靶向 INHBE 的 RNAi 剂

本公开要求 2024 年 03 月 08 日提交的中国专利申请 CN202410263661.7 和 2024 年 05 月 14 日提交的中国专利申请 CN202410594262.9 的优先权。

技术领域

本公开属于生物医药领域，具体涉及靶向抑制素 βE 基因（INHBE）的 siRNA、缀合物、组合物及其医药用途。

背景技术

抑制素 βE 基因（INHBE）是 TGF-β（转化生长因子-β）超家族蛋白中的成员之一，参与调节许多细胞过程，包括细胞增殖、细胞凋亡、免疫反应和激素分泌。抑制素负责抑制垂体分泌促卵泡素，可以参与调节许多不同的功能，例如下丘脑和垂体激素分泌、性腺激素分泌、生殖细胞发育和成熟、红细胞分化、胰岛素分泌、神经细胞存活、胚胎轴向发育或骨骼生长等。此外，INHBE 可能在内质网应激条件下被上调，从而该蛋白可能抑制胰腺和肝脏上的细胞增殖和生长。

体脂分布是心血管疾病和代谢疾病的一个重要判断依据，在各种体脂分布中，有一种特殊的体脂分布，很容易导致严重的心血管疾病或者代谢类疾病，其特征是腰部脂肪分布较多，和/或臀部脂肪堆积较少，从而导致腰臀比（WHR）较大。由于体脂分布异常导致的代谢类疾病包括：2 型糖尿病、高脂血症、血脂异常（低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C、甘油三酯、极低密度脂蛋白胆固醇 VLDL-C、载脂蛋白 B 或其他脂质部分的循环水平升高或改变）、肥胖症（特别是腹部肥胖）、脂肪代谢障碍、胰岛素抵抗、非酒精性脂肪性肝炎、高血压、高血糖、代谢综合征、冠状动脉疾病和其他动脉粥样硬化病症等。

目前，治疗代谢类疾病的方法主要有改变生活习惯、调节饮食、运动健身、服用降脂药（例如他汀类药物），但是这些方法效果较差，并且服用降脂药会产生一些副作用。干扰 RNAi（siRNA）是一种有效的沉默基因表达的方式，通过转录后调控机制，可以特异性降解与代谢类疾病相关的靶基因 mRNA，例如 INHBE，从而有效地抑制该靶基因表达，达到有效治疗此类疾病的目的。

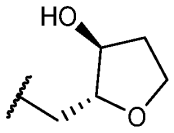
发明内容

本公开提供一种靶向 INHBE 的 RNAi 剂。

在一些实施方案中，本公开提供了一种 RNAi 剂，其包含形成双链区的正义链与反义链；所述正义链包含与 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸；所述反义链包含与 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID NO:18 中任一项所示的核苷酸序列相差不超过 3 个核

苷酸的至少 15 个连续核苷酸，其中，所述正义链中包含至少一个反向无碱基修饰的核苷和/或所述反义链中包含至少一个热不稳定修饰的核苷。

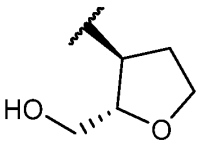
如无特别说明，在本公开的上下文中，所述反向无碱基修饰的核苷酸中的核苷具有如式（3-1）、如式（3-2）或如式（3-3）所示的结构，其中当所述反向无碱基修饰的核苷是序列 5’末端的第一个核苷时，其具有如式（3-1）所示的结构，当其是 3’ 末端的第一个核苷时，其具有如式（3-2）所示的结构，当其位于序列中间时，其具有如式（3-3）所示的结构：



朝向寡核苷酸3'端的键

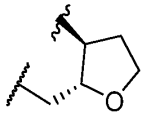
式（3-1）

朝向寡核苷酸5'端的键



式（3-2）；

朝向寡核苷酸5'端的键



朝向寡核苷酸3'端的键

式（3-3）。

在一些实施方案中，所述正义链中包含两个反向无碱基修饰的核苷，所述反向无碱基修饰的核苷是所述正义链的 5’端第一个核苷和 3’端第一个核苷。

在一些实施方案中，所述“相差不超过 3 个核苷酸”是指可以相差 0、1、2、3 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述“至少 15 个连续核苷酸”指至少连续 15、16、17、18、19、20 或 21 个核苷酸；优选地，至少连续 17、18、19、20 或 21 个核苷酸。

一些实施方案中，反义链与靶序列至少部分地互补以介导 RNA 干扰。在一些实施方案中，反义链与靶序列之间存在不多于 5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个错配。在一些实施方案中，反义链与靶序列完全反向互补。

一些实施方案中，正义链与反义链至少部分地反向互补以形成双链区。在一些实施方案中，正义链与反义链之间存在不多于 5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个错配。在一些实施方案中，正义链与反义链完全反向互补。

在一些实施方案中，本公开的 RNAi 剂包含一个或两个平端。

在一些实施方案中，本公开的 RNAi 剂的正义链和/或反义链各自独立地包含 1 个或 2 个未配对的核苷酸。一些实施方案中，所述反义链的 3’末端包含由未配对的核苷酸形成的突出端。

在一些实施方案中，所述正义链和反义链各自独立地由 16 至 35 个、16 至 34 个、17 至 34 个、17 至 33 个、18 至 33 个、18 至 32 个、18 至 31 个、18 至 30 个、18 至 29 个、18 至 28 个、18 至 27 个、18 至 26 个、18 至 25 个、18 至 24 个、18 至 23 个、19 至 25 个、19 至 24 个、或 19 至 23 个核苷酸组成。在一些实施方案中，所述正义链和反义链各自独立地由 18 个、19 个、20 个、21 个、22 个或 23 个核苷酸组成。

在一些实施方案中，所述正义链和反义链的长度相同或不同，所述正义链的长度为 19-23 个核苷酸，反义链的长度为 19-26 个核苷酸。因此，本公开提供的 RNAi 剂的正义链和反义链的长度比可以是 19/19、19/20、19/21、19/22、19/23、19/24、19/25、19/26、20/19、20/20、20/21、20/22、20/23、20/24、20/25、20/26、21/19、21/20、21/21、21/22、21/23、21/24、21/25、21/26、22/19、22/20、22/21、22/22、22/23、22/24、22/25、22/26、23/19、23/20、23/21、23/22、23/23、23/24、23/25 或 23/26。在一些实施方案中，所述 RNAi 剂的正义链和反义链的长度比为 19/19、19/21、21/21、21/23、23/23 或 23/25。在一些具体的实施方案中，所述正义链和反义链的长度比为 19/21、21/21 或 21/23。

在一些实施方案中，所述正义链包含如 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示的核苷酸序列；和/或所述反义链包含如 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID NO:18 中任一项所示的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述正义链是如 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示的核苷酸序列；和/或所述反义链是如 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID NO:18 中任一项所示的核苷酸序列。

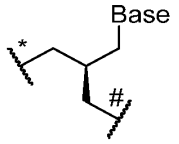
在一些实施方案中，所述正义链和/或反义链中至少一个核苷酸为修饰的核苷酸。在一些实施方案中，所述正义链和/或反义链中全部的核苷酸为修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，其中所述正义链中含有三个连续的 2’-氟代修饰的核苷酸。在一些实施方案中，按照从 5’端至 3’端的方向，第 7、8、9 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，当所述正义链 5’末端的一个核苷或多个核苷为反向无碱基修饰的核苷时，所述第 7、8、9 位的核苷指的是从第一个不是反向无碱基修饰的核苷为第 1 位开始计数的第 7、8、9 位，例如，对于如 SEQ ID NO:35 所示的正

义链：IBsUmsCmAmUmCmAmGfCfUfUmUmGmCmUmAmCmUmGmsUmsIB，以第 2 个核苷 Um 为第 1 位开始计数。其余位置的核苷酸为非 2’-氟代修饰的核苷酸，优选地，所述非 2’-氟代修饰的核苷酸为 2’-甲氧基修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，所述反义链中含有至少 5 个 2’-氟代修饰的核苷酸，例如可以含有 5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个 2’-氟代修饰的核苷酸。在一些实施方案中，按照 5’末端到 3’末端的方向，第 2、6、12、14 和 16 位的核苷酸各自独立地为 2’-氟代修饰的核苷酸。在一些实施方案中，所述反义链中含有 5 个 2’-氟代修饰的核苷酸，所述反义链中第 2、6、12、14 和 16 位的核苷酸各自独立地为 2’-氟代修饰的核苷酸，其余位置的核苷酸为 2’-氟代修饰的核苷酸。在一些实施方案中，所述反义链中含有 8 个 2’-氟代修饰的核苷酸，所述反义链中第 2、4、6、10、12、14、16、18 位的核苷酸各自独立地为 2’-氟代修饰的核苷酸，其余位置的核苷酸为非 2’-氟代修饰的核苷酸。在一些实施方案中，所述反义链中第 2、4、6、10、12、14、16、18 位的核苷酸为 2’-氟代修饰的核苷酸，第 7 位的核苷酸中的核苷为热不稳定修饰的核苷，其余位置的核苷酸为 2’-甲氧基修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，所述非氟代修饰的核苷酸为 2’ -甲氧基修饰的核苷酸或热不稳定修饰的核苷酸。所述热不稳定修饰的核苷酸是能够使核酸双链解离温度较未修饰的核酸双链降低的修饰。在一些实施方案中，所述热不稳定修饰的核苷酸具有如 WO2022028462A1 中所示的结构。在一些实施方案中，所述热不稳定修饰的核苷酸中的核苷具有如式（1）所示的结构：



式（1），

其中 Base 表示碱基，按照序列中从 5’ 端至 3’ 端的方向，“*”表示所述核苷与其 5’端相邻的核苷酸相连的位点，“#”表示与其 3’端相邻的核苷酸相连的位点。

在一些实施方案中，所述反义链中除 2’-氟代修饰的核苷酸外，其余位置的核苷酸均为 2’ -甲氧基修饰的核苷酸；或者所述反义链中第 7 位的核苷酸中的核苷为热不稳定修饰的核苷，其余位置的核苷酸为 2’-甲氧基修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，正义链和/或反义链中的至少一个磷酸二酯基为具有修饰基团的磷酸二酯基。所述修饰基团使得所述 RNAi 剂在生物样品或环境中具有增加的稳定性。在一些实施方案中，正义链和/或反义链中包括多个具有修饰基团的磷酸二酯基。在一些实施方案中，所述正义链和所述反义链中均含有多个具有修饰基团的磷酸二酯基，优选地，所述正义链和反义链中各自独立地含有至少

2 个具有修饰基团的磷酸二酯基。在一些实施方案中，所述正义链中含有 3 个具有修饰基团的磷酸二酯基，所述反义链中含有 4 个具有修饰基团的磷酸二酯基。在一些实施方案中，所述具有修饰基团的磷酸二酯基存在于选自以下的位置中的一处或多处：所述正义链的 5’末端端部和/或 3’末端端部第 1 个核苷酸到第 4 个核苷酸中的任意两个相邻的核苷酸之间，和/或所述反义链的 5’末端端部和/或 3’末端端部第 1 个核苷酸到第 4 个核苷酸中的任意两个相邻的核苷酸之间。例如，可以位于所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

在一些实施方案中，所述具有修饰基团的磷酸二酯基为硫代磷酸二酯基。

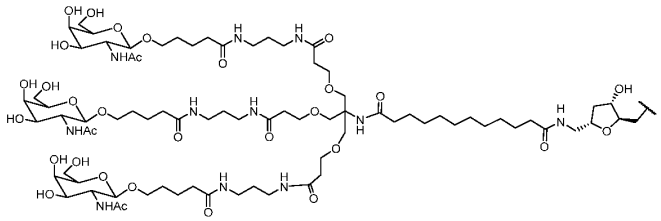
在一些实施方案中，所述正义链选自或包含：SEQ ID NO：19 至 SEQ ID NO：45 中任一项所示的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述反义链选自或包含：SEQ ID NO：74 至 SEQ ID NO：100 中任一项所示的核苷酸序列。

在一些实施方案中，本公开的 RNAi 剂还包含 1 个或多个递送基团。在一些实施方案中，所述 1 个或多个递送基团与正义链相连。优选地，本公开的 RNAi 剂含有 1 个递送基团。

在一些实施方案中，所述递送基团含有至少 1 个靶向肝脏的靶向配体。在一些实施方案中，所述靶向配体结合脱唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）。一些实施方案中，所述靶向配体包括半乳糖簇或半乳糖衍生物簇，所述半乳糖衍生物选自 N-乙酰基-半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺或 N-异丁酰基半乳糖胺，优选地，所述靶向配体为 N-乙酰基半乳糖胺（GalNAc）配体。在一些实施方案中，所述递送具体可以是如 PCT 申请 WO2023274395A 中如式（I）所示的核酸配体。

在一些实施方案中，所述递送基团具有如式（2）所示的结构：



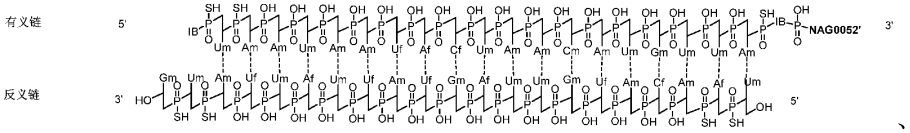
式（2）。

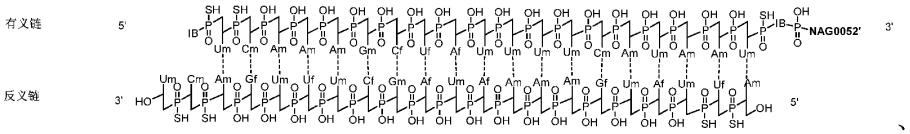
在一些实施方案中，所述递送基团通过磷酸二酯基团或硫代磷酸二酯基团与正义链的 3’末端的第一个核苷酸的核苷直接连接。

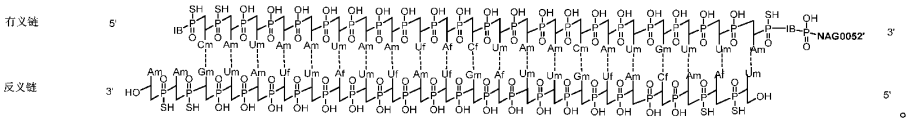
在一些实施方案中，本公开的 RNAi 剂中，所述正义链包含或选自如 SEQ ID NO:46 至 SEQ ID NO:73 中任一项所示的核苷酸序列；所述反义链包含或选自如 SEQ ID NO:101 至 SEQ ID NO:128 中任一项所示的核苷酸序列。

在一些实施方案中，其中，所述 RNAi 剂选自表 2b 中任一所示的 RNAi 剂。在一些实施方案中，所述 RNAi 剂选自 TJR102314、TJR102316、TJR102317、TJR102318、TJR102323、TJR102526、TJR102153、TJR102705、TJR102701、TJR102702、TJR102703、TJR102704、TJR102706、TJR102707、TJR102938、TJR102939、TJR102940、TJR102942、TJR102943、TJR102944、TJR102969、TJR102970 和 TJR102971。

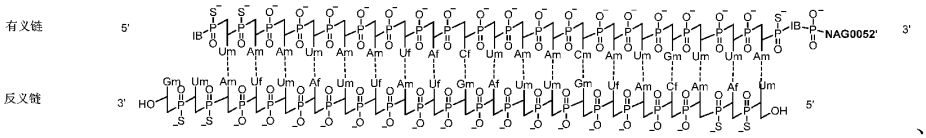
在一些实施方案中，其中，所述 RNAi 剂为如下结构或其药学上可接受的盐：

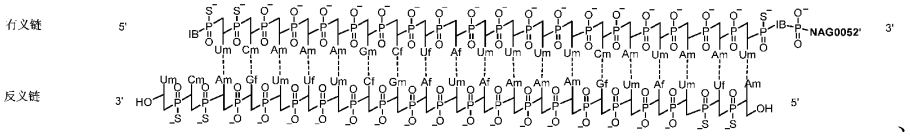


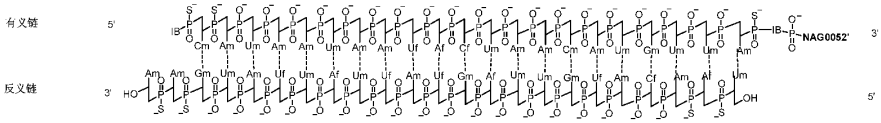




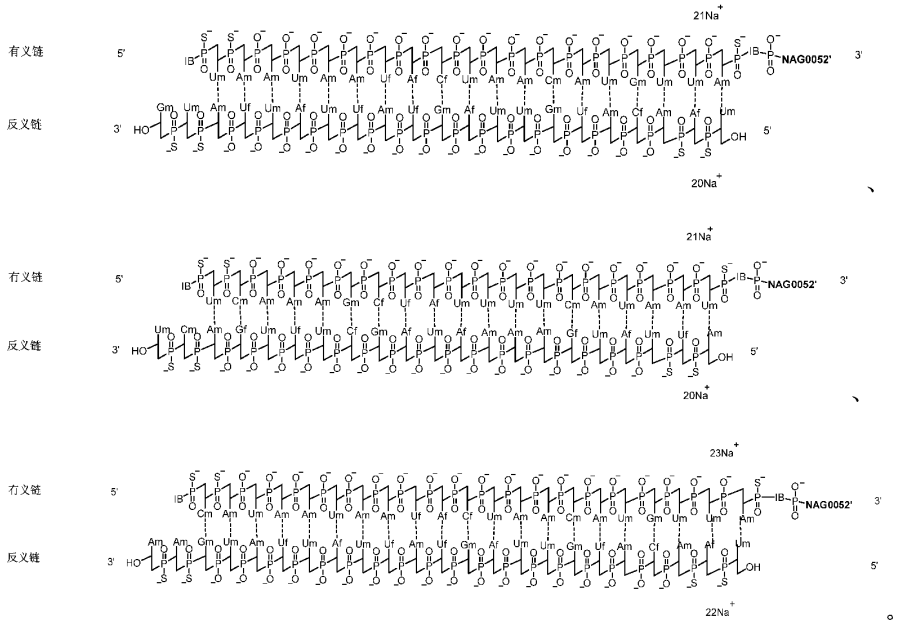
在一些实施方案中，所述 RNAi 剂包含如下结构：







在一些实施方案中，所述 RNAi 剂的药学上可接受的盐具有如下结构：



上述结构式中，有义链中按照 5’端至 3’端的方向为从左至右的方向，反义链中按照 3’端至 5’端的方向为从左至右的方向，IB 表示反向无碱基修饰的核苷，m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷为 2'-甲氧基修饰的核苷，f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷为 2'-氟代修饰的核苷；NAG0052’表示递送基团 NAG0052’。

反向无碱基修饰的核苷、2’-甲氧基修饰的核苷、2’-氟代修饰的核苷和递送基团 NAG0052’的结构均如下文表 1 中所示。

 表示硫代磷酸二酯基的阴离子形式， 表示磷酸二酯基的阴离子形式， 表示硫代磷酸二酯基的离子形式， 表示磷酸二酯基的离子形式， 表示硫代磷酸二酯基， 表示磷酸二酯基。所述硫代磷酸二酯基的离子形式、磷酸二酯基的离子形式、硫代磷酸二酯基和磷酸二酯基的结构如下文表 1 中所示。

另一方面，本公开提供一种药物组合物，其包含本公开所述的 RNAi 剂，和一种或多种其药学上可接受的载体；例如但不限于赋形剂、载剂（vehicle）、运载体（carrier）、稀释剂、和/或递药系统（如递送聚合物）。各种递药系统是已知的并且可以用于本公开 RNAi 剂，例如封装在脂质体中、微粒、微囊、能够表达

RNAi 剂的重组细胞、受体介导的细胞内吞作用、构建核酸作为逆转录病毒或其他载体的一部分。

在一些实施方案中，所述药物组合物中还可以包含药学上可接受的辅料和/或佐剂，该辅料可以为一种或多种本领域常规采用的各种制剂或化合物。例如，所述药学上可接受的辅料可以包括 pH 缓冲剂、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。

在一些实施方案中，所述的药物组合物的单位剂量为 0.001mg-1000mg。

在某些实施方案中，基于组合物的总重量，所述的药物组合物含有 0.01-99.99％的前述 RNAi 剂或其可药用盐或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.1-99.9％的前述 RNAi 剂或其可药用盐或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.5％-99.5％的前述 RNAi 剂或其可药用盐或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 1％-99％的前述 RNAi 剂或其可药用盐或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 2％-98％的前述 RNAi 剂或其可药用盐或其同位素取代物。

在某些实施方案中，基于组合物的总重量，所述的药物组合物含有 0.01％-99.99％的药学上可接受的载体。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.1％-99.9％的药学上可接受的载体。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.5％-99.5％的药学上可接受的载体。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 1％-99％的药学上可接受的载体。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 2％-98％的药学上可接受的载体。

在一些实施方案中，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot 或流式细胞术测定的，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物会抑制靶基因的表达至少 5％、至少 10％、至少 15％、至少 20％、至少 25％、至少 30％、至少 35％、至少 40％、至少 45％、至少 50％、至少 55％、至少 60％、至少 65％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 91％、至少 92％、至少 93％、至少 94％、至少 95％、至少 96％、至少 97％、至少 98％、或至少 99％。

在一些实施方案中，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot 或流式细胞术测定的，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物引起的靶基因 mRNA 剩余表达百分比为不高于 99%、不高于 95%、不高于 90%、不高于 85%、不高于 80%、不高于 75%、不高于 70%、不高于 65%、不高于 60%、不高于 55%、不高于 50%、不高于 45%、不高于 40%、不高于 35%、不高于 30%、

不高于 25%、不高于 20%、不高于 15%、或不高于 10%。

在一些实施方案中，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot、或流式细胞术测定的，RNAi 剂在保持在靶活性的同时，将脱靶活性减少了至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%或至少 75%。

在一些实施方案中，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot、或流式细胞术测定的，RNAi 剂使在靶活性的降低不超过 20%、至多 19%、至多 15%、至多 10%、至多 5%或超过 1%；同时，将脱靶活性减少了至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%或至少 75%。

在一些实施方案中，本公开所述 RNAi 剂或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot、或流式细胞术测定的，RNAi 剂使在靶活性提高至少 1%、至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%或至少 80%；同时，将脱靶活性减少了至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%或至少 75%。

另一方面，本公开提供一种降低 INHBE 表达的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物。

另一方面，本公开提供一种治疗和/或预防受试者与 INHBE 基因表达相关的疾病的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物。在一些实施方案中，其中所述相关疾病是代谢障碍类疾病。在一些实施方案中，所述代谢障碍类疾病选自代谢综合征（MS）、心血管疾病、肥胖症、肝炎、肾疾病中的一种或多种。

另一方面，本公开提供了本公开所述 RNAi 剂和/或药物组合物在制备治疗和/或预防相关疾病的药物中的用途。在一些实施方案中，所述相关疾病是与 INHBE 基因表达相关的疾病。在一些实施方案中，其中所述相关疾病是代谢障碍类疾病。在一些实施方案中，所述代谢障碍类疾病选自代谢综合征（MS）、心血管疾病、肥胖症、肝炎、肾疾病中的一种或多种。

另一方面，本公开提供了本公开所述 RNAi 剂和/或药物组合物在制备用于

抑制 INHBE 的表达的药物中的用途

另一方面，本公开公开了一种体内递送抑制 INHBE 表达和/或复制的 RNAi 剂的方法，所述方法包括给予受试者有效量或有效剂量的本公开的 RNAi 剂和/或或药物组合物。

本文所公开的 RNAi 剂或药物组合物和方法可以在细胞、细胞群、细胞群、组织或受试者中降低靶 mRNA 的水平，包括：向受试者给予治疗有效量的本公开所述的 RNAi 剂或药物组合物，所述 RNAi 剂与所述递送基团连接，从而抑制靶 mRNA 在受试者中的表达。

在一些实施方案中，在给予本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物前，所述受试者已被鉴定为在靶向的细胞或组织中具有靶基因的病理性上调。

本公开中所述的受试者是指确诊患有（或疑似患有、或易感于）将会受益于靶 mRNA 表达之减少或抑制的疾病或病症的受试者。

本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物递送可以是通过局部给药（例如，直接注射、植入、或局部给予），全身给药，或皮下，静脉内，腹膜内，或胃肠外途径，包括颅内（例如，心室内，实质内和鞘内），肌肉内，透皮，气道（气溶胶），鼻，口服，直肠，或局部（包括口颊和舌下）给药等任何合适的本领域常见的给药方式进行递送给药。

可选的实施方案中，本公开提供的药物组合物可以通过注射给予，例如，静脉内、肌内、皮内、皮下、十二指肠内或腹膜内注射。

可选的实施方案中，当靶向配体与 RNAi 剂连接成缀合物后，所述缀合物形式的 RNAi 剂可被包装在试剂盒中。

另一方面，本公开提供了一种细胞，其包含本公开的 RNAi 剂。所述细胞不能发育成动植物个体。

另一方面，本公开提供了一种试剂盒，其包含本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物。可选的实施方案中，当递送基团与 RNAi 剂连接成缀合物后，所述缀合物可被包装在试剂盒中。

本公开还提供了一种用于沉默细胞中靶基因的 mRNA 的方法，该方法包括将本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物引入该细胞中的步骤。

本公开还提供了一种用于在体内或在体外沉默细胞中靶基因或靶基因的 mRNA 的方法，该方法包括将根据本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物引入该细胞中的步骤。

本公开还提供了一种用于抑制靶基因或靶基因的 mRNA 表达的方法，该方法包括向有其需要的受试者施用有效量或有效剂量的根据本公开的 RNAi 剂和/或药物组合物。

在一些实施方案中，RNAi 剂和/或药物组合物的有效量或有效剂量为约 0.001mg/kg 体重至约 200mg/kg 体重、约 0.01mg/kg 体重至约 100mg/kg 体重或约

0.5mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重。

在一些实施方案中，靶基因是 INHBE 基因，靶 mRNA 是靶基因表达的 mRNA。

本公开还提供了一种制备 RNAi 剂的方法，其包括：合成本公开所述的 RNAi 剂。

本公开中所述化合物的可药用盐选自无机盐或有机盐，本公开所述化合物可与酸性或碱性物质反应成相应盐。本公开的上下文中，所述化合物包括本公开的 RNAi 剂。在一些实施方案中，所述可药用盐是钠盐。

另一方面，在不指明构型的情况下，本公开化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本公开设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、（-）-和（+）-对映体、（R）-和（S）-对映体、非对映异构体、（D）-异构体、（L）-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本公开的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本公开的范围之内。

另外，在不指明构型的情况下，本公开的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本公开的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。

本公开化合物可以是不对称的，例如，具有一个或多个立体异构体。除非另有说明，所有立体异构体都包括，如对映异构体和非对映异构体。本公开的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分，或通过使用手性原料或手性试剂合成。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的（R）-和（S）-异构体以及 D 和 L 异构体。如果想得到本公开某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。

本公开还包括一些与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本公开化合物。可结合到本公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{13}N、^{15}N、^{15}O、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F、^{123}I、^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

在不指明构型的情况下，本公开的化学结构中，键“／”表示未指定构型，即

如果化学结构中存在手性异构体，键“／”可以为“”或“”，或者同时包含“”和“”两种构型。虽然为简便起见将全部本公开所述结构式画成某些异构体形式，但是本公开可以包括所有的异构体，如互变异构体、旋转异构体、几何异构体、非对映异构体、外消旋体和对映异构体。本公开所述化合物的化学结构中，键“”并未指定构型，即键“”的构型可以为 E 型或 Z 型，或者同时包含 E 和 Z 两种构型。

本公开引入 WO2023138663A1、WO2022028462A1、WO2023274395A1、WO2023274395A 和 WO2024179573A1 全文。

术语解释

为了更容易理解本公开，以下具体定义了一些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本文使用的“RNAi 剂”（也称为“RNAi 触发剂”）意指含有能够以序列特异性方式降解或抑制（例如在适当的条件下降解或抑制）靶 mRNA 的信使 RNA（mRNA）转录物的翻译的 RNA 或 RNA 样（例如化学修饰 RNA）寡核苷酸分子。本文使用的 RNAi 剂可通过 RNA 干扰机制（即通过与哺乳动物细胞的 RNA 干扰途径机构（RNA 诱导的沉默复合物或 RISC）相互作用诱导 RNA 干扰）或通过任何备选机制或途径起作用。尽管认为本文使用的术语 RNAi 剂主要通过 RNA 干扰机制起作用，但所公开的 RNAi 剂不受任何特定作用途径或机制的束缚或限制。本文公开的 RNAi 剂由正义链和反义链组成，并且包括（但不限于）短（或小）干扰 RNA（siRNA）。本文所述的 RNAi 剂的反义链与所靶向的 mRNA 至少部分互补。RNAi 剂可包含一个或多个修饰核苷酸和/或一个或多个非磷酸二酯连键。

如无特别说明，在本公开上下文中，术语“抑制素 βE”、“INHBE”、在本公开中可互换使用。INHBE 包括但不限于人类 INHBE、食蟹猴 INHBE、小鼠 INHBE、大鼠 INHBE，其氨基酸和完整编码序列、mRNA 序列容易利用已公开的数据库取得，例如，GenBank、UniProt、OMIM 和猕猴（Macaca）基因组计划网站。

术语“INHBE”亦指 INHBE 基因的天然存在的 DNA 序列变异，如 INHBE 基因中的单核苷酸多态性（SNP）。示例性 SNP 可在 dbSNP 数据库中发现。

术语“靶序列”指在 INHBE 转录期间所形成的 mRNA 分子的核苷酸序列的连续部分，包括作为主要转录产物的 RNA 加工产物的 mRNA。所述靶序列中被靶向的部分应当足够长，才能作为 iRNA 指导的切割（iRNA-directed cleavage）的底物。在一个实施方案中，该靶序列在 INHBE 的蛋白质编码区内。如本文所使用的，在 RNA 介导的基因沉默的情形中，正义链（又称 SS、SS 链或有义链）

是指包含与靶 mRNA 序列相同或基本上相同的序列的链；反义链（又称 AS 或 AS 链）是指具有与靶 mRNA 序列互补或基本上互补的序列的链。

在描述本文所述的 RNAi 剂正义链的上下文中，术语“与 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸序列”旨在表示本文所述的 RNAi 剂正义链包含如 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸，或与 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸序列（任选地，相差不超过 2 个核苷酸序列；任选地，相差 1 个核苷酸序列）。本公开上下文中其他类似描述也应作相似理解，本公开所述“相差”不包含含有不同修饰的核苷酸的情形，即，含有同样碱基但不同的修饰的核苷酸不属于本公开所述相差的核苷酸。对本公开的上下文中对正义链和/或反义链的其他类似描述也应作同样理解。

本公开中，正义链或反义链的“5’区域”也即“5’端”、“5’末端”，可替换使用。例如反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位的核苷酸，也可替换为反义链 5’端的第 2 位至第 8 位的核苷酸。同理，正义链或反义链的“3’区域”、“3’末端”和“3’端”也可替换使用。

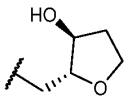
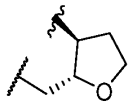
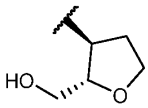
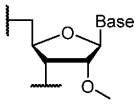
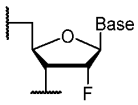
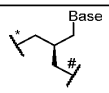
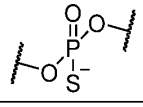
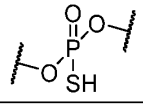
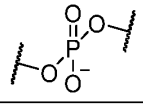
如无特别说明，本公开上下文中，“G”、“C”、“A”、“T”与“U”分别代表核苷酸，其分别包含鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷与尿嘧啶的碱基。本领域技术人员所熟知的是，碱基 T 和 U 的替换不会对 RNAi 剂序列的性质产生显著影响，本公开的序列中 U 可以任意替换为 T，替换后得到的序列也在本公开的保护范围。本公开的序列中，对于同一条核酸链，以从 5’端至 3’端的方向为从左至右的方向，小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷为 2'-甲氧基修饰的核苷；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷为 2'-氟代修饰的核苷；小写字母 s 表示与该字母 s 相邻的两个核苷之间为硫代磷酸二酯基连接，无特别说明，两个核苷之间通过磷酸二酯基连接; hmpNA 表示与其右侧相邻的括号中的一个核苷为具有 hmpNA 修饰的核苷；IB 表示反向无碱基修饰的核苷。如无特殊说明，本公开的“RNAi 剂”、“核苷酸”、“化合物”、“化学修饰”、“寡核苷酸”、“双链 RNAi 抑制剂分子”、“siRNA”、 “dsRNA”、“核酸”和“RNAi”均可独立地以盐、混合盐或非盐（例如游离酸或游离碱）的形式存在。当以盐或混合盐的形式存在时，其可为药学上可接受的盐。

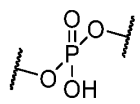
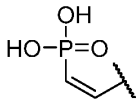
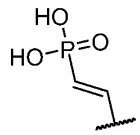
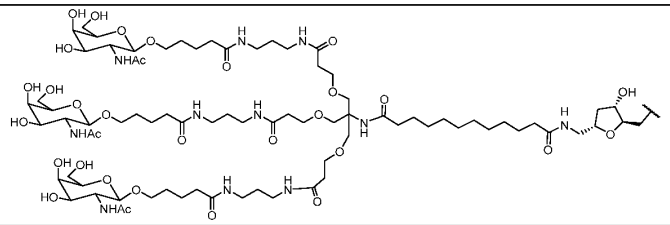
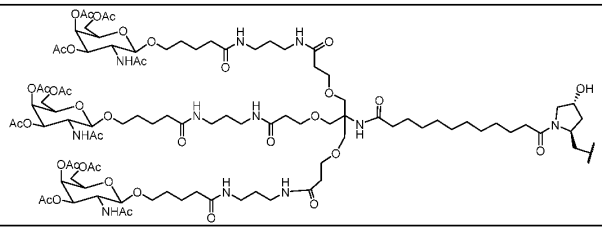
术语“药学上可接受的盐”包括药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的碱加成盐。当其以盐形式存在时，部分基团可能离子化形成阴离子/阳离子，例如，磷酸二酯基、硫代膦酸二酯基可以以阴离子形式存在，除非另有说明，下列各结构对应的盐形式的结构也在本公开的保护范围中。如无特别说明，每条链 3’端的第一个核苷酸的 3’位置为羟基；每条链 5’端的第一个核苷酸的 5’ 位置是羟

基。

上述修饰及连接基团分别具有如下表 1 中所示结构，其中 Base 表示对应位置的碱基：

表 1

结构	名称
 朝向寡核苷酸3'端的键；	位于序列 5’末端时的反向无碱基修饰的核苷
朝向寡核苷酸5'端的键  朝向寡核苷酸3'端的键	位于序列中间时的反向无碱基修饰的核苷
朝向寡核苷酸5'端的键 	位于序列 3’末端时的反向无碱基修饰的核苷
	2'-甲氧基修饰的核苷
	2'-氟代修饰的核苷
 按照序列中从 5’端至 3’端的方向，“*”所述核苷与其 5’端相邻的核苷酸相连的位点，“#” 所述核苷与其 3’端相邻的核苷酸相连的位点	hmpNA 修饰的核苷
	硫代磷酸二酯基阴离子形式
	硫代磷酸二酯基
	磷酸二酯基阴离子形式

	磷酸二酯基
	*Z*-乙烯基磷酸基
	*E*-乙烯基磷酸基
	-NAG0052’
	-L96’

如本文所使用的，术语“互补”或“反向互补”一词可互相替代使用，并具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，一条链的碱基与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。在 DNA 中，嘌呤碱基腺嘌呤始终与嘧啶碱基胸腺嘧啶（或者在 RNA 中为尿嘧啶）相配对；嘌呤碱基鸟嘌呤始终与嘧啶碱基胞嘧啶相配对。每个碱基对都包括一个嘌呤和一个嘧啶。当一条链上的腺嘌呤始终与另一条链上的胸腺嘧啶（或尿嘧啶）配对，以及鸟嘌呤始终与胞嘧啶配对时，两条链被认为是彼此相互补的，以及从其互补链的序列中可以推断出该链的序列。与此相应地，“错配”在本领域中意指在双链核酸中，对应位置上的碱基并未以互补的形式配对存在。

如本文所使用的，术语“抑制”，可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“阻抑”和其他类似术语交替使用，并且包括任何水平的抑制。抑制可通过这些变量中的一个或多个与对照水平相比的绝对或相对水平的减少来评估。该对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平，例如给药前基线水平或从未经处理或经对照（例如仅缓冲液对照或惰性剂对照）处理的受试者、细胞、或样品确定的水平。例如，可以采用 mRNA 剩余表达量来表征 RNAi 剂对靶基因表达的抑制程度，如 mRNA 剩余表达量为不高于 99%、不高于 95%、不高于 90%、不高于 85%、不高于 80%、不高于 75%、不高于 70%、不高于 65%、不高于 60%、不高于 55%、

不高于 50%、不高于 45%、不高于 40%、不高于 35%、不高于 30%、不高于 25%、不高于 20%、不高于 15%、或不高于 10%。靶基因表达的抑制率可以采用 Dual-Glo® Luciferase Assay System 检测，分别读取萤火虫化学发光值（Fir）和海肾化学发光值（Ren），计算相对值 Ratio= Ren/Fir；本公开中，剩余 mRNA 表达量比例（或剩余活性%）=Ratio （RNAi 剂处理组）/Ratio （无 RNAi 剂对照组），抑制率（%）=100%-剩余 mRNA 表达量（%）。

术语“药学上可接受的盐”包括药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的碱加成盐。

“药学上可接受的酸加成盐”是指能够保留游离碱的生物有效性而无其它副作用的，与无机酸或有机酸所形成的盐。无机酸盐包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等；有机酸盐包括但不限于甲酸盐、乙酸盐、2,2-二氯乙酸盐、三氟乙酸盐、丙酸盐、己酸盐、辛酸盐、癸酸盐、十一碳烯酸盐、乙醇酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、癸二酸盐、己二酸盐、戊二酸盐、丙二酸盐、草酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、油酸盐、肉桂酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、谷氨酸盐、焦谷氨酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、4-氨基水杨酸盐、萘二磺酸盐等。这些盐可通过本领域已知的方法制备。

“药学上可接受的碱加成盐”是指能够保持游离酸的生物有效性而无其它副作用的、与无机碱或有机碱所形成的盐。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。一些实施方案无机盐为铵盐、钠盐、钾盐、钙盐及镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下的盐：伯胺类、仲胺类及叔胺类，被取代的胺类，包括天然的被取代胺类、环状胺类及碱性离子交换树脂，例如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二甲基乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。一些实施方案有机碱包括异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己基胺、胆碱及咖啡因。这些盐可通过本领域已知的方法制备。

“有效量”或“有效剂量”指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的 RNAi 剂、化合物或药物组合物的量。对于预防用途，有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作，包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，诸如减少各种本公开靶基因、靶 mRNA 或靶蛋白相关病症的发病率或改善所述病症的一个或更多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓患者的

本公开靶基因、靶 mRNA 或靶蛋白相关病症的进展。

如本文所使用的，“患者”、“受试者”或“个体”可互换使用，包括人类或者非人类动物，例如哺乳动物，例如人或猴。

本公开提供的 RNAi 剂可以通过本领域常规的制备方法（例如固相合成和液相合成的方法）得到。其中，固相合成已经有商业化订制服务。可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的 RNAi 剂中，制备具有相应修饰的核苷单体的方法及将修饰的核苷酸基团引入 RNAi 剂的方法也是本领域技术人员所熟知的。

术语“化学修饰”或“修饰”包括核苷酸经化学手段或酶活手段的所有改变，例如化学部分的添加或去除、或以一个化学部分取代另一个化学部分。

术语“碱基”包含任何已知的 DNA 和 RNA 碱基、碱基类似物，例如嘌呤或嘧啶，其还包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、次黄苷和天然类似物。

术语“平端”或“平末端”可互换使用，是指在 RNAi 剂的给定的末端没有非配对的核苷酸或核苷酸类似物，即，没有核苷酸突出。大多数情况下，两个末端都是平末端的 RNAi 剂将在其整个长度范围内是双链的。

术语“约”、“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内，所述数值部分取决于怎样测量或测（即测量体系的限度）。例如，“约”可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者，“约”或“基本上包含”可意味着至多 20％的范围，例如 1%至 15%之间、在 1%至 10%之间、在 1%至 5%之间、在 0.5%至 5%之间、在 0.5%至 1%之间变化。本公开中，数字或数值范围之前有术语“约”的每种情况也包括给定数的实施方案。除非另外说明，否则当具体值在本申请和权利要求中出现时，“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

除另有说明，“任选地”、“任选”、“可选的”或“可选”是指意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如“任选地，R1 和 R2 直接相连成环”是指 R1 和 R2 直接相连成环可以发生但不必须存在，该说明包括 R1 和 R2 直接相连成环的情形和 R1 和 R2 不成环的情形。

在本公开的化学结构式中，“”或或其可以根据本文所述发明范围连接一个或多个任何基团。

术语“连接”，当表示两个分子之间的联系时，指两个分子通过共价键连接或者两个分子经由非共价键（例如，氢键或离子键）关联，包括直接连接、间接连接。

术语“直接连接”指第一化合物或基团与第二化合物或基团在没有任何间插

原子或原子基团的情况下连接。

术语“间接连接”指第一化合物或基团与第二化合物或基团通过中间基团、化合物或分子（例如，连接基团）连接。

术语“取代的”表示指定原子（通常是碳、氧和氮原子）上的任何一个或多个氢原子被本文所限定的任何基团所替代，条件是不超过所述指定原子的正常化合价并且取代生成稳定化合物。取代基的非限制性示例包括 C1-C6 烷基、C2-C6 烯基、C2-C6 炔基、氰基、羟基、氧代基、羧基、环烷基、环烯基、杂环基、杂芳基、芳基、酮、烷氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基或卤素（例如，F、Cl、Br、I）。当取代基是酮或氧代（即，=O）时，则原子上有两个（2 个）氢被替代。

“被一个或多个……取代”是指可以被单个或多个取代基取代。当被多个取代基取代时，可以是复数个相同取代基，也可以是一个或复数个不同取代基的组合。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；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，则该试剂可自任意分子生物学试剂的供应商以用于分子生物学应用的质量/纯度而获得。除非特别说明，以下实施例中所用的试剂均为市售商品。

实施例 1. INHEBE RNAi 剂的设计

以人 **INHBE** 基因（NM_031479.5）作为靶基因，以满足活性 siRNA 的一般规则设计本公开的 RNAi 剂。未经修饰的正义链及反义链序列见表 2a，经过 2’-氟代、2’-甲氧基等修饰的正义链和反义链序列详见表 2b。

表 2a. 未修饰的正义链、反义链

双链编号	SEQ ID NO:	SS 链（5'-3’）	SEQ ID NO:	AS 链（5'-3'）
TJR102661	1	UCAAAGCUAUUUUCAUAAU	10	AUUAUGAAAAUAGCUUUGAC U
TJR102826	2	UAAUGGCAAUGUGGUCAAA	11	UUUGACCACAUUGCCAUUAU G
TJR102831	3	UCAUCAGCUUUGCUACUGU	12	ACAGUAGCAAAGCUGAUGAC C
TJR102835	4	AGACCAAGAUGAAGUUUCA	13	UGAAACUUCAUCUUGGUCUC U

TJR102668	5	UUAAUAAAAAGGAGAAAGA	14	UCUUUCUCCUUUUUAUUAAGA
TJR102673	6	AAAAGGAGAAAGAAAAUCA	15	UGAUUUUCUUUCUCCUUUUUA
TJR102664	7	UAAUAAUACUAACAUGUUA	16	UAACAUGUUAGUAUUAUUAUG
TJR102667	8	CAUAAUAAUACUAACAUGUUA	17	UAACAUGUUAGUAUUAUUAUGAA
TJR102676	9	UAAAAAGGAGAAAGAAAAU	18	AUUUUCUUUCUCCUUUUUAUU

表 2b. 靶向 INHBE 基因的 RNAi 剂序列

双链编号	SEQ ID NO	SS 链（5'-3'）	SEQ ID NO:	AS 链（5'-3'）
TJR103001	19	IBsUmsCmAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUmsIB	74	AmsUfsUmAmUmGfAmAmAmAmUmAfGmCfUmUfUmGmAmsCmsUm
TJR103003	20	IBsUmsCmAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUmsIB	75	AmsUfsUmAfUmGfAmAmAmAfUmAfGmCfUmUfUmGfAmsCmsUm
TJR103004	21	IBsUmsCmAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUmsIB	76	AmsUfsUmAfUmGfhmpNA（A）AmAmAfUmAfGmCfUmUfUmGfAmsCmsUm
TJR103005	22	IBsUmsAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB	77	UmsAfsAmCmAmUfGmUmUmAmGmUfAmUfUmAfUmUmAmsUmsGm
TJR103007	23	IBsUmsAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB	78	UmsAfsAmCfAmUfGmUmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmsUmsGm
TJR103008	24	IBsUmsAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB	79	UmsAfsAmCfAmUfhmpNA（G）UmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmsUmsGm
TJR103009	25	IBsUmsUmAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAmsIB	80	UmsCfsUmUmUmCfUmCmCmUmUmUfUmUfAmUfUmAmAmsGmsAm
TJR103011	26	IBsUmsUmAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAmsIB	81	UmsCfsUmUfUmCfUmCmCmUfUmUfUmUfAmUfUmAfAmsGmsAm
TJR103012	27	IBsUmsUmAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAmsIB	82	UmsCfsUmUfUmCfhmpNA（U）CmCmUfUmUfUmUfAmUfUmAfAmsGmsAm

TJR1030 13	28	IBsAmsAmAmAmGmGmAfGf AfAmAmGmAmAmAmAmUm CmsAmsIB	83	UmsGfsAmUmUmUfUmCmUmUm UmCfUmCfCmUfUmUmUmsUms Am
TJR1030 15	29	IBsAmsAmAmAmGmGmAfGf AfAmAmGmAmAmAmAmUm CmsAmsIB	84	UmsGfsAmUfUmUfUmCmUmUfU mCfUmCfCmUfUmUfUmsUmsAm
TJR1030 16	30	IBsAmsAmAmAmGmGmAfGf AfAmAmGmAmAmAmAmUm CmsAmsIB	85	UmsGfsAmUfUmUfhmpNA （U） CmUmUfUmCfUmCfCmUfUmUfU msUmsAm
TJR1030 17	31	IBsUmsAmAmUmGmGmCfAf AfUmGmUmGmGmUmCmAm AmAmsIB	86	UmsUfsUmGmAmCfCmAmCmAm UmUfGmCfCmAfUmUmAmsUms Gm
TJR1030 19	32	IBsUmsAmAmUmGmGmCfAf AfUmGmUmGmGmUmCmAm AmAmsIB	87	UmsUfsUmGfAmCfCmAmCmAfU mUfGmCfCmAfUmUfAmsUmsGm
TJR1030 20	33	IBsUmsAmAmUmGmGmCfAf AfUmGmUmGmGmUmCmAm AmAmsIB	88	UmsUfsUmGfAmCfhmpNA （C） AmCmAfUmUfGmCfCmAfUmUfA msUmsGm
TJR1030 21	34	IBsUmsCmAmUmCmAmGfCf UfUmUmGmCmUmAmCmUm GmsUmsIB	89	AmsCfsAmGmUmAfGmCmAmAm AmGfCmUfGmAfUmGmAmsCms Cm
TJR1030 23	35	IBsUmsCmAmUmCmAmGfCf UfUmUmGmCmUmAmCmUm GmsUmsIB	90	AmsCfsAmGfUmAfGmCmAmAfA mGfCmUfGmAfUmGfAmsCmsCm
TJR1030 24	36	IBsUmsCmAmUmCmAmGfCf UfUmUmGmCmUmAmCmUm GmsUmsIB	91	AmsCfsAmGfUmAfhmpNA （G） CmAmAfAmGfCmUfGmAfUmGfA msCmsCm
TJR1030 25	37	IBsAmsGmAmCmCmAmAfGf AfUmGmAmAmGmUmUmUm CmsAmsIB	92	UmsGfsAmAmAmCfUmUmCmAm UmCfUmUfGmGfUmCmUmsCms Um
TJR1030 27	38	IBsAmsGmAmCmCmAmAfGf AfUmGmAmAmGmUmUmUm CmsAmsIB	93	UmsGfsAmAfAmCfUmUmCmAfU mCfUmUfGmGfUmCfUmsCmsUm
TJR1030 28	39	IBsAmsGmAmCmCmAmAfGf AfUmGmAmAmGmUmUmUm CmsAmsIB	94	UmsGfsAmAfAmCfhmpNA （U） UmCmAfUmCfUmUfGmGfUmCfU msCmsUm
TJR1030 29	40	IBsCmsAmUmAmAmUmAmA mUfAfCfUmAmAmCmAmUm GmUmUmAmsIB	95	UmsAfsAmCmAmUfGmUmUmAm GmUfAmUfUmAfUmUmAmUmG msAmsAm
TJR1030 31	41	IBsCmsAmUmAmAmUmAmA mUfAfCfUmAmAmCmAmUm GmUmUmAmsIB	96	UmsAfsAmCfAmUfGmUmUmAfG mUfAmUfUmAfUmUfAmUmGms AmsAm

TJR103032	42	IBsCmsAmUmAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB	97	UmsAfsAmCfAmUfhmpNA （G）UmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmUmGmsAmsAm
TJR103033	43	IBsUmsAmAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUmsIB	98	AmsUfsUmUmUmCfUmUmUmCmUmCfCmUfUmUfUmUmAmsUmsUm
TJR103035	44	IBsUmsAmAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUmsIB	99	AmsUfsUmUfUmCfUmUmUmCfUmCfCmUfUmUfUmUfAmsUmsUm
TJR103036	45	IBsUmsAmAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUmsIB	100	AmsUfsUmUfUmCfhmpNA （U）UmUmCfUmCfCmUfUmUfUmUfAmsUmsUm
TJR102938	46	IBsUmsAmAmUmGmGmCfAfAfUmGmUmGmGmUmCmAmAmAmsIB-NAG0052’	101	UmsUfsUmGmAmCfCmAmCmAmUmUfGmCfCmAfUmUmAmsUmsGm
TJR102939	47	IBsUmsCmAmUmCmAmGfCfUfUmUmGmCmUmAmCmUmGmUmsIB-NAG0052’	102	AmsCfsAmGmUmAfGmCmAmAmAmGfCmUfGmAfUmGmAmsCmsCm
TJR102940	48	IBsAmsGmAmCmCmAmAfGfAfUmGmAmAmGmUmUmUmCmAmsIB-NAG0052’	103	UmsGfsAmAmAmCfUmUmCmAmUmCfUmUfGmGfUmCmUmsCmsUm
TJR102707	49	IBsUmsUmAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAmsIB-NAG0052’	104	UmsCfsUmUmUmCfUmCmCmUmUmUfUmUfAmUfUmAmAmsGmsAm
TJR102703	50	IBsAmsAmAmAmGmGmAfGfAfAmAmGmAmAmAmAmUmCmAmsIB-NAG0052’	105	UmsGfsAmUmUmUfUmCmUmUmUmCfUmCfCmUfUmUmUmsUmsAm
TJR102153	51	IBsUmsAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB-NAG0052’	106	UmsAfsAmCmAmUfGmUmUmAmGmUfAmUfUmAfUmUmAmsUmsGm
TJR102526	52	IBsUmsCmAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUmsIB-NAG0052’	107	AmsUfsUmAmUmGfAmAmAmAmUmAfGmCfUmUfUmGmAmsCmsUm
TJR102941	53	IBsCmsAmUmAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB-NAG0052’	108	UmsAfsAmCmAmUfGmUmUmAmGmUfAmUfUmAfUmUmAmUmGmsAmsAm
TJR102706	54	IBsUmsAmAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUmsIB-NAG0052’	109	AmsUfsUmUmUmCfUmUmUmCmUmCfCmUfUmUfUmUmAmsUmsUm
TJR102942	55	IBsUmsAmAmUmGmGmCfAfAfUmGmUmGmGmUmCmAmAmAmsIB-NAG0052’	110	UmsUfsUmGfAmCfCmAmCmAfUmUfGmCfCmAfUmUfAmsUmsGm

TJR102943	56	IBsUmsCmAmUmCmAmGfCfUfUmUmGmCmUmAmCmUmGmUmsIB-NAG0052’	111	AmsCfsAmGfUmAfGmCmAmAfAmGfCmUfGmAfUmGfAmsCmsCm
TJR102944	57	IBsAmsGmAmCmCmAmAfGfAfUmGmAmAmGmUmUmUmCmAmsIB-NAG0052’	112	UmsGfsAmAfAmCfUmUmCmAfUmCfUmUfGmGfUmCfUmsCmsUm
TJR102945	58	IBsUmsUmAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAmsIB-NAG0052’	113	UmsCfsUmUfUmCfUmCmCmUfUmUfUmUfAmUfUmAfAmsGmsAm
TJR102701	59	IBsAmsAmAmAmGmGmAfGfAfAmAmGmAmAmAmAmUmCmAmsIB-NAG0052’	114	UmsGfsAmUfUmUfUmCmUmUfUmCfUmCfCmUfUmUfUmsUmsAm
TJR102314	60	IBsUmsAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB-NAG0052’	115	UmsAfsAmCfAmUfGmUmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmsUmsGm
TJR102316	61	IBsUmsCmAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUmsIB-NAG0052’	116	AmsUfsUmAfUmGfAmAmAmAfUmAfGmCfUmUfUmGfAmsCmsUm
TJR102318	62	IBsCmsAmUmAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB-NAG0052’	117	UmsAfsAmCfAmUfGmUmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmUmGmsAmsAm
TJR102704	63	IBsUmsAmAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUmsIB-NAG0052’	118	AmsUfsUmUfUmCfUmUmUmCfUmCfCmUfUmUfUmUfAmsUmsUm
TJR102969	64	IBsUmsAmAmUmGmGmCfAfAfUmGmUmGmGmUmCmAmAmAmsIB-NAG0052’	119	UmsUfsUmGfAmCfhmpNA（C）AmCmAfUmUfGmCfCmAfUmUfAmsUmsGm
TJR102970	65	IBsUmsCmAmUmCmAmGfCfUfUmUmGmCmUmAmCmUmGmUmsIB-NAG0052’	120	AmsCfsAmGfUmAfhmpNA（G）CmAmAfAmGfCmUfGmAfUmGfAmsCmsCm
TJR102971	66	IBsAmsGmAmCmCmAmAfGfAfUmGmAmAmGmUmUmUmCmAmsIB-NAG0052’	121	UmsGfsAmAfAmCfhmpNA（U）UmCmAfUmCfUmUfGmGfUmCfUmsCmsUm
TJR102972	67	IBsUmsUmAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAmsIB-NAG0052’	122	UmsCfsUmUfUmCfhmpNA（U）CmCmUfUmUfUmUfAmUfUmAfAmsGmsAm
TJR102702	68	IBsAmsAmAmAmGmGmAfGfAfAmAmGmAmAmAmAmUmCmAmsIB-NAG0052’	123	UmsGfsAmUfUmUfhmpNA（U）CmUmUfUmCfUmCfCmUfUmUfUmsUmsAm
TJR102315	69	IBsUmsAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB-NAG0052’	124	UmsAfsAmCfAmUfhmpNA（G）UmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmsUmsGm

TJR102317	70	IBsUmsCmAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUmsIB-NAG0052’	125	AmsUfsUmAfUmGfhmpNA（A）AmAmAfUmAfGmCfUmUfUmGfAmsCmsUm
TJR102319	71	IBsCmsAmUmAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAmsIB-NAG0052’	126	UmsAfsAmCfAmUfhmpNA（G）UmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmUmGmsAmsAm
TJR102705	72	IBsUmsAmAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUmsIB-NAG0052’	127	AmsUfsUmUfUmCfhmpNA（U）UmUmCfUmCfCmUfUmUfUmUfAmsUmsUm
TJR102323	73	UmsCmsAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmsUm-NAG0052	128	AmsUfsUmAfUmGfhmpNA（A）AmAmAfUmAfGmCfUmUfUmGfAmsCmsUm

表 3. 靶向 INHBE 基因的 RNAi 剂序列

双链编号	SEQ ID NO:	SS 链（5'-3’）	SEQ ID NO:	AS 链（5'-3'）
TJR100817	129	UmsCmsAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUm	164	AmsUfsUmAmUmGfAmAmAmAmUmAfGmCfUmUfUmGmAmsCmsUm
TJR100820	130	CmsUmsAmUmUmUmUfCfAfUmAmAmUmAmAmUmAmCmUm	165	AmsGfsUmAmUmUfAmUmUmAmUmGfAmAfAmAfUmAmGmsCmsUm
TJR102322	131	UmsCmsAmAmAmGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmsUm-NAG0052’	166	AmsUfsUmAfUmGfAmAmAmAfUmAf GmCfUmUfUmGfAmsCmsUm
TJR102928	132	UmsCmsAmAmAfGmCfUfAfUmUmUmUmCmAmUmAmAmUm	167	AmsUfsUmAmUmGfAmAmAmAmUmAmGmCfUmUfUmGmAmsCmsUm
TJR102930	133	GmsUmsCmCmAfCmAfAfAfGmUmCmAmAmAmGmCmUm AmUmUm	168	AmsAfsUmAmGmCfUmUmUmGmAmCmUmUfUmGfUmGmGmAmCmsAmsCm
TJR102665	134	AUACUAACAUGUUAUUUGA	169	UCAAAUAACAUGUUAGUAUUA
TJR102666	135	CUAACAUGUUAUUUGCCUUUU	170	AAAAGGCAAAUAACAUGUUAGUA
TJR100532	136	UmsAmsAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAm	171	UmsAfsAmCmAmUfGmUmUmAmGmUfAmUfUmAfUmUmAmsUmsGm
TJR100533	137	AmsUmsAmCmUmAmAfCfAfUmGmUmUmAmUmUmUmGmAm	172	UmsCfsAmAmAmUfAmAmCmAmUmGfUmUfAmGfUmAmUmsUmsAm

TJR101194	138	CmsAmsUmAmAmUmAmAmUfAfCfUmAmAmCmAmUmGmUmUmAm	173	UmsAfsAmCmAmUfGmUmUmAmGmUfAmUfUmAfUmUmAmUmGmsAmsAm
TJR102925	139	CmsAmsUmAmAfUmAfAfUfAmCmUmAmAmCmAmUmGmUmUmAm-L96’	174	UmsAfsAmCfAmUfGmUmUmAfGmUfAmUfUmAfUmUfAmUmGmsAmsAm
TJR102675	140	AAUAAAAAGGAGAAAGAAA	175	UUUCUUUCUCCUUUUUAUUAA
TJR100543	141	AmsAmsAmAmGmGmAfGfAfAmAmGmAmAmAmAmUmCmAm	176	UmsGfsAmUmUmUfUmCmUmUmUmCfUmCfCmUfUmUmUmsUmsAm
TJR102694	142	AmsAmsUmAmAmAmAfAfGfGmAmGmAmAmAmGmAmAmAm	177	UmsUfsUmCmUmUfUmCmUmCmCmUfUmUfUmUfAmUmUmsAmsAm
TJR102927	143	AmsAmsAmAmGfGmAfGfAfAmAGmAmAmAmAmUmCm Am-L96’	178	UmsGfsAmUfUmUfUmCmUmUfUmCf UmCfCmUfUmUf UmsUmsAm
TJR102690	144	AmsCmsUmUmUmCmUfUfAfAmUmAmAmAmAmAmGmGmAm	179	UmsCfsCmUmUmUfUmUmAmUmUmAfAmGfAmAfAmGmUmsAmsUm
TJR102691	145	UmsUmsUmCmUmUmAfAfUfAmAmAmAmAmGmGmAmGmAm	180	UmsCfsUmCmCmUfUmUmUmUmAmUfUmAfAmGfAmAmAmsGmsUm
TJR102692	146	UmsUmsCmUmUmAmAfUfAfAmAmAmAmGmGmAmGmAmAm	181	UmsUfsCmUmCmCfUmUmUmUmUmAfUmUfAmAfGmAmAmsAmsGm
TJR102926	147	UmsUmsAmAmUfAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAm-L96’	182	UmsCfsUmUfUmCfUmCmCmUfUmUf UmUfAmUfUmAfAmsGmsAm
TJR102827	148	UAAUGGCAAUGUGGUCAAG	183	CUUGACCACAUUGCCAUUA
TJR102829	149	UAAUGGCAAUGUGGUCAAA	184	UUUGACCACAUUGCCAUUA
TJR100497	150	UmsAmsAmUmGmGmCfAfAfUmGmUmGmGmUmCmAmAmAm	185	UmsUfsUmGmAmCfCmAmCmAmUmUfGmCfCmAfUmUmAmsUmsGm
TJR102843	151	UmsAmsAmUmGmGmCfAfAfUmGmUmGmGmUmCmAmAmGm	186	CmsUfsUmGmAmCfCmAmCmAmUmUfGmCfCmAfUmsUmsAm
TJR102845	152	UmsAmsAmUmGmGmCfAfAfUmGmUmGmGmUmCmAmAmAm	187	UmsUfsUmGmAmCfCmAmCmAmUmUfGmCfCmAfUmsUmsAm
TJR102836	153	AGACCAAGAUGAAGUUUCC	188	GGAAACUUCAUCUUGGUCU

TJR102838	154	AGACCAAGAUGAAGUUUCA	189	GGAAACUUCAUCUUGGUCU
TJR100500	155	AmsGmsAmCmCmAmAfGfAfUmGmAmAmGmUmUmUmCmAm	190	UmsGfsAmAmAmCfUmUmCmAmUmCfUmUfGmGfUmCmUmsCmsUm
TJR102850	156	AmsGmsAmCmCmAmAfGfAfUmGmAmAmGmUmUmUmCmCm	191	GmsGfsAmAmAmCfUmUmCmAmUmCfUmUfGmGfUmsCmsUm
TJR102852	157	AmsGmsAmCmCmAmAfGfAfUmGmAmAmGmUmUmUmCmAm	192	UmsGfsAmAmAmCfUmUmCmAmUmCfUmUfGmGfUmsCmsUm
TJR102832	158	GGUCAUCAGCUUUGCUACU	193	AGUAGCAAAGCUGAUGACC
TJR102833	159	UCAUCAGCUUUGCUACUGU	194	ACAGUAGCAAAGCUGAUGA
TJR102695	160	UmsAmsAmAmAmAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUm	195	AmsUfsUmUmUmCfUmUmUmCmUmCfCmUfUmUfUmUmAmsUmsUm
TJR102924	161	UmsAmsAmAmAfAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUm-L96’	196	AmsUfsUmUmUmCfUmUmUmCmUmCmCmUfUmUfUmUmAmsUmsUm
TJR102931	162	UmsAmsAmAmAfAmGfGfAfGmAmAmAmGmAmAmAmAmUm	197	AmsUfsUmUfUmCfUmUmUmCfUmCf CmUfUmUfUmUf AmsUmsUm
TJR102933	163	AmsAmsUmAmAfAmAfAfGfGmAmGmAmAmAmGmAmAm Am	198	UmsUfsUmCfUmUfUmCmUmCfCmUfUmUfUmUfAmUfUmsAmsAm
TJR102669	205	ACUUUCUUAAUAAAAAGGA	209	UCCUUUUUAUUAAGAAAGUAU
TJR102670	206	UUUCUUAAUAAAAAGGAGA	210	UCUCCUUUUUAUUAAGAAAGU
TJR102671	207	UUCUUAAUAAAAAGGAGAA	211	UUCUCCUUUUUAUUAAGAAAG
TJR100534	208	UmsUmsAmAmUmAmAfAfAfAmGmGmAmGmAmAmAmGmAm	212	UmsCfsUmUmUmCfUmCmCmUmUmUfUmUfAmUfUmAmAmsGmsAm

上述表 2a、表 2b 和表 3 中，同一条核酸序列中，G、C、A、U 分别代表具有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、尿嘧啶的核苷，从左至右按照从 5’端至 3’端的方向，小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷为 2'-甲氧基修饰的核苷；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷为 2'-氟代修饰的核苷；大写字母 IB 表示反向无碱基修饰的核苷；hmpNA 表示与其相邻的括号中的一个核

苷为具有 hmpNA 修饰的核苷；IB 表示反向无碱基修饰的核苷；小写字母 s 表示与该字母 s 相邻的两个核苷或相连的核苷与递送基团 NAG0052’或 L96’之间为硫代磷酸二酯基连接，无特别说明，两个相邻的核苷或相连的核苷与递送基团之间通过磷酸二酯基连接；如无特别说明，每条链 3’端的第一个核苷酸的 3’位为羟基；每条链 5’端的第一个核苷酸的 5’位是羟基。

所述 2'-甲氧基修饰的核苷、2'-氟代修饰的核苷、hmpNA 修饰的核苷、硫代磷酸二酯基、磷酸二酯基、NAG0052’、反向无碱基修饰的核苷结构如上文中表 1 所示，当本公开的 RNAi 剂以盐形式存在时，例如以钠盐形式存在时，表 1 中结构对应的盐形式的结构也在本公开的保护范围以内，表中 base 表示碱基。

实施例 2. 本公开的 RNAi 剂的合成

本公开的 RNAi 剂的合成与通常的亚磷酰胺固相合成法无异。合成过程简要描述如下：于 Dr.Oligo48 合成器（Biolytic）上，以通用 CPG 载体为起始，根据合成程序逐个连接无修饰的核苷亚磷酰胺单体或具有序列中对应位置修饰的核苷亚磷酰胺单体。本公开实施例使用的核苷亚磷酰胺单体购自上海兆维公司、苏州吉玛公司。采用 5-乙基硫-1H-四唑（ETT）作为活化剂（0 .6M 乙腈溶液），使用 0.22M 的 PADS 溶于 1:1 体积比的乙腈和 3-甲基吡啶（上海凌江）溶液作为硫化试剂，使用碘吡啶/水溶液（上海凌江）作为氧化剂。

固相合成完成后，寡核糖核苷酸自该固体支撑物裂解，采用 3:1 的 28%氨水和乙醇溶液在 50℃条件下浸泡 16 小时。然后离心，将上清液转移到另一个离心管中，浓缩蒸发干后，使用 C18 反向色谱纯化，流动相为 0.1M TEAA 和乙腈。目标寡核苷酸收集后冻干，并经 LC-MS 鉴定为目标产物，再经过 UV（260nm）定量。所得到的单链寡核苷酸，根据等摩尔比，按照互补配对，退火，最后所得到的双链 RNAi 剂溶于 1×PBS 中，并调整至实验所需浓度备用。

含有 NAG0052’的本公开的 RNAi 剂按照专利申请 WO2023138663A1 记载的方法制备获得。含有 hmpNA 修饰的核苷酸的本公开的 RNAi 剂按照专利申请 WO2022028462A1 记载的方法制备获得。按照和 WO2014025805A1 实施例记载相同的方法制备获得含有 L96’的 RNAi 剂。

实施例 3. psiCHECK 在靶水平验证

在 HEK293A 细胞中采用 9 个浓度梯度对本公开的 RNAi 剂进行体外分子水平模拟在靶活性筛选。

本实施例使用的 psi-CHECK 质粒购自于生工生物工程（上海）股份有限公司。以 INHBE 基因构建 RNAi 剂对应的在靶序列，插入到 psiCHECK-2 质粒中，

即 GSCM 在靶质粒。该质粒包含海肾荧光素酶基因及萤火虫荧光素酶基因。作为双报告基因系统，RNAi 剂的靶序列插入到海肾荧光素酶基因的 3'UTR 区域，RNAi 剂对于靶标序列的活性可以通过经萤火虫荧光素酶校准后的海肾荧光素酶表达情况的检测来反映，检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

将 HEK293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24 h，将 HEK293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8×10^3 个细胞，每孔 100 μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染 RNAi 剂及对应质粒，Lipofectamine2000 每孔使用 0.2 μL。质粒转染量为 20 ng 每孔对于在靶序列质粒，RNAi 剂共设置 9 个浓度点，最高浓度点终浓度为 20nM，4 倍梯度稀释，20nM，5nM，1.25nM，0.3125nM，0.0781 nM，0.0195 nM，0.0049 nM，0.0012 nM，0.0003 nM。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测在靶水平。

本实施例使用的实验材料和仪器详见表 4 和表 5。本实施例使用的稀释方案见表 6。实验结果如表 7 所示，表 7 结果表明本公开的 RNAi 剂具有优异的 pis-Check 系统在靶活性。

表 4. psi-CHECK 实验耗材和试剂

名称	公司	货号/型号
HEK293A 细胞	南京科佰	ATCC-Cobioer/CBP60202
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2940
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	11668-019

表 5. psi-CHECK 实验仪器

实验仪器		
名称	公司	货号/型号
Nanodrop	Thermo	Nanodrop One
酶标仪	PerkinElmer	EnVision2105
作图软件	/	Graph Prism 5

表 6. 样品多浓度稀释方案

RNAi 剂终浓度（nM）	加水与 RNAi 剂
20.0000	4 μL RNAi 剂 + 36 μL H2O
5.0000	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O
1.2500	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O
0.3125	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O
0.0781	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O
0.0195	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O
0.0049	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O

0.0012	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O
0.0003	10 μL RNAi 剂 + 30 μL H2O

表 7. psi-CHECK 在靶活性筛选结果

编号	靶基因 mRNA（GSCM）表达剩余百分比（平均值，%）				
	20.0000nM	5.0000nM	1.2500nM	0.3125nM	0.0781nM
TJR102314	11.61	10.22	9.99	12.38	22.71
TJR102316	9.98	10.84	9.78	9.56	15.32
TJR102317	7.95	7.38	8.18	10.00	17.64
TJR102318	9.18	8.42	8.70	12.62	28.12
TJR102323	6.09	6.62	7.87	9.36	20.97
TJR102526	8.66	8.97	9.86	9.18	12.24
TJR102153	8.98	6.99	6.59	7.64	15.52
编号	靶基因 mRNA 表达剩余百分比（平均值，%）				GSCM IC50（nM）
	0.0195nM	0.0049nM	0.0012nM	0.0003nM	
TJR102314	50.80	84.75	96.36	98.11	0.0205
TJR102316	39.52	71.19	88.36	93.42	0.0122
TJR102317	43.06	75.01	92.03	102.38	0.0140
TJR102318	65.00	90.23	100.30	102.44	0.0323
TJR102323	45.75	74.43	96.80	98.24	0.0159
TJR102526	26.09	62.01	95.87	106.52	0.0072
TJR102153	38.36	71.33	91.95	91.50	0.0123

实施例 4：对猴原代肝细胞（PCH）中 INHBE 的多浓度点抑制活性

转染前 24h，将 PCH 细胞以约 30,000 细胞/孔接种在 96 孔板中，每孔 100μL 培养基。转染时，参照产品说明手册，使用 Lipofectamine RNAi MAX（ThermoFisher，13778150）转染样品，样品转染的梯度终浓度为 20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064 和 0.00128 nM。在处理 24 小时后，使用高通量细胞 RNA 提取试剂盒（FG0417-L/ FG0418-XL, 磁珠法）进行细胞总 RNA 提取、RNA 逆转录实验（Takara，RR037A）和实时定量 PCR（Thermo，4444557）检测，测定猴 INHBE 的 mRNA 水平，根据 GAPDH 内参基因水平对猴 INHBE 的 mRNA 水平进行校正。该实验涉及的仪器如表 8 所示。

表 8. 实验仪器

实验仪器		
名称	公司	货号/型号
Nanodrop	Thermo	Nanodrop One
qPCR 仪器	ABI	7500 Fast

PCR	Life	Pro-Flex PCR system

其中，在实时定量 PCR 检测时，采用的是探针 Q-PCR 检测实验，其引物信息如表 9 所示。

表 9. Taqman 引物信息表

引物名称	SEQ ID NO	引物序列
mkINHBE-F	199	GGTTGCATCTGACCAGTCGT
mkINHBE-R	200	GGCTGAAGTGGAGTCTGTGAC
mkINHBE-P	201	CCATTCCCTGGAGCCACACTCC
mkGAPDH-F	202	TCAAGATCGTCAGCAACGCC
mkGAPDH-R	203	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
mkGAPDH-P	204	ACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCA

结果分析方法

Q-PCR 检测实验完毕后，按照系统自动设定的阈值获取相应的 Ct 值，可以通过 Ct 值比较，相对定量某个基因的表达：比较 Ct 指的是通过与内参基因 Ct 值之间的差值来计算基因表达差异，也称之是 2-△△Ct，△△Ct=[（Ct 实验组目的基因-Ct 实验组内参）-（Ct 对照组目的基因-Ct 对照组内参）]。

抑制率（%）=（1-目的基因表达剩余量）*100%。

结果以相对于经过对 RNAi 剂处理的细胞的猴 INHBE mRNA 表达剩余百分比来表示。表 10 数据结果表明，本公开的 RNAi 剂在 PCH 细胞中针对 INHBE 基因具有高水平的在靶抑制活性。

表 10. RNAi 剂在 PCH 细胞中的 INHBE 抑制活性

样品编号	靶基因 mRNA（PCH）表达剩余百分比（平均值，%）							PCH IC_{50}（nM）
	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128	
TJR102705	6.86	7.14	5.96	6.64	17.75	45.22	102.14	0.0055
TJR102701	24.47	19.61	14.13	14.76	18.78	37.88	64.06	0.0043
TJR102702	29.12	16.65	12.09	9.53	15.44	41.43	92.98	0.0062
TJR102703	26.88	19.54	17.09	11.80	12.79	30.60	80.14	0.0054
TJR102704	24.39	17.00	14.88	12.75	19.70	52.88	111.09	0.0068
TJR102706	8.26	11.47	7.04	5.83	10.19	34.87	79.06	0.0042
TJR102707	13.46	16.66	14.76	18.39	40.16	77.97	79.13	0.0244

实施例 5：对猴原代肝细胞（PCH）中 INHBE 的单点抑制活性

转染前 24h，将 PCH 细胞以约 30,000 细胞/孔接种在 96 孔板中，每孔 100 μL 培养基。转染时，参照产品说明手册，使用 Lipofectamine RNAi MAX（ThermoFisher，13778150）转染样品，样品转染的梯度终浓度为 4 nM。在处理 24 小时后，使用高通量细胞 RNA 提取试剂盒（FG0417-L/ FG0418-XL, 磁珠法）

进行细胞总 RNA 提取、RNA 逆转录实验（Takara，RR037A）和实时定量 PCR（Thermo，4444557）检测，测定猴 INHBE 的 mRNA 水平，根据 GAPDH 内参基因水平对猴 INHBE 的 mRNA 水平进行校正。其仪器、引物、计算方式等均参照实施例 4。表 11 数据结果表明，本公开的 RNAi 剂在 PCH 细胞中针对 INHBE 基因具有高水平的在靶抑制活性。

表 11. RNAi 剂在 PCH 细胞中的 INHBE 抑制活性

样品编号	PCH 细胞中剩余的 INHBE mRNA（%）
TJR102938	16.75
TJR102939	15.66
TJR102940	14.84
TJR102942	17.39
TJR102943	23.96
TJR102944	21.57
TJR102969	22.37
TJR102970	18.38
TJR102971	22.69

实施例 6：RNAi 剂在 AAV 构建的肝脏 hINHBE 的肥胖（DIO）小鼠模型中的药效实验

本实施例中的 DIO 雄性小鼠（购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司及其分子公司），4-5 周龄，体重为 30-32g。

所有小鼠进入动物设施后，适应性饲养 5 天后更换为 60%HFD 饲料饲喂，小鼠 6 周龄后根据小鼠体重选择 15 只小鼠静脉注射空载（2*10E11 vg/只），剩余小鼠静脉注射 AAV-hINHBE（2*10E11 vg/只）。空载及 AAV 注射 2 周后进行肝活检，qPCR 检测 hINHBE 表达。肝活检后一周禁食 5-6h，采集所有小鼠血液 80-100μl 离心得血浆，2 倍稀释后检测肝功（ALT、AST）、血脂四项（TC、TG、HDL-C、LDL-C），随后以 qPCR、肝功检测结果水平及体重水平为分组指标进行分组，组 1、组 2 和组 3 每组 12 只，每个时间点 4 只小鼠，分组当天定义为 D-1。其中组 1 小鼠为空载小鼠，组 2 和组 3 小鼠为 AAV 小鼠。

D0 开始给药，给予组 1 和组 2 小鼠 PBS，给予组 3 小鼠本公开的 RNAi 剂 TJR102316，给药剂量：3mg/kg，给药体积：5μl/g，给药方式：皮下给药，给药频率：单次给药。

药效周期：4 周。于 D7、D14、D28 天每组选择 4 只小鼠终点：（1）终点当天禁食 5-6h，采集小鼠血液，部分离心得血浆，2 倍稀释后检测肝功（ALT、AST）、血脂四项（TC、TG、HDL-C、LDL-C）；（2） 采集小鼠肝脏组织称重，取部分肝脏组织液氮速冻后进行 WB（Flag）检测，另取部分肝脏组织置于 RNALater 中保存，后续 qPCR 检测 hINHBE 表达，本公开的上下文中“hINHBE”

表示人 INHBE。

表 12 记载了在 D7、D14 和 D28 时，不同组别的肝脏中 hINHBE mRNA 表达量，表 12 数据表明，相较于组 2，给予了本公开的 RNAi 剂 TJR102316 的小鼠体内 hINHBE-mRNA 水平显著下降，表明本公开的 RNAi 剂能够有效抑制小鼠体内 hINHBE-mRNA 的表达。

表 12.小鼠体内 hINHBE-mRNA 水平

（肝脏中平均 hINHBE mRNA 表达量，以组 2 归一化）

组别	给药	D7	D14	D28
组 1（WT 小鼠）	PBS	0	0	0
组 2（AAV 小鼠）	PBS	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.08	1.03 ± 0.28
组 3（AAV 小鼠）	TJR102316	0.37 ± 0.06**	0.43 ± 0.16***	0.41 ± 0.12**

t-test 检验，*表示相较于组 2 p<0.05, **表示相较于组 2 p<0.01, ***表示相较于组 2 p<0.001, ****表示相较于组 2 p<0.0001。

表 13 记载了在 D7、D14 和 D28 时，不同组别的肝脏中 WB（Flag）检测标签蛋白表达量，表 13 数据表明，相较于组 2，给予了本公开的 RNAi 剂 TJR102316 的小鼠体内标签蛋白水平显著下降，表明本公开的 RNAi 剂能够有效抑制小鼠体内 INHBE 基因的表达。

表 13

组别	给药	D7	D14	D28
组 1（WT 小鼠）	PBS	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
组 2（AAV 小鼠）	PBS	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.47
组 3（AAV 小鼠）	TJR102316	0.07 ± 0.03****	0.19 ± 0.17***	0.17 ± 0.08**

One-way ANOVA 检验，*表示相较于组 2 p<0.05, **表示相较于组 2 p<0.01, ***表示相较于组 2 p<0.001, ****表示相较于组 2 p<0.0001。

实施例 7. RNAi 剂在高脂喂养的 hINHBE 小鼠肥胖模型中的药效学评价

本实施例中使用的 DIO-hINHBE 转基因纯合子雄性小鼠购于赛业（苏州）生物科技有限公司。

使用人源化的 hINHBE 转基因小鼠，并以 60% HFD （Research Diet

D12492）饮食饲养构建肥胖小鼠（DIO）模型。实验前，根据体重、体脂比（Lean、Fat%）随机分成 5 组，组 1 为对照组，给予 Vehicle 对照组生理盐水，组 2-组 5 分别给予本公开的 RNAi 剂 TJR102316 各剂量（0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg）。每组给药方式均为皮下给药，本公开的 RNAi 剂 TJR102316 的给药频率每 3 周给药 1 次，药效周期为 6 周。分组当天定义为 D-1，给药期为 D0 至 D42 天。

试验结果以平均值表示。两组样本之间比较采用独立样本 T 检验（T-Test），多组单变量比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）检验，多组双变量比较采用双因素方差分析（Two-way ANOVA）检验。数据分析软件为 Graphpad prism 9。****表示 $p<0.0001$;***表示 $p<0.001$; **表示 $p<0.01$；*表示 $p<0.05$，且 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

表 14 和表 15 分别记载了不同组别小鼠体重变化率和摄食量变化。结合表 14 和表 15 的实验结果可知，本申请的 RNAi 剂 TJR102316 不仅在低剂量已经具有良好的减重效果，且在各个剂量下对小鼠的摄食量也无明显影响，由此说明本公开的 RNAi 剂 TJR102316 可以在不影响小鼠摄食量的同时具有良好的减重效果。

表 14.小鼠体重变化率（相较于组 1）

组别	给药剂量	D15	D21	D30	D39
2	TJR102316（0.3 mg/Kg）	-1.77%	-3.47%	-4.40%	-5.20%
3	TJR102316 （1 mg/Kg）	-4.14%	-5.16%	-6.54%	-7.26%
4	TJR102316（3 mg/Kg）	-5.07%	-5.72%	-8.56%	-7.83%
5	TJR102316（10 mg/Kg）	-8.76%	-9.50%	-13.90%	-13.91%

表 15.小鼠摄食量变化（单位：g）

组别	给药剂量	D0	D15	D21	D30	D39
1	生理盐水	2.5	15.5	20.5	28.5	37.3
2	TJR102316（0.3 mg/Kg）	2.4	15.2	20.4	28.3	36.4
3	TJR102316 （1 mg/Kg）	2.3	14.0	18.8	26.3	34.1
4	TJR102316（3 mg/Kg）	2.6	14.5	19.7	26.9	36.2
5	TJR102316（10 mg/Kg）	2.5	13.7	19.1	26.2	35.5

表 16 记载了第 42 天时，小鼠体内 LDL-C 的水平、肠系膜脂肪（MAT）的质量、肝脏甘油三酯水平、和血清 β-羟丁酸水平。

由表 16 结果可知，本申请的 RNAi 剂 TJR102316 可以有效降低血清中的

LDL-C 水平、肠系膜脂肪质量和肝脏甘油三酯。

同时，给予了本申请的 RNAi 剂 TJR102316 的小鼠体内 β-羟丁酸出现了上升的趋势，说明本申请的 RNAi 剂可促进肝脏脂质 β-氧化，以 β-羟丁酸为机体供能。

表 16. D42 小鼠血清中 LDL-C 含量、肠系膜脂肪质量、肝脏甘油三酯水平和 β -羟丁酸含量

组别	给药剂量	LDL-C（mmol/L）	MAT（g）	肝脏甘油三酯（μmol/g）	β-羟丁酸（μmol/L）
1	生理盐水	3.25	1.30	260.16	387.4
2	TJR102316（0.3 mg/Kg）	3.36	0.81****	243.21	559.8*
3	TJR102316（1 mg/Kg）	3.14	0.75****	252.23	728.2****
4	TJR102316（3 mg/Kg）	2.61	0.71****	223.33	691.4****
5	TJR10231（10 mg/Kg）	2.25*	0.66****	161.16**	675.8****

实施例 8. psiCHECK 在靶水平验证

在 HEK293A 细胞中采用 9 个浓度梯度对表 3 中的 RNAi 剂进行体外分子水平模拟在靶活性筛选。

本实施例使用的 psi-CHECK 质粒购自于生工生物工程（上海）股份有限公司。以 INHBE 基因构建 RNAi 剂对应的在靶序列，插入到 psiCHECK-2 质粒中，即 GSCM 在靶质粒。该质粒包含海肾荧光素酶基因及萤火虫荧光素酶基因。作为双报告基因系统，RNAi 剂的靶序列插入到海肾荧光素酶基因的 3’UTR 区域，siRNA 对于靶标序列的活性可以通过经萤火虫荧光素酶校准后的海肾荧光素酶表达情况的检测来反映，检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

将 HEK293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24 h，将 HEK293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8×10^3 个细胞，每孔 100 μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染 siRNA 及对应质粒，Lipofectamine2000 每孔使用 0.2 μL。质粒转染量为 20 ng 每孔对于在靶序列质粒，siRNA 共设置 9 个浓度点，最高浓度点终浓度为 20nM，4 倍梯度稀释，20nM，5nM，1.25nM，0.3125nM，0.0781 nM，0.0195 nM，0.0049 nM，0.0012 nM，0.0003 nM。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测在靶水平。

本实施例使用的实验材料和仪器详见表 17 和表 18。本实施例使用的稀释方

案见表 19。实验结果如表 20、表 21、表 22 和表 23 所示。

表 17. psi-CHECK 实验耗材和试剂

名称	公司	货号/型号
HEK293A 细胞	南京科佰	ATCC-Cobioer/CBP60202
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2940
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	11668-019

表 18. psi-CHECK 实验仪器

实验仪器		
名称	公司	货号/型号
Nanodrop	Thermo	Nanodrop One
酶标仪	PerkinElmer	EnVision2105
作图软件	/	Graph Prism 5

表 19. 样品多浓度稀释方案

RNAi 剂终浓度（nM）	加水与 RNAi 剂
20.0000	4 μL RNAi 剂+ 36 μL H2O
5.0000	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
1.2500	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
0.3125	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
0.0781	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
0.0195	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
0.0049	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
0.0012	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O
0.0003	10 μL RNAi 剂+ 30 μL H2O

表 20. RNAi 剂在靶活性筛选结果

双链代码	GSCM IC_{50}（nM）
TJR100817	0.0064
TJR100820	0.4806
TJR100533	0.0461
TJR100532	0.0120

表 21. RNAi 剂在靶活性筛选结果

双链代码	GSCM IC_{50}（nM）
TJR102664	0.0107
TJR102665	0.0391
TJR102666	0.0421
TJR102667	0.0093
TJR102668	0.0680

TJR102669	＞20
TJR102670	＞20
TJR102671	＞20
TJR102673	0.0147
TJR102675	> 20
TJR102661	0.0262

表 22. RNAi 剂在靶活性筛选结果

编号	GSCM IC_{50}（nM）
TJR102826	0.0592
TJR102827	0.3732
TJR102829	0.0618
TJR102831	0.0128
TJR102832	0.1881
TJR102833	0.1401
TJR102835	0.0403
TJR102836	0.4017
TJR102838	0.1451

表 23. RNAi 剂在靶活性筛选结果

编号	GSCM IC_{50}（nM）
TJR102928	0.0112
TJR102930	0.2464
TJR102931	0.0317
TJR102933	0.1220
TJR102322	0.0107
TJR100497	0.0291
TJR102843	0.2453
TJR102845	0.0339
TJR100500	0.0603
TJR102850	0.8513
TJR102852	0.1766

实施例 9. psiCHECK 在靶水平验证

在 HEK293A 细胞中采用 2 个浓度梯度对 RNAi 剂进行体外分子水平模拟在靶活性筛选。实验过程、所使用的实验材料和仪器以及稀释过程、结果分析方法与实施例 8 相同。

表 24. RNAi 剂对 INHBE 抑制效果

编号	靶基因 mRNA（GSCM）表达剩余百分比（平均值，%）	
	0.31 nM	0.08 nM
TJR100817	10.04	12.91
TJR100820	51.21	85.92
TJR100532	9.52	19.98
TJR100533	21.03	62.60
TJR101194	10.58	22.15
TJR100534	20.99	40.91
TJR102690	105.91	111.34
TJR102691	49.22	78.22
TJR102692	58.21	78.49
TJR100543	12.73	28.61
TJR102694	43.19	71.41
TJR102695	15.91	25.01
TJR102924	17.68	38.54
TJR102925	25.81	59.61
TJR102926	29.65	57.18
TJR102927	17.68	38.54

权利要求书

1. 一种 RNAi 剂，其包含形成双链区的正义链与反义链，

所述正义链包含与 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:9 中任一项所示的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸；

所述反义链包含与 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID NO:18 中任一项所示的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸，

其中，

所述正义链中包含至少一个反向无碱基修饰的核苷；和/或

所述反义链中包含至少一个热不稳定修饰的核苷。

2. 如权利要求 1 所述的 RNAi 剂，其中：

所述正义链中包含两个反向无碱基修饰的核苷，所述反向无碱基修饰的核苷是所述正义链的 5’端第一个核苷和 3’端第一个核苷。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 RNAi 剂，其中：

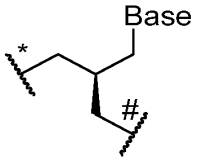
按照从 5’端至 3’端的方向，所述反义链中第 2、6、12、14、16 位的核苷酸各自独立地为 2’-氟代修饰的核苷酸，其余位置的核苷酸为非 2’-氟代修饰的核苷酸；或者，所述反义链中第 2、4、6、10、12、14、16、18 位的核苷酸各自独立地为 2’-氟修饰的核苷酸，其余位置的核苷酸为非 2’-氟代修饰的核苷酸。

4. 如权利要求 3 所述的 RNAi 剂，其中：

所述反义链中其余位置的核苷酸均为 2’-甲氧基修饰的核苷酸；或者

所述反义链中第 7 位的核苷酸中的核苷为热不稳定修饰的核苷，其余位置的核苷酸为 2’甲氧基修饰的核苷酸；

优选地，所述热不稳定修饰的核苷具有如式（1）所示的结构：



式（1）；

其中 Base 表示碱基，按照序列中从 5’端至 3’端的方向，“*”表示所述核苷与其 5’端相邻的核苷酸相连的位点，“#”表示与其 3’端相邻的核苷酸相连的位点。

5. 如权利要求 1-4 中任意一项所述的 RNAi 剂，其中

所述正义链和/或反义链中至少一个磷酸二酯基为具有修饰基团的磷酸二酯

基；

优选地，所述具有修饰基团的磷酸二酯基为硫代磷酸二酯基；

所述具有修饰基团的磷酸二酯基存在于选自以下位置中的至少一处：

所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

优选地，所述正义链中和所述反义链中各自独立地含有至少 2 个具有修饰基团的磷酸二酯基。

6.如权利要求 1-5 中任意一项所述的 RNAi 剂，按照从 5’端到 3’端的方向，所述正义链中第 7、8、9 位的核苷酸为 2’-氟代核苷酸，其余位置的核苷酸为非 2’-氟代修饰的核苷酸。

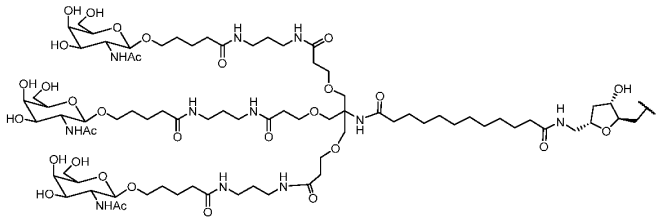
7. 如权利要求 1-6 中任意一项所述的 RNAi 剂，

所述正义链包含如 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:45 中任一项所示的核苷酸序列；

所述反义链包含如 SEQ ID NO:74 至 SEQ ID NO:100 中任一项所示的核苷酸序列。

8. 如权利要求 1-7 中任意一项所述的 RNAi 剂，所述 RNAi 剂还包含 1 个或多个递送基团，所述递送基团与所述正义链和/或反义链相连。

9. 如权利要求 8 所述的 RNAi 剂，所述递送基团具有如式（2）所示结构：



式（2）。

10. 如权利要求 9 所述的 RNAi 剂，其中，

所述正义链包含如 SEQ ID NO:46 至 SEQ ID NO:73 中任一项所示的核苷酸

序列；和/或

所述反义链包含 SEQ ID NO:101 至 SEQ ID NO:128 中任一项所示的核苷酸序列。

11. 如权利要求 1-10 中任意一项所述的 RNAi 剂，其中，所述 RNAi 剂选自 TJR102314、TJR102316、TJR102317、TJR102318、TJR102323、TJR102526、TJR102153、TJR102705、TJR102701、TJR102702、TJR102703、TJR102704、TJR102706、TJR102707、TJR102938、TJR102939、TJR102940、TJR102942、TJR102943、TJR102944、TJR102969、TJR102970 和 TJR102971。

12. 一种药物组合物，其包含：

如权利要求 1-11 中任一项所述的 RNAi 剂，和

药学上可接受的载体。

13. 一种试剂盒，其包含：

如权利要求 1-11 中任一项所述的 RNAi 剂；和/或

如权利要求 12 所述的药物组合物。

14. 一种降低抑制素 βE（INHBE）表达的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的如权利要求 1-11 中任一项所述的 RNAi 剂和/或如权利要求 12 所述的药物组合物。

15. 一种治疗和/或预防受试者中代谢障碍类疾病的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的如权利要求 1-11 中任一项所述的 RNAi 剂和/或如权利要求 12 所述的药物组合物；

所述代谢障碍类疾病选自：代谢综合征、心血管疾病、肥胖症、肝炎、和肾病。

16. 一种体内递送抑制 INHBE 表达和/或复制的 RNAi 剂的方法，所述方法包括给予受试者如权利要求 1-11 中任一项所述的 RNAi 剂和/或如权利要求 12 所述的药物组合物。

17. 一种制备 RNAi 剂的方法，其包括：

合成如权利要求 1-11 中任一项所述的 RNAi 剂或如权利要求 12 所述的药物组合物。