



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0006743

(43) 공개일자 2015년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0080580

(22) 출원일자 2013년07월09일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

(주)바이오니아

대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동)

주식회사 사노파-아벤티스 코리아

서울특별시 서초구 반포대로 235 (반포동, 반포동
오피스빌딩1)

(72) 발명자

채제욱

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 104동 201호 (전민동, 엑스포아파트)

윤평오

대전광역시 유성구 구죽로 25, 306동 1205호 (송강동, 송강그린아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 31 항

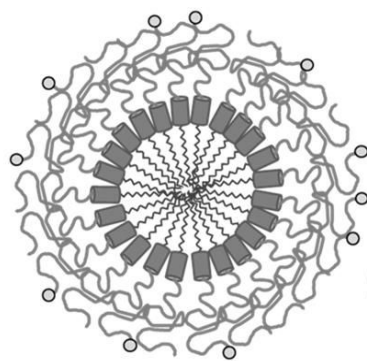
(54) 발명의 명칭 간암 연관 유전자 특이적 siRNA, 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 간암 연관 유전자 특이적 siRNA 및 이를 포함하는 고효율 이중나선 올리고 RNA 구조체에 관한 것으로, 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체는 세포 내로 효율적으로 전달되도록 하기 위하여 이중나선 RNA(siRNA)의 양 말단에 친수성 물질 및 소수성 물질을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합을 이용하여 접합된 형태의 구조를 가지며, 수용액에서 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체들의 소수성 상호작용에 의해 나노입자 형태로 전환될 수 있다. 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체에 포함된 siRNA는 간암 연관 유전자, 특히 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA인 것이 바람직하다.

또한 본 발명은 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법 및 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암, 특히 간암을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



Double stranded oligo RNA molecules
Hydrophobic compound
siRNA
Hydrophilic compound
Target specific ligand

(72) 발명자

김한나

전라북도 전주시 완산구 거마평로 109, 103동 130
2호 (효자동1가, 효자제일아파트)

박한오

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 208동 601호 (전
민동, 엑스포아파트)

한보람

경기도 부천시 소사구 범안로95번길 32, 310동
1204호 (범박동, 부천범박힐스테이트3단지아파트)

고영호

서울특별시 강서구 허준로 47, 206동 606호(
가양동, 성지아파트)

최기은

경기도 용인시 처인구 백옥대로1402번길 15-11,
105동 503호 (유방동, 일봉빌라)

김재은

서울특별시 성북구 북악산로 844, 102동 503호 (돈
암동, 브라운스톤 돈암 아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 300에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥(sense strand)과 이에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥으로 포함하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA.

청구항 2

제1항에 있어서,

siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥은 19 내지 31개의 뉴클레오타이드로 이루어진 것을 특징으로 하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA.

청구항 3

제 1항에 있어서,

서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 103, 107, 108, 112, 116, 117, 118, 121, 122, 201, 202, 203 및 204번으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥과 이에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항에 있어서,

siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥은 하나 이상의 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것을 특징으로 하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 화학적 변형은

뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(메틸), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl), -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형;

뉴클레오타이드 내 당(sugar) 구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형;

뉴클레오타이드결합의 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate), 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형;

PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형;

에서 선택된 하나 이상의 변형임을 특징으로 하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

siRNA의 안티센스 가닥의 5' 말단에 하나 이상의 인산기(phosphate group(s))가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA.

청구항 7

하기 구조식 (1)의 구조를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

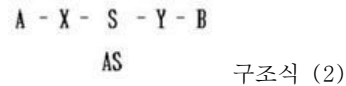
A-X-R-Y-B 구조식 (1)

상기 구조식 (1)에서 A는 친수성 물질, B는 소수성 물질, X 및 Y는 각각 독립적으로 단순 공유결합 또는 링커가 매개된 공유결합을 의미하며, R은 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA를 의미한다.

청구항 8

제7항에 있어서,

하기 구조식 (2)의 구조를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

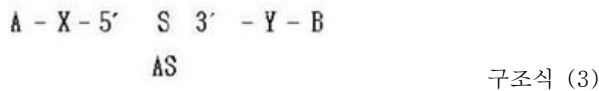


상기 구조식 (2)에서, S는 제7항에 따른 siRNA의 센스가닥, AS는 안티센스 가닥을 의미하며, A, B, X 및 Y는 제7항에서의 정의와 동일하다.

청구항 9

제8항에 있어서,

하기 구조식 (3)의 구조를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.:



상기 구조식 (3)에서, A, B, X, Y, S 및 AS는 제8항에서의 정의와 동일하며, 5' 및 3' 은 siRNA 센스가닥의 5' 말단 및 3' 말단을 의미한다.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 siRNA임을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

친수성 물질의 분자량은 200 내지 10,000 임을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 12

제11항에 있어서,

친수성 물질은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐피롤리돈 및 폴리옥사졸린으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 임을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 13

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소수성 물질의 분자량은 250 내지 1,000인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 14

제13항에 있어서,

소수성 물질은 스테로이드(steroid) 유도체, 글리세라이드(glyceride) 유도체, 글리세롤 에테르(glycerol ether), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), C₁₂ 내지 C₅₀의 불포화 또는 포화탄화수소(hydrocarbon), 디아실포스파티딜콜린(diacylphosphatidylcholine), 지방산(fatty acid), 인지질(phospholipid) 및 리포폴리아

민(lipopolyamine)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 스테로이드(steroid) 유도체는 콜레스테롤, 콜리스탄올, 콜산, 콜리스테릴 포르메이트, 코테스타닐 포르메이트 및 콜리스타닐아민으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 글리세라이드 유도체는 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체

청구항 17

제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 X 및 Y로 표시되는 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 비분해성 결합은 아마이드 결합 또는 인산화 결합인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 분해성 결합은 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 또는 효소 분해성 결합인 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 20

제7항 내지 16항 중 어느 한 항에 있어서,

친수성 물질에 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis, RME)을 통해 타겟 세포 내재화(internalization)를 증진시키는 수용체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 리간드(ligand)가 추가적으로 결합된 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 리간드는 타겟 수용체 특이적 항체나 앵타머, 펩타이드, 엽산(folate), N-아세틸 갈락토사민(N-acetyl Galactosamine, NAG), 포도당(glucose) 및 만노스(mannose) 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중나선 올리고 RNA 구조체.

청구항 22

제7항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 나노입자(nanoparticle).

청구항 23

제22항에 있어서,

서로 다른 서열을 포함하는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 혼합되어 구성되는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 24

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 siRNA, 제7항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체, 또는 제22항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

암의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 암은 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 유방암, 난소암, 신장암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 간암은 HCC(hepatocellular carcinoma) 임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 동결건조된 형태의 제형.

청구항 29

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 siRNA, 제7항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체, 제22항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 나노입자, 또는 제24항 내지 제28항에 따른 조성물 또는 제형을 예방 또는 치료를 요하는 개체에게 투여하는 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 암은 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 유방암, 난소암, 신장암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 간암은 HCC(hepatocellular carcinoma) 임을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 간암 연관 유전자 특이적 siRNA 및 이를 포함하는 고효율 이중나선 올리고 RNA 구조체에 관한 것으로, 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체는 세포 내로 효율적으로 전달되도록 하기 위하여 이중나선 RNA(siRNA)의 양 말단에 친수성 물질 및 소수성 물질을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합을 이용하여 접합된 형태의 구조를 가지며, 수용액에서 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체들의 소수성 상호작용에 의해 나노입자 형태로 전환될 수 있다. 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체에 포함된 siRNA는 간암 연관 유전자, 특히 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적인 siRNA인 것이 바람직하다.

[0002]

또한 본 발명은 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법 및 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암, 특히 간암을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 유전자의 발현을 억제하는 기술은 질병치료를 위한 치료제 개발 및 표적 검증에서 중요한 도구이다. 이 기술 중, 간섭 RNA(RNA interference, 이하 'RNAi' 라고 한다)는 그 역할이 발견된 이후로, 다양한 종류의 포유동물 세포(mammalian cell)에서 서열 특이적 mRNA에 작용한다는 사실이 밝혀졌다 (Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. J Mol Med (2005) 83: 764-773). 긴 사슬의 RNA 이중가닥이 세포로 전달되면, 전달된 RNA 이중가닥은 Dicer라는 엔도뉴클라아제(endonuclease)에 의하여 21 내지 23 이중가닥(base pair, bp)으로 프로세싱된 짧은 간섭 RNA (small interfering RNA, 이하 'siRNA' 라고 한다)로 변환되며, siRNA 는 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합하여 가이드(안티센스) 가닥이 타겟 mRNA를 인식하여 분해하는 과정을 통해 타겟 유전자의 발현을 서열 특이적으로 저해한다 (NUCLEIC-ACID THERAPEUTICS: BASIC PRINCIPLES AND RECENT APPLICATIONS. Nature Reviews Drug Discovery. 2002. 1, 503-514).
- [0004] 베르트랑(Bertrand) 연구진에 따르면 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA 가 안티센스 올리고뉴클레오티드 (Antisense oligonucleotide, ASO)에 비하여 생체 내/외(*in vitro* 및 *in vivo*)에서 mRNA 발현의 저해효과가 뛰어나고, 해당 효과가 오랫동안 지속되는 효과를 포함하는 것으로 밝혀졌다(Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. 296: 1000-1004). 또한 siRNA의 작용 기작은 타겟 mRNA와 상보적으로 결합하여 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 조절하기 때문에, 기존의 항체 기반 의약품이나 화합물질 (small molecule drug)에 비하여 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대될 수 있다는 장점을 가진다(Progress Towards *In Vivo* Use of siRNAs. MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4):664-670).
- [0005] siRNA 의 뛰어난 효과 및 다양한 사용범위에도 불구하고, siRNA가 치료제로 개발되기 위해서는 체내에서의 siRNA의 안정성(stability) 개선과 세포 전달 효율 개선을 통해 siRNA가 타겟 세포에 효과적으로 전달되어야 한다(Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. Drug Discov Today. 2006 Jan; 11(1-2):67-73).
- [0006] 상기 문제를 해결하기 위하여, 체내 안정성 개선을 위하여 siRNA의 일부 뉴클레오티드 또는 골격(backbone)을 핵산분해효소 저항성을 가지도록 변형(modification)하거나 바이러스성 벡터(viral vector), 리포솜 또는 나노입자(nanoparticle) 등의 전달체의 이용 등에 대한 연구가 활발하게 시도되고 있다.
- [0007] 아데노바이러스나 레트로바이러스 등의 바이러스성 벡터를 이용한 전달 시스템은 형질주입 효율(transfection efficacy)이 높지만, 면역원성(immunogenicity) 및 발암성(oncogenicity)이 높다. 반면에 나노입자를 포함하는 비바이러스성(non-viral) 전달 시스템은 바이러스성 전달 시스템에 비하여 세포전달효율은 낮은 편이지만, 생체 내(*in vivo*)에서의 안전성이 높고, 타겟 특이적으로 전달이 가능하며, 내포되어 있는 RNAi 올리고뉴클레오티드를 세포 또는 조직으로 흡수(uptake) 및 내재화(internalization) 등의 개선된 전달 효과가 높을 뿐 아니라, 세포독성 및 면역 유발(immune stimulation)이 거의 없다는 장점을 가지고 있어, 현재는 바이러스성 전달 시스템에 비해 유력한 전달방법으로 평가되어지고 있다 (Nonviral delivery of synthetic siRNA s *in vivo*. J Clin Invest. 2007 December 3; 117(12): 3623-3632).
- [0008] 상기 비바이러스성 전달 시스템 중에서 나노전달체(nanocarrier)를 이용하는 방법은 리포솜, 양이온 고분자 복합체 등의 다양한 고분자를 사용함으로써 나노입자를 형성하고, siRNA를 이러한 나노입자(nanoparticle), 즉 나노전달체(nanocarrier)에 담지하여 세포에 전달하는 형태를 가진다. 나노전달체를 이용하는 방법 중 주로 활용되는 방법은 고분자 나노입자(polymeric nanoparticle), 고분자 미셀(polymer micelle), 리포플렉스(lipoplex) 등이 있는데, 이 중에서 리포플렉스를 이용한 방법은 양이온성 지질로 구성되어 세포의 엔도솜(endosome)의 음이온성 지질과 상호작용하여 엔도솜의 탈 안정화 효과를 유발하여 세포 내로 전달하는 역할을 한다(Proc. Natl. Acad. Sci. 15; 93(21):11493-8, 1996).
- [0009] 또한, siRNA 패신저(passenger; 센스(sense)) 가닥의 말단 부위에 화합물질 등을 연결하여 증진된 약동력학(pharmacokinetics)적 특징을 갖도록 하여 생체 내(*in vivo*)에서 높은 효율을 유도할 수 있다는 것이 알려져 있다(Nature 11; 432(7014):173-8, 2004). 이 때 siRNA 센스(sense; 패신저(passenger)) 또는 안티센스(antisense; 가이드(guide)) 가닥의 말단에 결합된 화합 물질의 성질에 따라 siRNA 의 안정성이 달라진다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)과 같은 고분자 화합물이 접합된 형태의 siRNA 는 양이온성

물질이 존재하는 조건에서 siRNA의 음이온성 인산기와 상호작용하여 복합체를 형성함으로써, 개선된 siRNA 안정성을 가진 전달체가 된다(J Control Release 129(2):107-16, 2008). 특히 고분자 복합체로 구성된 미셀(micelle)들은 약물 전달 운반체로 쓰이는 다른 시스템인, 미소구체(microsphere) 또는 나노입자(nanoparticle) 등에 비해 그 크기가 극히 작으면서도 분포가 매우 일정하고, 자발적으로 형성되는 구조이므로 체제의 품질 관리 및 재현성 확보가 용이하다는 장점이 있다.

[0010]

또한, siRNA의 세포 내 전달 효율성을 향상시키기 위해, siRNA에 생체 적합성 고분자인 친수성 물질(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG))을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합으로 접합시킨 siRNA 접합체를 통해, siRNA의 안정성 확보 및 효율적인 세포막 투과성을 위한 기술이 개발되었다(대한민국 등록특허 제883471호). 하지만 siRNA의 화학적 변형 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)을 접합시키는 것(PEGylation)만으로는 생체 내에서의 낮은 안정성과 타겟 장기로의 전달이 원활하지 못하다는 단점은 여전히 가진다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA와 같은 이중나선 올리고 RNA에 친수성 및 소수성 물질이 결합된 이중나선 올리고 RNA 구조체가 개발되었는데, 상기 구조체는 소수성 물질의 소수성 상호작용에 의하여 SAMiRNA™(self assembled micelle inhibitory RNA)라고 명명된 자가조립 나노입자를 형성하게 되는데(대한민국 등록 특허 제1224828호 참조), SAMiRNA™ 기술은 기존의 전달기술들에 비해 매우 사이즈가 작으면서도 균일한(homogenous) 나노입자를 수득할 수 있다는 장점을 가진다.

[0011]

한편, 우리나라에서는 인구 4명 중 1명이 암(사망원인 1위)으로 사망하고 있으며, 해마다 진단방법과 치료수집 방법의 발전과 인구의 고령화와 환경변화 등으로 인해 그 숫자가 현저히 증가하는 추세이다. 또한 세계적인 암 발생 및 암으로 인한 사망 역시 증가하는 추세에 있어 암 정복을 위한 예방, 진단 및 치료기술은 인류공통의 시급한 과제이다(BT 기술 동향 보고서, 주요 질환별 신약개발 동향, 생명공학정책연구센터, 2007, 총서 제 72권).

[0012]

암은 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로, 혁신적인 암 치료제의 개발은 이에 대한 치료 시 발생하는 의료비를 절감할 수 있음과 동시에 고부가가치를 창출할 수 있다. 암의 치료는 수술, 방사선치료, 화학요법, 생물학적 치료로 구분되는데, 이 중에 화학요법은 화학물질로서 암 세포의 증식을 억제하거나 죽이는 치료법으로 항암제에 의하여 나타나는 독성은 상당부분 정상세포에서도 나타나기 때문에 일정 정도의 독성을 나타내며, 항암제가 효과를 나타내다가도 일정 기간의 사용 후에는 효과가 상실되는 내성이 발생하기 때문에 암세포에 선택적으로 작용하고 내성이 생기지 않는 항암제의 개발이 절실하다(암 정복의 현주소 Biowave 2004. 6(19)). 최근 암에 대한 분자유전정보의 확보를 통해 암의 분자적 특성을 표적으로 한 새로운 항암제의 개발이 진행되고 있으며, 암세포만이 가지고 있는 특징적인 분자적 표적(molecular target)을 겨냥하는 항암제들은 약제 내성이 생기지 않는다는 보고도 있다. 따라서 암세포만 가지고 있는 특징적인 분자적 표적을 겨냥한 유전자 치료제의 개발을 통해 기존 항암제에 비하여 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 치료제의 개발이 가능하다.

[0013]

RNA 간섭 현상을 이용하여 높은 특이성과 효율로 유전자 발현을 저해할 수 있음이 알려진 이후로 암에 대한 치료제로 다양한 유전자를 타겟으로 하는 siRNA 들이 연구되고 있다. 이들 유전자는 종양유전자(oncogene)을 비롯하여 항-세포자살물질(anti-apoptotic molecule), 텔로머레이즈(telomerase), 성장인자 수용체 유전자(growth factor receptor gene), 신호전달물질(signaling molecule) 등으로 암세포의 생존에 필요한 유전자의 발현을 저해시키거나 세포자살을 유도하는 것이 주된 방향이다(RNA interference in cancer. Biomolecular Engineering, 2006; 23:17734).

[0014]

ZBTB7A(zinc finger and BTB domain containing 7A)는 전사억제인자인 POK(POZ and Kruppel) 패밀리의(family)에 속한 프로토-종양유전자(proto-oncogene)로, 종양억제유전자인 ARF(alternate reading frame of the INK4a/ARF locus (CDKN2A))의 전사를 특이적으로 억제하고, p53을 간접적으로 불활성화시키는 것으로 알려져 있다(Won-Il Choi et al. (2009) Proto-oncogene FBI-1 Represses Transcription of p21CIP1 by Inhibition of Transcription Activation by p53 and Sp1. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 284(19):12633-12644). 즉, ZBTB7A는 ARF-Hdm2-p53-p21 경로(pathway)의 마스터 컨트롤러(master controller)로, 궁극적으로 상위단계(upstream) 조절자(regulator)를 전사 및 발현 수준에서 방해함으로써 세포 주기(cell cycle) 정지(arrest)인자인 p21에 영향을 준다. 따라서 ZBTB7A는 세포증식을 촉진시키고, S기(S phase)의 세포 수를 현저하게 증가시킨다. 또한, ZBTB7A는 간암을 비롯한 고형암(solid cancer)에서 비정상적으로 과발현되는 것으로 알려져 있다

(FBI-1 promotes cell proliferation and enhances resistance to chemotherapy of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. Cancer [2012, 118(1):134-146).

[0015] YAP1(Yes-associated protein 1)은 Yes 와 Src 단백질 타이로신 인산화효소(protein tyrosine-kinase)의 SH3 도메인(domain)과 결합되는 것으로 처음 발견(Sudol M (1994) Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. Oncogene 9: 2145-2152)되었는데, YAP1은 다양한 인간 암 중에서 과발현되는 잠재적인 종양유전자로, Hippo 종양억제경로의 두 가지 주요 효과기(effector) 중 하나이다(Pan D (2010) The hippo signaling pathway in development and cancer. Dev Cell 19: 491-505). YAP1은 전사과정(transcriptional)에서 TEAD 전사인자와 함께 공동활성제(co-activator)로 작용하여 세포의 성장 촉진과 세포자살을 저해하는 유전자를 증가시킨다(Zhao B, Kim J, Ye X, Lai ZC, Guan KL (2009) Both TEAD-binding and WW domains are required for the growth stimulation and oncogenic transformation activity of yes-associated protein. Cancer Res 69: 1089-98). YAP의 하류(downstream) 효과기 (effector)인 Hippo 종양억제경로는 CREB(cAMP response element-binding protein)와 함께 간암형성과 연관됨이 알려져있다(Mutual interaction between YAP and CREB promotes tumorigenesis in liver cancer. Hepatology. 2013 Mar 26).

[0016] CHD1L(Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like)는 DNA 복제(replication), 수선(repair) 및 전사(transcription) 과정에서 필요한 염색질(chromatin) 리모델링(remodeling)과 DNA 완화(relaxation) 과정과 관련이 있다고 알려져 있다(Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. Science. 2009 Sep 4;325(5945):1240-3). CHD1L은 ALC1(amplified in liver cancer 1)이라고도 불리우며, 간암(human hepatocellular carcinoma, HCC)에서 자주 증폭(frequently amplified)되어있고, 과발현(overexpression)되어있고, CHD1L이 과발현되면 세포주기의 G1/S기의 경과(transition)가 촉진되고, 세포자살이 억제되며, p53 발현의 감소를 통해 세포 증식을 촉진시키는 역할을 한다(Isolation and characterization of a novel oncogene, amplified in liver cancer 1, within a commonly amplified region at 1q21 in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008 Feb;47(2):503-10.).

[0017] 상기 살핀 바와 같이 ZBTB7A, YAP1 및 CHD1L의 암 치료제 타겟으로서의 가능성은 제시되어 있는 상황이지만, 아직까지 ZBTB7A, YAP1과 CHD1L에 대한 siRNA 치료제 및 이의 전달기술에 대한 기술개발은 미미한 상황으로, 특이적이며 고효율로 ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L의 발현을 저해할 수 있는 siRNA 치료제 및 이의 전달기술에 대한 시장의 수요는 매우 높은 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 목적은 상기와 같은 기존의 문제점을 해결하고자, ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L에 특이적이면서 매우 높은 효율로 그 발현을 저해할 수 있는 신규 siRNA 및 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 그리고 그러한 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적인 siRNA 또는 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 유효성분으로 포함하는 암, 특히 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적인 siRNA 또는 그러한 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 이용하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명에서는 서열번호 1 내지 서열번호 300에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥(sense strand)인 제1 올리고뉴클레오타이드와 그에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥인 제2 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 간암 연관 유전자인 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA를 제공한다.

[0022] 본 발명에서의 “ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA(s)”는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 단백질을 인코딩하는

유전자에 특이적인 siRNA(s)를 의미한다.

- [0023] 또한, ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L에 대한 특이성이 유지되는 한, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 300에 따른 서열을 포함하는 센스가닥 또는 이에 상보적인 안티센스 가닥에서, 하나 또는 2 이상의 염기가 치환, 결실, 또는 삽입된 서열을 포함하는 센스가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1 특이적 siRNA도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것임은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.
- [0024] ,상기 서열번호 1 내지 서열번호 100은 ZBTB7A에 특이적인 siRNA의 센스가닥 서열이고, 서열번호 101 내지 서열번호 200은 YAP1에 특이적인 siRNA의 센스가닥 서열이며, 서열번호 201 내지 서열번호 300은 CHD1L에 특이적인 siRNA의 센스가닥 서열이다.
- [0025] 본 발명에 따른 siRNA는 바람직하게는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8번에 따른 ZBTB7A 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 103, 107, 108, 112, 116, 117, 118, 121 또는 122번에 따른 YAP1 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 201, 202, 203 또는 204번에 따른 CHD1L 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하며,
- [0026] 더욱 바람직하게는 서열번호 1, 2 또는 4번에 따른 ZBTB7A 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 116, 118 또는 121번에 따른 YAP1 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 202, 203 또는 204번에 따른 CHD1L 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하고,
- [0027] 가장 바람직하게는 서열번호 4번에 따른 ZBTB7A 특이적인 siRNA의 센스가닥, 서열번호 118번에 따른 YAP1 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 204번에 따른 CHD1L 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함한다.
- [0028] 본 발명에 따른 siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥은 19 내지 31개의 뉴클레오타이드로 이루어지는 것이 바람직하며, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 300에서 선택된 어느 하나의 siRNA의 센스가닥 및 이에 상보적인 안티센스 가닥을 포함한다.
- [0029] 본 발명에서 제공되는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA는 해당 유전자를 암호화하는 mRNA와 상보적으로 결합할 수 있도록 설계된 염기서열을 가지므로, 해당 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 것이 특징이다. 또한, 상기 siRNA의 3' 말단에 하나 또는 두 개 이상의 비결합(unpaired)된 뉴클레오타이드를 포함하는 구조인 오버행(overhang)을 포함할 수 있으며,
- [0030] 또한, 상기 siRNA의 생체 내 안정성 향상을 위해, 핵산 분해효소 저항성 부여 및 비 특이적 면역반응 감소를 위한 다양한 변형(modification)을 포함할 수 있다 상기 siRNA를 구성하는 제1 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 ?CH₃(메틸), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl), -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형; 뉴클레오타이드 내 당(sugar) 구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형; 또는 뉴클레오타이드결합의 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate), 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형에서 선택된 하나 이상의 변형이 조합되어 사용될 수 있으며, PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형도 사용이 가능하다(Ann. Rev. Med. 55, 61-65 2004; US 5,660,985; US 5,958,691; US 6,531,584; US 5,808,023; US 6,326,358; US 6,175,001; Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:1139-1143, 2003; RNA, 9:1034-1048, 2003; Nucleic Acid Res. 31:589-595, 2003; Nucleic Acids Research, 38(17) 5761-5773, 2010; Nucleic Acids Research, 39(5) 1823-1832, 2011).
- [0031] 본 발명에서 제공되는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA는 해당 유전자의 발현을 저해시킬 뿐만 아니라, 해당 단백질의 발현을 현저하게 저해시킨다. 또한, 암의 치료에 있어서 사용되는 암 특이적 RNAi와 전형적인 조합(combination)되는 치료방법인 방사선이나 화학요법의 감수성을 향상시키는 것으로 알려져 있으므로(The Potential RNAi-based Combination Therapeutics. Arch Pharm Res 34(1): 1-2, 2011), 본 발명의 ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L 특이적 siRNA를 함께 사용하는 경우 해당 유전자들의 발현이 동시에 저해되어 암세포의 성장을 확연하게 저해할 수 있는 특징을 가진다.

있으며, siRNA 대신에 shRNA가 사용될 수도 있음은 본 발명의 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.

- [0046] 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 친수성 물질은 분자량이 200 내지 10,000 인 양이온성 또는 비이온성 고분자 물질인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1,000 내지 2,000인 비이온성 고분자 물질이다. 예를 들어, 친수성 고분자 물질로는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리옥사졸린 등의 비이온성 친수성 고분자 화합물을 사용하는 것이 바람직하지만, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 소수성 물질(B)은 소수성 상호작용을 통해 구조식(1)에 따른 올리고뉴클레오타이드 구조체로 구성된 나노입자를 형성하는 역할을 수행한다. 상기 소수성 물질은 분자량이 250 내지 1,000인 것이 바람직하며, 스테로이드(steroid) 유도체, 글리세라이드(glyceride) 유도체, 글리세롤 에테르(glycerol ether), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), C₁₂ 내지 C₃₀의 불포화 또는 포화 탄화수소(hydrocarbon), 디아실포스파티딜콜린 (diacylphosphatidylcholine), 지방산(fatty acid), 인지질(phospholipid), 리포폴리아민(lipopolyamine) 등이 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 목적에 부합하는 것이라면 어떠한 소수성 물질도 사용 가능하다는 점은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.
- [0048] 상기 스테로이드(steroid) 유도체는 콜레스테롤, 콜레스탄올, 콜산, 콜리스테릴 포르메이트, 코테스타닐 포르메이트 및 콜리스타닐아민으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 글리세라이드 유도체는 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 등에서 선택될 수 있는데 이때, 글리세라이드의 지방산은 C₁₂ 내지 C₃₀의 불포화 또는 포화 지방산이 바람직하다.
- [0049] 특히, 상기 소수성 물질 중에서도 포화 또는 불포화 탄화수소나 콜레스테롤이 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 구조체의 합성 단계에서 용이하게 결합시킬 수 있는 장점을 가지고 있다는 점에서 바람직하다.
- [0050] 상기 소수성 물질은 친수성 물질의 반대쪽 말단(distal end)에 결합되며, siRNA의 센스가닥 또는 안티센스 가닥의 어느 위치에 결합되어도 무방하다.
- [0051] 본 발명에 따른 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 친수성 물질 또는 소수성 물질과 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA는 단순 공유 결합 또는 링커가 매개된 공유결합(X 또는 Y)에 의해 결합된다. 상기 공유결합을 매개하는 링커는 친수성 물질, 또는 소수성 물질과 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA의 말단에서 공유결합하며, 필요에 따라 특정 환경에서 분해가 가능한 결합을 제공하는 한 특별히 한정되는 것은 아니다. 따라서, 상기 링커는 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조과정 중 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA 및/또는 친수성 물질(또는 소수성 물질)을 활성화하기 위해 결합시키는 어떠한 화합물도 사용될 수 있다. 상기 공유결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합 중 어느 것이어도 무방하다. 이때, 비분해성 결합으로는 아미드 결합 또는 인산화 결합이 있고, 분해성 결합으로는 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 또는 효소 분해성 결합 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 또한, 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 R로 표시되는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA는 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L와 특이적으로 결합할 수 있는 특성을 지니는 siRNA라면 모두 제한 없이 사용가능하며, 바람직하게는 본 발명에서는 서열번호 1 내지 서열번호 300번에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스가닥(sense strand)과 그에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥으로 구성된다.
- [0053] 본 발명에 따른 siRNA는 바람직하게는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8번에 따른 ZBTB7A 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 103, 107, 108, 112, 116, 117, 118, 121 또는 122번에 따른 YAP1 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 201, 202, 203 또는 204번에 따른 CHD1L 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하며,
- [0054] 더욱 바람직하게는 서열번호 1, 2 또는 4번에 따른 ZBTB7A 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 116, 118 또는 121번에 따른 YAP1 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 202, 203 또는 204번에 따른 CHD1L 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함하고,

- [0055] 가장 바람직하게는 서열번호 4번에 따른 ZBTB7A 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 118번에 따른 YAP1 특이적인 siRNA의 센스가닥, 또는 서열번호 204번에 따른 CHD1L 특이적 siRNA의 센스가닥을 포함한다.
- [0056] 한편, 종양(tumor)의 조직은 매우 견고하여 정상 조직에 비하여 확산 제한(diffusion-limitation)을 가지는데, 이러한 확산 제한은 종양 성장에 필요한 영양분, 산소 및 이산화탄소 같은 노폐물의 이동에 악영향을 주기 때문에, 혈관신생(angiogenesis)을 통해 주변에 혈관을 형성함으로써 확산 제한을 극복한다. 혈관신생을 통해 형성된 종양 조직 내 혈관은 종양의 종류에 따라 100 nm 내지 2 μ m 가량의 틈을 가진 헐거운 혈관 구조(leaky and defective blood vessel)를 가진다. 따라서 나노입자는 정상조직의 조직화된 모세 혈관에 비하여 헐거운 혈관 구조를 포함하는 암 조직의 모세혈관 내피(capillary endothelium)를 잘 통과하게 되어 혈액 내 순환 과정 중에 종양 간질(tumor interstitium)에 접근이 용이해지고, 또한 종양 조직 안에는 림프관(lymphatic drainage)이 없어 약물이 축적되는 결과를 나타내는데, 이를 EPR(enhanced permeation and retention) 효과라고 한다. 나노입자가 이러한 효과에 의해 종양 조직 특이적으로 잘 전달되는 것을 수동적 타겟팅(passive targeting)이라고 한다(Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urol. Oncol. 2008 Jan-Feb; 26(1):57-64). 능동적 타겟팅(active targeting)은 표적물질(targeting moiety)이 나노입자에 결합된 경우로, 나노입자를 타겟 조직에서의 축적을 증진(preferential accumulation)시키거나, 타겟 세포 안으로 나노입자가 전달되는 내재화(internalization)를 개선하는 것이 보고되었다 (Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake Trends Biotechnol. 2008 Oct; 26(10):552-8. Epub 2008 Aug 21). 능동적 타겟팅은 타겟 세포 표면 특이적 또는 과 발현 되어있는 탄수화물(carbohydrate), 수용체(receptor), 항원 (antigen)와 결합할 수 있는 능력을 가진 물질(타겟팅 모이어티, targeting moiety)을 이용한다(Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Mol Cancer Ther 2006; 5(8): 1909-1917).
- [0057] 따라서 본 발명에 따른 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및 이로부터 형성된 나노입자에 타겟팅 모이어티가 구비된다면, 효율적으로 타겟 세포로의 전달을 촉진하여, 비교적 낮은 농도의 투여량으로도 타겟 세포로 전달되어 높은 타겟 유전자 발현 조절 기능을 나타낼 수 있으며, 타 장기 및 세포로의 비 특이적인 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA의 전달을 방지할 수 있다.
- [0058] 이에 따라 본 발명은 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에 따른 구조체에 리간드(L), 특히 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis, RME)을 통해 타겟 세포 내재화(internalization)를 증진시키는 수용체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 리간드(ligand)가 추가적으로 결합된 이중나선 올리고 RNA, 구조체를 제공하며, 구조식 (1)에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체에 리간드가 결합된 형태는 하기 구조식 (4)와 같은 구조를 가진다.
- [0059] L-Z-A-X-R-Y-B 구조식 (4)
- [0060] 상기 구조식 (4)에서, A, B, X 및 Y는 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (3)에서의 정의와 동일하며, L은 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis, RME)을 통해 타겟 세포 내재화(internalization)를 증진시키는 수용체와 특이적으로 결합하는 특성을 가진 리간드를 의미한다.
- [0061] 상기 구조식 (4)에서의 리간드는 바람직하게는 타겟세포 특이적으로 세포내재화 (internalization)을 증진시키는 RME 특성을 가진 타겟 수용체 특이적 항체나 앵타머, 펩타이드; 또는 엽산(Folate, 일반적으로 folate와 folic acid는 서로 교차 사용되고 있으며, 본 발명에서의 엽산은 자연 상태 또는 인체에서 활성화 상태인 folate를 의미한다), N-아세틸 갈락토사민(N-acetyl Galactosamine, NAG) 등의 헥소아민(hexoamine), 포도당(glucose), 만노스(mannose)를 비롯한 당이나 탄수화물(carbohydrate) 등의 화학물질 등에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

- [0063] 본 발명에 따른 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 과정은 예를 들어,
- [0064] (1) 고형지지체(solid support)를 기반으로 친수성 물질을 결합 시키는 단계;
- [0065] (2) 상기 친수성 물질이 결합된 고형지지체(CPG) 기반으로 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [0066] (3) 상기 RNA 단일가닥 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 단계;
- [0067] (4) 상기 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [0068] (5) 합성이 완료되면 고형지지체(CPG)로부터 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일 가닥을 분리 정제하는 단계;
- [0069] (6) 제조된 RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링을 통해 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 단계;
- [0070] 를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0071] 본 발명에서의 고형지지체(solid support)는 Controlled Pore Glass(CPG)가 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니며, CPG인 경우 직경은 40~180 μm 인 것이 바람직하며, 500Å~3000Å의 공극 크기를 가지는 것이 바람직하다.
- [0072] 상기 단계 (5) 이후, 제조가 완료 되면 정제된 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일가닥은 MALDI-TOF 질량분석기로 분자량을 측정하여 목적하는 RNA-고분자 구조체 및 RNA 단일가닥이 제조되었는지를 확인할 수 있다. 상기 제조 방법에 있어서 (2) 단계에서 합성된 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계 (4)는 (1) 단계 이전 또는 (1) 단계 내지 (5)단계 중 어느 한 과정 중에 수행되어도 무방하다.
- [0073] 또한, (2)단계에서 합성된 RNA 단일가닥과 상보적 서열을 포함하는 RNA 단일가닥은 5' 말단에 인산기가 결합된 형태로 이용된 것을 특징으로 하는 제조방법도 될 수 있다.
- [0074] 한편, 본 발명의 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체에 추가적으로 리간드가 결합된 이중나선 올리고 RNA 구조체의 제조방법을 제공한다.
- [0075] 리간드가 결합된 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 올리고 RNA 구조체를 제조하는 방법은 예를 들어,
- [0076] 기능기가 결합되어 있는 고형지지체(CPG)에 친수성 물질을 결합시키는 단계;
- [0077] 기능기-친수성 물질이 결합되어있는 고형지지체(CPG)에 RNA 단일가닥을 합성하는 단계;
- [0078] 상기 RNA 단일가닥의 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 과정으로 합성하는 단계;
- [0079] 상기 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일 가닥을 합성하는 단계;
- [0080] 합성이 완료되면 고형지지체(CPG)로부터 기능기-RNA-고분자 구조체 및 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 분리하는 단계;
- [0081] 상기 기능기를 이용하여 친수성 물질 말단에 리간드를 결합하여 리간드-RNA-고분자 구조체 단일가닥을 제조하는 단계;
- [0082] 제조된 리간드-RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링의 통해 리간드-이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하는 단계;
- [0083] 를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0084] 상기 (6)단계 이후, 제조가 완료되면 리간드-RNA-고분자 구조체 및 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 분리 정제한 뒤 MALDI-TOF 질량 분석기로 분자량을 측정하여 목적하는 리간드-RNA-고분자 구조체 및 상보적인 RNA가 제조되었는지를 확인할 수 있다. 제조된 리간드-RNA-고분자 구조체와 상보적인 서열의 RNA 단일가닥의 어닐링을 통해 리간드-이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조할 수 있다. 상기 제조방법에 있어서 (3) 단계에서 합성된 RNA 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 RNA 단일가닥을 합성하는 단계 (4)는 독립적인 합성과정으로서 (1) 단계 이전 또는 (1) 단계 내지 (6) 단계 중 어느 한 과정 중에 수행되어도 무방하다.

- [0085] 본 발명의 또 다른 양태로서, ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 나노입자를 제공한다.
- [0086] 이미 앞서 설명한 바와 같이 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 1 유전자 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체는 소수성 및 친수성 물질을 모두 포함하고 있는 양친매성 (amphiphilic)이며, 친수성 부분은 체내에 존재하는 물 분자들과 수소결합 등의 상호작용을 통해 친화력을 가지고 있어 바깥쪽으로 향하게 되고, 소수성 물질들은 그들 간의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 통해 안쪽으로 향하게 되어 열역학적으로 안정한 나노입자를 형성하게 된다. 즉, 나노입자의 중심에 소수성 물질이 위치하게 되고, ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA 의 바깥쪽 방향에 친수성 물질이 위치하여 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA를 보호하는 형태의 나노입자를 형성한다. 이렇게 형성된 나노입자는 ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA의 세포 내 전달 향상 및 siRNA 효능을 향상시킨다.
- [0087] 본 발명에 따른 나노입자는 서로 다른 서열을 포함하는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체로 구성됨을 특징으로 하는데, 본 발명에서의 서로 다른 서열을 포함하는 siRNA는 다른 타겟 유전자, 예를 들어 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적인 siRNA일수도 있고, 동일한 타겟 유전자 특이성을 가지면서 그 서열이 다른 경우도 포함되어 해석된다.
- [0088] 또한, ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적인 siRNA 이외에 다른 암 특이적 타겟 유전자 특이적인 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 본 발명에 따른 나노입자에 포함될 수도 있다.
- [0089] 또한, 본 발명은 또 다른 양태로서, ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및/또는 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0090] 본 발명에 따른 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및/또는 상기 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물은 암세포의 증식 및 암세포의 사멸을 유도하여 암의 예방 또는 치료효과를 나타낸다. 따라서 본 발명에 따른 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA 및 이를 포함하는 조성물은 해당 유전자가 과발현되는 것으로 보고된 간암을 비롯하여 위암, 폐암, 췌장암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암 및 신장암을 비롯한 다양한 암의 예방 또는 치료에 효과가 있다.
- [0091] 특히, 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에는
- [0092] 서열번호 1 내지 서열번호 100에서 선택된 어느 하나의 서열, 바람직하게는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 번에 따른 서열에서 선택된 어느 하나의 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 1, 2 또는 4번에 따른 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 4번에 따른 서열을 포함하는 센스가닥 및 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 ZBTB7A 특이적인 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 또는,
- [0093] 서열번호 101 내지 서열번호 200에서 선택된 어느 하나의 서열, 바람직하게는 서열번호 103, 107, 108, 112, 116, 117, 118, 121 및 122번에서 선택된 어느 하나의 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 116, 118 또는 121번에 따른 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 118의 서열을 포함하는 센스가닥 및 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 YAP1 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 또는,
- [0094] 서열번호 201 내지 서열번호 300에서 선택된 어느 하나의 서열, 바람직하게는 서열번호 201, 202, 203 및 204번에서 선택된 어느 하나의 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 202, 203 또는 204번에 따른 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 204의 서열을 포함하는 센스가닥 및 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 CHD1L 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 포함될 수도 있고,
- [0095] 상기 ZBTB7A 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, YAP1 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체 및/또는 CHD1L 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 혼합된 형태로 포함될 수도 있다.
- [0096] 또한, ZBTB7A, YAP1이나 CHD1L 이외의 다른 암 특이적 타겟 유전자에 특이적인 siRNA, 또는 이를 포함하는 이중

나선 올리고 RNA 구조체가 본 발명에 따른 조성물에 추가적으로 포함될 수 있다.

- [0097] 상기와 같이 ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L 특이적 siRNA, 또는 상기 ZBTB7A, YAP1 및/또는 CHD1L 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체에 추가적으로 다른 암 특이적 타겟 유전자에 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 모두 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 이용할 경우, 흔히 암 치료에 이용되는 병용 요법(combination therapy)과 같이 상승적인 효과를 거둘 수 있다.
- [0098] 본 발명에 따른 조성물이 예방 또는 치료할 수 있는 암은 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 유방암, 난소암, 신장암 및 폐암 등을 예시할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0099] 또한, 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체로 이루어진 나노입자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 포함되는 나노입자도 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체에서 선택된 어느 하나의 구조체로만 순수하게 구성될 수도 있고, ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체가 2종 이상 혼합된 형태로 구성될 수도 있다.
- [0100] 본 발명의 조성물에는 상기의 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 본 발명의 유효성분과 양립 가능하여야 하며, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 한 성분 또는 둘 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있고, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다. 특히, 동결건조(lyophilized)된 형태의 제형으로 제제화하여 제공하는 것이 바람직하다. 동결건조 제형 제조를 위해서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려져 있는 방법이 사용될 수 있으며, 동결건조를 위한 안정화제가 추가될 수도 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 레밍톤 약학 과학(Remington's pharmaceutical Science, Mack Publishing company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질병에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0101] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분 등의 함량 및 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.
- [0102] 본 발명의 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, 건강 상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설을 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지의 기술을 이용하여 본 발명의 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.
- [0103] 본 발명에서는 본 발명에 따른 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA, 상기 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 조성물 또는 나노입자를 암의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.
- [0104] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이중나선 올리고 RNA 구조체, 이를 포함하는 나노입자를 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암의 예방 및 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0105] 본 발명에 따른 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자 특이적 siRNA, 이를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체를 포함하는 암 치료용 조성물은 부작용 없이 높은 효율로 ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 유전자의 발현을 억제하여 암, 특히 간암 치료효과를 거둘 수 있으므로, 현재 적절한 치료제가 없는 간암의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0106]

도 1은 본 발명에 따른 이중나선 올리고 고분자 구조체로 구성된 나노입자의 모식도.

도 2는 본 발명의 서열번호 1번 내지 8번 및 ZBTB7A_Ref(서열번호 310)을 센스가닥으로 가지는 siRNA 0.2, 1, 5 nM로 인간 간암 세포주(Huh-7)를 형질전환시킨 경우의 타겟유전자(target gene)의 발현 저해량을 나타내는 도면.

도 3은 본 발명의 서열번호 103번, 107번, 108번, 112번, 116번 내지 118번, 121번, 122번, 301번 및 YAP_Ref(서열번호 311)을 센스가닥으로 가지는 siRNA로 인간 간암 세포주(Huh-7)를 형질전환시킨 경우의 타겟유전자(target gene)의 발현 저해량을 나타내는 도면

A : 서열번호 103번, 107번, 108번, 112번, 116번 내지 118번 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA 0.2, 1, 5nM로 형질전환 시킨 경우의 타겟유전자의 발현 저해량

B : 서열번호 116번 내지 118번, 121번, 122번, 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA 및 YAP_Ref(서열번호 311)을 5, 20nM로 형질전환 시킨 경우의 타겟유전자의 발현 저해량

도 4는 본 발명의 서열번호 201번 내지 204번, 301번 및 CHD1L_Ref(서열번호 312)을 센스가닥으로 가지는 siRNA 0.2, 1, 5 nM로 인간 간암 세포주(Huh-7)를 형질전환시킨 경우의 타겟유전자(target gene)의 발현 저해량을 나타내는 도면.

도 5는 본 발명의 ZBTB7A에 대한 고효율의 siRNA인 서열번호 4번을 센스가닥으로 가지는 siRNA의 IC50(inhibition concentration 50%) 값을 나타내는 도면.

A : Hep3B 세포주에서의 IC50

B : Huh-7 세포주에서의 IC50

도 6는 본 발명의 YAP1에 대한 고효율의 siRNA인 서열번호 118번을 센스가닥으로 가지는 siRNA의 IC50(inhibition concentration 50%) 값을 나타내는 도면.

A : Hep3B 세포주에서의 IC50

B : Huh-7 세포주에서의 IC50

도 7는 본 발명의 CHD1L에 대한 고효율의 siRNA인 서열번호 204 번을 센스가닥으로 가지는 siRNA의 IC50(inhibition concentration 50%) 값을 나타내는 도면.

A : Hep3B 세포주에서의 IC50

B : Huh-7 세포주에서의 IC50

도 8은 본 발명에 따른 고효율의 siRNA에 의한 세포성장(cell proliferation) 저해효과를 나타내는 도면 (인간 간암 세포주(huh-7)에 농도별로 처리하여, 대조군(siCONT, 서열번호 301번, 20nM)에 대비하여 증가하는 세포수를 측정된 결과)

A : 서열번호 4번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 IC50이상의 농도(5, 20, 100nM)로 처리한 결과

B : 서열번호 118번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 IC50이상의 농도(5, 20nM)로 처리한 결과

C. 서열번호 204번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 IC50이상의 농도(5, 20, 100nM)로 처리한 결과

도 9는 본 발명의 서열번호 4, 118 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 두 종의 암세포에 형질전환시켜 해당 siRNA에 의한 콜로니 형성 분석(colony forming assay, CFA)을 통해 콜로니 형성 억제력을 확인한 사진

A : 서열번호 4번을 센스가닥으로 가지는 siRNA의 콜로니 형성분석

B : 서열번호 118번을 센스가닥으로 가지는 siRNA의 콜로니 형성분석

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0108] **실시예 1.ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 의목표 염기서열 디자인 및 siRNA의 제조**

[0109] ZBTB7A 유전자의 mRNA 서열(NM_015898) 또는 YAP1(NM_006106)유전자의 mRNA 서열 (NM_005180) 또는 CHD1L 유전자의 mRNA서열(NM_004284)에 결합할 수 있는 목표 염기서열(센스가닥)을 유전자별로 100종씩 디자인하고, 상기 목표 염기서열의 상보적 서열인 안티센스 가닥의 siRNA 를 제조하였다. 우선, 바이오니아(주)에서 개발된 유전자 디자인 프로그램(Turbo si-Designer)을 사용하여, 해당 유전자들의 mRNA 서열에서 siRNA가 결합할 수 있는 목표 염기서열을 디자인하였다. 본 발명의 간암 연관 유전자에 대한 siRNA 는 19개의 뉴클레오티드로 구성된 센스 가닥과 이에 상보적인 안티센스 가닥으로 구성된 이중가닥 구조이다. 또한 어떠한 유전자의 발현을 저해하지 않는 서열의 siRNA인 siCONT(서열번호 301을 센스가닥으로 가짐) 를 제조하였다. 상기 siRNA는 β -시아노에틸 포스포라미다이트(β -cyanoethyl phosphoramidite)를 이용하여 RNA 골격 구조를 이루는 포스포디에스터 결합을 연결하여 제조하였다 (Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984). 구체적으로, RNA 합성기(384 Synthesizer, BIONEER, 한국)를 사용하여, 뉴클레오티드가 부착된 고형 지지체 상에서, 차단제거(deblocking), 결합(coupling), 산화(oxidation) 및 캐핑(capping)으로 이루어지는 일련의 과정을 반복하여 원하는 길이의 RNA 를 포함하는 반응물을 수득하였다. 상기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan) 칼럼이 장착된 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)로 RNA를 분리 및 정제하고 이를 MALDI-TOF 질량 분석기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 목표 염기서열과 부합하는지 확인하였다. 이후, 센스와 안티센스 RNA가닥을 결합시켜 목적하는 이중가닥 siRNA(서열번호 1 내지 301)을 제조하였다 (표 1 참조).

표 1

[0110] **본 발명에 따른 siRNA의 센스가닥 서열**

서열번호	타겟 유전자	Sequence.
1	ZBTB7A	CAGACAAGACCUUAAAUGA
2	ZBTB7A	GUCCGAUGAUGACCUGGAU
3	ZBTB7A	GACAAGCUGAAGGUGCACA
4	ZBTB7A	CUCUGAGCGGACGUAAAA
5	ZBTB7A	GCAGCUGGACCUUGUAGAU
6	ZBTB7A	GCUGGACCUUGUAGAUCAA
7	ZBTB7A	CACAUCUUCUCGUCUCUUU
8	ZBTB7A	CACUGAGACUUCUUGUCAA
9	ZBTB7A	CCUCGCAAUAAAACCAACU
10	ZBTB7A	UGUAAACGGAACGGGUACUA
11	ZBTB7A	CAAAUCCAAUGUCACAAA
12	ZBTB7A	CCUUUGCCCACAACUACGA
13	ZBTB7A	CGGACUCGCCUAAAAACCA
14	ZBTB7A	GAAUCUAGGGUAGCGCUUU
15	ZBTB7A	GACAUCCUGAGUGGGCUGA
16	ZBTB7A	CUGCACUGAGACUUCUUGU
17	ZBTB7A	ACAAGCUGAAGGUGCACAU
18	ZBTB7A	AGGCACUGACUGUAAUCCA
19	ZBTB7A	GACUACUACCUGAAGUACU
20	ZBTB7A	GAAAACAGAAACCCGAGAA
21	ZBTB7A	CACUGAGACACAAACCUAU
22	ZBTB7A	CACAAAUCCAAUGUCACA
23	ZBTB7A	CGGAACGGGUACUACACUU
24	ZBTB7A	GCAUAUGCAAUGCUAGCAU
25	ZBTB7A	CGCAAUAAAACCAACUCUA
26	ZBTB7A	GGUUCUGACGUGAAGAGGU
27	ZBTB7A	GUUACAACCAACUUCUAUG
28	ZBTB7A	AUAUAUAUGACGCGUCACA
29	ZBTB7A	GCCCACAACUACGACCUGA

30	ZBTB7A	CUGCACAGACACCUCUAGA
31	ZBTB7A	ACUACUACCUGAAGUACUU
32	ZBTB7A	CUCUGUGACACACAUUCU
33	ZBTB7A	GCACUGACUGAAUCCAGG
34	ZBTB7A	GCUCUGAGCGGACGUUAAA
35	ZBTB7A	CGGUAACUUCACAGCCGGA
36	ZBTB7A	CGCCUAAAAACCAAAAAGA
37	ZBTB7A	CGUUUGGAGAUUCAAACU
38	ZBTB7A	GGCAACCAACCACAUAGA
39	ZBTB7A	GAACGGGUACUACAUUUA
40	ZBTB7A	CGGGUACUACAUUUAUCU
41	ZBTB7A	CAAAGGCACUGACUGAAU
42	ZBTB7A	GUGUACGAGAUUCGACUUC
43	ZBTB7A	GUAGAAUCCACUUCUGUUC
44	ZBTB7A	GCUGCACUGAGACUUCUUG
45	ZBTB7A	UCAAGAAAGACGGCUGCAA
46	ZBTB7A	UGCAUAUGCAAUGCUAGCA
47	ZBTB7A	UGAGCCCUCUUUCCACCUU
48	ZBTB7A	ACGAGAUCGACUUCGUCAG
49	ZBTB7A	CCCACAACUACGACCUGAA
50	ZBTB7A	GGACUCGCCUAAAAACCAA
51	ZBTB7A	GGGUAGCGCUUUCUCAGAU
52	ZBTB7A	CUAUGAGUCUUUCAGACAA
53	ZBTB7A	GGAGAUUCAAACUUCUGU
54	ZBTB7A	CCAAUGUCACAAAAGCAU
55	ZBTB7A	CGUAGAAUCCACUUCUGUU
56	ZBTB7A	CUUUAAGGACGAGGACGAG
57	ZBTB7A	AGAAGAAGAUCCGAGCCAA
58	ZBTB7A	AGAAUCUAGGGUAGCGCUU
59	ZBTB7A	GGUACUACAUUUAUCUUA
60	ZBTB7A	CAGGGCACUACUAAGGGA
61	ZBTB7A	GGAGAAAGGAGAUCCGACU
62	ZBTB7A	CACAUAGAAGUCUUGGCA
63	ZBTB7A	CUUGGCACUUGUAACGGA
64	ZBTB7A	CUUUGUAAACGGAACGGGUA
65	ZBTB7A	CUCUUUUUACUCAAAGGCA
66	ZBTB7A	GGUUUUGGUUCCCUUCCCU
67	ZBTB7A	CUUUCAGACAAGACCUUAA
68	ZBTB7A	UCUGUGACACACAUUCU
69	ZBTB7A	CUGUGACACACAUUCUUC
70	ZBTB7A	GAGCAGAAAGAAUUCUAA
71	ZBTB7A	GUUUGCAUAUGCAAUGCUA
72	ZBTB7A	ACGUGUACGAGAUCCGACU
73	ZBTB7A	AGCUGGACCUUGUAGAUCA
74	ZBTB7A	UCCCUCCUUCUGACGUUU
75	ZBTB7A	AGAGUCACGAUCAGAGGAA
76	ZBTB7A	CCAACGUGGGUGACAUCU
77	ZBTB7A	AGGGCACUUACUAAGGGAG
78	ZBTB7A	AGCCGGACUCGCCUAAAAA
79	ZBTB7A	AACGGGUACUACAUUUUAU
80	ZBTB7A	CAAGACCUUAAAUGAUUUC
81	ZBTB7A	UGCAAGACCUUCGUCCGCU
82	ZBTB7A	GCACUUUAAGGACGAGGAC
83	ZBTB7A	GAGAAAGGAGAUCCGACUG
84	ZBTB7A	GCACUUUGUAAACGGAACGG
85	ZBTB7A	ACGGAACGGGUACUACACU
86	ZBTB7A	ACGUAGAAUCCACUUCUGU
87	ZBTB7A	CAUUGUUAAGGGAAGCUU

88	ZBTB7A	ACAUCUGCAAGGUCCGCUU
89	ZBTB7A	UGAAGGUGCACAUGCGGAA
90	ZBTB7A	ACUUCUGUCUUCGUCCUCU
91	ZBTB7A	AGGCAACAGUGUGGGAUAA
92	ZBTB7A	UUAGAAGUCUUGGCACUUU
93	ZBTB7A	ACUGAGACUUCUUGUCAAU
94	ZBTB7A	ACAUCUUCUGUCUCUUUU
95	ZBTB7A	CUCAAGAAAGACGGCUGCA
96	ZBTB7A	GGCAACAGUGUGGGAUAAA
97	ZBTB7A	AAAAGGCAACCAACCACAU
98	ZBTB7A	GCUUGGGCCGGUUGAAUGU
99	ZBTB7A	UCCUCCCUAGCUCAGGGAU
100	ZBTB7A	GCACAGACACCUCAGAAA
101	YAP1	CAGAAGAUCAAAGCUACUU
102	YAP1	GUGCUAUAUAGUCACAU
103	YAP1	CAGGAUUGAGAACAUGA
104	YAP1	GUGAGUAGGUCAUAAUGU
105	YAP1	GAACAAAACGAGCAUGAAU
106	YAP1	CUCAGACUUAGAAGUCAGA
107	YAP1	CUCUUCACGCCGUCUGA
108	YAP1	GAGUACAGACAGUGGACUA
109	YAP1	GAAUUGUGGGUGGCCUAU
110	YAP1	CUUGGAAGGAGUGCCUAUA
111	YAP1	GUAGCCACAGAUUAAGAUU
112	YAP1	CGAGAUGAGAGUACAGACA
113	YAP1	GGUUUACCUUCAUUUAGCU
114	YAP1	CAGAUGGAGUUUAGAGUA
115	YAP1	GAGAUGAGAGUACAGACAG
116	YAP1	GAGUUCUGACAUCUUAU
117	YAP1	GAGAUGGAUACAGGUGAUA
118	YAP1	GCUGCCACCAAGCUAGUA
119	YAP1	GUACUUUCAGUCUAAAA
120	YAP1	CCUCGCAAGCAUGUUGUUA
121	YAP1	AGAUGAGAGUACAGACAGU
122	YAP1	GAGAUGGAAUGAACAUAGA
123	YAP1	GACAGUCUUCUUUGAGAU
124	YAP1	GACAGUGGACUAAGCAUGA
125	YAP1	GUUGUUUCUUCAGCUUCCU
126	YAP1	CGAGCAUGAAUUAACUCUU
127	YAP1	CUGUGAUACCGGCACAGU
128	YAP1	GGAGACCUAAGAGUCCUUU
129	YAP1	GUUUGAAUCAUAGCCUUGA
130	YAP1	CAAAAGUGGGGCGCAUUAU
131	YAP1	GAUGAAUUGGAAAGGAGCA
132	YAP1	GCCUAGUUUUGGAAGUAA
133	YAP1	GGAAGUGACUUUGCUACAA
134	YAP1	GCUCAUAUGUUAGGUACUU
135	YAP1	CUAGUUUGUAGUUCUCAUU
136	YAP1	GCUGCCAUUAAAGGCAGCU
137	YAP1	GGCAUGAGACAAUUCCAU
138	YAP1	CCUUGAUGUGGUCUCUUGU
139	YAP1	CCUGCGUAGCCAGUUACCA
140	YAP1	GACUAAAAUCCAGUGUCU
141	YAP1	CAAGUCUCAGGAAGCUUU
142	YAP1	GGAAGUGAGCCUGUUUGGA
143	YAP1	GCUUUUAUAGUGGUUACCU
144	YAP1	GCAUGCUCUAUGUUAGGU
145	YAP1	GCACCUAUCACUCUCGAGA

146	YAP1	GGACUAAGCAUGAGCAGCU
147	YAP1	GAGUUUGAAUCAUAGCCUU
148	YAP1	GGUGGAUUUUUAUCCUCGCA
149	YAP1	CAUAAGCCAGUUGCAGUUU
150	YAP1	GUGUCUACAGGAGUAAUAA
151	YAP1	UCAUGUCACAGCAUUUAGU
152	YAP1	UGUCCUUGUCCUAAUGUA
153	YAP1	UCAGUCAGGGCUUCUUAGA
154	YAP1	UCACUCUCGAGAUAGAGAU
155	YAP1	UGAAGGAUCUAAGGAGACA
156	YAP1	GAGUAAUAAUGGUUCCAA
157	YAP1	UAUUUUGGCCCUCAAUUU
158	YAP1	GAGAUGGCAAAGACAUCUU
159	YAP1	CAGCAGAAUAUGAUGAACU
160	YAP1	CACCAAGCUAGUAAAGAA
161	YAP1	GCACCGGAAAUUCCAUAA
162	YAP1	CCAGUGGAAAAACAUGAUU
163	YAP1	GAUUUUCUGCUCUCUCUUU
164	YAP1	GUCCUUGUCCUAAUGUAA
165	YAP1	ACAGCAUGUUCGAGCUCAU
166	YAP1	CUAGAAUAGCCCUAAUUU
167	YAP1	GUCUCAGGAUUUGAGAACA
168	YAP1	CUAAAUCUGUGAAGGAUCU
169	YAP1	GAACAAACGUCCAGCAAGA
170	YAP1	GUGUUCUAGAAAGAGCUAU
171	YAP1	CAUAAUGUGCAUGACAGAA
172	YAP1	CACCUAAGUACACCCACAA
173	YAP1	GAUGUAAGAGCAUGCUCU
174	YAP1	GGAUGGUGGGACUAAAAU
175	YAP1	GGGCAUACGGUAGAUUUA
176	YAP1	CUAGCACCUCUGUGUUUUA
177	YAP1	GGAAGGAGUGCCUAUAAUU
178	YAP1	GAAGGAGUGCCUAUAAUUU
179	YAP1	UCACCUAAGUACACCCACA
180	YAP1	UGAGAUACCUGAUGAUGUA
181	YAP1	UCAGGGCUUCUAGAUCUA
182	YAP1	AGAUGGAGUUUAGAGUAG
183	YAP1	CGACAGUCUUCUUUGAGA
184	YAP1	GAAUUGAGAACAAUGACGA
185	YAP1	CUCUGUGUUUUAAGGGUCU
186	YAP1	CUAGAAUGCAAAAUUGGGU
187	YAP1	GUGGAUUUUAUCCUCGCAA
188	YAP1	CCUACUUCUAUGCUGAAAA
189	YAP1	GGAACAAAACGAGCAUGAA
190	YAP1	GCAAUCACUGUGUGUAUA
191	YAP1	CCUAAGUACACCCACAAAA
192	YAP1	GGCUUCUAGAUUCUUA
193	YAP1	ACCGUUUCCAGACUACCU
194	YAP1	UGGAAUGAACAUAAGAAGGA
195	YAP1	UUGCUCUCCUUGUCCAUU
196	YAP1	UCUUACGAUGCCUCUGUA
197	YAP1	CUAUGAAGUAAUAGUUGGU
198	YAP1	CAGUUUUCAGGCUAAUACA
199	YAP1	CUCAGCUUGGAAGAUAAGA
200	YAP1	CAGUCAGGGCUUCUUAAGAU
201	CHD1L	UUCUUACUGCGCUUCAUA
202	CHD1L	CUGGAUAAGCUACUAGCAU
203	CHD1L	GGAGCCUUUGAAGUUGGA

204	CHD1L	CUGCUGCAUAAGACCUUGU
205	CHD1L	CUGAGUCAGCAAGUGAACU
206	CHD1L	GAGCUUCCCAAGAAGACAG
207	CHD1L	CGUUCCAAUGUCCUGUCUG
208	CHD1L	CCUCCUCAAGACAGCUGGU
209	CHD1L	GGUGGGAAUCCAACAAUUA
210	CHD1L	GCAUCCCAACUUAUAUAUA
211	CHD1L	CUCAUCGCAUUGGCCAAAA
212	CHD1L	GAAGAAAGCAAGUGUUCAU
213	CHD1L	AGUGUUCACUUCACGUA
214	CHD1L	GUCAGGUUUUCAUGUGCUA
215	CHD1L	GAGUGUUCUUGUUGUGGAU
216	CHD1L	GCUCAGCAUCGUGAUCGUU
217	CHD1L	CUUGGCCAUUAAGAACUUU
218	CHD1L	GAUGAAGCUCACAGGUUGA
219	CHD1L	CCUUGUCAGAGUUCUCAGU
220	CHD1L	CUGAAACAGGAGUCACGUU
221	CHD1L	CACGUUUUCAUGUGCUACU
222	CHD1L	CAGCAAGUGAACUGCACAA
223	CHD1L	GUGAUUAACCAUGGCAUGU
224	CHD1L	CUUUGGACAGCAGCCCAUU
225	CHD1L	GAGGUACUGCAAUAGAGUA
226	CHD1L	CUCAGAAUGACUUGCAAGC
227	CHD1L	CAAGACCUGAAACAGGAGU
228	CHD1L	CCUCAAGUACGUUAGUGGU
229	CHD1L	CUUUGUCCCUUGUCUGUUU
230	CHD1L	AGAAGGAGGCCAUUUUACU
231	CHD1L	AGAAAGCAAGUGUUCUUCU
232	CHD1L	GGGCAAGAUUUGUUGGCCU
233	CHD1L	GAAAAUGAGACGGCAAAGA
234	CHD1L	GGAGCACCAUGGAUGAAAU
235	CHD1L	CCUGGUGGGAUCCAACAA
236	CHD1L	UUGAAAAUGAGACGGCAAA
237	CHD1L	UGAUUGGUCGAGACACUGU
238	CHD1L	AGUUGAGUGAGAUACUCAA
239	CHD1L	GUGAACUGCACAAACUCUU
240	CHD1L	CUCCAAGACUAUAUGGAUU
241	CHD1L	CACUUGGCCAUUAAGAACU
242	CHD1L	GUGUUCAUUCUCCACGUUU
243	CHD1L	UCAGCAAGUGAACUGCACA
244	CHD1L	GGCCGAUCACUCCGAAUUA
245	CHD1L	CCGAUCACUCCGAAAUAAA
246	CHD1L	GGCAGAGGUGGUUUUUUUA
247	CHD1L	GGGAGGUGUCCUUUUUUUU
248	CHD1L	GACCUUGUCAGAGUUCUCA
249	CHD1L	GUGGUUUUUUUACAGCUCU
250	CHD1L	GCUUGAAAGAUGCAUCAUU
251	CHD1L	CCCAAAUGACCCAGAUGUU
252	CHD1L	CAAGACCCAGAUGCUACUU
253	CHD1L	CAGCUUGCUAGUUGCAUAA
254	CHD1L	UGAACAACUGGUAACCUU
255	CHD1L	UCAUUGUGCACUGCGUAGA
256	CHD1L	AGGUUUUAACUGGUUUGGU
257	CHD1L	CUGCAAUAGAGUAUUUCAA
258	CHD1L	GACUACCUAUGAGAUUUUGC
259	CHD1L	CGAGGAUGCUCUCAUUGUG
260	CHD1L	GAUUUGUUGCCUUGAUUG
261	CHD1L	GCUUCUACUGCGGUUCA

262	CHD1L	GCUGACAGGGAUUCACCUA
263	CHD1L	CCCUGCUGCAUAAGACCUU
264	CHD1L	GCUUCGAAAGUGUGGGAU
265	CHD1L	GCUGAUUGGUCGAGACACU
266	CHD1L	GCCAAGAGAAGGAGACUCA
267	CHD1L	CUGCAUAAGACCUUGUCAG
268	CHD1L	GCUGGAUAAGCUACUAGCA
269	CHD1L	CUCCGAAUAAAAGGCAGUG
270	CHD1L	CCAUAAGAACUUUGGACA
271	CHD1L	CAGAAAACCCUUUUGGAGA
272	CHD1L	GGAGUGUUCUUGUUGGGA
273	CHD1L	GAUGGUUCUGUGAGAGGA
274	CHD1L	CAGCUGGAGGGAGUAAACU
275	CHD1L	GUUGAGUGAGAUACUAAA
276	CHD1L	GAUUAUUCUAAAGAGCCCA
277	CHD1L	CAGAGGUGGUUUAUUACA
278	CHD1L	GCAUUAAGAUGGCAGCCCU
279	CHD1L	UCACCAACAUGAUCUAGA
280	CHD1L	AGUUGGAGACCACCGACU
281	CHD1L	UGGUCGAGACACUGUGGAA
282	CHD1L	AACAAUUAACGAGCCUUCU
283	CHD1L	CCUACGCUCUUAACGACUG
284	CHD1L	CUGACUACCUAUGAGAUUU
285	CHD1L	GGUGGGAGAUUUUAUUCAA
286	CHD1L	GACCUAGAUGCAUUUGAAA
287	CHD1L	CACCAACAUGAUCUAGAA
288	CHD1L	CCUCCAGUUGAGUGAGUA
289	CHD1L	CUGGUAACCUUCAGAAAA
290	CHD1L	GCUCUGCUGAGCUGGAUUA
291	CHD1L	CCGAGGAUGCUCUCAUUGU
292	CHD1L	CAUUGUCCUGUCUGGCAUU
293	CHD1L	AUAGAAGGAGGCCAUUUUA
294	CHD1L	ACUGCAAUAGAGUAUUUCA
295	CHD1L	CAGUUGAGUGAGAUACUCA
296	CHD1L	CCUUAAGAAUUGGCCCAGC
297	CHD1L	UCCCUGCUGCAUAAGACCU
298	CHD1L	GCUUGCUAGUUGCAUAAUA
299	CHD1L	GCUGGUGCCUUAAGAAUUG
300	CHD1L	AACUUUGGACAGCAGCCCA
301	siCONT	CUUACGCUGAGUACUUCGA

[0111] **실시예 2. 이중나선 올리고 RNA 구조체(SAMiRNA LP)의 제조**

[0112] 본 발명에서 제조한 이중나선 올리고 RNA 구조체(SAMiRNA LP)는 하기 구조식 (5)와 같은 구조를 가진다.

[0113] C₂₄-5' -S-3' -PEG

[0114] AS 구조식 (5)

[0115] 상기 구조식 (5)에서, S는 siRNA의 센스가닥; AS는 siRNA의 안티센스 가닥; PEG는 친수성 물질로 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol); C₂₄는 소수성 물질로 이황화결합(disulfide) 이 포함된 테트라도코산

(tetradocosane); 5' 및 3' 은 이중나선 올리고 RNA 말단의 방향성을 의미한다.

[0116] 상기 구조식 (5)에서의 siRNA의 센스가닥은 기존 특허(대한민국 공개 특허 공보 10-2012-0119212호)의 실시예 1에 기재된 방법에 따라 제조된 3' 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG, Mn=2,000)-CPG를 지지체로 하여 앞서 언급한 방식대로 β -시아노에틸포스포아미다이트를 이용하여 RNA 골격구조를 이루는 포스포디에스터 결합을 연결해가는 방법을 통해 3' 말단부위에 폴리에틸렌 글리콜이 결합된 센스가닥의 이중나선 올리고 RNA-친수성 물질 구조체를 합성한 뒤, 이황화 결합이 포함되어있는 테트라도코산을 5' 말단에 결합하여 원하는 RNA-고분자 구조체의 센스가닥을 제조하였다. 상기 가닥과 어닐링을 수행할 안티센스 가닥의 경우, 앞서 언급한 반응을 통해 센스가닥과 상보적인 서열의 안티센스 가닥을 제조하였다.

[0117] 합성이 완료되면 60℃의 온탕기(water bath)에서 28%(v/v) 암모니아(ammonia)를 처리하여 합성된 RNA 단일가닥과 RNA 고분자 구조체를 CPG로부터 떼어낸 뒤, 탈보호(deprotection) 반응을 통해 보호잔기를 제거하였다. 보호잔기가 제거된 RNA 단일가닥 및 RNA-고분자 구조체는 70℃의 오븐에서 엔-메틸피롤리돈(N-methylpyrrolidone), 트리에틸아민(triethylamine) 및 트리에틸아민트리하이드로플로라이드 (triethylaminetrihydrofluoride)를 부피비 10:3:4의 비율로 처리하여 2' TBDMS(tert-butyl dimethylsilyl)를 제거하였다.

[0118] 상기 반응물을 Daisogel C18(Daiso, Japan) 칼럼이 장착된 HPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)로 RNA를 분리 및 정제하고 이를 MALDI-TOF 질량 분석기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 목표 염기서열과 부합하는지 확인하였다. 이후, 각각의 이중나선 올리고 RNA 구조체를 제조하기 위하여 센스가닥과 안티센스 가닥을 동량 혼합하여 1X 어닐링 버퍼(30 mM HEPES, 100 mM 칼륨 아세테이트(Potassium acetate), 2 mM 마그네슘 아세테이트(Magnesium acetate), pH 7.0~7.5)에 넣고, 90 °C 항온수조에서 3분 반응시킨 후 다시 37 °C에서 반응시켜, 서열번호 1번 내지 8번, 103번, 107번, 108번, 112번, 116번 내지 118번, 121번, 122번, 201번 내지 204번 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 포함하는 이중나선 올리고 RNA 구조체(이하, 각각 SAMiRNALP-ZBTB, SAMiRNALP-YAP, SAMiRNALP-CHD, SAMiRNALP-CONT라 함)를 각각 제조하였다. 제조된 이중나선 올리고 RNA 구조체는 전기영동을 통하여 어닐링 되었음을 확인하였다.

[0119] 실시예 3. 이중나선 올리고 RNA 구조체(SAMiRNA LP)로 이루어진 나노입자 (SAMiRNA)의 제조 및 크기 측정

[0120] 상기 실시예 2에서 제조된 이중나선 올리고 RNA 구조체(SAMiRNA LP)는 이중나선 올리고 RNA의 말단에 결합된 소수성 물질 간의 소수성 상호작용에 의하여 나노입자, 즉 미셀(micelle)을 형성하게 된다(도 1 참조).

[0121] SAMiRNALP-ZBTB, SAMiRNALP-YAP, SAMiRNALP-CHD, SAMiRNALP-CONT로 이루어진 나노입자 크기 PDI(polydispersity index) 분석을 통해 해당 SAMiRNALP로 구성된 나노입자(SAMiRNA)의 형성을 확인하였다.

[0122] 실시예3-1. 나노입자의 제조

[0123] 상기 SAMiRNALP-ZBTB를 1.5 ml DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 녹인 뒤, -75℃, 5mTorr 조건에서 48시간 동안 동결건조를 통해 나노입자 파우더를 제조한 뒤, 용매인 DPBS에 녹여 균질화된 나노입자를 제조하였다. SAMiRNALP-YAP, SAMiRNALP-CHD, SAMiRNALP-CONT로 이루어진 나노입자도 동일한 방법으로 제조하였다.

[0124] 실시예 3-2. 나노입자의 크기 및 다분산지수(polydispersity index, 이하 'PDI'라 한다) 측정

[0125] 제타-전위 측정기(zeta-potential measurement)를 통하여 상기 나노입자의 크기를 측정하였다. 실시예 3-1에서 제조된 균질화된 나노입자는 제타-전위 측정기(Nano-ZS, MALVERN, 영국)로 크기를 측정하였는데, 물질에 대한 굴절률(Refractive index)은 1.459, 흡수율(Absorption index)은 0.001로 하고, 용매인 DPBS의 온도 25 °C 및 그에 따른 점도(viscosity)는 1.0200 및 굴절률은 1.335의 값을 입력하여 측정하였다. 1회 측정은 15 번 반복으로 구성된 크기 측정으로 이루어졌고, 이를 6 회 반복하였다.

[0126] PDI 값이 낮을수록 해당 입자가 고르게 분포하고 있음을 나타내는 수치로, 본 발명의 나노입자는 매우 균일한 크기로 형성됨을 알 수 있었다.

[0127] **실시예 4. 인간 간암세포(Hep3B, Huh-7) 세포주에서 siRNA를 이용한 타겟 유전자의 발현억제 확인.**

[0128] 상기 실시예 1에서 제조된 서열번호 1번 내지 8번, 103번, 107번, 108번, 201번 내지 204번 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 이용하여 인간 간암 세포(Huh-7)를 형질전환시키고, 상기 형질전환된 간암세포(Huh-7) 세포주에서 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

[0129] 또한, 상기 실시예 1에서 제조된 서열번호 112번, 116번 내지 118번, 121번, 122번 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 이용하여 인간간암세포(Hep3B)를 형질전환시키고, 상기 형질전환된 간암세포(Hep3B) 세포주에서 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

[0130] **실시예 4-1. 인간 간암세포주의 배양**

[0131] 미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 간암세포(Hep3B 및 Huh-7) 세포주를 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 배양배지(GIBCO/Invitrogen, USA, 10%(v/v) 우태아 혈청, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 µg/ml)에서 37 °C, 5%(v/v) CO₂의 조건 하에 배양하였다. 한국세포주은행(Korean cell line bank, KCLB)로부터 입수한 인간 간암세포(Huh-7) 세포주를 RPMI-1640 배양배지(GIBCO/Invitrogen, USA, 10%(v/v) 우태아 혈청, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 µg/ml)에서 37 °C, 5%(v/v) CO₂의 조건 하에 배양하였다.

[0132] **실시예4-2. 인간 간암 세포주로의 목표 siRNA의 형질주입(transfection)**

[0133] 상기 실시예 4-1에서 배양된 1×10^5 Huh7 세포주 및 1×10^5 Hep3B 세포주를 37°C에서 5 %(v/v) CO₂의 조건하에 12-웰 플레이트에서 18시간 동안 EMEM에서 배양한 뒤, 배지를 제거한 후 각 웰당 500µl의 Opti-MEM 배지(GIBCO, 미국)를 분주하였다.

[0134] 또한, 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 1.5µl와 Opti-MEM 배지 248.5µl를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 서열번호 1번 내지 8번 및 ZBTB7A-Ref(J Biomed Biotechnol. 2009; 2009:514287, 서열번호 310, 센스서열: GGGCGUCAUGGACUACUAC)을 센스가닥으로 가지는 ZBTB7A에 대한 siRNA, 서열번호 103번, 107번, 108번, 112번, 116번 내지 118번, 121번, 122번 및 YAP1-Ref(Molecular Cell, Vol. 11, 11?23, January, 2003, 서열번호 311, 센스서열: GACAUCUUCUGGUCAGAGA)을 센스가닥으로 가지는 YAP1에 대한 siRNA, 서열번호 201번 내지 204번 및 CHD1L-Ref (J Clin Invest 2010 Apr 1;120(4): 1178-91, 서열번호 312, 센스서열: CGUAUUGGACAUGCCACGAAA)을 센스가닥으로 가지는 CHD1L에 대한 siRNA 및 서열번호 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA (1pmole/µl) 0.2, 1 또는 5µl를 Opti-MEM 배지 230µl에 첨가하여 최종 농도가 0.2 nM, 1nM, 5 nM, 또는 20 nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스 (Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다.

[0135] 그 후, Opti-MEM이 분주된 종양세포주의 각 웰에 형질주입용 용액을 각각 500µl씩 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하였다. 여기에 EMEM 배양배지 1ml씩 분주한 다음 24시간 동안 37°C에서 5%(v/v) CO₂의 조건 하에서 배양하였다.

[0136] **실시예4-3. 타겟 유전자mRNA의 정량분석**

[0137] 상기 실시예 4-2에서 형질주입된 세포주로부터 전체 RNA를 추출하여 cDNA를 제조한 뒤, 실시간 PCR(real-time PCR)을 이용하여 타겟 유전자의 mRNA 발현량을 상대정량 하였다.

[0138] **실시예4-3-1. 형질주입된 세포로부터 RNA 분리 및 cDNA 제조**

[0139] RNA 추출 키트(AccuPrep Cell total RNA extraction kit, BIONEER, 한국)를 이용하여, 상기 실시예 4-2에서 형

질주입된 세포주로부터 전체 RNA를 추출하고, 추출된 RNA는 RNA 역전사 효소(AccuPower CycleScript RT Premix/dT20, Bioneer, 한국)를 이용하여, 하기와 같은 방법으로 cDNA를 제조하였다. 구체적으로, 0.25ml 에펜도르프 튜브에 담겨있는 AccuPower CycleScript RT Premix/dT20(Bioneer, 한국)에 한 튜브 당 추출된 1 μ g씩의 RNA를 넣고 총 부피가 20 μ l가 되도록 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수를 첨가하였다. 이를 유전자 증폭기(MyGenie™ 96 Gradient Thermal Block, BIONEER, 한국)로 30℃에서 1분 동안 RNA와 프라이머를 혼성화하고, 52℃에서 4분간 cDNA를 제조하는 두 과정을 6번 반복한 뒤, 95℃에서 5분 동안 효소를 불활성화 시켜 증폭 반응을 종료하였다.

[0140] 실시예4-3-2. 타겟 유전자 mRNA의 상대정량 분석

[0141] 상기 실시예 4-3-1에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 실시간 PCR을 통해 간암 질환 연관 유전자 mRNA의 상대적인 양을 하기와 같은 방법으로 정량하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 상기 실시예 4-3-1에서 제조된 cDNA를 증류수로 5배 희석하고, 타겟유전자 mRNA 발현량 분석을 위해서 희석된 cDNA 3 μ l와 2× GreenStar™ PCR master mix(BIONEER, 한국)를 10 μ l, 증류수 6 μ l, qPCR 프라이머(F, R 각각 10pmole/ μ l, BIONEER, 한국, 표 2 참조)을 1 μ l 넣어 혼합액을 만들었다. 한편, 타겟유전자 mRNA의 발현량을 정규화하기 위해 하우스키핑 유전자(housekeeping gene, 이하 HK 유전자)인 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 표준 유전자로 하였다. 상기 혼합액이 담긴 96-웰 플레이트를 Exicycler™96 Real-Time Quantitative Thermal Block(BIONEER, 한국)을 이용하여 하기와 같은 반응을 수행하였다: 95℃에서 15분간 반응하여 효소의 활성화 및 cDNA의 이차구조를 없앤 뒤, 94℃에서 30초 변성(denaturing), 58℃에서 30초 어닐링(annealing), 72℃에서 30초 연장(extension), SYBR 그린 스캔(SYBR green scan)의 4개의 과정을 42 회 반복 수행하고, 72℃에서 3분간 최종 연장을 수행한 뒤, 55℃에서 1분간 온도를 유지하고, 55℃에서 95℃까지 멜팅 커브(melting curve)를 분석하였다. PCR이 종료된 후, 각각 수득한 타겟유전자의 Ct(threshold cycle) 값은 GAPDH 유전자를 통해 보정된 타겟유전자의 Ct 값을 구한 뒤, 유전자 발현저해를 일으키지 않는 컨트롤 서열의 siRNA(서열번호 301번, siCONT)가 처리된 실험군을 대조군으로 하여 Δ Ct 값의 차이를 구했다.

[0142] 상기 Δ Ct 값과 계산식 $2(-\Delta Ct) \times 100$ 을 이용하여 ZBTB7A 특이적 siRNA (서열번호 1번 내지 8번 ZBTB7A-Ref)가 처리된 세포의 타겟 유전자의 발현량을 상대정량 하였다(도 2). 또한 YAP1특이적 siRNA(서열번호 103번, 107번, 108번, 112번, 116번 내지 118번, 121번, 122번, YAP1-Ref)가 처리된 실험군은 상기 방법과 동일한 방법으로 YAP1 qPCR 프라이머와 GAPDH qPCR 프라이머를 이용하여 타겟 유전자의 mRNA를 상대적 정량하였다(도 3). 또한 CHD1L 특이적 siRNA(201번 내지 204번, CHD1L-Ref)가 처리된 실험군은 상기 방법과 동일한 방법으로 CHD1L qPCR 프라이머와 GAPDH qPCR 프라이머를 이용하여 타겟 유전자의 mRNA를 상대적 정량하였다(도 4).

[0143] 그 결과, 본 발명의 몇 종의 siRNA는 선행문헌의 siRNA 서열보다 높은 목표유전자 발현 저해를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 고효율의 siRNA 를 선별하기 위하여 0.2 nM과 1nM 농도에서 각 유전자에 대한 mRNA 발현량이 공통적으로 높게 감소된 서열번호 4, 118, 204번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 선택하였다.

표 2

[0144] qPCR primer 서열정보 (F, Forward primer, R, Reverse primer)

name	Sequence	SEQ ID NO.
GAPDH-F	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG	302
GAPDH-R	ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	303
ZBTB7A-F	AGTGCTTCTCCTGGCCGTTG	304
ZBTB7A-R	CGACCACCTGCACAGACACC	305
YAP1-F	GAACCGTTTCCCAGACTACC	306
YAP1-R	GCATCAGCTCCTCTCCTTCT	307
CHD1L-F	CCGATCACTCCGAAATAAA	308
CHD1L-R	GCCTCTTCCTTTTGCTCTT	309

[0145] 실시예 5. 인간 간암세포(Hep3B, Huh-7) 세포주에서 IC50(inhibition concentration 50%) 측정.

[0146] 상기 실시예 4-3-2에서 선정된 서열번호 4, 118, 204 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA를 이용하여 인간

간암세포(Hep3B, Huh-7)를 형질전환시키고, 상기 형질전환된 간암세포(Hep3B, huh-7) 세포주에서 타겟 유전자의 발현 양상을 분석하여 선정된 고효율의 siRNA의 IC50를 측정하여 siRNA 성능을 확인하였다.

실시예 5-1. 인간 간암세포주의 배양

미합중국 종균협회(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수한 인간 간암세포(Hep3B) 세포주는 실시예 4-1과 동일한 조건에서 배양하였다.

한국세포주은행(Korean cell line bank, KCLB)로부터 입수한 인간 간암세포(Huh-7) 세포주는 실시예 4-1과 동일한 조건에서 배양하였다.

실시예5-2. IC50 측정

상기 실시예 4-3-2에서 확인된 고효율의 siRNA 중 각 유전자에 대하여 한 종씩 선정하여 IC50의 확인을 통해, 해당 siRNA의 성능을 확인하였다. 상기 실시예 5-1에서 배양된 Hep3B 세포주는 4-2와 동일한 조건에서 배양한 뒤, 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 1.5 μ l와 Opti-MEM 배지 248.5 μ l를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 각각의 서열번호 4, 118, 204 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA (0.01 pmole/ μ l) 0.8, 4 μ l, 또는 4, 118, 204 및 301번을 센스가닥으로 포함하는 siRNA (1 pmole/ μ l) 0.2, 1, 5 또는 20 μ l를 Opti-MEM 배지 230 μ l에 첨가하여 최종 농도가 8 pM, 40pM, 0.2nM, 1 nM 5nM 또는 20nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스 (Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다

또한, 상기 실시예 5-1에서 배양된 1×10^5 Huh-7 세포주는 4-2와 동일한 조건에서 배양한 뒤, 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 1.5 μ l와 Opti-MEM 배지 248.5 μ l를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 각각의 서열번호 4, 118, 204 및 301번을 센스가닥으로 포함하는 siRNA (0.01 pmole/ μ l) 0.8, 4 μ l, 또는 4, 118, 204 및 301번을 센스가닥으로 포함하는 siRNA (1 pmole/ μ l) 0.2, 1 또는 5 μ l를 Opti-MEM 배지 230 μ l에 첨가하여 최종 농도가 8 pM, 40pM, 0.2nM, 1 nM 또는 5nM인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스 (Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다.

그 후, Opti-MEM이 분주된 종양세포주의 각 웰에 형질주입용 용액을 각각 500 μ l씩 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하였다. 여기에 RPMI 1640 배양배지 1ml씩 분주한 다음 24시간 동안 37℃에서 5%(v/v) CO₂의 조건 하에서 배양하였다.

형질주입된 세포주로부터 전체 RNA를 추출하여 cDNA를 제조한 뒤, 실시간 PCR(real-time PCR)을 이용하여 실시예 4-3과 동일한 방법으로 타겟 유전자의 mRNA 발현량을 상대정량 하였다.

서열번호 4번을 센스가닥으로 포함하는 siRNA IC50는 Hep3B 세포주에서 1~5nM사이로 관찰되었으며, Huh-7 세포주에서 0.2~1nM사이로 관찰되었다(도 5). 서열번호 118번을 센스가닥으로 포함하는 siRNA의 IC50는 Hep3B 세포주에서 1~5nM사이로 관찰되었으며, Huh-7 세포주에서 0.2~1nM사이로 관찰되었다(도 6). 서열번호 204번을 센스가닥으로 포함하는 siRNA의 IC50는 Hep3B세포주에서 8~40pM사이로 관찰되었으며, Huh-7 세포주에서 40pM~0.2nM 사이로 관찰되어 본 발명에서 선정된 siRNA의 고효율을 재확인 하였다(도 7).

실시예 6. ZBTB7A, YAP1 또는 CHD1L 특이적 siRNA에 의한 세포성장저해 확인

상기 실시예 4-3-2에서 확인된 고효율의 siRNA인 서열번호 4번, 118번 또는 204번 siRNA 를 IC50 이상의 농도인 5, 20, 100 nM로 형질전환시켜 세포 성장 저해 효과를 확인하였다.

상기 실시예 5-1에서 배양된 1×10^5 Huh-7 세포주를 37℃에서 5 %(v/v) CO₂의 조건하에 12-웰 플레이트에서 18 시간 동안 RPMI-1640에서 배양한 뒤, 배지를 제거한 후 각 웰당 500 μ l의 Opti-MEM 배지(GIBCO, 미국)를 분주하였다. 한편, 리포펙타민 RNAi 맥스(Lipofectamine™ RNAi Max, Invitrogen, 미국) 1.5 μ l와 Opti-MEM 배지

248.5 μ l를 혼합하여 혼합액을 제조하였고, 실온에서 5분간 반응시킨 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 각각의 서열번호 4번, 118번, 204번 및 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA (10 pmole/ μ l) 0.5, 2, 10 μ l를 Opti-MEM 배지 230 μ l에 첨가하여 최종 농도가 각각 5 nM 인 siRNA 용액을 제조하였다. 상기 리포펙타민 RNAi 맥스 (Lipofectamine™ RNAi Max) 혼합액과 siRNA 용액을 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켜 형질주입용 용액을 제조하였다.

[0159] 그 후, Opti-MEM이 분주된 종양세포주의 각 웰에 형질주입용 용액을 각각 500 μ l씩 분주하고 6시간 동안 배양한 후, Opti-MEM 배지를 제거하였다. 여기에 RPMI 1640 배양배지 1ml씩 분주한 다음 72 시간 동안 37℃에서 5%(v/v) CO₂의 조건 하에서 배양하였다.

[0160] 세포수 확인을 통해 서열번호 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA가 처리된 실험군과 대비하여 세포성장(cell proliferation) 저해정도를 확인하였다(도 8).

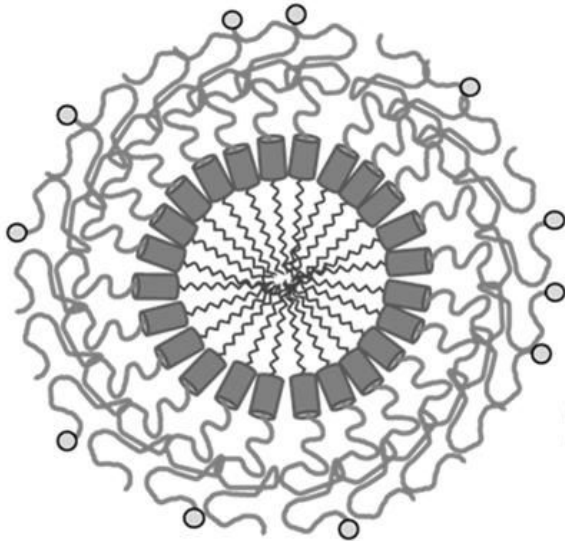
[0161] 실시예7. ZBTB7A 특이적 siRNA 또는 YAP1 특이적 siRNA에 의해 억제되는콜로니 형성 분석 (colony forming assay)

[0162] *in vitro* 상에서 단일세포(single cell)의 콜로니 형성 분석(colony forming assay)을 통해 세포의 암화(transformation)를 측정하는 방법은 반정량적(semi-quantitative)이고, 암세포가 보유하고 있는 세포의 접촉에 의한 세포 성장 억제의 상실(loss of contact inhibition) 및 고정-비의존적(anchorage independent)인 표현형적 특성에 기인한다. 상기 분석방법은 암세포에 특정 항암물질을 처리한 경우, *in vitro*상에서 해당 물질에 의한 암세포의 생존을 확인하는 용도로 사용이 된다(Clonogenic assay of cells *in vitro*. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9.).

[0163] 상기 실시예 4-3-2에서 선정된 고효율의 ZBTB7A 또는 YAP1 특이적 siRNA에 의해 암세포의 콜로니 형성(colony forming) 저해 정도를 확인하기 위해 콜로니 형성 분석(colony forming assay, CFA)를 수행하였다. 상기 실시예 5-1에서 배양된 Hep3B 와 Huh7 cell 을 직경 35 mm인 페트리디쉬(petri-dish)에 각각 1x10⁴으로 접종한 후, 20시간이 경과하였을 때 실시예 5-2와 동일한 방법으로 5nM 또는 100nM의 농도로 형질전환하였다. 형질전환된 세포들은 3일마다 배양배지를 교환해주었고, 형질전환 후 10일 또는 14일이 경과한 날에 Diff Quik(Sysmex, Japan)을 통해 염색하여 콜로니 형성정도를 비교하였다(도 9). 서열번호 4번 및 118번은 서열번호 301번을 센스가닥으로 가지는 siRNA로 처리된 대조군에 비하여 농도 의존적으로 매우 낮은 정도의 colony가 형성됨을 확인할 수 있었다(도 9).


도면

도면1




 Double stranded siRNA molecules

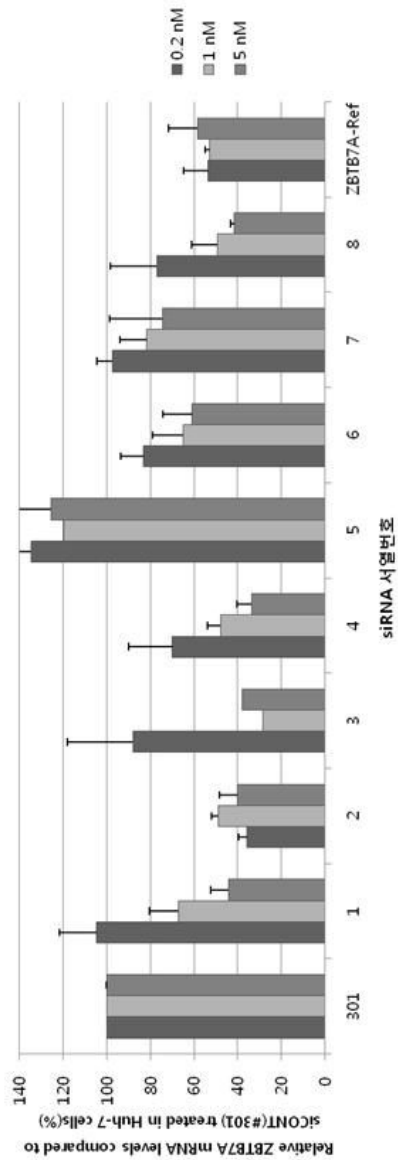
 Hydrophobic compound

 siRNA

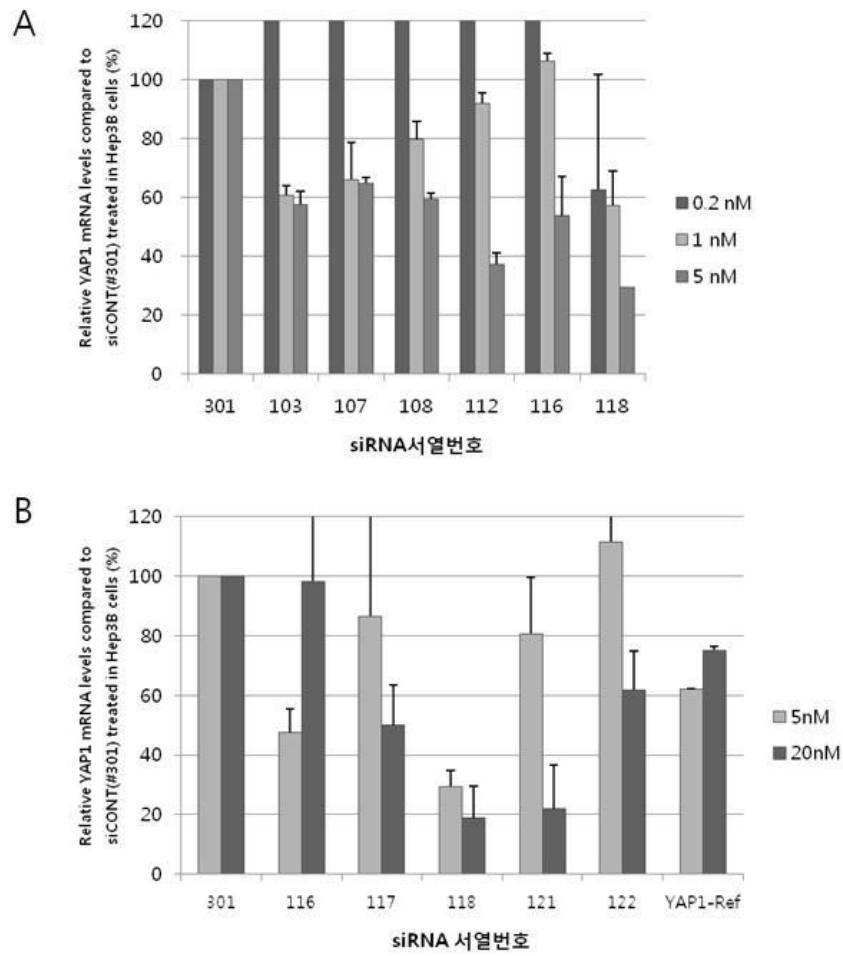
 Hydrophilic compound

 Target specific ligand

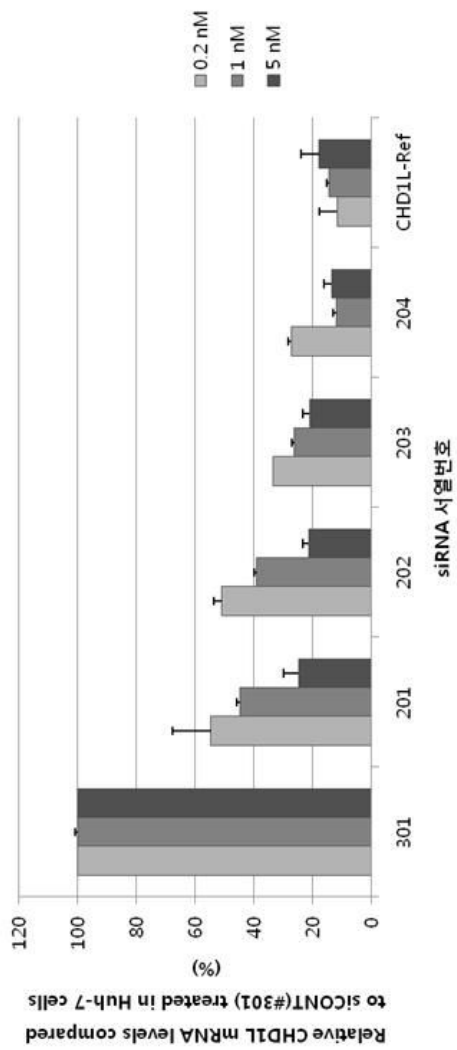
도면2



도면3

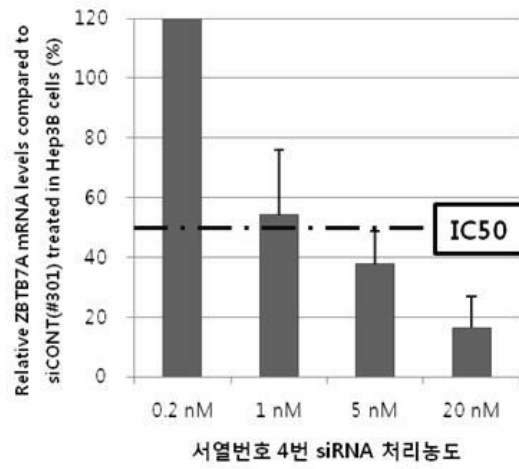


도면4

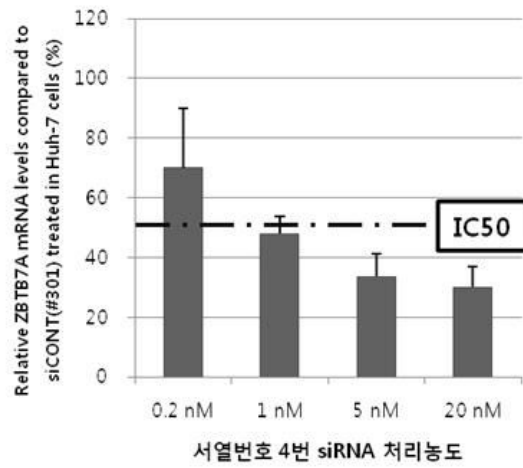


도면5

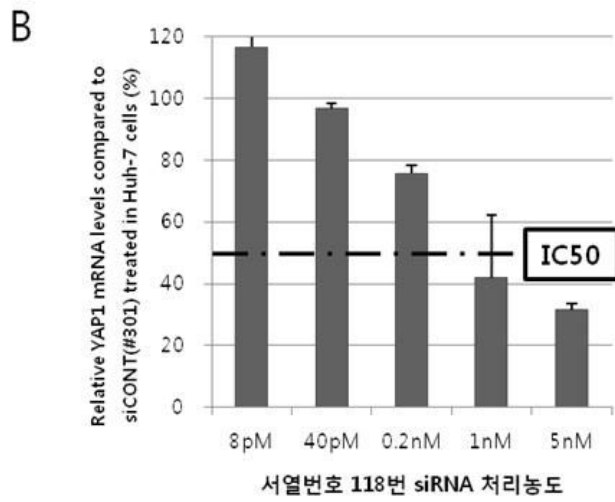
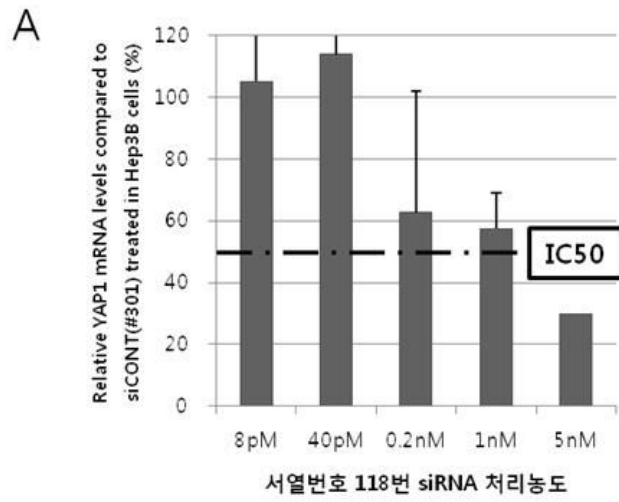
A



B

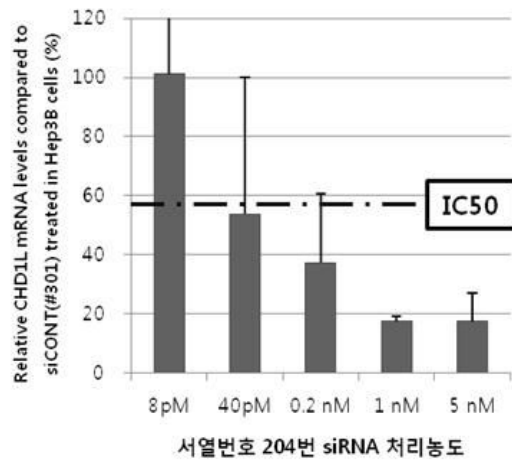


도면6

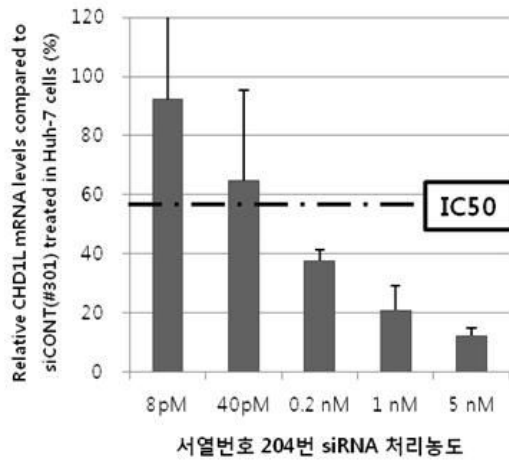


도면7

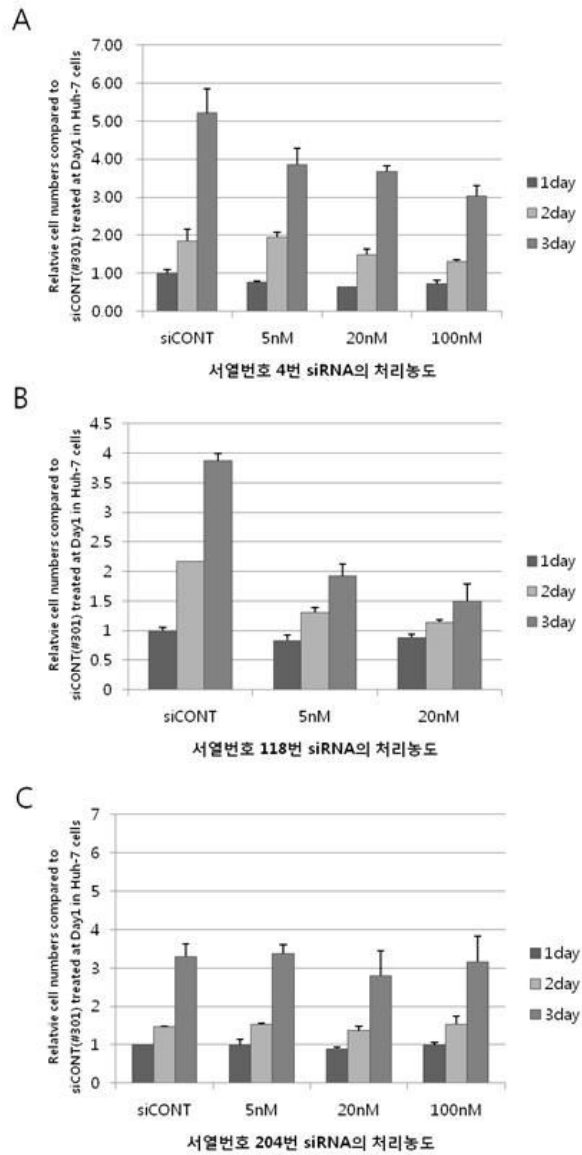
A



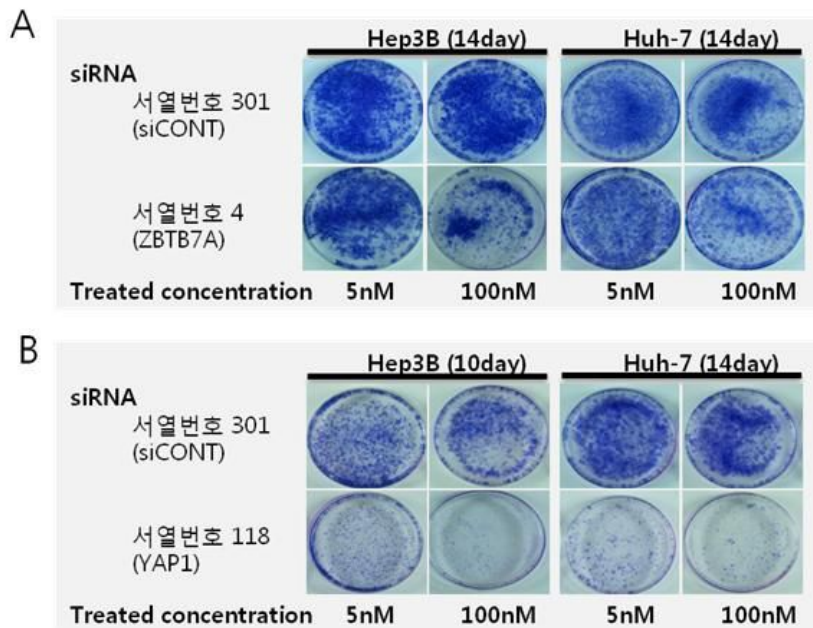
B



도면8



도면9



서열 목록

- <110> BIONEER CORPORATION
- <120> Liver cancer related genes-specific siRNA, double-stranded oligo RNA molecules comprising the siRNA, and composition for the prevention or treatment of cancer comprising the same
- <130> P13-B173
- <160> 312
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ZBTB7A
- <400> 1
- cagacaagac cuaaaauga
- <210> 2
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223>	ZBTB7A	
<400>	2	
guccgaugau gaccuggau		19
<210>	3	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	3	
gacaagcuga aggugcaca		19
<210>	4	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	4	
cucugagcgg acguaaaa		19
<210>	5	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	5	
gcagcuggac cuuguagau		19
<210>	6	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	6	
gcuggaccuu guagaucaa		19
<210>	7	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 7

cacauuuuuu cgucuuuu

19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 8

cacugagacu ucuugucaa

19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 9

ccucgcaaua aaaccaacu

19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 10

uguaacggaa cggguacua

19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 11

caaaauccaa ugucacaaa

19

<210> 12

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 12
 ccuuugccca caacuacga 19
 <210> 13
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 13
 cggacucgcc uaaaaacca 19

 <210> 14
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 14
 gaaucuaggg uagcgcuuu 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 15
 gacauccuga gugggcuga 19
 <210> 16
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 16

cugcacugag acuucuugu 19

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 17

acaagcugaa ggugcacau 19

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 18

aggcacugac uguaaucca 19

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 19

gacuacuacc ugaaguacu 19

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 20

gaaaacagaa acccgagaa 19

<210> 21

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	ZBTB7A	
<400>	21	
cacugagaca	caaaccuau	19
<210>	22	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	22	
cacaaauucc	aaugucaca	19
<210>	23	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	23	
cggaacgggu	acuacacuu	19
<210>	24	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	24	
gcuaugcaa	ugcuagcau	19
<210>	25	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	25	
cgcaauaaaa	ccaacucua	19
<210>	26	
<211>	19	

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	26	
	gguucugacg ugaagaggu	19
<210>	27	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	27	
	guuacaacca acuucuaug	19
<210>	28	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	28	
	auauauauga cgcgucaca	19
<210>	29	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	29	
	gcccaacu acgaccuga	19
<210>	30	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	30	
	cugcacagac accucaaga	19
<210>	31	

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 31
 acuacuaccu gaaguacuu 19

<210> 32
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 32
 cucugugaca cacacaucu 19

<210> 33
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 33
 gcacugacug uauccagg 19

<210> 34
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 34
 gcucugagcg gacguaaaa 19

<210> 35
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 35

cgguaacuuc acagccgga	19
<210> 36	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 36	
cgccuaaaaa ccaaaaaga	19
<210> 37	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 37	
cguuuggaga uucaaaacu	19
<210> 38	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 38	
ggcaaccaac cacauuaga	19
<210> 39	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 39	
gaacggguac uacacuuua	19
<210> 40	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	

<400>	40	
cggguacuac	acuuuauuc	19
<210>	41	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	41	
caaaggcacu	gacuguaau	19
<210>	42	
<211>	18	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	42	
guguacgaga	ucgacuuc	18
<210>	43	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	43	
guagaauc	cuucuguuc	19
<210>	44	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	44	
gcugcacuga	gacuucuug	19
<210>	45	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 45
 ucaagaaaga cggcugcaa 19
 <210> 46
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 46
 ugcauauagca augcuagca 19

 <210> 47
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 47
 ugagcccucu uuccaccuu 19
 <210> 48
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 48
 acgagauagca cuucgucag 19
 <210> 49
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 49
 cccacaacua cgaccugaa 19

 <210> 50

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 50
 ggacucgccu aaaaaccaa 19
 <210> 51
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 51
 ggguagcgc uucucagau 19
 <210> 52
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 52
 cuaugagucu uucagacaa 19

 <210> 53
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 53
 ggagauuca aacuucugu 19
 <210> 54
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 54
 ccaaugucac aaaagcaau 19

<210> 55
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 55
 cguagaaucc acuucuguu 19

<210> 56
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 56
 cuuuuaggac gaggacgag 19

<210> 57
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 57
 agaagaagau ccgagccaa 19

<210> 58
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 58
 agaaucuagg guagcgcuu 19

<210> 59
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A

<400>	59	
gguacuacac uuuaucuu		19
<210>	60	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	60	
cagggcacuu acuaaggga		19
<210>	61	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	61	
ggagaaagga gaucggacu		19
<210>	62	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	62	
cacauuagaa gucuuggca		19
<210>	63	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	63	
cuuggcacuu uguaacgga		19
<210>	64	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	ZBTB7A	
<400>	64	
cuuuguaacg	gaacgggua	19
<210>	65	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	65	
cucuuuuuac	ucaaaggca	19
<210>	66	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	66	
gguuuugguu	cccuucccu	19
<210>	67	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	67	
cuuucagaca	agaccuuaa	19
<210>	68	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	68	
ucugugacac	acacauuu	19
<210>	69	
<211>	19	

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	69	
	cugugacaca cacaucuuc	19
<210>	70	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	70	
	gcugcacuga gacuucuug	19
<210>	71	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	71	
	guuugcauau gcaaugcua	19
<210>	72	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	72	
	acguguacga gaucgacuu	19
<210>	73	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	73	
	agcuggaccu uguagauca	19

<210>	74	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	74	
ucccuccuuu	cugacguuu	19
<210>	75	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	75	
agagucacga	ucagaggaa	19
<210>	76	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	76	
ccaacguggg	ugacauccu	19
<210>	77	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	77	
agggcacuua	cuaagggag	19
<210>	78	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	78	

agccggacuc gccuaaaaa	19
<210> 79	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 79	
aacggguacu acacuuuau	19
<210> 80	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 80	
caagaccuua augauuuc	19
<210> 81	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 81	
ugcaagaccu ucguccgcu	19
<210> 82	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZBTB7A	
<400> 82	
gcacuuuaag gacgaggac	19
<210> 83	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	ZBTB7A	
<400>	83	
gagaaaggag	aucggacug	19
<210>	84	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	84	
gcacuuugua	acggaacgg	19
<210>	85	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	85	
acggaacggg	uacuacacu	19
<210>	86	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	86	
acguagaauc	cacuucugu	19
<210>	87	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A	
<400>	87	
cauuguuaaa	gggaagcuu	19
<210>	88	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 88

acaucugcaa gguccgcuu

19

<210> 89

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 89

ugaaggugca caugcggaa

19

<210> 90

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 90

acuucugucu ucguccucu

19

<210> 91

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 91

aggcaacagu gugggauaa

19

<210> 92

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 92

uuagaagucu uggcacuuu

19

<210> 93

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 93
 acugagacuu cuugucaau 19
 <210> 94
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 94
 acaucuucuc gucucuuuu 19

 <210> 95
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 95
 cucaagaaag acggcugca 19
 <210> 96
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 96
 ggcaacagug ugggauaaa 19
 <210> 97
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZBTB7A
 <400> 97

aaaaggcaac caaccacau

19

<210> 98

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 98

gcuugggccg guugaaugu

19

<210> 99

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 99

uccucccuag cucagggau

19

<210> 100

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A

<400> 100

gcacagacac cucaagaaa

19

<210> 101

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 101

cagaagauca aagcuacuu

19

<210> 102

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	YAP1	
<400>	102	
	gugcuaucau uagucacau	19
<210>	103	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	103	
	caggaaauga gaacaauga	19
<210>	104	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	104	
	gugaguaggu ucauaaugu	19
<210>	105	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	105	
	gaacaaaacg agcaugaau	19
<210>	106	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	106	
	cucagacuua gaagucaga	19
<210>	107	
<211>	19	

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	107	
	cucuucaacg ccgucauga	19
<210>	108	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	108	
	gaguacagac aguggacua	19
<210>	109	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	109	
	gaauuguggg ugugccuau	19
<210>	110	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	110	
	cuuggaagga gugccuaua	19
<210>	111	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	111	
	guagccacag auuaagauu	19
<210>	112	

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 112
 cgagaugaga guacagaca 19

<210> 113
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 113
 gguuuaccuu cauuuagcu 19

<210> 114
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 114
 cagauggagu uuuagagua 19

<210> 115
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 115
 gagaugagag uacagacag 19

<210> 116
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 116

gaguucugac auccuuaau	19
<210> 117	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 117	
gagauggaua caggugaua	19
<210> 118	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 118	
gcugccacca agcuagaua	19
<210> 119	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 119	
guacuuucag ugcuaaaa	19
<210> 120	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 120	
ccucgcaagc auguuguua	19
<210> 121	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	

<400>	121	
agaugagagu	acagacagu	19
<210>	122	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	122	
gagauggaau	gaacauaga	19
<210>	123	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	123	
gacagucuuc	uuugagau	19
<210>	124	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	124	
gacaguggac	uaagcauga	19
<210>	125	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	125	
guuguuucuu	cagcuuccu	19
<210>	126	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 126
 cgagcaugaa uaaacucuu 19
 <210> 127
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 127
 cugugauacc uggcacagu 19

 <210> 128
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 128
 ggagaccuaa gaguccuuu 19
 <210> 129
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 129
 guuugaauc uagccuuga 19
 <210> 130
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 130
 caaaaguggg uggcaauau 19

 <210> 131

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	131	
	gaugaaauugg aaaggagca	19
<210>	132	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	132	
	gccuuaguuu uggaaguua	19
<210>	133	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	133	
	ggaagugacu uugcuacaa	19
<210>	134	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	134	
	gcucauauugu uagguacuu	19
<210>	135	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	135	
	cuaguugua guucucauu	19

<210> 136
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 136
 gcugccauua aaggcagcu 19

<210> 137
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 137
 ggcaugagac aauuuccau 19

<210> 138
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 138
 ccuugaugug gucucuugu 19

<210> 139
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 139
 ccugcguagc caguuacca 19

<210> 140
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1

<400>	140	
gacucaaaau ccagugucu		19
<210>	141	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	141	
caagucugca ggaagcuuu		19
<210>	142	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	142	
ggaagugagc cuguuugga		19
<210>	143	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	143	
gcuuuauagu gguuuaccu		19
<210>	144	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	144	
gcaugcucau auguuaggu		19
<210>	145	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> YAP1

<400> 145

gcaccuauca cucucgaga

19

<210> 146

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 146

ggacuaagca ugagcagcu

19

<210> 147

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 147

gaguuugaau cauagccuu

19

<210> 148

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 148

gguggauuuu auccugca

19

<210> 149

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 149

cauaagccag uugcaguuu

19

<210> 150

<211> 19

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	150	
	gugucuacag gaguaauaa	19
<210>	151	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	151	
	ucaugucaca gcauuuagu	19
<210>	152	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	152	
	uguccuuguu ccuaaugua	19
<210>	153	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	153	
	ucagucaggg cuucuuga	19
<210>	154	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	154	
	ucacucucga gaugagagu	19

<210>	155	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	155	
ugaaggaucu aaggagaca		19
<210>	156	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	156	
gaguaauauu gguuuccaa		19
<210>	157	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	157	
uauuuuggcc cuucauuu		19
<210>	158	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	158	
gagauggcaa agacauuu		19
<210>	159	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	159	

cagcagaaua ugaugaacu	19
<210> 160	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 160	
caccaagcua gauaaagaa	19
<210> 161	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 161	
gcaccggaaa uuuccauaa	19
<210> 162	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 162	
ccaguggaaa aacaugauu	19
<210> 163	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 163	
gauuaucugc ucucucuuu	19
<210> 164	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	YAP1	
<400>	164	
guccuuguuc	cuaauguaa	19
<210>	165	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	165	
acagcauguu	cgagcucau	19
<210>	166	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	166	
cuagaauaag	cccuuuuuu	19
<210>	167	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	167	
gucucaggaa	uugagaaca	19
<210>	168	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	168	
cuaaaucugu	gaaggaucu	19
<210>	169	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 169

gaacaaacgu ccagcaaga

19

<210> 170

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 170

guguucuaga aagagcuau

19

<210> 171

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 171

cauaaagugc augacagaa

19

<210> 172

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 172

caccuaagua cacccacaa

19

<210> 173

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 173

gauguaagag caugcucau

19

<210> 174

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 174
 ggaugguggg acucaaaaau 19
 <210> 175
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 175
 gggcauacgg uagauuuu 19
 <210> 176
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 176
 cuagcaccuc uguguuuu 19
 <210> 177
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 177
 ggaaggagug ccuauaaau 19
 <210> 178
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 178

gaaggagugc cuauaaaauu

19

<210> 179

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 179

ucaccuaagu acaccaca

19

<210> 180

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 180

ugagauaccu gaugaugua

19

<210> 181

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 181

ucagggcuuc uuagaucua

19

<210> 182

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1

<400> 182

agauggaguu uuagaguag

19

<210> 183

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	YAP1	
<400>	183	
cgacagucuu cuuuugaga		19
<210>	184	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	184	
gaauugagaa caaugacga		19
<210>	185	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	185	
cucuguguuu uaagggu		19
<210>	186	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	186	
cuagaaugca aaauugggu		19
<210>	187	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	187	
guggauuuua uccucgcaa		19
<210>	188	
<211>	19	

<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	188	
	ccuacuucua ugcugaaaa	19
<210>	189	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	189	
	ggaacaaaac gagcaugaa	19
<210>	190	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	190	
	gcaaucacug uguuguaua	19
<210>	191	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	191	
	ccuaaguaca cccacaaaa	19
<210>	192	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1	
<400>	192	
	ggcuucuuag aucuacuaa	19
<210>	193	

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 193
 accguuuccc agacuaccu 19

<210> 194
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 194
 uggaaugaac auagaagga 19

<210> 195
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 195
 uugcucuucc uuguccauu 19

<210> 196
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 196
 ucuuacgaug cccucugua 19

<210> 197
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YAP1
 <400> 197

cuaugaagua auaguuggu	19
<210> 198	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 198	
caguuuucag gcuaauaca	19
<210> 199	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 199	
cucagcuugg gaagauaga	19
<210> 200	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> YAP1	
<400> 200	
cagucagggc uucuuagau	19
<210> 201	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 201	
uucuuacugc ggcuucaua	19
<210> 202	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	

<400>	202	
cuggauaagc	uacuagcau	19
<210>	203	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	203	
ggagccuuuu	gaaguugga	19
<210>	204	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	204	
cugcugcaua	agaccuugu	19
<210>	205	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	205	
cugagucagc	aagugaacu	19
<210>	206	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	206	
gagcuuccca	agaagacag	19
<210>	207	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 207
 cguuccaaug uccugucug 19
 <210> 208
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 208
 ccuccucaag acagcuggu 19

 <210> 209
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 209
 ggugggauc caacaaua 19
 <210> 210
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 210
 gcaucccaac uuacaua 19
 <210> 211
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 211
 cucaucgcau uggccaaaa 19

 <210> 212

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	212	
gaagaaagca aguguucau		19
<210>	213	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	213	
aguguucauc uuccacgua		19
<210>	214	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	214	
gucacguuuu caugucua		19
<210>	215	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	215	
gaguguucuu guuguggau		19
<210>	216	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	216	
gcucagcauc gugaucguu		19

<210> 217
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 217
 cuuggccaau aagaacuuu 19

<210> 218
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 218
 gaugaagcuc acagguuga 19

<210> 219
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 219
 ccuugucaga guucucagu 19

<210> 220
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 220
 cugaaacagg agucacguu 19

<210> 221
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L

<400>	221	
cacguuuuca	ugugcuacu	19
<210>	222	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	222	
cagcaaguga	acugcaciaa	19
<210>	223	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	223	
gugauauacc	auggcaugu	19
<210>	224	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	224	
cuuuggacag	cagcccauu	19
<210>	225	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	225	
gagguacugc	aaugagagua	19
<210>	226	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> CHD1L

<400> 226

cucagaauga cuugcaagc

19

<210> 227

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 227

caagaccuga aacaggagu

19

<210> 228

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 228

ccucaaguac guuaguggu

19

<210> 229

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 229

cuuugucccu ugucuguuu

19

<210> 230

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 230

agaaggaggc cauuuuacu

19

<210> 231

<211> 19

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 231
 agaaagcaag uguucaucu 19
 <210> 232
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 232
 gggcaagauu uguuggccu 19

 <210> 233
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 233
 gaaaaugaga cggcaaaga 19
 <210> 234
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 234
 ggagcaccau ggaugaaau 19
 <210> 235
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 235
 ccugguggga auccaacaa 19

<210>	236	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	236	
uugaaaauga gacggcaaa		19
<210>	237	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	237	
ugauuggucg agacacugu		19
<210>	238	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	238	
aguugaguga gauacucuaa		19
<210>	239	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	239	
gugaacugca caaacucuu		19
<210>	240	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	240	

cuccaagacu auauggauu	19
<210> 241	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 241	
cacuuggcca uuaagaacu	19
<210> 242	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 242	
guguucaucu uccacguau	19
<210> 243	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 243	
ucagcaagug aacugcaca	19
<210> 244	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 244	
ggccgaucac uccgaaaua	19
<210> 245	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	CHD1L	
<400>	245	
ccgaucacuc	cgaaaauaaa	19
<210>	246	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	246	
ggcagaggug	guuuuuuuu	19
<210>	247	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	247	
gggagguguc	uuuuuuuuu	19
<210>	248	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	248	
gaccuuguca	gaguucuca	19
<210>	249	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	249	
gugguuuuuu	uacagcucu	19
<210>	250	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 250

gcuugaaaaga ugcaucauu

19

<210> 251

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 251

cccaaaugac ccagauguu

19

<210> 252

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 252

caagacccag augcuacuu

19

<210> 253

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 253

cagcuugcua guugcauaa

19

<210> 254

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 254

ugaacaacug guaaaccuu

19

<210> 255

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	255	
	ucauugugca cugcguaga	19
<210>	256	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	256	
	agguuuuaac ugguauggu	19
<210>	257	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	257	
	cugcaauaga guauucaa	19
<210>	258	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	258	
	gacuaccuau gagauuugc	19
<210>	259	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	259	

cgaggaugcu cucauugug

19

<210> 260

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 260

gauuuguugg ccuugauug

19

<210> 261

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 261

gcuucuuacu gcggcuuca

19

<210> 262

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 262

gcugacaggg auucaccua

19

<210> 263

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L

<400> 263

cccugcugca uaagaccuu

19

<210> 264

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	CHD1L	
<400>	264	
gcuucgaaag	uguguggau	19
<210>	265	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	265	
gcugauuggu	cgagacacu	19
<210>	266	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	266	
gccaagagaa	ggagacuca	19
<210>	267	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	267	
cugcauaaga	ccuugucag	19
<210>	268	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	268	
gcuggauaag	cuacuagca	19
<210>	269	
<211>	19	

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 269
 cuccgaaaaua aaggcagug 19
 <210> 270
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 270
 ccauuuagaa cuuuggaca 19
 <210> 271
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 271
 cagaaaaccc uuuggaga 19

 <210> 272
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 272
 ggaguguucu uguugugga 19
 <210> 273
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 273
 ggaugguucu gugagagga 19
 <210> 274

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 274
 cagcuggagg gaguaacu 19

<210> 275
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 275
 guugagugag auacucaa 19

<210> 276
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 276
 gauuauucua aagagccca 19

<210> 277
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 277
 cagagguggu uuauuaca 19

<210> 278
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 278

gcauuuagau ggcagcccu	19
<210> 279	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 279	
ucaccaacau gaucauaga	19
<210> 280	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 280	
aguuggagac caccugacu	19
<210> 281	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 281	
uggucgagac acuguggaa	19
<210> 282	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	
<400> 282	
aacaauuacc aguccuucu	19
<210> 283	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CHD1L	

<400> 283
ccuacgcucu uaccagcug 19

<210> 284
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CHD1L
<400> 284
cugacuaccu augagauuu 19

<210> 285
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CHD1L
<400> 285
ggugggagau uuuaaucaa 19

<210> 286
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CHD1L
<400> 286
gaccuagau cauugaaa 19

<210> 287
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CHD1L
<400> 287
caccaacaug aucuagaa 19

<210> 288
<211> 19
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 288
 ccuccaguug agugagaua 19
 <210> 289
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 289
 cugguaaacc uucagaaaa 19

 <210> 290
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 290
 gcucugcuga gcuggauua 19
 <210> 291
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 291
 ccgagggaugc ucucuuugu 19
 <210> 292
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 292
 caauguccug ucuggcauu 19

 <210> 293

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	293	
auagaaggag gccauuuua		19
<210>	294	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	294	
acugcaauag aguauuuca		19
<210>	295	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	295	
caguugagug agauacuca		19
<210>	296	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	296	
ccuuaagaau uggcccagc		19
<210>	297	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CHD1L	
<400>	297	
ucccugcugc auaagaccu		19

<210> 298
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 298
 gcuugcuagu ugcauaaaua 19

<210> 299
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 299
 gcuggugccu uaagaauug 19

<210> 300
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHD1L
 <400> 300
 aacuuuggac agcagccca 19

<210> 301
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siCONT
 <400> 301
 cuuacgcuga guacuucga 19

<210> 302
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH-F

<400>	302	
ggtgaaggtc ggagtcaacg		20
<210>	303	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH-R	
<400>	303	
accatgtagt tgaggtcaat gaagg		25
<210>	304	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A-F	
<400>	304	
agtgcttctc ctggccgttg		20
<210>	305	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ZBTB7A-R	
<400>	305	
cgaccacctg cacagacacc		20
<210>	306	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	YAP1-F	
<400>	306	
gaaccgtttc ccagactacc		20
<210>	307	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> YAP1-R

<400> 307

gcatcagctc ctctccttct

20

<210> 308

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L-F

<400> 308

ccgatcactc cgaaataaa

19

<210> 309

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L-R

<400> 309

gcctcttctt tttgcctctt

20

<210> 310

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7A_Ref

<400> 310

gggcgucaug gacuacuac

19

<210> 311

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YAP1_Ref

<400> 311

gacauuuuuc ggucagaga

19

<210> 312

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHD1L_Ref

<400> 312

cguauuggac augccacgaa a

21