



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004924  
(43) 공개일자 2025년01월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/11 (2022.01)  
C12N 15/113 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7040420(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년08월14일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2020-7007211  
원출원일자(국제) 2018년08월14일  
심사청구일자 2021년08월12일
- (85) 번역문제출일자 2024년12월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/046772
- (87) 국제공개번호 WO 2019/036513  
국제공개일자 2019년02월21일
- (30) 우선권주장  
62/545,883 2017년08월15일 미국(US)

- (71) 출원인  
인텔리아 테라퓨틱스, 인크.  
미국, 매사추세츠 02139, 캠프릿지, 이리 스트리트 40
- (72) 발명자  
뎀브로브스키, 크리스찬  
미국 02139 매사추세츠주 캠프리지 에리 스트리트 40
- (74) 대리인  
양영준, 이상남

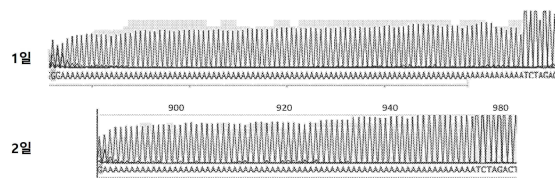
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 메신저 리보핵산(mRNA)을 암호화하는 안정화된 핵산

(57) 요약

본 개시는 폴리아데닐화된(폴리-A) 꼬리 분야에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, DNA 관심 단백질을 암호화 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 폴리-A 꼬리를 암호화하며, 여기서 상기 폴리-A 꼬리는 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 9/22** (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2830/50 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

관심 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 폴리아데닐화된(폴리-A) 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA로서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 8개의 연속 아데닌(A) 뉴클레오타이드의 제1 동중중합체 서열 및 하나 이상의 비-아데닌(A) 뉴클레오타이드를 포함하는 차단 서열을 포함하는 DNA.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 적어도 연속 아데닌(A) 뉴클레오타이드의 제2 동중중합체 서열을 추가로 포함하는 DNA.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 적어도 8개의 연속 아데닌(A) 뉴클레오타이드의 3개 이상의 동중중합체 서열을 포함하는 DNA.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제1 및/또는 후속 동중중합체 서열이 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드가 아데닌 뉴클레오타이드만을 함유하는 유사한 또는 동일한 길이의 3' 꼬리를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교하여 DNA 복제 동안 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드의 손실을 방지하는 DNA.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드가 상기 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 차단하도록 위치되어 폴리(A) 결합 단백질이 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치에 결합할 수 있는 DNA.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 적어도 50개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 40-1000, 40-900, 40-800, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200, 또는 40-100개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 95-100개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA.

#### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

#### 청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 96 또는 97개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 12**

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 차단 서열이 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 13**

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 차단 서열이 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2개 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 14**

청구항 12 또는 13에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드(들)이 적어도 8, 9, 10, 11 또는 12개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치하는 DNA.

**청구항 15**

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드가 적어도 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치하는 DNA.

**청구항 16**

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드가 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치하는 DNA.

**청구항 17**

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단 서열이 트리뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드 또는 모노뉴클레오타이드 차단 서열인 DNA.

**청구항 18**

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 19**

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 20**

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 21**

청구항 1 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 22**

청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 1개 초과 비-아데닌 뉴클레오타이드

또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 1개 초과인 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 23**

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1개 초과인 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 상기 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 1개 초과인 연속 스트레치가 폴리-A 꼬리 내에 불규칙적으로 이격되어 있는 DNA.

**청구항 24**

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 12개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 25**

청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 16개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 26**

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 25개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 27**

청구항 1 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 30개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 28**

청구항 1 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리-A 꼬리가 매 39개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유하는 DNA.

**청구항 29**

청구항 1 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 구아닌, 시토신, 또는 티민인 DNA.

**청구항 30**

청구항 29에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 구아닌 뉴클레오타이드인 DNA.

**청구항 31**

청구항 29에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 시토신 뉴클레오타이드인 DNA.

**청구항 32**

청구항 29에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 티민 뉴클레오타이드인 DNA.

**청구항 33**

청구항 29에 있어서, 하기로부터 선택된 1개 초과인 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA:

- a. 구아닌 및 티민 뉴클레오타이드;

- b. 구아닌 및 시토신 뉴클레오타이드;
- c. 티민 및 시토신 뉴클레오타이드; 또는
- d. 구아닌, 티민 및 시토신 뉴클레오타이드.

**청구항 34**

청구항 1 내지 청구항 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 구아닌, 시토신, 및 티민으로부터 선택된 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드로 구성되는 DNA.

**청구항 35**

청구항 1 내지 청구항 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 구아닌, 시토신 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA.

**청구항 36**

청구항 1 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드가 구아닌, 시토신 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 3개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA.

**청구항 37**

청구항 1 내지 청구항 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데닌 뉴클레오타이드가 아데노신 모노포스페이트인 DNA.

**청구항 38**

청구항 1 내지 청구항 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 치료적 단백질인 DNA.

**청구항 39**

청구항 38에 있어서, 상기 단백질이 사이토카인 또는 케모카인인 DNA.

**청구항 40**

청구항 38에 있어서, 상기 단백질이 성장 인자인 DNA.

**청구항 41**

청구항 38에 있어서, 상기 단백질이 Cas9 또는 변형된 Cas9인 DNA.

**청구항 42**

청구항 1 내지 청구항 41 중 어느 한 항의 DNA에 의해 암호화된 mRNA.

**청구항 43**

청구항 1 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA가 벡터 내에 있는 DNA.

**청구항 44**

청구항 43에 있어서, 상기 벡터가 숙주 세포 내에 있는 DNA.

**청구항 45**

청구항 43에 있어서, 아데닌 뉴클레오타이드만을 함유하는 유사한 또는 동일한 길이의 폴리-A 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교할 때 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드가 상기 숙주 세포의 성장 동안 상기 벡터 내의 폴리-A 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드의 손실을 방지하는 DNA.

**청구항 46**

하기를 포함하는, 청구항 43의 DNA 벡터로부터 mRNA를 생산하는 방법:

- a. 상기 폴리-A 꼬리의 하류(downstream)에 있는 벡터를 선형화하는 단계;
- b. 상기 선형화된 벡터를 변성시키는 단계; 및
- c. 구아닌, 시토신, 우라실 및 아데닌 뉴클레오타이드의 존재 하에서 상기 변성된 DNA를 RNA 폴리머라제와 접촉시키는 단계.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시는 안정화된 메신저 리보핵산(mRNA) 및 상기 안정화된 mRNA를 암호화하는 DNA 분야에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 폴리아데닐화는 메신저 RNA(mRNA)의 3' 말단에 다수의 아데닌 뉴클레오타이드를 부가하여, 폴리-A 꼬리를 형성하는 과정이다. 상기 폴리-A 꼬리는, 서열을 차단하는 다른 염기 없이, 다수의 반복된 아데닌 뉴클레오타이드, 예컨대, 아데노신 일인산염으로 이루어진다. 상기 폴리-A 꼬리는 mRNA의 핵 방출, 번역, 및 안정성에 중요하다. 천연에서, mRNA는 DNA에서 생성되므로, 말단 전이효소가 mRNA의 3' 말단에 아데닌 뉴클레오타이드를 부가한다. 이 효소 과정은 생체외에서 mRNA를 생성할 때 적용될 수 있으나, 이 과정은 제어하기 어렵고 상이한 길이의 폴리-A 꼬리를 초래한다. 플라스미드 내에 폴리-A 꼬리를 암호화함으로써, 상기 폴리-A 꼬리에서의 불균질성을 감소시키는 것이 가능하다. 그러나, 이것은 불균질성을 제거하지 못하며, 플라스미드의 잠재적 불안정과 같은 추가의 단점이 있다.

[0003] 상기 폴리-A 꼬리는 폴리-A-결합 단백질에 대한 결합 부위로서 작용한다. 폴리-A-결합 단백질은 핵으로부터의 mRNA 방출, 번역, mRNA의 분해를 억제하는 것을 돕는다. 핵으로부터의 방출 부재시, mRNA는 전형적으로 엑소좀에 의해 분해된다. 상기 폴리-A-결합 단백질은 번역에 필요한 단백질을 동원한다.

[0004] mRNA는, 예를 들어, 다양한 질환 및 장애의 치료를 위한 치료 분자로서 현재 사용되고 있다. mRNA는 단백질 대신에 대상체에 전달되어 대상체의 세포는 세포 내에서 mRNA에 의해 암호화된 단백질을 생산한다. 이들 및 다른 목적을 위해, mRNA는 종종 플라스미드에 함유된, DNA 주형으로부터의 전사를 통해 제조될 수 있다. mRNA 생산 동안, 상기 폴리-A 꼬리는 플라스미드로부터의 전사 후 또는 플라스미드 자체에 암호화된 후 효소적으로 mRNA에 부가될 수 있다. 상기 폴리-A 꼬리가 플라스미드 상에 암호화될 때, 상기 폴리-A 꼬리는 플라스미드 DNA 복제 주기에 걸쳐 더 짧아질 수 있고(즉, 아데닌 뉴클레오타이드를 상실할 수 있음), 결과로 생성된 DNA 및 후속 mRNA 집단에서 큰 변이를 초래할 수 있다. 따라서, 해당 기술분야에는 DNA 복제 동안 폴리-A 아데닌 뉴클레오타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드의 점진적 손실에 대해 안정적인고 내성있는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드를 설계할 필요성이 있다.

**발명의 내용**

[0005] 관심 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리아데닐화된(폴리-A) 꼬리를 암호화하는 DNA, 및 이를 포함하는 mRNA가 본 명세서에 개시되며, 여기서 상기 폴리-A 꼬리는 비-아데닌 뉴클레오타이드 "앵커"를 삽입함으로써 안정화된다.

[0006] 본 명세서에 사용된, 용어 "폴리-A 꼬리"는 mRNA 분자 상의 폴리-A 꼬리, 또는 DNA 플라스미드 내의 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열을 지칭한다. 폴리-A 꼬리는 플라스미드 내의 상보적 DNA 서열에 의해 암호화될 수 있다. DNA 서열 내의 반복 티민(T) 뉴클레오타이드의 서열, 예를 들어, 동중중합체(homopolymer) T 서열은, mRNA 상의 폴리-A 꼬리를 암호화할 수 있다. 2개 이상의 연속 아데노신(예를 들어, 아데노신 또는 테옥시아데노신), 티미딘, 또는 다른 뉴클레오타이드가 동중중합체로 지칭된다. 천연적으로 발생하는 폴리-A 꼬리는 길고 차단되지 않은 동중중합체 A 서열을 포함한다.

[0007] 본 명세서에 개시된, 비-아데닌 뉴클레오타이드 앵커는 규칙적이거나 불규칙적으로 이격된 간격으로 폴리-A 꼬리를 차단하고, 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA뿐만 아니라, DNA로부터 생성된 mRNA를 안정화시킨다. 예시적인 비-아데닌 뉴클레오타이드 앵커가 표 4에 제공되어 있다. 예를 들어, 앵커 서열은 폴리-A 꼬리 내의 2개의 아데닌 뉴클레오타이드 동중중합체 서열에 인접한다.

- [0008] 일부 실시형태에서, 관심 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 폴리아데닐화된(폴리-A) 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 조성물로서, 여기서 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 8개의 연속 아데닌(A) 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 비-아데닌(A) 뉴클레오타이드를 포함하는 조성물이 포괄된다.
- [0009] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0010] 일부 경우에, 아데닌 뉴클레오타이드만을 함유하는 유사한 또는 동일한 길이의 3' 꼬리를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교할 때 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 DNA 복제 동안 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드의 손실을 방지한다.
- [0011] 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 차단하도록 위치되어 폴리(A) 결합 단백질이 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치(stretch)에 결합할 수 있다.
- [0012] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 50개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 40-500개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0014] 일부 경우에서, 상기 폴리-A 꼬리는 95-100개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 96 또는 97개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드(들)은 적어도 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다.
- [0019] 일부 경우에서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 적어도 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 폴리-A 꼬리의 길이를 따라 임의의 위치에 불규칙적으로 이격된 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나 이상의 연속 스트레치를 가지며, 여기서 상기 폴리-A 꼬리의 길이를 따라 일부 위치에 적어도 8개의 연속 아데닌이 존재한다. 예를 들어, 폴리-A 꼬리는 길이가 70-1000개의 뉴클레오타이드일 수 있고, 적어도 8개의 연속 아데닌의 하나 이상의 스트레치가 존재하는 한, 상기 길이를 따라 불규칙적으로 이격된 임의의 수의 비-아데닌(단독 또는 그룹화된 것 중 어느 하나)을 가질 수 있다.
- [0022] 일부 경우에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0023] 일부 경우에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.

- [0024] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0025] 일부 경우에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 이 폴리-A 꼬리 내에 불규칙적으로 이격된 차단 서열로서 1개 초과와 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 뉴클레오타이드의 1개 초과와 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 이 폴리-A 꼬리 내에 불규칙적으로 이격된 1개 초과와 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 1개 초과와 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0028] 일부 경우에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 12개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 16개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 25개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0031] 일부 경우에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 30개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 39개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 또는 티민이다. 일부 경우에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 시토신 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 티민 뉴클레오타이드이다.
- [0034] 일부 경우에서, 1개 초과와 비-아데닌 뉴클레오타이드가 존재하는 경우, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 하기로부터 선택될 수 있다: a) 구아닌 및 티민 뉴클레오타이드; b) 구아닌 및 시토신 뉴클레오타이드; c) 티민 및 시토신 뉴클레오타이드; 또는 d) 구아닌, 티민 및 시토신 뉴클레오타이드.
- [0035] 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중에서 선택된 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드로 구성된다.
- [0036] 일부 경우에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 3개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0038] 상기 아데닌 뉴클레오타이드는 아데노신 모노포스페이트일 수 있다.
- [0039] 일부 실시형태에서, mRNA에 의해 암호화된 단백질은 치료적 단백질이다. 일부 경우에서, 상기 단백질은 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, Cas9 또는 변형된 Cas9이다.
- [0040] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 DNA에 의해 암호화된 mRNA가 포괄된다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 상기 DNA는 벡터 내에 있다. 상기 벡터는 곤충, 박테리아, 또는 포유동물(예를 들어, 사람) 세포를 포함하는 숙주 세포 내에 있을 수 있다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 아데닌 뉴클레오타이드만을 함유하는 유사한 또는 동일한 길이의 폴리-A 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교할 때 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는



부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 25개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 30개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 39개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 또는 티민이다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 시토신 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 티민 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA는 하기로부터 선택된 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다: (a) 구아닌 및 티민 뉴클레오타이드; (b) 구아닌 및 시토신 뉴클레오타이드; (c) 티민 및 시토신 뉴클레오타이드; 또는 (d) 구아닌, 티민 및 시토신 뉴클레오타이드. 상기한 일부 실시형태에서, 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중에서 선택된 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시형태에서, 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 3개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 아데닌 뉴클레오타이드는 아데노신 모노포스페이트이다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 치료적 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 사이토카인 또는 케모카인이다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 성장 인자이다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 Cas9 또는 변형된 Cas9이다.

[0046] 본 개시는 또한 이전 단락에 기재된 바와 같은 DNA에 의해 암호화된 mRNA를 포함한다.

[0047] 일부 실시형태에서, 이전 단락에 기재된 DNA는 또한 벡터 내에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 벡터는 숙주 세포 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA가 벡터 내에 있는 경우, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는, 아데닌 뉴클레오타이드만을 함유하는 유사한 또는 동일한 길이의 폴리-A 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교하여, 상기 숙주 세포의 성장 동안 상기 벡터 내에서 폴리-A 꼬리를 암호화하는 뉴클레오타이드의 손실을 방지한다.

[0048] 본 개시는 또한, 하기 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 DNA 벡터로부터 mRNA를 생성하는 방법을 포괄한다: (a) 폴리-A 꼬리의 하류에 있는 벡터를 선형화하는 단계; (b) 상기 선형화된 벡터를 변성시키는 단계; 및 (c) 구아닌, 시토신, 우라실, 및 아데닌 뉴클레오타이드의 존재 하에서 상기 변성된 DNA를 RNA 폴리머라제와 접촉시키는 단계.

### 도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 성장 라운드에 걸쳐 길이가 감소하는 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열을 도시한다. 각 클론은 클론을 암호화하는 플라스미드를 발현하는 숙주 세포의 연속적인 성장/정제 라운드에 의해 생성된 DNA를 지칭한다.

도 2는 2회의 성장 계대에 걸쳐 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리의 크기 유지를 도시한다.

도 3은 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA 또는 비-아데닌 뉴클레오타이드 및 SEAP(서열번호: 8)를 표적으로 삼는 단일 가이드 RNA를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA를 사용한 Cas9 mRNA 검정에서 측정된 분비된 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP) 수준을 도시한다.

도 4는 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA 또는 비-아데닌 뉴클레오타이드 및 SEAP(서열번호: 8)를 표적으로 삼는 단일 가이드 RNA를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA를 사용한 24시간 인큐베이션으로의 Cas9 mRNA 검정에서 측정된 SEAP 억제%를 도시한다.

도 5는 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA 또는 비-아데닌 뉴클레오타이드 및 SEAP(서열번호: 8)를 표적으로 삼는 단일 가이드 RNA를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA를 사용한 48시간 인큐베이션으로의 Cas9 mRNA 검정에서 측정된 SEAP 억제%를 도시한다.

도 6은 대조군 혈청전환 및 저장 용액(TSS) 완충액의 투약, 또는 서열번호: 9의 단일 가이드 RNA(마우스 TTR 유전자를 표적으로 삼음) 및 서열번호: 6(HiCas9 mRNA) 또는 서열번호: 7(파손된 폴리-A mRNA)에 의해 암호화된 mRNA 중 어느 하나로 제형화된 액체 나노입자(LNP)의 투약 7일 경과 후 마우스에서의 혈청 트랜스티레틴(TTR)

수준을 도시한다.

도 7은 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA 또는 비-아데닌 뉴클레오타이드 및 SEAP(서열번호: 8)를 표적으로 삼는 단일 가이드 RNA를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA를 사용한 48시간 인큐베이션으로의 Cas9 mRNA 검정에서 측정된 SEAP 억제%를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0050] 관심 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 폴리아데닐화된 꼬리를 암호화하는 DNA가 본원에 개시되며, 여기서 상기 폴리-A 꼬리는 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. DNA 복제 동안, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA는 아데닌 뉴클레오타이드만으로 구성된 폴리-A 꼬리와 비교하여 폴리-A 꼬리 내의 아데닌 뉴클레오타이드의 점진적인 손실을 더 적게 나타낼 수 있다. 따라서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드가 제공된다. 이러한 DNA에 의해 암호화된 mRNA도 포괄된다. DNA 및 RNA 둘 다는 비-차단된 폴리-A 꼬리를 포함하는 유사한 분자보다 아데닌 뉴클레오타이드의 처리(processive) 손실에 대해 더 큰 안정성을 나타낼 수 있다.
- [0051] 상기 관심 단백질은 임의의 천연 또는 비-천연 단백질일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "단백질"은 연속 아미노산의 임의의 서열을 지칭한다. 이와 같이, 단백질은 천연적으로 발생하는 단백질의 전체 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 지칭할 수 있다. 또한, 단백질은 전장 단백질의 단편을 포함하는 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 단백질은 천연적으로 발생하는 서열, 하나 이상의 변형을 갖는 천연적으로 발생하는 서열, 또는 천연에서 발생하지 않는 인공 서열일 수 있다.
- [0052] 상기 관심 단백질은 대상체에서 치료학적으로 사용될 수 있거나, 이 단백질은 생화학 반응에서 사용될 수 있다. 치료 단백질은, 다른 것들 중에서, 예를 들어, 성장 인자, 백신 또는 면역-종양학용 항원, 및 효소를 포함한다. 치료 단백질은 천연적으로 발생된 것이거나 변형된 것일 수 있다. 특정 상황에서, 변형된 단백질은 융합 단백질일 수 있다.
- [0053] 일부 실시형태에서, mRNA에 의한 단백질의 발현은 질환의 치료제로서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, mRNA에 의한 단백질의 발현은 암 면역요법, 감염성 질환에 대한 백신접종, I 형 알레르기에 대한 내성을 유도하기 위해, 대체 요법으로서, 또는 재생 의학으로서 사용하기 위한 것이다(문헌[Sergeeva OV et al, *Biochemistry (Moscow)* 81(7):709-722 (2016)] 참조).
- [0054] 일부 실시형태에서, 자가 수지상 세포는 전이성 전립선 암을 지닌 대상체에서 T-세포 면역 반응을 조절하기 위해 전립선-특이적 항원(PSA)을 암호화하는 mRNA로 생체 외에서 형질감염된다.
- [0055] 일부 실시형태에서, mRNA는 예방 백신이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 하나 이상의 항원성 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 상기 항원성 단백질(들)은 바이러스성 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 신체의 세포가 항원성 단백질을 생성하고 발현하게 한다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 위험 또는 질환 또는 개체 사이에 전파없이 항원성 단백질의 발현을 유발한다. 일부 실시형태에서, 항원성 단백질의 발현은 대상체의 면역계가 항체를 생성하게 한다. 일부 실시형태에서, 이들 항체는 바이러스를 중화시키고 바이러스에 노출된 후 미래의 감염을 예방할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 감염성 질환에 대한 예방 백신이다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 인플루엔자, 치쿤군야, 지카, 사이토메갈로바이러스, 사람 메타뉴모바이러스(HMPV), 또는 파라인플루엔자 바이러스 유형 3(PIV3)에 대한 예방 백신이다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 인플루엔자 H10 또는 H7 아형에 대한 예방 백신이다.
- [0056] 일부 실시형태에서, mRNA는 개인화된 암 백신이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 암 세포를 인식하고 반응을 나타내기 위해 암을 가진 대상체의 면역계를 프라이밍한다. 일부 실시형태에서, 이 반응은 개별 환자의 암 또는 종양에 맞춤화된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 환자의 특이적 신생항원(환자의 암 또는 종양에 존재하는 돌연변이를 갖는 특유 단백질)을 암호화한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 환자의 특이적 신생항원의 발현을 유발한다. 일부 실시형태에서, 신생항원의 발현은 암 세포를 인식하고 파괴하기 위해 환자에서 특이적 면역 반응을 유발한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 개인화된 암 백신으로서 사용된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 항-PD-1 요법과 같은 하나 이상의 체크 포인트 억제제 항체와 함께 개인화된 암 백신으로서 사용된다.
- [0057] 일부 실시형태에서, mRNA는 종양내 면역-종양학에 사용된다. 일부 실시형태에서, 종양으로의 mRNA의 주사는 표적이탈(off-target) 효과를 감소시키고/시키거나 전신 투여와 비교하여 더 강력할 수 있다. 일부

실시형태에서, 상기 mRNA는 CD134에 대한 리간드인 OX40L(CD252)의 발현을 유발한다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 인터루킨 12(IL-12)와 같은 사이토카인의 발현을 유발한다.

[0058] 일부 실시형태에서, mRNA는 국소 요법을 위한 단백질의 발현을 야기한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 국소 조직에서 더 많은 혈관의 생성 및 개선된 혈액 공급을 야기한다. 일부 실시형태에서, 상기 mRNA는 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF-A)의 발현을 유발한다. 일부 실시형태에서, VEGF-A의 발현은 국소적이고 일시적이다. 일부 실시형태에서, VEGF-A의 국소 및 일시적 발현은 심부전의 치료 또는 심장마비 후, 당뇨병성 상처 치유, 또는 다른 허혈성 혈관 질환의 치료에 사용된다.

[0059] 일부 실시형태에서, mRNA는 대체 요법을 위한 단백질의 발현을 야기한다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 계면 활성제 단백질-B이다.

[0060] 일부 실시형태에서, mRNA는 RNA-가이드된 뉴클레아제, 예컨대, 부류 2 CRISPR-연관된 Cas 엔도뉴클레아제, 예를 들어 Cas9/Csn1(Cas9)의 발현을 유발한다. 예시적인 Cas9 서열은 UniProt Q99ZW2이다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질은 또 다른 기능성 단백질 또는 펩타이드에 융합된 변형된 Cas9 또는 Cas9 단백질이다. 비활성인, 하나의 촉매 도메인, RuvC 또는 HNH 중 어느 하나를 갖는 Cas9의 변형된 버전을 "닉카제"라고 한다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물 및 방법은 닉카제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물 및 방법은 표적 DNA에서 이중 가닥 파괴보다 닉을 유도하는 닉카제 Cas9를 포함한다.

[0061] 일부 실시형태에서, 상기 Cas 단백질은 단지 하나의 기능성 뉴클레아제 도메인을 함유하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 Cas 단백질은 핵산 절단 활성을 감소시키기 위해 뉴클레아제 도메인 중 하나가 돌연변이되거나 완전히 또는 부분적으로 결실되도록 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성이 감소된 RuvC 도메인을 갖는 닉카제 Cas가 사용된다. 일부 실시형태에서, 불활성 RuvC 도메인을 갖는 닉카제 Cas가 사용된다. 일부 실시형태에서, 활성이 감소된 HNH 도메인을 갖는 닉카제 Cas가 사용된다. 일부 실시형태에서, 불활성 HNH 도메인을 갖는 닉카제 Cas가 사용된다.

[0062] 일부 실시형태에서, 키메라 Cas 단백질은 상기 DNA에 의해 암호화되며, 여기서 상기 단백질의 하나의 도메인 또는 영역은 다른 단백질의 일부로 대체된다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제 도메인은 FokI과 같은 다른 뉴클레아제로부터의 도메인으로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 변형된 뉴클레아제일 수 있다.

[0063] **I. 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA**

[0064] 본 명세서에 사용된, "폴리-A 꼬리"는 mRNA의 3' 말단에 아데노신 또는 다른 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 서열을 지칭한다. 천연 폴리-A 꼬리는 아데닌 뉴클레오타이드만으로 구성될 수 있지만, 본 발명의 "폴리-A 꼬리"는 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드 "앵커"에 의해 안정화된다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 차단 서열을 포함한다. 다시 말해서, 본 발명의 폴리-A 꼬리는 적어도 8개의 연속 아데닌을 포함하지만, 차단 또는 앵커 서열 내에 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 본 명세서에 개시된 차단 서열은 규칙적으로 또는 불규칙적으로 이격된 간격으로 폴리-A 꼬리를 차단하고 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA뿐만 아니라 상기 DNA로부터 생성된 mRNA를 안정화시킨다. 예시적인 차단 서열이 표 4에 제공된다.

[0065] 본원에 사용된, "비-아데닌 뉴클레오타이드"는 아데닌을 포함하지 않는 임의의 천연 또는 비 천연 뉴클레오타이드를 지칭한다. 구아닌, 티민 및 시토신 뉴클레오타이드는 예시적인 비-아데닌 뉴클레오타이드다.

[0066] DNA의 mRNA로의 전사 후 시작되는 폴리아데닐화 과정에서 천연 폴리-A 꼬리가 첨가된다. 그러나, 분자 생물학 방법에서, 폴리-A 꼬리는 종종 관심 단백질을 암호화하는 플라스미드 내의 DNA 섹션에 의해 암호화된다. 이 경우, 폴리-A 꼬리의 크기(즉, 폴리-A 꼬리에 포함된 아데닌 뉴클레오타이드의 수)는 이들 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 암호화하는 플라스미드 내의 DNA 뉴클레오타이드의 수에 직접적으로 의존한다.

[0067] 상기 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA 뉴클레오타이드의 수는, 예를 들어, 숙주 세포에서 플라스미드의 성장 동안 DNA 복제 동안 점진적으로 감소할 수 있다. 플라스미드에서 연속 아데닌-코딩 뉴클레오타이드의 수가 감소하면, 전장 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드의 수율이 감소되고, 더 짧은 폴리-A 꼬리를 가진 생성된 mRNA는 안정성이 감소되고/되거나 분해가 증가될 수 있다. 예를 들어, 40개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA는 90개 이상의 뉴클레오타이드의 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA보다 안정성이 더 낮을 것으로 예상될 수 있다. 안정성이 낮다는 것은 mRNA가 더 빨리 분해될 수 있고, 결과적으로 더 짧은 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA로부터 표적 단백질의 발현이 감소됨을 의미한다. 이와 같이, 숙주 세포 내에서 DNA 복제의 다수의

라운드에서 걸쳐 DNA 플라스미드 내에서 폴리-A 꼬리의 길이를 유지하는 것이 유리하다. 또한, 상기 폴리-A 꼬리는 번역에 중요할 수 있고, 더 긴 폴리-A 꼬리를 유지하는 것은 mRNA로부터의 개선된 단백질 발현을 초래할 수 있다.

[0068] 관심 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 폴리-A 꼬리 내에 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 포함은, 아데닌 뉴클레오타이드만을 함유하는 유사한 또는 동일한 길이의 3' 폴리-A 꼬리를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교하여, DNA 복제 동안 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드의 손실을 방지할 수 있다. 더 긴 폴리-A 꼬리의 존재는 또한 mRNA로부터 단백질 번역 효율을 향상시킬 수 있다.

[0069] **A. 아데닌 뉴클레오타이드**

[0070] 본 발명의 폴리-A 꼬리에서 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 폴리-A-결합 단백질이 연속 아데노신에 결합하도록 설계된다. 본 명세서에 사용된, "폴리-A 결합 단백질", "폴리 A 결합 단백질" 또는 "폴리아데닐화된-결합 단백질"은 mRNA의 폴리-A 꼬리에 결합하는 단백질을 지칭한다. 폴리-A 결합 단백질은 번역개시를 조절하는 기능을 할 수 있다. 폴리-A 꼬리에 결합함으로써, 폴리-A 결합 단백질은 이들을 ZCCHC6/ZCCHC11에 의한 우리딜화로부터 보호하여 mRNA 안정성에 기여할 수 있다. 폴리-A 결합 단백질은 세포질과 핵 사이를 왕복하는 비번역된 mRNA를 함유하는 세포질 메신저 리보 핵 단백질(mRNP) 과립에 국소화될 수 있다. 예시적인 폴리-A 결합 단백질은 PABPC1(Uniprot 참조번호: P11940)이다. 본 발명의 DNA는 mRNA로 전사될 때 하나 이상의 폴리-A 결합 단백질이 상기 폴리-A 꼬리에 결합하는 능력을 유지하도록 충분한 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 암호화할 수 있다. 차단된 비-아데닌 뉴클레오타이드 앵커는 이 기능적인 수의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 배치된다.

[0071] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 차단하도록 위치되어 폴리-A 결합 단백질이 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치(즉, 아데닌 뉴클레오타이드 동종중합체 또는 "동종중합체 A")에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드는 8, 9, 10, 11, 및/또는 12개의 연속 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 및/또는 40개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 및/또는 90개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 폴리-A RNA 서열 중의, 동종중합체는, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 또는 40개의 연속 아데노신 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드 서열 중의, 동종중합체는, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 또는 40개의 연속적인 티미딘 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 상이한 길이의 2개 이상의 동종중합체 A 서열을 포함하며, 예를 들어, 상기 폴리-A 꼬리 내의 차단 서열은 불규칙적으로 이격된다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 규칙적으로 이격된 차단 서열 및 동일한 길이의 둘 이상의 동종중합체를 포함한다.

[0072] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 제1 동종중합체 서열, 적어도 5개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 제2 동종중합체 서열, 및 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 앵커를 포함한다.

[0073] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 하나 이상의 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 8 내지 100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 하나 이상의 세트를 포함한다. 다수 세트의 연속 아데닌 뉴클레오타이드, 즉 다수의 동종중합체 서열을 지닌 폴리-A 꼬리의 경우, 각 세트의 아데닌 뉴클레오타이드는 동일한 길이일 필요는 없다.

[0074] 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 수 이외에, 폴리-A 꼬리는 또한 총 아데닌 뉴클레오타이드의 수를 특징으로 할 수 있다. 총 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 단순히 폴리-A 꼬리의 모든 아데닌 뉴클레오타이드의 합이다. 따라서, 아데닌 뉴클레오타이드의 연속적 또는 비연속적 그룹화의 상이한 그룹의 모든 아데닌 뉴클레오타이드는 폴리-A 꼬리의 총 아데닌 뉴클레오타이드 수에 포함될 것이다.

[0075] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-210, 210-220, 220-230, 230-240, 240-250, 250-260, 260-270, 270-280, 280-290, 290-300, 300-310, 310-320, 320-330, 330-340, 340-350, 350-360, 360-370, 370-380, 380-390, 390-400, 400-410, 410-420, 420-430, 430-440, 440-450, 450-460, 460-470, 470-480, 480-490, 490-500, 500-510, 510-520, 520-530, 530-540, 540-550, 550-560, 560-

570, 570-580, 580-590, 또는 590-600개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 길이가 적어도 8, 9, 10, 12, 25, 30, 50개 뉴클레오타이드인 하나 이상의 동중중합체 A 서열을 포함한다.

[0076] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 40-1000, 40-900, 40-800, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200, 또는 40-100개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0077] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 40개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 50개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 적어도 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 또는 300개의 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 96 또는 97개의 총 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.

[0079] 일부 실시형태에서, 상기 아데닌 뉴클레오타이드는 아데노신 모노포스페이트이다. 상기 뉴클레오타이드는 변형될 수 있다.

[0080] **B.비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 차단 서열**

[0081] 본 발명의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신 또는 티민과 같은 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 상기 뉴클레오타이드는 변형될 수 있다.

[0082] 일부 실시형태에서, 폴리-A 꼬리는 폴리-A 꼬리 내에 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 아데닌 뉴클레오타이드로만 구성된다. 상기 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 아데닌 뉴클레오타이드의 서열을 차단할 수 있다. 상기 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신 및 티민으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 시토신 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 티민 뉴클레오타이드이다. 상기 차단 서열은 모노뉴클레오타이드, 디뉴클레오타이드, 트리뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 상기 차단 서열은 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0083] 일부 실시형태에서, 단일 비-아데닌 뉴클레오타이드는 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 세트 또는 그룹을 차단시킬 수 있다. 폴리-A 결합 단백질이 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치에 결합할 수 있는 방식으로 상기 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드가 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 차단하도록 위치될 수 있다.

[0084] 일부 실시형태에서, 폴리-A 꼬리 내에 1개 초과 비-아데닌 뉴클레오타이드가 존재한다. 폴리-A 결합 단백질이 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치에 결합할 수 있는 방식으로 상기 1개 초과 비-아데닌 뉴클레오타이드가 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 차단하도록 위치될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비-아데닌 뉴클레오타이드는 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 1개 초과 세트 사이에 산재되어 있으며, 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 각각의 시리즈 내의 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 폴리-A 결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분하다.

[0085] 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 1개 초과 비-아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치 내에 있을 수 있다. 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 1개 초과 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 연속적인 뉴클레오타이드의 스트레치일 수 있다. 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 연속 아데닌 뉴클레오타이드, 예를 들어, 하나 이상의 동중중합체 A서열의 하나 이상의 세트 사이에 산재된 차단 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드의 수는 1, 2, 3, 4 또는 5개일 수 있다. 일부 실시형태에서, 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 연속 스트레치가 존재한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 연속 스트레치가 존재한다.

[0086] 상기 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드는 1개 초과 동일한 뉴클레오타이드일 수 있거나 또는 상기 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드는 서로 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 1개 초과 구아닌, 시토신 또는 티민 뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 또한 구아닌 및 티민 뉴클레오타이드; 구아닌 및 시토신 뉴클레오타이드; 티민 및 시토신 뉴클레오타이드; 또는 구아닌, 티민, 및 시토신 뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신 및 티민 중 하나 이상으로부터 선

택된 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신, 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 3개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 구아닌, 시토신 및 티민 중 하나 이상으로부터 선택된 3개 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 폴리-A 꼬리는 비-아데닌 뉴클레오타이드 사이의 규칙적인 또는 불규칙적인 간격으로 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리-A 꼬리가 패턴을 갖는 것으로 볼 수 있으며, 여기서 상기 패턴은 규칙적이거나 불규칙적이다. 상기 패턴의 핵심은, 길이를 따라 적어도 8개의 연속 아데닌이 존재하는 한, 상기 폴리-A 꼬리의 임의의 위치에서의 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 존재이다. 일부 실시형태에서, 폴리-A는 길이를 따라 임의의 위치에 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 아데닌 뉴클레오타이드는 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 가진 8개 이상의 아데닌 뒤의 임의의 위치에서 "차단된다". 상기 차단 서열은 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드, 또는 임의로 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2 내지 10개의 연속 뉴클레오타이드일 수 있다. 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 각각 하나의 또는 연속 뉴클레오타이드 스트레치는, 상기 폴리-A 꼬리의 끝까지, 하나 이상의 아데닌, 임의로 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드, 임의로 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드 등이 뒤따를 수 있다. 아데닌 뉴클레오타이드/비-아데닌 뉴클레오타이드의 이 패턴은 규칙적이거나 불규칙적인 간격으로 반복될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 폴리-A의 전체 길이를 따라 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 임의로 포함하는, 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나 또는 하나의 연속 스트레치만이 존재하는 경우와 같이, 패턴이 없을 수 있다.

[0087] **II. 폴리-A 꼬리에서의 아데닌 및 비-아데닌 뉴클레오타이드의 예시적인 패턴**

[0088] 본 발명의 폴리-A 꼬리는 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드와 같은, 다수의 상이한 패턴의 차단 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0089] 폴리-A 꼬리는 하나 또는 일련의 연속 아데닌 뉴클레오타이드, 이어서 비-아데닌 뉴클레오타이드로 시작될 수 있다. 일련의 아데닌 뉴클레오타이드로 시작하는 폴리-A 꼬리는 폴리-A 꼬리의 5' 말단이 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 오는 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 갖는 하나 또는 일련의 연속 아데닌 뉴클레오타이드로 구성됨을 의미한다. "뒤(after)"는 비-아데닌 뉴클레오타이드가 일련의 연속 아데닌 뉴클레오타이드에 대해 3'에 존재함을 의미한다.

[0090] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리의 5' 말단은 일련의 연속 아데닌 뉴클레오타이드와, 뒤이어 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드(들)로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드(들)은 8, 9, 10, 11 또는 12개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다. 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 적어도 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다. 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 적어도 8 내지 100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다. 일부 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치하며, 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드가 뒤따른다.

[0091] 일부 실시형태에서, 상기 폴리 A 꼬리의 5' 말단은 1 내지 8개의 아데닌 뉴클레오타이드와, 뒤이어 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드(들)로 구성된다. 이러한 실시형태에서, 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드(들)에는 더 많은 아데닌 뉴클레오타이드가 뒤따른다. 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 뒤따르는 아데닌 뉴클레오타이드는 또 다른 비-아데닌 뉴클레오타이드 앞에 적어도 8개의 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0092] 상기 폴리-A 꼬리를 시작하는 연속 아데닌 뉴클레오타이드 그룹의 크기 범위는 다양할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리의 5' 말단은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드로 구성된다. 제1 비-아데닌 뉴클레오타이드가 1-7개의 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 이격되는 경우, 상기 폴리-A 꼬리는 상기 비-아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 적어도 8개의 아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치를 추가로 포함한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 뒤에 위치한다.

- [0094] 상기 폴리-A 꼬리는 3' 말단에서 비-아데닌 뉴클레오타이드의 스트레치로 종결될 수 있다. 상기 폴리-A 꼬리의 3' 말단에서 비-아데닌 뉴클레오타이드의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드일 수 있다. 대안적으로, 상기 폴리-A 꼬리의 3' 말단은 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 폴리-A 꼬리는 하나의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 서열과, 뒤이어 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드, 임의로, 뒤이어 추가의 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리-A 꼬리는 또한 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드에 의해 차단된 1개 초과 연속 아데닌 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 서열은 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드일 수 있다. 차단 서열에서의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 수는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 폴리-A 꼬리는 또한 비-아데닌 뉴클레오타이드로 차단되거나 또는 산재된 1개 초과 일련의 연속 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 차단 서열의 길이는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 차단 서열의 길이는 1-3, 1-5, 1-10, 2-10, 2-8, 2-6, 또는 2-5개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 폴리-A 꼬리는 1개 초과 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트, 및 각각의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트 사이에 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 1개 초과 연속 스트레치를 포함하는 차단 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리-A 꼬리는 1개 초과 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트, 및 각각의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트 사이에 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2개 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 1개 초과 연속 스트레치를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리-A 꼬리는 1개 초과 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트 및, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 각각 포함하는 하나 이상의 차단 서열을 포함할 수 있다. 상기 세트는 각각 동일한 또는 상이한 수의 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다수의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트의 실시형태에서, 각각의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 세트는 폴리-A 결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 길이일 수 있다.
- [0097] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 상기 폴리-A 꼬리와 규칙적인 간격으로 위치한 차단 서열이다. 규칙적인 간격이란, 소정 세트수의 연속 아데닌 뉴클레오타이드에 이어서 반복된 방식으로 비-아데닌 뉴클레오타이드가 뒤따른다는 것을 의미한다.
- [0098] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는 상기 폴리-A 꼬리와 불규칙적인 간격으로 위치된다. 불규칙적인 간격이란, 소정 세트수의 연속 아데닌 뉴클레오타이드에 이어서 비-아데닌 뉴클레오타이드가 뒤따르고 이어서 제1 세트에 비해 다른 수의 아데닌을 포함하는 또 다른 세트의 연속 아데닌 뉴클레오타이드가 뒤따른다는 것을 의미한다.
- [0099] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 뉴클레오타이드 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 2-10개의 비-아데닌 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.
- [0100] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8-100개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나

의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 하나의 비-아데닌 뉴클레오타이드 또는 적어도 2개의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 2-10개의 뉴클레오타이드의 하나의 연속 스트레치를 포함하거나 또는 함유한다.

[0103] 일부 실시형태에서, 비-아데닌 뉴클레오타이드의 수는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 8 내지 50개의 아데닌 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다.

[0104] 폴리-A 꼬리 내의 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 12, 16, 25, 30, 또는 39개일 수 있다. 연속 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 39개를 초과할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 12개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 16개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 25개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 30개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 매 39개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드마다 1, 2, 3, 4 또는 5개의 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 함유한다. 연속 비-아데닌 뉴클레오타이드의 수는 또한 5개를 초과할 수 있다.

[0105] 예시적인 트리뉴클레오타이드 차단 서열은 GCG, CCG, GTG, TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG, 및 TTT를 함유한다. 63개의 가능한 트리뉴클레오타이드 차단 서열, 및 말단 A를 제외한 36개의 트리뉴클레오타이드 차단 서열이 존재한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG, 및 TTT 중에서 선택된 하나 이상의 트리뉴클레오타이드 차단 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열 내 또는 폴리-A 꼬리 내에서 3개 이상의 뉴클레오타이드 사이의 혼성화 및 어닐링을 최소화하도록 설계된 다수의 차단 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 3개 이상의 뉴클레오타이드 사이의 어닐링을 최소화하는 차단 서열은 말단 A를 생략하는 34개의 트리뉴클레오타이드 차단 서열로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 3개 이상의 뉴클레오타이드 사이의 어닐링을 최소화하는 차단 서열은 TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG 및 TTT 중에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 서열번호: 18에서, 상기 폴리-A 꼬리는 TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG, TTT, 및 CG 중에서 선택된 디- 및/또는 트리-뉴클레오타이드 차단 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 폴리-A 꼬리는 GCG, CCG, 및 GTG 중에서 선택된 트리뉴클레오타이드 차단 서열을 포함한다. 예시적인 디뉴클레오타이드 차단 서열은 CG, GC, CC, GG, TT, CT, TC, GT, 및 TG를 포함한다. 15개의 가능한 디뉴클레오타이드 차단 서열, 및 말단 A를 포함하지 않는 9개의 디뉴클레오타이드가 존재한다. 모노뉴클레오타이드 차단 서열은 C, G, 및 T일 수 있다. RNA 서열(예컨대, mRNA)을 지칭할 때, 상기 임의의 뉴클레오타이드 서열과 관련하여, DNA 서열과 달리, T는 U로 대체된다.

[0106] 해당 기술분야의 통상의 기술자는 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 갖는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 다수의 상이한 패턴의 DNA를 설계할 수 있을 것이다. 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 일부 예시적인 폴리-A 꼬리는, 예를 들어, 서열번호: 1-5, 10, 11 및 18로 제시되어 있다.

[0107] III. 사용 방법

- [0108] 본 발명의 DNA는 그 DNA에 의해 암호화된 mRNA의 생산에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA는 본 발명의 DNA에 의해 암호화된다.
- [0109] 일부 실시형태에서, 본 발명의 DNA는 mRNA의 생산을 위해 제조된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA는 벡터 내에 있다. 일부 실시형태에서, 상기 벡터는 숙주 세포 내에 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 DNA에 의해 암호화된 mRNA는 DNA에 의해 암호화된 관심 단백질을 번역하는데 사용된다.
- [0110] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드는, 아데닌 뉴클레오타이드만을 포함하는 유사한 또는 동일한 길이의 3' 꼬리를 포함하는 DNA에서 발생하는 손실과 비교할 때 DNA 복제 동안 하나 이상의 아데닌 뉴클레오타이드의 손실을 방지한다. DNA 복제는 DNA 정제를 위한 플라스미드 성장에 필요한 단계이다. 이와 같이, 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 본 발명의 DNA를 포함하는 플라스미드는, 아데닌 뉴클레오타이드만으로 구성된 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드와 비교하여, 상기 플라스미드의 성장 및 정제의 하나 이상의 라운드에 걸쳐 개선된 안정성을 나타낼 수 있다.
- [0111] 적어도 8개의 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열을 포함하는 본 발명의 DNA를 포함하는 플라스미드는 연속 아데닌 뉴클레오타이드만으로 구성된 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열을 포함하는 DNA를 포함하는 플라스미드에 비해 숙주 세포에서의 성장시 현저하게 큰 안정성을 가질 수 있다. DNA 서열을 지닌 플라스미드를 발현하는 숙주 세포의 성장 동안, 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA 서열은 아데닌 뉴클레오타이드만으로 구성된 폴리-A 꼬리와 비교하여 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA의 길이 감소에 대해 내성을 나타낼 수 있다. 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드는 아데닌 뉴클레오타이드만을 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드와 비교하여 숙주 세포의 성장 동안 아데닌의 손실을 방지한다.
- [0112] 해당 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 벡터를 성장 및 정제하는 임의의 수단이 플라스미드를 암호화하는 숙주 세포의 성장에 사용될 수 있다. 벡터의 성장 및 정제 과정은 또한 플라스미드 제조로 지칭될 수 있다. 플라스미드 정제의 표준 단계는 박테리아 배양물의 성장, 박테리아의 수확 및 용해, 및 플라스미드 DNA의 정제를 포함한다. 플라스미드 DNA를 정제하기 위해 다양한 제조업체로부터의 다수의 키트를 이용가능하다. 플라스미드 제조 단계는 소규모제조(기대 수율은 20 내지 40 µg 또는 50 내지 100 µg의 플라스미드 DNA임), 중규모제조(기대 수율은 100 내지 350 µg의 플라스미드 DNA임), 대규모제조(기대 수율은 500-850 µg의 플라스미드 DNA임), 메가규모제조(기대 수율은 1.5-2.5 mg의 플라스미드 DNA임) 또는 기가규모제조(기대 수율은 7.5-10 mg의 플라스미드 DNA임)일 수 있다. 치료적 mRNA 생산을 위해, 플라스미드는 100mg, 1g, 10g, 또는 그 초과 규모의 규모로 생산될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 비-아데닌 뉴클레오타이드를 갖는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드의 증가된 안정성 및 복제 효율은 이와 같은 규모로 제조된 플라스미드의 일관성 및 효율성을 개선시킬 수 있다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 본 발명의 DNA 벡터로부터 mRNA를 생성하는 방법이 포함된다. 일부 실시 양태에서, DNA 벡터로부터 mRNA를 생성하는 방법은 상기 폴리-A 꼬리의 하류에 있는 벡터를 선형화하는 단계; 선형화된 벡터를 변형시키는 단계; 및 구아닌, 시토신, 우라실, 아데닌, 또는 이러한 뉴클레오타이드의 화학적으로 변형된 버전, 그 중에서도, 예컨대, 슈도우리딘, N-1-메틸슈도우리딘, 메톡시우리딘과 같은 RNA 뉴클레오타이드의 존재 하에서 변형 DNA를 RNA 폴리머라제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 변형된 잔기, 예컨대, 염기, 당 및 뉴클레오타이드 잔기의 골격 변형이, 본원에 기재된 것과 같은 mRNA, 폴리뉴클레오타이드, 및 방법에 사용될 수 있다.
- [0114] 이 설명 및 예시적인 실시예는 제한적인 것으로 간주되어서는 안된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위의 목적상, 달리 나타내지 않는 한, 명세서 및 청구범위에 사용된 수량, 백분율, 또는 비율을 나타내는 모든 숫자 및 기타 수치는 모든 경우에 용어 "약"에 의해, 이미 그렇게 변형되지 않은 정도로 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 상반되게 나타내지 않는 한, 하기 명세서 및 첨부된 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 획득하고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 적어도, 또 균등론의 적용을 청구범위의 범위로 제한하려는 시도는 아니지만, 각각의 수치 파라미터는 적어도 기록된 유효숫자의 수에 비추어 통상적인 반올림 기법을 적용하여 해석되어야 한다.
- [0115] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 것과 같은, 단수 형태 "한(a)", "하나(an)" 및 "상기(the)" 및 임의의 단어의 임의의 단수 사용은, 명시적으로 명백하게 하나의 지시대상으로 제한되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 유의한다. 본 명세서에 사용된 것과 같은, 용어 "포함하다" 및 그의 문법적 변형은 비제한적

인 것으로 의도되며, 목록에서 항목의 인용은 열거된 항목에 대해 대체되거나 추가될 수 있는 다른 유사한 항목을 배제하는 것은 아니다.

[0116] **서열의 설명**

[0117] 이 표는 본원에서 참조된 특정 서열의 목록을 제공한다. 아래 표에서 DNA 서열의 RNA 버전을 참조할 때, T는 U로 대체됨을 유의한다. 아래 표에서 RNA 서열의 DNA 버전을 참조할 때, U는 T로 대체된다.

**표 1**

설명	서열	서열 번호
30, 30, 및 39개의 연속 아데노신과 함께 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하고 비-아데닌 뉴클레오타이드로 종결되는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAACCC	1
30PA - 30, 30 및 39개의 연속 아데노신과 함께 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA	2
25PA - 25개의 연속 아데노신의 4개 세트와 함께	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAGCGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCGAAAA	3

[0118]

설명	서열	서열 번호
비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGTGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	
16PA - 16개의 연속 아데노신의 6개 세트와 함께 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAA AAAAAAGAAA AAAAAAAAAA AAACAAAAA AAAAAAAAAA TAAAAAAA AAAAAATAA AAAAAAAAAA AAACAAAAA AAAAAAAAAA A	4
긴 16PA - 16개의 연속 아데노신 및 63개의 연속 아데노신의 6개 세트와 함께 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAA AAAAAAGAAA AAAAAAAAAA AAACAAAAA AAAAAAAAAA TAAAAAAA AAAAAATAA AAAAAAAAAA AAACAAAAA AAAAAAAAAA ACAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	5
97개의 아데노신으로 구성된 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA	TAATACGACTCACTATAGGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGC GGCTCGCTGTTCGTGTGTGTGTTCGTTGCAGGCCCTTATT CGGATCCATGGATAAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATC GGAACATAATCCGTGGGTGGGCAGTGATCAGGATGAAT ACAAAAGTCCCGTCCAAAGAAATTCAGGCTCCTGGGGAACAC CGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTG CTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAAGCGACCCGGCTCA AACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCG CATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCAACGAAATGGCA AAGTCGACGACAGCTTCTCCACCGGCTGGAAGAATCTT TCTGGTGGAGGAGCAAGAAGCATGACGGCATCTCTAT CTTTGGAAACATCTGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAG TACCCGACCATCTACCATCTCGGGAAGAAAGTTGGTTGACT CAACTGACAAAGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCT CGCCATATGATCAAAATCCGGCGACACTTCTGATCGAA GGCGATCTGAACCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTT TCATCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGA AAACCAATCAATGCTAGCGGCTCGATGCCAAGGCCATC CTGTCCGCCCGGCTGTGGAAGTCCGGCGCTCGAAAACC TGATCGCACAGCTGCCGGAGAGAAAAAAGACCGACTTTT CGGCAACTTGATCGCTCTCACTGGGACTCACTCCAAT TTCAAGTCCAATTTTGAACCTGGCCGAGGACCCAGCTGC AACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTGGACAATTT GCTGGCAAAATGGCGATCAGTACGGGATCTGTTCTT GCCGTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTGTCTGTCGGATA TCTTCCGCTGAACACCGAAATAACCAAGCCGCCCTTAG CGCTCGATGATTAAGCGGTACGACGACATCACAGGAT CTACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTG AAAAGTACAAGGAGATCTTTCGACCACTCCAAGAAATGG GTACGCAAGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAG TTCTATAAGTTCATCAAGCAATCCTGAAAAGATGGACG GAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGAGGATCT GCTCCGGAACAGAAACCTTTGACACCGGATCCATTCC CACAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTCCGG GCCAGGAGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAAACCGGA AAAATCGAGAAAAATCTGACGTTCCGCATCCCGTATTAC GTGGGCCACTGGCCGCGGCAATTCGCCCTTCCGCTGGA TGACTAGAAAAATCAGAGGAAACCATCACTCTTGGAAATTT CGAGGAAGTTGTGGATAAGGAGCTTCGGCAGAAAGCTTC ATCGAACGAATGACCAACTTCGACAGAAATCTCCAAACG AGAAGTGTCTTCTTAAGCACAGGCTCTTACGAATACTT CACTGTCTAACCAACTGACTAAAGTGAATACTGTTACT GAAGGAATGAGGAGCCGCCCTTCTGTCCGGAGAACAGA	6

[0119]

설명	서열	서열 번호
	AGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAA GGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAG ATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGTGGAGG ACAGATCAACGCTTCGCTGGGAACTATCATGATCTCCT GAAATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGACAACGAGGAG AACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCTGACCTTGACCC TTTTCGAGGATCGGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAAGC CTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTC AAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCTCTCCGCA AGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAC TATCCTGGATTCCTCAAATCGGATGGCTTCGTAATCGT AACTTCATGCAATTGATCCACGACGACGCTGACCTTTA AGGAGGACATCAAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGA CTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCG GCGATTAAGAAGGGAATCTGCAAACTGTGAAGTGGTGG ACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGACGGCACAACCGGAGAA TATCGTGATTGAAATGGCCCGAAGAAACCAAGACTACCCAG AAGGGCCGAAAACTCCCGGAAAGGATGAAGCGGATCG AAGAAGGATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGA GCACCCGGTGGAAAAACCGCAGCTGCAGAACGAGAGCTC TACCTGTACTATTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGG ACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGT GGACCACTCGTTCCACAGTCTTCTGAAGGATGACTCG ATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGACAGAG GGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTAAGAA GATGAGAATTACTGGCCGCGCTCTGAATGCGAAGCTG ATTACCCAGAGAAAGTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGC GCGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCAGCTG GCCGAGATCTTGGACTCCGCAATGAACATAAATACGACG AGAACGATAAGCTCATCCGGAAAGTGAAGGTGATACCCCT GAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTTCA TTTTCAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGGCC ATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCCGTAACCCCTGAT CAAAAAGTACCCTAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGA GACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGT CCGAACAGGAAATCGGGAAGCAACTCGGAATACTTCTT TTAICTCAAACATCATGAACTTTTCAAGACTGAAATTACG CTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAA CTAACGGAGAAACGGGCAGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAG GGACTTCGCAACTGTCGCAAAAGTCTCTATGCCCAGAA GTCAAATTTGTGAAGAAACCGAAGTGCAAACCGCCGAT TTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAA GCTCATTGACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAAGATAC GGAGGATTCGATTCGCCGACTGTGCGATACTCCGTCTCG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAGGAAAGAGCAAAAAGCTCAA ATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGA TCCTCGTTCGAGAAAGACCCGATTGATTCCTCGAGGCGA AAGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGATCTGATCATCAAACT CCCCAGTACTCACTGTTGAACTGGAAATGTCGGAAG CGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATG AGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCTCTATCT TGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGTCACCGGAAGAT AACGAACGAAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATT ATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTCAA GCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCCGACAAAGTCTG TCGGCTACAAATAGCATAGAGATAGCCGATCAGAGGAC AGGCCGAGAACATTATCCACTGTTCCACCTGACTAACCT GGGAGCCCGAGCCCTCAAGTACTTCGATACTACTATC	

[0120]

설명	서열	서열 번호
	GATCGCAAAGATACACGTCACCAAGGAAGTTCTGGACG CGACCCATGATCCACCAAGCATCACTGGACTTACGAAAC TAGGATCGATCTGTCCGACCTGGTGGCGATGGCGSTGGA TCTCCGAAAAAGAGAAAAGTGTAAATGAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAA AGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTT TTCGTTGGTAAAGCCAACACCCCTGTCTAAAAAACATAA ATTTCTTAATCAATTTGCCTCTTTCTCTGTGCTTCAAT TAATAAAAAATGAAAGAACCTCGAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA	
17 프로모터 및 서열번호: 1을 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA	TAATACGACT CACTATAGGG TCCCGCAGTC GGCCTCCAGC GGCTCTGCTT GTTCGTGTGT GTGTCTGTGC AGGCCTTATT CGGATCTGCC ACCATGGATA AGAAGTACTC GATCGGGCTG GATATCGGAA CTAATCCGT GGGTTGGCA GTGATCACGG ATGAATACAA AGTGCCGTCC AAGAAGTTCA AGTCTCTGGG GAACCCGAT AGACACAGCA TCAAGAAGAA TCTCATCGGA GCCCTGCTGT TTGACTCCGG CGAAACCGCA GAAGCGACCC GGCTCAACG TACCGGAGG CGACGCTACA CCCGGCGGAA GAATCGCATC TGCTATCTGC AAGAAATCTT TTCGAACGAA ATGGCAAAGG TGGACGACAG CTCTCTCCAC CGCCTGGMAG AATCTTCCCT GGTGGAGGAG GACAAAGAAG ATGAACGGCA TCCTATCTTT GGAAACATCG TGGACGAAGT GGCCTACCAC GAAAAGTACC CGACCATCTA CCATCTGCGG AAGAAGTTGG TTGACTCAAC TGACAAGGCC GACCTCAGAT TGATCTACTT GGCCCTCGCC CATATGATCA AATTCGCGGG ACACCTCCTG ATCGAAGGCG ATCTGAACCC TGATAACTCC GACGTGGATA AGCTGTTTCA TCAACTGGTG CAGACCTACA ACCAACTGTT CGAAGAAAAC CCAATCAATG CCAGCGGGGT CGATGCCAAG GCCATCCTGT CCGCCCGGCT GTCGAAGTCC CGGCGCCTCG AAAACCTGAT CGCACAGCTG CCGGGAGAGA AGAAGAACGG ACTTTTCGGC AACTTGATCG CTCTCTCACT GGGACTCACT CCAATTTCA AGTCCAATTT TGACCTGGCC GAGGACGCGA AGCTGCMACT CTCAAAAGGAC ACCTACGACG ACGACTTGA CAATTTGCTG GCACAAATTG GCGATCAGTA CGCGGATCTG TTCCTTGCCG CTAAGAACCCT TTCGGACGCA ATCTTGCTGT CCGATATCCT GCGCGTGAAC ACCGAAATAA CCAAAGCGCC GCTTAGCGCC TCGATGATTA AGCGGTACGA CGAGCATCAC CAGGATCTCA CGCTGCTCAA AGCGCTCGTG AGACAGCAAC TGCTGAAA GTACAAGGAG ATTTTCTTCG ACCAGTCCAA GAATGGGTAC GCAGGTACA TCGATGGAG CGCCAGCCAG GAAGATTCT ATAAATTAT CAAGCCAATC CTGAAAAGA TGGACGGAAC CGAAGAACTG CTGGTCAAGC TGAACAGGGA GGATCTGCTC CGCAACAGA GAACCTTTGA CAACGGAAGC ATTCACACC AGATCCATCT GGGTGAAGCTG CACGCCATCT TCGGCGCCCA GGAGGACTTT TACCCATTC TCAAGGACAA CCGGAAAAG	7

[0121]

설명	서열	서열 번호
	ATCGAGAAAA TTCTGACGTT CCGCATCCCG TATTACGTGG GCCACTGGC GCGCGCAAT TCGCGCTTCG CGTGGATGAC TAGAAAATCA GAGGAAACCA TCACTCCTTG GAATTTGAG GAAATTGTGG ATAAGGGAGC TTCGGCACAA TCCTTCATCG AACGAATGAC CAACTTCGAC AAGAATCTCC CAAACGAGAA GGTGCTTCCT AAGCACAGCC TCCTTACGA ATACTCACT GTCTACAACG AACTGACTAA AGTGAATAC GTTACTGAG GAATGAGGAA GCGGCTTT CTGAGCGGAG AACAGAAGA AGGATTTGTC GATCTGCTGT TCAAGACCAA CCGCAAGGTG ACCGCAAGC AGCTTAAAGA GGACTACTTC AAGAAGATCG AGTGTTCGA CTCAGTGGAA ATCAGCGGAG TGGAGGACAG ATTCACGCCT TCGCTGGGAA CCTATCATGA TCTCCTGAAG ATCATCAAG ACAAGGACTT CCTTGACAAC GAGGAGAACG AGGACATCCT GGAAGATATC GTCTGACCT TGACCTTTT CGAGGATCGC GAGATGATCG AGGAGAGGCT TAAGACCTAC GCTCATCTCT TCGACGATAA GGTCAAGAAA CAACTCAAGC GCGCCCGTA CACTGGTTGG GGCCGCCTCT CCCCAAGCT GATCAACGGT ATTCGCGATA AACAGAGCGG TAAACTATC CTGATTTC TCAATCGGA TGGCTTCGCT AATCGTAACT TCATGCGATT GATCCACGAC GACAGCCTGA CCTTTAAGGA GGACATCCAG AAAGCACAAG TGAGCGGACA GGGAGACTCA CTCATGAAC ACATCGCGAA TCTGGCCGGT TCGCCGGCGA TTAAGAAGGG AATCTGCAA ACTGTGAAGG TGGTGGACGA GCTGTTGAAG GTCATGGGAC GGCACAACC GGAGAATATC GTGATTGAAA TGGCCGAGA AAACGAGACT ACCCAGAAGG GCCAGAAGA CTCCCAGGAA AGGATGAAGC GGATCGAAGA AGGAATCAAG GAGCTGGGCA GCCAGATCCT GAAAGACAC CCGGTGGAAA ACACGCAGCT GCAGAACGAG AAGCTCTACC TGTACTATTT GCAAAATGGA CGGGACATGT ACGTGGACCA AGAGCTGGAC ATCAATCGGT TGTCTGATTA CGACGTGGAC CACATCGTTC CACAGTCCTT TCTGAAGGAT GACTCCATCG ATAACAAGGT GTTGACTCGC AGCGACAAGA ACAGAGGGAA GTCAGATAAT GTGCCATCGG AGGAGTCTGT GAAGAAGATG AAGAATTACT GCGGCGAGCT CCTGAATGCG AAGTGATTA CCCAGAGAAA GTTTGACAAAT CTCACTAAG CCGAGCGCGG CGGACTCTCA GAGCTGGATA AGGCTGGATT CATCAACCGG CAGCTGGTCG AGACTGGCA GATTACCAAG CACGTGGCGC AGATCCTGGA CTCCCAGATG AACACTAAAT ACGACGAGAA CGATAAGCTC ATCCGGGAAG TGAAGTGAT TACCCTGAAA AGCAAACCTT TGTCCGACTT TCGGAAGGAC TTTCAATTTT ACAAAGTGAG AGAAATCAAC AACTACCATC ACGCGCATGA CGCATACCTC AACGCTGTGG TCGGCACCGC CCTGATCAAG AAGTACCCTA AACTTGAATC GGAGTTGTG TACGGGAGCT ACAAGTCTA CGACCTGAGG AAGATGATAG CCAAGTCCGA ACAGGAAATC	

[0122]

설명	서열	서열 번호
	GGGAAAGCAA CTGCGAAATA CTTCTTTTAC TCAAACATCA TGAACCTCTT CAAGACTGAA ATTACGCTGG CCAATGGAGA AATCAGGAG AGGCCACTGA TCGAAACTAA CGGAGAAACG GGCGAAATCG TGTGGGACAA GGGCAGGGAC TTCGCAACTG TTCGCAAGT GCTCTCTATG CCGCAAGTCA ATATTGTGAA GAAACCGGAA GTGCAAAACG GCGGATTTTC AAAGGAATCG ATCTCCCAA AGAGAAATAG CGACAAGCTC ATTGCAGCA AGAAGACTG GGACCCGAAG AAGTACGGAG GATTCTGATC GCCGACTGTC GCATACTCCG TCCTCGTGGT GGCCAAAGTG GAGAAGGGAA AGAGCAAGAA GTCAAATCC GTCAAAGAGC TGCTGGGGAT TACCATCATG GAACGATCCT CGTTCGAGAA GAACCCGATT GATTTCTCTG AGGCGAAGGG TTACAAGGAG GTGAAGAAGG ATCTGATCAT CAACTGCC AAGTACTCAC TGTTCGAACT GGAATGGGT CGGAAGCGCA TGCTGGTTC GGCCGAGAA CTCCAGAAAG GAAATGAGCT GGCCTTGCCT AGCAAGTACG TCAACTTCTT CTATCTTGCT TCGCACTACG AGAAACTCAA AGGGTACCCG GAAGATAACG AACAGAAGCA GCTTTCTGTG GAGCAGCACA AGCATTATCT GGATGAAATC ATCGAACAAA TCTCCGAGTT TTCAGGCGC GTGATCCTCG CCGACGCCAA CCTCGACAAA GTCCTGTCCG CCTACAATA GCATAGAGAT AAGCCGATCA GAGAACAGGC CGAGAACATT ATCCACTTGT TCACCTGAC TAACCTGGGA GCTCCAGCCG CCTTCAAGTA CTTGATACT ACTATCGACC GCAAAAGATA CACGTCACCC AAGGAAGTTC TGGACGCGAC CCTGATCCAC CAAAGCATCA CTGGACTCTA CGAACTAGG ATCGATCTGT CGCAGCTGGG TGGCGTGGT GGCGGTGGAT CCTACCCATA CGACTGCCT GACTACGCCT CCGAGGTGG TGGCCCAAG AAGAAAGCGA AGGTGTGATA GCTAGCCATC ACATTTAAAA GCATCTCAGC CTACCATGAG AATAAGAGAA AGAAAATGAA GATCAATAGC TTATTCATCT CTTTTTCTTT TTCGTTGGTG TAAAGCCAAC ACCCTGTCTA AAAACATAA ATTTCFTTAA TCATTTTGCC TCTTTTCTCT GTGCTTCAAT TAATAAAAAA TGGAAAGAAC CTCGAGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAGCG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAC CGAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	
SEAP를 표적으로 삼는 단일 가이드 RNA	mC*mU*mC*C CUGAUGGAGA UGACAGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGUAGUCGC UUAUCAmAmC mUmUmGmAmA mAmAmAmGmU mGmGmCmAmC mCmGmAmGmU mCmGmGmUmG mCmU*mU*mU *mU	8
마우스 TTR을 표적으로 삼는 단일 가이드 RNA	mU*mU*mA* CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCGUAUCAmAm CmUmUmGm	9

[0123]

설명	서열	서열 번호
	AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
12PA - 12개의 연속 아데노신 및 모노뉴클레오타이드 차단 서열의 9개 세트와 함께 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAACA AAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAACA AAAAAAAAAAACA	10
8PA - 8개의 연속 아데노신 및 모노뉴클레오타이드 차단 서열의 12개 세트와 함께 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAATAAAAAAAAATAAAAAAAACA AAAGAAAAAAAAATAAAAAAAACA AAAAAAAAAGAAAAAAAAACA	11
폴리A-1 12개의 연속 아데노신의 6개 반복부를 분리하는 5개의 차단 서열을 포함하는 Bcl11a 프라이머 어닐링 부위 측정 서열	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGAAAAAA AAATGGAAAAAAACGGAAAAAAAGGTAAAA AAAAAAAAATAAAAAAAAAAACATAAAAAAAACG TTCATATCGGTCTTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	12
폴리A-2 12개의 연속 아데노신의 6개 세트를 분리하는 5개의 차단 서열을 포함하는 Bcl11a 프라이머 어닐링 부위 측정 서열	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGAATTCATCTAGCTCG AGAAAAATTCGAAAAAAACGTAAAAAAAAC TCAAAAAAAAGATAAAAAAAACCTAAAAAA AAATGTAAAAAAAGGAAAGTCTTCCATATCGGT CTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	13
폴리A-3 12개의 연속 아데노신의 6개 세트를 분리하는 5개의 차단 서열을 포함하는 Bcl11a 프라이머 어닐링 부위 측정 서열	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGGAAGACAAG GGAAAAAAACGCAAAAAAAACACA AAATGCAAAAAAATCGAAAAAAATCTAAA AAAAAAACGTTTATATCGGTCTAGACCACACTTCTTA CTGAGGTCCC	14
폴리A-4 12개의 연속 아데노신의 7개 세트를 분리하는 6개의 차단 서열을 포함하는 Ble11a 프라이머 어닐링 부위 측정 서열	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGAAAAATTC GAAAAAAACCCAAAAAAAGACAAAAAA AAATAGAAAAAAAGTTAAAAAAACTGAAAA AAAAAAATTTAAAAAAATCTAGACCACACTTCTT ACTGAGGTCCC	15
폴리A 1-2 12개의 연속 아데노신의 12개 세트를 분리하는 11개의 차단 서열을 포함하는 Ble11a 프라이머 어닐링 부위 측정 서열	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGAATTCATCTAGCTCG AGAAAAAAATGGAAAAAAACGGAAAAAA AAAAGTTAAAAAAATATAAAAAAAACATAAA AAAAAAACGAAAAAAACGTAAAAAAAACT CAAAAAAAAGATAAAAAAAACCTAAAAAA AAATGTAAAAAAAGGAAAGTCTTCCATATCGGT CTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	16
폴리A 3-4 12개의 연속 아데노신의 13개 세트를 분리	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGGAAGACAAG GGAAAAAAACGCAAAAAAAACACA AAATGCAAAAAAATCGAAAAAAATCTAAA AAAAAAACGAAAAAAACCAAAAAAAAGA	17

[0124]

설명	서열	서열 번호
하는 12개의 차단 서열을 포함하는 Bcl11a 프라이머 어닐링 부위 측정 서열	CAAAAAAAAAATAGAAAAAAAAAAGTAAAAAAAAAA AAACTGAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAATCTAGAC CACACTTCTTACTGAGTCCC	
300PA 12개의 연속 아데노신의 13개 반복부들 분리하는 24개의 차단 서열을 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리의 서열	AAAAAAAAAATGGAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAA AAGTAAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAACATAAAA AAAAAAAAACGAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAACTCA AAAAAAAAAAGATAAAAAAAAAAACTAAAAAAAAAA ATGTAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAACGCAAAAA AAAAACACAAAAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAAATCGA AAAAAAAAAATCTAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAA CCCCAAAAAAAAAAGCAAAAAAAAAAAATAGAAAAAA AAAAAGTAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAAATTTAA AAAAAAAAA	18
100PA - 97개 아데닌 뉴클레오타이드 동중 중합체를 포함하는 예시적인 폴리-A 꼬리 의 서열	AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAA	19
pUC-M 정방향 프라이머 서열2	GGGTATTTGCTCATGAGCG	20
pUC-M 역방향 프라이머 서열	TTTGTGATGCTCGTCAGGG	21
RN-Bcl11a 정방향	TCTTCCTTCAGTCTGTAACTCAG	22
RN-Bcl11a 역방향	GGGACCTCAGTAAGAAGTGTGG	23
Liv-1결손된; 98개의 연속 아데노신 으로 구성된 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTGCTGTGT CTGTCGTTGCGAGGCTTATTCGGGATCCGCCACCAATGGACA AGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGSAAACAAACAGCGT CGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACAGGTCCCGAGC AAGAAAGTTCAGGTTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAGAAGAACCCTGATCGSAGCACTGCTGTTCCAGCAGCGG AGAAACAGCAGAAACCAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAAGTACACAAAGAAAGAAACAGAAATCTGTACTCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAATGGCAAAGTCCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGGTCSAAAGAA GACAAAGACAGAAAGACACCCGATCTTCGGAACATCG TCGACGAAGTCCGATACAGGAAAGTACCCGACAAATCTA CCACTTGAAAAGAAAGCTGGTCGAGAGCAGAGCAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACCTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAAACAGCTTTTCGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAGGCCAATCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAAGACCGACTGTTCSAAACCTGNTCG CACTGAGCCCTGGGACTGACACCCAACTCAAGAGCAACTT CGACTTGGCAGAAAGACCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAAGTACGGAGACCTGTTCTGGCAGCAAGAAACCT GAGCGACCAATCTCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCCAGGACCTBACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGGCGGAAAGTCAAGGAA ATCTTCTTCGACCAAGCAAGACCGAATACGCAAGATCA TCGACGGAGGCAAGCCAGGAAAGAAATCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAAGAACTG CTGCTCAAGCTGAACAGAGAAAGCCCTGCTGAGAAAAGCAGA GAACAATTCGACACCGGAAAGCATCCCGCACAGATCCACCT	24

[0125]

설명	서열	서열 번호
	GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAGACAGGAAAGCTTC TACCCTGTTCTGAAAGGACACACAGAGAAAAGATCGAAAAGA ECCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCCGACCCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGGC GAAAGAACCAATCACACCCTGGAACTTCGAAAGATCCTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGATGAC AAATCTCGAACAAACCTGCCGAAACGAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAAGTCTACAAAG AACTGACAAAGSTCAAGTACCTCAGAGAGGAAATGAGAAA GCGGGCATTCCTGAGCGGAGAACGAGAGAGGGAATGCTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAAGSTCACAGTCAAGC AGCTGAAAGGAACTACTTCAAGAGATCGAATGCTTCGA CAGCTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCACCGCA AGCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGTCAATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAAAGAGACATCCT GGAAGACATCCTCCTGACACTGACACTCTTCAAGAGACAGA GAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACATAGCCACACCTGT TCGACCAAGSTCATGAAGCAGTGAAGAGAAAGNTA CACAGGATGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAGGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGCAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGCAGGATTCGCAACAGAAACTTCATGACAGCT GATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGAGAAAGACATCCAG AAGGCACAGGTGAGCGGACAGGGAGACAGCTTCACAGAAC AGATCGCAAACTGGCAGAAAGCCCGCAATCAGAAAGGG AATCCTGCAAGCAGTCAAGGTCTCGACGAATGGTCAAG CTCATGGGAGACACAAAGCCGAAAACATCGTCAATCGAAA TGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAAGGACAGAAAGAA CAGCAGAGAAAGATGAAGAGAAATCGAAAGAGGAAATCAAG GAATGGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAAACACCCGCTCGAAA ACACACAGCTGCCAAGAAAGGAAAGCTGACTGACTACTCT GCAGAAAGGAAAGAGACATGACTGACACAGGAACTGGAG ATCAACAGACTGAGCGACTAGGACCTCGACCAATCGCTCC CGAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAAGGAT CCTGACAGAAAGCGACAGAAACAGAGGAAAGGACCAAC GTCCCGAGGAAAGAGTCTCAAGAGATGAAGAAATACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACTGACAAAGGACAGAGAGGAGGACTGAGC GAATGGACAAGGCAAGGATTCATCAAGAGACAGCTGCTCG AAACAGAGCAGATCACAAAGCAGCTCGACAGATCTGGA CAGCAGATGAACACAAAGTACGACGAAACCGACAGCTG ATCAGAGATCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGGACTTCAGAAAGGACTTCGAGTCTACAGGTCAG AGAAATCAACAACTACCACACGACACAGGCAATACCTG AACGAGTCTGCGGAAACAGCAGTGAAGAAATACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGCTACGGGACTACAAGGTCATA CGAGCTCAGAAAGATGATCGAAAGAGCGACAGGAAATC GGAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAATCTTCTCAGACAGAAATCACACTGGCAAGGAGAA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAAGAAATCGTCTGGGACAAGGAAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGCTCAACATCCTCAA GAAAGCAAGATCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAAGCAACAGGACAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGAGTACGGAGGATTCGACAG CCGGACAGTCCGATACAGCTCTGGTCTGCAAGGCTC GAAAGGGAAAAGCAAGAGCTGAAGGCTCAAGGAAAC TGCTGGGAAATCACAAATCATGAAAGAAAGCAGCTTCGAAA GAACCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGATACAGGAA CTCAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTCCGAAAGTACAGCC	

[0126]

설명	서열	서열 번호
	TGTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAGGGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCACTTCCTGTACTGGCAAGCCACTAGG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCGGAAAGACAACGAACAGAAAGCA GCTGTTCTGTCGAAACAGCACAAGCACTACTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTGAGCAAGAGAGTCACTCTGG CAGACCGCAACCTGGACAAGCTCCTGAGCGCATACAACA GCACAGAGACAGCCGATCAGAGAACAGCCAGAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGAGCACCAGGAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAGGCACAAAGAACTCTGGACGCAACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAGAAATGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAGAGAGAA GAGAAGGCTTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCTTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGAAGGCCA ACACCCCTGCTTAAAAACATAAAATTTCTTAAATCATTTG CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCTCGAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
서열번호: 3을 포함하는 폴리-A 코리플 가진 Cas9 mRNA	TCCCGAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTCTGTGT GTGTCGTTGCAGGCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGAACAAACAGCGT CGGATGGGCACTCATCAGAGCAATAGAAAGTCCCGAGG AAGAACTCAGGTCCTGGGAAACACAGACAGCACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAACAAAGACTGAAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCCAGCAGCAG CTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTTGSAAGAA GACAAAGACAGCAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAGTACCCGACAACTTA CCACCTGAAAGAACTGCTGCTCAGCAGCAGACAGAGCA GACCTGAGACTGATCTACTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACTGAACCC GGCACACAGCGACTCGACAAAGCTGTTCACTCAGCTGGTC CAGACATACAACAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATCAACG CAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAGAAAGACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGASCATCTT CGAOCCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCACTAGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAGAACTT GAGCGACCAATCTGCTGAGCGAATCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGAGAACACAGCAGGACTGACACTGCTGAA GGCACCTGGTCAGACAGCACTGCGGAAAAGTACAAAGAA ATCTTCTTGCAGCAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGATTTACAAATTCAT CAAGCCGATCTTGGAAAAGATGGAACGAAACAGAAAGAACTG CTGTTCAAGCTGAACAGAGAAAGCCTGCTGAGAAAGCAGA GAAACATTCGACAAAGGAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGSAGACTGCAAGCAATCTGAGAGACAGGAAAGACTTC TACCCGTTCTGAAAGAACACAGAGAAAAGATCGAAAGAA TCCTGACATTCAGAAATCCGTAATACCTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAAGAAAGC GAAGAAACAAATCACACCCTGGAACTTGAAGAAAGTCTGCG	25

[0127]

설명	서열	서열 번호
	ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGAC AAATTCGACAAAGAACTGCCGAGCGAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTCCAGTCTACAAAG AACTGACAAAGGTCAAGTACCTCACAGAAAGAAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAAGGAAGACTACTTCAGAAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGEASTCGAAGACAGATTCACCGCA AGCCTGGAAACATACCACAGCCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACACGAAAGAAACGAAAGACATCCT GGAAGACATCTGCTGACACTGACACTGTTCCGAAAGACGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGACACCTGT TCGACGACAAGGTCAAGAGAGCTGAAGAGAAAGAAAGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGTGAATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC TGAAGAGCGCAGGATTCGCAACAGAAACTTCATGCAAGT GATCCAGCAGCAGGCTGACATTCAGGAGAGACATCCAG AAGCGCAGGTTCAGCGGACAGGGAGACGCTGCCACGAC ACATCCAAACTGGCAGAAAGCCCGCAATCAAGAAAGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAATGGTCAAG GTCATGGGAAAGACAAAGCCGAAACATCTGTCATCGAAA TGGCAAGGAAACCCAGACACAGAGAAAGGACAGAAAGAA CAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATTCCTGAAGGAAACCCCGTCCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACTCTGACTACCT ECAAGACGGAAGAGACATGTACTGTCACAGGAACTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGAGCTCGACCAATCGTCC CGCAGGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAACAAAGGT CCTGACAAAGAGCGACAAGAAAGAGGAAAGAGCGCAAC GTCCCGAGCGAAGAACTGTCAGAGAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACCGAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACTGACAAAGCGCAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAGGCGAGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCC AAACAGACAGATCAAAAGCAGTCCGACAGAACTCTGGA CAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAAGCAAGCTG ATCAGAGAAATCAAGGTCACTACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTCTACAAAGGTGAG AGAAATCAAACTACCACCAGCAGCAGCAGTACCTG AACCGAGTCTCGGAACAGCACTGATCAAGAAATACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCCTTACGGAGACTACAAGGTCTA CGAGTCAAGAAATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAGGCCAACAGCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAACCTCTTCAAGACAGAAATCACTGGCAACCGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGGAAACA GGAGAAATCCTTGGGACAAGGAAAGAACTTCGAAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATSCCGAGGTCAACATCTGCAA GAAGACAGAAATCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGC ATCTCCCGAAGAGAAACAGCAGCAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGAAATCGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTCCGATACAGGCTCCTGGTCTCGCAAAGGTC GAAAGGGAAAGAGCAAGAGCTGAAGAGGTCAGAGAAAC TGCTGGGAATCACAAATCATGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAA GAAACCGATCGACTTCTTGAAGCAAAAGGATCAAGGAA GTCAAGAGGAACTGATCATCAAGCTGCCGAAAGTACAGCC TGTTCGAACTGGAAACGGAAGAAAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAAATGCAAGAGGGAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACCTCACTTCTGTACTTGGCAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGAAAGCCCGAAGACAAAGCAAGAGCA GCTGTTCGTCGAAACAGCAAGCACTACTTGGACGAAATC	

[0128]

설명	서열	서열 번호
	ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCTGG CAGACGCAACCTGGACAGGTCTCGASCAGCATCAACAA GCACAGAGACAGCCGATCAGAGAACAGCCGAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGSCAG CATTCAAGTACTTCGACACAAATCGACAGAAAAGATA CACAAGCACAAGGAGTCTGGACGCAACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAAAGCCGAAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCTTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAAATGAAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCGGTGGTAAAGCCA ACACCCGTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
서열번호: 4를 포함하는 폴리-A 코리들 가진 Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCCTCCAGGGGCTCTGTTGTTGGTGTGT GTCTCGTTGCGAGCCCTTATTGGATCCGCCACCATTGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAGGTCCCAGC AAGAAGTTCAGAGTCTGGGAAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAACAAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAGAAAGAACAGAAATCTGACTACCTGC AGGAATCTTCAGCAACAAATGGCAAGGTCCAGCAGAG CTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGTTCCTGGTGGAGAA GACAAAGACAGAAAGACACCCGATCTTCGAAACATCG TCGACGAAGTCCGATACAGCAAAAGTACCAGCAATCTA CCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCCAGCAGCAGACAAAGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACATGATCA AGTTACAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACTGAAACCC GGACACAGCAGCAGCTCGACAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAAACAGCTGTTCGAAAGAAACCCGATCAAG CAAGCCGAGTCCAGCCAAAGCCATCTGAGCCGAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCCGACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAAGACGGACTGTTGSGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACAGCCGAACTCAAGAGCAACTT CGAAGTGGCAGAAAGCCAAAGCTGACAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACGACCTGGCAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGAGACTGTTCTGGCAGCAAGAAACCT GAGCGACGCAATCTGCTGAGCGAATCTGAGAGTCAAG ACAGAAATCACAAAGGCAACCCCTGAGCGCAAGCATATCA AGAGATACGACGAACACCACAGGACTGACACTGCTGAA GGCATGGTCAAGCAGCAGCTGCCGAAAAGTACAGAGAA ATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACCCAGGATACA TCGAGCGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAATCTACAAAGTCA CAAGCCGATCTGGAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGCCTGCTGAGAAAGCAGA GAACNTTCGACAAAGAAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCTGAGAAACAGGAAAGACTTC TACCCTGCTCAGAGGACAAACAGAAAAGATCGAAAAGA TCCTGACATTCAGAAATCCCTACTACCTCGGACCGCTGGC AAGAGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAAGAAAGAC GAGAAACAATCACCCCTGGAACTTCSAAGAACTGCTCG AGAAGGAGCAGCGCACAGAGCTTCCGAAAGATGAC AAACNTTCGACAAAGAAACCTGCCAAAGAAAGGTCTGCG AAGCACAGCCTGCTGACGAATCTCACAGTCTACAAAG AACTGACAAAGGTCAAGTACCTCACAGAAAGAAAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACGAAAGGCAATGCTC	26

[0129]

설명	서열	서열 번호
	GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCAAGACAGATTCACCGCA AGCTGGGAACATACCACAGCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAAGAAACGAAAGACATCCT BGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAGTCAAGAGAGCTGAAGAGAGAGAGATA CACAGGATGGGAAAGCTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTCCCAAAGAGAACTTCATGCCAGCT GATCCACGACGACAGCTGACATTCAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCCGAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAATGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAACACTCGTCAAGAAA TGGCAGAGAAAACCCAGACACACAGAGGGGACAGAGAA CAGCAGAGAAAGATGAGAGAAATCGAAGAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAGGAAACCCCGTCCAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACT GCAGAGCGGAAGAGACATGTACTCGACAGGAAGTGGAC ATCAAACAGACTGAGCGACTACGAGCTCGACACATCCTCC CGCAGAGCTTCTGAAGGACAGACATCGACAACAGGT CCTGACAAGAGCGGACAGAAACAGAGGAAAGCGCAAC GTCAGGAGCGAAGAGTCTCAAGAGATGAAGAACTACT BGAAGCAGCTGCTGACCCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACACCTGACAAAGCCAGAGAGAGGAGACTGAC GAACTGGACAAGGAGGATTCAAGAGACAGCTGGTGG AAAAAGACAGATCAAAAAGCAGCTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAAATGAAACAAAAGTACGACGAAACGAAAGCTG ATCAGAGAAATCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTCTACAAAGTCAAG AGAAATCAACAACCTACCACCGCACAGGAGGCACTCTG AACCGCTCGTCCGAAACGACTGATCAAGAAATACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCCTTACCGGAGACTACAAGTCA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC BGAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAATTTCTTCAAGACAGAAATCAACTGGCAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAAGGAGAAACA GGAGAAATCCTTGGGACAAGGGAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCCGAGTCAAGATCGTCAA GAAAGCAGAAATCCAGACAGGAGATTGACAAAGGAAAGC ATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGATACGGAGATTCGACAG CCCGACAGTCGCAACAGCGTCTGGTCTCGCAAGGTC BAAAAGGAAAGAGCAAGAGCTGAAGGCTCAAGGAAC TCGTGGGAATCACAAATCATGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAA BAAACCGATCGACTTCTGAAAGCAAGGGATACAGGAA GTCAGAGAGGACTGATCATCAGCTGCGAAGTACAGCC TGTTCGAATCGMAACGGAAAGAAAGATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAGGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCTGTACTTGGCAAGCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAAGCAAGAGCA GCTGTCTGTGAAACAGCACAAGCACTACTGGACGAAATC ATCGAAGCAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGACTCATCTGG CAGACGCAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA BCACAGAGCAAGCCGATCAGAGAACAGGCAAGAAACATC ATCCACTTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAGTACTTCGACAGCAAGAAATCGACAGAAAGAGATA	

[0130]

설명	서열	서열 번호
	CACAAGCACAAGGAACTCCTGGACGCAACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAACAAAGATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAGCCCGAAGAAGAA GAGAAAGGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCA ACACCCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTAAATCATTTTG CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAAGA ACCAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA AAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA AAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA	
서열번호: 5를 포함하는 폴리-A 꼬리 들 가진 Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTCTGTGT GTGTCTGTTGCAGGCTTATTCCGATCCGCAACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCCGAACAAACAGCCT CGGATGGGCAGTTCATCACAGACGAATACAAAGTCCCGAGC AAGAAATTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGAGAGCGG AGAAACAGCAGAAAGCAAGACTGAAGAGAAAGCAAGAA AGAAGATACACAAGAAAGAAAGAAAGAAATCTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTGCGGACAG CTTCCTCCACAGACTGGAGAAAGCTTCTGGTCCAGAA GACAAGAAAGCAGAAAGACACCCGATCTCGGAAACATCG TCGACCAAGTCCGATACCAAGAAAGTACCCGACAACTA CCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCCAGACACAGACAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGCAAGCTGTTCATCCAGCTGGT CAGACATAACACCAGCTGTTCCGAGAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTTCGACGCAAAAGGCAATCTGAGCGCAAGCT GAGCAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCCGACAGCTG CCGGGAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATCAAGAGCAACTT CGACTTGGCAGAAAGCAAGGCTGCACTGAGCAAGGAC ACATACGAGGAGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGAGACTGTTCTGGCAGCAAGAAACCT GAGCGACGCAATCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAAACACCCAGGACTGACACTGCTGAA GGCCTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGAAAGTACAGGAA ATCTTCTTCGACCGAGGCAAGAAAGGATACGCGAGTACA TCGCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGATCTACAACTTCAT CAAGCCGACTCTGGAAAAGTGGACGGAACAGAAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGCTGCTGAGAAAGCAGA GAACTTCGACAAAGGAAAGCTCCCGACCCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCTGAGAAAGCAGGAAGACTTC TACCCGTTCTGAAGGAAACAGAAAGAAAGTGGAAAAGA TCTTGCATTCAGAAATCCGTAAGTACGTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTCGCTGGATGACAAAGAAAGGC GAAAGAAACAAATCACACCTGGAACTTCGAAAGATCTGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGTTCATCGAAAGAAATGAC AAACTTCGACAAAGAACTGCCGAAAGAAAGTCTTCCCG AAGCACAGCCTGCTGACGAATACTTACAGTCTACAAAG AACTGACAAAGCTCAAGTACCTCAGAAAGAAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAAACGAAAGAAAGCAATCTGTC GACTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAAGTACTTCAAGAAAGATCGAATGCTTCGA CAGGTCGAAATCAGCGGAGTGAAGACAGATTCAGCGCA AGCTGGGAAACATACCAAGCAGCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCTGGACAACGAAAGAAAGCAAGACATCTCT	27

[0131]

설명	서열	서열 번호
	GGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAAGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATAACACGGATGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAACTCTGGACTCCGTAAGAGCGACGGATTTCGAAAACAGAACTTCATGACGCTGATCCACGACGACCTGACATTCAGAGAAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAACCTGGCAGGAGCCCGCAATCAAGAAAGGAAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACCAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACAAAGCCGGAAACATGCTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACACAGAAAGGGACAGAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAAGAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCTCGAAGGAACACCCGGTCAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAAGGAGAGACATGTACCTGCACAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGGCACTACGAGCTCGACCACTGCTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAAGGTCCTGACAAAGAGCCAGAAACAGAGGAAAGAGGCAACGTCCTGGAGCGAAGTCTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAAGCGAAAGCTGATCACACAGAGAAATGTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGCAAGGCAAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAGACAGATCACAAAGCAGCTGCACAGATCCTGGACAGCAGATGAACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGFCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCACAGAGTCAAGAAATCAACAACACAGCCACAGCGCATACCTGAAACAGTCTGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAATACCCGAGCTGGAAAGCGAATTCCTCTACGGAGACTACAAAGTCTACGACCTCAGAAAGATGATCCCAAGAGCGAACAGGAAATCGAAAGGCACAGCAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACTTCTCAGACAGAAATCACACTGGCAAGCGGAGAAATCAGAAAGGACCCGCTGATCGAAACAAAGCGGAAACAAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAAGAAAGAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGACTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCAGCATCGCATACAGCTCCTGGTCTCGCAAGGTCGAAAGGGAAAGCAAGAGTGAAGGCTGAAGGAACTGCTGGGAATCACAACTCTGGAAAGAGCAGCTTCGAAAAAACCCGATCGACTTCTGGAAAGCAAGGGATACAAGGAAATCAAGAAAGGACTGATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCGTTCGAACTGGAAAAACGGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCAGCAAGTACSTCAACTTCTGTACTGSCAAGCCACTACGAAAAGTGAAGGAAAGCCGGAAAGCAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCTGCGAACACAACTGGGAGCACCCGACGATTCAGACTTCGACACAACTCGACAGAAAGAGATACAAAGCACAAAGGAGTCTGGAGCCAGACTGATCCAGCAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGAGCCGAGAGGAGCCCGAAGAGAAAGAAAGGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGGAATAGAGAAAGAAATGAAGATCAATA	

[0132]



설명	서열	서열 번호
	CACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGGA ATCAGAGACAAGCAGACGGGAAGACAAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCCAGCGGATTCGCAAAACAGAAAATTTCATGCCAGCT GATCCACGACGACAGCCCTGACATTCAGGAGAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC ACATCGCAAACTGGCAGGAAGCCCGCAATCAGAAAGGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCCTCGACGAACCTGGTCAAG GTCATGGGAGACACAAAGCCGGAACATCGTCATCCGAAA TGGCAGGAGAAAACAGACACACAGAAAGGACAGAAAGAA CAGCAGAAAAGNATGAAGAGATTCGAAAGAGGATCAAG GAATGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCAAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAAAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACAGGAACTGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACCTCGACACATCCTCC CGCAGAGCTTCCTGAAAGACGACAGCATCGACACAAAGGT CCTGACAGAGGCGACAGAGACAGAGGAAAGGACGACAC GTCCGAGCGAAGAGTCTCAAGAGATGAAAGAACTACT GGAACAGCTGCTGAACCAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGCAACCTGACAAAGCCAGAGAGGAGGACTGAGC GAATGGAGAGGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCCG AAAACAGACAGATCACAAAGCAGCTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAAGCTG ATCAGAGAAATCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCAGTCTCAAGAGGTCAG AGAAATCAGCAACTACCACCGACAGGACGCAATACCTG AACCGACTCTCGAACACGACTGATCAAGAAATACCCGA AGCTGGAAAAGGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAGTCTA CGAGCTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAAATC GGAAGGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAATCTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGA AATCAGAAAGAGACCCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGTCTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCTCTCAA GAAACAGAAATCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGC ATCTGCCCAGAGAAACAGCGACAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGAGTACGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTCCGATACAGCGTCTCTGGTCTGCAAAAGGTC GAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCCGTCAGGAAC TGCTGGGAAATCACAAATCATGAAAGAGAGCAGCTTCGAAA GAACCCGATCGACTTCTGGAAAGCAAAGGATCAAGGAA GTCAGAGAGGACTGATCATCAAGCTGCCGAATACAGCC TCTTCGAATCGAAAACGGAAAGAAAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCTCTTACCTGGCAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGAAAGCCCGAAAGACACGAAACAGAAAGCA GCTGTTCTGTCGAAACAGCACAAGCACTACCTGGACAAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGG CAGAGCAAACTGGCAAGGTCCTGAGCGGNTAACAACA GCACAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGSCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCAACTGACAAAACCTGGGAGCACCCGACG CATTCAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCAAAAGGAAGTCTCTGGAACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAGAAATCGACTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCGAAAGAAAGAA GAGAAAGGTCAGTACGATCACAAATTAAGAAAGCATCTCA GCTTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT ACACCCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTT CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA	

[0134]

설명	서열	서열 번호
	ACCAAAAAAAAAATAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA ACAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAA GAAAAAAAAAACAATAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA	
서열번호: 11을 포함하는 폴리-A 꼬리클 가진 Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTGTGTGTGT GPTGCTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGSCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CCGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAGGTCCCAGGC AAGAAGTTCAGGTTCTTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGG AGAAACAGCAGAGCAACAGAGACTGAGAGAGAACAGCAAG AGAAGATACACAAGAAAGAAACAGAAATCTGTACCTGCG AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTGGAAAGAA GACAAGAAGCAGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACACGAAAGTACCCGCAATCTA CCACCTGAGAAAGAGCTGCTGACAGCAGACAGACAGGGCA GACTGAGACTGATCTACTGGCACTGGCACACATGATCA RGTTCAGAGGGACCTTCTGTTCGAGGAGAGCTGAAACCC GGACAACAGCSACTGCAAGAGCTGTTCATCCAGCTGCTC CAGACATAGAACCCAGCTGTTCGAAGAAAACCGATCAAG CAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATGCAAGCTG CCGGGGAAAAAGAAAGACGGACTGTTCCGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCACTGAGCAGGGCA ACATACGACGACGAGCTGGACAACTGCTGGCAGAGATCG GAGACCAGTACGACCTGCTTCTGGCAGCAAGAACTT GAGCGAGCCAACTCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTGAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCCCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGACACCCACAGGACTGACACTGCTGAA GGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAGAGCAAGACGGATACGACAGGATACA TCGACGGAGGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAGTTTCAT CAGCCGATCTGGAAAGATGGACGGACAGAAAGACTG CTGCTCAGCTGAACAGAGAAAGCTGCTGAGAAAGCAGA GAACATTCGACACGGGAAGCATCCCGCACAGATCCACTT GGGGAACTGCACGCAATCTGAGAGACAGGAAAGACTTC TACCCCTTCTGAAAGCAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA TCTTGACATTCAGAAATCCGTACTACTCGGACCGCTGGC AAGAGAAACAGCAGATTCGATGGATGACAAAGAAAGAGC GAAGAAACATCACACCCTGGATCTTCAAGAAAGTCTCG ACAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGAC AAATCTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCGG AAGCACAGCTGCTGTACGAATACTTACAGTCTACAAAG AACTGACAAAGSTCAAGTACTCACAGAAAGAAATGAGAAA GCCCGCATTCCTGAGCGGAAACAGAAAGGCAATCTGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGSTCACAGTCAAGC AGCTGAAAGGAGACTACTTCAAGAAAGTCAAGTCTGCA CAGCTCGAAATCAGCSAGTCAAGACAGATTCAAACGCA AGCTGGGAACATACCAGACTGCTGAAGATCATCAAG ACAAGGACTTCTGGCAACGAAAGAAAGAAAGACATCTCT GGAAGACATCTCTGACACTGACACTTTCGAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGACACACTGT TCGACGACAAAGTCAAGAGCAGCTGAAGAGAAAGAGATA CACAGGATGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAGCGA ATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAGACAAATCTGACCTCC TGAAGAGGACGGATTCGCAAGCAAGAACTTCAATGACAGCT GATCCACGACGACAGCTGACATTCAGGAAAGACATCCAG AAGGCACAGGTCAAGCGACAGGGAGACAGCTTCGACGAAAC	29

[0135]

설명	서열	서열 번호
	ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCANTCAAGAAGGG ANTCTTGCAGACAGTCAAGGTCTCGACGAACCTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAAGCCGGAAACNTGTCATCGAAA TGGCAAGGAAAAACCAAGCAACAGAAAGGACASAAAGAA CAGCAGAGAAAATGAAGAGAAATCGAAGAGGAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCAAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTCGACCCAGGAATGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCSACCACATCTCC CGCAGAGCTTCTGAGAGGAGAGCATCGACACAGAAAGGT CCTGACAAAGAGCGACAAAGACAGAGGAAGAGCGACAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCTCAAGAGATGAAGAATACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCG AAAACAGACAGATCACAAAGCAGCTCGCACAGATCCTGG CAGCAGAAFGAACCAAAAGTACGACGAAACGCAAGCTG ATCAGAGAGTCAAGGTCTACACTGAGAGCAAGCTGG TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTCTACAGGTCAG AGAAATCAACAACTACCACACCGCACGACGCAATCCTG AACGAGTCTGCGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGA AGCTGGAAAAGCGAATTCCTCTACGGAGACTACAAGGCTA CGACCTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAAACAGGAAATC GGAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCA TGAATCTTCTCAGACAGAAATCACTGGCAACGGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAAGGAGAAA CGAGAAATCTCTGGGCAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGGCTCTGAGCATGCCGAGGTCAGCATCGTCAA GAAACAGAAATCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAGC ATCTTCCCGAAGAGAAAACAGCGACAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGAAAGTACGGAGGATTCGACAG CCGCAGACTCGCATACAGCGTCTGGTCTCGCAAGGTC GAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAGAGCGTCAAGGAAC TGGTGGGATCACAAATCATGGAAAGAGCAGCTTCGAAA GAAACCGAATCGACTTCTGGAAGCAAGGGATACAGGAA GTCAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAAGTACAGCC TGTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAGAAATGCTGGCAG CGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCACTTCTGTACTTGGCAAGCCACTACG AAAGCTGAAGGAAAGCCCGAAGACAAAGCAAGAGCA GCTGTCTGTCGAAACAGCAAGCACTACTCGGAGCAATTC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGATCATCTGG CAGACGCAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGCAAGCCGATCAGAGAACAGGCAAGAAACATC ATCCACCTGTTCAACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTGACACAACAATCGCAGAAAGAGATA CACAGCAACAAGGAGTCTGGACGCAACTGATCCAC CAGAGCTACAGGACTGTACGAAACAAAGATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGGAAGCCCGAAGAGAA GAGAAAGGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGAAGCCA ACACCTTGTATAAAAAATAAAATTCCTTTAATCATTTG CCTCTTTCTCTGTGCTCAATTAATAAAAAATGGAAAAG ACCAAAAAAATAAAAAATAAAAAACAAAAAATAAAAA AAAAAAGAAAAATAAAAAATAAAAAAATAAAAA AATAAAAAAAGAAAAAATAAAAAATAAAAA	

[0136]

설명	서열	서열 번호
서열번호: 19를 포함하는 폴리-A 꼬리들 가진 Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CCGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGTCCCGAGC AAGAAGTTCAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGA AGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAACTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAATGGCAAAGTCCAGCAGACG CTTCTCCACAGACTGGAAGAAGCTTCCTGGTGAAGAA GACAAGAAGCAGCAAGACACCCGATCTTCGGAACATCG TCGACGAAGTCGCATACACGAAAAGTACCCGACATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGCACAGCAGACAGCAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACTGAACCC GGACACAGCGACCTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAAACAGCTGTTGGAAGAAAACCCGATCAAG CAAGCGGACTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTGGAAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTCAAGAGCAACTT CGACTGGCAGAAAGCGAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACACTGGACAACCTGCTGGCAGAGATCG GAGACAGTACGACAGCTGTTCTGGCAGCAAGAACCT GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCCAGGACTGACACTGCTGAA GGACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACCGAGGATACA TCGACGGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAAGACTG CTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGCCTGCTGAGAAGCAGA GAACATTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAGGCTCCTGCCG AAGCACACCTGCTGTACGAATACTTCAAGTCTACAAG AACTGACAAAGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCTCGAAATCAGCGGAGTCAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGAAACATACACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCTGGACAACGAAAGAAACGAAGACATCCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAAGACAGA GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGAGACAAAGTCAAGAGCAGTGAAGAGAAAGGATA CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGCAAGCAGAGCGGAAAGACAATCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTTCGCAACAGAAACTTCAAGCAGCT GATCCAGCAGCAGCCTGACATTCGAAGGAGACATCCAG AAGCACAGGTCAGCGGACAGGAGACAGCTGCACGAAC ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGG AATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAATGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCATCGAAA	30

[0137]

설명	서열	서열 번호
	TGGCAAGGAAAAACAGCAACACAGAGGGACAGAAAGAA CAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAGAAATCAAG GAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGACACCCCGTCCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTCTACTGTACTACCT GCAGAACGGAAAGACATGTACGTCCAGCAGGAATGGAC ATCAACAGACTGAGCGACTACGAGTCCAGCACATCGTCC CGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGAACAAAGGT CCTGACAAGAGCGACAAGAACAGAGGAAAGCGCAAC GTCCCGAGCGAAGAGTCTCAAGAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAGCGAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACTGACAAAGGACAGAGAGGGAGACTGAGC GAACTGGACAAGCAGGATTCATCAAGACAGCTGTCTCG AAACAAGACAGATCAAAAGCACCTCGCACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAGGACAAAGCTG ATCAGAGAAATCAAGGTCACTCACACTGAGAGCAAGCTGG TCAGGCACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTTCAG AGAAATCAACAACTACCACCGCACACGACGCATACCTG AACGAGCTCGTGGACAGCAGCTGATCAAGAAATACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCCTTACGGAGACTCAAGGTCTA CGACGTCAAAAGATGATCGCAAAGCGCAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCA TGAATTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAAGCGGAAACA GGGAATCTGTGGGACAAGGAAAGACTTCGCAACAG TCAGAAAGTCTGAGCATGCCGAGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGATTCAGCAAGGAAAGC ATCTGCCGAGAGAAACAGCGCAAGCTGATCGCAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTCGCATACAGGTCCTGGTCTCGCAAAGGTC GAAAGGGGAAAGAGCAAGAGCTGAGAGCGCTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAAATCATGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAA GAAACCGATCGACTTCTGGAAGCAAGGGATACAGGAA GTCAAGAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAAGTACAGCC TGTTCAAGTGGAAAGCGGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAAACTGCAAGAGGAAACGAACTGGCACTCCG AGCAAGTACGTCAACTTCTGTACTCTGGCAAGCCACTAG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAAGCAAGAGCA GCTGTTCTCGAACAGCAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCAATTCAGCAAGAGATCATCTGG CAGACGCAACCTGGACAAGTCTGAGCGCATACACAA GCACAGAGACAGCCGATCAGAGAACAGGCAAGAAACATC ATCCACTGTTCAACTGACAACTGGGAGCACCGGCAG CATCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCGACTGA GCCAGCTGGGAGGAGCGGAGGAGGAAAGCCGAAAGAA GAGAAAGGTTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAAAGAGAAAGAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTAAAGCCA ACACCCTGTCTAAAAGATAAATTTCTTAAATCATTTTG CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAATGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
서열번호: 2를 포함하는 폴리-A 꼬리 들 가진 Cas9 mRNA	TCCCGCAGTCGGCCTCCAGCGGCTCTGCTTGTCTGTGTGT GTGTCGTTGCAGGCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGAGATCGGAAACAAACAGCGT CGGATGGGCACTCATCACAGCAAGTCAAGGTCCTCCGAGC AAGAAAGTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA	31

[0138]

설명	서열	서열 번호
	TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGG AGAAACAGCAGAGCAACAAAGACTGAAGAGAACAGCAAGA AGMAGTACACAGAGAAAGAAACAGAACTGCTACCTGC AGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGTGCAGCAG CTTCTCCACAGACTGGAGAAAGCTTCTGGTGAAGAA GACAAAGACAGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAGTACCCGCAATCTA CCACCTGAGAAAGAGCTGGTCAAGCAGCAGCAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTGAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACTGAACCC GGCAACAGCGACCTCGCAAGCTGTTTATCCAGCTGGTC CAGACATACACCAGCTGTTGAAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATCTCAAGGCAACTT CGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC ACATACGACGACACTTGGCAACCTGCTGGCCAGATCG GAGACAGTACGACAGCTGTTCTGGCAGCAAGAACT GAGCGACGCAATCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAAACACACAGGACTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAA ATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGACAGGATA TCGACGGAGGAGCAAGCAGGAAAGAAATCTACAGTTTCA CAAGCCGATCTGAAAGAGATGGACGGACAGAAAGAACTG CTGCTCAAGCTGACAGAGAAAGCCTGCTGAGAAAGCAGA GAACTTCGACAAAGGAAAGTCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCTGAGAAGACAGGAAGACTTC TACCCCTTCTGAGGACAAACAGGAAAGATCGAAAAGA TCTTGCATTCAGAAATCCGTAACCTCGGACCGCTGGC AAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAAGAAAGGC GAAAGAAACAAATCACACCTGGAATCTGAAAGAGTCTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCAAGAAAGATGAC AAATTCGACAAAGAACTGCCGAAAGAAAGCTCTGCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAAATCTTCAAGTCTACAACG AACTGACAAAGTCAAGTACGTACAGAAAGAAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGGCAATCTGC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGTCAAGTCAAGC AGCTGAAAGGAAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAATGCTTCA CAGCGTCAAGATCAGCGGAGTCAAGACAGATCAAGCGCA AGCTGGGAAACATACACAGCTGCTGAAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCTGGACAAAGAAAGAAAGCAATCTCT GGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAAGACAGA GAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT TCGACGACAAAGTCAAGCAAGTGAAGAGAAAGAGATA CACAGGATGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAGCGA ATCAGAGCAAGCAGAGCGGAAAGACAACTCTGGACTTCC TGAAAGCGACGGATTCGAAACAGAAACTTCAAGCAGCT GATCCACGACGACAGCTGACATTCAGGAAGACATCCAG AAGGCACAGTCAAGCGCAGGAGACAGCTGCACGAAC ACATCGCAACCTGGCAGGAAAGCCCGCAATCAAGAAAGG AATCTGACAGCAGTCAAGGTCCTCGACCAACTGGTCAAG GTCATGGGAAAGACAAAGCCGAAACATCGTCAATCGAAA TGGCAAGGAAACCAAGCAACACAGAAAGGACAGAAAGAA CAGCAGAAAGAAATGAAGAAATCGAAAGAAAGAAATCAAG GAACTGGGAAAGCAGATCTGAAGGAAACCCGCTCGAAA ACACACAGCTGCAGACGAAAGCTGTACTTACTACTCT GCAGAACGGAAAGACATGTACTGACCCAGGAACTGGAC	

[0139]

설명	서열	서열 번호
	ATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCAACATCGTCC CGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGCGCAAC GTCCCGAGCGAAGAACTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAAGGACAGAGAGGAGGACTGAGC GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAGAAGACAGCTGCTCG AAAAAGACAGATCAAAAAGCAGTCGACAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACAAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAATCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG TCAGGACTTCAGAAAGGACTTCAGTTTCAAGAGTTCAG AGAAATCAACAACCTACCACAGCAGCAGCAGCATACCTG AACGCAGTCTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAAAGCGAAGCAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA TGAATTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGACAAGGAGAGACTTCGAAACAG TCAGAAAGTCTGAGCATGCCCGAGTCAACATCTGTCAA GAAGACAGAAATCCAGACAGGAGATTCAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGAAGAA AGAAGGACTGGGACCCGAGAAGATACGGAGGATTCGACAG CCCGACAGTTCGCATACAGCGTCTGGTCTCGCAAGGTC GAAAGGGGAAAGAGCAAGAGCTGAAAGCGCTCAAGGAAC TGTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGACTCGACTTCTGGAAGCAAGGGATACAGGAA GTCAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTCGAAGTGGAAAACGGAAAGAAAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCG AGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGCAACGAAACGAAAGCA GCTGTTCGTGAAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATC ATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGATCATCTGG CAGACGCAAACTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGCAAGCCGATCAGAGAACAGGCAAGAAACATC ATCCACTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCAACAAGGAACTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCAGGACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAGCCGGAAGAGAA GAGAAGGTTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAATGAAGATCAATA GCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGAAGGCCA ACACCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG CCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

[0140]

[0141]

포스포로티오에이트(PS) 연결 또는 결합은 포스포디에스테르 연결에서, 예를 들어, 뉴클레오타이드 염기 사이의 결합에서 하나의 비브릿지 포스페이트 산소가 황으로 치환된 결합을 지칭한다. 포스포로티오에이트가 올리고 뉴클레오타이드를 생성하기 위해 사용될 때, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 S-올리고로 지칭될 수 있다.

[0142]

"\*"는 PS 변형을 나타내는데 사용될 수 있다. 본 명세서에서, 용어 A\*, C\*, U\*, 또는 G\*는 PS 결합으로 그 다음 (예를 들어, 3') 뉴클레오타이드에 연결된 뉴클레오타이드를 나타내는데 사용될 수 있다.

[0143]

본 명세서에서, 용어 "mA\*", "mC\*", "mU\*", 또는 "mG\*"는 2'-O-Me로 치환되고, PS 결합으로 그 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오타이드에 연결된 뉴클레오타이드를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0144]

**실시예**

[0145]

하기 실시예는 특정개시된 실시형태를 예시하기 위해 제공되며, 어떠한 식으로든 본 개시의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0146]

**실시예 1 - 폴리-A 암호화를 위한 안정한 플라스미드의 설계 및 안정성**

[0147]

비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 설계하였다. 연속 아데닌 뉴클레오타이드 및 비-아데닌 뉴클레오타이드(예를 들어, 차단 서열)를 갖는 이들 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드의 안정성을 아데닌 뉴클레오타이드로만 구성된 폴리-A 꼬리와 비교하였다.

[0148]

아데노신만으로 구성된 mRNA 폴리-A 꼬리에서의 아데노신 수의 손실 문제는 표 2에 강조되어 있다. 96개의 아데노신의 폴리-A 꼬리를 함유하는 서열을 pUC57 플라스미드(Genscript)에 삽입하고, 대장균을 형질전환시켰다. 세포를 LB-Amp 플레이트 상에 플레이팅하고, 30 °C 또는 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 8개의 콜로니를 골라내고, LB-Amp 배지를 사용하여 96-웰 플레이트에 접종하고 30 °C 또는 37 °C에서 밤새 성장시켰다(1일차). 1일차 배양물로부터의 샘플을 신선한 LB-Amp 배지에 첨가하고 30 °C 또는 37 °C에서 추가로 2일 동안 성장시켰다(2일차). DNA를 1일차 및 2일차 배양물로부터 정제하고, 플라스미드에서 폴리-A 꼬리 길이를 결정하기 위해 서열분석하였다. 예시적인 결과는 하기 표 2 및 도 1에 제시되어 있다.

표 2

E. 콜라이에서 플라스미드 성장 후의 폴리-A 길이

37°C			30°C	
초기 콜로니 크기	1일차 폴리-A 길이	2일차 폴리-A 길이	초기 콜로니 크기	1일차 폴리-A 길이
Sm	95	18	Reg	80
Reg	95	68	Sm	95
Reg	95	94	Reg	39
Sm	95	N/A	Reg	48
Reg	96	N/A	Sm	95
Sm	36-95 혼재(mix)	18	Sm	95

[0149]

37°C			30°C	
초기 콜로니 크기	1일차 폴리-A 길이	2일차 폴리-A 길이	초기 콜로니 크기	1일차 폴리-A 길이
Sm	62	61	Reg	47
Reg	69	68	Sm	95

[0150]

[0151]

다수의 콜로니의 경우, 각 라운드의 성장은 상기 폴리-A 꼬리 내의 아데노신의 수의 감소와 연관되어 있었고, 단지 하나의 콜로니 만이 2회의 복제 라운드를 통해 90개가 넘는 아데노신을 유지했다. 또한, 박테리아 콜로니의 크기는 플라스미드로부터 폴리-A 꼬리 길이의 손실과 상관관계가 있었으며(즉, 더 큰 콜로니는 폴리-A 길이의 손실과 상응하였음), 이는 더 긴 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열이 플라스미드 생산 동안 박테리아 성장을 억제할 수 있음을 시사한다. 대장균의 콜로니로부터 정제된 DNA는 플라스미드 DNA를 보유하는 개별 대장균의 DNA 집단을 나타낸다. 따라서, 표 2에 제공된 값(및 본 명세서에 기재된 유사한 값)은 상기 집단의 평균 폴리-A 길이를 나타낸다. 또한, 폴리-A와 같은 긴 반복부의 PCR 및 서열분석 동안, 폴리머라제가 미끄러짐으로써, 서열이 실제 서열보다 약간 더 짧게 보이는 외관을 초래할 수 있다. 따라서, 95개의 아데노신을 보여주는 결과의 경우, 상기 플라스미드가 한 개의 아데노신을 잃었는지 또는 그것이 PCR의 아티팩트(artifact)인지 확실하지 않다. 그러나, PCR 증폭 및 서열분석 동안의 상당한 손실이 폴리머라제 미끄러짐의 아티팩트인 것은 아니다.

[0152]

별개의 실험에서, 대장균을 서열번호:1의 폴리-A 꼬리를 함유하는 pUC57 플라스미드로 형질전환시키고 LB-Amp 플레이트 상에 플레이팅하였다. 8개의 클론을 2 라운드의 성장을 통해 배양하고 상기 폴리-A 꼬리를 암호화하는 서열의 유지에 대해 시험하였다. 한 클론에 대한 대표적인 데이터가 도 2에 도시되어 있으며, 상기 꼬리를 암호화하는 플라스미드의 2 라운드 성장에 걸쳐 서열번호: 1의 폴리-A 꼬리에서는 꼬리 크기의 변화가 나타나지 않았다. 미니프랩(Miniprep) 1은 첫 번째 성장 라운드를 나타내고, 미니프랩 2는 두 번째 성장 라운드를 나타낸다. 미니프랩은 Invitrogen Purelink Quick Plasmid 미니프랩 키트를 사용하여 수행되었다.

[0153]

추가적 비-아데노신 패턴(서열번호: 3)을 갖는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 플라스미드를 대장균에서의 복제를 견딜 수 있는 능력에 대해 시험하였다. 서열 번호 3의 폴리-A 꼬리를 함유하는 서열을 pUC19 플라스미드(Genscript)에 삽입하고, 대장균을 형질전환시켰다. 세포를 LB-칸(Kan) 플레이트 상에 플레이팅하고, 30 °C 또는 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 8개의 콜로니를 골라 LB-칸 배지를 사용하여 96-웰 플레이트에 접종하고 30 °C 또는 37 °C에서 밤새 성장시켰다(1일차). 1일차 배양으로부터의 샘플을 신선한 LB-칸 배지에 첨가하고 30 °C 또는 37 °C에서 추가로 2일 동안 성장시켰다(2일차). DNA를 1일차 및 2일차 배양물로부터 정제하고, 상기 플라스미드에서 폴리-A 꼬리 길이를 결정하기 위해 서열분석하였다. 1일차 배양물 8개 중, 6개가 25개, 24개, 24개 및 24개 아데노신의 스트레치를 유지하였고, 서열분석된 12개의 2일차 배양물 중, 9개가 25개, 24개, 24개 및 24개 아데노신의 스트레치를 유지하였으며, 이는 아데노신-만의 서열과 비교하여 폴리-A 유지의 개선을 입증한다.

[0154]

이들 데이터는 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA가 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 암호화하는 DNA와 비교하여 다수의 라운드의 플라스미드 성장 및 정제에 걸쳐 개선된 안정성을 나타냄을 제시한다.

[0155]

**실시예 2 - 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 작제물의 활성**

[0156]

비-아데닌 뉴클레오타이드(차단 서열)를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA 대 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA의 효능에서의 차이가 있는지 여부를 측정하기 위한 실험을 수행하였다. Cas9 단백질을 암호

화하는 mRNA를, 분비된 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP)를 암호화하는 리포터 플라스미드, 뿐만 아니라 SEAP를 표적으로 삼는 가이드 RNA와 함께, 전기천공으로 HEK-293 세포 내로 형질감염시킨 모델시스템을 사용하였다. mRNA로부터 Cas9 단백질의 성공적인 발현은 SEAP 표적 서열의 절단을 초래하여, SEAP 생성 감소를 반영하는 색 변화를 초래한다. SEAP HEK-Blue 리포터 시약은 Invivogen에서 구입했다. T7 프로모터를 함유하고 아데노신-만의 폴리-A 꼬리(100개의 아데노신 뉴클레오타이드를 갖도록 설계되었지만, 서열 분석에 의해 97개의 아데노신 뉴클레오타이드를 갖는 것으로 나타났음)를 갖는 Cas9 mRNA를 암호화하는 서열(서열번호: 6) 또는 T7 프로모터를 함유하고 서열번호: 1의 폴리-A 꼬리를 갖는 Cas9 mRNA를 암호화하는 서열(서열번호: 7)을 pUC57 플라스미드(Genscript)에 클로닝하였다. mRNA는 각각의 mRNA를 암호화하는 선형화된 플라스미드로부터 시험관내 전사에 의해 생성되었다.

[0157] 도 3은 HEK-Blue 세포 분석에서 0.005-50 nM의 농도로 아데노신-만의 폴리-A 또는 서열번호: 1의 폴리-A를 가진 Cas9 mRNA, 및 SEAP를 표적으로 삼는 1  $\mu$ M 단일 가이드 RNA(서열번호: 8)의 적정을 도시한다.

[0158] HEK-Blue 결과는 폴리-A 꼬리 중 어느 하나를 가진 mRNA의 효과가 용량-반응 곡선에 걸쳐 유사하였음을 보여준다. 기준선 청색이 SEAP 발현을 나타내기 때문에, 더 높은 농도의 mRNA는 분홍색으로의 색상 변화에 의해 입증되는 바와 같이 SEAP 리포터 유전자 발현에서의 감소를 초래하였다. 따라서, 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리는 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리와 비교하여 Cas9 작제물의 발현 및 기능의 효능을 변화시키지 않았다.

[0159] 서열번호: 6의 Cas 9 mRNA의 발현에 의해 부여된 편집의 효능을 또한 서열번호: 7의 Cas9 mRNA(즉, 서열번호: 1의 폴리-A 꼬리와 비교되는 아데노신-만의 폴리-A 꼬리)와 비교하였다. 이들 실험을 위해, HEK-Blue 세포를 전기천공법에 의해 sgRNA(서열번호: 8) 및 2개의 상이한 mRNA로 형질감염시켰다.

[0160] 도 4는 24시간 인큐베이션 후 작제물 둘 다에 대한 SEAP 억제%를 나타낸다. 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리 및 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA의 SEAP 편집에 관한 EC<sub>50</sub>은 각각 0.050 및 0.054로 유사했다.

[0161] 도 5는 48시간 인큐베이션 후 작제물 둘 다에 대한 SEAP 억제%를 나타낸다. 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리 및 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA의 SEAP 편집에 관한 EC<sub>50</sub>은 각각 0.086 및 0.082로 유사했다.

[0162] mRNA 발현 및 활성을 또한 생체내에서 확인하였다. 서열번호: 6(HiCas9 mRNA) 및 서열번호: 7(결손된 폴리A mRNA)의 Cas9 mRNA를 서열번호: 9의 단일 가이드 RNA(마우스 TTR 유전자를 표적화함)와 함께 1:1 중량비로 지질 나노입자(LNP)로 제형화하고, 1 또는 0.5 mg/kg의 총 RNA로의 정맥내 투약에 의해 CD-1 암컷 마우스(n = 5)에 투여하였다. 투여 후 7일에 동물로부터 혈액을 채취하고, TTR 단백질의 혈청 수준을 ELISA로 측정하였다. 요약하면, 총 TTR 혈청 수준은 Mouse Prealbumin(트랜스티레틴) ELISA 키트(Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111)를 사용하여 측정하였다. 키트 시약 및 표준은 제조업체의 프로토콜에 따라 제조되었다. 플레이트를 450 nm의 흡광도에서 SpectraMax M5 플레이트 판독기에서 판독하였다. 혈청 TTR 수준은 4개 매개변수 로지스틱 곡선을 사용하여 표준 곡선에 맞추어 SoftMax Pro 소프트웨어 6.4.2 버전으로 계산하였다. 최종 혈청 값을 분석 회석에 대해 조정하였다.

[0163] 도 6은 투여 후 7일에 폴리-A 작제물 둘 다에 대한 유사한 수준의 혈청 TTR 녹다운(TTR 유전자의 편집 백분율을 나타냄)을 보여준다. 혈청 TTR 녹다운 결과는 7일에 수확된 마우스의 간에서 TTR 유전자좌의 서열 분석에 의해 확인되었다. 아데노신-만의 폴리-A mRNA를 제공받은 마우스는 각각 0.5 및 1 mg/kg의 총 RNA로 61.74 % 및 69.84 %의 편집을 나타내었고, 비-아데노신 뉴클레오타이드를 함유하는 폴리-A mRNA를 제공받은 마우스는 0.5 및 1 mg/kg의 총 RNA로 63.14 % 및 70.82 %의 편집을 나타냈다.

[0164] 따라서, 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA의 발현은, 아데노신만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA와 비교하여 유사한 편집 효능을 생성하였다.

[0165] **실시예 3 - 추가의 차단 서열을 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 작제물의 활성**

[0166] 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리-A 꼬리를 가진 mRNA 대 실시예 2에서와 같이 아데노신 뉴클레오타이드만을 함유하는 폴리-A 꼬리를 가진 것의 효능을 측정하기 위한 실험을 수행하였다. T7 프로모터를 함유하고 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 10, 또는 서열번호: 11을 포함하는 차단된 폴리-A 꼬리를 가진 Cas9 mRNA를 암호화하는 서열을, 프라이머를 이용한 PCR 증폭으로 제조하여 상기 폴리-A 서열

에 도입하였다. 이들 PCR 생성물로부터 시험관내 전사에 의해 mRNA가 생성되었다. 서열번호: 18에 대한 mRNA는, 상기 mRNA를 암호화하는 선형화된 플라스미드로부터 시험 관내 전사에 의해 생성되었다.

[0167] 도 7은 HEK-Blue 세포 분석에서 0.02-6 nM의 농도로의 아데노신-만의 폴리-A[100PA] 또는 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 10, 또는 서열번호: 11의 폴리-A를 가진 Cas9 mRNA, 및 SEAP를 표적으로 삼는 1 μM 단일 가이드 RNA(서열번호: 8)의 적정을 나타낸다. 구체적으로, 도 7은 48시간 인큐베이션 후 작제물에 대한 SEAP 억제 백분율을 나타내고, EC50 값은 하기 표 3에 제공된다. 모든 작제물은 활성적이다.

**표 3**

SEAP 억제에 대한 EC50 값

폴리A	Cas9 mRNA 작제물	EC50	표준 오차
98개의 연속 아데노신	Liv (U-결손된 Cas9 N1Me 슈도 U)	0.0627	0.0118
97개의 연속 아데노신	100 PA	0.0956	0.0041
서열번호: 4	16 PA	0.0692	0.0087
서열번호: 5	긴 16 PA	0.0705	2.237
서열번호: 3	25 PA	0.0500	0.0213
서열번호: 2	30 PA	0.0591	0.0086
서열번호:10	12 PA	0.0549	0.0296
서열번호: 11	8 PA	0.04233	0.0295

[0168]

[0169] **실시예 4 - 차단 서열을 갖는 긴 폴리A의 클로닝**

[0170] 표 4(아래)로부터의 12개의 차단 서열 및 12개의 연속 아데노신의 13개 반복부를 포함하는, 서열번호: 18[300pa]인, 300개 뉴클레오타이드의 긴 폴리 A 꼬리를 설계하였다. 서열번호: 18의 앵커 서열은 상기 폴리-A 꼬리 ~300개 nt 내의 트리뉴클레오타이드 차단 서열 사이의 하이브리드화 및 자가-어닐링이 최소화되도록 설계되었다. 아래 표 4는 차단 서열 간의 어닐링을 최소화시킨 차단 서열을 제공하고, 이 실험에 사용된 앵커를 포함한다.

[0171] 서열번호: 18을 클로닝하기 위해, 폴리A-1(서열번호: 12), 폴리A-2(서열번호: 13), 폴리A-3(서열번호: 14) 및 폴리A-4(서열번호: 15) 각각의 서열을 pUC57 미니벡터(Genscript)로 생성시킨다. Bcl11a 프라이머로 서열번호: 12를 증폭시키고, 제한 효소 XhoI 및 AclI로 PCR 생성물을 소화(digest)시키고, XhoI 및 BstBI로 소화된 서열번호: 13을 포함하는 pA2 플라스미드에 제한 단편을 결합시킴으로써 pA1-2 플라스미드를 생성시킨다. 서열번호: 14를 증폭하고, 동일한 방식으로 이를 플라스미드 pA4 상의 동일한 제한 부위에 결합시킴으로써 pA3-4 플라스미드를 생성시킨다. pA1-4 플라스미드(서열번호: 18을 포함함)는 pA3-4로부터 서열번호: 17의 서열을 증폭시키고, BbsI 및 XbaI 제한 효소로 PCR 단편을 소화시키고, BbsI 및 XbaI 제한 효소로 소화된 폴리 A1-2(서열번호: 16) 작제물 내로 제한 단편을 클로닝함으로써 조립된다. pA1-2 및 pA3-4 내로의 삽입물은 프라이머로서 [pUC-M 정방향 프라이머 서열2 및 pUC-M 역방향 프라이머 서열](서열번호: 20 및 21)를 사용하여 양방향으로부터 Sanger 서열분석에 의해 평가된다.

[0172] 생성된 서열번호: 18(300PA) 폴리A 서열은 pA1-4를 XhoI 및 XbaI로 소화시켜 단백질 암호화 벡터 내의 동일한 부위로 클로닝함으로써 절단된다. 모든 단계는 표준 조건에서 수행된다.

표 4

CGG CGT CGC  
 CTG CTT CTC  
 CAG CAT CAC  
 CCC CCG CCT

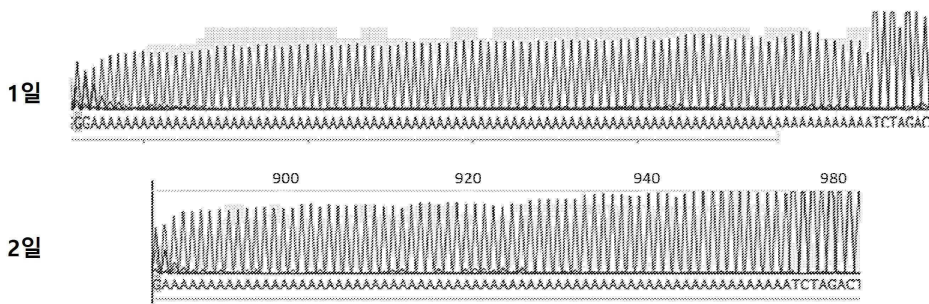
GGG GGT GGC  
 GCG GCT GCC  
 GAG GAT GAC  
 GTG GTT GTC

TGG TGT TGC  
 TTG TTT TTC  
 TAG TAT TAC  
 TCG TTC TCC

[0173]

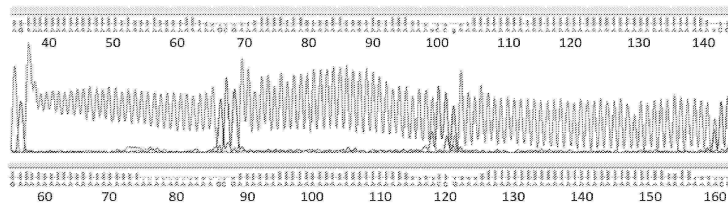
도면

도면1

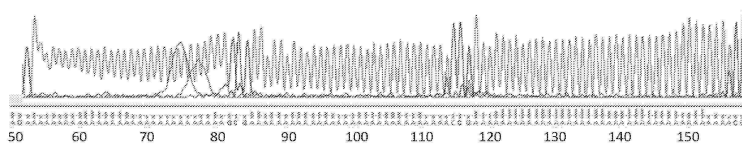


도면2

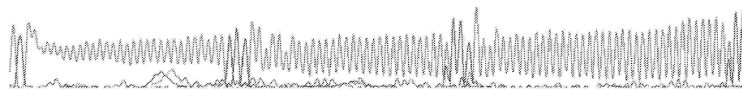
Genscript로부터의  
서열



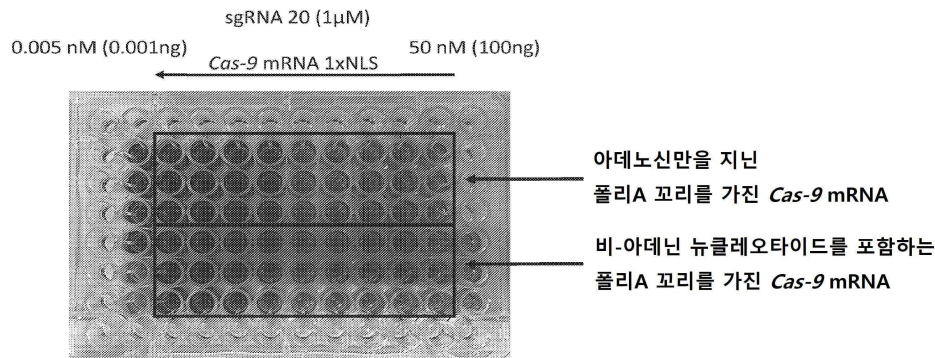
재변형된  
미니프렘 1



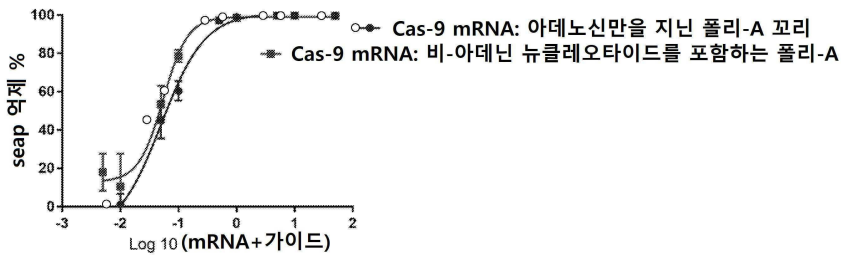
재성장된  
미니프렘 2



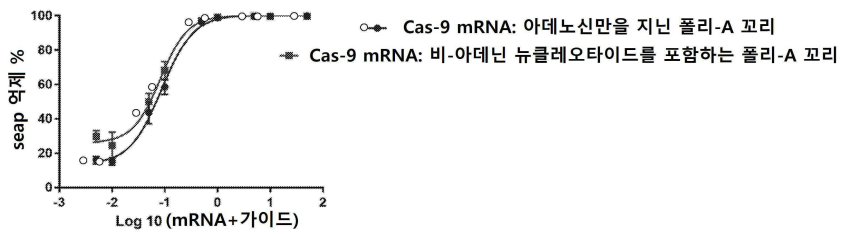
도면3



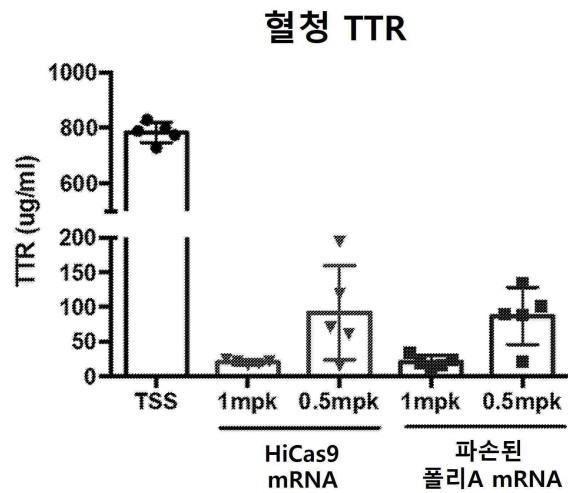
도면4



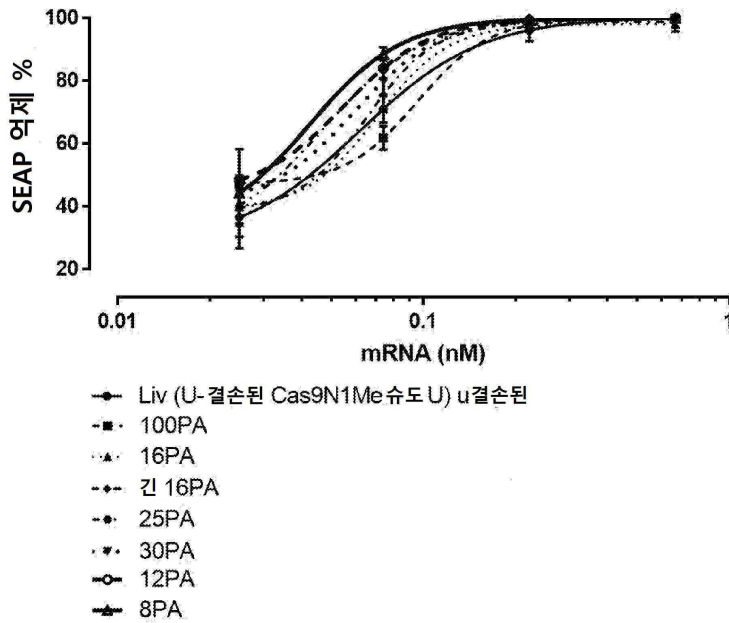
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> INTELLIA THERAPEUTICS, INC.

DOMBROWSKI, Christian

<120> STABILIZED NUCLEIC ACIDS ENCODING MESSENGER RIBONUCLEIC ACID  
(MRNA)

<130> 01155-0019-00PCT

<140> PCT/US2018/046772

<141> 2018-08-14

<150> US 62/545,883

<151> 2017-08-15

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: mRNA sequence of an exemplary poly-A tail comprising non-adenine nucleotides with 30, 30, and 39 consecutive

adenosines and ending with non-adenine nucleotides

<400> 1

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaccgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaccc 108

<210> 2

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 30PA - sequence of an exemplary poly-A tail comprising non-adenine nucleotides with 30, 30, and 39 consecutive adenosines

<400> 2

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaccgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 104

<210> 3

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 25PA - sequence of an exemplary poly-A tail comprising non-adenine nucleotides with four sets of 25 consecutive adenosines

<400> 3

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagcgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaccgaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa agtgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 109

<210> 4

<211> 101

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 16PA - sequence of an exemplary poly-A tail comprising non-adenine nucleotides with six sets of 16 consecutive adenosines

<400> 4

aaaaaaaaa aaaaagaaa aaaaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaaaaaaa taaaaaaaaa 60

aaaaaaaaataa aaaaaaaaaa aaaacaaaaa aaaaaaaaaa a 101

<210> 5

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 16PA long - sequence of an exemplary poly-A tail  
 comprising non-adenine nucleotides with six sets of 16  
 consecutive adenosines and 63 consecutive adenosines

<400> 5

aaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaaaaaaa taaaaaaaaa 60

aaaaaaaaataa aaaaaaaaaa aaaacaaaaa aaaaaaaaaa acaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 165

<210> 6

<211> 4523

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail consisting of 97  
 adenosines

<400> 6

taatacagact cactataggg tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt 60

gtgtcgttgc aggccttatt cggatccatg gataagaagt actcaatcgg gctggatc 120

ggaactaatt ccgtgggttg ggcagtgatc acggatgaat acaaagtgcc gtccaagaag 180

ttcaaggtcc tggggaacac cgatagacac agcatcaaga aaaatctcat cggagcctg 240

ctgtttgact ccggcgaac cgcagaagcg acccggctca aacgtaccgc gaggcgacgc 300

tacaccggc ggaagaatcg catctgctat ctgcaagaga tcttttcgaa cgaaatggca 360

aaggtcgacg acagcttctt ccaccgcctg gaagaatctt tcctgggtgga ggaggacaag 420

aagcatgaac ggcacatctat ctttggaaac atcgtcgacg aagtggcgta ccacgaaaag 480

taccgacca tctaccatct gcggaagaag ttggttact caactgacaa ggccgacctc 540

agattgatct acttggcctt cgcccatatg atcaaattcc gcggacactt cctgatcgaa 600

ggcgatctga accctgataa ctccgactg gataagcttt tcattcaact ggtgcagacc 660

tacaaccaac tgttcgaaga aaaccaatc aatgctagcg gcgtcgatgc caaggccatc 720

ctgtccgcc ggctgtcgaa gtcgcggcgc ctcgaaaacc tgatcgaca gctgccggga 780

gagaaaaaga acggactttt cggcaacttg atcgctctct cactgggact cactcccaat 840  
ttcaagtcca attttgacct ggccgaggac gcgaagctgc aactctcaa ggacacctac 900  
  
gacgacgact tggacaatit gctggcacia attggcgatc agtacgcgga tetgttcctt 960  
gccgctaaga acctttcggg cgcaatcttg ctgtccgata tcctgcgct gaacaccgaa 1020  
ataaccaaag cgccgcttag gcctcgatg attaagcggc acgacgagca tcaccaggat 1080  
ctcacgctgc tcaaagcgt ctgtgagacag caactgcctg aaaagtacia ggagatcttc 1140  
ttcgaccagt ccaagaatgg gtacgcaggg tacatcgatg gaggcgctag ccaggaagag 1200  
ttctataagt tcatcaagcc aatcttgaa aagatggacg gaaccgaaga actgctggtc 1260  
aagctgaaca gggaggatct gctccgaaa cagagaacct ttgacaacgg atccattccc 1320  
  
caccgatcc atctgggiga gctgcacgcc atcttgcggc gccaggagga cttttacca 1380  
ttctcaagg acaaccggga aaagatcgag aaaattctga cgttccgcat cccgtattac 1440  
gtgggcccac tggcgcgctg caattcgctg ttgcgctgga tgactagaaa atcagaggaa 1500  
accatcactc ctggaatit cgaggaagt gtggataagg gagcttcggc acaaagcttc 1560  
atcgaacgaa tgaccaactt cgacaagaat ctcccaaagc agaaggtgct tectaagcac 1620  
agcctcttt acgaatactt cactgtctac aacgaactga ctaaagtga atacgttact 1680  
gaaggaatga ggaagccggc ctttctgtcc ggagaacaga agaaagcaat tgtcgatctg 1740  
  
ctgttcaaga ccaaccgcaa ggtgaccgtc aagcagctta aagaggacta cttcaagaag 1800  
atcgagtgtt tcgactcagt ggaaatcagc ggggtggagg acagattcaa cgcttcgctg 1860  
ggaacctatc atgatctct gaagatcact aaggacaagg acttcttga caacgaggag 1920  
aacgaggaca tcctggaaga tatctctctg accttgacc ttttcgagga tcgagatg 1980  
atcgaggaga ggcttaagc ctacgtcat ctcttcgacg ataaggtcat gaaacaactc 2040  
aagcgcgcc ggtacactgg ttggggcctc ctctccgca agctgatcaa cggattctgc 2100  
gataaacaga gcggtaaaac tatctggat ttctcaaat cggatggctt cgctaatcgt 2160  
  
aacttcatgc aattgatcca cgacgacagc ctgacctta aggaggacat ccaaaaagca 2220  
caagtgtccg gacagggaga ctactccat gaacacatcg cgaatctggc cggttcggcg 2280  
gcgattaaga agggaatct gcaactgtg aaggtgctg acgagctggt gaaggtcatg 2340  
ggacggcaca aaccggagaa tatctgatt gaaatggccc gagaaaacca gactaccag 2400  
aagggccaga aaaactcccg cgaaaggatg aagcggatcg aagaaggaat caaggagctg 2460  
ggcagccaga tcctgaaaga gcaccgggtg gaaaacacgc agctgcagaa cgagaagctc 2520

tacctgtact atttgcaaaa tggacgggac atgtacgtgg accaagagct ggacatcaat 2580

cggttgctctg attacgacgt ggaccacatc gttccacagt cctttctgaa ggatgactcg 2640

atcgataaca aggtgttgac tcgcagcgac aagaacagag ggaagtcaga taatgtgcca 2700

tcggaggagg tcgtgaagaa gatgaagaat tactggcggc agctcctgaa tgcgaagctg 2760

attaccaga gaaagtttga caatctcact aaagccgagc gcggcggact ctgagagctg 2820

gataaggctg gattcatcaa acggcagctg gtcgagactc ggagattac caagcacgtg 2880

gcgcagatct tggactcccg catgaacact aaatacgacg agaacgataa gctcatccgg 2940

gaagtgaagg tgattaccct gaaaagcaaa cttgtgtcgg actttcggaa ggactttcag 3000

ttttacaaag tgagagaaat caacaactac catcacgcgc atgacgcata cctcaacgct 3060

gtggtcggta ccgccctgat caaaaagtac cctaaacttg aatcggagtt tgtgtacgga 3120

gactacaagg tctacgacgt gaggaagatg atagccaagt ccgaacagga aatcgggaaa 3180

gcaactgcga aatacttctt ttactcaaac atcatgaact tttcaagac taaaattacg 3240

ctggccaatg gagaaatcag gaagaggcca ctgatcgaac ctaacggaga aacgggcgaa 3300

atcgtgtggg acaagggcag ggacttcgca actgttcgca aagtgtcttc tatgccgcaa 3360

gtcaatattg tgaagaaaac cgaagtgcaa accggcggat tttcaaagga atcgatcctc 3420

ccaaagagaa atagcgacaa gctcattgca cgcaagaaag actgggaccc gaagaagtac 3480

ggaggattcg attcgccgac tgtcgatac tccgtcctcg tggaggccaa ggtggagaag 3540

ggaaagagca aaaagctcaa atccgtcaaa gagctgtctg ggattaccat catggaacga 3600

tcctcgttcg agaagaacc gattgatttc ctcgaggcga agggttacaa ggaggtgaag 3660

aaggatctga tcatcaaaact cccaagtac tcaactgtcg aactggaaaa tggtcggaag 3720

cgcatctgg cttcggccgg agaactcaa aaaggaatg agctggcctt gcctagcaag 3780

tacgtcaact tcctctatct tgcttcgcac tacgaaaaac tcaaagggtc accggaagat 3840

aacgaacaga agcagctttt cgtggagcag cacaagcatt atctggatga aatcatcgaa 3900

caaatctccg agttttcaaa gcgcgtgac ctgcggcagc ccaacctcga caaagtctg 3960

tcggcctaca ataagcatag agataagccg atcagagaac aggccgagaa cattatccac 4020

ttgttcacc tgactaacct gggagccca gccgccttca agtacttcga tactactatc 4080

gatcgcaaaa gatacacgtc caccaaggaa gttctggacg cgacctgat ccaccaaacg 4140

atcaactggac tctacgaaac taggatcgat ctgtcgcagc tgggtggcga tggcggtgga 4200

tctccgaaaa agaagagaaa ggtgtaatga gctagccatc acatttaaaa gcactcagc 4260

ctaccatgag aataagagaa agaaaatgaa gatcaatagc ttattcatct ctttttcttt 4320  
 ttcgttgggtg taaagccaac accctgtcta aaaaacataa atttctttaa tcattttgcc 4380  
 tcttttctct gtgcttcaat taataaaaaa tggaaaagaac ctcgagaaaa aaaaaaaaaa 4440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 4523

<210> 7

<211> 4581

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: T7 promoter and Cas9 mRNA with a poly-A tail

comprising SEQ ID NO: 1

<400> 7

taatacgact cactataggg tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt 60  
 gtgtcgttgc aggccttatt cggatctgcc accatggata agaagtactc gatcgggctg 120  
 gatatcggaa ctaattccgt gggttgggca gtgatcacgg atgaatacaa agtgccgtcc 180  
 aagaagtcca aggtcctggg gaacaccgat agacacagca tcaagaagaa tctcatcgga 240  
 gccctgctgt ttgactccgg cgaaaccgca gaagcgacce ggctcaaagc taccgcgagg 300  
 cgacgtcaca cccggcgcaa gaatcgcatc tgctatctgc aagaaatctt ttcgaacgaa 360  
 atggcaaagg tggacgacag cttcttccac cgcttgaag aatctttcct ggtggaggag 420

gacaagaagc atgaacggca tcctatcttt ggaaacatcg tggacgaagt ggcgtaccac 480  
 gaaaagtacc cgaccatcta ccatctgcgg aagaagtgg ttgactcaac tgacaaggcc 540  
 gacctcagat tgatctactt ggccctcgcc catatgatca aattccgcgg acacttctg 600  
 atcgaaggcg atctgaacce tgataactcc gacgtggata agctgttcat tcaactggtg 660  
 cagacctaca accaactgtt cgaagaaaac ccaatcaatg ccagcggcgt cgatccaag 720  
 gccatcctgt ccgcccggt gtggaagtgc cggcgcctcg aaaacctgat cgcacagctg 780  
 ccgggagaga agaagaacgg acttttcggc aacttgatcg ctctctcact gggactcact 840

cccaatttca agtccaattt tgacctggcc gaggacgcga agctgcaact ctcaaaggac 900  
 acctacgacg acgacttga caatttgctg gcacaaattg gcgatcagta cgcgatctg 960  
 ttccttgccg ctaagaacct ttcggacgca atcttgctgt ccgatatcct gcgctgaac 1020  
 accgaaataa ccaaagcgcg gcttagcgcc tcgatgatta agcggtacga cgagcatcac 1080  
 caggatctca cgctgctcaa agcgcctctg agacagcaac tgcctgaaaa gtacaaggag 1140  
 attttcttcg accagtccaa gaatgggtac gcagggtaca tcgatggagg cgccagccag 1200

gaagagtctt ataagttcat caagccaatc ctggaaaaga tggacggaac cgaagaactg 1260

ctggtcaagc tgaacagga ggatctgctc cgcaaacaga gaacctttga caacggaagc 1320

attccacacc agatccatct ggggtgagctg cacgccatct tgcggcgcca ggaggacttt 1380

taccatttc tcaaggacaa ccgggaaaag atcgagaaaa ttctgacgtt ccgcatcccg 1440

tattactggt gccactggc gcgcggcaat tcgcgcttcg cgtggatgac tagaaaatca 1500

gaggaaacca tcactccttg gaatttcgag gaagttgtgg ataagggagc ttcggcacia 1560

tccttcacg aacgaatgac caacttcgac aagaatctcc caaacgagaa ggtgcttctt 1620

aagcacagcc tcctttacga atacttcaact gtctacaacg aactgactaa agtgaatac 1680

gttactgaag gaatgaggaa gccgccttt ctgagcggag aacagaagaa agcgattgtc 1740

gatctgctgt tcaagaccaa ccgcaagggt accgtcaagc agcttaaaga ggactacttc 1800

aagaagatcg agtgtttcga ctcaagtggaa atcagcggag tggaggacag attcaacgt 1860

tcgctgggaa cctatcatga tctcctgaag atcatcaagg acaaggactt ccttgacaac 1920

gaggagaacg aggacatcct ggaagatac gtctgacct tgaccctttt cgaggatcgc 1980

gagatgatcg aggagaggt taagacctac gtcacatctt tcgacgataa ggtcatgaaa 2040

caactcaagc gccgccgta cactggttgg ggccgcctct cccgcaagct gatcaacggt 2100

attcgcgata aacagagcgg taaaactatc ctggatttcc tcaaatcgga tggcttcgct 2160

aatcgtaaat tcatgcagtt gatccacgac gacagcctga cctttaagga ggacatccag 2220

aaagcacaag tgagcggaca gggagactca ctccatgaac acatcgcgaa tctggccggt 2280

tcgccggcga ttaagaaggg aatcctgcaa actgtgaagg tggaggacga gctggtgaag 2340

gtcatgggac ggcacaaacc ggagaatcgt gtgattgaaa tggcccgaga aaaccagact 2400

accagaagc gccagaagaa ctcccgcgaa aggatgaagc ggatcgaaga aggaatcaag 2460

gagctgggca gccagatcct gaaagagcac ccggtggaaa acacgcagct gcagaacgag 2520

aagctctacc tgiactatct gcaaaatgga cgggacatgt acgtggacca agagctggac 2580

atcaatcgtt tctctgatta cgacgtggac cacatcgttc cacagtcctt tctgaaggat 2640

gactccatcg ataacaaggt gttgactcgc agcgacaaga acagagggaa gtcagataat 2700

gtgccatcgg aggaggtcgt gaagaagatg aagaattact ggcggcagct cctgaatgcg 2760

aagctgatta cccagagaaa gtttgacaat ctcaactaag ccgagcgcgg cggactctca 2820

gagctggata aggtctgatt catcaaacgg cagctggtcg agactcggca gattaccaag 2880

cagctggcgc agatcctgga ctcccgatg aacactaat acgacgagaa cgataagctc 2940

atccgggaag tgaaggatgac taccctgaaa agcaaacttg tgtcggactt tcggaaggac 3000  
 tttcagtttt acaaagttag agaaatcaac aactaccatc acgcgcatga cgcatacctc 3060  
 aacgctgtgg tcggcaccgc cctgatcaag aagtacccta aacttgaatc ggagtttgtg 3120  
 tacggagact acaaggctca cgacgtgagg aagatgatag ccaagtccga acaggaatc 3180  
 gggaaagcaa ctgcgaaata cttcttttac tcaaactca tgaacttctt caagactgaa 3240  
 attacgtgg ccaatggaga aatcaggaag aggccactga tcgaaactaa cggagaaacg 3300  
 ggcgaaatcg tgtgggacaa gggcagggac ttcgcaactg ttcgcaaagt gctctctatg 3360  
  
 ccgcaagtca atattgtgaa gaaaaccgaa gtgcaaaccg gcggattttc aaaggaatcg 3420  
 atcctcccaa agagaaatag cgacaagctc attgcacgca agaaagactg ggacccgaag 3480  
 aagtacggag gattcgattc gccgactgtc gcatactccg tcctcgtggt ggccaaggtg 3540  
 gagaagggaa agagcaagaa gctcaaatcc gtcaaagagc tgctggggat taccatcatg 3600  
 gaacgatcct cgttcgagaa gaaccggatt gatttctctg aggcgaaggg ttacaaggag 3660  
 gtgaagaagg atctgatcat caaactgcc aagtactcac tgttcgaact ggaaaatggt 3720  
 cggaagcgca tgctggcttc ggccggagaa ctccagaaag gaaatgagct ggccttgctt 3780  
  
 agcaagtacg tcaacttctt ctatcttctt tcgcactacg agaaactcaa agggtcaccg 3840  
 gaagataacg aacagaagca gcttttctgt gagcagcaca agcattatct ggatgaaatc 3900  
 atcgaacaaa tctccgagtt ttcaaagcgc gtgatcctcg ccgacgcaa cctcgacaaa 3960  
 gtctgtcgg cctacaataa gcatagagat aagccgatca gagaacaggc cgagaacatt 4020  
 atccacttgt tcacctgac taacctggga gctccagccg ccttcaagta cttcgatact 4080  
 actatcgacc gcaaaagata cacgtccacc aaggaagttc tggacgagc cctgatccac 4140  
 caaagcatca ctggactcta cgaaactagg atcgatctgt cgcagctggg tggcgatggt 4200  
  
 ggcggtggat cctaccata cgacgtgctt gactacgctt ccggaggtgg tggcccaag 4260  
 aagaaacgga aggtgtgata gctagccatc acatttaaa gcatctcagc ctacatgag 4320  
 aataagagaa agaaaatgaa gatcaatagc ttattcatct ctttttctt ttcgttggtg 4380  
 taaagccaac accctgtcta aaaaacataa atttctttaa tcattttgcc tettttctt 4440  
 gtgcttcaat taataaaaaa tggaaagaac ctcgagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500  
 aaaaaagcga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 4581

<210> 8

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: Single guide RNA targeting SEAP  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(3)  
 <223> Each nucleotide modified with 2'-O-Me and is linked to the next nucleotide with a Phosphorothioate (PS) linkage or bond  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (29)..(39)  
 <223> 2'-O-Me  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (68)..(96)  
 <223> 2'-O-Me  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (97)..(99)  
 <223> Each nucleotide modified with 2'-O-Me and is linked to the next nucleotide with a Phosphorothioate (PS) linkage or bond

<220><221> modified\_base  
 <222> (100)..(100)  
 <223> 2'-O-Me  
 <400> 8  
 cucccugaug gagaugacag guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 9  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: Single guide RNA targeting mouse TTR  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (1)..(3)  
 <223> Each nucleotide modified with 2'-O-Me and is linked to the next nucleotide with a Phosphorothioate (PS) linkage or bond  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (29)..(39)

<223> 2'-O-Me  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (68)..(96)  
 <223> 2'-O-Me  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (97)..(99)  
 <223> Each nucleotide modified with 2'-O-Me and is linked to the next nucleotide with a Phosphorothioate (PS) linkage or bond  
 <220><221> modified\_base  
 <222> (100)..(100)  
 <223> 2'-O-Me  
 <400> 9  
 uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
  
 cguaaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100  
 <210> 10  
 <211> 116  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: 12PA - mRNA sequence of an exemplary poly-A tail comprising non-adenine nucleotides with nine sets of 12 consecutive adenosines and mononucleotide interrupting sequences  
 <400> 10  
 aaaaaaaaa aataaaaaaaaa aaaaataaaa aaaaaaaaaaca aaaaaaaaaa ataaaaaaaa 60  
 aaaacaaaaa aaaaaaagaa aaaaaaaaaa caaaaaaaaa aaataaaaaa aaaaaa 116  
  
 <210> 11  
 <211> 115  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: 8PA - mRNA sequence of an exemplary poly-A tail comprising non-adenine nucleotides with twelve sets of 8 consecutive adenosines and mononucleotide interrupting sequences  
 <400> 11  
 aaaaaaaaaata aaaaaaataa aaaaaacaaa aaaaaaaaaaaa aaagaaaaaa aataaaaaaaaa 60

acaaaaaaaa caaaaaaaaaat aaaaaaaaaaga aaaaaaaaaacaa aaaaaataaa aaaaa 115

<210> 12

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PolyA-1, Bcl11a primer annealing sites flanking  
sequence comprising five interrupting sequences separating six  
repeats of 12 consecutive adenosines

<400> 12

tcttccttca gtctgtaaac ctgagctcga gaaaaaaaaa aaatggaaaa aaaaaaacg 60

gaaaaaaaaa aaaggtaaaa aaaaaaaaaata taaaaaaaaa aaacataaaa aaaaaaacg 120

ttcatatcgg ttctagacca cacttcttac tgaggtccc 159

<210> 13

<211> 188

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PolyA-2, Bcl11a primer annealing sites flanking  
  
sequence comprising five interrupting sequences separating six  
sets of 12 consecutive adenosines

<400> 13

tcttccttca gtctgtaaac ctgagaattc atctagctcg agaaaaaatt cgaaaaaaaa 60

aaaacgtaaa aaaaaaac tcaaaaaaaaa aaaagataaa aaaaaaac ctaaaaaaaa 120

aaaatgtaaa aaaaaaaaaag ggaaagtctt ccatatcgg tctagaccac acttcttact 180

gaggtccc 188

<210> 14

<211> 170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PolyA-3, Bcl11a primer annealing sites flanking  
  
sequence comprising five interrupting sequences separating six  
sets of 12 consecutive adenosines

<400> 14

tcttccttca gtctgtaaac ctcagctcga ggaagacaag ggaaaaaaaa aaaacgcaaa 60  
 aaaaaaaaa acaaaaaaaa aaaatgcaaa aaaaaaaaaat cgaaaaaaaa aaatctaaa 120  
 aaaaaaaaa gttcatatcg gttctagacc acatttetta ctgaggtccc 170

<210> 15

<211> 171

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PolyA-4, Bcl1a primer annealing sites flanking  
 sequence comprising six interrupting sequences separating seven

sets of 12 consecutive adenosines

<400> 15

tcttccttca gtctgtaaac ctcagctcga gaaaaaatc gaaaaaaaa aaacccaaaa 60  
 aaaaaaaga caaaaaaaaa aaatagaaaa aaaaaaaagt taaaaaaaa aaactgaaaa 120  
 aaaaaaatt taaaaaaaa aaatctagac cacacttctt actgaggtcc c 171

<210> 16

<211> 267

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PolyA 1-2, Bcl1a primer annealing sites flanking  
 sequence comprising 11 interrupting sequences separating 12 sets  
 of 12 consecutive adenosines

<400> 16

tcttccttca gtctgtaaac ctcagaattc atctagctcg agaaaaaaaa aaaatggaaa 60  
 aaaaaaaaa gaaaaaaaa aaaaggtaaa aaaaaaaaaat ataaaaaaaa aaacataaa 120  
 aaaaaaaaa gaaaaaaaa aaacgtaaaa aaaaaaaact caaaaaaaaa aaagataaaa 180  
 aaaaaaac taaaaaaaaa aaatgtaaaa aaaaaaaagg gaaagtcttc catatcggtt 240  
 ctgaccaca cttcttactg aggtccc 267

<210> 17

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PolyA 3-4, Bcl1a primer annealing sites flanking

sequence comprising 12 interrupting sequences separating 13 sets  
of 12 consecutive adenosines

<400> 17

```
tcttccttca gtctgtaaac ctgagctcga ggaagacaag ggaaaaaaaa aaaacgcaaa    60
aaaaaaaaac acaaaaaaaaa aaaatgcaaa aaaaaaaaaat cgaaaaaaaa aaaatctaaa    120
aaaaaaaaac gaaaaaaaaa aaacccaaaa aaaaaaaaaaga caaaaaaaaaa aaatagaaaa    180
aaaaaaaaagt taaaaaaaaa aaactgaaaa aaaaaaaaaatt taaaaaaaaa aaatctagac    240
cacacttctt actgaggtcc c                                                261
```

<210

> 18

<211> 370

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 300pa, mRNA sequence of an exemplary poly-A tail  
comprising 24 interrupting sequences separating 13 repeats of 12  
consecutive adenosines

<400> 18

```
aaaaaaaaaa aatggaaaaa aaaaaaacgg aaaaaaaaaa aaggtaaaaa aaaaaaatat    60
aaaaaaaaaa aacataaaaa aaaaaaacga aaaaaaaaaa acgtaaaaaa aaaaaactca    120
aaaaaaaaaa agataaaaaa aaaaaaccta aaaaaaaaaa atgtaaaaaa aaaaaaggga    180
aaaaaaaaaa acgcaaaaaa aaaaaacaca aaaaaaaaaa atgcaaaaaa aaaaaatcga    240

aaaaaaaaaa atctaaaaaa aaaaaacgaa aaaaaaaaaa ccaaaaaaa aaaaagacaa    300
aaaaaaaaaa tagaaaaaaa aaaaagttaa aaaaaaaaaa ctgaaaaaaa aaaaatttaa    360
aaaaaaaaaa                                                370
```

<210> 19

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 100PA - sequence of an exemplary poly-A tail  
comprising 97 adenine nucleotide homopolymer

<400> 19

```
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    60
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa                                                97
```

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: pUC-M seq2 forward primer  
 <400> 20  
 gggttattgt ctcatgagcg 20  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: pUC-M seq reverse primer  
 <400> 21  
 ttttggatg ctcgtcaggg 20  
 <210> 22  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: RN-Bcl11a for  
 <400> 22  
 tcttccttca gtctgtaaac ctgag 25  
 <210> 23  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: RN-Bcl11a rev  
 <400> 23  
 gggacctcag taagaagtgt gg 22  
 <210> 24  
 <211> 4506  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic: Liv-Udepleted: Cas9 mRNA with a poly-A tail consisting  
 of 98 consecutive adenosines

<400> 24

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60

cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120

cggatgggca gtcacacag acgaatacaa ggtcccgagc aagaagtca aggtcctggg 180

aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcggg gcaactgctgt tcgacagcgg 240

agaaacagca gaagcaacaa gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300

gaacagaatc tgctacctgc aggaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360

cttcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420

cccgatcttc ggaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480

ccacctgaga aagaagctgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540

ggcactggca cacatgatca agttcagagg acacttctctg atcgaaggag acctgaacct 600

ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctggt 660

cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720

gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780

actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840

cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatacgacg acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttcctggcag caaagaacct 960

gagcgcagca atcctgtctg gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaagccacc 1020

gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080

ggcactggtc agacagcagc tgccggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140

gaacggatc gcaggatata tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200

caagccgac ctggaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260

agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgcacc agatccacct 1320

gggagaactg cacgcaatcc tgagaagaca ggaagacttc tacccttcc tgaaggacaa 1380

cagagaaaag atcgaaaaga tcctgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgctggc 1440

aagaggaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaaacaa tcacaccgtg 1500

gaacttcgaa gaagtcgtcg acaagggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560

aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620

atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680

gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740  
  
 cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800  
 cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860  
 cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920  
 ggaagacatc gtctcgacac tgacactgtt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980  
 gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040  
 cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100  
 aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160  
  
 gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220  
 gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
 aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcatgggaa gacacaagcc 2340  
 ggaaaacatc gtcatcgaat tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
 cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
 gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
 gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
  
 cgacgtcgac cacatcgtcc cgagagactt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
 cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccagcgc aagaagtctg 2700  
 caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760  
 gttcgacaac ctgacaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
 catcaagaga cagctggtcg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880  
 cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
 cacactgaag agcaagetgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaaggtcag 3000  
  
 agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatactg aacgcagtcg tcggaacagc 3060  
 actgatcaag aagtaccga agctggaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120  
 cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180  
 cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240  
 aatcagaaag agaccgtga tcgaaacaaa cggagaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300  
 gggaagagac ttcgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360  
 gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420

cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
 cccgacagtc gcatacagcg tcctggctgt cgcaaaggtc gaaaagggaa agagcaagaa 3540  
 gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gcttcgaaaa 3600  
 gaacccgacg gacttcctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
 caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720  
 cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgcc agcaagtacg tcaacttctt 3780  
 gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840

gctgttcgtc gaacagcaca agcactacct ggacgaaatc atcgaaacaga tcagcgaatt 3900  
 cagcaagaga gtcatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtctctgagcg catacaaaa 3960  
 gcacagagac aagccgatca gagaacaggc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020  
 aaacctggga gcaccggcag cattcaagta ctctgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080  
 cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140  
 cgaaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200  
 gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctaccatg agaataagag 4260

aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctctttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320  
 acacctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380  
 attaataaaa aatggaaaga acctcgagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500  
 aaaaaa 4506

<210> 25

<211> 4512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 3

<400> 25

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60  
 cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120  
 cggatgggca gtcatcacag acgaatacaa ggtcccagc aagaagtcca aggtcctggg 180  
 aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcgga gcactgctgt tcgacagcgg 240  
 agaaacagca gaagcaaca gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300  
 gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360

cttcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420

cccgatcttc ggaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480

ccacctgaga aagaagetgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540

ggcactggca cacatgatca agttcagagg acacttcttg atcgaaggag acctgaacct 600

ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctgtt 660

cgaagaaaac ccgatcaacg caageggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720

gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780

actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840

cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatcgcagc acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttcttggcag caaagaacct 960

gagcgagcga atcctgtgta gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020

gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080

ggcactggtc agacagcagc tgccggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140

gaacggatac gcagatatac tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200

caagccgatc ctggaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260

agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgcacc agatccacct 1320

gggagaactg cagcaatcc tgagaagaca ggaagacttc taccgttcc tgaaggacaa 1380

cagagaaaag atcgaaaaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgtggc 1440

aagaggaaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaaacaa tcacacctg 1500

gaacttcgaa gaagtcgtcg acaaggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560

aaacttcgac aagaacctcg cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620

atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680

gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740

cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttca 1800

cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860

cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920

ggaagacatc gtctcgacac tgacactgtt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980

gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040

cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100

aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160  
 gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220  
 gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
 aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcatgggaa gacacaagcc 2340  
 ggaaaacatc gtcatgaaa tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
 cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
 gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
  
 gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
 cgacgtcgac cacatcgtcc cgcagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
 cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccagcgc aagaagtct 2700  
 caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760  
 gttcgacaac ctgacaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
 catcaagaga cagctggtcg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880  
 cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
  
 cactgaag agcaagctgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaaggtcag 3000  
 agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatacctg aacgcagtcg tcggaacagc 3060  
 actgatcaag aagtaccga agctggaaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120  
 cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180  
 cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240  
 aatcagaaag agaccgctga tcgaaacaaa cggagaaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300  
 gggaagagac ttcgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg ccgcaggtca acatcgtcaa 3360  
  
 gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420  
 cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
 cccgacagtc gcatacagc tcttggtcgt cgcaaaggtc gaaaagggaa agagcaagaa 3540  
 gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gettcgaaaa 3600  
 gaaccgatc gacttcctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
 caagctgcc aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720  
 cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgcc agcaagtacg tcaacttctt 3780  
  
 gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840  
 gctgttcgtc gaacagcaca agcactacct ggacgaaatc atcgaacaga tcagcgaatt 3900  
 cagcaagaga gtcatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtcctgagcg catacaaaa 3960

gcacagagac aagccgatca gagaacaggc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020  
 aaacctggga gcaccggcag cattcaagta ctctgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080  
 cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140  
 cgaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200

gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctacctg agaataagag 4260  
 aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctcttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320  
 acaccctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380  
 attaataaaa aatggaaaga accaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagc gaaaaaaaaa 4440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaccga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagtgaaa aaaaaaaaaa 4500  
 aaaaaaaaaa aa 4512

<210> 26

<211> 4504

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 4

<400> 26

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60  
 cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120  
 cggatgggca gtcacacag acgaatacaa ggtcccagc aagaagtca aggtcctggg 180  
 aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcggg gactgctgt tgcacagcgg 240  
 agaaacagca gaagcaaca gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300  
 gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360

cttctccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420  
 cccgatcttc gaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480  
 ccacctgaga aagaagctgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540  
 ggactggca cacatgatca agttcagagg acacttcttg atcgaaggag acctgaacct 600  
 ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctgtt 660  
 cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720  
 gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780

actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840  
 cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatcgcagc acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttcttggcag caaagaacct 960  
 gagcgacgca atcttctga gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020  
 gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080  
 ggcaactggtc agacagcagc tggcggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140  
 gaacggatac gcaggatata tgcagggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200  
  
 caagccgatc ctggaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260  
 agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgcacc agatccacct 1320  
 gggagaactg cagcaatcc tgaagaaca ggaagacttc taccgttcc tgaaggacia 1380  
 cagagaaaag atcgaaaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgctggc 1440  
 aagaggaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaaaca tcacaccgtg 1500  
 gaacttcgaa gaagtcgtcg acaagggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560  
 aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620  
  
 atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680  
 gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740  
 cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800  
 cagcgtcgaa atcagcggag tcaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860  
 cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920  
 ggaagacatc gtctgacac tgacactgtt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980  
 gaagacatac gcacacctgt tgcagacaaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040  
  
 cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100  
 aaagacaate ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160  
 gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220  
 gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
 aatcctgcag acagtcaagg tctcgcagca actggtcaag gtcattgggaa gacacaagcc 2340  
 ggaaaacatc gtcacgaaa tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
 cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
  
 gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
 gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
 cgacgtcgac cacatcgtcc cgcagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
 cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccagagc aagaagtctg 2700  
 caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760

gttcgacaac ctgacaaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
 catcaagaga cagctggctg aaacaagaca gatcaciaaag cacgtcgac agatcctgga 2880

cagcagaatg aacacaaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
 cacactgaag agcaagctgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaaggtcag 3000  
 agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatactg aacgcagtgc tcggaacagc 3060  
 actgatcaag aagtaccga agctggaaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120  
 cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180  
 cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240  
 aatcagaaag agaccgctga tcgaaacaaa cggagaaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300

gggaagagac ttgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360  
 gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420  
 cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
 cccgacagtc gcatacagcg tcttggctgt cgcaaaggtc gaaaaggga agagcaagaa 3540  
 gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gettcgaaaa 3600  
 gaaccgatc gacttcctgg aagcaaagg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
 caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720

cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgccg agcaagtacg tcaacttctt 3780  
 gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840  
 gctgttcgtc gaacagcaca agcaactacct ggacgaaatc atcgaacaga tcagcgaatt 3900  
 cagcaagaga gtatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtcttgagcg catacaaaa 3960  
 gcacagagac aagccgatca gagaacagc agaaaacatc atccactgt tcacactgac 4020  
 aaacctggga gcaccggcag cattcaagta cttcgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080  
 cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140

cgaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200  
 gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctaccatg agaataagag 4260  
 aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctcttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320  
 acacctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380  
 attaataaaa aatggaaaga accaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaacaaa 4440  
 aaaaaaaaaa aaataaaaaa aaaaaaaaaa taaaaaaaaa aaaaaacaaa aaaaaaaaaa 4500

aaaa 4504

<210> 27

<211> 4568

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 5

<400> 27

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60

cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120

cggatgggca gtcatcacag acgaatacaa ggtcccagc aagaagtca agtcctggg 180

aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcgga gcaactgctgt tcgacagcgg 240

agaaacagca gaagcaacaa gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300

gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360

cttcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420

ccgatcttc gaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480

ccacctgaga aagaagctgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540

ggcactggca cacatgatca agttcagagg acacttctg atcgaaggag acctgaacct 600

ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctggt 660

cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720

gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780

actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840

cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatacgagc acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttcctggcag caaagaacct 960

gagcgagcga atctgtctga gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020

gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080

ggcactggtc agacagcagc tgccggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140

gaacggatac gcaggataca tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200

caagccgatc ctgaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260

agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgcacc agatccacct 1320

gggagaactg cacgcaatcc tgagaagaca ggaagaacttc tacccttcc tgaaggacaa 1380

cagagaaaag atcgaaaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgctggc 1440

aagaggaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaacaa tcacaccgtg 1500  
gaacttcgaa gaagtcgtcg acaaggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560  
  
aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620  
atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtacacagaag gaatgagaaa 1680  
gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740  
cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800  
cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860  
cctgtgtaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920  
ggaagacatc gtctgacac tgacactggt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980  
  
gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040  
cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100  
aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160  
gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220  
gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcatgggaa gacacaagcc 2340  
ggaaaacatc gtcacgaaa tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
  
cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
cgacgtcgac cacatcgtcc cgagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccagcg aagaagtct 2700  
caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagetgatca cacagagaaa 2760  
gttcgacaac ctgacaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
  
catcaagaga cagctggtcg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880  
cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
cacactgaag agcaagctgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaagtcag 3000  
agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatactg aacgcagtcg tcggaacagc 3060  
actgatcaag aagtaccga agctggaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120  
cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180

cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240

aatcagaaag agaccgctga tcgaaacaaa cggagaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300

gggaagagac ttcgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360

gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420

cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480

cccgacagtc gcatacagcg tcctggctgt cgcaaaggtc gaaaagggaa agagcaagaa 3540

gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gcttcgaaaa 3600

gaacccgatc gacttctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660

caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720

cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgcc agcaagtacg tcaacttctt 3780

gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840

gctgttcgtc gaacagcaca agcactacct ggacgaaatc atcgaacaga tcagcgaatt 3900

cagcaagaga gtcacctgg cagacgaaa cctggacaag gtcctgagcg catacaaaa 3960

gcacagagac aagccgatc gagaacagc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020

aaacctggga gcaccggcag cattcaagta cttcgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080

cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140

cgaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200

gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctaccatg agaataagag 4260

aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctctttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320

acaccctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380

attaataaaa aatggaaaga accaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaacaaa 4440

aaaaaaaaaa aaataaaaaa aaaaaaaaaa taaaaaaaaa aaaaaaacia aaaaaaaaaa 4500

aaaaacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560

aaaaaaaaaa 4568

<210> 28

<211> 4519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 10

<400> 28

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60

cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120  
 cggatgggca gtcatcacag acgaatacaa ggtcccgagc aagaagttca aggtcctggg 180  
  
 aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcgga gcactgctgt tcgacagcgg 240  
 agaaacagca gaagcaacaa gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300  
 gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360  
 ctcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420  
 cccgatcttc ggaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480  
 ccactgaga aagaagctgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540  
 ggcaactggca cacatgatca agttcagagg acacttcttg atcgaaggag acctgaacct 600  
  
 ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctgtt 660  
 cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720  
 gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780  
 actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840  
 cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatacgagc acgacctgga 900  
 caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgacagctg ttcttggcag caaagaacct 960  
 gagcgagcga atcctgctga gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020  
  
 gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080  
 ggcaactggc agacagcagc tgccggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140  
 gaacggatac gcaggatata tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200  
 caagccgatc ctgaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260  
 agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgacc agatccacct 1320  
 gggagaactg cacgcaatcc tgagaagaca ggaagaactt taccgttcc tgaaggacaa 1380  
 cagagaaaag atcgaagaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgtggc 1440  
  
 aagaggaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaacaa tcacacctg 1500  
 gaacttcgaa gaagtcgtcg acaagggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560  
 aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620  
 atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680  
 gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740  
 cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800

cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860  
  
 cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920  
 ggaagacatc gtccctgacac tgacactggt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980  
 gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040  
 cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100  
 aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160  
 gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220  
 gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
  
 aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcatgggaa gacacaagcc 2340  
 ggaaaacatc gtcatcgaaa tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
 cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
 gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
 gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
 cgacgtcgac cacatcgtcc cgcagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
 cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccagcgc aagaagtcgt 2700  
  
 caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760  
 gttcgacaac ctgacaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
 catcaagaga cagctggtcg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880  
 cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
 cacactgaag agcaagctgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaaggtcag 3000  
 agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatactg aacgcagtcg tcggaacagc 3060  
 actgatcaag aagtaccga agctggaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120  
  
 cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180  
 cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240  
 aatcagaaag agaccgctga tcgaaacaaa cggagaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300  
 gggaagagac ttgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360  
 gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420  
 cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
 cccgacagtc gcatacagc tccttggtcgt cgcaaaggtc gaaaagggaa agagcaagaa 3540

gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gcttcgaaaa 3600  
 gaaccgcatc gacttcctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
 caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720  
 cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgccg agcaagtacg tcaacttctt 3780  
 gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840  
 gctgttcgtc gaacagcaca agcactacct ggacgaaatc atcgaacaga tcagcgaatt 3900  
 cagcaagaga gtcatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtcctgagcg catacaaaa 3960

gcacagagac aagccgatca gagaacaggc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020  
 aaacctggga gcaccggcag cattcaagta cttcgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080  
 cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140  
 cgaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200  
 gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctaccatg agaataagag 4260  
 aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctcttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320  
 acaccctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380

attaataaaa aatggaaaga accaaaaaaa aaaaataaaa aaaaaaata aaaaaaaaaa 4440  
 aaaaaaaaaa aaaaataaaa aaaaaaaca aaaaaaaaaa gaaaaaaaaa aaacaaaaaa 4500  
 aaaaaataaa aaaaaaaaaa 4519

<210> 29

<211> 4518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 11

<400> 29

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60  
 cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120  
  
 cggatgggca gtcatcacag acgaatacaa ggtcccagc aagaagtca agtcctggg 180  
 aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcgga gcaactgctgt tcgacagcgg 240  
 agaaacagca gaagcaaca gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300  
 gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360  
 cttcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420  
 cccgatcttc ggaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480

ccacctgaga aagaagctgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540

ggcactggca cacatgatca agttcagagg acacttcctg atcgaaggag acctgaacce 600

ggacaacage gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctgtt 660

cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgcgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720

gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780

actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840

cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatcgcagc acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttcttggcag caaagaacct 960

gagcgcgca atcctgctga gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020

gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080

ggcactggtc agacagcagc tggcggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140

gaacggatac gcaggatata tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200

caagccgatc ctggaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260

agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgacc agatccacct 1320

gggagaactg cacgcaatcc tgagaagaca ggaagacttc taccgttcc tgaaggacaa 1380

cagagaaaag atcgaaaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgtggc 1440

aagaggaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaaacaa tcacaccgtg 1500

gaacttcgaa gaagtcgtcg acaagggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560

aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620

atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680

gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740

cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800

cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860

cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920

ggaagacatc gtctgacac tgacactgtt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980

gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040

cacaggatgg ggaagactga gcgaaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100

aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160

gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220

gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
 aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcatgggaa gacacaagcc 2340  
 ggaaaacatc gtcatcgaaa tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
 cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
 gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
 gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
 cgacgtcgac cacatcgtcc cgcagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
  
 cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccgagcg aagaagtctg 2700  
 caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760  
 gttcgacaac ctgacaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
 catcaagaga cagctggtcg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880  
 cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
 cacactgaag agcaagctgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaagtcag 3000  
 agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatactg aacgcagtcg tcggaacagc 3060  
  
 actgatcaag aagtaccga agctggaaag cgaattctgc tacggagact acaaggtcta 3120  
 cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180  
 cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240  
 aatcagaaag agaccgctga tcgaaacaaa cggagaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300  
 gggaagagac ttcgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360  
 gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420  
 cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
  
 cccgacagtc gcatacagcg tcctggctgt cgcaaaggtc gaaaagggaa agagcaagaa 3540  
 gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gcttcgaaaa 3600  
 gaaccgacg gacttcctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
 caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720  
 cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgccg agcaagtacg tcaacttct 3780  
 gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840  
 gctgttcgtc gaacagcaca agcaactacct ggacgaaatc atcgaaacaga tcagcgaatt 3900  
  
 cagcaagaga gtcatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtctgagcg catacaaaa 3960  
 gcacagagac aagccgatca gagaacaggc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020  
 aaacctggga gcaccggcag cattcaagta cttcgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080

cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140  
cgaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200  
gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctaccatg agaataagag 4260  
aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctcttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320

acacctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380  
attaataaaa aatgaaaaga accaaaaaaaa ataaaaaaaa taaaaaaaaac aaaaaaaaaa 4440  
aaaaaagaaa aaaaataaaa aaaacaaaaa aaacaaaaaa aataaaaaaa agaaaaaaaa 4500  
caaaaaaaaaat aaaaaaaaa 4518

<210> 30  
<211> 4500  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 19  
<400> 30

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60

cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120  
cggatgggca gtcatcacag acgaatacaa ggtcccagc aagaagttca aggtcctggg 180  
aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcggg gactgctgtg tcgacagcgg 240  
agaaacagca gaagcaaca gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300  
gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360  
cttcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420  
cccgatcttc gaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480

ccacctgaga aagaagctgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540  
ggcactggca cacatgatca agttcagagg aacttctctg atcgaaggag acctgaacce 600  
ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctggt 660  
cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720  
gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg cggggagaaa agaagaacgg 780  
actgttcgga aaactgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840  
cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatacgacg acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttctggcag caaagaacct 960  
gagcgacgca atctgtctga gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020

gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080  
ggcactggtc agacagcagc tgccggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140  
gaacggatac gcaggatata tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200  
caagccgatc ctggaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260  
agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgcacc agatccacct 1320  
  
gggagaactg cacgcaatcc tgagaagaca ggaagacttc taccggttcc tgaaggacaa 1380  
cagagaaaag atcgaaaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgctggc 1440  
aagaggaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaaacaa tcacaccgtg 1500  
gaacttcgaa gaagtcgtcg acaagggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560  
aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620  
atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680  
gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740  
  
cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800  
cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860  
cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920  
ggaagacatc gtctgacac tgacactgtt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980  
gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040  
cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100  
aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160  
  
gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220  
gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280  
aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcattgggaa gacacaagcc 2340  
ggaaaacatc gtcatcgaaa tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400  
cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460  
gaaggaacac cgggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520  
gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580  
  
cgacgtcgac cacatcgtcc cgcagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640  
cctgacaaga agcgacaaga acagaggaag gagcgacaac gtcccagcagc aagaagtcgt 2700  
caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760  
gttcgacaac ctgacaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820  
catcaagaga cagctggctg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880

cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940  
cacactgaag agcaagctgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaaggtcag 3000

agaaatcaac aactaccacc acgacacacga cgcatacctg aacgcagtcg tcggaacagc 3060  
actgatcaag aagtacccga agctggaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120  
cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180  
cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240  
aatcagaaag agaccgctga tcgaacaaa cggagaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300  
gggaagagac ttcgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360  
gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420

cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
cccgacagtc gcatacagcg tcctggtcgt cgcaaaggtc gaaaagggaa agagcaagaa 3540  
gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gcttcgaaaa 3600  
gaaccgcatc gacttcctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720  
cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcaactgcc agcaagtacg tcaacttctt 3780  
gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840

gctgttcgtc gaacagcaca agcactacct ggacgaaatc atcgaaacaga tcagcgaatt 3900  
cagcaagaga gtatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtctgagcg catacaaaa 3960  
gcacagagac aagccgatca gagaacagc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020  
aaacctggga gcaccggcag cattcaagta cttcgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080  
cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140  
cgaaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200  
gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctacctg agaataagag 4260

aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctcttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320  
acacctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380  
attaataaaa aatggaaaga accaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500

<210> 31  
<211> 4500  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 mRNA with a poly-A tail comprising SEQ ID NO: 2

<400> 31

tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60

cggatccgcc accatggaca agaagtacag catcggactg gacatcggaa caaacagcgt 120

cggatgggca gtcatcacag acgaatacaa ggtcccagc aagaagttca aggtcctggg 180

aaacacagac agacacagca tcaagaagaa cctgatcgga gcactgctgt tcgacagcgg 240

agaaacagca gaagcaacaa gactgaagag aacagcaaga agaagataca caagaagaaa 300

gaacagaatc tgctacctgc aggaaatctt cagcaacgaa atggcaaagg tcgacgacag 360

cttcttccac agactggaag aaagcttctt ggtcgaagaa gacaagaagc acgaaagaca 420

cccgatcttc ggaaacatcg tcgacgaagt cgcataccac gaaaagtacc cgacaatcta 480

ccacctgaga aagaagetgg tcgacagcac agacaaggca gacctgagac tgatctacct 540

ggcactggca cacatgatca agttcagagg acacttctg atcgaaggag acctgaacct 600

ggacaacagc gacgtcgaca agctgttcat ccagctggtc cagacataca accagctggt 660

cgaagaaaac ccgatcaacg caagcggagt cgacgcaaag gcaatcctga gcgcaagact 720

gagcaagagc agaagactgg aaaacctgat cgcacagctg ccgggagaaa agaagaacgg 780

actgttcgga aacctgatcg cactgagcct gggactgaca ccgaacttca agagcaactt 840

cgacctggca gaagacgcaa agctgcagct gagcaaggac acatcagcag acgacctgga 900

caacctgctg gcacagatcg gagaccagta cgcagacctg ttcttggcag caaagaacct 960

gagcgcgca atcctgetga gcgacatcct gagagtcaac acagaaatca caaaggcacc 1020

gctgagcgca agcatgatca agagatacga cgaacaccac caggacctga cactgctgaa 1080

ggcactggtc agacagcagc tgccggaaaa gtacaaggaa atcttcttcg accagagcaa 1140

gaacggatac gcaggatata tcgacggagg agcaagccag gaagaattct acaagttcat 1200

caagccgatc ctggaaaaga tggacggaac agaagaactg ctggtcaagc tgaacagaga 1260

agacctgctg agaaagcaga gaacattcga caacggaagc atcccgcacc agatccacct 1320

gggagaactg cacgcaatcc tgagaagaca ggaagacttc taccgttcc tgaaggacaa 1380

cagagaaaag atcgaaaaga tcttgacatt cagaatcccg tactacgtcg gaccgtggc 1440

aagagaaaac agcagattcg catggatgac aagaaagagc gaagaacaa tcacaccgtg 1500

gaacttcgaa gaagtcgtcg acaaggagc aagcgcacag agcttcatcg aaagaatgac 1560

aaacttcgac aagaacctgc cgaacgaaaa ggtcctgccg aagcacagcc tgctgtacga 1620

atacttcaca gtctacaacg aactgacaaa ggtcaagtac gtcacagaag gaatgagaaa 1680

gccggcattc ctgagcggag aacagaagaa ggcaatcgtc gacctgctgt tcaagacaaa 1740

cagaaaggtc acagtcaagc agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttcga 1800

cagcgtcgaa atcagcggag tcgaagacag attcaacgca agcctgggaa cataccacga 1860

cctgctgaag atcatcaagg acaaggactt cctggacaac gaagaaaacg aagacatcct 1920

ggaagacatc gtctcgacac tgacactgtt cgaagacaga gaaatgatcg aagaaagact 1980

gaagacatac gcacacctgt tcgacgacaa ggtcatgaag cagctgaaga gaagaagata 2040

cacaggatgg ggaagactga gcagaaagct gatcaacgga atcagagaca agcagagcgg 2100

aaagacaatc ctggacttcc tgaagagcga cggattcgca aacagaaact tcatgcagct 2160

gatccacgac gacagcctga cattcaagga agacatccag aaggcacagg tcagcggaca 2220

gggagacagc ctgcacgaac acatcgcaaa cctggcagga agcccggcaa tcaagaaggg 2280

aatcctgcag acagtcaagg tcgtcgacga actggtcaag gtcatgggaa gacacaagcc 2340

ggaaaacatc gtcatcgaat tggcaagaga aaaccagaca acacagaagg gacagaagaa 2400

cagcagagaa agaatgaaga gaatcgaaga aggaatcaag gaactgggaa gccagatcct 2460

gaaggaacac ccggtcgaaa acacacagct gcagaacgaa aagctgtacc tgtactacct 2520

gcagaacgga agagacatgt acgtcgacca ggaactggac atcaacagac tgagcgacta 2580

cgacgtcgac cacatcgtcc cgagagctt cctgaaggac gacagcatcg acaacaaggt 2640

cctgacaaga agcgacaaga acagaggaaa gagcgacaac gtcccagagcg aagaagtctg 2700

caagaagatg aagaactact ggagacagct gctgaacgca aagctgatca cacagagaaa 2760

gttcgacaac ctgacaaagg cagagagagg aggactgagc gaactggaca aggcaggatt 2820

catcaagaga cagctggtcg aaacaagaca gatcacaag cacgtcgac agatcctgga 2880

cagcagaatg aacacaaagt acgacgaaaa cgacaagctg atcagagaag tcaaggtcat 2940

cacactgaag agcaagetgg tcagcgactt cagaaaggac ttccagttct acaaggtcag 3000

agaaatcaac aactaccacc acgcacacga cgcatactg aacgcagtcg tcggaacagc 3060

actgatcaag aagtaccga agctggaaag cgaattcgtc tacggagact acaaggtcta 3120

cgacgtcaga aagatgatcg caaagagcga acaggaatc ggaaaggcaa cagcaaagta 3180

cttcttctac agcaacatca tgaacttctt caagacagaa atcacactgg caaacggaga 3240

aatcagaaag agaccgtga tcgaaacaaa cggagaaaca ggagaaatcg tctgggacaa 3300

gggaagagac ttcgcaacag tcagaaaggt cctgagcatg cgcaggtca acatcgtcaa 3360

gaagacagaa gtccagacag gaggattcag caaggaaagc atcctgccga agagaaacag 3420

cgacaagctg atcgcaagaa agaaggactg ggacccgaag aagtacggag gattcgacag 3480  
 cccgacagtc gcatacagcg tcctggctgt cgcaaagtc gaaaaggaa agagcaagaa 3540  
 gctgaagagc gtcaaggaac tgctgggaat cacaatcatg gaaagaagca gcttcgaaaa 3600  
 gaacccgacg gacttcctgg aagcaaaggg atacaaggaa gtcaagaagg acctgatcat 3660  
 caagctgccg aagtacagcc tgttcgaact ggaaaacgga agaaagagaa tgctggcaag 3720  
 cgcaggagaa ctgcagaagg gaaacgaact ggcactgccg agcaagtacg tcaacttctt 3780  
 gtacctggca agccactacg aaaagctgaa gggaagcccg gaagacaacg aacagaagca 3840

gctgttcgtc gaacagcaca agcactacct ggacgaaatc atcgaacaga tcagcgaatt 3900  
 cagcaagaga gtcatcctgg cagacgcaaa cctggacaag gtcttgagcg catacaaaa 3960  
 gcacagagac aagccgatca gagaacaggc agaaaacatc atccacctgt tcacactgac 4020  
 aaacctggga gcaccggcag cattcaagta cttcgacaca acaatcgaca gaaagagata 4080  
 cacaagcaca aaggaagtcc tggacgcaac actgatccac cagagcatca caggactgta 4140  
 cgaaacaaga atcgacctga gccagctggg aggagacgga ggaggaagcc cgaagaagaa 4200  
 gagaaaggtc tagctagcca tcacatttaa aagcatctca gcctaccatg agaataagag 4260

aaagaaaatg aagatcaata gcttattcat ctctttttct ttttcgttgg tgtaaagcca 4320  
 acacctgtc taaaaaacat aaatttcttt aatcattttg cctcttttct ctgtgcttca 4380  
 attaatataa atggaaaaga accaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500