

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2023년 1월 12일 (12.01.2023) WIPO PCT

WO 2023/282704 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 15/113 (2010.01) C07H 19/048 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/009984
- (22) 국제출원일: 2022년 7월 8일 (08.07.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0089864 2021년 7월 8일 (08.07.2021) KR
- (71) 출원인: 올릭스 주식회사 (OLIX PHARMACEUTICALS, INC.) [KR/KR]; 16226 경기도 수원시 영통구 대학로 17, 1014호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 홍선우 (HONG, Sun Woo); 16822 경기도 용인시 수지구 동천로113번길 10, 1201동 2303호, Gyeonggi-do (KR). 박준현 (PARK, June Hyun); 16281 경기도 수원시 장안구 금당로39번길 34, 208동 503호, Gyeonggi-do (KR). 최정용 (CHOE, Jeong Yong); 16295 경기도 수원시 장안구 경수대로976번길 22, 111동 2102호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울특별시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

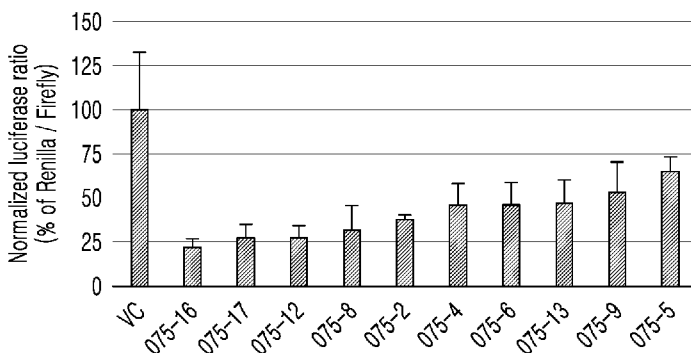
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: RNAI AGENT TARGETING MARC1 GENE, AND USE THEREOF

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

Human MARC1



(57) Abstract: The present invention relates to an RNAi agent targeting a mitochondrial amidoxime reducing component 1 (MARC1) gene, and a use thereof, and, more specifically, to: an RNAi agent comprising an antisense strand having sequence complementarity with an MARC1 mRNA sequence and a sense strand having sequence complementarity with the antisense strand; and a pharmaceutical composition for preventing or treating liver diseases such as non-alcoholic fatty liver disease, containing the RNAi agent.

(57) 요약서: 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.



WO 2023/282704 A1

명세서

발명의 명칭: MARC1 유전자를 표적으로 하는 RNAi 제제 및 이의 용도

기술분야

- [1] 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.

배경기술

- [2] 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.
- [3] 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 방치하면 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.
- [4] 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 대사 증후군에 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.

- [5] 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.

- [6] 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 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 MARC1의 발현을 특이적으로 억제하는 RNAi 제제를 제공하는 데 있다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 RNAi 제제를 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 간질환 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

- [9] 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.
- [10] 다른 양상은 상기 RNAi 제제를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [11] 또 다른 양상은 상기 RNAi 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [12] 또 다른 양상은 간질환을 예방 또는 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 상기 RNAi 제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [13] 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.

- [14] 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

- [15] 도 1은 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 50종을 각각 10 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 도 8은 일 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간의 외관을 육안으로 확인한 결과이다.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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 Coll α 1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [26] 도 12는 일 양상에 따른 OLX-031-1을 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (#031-1), 간 조직 내 중성 지방의 수준을 확인한 결과이다.
- [27] 도 13은 일 양상에 따른 OLX-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.
- [28] 도 14는 일 양상에 따른 OLX-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 지질단백질의 수준을 확인한 결과이다.
- [29] 도 15는 일 양상에 따른 OLX-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.
- [30] 도 16은 일 양상에 따른 OLX-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.
- [31] 도 17은 일 양상에 따른 OLX-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.
- [32] 도 18은 일 양상에 따른 OLX-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 Coll α 1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 18의 B는 α -SMA mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 18의 C는 TIMP1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [33] 도 19는 일 양상에 따른 OLX-031-2를 고지방 식이가 제공된 동물 모델에 투여한 후 (CDHFD 031-2, CDHFD-NCD 031-2), MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [34] 도 20a, 도 20b 및 도 20c는 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 134종을 각각 1 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [35] 도 21은 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 41종을 각각 0.1 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [36] 도 22는 일 양상에 따른 MARC1 asiRNA 30종을 각각 1 nM의 농도로 Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 단백질의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [37] 도 23은 일 양상에 따른 MARC1 GalNAc-asiRNA 41종을 각각 100 nM의 농도로

- Huh7 세포에 처리한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 도 27은 일 양상에 따른 OLX-031-2 또는 OLX-075-2를 각각 2.5 mpk, 5 mpk, 또는 10 mpk의 농도로 원숭이에 투여한 후, MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- [42] 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.
- [43] 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.

발명의 실시를 위한 형태

- [44] 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.
- [45]
- [46] 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.
- [47]
- [48] RNAi 제제
- [49] 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.

- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] 본 명세서에서 용어, "유전자"란 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 구조 단백질 또는 조절 단백질을 암호화할 수 있다. 이때, 조절 단백질은 전사인자, 열 충격 단백질 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 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 사이에서의 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.

- [56] 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.

[57]

[58] MARC1의 발현을 억제하기 위한 RNAi 제제

- [59] "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.

- [60] 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.

- [61] 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.

[62]

- [63] siRNA는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA)로 RNAi(RNA interference) 작용에 관여한다. RNAi는 1998년 *Caenorhabditis elegans*에서 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.

- [64] 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

포화와 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.

- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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 21n인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] 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.

- [71] 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.

[72]

[73] 화학적 변형이 도입된 RNAi 제제

- [74] 상기 RNAi 제제에서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것일 수 있다.

- [75] 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.

- [76] 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.

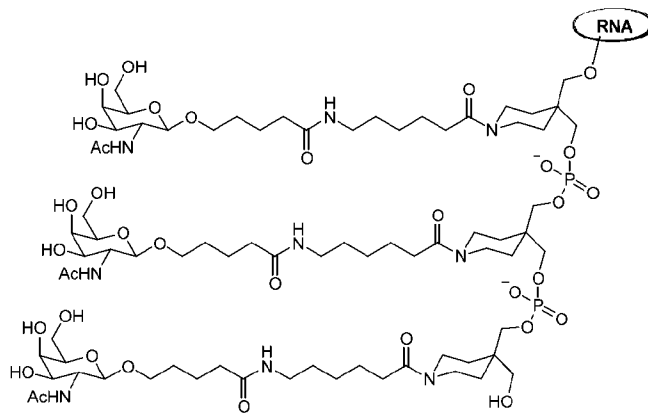
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에서 화학적 변형은 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다:
 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체와의 결합;
 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate),
 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형; 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃ (methyl), -OCH₃(methoxy), -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.

- [78] 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.

[79] **[화학식 1]**

[80]



- [81] 일 구체예에 있어서, 상기 센스 가닥은 하기로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함할 수 있다: 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.

- [82] 일 구체예에 있어서, 상기 안티센스 가닥은 하기로부터 선택되는 어느 하나 이상의 화학적 변형을 포함할 수 있다: 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), E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate), 또는 세포 침투 펩타이드와의 결합.

- [83] 다른 구체예에 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; 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.
- [84] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 표 2, 표 15, 표 16, 및 표 17에 열거된 안티센스 가닥 서열로부터 선택된 서열일 수 있고, 상기 안티센스 가닥은 표 2, 표 15, 표 16, 및 표 17에 열거된 센스 가닥 서열로부터 선택된 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [85] 일 구체예에서, 상기 센스 가닥은 하기 표의 (A) 내지 (O)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이고, 상기 안티센스 가닥은 하기 표의 (a) 내지 (q)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

[86]

	서열 (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*mAfGfGfUmGmGmCmCmUmAmCmUmCmA-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

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

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

[89]

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)

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

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

[92] 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.

[93]

[94] 간 질환

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

[96] 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.

[97]

[98] 약학적 조성물

[99] 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.

[100] 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.

[101] 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.

[102] 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.

[103] 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.

- [104] 상기 약학 조성물의 투여방법은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 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.
- [105] 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, 배설을 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.
- [106]
- [107] 또 다른 양상은 상기 RNAi 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [108] 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 기재를 생략한다.
- [109] 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.
- [110]
- [111] 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.
- [112]
- [113] **실시예 1: RNAi 유도용 핵산 분자의 스크리닝 및 치료 효능 평가**
- [114] **1-1. 50종의 asiRNA 디자인 및 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가**
- [115] 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 선별하여, 총 50종의 asiRNA를 디자인하고, 이를 IDT Korea, Inc.에서 10 nmole scale로 합성하였다. 이후, 합성된 asiRNA는 95°C 5분, 37°C 25분간 incubation 과정을 거쳐 annealing 하였고 12% Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) 후

ChemiDoc UV transilluminator (Biorad)를 통해 QC (quality control)를 하였다.

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

[117] [표 1]

[118]

NO.	asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
#1	asiMARC1-1	sense	GCUCUGGAUCUACCCU	1
		ant i sense	AGGGUAGAUCCAGAGCUGC	2
#2	asiMARC1-2	sense	CAGCUCUGGAUCUACC	3
		ant i sense	GGUAGAUCCAGAGCUGCGC	4
#3	asiMARC1-3	sense	GCAGCUCUGGAUCUAC	5
		ant i sense	GUAGAUCCAGAGCUGCGCC	6
#4	asiMARC1-4	sense	GCCAUUGGGCUGCGCA	7
		ant i sense	UGCGCAGCCCCAUGGCCGU	8
#5	asiMARC1-5	sense	GGCCAUUGGGCUGCGC	9
		ant i sense	GCGCAGCCCCAUGGCCGUG	10
#6	asiMARC1-6	sense	CGGCCAUUGGGCUGCG	11
		ant i sense	CGCAGCCCCAUGGCCGUGC	12
#7	asiMARC1-7	sense	ACGGCCAUGGGGCUGC	13
		ant i sense	GCAGCCCCAUGGCCGUGCA	14
#8	asiMARC1-8	sense	CACGGCCAUGGGGCUG	15
		ant i sense	CAGCCCCAUGGCCGUGCAC	16
#9	asiMARC1-9	sense	GGACAGGUUUUGGCUU	17
		ant i sense	AAGCCAAAACCUUGCCGC	18
#10	asiMARC1-10	sense	GGGACAGGUUUUGGCU	19
		ant i sense	AGCCAAAACCUUGCCGCA	20
#11	asiMARC1-11	sense	CGGGACAGGUUUUGGC	21
		ant i sense	GCCAAAACCUUGCCCGCAG	22
#12	asiMARC1-12	sense	AGCCUACACAAAGGAC	23
		ant i sense	GUCCUUUGUGUAGGUGCA	24
#13	asiMARC1-13	sense	GGUGCACUUCGAGCCU	25
		ant i sense	AGGCUCGAAGUGACACAGG	26
#14	asiMARC1-14	sense	CUGGUGCACUUCGAGC	27
		ant i sense	GCUCGAAGUGCACCAGGCG	28
#15	asiMARC1-15	sense	CCUGGUGCACUUCGAG	29
		ant i sense	CUUGAAGUGCACCAGGCGG	30
#16	asiMARC1-16	sense	GCCUGGUGCACUUCGA	31
		ant i sense	UCGAAGUGCACCAGGCGGU	32
#17	asiMARC1-17	sense	CGCCUGGUGCACUUCG	33
		ant i sense	CGAAGUGCACCAGGCGGUA	34
#18	asiMARC1-18	sense	CCGCCUGGUGCACUUC	35
		ant i sense	GAAGUGCACCAGGCGGUAG	36
#19	asiMARC1-19	sense	ACCGCCUGGUGCACUU	37
		ant i sense	AAGUGCACCAGGCGGUAGG	38
#20	asiMARC1-20	sense	UACCGCCUGGUGCACU	39
		ant i sense	AGUGCACCAGGCGGUAGGG	40
#21	asiMARC1-21	sense	CUACCGCCUGGUGCAC	41
		ant i sense	GUGCACCAGGCGGUAGGGC	42
#22	asiMARC1-22	sense	GACGUGGAACUGAAA	43
		ant i sense	UUUUCAGUCCACGUCACC	44
#23	asiMARC1-23	sense	UGACGUGGAACUGAAA	45
		ant i sense	UUUCAGUCCACGUCACCA	46
#24	asiMARC1-24	sense	GGAAACACUGAAGAGU	47
		ant i sense	ACUCUUCAGUUUCCAGC	48
#25	asiMARC1-25	sense	UGGAAACACUGAAGAG	49
		ant i sense	CUCUUCAGUUUCCAGCG	50
#26	asiMARC1-26	sense	CUGGAAACACUGAAGA	51
		ant i sense	UCUUCAGUUUCCAGCGG	52
#27	asiMARC1-27	sense	GCUGGAAACACUGAAG	53

[119]

		ant i sense	CUUCAGUGUUUCCAGCGGU	54
#28	asiMARC1-28	sense	CGCUGGAAACACUGAA	55
		ant i sense	UUCAGUGUUUCCAGCGGU	56
#29	asiMARC1-29	sense	CCGUGGAAACACUGA	57
		ant i sense	UCAGUGUUUCCAGCGGUUC	58
#30	asiMARC1-30	sense	CGCAGCUCUGGAUCUA	59
		ant i sense	UAGAUCAGAGCUGGCCA	60
#31	asiMARC1-31	sense	GCGCAGCUCUGGAUCU	61
		ant i sense	AGAUCAGAGCUGGCCAC	62
#32	asiMARC1-32	sense	GGCGCAGCUCUGGAUC	63
		ant i sense	GAUCAGAGCUGGCCACU	64
#33	asiMARC1-33	sense	GCCGGUGAGCGAGGCG	65
		ant i sense	CGCCUCGCUACCGGCACC	66
#34	asiMARC1-34	sense	CCUGGUCCUGAUUUC	67
		ant i sense	GGAAUACAGGACCAGCGA	68
#35	asiMARC1-35	sense	GCCUGGUCCUGAUUUC	69
		ant i sense	GAAAUACAGGACCAGCGAG	70
#36	asiMARC1-36	sense	CGCCUGGUCCUGAUUU	71
		ant i sense	AAAUACAGGACCAGCGAGG	72
#37	asiMARC1-37	sense	UGACUCAGUGCAGC	73
		ant i sense	GCUGCACUGAGAGUCAGGG	74
#38	asiMARC1-38	sense	CUGACUCAGUGCAG	75
		ant i sense	CUGCACUGAGAGUCAGGU	76
#39	asiMARC1-39	sense	CCUGACUCAGUGCA	77
		ant i sense	UGCACUGAGAGUCAGGGUG	78
#40	asiMARC1-40	sense	CCCUGACUCAGUGC	79
		ant i sense	GCACUGAGAGUCAGGGUGU	80
#41	asiMARC1-41	sense	ACCCUGACUCUCAGUG	81
		ant i sense	CACUGAGAGUCAGGGUGUC	82
#42	asiMARC1-42	sense	GCACGGCCUGGAGAU	83
		ant i sense	UAUCCAGGCCGUGCACU	84
#43	asiMARC1-43	sense	GAUCCUUUCAGGCG	85
		ant i sense	CGCCUCAGAAAGGAUCAAG	86
#44	asiMARC1-44	sense	UGAUCCUUUCAGGCG	87
		ant i sense	GCCUCAGAAAGGAUCAAGA	88
#45	asiMARC1-45	sense	UCUCAACUCCAGGCUA	89
		ant i sense	UAGCCUGGAGUUGAGAUCC	90
#46	asiMARC1-46	sense	AUCUCAACUCCAGGCU	91
		ant i sense	AGCCUGGAGUUGAGAUCCG	92
#47	asiMARC1-47	sense	GGAUCUCAACUCCAGG	93
		ant i sense	CCUGGAGUUGAGAUCCGCC	94
#48	asiMARC1-48	sense	CGGAUCUCAACUCCAG	95
		ant i sense	CUGGAGUUGAGAUCCGCCA	96
#49	asiMARC1-49	sense	GCGGAUCUCAACUCCA	97
		ant i sense	UGGAGUUGAGAUCCGCCAG	98
#50	asiMARC1-50	sense	AGGGUGAUGGCUUGUU	99
		ant i sense	AACAAGCCAUCACCCUUUU	100

[120] 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.

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

[122]

[123] **1-2. 23종의 GalNAc-asiRNA 디자인 및 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가**

[124] 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.

[125] [표 2]

[126]

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

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

[128] [표 3]

[129]

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

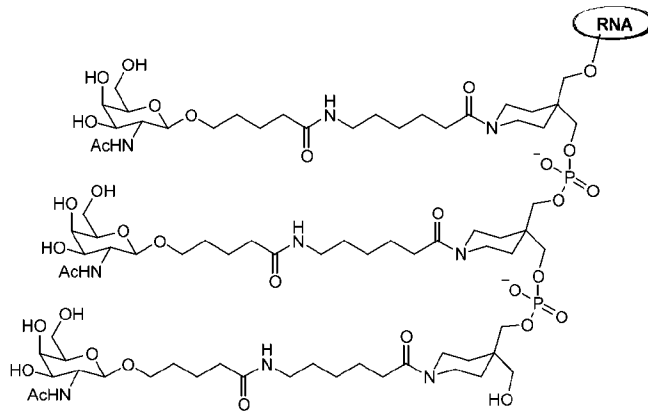
[130] 구체적으로, 상기 표 3에서, "*"은 기존의 포스포다이에스테르 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 치환된 형태를 의미하는 것이며, "m"은 기존의

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.

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

[132] **[화학식 1]**

[133]



[134] mRNA 수준에서의 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 MARC1 GalNAc-asiRNA를 C57BL/6 마우스로부터 유래된 일차 간 세포 (mouse primary hepatocyte)에 형질감염(transfection)시킨 후, qRT-PCR을 수행하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 측정하였다. 구체적으로, 상기 일차 간 세포는 24 well plate에 7.5×10^4 cells/well로 씨딩되었고, 여기에 MARC1 GalNAc-asiRNA (200 nM, OliX US, Inc.)를 처리하였다. 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 수행하였다. 이후, CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad)를 사용하여 MARC1 mRNA의 발현 수준을 확인하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군은 형질감염을 수행하지 않은 군 (NT), 음성 대조군으로 OLX700A-001-8 (10 nM)와 RNAiMAX (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150)를 첨가한 뒤, Invitrogen으로부터 제공된 프로토콜에 따라 형질감염을 수행한 군(NC), 양성 대조군(PC)으로 asiMARC1-30 (10nM)와 RNAiMAX (2 μ l/ml, Invitrogen Inc. 13778150)를 첨가한 뒤, Invitrogen으로부터 제공된 프로토콜에 따라 형질감염을 수행한 군(PC)을 사용하였다. 상기 OLX700A-001-8의 서열 정보는 표 4에 나타낸 바와 같으며, 표 2에서 "*", "m",

"f", "P", 및 "GalNAc"으로 표기된 화학적 변형은 상기 표 3에 나타난 바와 같다.

[135] [표 4]

Name	Sequence(5' → 3')	
	sense	mG*fC*mAfGfUfAmUfGmUfUmGfAmUfGmGfA-GalNAc
OLX700A-001-8	antisense	P-mU*fC*mCfAmUfCmAfAmCfAmUmAmCfUmG*fC*mU*fU*mC

[137] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, MARC1 GalNAc-asiRNA 23종의 처리에 따른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다. 이들 중에서도, OLX-002-1, OLX003-1, OLX-031-1의 발현 억제 효과는 보다 우수하였다.

[138]

[139] **1-3. 동물 모델을 이용한 치료 효능 평가**

[140] 본 실시예에서는 C57BL/6 마우스 (Male, n=15)를 대상으로, 상기 실시예 1-2에서 발현 억제 효과를 확인한 MARC1 GalNAc-asiRNA를 투여한 후, 이에 따른 치료적 효능을 평가하였다. 이를 위하여, 우선, 동물 모델 그룹을 정상 식이가 제공된 그룹 (Normal Chow)과 고지방 식이가 제공된 그룹 (HFD, High Fat Diet (Research Diet, D12492))으로 분류하고, 상기 그룹들을 투여되는 물질에 따라, 각각 1X PBS를 투여한 군 (VC), OLX-001-8을 투여한 군 (NC), OLX-003-1을 피하 투여한 군 (#3-1), 및 OLX-031-1을 피하 투여한 군(#31-1)으로 분류하였다. 본 실시예에서, 상기 동물 모델 그룹에 대한 구체적인 분류는 하기 표 5에 나타난 바와 같다.

[141] [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

[143] 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.

[144]

[145] **(1) MARC1 및 MARC2의 발현 양상 확인**

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

[147] 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.

[148]

[149] (2) 간의 외관 평가

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

[151] 그 결과, 도 4에 나타낸 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.

[152]

[153] (3) 병리 조직학적 평가

[154] 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 사용하여 H&E 염색을 실시하였다. 또한, OCT 포매제를 사용하여 수득한 4 μ m 두께의 동결 절편을 대상으로, Oil Red O 염색을 실시하였다.

[155] 그 결과, 도 5 및 도 6에 나타낸 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.

[156]

[157] 실시예 2. 동물 모델을 이용한 치료 효능 평가

[158] 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.

[159] [표 6]

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

[161] 구체적으로, 상기 표 6에서 "*", "m", "f", "P", "GalNAc", "EVP"로 표기된 화학적 변형은 하기 표 7에 나타낸 바와 같다.

[162] [표 7]

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
EVP	E-비닐포스포네이트 (E-Vinylphosphonate)

[164] 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 상태에서 5'-말단에 (E) 비닐포스포네이트가 결합된 형태를 의미하는 것이다.

[165]

[166] **2-1. HFD induced NASH mouse model에서 OLX-031-1의 치료 효능 평가**

[167] 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.

[168] **[표 8]**

[169]

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

[170] 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.

[171]

[172] **(1) MARC1 및 MARC2의 발현 양상 확인**

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

[174] 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.

[175]

[176] **(2) 간의 외관 평가**

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

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

[179]

[180] **(3) 병리 조직학적 평가**

- [181] 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.
- [182] 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.
- [183]
- [184] **(4) 간 조직 내 섬유화 관련 인자의 발현 및 중성지방 수준 평가**
- [185] 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 mCol1 α 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.
- [186] 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 mCol1 α 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.
- [187]
- [188] **(5) 혈청학적 평가**
- [189] 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.
- [190] 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.

[191]

[192] **2-2. CDHFD induced NASH mouse model에서 OLX-031-2의 치료 효능 평가**

[193] 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.

[194]

[표 9]

[195]

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

[196]

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

[198]

[199] **(1) 병리 조직학적 평가**

[200] 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.

[201]

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.

[202]

[203] (2) 간 조직 내 섬유화 관련 인자의 발현 평가

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

[205] 그 결과, 도 18에 나타낸 바와 같이, 고지방 식이가 제공된 그룹 (CDHFD, CDHFD-NCD)에서, 간 섬유화 관련 인자인 α -SMA, mColl α 1, 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, mColl α 1, 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.

[206]

[207] (3) MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

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

[209] 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.

[210]

[211]

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

[213] 3-1. 250종의 asiRNA 디자인 및 제작

[214] 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 선별하여, 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.

[215] [표 10]

[216]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-51	sense	GAGGGAAACAUGGUUA	101
	antisense	UAACCAUGUUUCCCUCCUGGU	102
asiMARC1-52	sense	GGAGGGAACALGGUA	103
	antisense	UACCAUGUUUCCCUCCUGGUU	104
asiMARC1-53	sense	ACCAGGAGGGAACAA	105
	antisense	UUGUUUCCCUCCUGGUUAUC	106
asiMARC1-54	sense	UCAACCAGGAGGGAAA	107
	antisense	UUUCCCUCCUGGUUGAUCACA	108
asiMARC1-55	sense	GGCUUGUGAUCACCA	109
	antisense	UGGUUGAUCACAAGCCAAAAC	110
asiMARC1-56	sense	GUCCUGAUUUCCUGA	111
	antisense	UCAGGGAUAUCAGGACCAGGC	112
asiMARC1-57	sense	CUCGCCUGGUCCUGAA	113
	antisense	UUCAGGACCAGGCGAGGUUCC	114
asiMARC1-58	sense	CCUCGCCUGGUCCUGA	115
	antisense	UCAGGACCAGGCGAGGUUCCU	116
asiMARC1-59	sense	GACACCCUGACUCUA	117
	antisense	UGAGAGUCAGGUGUCACCAU	118
asiMARC1-60	sense	UGGUGACACCCUGACA	119
	antisense	UGUCAGGGUGUCACCAUCGCA	120
asiMARC1-61	sense	GCGAUGGUGACACCCA	121
	antisense	UGGGUGUACCAUCGCAGGUC	122
asiMARC1-62	sense	CCACCACAAUGCAGA	123
	antisense	UCUGCAUUUGUGUGGGCGUU	124
asiMARC1-63	sense	GCCCACCACAAUGCA	125
	antisense	UGCAUUUGUGUGGGCGUUUU	126
asiMARC1-64	sense	AACGCCACCACAAAA	127
	antisense	UUUUGUGUGGGCGUUUGAU	128
asiMARC1-65	sense	UGCACAAGUCAGAGA	129
	antisense	UCUCUGCACUUGUGCACUGCA	130
asiMARC1-66	sense	GCUUCCUGAAGUCACA	131
	antisense	UGUGACUUCAGGAAGCUGGUU	132
asiMARC1-67	sense	CAGCUUCCUGAAGUCA	133
	antisense	UGACUUCAGGAAGCUGGUUUAU	134
asiMARC1-68	sense	ACCAGCUUCCUGAAGA	135
	antisense	UCUUCAGGAAGCUGGUUAUCC	136
asiMARC1-69	sense	GCCCAGUGGAUAACCA	137
	antisense	UGGUUAUCCACUGGGCGUGG	138
asiMARC1-70	sense	ACCGCCAGUGGAUAA	139
	antisense	UUAUCCACUGGGCGUGGCCU	140
asiMARC1-71	sense	CACUUCGAGCCUCACA	141
	antisense	UGUGAGGCUUGAAGUCACCA	142
asiMARC1-72	sense	UGCACUUCGAGCCUCA	143
	antisense	UGAGGCUUGAAGUCACCAGG	144
asiMARC1-73	sense	GACACCAGCCAUUCA	145
	antisense	UGAAUGGGCUGGUGUCUGAGU	146
asiMARC1-74	sense	CAGACACCAGCCAUUA	147
	antisense	UAUGGGCUGGUGUCUGAGUAA	148
asiMARC1-75	sense	CCAGAUUGCUUACUCA	149
	antisense	UGAGUAAGCAAUCUGGUCCUU	150
asiMARC1-76	sense	GACCAGAUUGCUUACA	151
	antisense	UGUAAGCAAUCUGGUCCUUGG	152
asiMARC1-77	sense	AGGACCAGAUUGCUUA	153
	antisense	UAAGCAAUCUGGUCCUUGGGU	154
asiMARC1-78	sense	ACCCAAGGACCAGUAU	155

[217]

	antisense	UAUCUGGUCCUUGGGUCGGAA	156
asiMARC1-79	sense	GACCCAAGGACCAGAA	157
	antisense	UUCUGGUCCUUGGGUCGGAAC	158
asiMARC1-80	sense	GCGAUGUCUAUGCAGA	159
	antisense	UCUGCAUAGACATCGCAUCCU	160
asiMARC1-81	sense	AGGAUGCGAUGUCUAA	161
	antisense	UUAGACAUCGCAUCCUGAAAU	162
asiMARC1-82	sense	CAGGAUGCGAUGUCUA	163
	antisense	UAGACAUCGCAUCCUGAAAUU	164
asiMARC1-83	sense	CCCAAUAUUGUAAUA	165
	antisense	UAAUACAUAUUGGGCCUGA	166
asiMARC1-84	sense	GCCCAAUAUUGUAAUA	167
	antisense	UAUUACAAUAUUGGGCCUGAA	168
asiMARC1-85	sense	GGCCCAAUAUUGUAAA	169
	antisense	UUUACAAUAUUGGGCCUGAAG	170
asiMARC1-86	sense	ACUUCAGGCCCAUAA	171
	antisense	UUAUUGGGCCUGAAGUUGGUU	172
asiMARC1-87	sense	AACUUCAGGCCCAAUA	173
	antisense	UAUUGGGCCUGAAGUUGGUUG	174
asiMARC1-88	sense	CAACUUCAGGCCCAA	175
	antisense	UUUGGGCCUGAAGUUGGUUGC	176
asiMARC1-89	sense	CCAACUUCAGGCCCAA	177
	antisense	UUGGGCCUGAAGUUGGUUCU	178
asiMARC1-90	sense	AGAGAAGAAAGUAAA	179
	antisense	UUUAACUUUCUUCUAGCCU	180
asiMARC1-91	sense	UAGAGAAGAAAGUAAA	181
	antisense	UUAACUUCUUCUAGCCUG	182
asiMARC1-92	sense	CUAGAGAAGAAAGUUA	183
	antisense	UAACUUUCUUCUAGCCUGG	184
asiMARC1-93	sense	CUGGCGGAUCUCAACA	185
	antisense	UGUUGAGAUCGCGCAGCGACG	186
asiMARC1-94	sense	AGCUUCUUAUUGGUGA	187
	antisense	UCACCAAUAAGAAGCUAUCC	188
asiMARC1-95	sense	GCAUUUUAACCACAGA	189
	antisense	UCUGUGGUUAAAAUGCAUCUG	190
asiMARC1-96	sense	UCCAGAUGCAUUAUA	191
	antisense	UUAAAAUGCAUCUGGAACAAG	192
asiMARC1-97	sense	UUCCAGAUGCAUUAUA	193
	antisense	UAAAAUGCAUCUGGAACAAGC	194
asiMARC1-98	sense	GUUCCAGAUGCAUUA	195
	antisense	UAAAUGCAUCUGGAACAAGCC	196
asiMARC1-99	sense	UGUCCAGAUGCAUUA	197
	antisense	UAAUGCAUCUGGAACAAGCCA	198
asiMARC1-100	sense	UUGUCCAGAUGCAUA	199
	antisense	UAUGCAUCUGGAACAAGCCAU	200

[218]

[표 11]

[219]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-101	sense	GUGUCAUGAGCAGGAA	201
	ant isense	UUCUGCUCAUGACACCGGUG	202
asiMARC1-102	sense	CUGUGGGCCAGLAAA	203
	ant isense	UUUACUGGCCCAGCAGGUACA	204
asiMARC1-103	sense	CCUGCUGGGCCAGUAA	205
	ant isense	UUACUGGCCCAGCAGGUACAC	206
asiMARC1-104	sense	CCCAGGGACCAUCAA	207
	ant isense	UUUGAUGGUCCUGGGUULUC	208
asiMARC1-105	sense	ACCCAGGGACCAUCAA	209
	ant isense	UUGAUGGUCCUGGGUULUC	210
asiMARC1-106	sense	GGCAGUAUUUGUGCA	211
	ant isense	UGCACAAAAUACUGCCCAAAG	212
asiMARC1-107	sense	CUUUGGGCAGUAUUA	213
	ant isense	UAAAUACUGCCCAAAGAGUGG	214
asiMARC1-108	sense	UCUUUGGGCAGUAUA	215
	ant isense	UAAUACUGCCCAAAGAGUGGU	216
asiMARC1-109	sense	CUCUUUGGGCAGUAUA	217
	ant isense	UAUACUGCCCAAAGAGUGGUG	218
asiMARC1-110	sense	ACUCUUUGGGCAGUAA	219
	ant isense	UUACUGCCCAAAGAGUGGUGA	220
asiMARC1-111	sense	CACUCUUUGGGCAGUA	221
	ant isense	UACUGCCCAAAGAGUGGUGAU	222
asiMARC1-112	sense	CCACUCUUUGGGCAGA	223
	ant isense	UCUGCCCAAAGAGUGGUGAUU	224
asiMARC1-113	sense	GGAAAAUCACCACUCA	225
	ant isense	UGAGUGGUGAUUUCCAUAUA	226
asiMARC1-114	sense	CGAAAGUUAUAUGGAA	227
	ant isense	UUCCAUUAUACUUCGUUCUG	228
asiMARC1-115	sense	CAGAACGAAAGUUAUA	229
	ant isense	UAUAACUUCGUUCUGAAGGG	230
asiMARC1-116	sense	UCAGAACGAAAGUUA	231
	ant isense	UUAACUUCGUUCUGAAGGGU	232
asiMARC1-117	sense	UUCAGAACGAAAGUUA	233
	ant isense	UAACUUCGUUCUGAAGGGUC	234
asiMARC1-118	sense	CCUUCAGAACGAAAGA	235
	ant isense	UCUUCGUUCUGAAGGGUCAC	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	UGUUCCAGCGGUCCUCCU	242
asiMARC1-122	sense	UCCUGGAAUAUAGAA	243
	ant isense	UUCUAAUAUCCAGGACAUAC	244
asiMARC1-123	sense	GUCCUGGAAUAUAGA	245
	ant isense	UCUAAUAUCCAGGACAUACG	246
asiMARC1-124	sense	AUGUCCUGGAAUAUA	247
	ant isense	UAAUAUCCAGGACAUACGGU	248
asiMARC1-125	sense	GUAUGUCCUGGAAUAA	249
	ant isense	UUAUCCAGGACAUACGGUUC	250
asiMARC1-126	sense	CGUAUGUCCUGGAAUA	251
	ant isense	UAUCCAGGACAUACGGUUC	252
asiMARC1-127	sense	CCGUAGUCCUGGAAA	253
	ant isense	UUUCCAGGACAUACGGUCCC	254

[220]

asiMARC1-128	sense	ACCGUAUGUCCUGGAA	255
	ant i sense	UUC CAGGACAUAACGGUCCCCA	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	UAAACCAUGCUUCAAGUGUU	266
asiMARC1-134	sense	CUCAAAAUGACAACA	267
	ant i sense	UGUUGUCAUUUUGAGAACAU	268
asiMARC1-135	sense	CUCUACAUUUUCUUA	269
	ant i sense	UAAAGAAAAUGUAGAGGUCUC	270
asiMARC1-136	sense	CGUCUUUUGGACUUA	271
	ant i sense	UGAAGUCCAAAAGACGAAAAA	272
asiMARC1-137	sense	GCUUCAUGUCCCAGA	273
	ant i sense	UCUGGGACAUUGAAGCAUUGA	274
asiMARC1-138	sense	CUCAAUGCUCAAUGA	275
	ant i sense	UCAUUGAAGCAUUGAGACACC	276
asiMARC1-139	sense	GUCUCAUGCUUCAA	277
	ant i sense	UUUGAAGCAUUGAGACACCAG	278
asiMARC1-140	sense	GUGUCUCAAUGCUUA	279
	ant i sense	UGAAGCAUUGAGACACCAGAA	280
asiMARC1-141	sense	UGGUGUCUCAAUGCUA	281
	ant i sense	UAGCAUUGAGACACCAGAAGU	282
asiMARC1-142	sense	CAGGAUUCUGAAAACA	283
	ant i sense	UGUUUUCAGAAUCCUGUCUUG	284
asiMARC1-143	sense	GACAGGAUUCUGAAA	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	CCGUUUAACUGAUUAA	293
	ant i sense	UUAAUCAGUUAACGGGGAGU	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

[221]

[표 12]

[222]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-151	sense	UCCGUUUUUCUACCAA	301
	ant i sense	UUGGUAGAUAAACGGAGAAGC	302
asiMARC1-152	sense	UCCUGUCACUACCACA	303
	ant i sense	UGUGGUAGUGACAGGAUGCAA	304
asiMARC1-153	sense	GAGAAAGAGGAAGAGA	305
	ant i sense	UCUCUCCUCUUCUCUUCU	306
asiMARC1-154	sense	GAGAAGAAGAGAAAGA	307
	ant i sense	UCUUUCUCUUCUUCUUCU	308
asiMARC1-155	sense	AAGAGAAGAAGAGAAA	309
	ant i sense	UUUCUCUUCUUCUUCUUCU	310
asiMARC1-156	sense	GAGAAAGAGAAGAAGA	311
	ant i sense	UCUUCUUCUUCUUCUUAACG	312
asiMARC1-157	sense	UACGCAAUGAAAAUA	313
	ant i sense	UAAUUUUCAUUGCGUACCUC	314
asiMARC1-158	sense	GUACGCAAUGAAAAUA	315
	ant i sense	UAUUUUCAUUGCGUACCUC	316
asiMARC1-159	sense	CAAAUUAUGGCUGAAA	317
	ant i sense	UUUCCAGCCAUUUUGGGUG	318
asiMARC1-160	sense	CCCAAAUUAUGGCUGGA	319
	ant i sense	UCCAGCCAUUUUGGGUGCA	320
asiMARC1-161	sense	CUUUUGAAUAGGCAUA	321
	ant i sense	UAUGCCAUUUCAAAGCUAGC	322
asiMARC1-162	sense	GCUUUUGAAUAGGCAA	323
	ant i sense	UUGCCAUUUCAAAGCUAGCC	324
asiMARC1-163	sense	GGCUAGCUUUUGAAA	325
	ant i sense	UUUCAAAGCUAGCCCGGGG	326
asiMARC1-164	sense	GGGCUAGCUUUUGAAA	327
	ant i sense	UUUCAAAGCUAGCCCGGGG	328
asiMARC1-165	sense	CGGGCUAGCUUUUGAA	329
	ant i sense	UUCAAAAGCUAGCCCGGGCU	330
asiMARC1-166	sense	CCGGGCUAGCUUUUGA	331
	ant i sense	UCAAAGCUAGCCCGGGCUU	332
asiMARC1-167	sense	CCCCGGGCUAGCUUUA	333
	ant i sense	UAAAGCUAGCCCGGGCUUGA	334
asiMARC1-168	sense	GCCCCGGGCUAGCUUA	335
	ant i sense	UAAGCUAGCCCGGGCUUGAG	336
asiMARC1-169	sense	AGCCCCGGGCUAGCUA	337
	ant i sense	UAGCUAGCCCGGGCUUGAGA	338
asiMARC1-170	sense	CUCAAGCCCCGGGCUA	339
	ant i sense	UAGCCCGGGCUUGAGAAGAA	340
asiMARC1-171	sense	ACCUUCAGGAAGCACA	341
	ant i sense	UGUGCUUCCUGAAGGUCACCU	342
asiMARC1-172	sense	AGGUGACCUUCAGGAA	343
	ant i sense	UUCUGAAGGUCACCUCAGUC	344
asiMARC1-173	sense	CCAUAGAUCUGGAUCA	345
	ant i sense	UGAUCCAGAUUAUGGAAAAU	346
asiMARC1-174	sense	CUGCAGAUUUAUUA	347
	ant i sense	UAAUUAAUUCUGCAGUGCUU	348
asiMARC1-175	sense	ACUGCAGAUUUAUUA	349
	ant i sense	UAUUAAUUCUGCAGUGCUUC	350
asiMARC1-176	sense	CAUUGGAUUUCCUAAA	351
	ant i sense	UUUAGGAAUCCAAUGCUGUC	352
asiMARC1-177	sense	GCAUUGGAUUUCCUAA	353
	ant i sense	UUAGGAAUCCAAUGCUGUCU	354

[223]

asiMARC1-178	sense	AGCAUUGGAUUUCCUA	355
	ant i sense	UAGGAAAUCCAUGCUGUCUG	356
asiMARC1-179	sense	AGACAGCAUUGGAUUA	357
	ant i sense	UAAUCCA AUGCUGUCUGAGAA	358
asiMARC1-180	sense	CAGACAGCAUUGGAUA	359
	ant i sense	UAUCCA AUGCUGUCUGAGAAG	360
asiMARC1-181	sense	GCUUCUCAGACAGCAA	361
	ant i sense	UUGCUGUCUGAGAAGCAGCAG	362
asiMARC1-182	sense	UGCUGCUUCUCAGACA	363
	ant i sense	UGUCUGAGAAGCAGCAGGGCC	364
asiMARC1-183	sense	CCUGCUGCUUCUCAGA	365
	ant i sense	UCUGAGAAGCAGCAGGGCCAG	366
asiMARC1-184	sense	AGGAUGGUUGUGUAGA	367
	ant i sense	UCUACACAACCAUCCUCCUGA	368
asiMARC1-185	sense	CUGGAUCCUUGCCAU	369
	ant i sense	UAUGGCAAGGAUCCAGGGGUC	370
asiMARC1-186	sense	CCUGGAUCCUUGCCAA	371
	ant i sense	UUGGCAAGGAUCCAGGGGUCC	372
asiMARC1-187	sense	CCCUGGAUCCUUGCCA	373
	ant i sense	UGGCAAGGAUCCAGGGGUCCU	374
asiMARC1-188	sense	GGACCCUGGAUCCUA	375
	ant i sense	UAGGAUCCAGGGGUCCUCCAU	376
asiMARC1-189	sense	UGGAGGACCCUGGAA	377
	ant i sense	UUCAGGGGUCCUCCAUACU	378
asiMARC1-190	sense	UGCUCUUCUCCAGUA	379
	ant i sense	UACUGGAGAAGGAGCACUCCG	380
asiMARC1-191	sense	GUGCUCUUCUCCAGA	381
	ant i sense	UCUGGAGAAGGAGCACUCCGU	382
asiMARC1-192	sense	ACGGAGUGCUCUUA	383
	ant i sense	UGAAGGAGCACUCCGUCAUUA	384
asiMARC1-193	sense	UGAAAAAGUUCUGAA	385
	ant i sense	UUUCAGAACUUUUCACCCGG	386
asiMARC1-194	sense	GUGAAAAAGUUCGAA	387
	ant i sense	UUCAGAACUUUUCACCCGGA	388
asiMARC1-195	sense	GGUGAAAAAGUUCUGA	389
	ant i sense	UCAGAACUUUUCACCCGGAA	390
asiMARC1-196	sense	CGGGUGAAAAAGUUA	391
	ant i sense	UGAACUUUUCACCCGGAACU	392
asiMARC1-197	sense	UCCGGGUGAAAAAGUA	393
	ant i sense	UACUUUUCACCCGGAACUGG	394
asiMARC1-198	sense	AAGUGAUUCAGUGUA	395
	ant i sense	UAUCACUGAAUCACUUUUCU	396
asiMARC1-199	sense	GAGAAGAAAAGUGUA	397
	ant i sense	UAUCACUUUUCUUCUCCUCA	398
asiMARC1-200	sense	GGAGAAGAAAAGUGAA	399
	ant i sense	UUCACUUUUCUUCUCCUCCAC	400

[224]

[13]

[225]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-201	sense	GGAGGAGAAGAAAAGA	401
	ant i sense	UCUUUCUUCUCCUCCACAGA	402
asiMARC1-202	sense	GUGGAGGAGAAGAAA	403
	ant i sense	UUUUCUUCUCCUCCACAGAAU	404
asiMARC1-203	sense	UGUGGAGGAGAAGAAA	405
	ant i sense	UUUCUUCUCCUCCACAGAAUU	406
asiMARC1-204	sense	CUGUGGAGGAGAAGAA	407
	ant i sense	UUCUUCUCCUCCACAGAAUUC	408
asiMARC1-205	sense	GGGGAAAAGGAAAGCA	409
	ant i sense	UGC UUCCUUU UCCCCUUUA	410
asiMARC1-206	sense	AAGGGGAAAAGGAAA	411
	ant i sense	UUUCCUUUCCCCUUUAAAG	412
asiMARC1-207	sense	CUUUAAGGGGGAAA	413
	ant i sense	UUUCCCCCUUUAAGGUUUU	414
asiMARC1-208	sense	CCUUUAAGGGGGAAA	415
	ant i sense	UUUCCCCCUUUAAGGUUUUC	416
asiMARC1-209	sense	ACCUUUAAGGGGGAA	417
	ant i sense	UUCCCCCUUUAAGGUUUUCA	418
asiMARC1-210	sense	UACUGAAAACCUUUA	419
	ant i sense	UUAAGGUUUUCAGUAGUCUA	420
asiMARC1-211	sense	CUACUGAAAACCUUA	421
	ant i sense	UAAAGGUUUUCAGUAGUCUAU	422
asiMARC1-212	sense	ACUACUGAAAACCUUA	423
	ant i sense	UAAGGUUUUCAGUAGUCUAUC	424
asiMARC1-213	sense	GACUACUGAAAACCUA	425
	ant i sense	UAGGUUUUCAGUAGUCUAUCU	426
asiMARC1-214	sense	UUUUUAAAACCCAAA	427
	ant i sense	UUUGGGUUUUAACAACUGAC	428
asiMARC1-215	sense	CAUAUGUCAGUUGUUA	429
	ant i sense	UAACAACUGACAUAUGCUUUC	430
asiMARC1-216	sense	GCAUAUGUCAGUUGUA	431
	ant i sense	UACAACUGACAUAUGCUUUC	432
asiMARC1-217	sense	AGCAUAUGUCAGUUGA	433
	ant i sense	UCAACUGACAUAUGCUUUCU	434
asiMARC1-218	sense	CCAUUUUGUCCUUGA	435
	ant i sense	UCAAAGGACAAAUGGCAUA	436
asiMARC1-219	sense	UGCCAUUUGUCCUUA	437
	ant i sense	UAAGGACAAAUGGCAUAAA	438
asiMARC1-220	sense	AGAUCUGAUGAAGUAA	439
	ant i sense	UUACUUCAGUAGUAGAG	440
asiMARC1-221	sense	CUCUAAGAUCUGAUGA	441
	ant i sense	UCAUCAGAUUUAGAGUUUA	442
asiMARC1-222	sense	GGAAGUUGACUAAACA	443
	ant i sense	UGUUUAGUCAACUCCCAUA	444
asiMARC1-223	sense	UGGAAGUUGACUAAA	445
	ant i sense	UUUAGUCAACUCCCAUAUA	446
asiMARC1-224	sense	UUGGAAGUUGACUAA	447
	ant i sense	UUAGUCAACUCCCAUAUAA	448
asiMARC1-225	sense	CUACUUUGACUAGUUA	449
	ant i sense	UAAUCAGUCAAGUAGCUUCC	450
asiMARC1-226	sense	GCUACUUUGACUAGUA	451
	ant i sense	UACUAGUCAAGUAGCUUCCA	452
asiMARC1-227	sense	AGCUACUUUGACUAGA	453
	ant i sense	UCUAGUCAAGUAGCUUCCAU	454

[226]

asiMARC1-228	sense	GGAAGCUACUUUGACA	455
	ant i sense	UGUCAAAGUAGCUUCCAUUUA	456
asiMARC1-229	sense	GCCUGGUCCUGAUUUA	457
	ant i sense	UAAAUCAGGACCAGGCGAGGU	458
asiMARC1-230	sense	CGCCUGGUCCUGAUUA	459
	ant i sense	UAAUCAGGACCAGGCGAGGUU	460
asiMARC1-231	sense	UCGCCUGGUCCUGAUA	461
	ant i sense	UAUCAGGACCAGGCGAGGUUC	462
asiMARC1-232	sense	CUGACUCUCAGUGCAA	463
	ant i sense	UUGCACUGAGAGUCAGGGUGU	464
asiMARC1-233	sense	CCUGACUCUCAGUGCA	465
	ant i sense	UGCACUGAGAGUCAGGGUGUC	466
asiMARC1-234	sense	CACCCUGACUCUCAGA	467
	ant i sense	UCUGAGAGUCAGGGUGUCCACC	468
asiMARC1-235	sense	GUGACACCCUGACUCA	469
	ant i sense	UGAGUCAGGGUGUCCACCAUCG	470
asiMARC1-236	sense	AGAUUGCUUACUCAGA	471
	ant i sense	UCUGAGUAAGCAAUCUGGUCC	472
asiMARC1-237	sense	UCUCAACUCCAGGCUA	473
	ant i sense	UAGCCUGGAGUUGAGAUCCGC	474
asiMARC1-238	sense	GGAUUCAACUCCAGA	475
	ant i sense	UCUGGAGUUGAGAUCCGCCAG	476
asiMARC1-239	sense	CGGAUCUCAACUCCAA	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	AGGGUGAUGGCUUUGUA	483
	ant i sense	UACAAGCCAUCACCCUUUUA	484
asiMARC1-243	sense	ACCUGCUGGGCCAGUA	485
	ant i sense	UACUGGCCAGCAGGUACACA	486
asiMARC1-244	sense	AGAGAAAGAGAAGAAA	487
	ant i sense	UUUCUUCUCUUUCUUAACGA	488
asiMARC1-245	Sense	UAGAGAAAGAGAAGAA	489
	ant i sense	UUCUUCUCUUUCUUAACGAG	490
asiMARC1-246	Sense	AGGAGAAGAAAAGUGA	491
	ant i sense	UCACUUUUCUUCUCCUCCACA	492
asiMARC1-247	sense	GCAGCCUACACAAAGA	493
	ant i sense	UCUUUGUGUAGGCUGCAGUGA	494
asiMARC1-248	sense	UGCAGCCUACACAAAA	495
	ant i sense	UUUUGUGUAGGCUGCAGUGAG	496
asiMARC1-249	sense	CAGUGCAGCCUACACA	497
	ant i sense	UGUGUAGGCUGCAGUGAGAGU	498
asiMARC1-250	sense	CUCAGUGCAGCCUACA	499
	ant i sense	UGUAGGCUGCAGUGAGAGUCA	500

[227]

[표 14]

[228]

asiRNA name	Sequence(5' → 3')		SEQ NO.
asiMARC1-251	sense	UCUCAGUGCAGCCUAA	501
	antisense	UUAGGCUGCACUGAGAGUCAG	502
asiMARC1-252	sense	CUCUCAGUGCAGCCUA	503
	antisense	UAGGCUGCACUGAGAGUCAGG	504
asiMARC1-253	sense	CCUUUCUGAGGGCUCA	505
	antisense	UGACGCCUCAGAAAGGAUCAA	506
asiMARC1-254	sense	UCCUUUCUGAGGGCGUA	507
	antisense	UACGCCUCAGAAAGGAUCAAG	508
asiMARC1-255	sense	AAGAAAGUUAAGCAA	509
	antisense	UUGCUUUAACUUUCUUCUCUA	510
asiMARC1-256	sense	GGUGACGUGGAACUGA	511
	antisense	UCAGUUCACGUCACCAUAA	512
asiMARC1-257	sense	UGGUGACGUGGAACUA	513
	antisense	UAGUCCACGUCACCAUAAG	514
asiMARC1-258	sense	CAGAUGCAUUUAACA	515
	antisense	UGUUAAGUAGCAUCUGGAACA	516
asiMARC1-259	sense	CCAUCAAAGUGGGAGA	517
	antisense	UCUCCACUUUGAUGGUCCCU	518
asiMARC1-260	sense	CAGGACCAUCAAAGA	519
	antisense	UCUUUGAUGGUCCUGGGUUU	520
asiMARC1-261	sense	CCAGGGACCAUAAAA	521
	antisense	UUUUGAUGGUCCUGGGUUU	522
asiMARC1-262	sense	UAUUUUGUGCUGGAAA	523
	antisense	UUUCCAGCACAAAUAUCUGCC	524
asiMARC1-263	sense	UUGGGCAGUAUUUGA	525
	antisense	UCAAUAUACUGCCCAAAGAGU	526
asiMARC1-264	sense	ACGCAAUAGAAAUUAA	527
	antisense	UUAAUUUUCAUUGCGUACCUC	528
asiMARC1-265	sense	CCAAAUUAGGCUGGAA	529
	antisense	UUCCAGCCAUUUUUGGGGUGC	530
asiMARC1-266	sense	CUUCUCAGACAGCAUA	531
	antisense	UAUGCUGUCUGAGAAGCAGCA	532
asiMARC1-267	sense	GCUCUUCUCAGACAA	533
	antisense	UUGUCUGAGAAGCAGCAGGGC	534
asiMARC1-268	sense	AGGAGGGAACAUGGA	535
	antisense	UCCAUGUUUCCUCCUGGUUG	536
asiMARC1-269	sense	CAGGAGGGAACAUGA	537
	antisense	UCAUGUUUCCUCCUGGUUGA	538
asiMARC1-270	sense	CUGAUUUCUUGACCA	539
	antisense	UGGUCAGGGAAUUCAGGACCA	540
asiMARC1-271	sense	CCUGGUCCUGAUUUA	541
	antisense	UGAAAUACAGACAGGCGAGG	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	UUUGUGUAGGCUGCACUGAGAG	550
asiMARC1-276	sense	CCUGACUCUCAGUGA	551
	antisense	UCACUGAGAGUCAGGGUGUCA	552
asiMARC1-277	sense	ACCCUGACUCUCAGUA	553
	antisense	UACUGAGAGUCAGGGUGUCAC	554
asiMARC1-278	sense	AAACGCCCAACACAAA	555

[229]

	ant i sense	UUUGUGGUGGCGUUUUGAUA	556
asiMARC1-279	sense	GCACAAGUGCAGAGUA	557
	ant i sense	UACUCUGCACUUGGCACUGC	558
asiMARC1-280	sense	GGUGCACUUCGAGCCA	559
	ant i sense	UGGCUCGAAGUGCACCAGGCG	560
asiMARC1-281	sense	GCCUGGUGCACUUCGA	561
	ant i sense	UCGAAGUGCACCAGGCGGUAG	562
asiMARC1-282	sense	CGCCUGGUGCACUUA	563
	ant i sense	UGAAGUGCACCAGGCGGUAGG	564
asiMARC1-283	sense	CCGCCUGGUGCACUUA	565
	ant i sense	UAAGUGCACCAGGCGGUAGG	566
asiMARC1-284	sense	ACCGCCUGGUGCACUA	567
	ant i sense	UAGUGCACCAGGCGGUAGGCG	568
asiMARC1-285	sense	CGACCCAAGGACCAGA	569
	ant i sense	UCUGGUCCUUGGUGCGAACA	570
asiMARC1-286	sense	CCGACCCAAGGACCAA	571
	ant i sense	UUGGUCCUUGGUGCGGAACAA	572
asiMARC1-287	sense	UGGCGGAUCUCAACUA	573
	ant i sense	UAGUUGAGAUCGCCAGCGAC	574
asiMARC1-288	sense	GUGACGUGGAACUGAA	575
	ant i sense	UUCAGUCCACGUCACCAUA	576
asiMARC1-289	sense	UUGGUGACGUGGAACA	577
	ant i sense	UGUCCACGUCACCAUAAGA	578
asiMARC1-290	sense	CCAGAUGCAUUUAAA	579
	ant i sense	UUUAAAUGCAUCUGGAACAA	580
asiMARC1-291	scnsc	GGCCAGUAUUGGAAA	581
	ant i sense	UUUCCAUUACUGGCCAGCA	582
asiMARC1-292	sense	GGGCCAGUAUUGGAA	583
	ant i sense	UUCCCAUUACUGGCCAGCAG	584
asiMARC1-293	sense	ACCAUCAAAGUGGAA	585
	ant i sense	UUCCCAUUUGAUGGUCCUG	586
asiMARC1-294	sense	GACCAUCAAGUGGGA	587
	ant i sense	UCCCAUUUGAUGGUCCUGG	588
asiMARC1-295	sense	UGGAAAACCCAGGAA	589
	ant i sense	UUCCUGGUAUUCCAGCACA	590
asiMARC1-296	sense	CUGGAAAACCCAGGGA	591
	ant i sense	UCCUGGGUAUUCCAGCACAA	592
asiMARC1-297	sense	CGCUGGAAACACUGAA	593
	ant i sense	UUCAGUUAUCCAGCGGUCC	594
asiMARC1-298	sense	CCGUGGAAACACUGA	595
	ant i sense	UCAGUUAUCCAGCGGUCCU	596
asiMARC1-299	sense	ACCGUGGAAACACUA	597
	ant i sense	UAGUGUAUCCAGCGGUCCU	598
asiMARC1-300	sense	AACCGUGGAAACACA	599
	ant i sense	UGUGUAUCCAGCGGUCCUUC	600

[230]

[231] **3-2. MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가**

[232] 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 시약만을 첨가한 군 (Mock), 양성 대조군으로 asiMARC1-30을 사용하여 실시예 1-2와 동일한 방식으로 형질감염을 수행한 군 (PC1)을 사용하였다. 이후, 상기와 같이 선별된 134종의 MARC1 asiRNA를 대상으로, 상기와 동일한 방식으로, MARC1 asiRNA 처리 농도만을 1 nM 또는 0.1 nM로 순차적으로 변경하면서, MARC1 mRNA 발현 수준을 평가하였다.

- [233] 그 결과, 도 20a 내지 도 20c에 나타낸 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 나타낸 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).

[234]

[235] **3-3. MARC1 단백질의 발현 억제 효과의 평가**

- [236] 단백질 수준에서 발현 억제 효율을 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.

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

[238]

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

[240] 4-1. 41종의 MARC1GalNAc-asiRNA 디자인 및 제작

[241] 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.

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

[243] [표 15]

GalNAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-031-1	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	anti sense	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-3	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	anti sense	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-4	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-031-6	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	anti sense	P-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-7	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-GalNAc
	anti sense	P-mA*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-8	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-031-9	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fG*mAmUmCmCfAmGfAmGmCmUmGfCmGfCmC*mA*mC*mU*mG
OLX-075-1	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmGfGmUmC*mC*mU*mU
OLX-080-1	sense	mG*fC*mGfAfUfGmUfCmUfAmUfGmCfAmGfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fC*mUmGmCmAfUmAfGmAmCmAmUfCmGfCmAmU*mC*mC*mU
OLX-089-1	sense	mC*fC*mAfAfCfUmUfCmAfGmGfCmCfCmAfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fU*mGmGmGmCfCmUfGmAmAmGmUfUmGfGmUmU*mG*mC*mU
OLX-090-1	sense	mA*fG*mAfGfAfAmGfAmAfAmGfUmUfAmAfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fU*mUmAmCmCfUmUfUmCmUmCfUmCfUmA*mG*mC*mC*mU
OLX-092-1	sense	mC*fU*mAfGfAfGmAfAmGfAmAfAmGfUmUfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fA*mAmCmUmUfUmCfUmCmUmCfUmAfGmC*mC*mU*mG*mG
OLX-099-1	sense	mU*fG*mUfUfCfCmAfGmAfUmGfCmAfUmUfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fA*mAmUmGmCfAmUfCmUmGmGmAfAmCfAmA*mG*mC*mC*mA
OLX-100-1	sense	mU*fU*mGfUfUfCmCfAmGfAmUfGmCfAmUfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fA*mUmGmCmAfUmCfUmGmGmAmAfCmAfAmG*mC*mC*mA*mU
OLX-114-1	sense	mC*fG*mAfAfAfGmUfUmAfUmAfUmGfGmAfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fU*mCmCmAmUfAmUfAmAmCmUmUfUmCfGmUmU*mC*mU*mG
OLX-124-1	sense	mA*fU*mGfUfCfCmUfGmGfAmAfUmAfUmUfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fA*mAmUmAmUfUmCfCmAmGmGmAfCmAfUmA*mC*mG*mG*mU
OLX-126-1	sense	mC*fG*mUfAfUfGmUfCmCfUmGfGmAfUmUfA-GalNAc
	anti sense	P-mU*fA*mUmUmCmCfAmGfGmAmCmAmUfAmCfGmG*mU*mU*mC*mC

[245]

OLX-129-1	sense	mC*fA*mGfAfAfCmUfGmAfGmAfCmCfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fG*mAmGmUmUfCmUfCmAmGmUmUfCmUfGmAm*mA*mC*mA
OLX-130-1	sense	mG*fG*mUfGfUfUmUfCmAfGmAfAmCfUmGfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fC*mAmGmUmUfCmUfGmAmAmCfAmCfCmA*mU*mG*mC*mU
OLX-131-1	sense	mG*fC*mAfUfGfGmUfGmUfUmUfCmAfGmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mCmUmGmAfAmAfCmAmCmAmAfUmGfCmU*mU*mC*mA*mA
OLX-137-1	sense	mG*fC*mUfUfCfAmAfUmGfUmCfCmCfAmGfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fC*mUmGmGmGfAmCfAmUmGmAmAfAmGfCmA*mU*mU*mG*mA
OLX-143-1	sense	mG*fA*mCfAfGfGmAfUmUfCmUfGmAfAmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mUmUmCmAfGmAfAmUmCmUmUfGmUfCmU*mU*mG*mU*mC
OLX-144-1	sense	mA*fG*mAfCfAfGmGfAmUfUmCfUmGfAmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mUmCmAmGfAmAfUmCmUmGfUmCfUmU*mG*mU*mC*mA
OLX-166-1	sense	mC*fC*mGfGfGfCmUfAmGfCmUfUmUfUmGfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fC*mAmAmAmAfGmCfUmAmGmCmCfCmGfGmG*mG*mC*mU*mU
OLX-177-1	sense	mG*fC*mAfUfUfGmGfAmUfUmUfCmCfUmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mAmGmGmAfAmAfUmCmCmAmAfUmGfCmU*mG*mU*mC*mU
OLX-194-1	sense	mG*fU*mGfAfAfAmAfAmGfUmUfCmUfGmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mCmAmGmAfAmCfUmUmUmUfCmAfCmC*mG*mG*mA
OLX-196-1	sense	mC*fG*mGfGfUfGmAfAmAfAmUfUmUfUmCfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fG*mAmAmCmUfUmUfUmUmCmAmCfCmCfGmG*mA*mA*mC*mU
OLX-200-1	sense	mG*fG*mAfGfAfAmGfAmAfAmUfGmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mCmAmCmUfUmUfUmCmUmCfUmCfCmU*mC*mC*mA*mC
OLX-212-1	sense	mA*fC*mUfAfCfUmGfAmAfAmAfCmCfUmUfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fA*mAmGmUmUfUmUfUmCmAmUmUfAmGfUmC*mU*mA*mU*mC
OLX-216-1	sense	mG*fC*mAfUfAfUmGfUmCfAmGfUmUfGmUfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fA*mCmAmCmUfUmGfAmCmAmUmAfUmGfCmU*mU*mU*mC*mC
OLX-218-1	sense	mC*fC*mAfUfUfUmUfGmUfCmCfUmUfUmGfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fC*mAmAmAmGfGmAfCmAmAmAmAfUmGfGmC*mA*mA*mU*mA
OLX-220-1	sense	mA*fG*mAfUfCfUmGfAmUfGmAfAmGfUmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mAmCmUmUfCmAfUmCmAmGmAfUmCfUmU*mA*mG*mA*mG
OLX-222-1	sense	mG*fG*mAfAfGfUmUfGmAfCmUfAmAfAmCfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fG*mUmUmAmGmUfCmAmAmCmUfUmCfCmC*mA*mA*mU*mA
OLX-223-1	sense	mU*fG*mGfGfAfAmGfUmUfGmAfCmUfAmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mUmAmGmUfCmAfAmCmUmCfCmCfAmA*mU*mA*mU*mA
OLX-224-1	sense	mU*fU*mGfGfGfAmAfGmUfUmGfAmCfUmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mAmGmUmCfAmAfCmUmUmCmCfCmAfAmU*mA*mU*mA*mA
OLX-233-1	sense	mC*fC*mUfGfAfCmUfCmUfCmAfGmUfGmCfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fG*mCmAmCmUfGmAfGmAmGmUmCfAmGfGmG*mU*mG*mU*mC
OLX-237-1	sense	mU*fC*mUfCfAfAmCfUmCfCmAfGmGfCmUfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fA*mGmCmCmUfGmGfAmGmUmUmGfAmGfAmU*mC*mC*mG*mC
OLX-264-1	sense	mA*fC*mGfCfAfAmUfGmAfAmAfAmUfUmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mAmAmUmUfUmUfCmAmUmUmGfCmGfUmA*mC*mC*mU*mC
OLX-274-1	sense	mG*fU*mGfCfAfGmCfCmUfAmCfAmCfAmAfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fU*mUmGmUmGfUmAfGmGmUmGfCmAfCmU*mG*mA*mG*mA
OLX-276-1	sense	mC*fC*mCfUfGfAmCfUmCfUmCfAmGfUmGfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fC*mAmCmUmGfAmGfAmGmUmCmAfGmGfGmU*mG*mU*mC*mA
OLX-281-1	sense	mG*fC*mCfUfGfGmUfGmCfAmCfUmUfCmGfA-GaINAc
	ant i sense	P-mU*fC*mGmAmAmGfUmGfCmAmCmAmGfGmGfCmG*mG*mU*mA*mG

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

[247]

[248] 4-2. MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가

[249] mRNA 수준에서 발현 억제 효율을 확인하기 위해, 상기 실시예 4-1에서 제작한 총 41종의 MARC1 GalNAc-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.

- [250] 그 결과, 도 23에 나타낸 바와 같이, MARC1 GalNAc-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.
- [251]
- [252] **4-3. 인간 유래 간 세포에 대한 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가**
- [253] mRNA 수준에서의 발현 억제 효과를 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.
- [254] 또한, MARC1 GalNAc-asiRNA의 처리 농도에 따른 mRNA 수준에서의 발현 억제 효과를 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.
- [255] 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).
- [256]
- [257] **실시예 5. 인간 MARC1을 표적으로 하는 GalNAc-asiRNA의 제작 및 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과의 평가**
- [258] 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.

[259] [표 16]

[260]

GalNAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-075-1	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	P-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-2	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-3	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-4	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-5	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-6	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-7	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-8	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-9	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUmGmCmUmUmAmCfUmCfA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-10	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmCmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-11	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmCmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-12	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmCmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-13	sense	mC*fC*mAfGfGfUmGmCmCmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-14	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-15	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-16	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU
OLX-075-17	sense	mC*mC*mAfGmAfUmUmGmCmUmUmAmCmUmCmA-GalNAc
	antisense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAmAmGmCmAmUmCfUmG*fG*mU*mC*mC*mU*mU

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

[262] 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 4×10⁴ 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.

[263] 그 결과, 도 26에 나타난 바와 같이, MARC1 GalNAc-asiRNA 17종의 처리에

다른 MARC1 mRNA의 발현 억제 효과를 확인하였다.

[264]

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

[266] 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 나타낸 바와 같다.

[267] [표 17]

GalNAc-asiRNA name	Sequence(5' → 3')	
OLX-031-2	sense	mG*fC*mGfCfAfGmCfUmCfUmGfGmAfUmCfU-Ga1NAc
	ant isense	EVP-mA*fG*mAmUmCfCmAfGfAmGmCmUmGfCmG*fC*mC*mA*mC
OLX-075-2	sense	mC*fC*mAfGfAfUmUfGmCfUmUfAmCfUmCfA-Ga1NAc
	ant isense	EVP-mU*fG*mAmGmUmAfAmGfCmAmAmUmCfUmGfGmU*mC*mC*mU*mU

[269] [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	OLX-075-2	2
6	5 mpk		2
7	10 mpk		2

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

[272]

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

[274] 7-1. SEAP 리포터를 이용한 발현 억제 효과의 평가

[275] 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 GalNAc-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 나타낸 바와 같다.

[276] [표 19]

[277]

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

[278]

한편, 상기 플라스미드로 형질감염된 시점으로부터 4주째 MARC1 GalNAc-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.

[279]

그 결과, 도 28에 나타낸 바와 같이, MARC1 GalNAc-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.

[280]

[281]

7-2. 이중 루시퍼라제 리포터를 이용한 발현 억제 효과의 평가

[282]

6 주령 Balb/c 마우스를 인간 MARC1 유전자를 포함하는 플라스미드 (psiCHECK-2-hMARC1)로 형질감염시킨 뒤, 3mpk의 상기 실시예 5의 MARC1 GalNAc-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 확인하여, 인간 MARC1 mRNA의 발현 억제 수준을 비교하였다.

[283]

그 결과, 도 29에 나타낸 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.

[284]

[285]

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

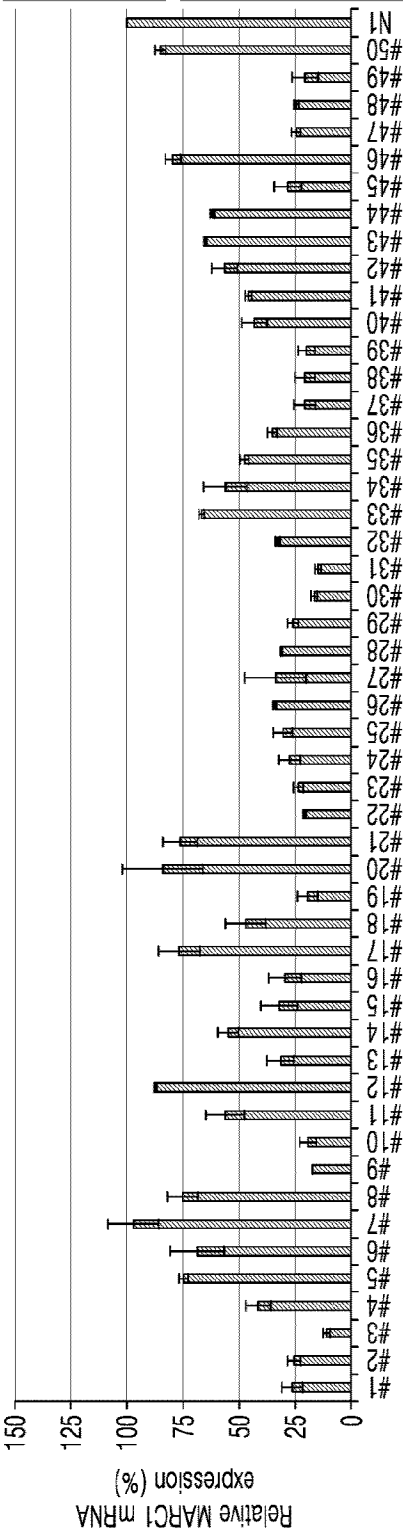
청구범위

- [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,

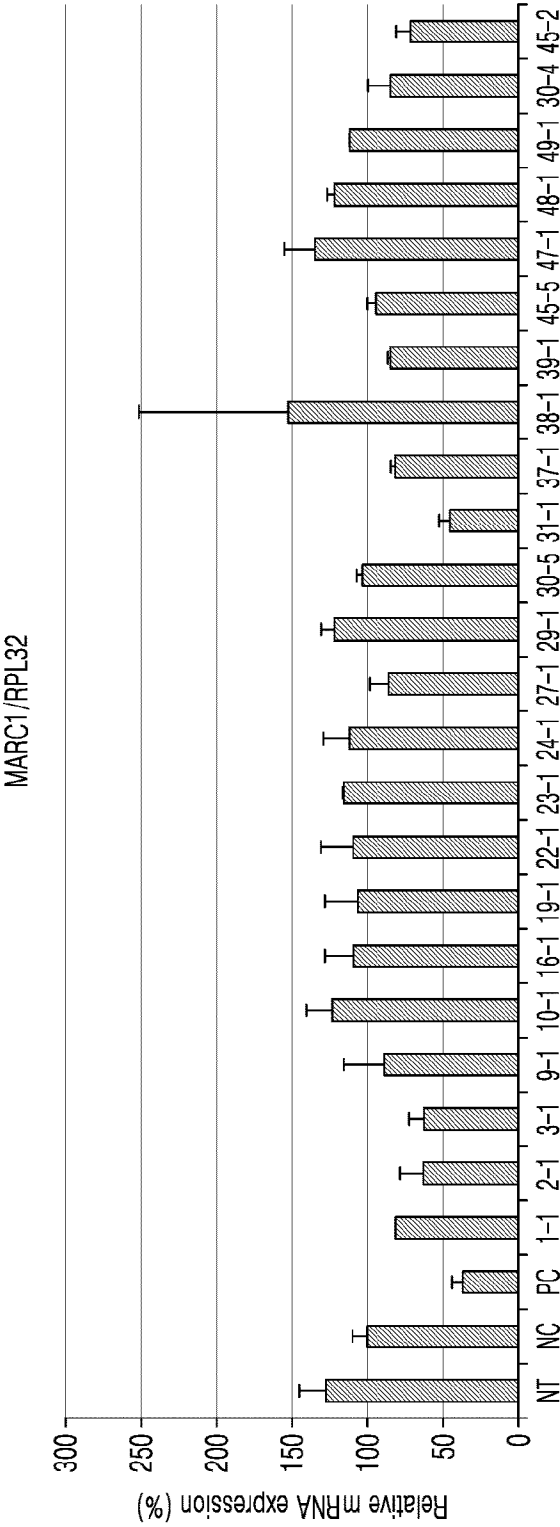
- RNAi 제제.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥은 3'말단에 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine; GalNAc) 유도체와 결합되어 있는 것인, RNAi 제제.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 상기 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것인, RNAi 제제.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 센스 가닥은 하기로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는 것인 RNAi 제제:
 5' 말단으로부터 인접한 2 내지 4개의 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형;
 1개 이상의 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; 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 뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노포페이트(boranophosphate), 또는 메틸포스포네이트(methyl phosphonate)로 변형;
 1개 이상의 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; 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.

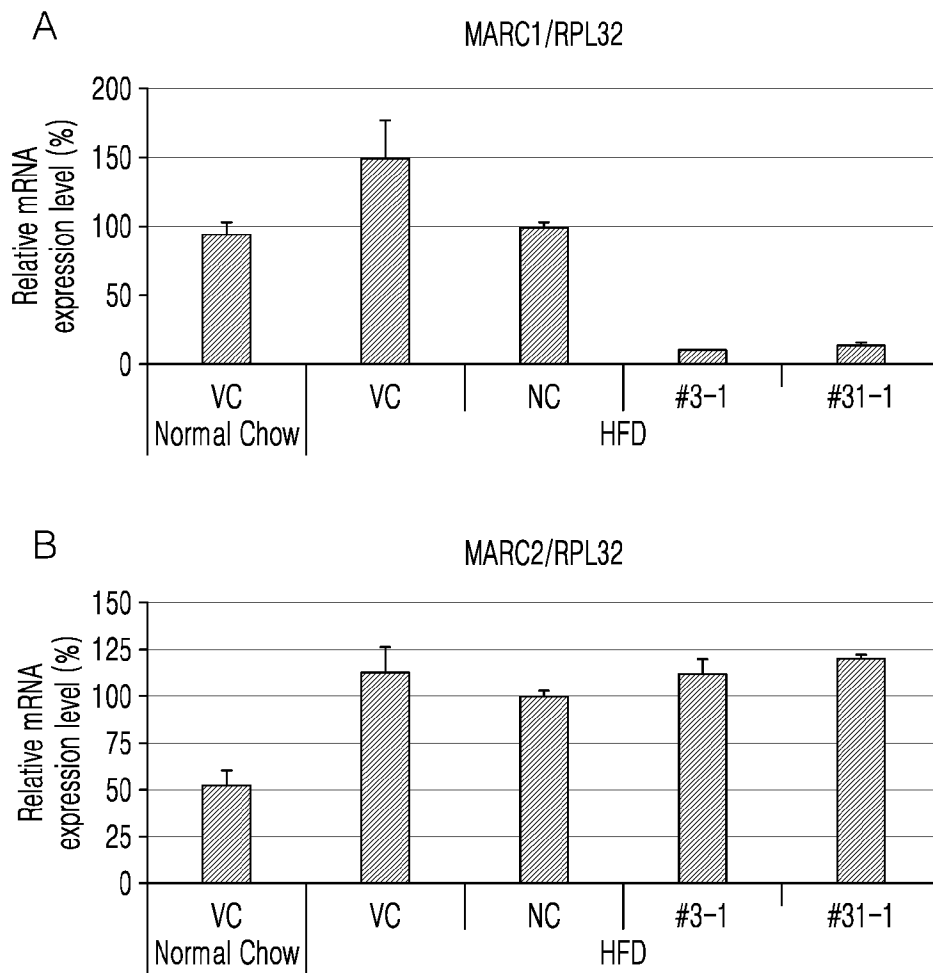
[도1]



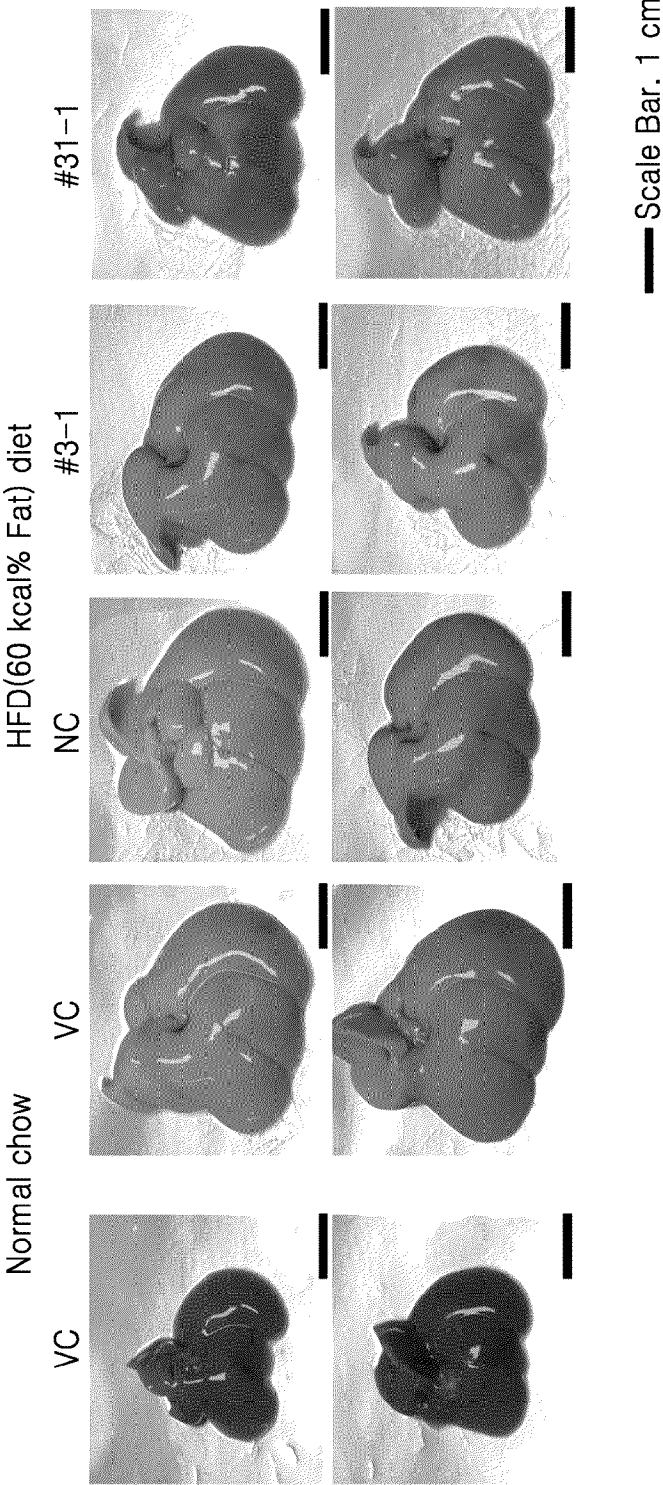
[도2]



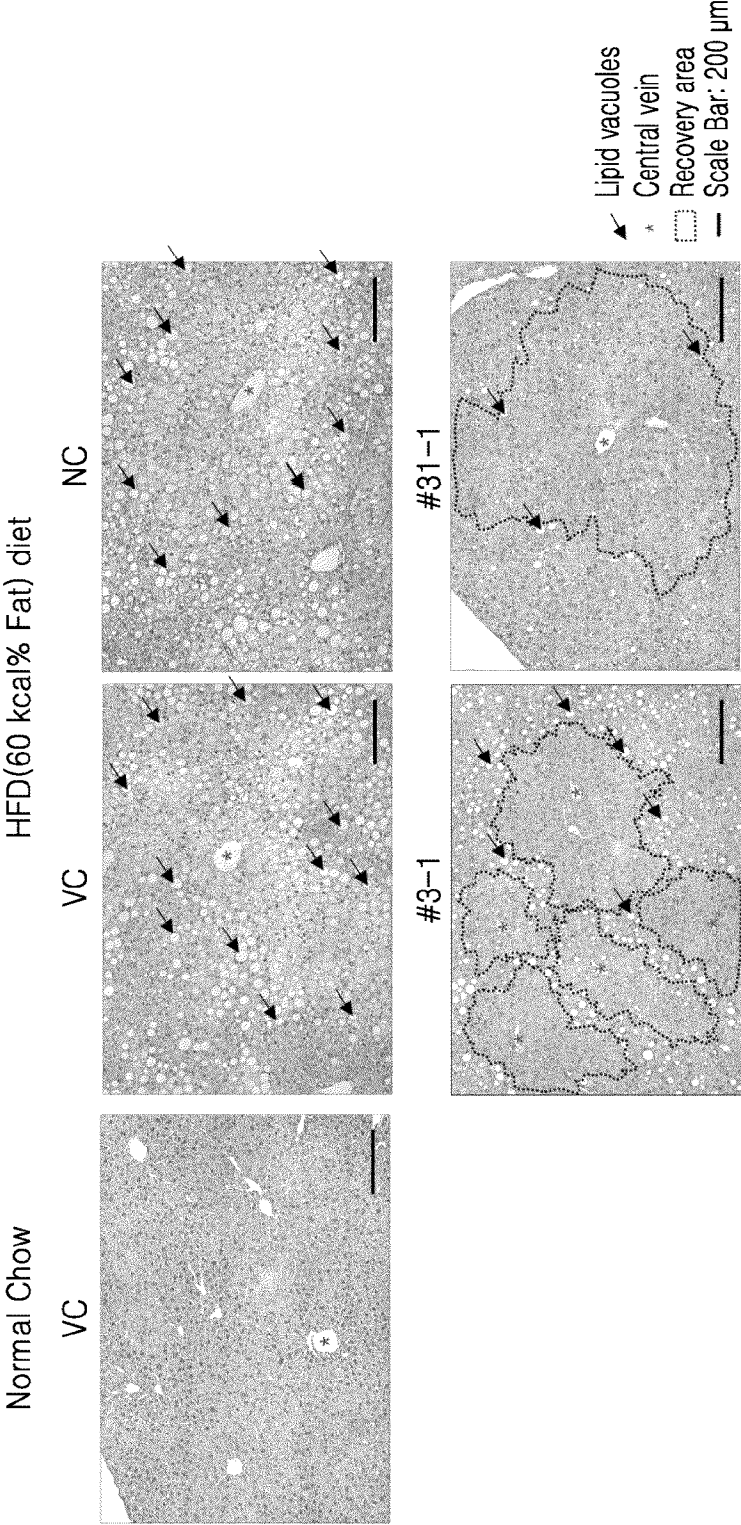
[도3]



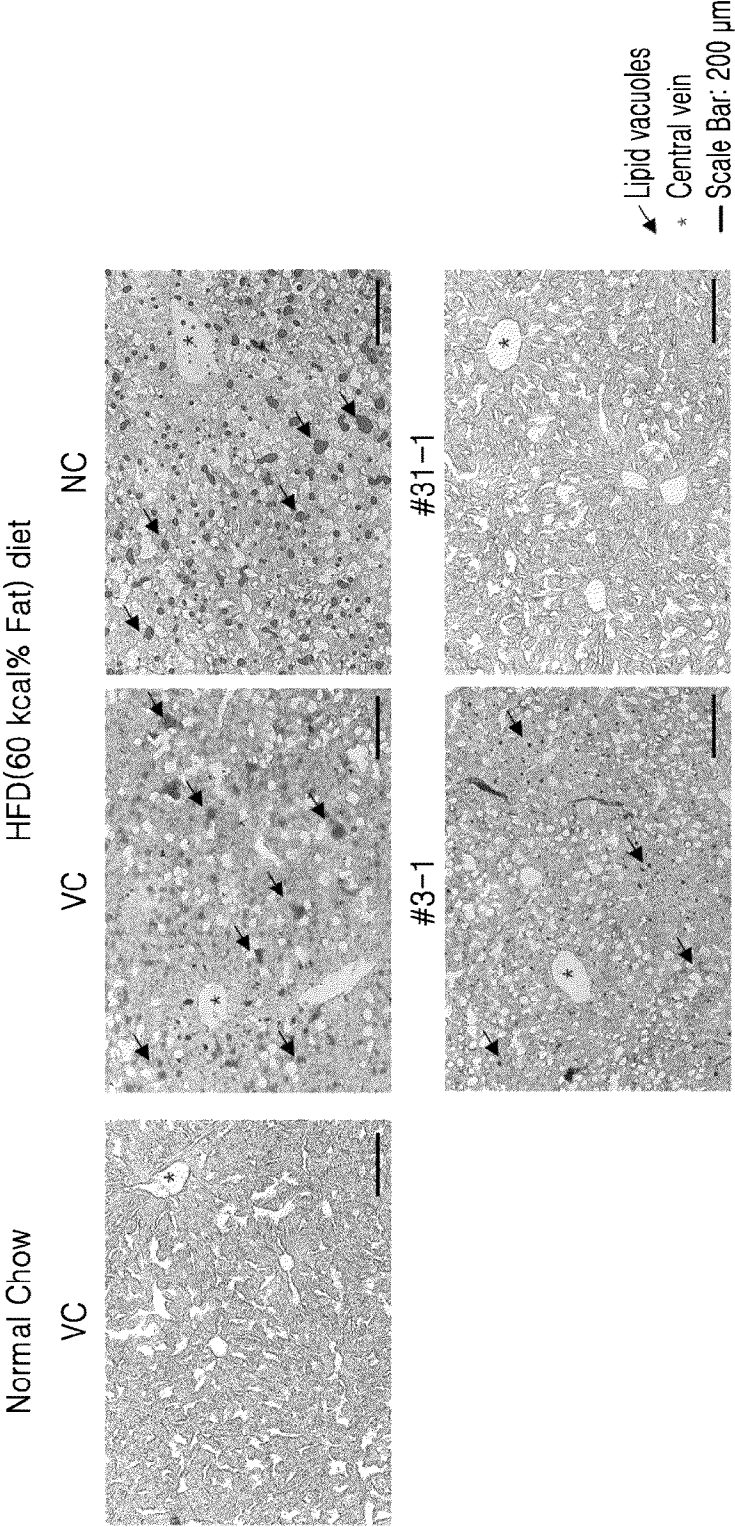
[도4]



[도5]

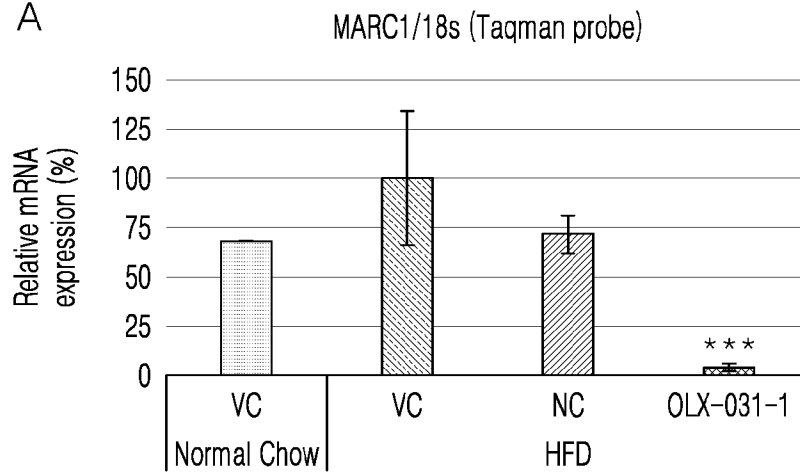


[도6]

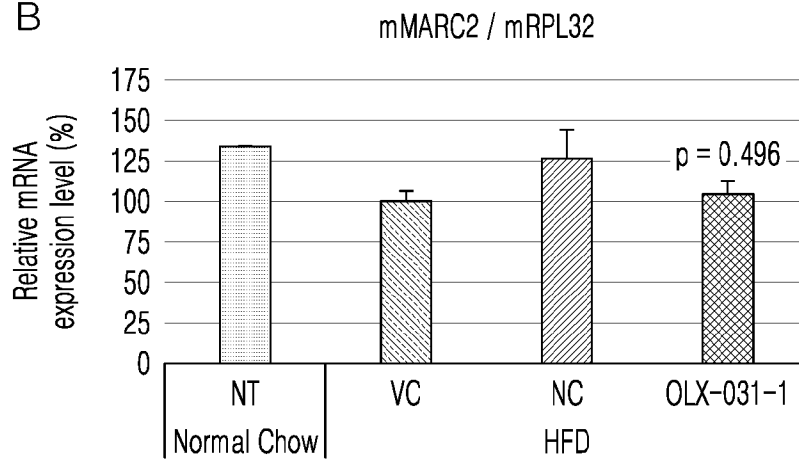


[도7]

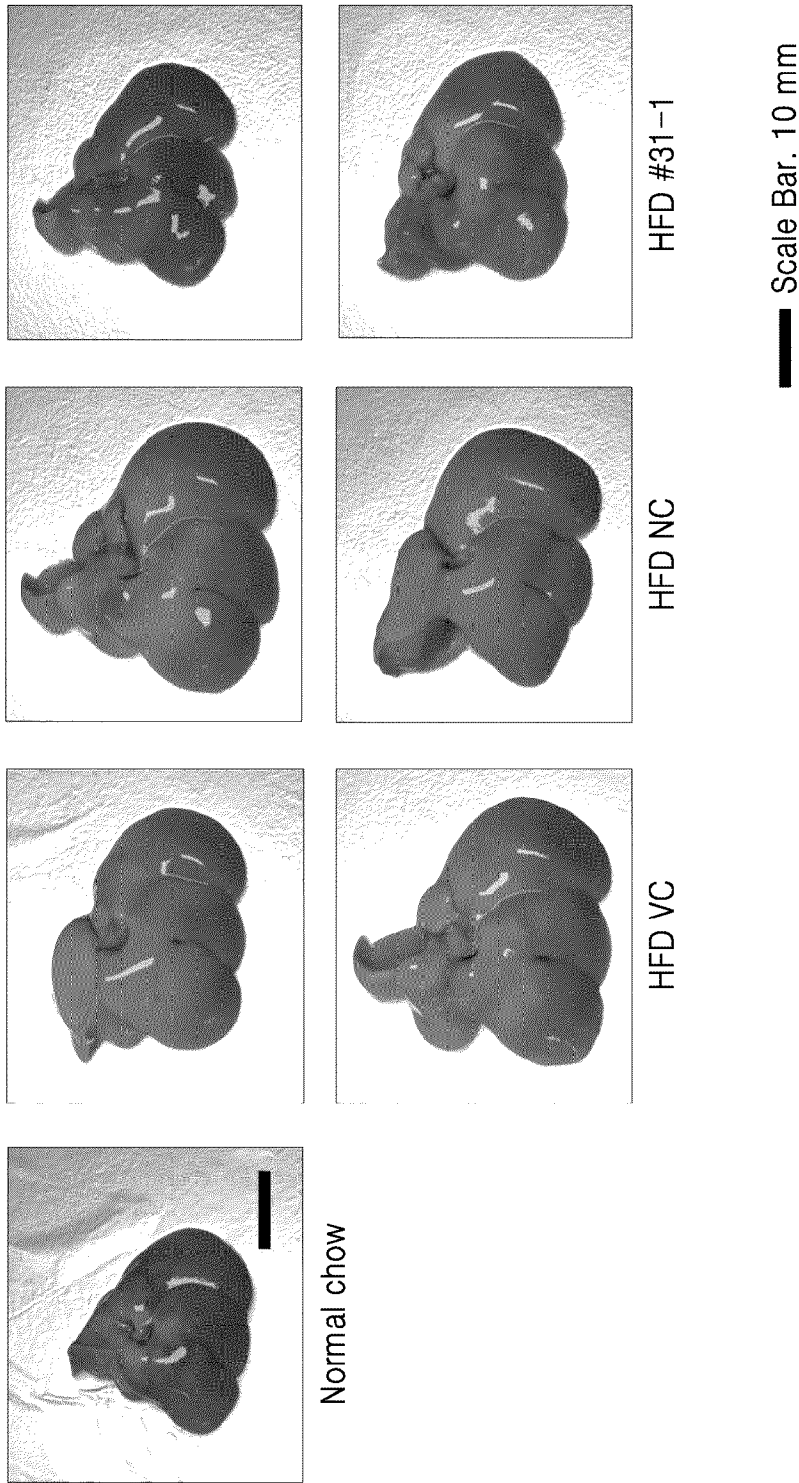
A



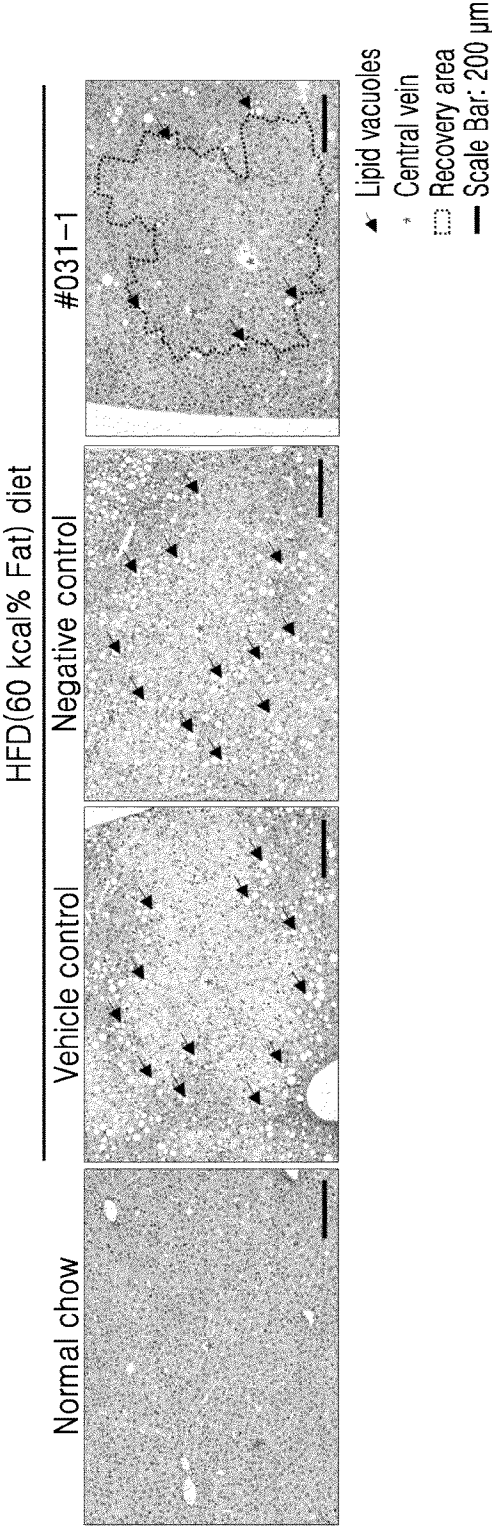
B



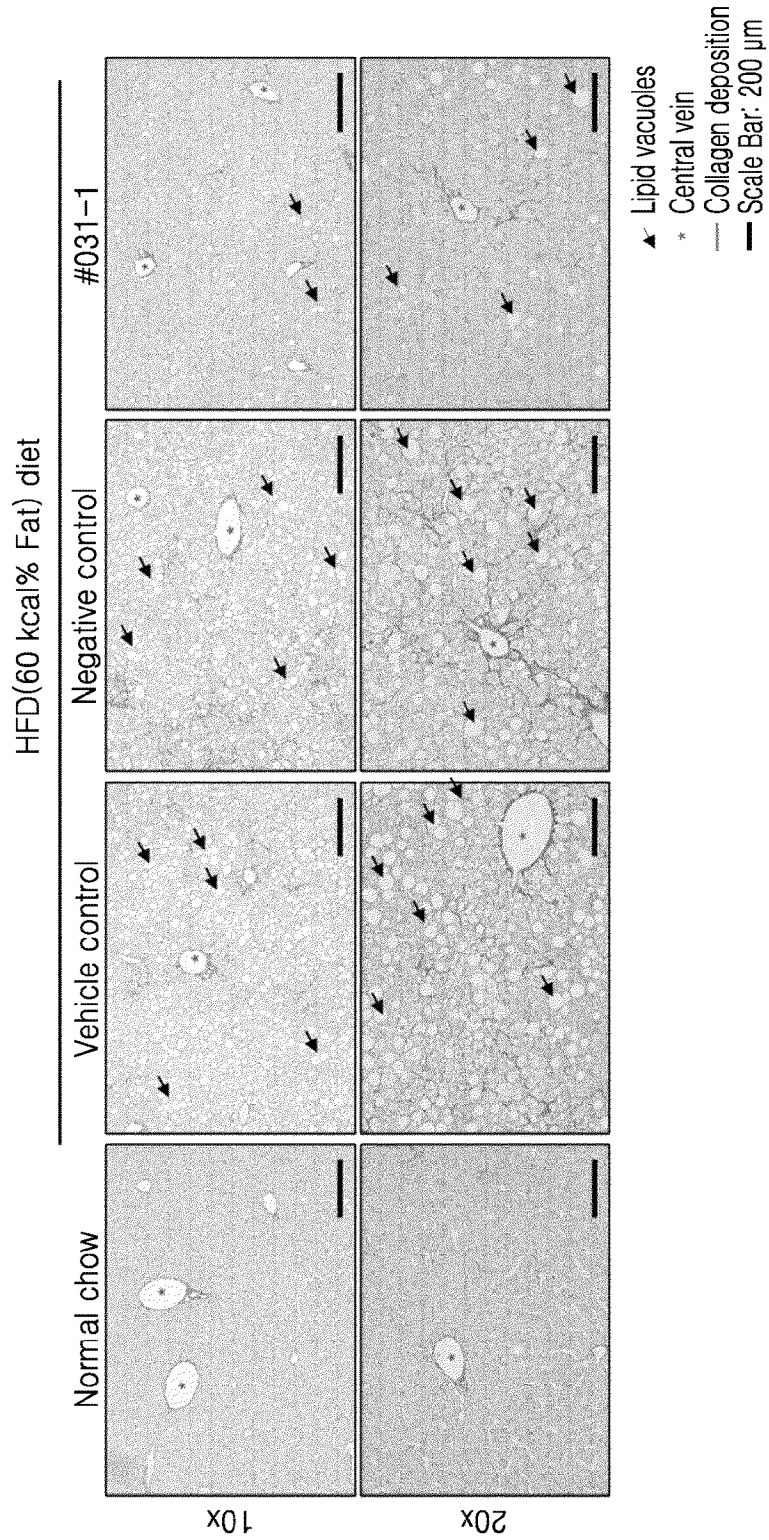
[도8]



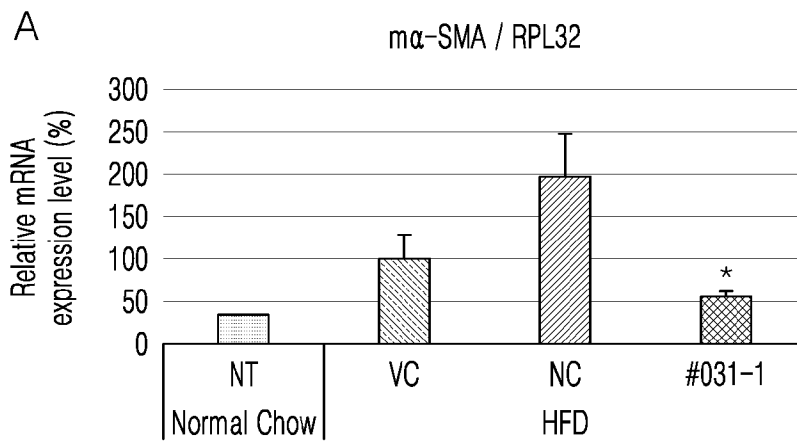
[도9]



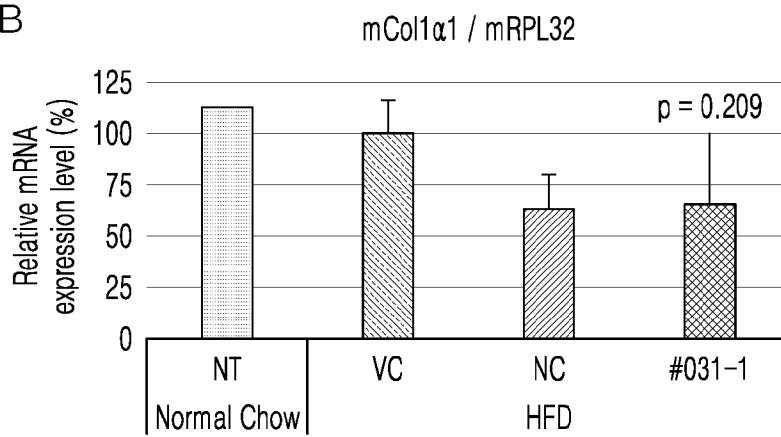
[도10]



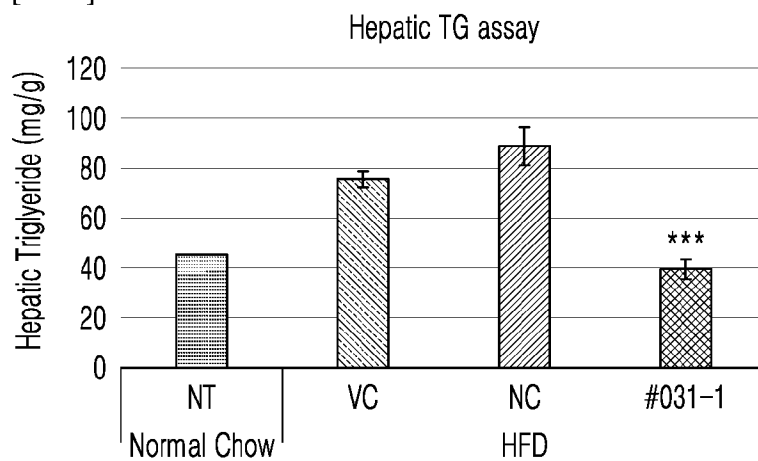
[도11]



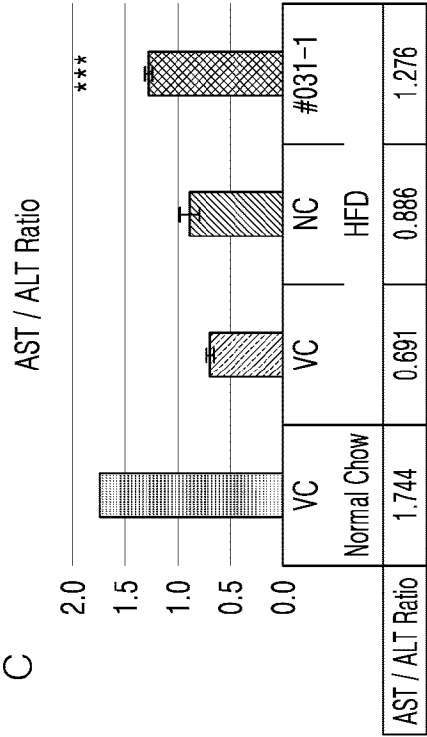
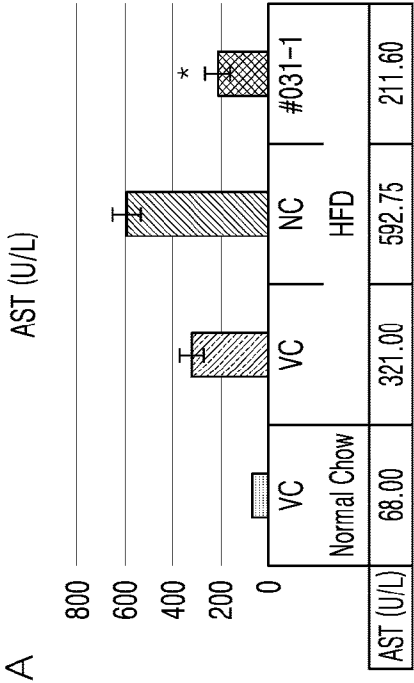
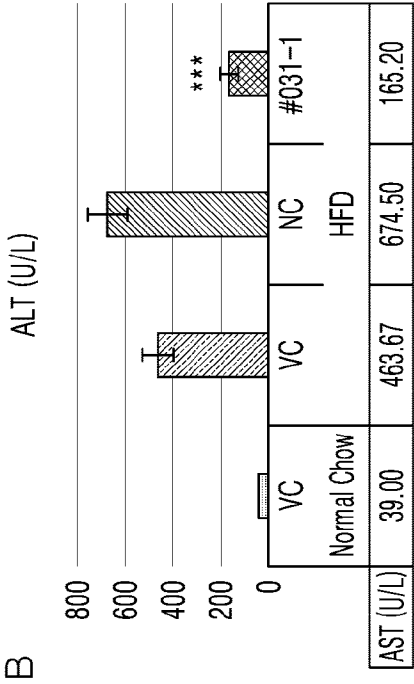
B



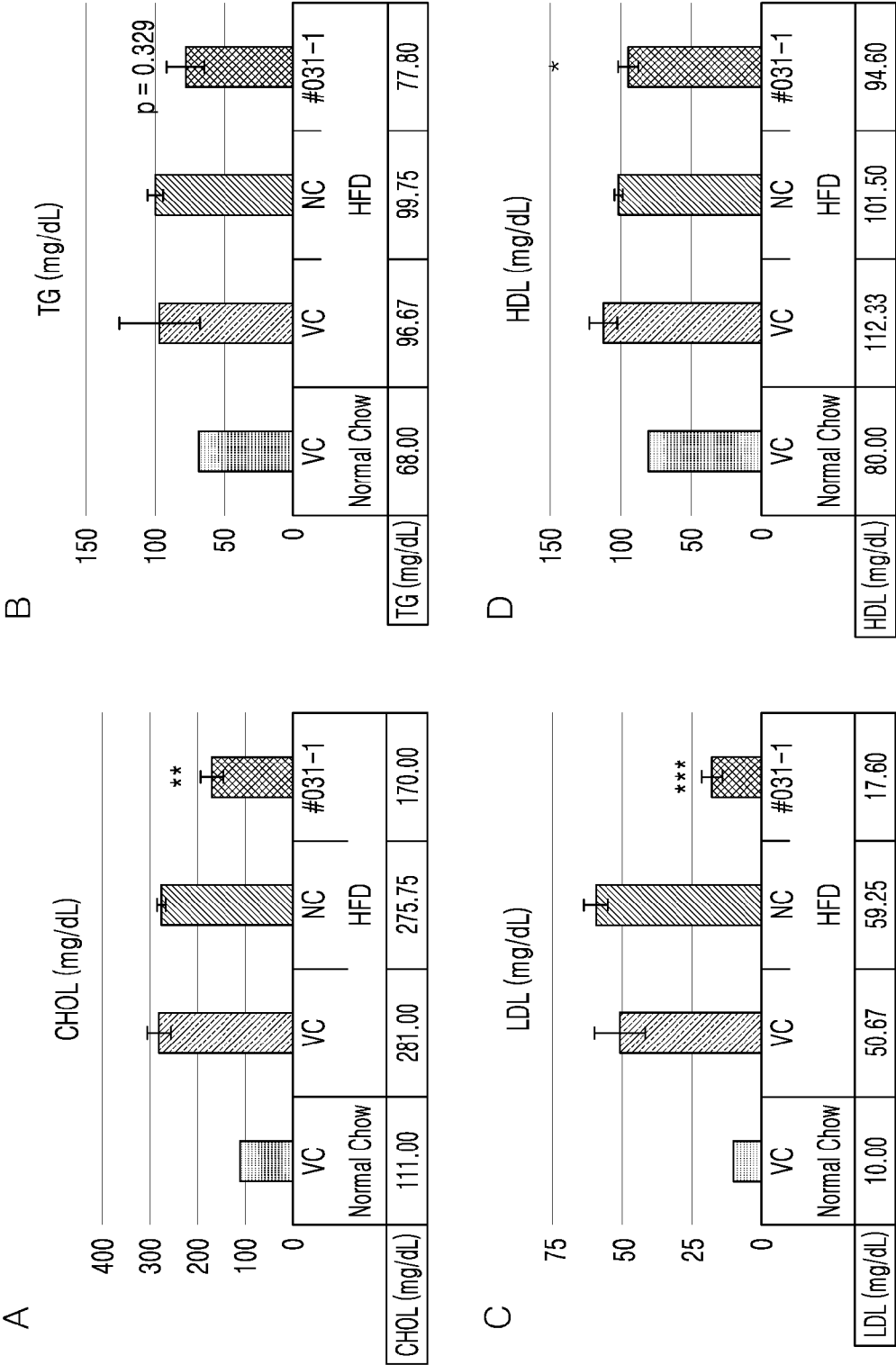
[도12]



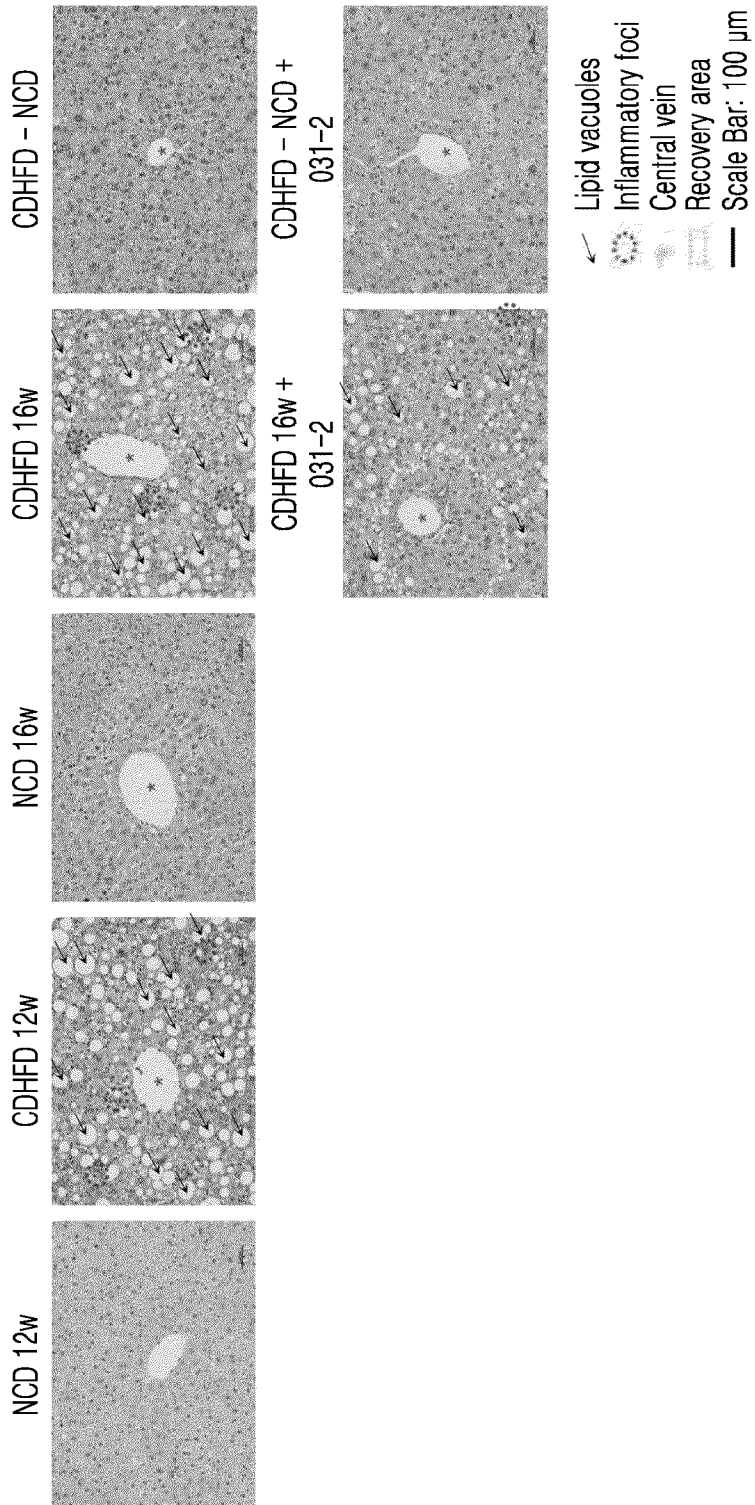
[도13]



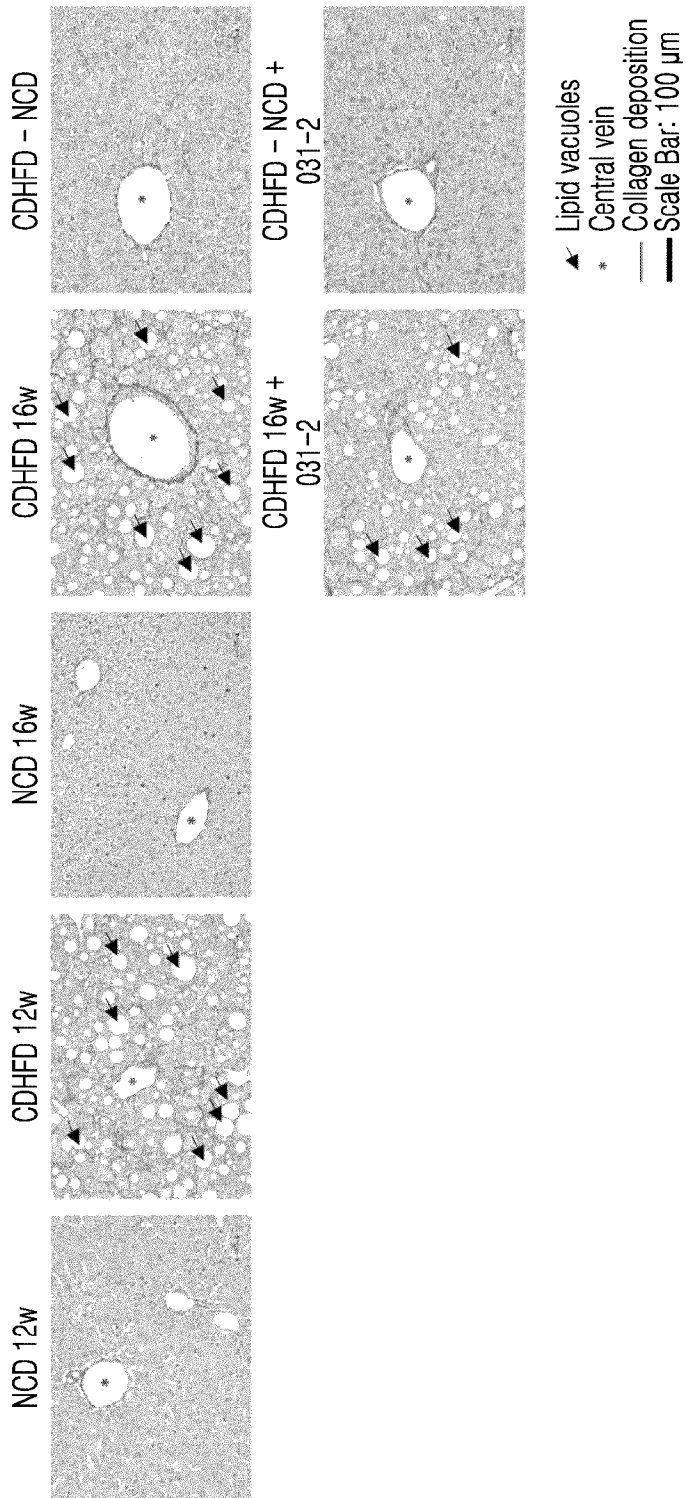
[도 14]



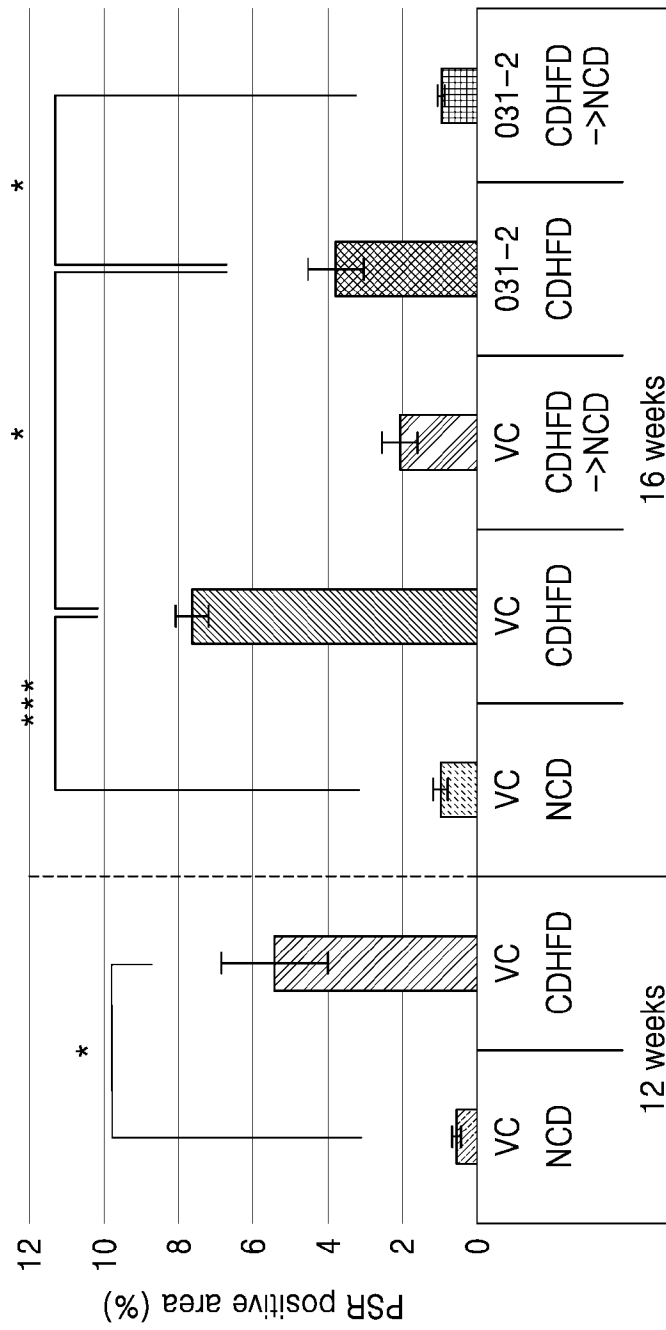
[도 15]



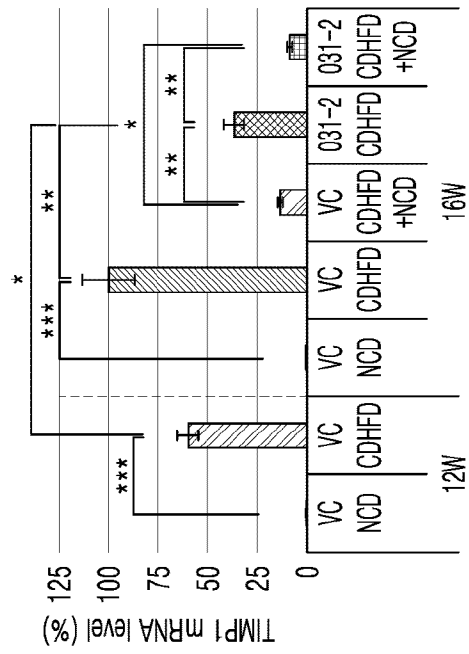
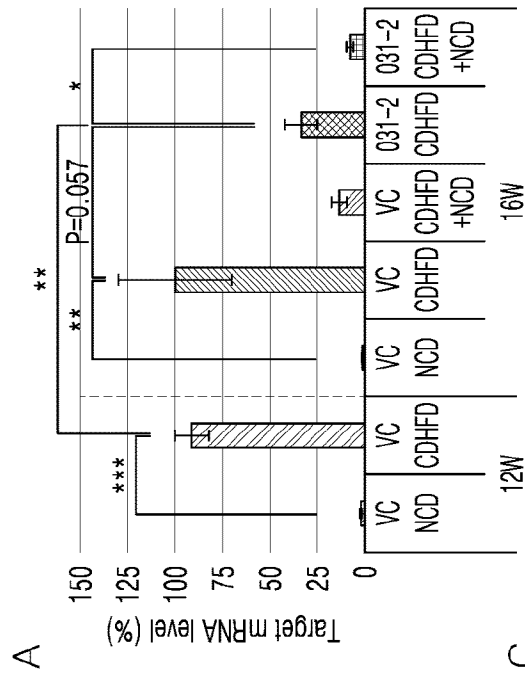
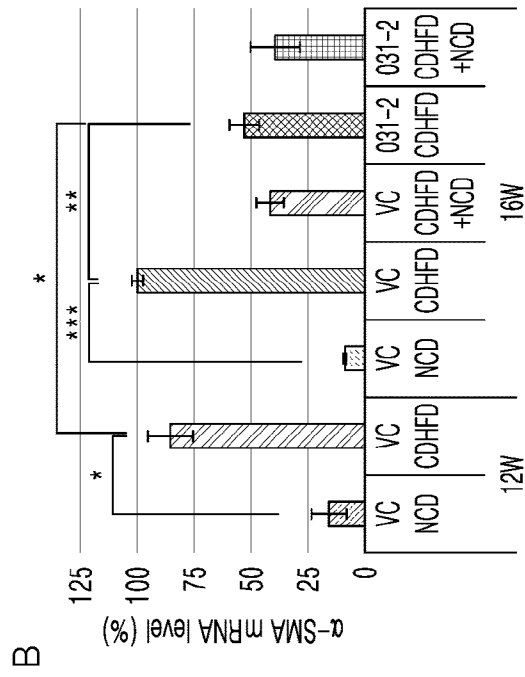
[도 16]



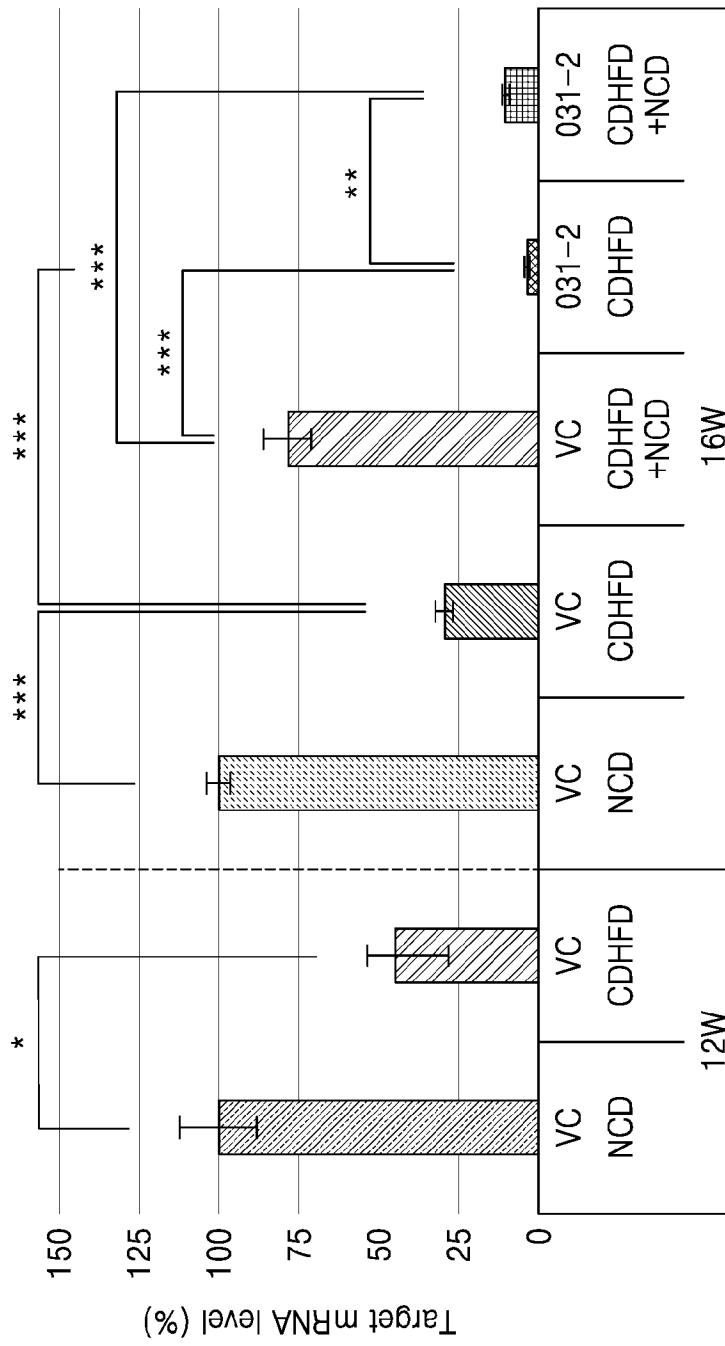
[도17]



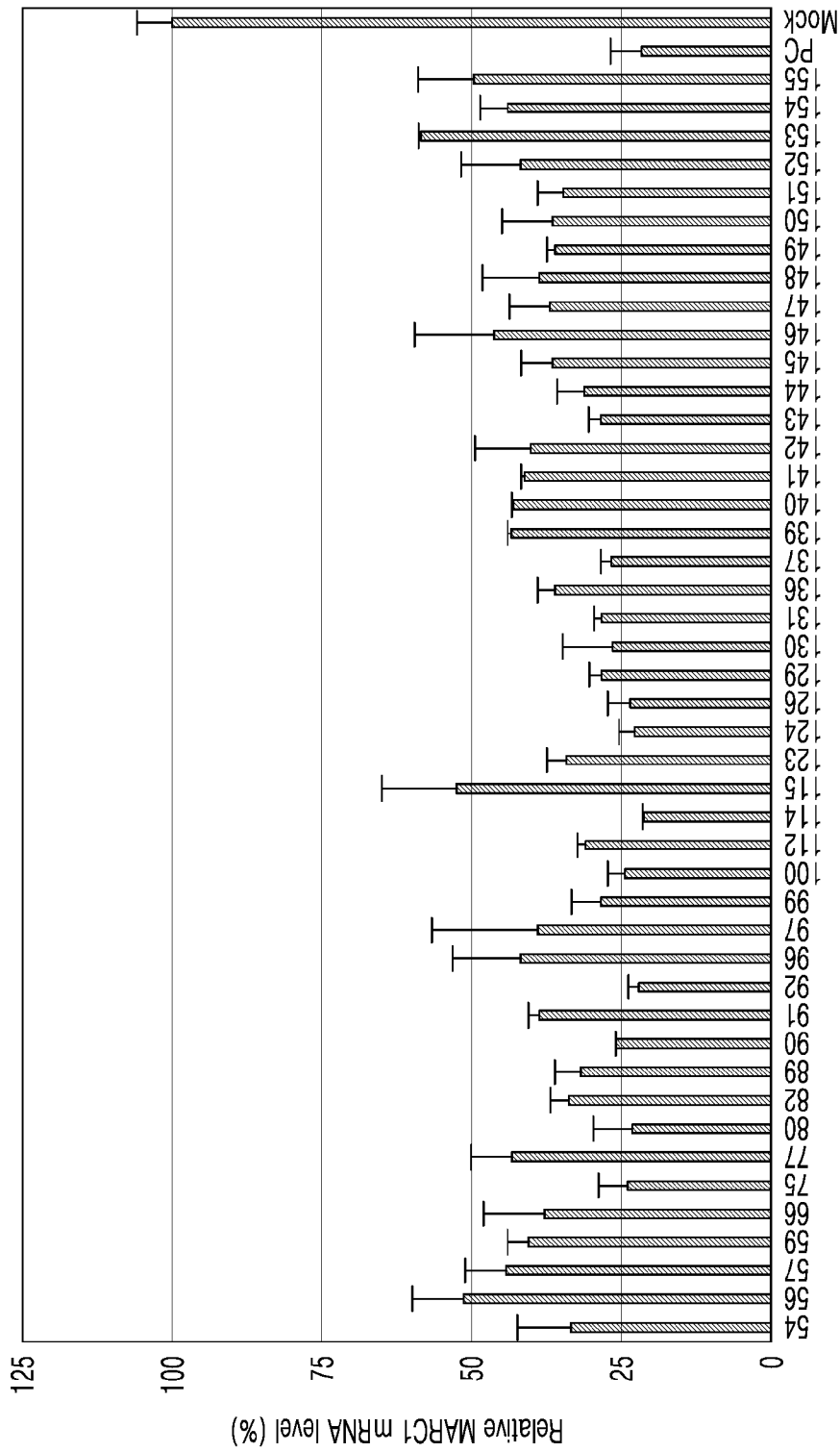
[도18]



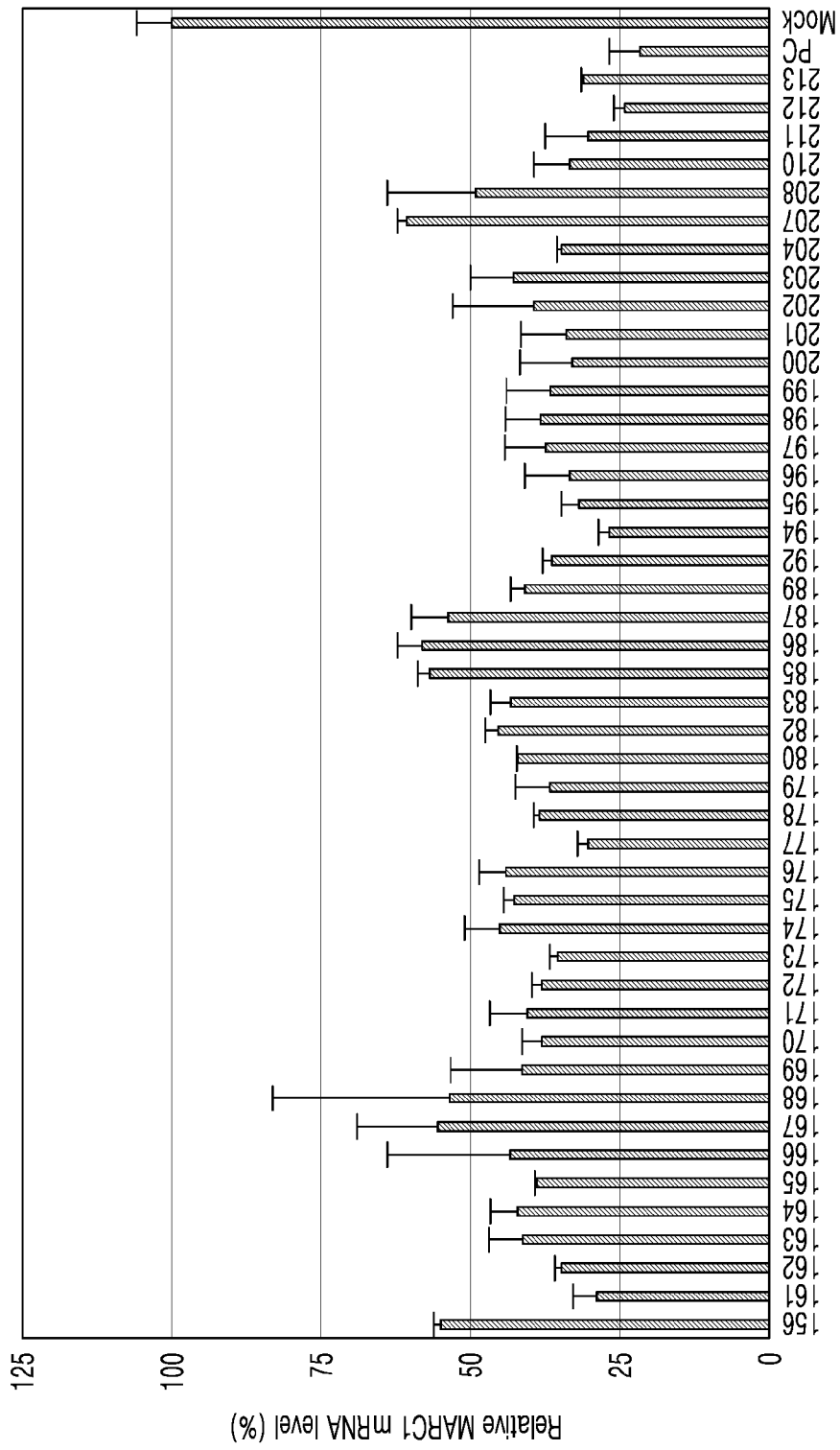
[도19]



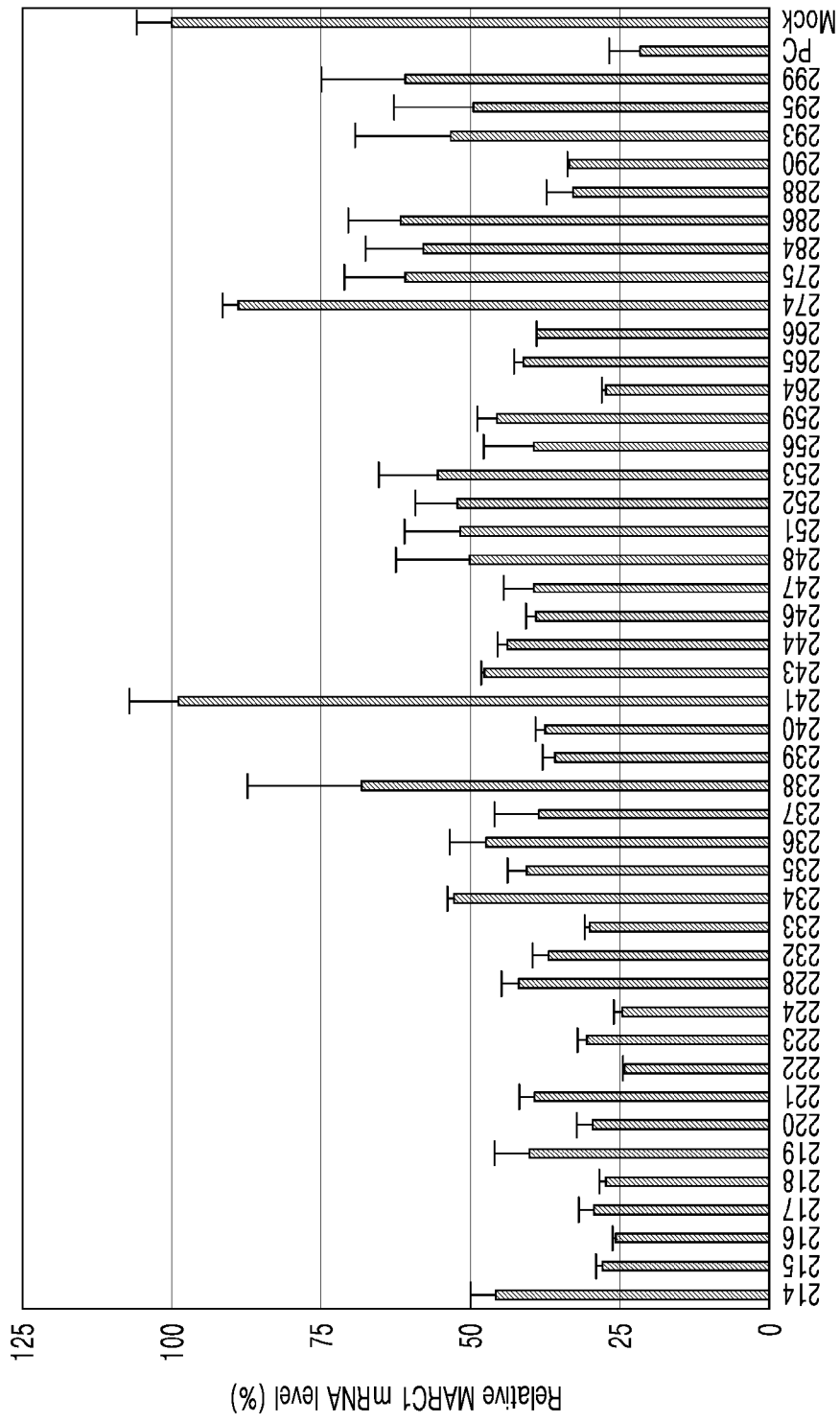
[도20a]



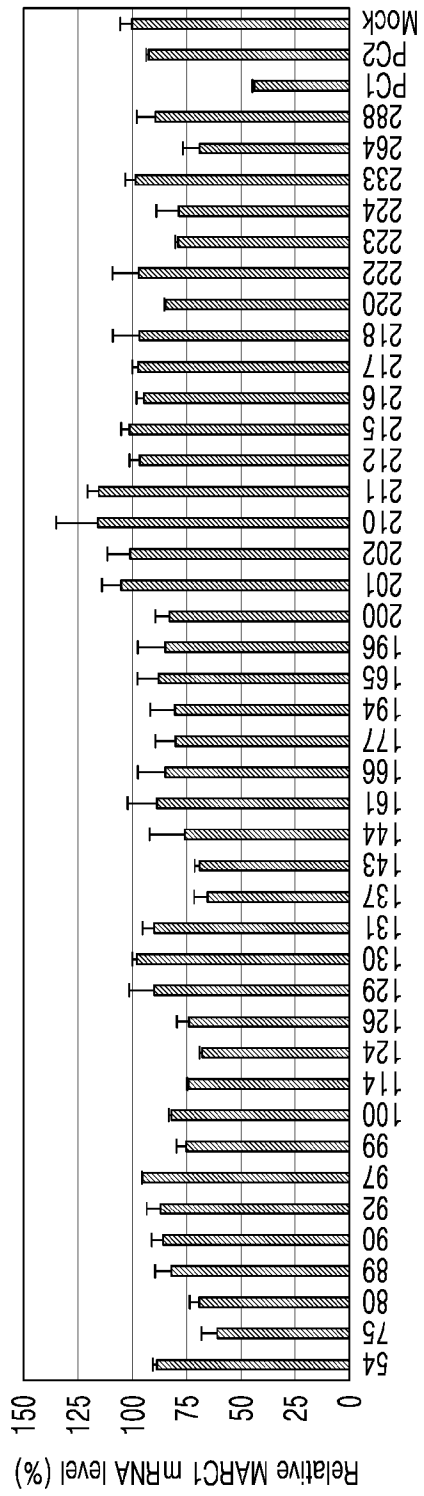
[도20b]



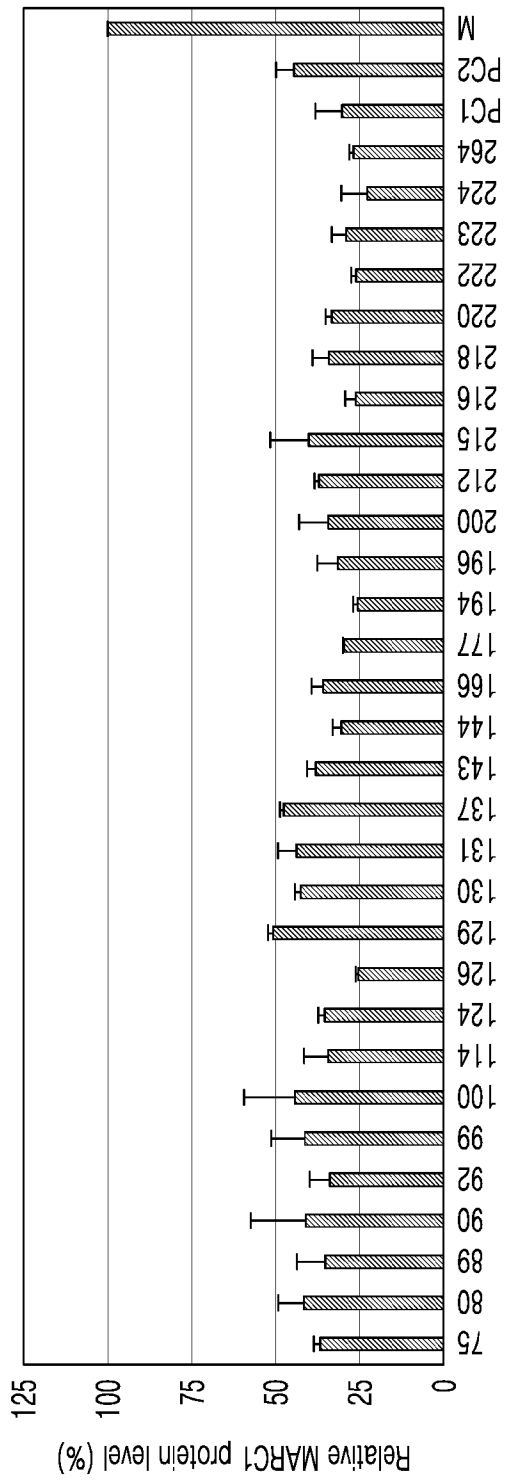
[도20c]



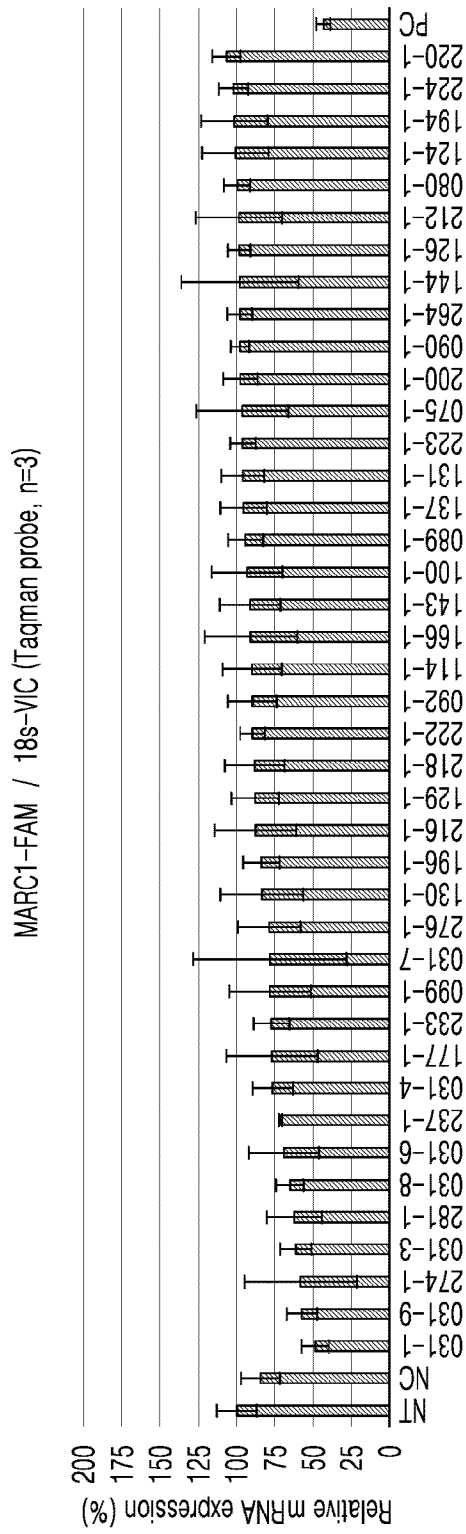
[도21]



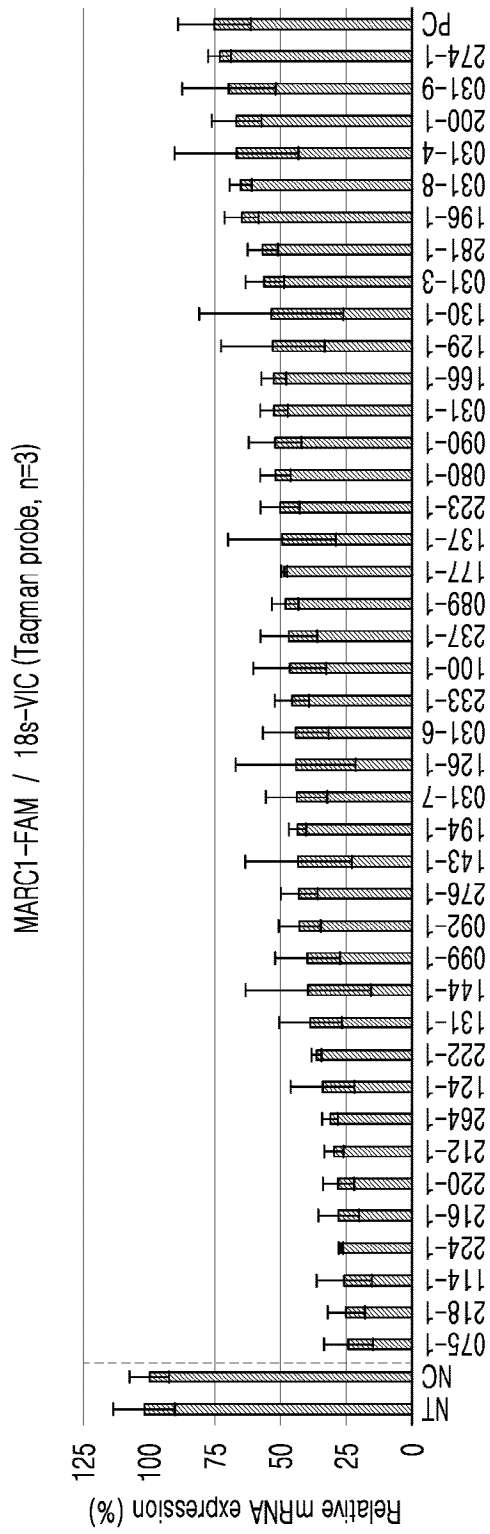
[도22]



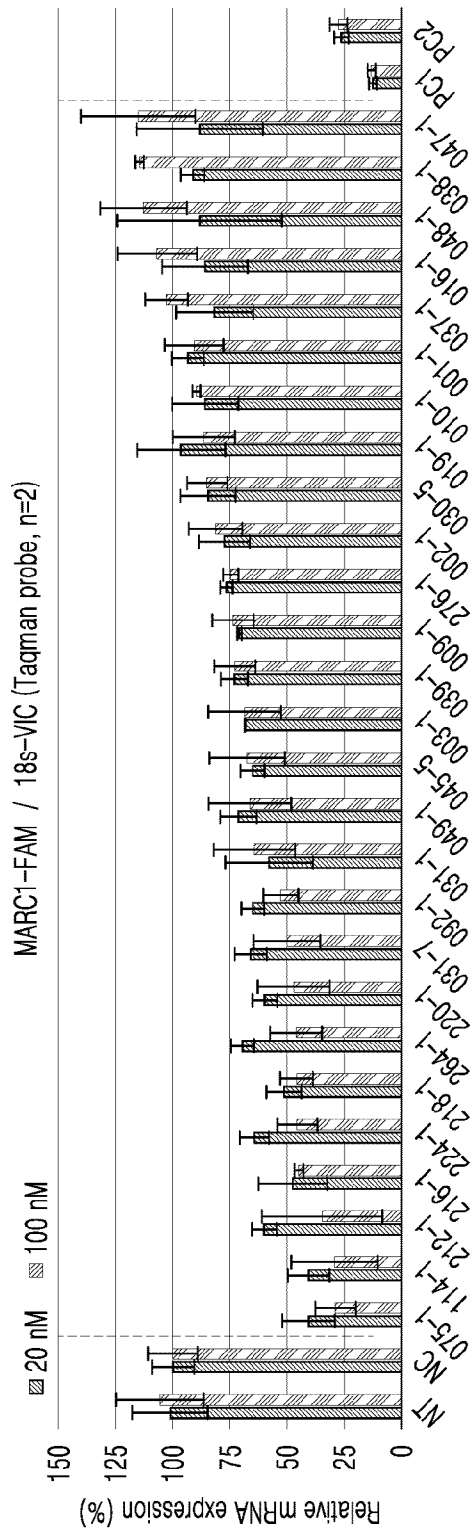
[도23]



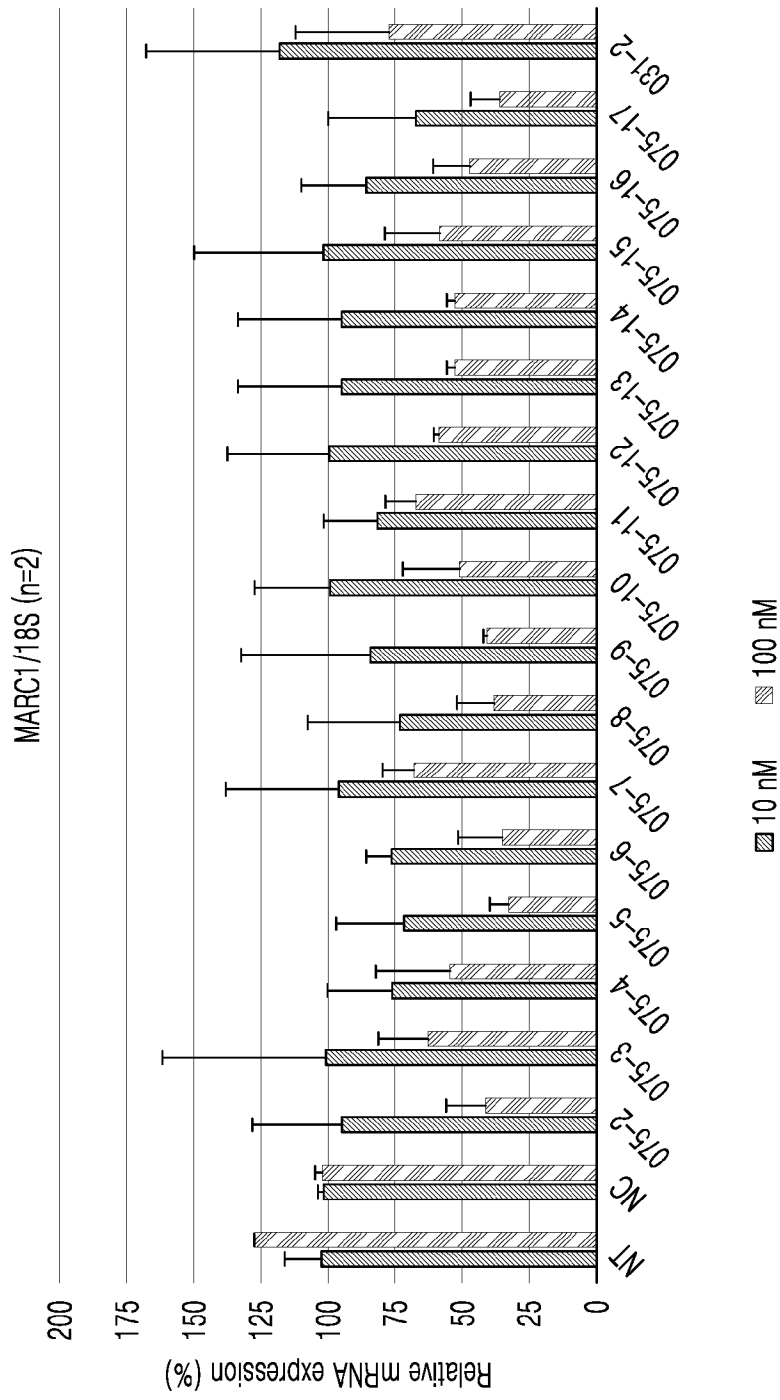
[도24]



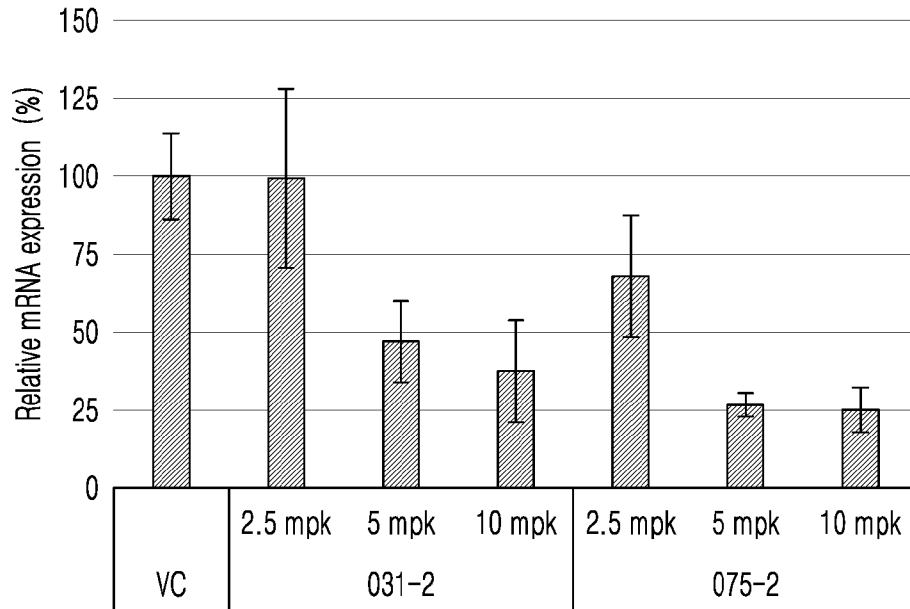
[도25]



[도26]

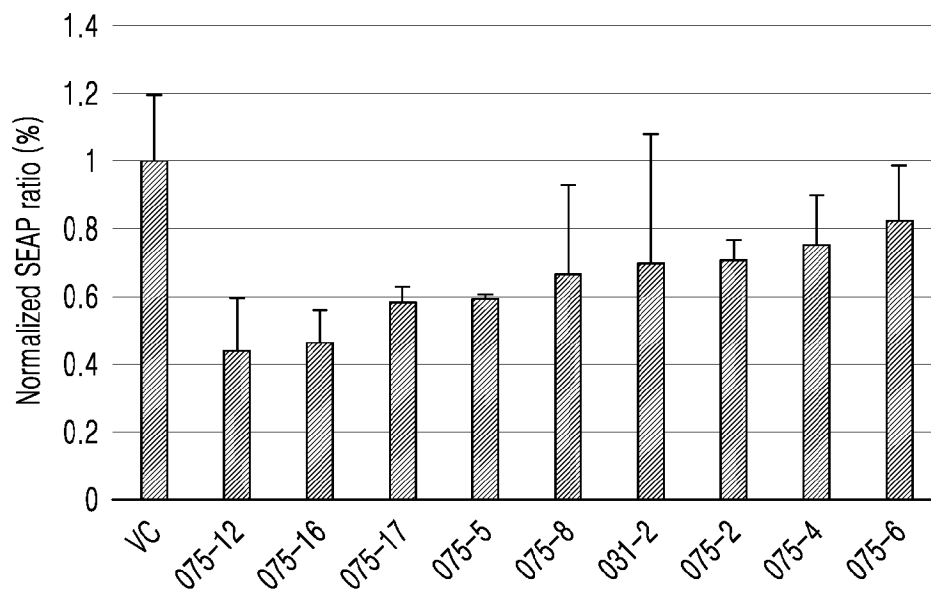


[도27]



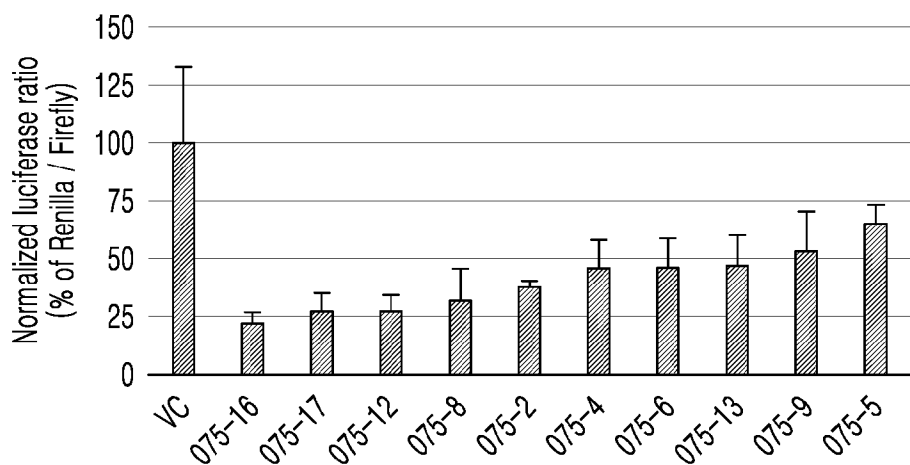
[도28]

Human MARC1 (n=3~4)



[도29]

Human MARC1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/009984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113(2010.01)i; C07H 19/048(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113(2010.01); A61K 38/28(2006.01); A61P 3/10(2006.01); C07H 19/056(2006.01); C12N 15/11(2006.01); G01N 33/68(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: Mitochondrial amidoxime reducing component 1(MARC1), RNA 간섭(RNA interference; RNAi), 센스 가닥(sense strand), 안티센스 가닥(antisense strand), 비알콜성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021-0038698 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 11 February 2021 (2021-02-11) See claims 1, 6 and 7; paragraphs [0056]-[0091]; and table B.	1,2,5,8-13
Y		16-19,21
A		3,4,6,7,14,15
Y	US 2020-0241005 A1 (VISCIENT BIOSCIENCES, INC.) 30 July 2020 (2020-07-30) See claims 1, 3 and 7.	16-19,21
A	HUDERT, C. A. et al. Variants in MARC1 and HSD17B13 reduce severity of NAFLD in children, perturb phospholipid metabolism, and suppress fibrotic pathways. medRxiv. 2020, inner pp. 1-28 (online publication date: 07 June 2020). See abstract.	1-19,21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 October 2022		Date of mailing of the international search report 19 October 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/009984**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-123410 A1 (AMGEN INC.) 18 June 2020 (2020-06-18) See entire document.	1-19,21
A	WO 2013-166155 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP. et al.) 07 November 2013 (2013-11-07) See entire document.	1-19,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/009984

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/009984

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 20 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/009984

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2021-0038698	A1	11 February 2021	US	10835581	B2	17 November 2020
				US	2019-160154	A1	30 May 2019
				US	2022-062385	A1	03 March 2022
US	2020-0241005	A1	30 July 2020	WO	2020-154567	A1	30 July 2020
WO	2020-123410	A1	18 June 2020	AU	2019-395341	A1	17 June 2021
				BR	112021011043	A2	31 August 2021
				CA	3122393	A1	18 June 2020
				CL	2021001490	A1	14 January 2022
				CN	113166759	A	23 July 2021
				EA	202191630	A1	29 November 2021
				EP	3894554	A1	20 October 2021
				IL	283550	A	29 July 2021
				IL	283550	D0	29 July 2021
				JP	2022-511866	A	01 February 2022
				KR	10-2021-0102313	A	19 August 2021
				SG	11202105900	A	29 July 2021
				US	2022-049252	A1	17 February 2022
WO	2013-166155	A1	07 November 2013	AR	090905	A1	17 December 2014
				AU	2013-256341	A1	07 November 2013
				CA	2871150	A1	07 November 2013
				EP	2844662	A1	11 March 2015
				EP	2844662	B1	16 September 2020
				JP	2015-520743	A	23 July 2015
				JP	2018-083816	A	31 May 2018
				JP	6259448	B2	10 January 2018
				TW	201408325	A	01 March 2014
				TW	I629996	B	21 July 2018
				US	2017-306324	A1	26 October 2017
				US	2018-079769	A1	22 March 2018
				US	2019-153016	A1	23 May 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i; C07H 19/048(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113(2010.01); A61K 38/28(2006.01); A61P 3/10(2006.01); C07H 19/056(2006.01); C12N 15/11(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Mitochondrial amidoxime reducing component 1(MARC1), RNA 간섭(RNA interference; RNAi), 센스 가닥(sense strand), 안티센스 가닥(antisense strand), 비알콜성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2021-0038698 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 2021.02.11 청구항 1, 6, 7; 단락 [0056]-[0091]; 및 표 B	1,2,5,8-13
Y		16-19,21
A		3,4,6,7,14,15
Y	US 2020-0241005 A1 (VISCIENT BIOSCIENCES, INC.) 2020.07.30 청구항 1, 3, 7	16-19,21
A	HUDERT, C. A. 등, Variants in MARC1 and HSD17B13 reduce severity of NAFLD in children, perturb phospholipid metabolism, and suppress fibrotic pathways, medRxiv, 2020년, 내부페이지 1-28(온라인 공개일: 2020.06.07.) 요약	1-19,21
A	WO 2020-123410 A1 (AMGEN INC.) 2020.06.18 문헌 전체	1-19,21
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년10월19일(19.10.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년10월19일(19.10.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2013-166155 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP. 등) 2013.11.07 문헌 전체	1-19,21

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **20**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 20은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2021-0038698 A1	2021/02/11	US 10835581 B2	2020/11/17
		US 2019-160154 A1	2019/05/30
		US 2022-062385 A1	2022/03/03
US 2020-0241005 A1	2020/07/30	WO 2020-154567 A1	2020/07/30
WO 2020-123410 A1	2020/06/18	AU 2019-395341 A1	2021/06/17
		BR 112021011043 A2	2021/08/31
		CA 3122393 A1	2020/06/18
		CL 2021001490 A1	2022/01/14
		CN 113166759 A	2021/07/23
		EA 202191630 A1	2021/11/29
		EP 3894554 A1	2021/10/20
		IL 283550 A	2021/07/29
		IL 283550 D0	2021/07/29
		JP 2022-511866 A	2022/02/01
		KR 10-2021-0102313 A	2021/08/19
		SG 11202105900 A	2021/07/29
		US 2022-049252 A1	2022/02/17
WO 2013-166155 A1	2013/11/07	AR 090905 A1	2014/12/17
		AU 2013-256341 A1	2013/11/07
		CA 2871150 A1	2013/11/07
		EP 2844662 A1	2015/03/11
		EP 2844662 B1	2020/09/16
		JP 2015-520743 A	2015/07/23
		JP 2018-083816 A	2018/05/31
		JP 6259448 B2	2018/01/10
		TW 201408325 A	2014/03/01
		TW I629996 B	2018/07/21
		US 2017-306324 A1	2017/10/26
		US 2018-079769 A1	2018/03/22
		US 2019-153016 A1	2019/05/23