

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0010593
(43) 공개일자 2023년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0084498
 (22) 출원일자 2022년07월08일
 심사청구일자 없음

(30) 우선권주장
 1020210089864 2021년07월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
 올릭스 주식회사
 경기도 수원시 영통구 대학4로 17, 1014호 (이의동, 에이스광교타워1)

(72) 발명자
 홍선우
 경기도 용인시 수지구 동천로113번길 10, 1201동 2303호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 2단지)

박준현
 경기도 수원시 장안구 금당로39번길 34, 208동 503호 (조원동, 주공뉴타운)

최정용
 경기도 수원시 장안구 경수대로976번길 22, 111동 2102호(조원동, 수원 한일타운)

(74) 대리인
 리앤목특허법인

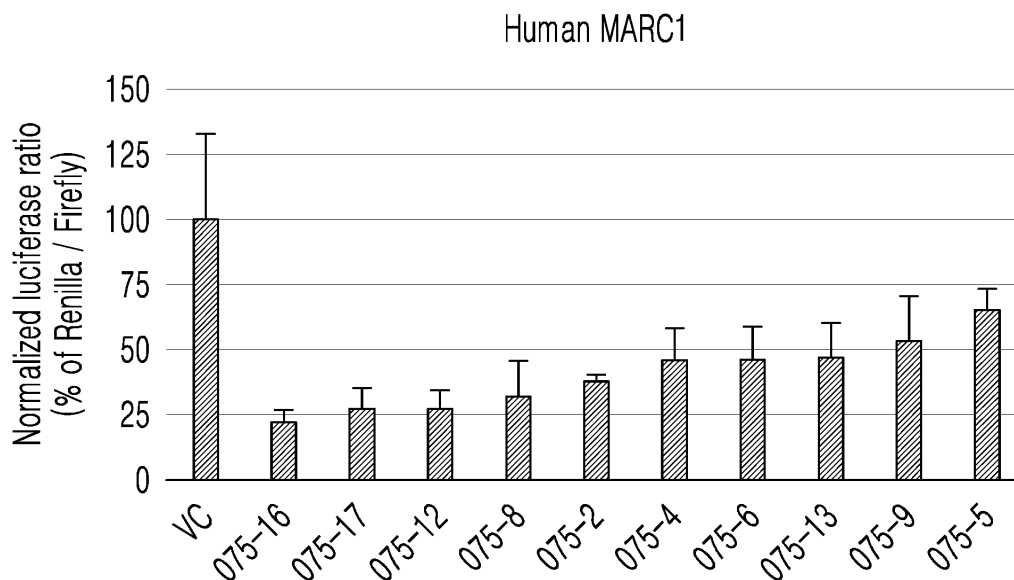
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 MARC1 유전자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 MARC1(Mitochondrial amidoxime reducing component 1) 유전자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 MARC1 mRNA 서열에 대해 서열 상보성을 갖는 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNAi 제제 및 상기 RNAi 제제를 포함하는 비알콜성 지방간질환 등의 간질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도29



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

C07H 21/02 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/31 (2013.01)

C12N 2310/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

MARC1(Mitochondrial amidoxime reducing component 1) mRNA 서열에 대해 서열 상보성을 갖는 길이가 19 내지 21 nt인 뉴클레오티드(nt)인 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 길이가 15 내지 17 nt인 센스 가닥을 포함하는 RNAi 제제로서,

상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 상기 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 RNAi 제제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 표 1, 표 10, 표 11, 표 12, 표 13, 및 표 14에 열거된 안티센스 가닥 서열로부터 선택된 서열을 갖는 것인, RNAi 제제.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호 149, 서열번호 159, 서열번호 177, 서열번호 179, 서열번호 183, 서열번호 197, 서열번호 199, 서열번호 227, 서열번호 247, 서열번호 251, 서열번호 257, 서열번호 259, 서열번호 261, 서열번호 273, 서열번호 285, 서열번호 287, 서열번호 331, 서열번호 353, 서열번호 387, 서열번호 391, 서열번호 399, 서열번호 423, 서열번호 429, 서열번호 431, 서열번호 435, 서열번호 439, 서열번호 443, 서열번호 445, 서열번호 447, 및 서열번호 527로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, RNAi 제제.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 서열번호 61, 서열번호 149, 서열번호 183, 서열번호 227, 서열번호 423, 서열번호 431, 서열번호 435, 서열번호 439, 서열번호 447, 서열번호 527, 및 서열번호 551로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, RNAi 제제.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 표 1, 표 10, 표 11, 표 12, 표 13, 및 표 14에 열거된 센스 가닥 서열로부터 선택된 서열을 갖는 RNAi 제제.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 150, 서열번호 160, 서열번호 178, 서열번호 180, 서열번호 184, 서열번호 198, 서열번호 200, 서열번호 228, 서열번호 248, 서열번호 252, 서열번호 258, 서열번호 260, 서열번호 262, 서열번호 274, 서열번호 286, 서열번호 288, 서열번호 332, 서열번호 354, 서열번호 388, 서열번호 392, 서열번호 400, 서열번호 424, 서열번호 430, 서열번호 432, 서열번호 436, 서열번호 440, 서열번호 444, 서열번호 446, 서열번호 448, 및 서열번호 528로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, RNAi 제제.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 62, 서열번호 150, 서열번호 184, 서열번호 228, 서열번호 424, 서열번호 432, 서열번호 436, 서열번호 440, 서열번호 448, 서열번호 528, 및 서열번호 552로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, RNAi 제제.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 RNAi 제제는 MARC1의 발현을 억제하는 것인, RNAi 제제.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 3'말단에 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체와 결합되어 있는 것인, RNAi 제제.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 상기 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것인, RNAi 제제.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 센스 가닥은 하기로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는 것인 RNAi 제제:

5' 말단으로부터 인접한 2 내지 4개의 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형;

1개 이상의 뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(methyl), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F, -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, 또는 -O-3-디메틸아미노프로필로 치환; 및

3' 말단에 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체 또는 세포 침투 펩타이드와의 결합.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 하기로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는 것인 RNAi 제제:

3' 말단 또는 5' 말단으로부터 인접한 2 내지 7개의 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형;

1개 이상의 뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(methyl), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F, -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, 또는 -O-3-디메틸아미노프로필로 치환; 및

5' 말단에 인산기(phosphate group), 또는 E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate), 또는 세포 침투 펩타이드와의 결합.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 RNAi 제제는

센스 또는 안티센스 가닥에서 3'말단 또는 5' 말단으로부터 인접한 2 내지 7개의 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 변형;

센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 1개 이상의 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy) 또는 -F로 치환되는 변형;

센스 가닥의 3' 말단에 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체와의 결합; 및

안티센스 가닥의 5' 말단에 인산기(phosphate group) 또는 E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate)와의 결합;으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 것인, RNAi 제제.

청구항 14

청구항 10에 있어서, 상기 센스 가닥은 표 2, 표 15, 표 16, 및 표 17에 열거된 안티센스 가닥 서열로부터 선택된 서열을 갖는 것인, RNAi 제제.

청구항 15

청구항 10에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 표 2, 표 15, 표 16, 및 표 17에 열거된 안티센스 가닥 서열로부터 선택된 서열을 갖는 것인, RNAi 제제.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 RNAi 제제를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 간질환은 지방간, 간 섬유증 또는 간경변인 것인 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 지방간은 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)인 것인 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 비알콜성 지방간 질환은 단순 지방간증(simple steatosis) 또는 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)인 것인 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 RNAi 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 21

간질환을 예방 또는 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 RNAi 제제의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MARC1(Mitochondrial amidoxime reducing component 1) 유전자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 MARC1 mRNA 서열에 대해 서열 상보성을 갖는 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 센스 가닥을 포함하는 RNAi 제제 및 상기 RNAi 제제를 포함하는 비알콜성 지방간질환 등의 간질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 들어 비만 인구의 증가에 따른 대사증후군의 유병률 증가와 함께 비알콜성 지방간질환의 유병률도 증가 추세에 있다. 지방간은 간세포 내에 중성지방이 축적되는 질환으로 비만의 합병증으로 유발되거나, 또는 기타 다양한 원인, 예컨대, 알코올, 당뇨, 영양불량증, 약물의 남용 등에 의해서 유발되는 것으로 보고되고 있는데, 크게 과다한 알코올 섭취로 인한 알코올성 지방간 질환과 알코올 섭취와 관계없이 간 내에 중성지방이 축적되는 비알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)으로 구분되며, 비알코올성 지방간질환에는 단순 지방간증(simple steatosis)과 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)이 포함된다.

[0003] 단순 지방간증은 비교적 예후가 양호하나, 지방축적이 심해지면 염증, 즉, 지방간염(steatohepatitis)으로 진행되며, 광범위한 지방간염을 수반하는 간에서는 간세포의 괴사가 나타나고 또한 성상세포(stellate cell)가 활성화되어 섬유화가 일어나게 되는데 특히 간정맥 말단 부위에서 굴모양혈관주변섬유화(perisinusoidal fibrosis)가 심하게 나타난다. 따라서, 지방간염을 방지하면 간의 섬유화 또는 간 경변으로 발전하여 예후가 불량해진다. 비알코올성 지방간염 환자의 15 - 50%에서 간의 섬유화 또는 경변이 나타나며 섬유화 환자의 30%에서는 10년 후에 간경변이 나타난다.

[0004] 비알콜성 지방간질환은 비만, 심장질환, 당뇨병 등 다양한 대사증후군과 밀접하게 연관이 되어 있으며, 이런 측면에서 인슐린 저항성 개선제, 항산화제, 고지혈증 치료제, 간 비호약, 안지오텐신 II 수용체의 길항제 등 대사증후군에 대한 억제 효과가 있는 약제들이 임상적으로 시도되었다. 그러나, 현재까지 비알콜성 지방간 질환 치료를 위한 임상적 증거를 지닌 약물에 대한 개발은 이루어지지 않고 있는 실정이며, 현재 사용 중인 약물들은 모두 차선택으로 선택할 수 있는 Off-label 약물만이 존재할 뿐이나, 이러한 기존 Off-label 약물들은 임상적 근거가 부족하고, 안전성 문제 등으로 사용이 제한적이라는 한계가 있다. 예를 들어, 인슐린 저항성 개선약인 피오그리타존(Pioglitazone)은 비알콜성 지방간염 치료제으로서 유망했지만 임상에서 간섬유화에 대한 실제적인 개선 효과가 나타나지 않았을 뿐 아니라, 골절 리스크, 체중 증가, 심부전 악화 및 발증 등의 부작용 문제점으로 인하여 치료제로서의 판정 기준을 명확하게 만족시키지 못하였다. 이처럼 비알콜성 지방간 질환에 대해 승인된 치료제가 전무한 상황에서, 최근 미국식품의약국(FDA)은 비알콜성 지방간염의 임상 지표로서, 염증 감소, 간 섬유화 감소, 비알콜성 지방간염 증상의 완화 등을 제시한 바 있다.

[0005] 한편, RNA 간섭(RNA interference) 현상을 이용한 질병의 치료는 mRNA를 타겟으로 하여, 유전자의 발현을 translational level에서 조절하는 짧은 간섭 RNA (small interfering RNA; siRNA)를 이용하기 때문에 보다 안전하게 질병을 치료하는 치료제로 각광받고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 비알콜성 지방간염의 임상 지표에 대한 개선 효과를 나타내는 새로운 안전한 약물을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, RNA 간섭 기술을 이용한 RNA 제제를 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 MARC1의 발현을 특이적으로 억제하는 RNAi 제제를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 RNAi 제제를 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 간질환 예방 또

는 치료방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 MARC1(Mitochondrial amidoxime reducing component 1) mRNA 서열에 대해 서열 상보성을 갖는 길이가 19 내지 21 nt인 뉴클레오티드(nt)인 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 길이가 15 내지 17 nt인 센스 가닥을 포함하는 RNAi 제제로서, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 상기 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 RNAi 제제를 제공한다.
- [0010] 다른 양상은 상기 RNAi 제제를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0011] 또 다른 양상은 상기 RNAi 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0012] 또 다른 양상은 간질환을 예방 또는 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 상기 RNAi 제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 일 양상에 따른 RNAi 제제는 비특이적 면역반응, 오프 타겟 효과와 같은 부작용을 완화하면서, MARC1을 인코딩하는 mRNA에 결합하여 이를 분해함으로써 상기 단백질의 발현을 억제할 수 있다.
- [0014] 또한, 일 양상에 따른 RNAi 제제는 간세포 표면 수용체를 타겟팅하여 간조직내 지방의 축적 완화, 염증 감소, 간 섬유화 감소, 비알콜성 지방간염 증상의 완화 등의 효과를 나타내므로, 비알콜성 지방간질환, 간 섬유증, 간 경변 등을 포함한 간질환의 표적 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 50종을 각각 10 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 2는 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 23종을 각각 200 nM의 농도로 C57BL/6 마우스로부터 유래된 일차 간 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 3은 일 양상에 따른 OLX-003-1, 또는 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#3-1, #31-1), MARC1 및 MARC2 mRNA의 발현 수준을 확인한 것으로서, 도 3의 A는 MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 3의 B는 MARC2 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 4는 일 양상에 따른 OLX-003-1, 또는 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#3-1, #31-1), 간의 외관을 육안으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 일 양상에 따른 OLX-003-1, 또는 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#3-1, #31-1), 간 실질 내 지방 액포의 수준을 H&E 염색법을 통해 확인한 결과이다.
- 도 6은 일 양상에 따른 OLX-003-1, 또는 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#3-1, #31-1), 간 실질 내 지방 액포의 수준을 Oil Red O 염색법을 통해 확인한 결과이다.
- 도 7은 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), MARC1 및 MARC2 mRNA의 발현 수준을 확인한 것으로서, 도 7의 A는 MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 7의 B는 MARC2 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 8은 일 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간의 외관을 육안으로 확인한 결과이다.
- 도 9는 일 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간 실질 내 지방 액포의 수준을 H&E 염색법을 통해 확인한 결과이다.
- 도 10은 일 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#31-1), 간 실질 내 지방 액포 및 콜라겐 침착의 수준을 Picro Sirius Red 염색법을 통해 확인한 결과이다.
- 도 11은 일 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간 섬유화 관련 인자의 발현 수준을 평가한 것으로서, 도 10의 A는 α -SMA mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 10의 B는 Col1a1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 12는 일 양상에 따른 OLY-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간 조직 내 중성 지방의 수준을 확인한 결과이다.

도 13은 일 양상에 따른 OLY-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간 손상 지표 인자의 변화를 확인한 것으로서, 도 13의 A는 혈청 내 AST 수준을 확인한 결과이고, 도 13의 B는 혈청 내 ALT 수준을 확인한 결과이고, 도 13의 C는 혈청 내 AST/ALT 비율을 산출한 결과이다.

도 14는 일 양상에 따른 OLY-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#31-1), 혈청 내 지질 지표 물질의 변화를 확인한 것으로서, 도 14의 A는 콜레스테롤의 수준을 확인한 결과이고, 도 14의 B는 중성지방의 수준을 확인한 결과이고, 도 14의 C는 저밀도 지질단백질의 수준을 확인한 결과이고, 도 14의 D는 고밀도 지질 단백질의 수준을 확인한 결과이다.

도 15는 일 양상에 따른 OLY-031-2를 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2), 간 실질 내 지방 액포 및 염증 병소의 수준을 H&E 염색법을 통해 확인한 결과이다.

도 16은 일 양상에 따른 OLY-031-2를 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2), 간 실질 내 지방 액포 및 콜라겐 침착의 수준을 Picro Sirius Red 염색법을 통해 확인한 결과이다.

도 17은 일 양상에 따른 OLY-031-2를 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2), PSR 염색 영역(%)을 비교하여, 간 실질 내 콜라겐 성분의 함량을 비교한 결과이다.

도 18은 일 양상에 따른 OLY-031-2를 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2), 간 섬유화 관련 인자의 발현 수준을 평가한 것으로서, 도 18의 A는 Col1a1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 18의 B는 α-SMA mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 18의 C는 TIMP1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 19는 일 양상에 따른 OLY-031-2를 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2), MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 20A 내지 도 20C는 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 134종을 각각 1 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 21은 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 41종을 각각 0.1 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 22는 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 30종을 각각 1 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 단백질의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 23은 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 41종을 각각 100 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 24는 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 41종을 각각 500 nM의 농도로 인간 유래의 일차 간 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 25는 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 41종을 각각 20 nM 또는 100 nM의 농도로 인간 유래의 일차 간 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 26은 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 17종을 각각 10 nM 또는 100 nM의 농도로 인간 유래의 일차 간 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 27은 일 양상에 따른 OLY-031-2 또는 OLY-075-2를 각각 2.5 mpk, 5 mpk, 또는 10 mpk의 농도로 원숭이에 투여한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 28은 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 9종을 pSELECT-mSEAP-hMARC1로 형질감염된 동물 모델에 투여한 후, SEAP 리포터 형광의 수준을 통해 인간 MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 29는 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 10종을 psiCHECK-2-hMARC1로 형질감염된 동물 모델에 투여한 후, Luciferase 리포터 형광의 수준을 통해 인간 MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.

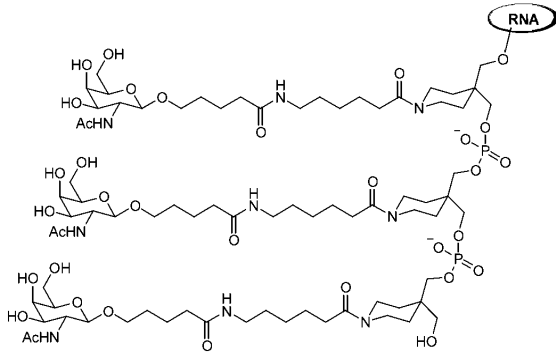
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0018] 일 양상은 MARC1(Mitochondrial amidoxime reducing component 1) mRNA 서열에 대해 서열 상보성을 갖는 길이가 19 내지 21 nt인 뉴클레오티드(nt)인 안티센스 가닥 및 상기 안티센스 가닥에 대해 서열 상보성을 갖는 길이가 15 내지 17 nt인 센스 가닥을 포함하는 RNAi 제제로서, 상기 안티센스 가닥의 5' 말단 및 상기 센스 가닥의 3' 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 RNAi 제제를 제공한다.
- [0020] RNAi 제제
- [0021] 본 명세서에서 용어, "RNAi(RNA interference; RNA 간섭)"는 목적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 가닥과 이것과 상보적인 서열을 가지는 가닥으로 구성되는 이중가닥 RNA(dsRNA)를 세포 등에 도입하여 목적 유전자 mRNA의 분해를 유도함으로써 목적 유전자의 발현을 억제하는 메커니즘을 의미한다.
- [0022] 본 명세서에서 용어, "RNAi 제제 (RNAi agents)" 또는 "RNAi 유도용 핵산 분자 (nucleic acid molecules inducing RNAi)"는 서열-특이적 방식으로 상기 RNA 간섭을 매개함으로써 유전자 발현 또는 바이러스 복제를 억제 또는 하향 조절할 수 있는 임의의 제제 또는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 개별 핵산 분자, 복수의 상기 핵산 분자, 또는 상기 핵산 분자의 풀(pool) 모두를 지칭할 수 있다. 일 구체예에 있어서 상기 RNAi 제제는 siRNA일 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 용어, "siRNA(small interfering RNA; 짧은 간섭 RNA)"는 서열 특이적으로 효율적인 유전자 발현 억제(gene silencing)를 매개하는 짧은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다.
- [0024] 본 명세서에서 용어, "유전자"란 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 구조 단백질 또는 조절 단백질을 암호화할 수 있다. 이때, 조절단백질은 전사인자, 열 충격단백질 또는 DNA/RNA 복제, 전사 및/또는 번역에 관여하는 단백질을 포함한다. 본 발명에 있어서, 발현 억제의 대상이 되는 목적 유전자는 바이러스 게놈에 내재된 것으로, 동물 유전자로 통합되거나 염색체 외 구성요소로서 존재할 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어, "안티센스 가닥(antisense strand)"은 관심 있는 목적 핵산(target nucleic acid)에 실질적으로 또는 100% 상보적인 폴리뉴클레오티드로서, 예를 들어 mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(e.g., microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및 hnRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 상보적일 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 용어, "센스 가닥(sense strand)"은 목적 핵산과 동일한 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로서, mRNA(messenger RNA), mRNA가 아닌 RNA 서열(e.g., microRNA, piwiRNA, tRNA, rRNA 및 hnRNA) 또는 코딩 또는 비코딩 DNA 서열과 전체로서 또는 일부로서 동일한 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어, "상보성(complementarity)" 또는 "상보적인 (complementary)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 상기 용어는 일반적으로 전통적인 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 또는 본 명세서에 기술된 다른 비-전통적 유형의 결합에 의해, 하나의 핵산 서열과 다른 핵산 서열 사이의 수소 결합 (들)의 형성 또는 존재를 지칭할 수 있다. 완벽한 상보성은 핵산 서열의 모든 인접 잔기가 제 2 핵산 서열에서 동일한 수의 인접 잔기와 수소 결합한다는 것을 의미할 수 있다. 부분 상보성은 핵산 분자 내에서, 다양한 미스매치(mismatch) 또는 비-염기쌍 뉴클레오티드 (non-based paired nucleotides) (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개 이상의 미스매치, 예를 들어, 1 내지 3개의 미스매치, 비-뉴클레오티드 링커 (non-nucleotide linker), 또는 비-염기쌍 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 상기 부분 상보성은, 핵산 분자의 센스 가닥과 안티센스 가닥 사이에서, 또는 핵산 분자의 안티센스 가닥과 이와 상응하는 표적 핵산 분자 사이에서, 벌지(bulges), 루프(loops), 돌출(overhang), 또는 블런트 말단(blunt end)을 초래할 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "블런트 말단 (blunt end)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 본 명세서의 RNAi 제제 또는 핵산 분자와 관련하여, 상기 용어는 돌출 뉴클레오티드가 없는, 이중 가닥 siRNA 분자의 말단을 지칭할 수 있다. 본 명세서에 기재된 siRNA 분자는 안티센스 가닥의 5'-말단, 및 센스 가닥의 3'-말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것일 수 있다.

- [0030] MARC1의 발현을 억제하기 위한 RNAi 제제
- [0031] "MARC1 (Mitochondrial amidoxime reducing component 1)은 포유동물의 몰리브덴(molybdenum) 함유 효소로, MTARC1 또는 MOSC1으로도 지칭되며, MARC1 효소의 결핍은 낮은 혈중 콜레스테롤 수치, 혈중 간 효소 수치, 간 지방 감소, 및 간경변 발병 위험 감소와 관련이 있어, 간 질환에 대한 잠재적인 치료 표적이 될 수 있는 것으로 알려져 있다. 상기 MARC1 단백질은 천연적으로 존재하는 야생형 MARC1 및 그의 기능적 변이체를 포함하는 것으로 해석될 수 있고, 상기 MARC1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 서열은 미국국립보건원의 GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 취득할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어, "발현(expression)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 상기 용어는 일반적으로, 유전자가 궁극적으로 단백질을 생성하는 과정을 의미할 수 있다. 상기 발현은 전사, 스플라이싱, 전사 후 변형, 또는 번역을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 발현 수준은 mRNA 수준 또는 단백질 수준의 검출에 의해 결정되거나 모니터링될 수 있다.
- [0033] 개체에서의 MARC1 유전자 발현과 관련하여 사용된 용어, "억제" 또는 "감소"는 비처리군 또는 정상 대조군 대비 통계적으로 유의미한 감소를 지칭한다. 상기 감소는 예를 들어, 최소 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 60%, 65%, 70%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상일 수 있으나, 이는 검출 또는 측정 방법에 따라, 검출 수준 이하일 수도 있다.
- [0035] siRNA는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA)로 RNAi(RNA interference) 작용에 관여한다. RNAi는 1998년 Caenorhabditis elegans에서 최초로 발견된 세포 내 유전자 조절 기작으로 작용기전은 세포 내로 투입된 RNA 이중 가닥 중 안티센스 가닥이 표적 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합함으로써 표적 유전자 분해를 유도한다고 알려져 있으며, 최근 가장 각광받는 신약 개발 후보 기술이다.
- [0036] 다만, 이러한 가능성과 반대로 siRNA의 부작용 및 단점이 계속적으로 보고되어 있다. RNAi 기반 치료제의 개발이 이루어지기 위해서는 1) 효과적인 전달시스템의 부재 2) 오프타겟 효과 3) 면역반응 유도 4) 세포 내 RNAi 기구 포화과 같은 장벽을 극복해야 할 필요성이 있다. siRNA가 표적 유전자의 발현을 직접적으로 조절할 수 있는 효과적인 방법임에도 불구하고 이와 같은 문제들로 인해 치료제 개발에 어려움을 겪고 있다. 이와 관련하여, 비대칭 siRNA(asymmetric shorter duplex siRNA, asiRNA)는 종래의 siRNA가 가지는 19+2 구조에 비해 짧은 이중나선 길이를 갖는 비대칭 RNAi 유도 구조이다. 기존 siRNA 구조 기술에서 확인되는 오프-타겟 효과, RNAi 기작의 포화, TLR3에 의한 면역반응 등의 문제점들을 극복한 기술이며, 이에 따라 부작용이 낮은 RNAi 신약 개발이 가능하다.
- [0037] 이를 바탕으로, 본 실시예에서 센스 가닥 및 상기 센스 가닥과 상보적인 안티센스 가닥을 포함하는 비대칭 siRNA를 제시하며, 일 실시예에 따른 siRNA는 오프-타겟 효과, RNAi 기작의 포화 등의 문제를 일으키지 않아 안정적으로 높은 전달 효율을 유지하면서, 목적하는 정도로 유효하게 MARC1 유전자에 대한 발현을 억제할 수 있다.
- [0038] 일 실시예에서는 MARC1을 표적으로 하는 비대칭 siRNA (asymmetric siRNA: asiRNA)를 디자인 및 제작하였으며, MARC1을 발현하는 세포에 상기 asiRNA를 transfection한 뒤, knockdown efficiency가 우수한 RNAi 유도용 핵산 분자, 즉 MARC1 asiRNA를 선별하였다.
- [0039] 일 구체예에 있어서, 상기 RNAi 제제는 상기 센스 가닥은 15 내지 17nt의 길이를 가지고, 상기 안티센스 가닥은 19 내지 21 nt의 길이를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 센스 가닥의 길이는 16nt, 이와 상보적인 안티센스 가닥의 길이는 19nt, 20nt, 또는 21nt인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 안티센스 가닥의 5'- 말단, 및 센스 가닥의 3'- 말단은 블런트 말단(blunt end)을 형성하는 것일 수 있다. 안티센스 가닥의 3' 말단은 예를 들어 2 내지 6nt의 오버행(overhang)을 포함할 수 있다.
- [0041] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 가닥은 표 1, 표 10, 표 11, 표 12, 표 13, 및 표 14에 열거된 안티센스 가닥 서열로부터 선택된 서열일 수 있고, 상기 안티센스 가닥은 가닥은 표 1, 표 10, 표 11, 표 12, 표 13, 및 표 14에 열거된 센스 가닥 서열로부터 선택된 서열을 포함하는 것일 수 있다.

- [0042] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 예를 들어, 상기 센스 가닥은 서열번호 149, 서열번호 159, 서열번호 177, 서열번호 179, 서열번호 183, 서열번호 197, 서열번호 199, 서열번호 227, 서열번호 247, 서열번호 251, 서열번호 257, 서열번호 259, 서열번호 261, 서열번호 273, 서열번호 285, 서열번호 287, 서열번호 331, 서열번호 353, 서열번호 387, 서열번호 391, 서열번호 399, 서열번호 423, 서열번호 429, 서열번호 431, 서열번호 435, 서열번호 439, 서열번호 443, 서열번호 445, 서열번호 447, 및 서열번호 527로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 61, 서열번호 149, 서열번호 183, 서열번호 227, 서열번호 423, 서열번호 431, 서열번호 435, 서열번호 439, 서열번호 447, 서열번호 527, 및 서열번호 551로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0043] 일 구체예에서, 상기 안티센스 가닥은 예를 들어, 서열번호 150, 서열번호 160, 서열번호 178, 서열번호 180, 서열번호 184, 서열번호 198, 서열번호 200, 서열번호 228, 서열번호 248, 서열번호 252, 서열번호 258, 서열번호 260, 서열번호 262, 서열번호 274, 서열번호 286, 서열번호 288, 서열번호 332, 서열번호 354, 서열번호 388, 서열번호 392, 서열번호 400, 서열번호 424, 서열번호 430, 서열번호 432, 서열번호 436, 서열번호 440, 서열번호 444, 서열번호 446, 서열번호 448, 및 서열번호 528로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 62, 서열번호 150, 서열번호 184, 서열번호 228, 서열번호 424, 서열번호 432, 서열번호 436, 서열번호 440, 서열번호 448, 서열번호 528, 및 서열번호 552로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0045] 화학적 변형이 도입된 RNAi 제제
- [0046] 상기 RNAi 제제에서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0047] 일반적인 siRNA는 포스페이트 백본 구조에 의한 높은 음전하 및 높은 분자량 등의 이유로 세포막을 통과할 수 없고 혈액에서의 빠른 분해 및 제거되어 실제 표적 부위에 RNAi 유도를 위한 충분한 양을 전달하는데 어려움이 있다. 현재 in vitro 전달의 경우 cationic lipids와 cationic polymers들을 이용한 높은 효율의 delivery 방법이 많이 개발되어 있지만, in vivo의 경우에는 in vitro 만큼의 높은 효율로 siRNA를 전달하기 어렵고, 생체 내에 존재하는 다양한 단백질들과 상호작용에 의하여 siRNA 전달 효율이 감소하는 문제점이 있다.
- [0048] 이에, 본 실시예에서는 비대칭 siRNA 구조에 화학적 변형을 도입하여 향상된 간 세포 표적 전달능 (hepatocyte targeted delivery ability)을 가지는 RNAi 제제를 제시하여, 보다 구체적으로, 별도의 전달체 없이 효과적이고 간 세포 내 전달을 할 수 있는 비대칭 siRNA 구조체 (GalNAc asymmetric siRNA, GalNAc-asiRNA)를 제시한다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에서 화학적 변형은 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다: N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체와의 결합; 뉴클레오티드 결합이 포스포티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형; 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(methyl), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F, -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, 또는 -O-3-디메틸아미노프로필로 치환; 인산기(phosphate group), E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate), 또는 세포 침투 펩타이드의 결합.
- [0050] 일 구체예에 있어서, 상기 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 유도체는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 것일 수 있다. N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 유도체는 간세포 표면의 ASGPR(Asialoglycoprotein receptor)를 인식해 RNAi 제제가 간 세포 내 유입되도록 도와주는 역할을 수행, 즉, ASGPR 타겟팅 모이어티로 작용하므로, 상기 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 유도체가 말단에 결합된 RNAi 제제는 간 세포로의 전달성이 향상되어 간 질환에 대해 효과적인 표적 치료를 제공하는 것일 수 있다.

[0051] [화학식 1]



[0052]

[0053] 일 구체예에 있어서, 상기 센스 가닥은 하기로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함할 수 있다: 5' 말단 으로부터 인접한 2 내지 4개의 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형; 1개 이상의 뉴클레오타이드 내 당 구조 의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(methyl), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F, -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸 티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, 또는 -O-3-디메틸아미노프로필로 치환; 및 3' 말단에 N-아세틸 갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체 또는 세포 침투 펩타이드와의 결합.

[0054] 일 구체예에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 하기로부터 선택되는 어느 하나 이상의 화학적 변형을 포함할 수 있 다: 3' 말단 또는 5' 말단으로부터 인접한 2 내지 7개의 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형; 1개 이상의 뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(methyl), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F, -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, 또는 -O-3-디메틸아미노 프로필로 치환; 및 5' 말단에 인산기(phosphate group), E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate), 또는 세포 침투 펩타이드와의 결합.

[0055] 다른 구체예에 있어서, 상기 RNAi 제제는 센스 또는 안티센스 가닥에서 3' 말단 또는 5' 말단으로부터 인접한 2 내지 7개의 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 변형; 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 중 1개 이상의 뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -OCH₃(methoxy) 또는 -F로 치환되는 변형; 및 센스 가닥의 3' 말단에 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체와의 결합; 및 안티센스 가닥의 5' 말단에 인산기(phosphate group) 또는 E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate) 결합;으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 것일 수 있다.

[0056] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 표 2, 표 15, 표 16, 및 표 17에 열거된 안티센스 가닥 서열로부터 선택된 서 열일 수 있고, 상기 안티센스 가닥은 표 2, 표 15, 표 16, 및 표 17에 열거된 센스 가닥 서열로부터 선택된 서 열을 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 하기 표의 (A) 내지 (O)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이고, 상기 안티센 스 가닥은 하기 표의 (a) 내지 (q)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

	서열 (5' → 3')
(A)	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
(B)	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-Ga1NAc
(C)	mC*fG*mAfAfAfGmUfUmAfUmGfGmAfA-Ga1NAc
(D)	mA*fC*mUfAfCfUmGfAmAfAmAfCmCfUmUfA-Ga1NAc
(E)	mG*fC*mAfUfAfUmGfUmCfAmGfUmUfGmUfA-Ga1NAc
(F)	mU*fU*mGfGfGfAmAfGmUfUmGfAmCfUmAfA-Ga1NAc
(G)	mC*fC*mAfUfUfUmUfGmUfCmCfUmUfUmGfA-Ga1NAc
(H)	mA*fC*mGfCfAfAmUfGmAfAmAfAmUfUmAfA-Ga1NAc
(I)	mA*fG*mAfUfCfUmGfAmUfGmAfAmGfUmAfA-Ga1NAc
(J)	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
(K)	mC*fU*mAfGfAfGmAfAmGfAmAfAmGfUmUfA-Ga1NAc
(L)	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-Ga1NAc
(M)	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-Ga1NAc
(N)	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-Ga1NAc
(O)	mC*fC*mCfUfGfAmCfUmCfUmCfAmGfUmGfA-Ga1NAc
(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*mAmAmAmGfGmAfCmAmAmAmUfUmGfGmC*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*mU*mG*mG
(m)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
(n)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
(o)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
(p)	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
(q)	P-mU*fC*mAmCmUmGfAmGfAmGmUmCmAfGmGfGmU*mG*mU*mC*mA

[0058]

[0059]

상기 서열에서 *는 포스포로티오에이트 결합(phosphorothioated bond), m은 2'-O-메틸(Methyl), f는 2'-플루오르(Fluoro), Ga1NAc은 화학식 1의 trivalent Ga1NAc 유도체, P는 5'-인산기(Phosphate group), EVP는 5'-E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate) 결합을 의미한다.

[0060]

구체적으로, 상기 RNAi 제제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 상기 표에서 선택되는 하기의 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 서열일 수 있다.

NO.	Sense strand	Antisense strand
1	(A)	(a) 또는 (b)
2	(B)	(c), (m), (n), (o), 또는 (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), 또는 (p)
13	(M)	(m), (n), (o), 또는 (p)
14	(N)	(m), (n), (o), 또는 (p)
15	(O)	(q)

[0061]

[0062]

다른 양상은 상기 RNAi 제제를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0063]

또 다른 양상은 간질환을 예방 또는 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 상기 RNAi 제제의 용도를 제공한다.

[0064] 상기 약학적 조성물은 전술한 RNAi 제제를 그대로 포함하거나 이를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0066] 간 질환

[0067] 상기 약제학적 조성물은 MARC1 유전자의 발현을 억제함으로써 간질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있다.

[0068] 상기 간 질환은 지방간, 간 섬유증, 또는 간경변을 포함하고, 여기서 "지방간"은 정상세포 내에는 존재하지 않는 중성지방이 간 세포 내에 비정상적으로 침착되어 보이는 현상이 나타난 것을 의미한다. 정상 간은 약 5%가 지방조직으로 구성되어 있으며 중성지방, 지방산, 인지질, 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스터가 지방의 주요 성분이나, 일단 지방간이 발생하면 대부분의 성분이 중성지방으로 대체되며 중성지방의 양이 간 중량의 5% 이상이면 지방간으로 진단된다. 상기 지방간은 "비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)"일 수 있으며, "비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)"은 음주와 관계없이 간 내에 중성지방이 축적되는 질환으로서, 지방산이 중성지방의 형태로 간의 실질세포 내에 5% 이상 축적된 경우로 정의될 수 있다. 상기 비알콜성 지방간 질환은 단순 지방간증(simple steatosis) 또는 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)일 수 있다. 비알콜성 지방간 질환은 병리학적으로 단순 지방간증(simple steatosis)과 염증을 동반한 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)으로 분류되는데, NASH는 NAFLD 중증형의 한 형태라 할 수 있다. 지방 축적이 심한 지방간증은 염증, 즉, 지방간염으로 진행되며, 장기간 방치시 간염, 간 섬유증, 간경변 등의 심각한 간 질환으로 이행될 수 있다. 단순 지방간증의 발병률은 정상체중을 지닌 사람에서는 10 - 15%이나 과체중을 지닌 사람에서는 80%로 크게 상승하므로, 비알콜성 지방간염이 효과적으로 치료되기 위해서는 간에 중성지방 축적을 효과적으로 감소시키고, 비알콜성 지방간증이 지방간염으로 진행되는 것을 억제하면서 지방간염의 염증을 개선시킴으로써 다음 단계로의 진행을 억제하는 것이 중요할 수 있다.

[0070] 약학적 조성물

[0071] 본 명세서에서 용어, "유효성분 (effective ingredient)"은 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 유효량의 성분을 의미한다. 구체적으로는, 유효량의 제제, 활성제, 또는 RNAi 제제를 의미할 수 있다.

[0072] 상기 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있고, 질병을 예방하거나, 질병 상태를 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 또는 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로)을 위한 적절한 양일 수 있다.

[0073] 본 명세서에서 용어, "예방 (prevention)"은 질환의 발생을 미리 차단하거나, 질환을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 예를 들어, 상기 간질환 또는 이의 특징적인 특성의 발생을 막거나, 발생을 방해하거나, 상기 간질환 또는 이의 특징적인 특성의 발생으로부터 방어 또는 보호하는 것을 지칭한다.

[0074] 본 명세서에서 용어, "치료 (treatment)"는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 의미한다. 또한, 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 예를 들어, 상기 간질환 또는 이의 특징적인 특성을 예방, 감소 또는 개선하거나, 또는 개체에서 상기 간 질환 또는 이의 특징적인 특성의 진행을 지연 (약화)시키는 것이다.

[0075] 본 명세서에서 용어, "유효량 (effective amount)"은 당업계에서 일반적으로 허용되는 의미를 지칭한다. 상기 용어는 일반적으로 연구자, 의사, 또는 기타 임상 의사 등이 추구하는 세포, 조직, 시스템, 동물, 또는 인간의 의도된 생물학적 반응 (예: 유익한 반응)을 이끌어낼 분자, 화합물, 또는 구성물의 양을 의미할 수 있다. 구체적으로, "치료학적 유효량 (therapeutically effective amount)"은 예컨대, 질병이나 장애와 관련된 측정 가능한 파라미터에 있어서 치료적으로 관련된 변화가 있어 특정 임상적 치료가 효과적이라고 간주될 수 있는 정도의 바람직한 의학적 반응을 이끌어낼 수 있는 분자, 화합물, 또는 구성물의 양을 의미할 수 있다. 상기 질병 또는 장애의 치료를 위한 약물의 치료학적 유효량은 상기 파라미터에서 치료적으로 관련된 변화를 초래하는데 필요한 양일 수 있다.

[0076] 상기 약학 조성물의 투여방법은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가

가 결정할 수 있다. 또한, 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 시럽제 등의 다양한 형태로 제제화 할 수 있으며 단위-투여량 또는 다-투여량 용기, 예를 들면 밀봉된 앰플 및 병 등으로 제공될 수도 있다.

[0077] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설율 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지 기술을 이용하여 본 발명의 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.

[0079] 또 다른 양상은 상기 RNAi 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0080] 상기 간질환을 치료하는 방법은 전술한 RNAi 제제 또는 약학적 조성물을 그대로 포함하거나 이를 이용하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

[0081] 본 명세서에서 용어, "개체"는 질병, 구체적으로 간질환의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양 등의 포유류를 모두 포함할 수 있다.

[0083] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1: RNAi 유도용 핵산 분자의 스크리닝 및 치료 효능 평가

[0086] 1-1. 50종의 asiRNA 디자인 및 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

[0087] 본 실시예에서는 MARC1을 표적으로 하는 고효율의 RNAi 간섭을 유도하는 이중 가닥의 핵산 분자를 확보하기 위해 MARC1 유전자에 대한 표적 서열 선정 후, 이에 대한 MARC1 asymmetric siRNA (asiRNA)를 디자인하였다 (Sense strand (16-mer), Antisense strand(19-mer)). 구체적으로, NCBI database 검색을 통해 MARC1 유전자 정보를 획득한 후, 동물실험을 고려하여 마우스와 공통 표적을 가지는 염기 서열 기준으로 일정 수준의 상동성을 보이는 염기 서열을 선발하여, 총 50종의 asiRNA를 디자인하고, 이를 IDT Korea, Inc.에서 10 nmole scale로 합성하였다. 이후, 합성된 asiRNA는 95℃ 5분, 37℃ 25분간 incubation 과정을 거쳐 annealing 하였고 12% Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) 후 ChemiDoc UV transilluminator (Biorad)를 통해 QC (quality control)를 하였다.

[0088] 상기의 방법에 따라 디자인된 MARC1 asiRNA의 서열 정보는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[0089] [표 1]

NO.	asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
#1	asiMARC1-1	sense	GCUCUGGAUCUACCCU	1
		antisense	AGGGUAGAUCCAGAGCUGC	2
#2	asiMARC1-2	sense	CAGCUCUGGAUCUACC	3
		antisense	GGUAGAUCCAGAGCUGCGC	4
#3	asiMARC1-3	sense	GCAGCUCUGGAUCUAC	5
		antisense	GUAGAUCCAGAGCUGCGCC	6
#4	asiMARC1-4	sense	GCCAUUGGGCUGCGCA	7
		antisense	UGCGCAGCCCCAUGGCCGU	8
#5	asiMARC1-5	sense	GGCCAUUGGGCUGCGC	9
		antisense	GCAGCAGCCCCAUGGCCGUG	10
#6	asiMARC1-6	sense	CGGCCAUUGGGCUGCG	11
		antisense	CGCAGCCCCAUGGCCGUGC	12
#7	asiMARC1-7	sense	ACGGCCAUGGGCUGC	13
		antisense	GCAGCCCCAUGGCCGUGCA	14
#8	asiMARC1-8	sense	CACGGCCAUGGGCUG	15
		antisense	CAGCCCCAUGGCCGUGCAC	16
#9	asiMARC1-9	sense	GGACAGUUUUGGCUU	17
		antisense	AAGCCAAAACUGUCCCGC	18
#10	asiMARC1-10	sense	GGGACAGUUUUGGCU	19
		antisense	AGCCAAAACUGUCCCGCA	20
#11	asiMARC1-11	sense	CGGGACAGUUUUGGC	21
		antisense	GCCAAAACUGUCCCGCAG	22
#12	asiMARC1-12	sense	AGCCUACACAAAGGAC	23
		antisense	GUCCUUUGUGUAGGCUGCA	24
#13	asiMARC1-13	sense	GGUGCACUUCGAGCCU	25
		antisense	AGGCUCGAAGUGCACCAGG	26
#14	asiMARC1-14	sense	CUGGUGCACUUCGAGC	27
		antisense	GCUCGAAGUGCACCAGGCG	28
#15	asiMARC1-15	sense	CCUGGUGCACUUCGAG	29
		antisense	CUCGAAGUGCACCAGGCGG	30
#16	asiMARC1-16	sense	GCCUGGUGCACUUCGA	31
		antisense	UCGAAGUGCACCAGGCGGU	32
#17	asiMARC1-17	sense	CGCCUGGUGCACUUCG	33
		antisense	CGAAGUGCACCAGGCGGUA	34
#18	asiMARC1-18	sense	CCGCCUGGUGCACUUC	35
		antisense	GAAGUGCACCAGGCGGUAG	36
#19	asiMARC1-19	sense	ACCGCCUGGUGCACUU	37
		antisense	AAGUGCACCAGGCGGUAGG	38
#20	asiMARC1-20	sense	UACCGCCUGGUGCACU	39
		antisense	AGUGCACCAGGCGGUAGGG	40
#21	asiMARC1-21	sense	CUACCGCCUGGUGCAC	41
		antisense	GUGCACCAGGCGGUAGGC	42
#22	asiMARC1-22	sense	GACGUGGAACUGAAAA	43
		antisense	UUUCAGUUCACGUCACC	44
#23	asiMARC1-23	sense	UGACGUGGAACUGAAA	45
		antisense	UUUCAGUUCACGUCACCA	46
#24	asiMARC1-24	sense	GGAAACACUGAAGAGU	47
		antisense	ACUCUUCAGUGUUCACGC	48
#25	asiMARC1-25	sense	UGGAAACACUGAAGAG	49
		antisense	CUCUUCAGUGUUCACGCG	50
#26	asiMARC1-26	sense	CUGGAAACACUGAAGA	51
		antisense	UCUUCAGUGUUCACGCGG	52
#27	asiMARC1-27	sense	GCUGGAAACACUGAAG	53

[0090]

		antisense	CUUCAGUGUUUCCAGCGGU	54
#28	asiMARC1-28	sense	CGCUGGAAACACUGAA	55
		antisense	UUCAGUGUUUCCAGCGGU	56
#29	asiMARC1-29	sense	CCGUGGAAACACUGA	57
		antisense	UCAGUGUUUCCAGCGGU	58
#30	asiMARC1-30	sense	CGCAGCUCUGGAUCUA	59
		antisense	UAGAUCAGAGCUGGCCA	60
#31	asiMARC1-31	sense	GCGCAGCUCUGGAUCU	61
		antisense	AGAUCAGAGCUGGCCAC	62
#32	asiMARC1-32	sense	GGCGCAGCUCUGGAUC	63
		antisense	GAUCCAGAGCUGGCCACU	64
#33	asiMARC1-33	sense	GCCGGUGAGCGAGGCG	65
		antisense	CGCCUCGCUACCGGCACC	66
#34	asiMARC1-34	sense	CCUGGUCCUGAUUUC	67
		antisense	GGAAUACAGGACCGGCGA	68
#35	asiMARC1-35	sense	GCCUGGUCCUGAUUUC	69
		antisense	GAAUACAGGACCGGCGAG	70
#36	asiMARC1-36	sense	CGCCUGGUCCUGAUUU	71
		antisense	AAAUACAGGACCGGCGAGG	72
#37	asiMARC1-37	sense	UGACUCUCAGUGCAGC	73
		antisense	GCUGCACUGAGUCAGGG	74
#38	asiMARC1-38	sense	CUGACUCUCAGUGCAG	75
		antisense	CUGCACUGAGUCAGGGU	76
#39	asiMARC1-39	sense	CCUGACUCUCAGUGCA	77
		antisense	UGCACUGAGUCAGGGUG	78
#40	asiMARC1-40	sense	CCCUGACUCUCAGUGC	79
		antisense	GCACUGAGAGUCAGGGUGU	80
#41	asiMARC1-41	sense	ACCCUGACUCUCAGUG	81
		antisense	CACUGAGAGUCAGGGUGUC	82
#42	asiMARC1-42	sense	GCACGCCUGGAGUAU	83
		antisense	UAUCCAGGCGGUGCACU	84
#43	asiMARC1-43	sense	GAUCCUUUCUGAGGCG	85
		antisense	CGCCUCAGAAAGGAUCAAG	86
#44	asiMARC1-44	sense	UGAUCCUUUCUGAGGC	87
		antisense	GCCUCAGAAAGGAUCAAGA	88
#45	asiMARC1-45	sense	UCUCAACUCCAGGCUA	89
		antisense	UAGCCUGGAGUUGAGAUCC	90
#46	asiMARC1-46	sense	AUCUCAACUCCAGGCU	91
		antisense	AGCCUGGAGUUGAGAUCCG	92
#47	asiMARC1-47	sense	GGAUUCAACUCCAGG	93
		antisense	CCUGGAGUUGAGAUCCGCC	94
#48	asiMARC1-48	sense	CGGAUCUCAACUCCAG	95
		antisense	CUGGAGUUGAGAUCCGCCA	96
#49	asiMARC1-49	sense	GCGGAUCUCAACUCCA	97
		antisense	UGGAGUUGAGAUCCGCCAG	98
#50	asiMARC1-50	sense	AGGGUGAUUGGCUUGUU	99
		antisense	AACAAGCCAUCACCCUUUU	100

[0091]

[0092]

이후, mRNA 수준에서 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 MARC1 asiRNA를 Huh7 세포에 형질감염시킨 후, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, 상기 Huh7 세포는 96 well plate에 8×10^3 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 MARC1 asiRNA (10 nM, OliX Inc.)와 RNAiMax (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150)를 첨가한 뒤, Invitrogen으로부터 제공된 프로토콜에 따라 형질감염을 수행하였다. 이후, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74136)를 사용하여 총 RNA를 추출하고, 이에 포함된 mRNA를 주형으로 하는 역전사 과정을 통하여 cDNA를 합성하였다. 이후, TB Green(Takara, RR820A)을 사용하여 PCR 혼합물을 준비하고 제조사의 지침에 따라 StepOne Real-Time PCR 시스템에서 정량적 PCR을 수행하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군은 형질 감염 시약만을 첨가한 군 (NT)을 사용하였다.

[0093]

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, MARC1 asiRNA 50종의 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다.

[0095]

1-2. 23종의 GalNAc-asiRNA 디자인 및 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

[0096]

본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 제조된 MARC1 asiRNA 중 23종의 MARC1 asiRNA를 대상으로, GalNAc 리간드 및 화학적 변형이 도입된 비대칭 siRNA를 디자인하였다. 구체적으로 다양한 화학적 변형 (2'OMe, PS, Fluoro 등)을 도입하고, 상기 센스 가닥의 3'말단에 "trivalent GalNAc"으로 표기된 유도체를 결합시켜 MARC1 GalNAc-asiRNA를 제조하였다.

[0097] [표 2]

GalNAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-001-1	sense	mG*fC*mUfCfUfGmGfAmUfCmUfAmCfCmCfU-GalNAc
	ant i sense	P-mA*fG*mGmGmUfAmGfAfUmCmCmAmGfAmG*fC*mU*mG*mC
OLX-002-1	sense	mC*fA*mGfCfUfCmUfGmGfAmUfCmUfAmCfC-GalNAc
	ant i sense	P-mG*fG*mUmAmGfAmUfCfCmAmGmAmGfCmU*fG*mC*mG*mC
OLX-003-1	sense	mG*fC*mAfGfCfUfCmUfGmGfAmUfCmUfAmCfC-GalNAc
	ant i sense	P-mG*fU*mAmGmAfUmCfCfAmGmAmGmCfUmG*fC*mG*mC*mC
OLX-009-1	sense	mG*fG*mAfCfAfGmGfUmUfUmUfGmGfCmUfU-GalNAc
	ant i sense	P-mA*fA*mGmCmCfAmAfAfAmCmCmUmGfUmC*fC*mC*mG*mC
OLX-010-1	sense	mG*fG*mGfAfCfAmGfCmUfUmUfUmGfGmCfU-GalNAc
	ant i sense	P-mA*fG*mCmCmAfAmAfAfCmCmUmGmUfCmC*fC*mG*mC*mA
OLX-016-1	sense	mG*fC*mCfUfGfGmUfGmCfAmCfUmUfCmGfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fC*mGmAmAfGmUfGfCmAmCmCmAfGmG*fC*mG*mG*mU
OLX-019-1	sense	mA*fC*mCfGfCfCmUfGmGfUmGfCmAfCmUfU-GalNAc
	ant i sense	P-mA*fA*mUmUmGfCmAfCfCmAmGmGmCfGmG*fU*mA*mG*mG
OLX-022-1	sense	mG*fA*mCfGfUfGmGfAmAfCmUfGmAfAmAfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fU*mUmUmCfAmGfUfUmCmCmAmCfGmU*fC*mA*mC*mC
OLX-023-1	sense	mU*fG*mAfCfGfUmGfGmAfAmCfUmGfAmAfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fU*mUmCmAfGmUfUfCmCmAmCmGfUmC*fA*mC*mC*mA
OLX-024-1	sense	mG*fG*mAfAfAfCmAfCmUfGmAfAmGfAmGfU-GalNAc
	ant i sense	P-mA*fC*mUmCmUfUmCfAfGmUmGmUmUfUmC*fC*mA*mG*mC
OLX-027-1	sense	mG*fC*mUfGfGfAmAfAmCfAmCfUmGfAmAfG-GalNAc
	ant i sense	P-mC*fU*mUmCmAfGmUfGfUmUmUmCmCfAmG*fC*mG*mG*mU
OLX-029-1	sense	mC*fC*mGfCfUfGmGfAmAfAmCfAmCfUmGfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fC*mAmGmUfGmUfUfUmCmCmAmGfCmG*fG*mU*mU*mC
OLX-030-4	sense	mC*fG*mCfAmGfCmUfCmUfGmGmAmUfCmUfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fA*mGfAmUfCmCfAmGfAmGfCmUfGmC*fG*mC*mC*mA
OLX-030-5	sense	mC*fG*mCfAfGfCmUfCmUfGmGfAmUfCmUfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fA*mGmAmUfCmCfAfGmAmGmCmUfGmC*fG*mC*mC*mA
OLX-031-1	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	ant i sense	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-037-1	sense	mU*fG*mAfCfUfCmUfCmAfGmUfGmCfAmGfC-GalNAc
	ant i sense	P-mG*fC*mUmGmCfAmCfUfGmAmGmAmGfUmC*fA*mG*mG*mG
OLX-038-1	sense	mC*fU*mGfAfCfUmCfUmCfAmGfUmGfCmAfG-GalNAc
	ant i sense	P-mC*fU*mGmCmAfCmUfGfAmGmAmGmUfCmU*fG*mG*mG*mU
OLX-039-1	sense	mC*fC*mUfGfAfCmUfCmUfCmAfGmUfGmCfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fG*mCmAmCfUmGfAfGmAmGmUmCfAmG*fG*mG*mU*mG
OLX-045-2	sense	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAmGmGfCmUfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fA*mGfCmCfUmGfGmAfGmUfUmGfAmG*fA*mU*fC*mC
OLX-045-5	sense	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAfGmGfCmUfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fA*mGmCmCfUmGfGfAmGmUmUmGfAmG*fA*mU*mC*mC
OLX-047-1	sense	mG*fG*mAfUfCfUmCfAmAfCmUfCmCfAmGfG-GalNAc
	ant i sense	P-mC*fC*mUmGmGfAmGfUfUmGmAmGmAfUmC*fC*mG*mC*mC
OLX-048-1	sense	mC*fG*mGfAfUfCmUfCmAfAmCfUmCfCmAfG-GalNAc
	ant i sense	P-mC*fU*mGmGmAfGmUfUfGmAmGmAmUfCmC*fG*mC*mC*mA
OLX-049-1	sense	mG*fC*mGfGfAfUmCfUmCfAmAfCmUfCmCfA-GalNAc
	ant i sense	P-mU*fG*mGmAmGfUmUfGfAmGmAmUmCfCmG*fC*mC*mA*mG

[0098]

[0099] 구체적으로, 상기 표 2에서 "*", "m", "f", "P", "GalNAc"로 표기된 화학적 변형은 상기 표 3에 나타난 바와 같다.

[0100] [표 3]

표기법	화학적 변형
*	포스포로티오에이트 결합(phosphorothioate bond)
m	2'-O-메틸(Methyl)
f	2'-플루오르(Fluoro)
P	5'-인산기(Phosphate group)
"GalNAc"	화학식 1의 trivalent GalNAc 유도체

[0101]

[0102] 구체적으로, 상기 표 3에서, "*"은 기존의 포스포다이에스터 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 치환된 형태를 의미하는 것이며, "m"은 기존의 2'-OH가 2'-O-메틸로 치환된 형태를 의미하는 것이다. 또한, "f"는 예를 들어, fG의 경우, 기존의 G(구아닌)의 2'-OH가 플루오르로 치환된 형태를 의미하는 것이며, "P"는 5'-말단에 인산기가 결합된 형태(5' 말단 염기 내 5번 탄소에 결합된 산소에 인산기가 결합)를 의미하는 것이다. 또한, "GalNAc"은 센스가닥의 3' 말단에 하기 화학식 1의 trivalent GalNAc 유도체가 결합된 형태를 의미하는 것이다.

[0103] 한편, 상기 trivalent GalNAc 유도체의 구조는 하기 화학식 1에 나타난 바와 같다.

[0113] [표 5]

Group	Dose	Treatment		Number
1	0	Normal Chow	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

[0114]

[0115] 한편, 고지방 식이가 제공된 시점으로부터 16주째 MARC1 GalNAc-asiRNA를 투여하였고, 이로부터 2주 경과 후 MARC1 asiRNA를 재차 투여하였다. 상기 2차 투여를 실시한 시점으로부터 2주 경과 후, 대상 마우스로부터 간을 적출하고, 이로부터 간 조직 시료 및 이의 절편을 수득하였다.

[0117] (1) MARC1 및 MARC2의 발현 양상 확인

[0118] 상기 마우스로부터 수득한 간 조직 시료를 대상으로, 상기 실시예 1-2와 동일한 방식으로 MARC1 및 MARC2 mRNA의 발현 수준을 평가하였다.

[0119] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 일 실시예에 따른 OLX-003-1 또는 OLX-031-1을 투여한 그룹 (#3-1, #31-1)은, 고지방 식이가 제공된 다른 그룹 (VC, NC)과 비교하여, MARC1 mRNA에 대한 발현 억제를 보여준 반면, MARC2 mRNA의 발현에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0121] (2) 간의 외관 평가

[0122] 상기 마우스로부터 수득한 간을 육안으로 관찰하여, 간의 변연부위의 변화를 평가하였다.

[0123] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹(VC, NC)은 간의 가장자리, 즉, 변연 부위가 날카롭지 못했던 반면, 일 실시예에 따른 OLX-003-1 또는 OLX-031-1을 투여한 그룹(#3-1, #31-1)은 정상 그룹과 유사한 형태적 특성을 나타냄을 확인하였다.

[0125] (3) 병리 조직학적 평가

[0126] 상기 마우스로부터 수득한 간 조직 시료를 10% NBF (Neutral Buffered Formalin) 용액으로 고정화하고, 파라핀 포매 블록을 제조한 뒤, 이로부터 4μm 두께의 조직 절편을 제조하였다. 이후, 상기 조직 절편을 대상으로, Mayer's hematoxylin 시약을 사용하여 H&E 염색을 실시하였다. 또한, OCT 포매제를 사용하여 수득한 4μm 두께의 동결 절편을 대상으로, Oil Red O 염색을 실시하였다.

[0127] 그 결과, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (VC, NC)에서, 간 실질에 형성된 다수의 지방 액포 (Lipid vacuoles)가 관찰된 반면, 일 실시예에 따른 OLX-003-1 또는 OLX-031-1을 투여한 그룹 (#3-1, #31-1)에서는, 지방 액포의 형성이 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.

[0129] 실시예 2. 동물 모델을 이용한 치료 효능 평가

[0130] 본 실시예에서는 C57BL/6 마우스를 대상으로, 상기 실시예 1에서 발현 억제 효과를 확인한 asiMARC1-031를 주형으로 하여, 하기 표 6의 MARC1 GalNAc-asiRNA를 피하 투여한 후, 이에 따른 치료적 효능을 평가하였다.

[0131] [표 6]

GalNAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-031-1	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	antisense	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-2	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	antisense	EVP-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC

[0132]

[0133] 구체적으로, 상기 표 6에서 "*", "m", "f", "P", "GalNAc", "EVP"로 표기된 화학적 변형은 하기 표 7에 나타난

바와 같다.

[표 7]

표기법	화학적 변형
*	포스포로티오에이트 결합(phosphorothioate bond)
m	2'-O-메틸(Methyl)
f	2'-플루오르(Fluoro)
P	5'-인산기(Phosphate group)
"GalNAc"	화합식 1의 trivalent GalNAc 유도체
EVP	E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate)

구체적으로, 상기 표 7에서, "*", "m", "f", "P", "GalNAc"은 전술한 바와 같다. 또한, "EVP"는 5'-말단에 (E) 비닐포스포네이트가 결합된 형태 (5' 말단 염기 내 5번 탄소를 포함하는 이중 결합 형성)를 의미하는 것으로, 예를 들어, EVP-mU의 경우 기존의 U(구아닌)의 2'-OH가 2'-O-메틸로 치환된 형태에서 5'-말단에 (E) 비닐포스포네이트가 결합된 형태를 의미하는 것이다.

2-1. HFD induced NASH mouse model에서 OLX-031-1의 치료 효능 평가

동물 모델 그룹을 정상 식이가 제공된 그룹 (Normal Chow)과 고지방 식이가 제공된 그룹 (HFD)으로 분류하고, 상기 그룹들을 투여되는 물질에 따라, 각각 1X PBS를 투여한 군 (VC), OLX700A-001-8을 투여한 군 (NC), OLX-031-1을 투여한 군 (#31-1)으로 분류하였다. 본 실시예에서, 상기 동물 모델 그룹에 대한 구체적인 분류는 하기 표 8에 나타낸 바와 같다.

[표 8]

Group	Dose	Treatment		Number
1	0	Normal Chow	VC	1
2	0	HFD	VC	3
3	10 mpk		NC	4
4	10 mpk		OLX-031-1	5

한편, 고지방 식이가 제공된 시점으로부터 28주째 OLX-031-1을 투여하였고, 이로부터 1주일 간격으로 총 3회 OLX-031-1을 추가 투여하였다. 총 4회의 투여를 마친 시점으로부터 1주 경과 후, 대상 마우스로부터 간을 적출하고, 이로부터 간 조직 시료 및 이의 절편, 혈청 시료를 수득하였다.

(1) MARC1 및 MARC2의 발현 양상 확인

상기 마우스로부터 수득한 간 조직 시료를 대상으로, 상기 실시예 1-2와 동일한 방식으로 MARC1 및 MARC2 mRNA의 발현 수준을 평가하였다.

그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 일 실시예에 따른 OLX-031-1을 투여한 그룹(#31-1)은, 고지방 식이가 제공된 다른 그룹 (VC, NC)과 비교하여, MARC1 mRNA에 대한 발현 억제를 보여준 반면, MARC2 mRNA의 발현에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

(2) 간의 외관 평가

상기 마우스로부터 수득한 간을 육안으로 관찰하여, 간의 변연부위의 변화를 평가하였다.

그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹(HFD VC, HFD NC)은 간의 가장자리, 즉, 변연부위가 날카롭지 못했던 반면, 일 실시예에 따른 OLX-31-1을 투여한 그룹 (#31-1)은 정상 그룹과 유사한 형태적 특성을 나타냄을 확인하였다.

(3) 병리 조직학적 평가

[0153] 상기 마우스로부터 수득한 간 조직 시료를 10% NBF(Neutral Buffered Formalin) 용액으로 고정화하고, 파라핀 포매 블록을 제조한 뒤, 이로부터 4 μ m 두께의 조직 절편을 제조하였다. 이후, 상기 조직 절편을 대상으로, Mayer's hematoxylin 시약을 사용한 H&E 염색 및 Picro Sirius Red을 실시하였다.

[0154] 그 결과, 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (VC, NC)에서, 간 실질에 형성된 다수의 지방 액포와 콜라겐의 침착이 관찰된 반면, 일 실시예에 따른 OLX-031-1을 투여한 그룹 (#31-1)은 이러한 지방 액포의 형성과 콜라겐 침착이 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.

[0156] (4) 간 조직 내 섬유화 관련 인자의 발현 및 중성지방 수준 평가

[0157] 상기 마우스로부터 수득한 간 조직 시료를 대상으로, 간 섬유화 관련 인자의 발현 수준 및 중성 지방의 수준을 평가하였다. 구체적으로, 간 조직 유래의 세포를 대상으로 Tri-RNA reagent (FAVORGEN, FATRR 001)를 사용하여, total RNA를 추출하고, 이를 주형으로 하는 역전사 과정을 통하여 cDNA를 합성하였다 (High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814)). 이후, 상기 합성된 cDNA를 주형으로 하여, 정량적 PCR을 TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara, RR420A)를 사용하여 수행하였다. 이후, StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) 및 항존 유전자인 RPL32의 발현 수준을 적용하여, α -SMA 및 mColla 1 mRNA의 발현 수준을 평가하였다. 또한, 간 조직 시료를 균질화기 (homogenizer, 100 mg/mL, 1:10 희석)를 사용하여 5% NP-40/UPW 내에서 균질화하였다. 이후, 상기 균질화된 시료를 대상으로, Triglyceride Assay Kit (Abcam, ab65336)를 사용하여, 중성 지방 수준을 측정하였다.

[0158] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (VC, NC)에서, 간 섬유화 관련 인자인 α -SMA mRNA의 발현 수준이 증가한 반면, 일 실시예에 따른 OLX-031-1을 투여한 그룹 (#31-1)에서는 이러한 α -SMA 및 mColla 1 mRNA의 발현 증가가 감소하였음을 확인하였다. 또한, 도 12에 나타낸 바와 같이, 간 조직 내 중성 지방의 수준 역시 일 실시예에 따른 OLX-031-1의 투여에 의해 감소됨을 확인하였다.

[0160] (5) 혈청학적 평가

[0161] 상기 마우스로부터 수득한 혈청 시료를 대상으로, 간 손상의 지표 인자인 AST (Aspartate aminotransferase), 및 ALT (Alanine aminotransferase), 그리고, 지질 지표 물질인 콜레스테롤 (CHOL), 중성지방 (TG), 저밀도 지질단백질 (LDL), 및 고밀도 지질단백질(HDL)의 수준을 확인하였다.

[0162] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (VC, NC)에서, AST 및 ALT 수준이 현격하게 상승했던 반면, 일 실시예에 따른 OLX-031-1을 투여한 그룹 (#31-1)에서는 이러한 AST 및 ALT 수준의 상승이 감소하였음을 확인하였다. 또한, 도 14에 나타낸 바와 같이, 지질 지표 물질의 수준 역시 일 실시예에 따른 OLX-031-1을 투여한 그룹 (#31-1)에서 감소하였음을 확인하였다.

[0164] 2-2. CDHFD induced NASH mouse model에서 OLX-031-2의 치료 효능 평가

[0165] 동물 모델 그룹을 식이의 종류와 제공 기간에 따라, 12주간 정상 식이가 제공된 그룹 (NCD 12w), 16주간 정상 식이가 제공된 그룹 (NCD 16w), 12주간 고지방 식이가 제공된 그룹 (CDHFD 12w), 16주간 고지방 식이가 제공된 그룹 (CDHFD 16w), 12주간 고지방 식이가 제공되고, 4주간 정상 식이가 제공된 그룹 (CDHFD-NCD)으로 분류하고, 상기 그룹들을 다시 투여되는 물질에 따라, 각각 1X PBS를 투여한 군 (VC), OLX-031-2를 투여한 군 (#31-2)으로 분류하였다. 본 실시예에서, 상기 동물 모델 그룹에 대한 구체적인 분류는 하기 표 9에 나타낸 바와 같다.

[0166] [표 9]

Group	Dose	Treatment		Number
1	0	12주간 정상 식이 (NCD 12w)	VC	3
2	0	16주간 정상 식이 (NCD 16w)	VC	5
3	0	12주간 고지방 식이 (CDHFD 12w)	VC	3
4	0	16주간 고지방 식이 (CDHFD 16w)	VC	3
5	0	12주간 고지방 식이, 4주간 정상 식이 (CDHFD-NCD)	VC	4
6	10 mpk	16주간 고지방 식이 (CDHFD 16w)	OLX-031-2	4
7	10 mpk	12주간 고지방 식이, 4주간 정상 식이 (CDHFD-NCD)	OLX-031-2	4

[0167]

[0168] 한편, 고지방 식이가 제공된 시점으로부터 12주째 OLX-031-2를 투여하였고, 이로부터 2주 경과 후 OLX-031-2를 제차 투여하였다. 상기 2차 투여를 실시한 시점으로부터 2주 경과 후, 대상 마우스로부터 간을 적출하고, 이로부터 간 조직 시료 및 이의 절편을 획득하였다. 한편, 상기 동물 모델 그룹 1 및 3에서는 고지방 식이가 제공된 시점으로부터 12주째 마우스를 희생시키고, 상기의 시료들을 획득하였다.

[0170] (1) 병리 조직학적 평가

[0171] 상기 실시예 2-1의 (3)과 동일한 방식으로 조직 절편에 대한 H&E 염색 및 Picro Sirius Red을 실시하여, 간 실질에 형성된 다수의 지방 액포와 콜라겐의 침착 등의 변화를 확인하였다.

[0172] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (CDHFD 12w, CDHFD 16w)은 간 실질에 다수의 지방 액포와 염증 병소 (inflammatory foci)가 관찰된 반면, 일 실시예에 따른 OLX-031-2를 투여한 그룹 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2)에서는 이러한 지방 액포와 염증 병소가 감소하였음을 확인하였다. 또한, 도 16 및 도 17에 나타낸 바와 같이, 일 실시예에 따른 OLX-031-2를 투여한 그룹 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2)에서 지질 성분 및 콜라겐 침착이 유의적으로 감소하였음을 확인하였다. 특히, OLX-031-2를 투여한 그룹 6 (CDHFD 16w 31-2)은 고지방 식이가 제공된 그룹 3 및 4 (CDHFD 12w, CDHFD 16w)에 비해, 지방 액포와 콜라겐 침착 수준이 감소되었는 바, 이는 비알콜성 지방간염에 대한 유효한 치료 효능을 보여주는 것이다.

[0174] (2) 간 조직 내 섬유화 관련 인자의 발현 평가

[0175] 상기 실시예 2-1의 (4)과 동일한 방식으로 간 섬유화 관련 인자의 발현 수준을 평가하였다.

[0176] 그 결과, 도 18에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (CDHFD, CDHFD-NCD)에서, 간 섬유화 관련 인자인 α -SMA, mCol1a1, 및 TIMP1 mRNA의 발현 수준이 증가한 반면, 일 실시예에 따른 OLX-031-2를 투여한 그룹 (#CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2)에서는, 이러한 α -SMA, mCol1a1, 및 TIMP1 mRNA의 발현 증가가 감소하였음을 확인하였다. 이 역시, 상기 실험 결과와 마찬가지로, OLX-031-2를 투여한 그룹 6 (31-2 CDHFD)은 고지방 식이가 제공된 그룹 3 및 4 (CDHFD 12w, CDHFD 16w)과 현격한 차이를 보여주었다.

[0178] (3) MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

[0179] 상기 마우스로부터 획득한 간 조직 시료를 대상으로, 상기 실시예 1-2와 동일한 방식으로 MARC1 mRNA의 발현 수준을 평가하였다.

[0180] 그 결과, 도 19에 나타낸 바와 같이, 일 실시예에 따른 OLX-031-2를 투여한 그룹 (#CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2)에서는, MARC1 mRNA의 발현 수준이 다른 그룹에 비해 유의적으로 낮음을 확인하였다.

[0182] 실시예 3: RNAi 유도용 이중가닥 핵산 분자의 2차 스크리닝

[0183] 3-1. 250종의 asiRNA 디자인 및 제작

[0184] 본 실시예에서는 상기 1-2과 동일한 방식으로, NCBI database 검색을 통해 MARC1 유전자 정보를 획득한 후, 인간 및 원숭이 유래 MARC1 각각에 대하여, 공통의 표적을 가지는 염기 서열 기준으로 일정 수준의 상동성을 보이는 염기 서열을 선발하여, 총 250종의 asiRNA를 디자인하고 (Sense strand (16-mer), Antisense strand (21-mer)), 이를 bioneer에서 10 nmole scale로 합성하였다. 상기의 방법에 따라 디자인된 MARC1 asiRNA의 서열 정보는 하기 표 10 내지 표 14에 나타낸 바와 같다.

[0185] [표 10]

asiRNA name		Sequence(5' → 3')	SEQ NO.
asiMARC1-51	sense	GAGGGAAACAUUGGUUA	101
	ant isense	UAACCAUGUUUCCUCCUGGU	102
asiMARC1-52	sense	GGAGGGAAACAUGGUA	103
	ant isense	UACCAUGUUUCCUCCUGGUU	104
asiMARC1-53	sense	ACCAGAGGGAAACAA	105
	ant isense	UUGUUUCCUCCUGGUUGAUC	106
asiMARC1-54	sense	UCAACAGGAGGGAAA	107
	ant isense	UUUCCUCCUGGUUGAUCACA	108
asiMARC1-55	sense	GGCUUGUGAUCAACCA	109
	ant isense	UGGUUGAUCACAAGCCAAAAC	110
asiMARC1-56	sense	GUCCUGAUUUCCUGA	111
	ant isense	UCAGGGAAAUCAGGACCAGGC	112
asiMARC1-57	sense	CUCGCCUGGUCCUGAA	113
	ant isense	UUCAGGACCAGGCGAGGUCC	114
asiMARC1-58	sense	CCUCGCCUGGUCCUGA	115
	ant isense	UCAGGACCAGGCGAGGUCCU	116
asiMARC1-59	sense	GACACCCUGACUCUCA	117
	ant isense	UGAGAGUCAGGGUGUCACCAU	118
asiMARC1-60	sense	UGGUGACACCCUGACA	119
	ant isense	UGUCAGGGUGUCACCAUCGCA	120
asiMARC1-61	sense	GCGAUGGUGACACCCA	121
	ant isense	UGGGUGUACCAUCGCAGGUC	122
asiMARC1-62	sense	CCACCACAAUGCAGA	123
	ant isense	UCUGCAUUGUGGUGGGGUGU	124
asiMARC1-63	sense	GCCACCACAAUGCA	125
	ant isense	UGCAUUGUGGUGGGGUGUUU	126
asiMARC1-64	sense	AACGCCACCACAAAA	127
	ant isense	UUUUGUGGUGGGCGUUUGAU	128
asiMARC1-65	sense	UGCACAAGUCAGAGA	129
	ant isense	UCUCUGCACUUGGCACUGCA	130
asiMARC1-66	sense	GCUUCCUGAAGUCACA	131
	ant isense	UGUGACUUCAGGAAGCUGGUU	132
asiMARC1-67	sense	CAGCUUCCUGAAGUCA	133
	ant isense	UGACUUCAGGAAGCUGGUUAU	134
asiMARC1-68	sense	ACCAGUUCUGAAGA	135
	ant isense	UCUUCAGGAAGCUGGUUAUCC	136
asiMARC1-69	sense	GCCACUGGAUAACCA	137
	ant isense	UGGUUAUCCACUGGGGCGUGG	138
asiMARC1-70	sense	ACCGCCAGUGGAUAA	139
	ant isense	UUUUAUCCACUGGGCGUGGCCU	140
asiMARC1-71	sense	CACUUCGAGCCUCACA	141
	ant isense	UGUGAGGCUCGAAGUCACCA	142
asiMARC1-72	sense	UGCACUUCGAGCCUCA	143
	ant isense	UGAGGCUCGAAGUCACCAGG	144
asiMARC1-73	sense	GACACCAGCCAUUCA	145
	ant isense	UGAAUGGGCUGGUGUCUGAGU	146
asiMARC1-74	sense	CAGACACCAGCCAUUA	147
	ant isense	UAUGGGCUGGUGUCUGAGUAA	148
asiMARC1-75	sense	CCAGAUUGCUUACUCA	149
	ant isense	UGAGUAAGCAAUCUGGUCCUU	150
asiMARC1-76	sense	GACCAGAUUGCUUACA	151
	ant isense	UGUAAGCAAUCUGGUCCUUGG	152
asiMARC1-77	sense	AGGACCAGAUUGCUUA	153
	ant isense	UAAGCAAUCUGGUCCUUGGU	154
asiMARC1-78	sense	ACCCAAGGACCAGAUUA	155

[0186]

	ant i sense	UAUCUGGUCCUUGGGUCGGAA	156
asiMARC1-79	sense	GACCCAAGGACCAGAA	157
	ant i sense	UUCUGGUCCUUGGGUCGGAAC	158
asiMARC1-80	sense	GCGAUGUCUAGCAGA	159
	ant i sense	UCUGCAUAGACAUCGCAUCCU	160
asiMARC1-81	sense	AGGAUGCGAUGUCUAA	161
	ant i sense	UUAGACAUCGCAUCCUGAAAU	162
asiMARC1-82	sense	CAGGAUGCGAUGUCUA	163
	ant i sense	UAGACAUCGCAUCCUGAAAUU	164
asiMARC1-83	sense	CCCAAUUUGUAAUUA	165
	ant i sense	UAUUACAUAUUGGGCCUGA	166
asiMARC1-84	sense	GCCCAUAUUGUAAUA	167
	ant i sense	UAUUACAUAUUGGGCCUGAA	168
asiMARC1-85	sense	GGCCCAUAUUGUAAA	169
	ant i sense	UUUACAUAUUGGGCCUGAAG	170
asiMARC1-86	sense	ACUUCAGGCCCAUUA	171
	ant i sense	UUUUGGGCCUGAAGUUGGUU	172
asiMARC1-87	sense	AACUUCAGGCCCAUA	173
	ant i sense	UAUUGGGCCUGAAGUUGGUUG	174
asiMARC1-88	sense	CAACUUCAGGCCCAA	175
	ant i sense	UUUGGGCCUGAAGUUGGUUGC	176
asiMARC1-89	sense	CCAACUUCAGGCCCAA	177
	ant i sense	UUGGGCCUGAAGUUGGUUGCU	178
asiMARC1-90	sense	AGAGAAGAAAGUAAA	179
	ant i sense	UUUAACTUUCUUCUCUAGCCU	180
asiMARC1-91	sense	UAGAGAAGAAAGUUA	181
	ant i sense	UUAACUUCUUCUCUAGCCUG	182
asiMARC1-92	sense	CUAGAGAAGAAAGUUA	183
	ant i sense	UAACUUCUUCUCUAGCCUGG	184
asiMARC1-93	sense	CUGGCGGAUCUACAA	185
	ant i sense	UGUUGAGAUCGCCAGCGACG	186
asiMARC1-94	sense	AGCUUCUUAUUGGUGA	187
	ant i sense	UCACCAUAAGAAGCUAUCC	188
asiMARC1-95	sense	GCAUUUUAAACCACAGA	189
	ant i sense	UCUGUGGUUAAAUGCAUCUG	190
asiMARC1-96	sense	UCCAGAUGCAUUUUA	191
	ant i sense	UUAAAUGCAUCUGGAACAAG	192
asiMARC1-97	sense	UUCCAGAUGCAUUUA	193
	ant i sense	UAAAUGCAUCUGGAACAAGC	194
asiMARC1-98	sense	GUCCAGAUGCAUUUA	195
	ant i sense	UAAAUGCAUCUGGAACAAGCC	196
asiMARC1-99	sense	UGUCCAGAUGCAUUA	197
	ant i sense	UAAUGCAUCUGGAACAAGCCA	198
asiMARC1-100	sense	UUGUCCAGAUGCAUA	199
	ant i sense	UAUGCAUCUGGAACAAGCCAU	200

[0187]

[0188] [표 11]

asiRNA name		Sequence(5' → 3')	SEQ NO.
asiMARC1-101	sense	GUGUCAUGAGCAGGAA	201
	ant isense	UUCCUGCUCAUGACACCGGUG	202
asiMARC1-102	sense	CUGCUGGGCCAGUAAA	203
	ant isense	UUUACUGGCCAGCAGGUACA	204
asiMARC1-103	sense	CCUGCUGGGCCAGUAA	205
	ant isense	UUACUGGCCAGCAGGUACAC	206
asiMARC1-104	sense	CCCAGGGACCAUAAA	207
	ant isense	UUUGAUGGUCCUGGGUUUUC	208
asiMARC1-105	sense	ACCCAGGGACCAUCAA	209
	ant isense	UUGAUGGUCCUGGGUUUCC	210
asiMARC1-106	sense	GGCAGAUUUUGUGCA	211
	ant isense	UGCACAAAAUACUGCCCAAAG	212
asiMARC1-107	sense	CUUUGGCAGUAUUUA	213
	ant isense	UAAUACUGCCCAAAGAGUGG	214
asiMARC1-108	sense	UCUUUGGCAGUAUUA	215
	ant isense	UAAUACUGCCCAAAGAGUGGU	216
asiMARC1-109	sense	CUCUUUGGCAGUAUA	217
	ant isense	UAUACUGCCCAAAGAGUGGUG	218
asiMARC1-110	sense	ACUCUUUGGCAGUAA	219
	ant isense	UUACUGCCCAAAGAGUGUGA	220
asiMARC1-111	sense	CACUCUUUGGCAGUA	221
	ant isense	UACUGCCCAAAGAGUGGUGAU	222
asiMARC1-112	sense	CCACUCUUUGGCAGAA	223
	ant isense	UCUGCCCAAAGAGUGGUAUU	224
asiMARC1-113	sense	GGAAAAUCACCACUCA	225
	ant isense	UGAGUGGUGAUUUCCAUAUA	226
asiMARC1-114	sense	CGAAAGUUAU/AUGGAA	227
	ant isense	UUCCAUAUAACUUUCGUUCUG	228
asiMARC1-115	sense	CAGAACGAAAGUUAUA	229
	ant isense	UAUAACUUUCGUUCUGAAGGG	230
asiMARC1-116	sense	UCAGAACGAAAGUUA	231
	ant isense	UUAACUUUCGUUCUGAAGGGU	232
asiMARC1-117	sense	UUCAGAACGAAAGUUA	233
	ant isense	UAACUUUCGUUCUGAAGGGUC	234
asiMARC1-118	sense	CCUUCAGAACGAAAGA	235
	ant isense	UCUUUCGUUCUGAAGGGUCAC	236
asiMARC1-119	sense	ACCCUUCAGAACGAAA	237
	ant isense	UUUCGUUCUGAAGGGUCACAC	238
asiMARC1-120	sense	GACCCUUCAGAACGAA	239
	ant isense	UUCGUUCUGAAGGGUCACACU	240
asiMARC1-121	sense	GGAACCGCUGGAAACA	241
	ant isense	UGUUUCCAGCGGUCCUCCU	242
asiMARC1-122	sense	UCCUGGAAUUAUAGAA	243
	ant isense	UUCUAAUUAUCCAGGACAUAC	244
asiMARC1-123	sense	GUCCUGGAAUUAUAGA	245
	ant isense	UCUAAUUAUCCAGGACAUACG	246
asiMARC1-124	sense	AUGUCCUGGAAUUA	247
	ant isense	UAAUUAUCCAGGACAUACGGU	248
asiMARC1-125	sense	GUUUGUCCUGGAAUUA	249
	ant isense	UUUAUCCAGGACAUACGGUUC	250
asiMARC1-126	sense	CGUAUGUCCUGGAAUA	251
	ant isense	UAUUAUCCAGGACAUACGGUCC	252
asiMARC1-127	sense	CCGUUUGUCCUGGAAA	253
	ant isense	UUUCCAGGACAUACGGUCCC	254

[0189]

asiMARC1-128	sense	ACCGUAUGUCCUGGAA	255
	ant i sense	UUCCAGGACAUACGGUCCCA	256
asiMARC1-129	sense	CAGAACUGAGACCUCA	257
	ant i sense	UGAGGUCUCAGUUCUGAAACA	258
asiMARC1-130	sense	GGUGUUUCAGAACUGA	259
	ant i sense	UCAGUUCUGAAACACCAUGCU	260
asiMARC1-131	sense	GCAUGGUGUUUCAGAA	261
	ant i sense	UUCUGAAACACCAUGCUCAA	262
asiMARC1-132	sense	AGCAUGGUGUUUCAGA	263
	ant i sense	UCUGAAACACCAUGCUCAAG	264
asiMARC1-133	sense	UUGAAGCAUGGUGUUA	265
	ant i sense	UAACACCAUGCUCAAGUGUU	266
asiMARC1-134	sense	CUCAAAAUGACAACA	267
	ant i sense	UGUUGUCAUUUUGAGACAU	268
asiMARC1-135	sense	CUCUACAUUUUCUUUA	269
	ant i sense	UAAAGAAAUGAGAGGUCUC	270
asiMARC1-136	sense	CGUCUUUGGACUUA	271
	ant i sense	UGAAGUCCAAAAGACGAAAA	272
asiMARC1-137	sense	GCUUCAUGUCCCAGA	273
	ant i sense	UCUGGGACAUUGAAGCAUGA	274
asiMARC1-138	sense	CUCAUUCUUAUGA	275
	ant i sense	UCAUGAAGCAUUGAGACACC	276
asiMARC1-139	sense	GUCUCAUGCUCAAA	277
	ant i sense	UUUGAAGCAUUGAGACACCAG	278
asiMARC1-140	sense	GUGUCUCAUGCUUA	279
	ant i sense	UGAAGCAUUGAGACACCAGAA	280
asiMARC1-141	sense	UGGUGUCUCAUGCUA	281
	ant i sense	UAGCAUUGAGACACCAGAAGU	282
asiMARC1-142	sense	CAGGAUUCUGAAAAACA	283
	ant i sense	UGUUUCAGAAUCCUGUCUUG	284
asiMARC1-143	sense	GACAGGAUUCUGAAAA	285
	ant i sense	UUUUCAGAAUCCUGUCUUGUC	286
asiMARC1-144	sense	AGACAGGAUUCUGAAA	287
	ant i sense	UUUCAGAAUCCUGUCUUGUCA	288
asiMARC1-145	sense	GACAAGACAGGAUUA	289
	ant i sense	UGAAUCCUGUCUUGUCAUUUA	290
asiMARC1-146	sense	AUGACAAGACAGGAUA	291
	ant i sense	UAUCCUGUCUUGUCAUUUAAG	292
asiMARC1-147	sense	CCGUUUAACUGAUUA	293
	ant i sense	UUAUUCAGUUAACGGGGAGU	294
asiMARC1-148	sense	CCCGUUUAACUGAUUA	295
	ant i sense	UAAUCAGUUAACGGGGAGUU	296
asiMARC1-149	sense	CCCCGUUUAACUGAUUA	297
	ant i sense	UAUCAGUUAACGGGGAGUUU	298
asiMARC1-150	sense	CGUUUAUCUACCAAGA	299
	ant i sense	UCUUGGUAGAUAAACGGAGAA	300

[0190]

[0191]

[표 12]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-151	sense	UCCGUUUUACUACCAA	301
	antisense	UUGGUAGAUAAACGGAGAAGC	302
asiMARC1-152	sense	UCCUGUCACUACCACA	303
	antisense	UGUGGUAGUGACAGGAUGCAA	304
asiMARC1-153	sense	GAGAAAGAGGAAGAGA	305
	antisense	UCUCUUCUCUUUCUCUCUU	306
asiMARC1-154	sense	GAGAAGAAGAGAAAGA	307
	antisense	UCUUUCUCUUUCUCUUUCU	308
asiMARC1-155	sense	AAGAGAAGAGAGAAA	309
	antisense	UUUCUCUUUCUCUUUCUCU	310
asiMARC1-156	sense	GAGAAAGAGAGAAAGA	311
	antisense	UCUUCUCUCUUUCUCUAACG	312
asiMARC1-157	sense	UACGCAUGAAAAUUA	313
	antisense	UAAUUUCAUUGCGUACCUCA	314
asiMARC1-158	sense	GUACGCAUGAAAAUA	315
	antisense	UAUUUCAUUGCGUACCUCAU	316
asiMARC1-159	sense	CAAAUAGGCUGGAAA	317
	antisense	UUUCCAGCCAUUUUGGGGUG	318
asiMARC1-160	sense	CCCAAAUAGGCUGGA	319
	antisense	UCCAGCCAUUUUGGGGUGCA	320
asiMARC1-161	sense	CUUUUGAAAUGGCAUA	321
	antisense	UAUGCCAUUCAAAGCUAGC	322
asiMARC1-162	sense	GCUUUUGAAAUGGCAA	323
	antisense	UUGCCAUUCAAAGCUAGCC	324
asiMARC1-163	sense	GGCUAGCUUUUGAAAA	325
	antisense	UUUUCAAAAGCUAGCCCGGGG	326
asiMARC1-164	sense	GGGCUAGCUUUUGAAA	327
	antisense	UUUCAAAGCUAGCCCGGGGC	328
asiMARC1-165	sense	CGGGCUAGCUUUUGAA	329
	antisense	UUCAAAGCUAGCCCGGGGCU	330
asiMARC1-166	sense	CCGGGCUAGCUUUUGA	331
	antisense	UCAAAGCUAGCCCGGGGCUU	332
asiMARC1-167	sense	CCCCGGGCUAGCUUUA	333
	antisense	UAAAGCUAGCCCGGGGCUUGA	334
asiMARC1-168	sense	GCCCCGGGCUAGCUUA	335
	antisense	UAAGCUAGCCCGGGGCUUGAG	336
asiMARC1-169	sense	AGCCCCGGGCUAGCUA	337
	antisense	UAGCUAGCCCGGGGCUUGAGA	338
asiMARC1-170	sense	CUCAAGCCCCGGGCUA	339
	antisense	UAGCCCCGGGCUUGAGAAGAA	340
asiMARC1-171	sense	ACCUUCAGGAAGCACA	341
	antisense	UGUGCUUCCUGAAGGUCACCU	342
asiMARC1-172	sense	AGGUGACCUUCAGGAA	343
	antisense	UUCUGAAGGUCACCUCAGUC	344
asiMARC1-173	sense	CCAUAGAUCUGGAUCA	345
	antisense	UGAUCCAGAUUAUGGAAAAU	346
asiMARC1-174	sense	CUGCAGAUUAUUAUUA	347
	antisense	UAAUUAUAUUCUGCAGUGCUU	348
asiMARC1-175	sense	ACUGCAGAUUAUUAUA	349
	antisense	UAUUAAUUCUGCAGUGCUUC	350
asiMARC1-176	sense	CAUUGGAUUUCCUAAA	351
	antisense	UUUAGGAAAUCCAAUGCUGUC	352
asiMARC1-177	sense	GCAUUGGAUUUCCUAA	353
	antisense	UUAGGAAAUCCAAUGCUGUCU	354

[0192]

asiMARC1-178	sense	AGCAUUGGAUUUCCUA	355
	antisense	UAGGAAAUCCAUGCUGUCUG	356
asiMARC1-179	sense	AGACAGCAUUGGAUUA	357
	antisense	UAAUCCAUGCUGUCUGAGAA	358
asiMARC1-180	sense	CAGACAGCAUUGGAUA	359
	antisense	UAUCCAUGCUGUCUGAGAAG	360
asiMARC1-181	sense	GUUCUCAGACAGCAA	361
	antisense	UUGCUGUCUGAGAAGCAGCAG	362
asiMARC1-182	sense	UGCUGCUUCUCAGACA	363
	antisense	UGUCUGAGAAGCAGCAGGGCC	364
asiMARC1-183	sense	CCUGCUGCUUCUCAGA	365
	antisense	UCUGAGAAGCAGCAGGGCCAG	366
asiMARC1-184	sense	AGGAUGGUUGUGAGA	367
	antisense	UCUACACAACCAUCCUCCUGA	368
asiMARC1-185	sense	CUGGAUCCUUGCCAUA	369
	antisense	UAUGGCAAGGAUCCAGGGGUC	370
asiMARC1-186	sense	CCUGGAUCCUUGCCAA	371
	antisense	UUGGCAAGGAUCCAGGGGUCC	372
asiMARC1-187	sense	CCCUGGAUCCUUGCCA	373
	antisense	UGGCAAGGAUCCAGGGGUCCU	374
asiMARC1-188	sense	GGACCCUGGAUCCUA	375
	antisense	UAGGAUCCAGGGGUCCUCCAU	376
asiMARC1-189	sense	UGGAGGACCCUGGAA	377
	antisense	UUCCAGGGGUCCUCCAUACU	378
asiMARC1-190	sense	UGCUCUUCUCCAGUA	379
	antisense	UACUGGAGAAGGACACUCCG	380
asiMARC1-191	sense	GUGCUCCUUCUCCAGA	381
	antisense	UCUGGAGAAGGACACUCCGU	382
asiMARC1-192	sense	ACGGAGUGCUCCUUA	383
	antisense	UGAAGGAGCACUCCGUCAUUA	384
asiMARC1-193	sense	UGAAAAGUUCUGAAA	385
	antisense	UUUCAGAACUUUUACCCCGG	386
asiMARC1-194	sense	GUGAAAAAGUUCUGAA	387
	antisense	UUCAGAACUUUUACCCCGGA	388
asiMARC1-195	sense	GGUGAAAAAGUUCUGA	389
	antisense	UCAGAACUUUUACCCCGGAA	390
asiMARC1-196	sense	CGGGUGAAAAAGUUA	391
	antisense	UGAACUUUUACCCCGGAACU	392
asiMARC1-197	sense	UCCGGGUGAAAAAGUA	393
	antisense	UACUUUUUACCCCGGAACUGG	394
asiMARC1-198	sense	AAGUGAUUCAGUGAUA	395
	antisense	UAUCACUGAAUACAUUUUCUU	396
asiMARC1-199	sense	GAGAAGAAAAGUGAUA	397
	antisense	UAUCACUUUUUCUCCUCCA	398
asiMARC1-200	sense	GGAGAAGAAAAGUGAA	399
	antisense	UUCACUUUUUCUCCUCCAC	400

[0193]

[0194] [표 13]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-201	sense	GGAGGAGAAGAAAAGA	401
	antisense	UCUUUUCUUCUCCUCCACAGA	402
asiMARC1-202	sense	GUGGAGGAGAAGAAA	403
	antisense	UUUUCUUCUCCUCCACAGAAU	404
asiMARC1-203	sense	UGUGGAGGAGAAGAAA	405
	antisense	UUUCUUCUCCUCCACAGAAU	406
asiMARC1-204	sense	CUGUGGAGGAGAAGAA	407
	antisense	UUCUUCUCCUCCACAGAAUUC	408
asiMARC1-205	sense	GGGGAAAAGGAAAGCA	409
	antisense	UGC UUUCUUUUCUUUUUA	410
asiMARC1-206	sense	AAGGGGAAAAGGAAA	411
	antisense	UUUCCUUUCCUUUUAAAG	412
asiMARC1-207	sense	CUUUAAAGGGGAAA	413
	antisense	UUUCCCCUUUAAAGGUUU	414
asiMARC1-208	sense	CCUUUAAAGGGGAAA	415
	antisense	UUUCCCCUUUAAAGGUUUUC	416
asiMARC1-209	sense	ACCUUUAAAGGGGAA	417
	antisense	UCCCCUUUAAAGGUUUCA	418
asiMARC1-210	sense	UACUGAAAACCUUUA	419
	antisense	UUAAAGGUUUCAGUAGUCUA	420
asiMARC1-211	sense	CUACUGAAAACCUUA	421
	antisense	UAAAGGUUUCAGUAGUCUAU	422
asiMARC1-212	sense	ACUACUGAAAACCUA	423
	antisense	UAGGUUUUCAGUAGUCUAUC	424
asiMARC1-213	sense	GACUACUGAAAACCUA	425
	antisense	UAGGUUUUCAGUAGUCUAUCU	426
asiMARC1-214	sense	UUGUUUAAAACCCAAA	427
	antisense	UUUGGGUUUUAACACUGAC	428
asiMARC1-215	sense	CAUAGUCAGUUGUA	429
	antisense	UAAACACUGACAUUAGCUUUC	430
asiMARC1-216	sense	GCAUAGUCAGUUGUA	431
	antisense	UACAAUGACAUUAGCUUCC	432
asiMARC1-217	sense	AGCAUAGUCAGUUGA	433
	antisense	UCAACUGACAUUAGCUUCCU	434
asiMARC1-218	sense	CCAUUUUGUCCUUUGA	435
	antisense	UCAAAGGACAAAUGGCAUAU	436
asiMARC1-219	sense	UGCCAUUUUGUCCUUA	437
	antisense	UAAAGGACAAAUGGCAUAAA	438
asiMARC1-220	sense	AGAUCUGAUGAAGUAA	439
	antisense	UUACUUCAGACAUUAGAG	440
asiMARC1-221	sense	CUCUAAGAUCUGAUGA	441
	antisense	UCAUCAGAUUAGAGUUAUA	442
asiMARC1-222	sense	GGAAGUUGACUAAACA	443
	antisense	UGUUUAGUCAACUCCCAUAU	444
asiMARC1-223	sense	UGGGAAGUUGACUAAA	445
	antisense	UUUAGUCAACUCCCAUAUA	446
asiMARC1-224	sense	UUGGGAAGUUGACUAA	447
	antisense	UUAGUCAACUCCCAUAUA	448
asiMARC1-225	sense	CUACUUUGACUAGUUA	449
	antisense	UAACUAGUCAAGUAGCUUCC	450
asiMARC1-226	sense	GCUACUUUGACUAGUA	451
	antisense	UACUAGUCAAGUAGCUUCCA	452
asiMARC1-227	sense	AGCUACUUUGACUAGA	453
	antisense	UCUAGUCAAGUAGCUUCCAU	454

[0195]

asiMARC1-228	sense	GGAAGCUACUUGACA	455
	ant i sense	UGUCAAGUAGCUUCCAUIUA	456
asiMARC1-229	sense	GCCUGGUCCUGAUUUA	457
	ant i sense	UAAAUCCAGGACCAGGCGAGGU	458
asiMARC1-230	sense	CGCCUGGUCCUGAUUA	459
	ant i sense	UAAUCAGGACCAGGCGAGGUU	460
asiMARC1-231	sense	UCGCCUGGUCCUGAUUA	461
	ant i sense	UAUCAGGACCAGGCGAGGUUC	462
asiMARC1-232	sense	CUGACUCUCAGUGCAA	463
	ant i sense	UUGACUCAGAGUCAGGGUGU	464
asiMARC1-233	sense	CCUGACUCUCAGUGCA	465
	ant i sense	UGCACUGAGAGUCAGGGUGUC	466
asiMARC1-234	sense	CACCCUGACUCUCAGA	467
	ant i sense	UCUGAGAGUCAGGGUGUCACC	468
asiMARC1-235	sense	GUGACACCCUGACUCA	469
	ant i sense	UGAGUCAGGGUGUCACCAUCG	470
asiMARC1-236	sense	AGAUUGCUUACUCAGA	471
	ant i sense	UCUGAGUAGCAUUCUGGUCC	472
asiMARC1-237	sense	UCUCAACUCCAGGCUA	473
	ant i sense	UAGCCUGGAGUUGAGAUCCGC	474
asiMARC1-238	sense	GGAUCUCAACUCCAGA	475
	ant i sense	UCUGGAGUUGAGAUCCGCCAG	476
asiMARC1-239	sense	CGGAUCUCAACUCCA	477
	ant i sense	UUGGAGUUGAGAUCCGCCAGC	478
asiMARC1-240	sense	GCGGAUCUCAACUCCA	479
	ant i sense	UGGAGUUGAGAUCCGCCAGCG	480
asiMARC1-241	sense	GGCGGAUCUCAACUCA	481
	ant i sense	UGAGUUGAGAUCCGCCAGCGA	482
asiMARC1-242	sense	AGGGUGAUGGCUUGUA	483
	ant i sense	UACAAGCCAUCACCCUUUUA	484
asiMARC1-243	sense	ACCUGCUGGGCCAGUA	485
	ant i sense	UACUGGCCAGCAGGUACACA	486
asiMARC1-244	sense	AGAGAAAGAGAAGAAA	487
	ant i sense	UUUCUUCUCUUCUCUAACGA	488
asiMARC1-245	Sense	UAGAGAAAGAGAAGAA	489
	ant i sense	UUCUUCUCUUCUCUAACGAG	490
asiMARC1-246	Sense	AGGAGAAGAAAAGUGA	491
	ant i sense	UCACUUUUUCUCCUCCACA	492
asiMARC1-247	sense	GCAGCCUACACAAAAGA	493
	ant i sense	UCUUUGUGUAGGCUGCACUGA	494
asiMARC1-248	sense	UGCAGCCUACACAAAA	495
	ant i sense	UUUUGUGUAGGCUGCACUGAG	496
asiMARC1-249	sense	CAGUGCAGCCUACACA	497
	ant i sense	UGUGUAGGCUGCACUGAGAGU	498
asiMARC1-250	sense	CUCAGUGCAGCCUACA	499
	ant i sense	UGUAGGCUGCACUGAGAGUCA	500

[0196]

[0197] [표 14]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-251	sense	UCUCAGUGCAGCCUAA	501
	antisense	UUAGGUCGACUGAGAGUCAG	502
asiMARC1-252	sense	CUCUCAGUGCAGCCUA	503
	antisense	UAGGUCGACUGAGAGUCAGG	504
asiMARC1-253	sense	CCUUUCUGAGGCGUCA	505
	antisense	UGAGGCCUCAGAAAGGAUCAA	506
asiMARC1-254	sense	UCCUUUCUGAGGCGUA	507
	antisense	UACGCCUCAGAAAGGAUCAAG	508
asiMARC1-255	sense	AAGAAAGUUAAGCAA	509
	antisense	UUGCUUUAACUUUCUCUCUA	510
asiMARC1-256	sense	GGUGACGUGGAACUGA	511
	antisense	UCAGUCCACGUCACCAUAA	512
asiMARC1-257	sense	UGGUGACGUGGAACUA	513
	antisense	UAGUCCACGUCACCAUUAAG	514
asiMARC1-258	sense	CAGAUGC AUUUUAACA	515
	antisense	UGUAAAAUGCAUCUGGAACA	516
asiMARC1-259	sense	CCAUCAAAGUGGAGA	517
	antisense	UCUCCCAUUGAUGGUCCCU	518
asiMARC1-260	sense	CAGGGACCAUCAAGA	519
	antisense	UCUUUGAUGGUCCUGGGUUU	520
asiMARC1-261	sense	CCAGGGACCAUAAAA	521
	antisense	UUUUGAUGGUCCUGGGUUU	522
asiMARC1-262	sense	UAUUUUGUGCUGGAAA	523
	antisense	UUUCCAGCACAAAUAACUGCC	524
asiMARC1-263	sense	UUGGGCAGUAUUUGA	525
	antisense	UCAAUAACUGCCCAAGAGU	526
asiMARC1-264	sense	ACGCAAUAGAAAAUUA	527
	antisense	UUAAUUUUCAUUGCGUACCUC	528
asiMARC1-265	sense	CCAAAUUGGCUGGAA	529
	antisense	UUCCAGCCAUAUUUGGGGUGC	530
asiMARC1-266	sense	CUUCUCAGACAGCAUA	531
	antisense	UAUGCUGUCUGAGAAGCAGCA	532
asiMARC1-267	sense	GCUGCUUCUCAGACAA	533
	antisense	UUGUCUGAGAAGCAGAGGGC	534
asiMARC1-268	sense	AGGAGGGAACAUGGA	535
	antisense	UCCAUGUUUCCCUCCUGGUUG	536
asiMARC1-269	sense	CAGGAGGGAACAUGA	537
	antisense	UCAUGUUCUCCUCCUGGUUGA	538
asiMARC1-270	sense	CUGAUUUCUCCUGACCA	539
	antisense	UGGUCAGGGAAAUACAGGACCA	540
asiMARC1-271	sense	CCUGGUCCUGAUUUA	541
	antisense	UGAAAUACAGACCAGGCGAGG	542
asiMARC1-272	sense	AGCCUACACAAAGGAA	543
	antisense	UUCCUUUGUGUAGGCUGCACU	544
asiMARC1-273	sense	CAGCCUACACAAAGGA	545
	antisense	UCCUUUGUGUAGGCUGCACUG	546
asiMARC1-274	sense	GUGCAGCCUACACAAA	547
	antisense	UUUGUGUAGGCUGCACUGAGA	548
asiMARC1-275	sense	AGUGCAGCCUACACAA	549
	antisense	UUUGUAGGCUGCACUGAGAG	550
asiMARC1-276	sense	CCCUGACUCUCAGUGA	551
	antisense	UCACUGAGAGUCAGGGUGUCA	552
asiMARC1-277	sense	ACCCUGACUCUCAGUA	553
	antisense	UACUGAGAGUCAGGGUGUCAC	554
asiMARC1-278	sense	AAACGCCACCACAAA	555

[0198]

	antisense	UUUGUGGUGGCGUUUGAUA	556
asiMARC1-279	sense	GCACAAGUCGAGAGUA	557
	antisense	UACUCUGCACUUGUGCACUGC	558
asiMARC1-280	sense	GGUGCACUUCGAGCCA	559
	antisense	UGGCUUGAAGUGACAGGCG	560
asiMARC1-281	sense	GCCUGGUGCACUUGA	561
	antisense	UCCAAGUGCACCAGCGGUAG	562
asiMARC1-282	sense	CGCCUGGUGCACUUA	563
	antisense	UGAAGUGCACCAGCGGUAGG	564
asiMARC1-283	sense	CCGCCUGGUGCACUUA	565
	antisense	UAAGUGCACCAGCGGUAGGG	566
asiMARC1-284	sense	ACCGCUGGUGCACUA	567
	antisense	UAGUGCACCAGCGGUAGGGC	568
asiMARC1-285	sense	CGACCCAAGGACAGA	569
	antisense	UCUGGUCCUUGGUGCGAACA	570
asiMARC1-286	sense	CCGACCCAAGGACCA	571
	antisense	UUGGUCCUUGGUGCGAACA	572
asiMARC1-287	sense	UGGCGGAUCUACUA	573
	antisense	UAGUGAGAUCGCCAGCGAC	574
asiMARC1-288	sense	GUGACGUGAACUGAA	575
	antisense	UUCAGUCCACGUCACCAUA	576
asiMARC1-289	sense	UUGGUGACGUGGAACA	577
	antisense	UGUCCACGUCACCAUAAGA	578
asiMARC1-290	sense	CCAGAUGCAUUUAAA	579
	antisense	UUUAAAUGCAUCUGGAACA	580
asiMARC1-291	sense	GGCCAGUAAUGGGAA	581
	antisense	UUUCCAUUACUGGCCAGCA	582
asiMARC1-292	sense	GGGCCAGUAAUGGGAA	583
	antisense	UUCCCAUACUGGCCAGCAG	584
asiMARC1-293	sense	ACCAUCAAAGUGGAA	585
	antisense	UUCCCAUUGAUGGUCCUG	586
asiMARC1-294	sense	GACCAUCAAGUGGGA	587
	antisense	UCCCAUUGAUGGUCCUGG	588
asiMARC1-295	sense	UGGAAAACCCAGGAA	589
	antisense	UUCUUGGGUUUCCAGCACA	590
asiMARC1-296	sense	CUGGAAAACCCAGGGA	591
	antisense	UCCUGGGUUUCCAGCACA	592
asiMARC1-297	sense	CGCUGGAAACACUGAA	593
	antisense	UUCAGUGUUCCAGCGGUUCC	594
asiMARC1-298	sense	CCGCUUGAAACACUGA	595
	antisense	UCAGUGUUCCAGCGGUUCCU	596
asiMARC1-299	sense	ACCGCUGGAAACACUA	597
	antisense	UAGUGUUCCAGCGGUUCCU	598
asiMARC1-300	sense	AACCGCUGGAAACACA	599
	antisense	UGUGUUUCCAGCGGUUCCU	600

[0199]

[0201]

3-2. MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

[0202]

mRNA 수준에서 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 MARC1 asiRNA를 Huh7 세포에 형질감염시킨 후, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, 상기 Huh7 세포는 96 well plate에 8×10^3 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 MARC1 asiRNA (10 nM, OliX Inc.)와 RNAiMax (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150)를 첨가한 뒤, Invitrogen으로부터 제공된 프로토콜에 따라 형질감염을 수행하였다. 이로부터 24시간 후, SuperPrep™ Cell lysis & RT kit for qPCR Kit II (TOYOBO, SCQ-401)를 사용하여 cell lysate를 준비하고, 이에 포함된 mRNA를 주형으로 하는 역전사 과정을 통하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 cDNA를 주형으로 하여, 정량적 PCR을 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (TOYOBO, QPS-101), 및 Probe (Hs00224227_m1, Hs03928985_g1, Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였고, mRNA 발현 억제 수준을 기준으로, 1차적으로 총 134 종의 MARC1 asiRNA를 선별하였다 (미도시). 한편, 본 실시예에서 대조군은 형질 감염 시 약만을 첨가한 군 (Mock), 양성 대조군으로 asiMARC1-30을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방식으로 형질감염을 수행한 군 (PC1)을 사용하였다. 이후, 상기과 같이 선별된 134종의 MARC1 asiRNA를 대상으로, 상기과 동일한 방식으로, MARC1 asiRNA 처리 농도만을 1 nM 또는 0.1 nM로 순차적으로 변경하면서, MARC1 mRNA 발현 수준을 평가하였다.

[0203]

그 결과, 도 20A 내지 도 20C에 나타난 바와 같이, MARC1 asiRNA 134종 1 nM 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였고, 이들 중에서, MARC1 발현 억제 효율이 우수한 상위 41 종의 MARC1 asiRNA를 선별하였다 (#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). 또한, 도 21에 나타난 바와 같이, 상기 발현 억제 효과를 확인한 MARC1 asiRNA 41종 0.1 nM 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였고, 이들 중에서, 다시 MARC1 발현 억제 효율이 우수한 상위 30 종의 MARC1 asiRNA를 선별하였다 (#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).

[0205] **3-3. MARC1 단백질의 발현 억제 효과의 평가**

[0206] 단백질 수준에서 발현 억제 효과를 확인하기 위해, 상기 실시예 3-2에서 선별된 30종의 MARC1 asiRNA를 Huh7 세포에 형질감염시킨 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 MARC1 단백질의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, 상기 Huh7 세포는 12 well plate에 5×10^4 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 MARC1 asiRNA 1 nM, OliX Inc.)와 RNAiMax (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150)를 첨가한 뒤, Invitrogen으로부터 제공된 프로토콜에 따라 형질감염을 수행하였다. 이로부터 48시간 후, 상기 형질감염된 세포를 파쇄하여 각 샘플마다 15 μ g의 cell lysate를 수득하였다. 상기 수득한 cell lysate를 대상으로, 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔, MARC1 Rabbit 폴리클로날 항체 (1:1000 dilution in 3% BSA, Abcepta, AP9754c), 및 Vinculin Mouse 모노클로날 항체 (1:1000 dilution in 3% BSA, Santa Cruz Biotechnology, sc-73614)를 사용하여 Western blot을 수행하였고, ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)으로 MARC1 단백질의 발현 수준을 확인하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군은 형질 감염 시약만을 첨가한 군 (M), 양성 대조군으로 asiMARC1-30 또는 asiMARC1-31을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방식으로 형질감염을 수행한 군(PC1, PC2)을 사용하였다.

[0207] 그 결과, 도 22에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 3-2에서 선별된 총 30 종의 MARC1 asiRNA는 모두 MARC1 단백질의 발현을 억제함을 확인하였다.

[0209] **실시예 4: 화학적 변형이 도입된 RNAi 유도용 핵산 분자의 제조**

[0210] **4-1. 41종의 MARC1 GalNAc-asiRNA 디자인 및 제작**

[0211] 본 실시예에서는 상기 실시예 1 및 3에서 발현 억제 효과를 확인한 MARC1 asiRNA를 대상으로, GalNAc ligand 및 화학적 변형이 도입된 비대칭 siRNA (GalNAc-asiRNA)를 디자인하였다. 상기 디자인된 GalNAc-asiRNA는 상기 asiRNA에 비해, 다양한 화학적 변형 (2'OMe, PS, Fluoro, GalNAc ligand 등)이 도입된 것으로서, 간 세포 내부로의 전달이 향상된 비대칭 siRNA이다.

[0212] 본 실시예에서 제작한 총 41종의 MARC1 GalNAc-asiRNA의 서열 정보는 하기 표 15과 같다.

[0213] [표 15]

GalNAc-siRNA name	Sequence(5' → 3')	
	sense	anti sense
OLX-031-1	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-3	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-4	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-Ga1NAc	P-mU*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-6	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-7	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-8	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-Ga1NAc	P-mU*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-9	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-Ga1NAc	P-mU*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-075-1	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-Ga1NAc	P-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-080-1	mG*fC*mGfAfUfGmUfCmUfAmUfGmCfAmGfA-Ga1NAc	P-mU*fC*mUmGmCmAfUmAfGmAmCmAfUmGfCmA*mU*mC*mC*mU
OLX-089-1	mC*fC*mAfAfCfUmUfCmAfGmGfCmCfCmAfA-Ga1NAc	P-mU*fU*mGmGmCfCmUfGmAmAmGmUfUmGfGmU*mG*mC*mU
OLX-090-1	mA*fG*mAfGfAfAmGfAmAfAmGfUmUfAmAfA-Ga1NAc	P-mU*fU*mUmAmAmCfUmUfUmCmUmUmCfUmCfUmA*mG*mC*mC*mU
OLX-092-1	mC*fU*mAfGfAfGmAfAmGfAmAfAmGfUmUfA-Ga1NAc	P-mU*fA*mAmCmUmUfUmCfUmUmCmUmCfUmAfGmC*mC*mU*mG*mG
OLX-099-1	mU*fG*mUfUfCfCmAfGmAfUmGfCmAfUmUfA-Ga1NAc	P-mU*fA*mAmUmGmCfAmUfCmUmGmAmAfAmCfAmA*mG*mC*mC*mA
OLX-100-1	mU*fU*mGfUfUfCmCfAmGfAmUfGmCfAmUfA-Ga1NAc	P-mU*fA*mUmGmCmAfUmCfUmGmGmAmAfAmGfAmG*mC*mC*mA*mU
OLX-114-1	mC*fG*mAfAfAfGmUfUmAfUmAfUmGfGmAfA-Ga1NAc	P-mU*fU*mCmCmAfAmUfAmAmCmUmUfUmCfGmU*mU*mC*mU*mG
OLX-124-1	mA*fU*mGfUfCfCmUfGmGfAmAfUmAfUmUfA-Ga1NAc	P-mU*fA*mAmUmAmUfUmCfCmAmGmGmAfAmAfUmA*mC*mG*mG*mU
OLX-126-1	mC*fG*mUfAfUfGmUfCmCfUmGfGmAfAmUfA-Ga1NAc	P-mU*fA*mUmUmCmCfAmGfGmAmCmAfAmCfGmG*mU*mU*mC*mC

[0214]

OLX-129-1	sense	mC*fA*mGfAfAfCmUfGmAfGmAfCmCfUmCfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fG*mAmGmUfCmUfCmAmGmUfCmUfGmAmA*mA*mC*mA
OLX-130-1	sense	mG*fG*mUfGfUfUmUfCmAfGmAfAmCfUmGfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fC*mAmGmUfCmUfGmAmAmCfAmCfCmA*UmG*mC*mU
OLX-131-1	sense	mG*fC*mAfUfGfGmUfGmUfUmUfCmAfGmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mCmUmGmAfAmAfCmAmCmCmAfUmGfCmU*mU*mC*mA
OLX-137-1	sense	mG*fC*mUfUfCfAmAfUmGfUmCfCmCfAmGfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fC*mUmGmGmGfAmCfAmUmUmGmAfAmGfCmA*UmU*mG*mA
OLX-143-1	sense	mG*fA*mCfAfGfGmAfUmUfCmUfGmAfAmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mUmUmCmAfGmAfAmUmCmUmUfGmUfCmU*mU*mG*mU*mC
OLX-144-1	sense	mA*fG*mAfCfAfGmGfAmUfUmCfUmGfAmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mUmCmAmGfAmAfUmCmUmGfUmCfUmU*mG*mU*mC*mA
OLX-166-1	sense	mC*fC*mGfGfGfCmUfAmGfCmUfUmUfUmGfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fC*mAmAmAmAfGmCfUmAmGmCmCfCmGfGmG*mC*mU*mU
OLX-177-1	sense	mG*fC*mAfUfUfGmGfAmUfUmUfCmCfUmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mAmGmGmAfAmAfUmCmCmAmAfUmGfCmU*mG*mU*mC*mU
OLX-194-1	sense	mG*fU*mGfAfAfAmAfAmGfUmUfCmUfGmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mCmAmGmAfAmCfUmUmUmUfCmAfCmC*mC*mG*mG*mA
OLX-196-1	sense	mC*fG*mGfGfUfGmAfAmAfAmAfGmUfUmCfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fG*mAmAmCmUfUmUfUmUmCmAmCfCmCfGmG*mA*mC*mU
OLX-200-1	sense	mG*fG*mAfGfAfAmGfAmAfAmAfGmUfGmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mCmAmCmUfUmUfUmCmUmUmCfUmCfCmU*mC*mC*mA*mC
OLX-212-1	sense	mA*fC*mUfAfCfUmGfAmAfAmAfCmCfUmUfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fA*mAmGmUfUmUfUmCmAmGmUfAmGfUmC*mU*mA*mU*mC
OLX-216-1	sense	mG*fC*mAfUfAfUmGfUmCfAmGfUmUfGmUfa-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fA*mCmAmCmCfUmGfAmCmAmUmAfUmGfCmU*mU*mC*mC
OLX-218-1	sense	mC*fC*mAfUfUfUmUfGmUfCmCfUmUfUmGfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fC*mAmAmAmGfGmAfCmAmAmAmAfUmGfGmC*mA*mU*mA
OLX-220-1	sense	mA*fG*mAfUfCfUmGfAmUfGmAfAmGfUmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mAmCmUmUfCmAfUmCmAmGmAfUmCfUmU*mA*mG*mA*mG
OLX-222-1	sense	mG*fG*mAfAfGfUmUfGmAfCmUfAmAfAmCfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fG*mUmUmAmAfGmUfCmAmAmCmUfUmCfCmC*mA*mA*mU*mA
OLX-223-1	sense	mU*fG*mGfGfAfAmGfUmUfGmAfCmUfAmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mUmAmGmUfCmAfAmCmUmUmCfCmCfAmA*UmU*mA*mU*mA
OLX-224-1	sense	mU*fU*mGfGfGfAmAfGmUfUmGfAmCfUmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mAmGmUmCfAmAfCmUmUmCmCfCmAfAmU*mA*mU*mA
OLX-233-1	sense	mC*fC*mUfGfAfCmUfCmUfCmAfGmUfGmCfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fG*mCmAmCmUfGmAfGmAmGmUmCfAmGfGmG*mU*mG*mU*mC
OLX-237-1	sense	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAfGmGfCmUfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fA*mGmCmUfGmGfAmGmUmUmGfAmGfAmU*mC*mC*mG*mC
OLX-264-1	sense	mA*fC*mGfCfAfAmUfGmAfAmAfAmUfUmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mAmAmUfUmUfCmAmUmUmGfCmGfUmA*mC*mC*mU*mC
OLX-274-1	sense	mG*fU*mGfCfAfGmCfCmUfAmCfAmCfAmAfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fU*mUmGmUmGfUmAfGmGmCmUmGfCmAfCmU*mG*mA*mG*mA
OLX-276-1	sense	mC*fC*mCfUfGfAmCfUmCfUmCfAmGfUmGfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fC*mAmCmUmGfAmGfAmGmUmCmAfGmGfGmU*mG*mU*mC*mA
OLX-281-1	sense	mG*fC*mCfUfGfGmUfGmCfUmCfUmGfA-Ga1Nac
	ant isense	P-mU*fC*mGmAmAmGfUmGfCmAmCmCmAfGmGfCmG*mG*mU*mA*mG

[0215]

[0216]

구체적으로, 상기 표 15에서 "*", "m", "f", "P", 및 "Ga1Nac"으로 표기된 화학적 변형은 상기 표 7에 나타낸 바와 같다.

[0218]

4-2. MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

[0219]

mRNA 수준에서 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 실시예 4-1에서 제작한 총 41종의 MARC1 Ga1Nac-asiRNA (100 nM) 각각을 C57BL/6 마우스 (Koatech)로부터 유래된 일차 배양된 마우스 간 세포 (Primary cultured mouse hepatocytes: PMH)에 처리한 후 (n=3), 실시예 1-2와 동일한 방식으로 qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군은 물질을 처리하지 않은 군 (NT), 음성 대조군으로 OLX700A-001-8 (100 nM)을 처리한 군 (NC), 양성 대조군으로 OLX-031-1 (10 nM)을 처리한 군(PC)을 사용하였다.

[0220]

그 결과, 도 23에 나타낸 바와 같이, MARC1 Ga1Nac-asiRNA 41종의 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다. 이들 중에서도, 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-031-4의 발현 억제 효과는 보다 우수하였다.

[0222]

4-3. 인간 유래 간 세포에 대한 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

- [0223] mRNA 수준에서의 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 실시예 4-1에서 제작한 총 41종의 MARC1 GalNAc-asiRNA 각각을 인간으로부터 유래된 일차 간 세포 (Primary human hepatocyte, F00995-P)에 처리한 후 (n=3), qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, 상기 일차 간 세포는 96 well plate에 4×10^4 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 MARC1 GalNAc-asiRNA (500 nM, OliX Inc.)을 처리한 후, 실시예 1-2와 동일한 방식으로, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군은 물질을 처리하지 않은 군 (NT), 음성 대조군으로 OLX700A-001-8 (500 nM)을 처리한 군 (NC), 양성 대조군으로 OLX-031-1 (10 nM)을 처리한 군(PC)을 사용하였다.
- [0224] 또한, MARC1 GalNAc-asiRNA의 처리 농도에 따른 mRNA 수준에서의 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 인간으로부터 유래된 일차 간 세포는 96 well plate에 3×10^4 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 각각 20 nM 또는 100nM의 MARC1 GalNAc-asiRNA (OliX Inc.)를 처리하였다 (n=2). 이후, 실시예 1-2와 동일한 방식으로, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군은 물질을 처리하지 않은 군 (NT), 음성 대조군으로 OLX700A-001-8 (100 nM)를 처리한 군 (NC), 양성 대조군으로 OLX-075-1 또는 OLX-218-1 (10 nM)을 처리한 군 (PC1, 및 PC2)을 사용하였다.
- [0225] 그 결과, 도 24에 나타낸 바와 같이, MARC1 GalNAc-asiRNA 41종의 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다. 또한, 도 25에 나타낸 바와 같이, 상기 41종의 MARC1 GalNAc-asiRNA는 농도 의존적으로 MARC1의 발현을 억제시키며, 특히, 상기 실시예 1에서 확보한 OLX-031-1보다 우수한 효력을 가지는 총 10종의 MARC1 GalNAc-asiRNA를 선별하였다 (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).
- [0227] **실시예 5. 인간 MARC1을 표적으로하는 GalNAc-asiRNA의 제작 및 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가**
- [0228] 본 실시예에서는 상기 실시예 4의 실험 결과를 토대로, 우수한 효과를 보인 OLX-075-1을 선택하여, 다양한 화학적 변형을 갖는 MARC1 GalNAc-asiRNA를 제작하였다. 본 실시예에서 제작한 총 17종의 MARC1 GalNAc-asiRNA의 서열 정보는 하기 표 16과 같다.

[0229] [표 16]

GalNAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-075-1	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-2	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-3	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-4	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-5	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-6	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCmUmUmAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-7	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCmUmUmAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-8	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCmUmUmAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-9	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCmUmUmAmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-10	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-11	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-12	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-13	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmGmCmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-14	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUfGmCmUmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-15	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUfGmCmUmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-16	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUfGmCmUmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-17	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUfGmCmUmUmAmCmUmCmA-GaINAc
	ant i sense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU

[0230]

[0231] 구체적으로, 상기 표 16에서 "*", "m", "f", "P", "GaINAc", 및 "EVP"로 표기된 화학적 변형은 상기 표 7에 나타난 바와 같다.

[0232] 또한, mRNA 수준에서의 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 제작한 총 17종의 MARC1 GalNAc-asiRNA 각각을 인간으로부터 유래된 일차 간 세포 (Primary human hepatocyte, F00995-P)에 처리한 후 (n=3), qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, 상기 일차 간 세포는 96 well plate에 4×10^4 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 MARC1 GalNAc-asiRNA (10 nM 또는 100 nM, OliX Inc.)을 처리한 후, 실시예 1-2와 동일한 방식으로, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다.

[0233] 그 결과, 도 26에 나타난 바와 같이, MARC1 GalNAc-asiRNA 17종의 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다.

[0235] 실시예 6. 원숭이 모델을 이용한 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과 평가

[0236] 원숭이 동물모델을 대상으로 다양한 농도 (2.5, 5, 또는 10 mp)의 OLX-031-2 또는 OLX-075-2를 1주일 마다 총 2회 피하 투여한 후, 상기 2차 투여를 실시한 시점으로부터 1주 경과 후, 대상 원숭이로부터 간을 적출하고, 이로부터 간 조직 시료 및 이의 절편을 수득하였다. 이후, 실시예 1-2와 동일한 방식으로, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 본 실시예에서, 상기 OLX-031-2 및 OLX-075-2의 서열 정보는 하기 표 17와 같으며, 동물 모델 그룹에 대한 구체적인 분류는 하기 표 18에 나타난 바와 같다.

[표 17]

GaINAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-031-2	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GaINAc
	antisense	EVP-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-075-2	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GaINAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mU*mU

[표 18]

Group	Dose	Treatment	Number
1	0	VC (1xPBS)	2
2	2.5 mpk	OLX-031-2	2
3	5 mpk		2
4	10 mpk		2
5	2.5 mpk		2
6	5 mpk	OLX-075-2	2
7	10 mpk		2

그 결과, 도 27에 나타난 바와 같이, OLX-075-2 투여 군에서 보다 우수한 MARC1 mRNA 발현 억제 효과를 확인하였으며, 이러한 효과는 농도 의존적인 경향성을 보여주었다.

실시예 7. 동물 모델을 이용한 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과 평가

7-1. SEAP 리포터를 이용한 발현 억제 효과의 평가

6 주령 Balb/c 마우스 (Female)를 인간 MARC1 유전자 및 이와 연결된 SEAP 리포터를 포함하는 플라스미드 (pSELECT-mSEAP-hMARC1)로 형질감염시킨 뒤, 동물 모델 그룹을 투여되는 물질에 따라, 각각 1X PBS를 투여한 군 (VC), 상기 실시예 5의 MARC1 GaINAc-asiRNA를 투여한 군 (OLX-075-2, OLX-075-4, OLX-075-5, OLX-075-6, OLX-075-8, OLX-075-12, OLX-075-16, OLX-075-18) 및 상기 실시예 6의 OLX-031-2를 투여한 군으로 분류하였다. 본 실시예에서, 상기 동물 모델 그룹에 대한 구체적인 분류는 하기 표 19에 나타난 바와 같다.

[표 19]

Group	Dose	Treatment	Number
1	0	VC (1xPBS)	4
2	3 mpk	OLX-075-2	5
3	3 mpk	OLX-075-4	4
4	3 mpk	OLX-075-5	4
5	3 mpk	OLX-075-6	4
6	3 mpk	OLX-075-7	4
7	3 mpk	OLX-075-12	4
8	3 mpk	OLX-075-16	5
9	3 mpk	OLX-075-18	5
10	3 mpk	OLX-031-2	4

한편, 상기 플라스미드로 형질감염된 시점으로부터 4주째 MARC1 GaINAc-asiRNA를 피하 투여하였고, 이로부터 1주 경과 후 혈액 샘플을 채취하고, SEAP 리포터 형광의 수준을 Phospha-Light™ SEAP Reporter Gene Assay System (Invitrogen™, T1015)을 통해 확인하여, 인간 MARC1 mRNA의 발현 억제 수준을 비교하였다.

그 결과, 도 28에 나타난 바와 같이, MARC1 GaINAc-asiRNA 9종의 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 나타내었고, 이들 중에서도, OLX-075-12, OLX-075-16, OLX-075-17, OLX-075-5, OLX-075-8, 또는 OLX-075-2 투여 군에서의 발현 억제 효과가 보다 우수하였다.

7-2. 이중 루시퍼라제 리포터를 이용한 발현 억제 효과의 평가

6 주령 Balb/c 마우스를 인간 MARC1 유전자를 포함하는 플라스미드 (psiCHECK-2-hMARC1)로 형질감염시킨 뒤, 3mpk의 상기 실시예 5의 MARC1 GaINAc-asiRNA를 피하 투여하였다 (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). 이로부터 3일 경과 후 혈액 샘플을 채취하여, Luciferase 리포터 형광의 수준을 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, E1980)을 통해 확인

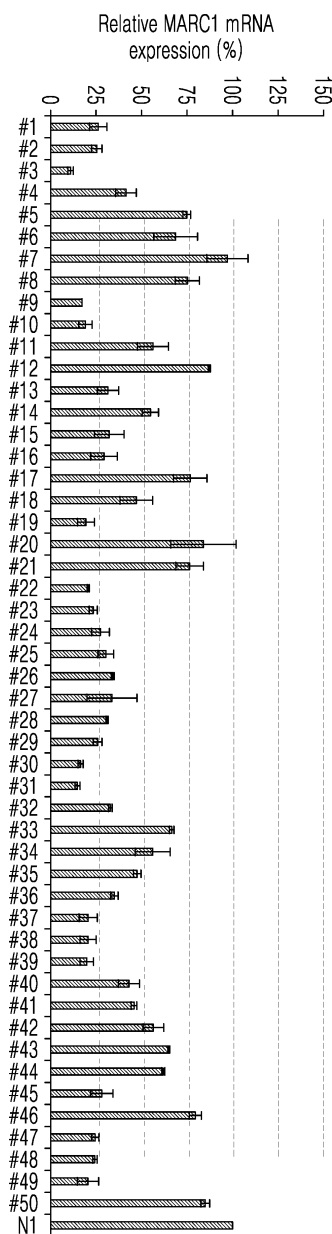
하여, 인간 MARC1 mRNA의 발현 억제 수준을 비교하였다.

[0253] 그 결과, 도 29에 나타난 바와 같이, 다양한 화학적 변형을 갖는 실시예 5의 MARC1 GalNAc-asiRNA 투여 군은 모두 우수한 MARC1 mRNA 발현 억제 효과를 나타내었고, 이들 중에서도, OLX-075-16, OLX-075-17, OLX-075-12, OLX-075-8, OLX-075-8 투여 군에서의 발현 억제 효과가 보다 우수하였다.

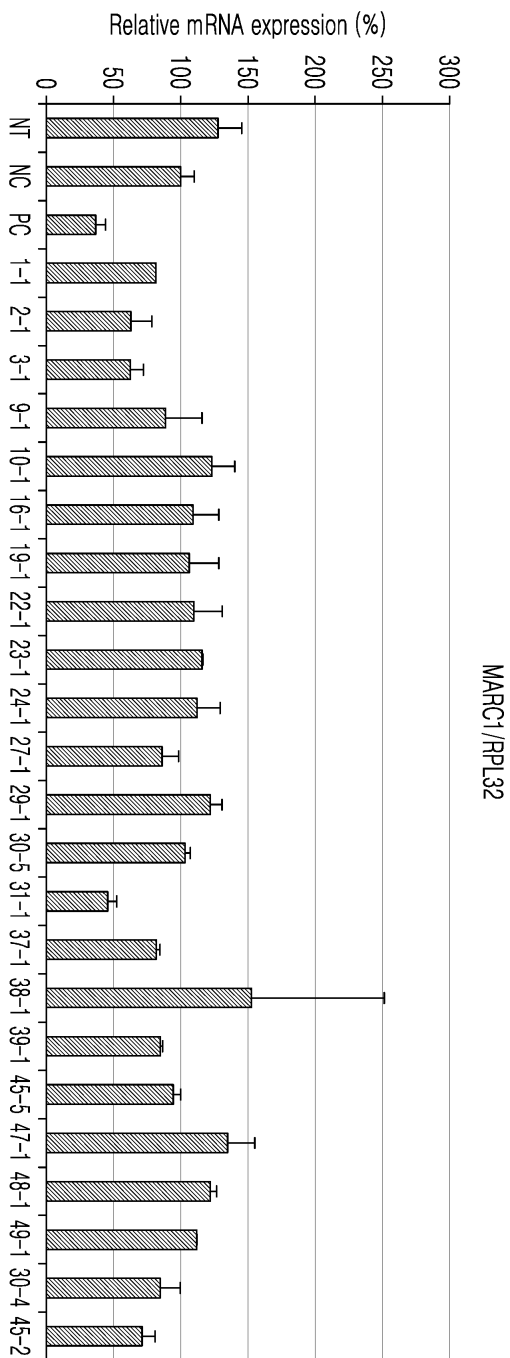
[0255] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

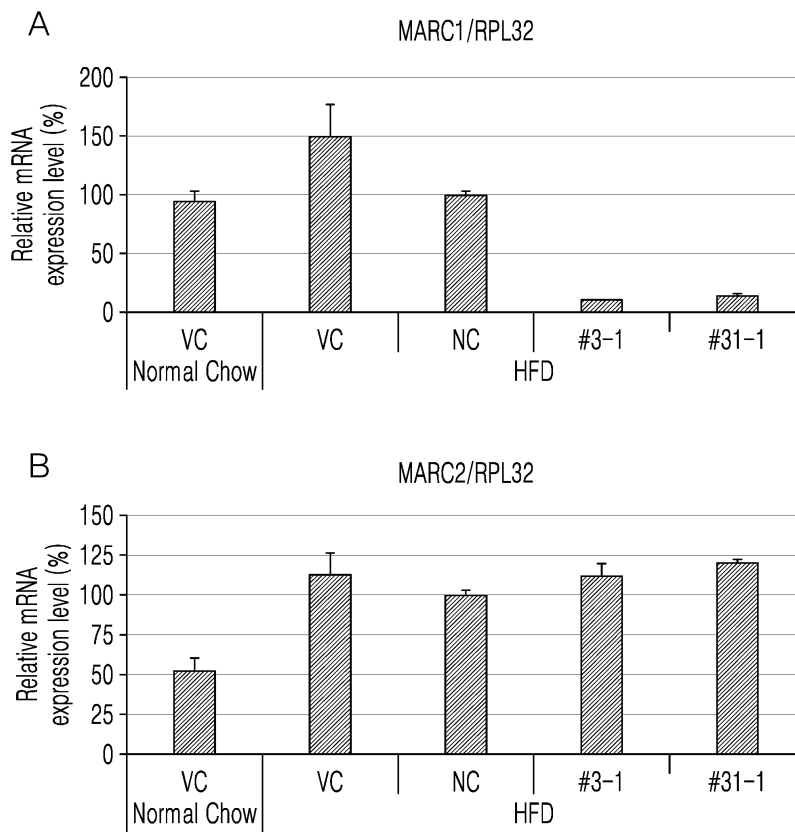
도면1



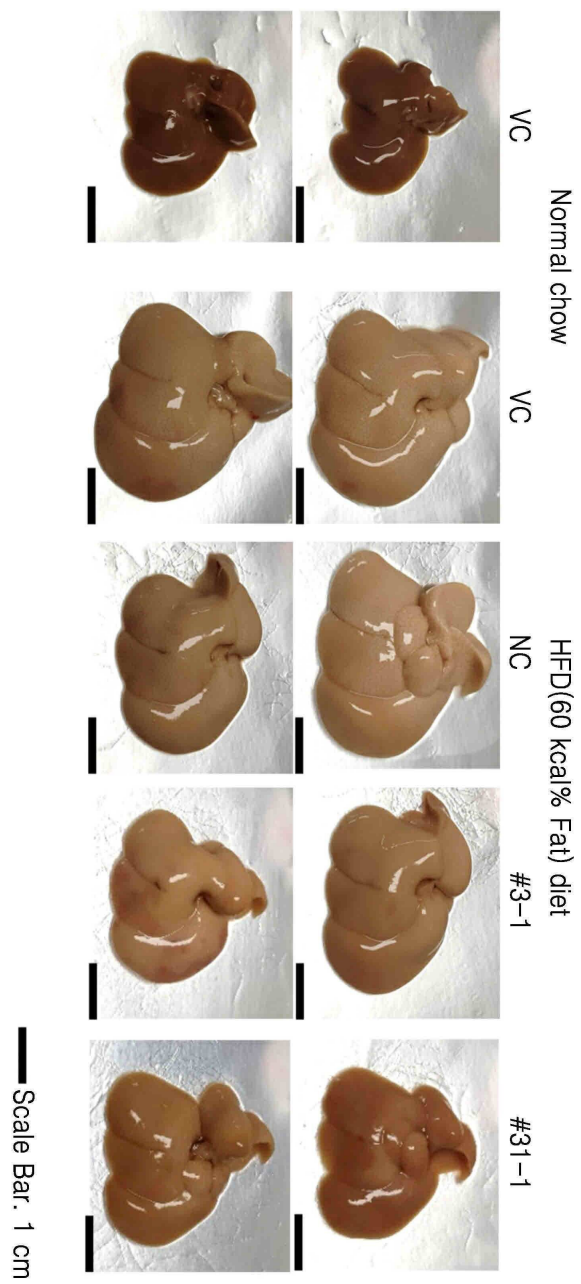
도면2



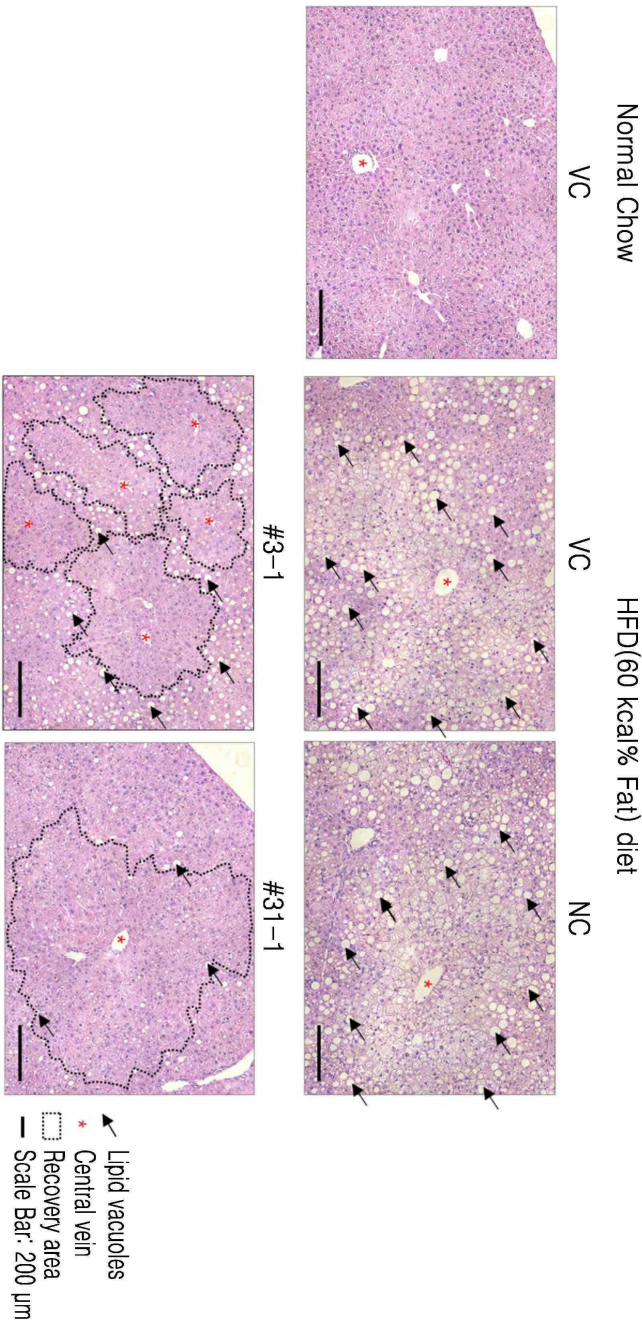
도면3



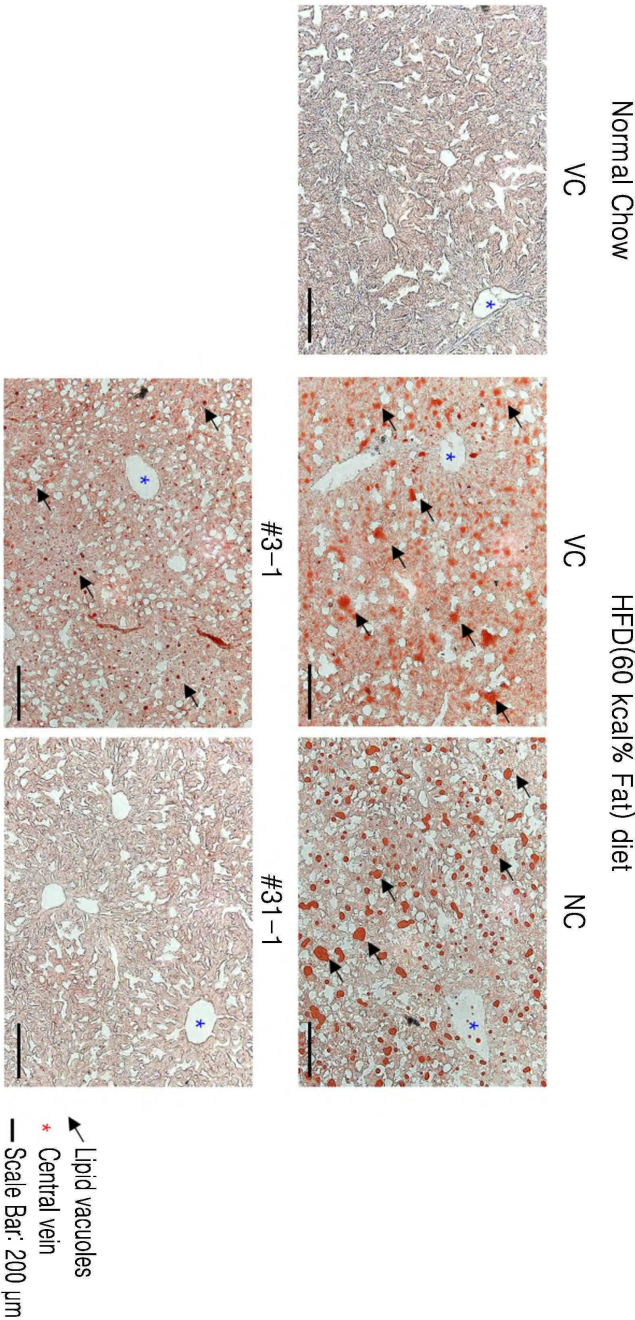
도면4



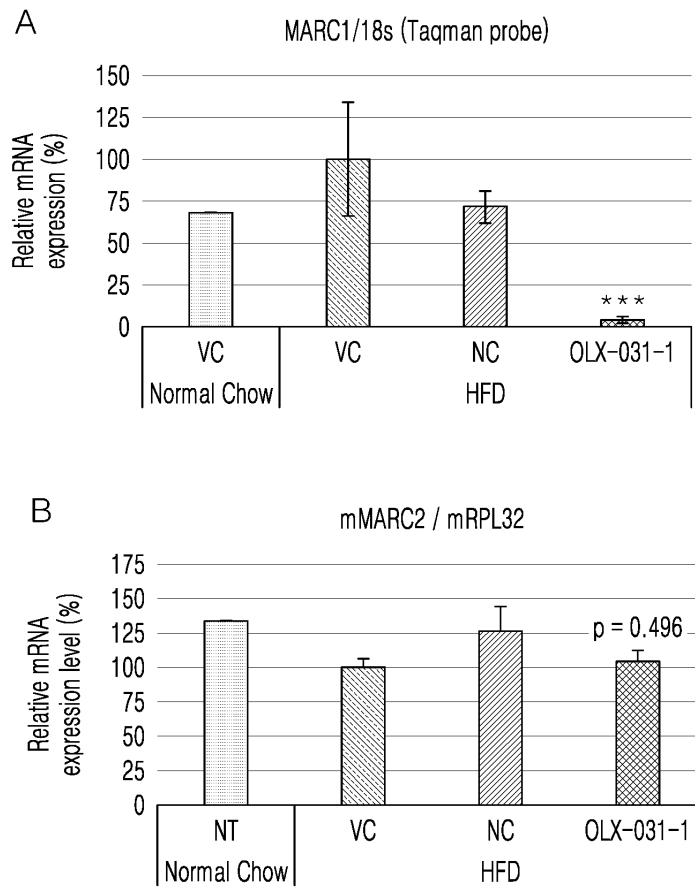
도면5



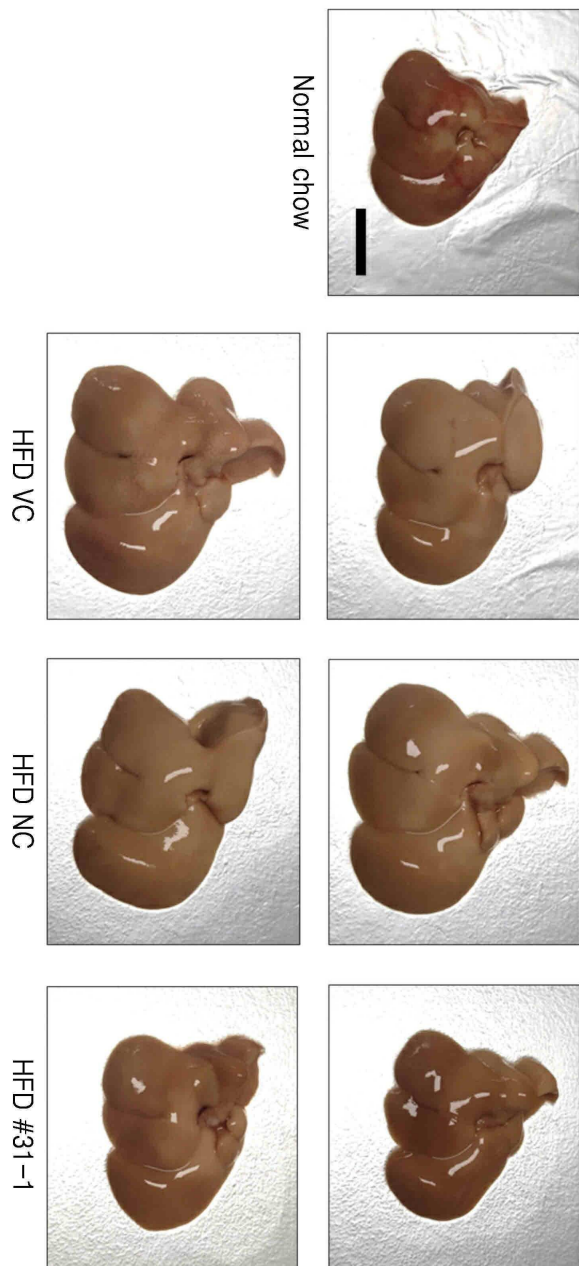
도면6



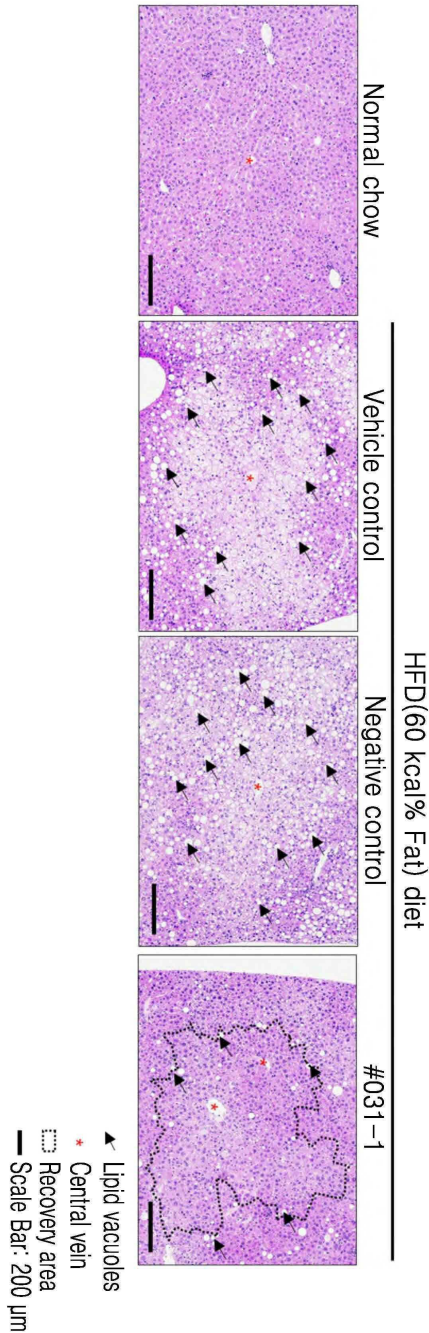
도면7



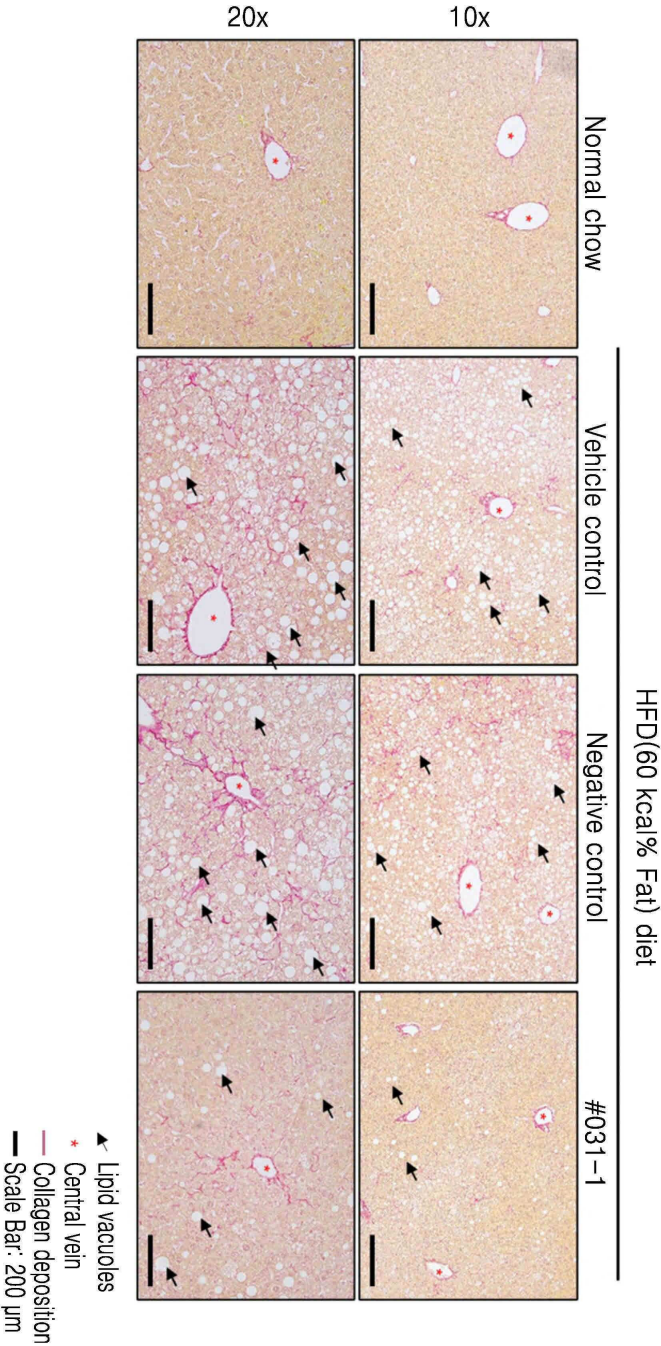
도면8



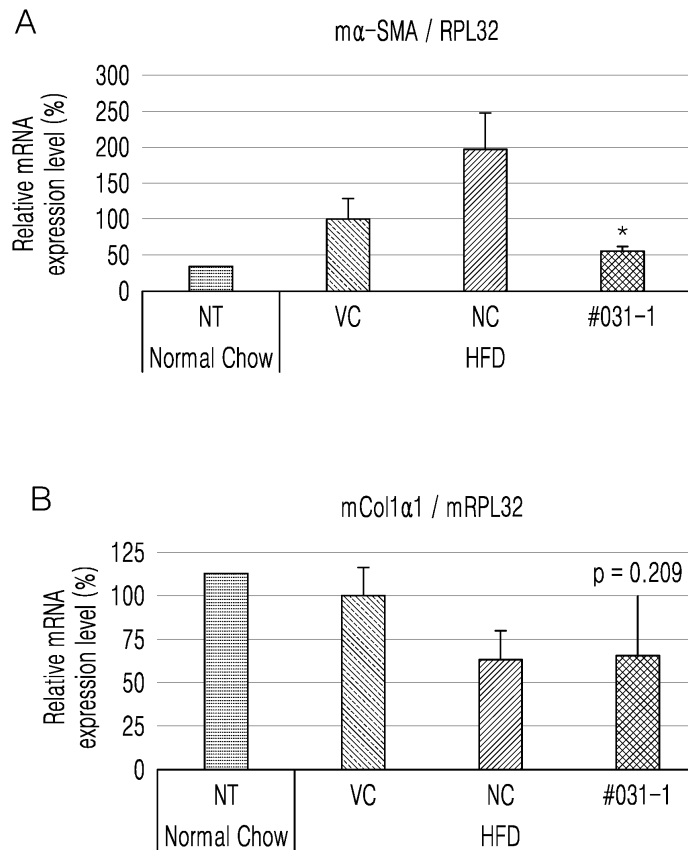
도면9



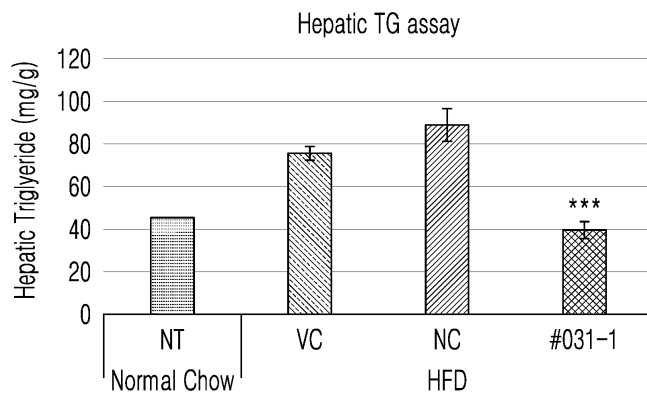
도면10



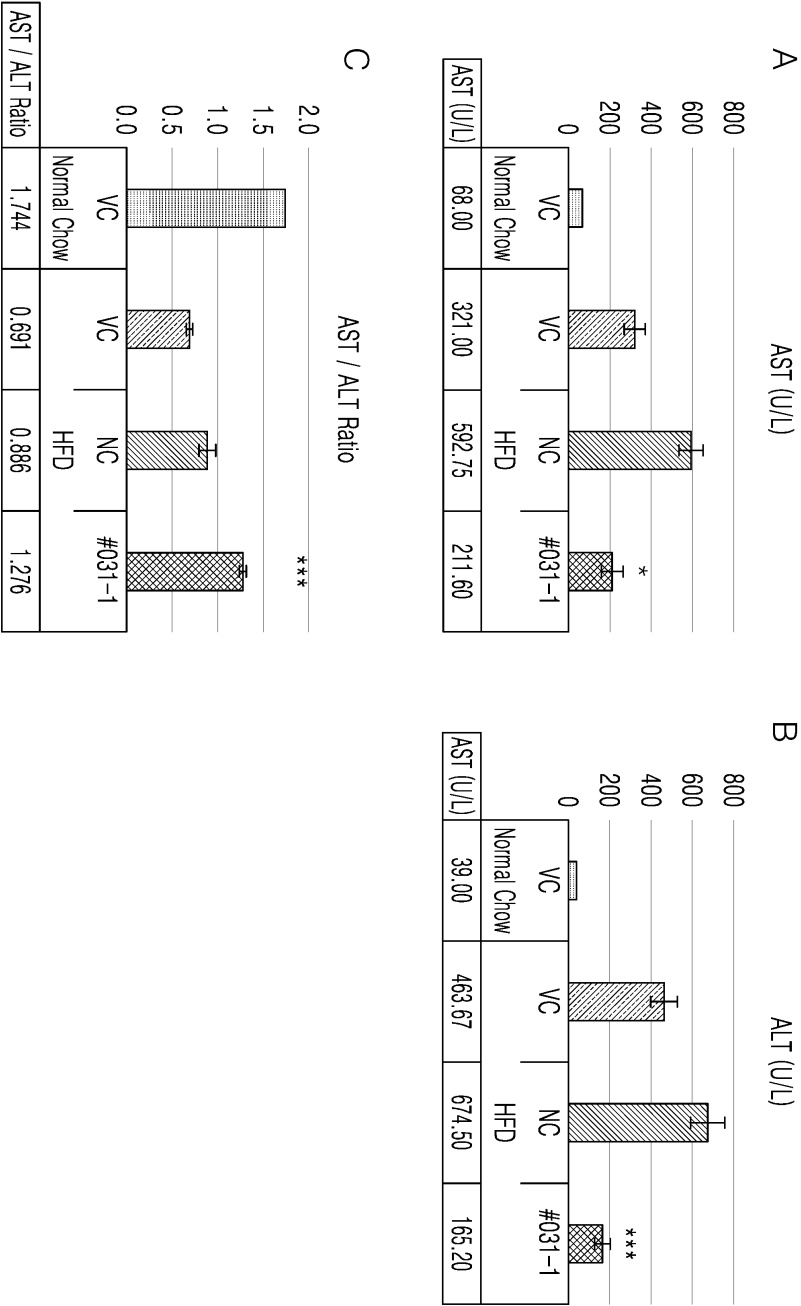
도면11



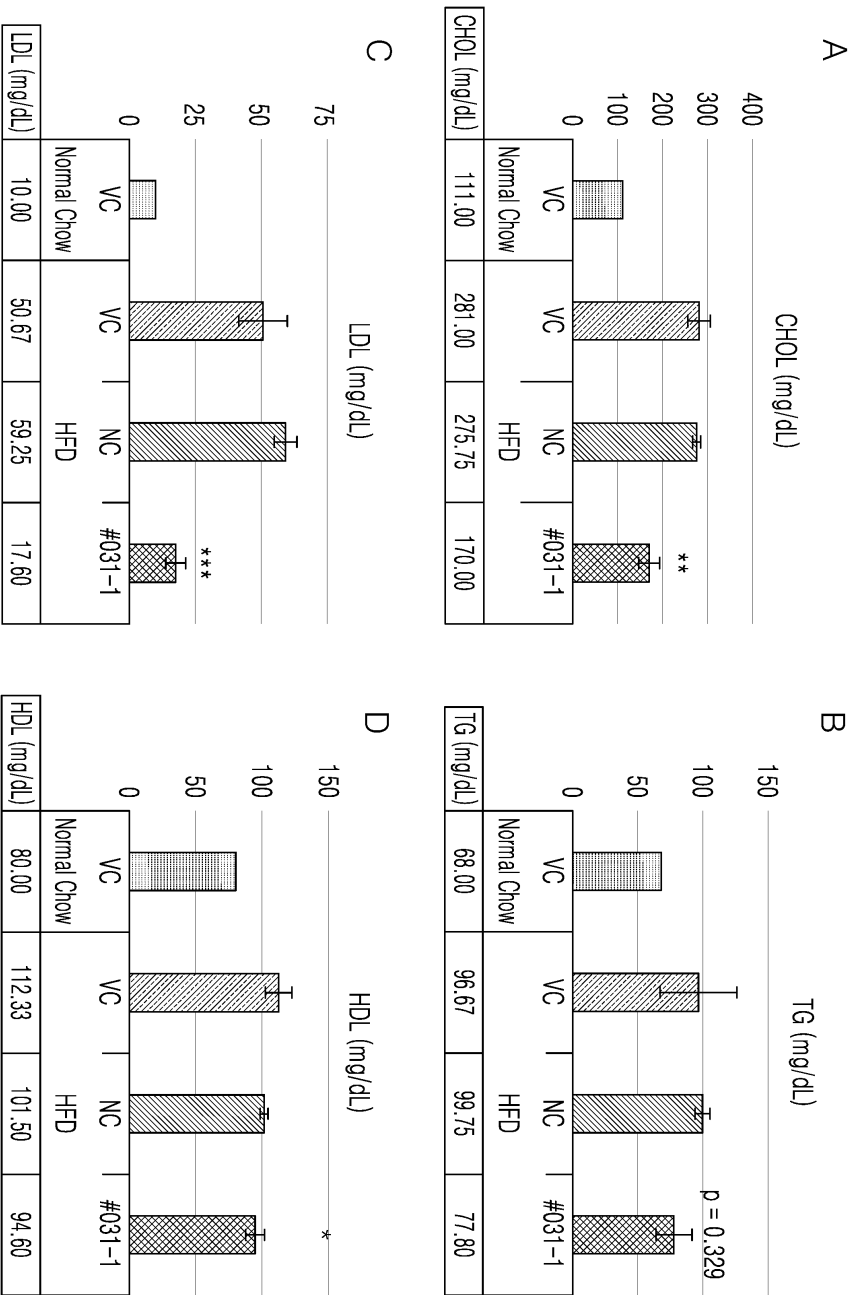
도면12



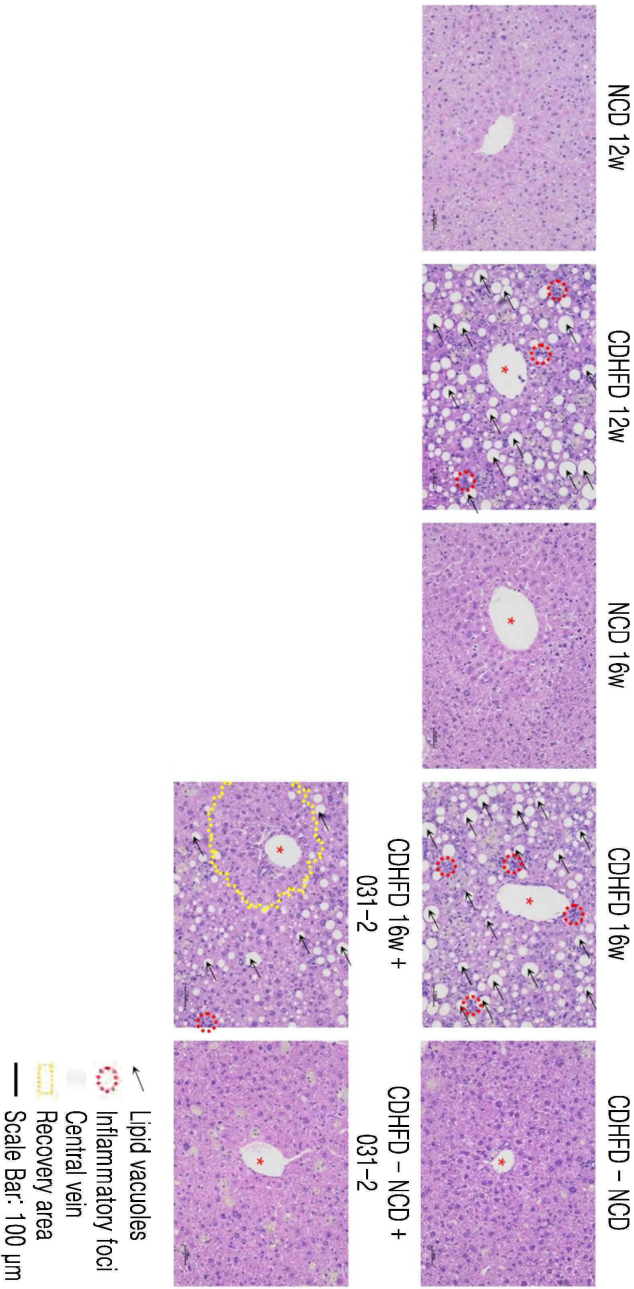
도면13



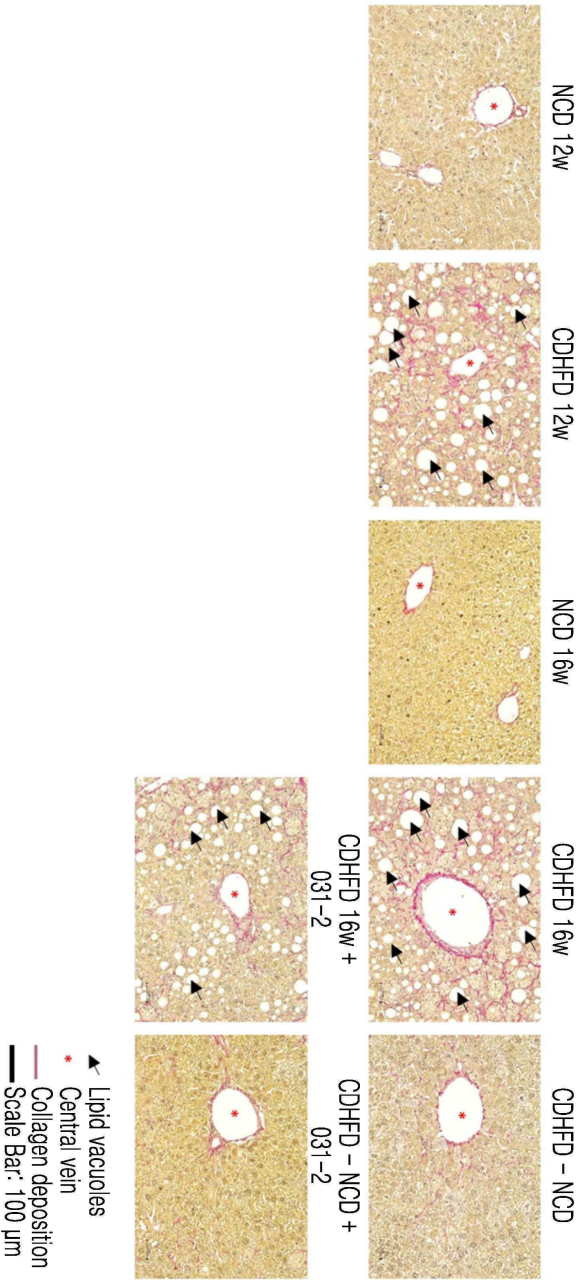
도면14



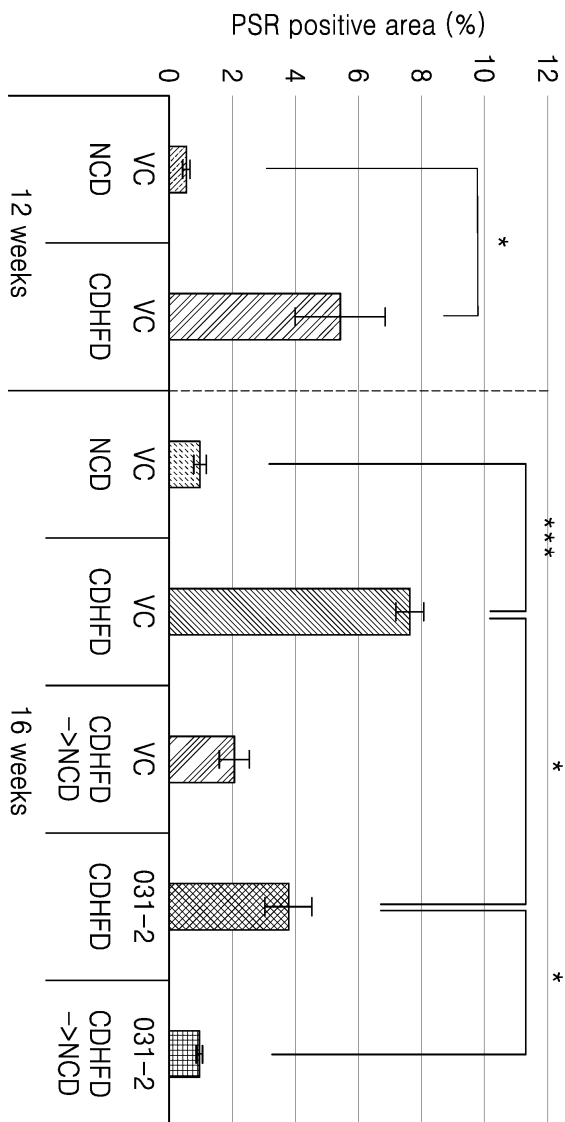
도면15



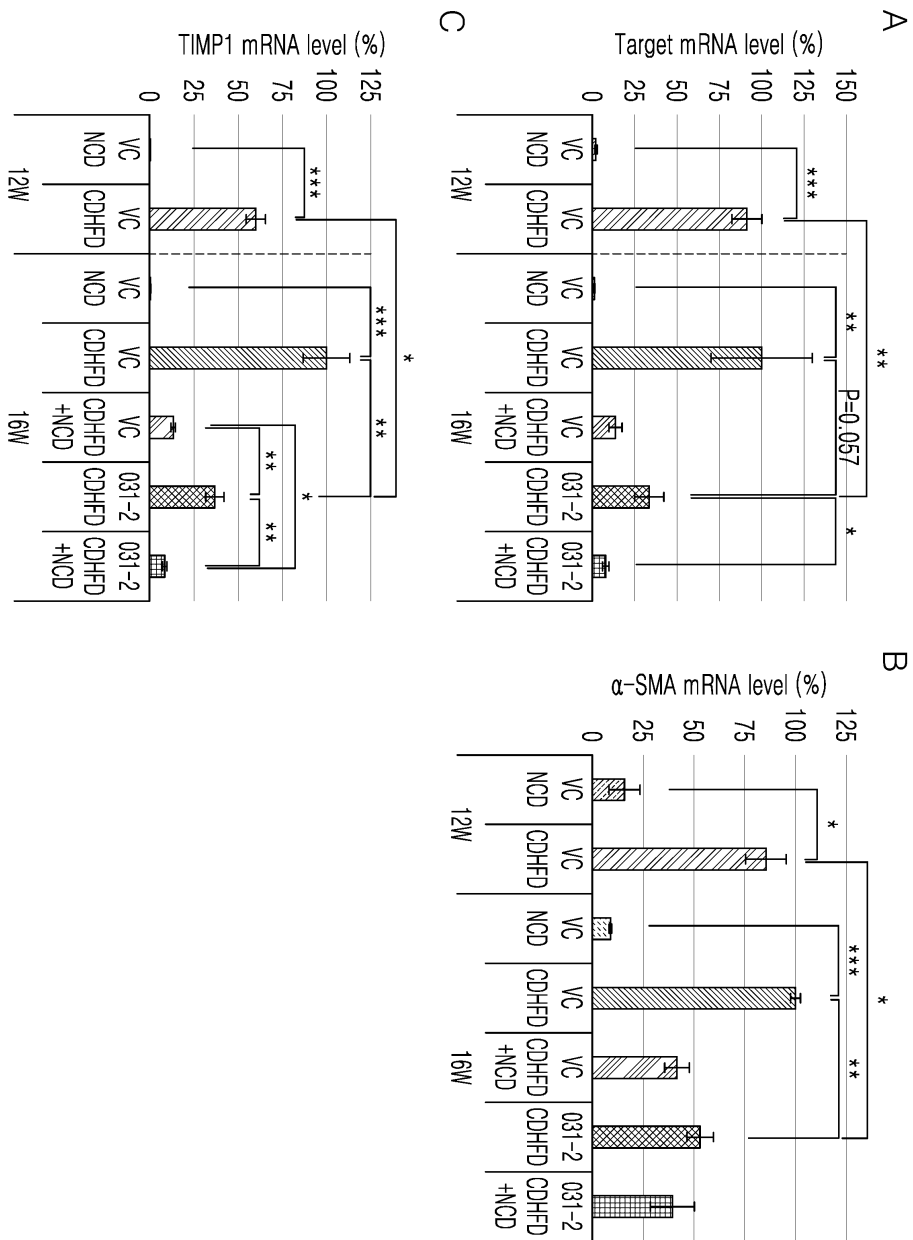
도면16



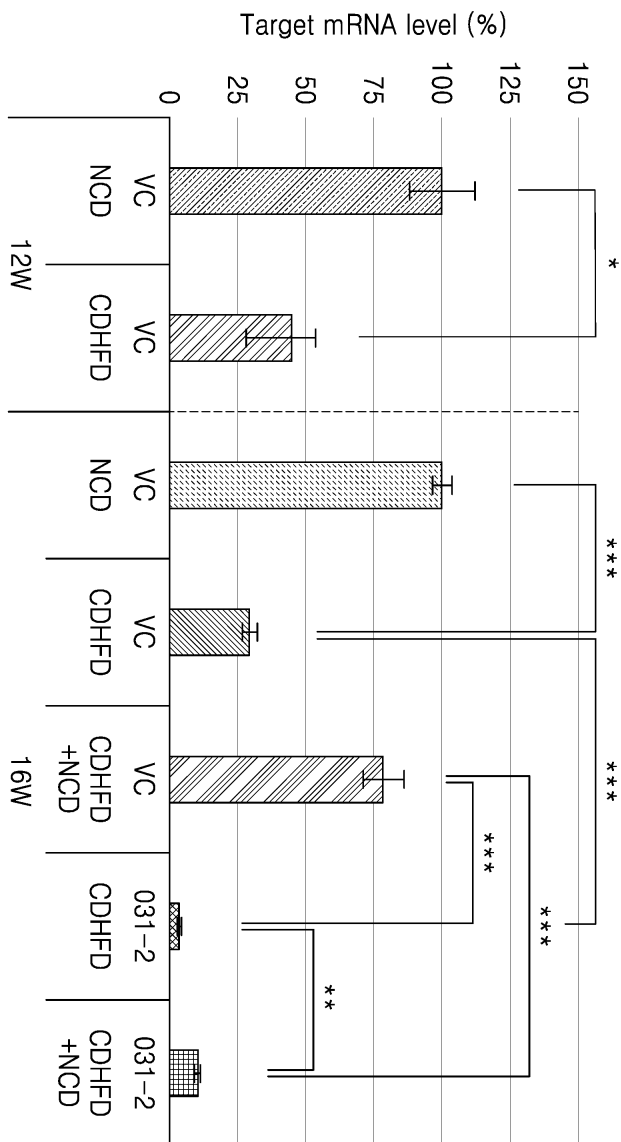
도면17



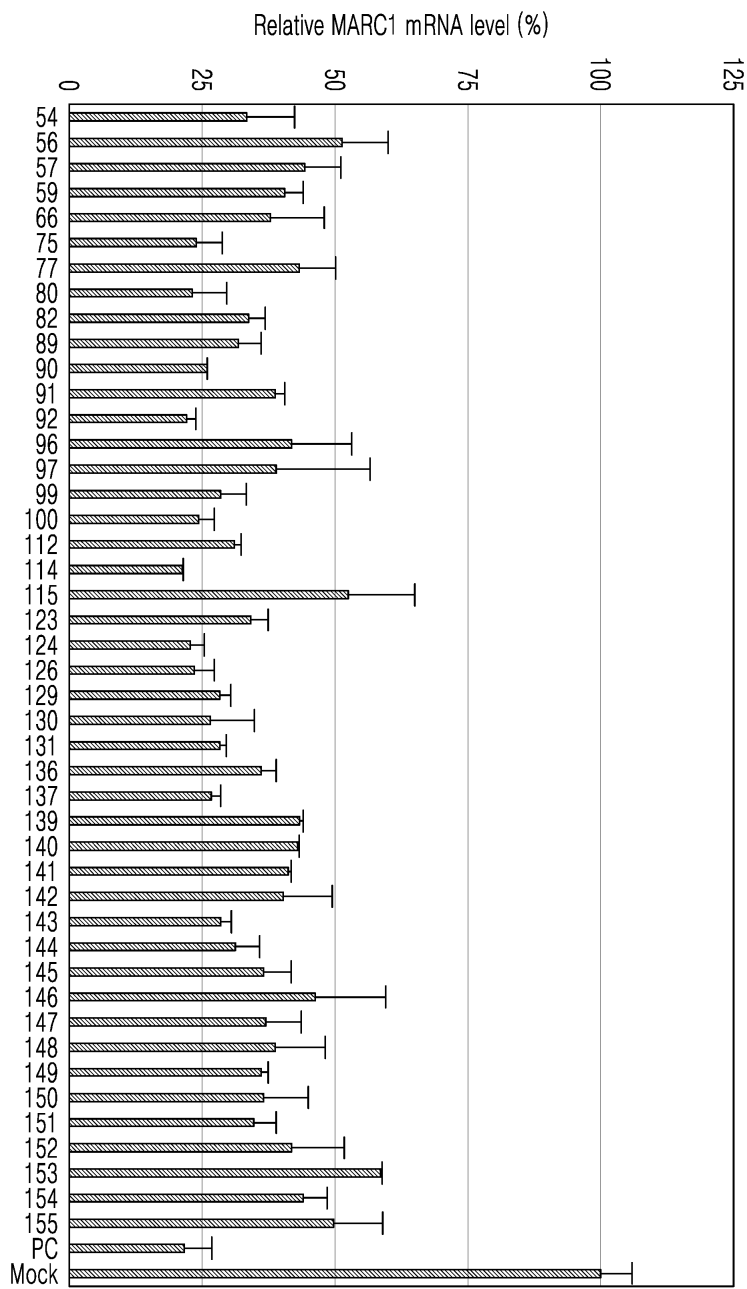
도면18



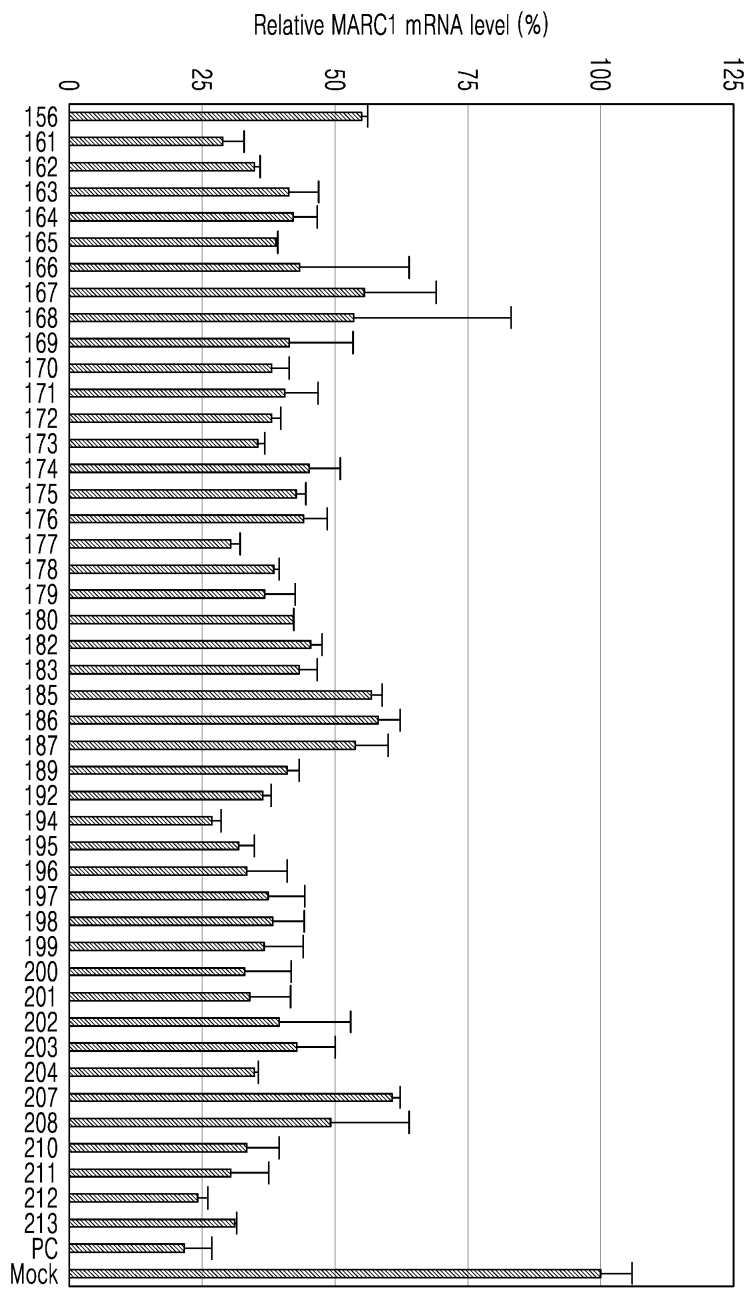
도면19



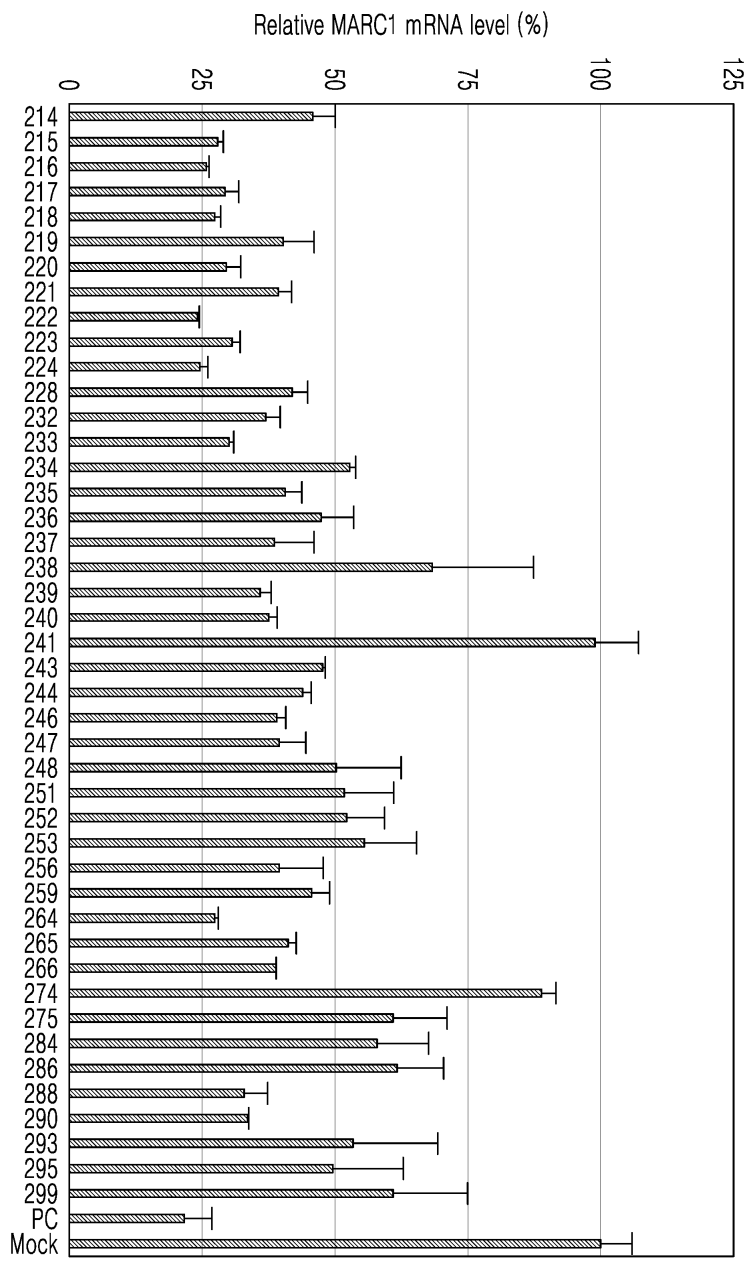
도면20a



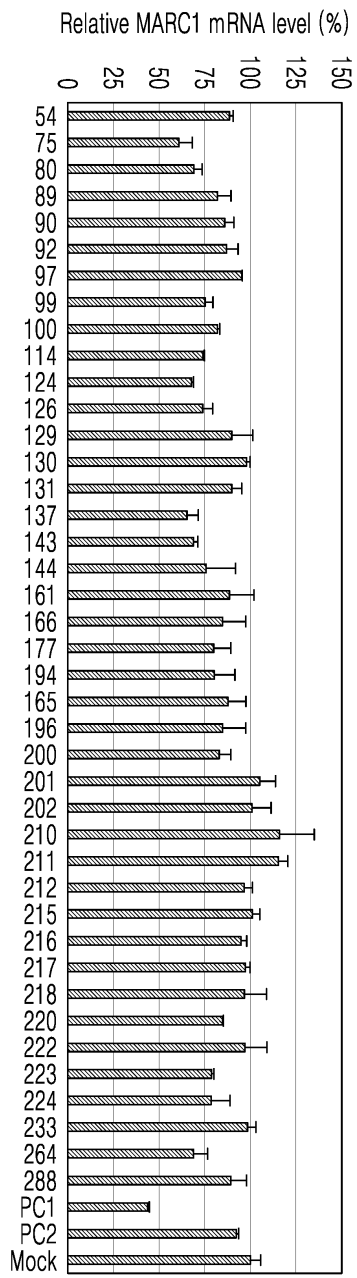
도면20b



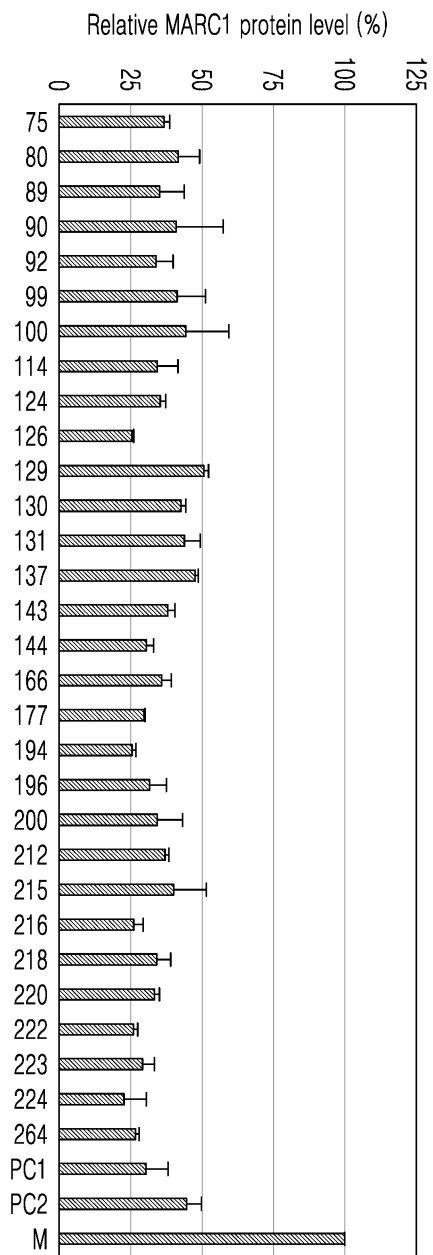
도면20c



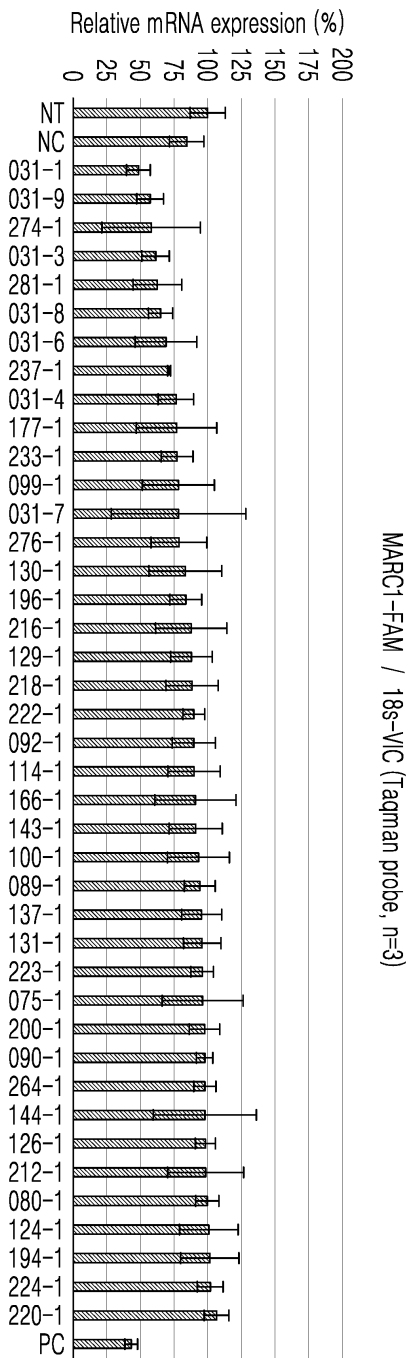
도면21



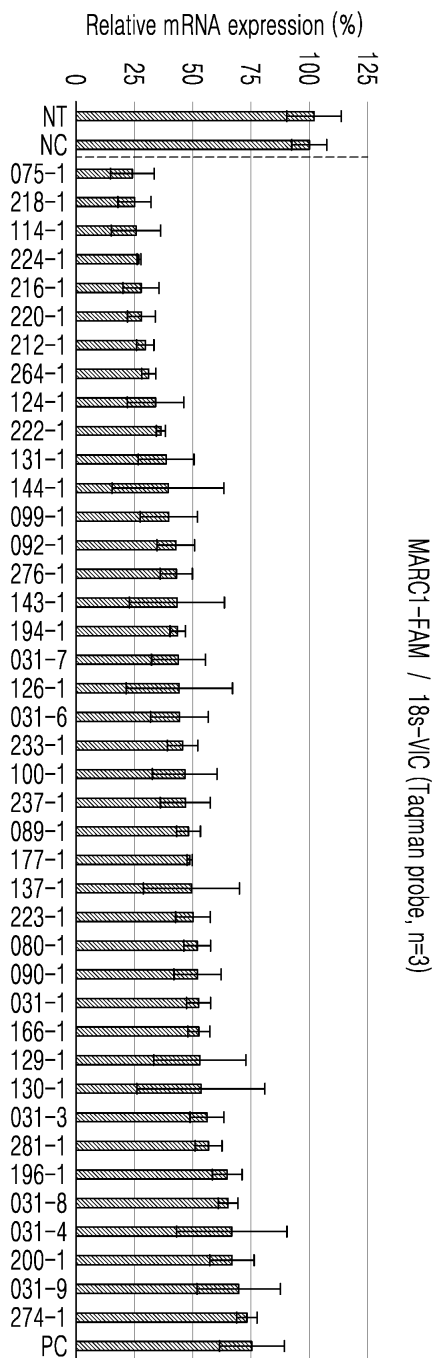
도면22



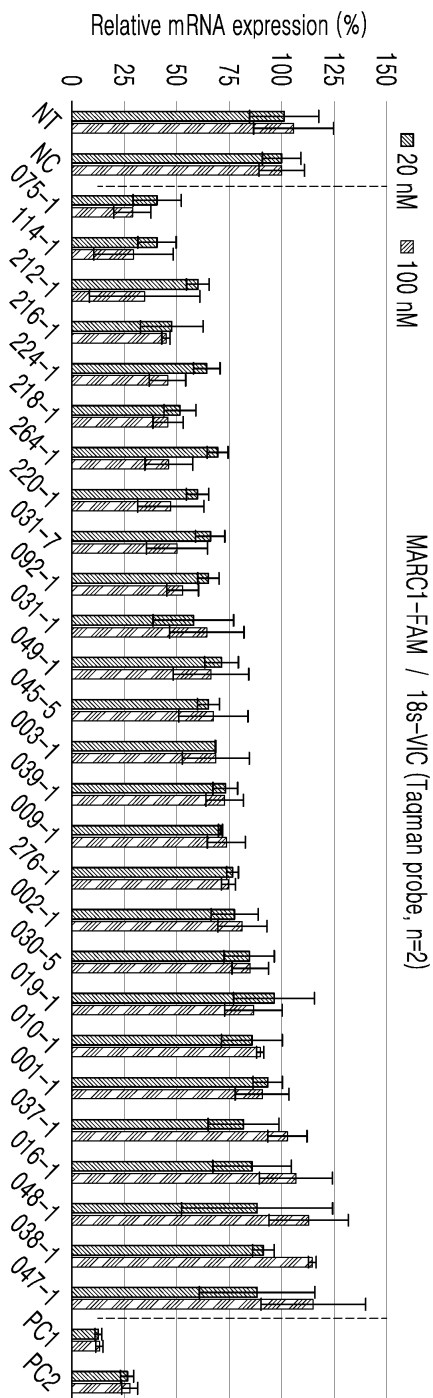
도면23



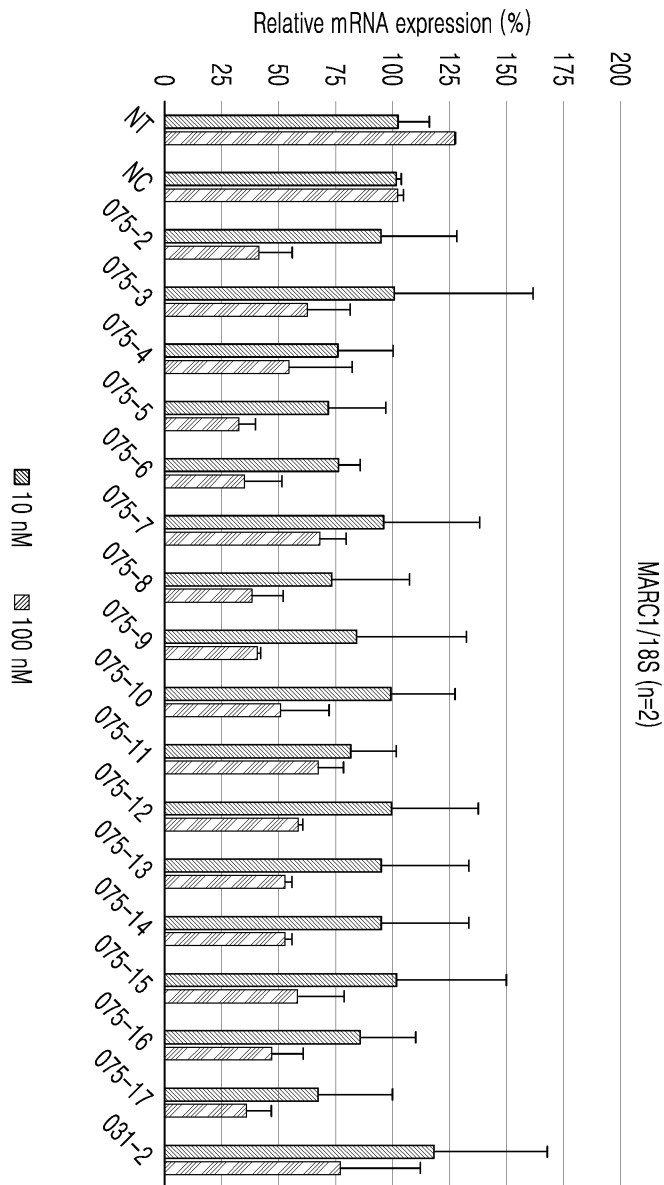
도면24



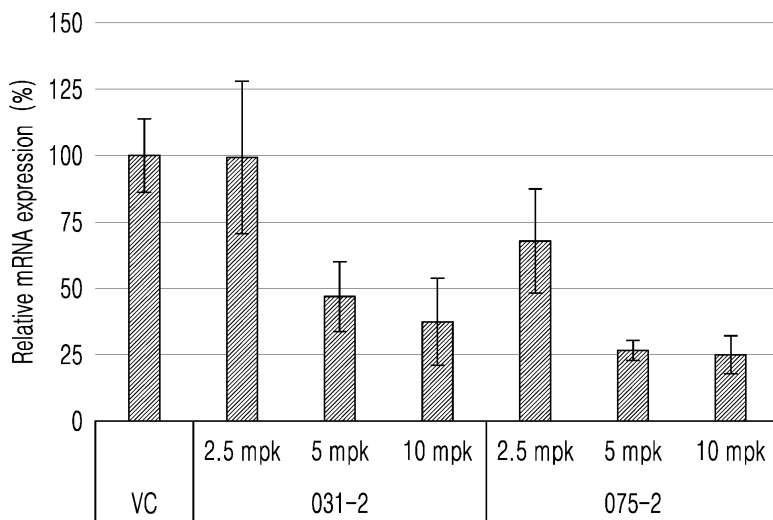
도면25



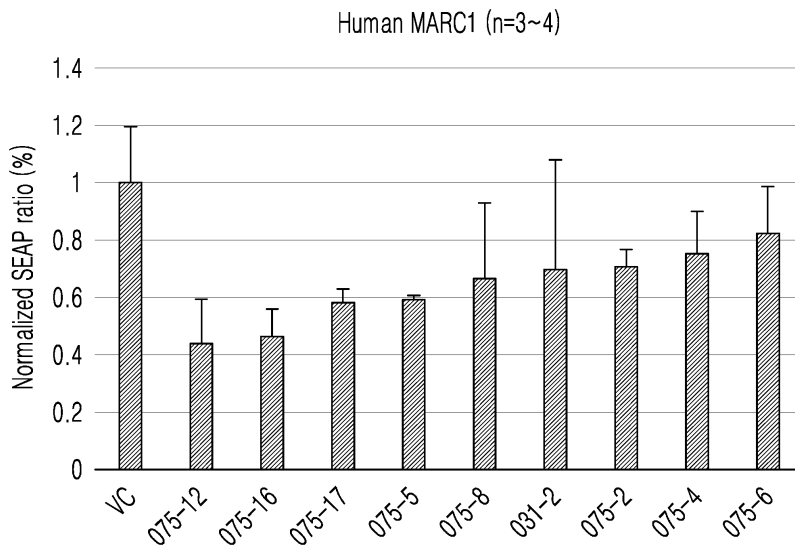
도면26



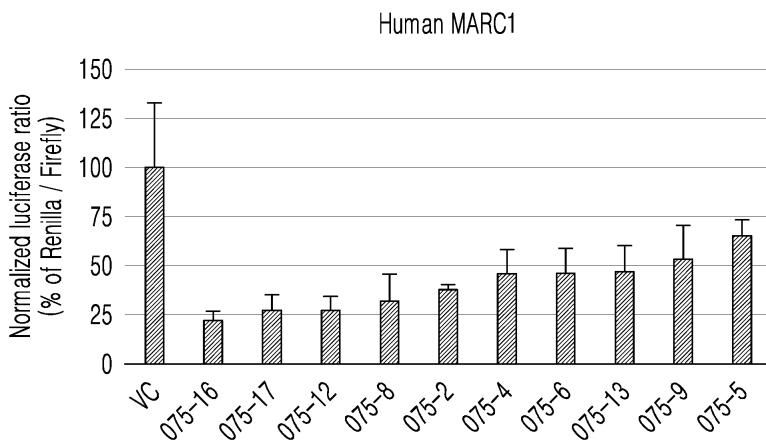
도면27



도면28



도면29



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.