

小 RNA 及其在高血脂治疗中的用途

本申请要求申请日为 2022 年 01 月 28 日的中国专利申请 CN202210106396.2 的优先权，本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明一般地涉及核酸治疗领域。更具体地，本发明涉及新的小 RNA 及其在治疗高血脂中的用途。

背景技术

高胆固醇血症是一种常见的血脂异常，其特点是低密度脂蛋白 C (LDL-C) 水平升高。众所周知，它与动脉粥样硬化性心血管疾病的风险增加直接相关。LDL-C 通过血液输送胆固醇并将其沉积在动脉壁，从而增加动脉粥样硬化，从而导致斑块的形成。高胆固醇血症治疗的主要目的是降低血脂 LDL-C 水平，从而减少斑块形成，从而降低心血管疾病的发病率和死亡率。

传统的治疗方法是使用他汀类药物。这类药物通过抑制 HMG-CoA 还原酶来增加 LDL 受体的表达，从而增加肝脏对 LDL 颗粒的清除率。然而，一些患者表现出不能耐受他汀类药物，且他汀类药物会引起肌痛或肝脏毒性等副作用。

枯草杆菌蛋白转化酶 9(PCSK9)是由肝脏表达并分泌到血流中的丝氨酸蛋白酶。PCSK9 与 LDL 受体的结合使 LDL 受体更容易被半胱氨酸组织蛋白酶切割和细胞内降解。因此，PCSK9 的表达和释放到循环中，会增加血浆低密度脂蛋白的浓度。Inclisiran 是一种完全化学稳定的双链 RNA，以 PCSK9 mRNA 的 3'UTR 为靶点。Inclisiran 与 N-乙酰半乳糖胺碳水化合物偶联，使其特异性地被肝细胞摄取，是一种用于治疗高血脂的小干扰核糖核酸(siRNA)分子。Inclisiran 现在已被证明一次皮下注射可以降低患者的低密度脂蛋白胆固醇水平 6 个月,因此在本发明中作为阳性药对比。

然而注射类药物与口服药物相比总给患者带来不佳的体验。本发明人的研究小组在之前的研究中发现了从药用植物中提取多种能够促进核酸递送的化合物或合成的化合物，利用所提取的化合物或多种组合可以将核酸如 sRNA 口服递送进入有此需要的对象体内的靶部位。本发明中从药用植物汤剂体 sRNA 库中筛选出与 PCSK9 完全互补匹配的天然药 RNA，在治疗高血脂中有显著的作用，并且可以同时通过靶向 GCGR 发挥降糖功效。

发明内容

本申请部分基于发明人对一系列药用植物小 RNA 的发现：本发明人从药用植物中分离出的小 RNA 可以在高脂小鼠模型上起到降低血脂的作用。

本发明人利用肥胖小鼠模型，即 ob/ob 小鼠模型，筛选了从中药菊苣中分离的

具有降血脂功能的小 RNA。

本发明人利用比格犬和高脂血食蟹猴模型，验证了从中药菊苣中分离的该小 RNA 在大型动物上改善血糖血脂的功能。

与 Inclisiran 相比，本发明提供的小 RNA 具有显著改善葡萄糖耐量、增强对胰岛素 5 的敏感性、降低血清甘油三酯与低密度脂蛋白水平、升高高密度脂蛋白水平、降低肝脏脂质堆积以及降低肝组织炎症因子水平、改善肝功能的功效。

基于以上发现，在第一方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，其包含以下序列或由以下序列组成：

- A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列；
- 10 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列；
- C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有至少 10 个、优选地至少 9 个、至少 8 个、至少 7 个、至少 6 个、至少 5 个、至 15 少 4 个、至少 3 个、至少 2 个、至少 1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，
- D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列，或
- E) 靶向 PCSK9 或 GCGR 基因的核苷酸序列，优选地，能够与 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合的核苷酸序列。

20 在一个优选的实施方案中，根据本发明所述的分离的核酸分子通过靶向 PCSK9 而发挥降血脂功效，优选地，其通过与 PCSK9 的 CDR、3'UTR 或 5'UTR 互补结合降低 PCSK9 的表达而发挥降血脂功效，优选地，与如 SEQ ID NO: 76 所示的 PCSK9 的 CDS 区互补结合降低 PCSK9 的表达而发挥降血脂功效。

在优选的实施方案中，根据本发明所述的分离的核酸分子是 RNA 分子或 DNA 25 分子，优选地，其是小 RNA 分子；优选地，其是长度为 18-24 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，其是长度为 19、20、21、22、23、或 24 个核苷酸的小 RNA 分子。

在一个实施方案中，本发明提供了分离的小 RNA 分子，其靶向 PCSK9 基因，并且其包含以下序列或由以下序列组成：

- A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列；
- 30 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列；
- C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、 35 5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，
- D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的

核苷酸序列杂交的序列，或

E) 与 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合的核苷酸序列。

在具体的实施方案中，本发明提供的小 RNA 分子与 PCSK9 的 CDR、3'UTR 或 5'UTR 互补结合。

5 在具体的实施方案中，本发明提供了靶向 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列的小 RNA 分子。

在具体的实施方案中，本发明提供了分离的小 RNA 分子，其包含以下序列或由以下序列组成：

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列；

10 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列，并且与 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合；

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、
15 5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，并且与 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合；或

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列。

在本发明的实施方案中，本发明的分离的小 RNA 分子通过靶向 PCSK9 CDS
20 和/或 GCGR CDS 而发挥降脂、降糖和/或降压功能。

在本发明的实施方案中，本发明的小 RNA 分子可以是单链形式或双链形式。

根据本发明的双链形式的小 RNA 分子包含正义链和反义链，其中所述正义链包含以下序列或由以下序列组成：

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列；

25 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列；

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有至多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的核苷酸序列，优选地与 SEQ ID NO: 1 至
30 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的核苷酸序列，

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列杂交的核苷酸序列，或

E) 与 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合的核苷酸序列；和
35 所述反义链包含与所述正义链互补的序列。

另一方面，本发明提供了一种前体 miRNA，其可在宿主内加工成本发明所述

的分离的小 RNA 分子。

另一方面，本发明提供了一种多核苷酸，其可被宿主转录形成本发明所述的前体 miRNA。

另一方面，本发明提供了一种表达载体，其包含本发明的核酸分子、分离的
5 小 RNA 分子、前体 miRNA 和/或多核苷酸。

另一方面，本发明提供了一种宿主细胞，其被本发明所述的表达载体转染。

另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含治疗有效量的根据本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体或宿主细胞，以及一种或多种药学上可接受的佐剂、赋形剂和/或稳定剂。优选地，根据本发明的
10 药物组合物可用于口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用，优选地，根据本发明的组合物通过口服施用。

优选地，在本发明的药物组合物中，所述核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体或宿主细胞的含量为 0.1-1000 μ M、优选为 3.0 μ M-300 μ M；优
15 选为 0.3 μ M、0.6 μ M、0.9 μ M、1.0 μ M、3.0 μ M、6.0 μ M、9.0 μ M、10.0 μ M、13.0 μ M、16.0 μ M、19.0 μ M、20.0 μ M、23.0 μ M、26.0 μ M、29.0 μ M、30.0 μ M、33.0 μ M、36.0 μ M、39.0 μ M、40.0 μ M、43.0 μ M、46.0 μ M、49.0 μ M、50.0 μ M、53.0 μ M、56.0 μ M、59.0 μ M、60.0 μ M、63.0 μ M、66.0 μ M、69.0 μ M、70.0 μ M、73.0 μ M、76.0 μ M、79.0 μ M、80.0 μ M、83.0 μ M、86.0 μ M、89.0 μ M、90.0 μ M、100 μ M、130 μ M、160 μ M、190 μ M、200 μ M、
20 250 μ M、300 μ M、350 μ M、400 μ M、450 μ M、500 μ M、550 μ M、600 μ M、650 μ M、700 μ M、750 μ M、800 μ M、850 μ M、900 μ M、950 μ M、1000 μ M、或这些点值之间的任意范围。

另一方面，本发明提供了根据本发明所述的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗受试
25 者中高血脂的药物中的用途；优选地，所述根据本发明所述的分离的核酸分子、载体、细胞或药物组合物可用于改善血清高低密度脂蛋白与甘油三酯水平，并同时降低血糖，和/或保护高血脂引起的肝脏损伤。

优选地，根据本发明的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物可以与一种或多种，优选一种至三种其
30 他药物组合用于治疗高血脂，所述其他药物选自他汀类、胆固醇转运抑制剂、胆酸螯合剂、苯氧芳酸类、烟酸类、CETP 抑制剂、MTP 抑制剂和 PCSK9 抑制剂的其他药物。

本发明提供的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物可用于治疗和/或预防与血脂升高相关的疾病，包
35 括但不限于，治疗和/或预防动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗塞、脑出血、脑血栓。

另一方面，本发明提供了根据本发明所述的分离的核酸分子、小 RNA 分子、

前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗受试者中高血压的药物中的用途。

另一方面，本发明提供了根据本发明所述的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗受试者中糖尿病的药物中的用途；优选地，所述根据本发明所述的分离的核酸分子、载体、细胞或药物组合物可用于改善葡萄糖耐量、增强对胰岛素的敏感性。

优选地，根据本发明的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物可以与一种或多种，优选一种至三种其他药物组合用于治疗糖尿病，所述其他药物选自胰岛素及其类似物、磺酰脲类促泌剂、二甲双胍类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类衍生物促敏剂、苯茴酸类衍生物促泌剂、GLP-1 受体激动剂和 DPP-4 酶抑制剂。

另一方面，本发明提供了用于治疗有需要的受试者中高血脂症的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本发明所述的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物；优选地，如本文所用的“受试者”是脊椎动物，更优选地是哺乳动物，甚至更优选地是家畜或伴侣动物，例如鸡、鹅、鸭、山羊、绵羊、牛、猪、马、狗、猫、仓鼠、大鼠、小鼠、仓鼠或豚鼠。最优选地，受试者是人。

在另一方面，本发明提供了用于治疗有需要的受试者中高血压的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本发明所述的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

在另一方面，本发明提供了用于治疗有需要的受试者中糖尿病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本发明所述的分离的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

在另一方面，本发明提供了在有需要的受试者中治疗和/或预防与血脂升高相关的疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本发明的分离的核酸分子、分离的小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、或药物组合物，所述与血脂升高相关的疾病选自动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗塞、脑出血、脑血栓。

在另一方面，提供了一种治疗基因表达异常相关疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

在另一方面，本发明提供了一种抑制基因表达和/或活性的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

除非有相反的说明，否则本文使用的术语具有本领域技术人员通常理解的含义。

术语

通常，人们一般把siRNA， miRNA及其它非编码小RNA不加区分地称之为小核酸或小RNA(sRNA)。如本文使用的“小RNA”是一大类小的非编码RNA，其由动、植物基因组内所编码，长度大约为18-24个核苷酸。研究表明，小RNA参与各种各样的调节途径，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等等。

如本文中所用的小RNA（sRNA），可以是单链或双链RNA，包括但不限于siRNA、miRNA，其可以是天然的或合成的RNA。

如本文所用的术语“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”，并且通常意指 DNA 或 RNA 聚合物，其可以是单链的或双链的、合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的)；其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸。在一些实施方案中，核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或替换。然而，如本文所讨论的，在一些情况下对核酸而言，包含一个或更多个插入、缺失、倒位和/或替换可以是合适的。

如本文所用的术语在“严格条件下杂交”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(例如，SEQ ID NO: 1 所示的序列)特异性杂交。严格性条件可以包括例如低盐和/或高温条件，例如由在约 50℃至 70℃的温度下约 0.02M至 0.1M NaCl 或等同物提供的。

如本文所用，“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同一的。两个序列之间的同一性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100 的函数。

如本文所用的术语“载体”，是指并入本文所述的核酸的重组表达载体。所述重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体，并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞，包括但不限于植物表达载体、动物表达载体、病毒载体，例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。这些载体是本领域技术人员熟知的，并且可以商购获得。

本文所用的术语“宿主细胞”是指可以转染有本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞，例如植物、动物、真菌或藻类，或者可以是原核细胞，例如细菌或原生动物。

多种转染技术是本领域公知的，包括但不限于磷酸钙共沉淀、直接微注射到培养的细胞内、电穿孔、脂质体介导的基因转移、脂质介导的转导和使用高速微型射弹的核酸递送。

如本文所用，“治疗”包括治疗在哺乳动物中(特别是在人类中)的疾病状态，并且包括：(a)抑制疾病状态，即阻止其发展；和/或(b)缓解疾病状态，即引起疾病状态消退。

如本文所用，术语“受试者”是指可能潜在地从用本发明的核酸分子、包含其的载体、细胞或组合物的治疗中受益的任何人类或非人类生物体。示例性受试者包括患有糖尿病的受试者。优选地，如本文所用的“受试者”是脊椎动物，更优选地是哺乳动物，甚至更优选地是家畜或伴侣动物，例如鸡、鹅、鸭、山羊、绵羊、牛、猪、马、狗、猫、仓鼠、大鼠、小鼠、仓鼠或豚鼠。最优选地，受试者是人。

如本文所用，术语“治疗有效量”旨在包括当单独或组合施用本发明的核酸分子、包含其的载体、细胞或组合物时，使受试者获益的所述核酸分子、包含其的载体、细胞或组合物的量。

如本文所用，术语“互补结合”或“互补地结合”是指两条单链彼此碱基配对以形成可检测的双链。但是，只要可以形成稳定的双链，就允许两条单链之间存在一定百分比的不匹配。例如，在一些实施方案中，双链具有约 1%，约 2%，约 3%，约 4%，约 5%，约 6%，约 7%，约 8%，约 9%，约 10%，约 15%，约 20%，约 25%，约 30%，约 35%，约 40%，约 45%，或约 50% 的不匹配。

为了更详细的说明本发明，本说明书提供了下列具体实施方案，并结合附图说明这些具体实施方案，但本公开的方案并非仅限于此。本领域技术人员可以结合本领域的公知常识，对本发明的方法、用途和小 RNA 进行适当的改变，只要其能够实现本发明所述的功能，即应落入本发明的范围内。

如本文中所用，术语“高血脂”、“高脂血症”和“血脂升高”可互换使用，指的是由各种原因导致的血浆中的胆固醇、甘油三酯以及低密度脂蛋白水平升高，而高密度脂蛋白过低的一种的全身质代谢异常的疾病。

高脂血症可分为原发性和继发性高脂血症，原发性高脂血症是原来无任何其他疾病而发生高脂血症，一般是因为遗传因素；继发性高脂血症是由于各种原因引起的高脂血症，比如：糖尿病、甲状腺功能减退、肾病综合征、肾移植、胆道阻塞等。不良饮食习惯一起的高脂血症，如暴饮暴食、嗜酒、偏食、饮食不规律等。长期服用某种药物可以导致的高脂血症，如：避孕药、激素类药物等。精神因素导致的高脂血症，就是由于长期精神紧张，导致内分泌代谢紊乱，形成高脂血症。

附图说明

图 1A 至图 1H 显示通过双荧光素酶报告基因检测系统检测的本发明的小 RNA 对枯草杆菌蛋白转化酶 9(PCSK9)的靶向作用。空白表示不转染小 RNA，NC 为无义对照序列组。图中的横轴表示与 PCSK9 结合的小 RNA 名称，例如，PCSK9-7 表示本发明的小 RNA PCSK9-sRNA-7，其余以此类推，PCSK9-7 又名 Juju-JzJt-1；

图 2A 至图 2C 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1、PCSK9-3、PCSK9-5、PCSK9-6 与 Inclisiran 对比通过逆转录-实时荧光定量 PCR 在 HepG2(人肝癌细胞)上对靶基因 PCSK9 及 LDLR mRNA 水平的影响；空白表示不转染小 RNA，NC 为无义对照序

列组; Inclisiran 代表阳性对照组; Juju-JzJt-1 (0.1nM, 0.3nM, 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM)代表不同剂量的实验组; PCSK9-3、PCSK9-5、PCSK9-6 代表剂量为 100nM 的实验组;

图 3A、图 3B、图 3C 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 对比通过蛋白质免疫印迹法在 HepG2 细胞上对靶基因 PCSK9 及 LDLR 蛋白质水平的影响; 空白表示不转染小 RNA, NC 为无义对照序列组; Inclisiran 代表阳性对照组; Juju-JzJt-1 (0.1nM, 0.3nM, 1nM, 3nM, 10nM, 100nM,)代表不同剂量的实验组;

图 4A 和图 4B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 对比在 HepG2 细胞上对摄取红色荧光标记人源低密度脂蛋白的影响; 空白表示不转染小 RNA, NC 为无义对照序列组; Inclisiran 代表阳性对照组; Juju-JzJt-1 代表实验组;

图 5A 至图 5D 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1、PCSK9-3 与 Inclisiran 对比在高脂模型 ob/ob 小鼠口服葡萄糖耐量的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1 (0.2mg/kg, 0.6mg/kg, 2mg/kg)代表不同剂量的实验组; PCSK9-3 代表剂量为 2mg/kg 的实验组;

图 6A 和图 6B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较对高脂模型 ob/ob 小鼠胰岛素耐量的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1(2mg/kg)代表实验组;

图 7A、图 7B 和图 7C 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较对高脂模型 ob/ob 小鼠血清甘油三酯、低密度脂蛋白、胆固醇的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1 (0.2mg/kg, 0.6mg/kg, 2mg/kg)代表不同剂量的实验组;

图 8A 和图 8B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 对比通过逆转录-实时荧光定量 PCR 在小鼠肝脏中对靶基因 PCSK9 及 LDLR 信使 RNA 水平的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1(2mg/kg)代表实验组;

图 9A、图 9B、图 9C 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 对比通过蛋白质免疫印迹法在 HepG2 细胞上对靶基因 PCSK9 及 LDLR 蛋白质水平的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1(2mg/kg)代表实验组;

图 10 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较对高脂模型 ob/ob 小鼠肝脏油红 O 染色的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1(2mg/kg)代表实验组;

图 11A、图 11B 和图 11C 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较在高脂模型 ob/ob 小鼠肝组织中对炎症因子白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 的影响; 其中 ob/ob 代表模型组; NC 代表阴性对照组; Inclisiran(15mg/kg)代表阳性对照组; Juju-JzJt-1 (0.2mg/kg, 0.6mg/kg, 2mg/kg)代表 ob/ob+ Juju-JzJt-1

不同剂量的实验组；

图 12A 和图 12B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 对比格犬口服葡萄糖耐量的影响；其中空白代表不做任何处理；NC 代表阴性对照组；Juju-JzJt-1 (5mg/kg)代表实验组；

5 图 13A、图 13B 和图 13C 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 对比格犬血清低密度脂蛋白、胆固醇、高密度脂蛋白的影响；其中空白代表不做任何处理；NC 代表阴性对照组；Juju-JzJt-1 (5mg/kg)代表实验组；

图 14A 和图 14B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 对比 Inclisiran 在高脂血食蟹猴模型上口服葡萄糖耐量的影响；NC 代表阴性对照组；Inclisiran 代表阳性对照组；

10 Juju-JzJt-1 (15mg/kg)代表实验组；

图 15A、图 15B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 对比 Inclisiran 在高脂血食蟹猴模型上对血清低密度脂蛋白、胆固醇的影响；其中模型代表高脂血模型组；NC 代表阴性对照组；Inclisiran 代表阳性对照组；Juju-JzJt-1 (5mg/kg, 15mg/kg)代表实验组；

15 图 16 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 对比 Inclisiran 在高脂血食蟹猴模型上对收缩压的影响；其中 NC 代表阴性对照组；Inclisiran 代表阳性对照组；Juju-JzJt-1 (50mg/kg)代表实验组；

图 17A、图 17B 显示本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 通过靶向枯草杆菌蛋白转化酶 9(PCSK9)发挥降血脂功效，通过胰高血糖素受体(GCGR)发挥降血糖功效，其中
20 WT 表示 PCSK9 CDS（蛋白质编码区）野生型或 GCGR CDS 野生型（图 17A 和 17B）；MUT 表示 PCSK9 CDS 突变型（或 GCGR CDS 突变型（图 17A 和 17B）；NC 代表阴性对照；Juju-JzJt-1 代表加入本发明的小 RNA。

具体实施方式

25 以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

30 实施例 1. 药用植物来源靶向 PCSK9 的小 RNA 筛选及聚类

本发明人通过双荧光素酶报告基因检测系统研究了本发明人从药用植物获得的小 RNA 对枯草杆菌蛋白转化酶 9(PCSK9) 的靶向作用，从而研究了其发挥降脂功效的潜能。

35 培养 293T（人胚肾细胞）细胞，并且分别转染待筛选的小 RNA 和 NC，之后转染 PCSK9 全长的双荧光素酶报告基因质粒，48 小时后检测双荧光素酶活性。

与 NC 相比，这些小 RNA 通过与 PCSK9（所述 PCSK9 的 NCBI 编号为

NM_174936.4) 结合, 可以显著降低双荧光素酶的活性, 证明这些小 RNA 可能具有降脂的功能(结果参见图 1A 至图 1H)。其中, 小 RNA 的具体序列见表 1 所示。
选择 PCSK9-sRNA-7 为后续实施研究对象, 因其来源又名 Juju-JzJt-1。

根据小 RNA 靶向 PCSK9 转录本位置不同分类, 分类结果见表 2。同时本发
5 明的小 RNA SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 7 可以通过靶向 GCGR 发挥作用。

表 1 药用植物来源靶向 PCSK9 的小 RNA 序列

名称	序列	SEQ ID NO:
PCSK9-sRNA-1	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	1
PCSK9-sRNA-2	AGCAGCAGCAGCAGCAGCA	2
PCSK9-sRNA-3	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	3
PCSK9-sRNA-4	CAGCAGCAGCAGCAGCAG	4
PCSK9-sRNA-5	CAGCAGCAGCAGCAGCAGC	5
PCSK9-sRNA-6	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	6
PCSK9-sRNA-7 (Juju-JzJt-1)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	7
PCSK9- sRNA-27	UCGACGCGGGCUCUGCUGUU	8
PCSK9- sRNA-28	CCGUGCGCUGGAUUAUGACUG	9
PCSK9- sRNA-29	UGGGCGGCAUUGUCUGCGGAU	10
PCSK9-sRNA-30	UGCAGCCCCAAUCGGGCGGUA	11
PCSK9-sRNA-31	UGCGGCUGGAUACCUCCUUU	12
PCSK9-sRNA-32	CGCGCUUGACUGCGAGACAGA	13
PCSK9-sRNA-33	AUGGCUGUCGUCAGCUCGUGU	14
PCSK9-sRNA-36	CCGGCGGACUGCUCGAGCUGC	15
PCSK9-sRNA-39	CUGCCGGCGGACUGCUCGAGC	16
PCSK9-sRNA-40	CCCAGCCCCGAACCCGUCGGC	17
PCSK9-sRNA-41	CGGCUGUCGGUGGUCUGCUCG	18
PCSK9-sRNA-55	GGUGGCUGUAGUUUAGUGGUA	19
PCSK9-sRNA-58	AGCUUCAGUUGUCCGAUUUGU	20
PCSK9-sRNA-62	AGGGCUGUAGCUCAGUUGGUA	21
PCSK9-sRNA-63	CCUCGGCCGGAUGCGGAACGG	22
PCSK9-sRNA-68	CCGACCCCGAUCUUCUGUGAA	23
PCSK9-sRNA-71	GCUCGUAGUUGGACCUUGGGU	24
PCSK9-sRNA-72	GCUCGUAGUUGGACCUUGGGA	25
PCSK9-sRNA-75	CCCUGCGUCGCUCCGAUUCGU	26
PCSK9-sRNA-77	UCUUCGGAAUUUGAAGCUAGA	27
PCSK9-sRNA-79	UCCUCGAUGGUCUAAACGGUCA	28
PCSK9-sRNA-80	CGGCUGUCGGCGAACUGCUCG	29
PCSK9-sRNA-81	ACACGGUCCAGACUCCUACGG	30
PCSK9-sRNA-82	CGUUUCACGUCGGGUUCACCA	31
PCSK9-sRNA-83	AAUGGCACCGUAAUUCGGGA	32
PCSK9-sRNA-84	CGGAAGCCGGGUUACGGUGCC	33

PCSK9-sRNA-85	CGCCGUCCGAAUUGUAGUCUG	34
PCSK9-sRNA-86	UGGCUGUCGUCAGCUCGUGUU	35
PCSK9-sRNA-87	CGGAAUCCGCUAAGGACUGUG	36
PCSK9-sRNA-88	UGCGCCUCGGUCGGAUGUGGA	37
PCSK9-sRNA-90	CUCCCCAUCCGGCCCGUCUUG	38
PCSK9-sRNA-91	CCGGUGCGUUCUGACAGUCU	39
PCSK9-sRNA-93	UGCCUGGCGGCUGUAGCGCGG	40
PCSK9-sRNA-94	CGAAUCCUGGCUGUUGUAUGU	41
PCSK9-sRNA-95	CAUGCCUGUCCGAGCGUCAUU	42
PCSK9-sRNA-96	CAUGCCUGUUCGAGCGUCAUU	43
PCSK9-sRNA-98	AUCGGCUCGGGACAUUGACCG	44
PCSK9-sRNA-99	UAUUCUGGUGUCCUAGGCGUA	45
PCSK9-sRNA-100	CCUUCGGAGUUUGAAGCUAGA	46
PCSK9-sRNA-101	CGGACUGCUCGAGCUGCUUCC	47
PCSK9-sRNA-102	AUGCGAGAGUAGGGAACUGCC	48
PCSK9-sRNA-103	CUUGACUCUAGUCCGACUUUG	49
PCSK9-sRNA-104	AUCGACUCGGGGCGUGGACCG	50
PCSK9-sRNA-107	GUGGCUGUAGUUUAGUGGUAA	51
PCSK9-sRNA-109	GCUCGUAGUUGGACUUUGGGU	52
PCSK9-sRNA-110	GCUCGUAGUUGGACUUUGGGA	53
PCSK9-sRNA-111	UCCUCGAUGGUCUAACGGCUA	54
PCSK9-sRNA-112	CGGGCUUUGCCCGGUGCUCUG	55
PCSK9-sRNA-113	UGUGAGCUCGAUGAGUAGGGC	56
PCSK9-sRNA-114	ACACGGCCCAGACUCCUACGG	57
PCSK9-sRNA-115	GUGGAGCGGUGAAAUGCGUAG	58
PCSK9-sRNA-116	CCCGUCGGCUGUCGGUGGACU	59
PCSK9-sRNA-117	UAGGUAGCGCCUCAUGUAUCA	60
PCSK9-sRNA-118	CGAUUCUCGGAUUGGACACCA	61
PCSK9-sRNA-119	CUCACUGGUCGAGUCGGCCUG	62
PCSK9-sRNA-122	AUUCCGGUCCUAUUCUGUUGG	63
PCSK9-sRNA-123	GUGUUGACUUCAGUUUUAUGA	64
PCSK9-sRNA-124	AGGACGUGCUGAAUCUGCGAAA	65
PCSK9-sRNA-125	AAAGUUGGGGGCUCGAAGACG	66
PCSK9-sRNA-126	AUGCCUGUUUGAGCGUCAUUU	67
PCSK9-sRNA-127	CGGCUGGAUCACCUCCUUUCU	68
PCSK9-sRNA-131	CGGACAAGGGGAAUCCGACUG	69
PCSK9-sRNA-132	CGCCUCGUGAACUCAUCUUCG	70
PCSK9-sRNA-135	CCCCAUGCCGCACCGAUUCGU	71
PCSK9-sRNA-136	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGA	72
PCSK9-sRNA-137	GCACCGGCUAACUCUGUGCCA	73
PCSK9-sRNA-276	GCCUGGGCGGAGCGGUCGUGGUGCA	74
PCSK9-sRNA-1595	UGCAGCCCCAAUAGGGCGGUA	75
	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	76

	CTGCTGTTGCTGCTGCTGCTG	77
--	-----------------------	----

注：表 1 所示的序列按照小 RNA 的 5’ 至 3’ 方向撰写。

表 2 小 RNA 分组

靶向转录本及位置	序列号
<i>PCSK9</i> 3'UTR	SEQ ID NO: 11、17、20、22、32、34、38、44、50、55、62、65、71、72、75
<i>PCSK9</i> 5'UTR	SEQ ID NO: 8、9、16、39、40、42、43、47、67、73
<i>PCSK9</i> CDS、 <i>GCGR</i> CDS	SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7
<i>PCSK9</i> CDS	SEQ ID NO: 10、12、13、14、15、18、19、21、23、24、25、26、27、28、29、30、31、33、35、36、37、41、45、46、48、49、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、63、64、66、68、69、70、74

在以下实施例中，发明人进一步验证了小 RNA Juju-JzJt-1 的功能。在细胞实验中使用的小 RNA 是根据提供序列互补合成的双链 RNA，在所有动物实验中是单链小 RNA。

5 **实施例 2. 小 RNA 转染 HepG2 后逆转录-实时荧光定量 PCR 及蛋白质免疫印迹实验**

在 24 孔板/12 孔板中培养 HepG2 细胞，在密度达到 70-80%后转染 NC，双链去修饰的 Inclisiran，或小 RNA PCSK9-3、PCSK9-5、PCSK9-6，梯度剂量的小 RNA Juju-JzJt-1，培养 24 小时或 48 小时后收集细胞总 RNA 或蛋白质，以逆转录-实时
10 荧光定量 PCR 法对信使 RNA PCSK9、LDLR 进行相对定量(参见图 2A 和图 2B)，以蛋白质免疫印迹法对蛋白质 PCSK9、LDLR 相对定量并进行统计分析(参见图 3A、图 3B、图 3C)。

实施例 3. HepG2 摄取红色荧光标记人源低密度脂蛋白的实验

15 在 12 孔板中培养 HepG2 细胞，在密度达到 50-60%后转染 NC，双链去修饰的 Inclisiran 或小 RNA Juju-JzJt-1，培养 48 小时后给予红色荧光标记人源低密度脂蛋白再培养 6 小时。荧光显微镜下拍摄细胞，并统计阳性细胞百分比(参见图 4A 和 4B)。

20 **实施例 4. 本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 的制备**

向 5 nmol 小 RNA Juju-JzJt-1 (SEQ ID NO: 1) 干粉中加入 300 μL 无核酸酶水溶解后，加入 10 μL 10 mg/mL sphingosine(d18:1) (D-erythro-sphingosine，购买自 Avanti，货号 860490P) 的脂质溶液，充分震荡混匀之后，90 摄氏度水浴 15 分钟，冷却至室温，制备出包含小 RNA Juju-JzJt-1 和 sphingosine(d18:1)的混合液。

25 以类似的方式制备阴性对照混合液，其中将小 RNA Juju-JzJt-1 替换成无义对照序列 NC，其余步骤同上。

实施例 5. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较改善高脂模型 ob/ob 小鼠葡萄糖耐量的实验

30 ob/ob 模型组：不做任何处理；

NC 组：以 2mg/kg 的剂量灌胃给予本草体 sphingosine(d18:1) - NC，连续给药 14 天；

Inclisiran 组：以 15 mg/kg 的剂量皮下注射 Inclisiran，在实验第一天给药一次；

Juju-JzJt-1 组：以 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg 或 2 mg/kg 的剂量灌胃给予本草体
35 sphingosine(d18:1)-Juju-JzJt-1，连续给药 14 天；

PCSK9-3 组：以 2 mg/kg 的剂量灌胃给予本草体 sphingosine(d18:1)- PCSK9-3，连续给药 14 天

口服葡萄糖耐量试验

小鼠空腹 16 小时，16 小时后对每只鼠进行体重称量，按照体重计算口服葡萄糖的量（注射量标准：1200 mg/kg，葡萄糖溶液的浓度：120mg/mL），首先测定此时的空腹血糖，以 0 分钟血糖作为标记。固定小鼠，针头与腹部 45°角度刺入腹腔，缓慢注射葡萄糖溶液，而后开始计时，分别在第 15 分钟、第 30 分钟、第 45 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟时检测血糖量（取鼠尾部血进行检测），绘制折线图（参见图 5A 和图 5C）。

在高脂模型 ob/ob 小鼠的口服葡萄糖耐量试验中，与模型组相比，15 mg/kg Inclisiran 处理的小鼠葡萄糖耐受能力没有变化，而 2 mg/kg Juju-JzJt-1、PCSK9-3 的治疗能显著地抑制血糖的上升并保持血糖处于较低的平稳状态，明显增强对糖的代谢能力（参见图 5B 和图 5D）。综上所述，本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 不仅在降低血脂方面有很好的功效，还可以改善小鼠葡萄糖耐量的作用，而 Inclisiran 对葡萄糖耐量的改善无明显作用。

实施例 6. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较改善高脂模型 ob/ob 小鼠胰岛素耐量的实验

小鼠空腹 4 小时，4 小时后对每只鼠进行体重称量，按照体重计算需腹腔注射的胰岛素的量（注射量标准：1.2 IU/kg，胰岛素的浓度：0.12IU/mL），首先测定此时的空腹血糖，以 0 分钟血糖作为标记。固定小鼠，针头与腹部 45°角度刺入腹腔，缓慢注射胰岛素，而后开始计时，分别在第 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟时检测血糖量（取鼠尾部血进行检测），绘制折线图（参见图 6A 和图 6B）。

在高脂模型 ob/ob 小鼠的胰岛素耐量试验中，与模型组相比，15 mg/kg Inclisiran 处理的小鼠葡萄糖水平没有变化，而 2 mg/kg Juju-JzJt-1 显著增强了胰岛素敏感性。综上所述，本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 在机体对胰岛素的敏感性方面有着明显的增强作用。

实施例 7. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 与 Inclisiran 比较改善高脂模型 ob/ob 小鼠血清甘油三酯、低密度脂蛋白、胆固醇的实验

小鼠给药 14 天后，眼球取血，分离血清，通过试剂盒检测血清中甘油三酯、低密度脂蛋白、胆固醇进行不同给药组含量比较，绘制点图（参见图 7A、图 7B、图 7C）。

在高脂模型 ob/ob 小鼠的血清三项指标含量检测中，与阴性对照组相比，15 mg/kg Inclisiran 与 Juju-JzJt-1 处理的小鼠都可以显著降低血清甘油三酯水平，并在低密度脂蛋白和胆固醇降低效果上 2 mg/kg Juju-JzJt-1 优于 Inclisiran。

实施例 8. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 对高脂模型 ob/ob

小鼠肝脏 PCSK9、LDLR 表达水平的影响

小鼠给药 14 天后，取肝脏收集组织总 RNA 或蛋白质，以逆转录-实时荧光定量 PCR 法对信使 RNA *PCSK9*、*HepG2* 进行相对定量(参见图 8A 和 8B)，以蛋白质免疫印迹法对蛋白质 PCSK9、HepG2 相对定量并进行统计分析(参见图 9A、图 9B、图 9C)。

实施例 9. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 对高脂模型 ob/ob 小鼠肝脏病变的改善作用

小鼠给药 14 天后，取肝脏进行 4%多聚甲醛溶液中固定，然后进行油红 O 染色。

肝脏油红 O 染色的结果表明（参见图 10），高脂模型组和阴性对照组小鼠肝脏的切片有明显的脂质堆积现象，15mg/kg Inclisiran 与 2 mg/kg 小 RNA Juju-JzJt-1 处理均能显著改善这种肝脏脂质堆积现象。

实施例 10. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 对高脂模型 ob/ob 小鼠肝脏炎症因子的改善作用

小鼠给药 14 天后，取肝脏于强 RIPA 裂解液中，并用台式组织匀浆破碎仪研磨，分离上清后用酶联免疫吸附试验试剂盒检测肝中炎症因子白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α ，比较不同组三种炎症因子的含量，绘制点图（参见图 11A、图 11B 和图 11C）。

在高脂模型 ob/ob 小鼠的肝组织炎症因子含量检测中，与模型组相比，15 mg/kg Inclisiran 与 2 mg/kg Juju-JzJt-1 显著上述三种炎症因子。综上所述，本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 可以显著降低 ob/ob 小鼠的肝组织炎症因子水平，改善肝功能。

实施例 11. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 改善比格犬葡萄糖耐量的实验

15 只比格犬（由北京芳元缘养殖场提供），随机分为以下 3 组：

空白组：不做任何处理；

NC 组：阴性对照组，以 5mg/kg 的剂量灌胃给予本草体 sphingosine(d18:1) - NC，连续给药 7 天；

Juju-JzJt-1 组：以 5 mg/kg 的剂量灌胃给予本草体 sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1，连续给药 7 天；

口服葡萄糖耐量试验

比格犬禁食 8 小时，对每只犬进行体重称量。肌肉注射麻醉剂麻醉后，首先测定空腹血糖，以 0 分钟血糖作为标记。按照体重灌胃给予 8ml/kg 的 50%的葡萄糖溶液，分别在第 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟和 180 分钟静脉

取血，血糖仪检测立即检测动物血糖，绘制折线图（参见图 12A 和图 12B）。

在比格犬口服葡萄糖耐量试验中，与阴性对照组相比，5 mg/kg sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 的治疗能显著地抑制血糖的上升并保持血糖处于较低的平稳状态，明显增强对糖的代谢能力。综上所述，本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 不仅在降低血脂方面有很好的功效，还可以改善小鼠葡萄糖耐量的作用，而 Inclisiran 对葡萄糖耐量的改善无明显作用。

实施例 12. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 改善比格犬血清低密度脂蛋白、胆固醇、高密度脂蛋白的实验

在给药前和给药 7 天后，取全血分离血清，通过全自动生化分析仪检测血清中甘油三酯、低密度脂蛋白、胆固醇，以给药前为基线计算给药后不同给药组指标变化率，绘制线图（参见图 13A、图 13B、图 13C）。

与模型组或阴性对照组相比，5 mg/kg Juju-JzJt-1 可以在比格犬中显著降低血清低密度脂蛋白和胆固醇水平，并升高血清高密度脂蛋白水平。

实施例 13. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 改善高脂血食蟹猴葡萄糖耐量的实验

24 只雄性高脂血食蟹猴（由江苏柯玛麒提供），实验期间保持高脂饲料喂养，随机分为以下 5 组：

模型组：不做任何处理；

NC 组：阴性对照组，以 5mg/kg 的剂量灌胃给予本草体 sphingosine(d18:1) - NC-小 RNA，连续给药 14 天；

Inclisiran 组：阳性对照组，以 5 mg/kg 的剂量皮下注射 Inclisiran，在实验第一天给药一次；

Juju-JzJt-1 组：以 5 mg/kg、15 mg/kg 或 50 mg/kg 剂量灌胃给予本草体 sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1，连续给药 14 天；

口服葡萄糖耐量试验

食蟹猴禁食 12 小时，对每只犬进行体重称量。测定空腹血糖，以 0 分钟血糖作为标记。按照体重灌胃给予 10ml/kg 的 30% 的葡萄糖溶液，分别在第 5 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟和 120 分钟尾静脉取血，血糖仪检测立即检测动物血糖，绘制折线图（参见图 14A 和图 14B）。

在食蟹猴口服葡萄糖耐量试验中，与阴性对照组相比，15 mg/kg sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 的治疗能显著地抑制血糖的上升并保持血糖处于平稳状态，而 Inclisiran 没有改善血糖的效果。

实施例 14. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 改善高脂血食蟹

猴血清低密度脂蛋白、胆固醇的实验

在给药前和给药期间，取全血分离血清，通过全自动生化分析仪检测血清中低密度脂蛋白和胆固醇含量，以给药前为基线计算给药后不同给药组指标变化率，绘制线图（参见图 15A、图 15B）。

5 与模型组或阴性对照组相比，5 mg/kg 或 15 mg/kg Juju-JzJt-1 均可显著降低食蟹猴血清低密度脂蛋白和胆固醇水平。5 mg/kg Juju-JzJt-1 效果与 Inclisiran 相当，15 mg/kg Juju-JzJt-1 效果更优。综上所述，本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 可以在灵长类动物中发挥改善血脂作用，效果不劣于 Inclisiran。

10 实施例 15. 本发明的本草体 Sphingosine(d18:1) - Juju-JzJt-1 改善高脂血症食蟹猴收缩压的实验

在实验第 11 天给药前测量食蟹猴收缩压，绘制点图（参见图 16）。

与阴性对照组相比，50mg/kg Juju-JzJt-1 可降低食蟹猴收缩压水平，而 Inclisiran 组没有改善血压的效果。综上所述，本发明的小 RNA Juju-JzJt-1 可以在灵长类动物中发挥改善血脂、血糖、血压的作用，且效果不劣于 Inclisiran。

实施例 16. 小 RNA Juju-JzJt-1 通过靶向 PCSK9 发挥降血脂功效，通过靶向 GCGR 发挥降血糖功效

培养 293T 细胞，分别转染小 RNA Juju-JzJt-1 和 NC，和转染 PCSK9 或 GCGR 的双荧光素酶报告基因质粒，48 小时后检测双荧光素酶活性（参见图 17A 和图 17B）。

与 NC 相比，Juju-JzJt-1 通过与 PCSK9（所述 PCSK9 的 NCBI 编号为 NM_174936.4）的蛋白质编码区序列 CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG（SEQ ID NO: 76）互补结合（参见图 17A），可以显著降低双荧光素酶的活性，而将 Juju-JzJt-1 与 PCSK9 结合区碱基突变之后，结合能力消失，证明小 RNA Juju-JzJt-1 通过靶向 PCSK9 而发挥降血脂功效。

与 NC 相比，Juju-JzJt-1 通过与 GCGR（所述 GCGR 的 NCBI 编号为 NM_000160.5）的蛋白质编码区的序列 CTGCTGTTGCTGCTGCTGCTG（SEQ ID NO: 77）互补结合（参见图 17B），可以显著降低双荧光素酶的活性，而将 Juju-JzJt-1 与 GCGR 结合区碱基突变之后，结合能力消失，证明小 RNA Juju-JzJt-1 通过靶向 GCGR 而发挥降血糖功效。

权利要求书：

1. 一种分离的核酸分子，其包含以下序列或由以下序列组成：

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列；

5 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列；

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有至多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的核苷酸序列，优选地与 SEQ ID NO: 1 至
10 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的核苷酸序列，

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列杂交的核苷酸序列，或

F) 靶向 PCSK9 或 GCGR 基因的核苷酸序列，优选地，能够与 SEQ ID NO:
15 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合的核苷酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的分离的核酸分子，其通过靶向 PCSK9 而发挥降血脂功效，优选地，其通过与 PCSK9 的 CDR、3'UTR 或 5'UTR 互补结合降低 PCSK9 的表达而发挥降血脂功效，优选地，与如 SEQ ID NO: 76 所示的 PCSK9 的 CDS
20 区互补结合降低 PCSK9 的表达而发挥降血脂功效。

3. 根据权利要求 1 或 2 任一项所述的分离的核酸分子，其是 RNA 分子或 DNA 分子。

25 4. 根据权利要求 3 所述的分离的核酸分子，其是小 RNA 分子，优选地，其是长度为 18-24 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，其是长度为 19、20、21、22、23、或 24 个核苷酸的小 RNA 分子。

5. 一种分离的小 RNA 分子，其靶向 PCSK9 基因，并且包含以下序列或由以下序列组成：
30

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列；

B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列；

35 C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 75 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列, 或

E) 与 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列互补结合的核苷酸序列。

5 6. 一种分离的小 RNA 分子, 其靶向如 SEQ ID NO: 76 或 77 所示的核苷酸序列, 优选地, 所述分离的小 RNA 分子包含以下序列或由以下序列组成:

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列;

B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、
10 99%序列同一性的序列;

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列, 优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列; 或

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 7 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列。
15

7. 根据权利要求 6 所述的分离的小 RNA 分子, 其通过靶向 PCSK9 CDS 和/或 GCGR CDS 而发挥降脂、降糖和/或降压功能。

20 8. 根据权利要求 5-7 中任一项所述的分离的小 RNA 分子, 其是单链或双链形式的小 RNA 分子。

9. 一种前体 miRNA, 其可在宿主内加工成如权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子。

25

10. 一种多核苷酸, 其可被宿主转录形成如权利要求 9 所述的前体 miRNA。

11. 一种表达载体, 其包含权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、
30 和/或权利要求 10 所述的多核苷酸。

12. 一种宿主细胞, 其被权利要求 11 所述的表达载体转染。

13. 一种药物组合物, 其包含治疗有效量的权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、或
35 权利要求 12 所述的宿主细胞, 以及一种或多种药学上可接受的佐剂、赋形剂和/

或稳定剂，优选地，所述药物组合物用于口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用。

5 14. 根据权利要求 13 所述的药物组合物，其中所述药物组合物中分离的核酸分子、分离的小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体或宿主细胞的含量为 0.1-1000 μ M、优选为 3.0 μ M-300 μ M。

10 15. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途，所述疾病选自高脂血症、高血压和糖尿病。

15 16. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途，所述疾病选自与血脂升高相关的疾病，优选地，所述疾病选自动脉粥样硬化、冠
20 心病、心肌梗塞、脑出血、脑血栓。

17. 一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权
25 利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物，所述疾病选自高脂血症、高血压和糖尿病。

18. 一种治疗基因表达异常相关疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权
30 利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物。

35 19. 一种抑制基因表达和/或活性的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权利要求 10 所

述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物。

20. 一种在有需要的受试者中治疗和/或预防与血脂升高相关的疾病的方法，
- 5 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 5-8 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 9 所述的前体 miRNA、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的表达载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物，所述与血脂升高相关的疾病选自动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗塞、脑出血、脑血栓。

10