



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117677697 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 08

(21) 申请号 202280048413.X

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

(22) 申请日 2022.07.08

专利代理师 金德善

(30) 优先权数据

10-2021-0089864 2021.07.08 KR

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07H 19/048 (2006.01)

2024.01.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/009984 2022.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/282704 KO 2023.01.12

(71) 申请人 奥利克斯医药有限公司

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 洪善宇 朴峻贤 崔正容

权利要求书2页 说明书36页
序列表(电子公布) 附图29页

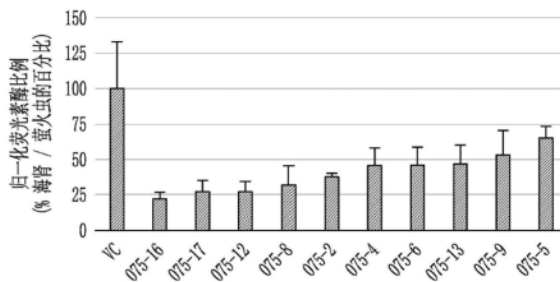
(54) 发明名称

靶向MARC1基因的RNAi制剂及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种靶向线粒体胺肟基还原组分1(MARC1: Mitochondrial amidoxime reducing component 1)基因的RNAi制剂及其用途,更具体地,涉及一种RNAi制剂以及包括所述RNAi制剂的用于预防或治疗非酒精性脂肪肝病等肝脏疾病的药物组合物,所述RNAi包括反义链和有义链,所述反义链对MARC1mRNA序列具有序列互补性,且所述有义链对所述反义链具有序列互补性。

人 MARC1



1. 一种RNAi制剂,其包括:反义链,其对线粒体胺肟基还原组分1(MARC1:Mitochondrial amidoxime reducing component 1)mRNA序列具有序列互补性,并且是长度为19nt至21nt的核苷酸;以及

有义链,其对所述反义链具有序列互补性,并且长度为15nt至17nt,其中,所述反义链的5'末端和所述有义链的3'末端形成钝端。

2. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述有义链具有选自表1、表10、表11、表12、表13、表14所列反义链序列中的序列。

3. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述有义链是选自由SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:179、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:257、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:261、SEQ ID NO:273、SEQ ID NO:285、SEQ ID NO:287、SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:353、SEQ ID NO:387、SEQ ID NO:391、SEQ ID NO:399、SEQ ID NO:423、SEQ ID NO:429、SEQ ID NO:431、SEQ ID NO:435、SEQ ID NO:439、SEQ ID NO:443、SEQ ID NO:445、SEQ ID NO:447以及SEQ ID NO:527组成的组中的任一种。

4. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述有义链是选自由SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:423、SEQ ID NO:431、SEQ ID NO:435、SEQ ID NO:439、SEQ ID NO:447、SEQ ID NO:527以及SEQ ID NO:551组成的组中的任一种。

5. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述反义链具有选自表1、表10、表11、表12、表13、表14所列有义链序列中的序列。

6. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述反义链是选自由SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:178、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:258、SEQ ID NO:260、SEQ ID NO:262、SEQ ID NO:274、SEQ ID NO:286、SEQ ID NO:288、SEQ ID NO:332、SEQ ID NO:354、SEQ ID NO:388、SEQ ID NO:392、SEQ ID NO:400、SEQ ID NO:424、SEQ ID NO:430、SEQ ID NO:432、SEQ ID NO:436、SEQ ID NO:440、SEQ ID NO:444、SEQ ID NO:446、SEQ ID NO:448以及SEQ ID NO:528组成的组中的任一种。

7. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述反义链是选自由SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:424、SEQ ID NO:432、SEQ ID NO:436、SEQ ID NO:440、SEQ ID NO:448、SEQ ID NO:528以及SEQ ID NO:552组成的组中的任一种。

8. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,

其抑制MARC1的表达。

9. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述有义链在3'末端与N-乙酰半乳糖胺衍生物结合。

10. 根据权利要求1所述的RNAi制剂,其中,

所述有义链或所述反义链包括一个或多个化学修饰。

11. 根据权利要求10所述的RNAi制剂,其中,
所述有义链包括选自以下的一个或多个化学修饰:
与5'末端相邻的2个至4个核苷酸键被修饰为硫代磷酸酯、硼磷酸酯或膦酸甲酯;
在一个或多个核苷酸内糖结构的2'碳位置中,-OH基团被-CH₃(甲基)、-OCH₃(甲氧基)、-NH₂、-F、-O-2-甲氧基乙基-0-丙基、-O-2-甲硫基乙基、-O-3-氨基丙基,或-O-3-二甲基氨基丙基所取代;以及
在3'末端中与N-乙酰半乳糖胺衍生物或细胞穿透肽结合。
12. 根据权利要求10所述的RNAi制剂,其中,
所述反义链包括选自以下的一个或多个化学修饰:
与3'末端或5'末端相邻的2个至7个核苷酸键被修饰为硫代磷酸酯、硼磷酸酯或膦酸甲酯;
在一个或多个核苷酸内糖结构的2'碳位置中,-OH基团被-CH₃(甲基)、-OCH₃(甲氧基)、-NH₂、-F、-O-2-甲氧基乙基-0-丙基、-O-2-甲硫基乙基、-O-3-氨基丙基,或-O-3-二甲基氨基丙基所取代;以及
在5'末端中与磷酸基团、E-乙烯基膦酸酯或细胞穿透肽结合。
13. 根据权利要求10所述的RNAi制剂,其包括选自由以下组成的组中的一个或多个修饰:
在有义链或反义链中,与3'末端或5'末端相邻的2个至7个核苷酸键被修饰为硫代磷酸酯;
在有义链或反义链中的一个或多个核苷酸内糖结构的2'碳位置中,-OH基团被-OCH₃(甲氧基)或-F所取代的修饰;
在有义链的3'末端与N-乙酰半乳糖胺衍生物结合;以及
在反义链的5'末端与磷酸基团或E-乙烯基膦酸酯结合。
14. 根据权利要求10所述的RNAi制剂,其中,
所述有义链具有选自表2、表15、表16以及表17所列反义链序列中的序列。
15. 根据权利要求10所述的RNAi制剂,其中,
所述反义链具有选自表2、表15、表16以及表17所列反义链序列中的序列。
16. 一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其包括:
根据权利要求1至15中任一项所述的RNAi制剂作为活性成分。
17. 根据权利要求16所述的用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其中,
所述肝脏疾病是脂肪肝、肝纤维化或肝硬化。
18. 根据权利要求17所述的用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其中,
所述脂肪肝为非酒精性脂肪肝病。
19. 根据权利要求18所述的用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其中,
所述非酒精性脂肪肝病是单纯性脂肪肝或非酒精性脂肪性肝炎。
20. 一种预防或治疗肝脏疾病的方法,其包括:
将根据权利要求1至15中任一项所述的RNAi制剂施用于个体。
21. 一种根据权利要求1至15中任一项所述的RNAi制剂在制备用于预防或治疗肝脏疾病的药物的用途。

靶向MARC1基因的RNAi制剂及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种靶向线粒体胺肟基还原组分1(MARC1;Mitochondrial amidoxime reducing component 1)基因的RNAi制剂及其用途,更具体地,涉及一种RNAi制剂以及包括所述RNAi制剂的用于预防或治疗非酒精性脂肪肝病等肝脏疾病的药物组合物,所述RNAi包括反义链和有义链,所述反义链对MARC1 mRNA序列具有序列互补性,且所述有义链对所述反义链具有序列互补性。

背景技术

[0002] 近年来,肥胖人口增加所导致的代谢综合症的患病率也在增加,同时非酒精性脂肪肝病的患病率也呈增加趋势。脂肪肝是一种肝细胞中堆积中性脂肪的疾病,据报告其因肥胖并发症被诱发或者因酒精、糖尿病、营养不良、药物滥用等其它各种原因而被诱发,并且其大致可分为因过度摄取酒精而引起的酒精性脂肪肝病以及与酒精摄取无关地在肝内堆积中性脂肪的非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease;NAFLD),非酒精性脂肪性肝病包括单纯性脂肪肝(simple steatosis)和非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis;NASH)。

[0003] 单纯性脂肪肝预后较好,但若是脂肪堆积严重会进展为炎症,即脂肪性肝炎,在伴有广泛性脂肪性肝炎的肝脏中会出现肝细胞坏死,并且由于星状细胞(stellate cell)被激活而引起纤维化,尤其会在肝静脉末端部位中出现严重的窦周纤维化(perisinusoidal fibrosis)。因此,若不治疗脂肪性肝炎,会发展为肝纤维化或肝硬化,从而使预后不良。15%至50%的非酒精性脂肪性肝炎患者会出现肝纤维化或肝硬化,并且十年后30%的肝纤维化患者会出现肝硬化。

[0004] 非酒精性脂肪肝病与肥胖、心脏病、糖尿病等各种代谢综合征密切相关,因此在这方面临床上尝试着使用胰岛素抵抗改善剂、抗氧化剂、高脂血症治疗、保肝药物、血管紧张素II受体抑制剂等对代谢综合征具有抑制效果的药剂。然而,迄今为止,未研发具有临床证据的用于治疗非酒精性脂肪肝病的药物,并且目前使用的药物只有退而求其次选择的超说明书(Off-label)药物,然而这种现有的超说明书药物缺乏临床依据且并因安全性问题等而存在使用限制。例如,胰岛素抵抗改善剂比格列酮(Pioglitazone)作为非酒精性脂肪性肝炎的治疗药物而受到关注,但其在临床中未显示出对肝纤维化的实际改善效果,并且还因骨折风险、体重增加、使心力衰竭恶化和发作等副作用而未能明确满足作为治疗剂的判定标准。如上所述,在没有任何获得批准的非酒精性脂肪肝病治疗剂的情况下,近期美国食品药品监督管理局(FDA)提出将减少炎症、减少肝纤维化、缓解非酒精性脂肪性肝炎症状等作为非酒精性脂肪性肝炎的临床指标。

[0005] 此外,利用RNA干扰(RNA interference)现象治疗疾病通过靶向mRNA而利用在翻译水平(translational level)中调节基因表达的小干扰RNA(small interfering RNA; siRNA),因此其作为更加安全治疗疾病的治疗剂而受到关注。

[0006] 因此,本发明人为研发出对非酒精性脂肪性肝炎的临床指标显示出改善效果的新

的安全药物而做出不懈努力,最终研发出利用RNA干扰技术的RNA制剂。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的目的在于提供一种特异性抑制MARC1表达的RNAi制剂。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物或者预防或治疗肝脏疾病的方法,所述药物组合物包括所述RNAi制剂。

[0010] 技术方案

[0011] 为实现上述目的,一方面提供一种RNAi制剂,其包括:反义链,其对线粒体胺肟基还原组分1(MARC1:Mitochondrial amidoxime reducing component 1)mRNA序列具有序列互补性,并且是长度为19nt至21nt的核苷酸;以及有义链,其对所述反义链具有序列互补性,并且长度为15nt至17nt,其中,所述反义链的5'末端和所述有义链的3'末端形成钝端(blunt end)。

[0012] 另一方面提供一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其包括所述RNAi制剂作为活性成分。

[0013] 另一方面提供一种预防或治疗肝脏疾病的方法,其包括将所述RNAi制剂施用于个体。

[0014] 另一方面提供一种所述RNAi制剂在制备用于预防或治疗肝脏疾病药物的用途。

[0015] 有益效果

[0016] 根据一方面的RNAi制剂缓和特异性免疫反应、脱靶效应等副作用,同时与编码MARC1的mRNA结合而进行分解,从而能够抑制所述蛋白质的表达。

[0017] 此外,根据一方面的RNAi制剂通过以肝细胞表面受体为靶点而表现出缓和肝组织中的脂肪堆积、减轻炎症、减少肝纤维化、缓和酒精性脂肪性肝炎症状等效果,因此可用作包括非酒精性脂肪肝病、肝纤维化、肝硬化等肝脏疾病的靶向治疗剂。

附图说明

[0018] 图1是在Huh7细胞中分别以10nM的浓度处理根据一方面的50种MARC1 asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0019] 图2是在来源于C57BL/6小鼠的原代肝细胞中分别以200nM的浓度处理根据一方面的23种MARC1 GalNAc-asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0020] 图3是在将根据一方面的OLX-003-1或OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后(#3-1,#31-1),确认MARC1和MARC2 mRNA表达水平的结果,图3的A为确认MARC1 mRNA表达水平的结果,图3的B为确认MARC2 mRNA表达水平的结果。

[0021] 图4是在将根据一方面的OLX-003-1或OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后(#3-1,#31-1),肉眼确认肝脏外观的结果。

[0022] 图5是在将根据一方面的OLX-003-1或OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后(#3-1,#31-1),经H&E染色法确认肝实质中脂肪液泡水平的结果。

[0023] 图6是在将根据一方面的OLX-003-1或OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后(#3-1,#31-1),经油红O(Oil Red O)染色法确认肝实质中脂肪液泡水平的结果。

[0024] 图7是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#031-1), 确认MARC1 mRNA和MARC2 mRNA表达水平的结果, 图7的A为确认MARC1 mRNA表达水平的结果, 图7的B为确认MARC2 mRNA表达水平的结果。

[0025] 图8是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#031-1), 肉眼观察肝脏外观的结果。

[0026] 图9是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#031-1), 经H&E染色法确认肝实质中脂肪液泡水平的结果。

[0027] 图10是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#31-1) 经天狼猩红 (Picro Sirius Red) 染色法确认肝实质中脂肪液泡和胶原蛋白沉积水平的结果。

[0028] 图11是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#031-1), 评估肝纤维化相关因子表达水平的结果, 图11的A为确认 α -SMA mRNA的表达水平的结果, 图11B为确认Col1 α 1mRNA表达水平的结果。

[0029] 图12是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#031-1), 确认肝组织中中性脂肪水平的结果。

[0030] 图13是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#031-1), 确认肝损伤指标因子变化的结果, 图13的A为确认血清中AST水平的结果, 图13的B为确认血清中ALT水平的结果, 图13的C为计算血清中AST/ALT比例的结果。

[0031] 图14是在将根据一方面的OLX-031-1施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (#31-1), 确认血清中脂质指标物质变化的结果, 图14的A为确认胆固醇水平的结果, 图14的B为确认中性脂肪水平的结果, 图14的C为确认低密度脂蛋白水平的结果, 图14的D为确认高密度脂蛋白水平的结果。

[0032] 图15是在将根据一方面的OLX-031-2施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2), 经H&E染色法确认肝实质中脂肪液泡和炎症病灶水平的结果。

[0033] 图16是在将根据一方面的OLX-031-2施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2), 经天狼猩红染色法确认肝实质中脂肪液泡和胶原蛋白沉积水平的结果。

[0034] 图17是在将根据一方面的OLX-031-2施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2), 通过对比PSR染色区域 (%) 来比较肝实质中胶原蛋白成分含量的结果。

[0035] 图18是在将根据一方面的OLX-031-2施用于被提供高脂肪饮食的动物模型后 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2), 评估肝纤维化相关因子表达水平的结果, 图18的A为确认Col1 α 1mRNA表达水平的结果, 图18的B为确认 α -SMA mRNA表达水平的结果, 图18的C为确认TIMP1 mRNA表达水平的结果。

[0036] 图19是在将根据一方面的OLX-031-2施用于提供高脂肪饮食的动物模型后 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2), 确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0037] 图20a、图20b以及图20c是在将Huh7细胞中分别以1nM的浓度处理根据一方面的134种MARC1 asiRNA后, 确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0038] 图21是在Huh7细胞中分别以0.1nM的浓度处理根据一方面的41种MARC1 asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0039] 图22是在Huh7细胞中分别以1nM的浓度处理根据一方面的30种MARC1 asiRNA后,确认MARC1蛋白表达水平的结果。

[0040] 图23是在Huh7细胞中分别以100nM的浓度处理根据一方面的41种MARC1 GalNAc-asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0041] 图24是在来源于人的原代肝细胞中分别以500nM的浓度处理根据一方面的41种MARC1 GalNAc-asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0042] 图25是在来源于人的原代肝细胞中分别以20nM或100nM的浓度处理根据一方面的41种MARC1 GalNAc-asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0043] 图26是在来源于人的原代肝细胞中分别以10nM或100nM的浓度处理根据一方面的17种MARC1 GalNAc-asiRNA后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0044] 图27是在将根据一方面的OLX-031-2或OLX-075-2分别以2.5mpk、5mpk、或10mpk的浓度施用于猴后,确认MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0045] 图28是在将根据一方面的9种MARC1 GalNAc-asiRNA施用于被pSELECT-mSEAP-hMARC1转染的动物模型后,通过SEAP报告荧光水平确认人MARC1 mRNA表达水平的结果。

[0046] 图29是在将根据一方面的10种MARC1 GalNAc-asiRNA施用于被psiCHECK-2-hMARC1转染的动物模型后,通过荧光素酶(Luciferase)报告荧光水平确认人MARC1 mRNA表达水平的结果。

具体实施方式

[0047] 本申请中公开的每个描述和实施方式可以适用于每个其它描述和实施方式。即,本申请中公开的各种要素的任何组合包括在本申请的范畴。此外,不应认为本申请的范围受限于以下的具体描述。

[0048] 一方面提供一种RNAi制剂,其包括:反义链,其对线粒体胺肟基还原组分1(MARC1: Mitochondrial amidoxime reducing component 1)mRNA序列具有序列互补性,并且是长度为19nt至21nt的核苷酸;以及有义链,其对所述反义链具有序列互补性,并且长度为15nt至17nt,其中,所述反义链的5'末端和所述有义链的3'末端形成钝端(blunt end)。

[0049] RNAi制剂

[0050] 在本说明书中,术语“RNAi(RNA interference;RNA干扰)”是指将由具有与靶基因的mRNA同源的序列的链以及具有与其互补的序列的链所组成的双链RNA(dsRNA)引入细胞等而诱导靶基因mRNA的分解,从而抑制靶基因表达的机制。

[0051] 在本说明书中,术语“RNAi制剂(RNAi agents)”或“诱导RNAi的核酸分子(nucleic acid molecules inducing RNAi)”指代通过序列-特异性方式介导所述RNA干扰而抑制或下调基因表达或病毒复制的任一制剂或核酸分子。所述术语可以指代个别核酸分子、复数个所述核酸分子、或所述核酸分子的库(pool)。在一具体实施例中,所述RNAi制剂可以是siRNA。

[0052] 在本说明书中,术语“siRNA(small interfering RNA;小干扰RNA)”是指序列特异性地介导有效的基因沉寂(gene silencing)的短双链RNA(dsRNA)。

[0053] 在本说明书中,术语“基因”应从最广义的层面被考虑,其可以编码结构蛋白或调节蛋白。此时,调节蛋白包括参与到转录因子、热休克蛋白或DNA/RNA复制、转录和/或翻译的蛋白质。在本发明中,成为抑制表达对象的靶基因是病毒基因组固有的基因,其可以被整合到动物基因或以染色体之外的构成要素而存在。

[0054] 在本说明书中,术语“反义链(antisense strand)”是与感兴趣的靶核酸实际互补或100%互补的多个核苷酸,例如其可以与mRNA(信使RNA:messenger RNA)、除mRNA之外的RNA序列(例如,microRNA、piwiRNA、tRNA、rRNA以及hnRNA)或者编码或非编码DNA序列全部或部分互补。

[0055] 在本说明书中,术语“有义链(sense strand)”是具有与靶核酸相同的核酸序列的多核苷酸,是指与mRNA(信使RNA)、除mRNA之外的RNA序列(例如,microRNA、piwiRNA、tRNA、rRNA以及hnRNA)或者编码或非编码DNA序列全部或部分相同的多核苷酸。

[0056] 在本说明书中,术语“互补性(complementarity)”或“互补的(complementary)”指称所属领域普遍接受的含义。所述术语通常指,通过传统的华森-克里克(Watson-Crick)或本说明书中描述的其它非传统类型的结合,一个核酸序列和其它核酸序列之间的氢键的形成或存在。完美的互补性可以指核酸序列的全部相邻残基与第二核酸序列中相同数量的相邻残基氢键合。部分互补性可以包括核酸分子内的各种错配(mismatch)或非碱基对核苷酸(non-based paired nucleotides)(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多的错配,例如1至3个错配、非核苷酸接头(non-nucleotide linker)、或非碱基对核苷酸)。所述部分互补性可能在核酸分子的有义链和反义链之间或者核酸分子的反义链和与其对应的靶核酸分子之间引起隆起(bulges)、圆圈(loops)、突出(overhang),或钝端(blunt end)。

[0057] 在本说明书中,术语“钝端(blunt end)”指代所属领域普遍接受的含义。在本说明书中的RNAi制剂或核酸分子中,所述术语可以指代无突出核苷酸的双链siRNA分子的末端。在本说明书中所述的siRNA分子中,反义链的5'末端以及有义链的3'末端可以形成钝端(blunt end)。

[0058] 用于抑制MARC1表达的RNAi制剂

[0059] “线粒体胺肟基还原组分1(MARC1:Mitochondrial amidoxime reducing component1)是含哺乳动物钼(molybdenum)的酶,其也被称作MTARC1或MOSC1,已知缺乏MARC1酶与低血液胆固醇水平、低血液肝酶水平、减少肝脂肪以及降低肝硬化发病风险有关,因此已知其可作为对肝脏疾病的潜在治疗靶点。所述MARC1蛋白可以理解为包括天然存在的野生型MARC1及其功能性变体,所述MARC1蛋白或编码其的基因序列可以从美国国立卫生研究院GenBank等已知数据库获得。

[0060] 在本说明书中,术语“表达(expression)”指代所属领域普遍接受的含义。所述术语通常可以指基因最终生成蛋白质的过程。所述表达包括但不限于转录、剪接、转录后修饰或翻译。如本文所用,表达水平可以由检测出的mRNA水平或蛋白质水平而确定或监测。

[0061] 在个体中使用的有关MARC1基因表达的术语“抑制”或“减少(降低)”指代,相较于非处理组或正常对照组出现统计学上显著的减少。所述减少可以是例如最少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、60%、65%、70%、70%、80%、85%、90%、95%或更高,但其根据检测或测量方法可以小于或等于检测水平。

[0062] siRNA作为小干扰RNA(small interfering RNA)参与RNAi(RNA interference)作

用。RNAi是1998年首次在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现的一种细胞内基因调控机制,已知其作用机理为引入细胞内的双链RNA中的反义链与靶基因的mRNA互补结合,从而诱导靶基因的分解,其是近年来最受关注的新药研发候选技术。

[0063] 然而,与这种可能性相反,不断有报告指出siRNA的副作用和缺点。若要实现基于RNAi治疗剂的研发,有必要克服以下障碍:1) 缺乏有效的传递系统,2) 脱靶效应,3) 诱导免疫反应,4) 细胞内RNAi机制的饱和等。尽管siRNA是能够直接调节靶基因表达的有效方法,但治疗剂研发因这些问题而面临困难。在这方面,不对称siRNA (asymmetric shorter duplex siRNA, asiRNA) 具有不对称RNAi诱导结构,其具有短于传统siRNA所具有的19+2结构的双链长度。这是一种克服了现有siRNA结构技术中存在的脱靶效应、RNAi机制饱和以及TLR3引起的免疫反应等问题的技术,由此能够研发副作用地的RNAi新药。

[0064] 以此为基础,本实施例提出一种包括有义链以及与所述有义链互补的反义链的不对称siRNA,根据一实施例的siRNA不引起脱靶效应、RNAi机制饱和等问题,因此稳定保持高的传递效率,并且可以按照所需水平有效抑制对MARC1基因的表达。

[0065] 在一实施例中,设计、制作了靶向MARC1的不对称siRNA (asymmetric siRNA: asiRNA),并将所述asiRNA转染 (transfection) 到表达MARC1的细胞后筛选出敲低效率优异的用于诱导RNAi的核酸分子,即MARC1 asiRNA。

[0066] 在一具体实施例中,所述RNAi制剂的特征可以是所述有义链具有15nt至17nt的长度,并且所述反义链具有19nt至21nt的长度。更优选地,其特征可以是所述有义链的长度为16nt,并且与其互补的反义链的长度为19nt、20nt或21nt,但不限于此。

[0067] 所述反义链的5' -末端以及有义链的3' -末端可以形成钝端 (blunt end)。反义链的3'末端可以包括例如2nt至6nt的突出 (overhang)。

[0068] 在一具体实施例中,所述有义链可以是选自表1、表10、表11、表12、表13和表14所列反义链序列中的序列,所述反义链可以包括选自表1、表10、表11、表12、表13和表14所列有义链序列中的序列。

[0069] 在一具体实施例中,所述有义链可以是选自由SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:179、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:257、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:261、SEQ ID NO:273、SEQ ID NO:285、SEQ ID NO:287、SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:353、SEQ ID NO:387、SEQ ID NO:391、SEQ ID NO:399、SEQ ID NO:423、SEQ ID NO:429、SEQ ID NO:431、SEQ ID NO:435、SEQ ID NO:439、SEQ ID NO:443、SEQ ID NO:445、SEQ ID NO:447以及SEQ ID NO:527组成的组中的任一个,例如,可以是选自由SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:423、SEQ ID NO:431、SEQ ID NO:435、SEQ ID NO:439、SEQ ID NO:447、SEQ ID NO:527、以及SEQ ID NO:551组成的组中的任一个。

[0070] 在一具体实施例中,所述反义链可以是例如选自由SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:178、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:258、SEQ ID NO:260、SEQ ID NO:262、SEQ ID NO:274、SEQ ID NO:286、SEQ ID NO:288、SEQ ID NO:332、SEQ ID NO:354、SEQ ID NO:388、SEQ ID NO:392、SEQ ID NO:400、SEQ ID NO:424、SEQ ID NO:430、SEQ ID NO:432、SEQ ID NO:436、SEQ ID NO:440、SEQ ID NO:444、SEQ ID NO:446、SEQ ID NO:448以及

SEQ ID NO:528组成的组中的任一个,例如可以是选自由SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:424、SEQ ID NO:432、SEQ ID NO:436、SEQ ID NO:440、SEQ ID NO:448、SEQ ID NO:528以及SEQ ID NO:552所组成的组中的任一个。

[0071] 引入化学修饰的RNAi制剂

[0072] 在所述RNAi制剂中,所述有义链或反义链可以包括一个或多个化学修饰(chemicalmodification)。

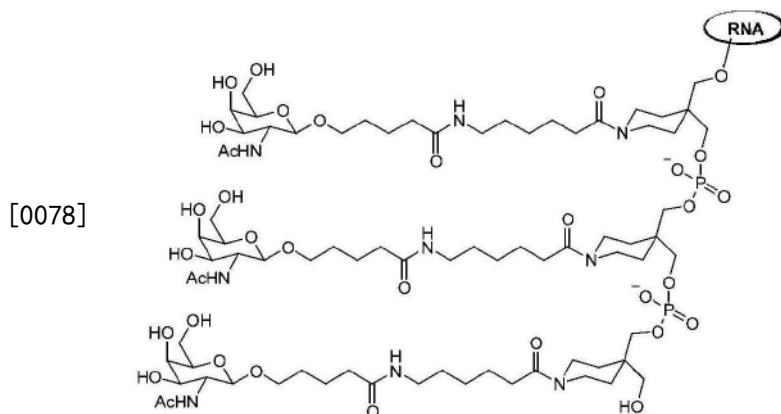
[0073] 一般的siRNA由于磷酸盐骨架结构导致的高负电荷和高分子量等原因而无法穿过细胞膜,并且在血液中被迅速分解和去除,因此难以将足以用于诱导RNAi的量传递至靶位点。目前,在体外(in vitro)传递方面,已研发出许多使用阳离子脂质(cationic lipids)和阳离子聚合物(cationic polymers)的高效的传递方法,而在体内(in vivo)方面,难以以体外相同的高效率传递siRNA,并且因与体内存在的各种蛋白质的相互作用而出现siRNA传递效率降低的问题。

[0074] 对此,本实施例提供一种通过对不对称siRNA结构引入化学修饰而具有提高的肝细胞靶向传递能力(hepatocyte targeted delivery ability)的RNAi制剂,更具体地,提供一种在无需额外载体的情况下有效传递至肝细胞的不对称siRNA结构(GalNAc asymmetric siRNA, GalNAc-asiRNA)。

[0075] 在本发明中,所述有义链或反义链中的化学修饰可以包括选自由以下组成的组中的一种或多种:与N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine; GalNAc)衍生物的结合;核苷酸结合修饰为硫代磷酸酯(phosphorothioate)、硼磷酸酯(boran ophosphate)或膦酸甲酯(methyl phosphonate);在核苷酸内糖结构的2' 碳位置中,-OH基团被-CH₃(甲基)、-OCH₃(甲氧基)、-NH₂、-F、-O-2-甲氧基乙基-0-丙基、-O-2-甲硫基乙基(methylthioethyl)、-O-3-氨基丙基,或-O-3-二甲基氨基丙基所取代;磷酸基团(phosphate group)、E-乙烯基膦酸酯(E-Vinylphosphonate)或细胞穿透肽结合。

[0076] 在一具体实施例中,所述N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物可具有以下化学式1的结构。N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物发挥通过识别肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR:Asialoglycoprotien receptor)帮助RNAi制剂引入至肝细胞内的作用,即充当ASGPR的靶向部分,因此末端结合有所述N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物的RNAi制剂向肝细胞的传递性得到提高,从而能够为肝脏疾病提供有效的靶向治疗。

[0077] **【化学式1】**



[0079] 在一具体实施例中,所述有义链可以包括选自以下的一个或多个化学修饰:与5'

末端相邻的2个至4个核苷酸结合被修饰为硫代磷酸酯、硼磷酸酯或膦酸甲酯；在一个或多个核苷酸内糖结构的2' 碳位置中，-OH基团被-CH₃ (甲基)、-OCH₃ (甲氧基)、-NH₂、-F、-0-2-甲氧基乙基-0-丙基、-0-2-甲硫基乙基、-0-3-氨基丙基，或-0-3-二甲基氨基丙基所取代；以及在3' 末端中与N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 衍生物或细胞穿透肽结合。

[0080] 在一具体实施例中，所述反义链可以包括选自以下的一个或多个化学修饰：与3' 末端或5' 末端相邻的2个至7个核苷酸键被修饰为硫代磷酸酯、硼磷酸酯或膦酸甲酯；在一个或多个核苷酸内糖结构的2' 碳位置中，-OH基团被-CH₃ (甲基)、-OCH₃ (甲氧基)、-NH₂、-F、-0-2-甲氧基乙基-0-丙基、-0-2-甲硫基乙基、-0-3-氨基丙基，或-0-3-二甲基氨基丙基所取代；以及在5' 末端中与磷酸基团、E-乙烯基膦酸酯或细胞穿透肽结合。

[0081] 在另一具体实施例中，所述RNAi制剂可以包括选自由以下组成的组中的一个或多个修饰：在有义链或反义链中，与3' 末端或5' 末端相邻的2个至7个核苷酸键被修饰为硫代磷酸酯；在有义链或反义链中的一个或多个核苷酸内糖结构的2' 碳位置中，-OH基团被-OCH₃ (甲氧基) 或-F所取代的修饰；在有义链的3' 末端与N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 衍生物结合；以及在反义链的5' 末端与磷酸基团或E-乙烯基膦酸酯结合。

[0082] 在一具体实施例中，所述有义链可以具有选自表2、表15、表16和表17所列反义链序列中的序列，所述反义链可以包括选自表2、表15、表16和表17所列有义链序列中的序列。

[0083] 在一具体实施例中，所述有义链是选自由下表的 (A) 至 (O) 组成的组中的任一个，所述反义链可以是选自由表的 (a) 至 (q) 组成的组中的任一个。

[0084]

	序列 (5' -> 3')
(A)	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
(B)	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
(C)	mC*fG*mAfAfAfGmUfUmAfUmAfUmGfGmAfA-GalNAc
(D)	mA*fC*mUfAfCfUmGfAmAfAmAfCmCfUmUfA-GalNAc
(E)	mG*fC*mAfUfAfUmGfUmCfAmGfUmUfGmUfA-GalNAc
(F)	mU*fU*mGfGfGfAmAfGmUfUmGfAmCfUmAfA-GalNAc
(G)	mC*fC*mAfUfUfUmUfGmUfCmCfUmUfUmGfA-GalNAc
(H)	mA*fC*mGfCfAfAmUfGmAfAmAfAmUfUmAfA-GalNAc
(I)	mA*fG*mAfUfCfUmGfAmUfGmAfAmGfUmAfA-GalNAc
(J)	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
(K)	mC*fU*mAfGfAfGmAfAmGfAmAfAmGfUmUfA-GalNAc
(L)	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
(M)	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
(N)	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
(O)	mC*fC*mCfUfGfAmCfUmCfUmCfAmGfUmGfA-GalNAc
(a)	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
(b)	EVP-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
(c)	P-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
(d)	P-mU*fU*mCmCmAmUfAmUfAmAmCmUmUfUmCfGmU*mU*mC*mU*mG
(e)	P-mU*fA*mAmGmGmUfUmUfUmCmAmGmUfAmGfUmC*mU*mA*mU*mC

(f)	P-mU*fA*mCmAmAmCfUmGfAmCmAmUmAfUmGfCmU*mU*mU*mC*mC
(g)	P-mU*fU*mAmGmUmCfAmAfCmUmUmCmCfCmAfAmU*mA*mU*mA*mA
(h)	P-mU*fC*mAmAmAmGfGmAfCmAmAmAmAfUmGfGmC*mA*mA*mU*mA
(i)	P-mU*fU*mAmAmUmUfUmUfCmAmUmUmGfCmGfUmA*mC*mC*mU*mC
(j)	P-mU*fU*mAmCmUmUfCmAfUmCmAmGmAfUmCfUmU*mA*mG*mA*mG
(k)	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
(l)	P-mU*fA*mAmCmUmUfUmCfUmUmCmUmCfUmAfGmC*mC*mU*mG*mG
(m)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
(n)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
(o)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
(p)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
(q)	P-mU*fC*mAmCmUmGfAmGfAmGmUmCmAfGmGfGmU*mG*mU*mC*mA

[0085] 在所述序列中,*指硫代磷酸酯结合 (phosphorothioated bond),m指2'-O-甲基 (Methyl),f指2'-氟 (Fluoro),GalNAc指化学式1的三价GalNAc衍生物,P指5'-磷酸基团 (Phosphate group),EVP指5'-E-乙烯基磷酸酯 (E-Vinylphosphate) 结合。

[0086] 具体地,所述RNAi制剂的有义链和反义链可以是选自上表的以下有义链和反义链的序列。

编号	有义链	反义链
1	(A)	(a) 或 (b)
2	(B)	(c)、(m)、(n)、(o)、或 (p)
3	(C)	(d)
4	(D)	(e)
5	(E)	(f)
6	(F)	(g)
7	(G)	(h)
8	(H)	(i)
9	(I)	(j)
10	(J)	(k)
11	(K)	(l)
12	(L)	(m)、(n)、(o)、或 (p)
13	(M)	(m)、(n)、(o)、或 (p)
14	(N)	(m)、(n)、(o)、或 (p)
15	(O)	(q)

[0088] 另一方面提供一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其包括所述RNAi制剂作为活性成分。

[0089] 另一方面提供一种所述RNAi制剂在制备用于预防或治疗肝脏疾病的药物的用途。

[0090] 所述药物组合物包括或利用上述RNAi制剂,因此省略两者之间的共同内容,以避免说明书过于复杂。

[0091] 肝脏疾病

[0092] 所述药物组合物可以用作通过抑制MARC1基因的表达来预防或治疗肝脏疾病的药物组合物的活性成分。

[0093] 所述肝脏疾病包括脂肪肝、肝纤维化或肝硬化,其中,“脂肪肝”是指正常细胞中不存在的中性脂肪看似在肝细胞内异常沉积的现象。正常肝脏的约5%由脂肪组织组成,中性脂肪、脂肪酸、磷脂、胆固醇、胆固醇酯是脂肪的主要成分,但一旦发生脂肪肝,大部分成分会被中性脂肪所取代,若中性脂肪含量为肝脏重量的5%或更高,则诊断为脂肪肝。所述脂肪肝可以是“非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease;NAFLD)”,“非酒精性脂肪肝”是指中性脂肪与饮酒无关地在肝脏内堆积的疾病,其可以定义为脂肪酸以中性脂肪的形式在肝脏实质细胞内堆积5%或更高的情况。所述非酒精性脂肪肝病可以是单纯性脂肪肝(simple steatosis)或非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis;NASH)。非酒精性脂肪肝病在病理学上分为单纯性脂肪肝(simple steatosis)和伴有炎症的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis;NASH),NASH可以被认为是一种严重形式。脂肪堆积严重的脂肪肝会演变为炎症,即脂肪性肝炎,若长期不治疗会进展成肝炎、肝纤维化、肝硬化等严重的肝脏疾病。单纯性脂肪肝的发病率在正常体重人中为10%至15%,而在体重超重的人中大幅提高至80%,因此为了有效治疗非酒精性脂肪性肝炎,可能重要的是有效降低中性脂肪堆积到肝脏中,并且在抑制非酒精性脂肪肝病演变为脂肪性肝炎的同时改善脂肪性肝炎,从而抑制进展成下一阶段疾病。

[0094] 药物组合物

[0095] 在本说明书中,术语“活性成分(effective ingredient)”是指对临床或生物化学结果带来有利或优选影响的适度有效量的成分。具体地,可以指有效量的制剂、活化剂或RNAi制剂。

[0096] 所述有效量可以施用一次或更多次,并且其可以是用于预防疾病,或者非限制性地对疾病实现症状的缓和、疾病范围的减少、病情稳定(即,不恶化)、疾病进展的延缓或速度的降低,或者病情的改善或一时缓和与减轻(部分或全部)的适度量。

[0097] 在本说明书中,术语“预防(prevention)”是指预先防止疾病发生、抑制疾病或延迟进展的所有行为。例如,指代防止所述肝脏疾病或其特征性的特性发生、阻碍疾病发生,或者针对所述肝脏疾病或其特征性的特性进行防御或保护。

[0098] 在本说明书中,术语“治疗(treatment)”是指治疗学上的治疗和预防或者预防措施方法。此外,指代使疾病症状好转或有利发展的所有行为。例如,预防、减少或改善所述肝脏疾病或其特征性的特性,或者在个体中延迟(弱化)所述肝脏疾病或其特征性的特性。

[0099] 在本说明书中,术语“有效量(effective amount)”指代所属领域普遍接受的含义。上述术语通常可以是指研究人员、兽医、医生或其它临床医生等所寻求的能够诱导细胞、组织、系统、动物或人类的预期的生物反应(例如,有益反应)的分子化合物或构建体的量。具体地,“治疗有效量(therapeutically effective amount)”是指,例如能够引起以下程度的优选医学反应的分子,化合物或构建体的量:在与疾病或障碍相关的可测量参数方面存在治疗相关变化,因而能够认为特定临床治疗有效。用于治疗疾病或障碍的药物的治疗有效量可以是对所述参数引起治疗相关变化所需的量。

[0100] 所述药物组合物的施用方法可由本领域技术人员根据常规患者的症状和患病程度来决定。此外,其可以配制为粉剂、片剂、胶囊剂、溶液剂、注射剂、软膏剂以及糖浆剂等多

种剂型,也能够以单位剂量或多剂量容器的形式提供,例如密封的安瓿和瓶子。

[0101] 本发明的药物组合物可以口服或肠胃外施用。根据本发明的组合物的施用途径可以是例如口腔、静脉内、肌肉内、动脉内、骨髓内、鞘内、心内、经皮、皮下、腹膜内、肠内、舌下或局部,但不限于此。根据本发明的组合物的剂量范围根据患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、施用时间、施用方法、排泄率或疾病的严重程度而变化,并且可由所属领域的技术人员容易地决定。此外,可利用已知技术将本发明的组合物配制成适当的剂型,以用于临床施用。

[0102] 另一方面提供一种预防或治疗肝脏疾病的方法,其包括将所述RNAi制剂施用于个体中。

[0103] 所述治疗肝脏疾病的方法包括或利用上述RNAi制剂或药物组合物,因此省略对两者之间的共同内容进行描述,以避免说明书过于复杂。

[0104] 在本说明书中,术语“个体”是指需要治疗疾病,具体地是需要治疗肝脏疾病的对象,更具体地,其可以包括人或非人灵长类动物、小鼠(mouse)、狗、猫、马、牛、羊、猪、山羊、骆驼以及羚羊等哺乳动物。

[0105] 在下文,通过实施例进一步详细描述本发明。然而,这些实施例仅用于示例性描述本发明,本发明不限于此。

[0106] 实施例1:筛选用于诱导RNAi的核酸分子以及评估其治疗功效

[0107] 1-1.设计50种asiRNA并评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0108] 在本实施例中,为了获得诱导高效率的靶向MARC1的RNAi的双链核酸分子,选定针对MARC1基因的靶序列后设计了对应的MARC1不对称siRNA(asiRNA)(有义链(16-mer)、反义链(19-mer))。具体地,通过检索NCBI数据库(database)获得MARC1基因信息,然后考虑到动物实验,与小鼠具有共同靶点的碱基序列为准选择显示出一定水平同源性的碱基序列,从而设计出共50种asiRNA,并在IDT Korea,Inc.以10nmole scale进行合成。然后,使合成的asiRNA经过95℃下5分钟、37℃下25分钟的孵育(incubation)过程,经过12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide Gel Electrophoresis:PAGE)后通过ChemiDoc UV透照仪(transilluminator)(Biorad)进行质量控制(quality control,QC)。

[0109] 通过上述方法设计的MARC1 asiRNA的序列信息如下表1所示。

[0110] 【表1】

编号	asiRNA名称	序列 (5' → 3')		SEQ NO.
#1	asiMARC1-1	有义链	GCUCUGGAUCUACCCU	1
		反义链	AGGGUAGAUCAGAGCUGC	2
#2	asiMARC1-2	有义链	CAGCUCUGGAUCUACC	3
		反义链	GGUAGAUCAGAGCUGCGC	4
#3	asiMARC1-3	有义链	GCAGCUCUGGAUCUAC	5
		反义链	GUAGAUCAGAGCUGCGCC	6
#4	asiMARC1-4	有义链	GCCAUGGGGUGCGCA	7
		反义链	UGCGCAGCCCAUGGCGGU	8
#5	asiMARC1-5	有义链	GGCCAUGGGGUGCGC	9
		反义链	GCGCAGCCCAUGGCGGUG	10
#6	asiMARC1-6	有义链	CGGCCAUGGGGUGCG	11
		反义链	CGCAGCCCAUGGCGGUGC	12
#7	asiMARC1-7	有义链	ACGGCCAUGGGGUGC	13
		反义链	GCAGCCCAUGGCGGUGCA	14
#8	asiMARC1-8	有义链	CACGGCCAUGGGGUG	15
		反义链	CAGCCCAUGGCGGUGCAC	16
#9	asiMARC1-9	有义链	GGACAGUUUUGGCUU	17
		反义链	AAGCCAAAACUGUCCCGC	18
#10	asiMARC1-10	有义链	GGGACAGUUUUGGCU	19
		反义链	AGCCAAAACUGUCCCGCA	20
#11	asiMARC1-11	有义链	CGGGACAGUUUUGGC	21
		反义链	GCCAAAACUGUCCCGCAG	22
#12	asiMARC1-12	有义链	AGCCUACACAAGGAC	23
		反义链	GUCCUUUGUGUAGGUGCA	24
#13	asiMARC1-13	有义链	GGUGCACUUCGAGCCU	25
		反义链	AGGCUCGAAGUGCACCAGG	26
#14	asiMARC1-14	有义链	CUGGUGCACUUCGAGC	27
		反义链	GCUCGAAGUGCACCAGGCG	28
#15	asiMARC1-15	有义链	CCUGGUGCACUUCGAG	29
		反义链	CUCGAAGUGCACCAGGCGG	30
#16	asiMARC1-16	有义链	GCCUGGUGCACUUCGA	31
		反义链	UCCAAGUGCACCAGGCGGU	32
#17	asiMARC1-17	有义链	CGCCUGGUGCACUUCG	33
		反义链	CGAAGUGCACCAGGCGGUA	34
#18	asiMARC1-18	有义链	CCGCCUGGUGCACUUC	35
		反义链	GAAGUGCACCAGGCGGUAG	36
#19	asiMARC1-19	有义链	ACCGCCUGGUGCACUU	37
		反义链	AAGUGCACCAGGCGGUAGG	38
#20	asiMARC1-20	有义链	UACCGCCUGGUGCACU	39
		反义链	AGUGCACCAGGCGGUAGGG	40
#21	asiMARC1-21	有义链	CUACCGCCUGGUGCAC	41
		反义链	GUGCACCAGGCGGUAGGGC	42
#22	asiMARC1-22	有义链	GACGUGGAACUGAAAA	43
		反义链	UUUCAGUCCACGUCACC	44
#23	asiMARC1-23	有义链	UGACGUGGAACUGAAA	45
		反义链	UUUCAGUCCACGUCACCA	46
#24	asiMARC1-24	有义链	GGAAACACUGAAGAGU	47
		反义链	ACUCUUCAGUGUUCCAGC	48
#25	asiMARC1-25	有义链	UGGAAACACUGAAGAG	49
		反义链	CUCUUCAGUGUUCCAGCG	50
#26	asiMARC1-26	有义链	CUGGAAACACUGAAGA	51
		反义链	UCUUCAGUGUUCCAGCGG	52
#27	asiMARC1-27	有义链	GCUGGAAACACUGAAG	53
		反义链	CUUCAGUGUUCCAGCGGU	54

[0111]

#28	asiMARC1-28	有义链	CGCUGGAAACACUGAA	55
		反义链	UUCAGUGUUUCCAGCGUU	56
#29	asiMARC1-29	有义链	CCGCGGAAACACUGA	57
		反义链	UCAGUGUUUCCAGCGUUC	58
#30	asiMARC1-30	有义链	CGCAGCUCUGGAUCUA	59
		反义链	UAGAUCAGAGCUGCGCCA	60
#31	asiMARC1-31	有义链	GCGCAGCUCUGGAUCU	61
		反义链	AGAUCAGAGCUGCGCCAC	62
#32	asiMARC1-32	有义链	GGCGCAGCUCUGGAUC	63
		反义链	GAUCCAGAGCUGCGCCACU	64
#33	asiMARC1-33	有义链	GCCGGUGAGCGAGGCG	65
		反义链	CGCCUCGCUCACCGGCACC	66
#34	asiMARC1-34	有义链	CCUGGUCCUGAUUCC	67
		反义链	GGAAAUCCAGGACCAGGCGA	68
#35	asiMARC1-35	有义链	GCCUGGUCCUGAUUUC	69
		反义链	GAAAUCAGGACCAGGCGAG	70
#36	asiMARC1-36	有义链	CGCCUGGUCCUGAUUU	71
		反义链	AAAUCAGGACCAGGCGAGG	72
#37	asiMARC1-37	有义链	UGACUCUCAGUGCAGC	73
		反义链	GCUGCACUGAGAGUCAGGG	74
#38	asiMARC1-38	有义链	CUGACUCUCAGUGCAG	75
		反义链	CUGCACUGAGAGUCAGGGU	76
#39	asiMARC1-39	有义链	CCUGACUCUCAGUGCA	77
		反义链	UGCACUGAGAGUCAGGGUG	78
#40	asiMARC1-40	有义链	CCCUGACUCUCAGUGC	79
		反义链	GCACUGAGAGUCAGGGUGU	80
#41	asiMARC1-41	有义链	ACCCUGACUCUCAGUG	81
		反义链	CACUGAGAGUCAGGGUGUC	82
#42	asiMARC1-42	有义链	GCACGCCUGGAGAUUA	83
		反义链	UAUCUCCAGGCCUGGACU	84
#43	asiMARC1-43	有义链	GAUCCUUUCUGAGGCG	85
		反义链	CGCCUCAGAAAGGAUCAAG	86
#44	asiMARC1-44	有义链	UGAUCCUUUCUGAGGC	87
		反义链	GCCUCAGAAAGGAUCAAGA	88
#45	asiMARC1-45	有义链	UCUCAACUCCAGGCUA	89
		反义链	UAGCCUGGAGUUGAGAUC	90
#46	asiMARC1-46	有义链	AUCUCAACUCCAGGCU	91
		反义链	AGCCUGGAGUUGAGAUCG	92
#47	asiMARC1-47	有义链	GGAUCUCAACUCCAGG	93
		反义链	CCUGGAGUUGAGAUCGCGC	94
#48	asiMARC1-48	有义链	CGGAUCUCAACUCCAG	95
		反义链	CUGGAGUUGAGAUCGCGCA	96
#49	asiMARC1-49	有义链	GCGGAUCUCAACUCCA	97
		反义链	UGGAGUUGAGAUCGCGCAG	98
#50	asiMARC1-50	有义链	AGGGUGAUGGCUUGUU	99
		反义链	AACAAGCCAUCACCCUUUU	100

[0112] 然后,为了确认mRNA水平中的表达抑制效率,将所述MARC1 asiRNA转染至Huh7细胞后进行qRT-PCR,从而测量MARC1 mRNA的表达水平。具体地,将所述Huh7细胞以每孔 8×10^3 细胞的量接种至96孔板,在其中添加MARC1 asiRNA(10nM, Olix Inc.)和RNAiMax(2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150)后,按照Invitrogen提供的方案进行了转染。然后,利用RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, 74136)提取总RNA,并通过将其中包含的mRNA作为模板的逆转录过程合成了cDNA。然后,使用TB Green(Takara, RR820A)制备PCR混合物,并按照制造商的说明在StepOne实时PCR系统中进行了定量PCR。此外,在本实施例中,将仅添加了转染

试剂的组 (NT) 作为对照组。

[0114] 结果如图1所示,确认到MARC1 mRNA根据处理50种MARC1 asiRNA的表达抑制效果。

[0115] 1-2.设计23种GalNAc-asiRNA并评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0116] 在本实施例中,针对在上述实施例1中制备的MARC1 asiRNA中的23种MARC1 asiRNA,设计了引入GalNAc配体和化学修饰的不对称siRNA。具体地,通过引入各种化学修饰(2'OMe、PS、Fluoro等)以及将标记为“三价GalNAc”的衍生物结合到所述有义链的3'末端,制备了MARC1 GalNAc-asiRNA。

[0117] 【表2】

GalNAc-asiRNA 名称	序列 (5' → 3')	
OLX-001-1	有义链	mG*fC*mUfCfUfGmGfAmUfCmUfAmCfCmCfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fG*mGmGmUfAmGfAfUmCmCmAmGfAmG*fC*mU*mG*mC
OLX-002-1	有义链	mC*fA*mGfCfUfCmUfGmGfAmUfCmUfAmCfC-GalNAc
	反义链	P-mG*fG*mUmAmGfAmUfCfCmAmGmAmGfCmU*fG*mC*mG*mC
OLX-003-1	有义链	mG*fC*mAfGfCfUfCmUfGmGfAmUfCfUmAfC-GalNAc
	反义链	P-mG*fU*mAmGmAfUmCfCfAmGmAmGmCfUmG*fC*mG*mC*mC
OLX-009-1	有义链	mG*fG*mAfCfAfGmGfUmUfUmUfGmGfCmUfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fA*mGmCmCfAmAfAfAmCmUmGfUmC*fC*mC*mG*mC
OLX-010-1	有义链	mG*fG*mGfAfCfAmGfGmUfUmUfUmUfGmCfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fG*mCmCmAfAmAfAfCmCmUmGmUfCmC*fC*mG*mC*mA
OLX-016-1	有义链	mG*fC*mCfUfGfGmUfGmCfAmCfUmUfCmGfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fC*mGmAmAfGmUfGfCmAmCmCmAfGmG*fC*mG*mG*mU
OLX-019-1	有义链	mA*fC*mCfGfCfCmUfGmGfUmGfCmAfCmUfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fA*mGmUmGfCmAfCfCmAmGmGmCfGmG*fU*mA*mG*mG
OLX-022-1	有义链	mG*fA*mCfGfUfGmGfAmAfCmUfGmAfAmAfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fU*mUmUmCfAmGfUfUmCmCmAmCfGmU*fC*mA*mC*mC
OLX-023-1	有义链	mU*fG*mAfCfGfUmGfGmAfAmCfUmGfAmAfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fU*mUmCmAfGmUfUfCmCmAmCmGfUmC*fA*mC*mC*mA
OLX-024-1	有义链	mG*fG*mAfAfAfCmAfCmUfGmAfAmGfAmGfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fC*mUmCmUfUmCfAfGmUmGmUmUfUmC*fC*mA*mG*mC
OLX-027-1	有义链	mG*fC*mUfGfGfAmAfAmCfAmCfUmGfAmAfG-GalNAc
	反义链	P-mC*fU*mUmCmAfGmUfGfUmUmUmCmCfAmG*fC*mG*mG*mU
OLX-029-1	有义链	mC*fC*mGfCfUfGmGfAmAfAmCfAmCfUmGfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fC*mAmGmUfGmUfUfUmCmCmAmGfCmG*fG*mU*mU*mC
OLX-030-4	有义链	mC*fG*mCfAmGfCmUfCmUfGmGmAmUfCmUfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fA*mGfAmUfCmCfAmGfAmGfCmUfGmC*fG*mC*fC*mA
OLX-030-5	有义链	mC*fG*mCfAfGfCmUfCmUfGmGfAmUfCmUfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fA*mGmAmUfCmCfAfGmAmGmCmUfGmC*fG*mC*mC*mA
OLX-031-1	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-037-1	有义链	mU*fG*mAfCfUfCmUfCmAfGmUfGmCfAmGfC-GalNAc
	反义链	P-mG*fC*mUmGmCfAmCfUfGmAmGmAmGfUmC*fA*mG*mG*mG
OLX-038-1	有义链	mC*fU*mGfAfCfUfCmUfCmAfGmUfGmCfAmGfA-GalNAc
	反义链	P-mC*fU*mGmCmAfCmUfGfAmGmAmGmUfCmA*fG*mG*mG*mU
OLX-039-1	有义链	mC*fC*mUfGfAfCmUfCmUfCmAfGmUfGmCfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fG*mCmAmCfUmGfAfGmAmGmUmCfAmG*fG*mG*mU*mG
OLX-045-2	有义链	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAmGmGfCmUfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fA*mGfCmCfUmGfGmAfGmUfUmGfAmG*fA*mU*fC*mC
OLX-045-5	有义链	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAfGmGfCmUfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fA*mGmCmCfUmGfGfAmGmUmUmGfAmG*fA*mU*mC*mC
OLX-047-1	有义链	mG*fG*mAfUfCfUmCfAmAfCmUfCmCfAmGfG-GalNAc
	反义链	P-mC*fC*mUmGmGfAmGfUfUmGmAmGmAfUmC*fC*mG*mC*mC
OLX-048-1	有义链	mC*fG*mGfAfUfCmUfCmAfAmCfUmCfCmAfG-GalNAc
	反义链	P-mC*fU*mGmGmAfGmUfUfGmAmGmAmUfCmC*fG*mC*mC*mA
OLX-049-1	有义链	mG*fC*mGfGfAfUmCfUmCfAmAfCmUfCmCfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fG*mGmAmGfUmUfGfAmGmAmUmCfCmG*fC*mC*mA*mG

[0118]

[0119] 具体地,上述表2中由“*”、“m”、“f”、“P”以及“GalNAc”表示的化学修饰如上述表3所示。

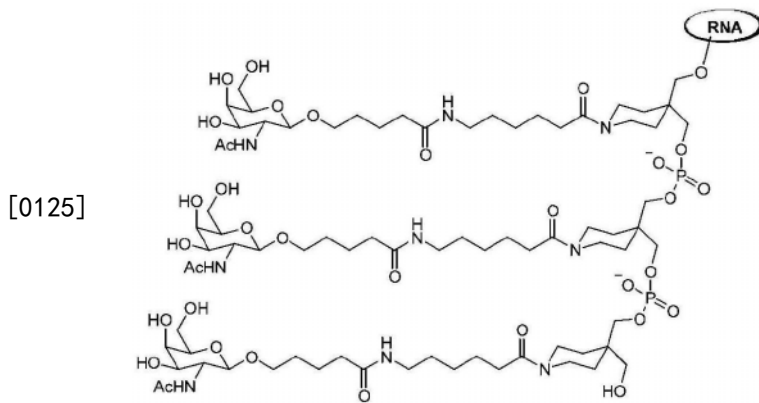
[0120] 【表3】

标记法	化学修饰
*	硫代磷酸酯键 (phosphorothioate bond)
m	2' O甲基 (Methyl)
f	2' -氟 (Fluoro)
P	5' -磷酸基团 (Phosphate group)
“GalNAc”	化学式1的三价GalNAc衍生物

[0122] 具体地,在上述表3中,“*”是指现有的磷酸二酯结合被硫代磷酸酯结合取代,“m”是指现有的2' -OH被2' -O-甲基所取代的形式。另外,“f”例如以fG为例是指现有G(鸟嘌呤)的2' -OH被氟锁取代的形式,“P”是指磷酸基团结合到5' 末端的形式(磷酸基团与结合到5' 末端碱基中碳5的氧结合)。此外,“GalNAc”是指在有义链的3' 末端结合有以下化学式1中三价GalNAc衍生物的形式。

[0123] 此外,所述三价GalNAc衍生物的结构如以下化学式1所示。

[0124] 【化学式1】



[0126] 为了确认mRNA水平中的表达抑制效率,将所述MARC1 GalNAc-asiRNA转染至来源于C57BL/6小鼠的原代肝细胞中,然后通过进行qRT-PCR测量了MARC1 mRNA的表达水平。具体地,将所述原代肝细胞以每孔 7.5×10^4 细胞的量接种至24孔板,在此用MARC1 GalNAc-asiRNA (200nM, OliX US, Inc.) 对其进行了处理。从所述处理起24小时后,使用SuperPrep™ Cell lysis&RT kit for qPCR Kit II (TOYOBO, SCQ-401) 制备细胞裂解物 (cell lysate), 并通过将其中包含的mRNA作为模板的逆转录过程合成了cDNA。然后,以合成的cDNA为模板,使用THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (TOYOBO, QPS-101) 和Probe (Hs00224227_m1、Hs03928985_g1, Applied Biosystems) 进行了定量PCR。然后,利用CFX Connect实时PCR系统 (Bio-Rad) 确认了MARC1 mRNA的表达水平。此外,在本实施例中,将未进行转染的组 (NT) 作为对照组,将添加OLX700A-001-8 (10nM) 和RNAiMAX (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150) 后按照Invitrogen提供的方案进行转染的组 (NC) 作为阴性对照组,并将添加asiMARC1-30 (10nM) 和RNAiMAX (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150) 后按照Invitrogen提供的方案进行转染的组作为阳性对照组 (PC)。所述OLX700A-001-8的序列讯息如表4所示,表2中由“*”、“m”、“f”、“P”以及“GalNAc”表示的化学修饰如上述表3所示。

[0127] 【表4】

名称	序列 (5' → 3')	
	OLX700A-001-8	有义链
	反义链	P-mU*fC*mCfAmUfCmAfAmCfAmUmAmCfUmG*fC*mU*fU*mC

[0129] 结果如图2所示,确认到MARC1 mRNA根据处理23种MARC1 GalNAc-asiRNA的表达抑制效果。其中,OLX-002-1、OLX003-1、OLX-031-1的表达抑制效果更为优异。

[0130] 1-3. 利用动物模型评估治疗功效

[0131] 在本实施例中,针对C57BL/6小鼠(雄性,n=15)施用了所述通过实施例1-2确认表达抑制效果的MARC1 GalNAc-asiRNA后评估了由此引起的治疗功效。为此,首先将动物模型组分为被提供正常饮食的组(Normal Chow)和被提供高脂肪饮食的组(HFD,High Fat Diet (Research Diet,D12492)),并根据施用的物质将上述组分别分类为施用1X PBS的组(VC)、施用OLX-001-8的组(NC)、皮下施用OLX-003-1的组(#3-1)、以及皮下施用OLX-003-1的组(#31-1)。在本实施例中,对上述动物模型组的具体分类如下表5所示。

[0132] 【表5】

组	剂量	治疗		次数
		正常饮食	VC	
1	0	正常饮食	VC	3
2	0	HFD	VC	4
3	9 mpk		NC	2
4	9 mpk		OLX-003-1	2
5	9 mpk		OLX-031-1	2

[0134] 此外,在被提供高脂肪饮食起第16周时施用了MARC1 GalNAc-asiRNA,从所述施用时间点起2周后再次施用了MARC1 asiRNA。在进行上述第2次施用起2周后,从目标小鼠中取出肝脏,由此获得了肝组织试样及其切片。

[0135] (1) 确认MARC1和MARC2的表达模式

[0136] 针对所述通过小鼠获得的肝组织试样,与上述实施例1-2相同的方式评估了MARC1 mRNA和MARC2 mRNA的表达水平。

[0137] 结果如图3所示,确认到相较于被提供高脂肪饮食的其它组(VC、NC),施用了根据一实施例的OLX-003-1或OLX-031-1的组(#3-1、#31-1)对MARC1 mRNA表现出表达抑制,而对MARC2 mRNA的表达并未带来影响。

[0138] (2) 评估肝脏外观

[0139] 肉眼观察所述通过小鼠获得的肝脏,从而评估肝脏边缘区域的变化。

[0140] 结果如图4所示,确认到被提供高脂肪饮食的组(VC、NC)在肝脏的边缘,即边缘区域并不尖锐,与此相反,施用了根据一实施例的OLX-003-1或OLX-031-1的组(#3-1、#31-1)表现出与正常组相似的形态特性。

[0141] (3) 组织病理学上的评估

[0142] 用10%中性缓冲福尔马林(NBF:Neutral Buffered Formalin)溶液固定所述通过小鼠获得的肝组织试样并制备石蜡包埋块后,由此制备出厚度为4μm的组织切片。然后,针对上述组织切片,利用Mayer苏木精试剂进行了H&E染色。此外,针对已获得的4μm厚度的冷冻切片,利用OCT包埋剂进行了油红O染色。

[0143] 结果如图5和图6所示,在被提供高脂肪饮食的组(VC、NC)观察到肝实质中形成的多个脂肪液泡,而在施用了根据一实施例的OLX-003-1或OLX-031-1的组(#3-1、#31-1)中,

脂肪液泡的形成显着降低。

[0144] 实施例2. 利用动物模型评估治疗功效

[0145] 在本实施例中, 针对C57BL/6小鼠, 以所述通过实施例1确认表达抑制效果的asiMARC1-031为模板, 皮下施用下表6的MARC1 GalNAc-asiRNA后评估了由此引起的治疗功效。

[0146] 【表6】

GalNAc-asiRNA名称		序列 (5' → 3')
[0147] OLX-031-1	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	反义链	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-2	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	反义链	EVP-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC

[0148] 具体地, 上述表6中由“*”、“m”、“f”、“P”、“GalNAc”以及“EVP”表示的化学修饰如上述表7所示。

[0149] 【表7】

标记法	化学修饰
*	硫代磷酸酯键 (phosphorothioatebond)
m	2' -O-甲基 (Methyl)
f	2' -氟 (Fluoro)
P	5' -磷酸基团 (Phosphategroup)
“GalNAc”	化学式1的三价GalNAc衍生物
EVP	E-乙烯基膦酸酯 (E-Vinylphosphonate)

[0151] 具体地, 上述表7中的“*”、“m”、“f”、“P”、“GalNAc”如上所述。此外, “EVP”是指5' -末端结合有(E) 乙烯基膦酸酯的形式 (形成在5' 末端碱基中包括碳5的双键), 例如EVP-mU是指从原本的U (尿苷) 的2' -OH被2' -O-甲基取代的形式变为在5' -末端结合(E) 乙烯基膦酸酯的形式。

[0152] 2-1. 评估OLX-031-1在诱导NASH小鼠模型HFD中的治疗功效

[0153] 将动物模型组分为被提供正常饮食的组 (Normal Chow) 和被提供高脂肪饮食的组 (HFD), 并且根据施用的物质, 将上述组分类为施用1X PBS的组 (VC)、施用OLX700A-001-8的组 (NC) 以及施用OLX-031-1的组 (#31-1)。在本实施例中, 对上述动物模型组的具体分类如下表8所示。

[0154] 【表8】

组	剂量	治疗		次数
[0155] 1	0	正常饮食	VC	1
2	0	HFD	VC	3
3	10 mpk		NC	4
4	10 mpk		OLX-031-1	5

[0156] 此外, 在被提供高脂肪饮食起第28周时施用了OLX-031-1, 从所述施用时间点起每周施用OLX-031-1, 共三次。在进行共4次施用起1周后, 从目标小鼠中取出肝脏, 由此获得了肝组织试样及其切片与血清试样。

[0157] (1) 确认MARC1和MARC2的表达模式

[0158] 针对所述通过小鼠获得的肝组织试样, 以与上述实施例1-2相同的方式评估了MARC1 mRNA和MARC2 mRNA的表达水平。

[0159] 结果如图7所示,与被提供高脂肪饮食的其它组(VC、NC)相比,施用了根据一实施例的OLX-031-1的组(#31-1)表现出对MARC1 mRNA的表达抑制,而对MARC2 mRNA的表达未产生影响。

[0160] (2) 评估肝脏外观

[0161] 肉眼观察所述通过小鼠获得的肝脏,从而评估肝脏边缘区域的变化。

[0162] 结果如图8所示,确认到被提供高脂肪饮食的组(HFD VC、HFD NC)在肝脏的边缘,即边缘区域并不尖锐,与此相反,施用了根据一实施例的OLX-31-1的组(#31-1)表现出与正常组相似的形态特性。

[0163] (3) 组织病理学上的评估

[0164] 用10%NBF溶液固定所述通过小鼠获得的肝组织试样并制备石蜡包埋块后,由此制备出厚度为4 μ m的组织切片。然后,针对上述组织切片,利用Mayer苏木精试剂进行了H&E染色和天狼猩红染色。

[0165] 结果如图9和图10所示,在被提供高脂肪饮食的组(VC、NC)观察到肝实质中形成的多个脂肪液泡和胶原蛋白的沉积,而在施用了根据一实施例的OLX-031-1的组(#31-1)中,这种脂肪液泡的形成以及胶原蛋白的沉积显着降低。

[0166] (4) 评估肝组织内纤维化相关因子的表达和中性脂肪水平

[0167] 针对所述通过小鼠获得的肝组织试样,评估了肝纤维化相关因子的表达水平和中性脂肪水平。具体地,针对来源于肝组织的细胞使用Tri-RNA reagent (FAVORGEN、FATRR 001)提取总RNA,并通过以此为模板的逆转录过程合成了cDNA(High-Capacity cDNA反转录试剂盒(Applied Biosystems,4368814))。然后,以上述合成的cDNA为模板,使用TBGreen® Premix Ex Taq™(Takara,RR420A)进行了定量PCR。然后,通过适用StepOne™实时PCR系统(Applied Biosystems™)和作为持家基因的RPL32的表达水平,评估了 α -SMA和mColl1 α 1mRNA的表达水平。此外,利用匀浆机以5% NP-40/UPW对肝组织试样进行均化。然后,针对上述被均化的试样,使用甘油三酯检测试剂盒(Triglyceride Assay Kit)(Abcam,ab65336)测量了中性脂肪水平。

[0168] 结果如图11所示,在被提供高脂肪饮食的组(VC、NC)中,作为肝纤维化相关的因子的 α -SMA mRNA的表达水平增加,而在施用了根据一实施例的OLX-031-1的组(#31-1)中,这种 α -SMA和mColl1 α 1mRNA的表达增加却下降。此外,如图12所示,确认到肝组织内中性脂肪的水平也因施用根据一实施例的OLX-031-1而下降。

[0169] (5) 血清学上的评估

[0170] 针对所述通过小鼠获得的血清试样,确认了作为肝损伤指标因子的AST(Aspartate aminotransferase)和ALT(Alanine aminotransferase),以及作为脂质指标物质的胆固醇(CHOL)、中性脂肪(TG)、低密度脂蛋白(LDL)以及高密度脂蛋白(HDL)的水平。

[0171] 结果如图13所示,在提供高脂肪饮食的组(VC、NC)中,AST和ALT水平显着提高,而在施用了根据一实施例的OLX-031-1的组(#31-1)中,这种AST和ALT水平的提高却降低。此外,如图14所示,确认到脂质指标物质的水平也在施用了根据一实施例的OLX-031-1的组(#31-1)中下降。

[0172] 2-2. 评估OLX-031-2在诱导NASH小鼠模型CDHFD中的治疗功效根据饮食类型和提供时间,将动物模型分为12周内被提供正常饮食的组(NCD 12w)、16周内被提供正常饮食的

组 (NCD 16w)、12周内被提供高脂肪饮食的组 (CDHFD 12w)、16周内被提供高脂肪饮食的组 (CDHFD 16w)、12周内被提供高脂肪饮食且4周内被提供正常饮食的组 (CDHFD-NCD),并根据施用的物质,重新将上述组分别分类为施用了1X PBS的组 (VC) 和施用了OLX-031-2的组 (#31-2)。在本实施例中,对上述动物模型组的具体分类如下表9所示。

[0173] 【表9】

组	剂量	Treatment	次数	
1	0	12周正常饮食 (NCD12W)	VC	3
2	0	16周正常饮食 (NCD16W)	VC	5
3	0	12周高脂肪饮食 (CDHFD12W)	VC	3
4	0	16周高脂肪饮食 (CDHFD16W)	VC	3
5	0	12周高脂肪饮食、4周正常饮食 (CDHFD-NCD)	VC	4
6	10 mpk	16周高脂肪饮食 (CDHFD16W)	OLX-031-2	4
7	10 mpk	12周高脂肪饮食、4周正常饮食 (CDHFD-NCD)	OLX-031-2	4

[0175] 此外,在被提供高脂肪饮食起第12周时施用了OLX-031-2,并且从所述施用时间点起2周后再次施用了OLX-031-2。在进行上述第2次施用起2周后,从目标小鼠中取出肝脏,由此获得了肝组织试样及其切片。此外,针对所述动物模型组1和3,在被提供高脂肪饮食起第12周时牺牲小鼠后获得了上述试样。

[0176] (1) 组织病理学上的评估

[0177] 以与上述实施例2-1的(3)相同的方式,对组织切片进行了H&E染色和天狼猩红染色,从而确认了肝实质中形成的多个脂肪液泡和胶原蛋白的沉积等变化。

[0178] 结果如图15所示,在被提供高脂肪饮食的组 (CDHFD 12w, CDHFD 16w) 观察到肝实质中的多个脂肪液泡和炎症病灶 (inflammatory foci),而在施用了根据一实施例的OLX-031-2的组 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2) 中,这种脂肪液泡和炎症病灶却减少。此外,如图16和图17所示,确认到在施用了根据一实施例的OLX-031-2的组 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2) 中,脂质成分和胶原蛋白的沉积显著降低。特别地,施用了OLX-031-2的组6 (CDHFD 16w 31-2) 与被提供高脂肪饮食的组3、组4 (CDHFD 12w、CDHFD 16w) 相比,脂肪液泡和胶原蛋白的沉积水平降低,这表示对非酒精性脂肪性肝炎的有效治疗功效。

[0179] (2) 评估肝组织内纤维化相关因子的表达

[0180] 以与上述实施例2-1的(4)相同的方式,评估了肝纤维化相关因子的表达水平。

[0181] 结果如图18所示,在被提供高脂肪饮食的组 (CDHFD、CDHFD-NCD) 中,作为肝纤维化相关因子的 α -SMA、mCol1 α 1和TIMP1 mRNA的表达水平提高,而在施用了根据一实施例的OLX-031-2的组 (CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2) 中,这种 α -SMA、Col1 α 1和TIMP1 mRNA的表达水平却降低。这与上述试验结果同样地表现出施用了OLX-031-2的组6 (31-2CDHFD) 与被提供高脂肪饮食的组3、组4 (CDHFD 12w, CDHFD 16w) 的显著差异。

[0182] (3) 评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0183] 针对所述通过小鼠获得的肝组织试样,以与上述实施例1-2相同的方式评估了MARC1 mRNA的表达水平。

[0184] 结果如图19所示,确认到在施用了根据一实施例的OLX-031-2的组 (#CDHFD 031-2、CDHFD-NCD 031-2) 中,MARC1 mRNA的表达水平显著低于其它组。

[0185] 实施例3:用于诱导RNAi的双链核酸分子的二次筛选

[0186] 3-1. 设计和制作250种asiRNA

[0187] 在本实施例中,以与上述1-2相同的方式通过NCBI数据库检索获得MARC1基因信息

后,针对来源于人和猴的每个MARC1,选出以具有共同靶点的碱基序列为准表现出一定水平同源性的碱基序列,从而设计共250种asiRNA(有义链(16-mer)、反义链(21-mer)),并在bioneer将其以10nmole scale进行了合成。通过上述方法设计的MARC1 asiRNA的序列信息如下表10至表14所示。

[0188] 【表10】

asiRNA名称	序列 (5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-51	有义链	GAGGGAAACAUGGUUA	101
	反义链	UAACCAUGUUUCCUCCUGGU	102
asiMARC1-52	有义链	GGAGGGAAACAUGGUA	103
	反义链	UACCAUGUUUCCUCCUGGUU	104
asiMARC1-53	有义链	ACCAGGAGGGAAACAA	105
	反义链	UUGUUUCCUCCUGGUUGAUC	106
asiMARC1-54	有义链	UCAACCAGGAGGGAAA	107
	反义链	UUUCCUCCUGGUUGAUCACA	108
asiMARC1-55	有义链	GGCUUGUGAUCAACCA	109
	反义链	UGGUUGAUCACAAGCCAAAAC	110
asiMARC1-56	有义链	GUCCUGAUUCCUGA	111
	反义链	UCAGGGAAAUACAGGACCAGGC	112
asiMARC1-57	有义链	CUCGCCUGGUCCUGAA	113
	反义链	UUCAGGACCAGGCGAGGUCC	114
asiMARC1-58	有义链	CCUGCCUGGUCCUGA	115
	反义链	UCAGGACCAGGCGAGGUCCU	116
asiMARC1-59	有义链	GACACCCUGACUCUCA	117
	反义链	UGAGAGUCAGGGUGUCACCAU	118
asiMARC1-60	有义链	UGGUGACACCCUGACA	119
	反义链	UGUCAGGGUGUCACCAUCGCA	120
asiMARC1-61	有义链	GCGAUGGUGACACCCA	121
	反义链	UGGGUGUCACCAUCGAGGUC	122
asiMARC1-62	有义链	CCACCACAAUUCGAGA	123
	反义链	UCUGCAUUGUGUGGGCGUU	124
asiMARC1-63	有义链	GCCACCACAAUUGCA	125
	反义链	UGCAUUGUGUGGGCGUUU	126
asiMARC1-64	有义链	AACGCCACCACAAAA	127
	反义链	UUUUUGUGUGGGCGUUUGAU	128
asiMARC1-65	有义链	UGCACAAGUCAGAGA	129
	反义链	UCUCUGCACUUGGCACUGCA	130
asiMARC1-66	有义链	GCUUCCUGAAGUCACA	131
	反义链	UGUGACUUCAGGAAGCUGGUU	132
asiMARC1-67	有义链	CAGCUUCCUGAAGUCA	133
	反义链	UGACUUCAGGAAGCUGGUU	134
asiMARC1-68	有义链	ACCAGCUUCCUGAAGA	135
	反义链	UCUUCAGGAAGCUGGUUAUCC	136
asiMARC1-69	有义链	GCCAGUGGAUAACCA	137
	反义链	UGGUUAUCCACUGGGCGGUGG	138
asiMARC1-70	有义链	ACCGCCAGUGGAUAA	139
	反义链	UUAUCCACUGGGCGGUGCCU	140
asiMARC1-71	有义链	CACUUCGAGCCUCACA	141
	反义链	UGUGAGGCUCGAAGUCACCA	142
asiMARC1-72	有义链	UGCACUUCGAGCCUCA	143
	反义链	UGAGGCUCGAAGUCACACAGG	144
asiMARC1-73	有义链	GACACCAGCCAUUCA	145
	反义链	UGAAUGGGCUGGUGUCAGAGU	146
asiMARC1-74	有义链	CAGACACCAGCCAUUA	147
	反义链	UAUGGGCUGGUGUCUGAGUAA	148
asiMARC1-75	有义链	CCAGAUUGCUUACUCA	149
	反义链	UGAGUAAGCAAUCUGGUCCUU	150
asiMARC1-76	有义链	GACCAGAUUGCUUACA	151
	反义链	UGUAAGCAAUCUGGUCCUUGG	152
asiMARC1-77	有义链	AGGACCAGAUUGCUUA	153
	反义链	UAAGCAAUCUGGUCCUUGGGU	154
asiMARC1-78	有义链	ACCCAAGGACCAGAUUA	155
	反义链	UAUCUGGUCCUUGGUCGGAA	156

[0189]

[0190]

asiMARC1-79	有义链	GACCCAAGGACCAGAA	157
	反义链	UUCUGGUCUUGGGUCGGAAC	158
asiMARC1-80	有义链	GCGAUGUCUAUGCAGA	159
	反义链	UCUGCAUAGACAUCGCAUCCU	160
asiMARC1-81	有义链	AGGAUGCGAUGUCUAA	161
	反义链	UUAGACAUCGCAUCCUGAAAU	162
asiMARC1-82	有义链	CAGGAUGCGAUGUCUA	163
	反义链	UAGACAUCGCAUCCUGAAAUU	164
asiMARC1-83	有义链	CCCAAUAUUGUAAUUA	165
	反义链	UAAUUAACAUAUUGGGCCUGA	166
asiMARC1-84	有义链	GCCCAAUAUUGUAAUA	167
	反义链	UAUUAACAUAUUGGGCCUGAA	168
asiMARC1-85	有义链	GGCCCAAUAUUGUAAA	169
	反义链	UUUACAUAUUGGGCCUGAAG	170
asiMARC1-86	有义链	ACUUCAGGCCCAAUA	171
	反义链	UUUUGGGCCUGAAGUUGGUU	172
asiMARC1-87	有义链	AACUUCAGGCCCAAUA	173
	反义链	UAUUGGGCCUGAAGUUGGUUG	174
asiMARC1-88	有义链	CAACUUCAGGCCCAA	175
	反义链	UUUGGGCCUGAAGUUGGUUC	176
asiMARC1-89	有义链	CCAACUUCAGGCCCAA	177
	反义链	UUGGGCCUGAAGUUGGUUCU	178
asiMARC1-90	有义链	AGAGAAGAAAGUAAA	179
	反义链	UUUAACUUUCUUCUAGCCU	180
asiMARC1-91	有义链	UAGAGAAGAAAGUAAA	181
	反义链	UUAAACUUUCUUCUAGCCUG	182
asiMARC1-92	有义链	CUAGAGAAGAAAGUUA	183
	反义链	UAACUUUCUUCUAGCCUGG	184
asiMARC1-93	有义链	CUGGCGGAUCUCAACA	185
	反义链	UGUUGAGAUCGCCAGCGACG	186
asiMARC1-94	有义链	AGCUUCUUAUUGGUGA	187
	反义链	UCACCAAUAAGAAGCUAUCC	188
asiMARC1-95	有义链	GCAUUUUAACCACAGA	189
	反义链	UCUGGGUUAUUAUGCAUCUG	190
asiMARC1-96	有义链	UCCAGAUGCAUUUUA	191
	反义链	UUAAAUGCAUCUGGAACAAG	192
asiMARC1-97	有义链	UCCAGAUGCAUUUUA	193
	反义链	UAAAUGCAUCUGGAACAAGC	194
asiMARC1-98	有义链	GUCCAGAUGCAUUUA	195
	反义链	UAAAUGCAUCUGGAACAAGCC	196
asiMARC1-99	有义链	UGUCCAGAUGCAUUA	197
	反义链	UAAUGCAUCUGGAACAAGCCA	198
asiMARC1-100	有义链	UUGUCCAGAUGCAUA	199
	反义链	UAUGCAUCUGGAACAAGCCAU	200

[0191] 【表11】

asiRNA名称	序列 (5' →3')		SEQ NO.
asiMARC1-101	有义链	GUGUCAUGAGCAGGAA	201
	反义链	UUCCUGCUCAUGACACCGGUG	202
asiMARC1-102	有义链	CUGCUGGGCCAGUAAA	203
	反义链	UUUACUGGCCACAGAGUACA	204
asiMARC1-103	有义链	CCUGCUGGGCCAGUAA	205
	反义链	UUACUGGCCACAGAGUACAC	206
asiMARC1-104	有义链	CCCAGGGACCAUCAA	207
	反义链	UUUGAUGGUCCUGGGUUUUC	208
asiMARC1-105	有义链	ACCCAGGGACCAUCAA	209
	反义链	UUGAUGGUCCUGGGUUUUC	210
asiMARC1-106	有义链	GGCAGUAUUUUGUGCA	211
	反义链	UGCACAAAUAUCUGCCCAAAG	212
asiMARC1-107	有义链	CUUUGGGCAGUAUUUA	213
	反义链	UAAAUAUCGCCCAAAGAGUGG	214
asiMARC1-108	有义链	UCUUUGGGCAGUAUUUA	215
	反义链	UAAUAUCGCCCAAAGAGUGGU	216
asiMARC1-109	有义链	CUCUUUGGGCAGUAUA	217
	反义链	UAUAUCGCCCAAAGAGUGGUG	218
asiMARC1-110	有义链	ACUCUUUGGGCAGUAA	219
	反义链	UUACUGCCCAAAGAGUGGUGA	220
asiMARC1-111	有义链	CACUCUUUGGGCAGUA	221
	反义链	UACUGCCCAAAGAGUGGUGAU	222
asiMARC1-112	有义链	CCACUCUUUGGGCAGA	223
	反义链	UCUGCCCAAAGAGUGGUGAUU	224
asiMARC1-113	有义链	GGAAAUCACCACUCA	225
	反义链	UGAGUGGUGAUUUCCAUAUA	226
asiMARC1-114	有义链	CGAAAGUUAUUGGAA	227
	反义链	UUCCAUAUAACUUUCGUUCUG	228
asiMARC1-115	有义链	CAGAACGAAAGUUUA	229
	反义链	UAUAACUUUCGUUCUGAAGGG	230
asiMARC1-116	有义链	UCAGAACGAAAGUUA	231
	反义链	UUAACUUUCGUUCUGAAGGGU	232
asiMARC1-117	有义链	UUCAGAACGAAAGUUA	233
	反义链	UAACUUUCGUUCUGAAGGGUC	234
asiMARC1-118	有义链	CCUUCAGAACGAAAGA	235
	反义链	UCUUUCGUUCUGAAGGGUCAC	236
asiMARC1-119	有义链	ACCCUUCAGAACGAAA	237
	反义链	UUUCGUUCUGAAGGGUCACAC	238
asiMARC1-120	有义链	GACCCUUCAGAACGAA	239
	反义链	UUCGUUCUGAAGGGUCACACU	240
asiMARC1-121	有义链	GGAAACCGUGGAAACA	241
	反义链	UGUUCCAGCGGUCCUCCU	242
asiMARC1-122	有义链	UCCUGGAAUAUUAGAA	243
	反义链	UUCUAAUAUCCAGGACAUAC	244
asiMARC1-123	有义链	GUCCUGGAAUAUUAGA	245
	反义链	UCUAAUAUCCAGGACAUACG	246
asiMARC1-124	有义链	AUGUCCUGGAAUAUUUA	247
	反义链	UAAUAUCCAGGACAUACGGU	248
asiMARC1-125	有义链	GUUUGUCCUGGAAUUA	249
	反义链	UUUUAUCCAGGACAUACGGUUC	250
asiMARC1-126	有义链	CGUAUGUCCUGGAAUA	251
	反义链	UAUUCAGGACAUACGGUUC	252
asiMARC1-127	有义链	CCGUAUGUCCUGGAAA	253
	反义链	UUUCAGGACAUACGGUUC	254

[0192]

[0193]

asiMARC1-128	有义链	ACCGUAUGUCCUGGAA	255
	反义链	UCCAGGACAUACGGUCCCA	256
asiMARC1-129	有义链	CAGAACUGAGACCUCA	257
	反义链	UGAGGUCUCAGUUCUGAAACA	258
asiMARC1-130	有义链	GGUGUUUCAGAACUGA	259
	反义链	UCAGUUCUGAAACACCAUGCU	260
asiMARC1-131	有义链	GCAUGGUGUUUCAGAA	261
	反义链	UUCUGAAACACCAUGCUCAA	262
asiMARC1-132	有义链	AGCAUGGUGUUUCAGA	263
	反义链	UCUGAAACACCAUGCUCAAG	264
asiMARC1-133	有义链	UUGAAGCAUGGUGUUA	265
	反义链	UAACACCAUGCUCAAGUGUU	266
asiMARC1-134	有义链	CUCAAAAUGACAACA	267
	反义链	UGUUGCAUUUUUGAGAACAU	268
asiMARC1-135	有义链	CUCUACAUUUCUUUA	269
	反义链	UAAAGAAAUGUAGAGGUCUC	270
asiMARC1-136	有义链	CGUCUUUUGGACUUA	271
	反义链	UGAAGUCCAAAAGACGAAAAA	272
asiMARC1-137	有义链	GCUUCAUUGUCCAGA	273
	反义链	UCUGGGACAUUGAAGCAUGA	274
asiMARC1-138	有义链	CUCAAUGCUCAAUGA	275
	反义链	UCAUUGAAGCAUUGAGACACC	276
asiMARC1-139	有义链	GUCUCAUUGCUCAA	277
	反义链	UUUGAAGCAUUGAGACACCAG	278
asiMARC1-140	有义链	GUGUCUCAAUGCUUA	279
	反义链	UGAAGCAUUGAGACACCAGAA	280
asiMARC1-141	有义链	UGGUGUCUCAAUGCUA	281
	反义链	UAGCAUUGAGACACCAGAAGU	282
asiMARC1-142	有义链	CAGGAUUCUGAAAACA	283
	反义链	UGUUUCAGAAUCCUGUCUUG	284
asiMARC1-143	有义链	GACAGAUUCUGAAAA	285
	反义链	UUUCAGAAUCCUGUCUUGUC	286
asiMARC1-144	有义链	AGACAGGAUUCUGAAA	287
	反义链	UUUCAGAAUCCUGUCUUGUCA	288
asiMARC1-145	有义链	GACAAGACAGGAUUA	289
	反义链	UGAAUCCUGUCUUGUCAUUUA	290
asiMARC1-146	有义链	AUGACAAGACAGGAUA	291
	反义链	UAUCCUGUCUUGUCAUUUAAG	292
asiMARC1-147	有义链	CCGUUUAACUGAUUA	293
	反义链	UUAAUCAGUUAACGGGGAGU	294
asiMARC1-148	有义链	CCCGUUUAACUGAUUA	295
	反义链	UAAUCAGUUAACGGGGAGUU	296
asiMARC1-149	有义链	CCCCGUUUAACUGAUUA	297
	反义链	UAUCAGUUAACGGGGAGUUU	298
asiMARC1-150	有义链	CGUUUAUCUACCAAGA	299
	反义链	UCUUGGUAGUUAACGGAGAA	300

[0194] 【表12】

asiRNA名称	序列 (5' →3')		SEQ NO.
asiMARC1-151	有义链	UCCGUUUUUCUACCAA	301
	反义链	UUGGUAGAUAAACGGAGAAGC	302
asiMARC1-152	有义链	UCCUGUCACUACCACA	303
	反义链	UGUGGUAGUGACAGGAUGCAA	304
asiMARC1-153	有义链	GAGAAAGAGGAAGAGA	305
	反义链	UCUCUCCUCUUCUCUUCUU	306
asiMARC1-154	有义链	GAGAAGAAGAGAAGA	307
	反义链	UCUUUCUCUUCUUCUUCUU	308
asiMARC1-155	有义链	AAGAGAAGAAGAGAAA	309
	反义链	UUUCUCUUCUUCUUCUUCU	310
asiMARC1-156	有义链	GAGAAAGAGAAGAAGA	311
	反义链	UCUUCUUCUUCUUCUUAACG	312
asiMARC1-157	有义链	UACGCAAUGAAAAUUA	313
	反义链	UAAUUUCAUUGCGUACCUCA	314
asiMARC1-158	有义链	GUACGCAAUGAAAAUA	315
	反义链	UAUUUCAUUGCGUACCUCAU	316
asiMARC1-159	有义链	CAAAUAUGGCUGGAAA	317
	反义链	UUUCCAGCCAUUUUGGGUG	318
asiMARC1-160	有义链	CCCAAAUUGGCUGGA	319
	反义链	UCCAGCCAUUUUGGGUGCA	320
asiMARC1-161	有义链	CUUUUGAAAUGGCAUA	321
	反义链	UAUGCCAUUUCAAAAGCUAGC	322
asiMARC1-162	有义链	GCUUUUGAAAUGGCAA	323
	反义链	UUGCCAUUUCAAAAGCUAGCC	324
asiMARC1-163	有义链	GGCUAGCUUUUGAAA	325
	反义链	UUUCAAAGCUAGCCCGGGG	326
asiMARC1-164	有义链	GGGCUAGCUUUUGAAA	327
	反义链	UUUCAAAAGCUAGCCCGGGGC	328
asiMARC1-165	有义链	CGGGCUAGCUUUUGAA	329
	反义链	UUCAAAAGCUAGCCCGGGGCU	330
asiMARC1-166	有义链	CCGGGCUAGCUUUUGA	331
	反义链	UCAAAAGCUAGCCCGGGGCUU	332
asiMARC1-167	有义链	CCCCGGGCUAGCUUUA	333
	反义链	UAAAGCUAGCCCGGGGCUUGA	334
asiMARC1-168	有义链	CCCCGGGCUAGCUUA	335
	反义链	UAAGCUAGCCCGGGGCUUGAG	336
asiMARC1-169	有义链	AGCCCGGGCUAGCUA	337
	反义链	UAGCUAGCCCGGGGCUUGAGA	338
asiMARC1-170	有义链	CUCAAGCCCGGGCUA	339
	反义链	UAGCCCGGGGCUUGAGAAGAA	340
asiMARC1-171	有义链	ACCUUCAGGAAGCACA	341
	反义链	UGUGCUUCCUGAAGGUCACCU	342
asiMARC1-172	有义链	AGGUGACCUUCAGGAA	343
	反义链	UUCUGAAGGUCACCUCAGUC	344
asiMARC1-173	有义链	CCAUAGAUCUGGAUCA	345
	反义链	UGAUCCAGAUUAUGGAAAUA	346
asiMARC1-174	有义链	CUGCAGAUUUAUUUA	347
	反义链	UAAUUAAUAUCUGCAGUGCUU	348
asiMARC1-175	有义链	ACUGCAGAUUUAUUUA	349
	反义链	UAUUAAUAUCUGCAGUGCUUC	350
asiMARC1-176	有义链	CAUUGGAUUUCCUAAA	351
	反义链	UUUAGGAAAUCCAAUGCUGUC	352
asiMARC1-177	有义链	GCAUUGGAUUUCCUAA	353
	反义链	UUAGGAAAUCCAAUGCUGUCU	354

[0195]

[0196]

asiMARC1-178	有义链	AGCAUUGGAUUUCCUA	355
	反义链	UAGGAAAUCCAAUGCUGUCUG	356
asiMARC1-179	有义链	AGACAGCAUUGGAUUA	357
	反义链	UAAUCCAAUGCUGUCUGAGAA	358
asiMARC1-180	有义链	CAGACAGCAUUGGAUA	359
	反义链	UAUCCAAUGCUGUCUGAGAAG	360
asiMARC1-181	有义链	GCUUCUCAGACAGCAA	361
	反义链	UUGCUGUCUGAGAAGCAGCAG	362
asiMARC1-182	有义链	UGCUGCUUCUCAGACA	363
	反义链	UGUCUGAGAAGCAGCAGGGCC	364
asiMARC1-183	有义链	CCUGCUGCUUCUCAGA	365
	反义链	UCUGAGAAGCAGCAGGCCAG	366
asiMARC1-184	有义链	AGGAUGGUUGUUGAGA	367
	反义链	UCUACACAACCAUCCUCCUGA	368
asiMARC1-185	有义链	CUGGAUCCUUGCCAUA	369
	反义链	UAUGCAAGGAUCCAGGGGUC	370
asiMARC1-186	有义链	CCUGGAUCCUUGCCAA	371
	反义链	UUGGCAAGGAUCCAGGGGUCC	372
asiMARC1-187	有义链	CCCUGGAUCCUUGCCA	373
	反义链	UGGCAAGGAUCCAGGGGUCCU	374
asiMARC1-188	有义链	GGACCCUUGGAUCCUA	375
	反义链	UAGGAUCCAGGGUCCUCAU	376
asiMARC1-189	有义链	UGGAGGACCCUGGAA	377
	反义链	UUCAGGGUCCUCAUGACU	378
asiMARC1-190	有义链	UGCUCUUCUCCAGUA	379
	反义链	UACUGGAGAAGGAGCACUCCG	380
asiMARC1-191	有义链	GUGCUCUUCUCCAGA	381
	反义链	UCUGGAGAAGGAGCACUCCGU	382
asiMARC1-192	有义链	ACGGAGUCUCCUUA	383
	反义链	UGAAGGAGCACUCCGUCAUUA	384
asiMARC1-193	有义链	UGAAAAGUUCUGAAA	385
	反义链	UUUCAGAACUUUUCACCCGG	386
asiMARC1-194	有义链	GUGAAAAGUUCUGAA	387
	反义链	UUCAGAACUUUUCACCCGGA	388
asiMARC1-195	有义链	GGUGAAAAGUUCUGA	389
	反义链	UCAGAACUUUUCACCCGGAA	390
asiMARC1-196	有义链	CGGGUGAAAAGUUA	391
	反义链	UGAACUUUUCACCCGGAACU	392
asiMARC1-197	有义链	UCCGGUGAAAAGUA	393
	反义链	UACUUUUCACCCGGAACUGG	394
asiMARC1-198	有义链	AAGUGAUUCAGUGUA	395
	反义链	UAUCACUGAAUCUUUUCUU	396
asiMARC1-199	有义链	GAGAAGAAAAGUGUA	397
	反义链	UAUCACUUUUCUCCUCCA	398
asiMARC1-200	有义链	GGAGAAGAAAAGUGAA	399
	反义链	UUCACUUUUCUCCUCCAC	400

[0197] 【表13】

asiRNA名称	序列 (5' →3')		SEQ NO.
asiMARC1-201	有义链	GGAGGAGAAGAAAAGA	401
	反义链	UCUUUCUUCUCCUCCACAGA	402
asiMARC1-202	有义链	GUGGAGGAGAAGAAAA	403
	反义链	UUUUCUUCUCCUCCACAGAAU	404
asiMARC1-203	有义链	UGUGGAGGAGAAGAAA	405
	反义链	UUUCUUCUCCUCCACAGAAU	406
asiMARC1-204	有义链	CUGUGGAGGAGAAGAA	407
	反义链	UUCUUCUUCUCCACAGAAUUC	408
asiMARC1-205	有义链	GGGAAAAGGAAAGCA	409
	反义链	UGC UUCCUUUUC CCCC UUA	410
asiMARC1-206	有义链	AAGGGGAAAAGGAAA	411
	反义链	UUUCUUUUC CCCC UUAAG	412
asiMARC1-207	有义链	CUUAAAAGGGGAAA	413
	反义链	UUU CCCC UUAAGGUUU	414
asiMARC1-208	有义链	CCUUAAAAGGGGAAA	415
	反义链	UU CCCC UUAAGGUUUUC	416
asiMARC1-209	有义链	ACCUUAAAAGGGGAA	417
	反义链	UUC CCCC UUAAGGUUUCA	418
asiMARC1-210	有义链	UACUGAAAACCUUAA	419
	反义链	UUAAAGGUUUUCAGUAGUCUA	420
asiMARC1-211	有义链	CUACUGAAAACCUUA	421
	反义链	UAAAGGUUUUCAGUAGUCUAU	422
asiMARC1-212	有义链	ACUACUGAAAACCUUA	423
	反义链	UAAGGUUUUCAGUAGUCUAUC	424
asiMARC1-213	有义链	GACUACUGAAAACCUA	425
	反义链	UAGGUUUUCAGUAGUCUAUCU	426
asiMARC1-214	有义链	UUGUUAAAACCCAAA	427
	反义链	UUUGGGUUUUAACAACUGAC	428
asiMARC1-215	有义链	CAUAUGUCAGUUGUA	429
	反义链	UAACAACUGACAUAUGCUUUC	430
asiMARC1-216	有义链	GCAUAUGUCAGUUGUA	431
	反义链	UACAACUGACAUAUGCUUUC	432
asiMARC1-217	有义链	AGCAUAUGUCAGUUGA	433
	反义链	UCAACUGACAUAUGCUUUCU	434
asiMARC1-218	有义链	CCAUUUUGUCCUUGA	435
	反义链	UCAAAGGACAAAUGGCAAUA	436
asiMARC1-219	有义链	UGCCAUUUUGUCCUUA	437
	反义链	UAAGGACAAAUGGCAAUAAA	438
asiMARC1-220	有义链	AGAUCUGAUGAAGUAA	439
	反义链	UUACUUCUACAGAUUUAGAG	440
asiMARC1-221	有义链	CUCUAAGAUCUGAUGA	441
	反义链	UCAUCAGAUUUAGAGUUUA	442
asiMARC1-222	有义链	GGAAGUUGACUAAACA	443
	反义链	UGUUUAGUCAACUCCCAAUA	444
asiMARC1-223	有义链	UGGGAAGUUGACUAAA	445
	反义链	UUUAGUCAACUCCCAAUA	446
asiMARC1-224	有义链	UUGGGAAGUUGACUAA	447
	反义链	UUAGUCAACUCCCAAUAAA	448
asiMARC1-225	有义链	CUACUUUGACUAGUUA	449
	反义链	UAACUAGUCAAGUAGCUUCC	450
asiMARC1-226	有义链	GCUACUUUGACUAGUA	451
	反义链	UACUAGUCAAGUAGCUCCA	452
asiMARC1-227	有义链	AGCUACUUUGACUAGA	453
	反义链	UCUAGUCAAGUAGCUCCA	454

[0198]

asiMARC1-228	有义链	GGAAGCUACUUUGACA	455
	反义链	UGUCAAGUAGCUCCAUUUA	456
asiMARC1-229	有义链	GCCUGGUCCUGAUUUA	457
	反义链	UAAAUCAGGACCAGGCGAGGU	458
asiMARC1-230	有义链	CGCCUGGUCCUGAUUA	459
	反义链	UAAUCAGGACCAGGCGAGGUU	460
asiMARC1-231	有义链	UCGCCUGGUCCUGAUUA	461
	反义链	UAUCAGGACCAGGCGAGGUUC	462
asiMARC1-232	有义链	CUGACUCUCAGUGCAA	463
	反义链	UUGCACUGAGAGUCAGGUGU	464
asiMARC1-233	有义链	CCUGACUCUCAGUGCA	465
	反义链	UGCACUGAGAGUCAGGUGUC	466
asiMARC1-234	有义链	CACCCUGACUCUCAGA	467
	反义链	UCUGAGAGUCAGGUGUCACC	468
asiMARC1-235	有义链	GUGACACCCUGACUCA	469
	反义链	UGAGUCAGGUGUCACCAUCG	470
asiMARC1-236	有义链	AGAUUGCUUACUCAGA	471
	反义链	UCUGAGUAAGCAAUCUGUCC	472
asiMARC1-237	有义链	UCUCAACUCCAGGCUA	473
	反义链	UAGCCUGGAGUUGAGAUCCGC	474
asiMARC1-238	有义链	GGAUUCUACUCCAGA	475
	反义链	UCUGGAGUUGAGAUCCGCCAG	476
asiMARC1-239	有义链	CGGAUCUCAACUCCAA	477
	反义链	UUGGAGUUGAGAUCCGCCAGC	478
asiMARC1-240	有义链	GCGGAUCUCAACUCCA	479
	反义链	UGGAGUUGAGAUCCGCCAGCG	480
asiMARC1-241	有义链	GGCGGAUCUCAACUCA	481
	反义链	UGAGUUGAGAUCCGCCAGCGA	482
asiMARC1-242	有义链	AGGGUGAUGGCUUGUA	483
	反义链	UACAAGCCAUCACCCUUUCA	484
asiMARC1-243	有义链	ACCUGCUGGCCAGUA	485
	反义链	UACUGGCCAGCAGGUACACA	486
asiMARC1-244	有义链	AGAGAAAGAGAAGAAA	487
	反义链	UUUCUUCUCUUUCUCAACGA	488
asiMARC1-245	有义链	UAGAGAAAGAGAAGAA	489
	反义链	UUCUUCUCUUUCUCAACGAG	490
asiMARC1-246	有义链	AGGAGAAGAAAAGUGA	491
	反义链	UCACUUUCUUCUCCUCCACA	492
asiMARC1-247	有义链	GCAGCCUACACAAGA	493
	反义链	UCUUUGUGUAGGUGCAGUGA	494
asiMARC1-248	有义链	UGCAGCCUACACAAAA	495
	反义链	UUUUGUGUAGGUGCACUGAG	496
asiMARC1-249	有义链	CAGUGCAGCCUACACA	497
	反义链	UGUGUAGGUGCACUGAGAGU	498
asiMARC1-250	有义链	CUCAGUGCAGCCUACA	499
	反义链	UGUAGGUGCACUGAGAGUCA	500

[0199]

[0200] 【表14】

asiRNA名称	序列 (5' →3')		SEQ NO.
asiMARC1-251	有义链	UCUCAGUGCAGCCUAA	501
	反义链	UUAGGCUGCAGAGAGUCAG	502
asiMARC1-252	有义链	CUCUCAGUGCAGCCUA	503
	反义链	UAGGCUGCAGAGAGUCAGG	504
asiMARC1-253	有义链	CCUUUCUGAGGCGUCA	505
	反义链	UGACGCCUCAGAAAGGAUCAA	506
asiMARC1-254	有义链	UCCUUUCUGAGGCGUA	507
	反义链	UACGCCUCAGAAAGGAUCAAG	508
asiMARC1-255	有义链	AAGAAAGUUAAGCAA	509
	反义链	UUGCUIUAACUUCUUCUCUA	510
asiMARC1-256	有义链	GGUGACGUGGAACUGA	511
	反义链	UCAGUCCACGUCACCAUAA	512
asiMARC1-257	有义链	UGGUGACGUGGAACUA	513
	反义链	UAGUCCACGUCACCAUUAAG	514
asiMARC1-258	有义链	CAGAUCAUUUAACA	515
	反义链	UGUAAAAUGCAUCUGGAACA	516
asiMARC1-259	有义链	CCAUCAAGUGGGAGA	517
	反义链	UCUCCACUUUGAUGGUCCU	518
asiMARC1-260	有义链	CAGGACCAUCAAGA	519
	反义链	UCUUUGAUGGUCCUGGGUUU	520
asiMARC1-261	有义链	CCAGGACCAUCAAAA	521
	反义链	UUUGAUGGUCCUGGGUUU	522
asiMARC1-262	有义链	UAUUUGUCUGGAAA	523
	反义链	UUUCCAGCACAAAUAUCUGCC	524
asiMARC1-263	有义链	UUGGCAGUAUUUGA	525
	反义链	UCAAAAUAUCUGCCAAAGAGU	526
asiMARC1-264	有义链	ACGCAAUGAAAUUA	527
	反义链	UUAAUUUUAUUGCGUACCUC	528
asiMARC1-265	有义链	CCAAAUAUGGCUGGAA	529
	反义链	UCCAGCCAUUUUGGGUGC	530
asiMARC1-266	有义链	CUUCUCAGACAGCAUA	531
	反义链	UAUGCUGUCUGAGAAGCAGCA	532
asiMARC1-267	有义链	GCUGCUUCUCAGACAA	533
	反义链	UUGUCUGAGAAGCAGCAGGC	534
asiMARC1-268	有义链	AGGAGGAAACAUGGA	535
	反义链	UCCAUGUUUCCUCCUGGUUG	536
asiMARC1-269	有义链	CAGGAGGAAACAUGA	537
	反义链	UCAUGUUUCCUCCUGGUUGA	538
asiMARC1-270	有义链	CUGAUUCCUGACCA	539
	反义链	UGGUCAGGAAAUACAGGACCA	540
asiMARC1-271	有义链	CCUGGUCCUGAUUCA	541
	反义链	UGAAAUCAGGACCAGGCGAGG	542
asiMARC1-272	有义链	AGCCUACACAAAGGAA	543
	反义链	UUCCUUUGUGUAGGCUGCACU	544
asiMARC1-273	有义链	CAGCCUACACAAAGGA	545
	反义链	UCCUUUGUGUAGGCUGCACUG	546
asiMARC1-274	有义链	GUGCAGCCUACACAAA	547
	反义链	UUUGUGUAGGCUGCACUGAGA	548
asiMARC1-275	有义链	AGUGCAGCCUACACAA	549
	反义链	UUGUGUAGGCUGCACUGAGAG	550
asiMARC1-276	有义链	CCCUGACUCACAGUGA	551
	反义链	UCACUGAGAGUCAGGGUGUCA	552
asiMARC1-277	有义链	ACCCUGACUCUCAGUA	553
	反义链	UACUGAGAGUCAGGGUGUCAC	554
asiMARC1-278	有义链	AAACGCCACCAAAA	555
	反义链	UUUGUGGGGGCGUUUGAUA	556

[0201]

[0202]

asiMARC1-279	有义链	GCACAAGUGCAGAGUA	557
	反义链	UACUCUGCACUUGUGCACUGC	558
asiMARC1-280	有义链	GGUGCACUUCGAGCCA	559
	反义链	UGGCUCGAAGUGCACCAGGCG	560
asiMARC1-281	有义链	GCCUGGUGCACUUCGA	561
	反义链	UCGAAGUGCACCAGGCGGUAG	562
asiMARC1-282	有义链	CGCCUGGUGCACUUA	563
	反义链	UGAAGUGCACCAGGCGGUAGG	564
asiMARC1-283	有义链	CCGCCUGGUGCACUUA	565
	反义链	UAAGUGCACCAGGCGGUAGGG	566
asiMARC1-284	有义链	ACCGCUGGUGCACUA	567
	反义链	UAGUGCACCAGGCGGUAGGGC	568
asiMARC1-285	有义链	CGACCCAAGGACCAGA	569
	反义链	UCUGGUCCUUGGGUCGGAACA	570
asiMARC1-286	有义链	CCGACCCAAGGACCAA	571
	反义链	UUGGUCCUUGGGUCGGAACA	572
asiMARC1-287	有义链	UGGCGGAUCUCAACUA	573
	反义链	UAGUUGAGAUCGCGCAGCGAC	574
asiMARC1-288	有义链	GUGACGUGGAACUGAA	575
	反义链	UUCAGUUCACGUCACCAUA	576
asiMARC1-289	有义链	UUGGUGACGUGGAACA	577
	反义链	UGUUCACGUCACCAUAAGA	578
asiMARC1-290	有义链	CCAGAUGCAUUUUA	579
	反义链	UUUAAAUGCAUCUGGAACA	580
asiMARC1-291	有义链	GGCCAGUAAUGGGAAA	581
	反义链	UUUCCAUUACUGGCCAGCA	582
asiMARC1-292	有义链	GGCCAGUAAUGGGAA	583
	反义链	UUCCAUUACUGGCCAGCAG	584
asiMARC1-293	有义链	ACCAUCAAGUGGGAA	585
	反义链	UUCCACUUUGAUGGUCCUG	586
asiMARC1-294	有义链	GACCAUCAAGUGGGA	587
	反义链	UCCACUUUGAUGGUCCUGG	588
asiMARC1-295	有义链	UGGAAAACCCAGGGAA	589
	反义链	UUCCUGGGUUUCCAGCACA	590
asiMARC1-296	有义链	CUGGAAAACCCAGGGA	591
	反义链	UCCUGGGUUUCCAGCACA	592
asiMARC1-297	有义链	CGCUGGAAACACUGAA	593
	反义链	UUCAGUUUCCAGCGGUCC	594
asiMARC1-298	有义链	CCGUGGAAACACUGA	595
	反义链	UCAGUUUCCAGCGGUCCU	596
asiMARC1-299	有义链	ACCGCUGGAAACACUA	597
	反义链	UAGUUUCCAGCGGUCCU	598
asiMARC1-300	有义链	AACCGCUGGAAACACA	599
	反义链	UGUUUCCAGCGGUCCUUC	600

[0203] 3-2. 评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0204] 为了确认mRNA水平中的表达抑制效率,将所述MARC1 asiRNA转染至Huh7细胞后进行qRT-PCR,从而测量了MARC1 mRNA的表达水平。具体地,所述Huh7细胞以每孔 8×10^3 细胞的量接种至96孔板,在其中添加MARC1 asiRNA (10nM, Olix Inc.) 和RNAiMax (2 μ l/ml, Invitrogen Inc.13778150) 后按照Invitrogen提供的方案进行了转染。从进行所述处转染的时间点起24小时后,使用SuperPrepTM Cell lysis&RT kit for qPCR Kit II (TOYOBO, SCQ-401) 制备细胞裂解物,并通过将其中包含的mRNA作为模板的逆转录过程合成了cDNA。然后,以所述合成的cDNA为模板,使用THUNDERBIRD[®] Probe qPCR Mix (TOYOBO, QPS-101) 和 Probe (Hs00224227_m1、Hs03928985_g1、Applied Biosystems) 进行了定量PCR,并以mRNA表达抑制水平为准初步筛选出共134种MARC1 asiRNA (未示出)。此外,在本实施例中,将仅添

加转染试剂的组 (Mock) 作为对照组, 将利用asiMARC1-30与实施例1-2相同的方式进行转染的组 (PC1) 作为阳性对照组。然后, 针对如上所述筛选出的134种MARC1 asiRNA, 仅将MARC1 asiRNA处理浓度依次变更为1nM或0.1nM的情况下, 与如上所述相同的方式评估了MARC1 mRNA表达水平。

[0205] 结果如图20a至图20c所示, 确认了MARC1 mRNA根据处理1nM的134种MARC1 asiRNA的表达抑制效果, 并从中筛选出MARC1表达抑制效率优异的前41种MARC1 asiRNA (#54、#75、#80、#89、#90、#92、#97、#99、#100、#114、#124、#126、#129、#130、#131、#137、#143、#144、#161、#166、#177、#194、#195、#196、#200、#201、#202、#210、#211、#212、#215、#216、#217、#218、#220、#222、#223、#224、#233、#264、#268)。此外, 如图21所示, 确认了MARC1 mRNA根据处理0.1nM的已确认上述表达抑制效果的41种MARC1 asiRNA的表达抑制效果, 并从中筛选出MARC1表达抑制效率优异的前30种MARC1 asiRNA (#75、#80、#89、#90、#92、#99、#100、#114、#124、#126、#129、#130、#131、#137、#143、#144、#166、#177、#194、#196、#200、#212、#215、#216、#218、#220、#222、#223、#224、#264)。

[0206] 3-3. 评估MARC1蛋白的表达抑制效果

[0207] 为了确认蛋白水平中的表达抑制效率, 将从上述实施例3-2中筛选出的30种MARC1 asiRNA转染至Huh7细胞, 然后通过进行免疫印迹 (Western blot) 测量了MARC1蛋白的表达水平。具体地, 所述Huh7细胞以每孔 5×10^4 细胞的量接种至12孔板, 在其中添加MARC1 asiRNA (1nM, Olix Inc.) 和RNAiMax (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150) 后按照Invitrogen提供的方案进行了转染。从进行所述转染的时间点起48小时后破碎转染的细胞, 从而在每个样品中获得了15 μ g的细胞裂解物。针对所述获得的细胞裂解物, 使用10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶、MARC1兔多克隆抗体 (1:1000稀释于3%的BSA, Abcepta, AP9754c) 和小鼠黏着斑蛋白 (Vinculin Mouse) 单克隆抗体 (1:1000稀释于3%的BSA, Santa Cruz Biotechnology, sc-73614) 进行免疫印迹, 并通过ChemiDoc XRS+System (Bio-Rad) 确认了MARC1蛋白的表达水平。此外, 在本实施例中, 将仅添加转染试剂的组 (M) 作为对照组, 将利用asiMARC1-30或asiMARC1-31与实施例1-2相同的方式进行转染的组 (PC1、PC2) 作为阳性对照组。

[0208] 结果如图22所示, 确认到从上述实施例3-2筛选出的共30种MARC1 asiRNA均抑制MARC1蛋白的表达。

[0209] 实施例4: 制备引入化学修饰的用于诱导RNAi的核酸分子

[0210] 4-1. 设计和制作41种MARC1 GalNAc-asiRNA

[0211] 在本实施例中, 针对所述通过实施例1和3确认表达抑制效果的MARC1 asiRNA, 设计了引入GalNAc配体和化学修饰的不对称siRNA (GalNAc-asiRNA)。所述设计的GalNAc-asiRNA与所述asiRNA相比, 引入了各种化学修饰 (2' OMe、PS、Fluoro、GalNAc配体等), 其为向肝细胞内部的传递得到提高的不对称siRNA。

[0212] 通过本实施例制作的共41种MARC1 GalNAc-asiRNA的序列信息如下表15所示。

[0213] 【表15】

[0214]

GalNAc-asiRNA 名称	序列 (5' → 3')	
OLX-031-1	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
	反义链	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-3	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
	反义链	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-4	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-6	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
	反义链	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-7	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
	反义链	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-8	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-9	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-075-1	有义链	mC*fC*mAfgfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mAmGmUmAfaAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-080-1	有义链	mG*fC*mGfAfUfGmUfCmUfAmUfGmCfAmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mUmGmCmAfUmAfgAmCmAmUfCmGfCmA*mU*mC*mC*mU
OLX-089-1	有义链	mC*fC*mAfaFcfUmUfCmAfGmGfCmCfCmAfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mGmGmCfCmUfGmAmAmGmUfUmGfGmU*mU*mG*mC*mU
OLX-090-1	有义链	mA*fG*mAfgfAfAmGfAmAfaAmGfUmUfAmAfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mUmAmAmCfUmUfUmCmUmUmCfUmCfUmA*mG*mC*mC*mU
OLX-092-1	有义链	mC*fU*mAfgfAfGmAfaAmGfAmAfaAmGfUmUfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fa*mAmCmUmUfUmCfUmUmCmUmCfUmAfgmC*mC*mU*mG*mG
OLX-099-1	有义链	mU*fG*mUfUfCfCmAfGmAfUmGfCmAfUmUfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fa*mAmUmGmCfAmUfCmUmGmGmAfaAmCfAmA*mG*mC*mC*mA
OLX-100-1	有义链	mU*fU*mGfUfUfCmCfAmGfAmUfGmCfAmUfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fa*mUmGmCmAfUmCfUmGmGmAfaCmAfaAmG*fC*mC*mA*mU
OLX-114-1	有义链	mC*fG*mAfaFafGmUfUmAfaUmAfaUmGfGmAfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mCmCmAmUfAmUfAmAmCmUmUfUmCfGmU*mU*mC*mU*mG
OLX-124-1	有义链	mA*fU*mGfUfCfCmUfGmGfAmAfaUmAfaUmUfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fa*mAmUmAmUfUmCfCmAmGmGmAfaCmAfaUmA*mC*mG*mG*mU
OLX-126-1	有义链	mC*fG*mUfaFafUfGmUfCmCfUmGfGmAfaUmUfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fa*mUmUmCmCfAmGfGmAmCmAmUfAmCfGmG*mU*mU*mC*mC

[0215]

OLX-129-1	有义链	mC*fA*mGfAfAfCmUfGmAfGmAfCmCfUmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mAmGmUmUfCmUfCmAmGmUmUfCmUfGmA*mA*mC*mA
OLX-130-1	有义链	mG*fG*mUfGfUfUfCmAfGmAfAmCfUmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mAmGmUmUfCmUfGmAmAmCfAmCfCmA*mU*mG*mC*mU
OLX-131-1	有义链	mG*fC*mAfUfGfGmUfGmUfUfCmAfGmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mCmUmGmAfAmAfCmAmCmCmAfUmGfCmU*mU*mC*mA*mA
OLX-137-1	有义链	mG*fC*mUfUfCfAmAfUmGfUmCfCmCfAmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mUmGmGmGfAmCfAmUmUmGmAfAmGfCmA*mU*mU*mG*mA
OLX-143-1	有义链	mG*fA*mCfAfGfGmUfUfCmUfGmAfAmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mUmUmCmAfGmAfAmUmCmCmUfGmUfCmU*mU*mG*mU*mC
OLX-144-1	有义链	mA*fG*mAfCfAfGmGfAmUfUmCfUmGfAmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mUmCmAmGfAmAfUmCmCmUmGfUmCfUmU*mG*mU*mC*mA
OLX-166-1	有义链	mC*fC*mGfGfGfCmUfAmGfCmUfUfUmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mAmAmAmAfGmCfUmAmGmCmCfCmGfGmG*mG*mC*mU*mU
OLX-177-1	有义链	mG*fC*mAfUfUfGmGfAmUfUmUfCmCfUmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mAmGmGmAfAmAfUmCmCmAmAfUmGfCmU*mG*mU*mC*mU
OLX-194-1	有义链	mG*fU*mGfAfAfAmAfAmGfUmUfCmUfGmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mCmAmGmAfAmCfUmUmUmUfCmAfCmC*mC*mG*mG*mA
OLX-196-1	有义链	mC*fG*mGfGfUfGmAfAmAfAmAfGmUfUmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mAmAmCmUfUmUfUmCmAmCfCmCfGmG*mA*mA*mC*mU
OLX-200-1	有义链	mG*fG*mAfGfAfAmGfAmAfAmAfGmUfGmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mCmAmCmUfUmUfUmCmUmUmCfUmCfCmU*mC*mC*mA*mC
OLX-212-1	有义链	mA*fC*mUfAfCfUmGfAmAfAmAfCmCfUmUfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fA*mAmGmUmUfUmUfUmCmAmGmUfAmGfUmC*mU*mA*mU*mC
OLX-216-1	有义链	mG*fC*mAfUfAfUmGfUmCfAmGfUmUfGmUfa-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fA*mCmAmAmCfUmGfAmCmAmUmAfUmGfCmU*mU*mU*mC*mC
OLX-218-1	有义链	mC*fC*mAfUfUfUmUfGmUfCmCfUmUfUmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mAmAmAmGfGmAfCmAmAmAmAfUmGfGmC*mA*mA*mU*mA
OLX-220-1	有义链	mA*fG*mAfUfCfUmGfAmUfGmAfAmGfUmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mAmCmUmUfCmAfUmCmAmGmAfUmCfUmU*mA*mG*mA*mG
OLX-222-1	有义链	mG*fG*mAfAfGfUfGmUfGmUfAmAfAmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mUmUmAmAfGmUfCmAmAmCmUfUmCfCmC*mA*mA*mU*mA
OLX-223-1	有义链	mU*fG*mGfGfAfAmGfUmUfGmUfCmUfAmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mUmAmGmUfCmAfAmCmUmUmCfCmCfAmA*mU*mA*mU*mA
OLX-224-1	有义链	mU*fU*mGfGfGfAmAfGmUfUmGfAmCfUmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mAmGmUmCfAmAfCmUmUmCmCfCmAfAmU*mA*mU*mA*mA
OLX-233-1	有义链	mC*fC*mUfGfAfCmUfCmUfCmAfGmUfGmCfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fG*mCmAmCmUfGmAfGmAmGmUmCfAmGfGmG*mU*mG*mU*mC
OLX-237-1	有义链	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAfGmGfCmUfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fA*mGmCmUfGmGfAmGmUmUmGfAmGfAmU*mC*mC*mG*mC
OLX-264-1	有义链	mA*fC*mGfCfAfAmUfGmAfAmAfAmUfUmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mAmAmUmUfUmUfCmAmUmUmGfCmGfUmA*mC*mC*mU*mC
OLX-274-1	有义链	mG*fU*mGfCfAfGmCfCmUfAmCfAmCfAmAfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fU*mUmGmUmGfUmAfGmGmCmUmGfCmAfCmU*mG*mA*mG*mA
OLX-276-1	有义链	mC*fC*mCfUfGfAmCfUmCfUmCfAmGfUmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mAmCmUmGfAmGfAmGmUmCmAfGmGfGmU*mG*mU*mC*mA
OLX-281-1	有义链	mG*fC*mCfUfGfGmUfGmCfAmCfUmUfCmGfA-Ga1NAc
	反义链	P-mU*fC*mGmAmAmGfUmGfCmAmCmCmAfGmGfCmG*mG*mU*mA*mG

[0216] 具体地,上述表15中由“*”、“m”、“f”、“P”以及“Ga1NAc”表示的化学修饰如上述表7所示。

[0217] 4-2. 评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0218] 为了确认在mRNA水平中的表达抑制效率,将所述通过实施例4-1制作的共41种MARC1 Ga1NAc-asiRNA (100nM) 分别对来源于C57BL/6小鼠 (Koatech) 且进行原代培养的小鼠肝细胞 (Primary cultured mouse hepatocytes: PMH) 进行处理后 (n=3), 以与实施例1-

2相同的方式执行qRT-PCR,从而测量了MARC1 mRNA的表达水平。此外,在本实施例中,将未处理物质的组(NT)作为对照组,将处理OLX700A-001-8(100nM)的组(NC)作为阴性对照组,将处理OLX-031-1(10nM)的组(PC)作为阳性对照组。

[0219] 结果如图23所示,确认到MARC1 mRNA根据处理41种MARC1 GalNAc-asiRNA的表达抑制效果。其中,OLX-031-1、OLX-031-9、OLX-274-1、OLX-231-3、OLX-281-1、OLX-031-8、OLX-031-6、OLX-237-1、OLX-031-4的表达抑制效果更优异。

[0220] 4-3. 评估MARC1 mRNA对来源于人的肝细胞的表达抑制效果

[0221] 为了确认在mRNA水平中的表达抑制效率,将所述通过实施例4-1制作的共41种MARC1 GalNAc-asiRNA分别对来源于人的原代肝细胞(Primary human hepatocyte, F00995-P)进行处理后(n=3),通过执行qRT-PCR测量了MARC1 mRNA的表达水平。具体地,将所述原代肝细胞以每孔 4×10^4 细胞的量接种至96孔板,用MARC1 GalNAc-asiRNA(500nM, OliX Inc.)对其进行处理后,以与实施例1-2相同的方式执行qRT-PCR,从而测量了MARC1 mRNA的表达水平。此外,在本实施例中,将未处理物质的组(NT)作为对照组,将处理OLX700A-001-8(500nM)的组(NC)作为阴性对照组,将处理OLX-031-1(10nM)的组(PC)作为阳性对照组。

[0222] 此外,为了确认在mRNA水平中根据MARC1 GalNAc-asiRNA处理浓度的表达抑制效率,将所述来源于人的原代肝细胞以每孔 3×10^4 细胞的量接种至96孔板,并用20nM或100nM的MARC1 GalNAc-asiRNA(OliX Inc.)进行了处理(n=2)。然后,以与实施例1-2相同的方式执行qRT-PCR,从而测量了MARC1 mRNA的表达水平。此外,在本实施例中,将未处理物质的组(NT)作为对照组,将处理OLX700A-001-8(100nM)的组(NC)作为阴性对照组,将处理OLX-075-1或OLX-218-1(10nM)的组(PC1、PC2)作为阳性对照组。

[0223] 结果如图24所示,确认到MARC1 mRNA根据处理41种MARC1 GalNAc-asiRNA的表达抑制效果。此外,如图25所示,所述41种MARC1 GalNAc-asiRNA浓度依赖性地抑制MARC1的表达,特别地,筛选出具有比通过上述实施例1得到的OLX-031-1更优异功效的共10种MARC1 GalNAc-asiRNA(OLX-075-1、OLX-114-1、OLX-212-1、OLX-216-1、OLX-224-1、OLX-218-1、OLX-264-1、OLX-220-1、OLX-31-7、OLX-92-1)。

[0224] 实施例5. 制作靶向人MARC1的GalNAc-asiRNA以及评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0225] 在本实施例中,基于上述实施例4的试验结果,通过选择表现出优异效果的OLX-075-1制作了具有各种化学修饰的MARC1 GalNAc-asiRNA。通过本实施例制作的共17种MARC1 GalNAc-asiRNA的序列信息如下表16所示。

[0226] 【表16】

[0227]

GalNAc-asiRNA 名称	序列 (5' →3')	
OLX-075-1	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	P-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-2	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-3	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-4	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-5	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-6	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-7	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-8	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-9	有义链	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-10	有义链	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-11	有义链	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-12	有义链	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-13	有义链	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-14	有义链	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-15	有义链	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-16	有义链	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-17	有义链	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU

[0228] 具体地,上述表16中由“*”、“m”、“f”、“P”、“GalNAc”以及“EVP”表示的化学修饰如上述表7所示。

[0229] 此外,为了确认在mRNA水平中的表达抑制效率,将所述已制作的共17种MARC1 GalNAc-asiRNA分别对来源于人的原代肝细胞(Primary human hepatocyte, F00995-P)进行处理后(n=3),通过执行qRT-PCR测量了MARC1 mRNA的表达水平。具体地,将所述原代肝细胞以每孔 4×10^4 细胞的量接种至96孔板,用MARC1 GalNAc-asiRNA(10nM或100nM, OIIX Inc.)对其进行处理后,以与实施例1-2相同的方式执行qRT-PCR,从而测量了MARC1 mRNA的表达水平。

[0230] 结果如图26所示,确认到MARC1 mRNA根据处理17种MARC1 GalNAc-asiRNA的表达抑制效果。

[0231] 实施例6.利用猴模型评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0232] 针对猴动物模型,每周共2次皮下施用各种浓度(2.5mp、5mp、或10mp)的OLX-031-2或OLX-075-2后,从进行所述2次施用起一周后从目标猴中取出肝脏,由此获得了肝组织试样及其切片。然后,以与实施例1-2相同的方式执行qRT-PCR,从而测量了MARC1 mRNA的表达

水平。在本实施例中,所述OLX-031-2和OLX-075-2的序列信息如下表17,对动物模型组的具体分类如下表18所示。

[0233] 【表17】

GalNAc-asiRNA 名称	序列 (5' →3')	
[0234] OLX-031-2	有义链	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	反义链	EVP-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-075-2	有义链	mC*fC*mAfgfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	反义链	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU

[0235] 【表18】

组	剂量	治疗	次数
1	0	VC (1xPBS)	2
[0236] 2, 3, 4, 5	2.5 mpk	OLX-031-2	2
	5 mpk		2
	10 mpk		2
	2.5 mpk		2
6, 7	5 mpk	OLX-075-2	2
	10 mpk		2
	10 mpk		2

[0237] 结果如图27所示,在OLX-075-2施用组中确认到更优异的MARC1 mRNA表达抑制效果,并且这种效果表现出浓度依赖性的倾向。

[0238] 实施例7. 利用动物模型评估MARC1 mRNA的表达抑制效果

[0239] 7-1. 利用SEAP报告评估表达抑制效果

[0240] 用包括人MARC1基因以及与其连接的SEAP报告的质粒 (pSELECT-mSEAP-hMARC1) 对六周龄Ba1b/c小鼠 (雌性) 进行转染,然后根据施用的物质将动物模型组分别分类为施用1X PBS的组 (VC),施用上述实施例5中MARC1 GalNAc-asiRNA的组 (OLX-075-2,OLX-075-4,OLX-075-5,OLX-075-6,OLX-075-8,OLX-075-12,OLX-075-16,OLX-075-18),以及施用上述实施例6中OLX-031-2的组。在本实施例中,对上述动物模型组的具体分类如下表19所示。

[0241] 【表19】

组	剂量	治疗	次数
1	0	VC (1xPBS)	4
2	3mpk	OLX-075-2	5
3	3mpk	OLX-075-4	4
4	3mpk	OLX-075-5	4
5	3mpk	OLX-075-6	4
6	3mpk	OLX-075-7	4
7	3mpk	OLX-075-12	4
8	3mpk	OLX-075-16	5
9	3mpk	OLX-075-18	5
10	3mpk	OLX-031-2	4

[0243] 此外,从被所述质粒转染起4周时皮下注射了MARC1 GalNAc-asiRNA,从所述施用时间点起一周后采集血样,并通过Phospha-Light™ SEAP报告基因检测系统 (Invitrogen™,T1015) 确认了SEAP报告荧光水平,从而比较了人MARC1 mRNA的表达抑制水

平。

[0244] 结果如图28所示,显示出MARC1 mRNA根据处理9种MARC1 GalNAc-asiRNA的表达抑制效果,其中,表达抑制效果在OLX-075-12、OLX-075-16、OLX-075-17、OLX-075-5、OLX-075-8或OLX-075-2施用组中更优异。

[0245] 7-2. 利用双萤光素酶报告评估表达抑制效果

[0246] 用包括人MARC1基因的质粒(psiCHECK-2-hMARC1)对六周龄Balb/c小鼠进行转染,然后皮下注射了3mpk上述实施例5中的MARC1 GalNAc-asiRNA(OLX-075-2、OLX-075-4、OLX-075-5、OLX-075-6、OLX-075-8、OLX-075-12、OLX-075-16、OLX-075-17、OLX-075-18)。从所述施用时间点起三天后采集血样,通过双荧光素酶报告基因系统(Dual-Luciferase® Reporter Assay System)(Promega,E1980)确认了荧光素酶报告的荧光水平,从而测量了人MARC1 mRNA的表达抑制水平。结果如图29所示,具有各种化学修饰的实施例5的MARC1 GalNAc-asiRNA施用组均表现出优异的MARC1 mRNA表达抑制效果,其中,表达抑制效果在OLX-075-16、OLX-075-17、OLX-075-12、OLX-075-8、OLX-075-8施用组中更优异。

[0247] 以上对本发明的具体部分进行了详细描述,对于所属领域的技术人员而言,这些具体技术仅为优选实施方案,明确的是本发明的范围并不受限于此。因此,本发明的实际范围由所附权利要求以及其等同物而定义。

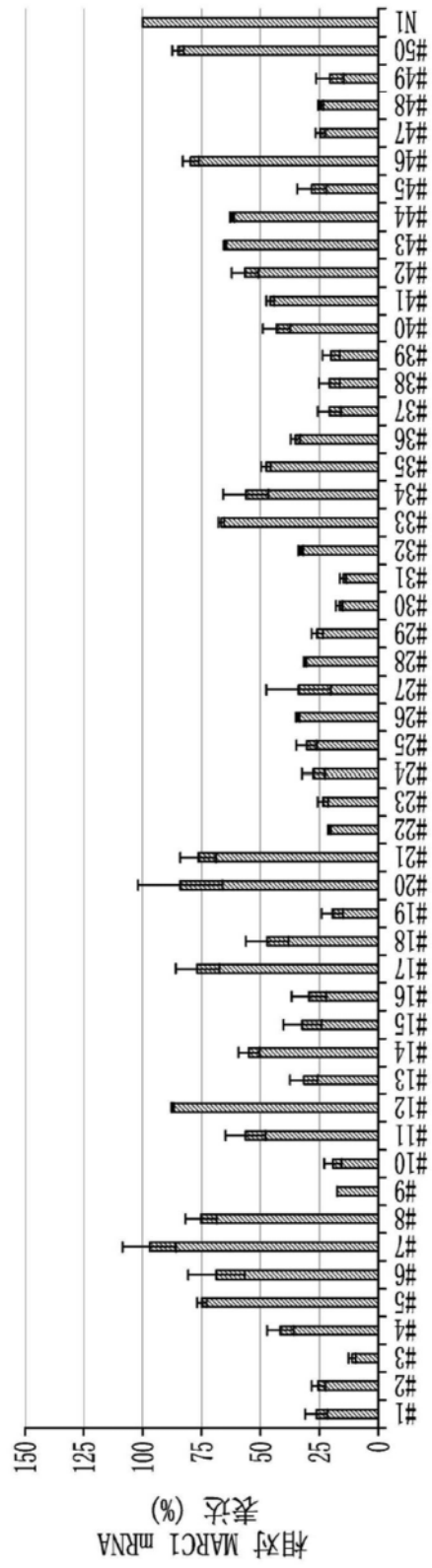


图1

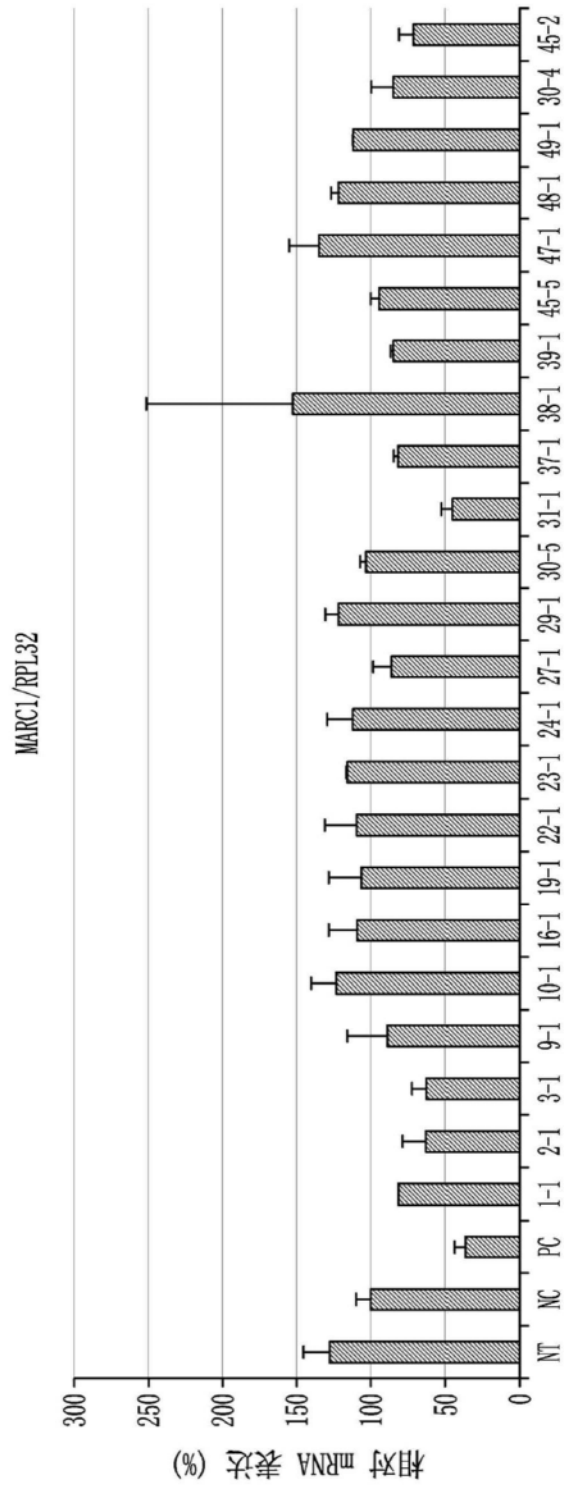


图2

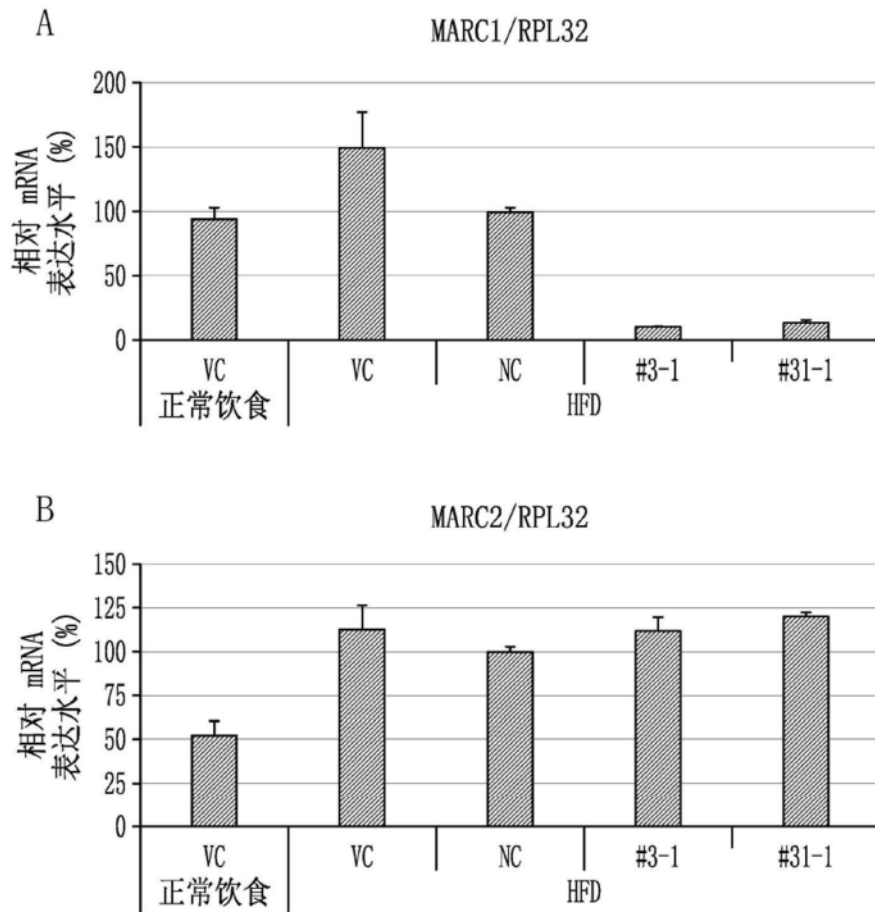


图3

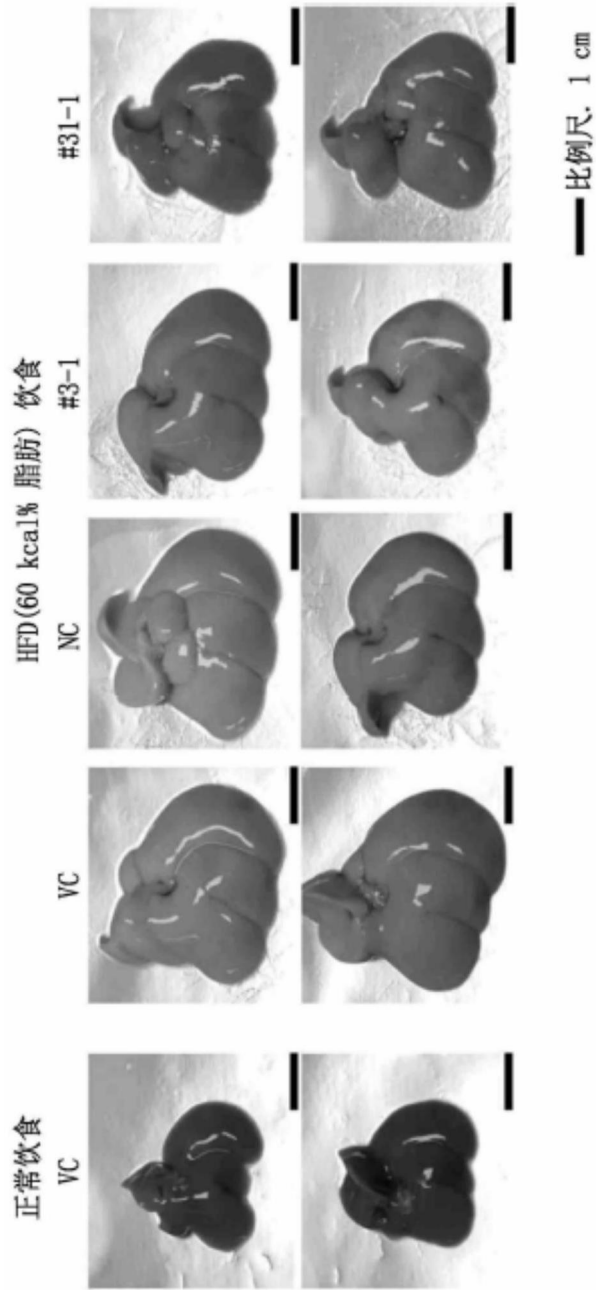


图4

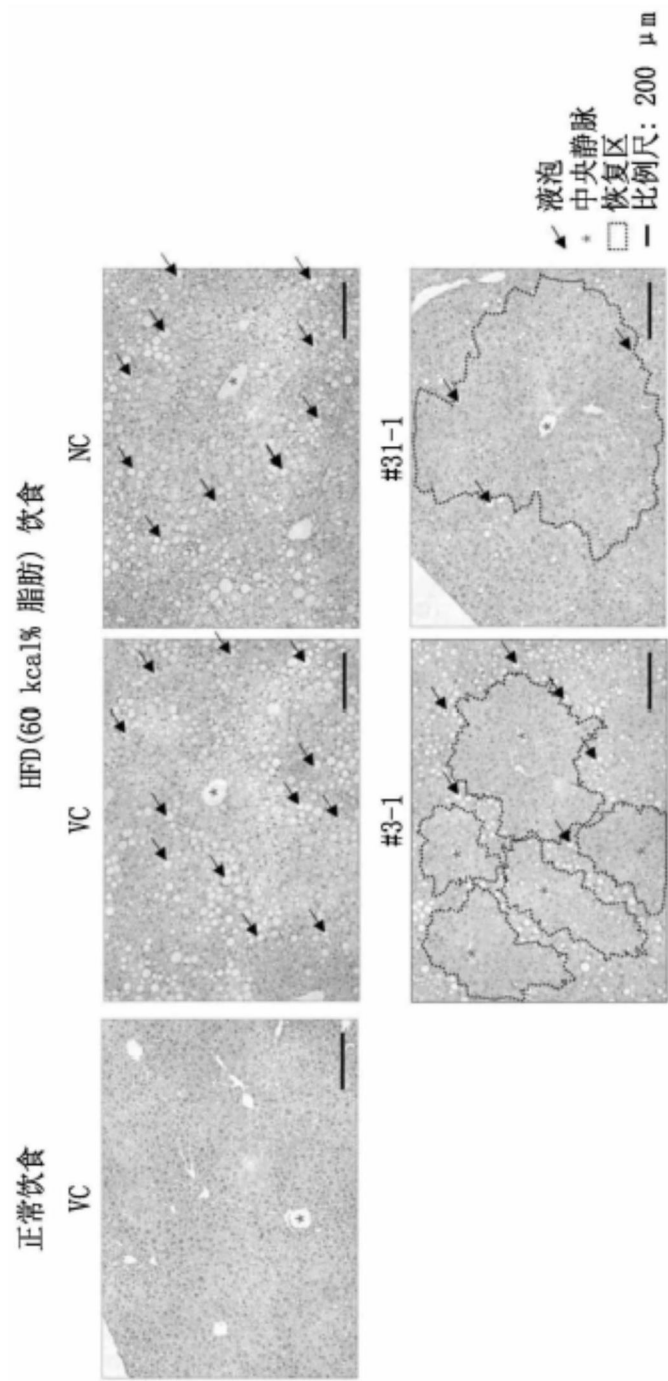


图5

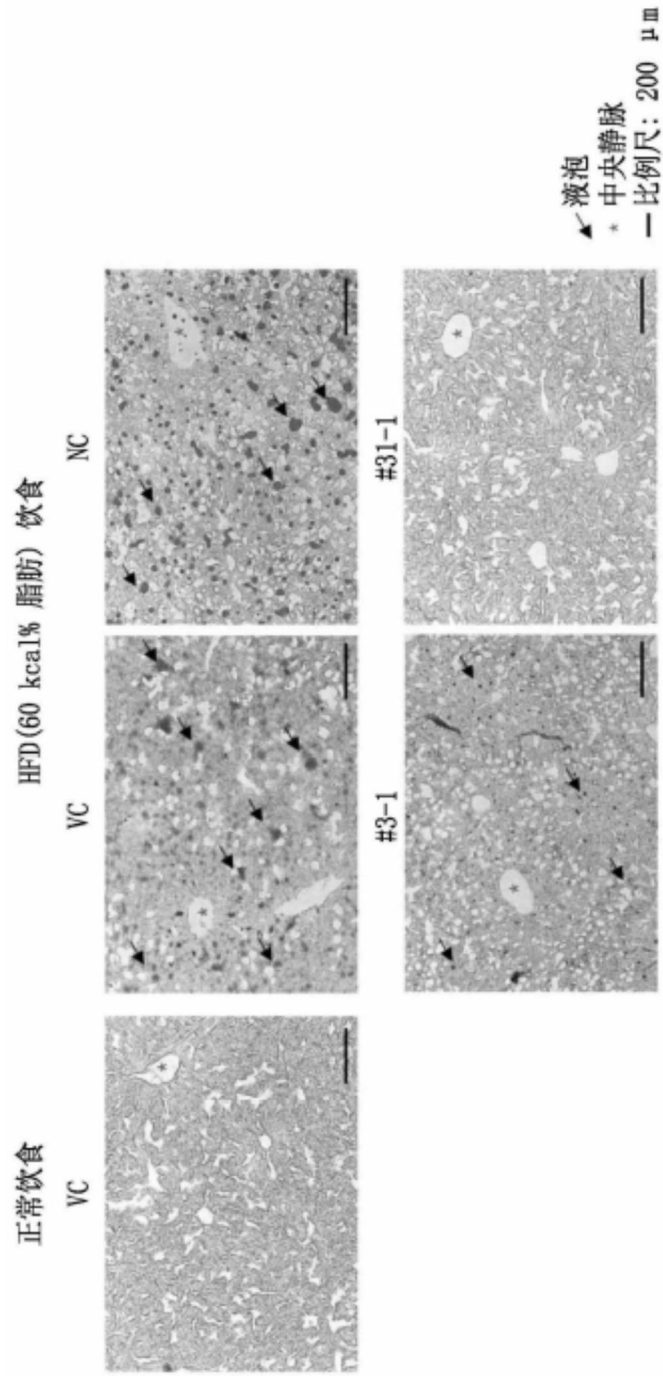


图6

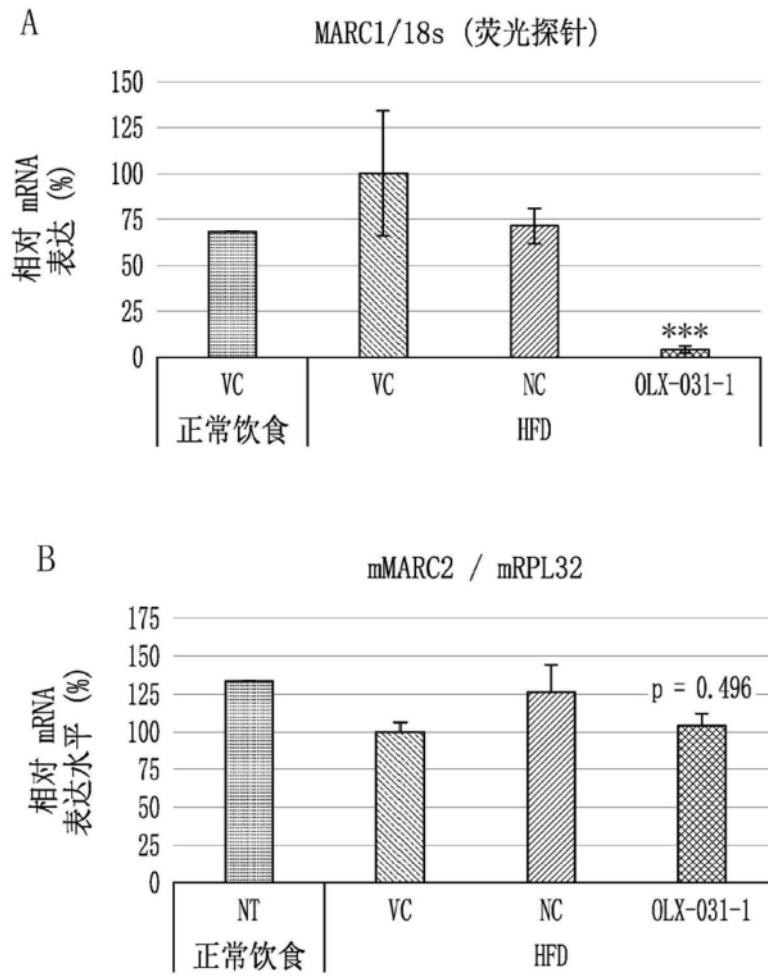


图7

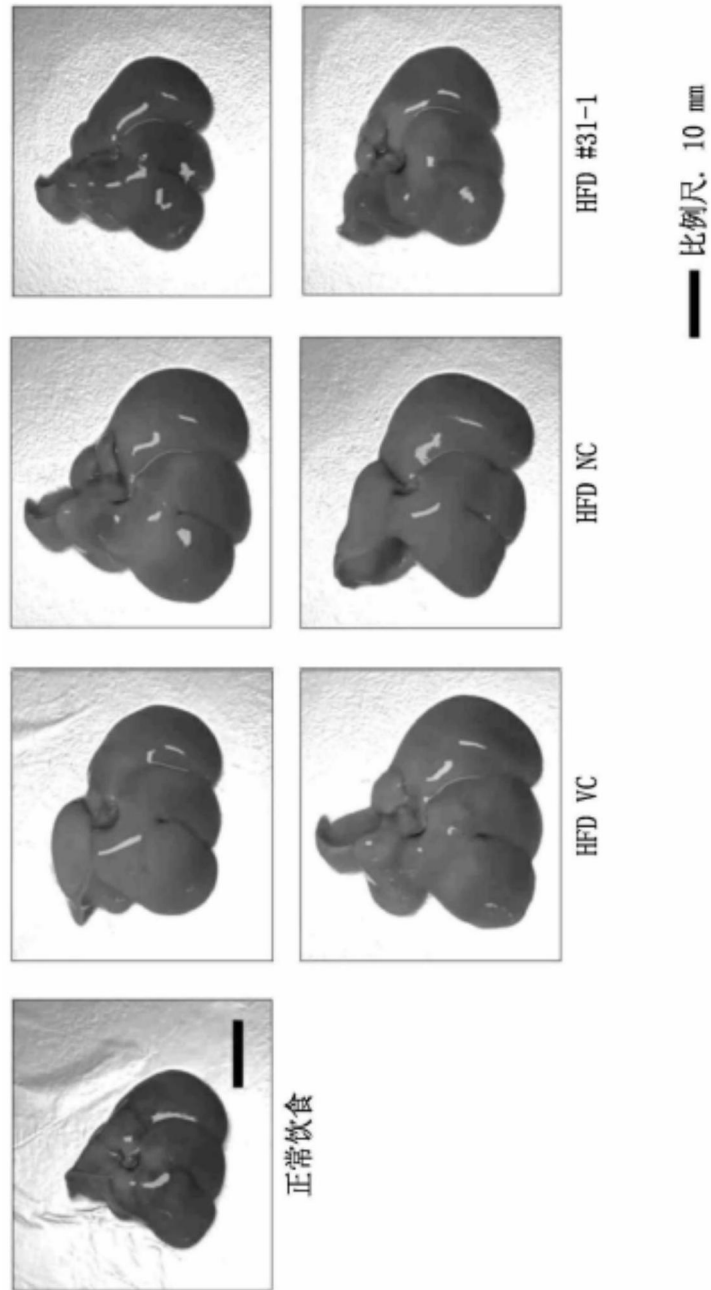


图8

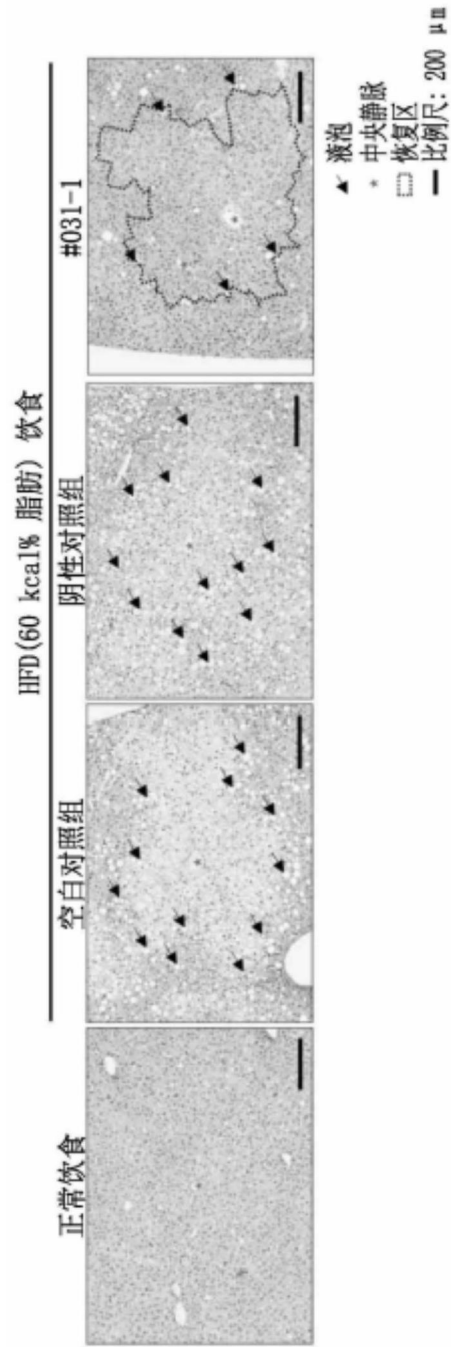


图9

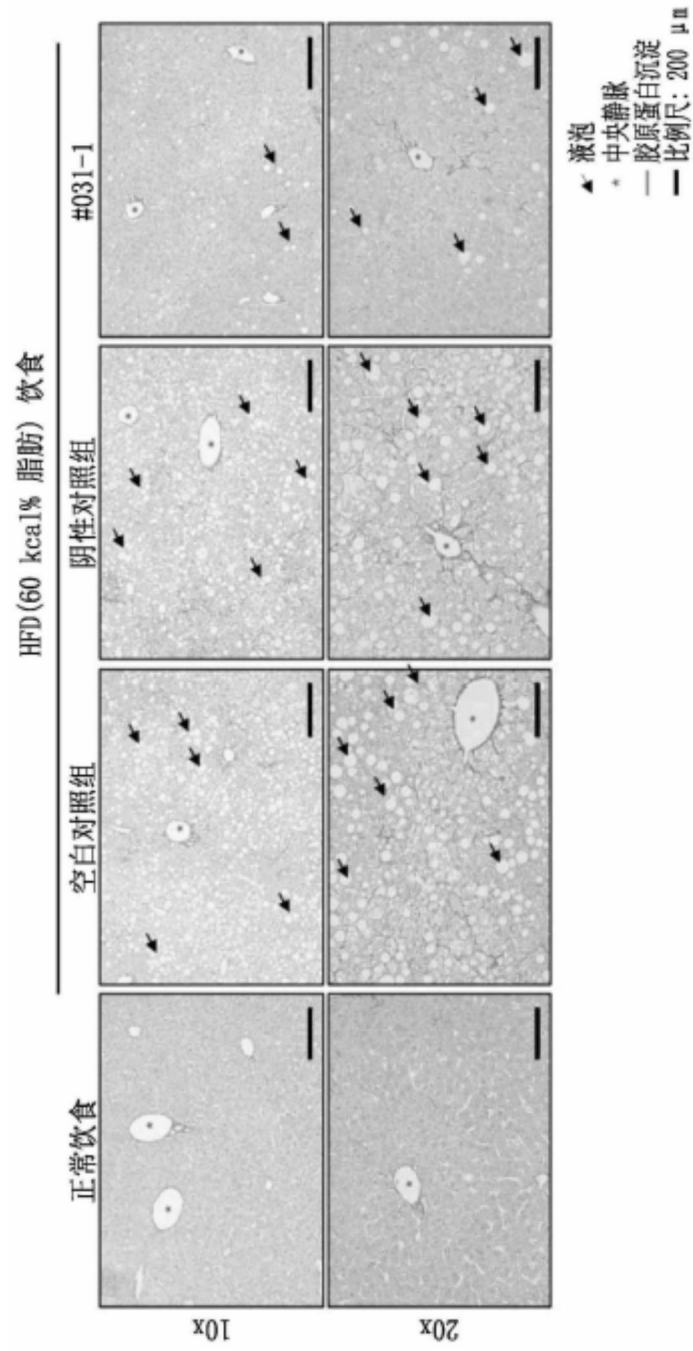


图10

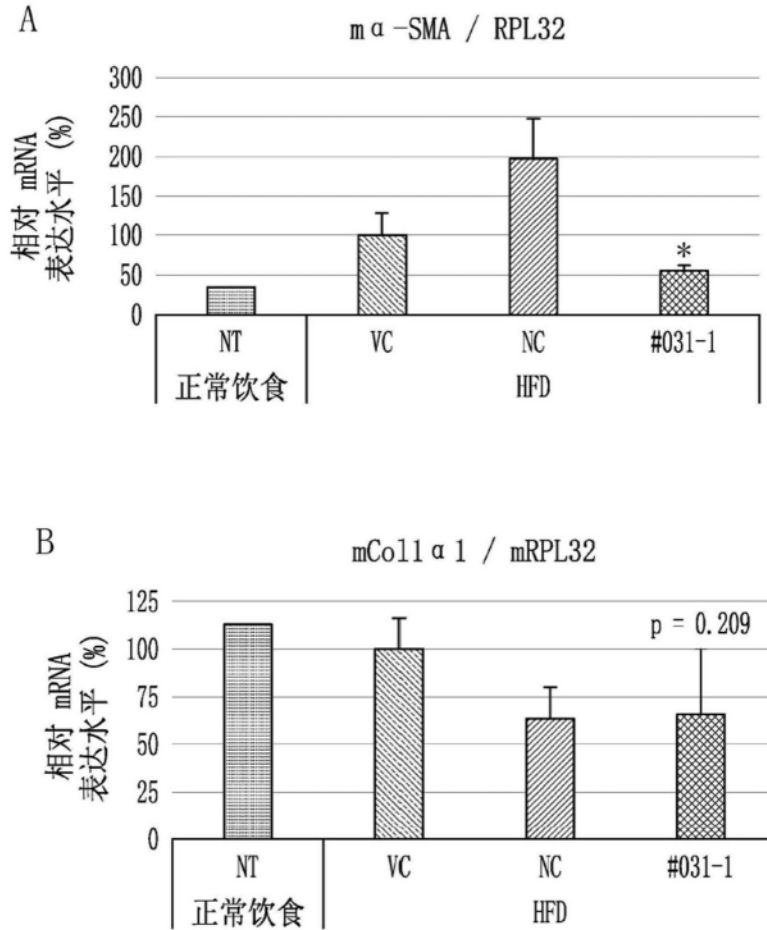


图11

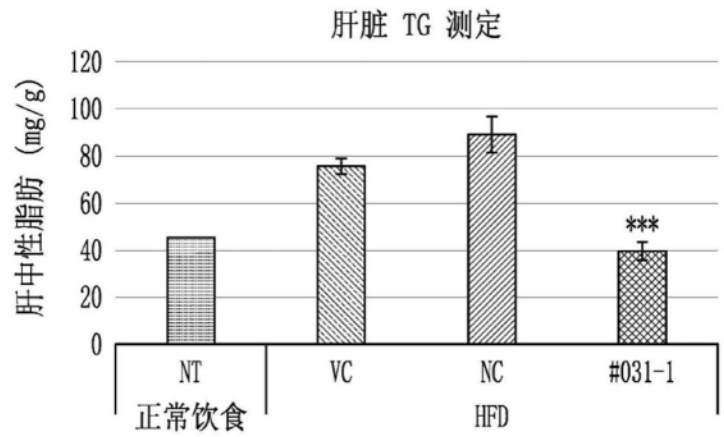


图12

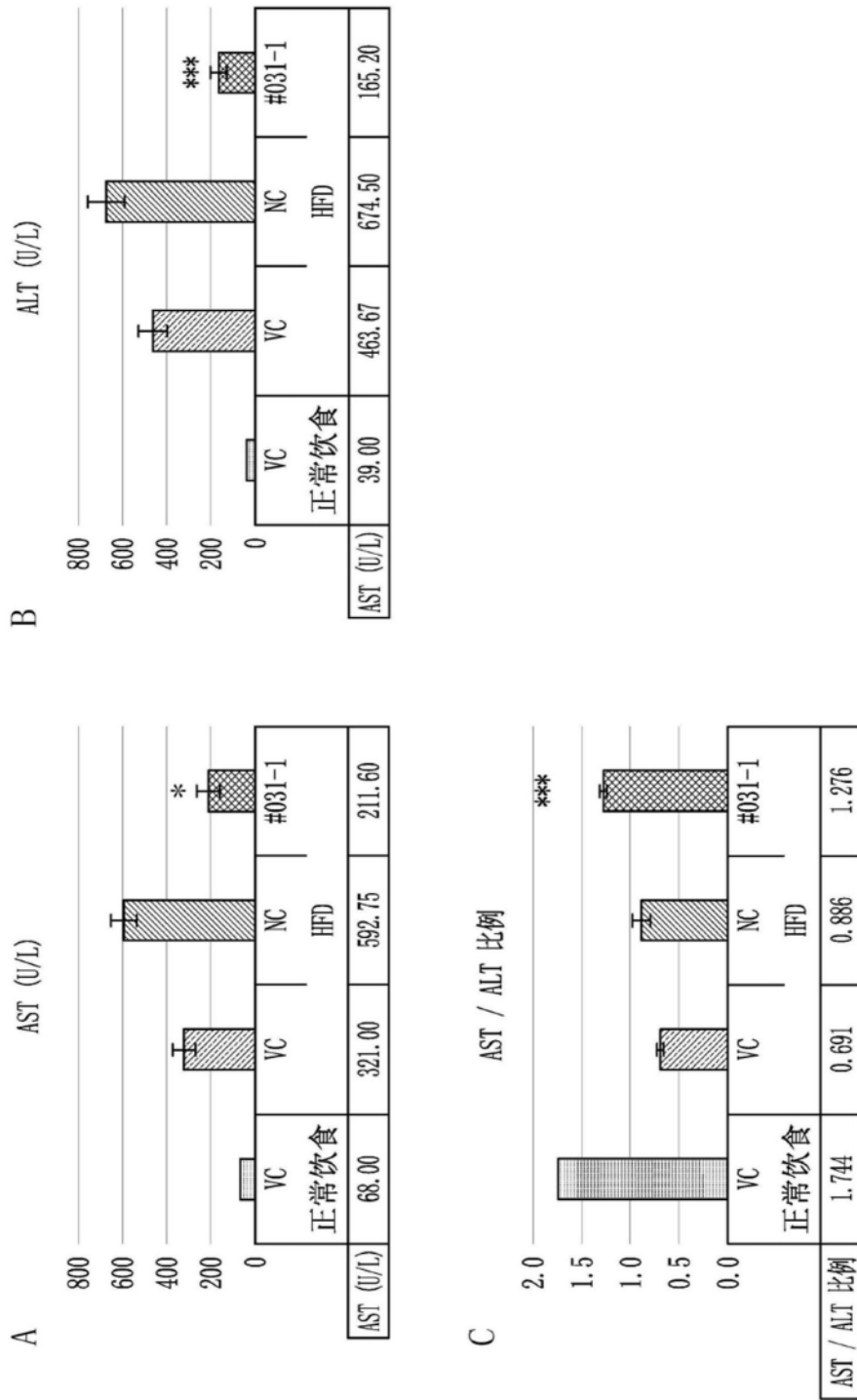


图13

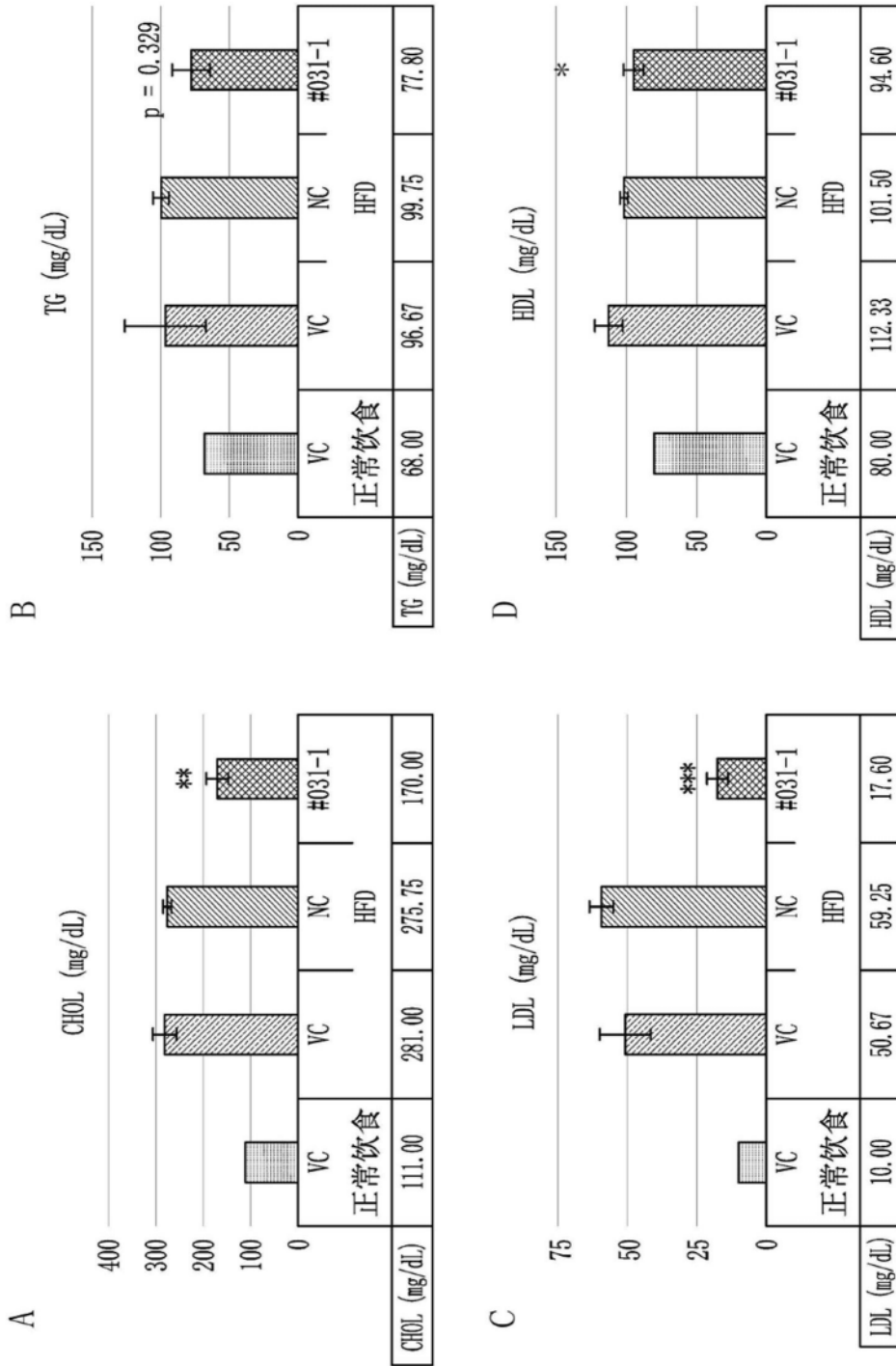


图14

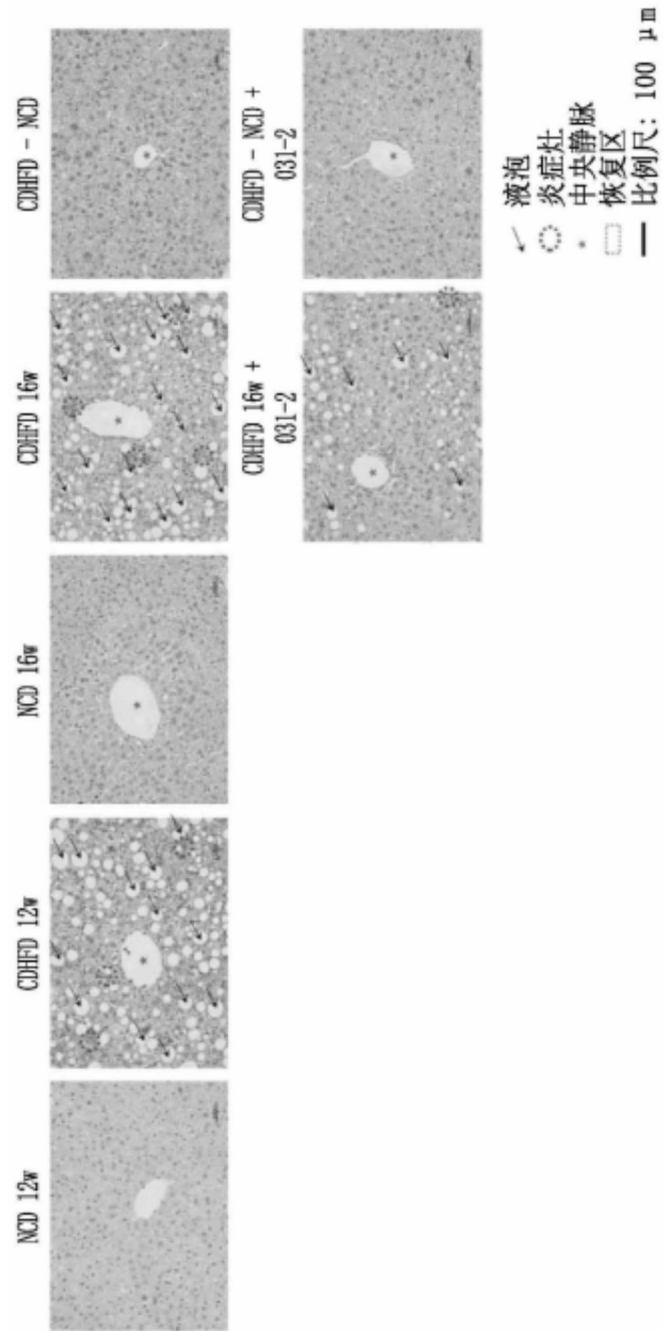


图15

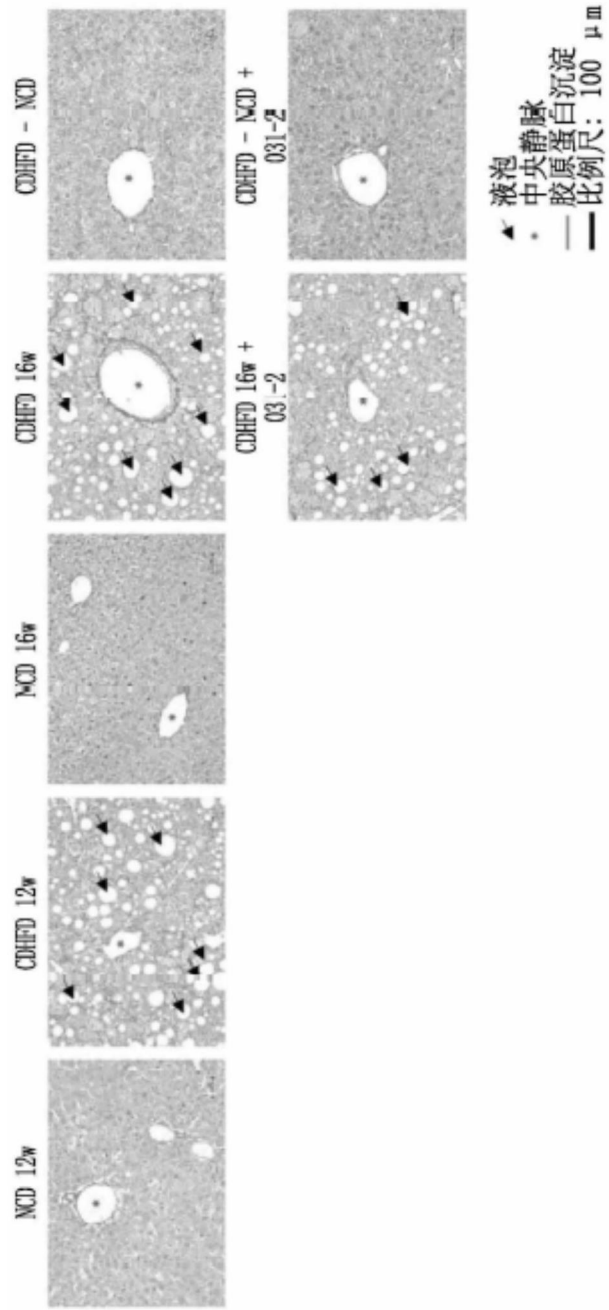


图16

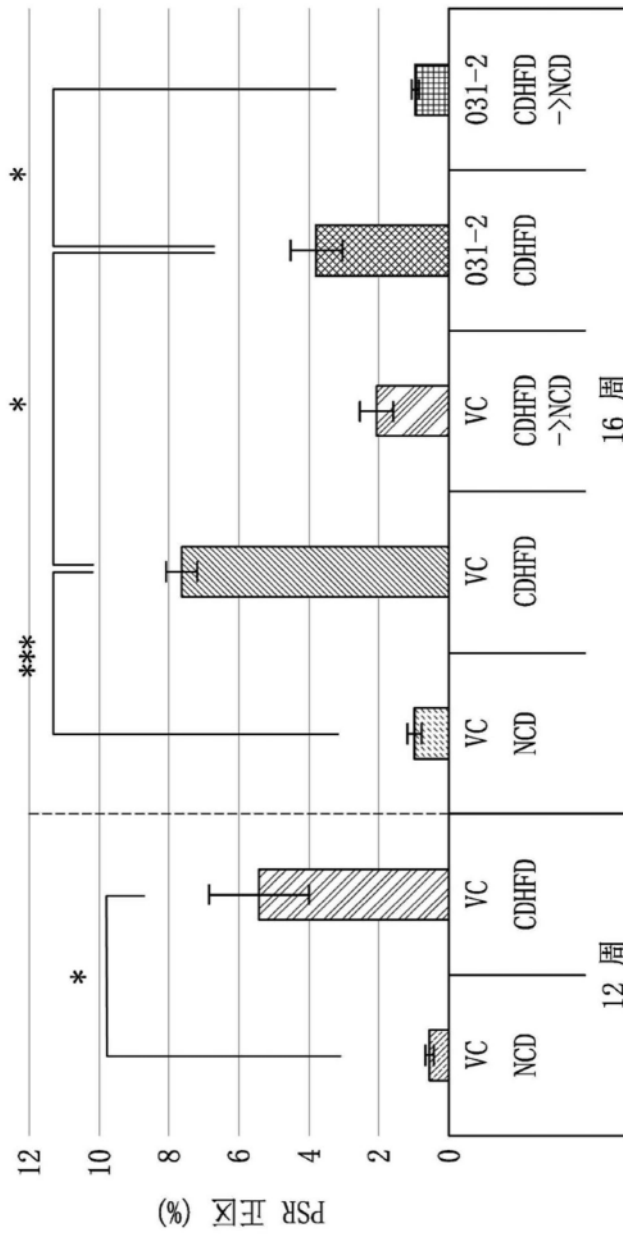


图17

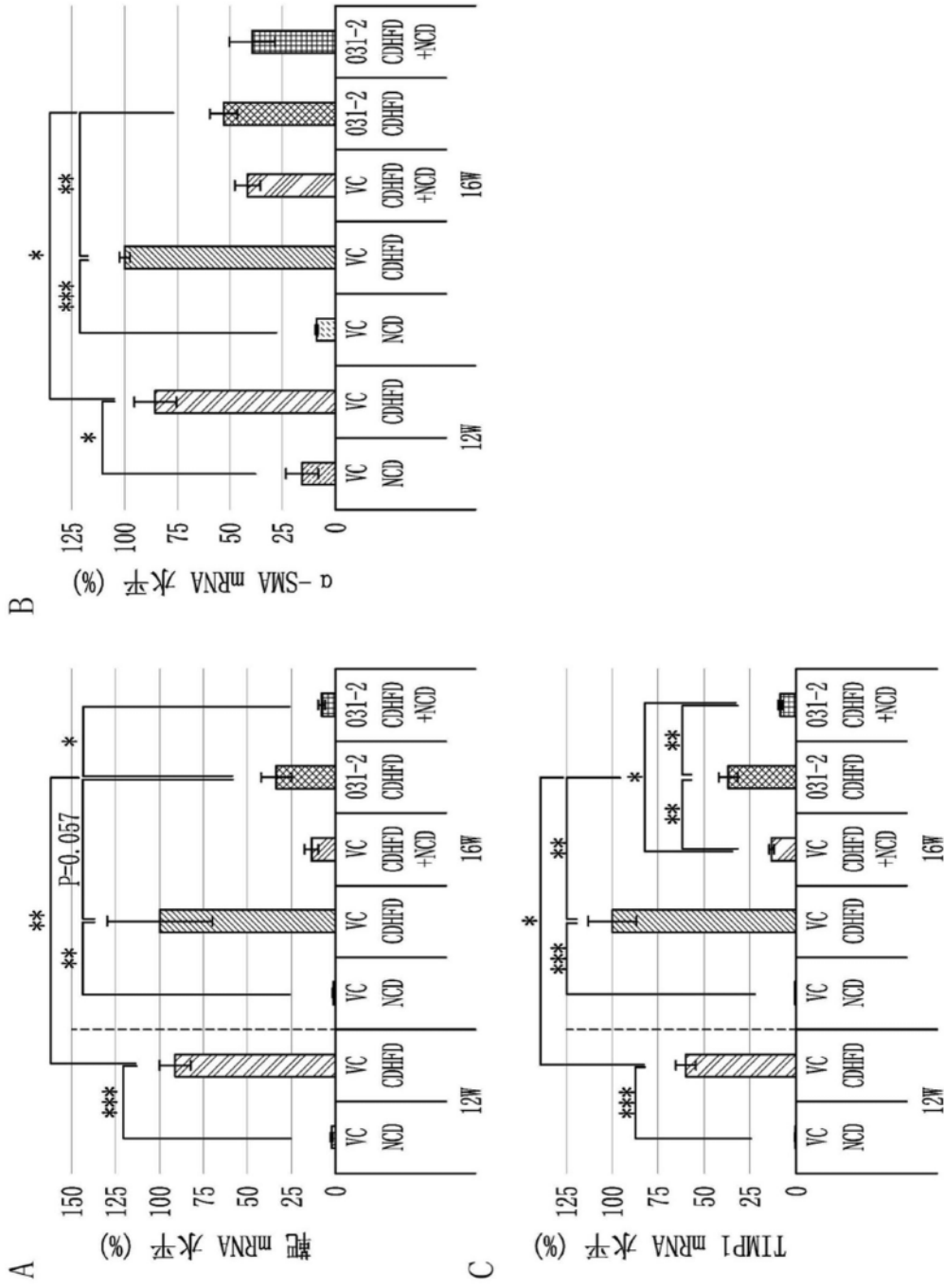


图18

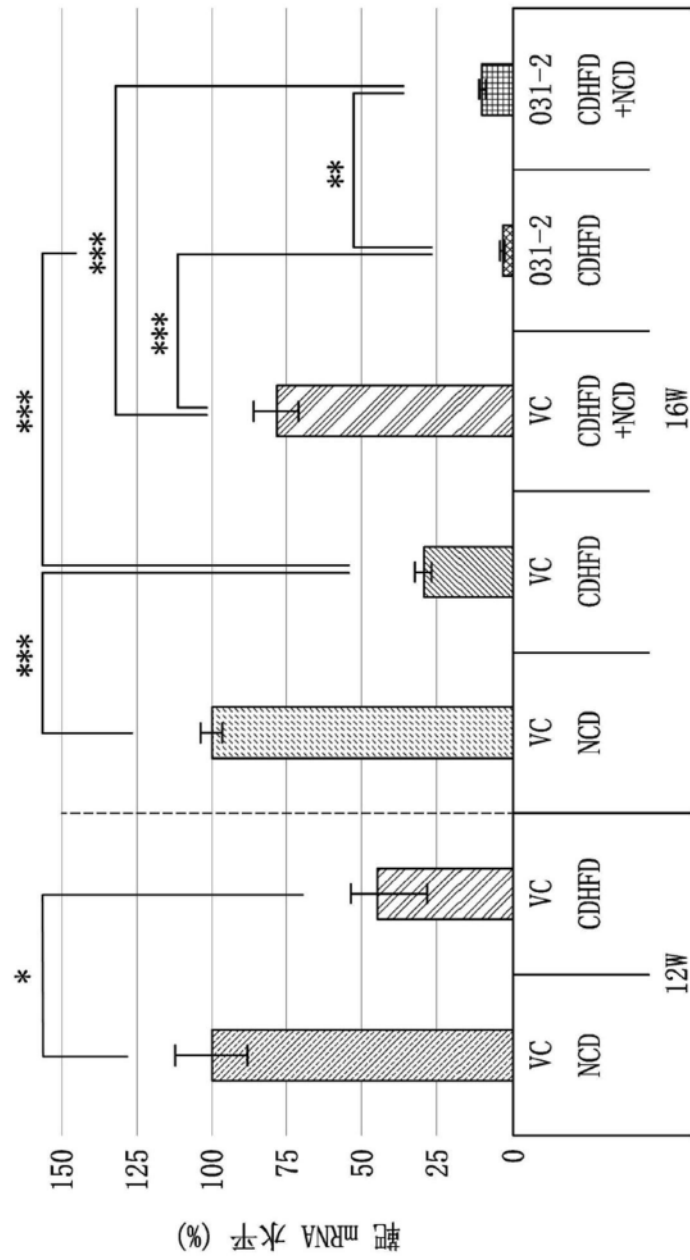


图19

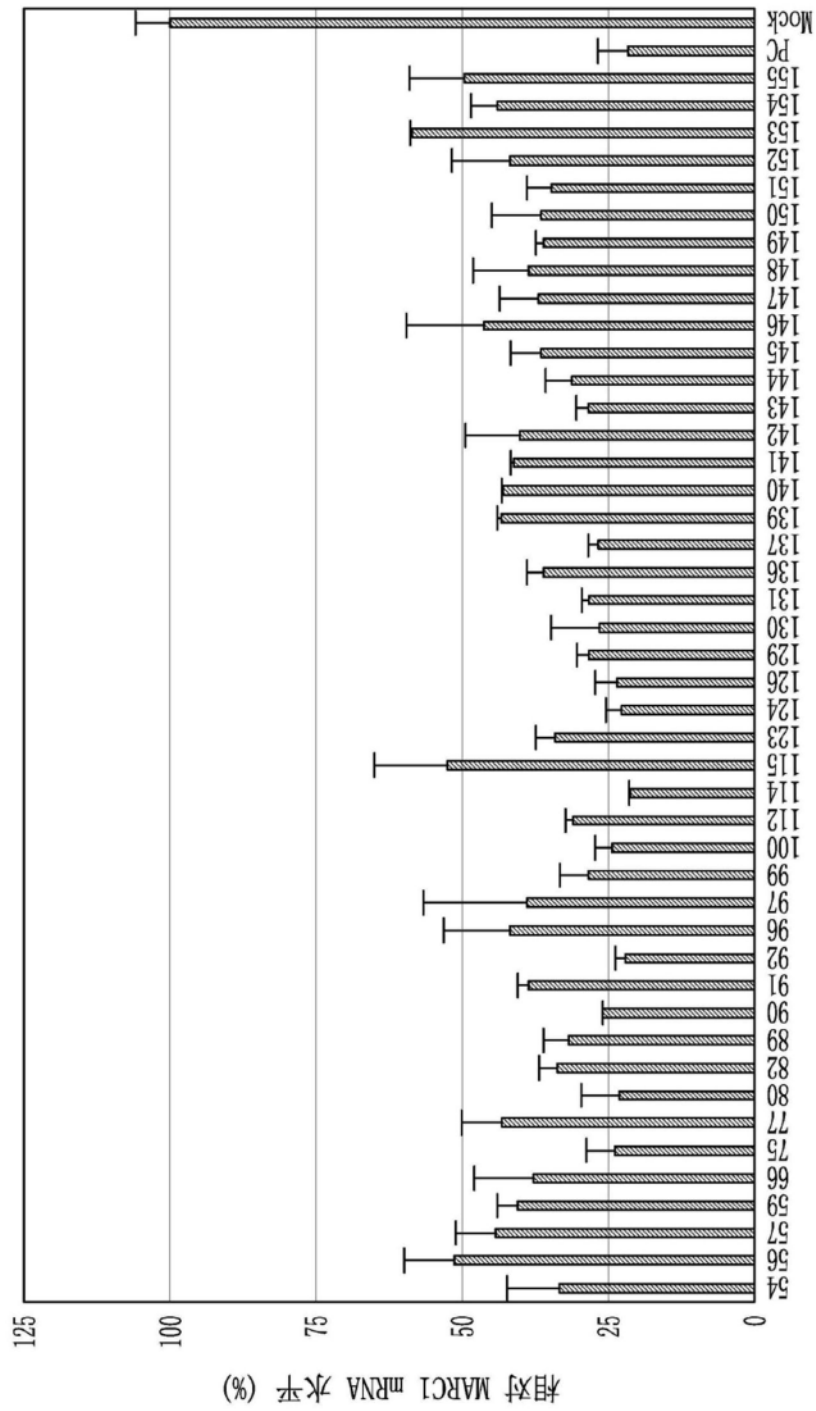


图20a

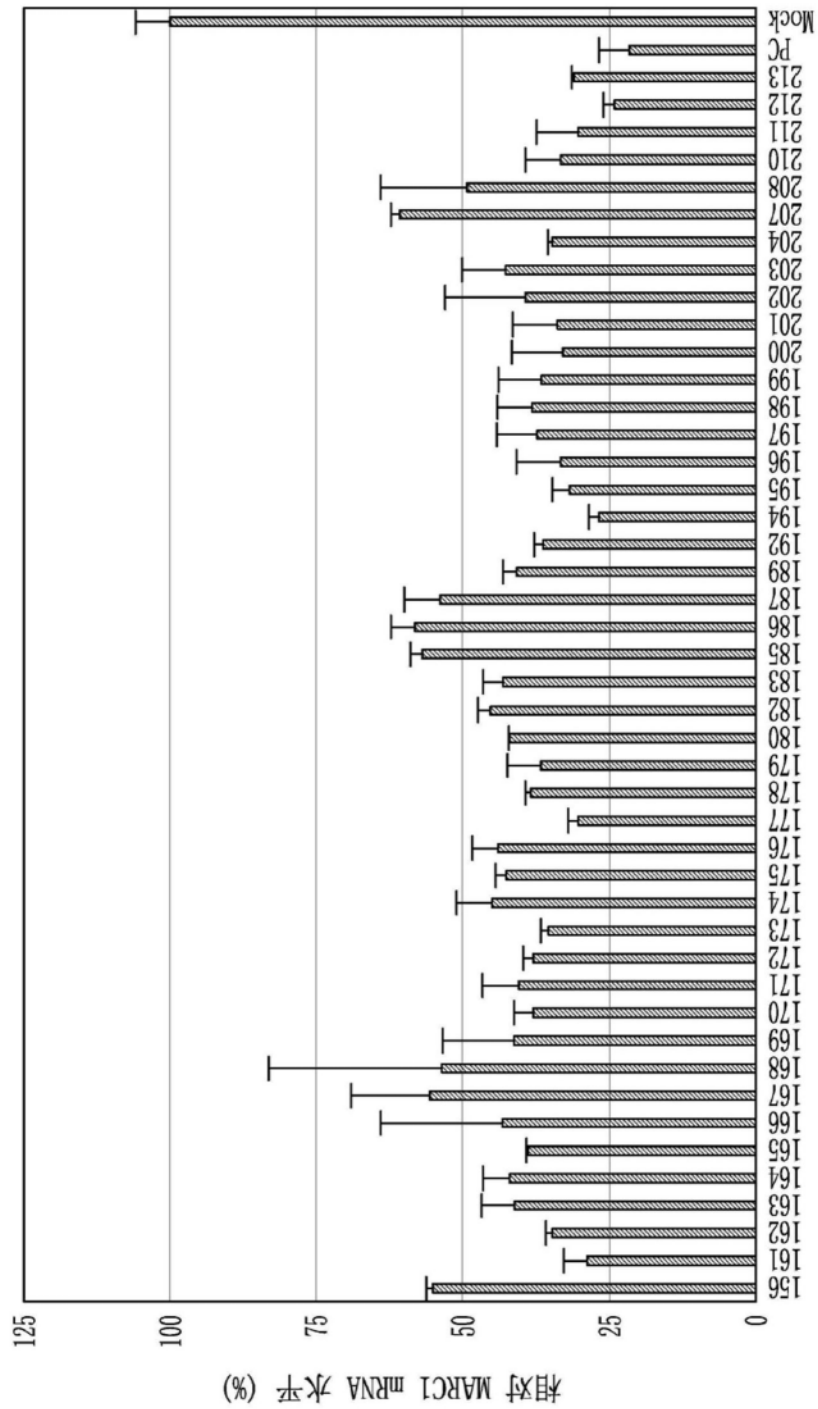


图20b

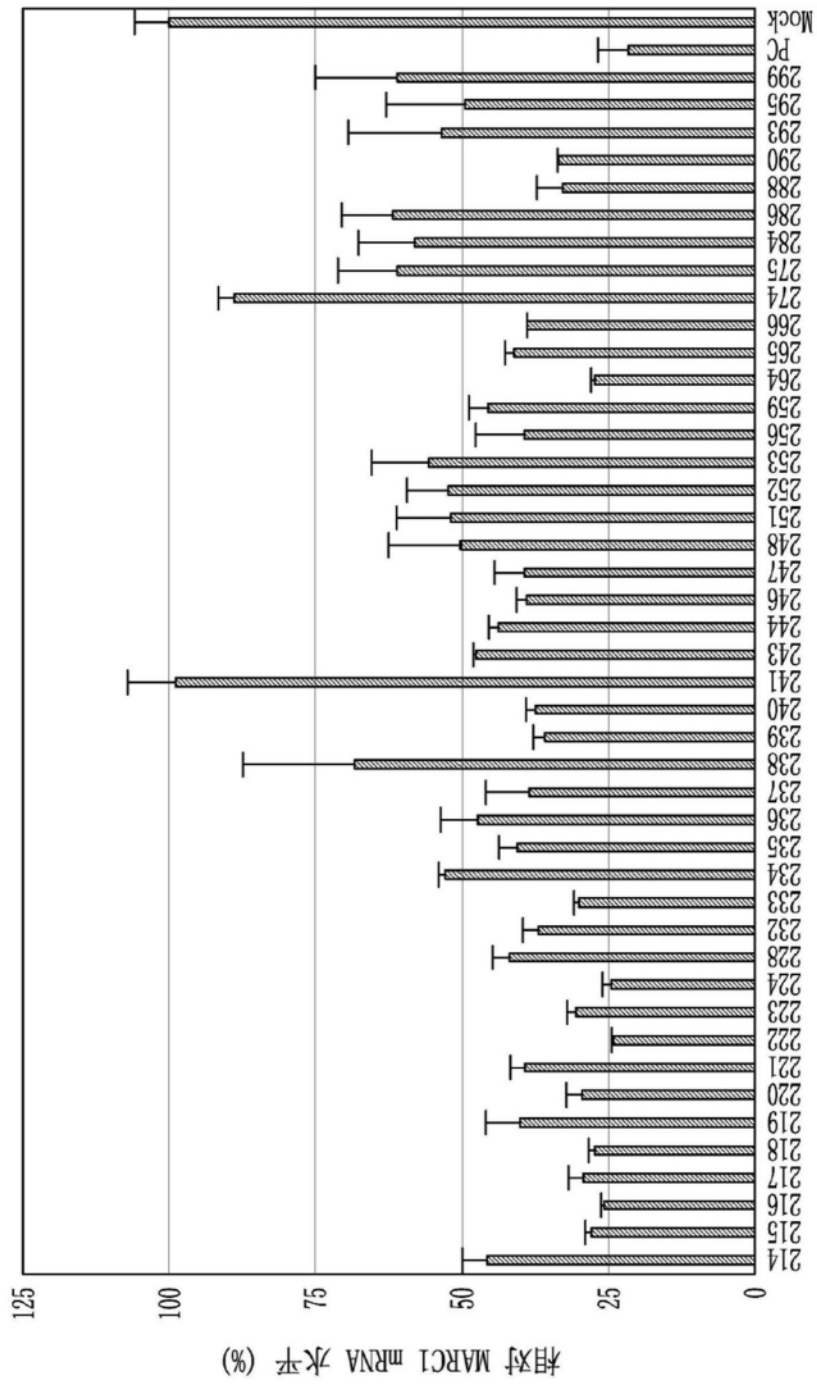


图20c

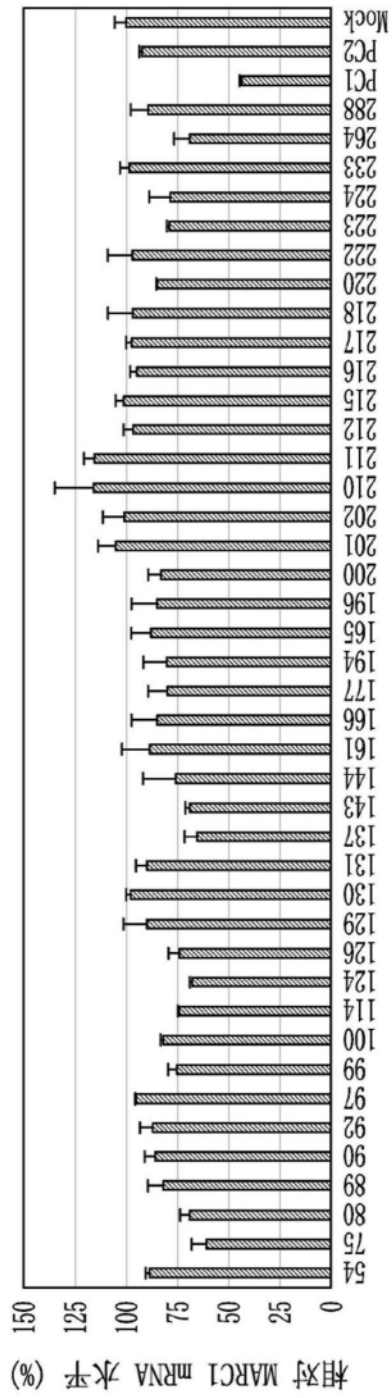


图21

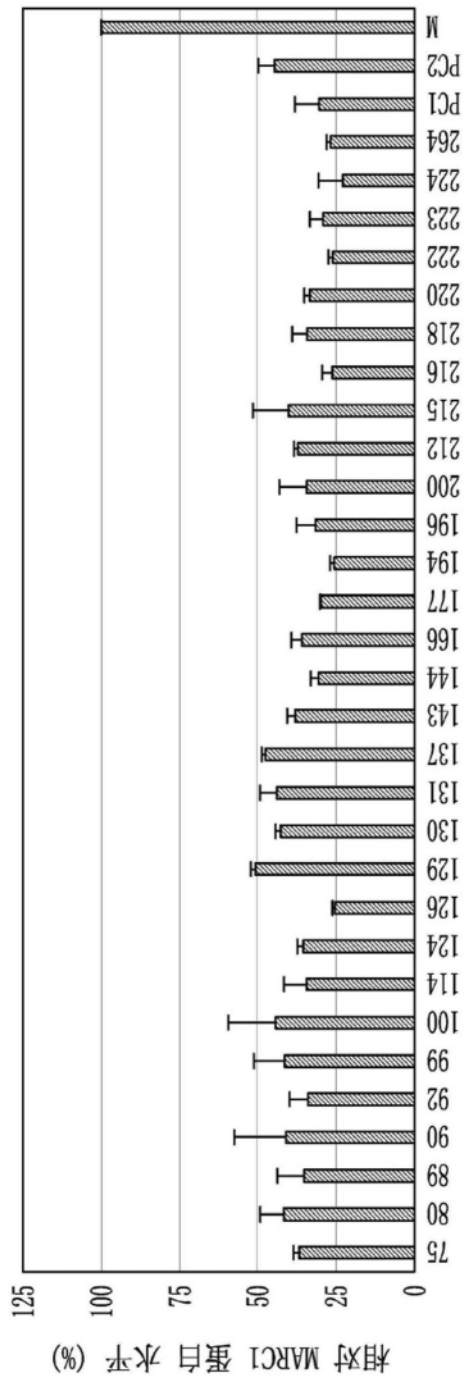


图22

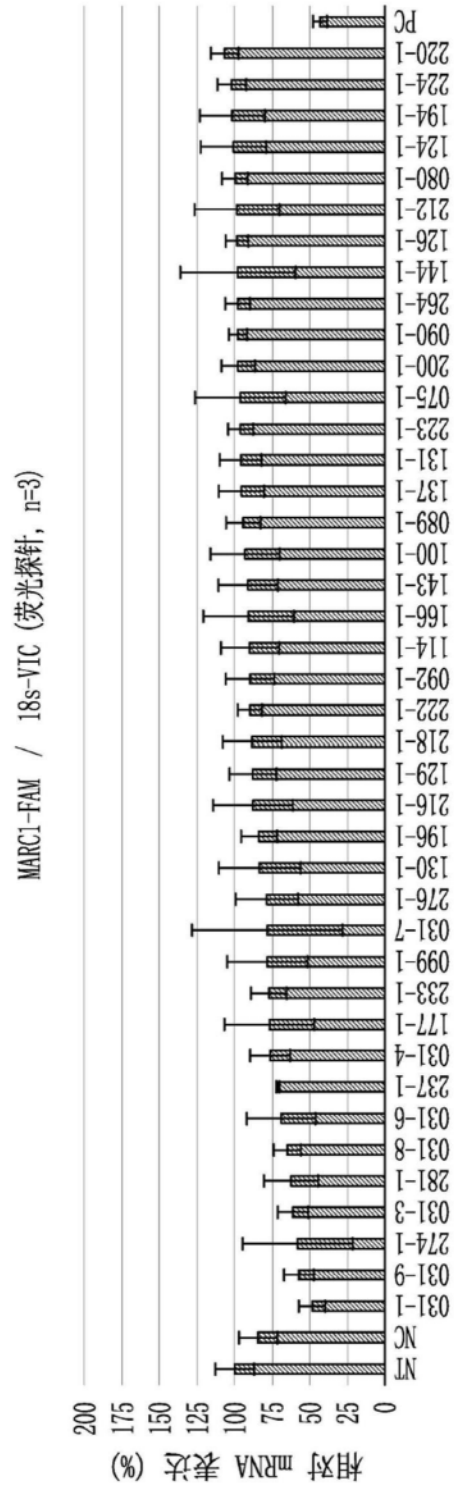


图23

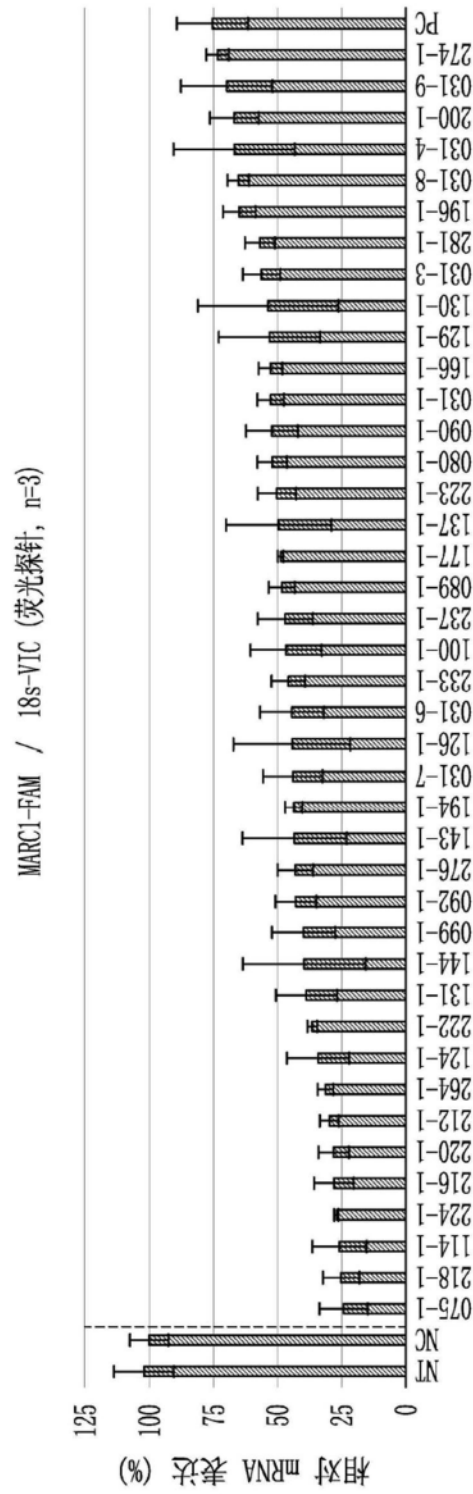


图24

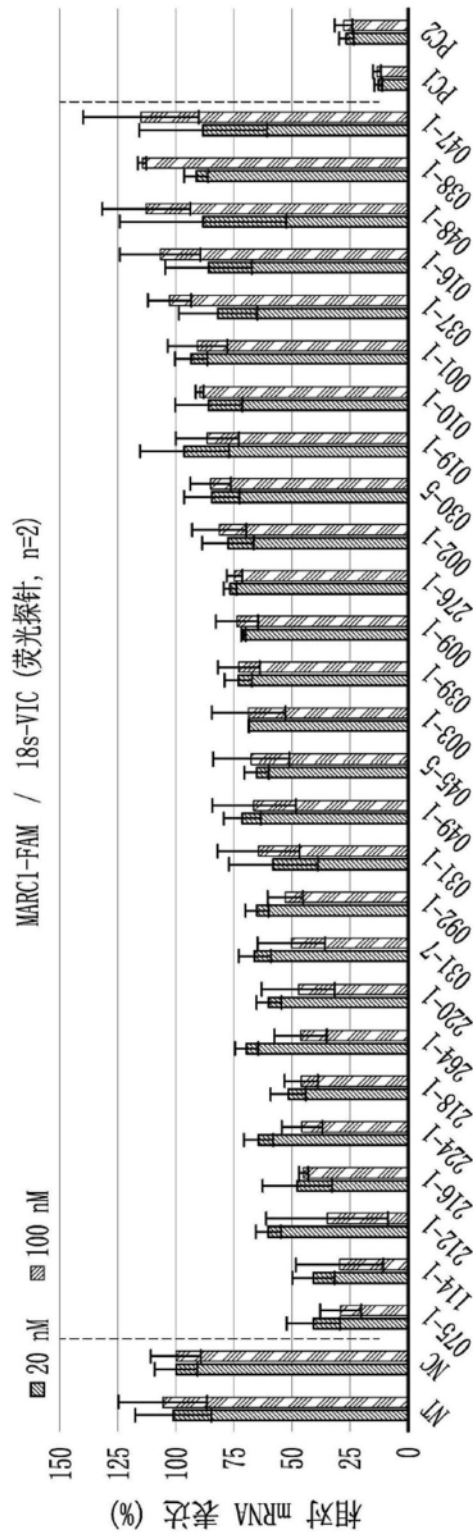


图25

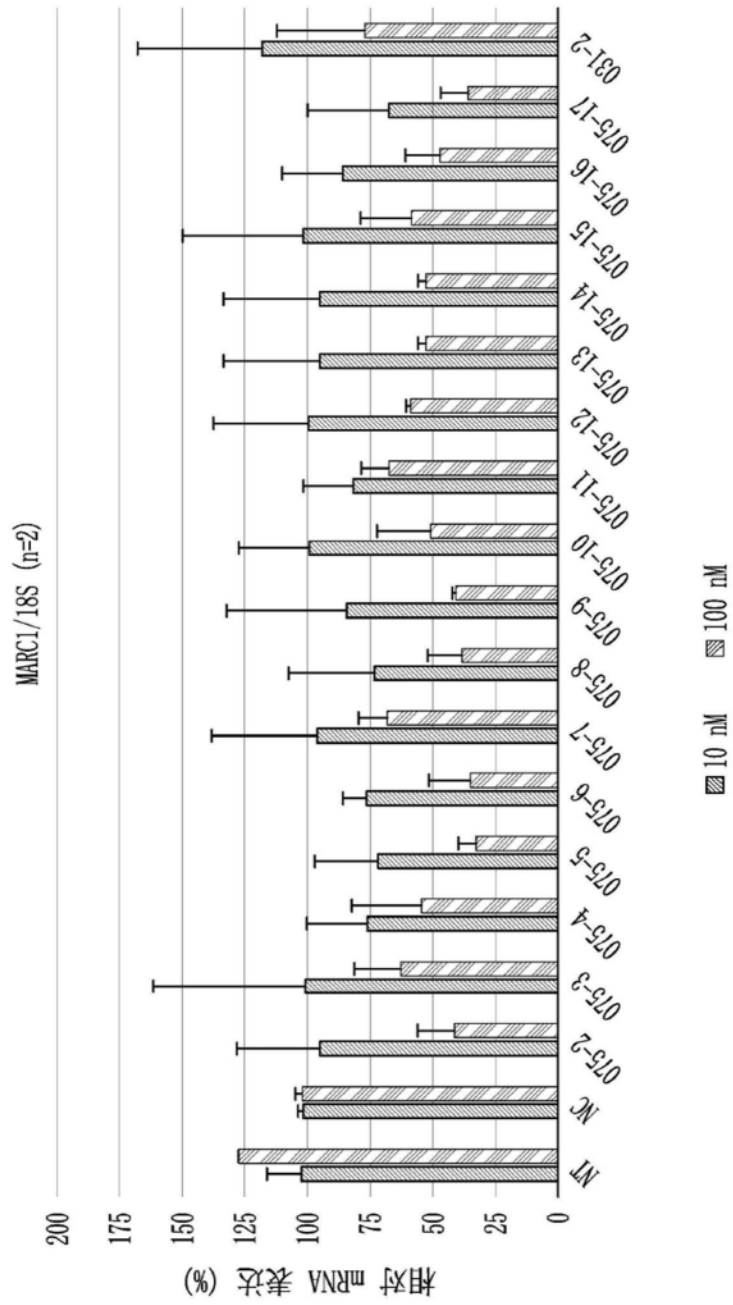


图26

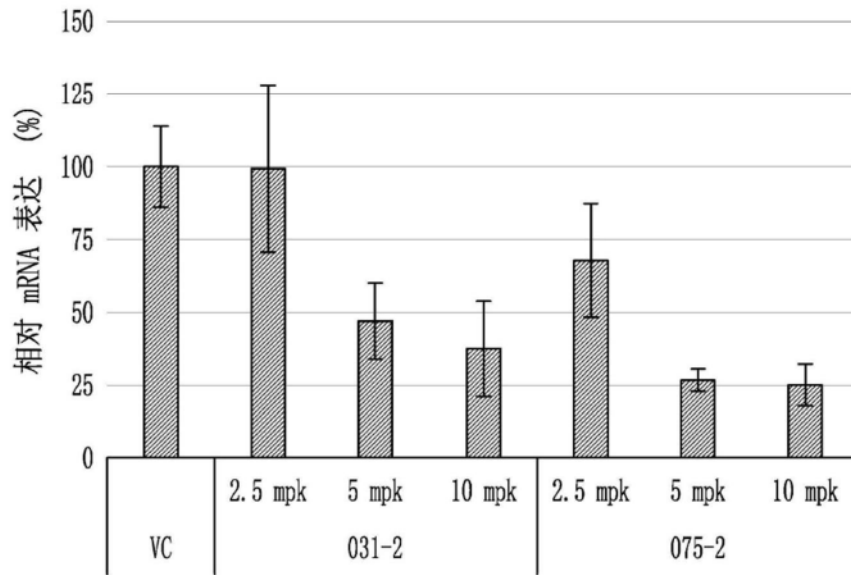


图27

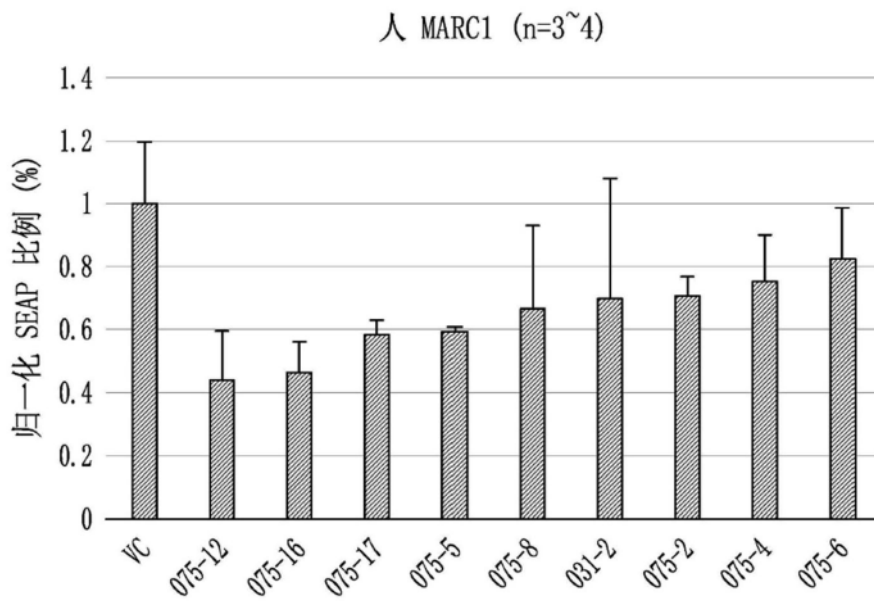


图28

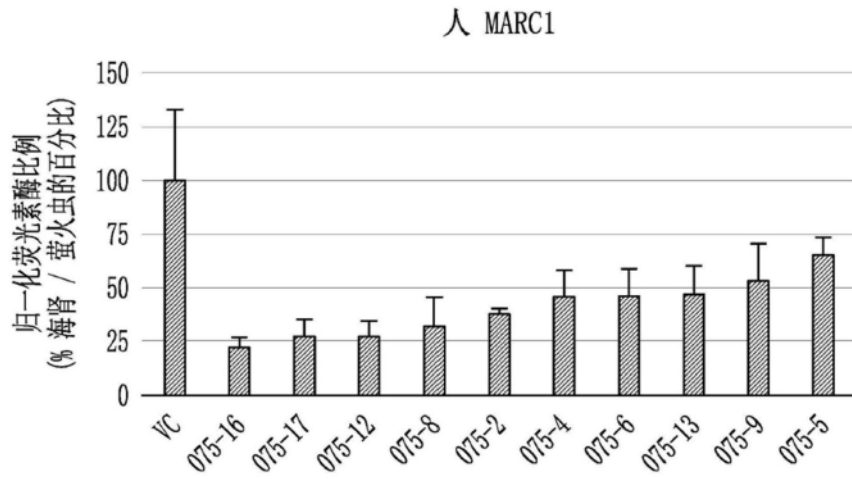


图29