

pathway)，旁路途径(Alternative pathway)和凝集素途径(Lectin pathway)。补体蛋白 C5 处于补体级联反应的末端，补体激活的所有途径均引起 C5 分子的裂解，从而产生过敏毒素 C5a 和 C5b。C5a 与受体结合发挥主要促炎性活性，C5b 与另外四种补体蛋白(C6、C7、C8 和 C9)结合形成复合物 C5b-9，C5b-9 通过形成膜攻击复合体(MAC)来引起细胞溶解，并且亚溶解型 MAC 和可溶性 C5b-9 还具有众多的非细胞溶解免疫功能(MAC)。从 C5 裂解产生的这两种补体效应子 C5a 和 C5b-9 是在不同疾病中负责传播和/或启动病理学的补体系统的关键组分，如：眼科疾病：老年性黄斑变性(AMD)等；CNS/ PNS 疾病：阿尔兹海默症(AD)、重症肌无力(gMG)等；肾脏疾病：非典型溶血尿毒综合征(aHUS)、C3 肾小球病(C3G)和 IgA 肾病等；血液疾病：阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、血栓性微血管病(TMA)等。因此，靶向 C5 蛋白可以调控由 3 种不同补体通路激活的补体信号。

在本领域中存在对患有补体组分 C5 相关联的疾病的患者进行替代疗法和联合疗法的需求。

发明内容

本发明提供一种抑制补体 C5 基因表达的 dsRNA 分子、试剂、试剂盒及其药物组合物，以及上述 dsRNA 分子、试剂、试剂盒或药物组合物在抑制或降低 C5 基因表达、预防或治疗补体介导的疾病或症状的方法和用途。所述 dsRNA 分子通过 RNAi 作用，促进 C5 mRNA 的序列特异性降解，实现抑制 C5 基因表达或降低 C5 基因表达的水平。

一个方面，本发明提供了一种用于抑制补体组分 C5 的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂，其中该 dsRNA 包含一个有义链和一个反义链，其中该有义链和/或反义链包含与表 2、表 6、表 9 中任意列出的有义序列和反义序列的核苷酸序列相差不多于 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸。

在一些实施方案中，本发明提供了一种 dsRNA 分子，其正义链的核苷酸序列如表 2 中序列所示，反义链的核苷酸序列如表 2 中序列所示。所述正义链和/或所述反义链包括 15-25 个核苷酸或由 15-25 个核苷酸组成，所述反义链与序列表中序列的 15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、

24 个或 25 个连续的核苷酸互补,所述双链区的长度为 15-25bp,优选为 19-21bp,所述 dsRNA 分子中的至少一个核苷酸经过修饰。

在一些实施方案中,所述有义链和反义链包含选自下组的序列,该组由名为以下各项的 dsRNA 分子组成: 5-E04、5-E05、7-E04、7-E05、17-E04、17-E05、32-E04、32-E05、85-E04、85-E05、GAL-E5、GAL-E17、GAL-E85-1、GAL-E85。

在一些实施方案中,所述修饰选自如下中任一种或多种: 锁核酸(LNA)修饰、开环或非锁(UNA)修饰、2'-甲氧基乙基修饰、2'-O-甲基修饰、2'-O-烯丙基修饰、2'-C-烯丙基修饰、2'-氟代修饰、2'-脱氧修饰、2'-羟基修饰、硫代磷酸骨架修饰、DNA 修饰、荧光探针修饰和配体修饰。

在一些实施方案中,所述 dsRNA 分子的正义链裸序列如(A1), (A2)或(A3)所示; 所述 dsRNA 分子的反义链裸序列如(A4) (A5)或(A6)所示:

(A1)GUGAUUCAAGUUUAUGGAUAC (SEQ ID NO: 5)

(A2) UGUGUAUUUGGAAGUUGUAUC (SEQ ID NO: 17)

(A3) GUGAAGAAAUGUUGUACGAU (SEQ ID NO: 85)

(A4) GUAUCCAUAACUUGAAUCACAA (SEQ ID NO: 105)

(A5) GAUACAACUCCAAAUACACAU (SEQ ID NO: 117)

(A6) AUCGUAACAACAUUUCUUCACUA (SEQ ID NO: 185)。

在一些实施方案中,本发明提供的 dsRNA 分子的修饰方式包括:(1)正义链: 长为 17-21nt, 如 21nt; 由 2'-O-甲基修饰区和 2'-氟代修饰区交替组成, 每个修饰区的长度为 1 至 3 个核苷酸; 5'末端和 3'末端起的第一个修饰区的修饰方式相同; (2)反义链: 长为 19-23nt, 如 23nt; 由 2'-O-甲基修饰区、2'-氟代修饰区、未修饰区或 DNA 区交替组成, 每个修饰区的长度为 1 至 5 个核苷酸; 且从 5'末端起的第 2 至 5 位的连续的核苷酸区, 和从 3'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区, 均是由硫代磷酸骨架连接。

在一些实施方案中,本发明的 dsRNA 分子的修饰方式包括: (1)正义链: 长为 21nt, 从 5'末端起 7 位、9-11 位具有 2'-氟代修饰, 其余位置为 2'-O-甲基修饰, 5'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区由硫代磷酸骨架连接; (2)反义链: 长为 23nt; 从 5'末端起 2 位、14、16 位以及任选的 6 位具有 2'-氟代修饰, 其余位置为 2'-O-甲基修饰, 5'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区, 以及 3'末端起的第

修饰基序 3 为 XmsXfsXmXmXmXfXmXmXmXmXmXmXfXmXfXmXmXmXmXmsXmsXm

修饰基序 4 为 XmsXfsXmXmXmXmXmXmXmXmXmXmXmXfXmXfXmXmXmXmXmsXmsXm;

并且其中, 各修饰基序中的 X 从 5' 至 3' 依次分别代表所述正义链从 5' 至 3' 的核糖核苷酸, Xm 表示经 2'-O-甲基修饰的核糖核苷酸; Xf 表示经 2'-氟代修饰的核糖核苷酸; s 表示前后两个核苷酸由硫代磷酸骨架连接。

在一些优选的实施方案中, 所述 dsRNA 分子选自如下所示的 dsRNA 分子:

5-E04

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 5;

反义链:

具有修饰基序 3 的 SEQ ID NO: 105。

5-E05

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 5;

反义链:

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO: 105。

7-E04

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 7;

反义链:

具有修饰基序 3 的 SEQ ID NO: 107。

7-E05

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 7;

反义链:

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO: 107。

17-E04

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 17;

反义链:

具有修饰基序 3 的 SEQ ID NO: 117。

17-E05

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 17;

反义链:

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO: 117。

32-E04

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 32;

反义链:

具有修饰基序 3 的 SEQ ID NO: 132。

32-E05

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 32;

反义链:

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO: 132。

85-E04

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 85;

反义链:

具有修饰基序 3 的 SEQ ID NO: 185。

85-E05

正义链:

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO: 85;

反义链:

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO: 185。

在一些优选的实施方案中，所述 dsRNA 分子为 85-E04、85-E05、5-E05 或 17-E05。

在一些实施方案中，所述 dsRNA 分子具有配体修饰。所述配体是由宿主细胞摄取的部分，配体修饰可改善 dsRNA 分子的细胞摄取、细胞内靶向、半衰期、或药物代谢或动力学性等性能。在一些实施方案中，与不经配体修饰的 dsRNA 相比，配体修饰的 dsRNA 针对选定靶标(如特定的组织类型、细胞类型、细胞器等)，如肝细胞，具有增强的亲和力或细胞摄取力。配体修饰不会干扰所述 dsRNA 的活性。

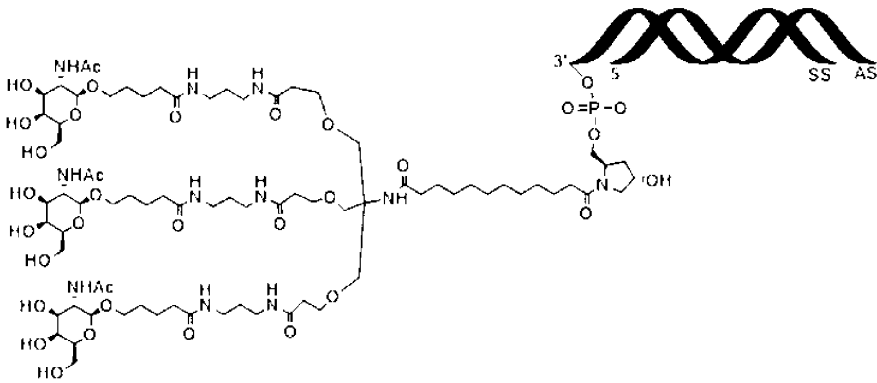
在一些实施方案中，所述配体修饰为对所述 dsRNA 分子的 3'末端、5'末端和/或序列中间进行一个或多个配体修饰。

在一些优选的实施方案中，所述配体选自如下：胆固醇、生物素、维生素、半乳糖衍生物或类似物、乳糖衍生物或类似物、N-乙酰半乳糖胺衍生物或类似物、N-乙酰葡萄糖胺衍生物或类似物。所述配体靶向细胞表面受体，包括半乳糖、半乳糖胺、乳糖、或 N-乙酰半乳糖胺/葡萄糖胺部分。所述配体优选靶向肝，尤其是肝的实质细胞。

在一些优选的实施方案中，所述配体靶向 ASGPR 受体。

在一些优选的实施方案中，所述配体还可为人血清白蛋白(HSA)、透明质酸、多肽等。

在一些优选的实施方案中，所述配体为 L96，所述 L96 结构及其与所述正义链核苷酸连接方式如下：



。

修饰基序4: XmsXfsXmXmXmXmXmXmXmXmXmXmXfXmXfXmXmXmXmXmsXmsXm;

修饰基序5: XmsXfsXfXmXfXmXfXmXfXmXmXfXmXfXmXfXmXmXmsXmsXmdTdT;

其中, Xm 表示经 2'-O-甲基修饰的核糖核苷酸; Xf 分别表示经 2'-氟代修饰的核糖核苷酸; s 表示前后两个核苷酸由硫代磷酸骨架连接。

应当理解, 在本申请中, 当描述 dsRNA 分子的正义链具有如修饰基序 1 或 2 所示的修饰, 或描述 dsRNA 分子的反义链具有如修饰基序 3、4 或 5 所示的修饰时, 是指各修饰基序中的 X 分别从 5'至 3'依次对应所述正义链或反义链从 5'至 3'的核糖核苷酸, 其中所述正义链或反义链从 5'至 3'的核糖核苷酸与其对应的所述修饰基序中的相同位置的 X 具有相同的核糖核苷酸修饰。例如, 当描述 dsRNA 分子的正义链具有如修饰基序 1 所示的修饰, 则是指所述 dsRNA 的分子的正义链从 5'至 3'的核糖核苷酸分别依次具有与修饰基序 1 中从 5'至 3'的各 X 相同的核糖核苷酸修饰, 即所述正义链从 5'末端起 7 位、9-11 位具有 2'-氟代修饰, 其余位置为 2'-O-甲基修饰, 5'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区由硫代磷酸骨架连接; 同理当描述 dsRNA 分子的反义链具有如修饰基序 4 所示的修饰, 则是指所述 dsRNA 的分子的反义链从 5'至 3'的核糖核苷酸分别依次具有与修饰基序 4 中从 5'至 3'的各 X 相同的核糖核苷酸修饰, 即所述反义链从 5'末端起 2 位、14 位及 16 位具有 2'-氟代修饰, 其余位置为 2'-O-甲基修饰, 5'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区, 以及 3'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区由硫代磷酸骨架连接。在一些实施方案中, 当描述 dsRNA 分子的正义链具有如修饰基序 1 或 2 所示的修饰, 或描述 dsRNA 分子的反义链具有如修饰基序 3、4 或 5 所示的修饰时, 所述 dsRNA 分子各位的核苷酸除与所述修饰基序中的 X 对应的核苷酸修饰以外不包含其他化学修饰。在一些实施方案中, 当描述 dsRNA 分子的正义链具有如修饰基序 1 或 2 所示的修饰, 或描述 dsRNA 分子的反义链具有如修饰基序 3、4 或 5 所示的修饰时, 所述 dsRNA 分子各位的核苷酸除与所述修饰基序中的 X 对应的核苷酸修饰以及正义链 3'端连接的配体以外, 不包含其他化学修饰。

在一些更优选的实施方案中, 所述配体修饰的 dsRNA 选自如下分子:

正义链：

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO.85，其 3' 端连接 L96。

反义链：

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO.185。

正义链：

具有修饰基序 1 的 SEQ ID NO.5，其 3' 端连接 L96。

反义链：

具有修饰基序 4 的 SEQ ID NO.105。

在一些优选的实施方案中，所述 dsRNA 分子的每条链中可有 0%-100% 的经修饰的核苷酸，如 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100% 经修饰的核苷酸。所述修饰可在悬垂区或双链区。所述修饰可用于改善 dsRNA 分子的体外或体内特征，例如稳定性、生物分布、抑制活性等。上述修饰可以组合使用。

在一些优选的实施方案中，所述 dsRNA 分子的每条链末端具有悬垂或是平末端；包括任一链或双链的 5' 和/或 3' 有 1-8 个悬垂，如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个悬垂，悬垂任意选自 U、A、G、C、T、dT。

在一些优选的实施方案中，所述 dsRNA 分子能够抑制人、食蟹猴的 C5 基因表达。

另一方方面，本发明还涉及与 dsRNA 相关的生物材料；

在一些实施方案中，所述 dsRNA 相关的生物材料可选自以下任意一种：

(A) 能够产生所述 dsRNA 的 DNA 分子；

(B) 能够表达所述 dsRNA 的载体；

(C) 试剂或试剂盒，含有所述 dsRNA 或者所述 DNA 分子或所述载体；

(D) 药物组合物，由所述 dsRNA 分子和药学上可接受的其它组分组成。

在一些实施方案中，所述药物组合物包括药理学有效量的本发明的 dsRNA 分子和其他药学可接受的组分；所述“有效量”是指能有效产生预期的药理学治疗效果的 dsRNA 分子的量。

在一些实施方案中，“其他组分”包括水、盐水、葡萄糖、缓冲液(如 PBS)，赋形剂、稀释剂、崩解剂、结合剂、润滑剂、甜味剂，调味剂，防腐剂或其组合。

另一方面，本发明涉及 dsRNA 或相关的生物材料用于预防和/或治疗由 C5 基因介导的疾病，或者用于缓解由 C5 基因介导的疾病的症状的用途。另一个方面，本发明涉及 dsRNA 或相关生物材料用于制备预防和/或治疗由 C5 基因介导的疾病，或者用于缓解由 C5 基因介导的疾病的症状的制剂或药物的用途。所述由 C5 基因介导的疾病包括但不限于：阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、哮喘、类风湿性关节炎(RA)、抗磷脂抗体综合征、狼疮肾炎、缺血-再灌注损伤、典型的或感染性溶血性尿毒症综合征(tHUS)、致密沉积物病(DDD)、视神经脊髓炎(NMO)、多灶性运动神经病(MMN)、多发性硬化(MS)、黄斑变性(例如，年龄相关的黄斑变性(AMD))、溶血、肝脏酶升高以及血小板低(HELLP)综合征、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)；自发性流产、寡免疫血管炎、大疱性表皮松解症、习惯性流产、先兆子痫、创伤性脑损伤、重症肌无力、冷凝集素病、皮炎大疱性类天疱疮、志贺毒素(Shiga toxin)大肠杆菌(E.coli)相关的溶血性尿毒症综合征、C3 肾病、抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关联的血管炎、体液和血管移植排斥、移植物功能异常、心肌梗塞、异源移植、脓毒症、冠状动脉病、皮炎、格雷夫斯病、动脉粥样硬化、阿耳茨海默氏病、全身性炎症反应脓毒症、脓毒性休克、脊髓损伤、肾小球性肾炎、桥本氏甲状腺炎、I 型糖尿病、牛皮癣、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、ITP、肺出血肾炎综合征、德戈斯病、抗磷脂综合征(APS)、灾难性 APS(CAPS)、心血管病症、心肌炎、脑血管疾病、外周血管疾病、肾血管疾病、肠系膜/肠血管疾病、血管炎、亨诺赫-舍恩莱因紫癜肾炎、全身性红斑狼疮相关联的血管炎、与类风湿性关节炎相关联的血管炎、免疫复合物血管炎、高安氏病、扩张性心肌病、糖尿病性血管病、川崎氏病(动脉炎)、与病毒感染相关的疾病(如 COVID-19 引起的新冠肺炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、与 C5 有关的肿瘤(例如：肝癌、肺癌等)、静脉气体栓子(VGE)以及支架放置、旋转式动脉粥样斑块去除术、膜性肾病、格-巴二氏综合征和经皮穿刺冠状动脉成形术(PTCA)后的再狭窄。

另一个方面，本发明涉及 dsRNA 或相关生物材料用于制备预防和/或治疗 IgA 肾病的用途。

在一些实施方案中，本发明还提供了如下任一所示的应用：

所述 dsRNA 或所述生物材料在抑制 C5 基因表达或者制备用于抑制 C5 基因表达的产品中的应用。

其中，所述抑制 C5 基因表达为抑制或降低体内或体外细胞中人、猴的 C5 基因表达水平；所述抑制 C5 基因表达为所述 C5 基因表达水平至少抑制或降低了 95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%。靶基因、靶 RNA 或靶蛋白水平的检测可用于预测或评估活性、效力或治疗结果。

在一些实施方案中，所述细胞为表达 C5 的哺乳动物细胞，如灵长类动物细胞、人细胞。更优选靶细胞中 C5 基因高水平表达。更优选：细胞来源于脑、肺脏、肝脏、肾脏、肿瘤。进一步优选：细胞为肝癌细胞。

在一些实施方案中，所述细胞选自 HepG2、HEP3B、Huh7、MHCC97H、Hela、食蟹猴原代细胞，人原代细胞。

在一些实施方案中，所述 dsRNA 分子的细胞终浓度为 0.001-1000nM，如 0.001-10nM，10-500nM，25-300nM 或 50-100nM。

在一些实施方案中，所述 dsRNA 或相关的生物材料可以通过任何合适的手段来施用，如胃肠外给药，胃肠给药包括肌肉、静脉、动脉、腹膜、或皮下注射；给药方式包括但不限于单次施用或多次施用。

在一些优选的实施方案中，所述给药剂量范围为 0.1mg/kg 至 100mg/kg，0.5mg/kg 至 50mg/kg、3mg/kg 至 36mg/kg、2.5mg/kg 至 20mg/kg、5mg/kg 至 15mg/kg，例如：3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg、25mg/kg、26mg/kg、27mg/kg、28mg/kg、29mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、35mg/kg、36mg/kg。

在一些实施方案中，单剂量的药物组合物可以长久持续，C5 表达下降持续至少 3、5、7、10、14 或更长时间。

在一些实施方案中，所述 dsRNA 或所述生物材料在降低血清中 C5 或者制备用于降低血清中 C5 的产品中的应用。

其中，所述降低血清中 C5 浓度为降低人或猴血清中 C5 浓度；例如：血清 C5 的浓度或含量至少减少了 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%。

在一些实施方案中，所述 dsRNA 或所述生物材料在预防和/或治疗由 C5 基因介导的疾病或者制备用于预防和/或治疗由 C5 基因介导的疾病的产品的应用；

在一些实施方案中，所述 dsRNA 或所述生物材料在缓解由 C5 基因介导的疾病的症状或者制备用于缓解由 C5 基因介导的疾病的症状的产品中的应用。

在一些实施方案中，所述由 C5 基因介导的疾病优选免疫相关性、血液相关性、代谢相关性疾病。

在一些实施方案中，所述 C5 基因介导的疾病或症状可由 C5 基因过量表达、C5 蛋白过量产生引起，并可通过下调 C5 基因表达进行调节。所述治疗是指 C5 基因介导的疾病或症状的缓解、减轻或治愈，如血清 C5 水平的降低。例如：血清 C5 的含量或浓度减少了 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%。

在一些实施方案中，本发明同样所述经配体修饰的 dsRNA 分子在制备肝脏靶向性药物中的应用；所述肝脏靶向性药物可用于治疗由 C5 基因介导的肝脏疾病。

另一方面，本发明还提供了用于治疗患有将受益于抑制或减少 C5 基因的表达的病症的受试者的方法和/或联合疗法，该病症例如补体组分 C5 相关联的疾病，如阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)和非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)，这些方法和/或联合疗法使用了影响补体组分 C5 基因的 RNA 转录物的 RNA 诱导沉默复合体(RISC)介导的裂解的 RNAi 组合物。

本发明的这些联合疗法包括向患有一种补体组分 C5 相关联的疾病的患者给予本发明的一种 RNAi 试剂和一种另外的治疗剂，如抗补体组分 C5 抗体或其抗原结合片段，例如依库珠单抗。本发明的这些联合疗法通过使 C5 mRNA 与本发明的一种 RNAi 试剂靶向来使该受试者中的 C5 水平降低(例如，约 30%、35%、

40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约 99%), 并且因此, 允许治疗该受试者所要求的治疗(或预防)有效量的依库珠单抗减少, 从而降低治疗成本并且容许更简单和更方便的给予依库珠单抗的方法, 如皮下给予。

在一些实施方案中, 该另外的治疗剂可以是一种抗补体组分 C5 抗体或其抗原结合片段或衍生物。

本发明的创新性体现在: 1、经修饰的 dsRNA 分子具有高稳定性和高抑制活性; 2、经配体修饰的 dsRNA 分子在保持了较高的抑制活性和稳定性的同时, 还具有较好的肝靶向性和促进细胞内吞的能力, 可降低对其他组织或器官的影响以及减少 dsRNA 分子使用量, 可达到减轻毒性和降低成本的目的; 另外, 配体修饰的 dsRNA 分子无需转染试剂即可进入靶细胞和靶组织, 降低了转染试剂的负性影响, 如细胞或组织毒性, 从而为靶向治疗提供可能。尽管能够尝试进行许多修饰来改善 dsRNA 的性能, 然而这些尝试通常很难阐释既介导 RNA 干扰又在血清中具有提高的稳定性(例如, 具有对核酸酶的增加的抗性和/或延长的持续时间), 本发明的经修饰的 dsRNA 具有高稳定性的同时保持了高的抑制活性, 取得了预料不到的技术效果。

定义:

siRNA 中能与靶基因 mRNA 互补配对的一条链为反义链 (Antisense strand, AS), 另一条链称为有义链或正义链 (Sense strand, SS)。

“G”、“C”、“A”、“T”和“U”通常分别代表以鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶为碱基的核苷酸。

REL(Relative expression level): mRNA 相对表达水平

GalNAc: N-乙酰半乳糖胺

修饰: N=RNA; dN=DNA; Nm=2 'OMe 修饰; Nf=2 'F 修饰; (s)=PS 骨架(即 5'-硫代修饰的磷酸骨架)

与术语 “C5”可互换使用的“补体组分 C5”是指熟知的基因和多肽, 该基因和多肽在本领域中又称为 Prepro-C5、ECLZB、CPAMD4、C3 和 PZP 样含 α -2-巨球蛋白结构域的蛋白质、过敏毒素 C5a 类似物、溶血补体(Hc)以及补体 C5; 人 C5 mRNA 转录物的序列可以例如在基因库登录号 GI:38016946(NM_001735.2;

SEQ ID NO:207)中找到。恒河猴 C5 mRNA 的序列可以例如在基因库登录号 GI:297270262(XM_001095750.2; SEQ ID NO:208)中找到。小鼠 C5mRNA 的序列可以例如在基因库登录号 GI:291575171(NM_010406.2; SEQ ID NO:209)中找到。大鼠 C5mRNA 的序列可以例如在基因库登录号 GI:392346248(XM_345342.4; SEQ ID NO:210)中找到。使用公共可获得的数据库例如基因库容易地获得 C5 mRNA 序列的另外实例。

通常，dsRNA 分子的每个链的大多数核苷酸是核糖核苷酸，但如在此所详细描述，每个链或这两个链还可以包括一个或多个非核糖核苷酸，例如脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。另外，如在本说明书中所使用，“RNAi 试剂”可以包括具有化学修饰的核糖核苷酸；RNAi 试剂可以在多个核苷酸上包括许多修饰。此类修饰可以包括在此披露的或在本领域中已知的所有类型的修饰。如在 siRNA 类型分子中所使用的任何此类修饰出于本说明书和权利要求的目的，涵盖在“RNAi 试剂”中。

附图说明

图 1： dsRNA 高通量筛选结果图。

图 2： 未修饰候选 dsRNA 序列在 HepG2 细胞中单次筛选结果。

图 3： 修饰 dsRNA 序列在 HepG2 细胞中单次筛选结果。

图 4： 修饰 dsRNA 在 HepG2 细胞中的 IC₅₀ 结果。

图 5： GalNAc 偶联 dsRNA 在 HepG2 细胞中单剂量筛选结果。

图 6： GalNAc 偶联 dsRNA 在食蟹猴原代肝细胞中单剂量筛选结果。

图 7： 体内 1mpk 单次给药 C5 含量检测结果。

图 8： 体内剂量梯度单次给药 C5 含量检测结果。

图 9： 体内食蟹猴单次给药 C5 含量检测结果。

图 10： 两种修饰基序反义链（修饰基序 3 和修饰基序 4）的比较。

具体实施方式

实施例 1、C5-dsRNA 活性筛选实验

一、dsRNA 设计

根据人 C5 mRNA 序列，选择不同位点设计多 C5 dsRNAs，设计的所有单个 dsRNA 均能靶向靶基因的所有转录本(如表 1)，以上序列(如表 2)经序列相似性软件比对与其他所有非靶标基因序列有最低同源性。本发明中采用阿里拉姆制药公司（Alnylam Pharmaceuticals）临床在研 C5 dsRNA 产品 cemdisiran（专利序列 AD-62643）的序列作为本发明阳性参考序列，基于相关序列的状态（非修饰或修饰，缀合配体等），本发明中分别命名为 PC，PC-ESC 或 GAL-PC。

表 1：靶基因

靶基因	物种	Gene ID	NM_ID
C5	Homo sapiens(人)	727	NM_001735.3 SEQ ID NO.211
C5	Macaca fascicularis（食蟹猴）	102125658	XM_005580915.3 SEQ ID NO.212

表 2：高通量筛选 dsRNA 序列

名称 编号	有义序列(5'→3')	SEQ ID NO:	无义序列(5'→3')	SEQ ID NO:
1	AUUUCAGCACCAAAAAUAUUC	1	GAAUAUUUUUGGUGCUGAAAUGA	101
2	UUCAGCACCAAAAAUAUCCG	2	CGGAUAUUUUUGGUGCUGAAAU	102
3	UCAGCACCAAAAAUAUCCGU	3	ACGGAUAUUUUUGGUGCUGAAA	103
4	UAUUGUGAUUCAAGUUUAUG G	4	CCAUAAACUUGAAUCACAAUAUU	104
5	GUGAUUCAAGUUUAUGGAUA C	5	GUAUCCAUAACUUGAAUCACAA	105
6	GAUUCAAGUUUAUGGAUACA C	6	GUGUAUCCAUAACUUGAAUCAC	106
7	AGCAUUUGAUGCAACAAUCUC	7	GAGAUUGUUGCAUCAAUGCUUC	107
8	GCAACAAUCUCUAUUAAAAG U	8	ACUUUUAAUAGAGAUUGUUGCAU	108
9	CAACAAUCUCUAUUAAAAGU U	9	AACUUUUAAUAGAGAUUGUUGCA	109
10	UCUCUAUUAAAAGUUAUCCU G	10	CAGGAUAACUUUUAAUAGAGAUU	110
11	AGUUAUCCUGAUAAAAAAUU U	11	AAAUUUUUUAUCAGGAUAACUUU	111
12	AUUUAUCCUCAGAGAAUAAA U	12	AUUUAUUCUCUGAGGAUAAAUGA	112

13	UUAUCCUCAGAGAAUAAAU C	13	GAAUUUAUUCUCUGAGGAUAAAU	113
14	GAGAAUAAAUUCCAAAACUC U	14	AGAGUUUUGGAAUUUAUUCUCUG	114
15	UCUUAACAAUACAACCAAAAC	15	GUUUUGGUUGUAUUGUUAAGAUAU	115
16	CCCAGUUUCUUAUGUGUAUU U	16	AAAUACACAUAAAGAAACUGGGUU	116
17	UGUGUAUUUGGAAGUUGUAU C	17	GAUACAACUCCAAAUACACAU	117
18	AGUUGUAUCAAGCAUUUUU C	18	GAAAAAUGCUUUGAUACAACUUC	118
19	CUUCAUUCAUACAGACAAACC	19	GGUUUGUCUGUAUGAAUGAAGAG	119
20	ACAGACAAACCUGUUUAUACU	20	AGUAUAAACAGGUUUGUCUGUAU	120
21	CAGACAAACCUGUUUAUACUC	21	GAGUAUAAACAGGUUUGUCUGUA	121
22	AACCUGUUUAUACUCCAGACC	22	GGUCUGGAGUAUAAACAGGUUUG	122
23	AGAGUUUAUUCGUUGAAUGA C	23	GUCAUUAACGAAUAAACUCUAA	123
24	CUGUCUUAACUUUCAUAGAUC	24	GAUCUAUGAAAGUUAAGACAGUU	124
25	GUCUUAACUUUCAUAGAUCU	25	AGGAUCUAUGAAAGUUAAGACAG	125
26	UUGAUCAUAUUGGAAUUAUC U	26	AGAUAUUCCAAUAUGAUCAAUU	126
27	UGAUCAUAUUGGAAUUAUCU C	27	GAGAUAAUCCAAUAUGAUCAAU	127
28	UCAUAUUGGAAUUAUCUCUU U	28	AAAGAGAUAAUCCAAUAUGAUC	128
29	UUUUCCUGACUUCAAGAUUCC	29	GGAAUCUUGAAGUCAGGAAAAGA	129
30	ACUUCAAGAUUCCGUCUAAUC	30	GAUUAGACGGAAUCUUGAAGUCA	130
31	CUUCAAGAUUCCGUCUAAUCC	31	GGAUUAGACGGAAUCUUGAAGUC	131
32	UUCCGUCUAAUCCUAGAU AUG	32	CAUAUCUAGGAUUAGACGGAAUC	132
33	UAAUCCUAGAU AUGGUAUGU G	33	CACAUACCAUAUCUAGGAUUAGA	133
34	UAAUAUAAAGAGGACUUUU C	34	GAAAAGUCCUCUUUAU AUUUAGC	134
35	AUUACUAUAAAAGCAAGAU U	35	AUAUCUUGC UUUUAUAGUAAUUU	135
36	AAGCAAGAU AUUUUUAUAAU A	36	UAUUAUAAAAAU AUCUUGC UUUU	136
37	UUUUAUAAUAAAGUAGUCAC U	37	AGUGACUACUUAUUAUAAAAAU	137

38	CACUGAGGCUGACGUUUUAU U	38	AUAUAAAACGUCAGCCUCAGUGAC	138
39	ACUGAGGCUGACGUUUUAU C	39	GAUAUAAAACGUCAGCCUCAGUGA	139
40	AAAGAUGAUCAAAAAGAAU G	40	CAUUUCUUUUUGAUCAUUUUUU	140
41	AAAACACAAUGUUGAUAAA G	41	CAUUUAUCAACAUGUGUUUUGC	141
42	AAACACAAUGUUGAUAAA G	42	CCAUUUAUCAACAUGUGUUUUG	142
43	UGUCAUACUACAGUUUAG G	43	CUUCUAAAACUGUAGUAUGACAGU	143
44	AAGAUUUAAACAACAAGU C	44	GGUACUUGUUGUUUAAAUCUUCU	144
45	GAUUUAAACAACAAGUAC U	45	AAGGUACUUGUUGUUUAAAUCU	145
46	AAACAACAAGUACCUUUUA U	46	AUAUAAAAGGUACUUGUUGUUAA	146
47	AACAACAAGUACCUUUUA U	47	AAUAUAAAAGGUACUUGUUGUU	147
48	ACAACAAGUACCUUUUA G	48	CAAUAUAAAAGGUACUUGUUGUU	148
49	CAACAAGUACCUUUUAU U	49	GCAAUAUAAAAGGUACUUGUUGU	149
50	CUUUUAUUGCUGUAACAG C	50	GACUGUACAGCAAUAUAAAAGGU	150
51	CAGAAUACCUGGCAUCAA U	51	AUUUGAUGCCAGGUAUUUCUGCC	151
52	CAGGUUAAAGAUUCGCU C	52	GUCAAGCGAAUCUUUAACCUGCA	152
53	AGGUUAAAGAUUCGCU C	53	GGUCAAGCGAAUCUUUAACCUGC	153
54	ACGGUGCUGGAGUUUAA C	54	GACAUUAAACUCCAGCACCGUCA	154
55	CUGGAGUUUAAUGUCAAA U	55	AGUUUUGACAUUAAACUCCAGCA	155
56	UGGAGUUUAAUGUCAAA G	56	CAGUUUUGACAUUAAACUCCAGC	156
57	GGAAGGUUACCGAGCAA G	57	CUAUUGCUCGGUAACCUUCCUG	157
58	GGAAGGUUACCGAGCAA C	58	GCUAUUGCUCGGUAACCUUCCCU	158
59	CCGAGCAAUAGCAUACU C	59	GAUGAGUAUGCUAUUGCUCGGUA	159
60	AUAUUGAUUGGACUGAU A	60	GGUUAUCAGUCCAAUCAAUUAA	160

	C			
61	AUU AUUGUUACCCCCAAAAGC	61	GCUUUUGGGGGUAACAAUAAU AU	161
62	CCCCAAAGCCCAUUAUUGAC	62	GUCAAUAUAUGGGCUUUUGGGGG	162
63	CCAUAUAUUGACAAAAUAAC U	63	AGUUAUUUUGUCAUAUAUGGGC	163
64	CAUAUAUUGACAAAAUAACU C	64	GAGUUAUUUUGUCAUAUAUGGG	164
65	GACAAAAUAACUCACUAUAA U	65	AUUAUAGUGAGUUAUUUUGUCA	165
66	ACAAAAUAACUCACUAUAAU U	66	AAUUAUAGUGAGUUAUUUUGUCA	166
67	CAAAUAACUCACUAUAAUU A	67	UAAUUAUAGUGAGUUAUUUUGUC	167
68	AACUCACUAUAAUUACUUGA U	68	AUCAAGUAAUUAUAGUGAGUUAU	168
69	UUUAUCCAAGGGCAAAAUUA U	69	AUAAUUUUGCCCUUGGAUAAAAU	169
70	UUAUCCAAGGGCAAAAUUAU C	70	GAUAAUUUUGCCCUUGGAUAAAA	170
71	UAUCCAAGGGCAAAAUUAUCC	71	GGAUAAUUUUGCCCUUGGAUAAA	171
72	GGGCAAAAUUAUCCACUUUG G	72	CCAAAGUGGAUAAUUUUGCCCUU	172
73	GGCAAAAUUAUCCACUUUGGC	73	GCCAAAGUGGAUAAUUUUGCCCU	173
74	AAUUUUCAGAUCAUCUUAU C	74	GAUAAGAUGCAUCUGAAAAUUUC	174
75	AUCUUAUCAAGUAUAAACA U	75	AUGUUUAUACUUUGAUAGAUGC	175
76	UCUUAUCAAGUAUAAACA U	76	AAUGUUUAUACUUUGAUAGAUG	176
77	CUUAUCAAGUAUAAACA C	77	GAAUGUUUAUACUUUGAUAGAUA	177
78	UGAUUCAGUCUGGUUAAAU U	78	AUAUUUAACCAGACUGAAUCAGA	178
79	GAUUCAGUCUGGUUAAAU U	79	AAUAUUUAACCAGACUGAAUCAG	179
80	UUAAUAUUGAAGAAAAAUG U	80	ACAUUUUUCUCAAUAUUUAACC	180
81	AACUGUGUCUCUAAUAUGG C	81	GCCAUAAUAAGAGACACAGUUUG	181
82	UUGGAAAGAGUAUUUCAAU C	82	GAAUUGAAAUAUCUCUUCCAAGG	182

83	AAAAGAAGAUAGAAGAAUA G	83	CUAUUUCUUCUAUCUUCUUUUGC	183
84	AAAUAGCUGCUAAAUAUAAA C	84	GUUUUAUAUUUAGCAGCUAUUUCU	184
85	GUGAAGAAAUGUUGUUACGA U	85	AUCGUAACAACAUUUCUUCACUA	185
86	UGAAGAAAUGUUGUUACGAU G	86	CAUCGUAACAACAUUUCUUCACU	186
87	UUCACUGAAUGUUGUGUCGU C	87	GACGACACAACAUUCAGUGAAAG	187
88	GUGCUAAUAUCUCUCAUAAA G	88	CUUUUAUGAGAGAUUUAGCACGG	188
89	AAGACCCUGUUACCAGUAAGC	89	GCUUACUGGUAACAGGGUCUUCA	189
90	GCCAGAAAUUCGGAGUUAUU U	90	AAAUAACUCCGAAUUUCUGGCUU	190
91	CCAGAAAUUCGGAGUUAUUU U	91	AAAAUAACUCCGAAUUUCUGGCU	191
92	AGAAAUUCGGAGUUAUUUUC C	92	GGAAAAUAACUCCGAAUUUCUGG	192
93	AAGAAAACAGUUGCAGUUUG C	93	GCAAACUGCAACUGUUUUCUUCU	193
94	UUUCAAAACACUGGUAUAUGU G	94	CACAUAUACCAGUGUUUGAAAUG	194
95	CUUCCUGGAAAUGAAUAUACC	95	GGUAUAUUCAUUUCAGGAAGAC	195
96	AACUGUUUACAACUAUAGGA C	96	GUCCUAUAGUUGUAAACAGUUCC	196
97	ACUGUUUACAACUAUAGGAC U	97	AGUCCUAUAGUUGUAAACAGUUC	197
98	CUGUUUACAACUAUAGGACU U	98	AAGUCCUAUAGUUGUAAACAGUU	198
P C	AAGCAAGAUUUUUUAUAAU A	99	UAUUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU TT	100

二、dsRNA（缀合物）的合成与纯化

本发明中的 dsRNA 仅含核糖核苷酸或 2'-甲氧基或 2'-氟修饰寡核苷酸，其按照理论产量 1 μ mol 合成规格完成，选用 1 μ mol 通用的 Frit 载体(1000Å =100nm，逗点生物)或带保护基的 GalNAc 衍生物 L96 的 CPG 载体（凯莱英）在 LK-192X 合成仪上制备所有的寡核苷酸。根据序列需要，将对应核苷的所有亚磷酰胺单体(均按照 1:40(g/mL)的无水乙腈溶剂稀释，偶联时间为 3 min，共两次偶联。使用 3% TCA 进行脱保护，采用 0.3 M 苄硫基四唑乙腈溶液进行活化，并通过

CAPA/CAPB 和 50 mM I_2 溶液分别进行盖帽和氧化。在去三苯甲基合成 (Trityl-off synthesis) 后, 将固相载体转移至 2mL 离心管中, 加入 1.2mL 氨水置于 65°C 烘箱中加热 3h, 脱去保护基。然后冷却至室温, 真空浓缩 30min, 将溶液通过 0.22 μ m 滤膜过滤至进样瓶中, 采用半制备反相纯化仪进行单链纯化, 洗脱梯度为 7%~30%(ACN:100 mM TEAA), 时间 10 min; 流速: 5 mL/min, 纯化制备后真空浓缩, 室温旋干。最后用水溶解样品, 在 GE Hi-Trap 脱盐柱上将每种溶液脱盐以洗脱最终的寡聚核苷酸产物。分别使用 ESI-MS 和 IEX HPLC 确认所有的特性和纯度。采用酶标仪紫外定浓, 将等摩尔量的有义链和反义链混合并至新的发货管中, 95 °C 加热 5 min, 并缓慢退火至室温, 最后采用真空浓缩仪室温旋干得到最终产品。

三、C5-dsRNA 体外活性高通量筛选检测

1、构建检测质粒

采用 psicheck-2 质粒构建重组质粒(金斯瑞生物科技)), 含有所有待测 C5 dsRNA 的目标序列, 克隆位点为 psicheck-2 质粒的 5'XhoI、3'NotI 位点。

2、C5 dsRNA 和重组质粒共转染 293T 细胞

所有细胞均购买自 ATCC; 其他试剂均可商购。

细胞系转染: 细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 于5%CO₂、37°C 恒温培养箱中培养, 待细胞处于对数生长期且状态良好时(70%汇合度)时铺板转染。调整293T人胚肾细胞浓度为 3×10^5 /ml, 96孔板中每孔加入0.1ml细胞溶液, 培养过夜。配制转染复合物: 将8 μ L Opti-MEM, 8ng重组质粒和2 μ L 10nM dsRNA 混合, 9.5 μ L Opti-MEM和0.5 μ L Lipofectamine 2000转染试剂混合, 静置5min, 然后将以上两个混合物混合, 静置20min。将上述转染复合物加入96孔板中, 于5% CO₂、37°C恒温培养箱中孵育6h。吸出上清, 每孔加入0.1mL完全培养基, 继续培养24h收样品。实验均有3次重复, 并将仅转染试剂对照组 (Mock组) mRNA 相对表达水平设置为 100%, 其他组数值均为相对Mock组的相对表达活性或表达量。

3、DLR检测分析

使用Dual-Luciferase Reporter Assay System试剂盒(Promega)进行检测, 根据试剂盒说明书裂解收集处理细胞, 用Infinite Eplex酶标仪(TECAN)依次检测萤火

虫(*Photinus pyralis*)萤光素酶和海肾(*Renilla reniformis*)萤光素酶的荧光强度，计算海肾(*Renilla reniformis*)萤光素酶与萤火虫(*Photinus pyralis*)萤光素酶荧光强度的比值，并以Mock组为对照做归一化处理，Mock组活性为100%。表3为DLR检测的结果，C5 dsRNA试验组相对Mock组的双萤光素酶报告基因表达水平的平均值。

表3： 293T细胞中高通量筛选结果

名称编号	相对活性%（10nM）
1	10.7
2	53.0
3	41.2
4	4.2
5	7.9
6	24.5
7	5.9
8	10.2
9	16.6
10	27.1
11	13.1
12	14.7
13	59.1
14	17.2
15	21.6
16	16.0
17	10.6
18	17.3
19	22.3
20	41.8
21	33.4

22	27.3
23	14.9
24	19.6
25	82.8
26	23.8
27	41.3
28	31.2
29	42.2
30	19.1
31	21.0
32	11.3
33	35.0
34	21.1
35	14.4
36	17.8
37	26.7
38	15.4
39	13.8
40	13.0
41	12.0
42	13.6
43	16.9
44	11.3
45	35.0
46	21.0
47	17.2
48	21.3
49	21.8
50	18.9

51	14.9
52	18.6
53	20.0
54	53.9
55	163.5
56	141.8
57	88.7
58	50.5
59	13.0
60	160.9
61	42.4
62	28.5
63	37.9
64	34.3
65	25.6
66	28.9
67	27.2
68	45.0
69	25.2
70	44.6
71	49.0
72	31.7
73	30.0
74	29.7
75	60.5
76	59.0
77	50.5
78	24.2
79	39.7

80	97.7
81	38.0
82	40.2
83	32.1
84	12.3
85	5.6
86	21.2
87	23.9
88	24.1
89	41.5
90	23.5
91	27.0
92	26.5
93	13.5
94	71.3
95	28.5
96	24.9
97	17.5
98	18.6
PC	9.7

如图1所示，在293T细胞中进行的C5 dsRNA筛选发现了多条优选序列，保留了效果较好且序列同时靶向人和食蟹猴C5的5条dsRNA分子作为候选序列，分别为编号为5，7，17，32，85的dsRNA分子。同时，未修饰的阳性对照组PC也表现出对较优的抑制活性。

四、靶mRNA水平的实时定量PCR分析

1、C5 dsRNA转染HepG2细胞

HepG2细胞在含10％胎牛血清的DMEM培养基中，于5％CO₂、37℃恒温培

养箱中培养，待细胞处于对数生长期且状态良好时(70%汇合度)时铺板转染。调整细胞密度，每孔 2×10^5 个细胞铺种到24孔板中。配制转染复合物：将250 μ L Opti-MEM和5 μ L 1nM或0.1nM dsRNA混合，250 μ L Opti-MEM和1.5 μ L RNAiMax转染试剂混合，静置5min，然后将以上两个混合物混合，静置20min。将上述转染复合物加入24孔板中，于5%CO₂、37℃恒温培养箱中孵育6h。吸出上清，每孔加入1mL完全培养基，继续培养24h。

2、实时荧光定量PCR分析

转染 24h 后裂解细胞，采用诺唯赞柱提法 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒（参考诺唯赞 RC112-01 说明书）提取细胞总 RNA。采用 Takara PrimeScript RT Master Mix RR036Q 逆转录为 cDNA。表 3 为 QPCR 引物序列信息，以人 GAPDH 基因为内参基因，使用美国 Bio-Rad 公司 CFX96 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。实验中以 Mock 组为对照做归一化处理，Mock 组 C5 mRNA 表达量为 1。

表4： QPCR引物序列信息

引物名称	上游引物序列(5' to 3')	SEQ ID NO:	下游引物序列(5' to 3')	SEQ ID NO:
人-GAPDH	GATTTGGTCGTATTGGGCGC	199	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	200
人-C5	ACTGAATGTTGTGTCGTCGC	201	CCAACGCCTTGAATTCCCA	202
猴-C5	CTGAAGCCTGGGATTCCATA	203	CGTCACTCCAGATGGGAGAT	204
猴-GAPDH	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	205	TGACGATCTTGAGGCTGTTG	206

4、数据分析

PCR反应结束后，一个样品的9个重复(每个样品3个转染重复，3个qPCR时重复)的Ct误差在±0.5，以参照基因作为标准并通过CFX96软件进行相对定量分析并通过GarphPad软件进行统计分析。表5为将上述筛选到的5条候选dsRNA分子进一步在HepG2细胞中的验证结果。

表5 未修饰dsRNA在HepG2细胞中单剂量筛选

名称编号	C5 mRNA 相对表达量 (1nM)	平均误差 (±SEM)	C5 mRNA 相对表达量 (0.1nM)	平均误差 (±SEM)
------	------------------------	----------------	--------------------------	----------------

5	0.063	0.014	0.174	0.015
7	0.124	0.016	0.174	0.015
17	0.110	0.012	0.219	0.014
32	0.148	0.015	0.279	0.030
85	0.088	0.007	0.198	0.028
PC	0.119	0.007	0.293	0.010

上述候选dsRNA的靶位置（相对于人C5转录本NM_001735.3）为：编号5：147-167；编号7：173-193；编号17：332-352；编号32：598-618；编号85：2112-2132。

应当理解，在本申请实施例中凡具有相同名称编号数字的dsRNA，其裸序列（即碱基序列）均相同。

实施例2、C5-dsRNA的优化

一、抑制活性检测

为进一步确认上述5条优选的dsRNA分子的抑制活性，我们分别对其进行序列修饰优化(表6)，对候选序列不同位置进行氟代和甲氧基修饰组合，总的修饰策略反义链尽可能采用甲氧基修饰替代，序列设计如表6所示。转染细胞为HepG2细胞，其合成、转染、定量PCR检测步骤同实施例一。表7，表8为相对Mock组的靶基因表达水平的平均值(Mock组的mRNA相对表达水平为1)。

表6：修饰dsRNA序列

名称	有义链裸序列(5'→3')	修饰基序	反义链裸序列(5'→3')	修饰基序
5-E04	SEQ ID NO.5	基序 1	SEQ ID NO.105	基序 3
5-E05	SEQ ID NO.5	基序 1	SEQ ID NO.105	基序 4
7-E04	SEQ ID NO.7	基序 1	SEQ ID NO.107	基序 3
7-E05	SEQ ID NO.7	基序 1	SEQ ID NO.107	基序 4
17-E04	SEQ ID NO.17	基序 1	SEQ ID NO.117	基序 3
17-E05	SEQ ID NO.17	基序 1	SEQ ID NO.117	基序 4
32-E04	SEQ ID NO.32	基序 1	SEQ ID NO.132	基序 3
32-E05	SEQ ID NO.32	基序 1	SEQ ID NO.132	基序 4
85-E04	SEQ ID NO.85	基序 1	SEQ ID NO.185	基序 3

85-E05	SEQ ID NO.85	基序 1	SEQ ID NO.185	基序 4
PC-ESC	SEQ ID NO.99	基序 2	SEQ ID NO.100	基序 5

注：表6中“-”左侧数字或字母为名称编号。

修饰基序1: XmsXmsXmXmXmXmXfXmXfXfXmXmXmXmXmXmXmXmXm

修饰基序2: XmsXmsXfXmXfXmXfXmXfXfXfXmXmXfXmXfXmXmXm

修饰基序3: XmsXfsXmXmXmXfXmXmXmXmXmXmXmXfXmXfXmXmXmXmsXmsXm

修饰基序4: XmsXfsXmXmXmXmXmXmXmXmXmXmXfXmXfXmXmXmXmsXmsXm

修饰基序5: XmsXfsXfXmXfXmXmXfXmXfXmXmXfXmXfXmXmXmsXmsXmdTdT

表7：修饰dsRNA在HepG2细胞中的单剂量筛选

样品名称	C5 mRNA 相对表达量 (1nM)	标准误 (±SEM)
5-E04	0.181	0.012
5-E05	0.161	0.005
7-E04	0.705	0.050
7-E05	0.400	0.039
17-E04	0.241	0.016
17-E05	0.220	0.015
32-E04	0.623	0.046
32-E05	0.641	0.028
85-E04	0.151	0.008
85-E05	0.134	0.009
PC-ESC	0.390	0.012

注：表7中“-”左侧数字或字母为名称编号。

表8：修饰dsRNA在HepG2肝细胞中的IC₅₀数据

样品名称	IC50(nM)
5-E05	0.0147
17-E05	0.2273
85-E04	0.0152
85-E05	0.0138
PC-ESC	0.1497

注：表8中“-”左侧数字或字母为名称编号。

如图3，图4所示，化学修饰的5-E05、17-E05、E85-E05及85-E04在HepG2细胞中具有更高的抑制活性，均优效于或等效于阳参PC-ESC。同时也证明修饰方案是重要的，某些修饰会降低抑制活性，在正义链修饰一致的情况下，从反义链的两种修饰基序（修饰基序3和4）的比较而言，5-E05、17-E05、E85-E05优于对应的5-E04、17-E04、E85-E04，可见本发明反义链尽可能采用2’甲氧基修饰替代

（修饰基序4，参见图10）的策略对提高抑制活性有效。

实施例3 GalNAc-dsRNA体外有效性检测

将候选的修饰dsRNA进行GalNAc偶联形成GAL-dsRNA复合物，各复合物结构如表9所示。我们进一步在食蟹猴原代肝细胞和HepG2细胞中验证了复合物的活性。

1、食蟹猴原代肝细胞mRNA表达水平检测

24孔板预先用collagen I，rat tail包被，将食蟹猴原代肝细胞（购买自立沃生物科技）铺到24孔板中， 2×10^5 个/孔。次日，其合成、转染、定量PCR检测步骤同实施例一。GalNAc-dsRNA转染终浓度为10nM，食蟹猴引物序列如表3所示。由结果可知(图5)，候选序列能够有效地沉默食蟹猴原代肝细胞中C5基因的表达。

2、HepG2细胞中mRNA表达水平检测

检测步骤参见实施例一，以猴GAPDH基因为内参基因，检测所用引物见表4。表10，表11为相对Mock组的靶基因表达水平的平均值(Mock组的mRNA相对表达水平为1)。

表9：GalNAc偶联dsRNA序列

样品名称	有义链裸序列(5'->3')	修饰基序	反义链裸序列(5'->3')	修饰基序
GAL-E5	SEQ ID NO.5	基序 1	SEQ ID NO.105	基序 4
GAL-E17	SEQ ID NO.17	基序 1	SEQ ID NO.117	基序 4
GAL-E85-1	SEQ ID NO.85	基序 1	SEQ ID NO.185	基序 3
GAL-E85	SEQ ID NO.85	基序 1	SEQ ID NO.185	基序 4
GAL-PC	SEQ ID NO.99	基序 2	SEQ ID NO.100	基序 5

注 1：表 9 中“E”右侧的数字为名称编号。GAL-PC 中的 PC 为名称编号。

注 2：表 9 中所有序列正义链的 3' 端连接 L96 配体。

表10：GalNAc偶联dsRNA在原代食蟹猴肝细胞中单剂量筛选

样品名称	C5 mRNA 相对表达量 (10nM)	标准误 (±SEM)
GAL-E5	0.136	0.011
GAL-E17	0.124	0.008
GAL-E85-1	0.101	0.004
GAL-E85	0.084	0.003
GAL-PC	0.163	0.011

注：表 10 中“E”右侧的数字为名称编号。GAL-PC 中的 PC 为名称编号。

表11: GalNAc偶联dsRNA在HepG2细胞中单剂量筛选

样品名称	C5 mRNA 相对表达量 (1nM)	平均标准误 (±SEM)
GAL-E5	0.222	0.017
GAL-E17	0.344	0.060
GAL-E85	0.154	0.011
GAL-E85-1	0.180	0.008
GAL-PC	0.260	0.013

注: 表 11 中 “E” 右侧的数字为名称编号。GAL-PC 中的 PC 为名称编号。

结果如图 5, 图 6 所示, 候选的 GAL-E5,GAL-E85,GAL-E85-1 均有效沉默细胞中 C5 的表达, 且活性优于阳参 GAL-PC 组。

实施例4、体内有效性检测

试验采用6~8周周龄的SPF级人源化C5小鼠(上海南方模式生物科技股份有限公司), 随机分组, 每组10只, 雌雄各半, 皮下单次注射给药(给药分组见表13, 表14)。第-3 (给药前)、3、7、12、19、26、33、40、54天 (第一剂量为第0天) 采血, 眼球后部放血收集血清用于C5 蛋白含量检测。

表12: 1mpk单次给药方案

药物名称	给药剂量	人源化 C5 小鼠	采血时间
Blank	生理盐水	N=10, 雌、雄各 5 只	第-3、3、7、12、19、26、33、40、54 天
GAL-E5	1mpk		
GAL-E17	1mpk		
GAL-E85-1	1mpk		
GAL-E85	1mpk		
GAL-PC	1mpk		

注: 表 12 中 “E” 右侧的数字为名称编号。GAL-PC 中的 PC 为名称编号。

表13: 剂量梯度单次给药方案

药物名称	给药剂量	人源化 C5 小鼠	采血时间
Blank	生理盐水	N=10, 雌、雄各 5 只	第-3、3、12、19、26、33、40、54、61、68、75、82、89、96、103 天
GAL-PC	0.3mpk		
	1mpk		
	3mpk		
GAL-E5	0.3mpk		
	1mpk		
	3mpk		
GAL-E85	0.3mpk		
	1mpk		
	3mpk		

注: 表 13 中 “E” 右侧的数字为名称编号。GAL-PC 中的 PC 为名称编号。

C5 蛋白ELISA检测

1、方法

血清按1: 20000稀释后采用ab125963 ELISA检测试剂盒检测各组血清中残留C5的含量，具体操作步骤参考ab125963 ELISA检测说明书，通过酶标仪在450nm波长下检测吸光值，各组相对Blank组的相对残留率，并用GraphPad软件进行统计分析。

2、结果

实验结果显示(图7)，在1mpk单次给药中，候选的4条dsRNA分子给药组小鼠体内血清中C5的含量均显著低于空白对照组，且优于阳参对照组。进一步的剂量探索试验结果(图8)表明：相较阳参对照GAL-PC(3mpk)在第33天回到药前点，GAL-E85（0.3mpk）回到药前点延长至第47天，而中、高剂量则延长时间更久至103天。同时，候选GAL-E5也表现出显著优效于GAL-PC组的潜力。总之，我们的结果证明，我们候选的针对C5靶点的dsRNA分子对C5的抑制效果优于目前临床在研的cemdisiran(AD-62643)，具有治疗C5相关疾病的潜力。

实施例5、体内食蟹猴有效性检测

试验采用成年雄性食蟹猴，每组3只，皮下单次注射给药(给药分组见表14)。按照第-3天作为药前点，第0天作为给药点，并于指定时间点采血检测。收集的血清采用 ab125963 ELISA 检测试剂盒用于 C5 蛋白含量检测，具体步骤同实施例4。各组相对药前点进行 C5 残留率的统计。

表14：3mpk单次给药方案

药物名称	给药剂量	食蟹猴	采血时间
GAL-E5	3mpk	N=3,雄性	-3、3、7、14、21、
GAL-E85	3mpk		28、32、35、39、42、
GAL-PC	3mpk		45、49、53、56

注：表14中“E”右侧的数字为名称编号。GAL-PC中的PC为名称编号。

实验结果显示(图9)，相比阳参对照分子GAL-PC，我们的候选分子GAL-E85和GAL-E5均对C5蛋白表现出更强且更持久的抑制效果。GAL-PC的最高抑制率为47.5%，GAL-E85和GAL-E5的最高抑制率分别为90.2%和85.5%。

综上，可以看出在本申请的dsRNA使用修饰基序1时，反义链采用修饰基序4相较于采用修饰基序3可以获得更优的体内和体外抑制效率。

以上描述地仅是优选实施方案，其只作为示例而不限制实施本申请所必需特征的组合。所提供的标题并不意指限制本申请的多种实施方案。术语例如“包含”、“含”和“包括”不意在限制。此外，除非另有说明，没有数词修饰时包括复数形式，以及“或”、“或者”意指“和/或”。除非本文另有定义，本文使用的所有技术和科学术语的意思与本领域技术人员通常理解的相同。本申请中提及的所有公开物和专利通过引用方式并入本文。不脱离本申请的范围和精神，本申请的所描述的方法和组合物的多种修饰和变体对于本领域技术人员是显而易见的。虽然通过具体的优选实施方案描述了本申请，但是应该理解所要求保护的本申请不应该被不适当地局限于这些具体实施方案。事实上，那些对于相关领域技术人员而言显而易见的用于实施本申请的所描述的模式的各种变体意在包括在随附的权利要求的范围内。

权利要求书

1. 一种抑制 C5 基因表达的 dsRNA 分子，包括互补形成双链区的正义链和反义链，所述正义链和/或所述反义链包括 15-25 个核苷酸或由 15-25 个核苷酸组成，所述反义链与如 SEQ ID NO: 1-98 中任一项所示序列的至少 15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、或 21 个连续的核苷酸互补，所述双链区的长度为 15-25bp，所述 dsRNA 分子中的至少一个核苷酸经过修饰。

2. 根据权利要求 1 所述的 dsRNA 分子，其特征在于：所述正义链的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1-98 中任一项所示；其中所述 dsRNA 分子中与所述正义链的核苷酸序列 SEQ ID NO: 1-98 对应的反义链核苷酸序列依次如 SEQ ID NO: 101 至 198 所示。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 dsRNA 分子，其特征在于：所述修饰选自如下中的任一种或多种：锁核酸修饰、开环或非锁核酸修饰、2'-甲氧基乙基修饰、2'-O-甲基修饰、2'-O-烯丙基修饰、2'-C-烯丙基修饰、2'-氟代修饰、2'-脱氧修饰、2'-羟基修饰、硫代磷酸骨架修饰、DNA 修饰、荧光探针修饰和配体修饰。

4. 根据权利要求 3 所述的 dsRNA 分子，其特征在于：所述 dsRNA 分子的修饰方式包括：(1)正义链：长为 17-21nt，优选 21nt；由 2'-O-甲基修饰区和 2'-氟代修饰区交替组成，每个修饰区的长度为 1 至 3 个核苷酸；5'末端和 3'末端起的第一个修饰区的修饰方式相同；(2)反义链：长为 19-23nt，优选 23nt；由 2'-O-甲基修饰区、2'-氟代修饰区、未修饰区或 DNA 区交替组成，每个修饰区的长度为 1-5 个核苷酸；且从 5'末端起的第 2 至 5 位的连续的核苷酸区，和从 3'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区，均由硫代磷酸骨架连接；

优选地，(1)正义链：长为 21nt，从 5'末端起 7 位、9-11 位具有 2'-氟代修饰，其余位置为 2'-O-甲基修饰，5'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区由硫代磷酸骨架连接；(2)反义链：长为 23nt；从 5'末端起 2 位、14、16 位以及任选的 6 位具有 2'-氟代修饰，其余位置为 2'-O-甲基修饰，5'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区，以及 3'末端起的第 1 至 3 位的连续的核苷酸区由硫代磷酸骨架连接。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的 dsRNA 分子，其特征在于：所述 dsRNA 分子的正义链裸序列如(A1)，(A2)或(A3)所示；所述 dsRNA 分子的反义链裸序列如(A4)，(A5)或(A6)所示：

。

8.根据权利要求 5 至 7 中任一项所述的 dsRNA 分子，其特征在于：
所述正义链具有如修饰基序 1 所示的修饰，所述反义链具有如基序修饰 4 所示的修饰。

9.药物组合物，其包含权利要求 1-8 中任一所述的 dsRNA 分子和药学上可接受的赋形剂，优选所述药物组合物进一步包含另一种抑制补体蛋白或补体蛋白表达的化合物。

10.一种 dsRNA 的用途，选自如下组中的任意一项：

(I)权利要求 1-8 中任一所述的 dsRNA 或权利要求 9 所述的药物组合物在抑制补体 C5 基因表达或者制备用于抑制补体 C5 基因表达的产品中的应用；

(II)权利要求 1-8 中任一所述的 dsRNA 或权利要求 9 所述的药物组合物在制备降低血清中 C5 蛋白的产品中的应用；

(III)权利要求 1-8 中任一所述的 dsRNA 或权利要求 9 所述的药物组合物在预防和/或治疗由补体 C5 基因介导的疾病或者制备用于预防和/或治疗由补体 C5 基因介导的疾病的產品中的应用；

(IV)权利要求 1-8 中任一所述的 dsRNA 或权利要求 9 所述的药物组合物在缓解由补体 C5 基因介导的疾病的症状或者制备用于缓解由补体 C5 基因介导的疾病的症状的产品中的应用；

其中，所述由补体 C5 基因介导的疾病选自以下的任一种或多种：眼科疾病、血液疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病、肾脏疾病、神经性疾病或肿瘤性疾病；所述眼科疾病包括：干/湿性老年性黄斑变性(AMD)，地图样萎缩(GA)等；所述神经性疾病包括：阿尔兹海默症(AD)、重症肌无力(gMG)等；所述肾脏疾病包括：典型溶血尿毒综合征(aHUS)、C3 肾小球病(C3G)、IgA 肾病和狼疮性肾炎；所述血液疾病包括：阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、血栓性微血管病(TMA)等；所述自身免疫性疾病包括：类风湿性关节炎，红斑狼疮等；所述手术相关性疾病包括：肝缺血-再灌注损伤、烧伤修复、器官移植后排斥等；所述呼吸道疾病包括：哮喘、特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)等；所述肿瘤性疾病包括：与补体有关的肝癌或肺癌。

11. 抑制 C5 基因表达的双链核酸或其药学上可接受的盐，所述双链核酸包括第一链和第二链，

所述第一链为：AUCGUAACAACAUUUCUUCACUA（SEQ ID NO: 185），

所述第二链为：GUGAAGAAAUGUUGUUACGAU（SEQ ID NO: 85）；

或

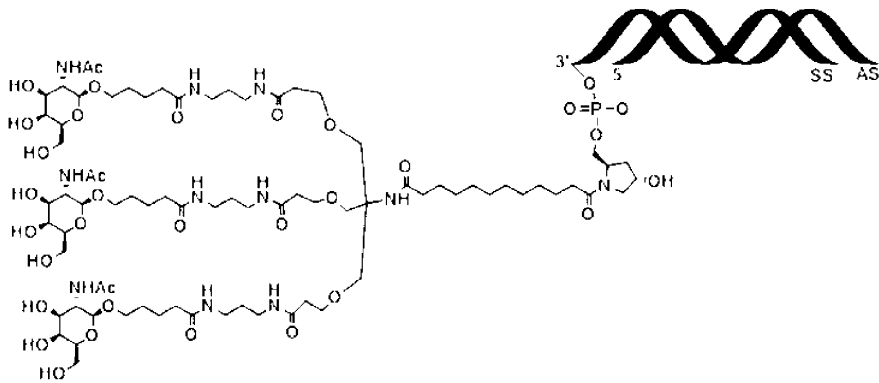
所述第一链为：GUAUCCAUAACUUGAAUCACAA（SEQ ID NO: 105），

所述第二链为：GUGAUUCAAGUUUAUGGAUAC（SEQ ID NO: 5）；

所述第一链的修饰基序为修饰基序 4：XmsXfsXmXmXmXmXmXmXmXmXmXmXmXfXmXfXmXmXmXmXmsXmsXm；

所述第二链 3'连接 L96 配体和修饰基序 1：XmsXmsXmXmXmXmXfXmXfXfXfXmXmXmXmXmXmXmXmXmXm；

其中，Xm 表示经 2'-O-甲基修饰的核糖核苷酸 A、U、C 或 G；Xf 分别表示经 2'-氟代修饰的核糖核苷酸 A、U、C 或 G；(s)表示前后两个核苷酸由硫代磷酸骨架连接；所述所述第二链 3'连接 L96 配体的连接方式如下：



。

12. 药用组合物，所述组合物包含权利要求 11 所述的双链核酸以及药学上可接受的载体。