

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 8 月 11 日 (11.08.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/166140 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/111137
- (22) 国际申请日: 2021 年 8 月 6 日 (06.08.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110159772.X 2021年2月5日 (05.02.2021) CN
- (71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。
- (72) 发明人: 郝海平(HAO, Haiping); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。王洪(WANG, Hong); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。潘晓洁(PAN, Xiaojie); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。王广基(WANG, Guangji); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。于洋(YU, Yang); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。
- (74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所(普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江

苏省南京市白下区中山东路198号龙台国际大厦1912室, Jiangsu 210005 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: FXR-TARGETED SARNA AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: FXR靶向的saRNA及其应用

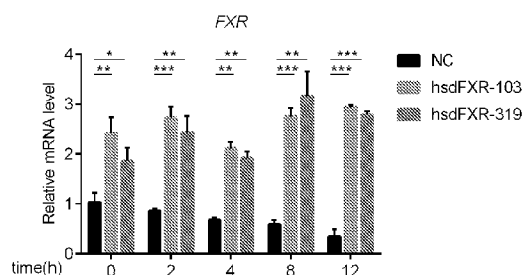


图 3

(57) Abstract: Provided are an FXR-targeted saRNA and an application thereof in the preparation of a drug against hepatocyte apoptosis. The saRNA consists of a sense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 2 and an antisense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 3, or a sense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 4 and an antisense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 5, or a sense strand shown in SEQ ID NO: 6 and an antisense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 7, or a sense strand shown in SEQ ID NO: 8 and an antisense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 9, or a sense strand shown in SEQ ID NO: 10 and an antisense strand having a sequence as shown in SEQ ID NO: 11. According to the saRNA, by promoting the transcription of FXR and upregulating the expression level of the gene, the down-regulated expression level of FXR in the liver in a disease state is restored to normal, and apoptosis is alleviated.

(57) 摘要：提供了一种FXR靶向的saRNA及其在制备对抗肝细胞凋亡的药物中的应用。该saRNA由序列如SEQ ID NO：2所示的正义链和序列如SEQ ID NO：3所示的反义链组成，或者由SEQ ID NO：4所示的正义链和序列如SEQ ID NO：5所示的反义链组成，或者由SEQ ID NO：6所示的正义链和序列如SEQ ID NO：7所示的反义链组成，或者由SEQ ID NO：8所示的正义链和序列如SEQ ID NO：9所示的反义链组成，或者由SEQ ID NO：10所示的正义链和序列如SEQ ID NO：11所示的反义链组成。该saRNA通过促进FXR的转录并上调该基因的表达水平，使疾病状态下下调的肝脏FXR表达水平恢复正常，并改善细胞凋亡。

FXR 靶向的 saRNA 及其应用

技术领域

本发明涉及一类 FXR 靶向的 saRNA 及其应用，尤其涉及一类可上调 FXR 表达水平的 saRNA 及其应用。

背景技术

肝脏疾病，包括病毒性肝炎（HBV/HCV 等）、非酒精性脂肪肝、酒精性脂肪肝、肝纤维化、肝硬化和肝癌等，在全球范围的发病率居高不下，肝病已经成为威胁人类健康的重要杀手。目前全球约有 1.85 亿人感染 HCV，其中慢性感染者约 1.3-1.7 亿人；另外，全球一般人群的非酒精性脂肪性肝病（Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）患病率超过 25%，且已有超过 1 亿人口的进展为非酒精性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis, NASH），NASH 已发展成为肝移植的主要原因，然而目前治疗各类肝脏疾病的特异性药物并不多。

细胞凋亡是一种基本的生物学现象，对生物体进化、内环境稳态及机体发育等具有重要作用；而凋亡过程紊乱则与多种疾病的发生发展密切相关，如肝细胞凋亡是各种肝病（包括 NAFLD/NASH，酒精性肝炎、药物性肝损伤、病毒性肝炎、胆汁淤积型肝损伤、缺血-再灌注性肝损伤、肝豆状核变性、肝纤维化/硬化、肝癌等）的共同特征和病理机制。

法尼醇 X 受体（Farnesoid X Receptor, FXR，又称 NR1H4）是核受体超家族的一员，它在调节胆汁酸代谢、脂质代谢和糖代谢中发挥重要功能，同时它与能量平衡、炎症与免疫、肝纤维化以及肝脏再生密切相关。因此，FXR 被广泛认为是重要的保肝药物研发靶标。目前基于 FXR 为靶点的药物研发策略主要集中于 FXR 激动剂或拮抗剂的研发，即旨在调控 FXR 的转录活性状态。FXR 激动剂作为保肝药物的研发是当前的研究热点，其中，奥贝胆酸作为一种强 FXR 激动剂，为原发性胆汁性肝硬化药物，已于 2016 年 5 月被美国 FDA 批准上市，是以 FXR 为靶点成功上市的第一例药物；其抗 NASH 药效已完成临床 III 期研究，然而其临床药效欠佳：服用安慰剂组的患者中有 12% 发现肝纤维化指标有改善，而服用高剂量奥贝胆酸的患者中有 23% 发现肝纤维化指标有改善，提示通过奥贝胆酸等 FXR 激动剂转录激活 FXR 后的药理效应比较局限。

研究表明，NASH 以及肝纤维化状态下，肝脏中 FXR 表达下调。靶标蛋白的缺失使得其激动剂或者拮抗剂无法通过调控该靶标来发挥作用，这是导致 FXR 激动剂临床药效不佳的主要原因；此外，肝细胞凋亡进程中伴随着 FXR 的表达

下调，加速加重肝细胞凋亡；并且提高 FXR 表达具有抗凋亡作用；另外，随着年龄的增大，肝脏中 FXR 的表达显著下调，这是引起脂肪肝的重要因素。因此，需重视 FXR 自身表达对疾病发生发展以及其配体药理活性的作用；基于此，调控 FXR 的自身表达是新的靶向 FXR 的重要策略。然而如何调控 FXR 蛋白的基因表达尚无成熟的技术手段。

发明内容

发明目的：本发明的第一目的是提供一类 FXR 靶向的 saRNA，第二目的是提供所述 saRNA 的应用。

技术方案：本发明的 FXR 靶向的 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-1000 至-1 位点区域互补的核苷酸序列。

进一步地，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-102 位点至-84 位点区域互补的核苷酸序列。

进一步地，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-103 位点至-85 位点区域互补的核苷酸序列。

进一步地，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-105 位点至-87 位点区域互补的核苷酸序列。

进一步地，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-318 位点至-300 位点区域互补的核苷酸序列。

进一步地，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-319 位点至-301 位点区域互补的核苷酸序列。

更具体地，所述 saRNA 由序列如 SEQ ID NO: 2 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 3 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 4 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 5 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 6 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 7 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 8 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 9 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 10 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 11 所示的反义链组成。

本发明从 saRNA 的角度，首次设计合成了特异性靶向 FXR (NR1H4) 的系列 saRNA，其具有特异性高、专一性强的特点，可显著调控 FXR 的转录和表达，从而发挥抗肝细胞凋亡的活性，可用于制备对抗具有肝细胞凋亡表型的肝脏疾病的药物。

本发明还公开了所述的 saRNA 在制备由于 FXR 表达下调引起的相关疾病的药物中的应用。

本发明又公开了所述的 saRNA 在制备对抗肝细胞凋亡的药物中的应用。

上述药物为治疗肝脏疾病的药物，其中肝脏疾病具有肝细胞凋亡表型，可具体治疗不限于以下疾病：病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病、肝纤维化、肝硬化、肝癌、胆汁淤积性肝病、药物性肝损害等。

有益效果：与现有技术相比，本发明具有如下显著优点：

(1) 该系列 saRNA 均能够促进 FXR 基因的转录，均能够恢复多种诱因导致下调的 FXR 表达水平，与对照组具有显著差异，最优达到***P<0.001；

(2) 该系列 saRNA 均能够对抗各种诱因导致的肝细胞凋亡，与对照组具有显著差异，最优达到***P<0.001；

(3) 该系列 saRNA 作用靶点精准，特异性高、专一性强，适应症广泛，可制备为治疗具有肝细胞凋亡表型的多种肝脏疾病的药物。

附图说明

图 1 为细胞凋亡状态下 FXR 的表达水平，其中：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001；

图 2 为本申请的 saRNA 对健康细胞中 NR1H4 基因表达的调控作用，其中：*P<0.05，***P<0.001；

图 3 为本申请的 saRNA 对凋亡细胞中 NR1H4 基因表达的调控作用，其中：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001；

图 4 为本申请的 saRNA 对细胞凋亡的缓解作用，其中：**P<0.01，***P<0.001。

具体实施方式

下面结合附图对本发明的技术方案作进一步说明。

实施例 1：细胞凋亡状态下 FXR 的表达变化

1、实验材料

DMEM 培养基购自 GIBCO (Grand Island, New York, USA)。胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 Hyclone (Logan, Utah, USA)。胰蛋白酶 Trypsin 购自 Amersco (Solon, Ohio, USA)。细胞培养耗材购于 Costar (USA)。放线菌素 D (Actinomycin, ActD) 和放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 购于 MedChem Express 公司 (NJ, USA)。重组人肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF α) 购于 Peprotech 公司 (Rocky Hill, USA)，重组人 FasL 蛋白和重组人 TRAIL 蛋白购于 Sino Biological 公司 (Wayne, PA, USA)。RNAiso Plus 购于 RNAiso Plus 购于 TaKaRa Biotechnology (大连, 中国)。HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR 及

ChamQ SYBR qPCR Master Mix 均购于 Vazyme Biotechnology (南京, 中国)。所有引物均由 Invitrogen 公司 (上海, 中国) 设计合成。DEPC 水购于碧云天生物技术有限公司 (上海, 中国)。

2、实验方法

2.1 细胞培养及给药处理

人肝细胞系 L02 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 取对数生长期的细胞按 2×10^5 个/孔接种于 12 孔板中。24h 后分别用 TRAIL, ActD/TNF α , CHX/FasL 法造凋亡模型。TRAIL 给药浓度为 50ng/ml, 给药时间为 0、2、4、8、12、24h。ActD/TNF α 给药浓度为 0.2 μ M 和 20ng/ml, 其中 ActD 预给 30min, 给药时间为 0、1、2、4、8、12h。CHX/FasL 给药浓度为 50 μ M 和 50ng/ml, 其中 CHX 预给 30min, 给药时间为 0、2、4、8h。

2.2 PCR

RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA, 将其反转录为 cDNA 然后通过荧光定量 PCR 法分析 FXR 的转录表达变化。荧光定量 PCR 所使用的引物见下表 1:

表 1 荧光定量 PCR 所使用的引物

基因	序列
NR1H4	Forward: 5'-AACAGAACAAGTGGCAGGATC-3' Reverse: 5'-GCATTCAGCCAACATTCCCA-3'
GAPDH	Forward: 5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTC-3' Reverse: 5'-GCTCCCCCTGCAAATGA-3'

3、实验结果

如图 1 所示, 在 TRAIL、ActD/TNF α 、CHX/FasL 3 种凋亡模型下, FXR 的 mRNA 水平均表现出时间依赖性的下降。

实施例 2: 靶向 FXR 的 saRNA 设计及验证

1、实验材料

Lipofectamine RNAiMAX 购于 Thermo Fisher (CA, USA)。Opti-MEM 培养基购于 GIBCO (Grand Island, New York, USA)。所有 saRNA 均由吉满生物科技有限公司 (上海, 中国) 合成。重组人 TRAIL 蛋白同实施例 1。

其余试剂同实施例 1。

2、实验方法

2.1 FXR 启动子序列查询

在网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得 FXR 启动子区序列。

根据 saRNA 序列的设计原则, 设计获得 FXR 的 5 对 saRNA 及其对应 FXR 启动子区位点。FXR 启动子区位点-1000 位点至-1 位点的序列 (SEQ ID NO:1)

如下所示:

GAGCTTGGTACAGGTTGGCAGAGGTTGGGATGTCTGAAGGGACAGAATGT
GAGAAAATCCTAGAGACATTAGGGCTAGATCTTCAGGTGTGGAAGGGGTTC
TAAATGTCAAGCATTTTGTGTTTCGTTTTTTAGGCATAGAGAGTGCATTGGGG
ATTTTCGATGAGGGGAGTGCCTAGCAAGTTGCTGGGTACATAGTAGGCTGA
TAATCAATCAATGATGGTTCAACTAATGAAGGAGAGAAATAATAATTGCCAC
AAATTATTGGGTGATTGCTATCTGCCACACACTTTTCTAAACATTTTCACTAC
TCATGTAATTCTCACCACAGCCCATGAGATGGTTTCTCCATATCCATTCTACA
GATGAGGAACTGAGACTCAGAGAGGCTAAGTGTCTTGCTCAAGGCTGTG
ACTAAAGAGTGGGCATCTAACCAGAGCCTGTGCTTCCACACTGCTGTGCAA
TTTGGAACACAGAAGAAGGGGAGAGAAGAAAAAGGGGTGTGGGACCAA
TGTCATCCAGAAAGGAAGCTATGATAGGCCCAAAGTAGGAGAAGAACAAT
GTGGGTGTGAAATAAGAGACATTCCAAAGATGCAATCAACCCAAATCTGTT
ATTATTTGATATGGGTGGCTGGGCAGAGGGAAGGGTCAAAAAGGCTCCCA
GCTTCTAGTTTCAGTCCCGGGGAAGTGATAGAGCTATTCAAAGAAGTTGTAG
TGAGAGAGAGGGAAGATGACAGTTTGGTTTTAGTTGATGTGTACAGAAATA
CGGGTGCCCAGGAGCCCACAAAACGGCCAGAGGAGAAATGCTTTCAAAG
GCAAGCTGCAGGGCTCCTTGGTTTTTGTCACATTCCTCATTCTGGGGCTTTGC
GGTTTTGTCTTGGAATCTCGAGGCTCTCCCAAGGTTCTTTCTATGTTTATA
TCATTTAGCAGGGAAGGATTGTTAATGACTAATCTGTGTCCATGAGGCACA
GAGCCAAGGAAGAGATGCTGCTGCTAGCCC。

2.2 细胞培养及 saRNA 转染

人肝细胞系 L02 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 取对数生长期的细胞按 2×10^5 个/孔接种于 12 孔板中。24h 后以 50nM 转染细胞, 转染 48h 后收获细胞。RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA, 将其反转录为 cDNA 然后通过荧光定量 PCR 法分析 FXR 的转录表达变化。

2.3 TRAIL 诱导的细胞凋亡模型

同实施例 1。

2.4 PCR

同实施例 1。

3、实验结果

3.1 saRNA 序列

hdsFXR-102:

正义链: 5'-AGGUUCCUUUCUAUGUUUA[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:6)

反义链: 5'-UAAACAUAGAAAGGAACCU[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:7)

(FXR 启动子区-102 位点至-84 位点)。

hdsFXR-103:

正义链: 5'-AAGGUUCCUUUCUAUGUUU[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:2)

反义链: 5'-AAACAUAGAAAGGAACCU[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:3)

(FXR 启动子区-103 位点至-85 位点)。

hdsFXR-105:

正义链: 5'-CCAAGGUUCCUUUCUAUGU[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:8)

反义链: 5'-ACAUAGAAAGGAACCUUG[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:9)

(FXR 启动子区-105 位点至-87 位点)。

hdsFXR-318:

正义链: 5'-GGAAGUGAUAGAGCUAUUC[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:10)

反义链: 5'-GAUAGCUCUAUCACUUC[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:11)

(FXR 启动子区-318 位点至-300 位点)。

hdsFXR-319:

正义链: 5'-GGGAAGUGAUAGAGCUAUU[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:4)

反义链: 5'-AAUAGCUCUAUCACUUC[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:5)

(FXR 启动子区-319 位点至-301 位点)。

3.2 saRNA 验证

首先在正常 L02 细胞中考察验证了上述 saRNA 对 FXR 基因表达的调控作用。如图 2 所示, 5 对 saRNA 均具有激活效果, 均可以显著促进 FXR 基因的转录, 使其 mRNA 水平上调; 且 hdsFXR-103 和 hdsFXR-319 优于 hdsFXR-102、hdsFXR-105 和 hdsFXR-318。

3.3 saRNA 对凋亡细胞中 FXR 表达的调控作用

同实施例 1 所述, 凋亡状态下 FXR 基因表达水平呈时间依赖性的下调。如图 3 所示, TRAIL 诱导的 L02 凋亡状态下, FXR 基因表达呈时间依赖性的下调; 而上述 saRNA 对此具有显著的逆转作用, 对凋亡模型中各个时间点和不同程度的 FXR 下调均具有显著的逆转作用。

实施例 3: 系列 saRNA 对细胞凋亡的药理活性

1、实验材料

噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)购于 MedChem Express 公司 (NJ, USA)。

其余试剂同实施例 2。

2、实验方法

2.1 细胞培养、转染和给药处理

人肝细胞系 L02 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 取对数生长期的细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。24h 后以 50nM 转染细胞, 转染 48h 后进行凋亡造模。TRAIL 给药浓度为 50ng/ml, 给药 24h。ActD/TNF α 给药浓度为 0.2 μ M 和 20ng/ml, 其中 ActD 预给 30min, 给药时间为 8h。CHX/FasL 给药浓度为 50 μ M 和 50ng/ml, 其中 CHX 预给 30min, 给药时间为 8h。

2.2 细胞活力检测

给药时间结束后, 每孔加入 20 μ l MTT (5mg/ml), 37℃继续孵育 4h, 吸出弃去培养基, 每孔加入 150 μ l DMSO, 37℃孵育 10min, 490nm 波长测定吸光度。

3、实验结果

如图 4 所示, hdsFXR-102、hdsFXR-103、hdsFXR-105、hdsFXR-318 和 hdsFXR-319 在 TRAIL(图 4A 和图 4D)、ActD/TNF α (图 4B 和图 4E)和 CHX/FasL (图 4C 和图 4F) 3 种经典凋亡模型下均具有显著的抗细胞凋亡效果。

权 利 要 求 书

1、一种 FXR 靶向的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-1000 至-1 位点区域互补的核苷酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-102 位点至-84 位点区域互补的核苷酸序列。

3、根据权利要求 1 所述的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-103 位点至-85 位点区域互补的核苷酸序列。

4、根据权利要求 1 所述的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-105 位点至-87 位点区域互补的核苷酸序列。

5、根据权利要求 1 所述的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-318 位点至-300 位点区域互补的核苷酸序列。

6、根据权利要求 1 所述的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 包括与 NR1H4 基因启动子区-319 位点至-301 位点区域互补的核苷酸序列。

7、根据权利要求 1 所述的 saRNA，其特征在于，所述 saRNA 由序列如 SEQ ID NO: 2 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 3 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 4 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 5 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 6 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 7 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 8 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 9 所示的反义链组成，或者由 SEQ ID NO: 10 所示的正义链和序列如 SEQ ID NO: 11 所示的反义链组成。

8、一种权利要求 1-7 任一所述的 saRNA 在制备由于 FXR 表达下调引起的相关疾病的药物中的应用。

9、一种权利要求 1-7 任一所述的 saRNA 在制备对抗肝细胞凋亡的药物中的应用。

10、根据权利要求 8 或 9 所述的应用，其特征在于，所述药物为治疗肝脏疾病的药物。

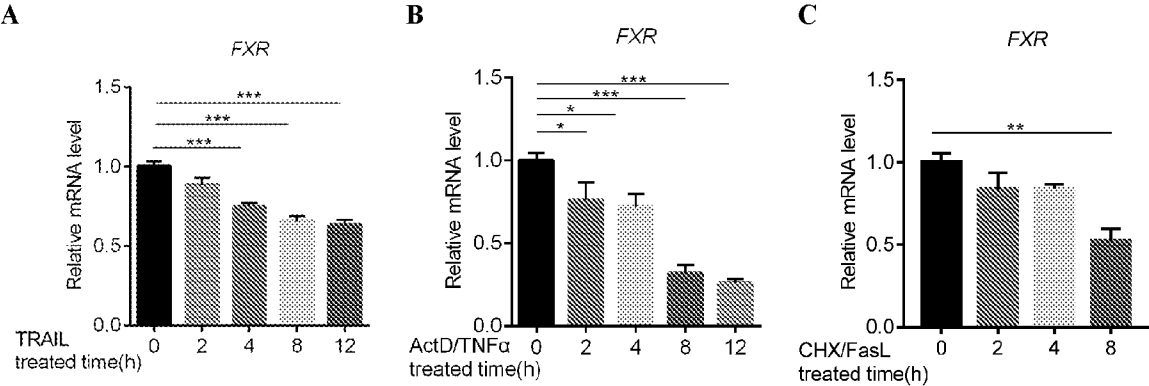


图 1

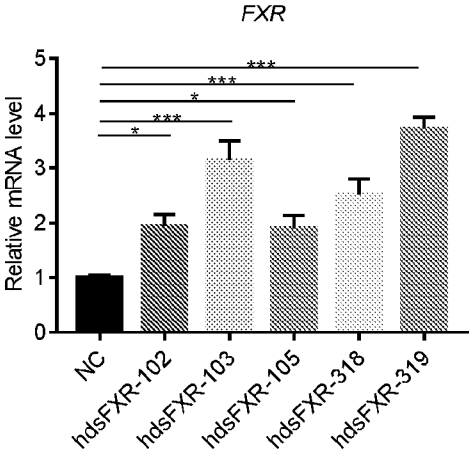


图 2

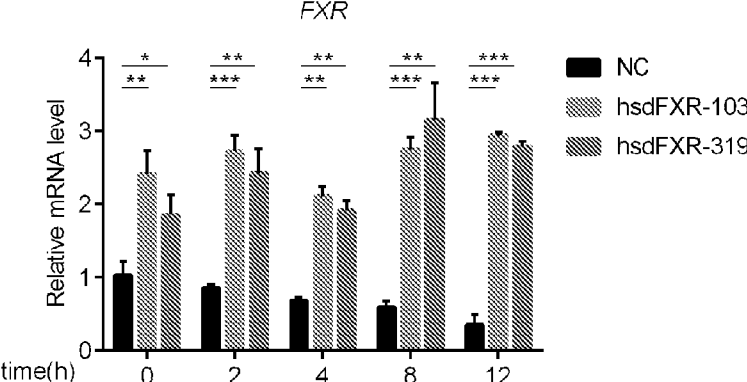


图 3

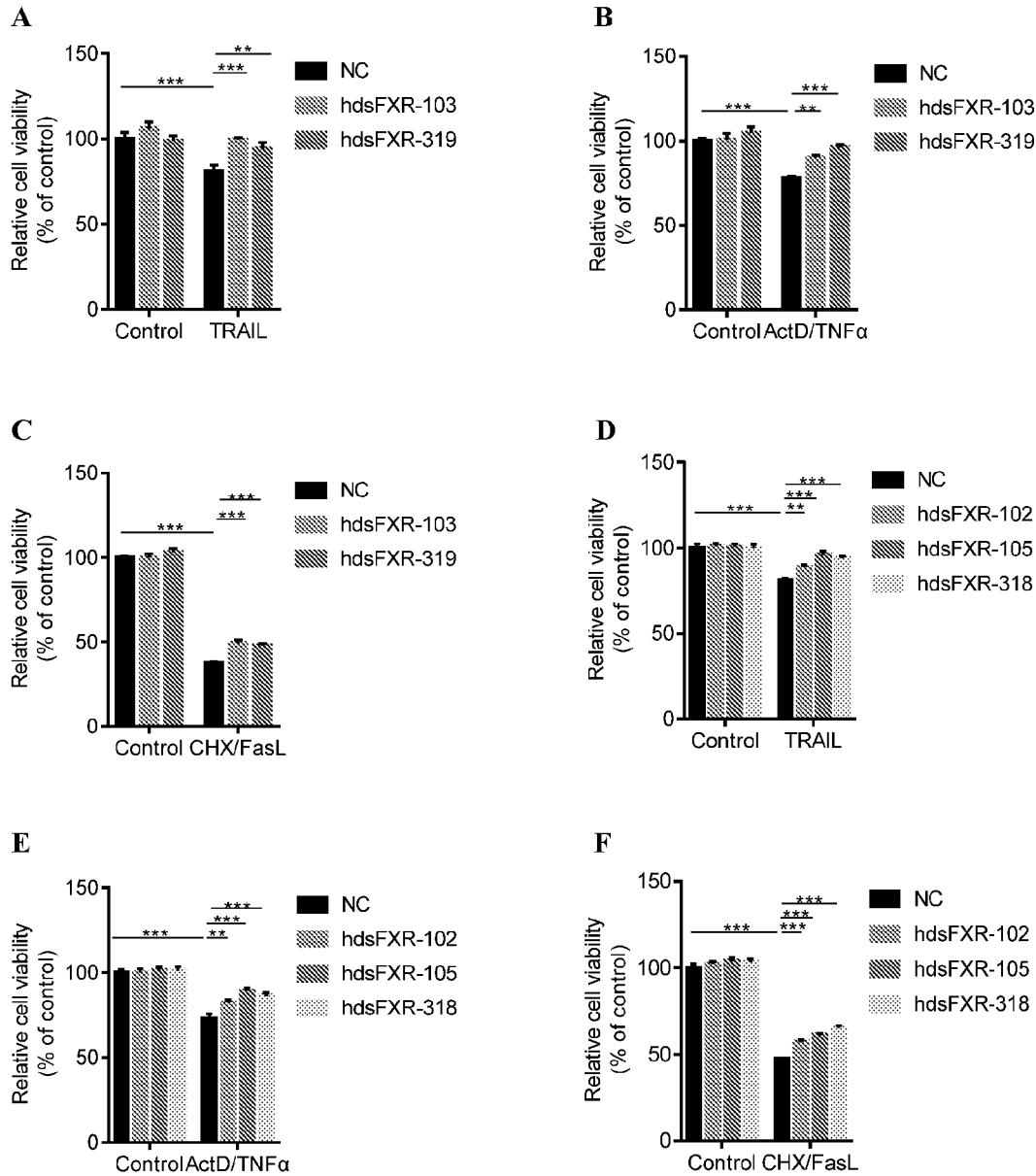


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/111137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPL, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 百度搜索, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 法尼醇, 受体, 小激活, 小活化, 核受体, 肝, 启动子, Farnesoid X Receptor, small activating RNA, FXR, hFXR, NR1H4, liver, promoter, saRNA, RNAa; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: sequence search for SEQ ID NOs: 1-11

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112941076 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 11 June 2021 (2021-06-11) see claims 1-10	1-10
A	US 2018305689 A1 (MINA THERAPEUTICS LIMITED) 25 October 2018 (2018-10-25) see abstract and description paragraphs 100-101	1-10
A	CN 109303921 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 05 February 2019 (2019-02-05) see entire document	1-10
A	CN 108103063 A (ZHANG, Hao) 01 June 2018 (2018-06-01) see entire document	1-10
A	US 2020255826 A1 (MINA THERAPEUTICS LIMITED) 13 August 2020 (2020-08-13) see entire document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 2021

Date of mailing of the international search report

15 November 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/111137

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	谢杨 等 (XIE, Yang et al.). "核受体FXR代谢调控作用及肿瘤细胞增殖机制研究进展 (Progress in the Role of Farnesoid X Receptor in Metabolic Regulation and Tumor Cell Proliferation)" <i>生理学报 (Acta Physiologica Sinica)</i> , Vol. 66, No. 2, 18 April 2014 (2014-04-18), ISSN: 0371-0874, pp. 252-258, see entire document	1-10
A	王运 等 (WANG, Yun et al.). "小激活RNA(saRNA)---肿瘤治疗新途径 (saRNA: the New Anti-tumor Therapy)" <i>中国生物化学与分子生物学报 (Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)</i> , Vol. 30, No. 10, 31 October 2014 (2014-10-31), ISSN: 1007-7626, pp. 979-984, see entire document	1-10
A	NCBI. "GenBank Accession number : AY245533.1" <i>GENBANK</i> , 01 March 2004 (2004-03-01), See FEATURES and sequences	1-10
A	Huber, RM et al. "Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters" <i>Gene</i> , Vol. 290, No. 1-2, 15 May 2002 (2002-05-15), ISSN: 0378-1119, pp. 35-43, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/111137

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/111137

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112941076	A	11 June 2021	None			
US	2018305689	A1	25 October 2018	EP	3286318	A2	28 February 2018
				JP	2021035360	A	04 March 2021
				JP	2018512876	A	24 May 2018
				WO	2016170348	A2	27 October 2016
				WO	2016170348	A3	13 April 2017
				WO	2016170348	A8	30 November 2017
CN	109303921	A	05 February 2019	None			
CN	108103063	A	01 June 2018	None			
US	2020255826	A1	13 August 2020	AU	2018330495	A1	26 March 2020
				US	2020255827	A1	13 August 2020
				CA	3075205	A1	14 March 2019
				WO	2019048631	A1	14 March 2019
				TW	201920669	A	01 June 2019
				WO	2019048632	A1	14 March 2019
				EP	3679138	A1	15 July 2020
				CA	3075219	A1	14 March 2019
				AU	2018330494	A1	26 March 2020
				EP	3679139	A1	15 July 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/111137

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 百度学术搜索, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 法尼醇, 受体, 小激活, 小活化, 核受体, 肝, 启动子, Farnesoid X Receptor, small activating RNA, FXR, hFXR, NR1H4, liver, promoter, saRNA, RNAa; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs:1-11的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 112941076 A (中国药科大学) 2021年 6月 11日 (2021 - 06 - 11) 参见权利要求1-10	1-10
A	US 2018305689 A1 (MINA THERAPEUTICS LTD) 2018年 10月 25日 (2018 - 10 - 25) 参见摘要及说明书第100-101段	1-10
A	CN 109303921 A (中国药科大学) 2019年 2月 5日 (2019 - 02 - 05) 参见全文	1-10
A	CN 108103063 A (张灏) 2018年 6月 1日 (2018 - 06 - 01) 参见全文	1-10
A	US 2020255826 A1 (MINA THERAPEUTICS LTD) 2020年 8月 13日 (2020 - 08 - 13) 参见全文	1-10
A	谢杨等. “核受体FXR代谢调控作用及肿瘤细胞增殖机制研究进展” 生理学报, 第66卷, 第2期, 2014年 4月 18日 (2014 - 04 - 18), ISSN: 0371-0874, 第252-258页, 参见全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 10月 25日

国际检索报告邮寄日期

2021年 11月 15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

李振鹏

电话号码 86-(010)-62411085

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	王运等. "小激活RNA (saRNA) ---肿瘤治疗新途径" 中国生物化学与分子生物学报, 第30卷, 第10期, 2014年 10月 31日 (2014 - 10 - 31), ISSN: 1007-7626, 第979-984页, 参见全文	1-10
A	NCBI. "GenBank登录号: AY245533.1" GENBANK, 2004年 3月 1日 (2004 - 03 - 01), 参见FEATURES部分及序列	1-10
A	Huber, RM等. "Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters" Gene, 第290卷, 第1-2期, 2002年 5月 15日 (2002 - 05 - 15), ISSN: 0378-1119, 第35-43页, 参见全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/111137

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112941076	A	2021年 6月 11日	无			
US	2018305689	A1	2018年 10月 25日	EP	3286318	A2	2018年 2月 28日
				JP	2021035360	A	2021年 3月 4日
				JP	2018512876	A	2018年 5月 24日
				WO	2016170348	A2	2016年 10月 27日
				WO	2016170348	A3	2017年 4月 13日
				WO	2016170348	A8	2017年 11月 30日
CN	109303921	A	2019年 2月 5日	无			
CN	108103063	A	2018年 6月 1日	无			
US	2020255826	A1	2020年 8月 13日	AU	2018330495	A1	2020年 3月 26日
				US	2020255827	A1	2020年 8月 13日
				CA	3075205	A1	2019年 3月 14日
				WO	2019048631	A1	2019年 3月 14日
				TW	201920669	A	2019年 6月 1日
				WO	2019048632	A1	2019年 3月 14日
				EP	3679138	A1	2020年 7月 15日
				CA	3075219	A1	2019年 3月 14日
				AU	2018330494	A1	2020年 3月 26日
				EP	3679139	A1	2020年 7月 15日