



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월04일

(11) 등록번호 10-2382772

(24) 등록일자 2022년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/90 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12Q 1/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7000571
(22) 출원일자(국제) 2017년06월08일
심사청구일자 2020년06월05일
(85) 번역문제출일자 2019년01월08일
(65) 공개번호 10-2019-0017022
(43) 공개일자 2019년02월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/036648
(87) 국제공개번호 WO 2017/214460
국제공개일자 2017년12월14일
(30) 우선권주장
62/347,553 2016년06월08일 미국(US)
15/493,129 2017년04월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02015026885 A1*
US20160040189 A1
US20140273232 A1
W02015139139 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
애질런트 테크놀로지스, 인크.
미국 캘리포니아주 95051 산타 클라라 스티븐스 크릭 불러바드 5301
(72) 발명자
델링거 더글라스 제이
미국 캘리포니아주 95051-7201 산타 클라라 스티븐스 크릭 불러바드 5301 엠에스: 1에이-피비
라이언 다니엘 이
미국 캘리포니아주 95051-7201 산타 클라라 스티븐스 크릭 불러바드 5301 엠에스: 1에이-피비
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 17 항

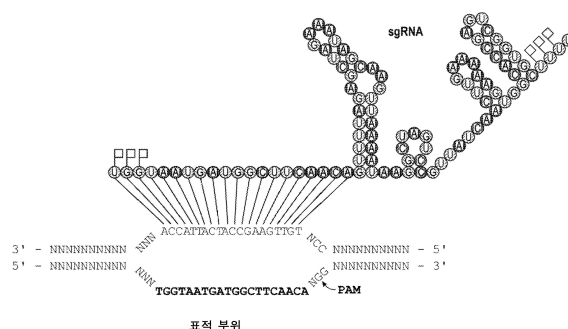
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **화학적으로 변형된 가이드 RNA를 사용하는 고 특이성 게놈 편집**

(57) 요약

본 발명은 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA 및 CRISPR-Cas 시스템에서 그의 용도에 관한 것이다. 상기 화학적으로 변형된 가이드 RNA는 표적 폴리뉴클레오타이드 서열에 대하여 향상된 특이성을 갖는다. 본 발명은 또한 폴리뉴클레오타이드의 절단 또는 닉킹을 위하여, 및 고 특이성 게놈 편집을 위하여 화학적으로 변형된 가이드 RNA의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/907 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12Q 1/44 (2013.01)

C12N 2310/31 (2013.01)

C12N 2310/3125 (2013.01)

C12N 2310/313 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12Q 2521/301 (2013.01)

(72) 발명자

로이 셉해덱

미국 캘리포니아주 95051-7201 산타 클라라 스티븐
스 크릭 불러바드 5301 엠에스: 1에이-피비

샘슨 제프리 알

미국 캘리포니아주 95051-7201 산타 클라라 스티븐
스 크릭 불러바드 5301 엠에스: 1에이-피비

명세서

청구범위

청구항 1

(a) (i) PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, 및 (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및

(b) 상기 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절

을 포함하는 합성 가이드 RNA로서,

상기 가이드 서열이, N이 -10 내지 6의 정수인 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 가이드 서열이 상기 가이드 서열의 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N 또는 16-N에 위치한 하나 이상의 변형을 포함하며, 상기 가이드 RNA가 표적 폴리뉴클레오타이드 및 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이를 식별하는 특성을 갖는, 합성 가이드 RNA.

청구항 2

제1항에 있어서,

가이드 RNA가 단일 가이드 RNA(sgRNA)인, 합성 가이드 RNA.

청구항 3

PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함하는 합성 crRNA로서,

상기 가이드 서열이, N이 -10 내지 6의 정수인 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 가이드 서열이 상기 가이드 서열의 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N 또는 16-N에 위치한 하나 이상의 변형을 포함하며, 상기 crRNA가 표적 폴리뉴클레오타이드 및 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이를 식별하는 특성을 갖는, 합성 crRNA.

청구항 4

제1항에 있어서,

하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 5-N 또는 11-N, 또는 이들의 조합에 위치하는, 합성 가이드 RNA.

청구항 5

제3항에 있어서,

하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 5-N 또는 11-N, 또는 이들의 조합에 위치하는, 합성 crRNA.

청구항 6

제1항에 있어서,

하나 이상의 변형이 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 변형된 염기, C3'-엔도 당 퍼커(sugar pucker) 배치형태를 부여하는 2'-변형, 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.

청구항 7

제3항에 있어서,

하나 이상의 변형이 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 변형된 염기, C3'-엔도 당 퍼커(sugar pucker) 배치형태를 부여하는 2'-변형, 및 이들의 조합으로부터

터 선택되는, 합성 crRNA.

청구항 8

제6항에 있어서,

2'-변형이 2'-O-메틸, 2'-플루오로 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.

청구항 9

제7항에 있어서,

2'-변형이 2'-O-메틸, 2'-플루오로 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 crRNA.

청구항 10

제1항에 있어서,

하나 이상의 변형이 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-O-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.

청구항 11

제3항에 있어서,

하나 이상의 변형이 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-O-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)로부터 선택되는, 합성 crRNA.

청구항 12

제1항에 있어서,

합성 가이드 RNA의 5'-말단, 3'-말단 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.

청구항 13

제3항에 있어서,

합성 crRNA의 5'-말단, 3'-말단 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 crRNA.

청구항 14

제1항에 있어서,

표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 유전자, IL2RG 유전자 또는 VEGFA 유전자 내에 위치하는, 합성 가이드 RNA.

청구항 15

제3항에 있어서,

표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 유전자, IL2RG 유전자 또는 VEGFA 유전자 내에 위치하는, 합성 crRNA.

청구항 16

표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;

제1항, 제2항, 제4항, 제6항, 제8항, 제10항, 제12항 및 제14항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계;

Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계; 및

상기 표적 폴리뉴클레오타이드에 gRNA의 하이브리드화 및 CRISPR 기능의 수행을 초래하기 위한 조건 하에서 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 상기 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계

를 포함하는, CRISPR 기능의 특이성을 향상시키는 방법으로서,

상기 Cas 단백질이 단백질로서 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로서 제공되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

폴리뉴클레오타이드 표적을 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계가 세포에서 수행되고, 상기 복합체를 형성하는 단계가 상기 세포의 외부에서 또는 내부에서 수행되는, 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 2016년 6월 8일자 출원된 미국 가출원 62/347,553, 및 2017년 4월 20일자 출원된 미국 비가출원 15/493,129를 우선권 주장하고, 이들의 내용은 참고로 그 전체가 편입된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 분자성 생물학의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 규칙적으로 공간사이의 짧은 회문성 반복부의 클러스터(CRISPR) 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 원상태 원핵 CRISPR-Cas 시스템은 일정한 길이의 개입 가변성 서열을 가진 다수의 짧은 반복부(즉, 규칙적으로 공간사이의 짧은 회문성 반복부의 클러스터, 또는 "CRISPR"), 및 CRISPR-관련("Cas") 단백질을 포함한다. 전사된 CRISPR 어레이의 RNA는 Cas 단백질의 서브셋에 의해 작은 가이드 RNA로 가공되고, 이는 일반적으로 아래에 논의된 바와 같이 2 성분을 갖는다. 적어도 6개의 상이한 시스템: 유형 I, 유형 II, 유형 III, 유형 IV, 유형 V 및 유형 VI이 있다. RNA의 성숙한 crRNA로의 가공에서 관여된 효소는 6개의 시스템에서 상이하다. 원상태 원핵 유형 II 시스템에서, 가이드 RNA("gRNA")는 CRISPR RNA("crRNA") 및 트랜스-작용 RNA("tracrRNA")로서 지칭된 2개의 짧은, 비-코딩 RNA 중을 포함한다. 예시적 시스템에서, gRNA는 Cas 뉴클레아제와 복합체를 형성한다. gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체는, gRNA의 한 부분에 상보성 서열인, 프로토스페이서 인접한 모티프("PAM") 및 프로토스페이서를 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 결합시킨다. gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드의 인식 및 결합은 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단을 유도한다. 원상태 CRISPR-Cas 시스템은, gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체가 진핵 유기체에서 RNAi에 유사한 방식으로 외인성 유전 인자를 인식 및 침묵화하는, 원핵생물에서 면역 시스템으로서 기능하여 외인성 유전 인자, 예컨대 플라스미드 및 파지에 저항을 부여한다.

[0006] crRNA 및 tracrRNA가 공유적으로 연결되는 단일-가이드 RNA("sgRNA")가 자연적으로-현존하는 crRNA와 tracrRNA 사이 형성된 복합체를 대체할 수 있다는 것이 실증되었다.

발명의 내용

[0007] sgRNA를 포함하는, gRNA 개발에 관련된 고려사항들은 특이성, 안정성, 및 기능성을 포함한다. 특이성은 원하는 표적 서열을 결합, 니킹, 및/또는 절단하기 위한 특정 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체의 능력을 지칭하고, 반면에 원하는 표적으로부터 서열 및/또는 위치에서 상이한 폴리뉴클레오타이드의 결합, 니킹, 및/또는 절단은 거의 발

생하지 않는다. 따라서, 특이성은 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체의 오프-표적 효과 최소화를 지칭한다. 그럼에도 불구하고, 원하는 gRNA 기능성을 가지면서, 감소된 오프-표적 효과를 가진 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 원하는 결합 친화도를 갖는, sgRNA를 포함하는, gRNA 제공이 필요하다. 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 원하는 결합 친화도 및/또는 감소된 오프-표적 결합을 가진, 향상된 특이성을 갖는, sgRNA를 포함하는, gRNA를 제조 및 사용하는 향상된 방식이 또한 필요하다.

도면의 간단한 설명

[0008]

도 1은 예시적 CRISPR-Cas 시스템의 실례이다. 복합체는 단일-가이드 RNA 및 Cas 단백질에 의해 형성되고, 복합체는 표적 폴리뉴클레오타이드를 인식하고 결합시킨다. Cas 뉴클레아제는 S. 파이로게네스 Cas9 뉴클레아제이다. S. 파이로게네스 Cas9 뉴클레아제는 PAM 서열이다(여기에서, PAM 서열은 NGG의 3-뉴클레오타이드 서열이고, 여기에서 N은 A, G, C 또는 T이지만, 다른 PAM 서열, 예컨대 NAG 및 기타는 실재한다고 공지된다). sgRNA는 가이드 서열, crRNA 서열 또는 분절, 및 tracrRNA 서열 또는 분절을 포함한다. sgRNA의 가이드 서열은 PAM 서열의 직접적으로 업스트림 DNA 표적과 하이브리드화한다.

도 2a는 crRNA 분절 (203) 및 tracrRNA 분절 (205)를 포함하는 예시적 가이드 RNA (201)을 도시한다. 도 2b는 crRNA 분절 (209) 및 tracrRNA 분절 (211)을 포함하는 예시적 단일-가이드 RNA (207)을 도시하고, 여기서 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절은 루프 (213)을 통해 연결된다.

도 3은 가이드 RNA에서 포함될 수 있는 다양한 화학적 변형의 일부의 구조를 도시하고; 물론, 도 3은 제한하기 위한 것은 아니고 본 명세서에서 기재된 바와 같이 많은 다른 변형은 이용될 수 있다.

도 4는 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스가 가열에 의해 별개의 가닥으로 분리함에 따라 자외선(UV) 흡광도가 얼마나 증가하는지를 증명하는 그래프이다. 에스자형 곡선은 듀플렉스의 별개의 가닥으로의 해리를 반영하고, 에스자형 곡선의 중심은 듀플렉스의 T_m 이다. 곡선은 생리적 염 농도에서 20-뉴클레오타이드 RNA/DNA 듀플렉스의 용융 온도가 약 50°C이다.

도 5a는 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 하이브리드화된 듀플렉스를 형성하는 그리고 가이드 RNA의 확장 영역, 잠금 영역, 샘플링 영역, 씨드 영역(전형적으로 10-mer), 이중-가이드 줄기 또는 단일-가이드 줄기-루프, 및 tracrRNA 영역을 보여주는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 또는 투-피스 이중-가이드 RNA("dgRNA")를 설명한다. 도 5b는 가이드 서열 및 상보성 DNA 서열의 씨드 부분 사이 씨드 듀플렉스의 초기 형성 후, 뉴클레오타이드의 결합이 샘플링 영역 및 잠금 영역을 통해 순차적으로 진행하여 용융 온도를 갖는 RNA/DNA 듀플렉스를 형성하는 방법을 설명한다. 도 5c는 씨드 영역의 뉴클레오타이드에서 화학적 변형이 고수준의 협동성을 유지하면서 개별 염기 쌍의 결합 에너지를 감소시킬 수 있어서, 그렇게 함으로써 샘플링 영역을 확장시키고 RNA/DNA 듀플렉스의 용융 온도를 저하시킨다는 것을 설명한다. 도 5c는 또한 샘플링 영역에서 화학적 변형을 설명한다.

도 6a는 20-뉴클레오타이드 가이드 서열을 가진 그리고 가이드 서열에서 다양한 위치에 편입된 화학적 변형의 다양한 유형에 의해 변형된 실험적 crRNA 폴리뉴클레오타이드를 설명한다. 도 6b는 미변형된 crRNA를 포함하는 RNA/DNA 듀플렉스에 대한 용융 곡선을 도시한다. 도 6c 내지 6f는 구별되는 가이드 서열에서 뉴클레오타이드 6 내지 9에 변형의 상이한 유형을 포함하는 화학적으로 변형된 crRNA를 포함하는 RNA/DNA 듀플렉스에 대한 용융 곡선을 도시한다.

도 7은 음의 또는 양의 정수, 각각에 의해 x-축상에 표시된 바와 같이 가이드 서열의 증분적 5' 절단 또는 5' 확장 후 상보성 DNA 가닥에 하이브리드화된 (crRNA에서) 가이드 서열의 20-염기 쌍 듀플렉스의 용융 온도에서 변화를 보여주는 그래프이다.

도 8a는, CLTA1 온-표적, CLTA1 오프1-표적 및 CLTA1 오프3-표적 각각을 나타내는, "온"으로 불리는 표적 폴리뉴클레오타이드의 시험관내 절단 그리고 "오프1" 및 "오프3"으로 불리는 2개의 상이한 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 별도로 분석된 절단에 관하여 인간 CLTA 유전자에서 "CLTA1" 서열에 표적화된 gRNA에서 화학적 변형의 영향을 도시한다.

도 8b는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 비 계산에 의해 도 8a에서 절단 결과에서 유래된다. 분석된 가이드 RNA당 각각의 온-표적 절단 백분율에 각각의 비를 곱셈함으로써 수득된 "특이성 스코어"가 또한 계산된다. 음영된 비 및 특이성 스코어는 도 8b에서 도시된 기타에 관하여 그것의 더 큰 값으로 주목할 만하다.

도 9a는, CLTA4 온-표적, CLTA4 오프1-표적, CLTA4 오프2-표적 및 CLTA4 오프3-표적 각각을 나타내는, "온"으

로 불리는 표적 폴리뉴클레오타이드의 시험관내 절단 그리고 "오프1", "오프2", 및 "오프3"으로 불리는 3개의 상이한 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 별도로 분석된 절단에 관하여 인간 CLTA 유전자에서 "CLTA4" 서열에 표적화된 gRNA내 다양한 위치에 2'-O-메틸-3'-PACE("MP") 변형의 영향을 도시한다.

도 9b는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 비 계산에 의해 도 9a에서 절단 결과에서 유래된다. 특이성 스코어는 도 8b에 대하여 기재된 바와 같이 계산되고, 1.5 초과 또는 동등의 스코어는 음영된다. 오프-표적 폴리뉴클레오타이드당 3개의 최고 스코어는 더 어두운 음영에 의해 표시된다.

도 10은 이 도에서 IL2RG 온-표적 및 IL2RG 오프3-표적 각각을 나타내는 "온"으로 불리는 표적 폴리뉴클레오타이드의 시험관내 절단 그리고 "오프3"으로 불리는 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 별도로 분석된 절단에 관하여 인간 IL2RG 유전자에서 서열에 표적화된 gRNA내 다양한 위치에 MP 변형의 영향을 도시한다. 비는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된다. 특이성 스코어는 도 8b에 대하여 기재된 바와 같이 계산되고, 2.0 초과의 스코어는 음영된다. 3개의 최고 스코어는 더 어두운 음영에 의해 표시된다.

도 11a는 이 도에서 HBB 온-표적 및 HBB 오프1-표적 각각을 나타내는 "온"으로 불리는 표적 폴리뉴클레오타이드의 시험관내 절단 그리고 "오프1"로 불리는 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 별도로 분석된 절단에 관하여 인간 HBB 유전자에서 서열에 표적화된 gRNA내 다양한 위치에 MP 변형의 영향을 도시한다. 비는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된다. 특이성 스코어는 도 8b에 대하여 기재된 바와 같이 계산되고, 2.0 초과의 스코어는 음영된다. 3개의 최고 스코어는 더 어두운 음영에 의해 표시된다.

도 11b는 이 도에서 내인성 HBB 온-표적, HBB 오프1-표적, HBB 오프2-표적 및 HBB 오프3-표적 부위 각각을 나타내는 "온"으로 불리는 표적 게놈성 유전자좌의 절단 대 "오프1", "오프2" 및 "오프3"으로 불리는 3개의 상이한 오프-표적 게놈성 유전자좌의 동반 절단에 관하여 합성 sgRNA 및 Cas9-발현 플라스미드로 형질감염된 인간 K562 세포내 인간 HBB 유전자에서 서열에 표적화된 gRNA내 변형의 다양한 유형의 영향을 도시한다. "미변형"은 화학적으로 변형되지 않았던 sgRNA를 표시한다. "3xM"은 2'-O-메틸("M") 뉴클레오타이드가 sgRNA 가닥의 바로 맨앞 3개의 그리고 바로 맨 마지막 3개의 뉴클레오타이드에서, 즉 그것의 5' 및 3' 말단 각각에서 편입되었다는 것을 나타낸다. 유사하게, "3xMS"는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트("MS") 뉴클레오타이드가 마찬가지로 sgRNA의 5' 및 3' 말단에서 편입되었다는 것을 나타내고, 반면에 "3xMSP"는 2'-O-메틸-3'-티오파스("MSP") 뉴클레오타이드가 마찬가지로 sgRNA의 5' 및 3' 말단에서 편입되었다는 것을 나타낸다. 모든 sgRNA는 형질감염된 세포내 표시된 유전자좌의 편집을 위하여 분석되었다.

도 12a는, 최고부터 최저까지 특이성 스코어에 따라 등급화된 엔트리로, 도 11a에서 나타난 바와 같이 엔트리 1 내지 17에서 동일한 결과를 도시한다. 엔트리 18 내지 64는, HBB 온-표적 및 HBB 오프1-표적 각각을 나타내는, "온"으로 불리는 표적 폴리뉴클레오타이드의 시험관내 절단 그리고 "오프1"로 불리는 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 별도로 분석된 절단에 관하여 인간 HBB 유전자에서 서열에 표적화된 gRNA내 다양한 위치에 추가의 MP 변형의 영향을 보여준다. "1xMP"는 양쪽 5' 및 3' 말단에서 말단 뉴클레오타이드가 MP로 변형되었던 것을 나타낸다. 비는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된다. 특이성 스코어는 도 8b에 대하여 기재된 바와 같이 계산된다. 최고 스코어는 음영된다.

도 12b는 이 도에서 내인성 HBB 온-표적 및 HBB 오프1-표적 부위 각각을 나타내는 "온"으로 불리는 표적 게놈성 유전자좌의 절단 그리고 "오프1"로 불리는 오프-표적 게놈성 유전자좌의 동반 절단에 관하여 형질감염된 세포내 인간 HBB 유전자에서 서열에 표적화된 gRNA내 다양한 위치에 MP 변형의 영향을 도시한다. 합성 sgRNA 및 재조합 Cas9 단백질의 복합체로 형질감염된 배양된 세포에서 한쪽 또는 양쪽 부위에 산출된 절단의 백분율은 정제된 게놈성 DNA의 분할된 샘플에서 온-표적 및 오프-표적 유전자좌의 PCR 증폭에 의한 48 시간 사후-형질감염, 이어서 풀링된 앰플리콘의 차세대 서열분석 및 평가된 온-표적 또는 오프-표적 절단 부위 근처 인텔의 존재 대 부재에 따른 서열 판독의 생물정보 분할로 결정된다. 형질감염된 세포의 각각의 샘플에서 생성된 인텔은 sgRNA:Cas9 복합체 대신에 완충액으로 처리된 모의-형질감염된 세포의 대조군 샘플에 비해 정규화된다. 비는 별도로 형질감염된 각각의 sgRNA에 대하여 오프-표적 부위를 보여주는 판독의 수 대 표적 부위 인텔을 보여주는 서열 판독의 수로 계산된다. 특이성 스코어는 도 8b에 대하여 기재된 바와 같이 계산된다. "1xMP"는 양쪽 5' 및 3' 말단에서 말단 뉴클레오타이드가 MP로 변형되었다는 것을 나타낸다. 엔트리 1 내지 21은 K562 세포 형질감염 및 배양에 의해 수득된 결과를 보여주고, 반면에 엔트리 22 내지 42는 (또한 iPS 세포 또는 iPSCs로서도 공지된) 유도된

만능 줄기 세포 형질감염 및 배양에 의해 수득된 결과를 보여준다. 엔트리 1 내지 12는 최고부터 최저까지 특이성 스코어에 따라 등급화된다. 마찬가지로 엔트리 13 내지 19, 엔트리 22 내지 33, 및 엔트리 34 내지 40은 그룹화당 특이성 스코어에 의해 등급화된다. 2.0 초과 특이성 스코어는 음영된다.

도 12c는 그룹화당 최고부터 최저 비까지 분류된, 측정된 비에 따라 도 12b에서 결과의 대안적인 조직화를 도시한다.

도 13은 도 9a, 9b, 10 및 11a에서 제시된 결과의 비교를 도시한다. 도 13은 표적 폴리뉴클레오타이드 절단용 Cas 시스템에서 사용될 때 표적 특이성에 관하여 화학적으로 변형된 가이드 RNA의 연구로부터 몇 개의 추세를 도시한다. 추세에 의해 지지된 개념은 오프-표적 폴리뉴클레오타이드가 또한 Cas 시스템에서 존재하는 경우 특히 유용하다.

도 14는 K562 세포에서 IL2RG sgRNA 및 VEGFA sgRNA내 변형의 다양한 유형의 영향을 도시한다.

도 15는 인간 K562 세포에서 HBB 유전자의 상동 지정 복구(HDR)의 이들 실험으로부터 결과를 도시한다.

도 16은, 변형된 또는 미변형된 sgRNA에 대하여 HBB 온-표적 부위 및 16 유사한 오프-표적 부위에서 인텔 형성을 측정하였던, 제1 평가로부터 결과를 도시한다.

도 17은 양쪽 평가로부터 증폭된 DNA 유전자좌(PCR) 또는 포획된 DNA 유전자좌(SureSelect)의 심도 서열분석 분석으로부터 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은, 적어도 부분적으로, gRNA에 특정 화학적 변형이 CRISPR-Cas 시스템에 의해 용인되고 표적 폴리뉴클레오타이드에 Cas:gRNA 결합, 상기의 니킹, 및/또는 상기의 절단의 효능을 실질적으로 타협 없이 Cas:gRNA 복합체화의 오프-표적 효과를 감소시킨다는 예기치 못한 발견에 기반된다.

[0010] 본 발명은 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 특이성-향상 변형은 합성 가이드 RNA와 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하나 이상의 뉴클레오타이드 쌍의 회합을 약화 또는 강화시키고/거나 합성 가이드 RNA와 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하나 이상의 뉴클레오타이드 쌍의 회합을 약화시켜 이로써 오프-표적 약화의 적어도 하나가 존재하면 온-표적 약화보다 더 크다. 합성 가이드 RNA는 gRNA 기능성을 갖는다. 특이성-향상 변형(들)은 가이드 서열에서, 예를 들어, 잠금 영역, 샘플링 영역, 및/또는 씨드 영역에서 위치할 수 있다. 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형(들)은 gRNA 및 표적 폴리뉴클레오타이드 서열 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열(들)에 의해 형성된 듀플렉스의 용융 온도를 저하시키거나, gRNA/표적 듀플렉스의 용융 온도를 상승시키고 하나 이상의 gRNA/오프-표적 듀플렉스의 용융 온도를 저하시킨다. 본 발명은 또한 이들 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체, 합성 가이드 RNA를 사용하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법, 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 세트, 라이브러리, 키트 및 어레이를 제공한다. 본 발명은 또한 합성 가이드 RNA의 제조 방법을 제공한다.

[0011] I. 정의

[0012] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "가이드 RNA"는 일반적으로 Cas 단백질에 결합할 수 있고 표적 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 또는 mRNA 분자) 내에서 특정 위치에 Cas 단백질 표적화에 일조할 수 있는 RNA 분자(또는 집합적으로 RNA 분자의 그룹)를 지칭한다. 가이드 RNA는 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가이드 RNA는 tracrRNA가 아닌 crRNA를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "crRNA" 또는 "crRNA 분절"은 폴리뉴클레오타이드-표적화 가이드 서열, 줄기 서열(추가적 명료성을 위하여: 줄기 서열은, 단일 가이드 RNA에서, tracrRNA의 상응하는 일부와 줄기를 형성하는 줄기-형성 서열을 포괄한다), 및, 임의로, 5'-돌출부 서열을 포함하는 RNA 분자 또는 이의 부분을 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "tracrRNA" 또는 "tracrRNA 분절"은 단백질-결합 분절을 포함하는 RNA 분자 또는 이의 부분을 지칭한다(예를 들어, 단백질-결합 분절은 CRISPR-관련 단백질, 예컨대 Cas9와 상호작용할 수 있다). tracrRNA는 또한 부분적으로 또는 완전히 crRNA에 하이브리드화하는 분절을 포함한다. 용어 "가이드 RNA"는 단일-가이드 RNA(sgRNA)를 포괄하고, 여기에서 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절은 동일한 RNA 분자 또는 가닥에서 위치한다. 용어 "가이드 RNA"는 또한, 집합적으로, 2 이상의 RNA 분자의 그룹을 포괄하고, 여기에서 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절은 별개의 RNA 분자에서 위치한다. 용어 "가이드 RNA"는 또한 Cas9(예를 들어, Cpf1 단백질) 이외의 Cas 단백질을 결합시키는 그리고 표적 폴리뉴클레오타이드에서 상보성 서열(또는 "표적 서열")을 결합, 니킹 및/또는 절단시킬 수 있는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하기 위해 Cas 단백질 결합을 포함하는 가이드 RNA의 기능을

포함하는 RNA의 단일 또는 분절화된 가닥 내에서 가이드 서열을 갖는 분자성 분절의 RNA 분자 또는 적합한 그룹을 포괄한다.

[0013] 용어 "가이드 서열"은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 표적 서열에 부분적인 또는 완전한 상보성을 갖는 그리고 Cas 단백질에 의해 용이하게 된 염기 짝짓기에 의해 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 RNA에서 뉴클레오타이드의 인접 서열을 지칭한다. 도 1에서 도시된 예에서 설명된 바와 같이, 표적 서열은 PAM 부위에 인접한다(PAM 서열, 및 다른 가닥에서 그것의 상보성 서열은, PAM 부위를 함께 구성한다). PAM 서열(cas9에 대하여 NGG)의 즉시 업스트림은 표적 서열에 상보성인 서열(도 1에서 볼드체, 바닥 가닥)이다. 가이드 서열에 하이브리드화하는, 표적 서열은 PAM 서열의 보체(cas9에 대하여 CCN)로부터 즉시 다운스트림이다. 가이드 서열(5'에서 제1 뉴클레오타이드)의 뉴클레오타이드 1은 표적 서열의 마지막 뉴클레오타이드에 상보성이고, 한편 가이드 서열의 마지막 뉴클레오타이드(도 1에서 가이드 서열의 뉴클레오타이드 20)는, PAM 부위(및 PAM 서열의 보체로부터 즉시 다운스트림)에 바로 옆인, 표적 서열의 제1 뉴클레오타이드에 상보성이다. 다른 예 예컨대 Cpf1에서, 가이드 서열에 하이브리드화하는, 표적 서열의 위치는 PAM 서열의 보체로부터 업스트림일 수 있다.

[0014] 가이드 서열은 약 10 뉴클레오타이드만큼 짧을 수 있고 약 30 뉴클레오타이드만큼 길 수 있다. 전형적인 가이드 서열은 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 및 24 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 합성 가이드 서열은 일반적으로 20 뉴클레오타이드 길이이지만, 더 길거나 더 짧을 수 있다. 가이드 서열이 20 뉴클레오타이드보다 짧은 경우, 전형적으로 20-뉴클레오타이드 가이드 서열에 비교된 5'-말단으로부터 결실이다. 예로써, 가이드 서열은 표적 서열에 상보성인 20 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 환언하면, 가이드 서열은, DNA와 RNA 사이 A/U 차이를 제외하고, PAM 서열의 20 뉴클레오타이드 업스트림과 동일하다. 이러한 가이드 서열이 5'-말단으로부터 3 뉴클레오타이드에 의해 절단되면, 20-뉴클레오타이드 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4는 이제 17-mer에서 뉴클레오타이드 1이 되고, 20-뉴클레오타이드 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5는 이제 17-mer등에서 뉴클레오타이드 2가 된다. 신규한 위치는 최초 위치 마이너스 3이다. 유사하게, 가이드 서열은 표적 부위에서 20 초과 뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있고, 추가의 뉴클레오타이드가 가이드 서열의 5'-말단에 위치하는 것은, 가이드 서열의 3'-말단이 PAM 부위에 바로 옆 표적에 상보성이기 때문이다. 재차 예로써, 22-뉴클레오타이드 가이드 서열에서, 20-mer에서 제1 뉴클레오타이드 1은 이제 뉴클레오타이드 3이 되고, 20-mer에서 제1 뉴클레오타이드 2는 이제 뉴클레오타이드 4 등이 된다. 신규한 위치는 최초 위치 플러스 2, 또는 마이너스(-2)이다. 따라서, 가이드 서열은 5'-말단으로부터 카운팅하는 뉴클레오타이드 1 내지 "20 마이너스 N"(20-N)으로 구성되고, 여기서 N은 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 양의 또는 음의 정수이다. 가이드 서열 내에서 주어진 뉴클레오타이드 위치는 "위치 수 마이너스 N"(수-N)으로서 언급될 것이다. 예를 들어, 위치 5에서 뉴클레오타이드는, 가이드 서열이 5'-말단에서 N 뉴클레오타이드에 의해 절단 또는 연장되는 경우 발생하는 20 뉴클레오타이드 가이드 서열로부터 수득된 참조 위치로부터 위치 5의 이동을 표시하기 위해, "5-N"(5 마이너스 N)으로서 언급될 것이다. 뉴클레오타이드 위치는 양의 정수이다. 따라서, 음수이거나 0인 임의의 (수-N) 위치는 고려할 가치가 없고, 무시될 수 있다. 가이드 서열은 gRNA를 구성하는 가닥 또는 가닥들 내에서 어디든지 배치될 수 있다. 전형적인 가이드 서열은 gRNA 가닥의 5' 말단 또는 3' 말단에서 또는 근처에서 위치한다.

[0015] 용어 "스캐폴드"는 실질적으로 동일한 또는 천연 생물학적 종을 거쳐 고도로 보존되는 서열을 포함하는 가이드 RNA 분자의 부분을 지칭한다. 스캐폴드는 tracrRNA 분절 그리고 crRNA 분절의 3' 말단에서 또는 근처에서 폴리뉴클레오타이드-표적화 가이드 서열 이외의 crRNA 분절의 부분(반복 부분)을 포함한다.

[0016] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 DNA 분자, RNA 분자, 또는 이의 유사체를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는, 비제한적으로 DNA 분자 예컨대 cDNA, 게놈성 DNA, 플라스미드 또는 벡터 DNA 또는 합성 DNA 및 RNA 분자 예컨대 가이드 RNA, 메신저 RNA 또는 합성 RNA를 포함한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 단일-가닥 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 기술 분야에서 표준 협약은 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, RNA 분자, DNA 분자의 구별되는 가닥, 및 2 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 다양한 핵산이 그것의 5' 말단으로부터 일반적으로 넘버링되고, 그와 같은 분자에 공유적으로 연결된 5' 연장 또는 "돌출부"의 사례를 포함하여, 이러한 협약은 내내 사용된다.

[0017] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "변형" 또는 "화학적 변형"은, 4개의 가장 흔한 천연 리보뉴클레오타이드: 아데노신, 구아노신, 시티딘, 및 우리딘 리보뉴클레오타이드에서 발견되는 것과 상이한, 화학적 모이어티, 또는 화학적 구조의 부분을 지칭한다. 따라서 용어 "변형"은 아데노신, 구아노신, 시티딘, 또는 우리딘 리보뉴클레오타이드의 가장 흔한 천연 분자성 구조에서, 또는 구조상에서 분자성 변화를 지칭한다. 용어 "변형"은 핵염기에서 또는 핵염기상에서, 당에서 또는 당상에서, 및/또는 인터뉴클레오타이드 포스포디에스테르 결합에서 변화를

지칭할 수 있다. 용어 "변형"은 본질에서 발생하는 리보뉴클레오타이드에서 화학적 구조적 변화 예컨대 천연 전달 RNA(tRNA)에서 발생하는 화학적 변형, 예를 들어 비제한적으로 2'-O-메틸, 1-메틸아데노신, 2-메틸아데노신, 1-메틸구아노신, 7-메틸구아노신, 2-티오시토신, 5-메틸시토신, 5-포르밀시토신, 슈도우리딘, 디하이드로우리딘, 리보티미딘, 또는 기타 동종을 지칭할 수 있다. 용어 "변형"은 본질에서 전형적으로 발견되지 않는 화학적 변형, 예를 들어 비제한적으로 2'-플루오로, 2'-O-메톡시에틸, 2'-O-페닐, 또는 기타 동종을 지칭할 수 있다. 용어 "동일한 변형"은 당에서 또는 당상에서, 또는 인터뉴클레오타이드 결합에서 화학적 변형의 동일한 유형을 지칭하고; 예를 들어, 2'-O-메틸은 아데노신, 구아노신, 시티딘, 및/또는 우리딘 리보뉴클레오타이드의 2' 위치에 부착될 수 있고, 그와 같은 변형은 변형 또는 "동일한 변형"의 동일한 유형으로 지칭될 수 있다. 반대로, 핵염기에 대한 변형은 변형된 핵염기가 동일한 분자성 구조로 구성되었다면 "동일한 변형"으로서 확인될 뿐이다. 예로 구별을 설명하기 위해, 1-메틸구아노신 및 7-메틸구아노신 양쪽은 가장 흔한 천연 구아노신의 메틸 기 변형을 갖지만 이들이 "동일한 변형"이 아닌 것은 변형된 핵염기가 상이한 분자성 구조를 갖기 때문이다. 추가 예에서, RNA의 가닥은 3개의 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트에 의해 각각 변형된, 1 구아노신 및 2 시티딘을 포함할 수 있고, 그와 같은 뉴클레오타이드는 동일한 방식으로 변형된 또는 동일한 변형으로 변형된 바와 같이 정확하게 기재될 수 있다. 반대로, RNA의 상이한 가닥은 5-메틸시티딘 뿐만 아니라 5-메틸 치환체가 부족한 시티딘을 포함할 수 있고, 양쪽 시티딘 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트에 의해 변형될 수 있고, 그럼에도 불구하고 이들 2개의 시티딘 뉴클레오타이드는 상이한 변형을 포함하고 동일한 방식으로 변형된 것으로서 지칭되지 않을 것이다.

[0018] 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 맥락에서 용어 "변형"은 비제한적으로 하기를 포함한다: (a) 말단 변형, 예를 들어, 5' 말단 변형 또는 3' 말단 변형, (b) 염기의 대체 또는 제거를 포함하는, 핵염기(또는 "염기") 변형, (c) 2', 3', 및/또는 4' 위치에서 변형을 포함하는, 당 변형, 및 (d) 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 대체를 포함하는, 백본 변형. 용어 "변형된 뉴클레오타이드"는 일반적으로, 뉴클레오타이드 포스페이트를 포함하는, 하나 이상의 염기, 당, 및 포스포디에스테르 결합 또는 백본 부분의 화학적 구조에 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 가이드 RNA에 대한 화학적 변형은, 2015년 12월 3자일 출원된, 미국 특허 출원 14/757,204에서 개시되고, 그 전체 내용은 참고로 본 명세서에서 편입된다.

[0019] 용어 "xA", "xG", "xC", "xT", "xU", 또는 "x(A,G,C,T,U)" 및 "yA", "yG", "yC", "yT", "yU", 또는 "y(A,G,C,T,U)"는 하기에 의해 기재된 바와 같이 뉴클레오타이드, 핵염기, 또는 핵염기 유사체를 지칭한다: Krueger 등, "Synthesis and Properties of Size-Expanded DNAs: Toward Designed, Functional Genetic Systems", (2007) Acc. Chem. Res. 40, 141-50, 이의 내용은 참고로 그 전체가 이로써 편입됨.

[0020] 용어 "비구조적 핵산" 또는 "UNA"는, 이의 내용은 참고로 그 전체가 이로써 편입되는, 미국 특허 7,371,580에서 기재된 바와 같이 뉴클레오타이드, 핵염기, 또는 핵염기 유사체를 지칭한다. 비구조적 핵산, 또는 UNA, 변형은 또한 "슈도-상보성" 뉴클레오타이드, 핵염기 또는 핵염기 유사체로서 지칭된다(참조 예를 들어, Lahoud 등. (1991) Nucl. Acids Res. 36: 10, 3409-19).

[0021] 용어 "PACE" 및 "티오페"는 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 기 각각을 함유하는 인터뉴클레오타이드 포스포디에스테르 결합 유사체를 지칭한다. 이들 변형은 포스포노카복실레이트 모이어티, 포스포노카복실레이트 에스테르 모이어티, 티오포스포노카복실레이트 모이어티 및 티오포스포노카복실레이트 에스테르 모이어티를 포함하는 화합물의 넓은 부류에 속한다. 이들 연결은 일반 식 $P(CR^1R^2)_nCOOR$ 및 $(S)-P(CR^1R^2)_nCOOR$ (식중 n은 정수 0 내지 6이고 각각의 R^1 및 R^2 는 독립적으로 H, 알킬 및 치환된 알킬로 구성되는 군으로부터 선택된다)에 의해 각각 기재될 수 있다. 이들 변형의 일부는 하기에 의해 기재된다: Yamada, Dellinger 등, "Synthesis and Biochemical Evaluation of Phosphonoformate Oligodeoxyribonucleotides" (2006) J. Am. Chem. Soc. 128: 15, 5251-61, 이의 내용은 참고로 그 전체가 이로써 편입됨.

[0022] 본 개시내용 일부 대신에, 특허 합성 가이드 RNA의 구조 및 서열 그리고 그와 같은 합성 가이드 RNA로 실험적 결과를 개시하는 도에서 특정 약어는 특정 변형을 표시하는데 사용된다. "M"은 2'-O-메틸 변형을 표시하기 위해 본 명세서에서 사용되고; "S"는 3'-포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 표시하기 위해 본 명세서에서 사용되고; "P"는 3'-포스포노아세테이트(또는 PACE) 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 표시하기 위해 본 명세서에서 사용되고; "MS"는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 표시하기 위해 본 명세서에서 사용되고; "MP"는 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(또는 2'-O-메틸-3'-PACE) 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 표시하기 위해 본 명세서에서 사용되고; "MSP"는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트 인터뉴

클레오타이드 결합 변형을 표시하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

- [0023] "당 퍼커"는 5-원 당 고리의 1 또는 2 원자가 평면에서 벗어나도록 야기시키는 입체적 힘으로 인해 비-평면인 당 고리를 지칭한다. 리보푸라노스에서, 평면 C1'-O4'-C4'는 고정된다. 엔도-퍼커는 이러한 평면을 벗어나 C2' 또는 C3'이 O5'의 방향으로 변하는 것을 의미한다. 엑소-퍼커는 반대 방향으로 이동을 설명한다. C2'-엔도 및 C3'-엔도는 자연적으로 평형상태이지만, 화학적 변형은 당을 바람직한 퍼커로 유도시킬 수 있다. RNA에서 C3'-엔도 형태는 우세하다. DNA는 양쪽 형태에서 취할 수 있고 조절할 수 있다.
- [0024] 용어 "씨드 영역"은 가이드 서열의 표적 핵산 서열에 하이브리드화를 개시하는 표적 핵산 서열에 상보성인 가이드 서열의 영역을 지칭한다. 일부 경우에, 씨드 영역은 단백질, 펩타이드, 또는 단백질 복합체에 의해 일조되는 준-안정한 듀플렉스를 형성한다. 보통, gRNA의 가이드 서열에서 용어 씨드 영역은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 20-뉴클레오타이드 가이드 서열에서 뉴클레오타이드 11 내지 20으로 구성되지만, 영역은 뉴클레오타이드 서열 그리고 이 영역내 RNA 뉴클레오타이드에서 화학적 변형에 또는 관련된 펩타이드, 단백질 또는 단백질 복합체의 변형을 통해 의존하여 더 짧게 또는 더 길게 운영할 수 있다.
- [0025] 용어 "샘플링 영역"은 씨드 영역에 인접한 영역을 지칭하고, 이들 뉴클레오타이드의 결합은 듀플렉스의 결합 에너지가 결합이 발생하고 있는 온도와 맞먹는 때까지 진행한다. 보통, gRNA에서 용어 샘플링 영역은, 하나 이상의 변형이 샘플링 영역을 기능적으로 연장하는 경우와 같이, 달리 나타내지 않는 한, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 20-뉴클레오타이드 가이드 서열에서 뉴클레오타이드 5 내지 10으로 구성되어, 그렇게 함으로써 가이드 서열에서, 뉴클레오타이드 1 내지 10, 대안적으로 2 내지 10, 대안적으로 3 내지 10, 대안적으로 4 내지 10, 대안적으로 1 내지 11, 대안적으로 2 내지 11, 대안적으로 3 내지 11, 대안적으로 4 내지 11, 대안적으로 5 내지 11, 대안적으로 1 내지 12, 대안적으로 2 내지 12, 대안적으로 3 내지 12를 포괄한다.
- [0026] 용어 "잠금 영역"은 형성된 듀플렉스의 결합 에너지가 결합이 발생하고 있는 온도 초과인 샘플링 영역에 인접한 영역을 지칭한다. 보통, gRNA에서 용어 잠금 영역은, 달리 나타내지 않는 한, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 5' 말단에서 뉴클레오타이드 1, 대안적으로 뉴클레오타이드 1 및 2, 대안적으로 뉴클레오타이드 1 내지 3으로 잠금 영역을 기능적으로 짧게 하는 경우일 바와 같이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 20-뉴클레오타이드 가이드 서열에서 뉴클레오타이드 1 내지 4로 구성된다. 잠금 영역은 하나 이상의 뉴클레오타이드가 전형적인 20 뉴클레오타이드부터 21 뉴클레오타이드까지, 대안적으로 22 뉴클레오타이드까지, 대안적으로 23 뉴클레오타이드까지, 대안적으로 24 뉴클레오타이드까지, 대안적으로 25 뉴클레오타이드 또는 초과까지 가이드 서열을 연장시키기 위해 5' 말단에 공유적으로 연결되면 CRISPR-Cas9 시스템의 전형적인 가이드 서열의 20-뉴클레오타이드 길이를 넘어 연장할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "표적 폴리뉴클레오타이드" 또는 "표적"은 표적 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, 특정 구현예에서, 이중-가닥 DNA이다. 특정 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 RNA이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "표적 핵산 서열" 또는 "표적 서열"은 CRISPR 시스템을 사용하여 결합, 니킹, 또는 절단하기를 바라는 특정 서열 또는 이의 보체를 의미한다. 특정 구현예에서, 2 이상의 표적 서열은, 예를 들어 상동성 재조합 목적으로 2개의 특정 표적 서열 사이 서열을 대체하기 위해, 동일한 반응에서 결합, 니킹, 또는 절단되도록 선택될 수 있다. 대안적으로, 2 이상의 표적 서열은 다중 표적이 동일한 시간에 결합 및 농축되는 경우 또한 유용하다. 따라서, 2 이상의 표적 서열이 사용되는 경우, 각각의 표적 폴리뉴클레오타이드는, 목적에 따라, 동일한 유전자에서 일 수 있거나 아닐 수 있다.
- [0028] "오프-표적 폴리뉴클레오타이드" 또는 "오프-표적"은 의도된 표적 핵산에 부분적으로 상동성 산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 오프-표적 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, 특정 구현예에서, 이중-가닥 DNA이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "오프-표적 핵산 서열" 또는 "오프-표적 서열"은, 표적 핵산 서열과 동일하지 않지만, 상기와 실질적 서열 동일성을 갖는 그리고 CRISPR 시스템을 사용하여 결합, 니킹, 또는 절단하기를 바라지 않는 특정 서열 또는 이의 보체를 의미한다. 예를 들어, 오프-표적 핵산 서열은 적어도 약 60%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 90 내지 95%, 적어도 약 97%, 또는 초과 뉴클레오타이드(또는 아미노산) 서열 동일성을 갖는 경우 표적 핵산 서열과 실질적 서열 동일성을 갖는다.
- [0029] 용어 "HBB 폴리뉴클레오타이드", "VEGFA 폴리뉴클레오타이드", "IL2RG 폴리뉴클레오타이드", "CLTA1 폴리뉴클레오타이드", 및 "CLTA4 폴리뉴클레오타이드"는 유전자 HBB, VEGFA, IL2RG, CLTA1 또는 CLTA4, 각각의 적어도 한 부분을 포함하는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 그와 같은 폴리뉴클레오타이드는 자연 발생,

재조합성, 또는 합성 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 그와 같은 폴리뉴클레오타이드는 그와 같은 유전자와 관련된 계통내 유전자좌에서 발견된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 따라서 그와 같은 유전자의 대립 유전자 및 변이체를 포괄한다.

[0030] 용어 "특이성"은 얼마나 양호하게 가이드 RNA가 온 표적 폴리뉴클레오타이드와 하나 이상의 오프 표적 폴리뉴클레오타이드 사이를 식별할 수 있는지를 지칭한다. 가이드 RNA의 특이성은, 예를 들어, 온 표적 절단, 결합, 또는 니킹 백분율 뿐만 아니라 오프 표적 절단, 결합, 또는 니킹 백분율 계산; 온:오프 비 계산; 및/또는 비교할 만한 온 및 오프 표적 백분율에서 유래된 특이성 스코어(참조 본 개시내용의 실시예)에 의해 결정될 수 있다. 용어 "온 표적 백분율"은 검정 내에서 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합의 백분율을 지칭하고; 예로써, 검정에서 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 90%의 절단, 니킹 또는 결합을 유발시키면 가이드 RNA는 90% 온 표적 백분율을 갖는다. 용어 "온:오프 비"는 분석된 가이드 RNA당 온 표적 백분율 및 오프 표적 백분율의 비를 지칭하고; 예로써, 80% 온 표적 백분율 및 8% 오프 표적 백분율을 갖는 가이드 RNA는 10의 온:오프 비를 갖는다. 용어 "특이성 스코어"는 분석된 가이드 RNA당 그것의 각각의 온-표적 백분율에 온:오프 비를 곱셈함으로써 수득된 수를 지칭하고; 예로써, 80% 온 표적 백분율 및 8% 오프 표적 백분율을 갖는 가이드 RNA는 10의 온:오프 비를 산출하고 8의 특이성 스코어를 갖는다. 일부 검정에서, 결합 또는 니킹은 대리로서 절단을 사용하여 평가되고; 예를 들어, 표적 부위에서 인텔 형성이 절단을 평가하기 위한 서열분석에 의해 정량화되는 검정에서, 그와 같은 검정은 또한 gRNA의 활성 결합 또는 니킹을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0031] 용어 "연속 특이성-향상 변형"은 서로에 대해서 인접한 가이드 RNA에서 2 이상의 특이성-향상 변형을 지칭한다. 가이드 RNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 연속 특이성-향상 변형을 포함할 수 있다. 널리 사용된 CRISPR-Cas9 시스템에서, 가이드 RNA는, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20을 포함하는 가이드 서열을 포함한다. 하나 이상의 연속 특이성-향상 변형은, 예를 들어, 뉴클레오타이드 1 및 2, 뉴클레오타이드 1 내지 3, 뉴클레오타이드 1 내지 4, 뉴클레오타이드 1 내지 5, 뉴클레오타이드 1 내지 6, 뉴클레오타이드 1 내지 7, 뉴클레오타이드 1 내지 8, 뉴클레오타이드 1 내지 9, 뉴클레오타이드 1 내지 10, 뉴클레오타이드 2 및 3, 뉴클레오타이드 2 내지 4, 뉴클레오타이드 2 내지 5, 뉴클레오타이드 2 내지 6, 뉴클레오타이드 2 내지 7, 뉴클레오타이드 2 내지 8, 뉴클레오타이드 2 내지 9, 뉴클레오타이드 2 내지 10, 뉴클레오타이드 3 및 4, 뉴클레오타이드 3 내지 5, 뉴클레오타이드 3 내지 6, 뉴클레오타이드 3 내지 7, 뉴클레오타이드 3 내지 8, 뉴클레오타이드 3 내지 9, 뉴클레오타이드 3 내지 10, 및 기타 등등에서 변형을 포함할 수 있다.

[0032] 용어 "하이브리드화" 또는 "하이브리드화하는"은 2개의 구성성분 가닥이 수소 결합에 의해 연결되는 이중-가닥 구조 또는 영역을 형성하기 위해 적합한 하이브리드화 조건 하에서 완전히 또는 부분적으로 상보성 폴리뉴클레오타이드 가닥이 합치는 과정을 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "부분적 하이브리드화"는 이중-가닥 구조 또는 영역이 하나 이상의 벌지 또는 미스매치를 함유하는 경우를 포함한다. 수소 결합이 전형적으로 아데닌과 티민 또는 아데닌과 우라실(A 및 T 또는 A 및 U) 또는 시토신과 구아닌(C 및 G) 사이 형성하여도, 다른 비표준적 염기 쌍을 형성할 수 있다(참조, 예를 들어, Adams 등, "The Biochemistry of the Nucleic Acids", 11th ed., 1992). 변형된 뉴클레오타이드가 비-정준 방식으로 하이브리드화를 허용 또는 촉진시키는 수소 결합을 형성할 수 있다는 것이 고려된다.

[0033] 용어 "절단" 또는 "절단하는"은 폴리뉴클레오타이드의 포스포디에스테르 백본에서 공유 포스포디에스테르 결합의 파괴를 지칭한다. 용어 "절단" 또는 "절단하는"은 양쪽 단일-가닥 절단 및 이중-가닥 절단을 포괄한다. 이중-가닥 절단은 2개의 구별되는 단일-가닥 절단 사건의 결과로서 발생할 수 있다. 절단은 어느 한쪽 뚫힌 말단 또는 엇갈린 말단의 생산을 초래할 수 있다.

[0034] 용어 "CRISPR-관련 단백질" 또는 "Cas 단백질"은 야생형 Cas 단백질, 이의 단편, 또는 이의 돌연변이체 또는 변이체를 지칭한다. 용어 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 야생형 Cas 단백질, 예를 들어, 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입, 결실, 절단을 갖는 단백질의 단백질 또는 폴리펩타이드 유도체, 융합 단백질, 또는 이들의 조합을 지칭한다. 특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 Cas 단백질의 뉴클레아제 활성을 실질적으로 보유한다. 특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 한쪽 또는 양쪽 뉴클레아제 도메인이 불활성이도록 돌연변이된다. 특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 뉴클레아제 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 그것의 야생형 대응물의 일부 또는 모든 뉴클레아제 활성이 부족하다. 용어 "CRISPR-관련 단백질" 또는 "Cas 단백질"은 또한 원핵생물의 다양한 종의 (그리고 프레보텔라 및 프란시셀라 리보핵단백질로부터 클러스터링된 규칙적으로 공간사이의 짧은 회문성 반복부 또는 CRISPR/Cpf1 리보핵단백질로 명명된) 야생형 Cpf1 단백질, 이의 단편, 또는 이의 돌연변이체 또는 변이체를 포

함한다.

- [0035] Cas 단백질의 용어 "뉴클레아제 도메인"은 DNA 절단용 촉매적 활성을 갖는 단백질 내에서 폴리펩타이드 서열 또는 도메인을 지칭한다. Cas9는 전형적으로 PAM 서열의 이중-가닥 절단 업스트림을 촉매화시킨다. 뉴클레아제 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇄에서 함유될 수 있거나, 절단 활성은 2(이상의) 폴리펩타이드의 회합에서 비롯할 수 있다. 단일 뉴클레아제 도메인은 주어진 폴리펩타이드 내에서 아미노산의 1 초과와 단리된 스트레치로 구성될 수 있다. 이들 도메인의 예는 RuvC-유사 모터프(서열 번호: 1내 아미노산 7-22, 759-766 및 982-989) 및 HNH 모터프(아미노산 837-863)을 포함하고; 하기를 참고한다: Gasiunas 등. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:39, E2579-E2586 및 W02013176772.
- [0036] "gRNA 기능성"을 갖는 합성 가이드 RNA는 자연 발생 가이드 RNA의 기능, 예컨대 Cas 단백질과 회합, 또는 Cas 단백질과 회합에서 가이드 RNA에 의해 수행된 기능의 하나 이상을 갖는 것이다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드에 Cas 단백질 또는 gRNA:Cas 단백질 복합체의 표적화를 포함한다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드의 니킹을 포함한다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단을 포함한다. 특정 구현예에서, 기능성은 Cas 단백질과 회합 또는 상기에 결합을 포함한다. 예를 들어, Cas 단백질은 하나 이상의 단백질 또는 이의 부분에 융합된 "사망된" Cas 단백질(dCas), 예컨대 전사 인자 향상제 또는 억제인자 데아미나제 단백질 등으로 조작될 수 있어서, 이로써 하나 이상의 기능은 융합된 단백질(들) 또는 이의 부분(들)에 의해 수행된다. 특정 구현예에서, 기능성은, 조작된 Cas 단백질을 가진 인공 CRISPR-Cas 시스템을 포함하여, Cas 단백질을 가진 CRISPR-Cas 시스템에서 가이드 RNA의 임의의 다른 공지된 기능이다. 특정 구현예에서, 기능성은 천연 가이드 RNA의 임의의 다른 기능이다. 합성 가이드 RNA는 자연 발생 가이드 RNA보다 더 큰 또는 더 적은 정도로 gRNA 기능성을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 유사한 자연 발생 가이드 RNA와 비교하여 한 특성에 대해 더 큰 기능성 및 또 다른 특성에 대해 더 적은 기능성을 가질 수 있다.
- [0037] 단일-가닥 "니킹" 활성을 갖는 Cas 단백질은, 야생형 Cas 단백질과 비교된 경우 dsDNA의 2 가닥 중 하나를 절단시키는 감소된 능력을 갖는, Cas 돌연변이체 또는 Cas 변이체를 포함하는, Cas 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질은 RuvC 도메인(또는 HNH 도메인)의 기능을 감소시키는 그리고 결국 표적 DNA의 1 가닥을 절단시키는 능력을 감소시키는 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)를 갖는다. 그와 같은 변이체의 예는 S. 파이오제네스 Cas9에서 D10A, H839A/H840A, 및/또는 N863A 치환을 포함하고, 다른 종의 Cas9 효소내 동등한 부위에서 동일한 또는 유사한 치환을 또한 포함한다.
- [0038] "결합" 활성을 갖는 또는 표적 폴리뉴클레오타이드를 "결합시키는" Cas 단백질은 가이드 RNA와 복합체를 형성하는 Cas 단백질을 지칭하고, 그와 같은 복합체인 경우, 가이드 RNA는, 염기 쌍을 형성하기 위해 가이드 RNA 및 다른 폴리뉴클레오타이드의 염기 사이 수소 결합을 통해, 또 다른 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 표적 폴리뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화한다. 수소 결합은 왓슨 크릭 염기 짝짓기에 의해 또는 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 발생할 수 있다. 하이브리드는 듀플렉스를 형성하는 2개의 가닥, 다중-가닥 트리플렉스를 형성하는 3 이상의 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0039] "CRISPR 기능"은, 비제한적으로 유전자 편집, DNA 절단, DNA 니킹, DNA 결합, 유전자 발현의 조절, CRISPR 활성화(CRISPRa), CRISPR 간섭(CRISPRi), 및 또 다른 효과기에 cas 단백질 연결에 의해 달성될 수 있는 임의의 다른 기능을 포함하는, CRISPR 시스템에 의해 달성될 수 있는 임의의 기능 또는 효과를 의미하여, 그렇게 함으로써 cas 단백질에 의해 인식된 표적 서열에서 효과기 기능을 달성한다. 예를 들어, 뉴클레아제 없는 cas 단백질은 전사 인자, 데아미나제, 메틸화효소 등에 융합될 수 있다. 수득한 융합 단백질은, 표적용 가이드 RNA의 존재 하에서, 표적인, 탈아미네이트, 또는 메틸레이트의 전사를 조절하는데 사용될 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 서열의 용어 "부분" 또는 "단편"은 완전한 서열보다 더 작은 서열의 임의의 부분(예를 들어, 뉴클레오타이드 하위서열 또는 아미노산 하위서열)을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드의 부분은 임의의 길이, 예를 들어, 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300 또는 500 이상 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 가이드 서열의 부분은 가이드 서열의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 예를 들어, 가이드 서열의 3분의 1 이하, 예를 들어, 길이 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0041] 분자의 맥락에서 용어 "에서 유래된"은 모체 분자 또는 그 모체 분자로부터 정보를 사용하여 단리된 또는 제조된 분자를 지칭한다. 예를 들어, (탈활성화된 Cas9, "사망된 Cas9", 또는 dCas9로서 또한 공지된) Cas9 단일-돌연변이체 니카제 및 Cas9 이중-돌연변이체 무효-뉴클레아제는 야생형 Cas9 단백질에서 유래된다.

- [0042] 2 이상의 폴리뉴클레오타이드(또는 2 이상의 폴리펩타이드)의 맥락에서 용어 "실질적으로 동일한"은, 서열 비교 알고리즘을 사용하여 또는 육안 검사에 의해 최대 관련성으로 비교된 및 정렬된 경우, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 약 90 내지 95%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 이상 뉴클레오타이드(또는 아미노산) 서열 동일성을 갖는 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오타이드 사이 "실질적 동일성"은 적어도 약 20 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 50 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 100 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 200 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 300 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 500 뉴클레오타이드 길이의 폴리뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐, 또는 폴리뉴클레오타이드의 전체 길이에 걸쳐 실재한다. 바람직하게는, 폴리펩타이드 사이 "실질적 동일성"은 적어도 약 50 아미노산 잔기 길이, 적어도 약 100 아미노산 잔기 길이의 폴리펩타이드의 영역에 걸쳐, 또는 폴리펩타이드의 전체 길이에 걸쳐 실재한다.
- [0043] 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 수많은 범위의 값은 제공된다. 그 범위의 상한과 하한 사이, 하한의 단위의 10분의 1까지, 각각의 개입 값이 또한 구체적으로 고려되는 것이 이해된다. 각각의 더 작은 범위 또는 언급된 범위에 의해 포괄된 개입 값은 또한 구체적으로 고려된다. 용어 "약"은 일반적으로 표시된 수의 플러스 또는 마이너스 10%를 지칭한다. 예를 들어, "약 10%"는 9% 내지 11%의 범위를 표시할 수 있고, "약 20"은 18 내지 22를 의미할 수 있다. "약"의 다른 의미는 문맥, 예컨대 반올림 계수로부터 분명할 수 있고, 그래서, 예를 들어 "약 1"은 0.5 내지 1.4를 또한 의미할 수 있다.
- [0044] II. CRISPR-매개된 서열-특이적 결합 및/또는 절단 또는 니킹
- [0045] 도 1에서 도시된 것은 DNA의 CRISPR-Cas9-매개된 서열-특정 절단의 다이어그램이다. 가이드 RNA는 5' 도메인, 내부적으로 배치된 염기-짝짓기된 줄기, 및 3' 도메인 내에서 예시적 20-뉴클레오타이드(또는 20-nt; 뉴클레오타이드는 종종 "nt"로서 약칭된다) 가이드 서열(다른 가이드 서열은, 예를 들어, 약 15 내지 약 30 nt 길이일 수 있다)을 가진 sgRNA로서 묘사된다. 가이드 서열은 DNA 표적에서 예시적 20-nt 표적 서열에 상보성이다. 줄기는 crRNA내 반복 서열에 상응하고 tracrRNA에서 서열에 상보성이다. 가이드 RNA의 3' 도메인은 Cas9 뉴클레아제를 결합시키는 tracrRNA의 3' 도메인에 상응한다. Cas9:grNA 복합체는 Cas9에 의해 인식된 PAM 서열의 직접적으로 업스트림에 표적 DNA 서열 또는 프로토스페이서를 결합 및 절단시킨다. 도 1에서, 3-nt PAM 서열은 예시되지만; 4-nt, 5-nt 및 더욱더 긴 PAM 서열을 포함하는 다른 PAM 서열은 공지되어 있다.
- [0046] CRISPR-Cas 게놈 편집을 위하여, 가이드 RNA는 RNA가 양쪽 단백질에 대하여 스캐폴드로서 그리고 듀플렉스 DNA 표적에 대하여 서열 인식으로서 작용하는 RNA-단백질 복합체에서 기능한다. 복합체는 뉴클레오타이드 PAM 서열에 대하여 제1 스캐닝을 통해 게놈성 DNA를 인식한다. 일단 PAM 서열이 확인되면 RNA-단백질 복합체는 가이드 RNA의 가이드 서열과 게놈성 DNA 표적 사이 RNA/DNA 듀플렉스를 형성하기 위해 시도한다. 이러한 듀플렉스는 grNA의 "씨드 영역"의 Cas 단백질-매개된 염기 짝짓기에 의해 최초 개시되고, 여기에서 씨드 영역은 약 10 뉴클레오타이드 길이인 것으로 생각된다. 씨드 영역의 결합 후, 안정한 RNA/DNA 듀플렉스는 가이드 RNA의 5' 말단에서 잔여 뉴클레오타이드의 하이브리드화에 의해 형성되고; 이것은 전형적으로 20-뉴클레오타이드 DNA/RNA 듀플렉스를 초래하고 단백질 복합체에 의해 표적 DNA의 이중-가닥 절단으로 진행된다.
- [0047] 게놈 편집을 위하여 CRISPR-Cas RNA-단백질 복합체의 유용성을 가능하게 하기 위한 중요한 양태는 서열 특이성이다. CRISPR-Cas RNA-단백질 복합체는 회복 또는 재조합을 통해 유전자를 불활성화 또는 변형시키기 위한 공정에서 제1 단계로서 게놈성 DNA를 절단시킨다. 이 공정에서 미의도적인 "오프-표적" 부위에서 게놈성 DNA의 절단은 원치않는 결과, 예컨대 게놈에서 다른 곳에 서열 돌연변이의 창출을 가질 수 있다. 현재, 이들 오프-표적 절단 사건은 어느 한쪽 스크리닝 기술에 의해 검출되고 있거나, 교배 기술에 의해 제거되고 있거나, 무시되고 있다. CRISPR-Cas RNA-단백질 복합체는 원핵생물내 적응성 면역 시스템으로서 진화하였고; 이들 복합체의 서열 특이성에서 향상은 진핵 유전체학에서 도구로서 넓은 유용성을 갖는 CRISPR-Cas RNA-단백질 복합체에 대하여 상당한 진보 및 혁신을 구성할 것이다.
- [0048] 서열 특이성은 표적 부위에 스캔, 검출, 및 결합할 수 있는 grNA:Cas 단백질 복합체, 또는 유기체의 전체 게놈 내에서 인접 뉴클레오타이드의 스트링에 의해 개시한다. 이것을 하기 위해 표적 서열은 인접 뉴클레오타이드의 그것의 스트링 또는 서열이 관심의 유기체의 전체 게놈에서 단 한번 실재하고 원하는 게놈 편집의 부위에 위치하도록 충분히 길 필요가 있다. 게놈 내에서 특유성을 부여하는데 필요한, 인접 뉴클레오타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드의 스트링의 길이는 그 특정 폴리뉴클레오타이드의 "정보 함량"에 의해 결정된다. 대부분의 진핵 세포 및 유기체에 대하여, 표적 폴리뉴클레오타이드는 전체 게놈에서 충분한 정보 함량이 비반복되도록 18 내지 22 뉴클레오타이드 길이의 범위일 필요가 있다(J. Mol. Biol. (1986), 188, 415-431). 보통, 표적 폴리뉴클레

오타이드가 더 길수록 더 많은 정보 함량 및 더욱 가능한 그것의 서열이 게놈에서 단 한번 실재할 것이고; 19-뉴클레오타이드 서열은 18-뉴클레오타이드 서열보다 더 많은 정보 함량을 갖고, 20-뉴클레오타이드 서열은 19-뉴클레오타이드 서열 및 기타 등등보다 더 많은 정보 함량을 갖는다. 그러나, 비반복 20-뉴클레오타이드 서열은 게놈내 다른 곳에 상이한 20-nt 서열에서 1 뉴클레오타이드의 모두의 서열을 매칭시킬 수 있고, 단일 미스매치를 함유하는 서열은 오프-표적 부위를 포함한다. 오프-표적 서열 대 20-뉴클레오타이드 표적 서열에 대한 가이드 서열의 상대 결합은 가이드 서열과 온-표적 서열 뿐만 아니라 오프-표적 서열 사이 각각의 결합 에너지 및 동역학 평형에 의해 제어된다.

[0049] 올리고뉴클레오타이드의 차별적인 결합 에너지는 제어되고 DNA 및 RNA 결합의 협동 효과에 의해 극대화될 수 있다. 협동성은 2개의 방식에서 하이브리드화 동안 DNA 및 RNA 결합에 대하여 정의되어 왔다. 먼저, 올리고뉴클레오타이드가 그것의 개별 뉴클레오타이드 하위단위를 결합하기 시작하는 경우, 상보성 핵염기에 뉴클레오타이드 하위단위의 결합은 올리고뉴클레오타이드 서열에서 그 다음 인접한 뉴클레오타이드의 후속적인 결합에서 긍정적 효과를 갖는다. 동일한 시간에 개별 뉴클레오타이드의 미결합은 그 다음 인접한 뉴클레오타이드의 결합에서 부정적 효과를 갖는다. 미스매치가 염기 쌍에 시도하는 경우, 그 미스매칭된 쌍의 미결합은 인접한 뉴클레오타이드 쌍의 결합에서 부정적 효과를 갖고 마찬가지로 매칭된 뉴클레오타이드 쌍이 성공적으로 결합하는 경우 인접한 뉴클레오타이드 쌍의 결합에서 긍정적 효과를 갖는다. 전체적인 에너지 관점으로부터 올리고뉴클레오타이드가 다중 증분적 단계에서 결합 및 미결합하는 개별 뉴클레오타이드 하위단위로서 결합하기 시작하는 경우, 중간 상태는 통계적으로 단계가 서로 독립적으로 발생하는 시스템에 비해 과소표시된다. 환언하면, 결합된 또는 미결합된 이외의 제한된 수의 동역학 및 제한된 정도의 자유가 있다. 분자성 관점으로부터 뉴클레오타이드의 스트링은 어느 정도 강성이고 일단 뉴클레오타이드가 결합하면, 인접한 뉴클레오타이드는 매우 제한된 정력적인 확인을 가져서 결합을 유발시키는 것 이외 채택할 수 있다. DNA 및 RNA 협동 결합을 보유하기 위해 분자성 강성/경직성에 대한 필요성은 하기에 의해 거의 30 년 전 먼저 실증되었다: Z. A. Shabarova (1988) Bioorg. Khim. 14: 12, 1656-62. 14 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 DNA 올리고뉴클레오타이드는, 화학적 결찰을 사용함으로써 1,3-디아미노프로판 또는 1,3-프로판디올 연결에 의해 공유적으로 연결된, 각각 7 뉴클레오타이드 길이인, 2개의 올리고뉴클레오타이드로부터 작제되었다. 가요성 올리고뉴클레오타이드는 상보성 14-뉴클레오타이드 DNA 올리고뉴클레오타이드에 결합되었고 결합 에너지는 측정되었다. 천연 DNA 백본의 강성/경직성 없이 가요성 14-뉴클레오타이드 DNA 단일 가닥은, 협동성이 부족한 2개의 독립적인 7-뉴클레오타이드 DNA 올리고뉴클레오타이드이었던 것처럼, 상당히 더 낮은 결합 에너지로 결합하였다. 협동성으로서 공지된 관측된 현상은 비-협동 시스템에서 보여질 것보다 더 높은 정도의 매치 대 미스매치 구별을 허용하고 뉴클레오타이드 서열의 특이성 증가를 위하여 중요한 성분이다. Cas 단백질은 씨드 영역의 10 뉴클레오타이드를 A-형태 나선의 단일-가닥 부분으로 선배열하기 위한 결정 구조에 의해 나타났다. RNA의 A-형태 나선으로의 선배열은 gRNA의 가이드 서열이 채택할 수 있는 동역학 상태의 수를 제한시키고, 따라서 씨드 영역에서 DNA/RNA 하이브리드화의 협동성을 증가시킨다.

[0050] 뉴클레오타이드의 상보성 스트링에 뉴클레오타이드의 스트링의 전체적인 결합 에너지는 전형적으로 용융 온도 (T_m)에 의해 정의된다. 용융 온도는 이들이 50% 결합되고 50% 미결합된다는 점에서 2개의 결합된 뉴클레오타이드 스트링 또는 가닥을 해리시키도록 요구된(즉, 염기 짝짓기 또는 하이브리드화에 의해 결합된) 온도이다. 용융 온도는 흡광증가로서 공지된 현상에 의해 측정된다. UV 흡수는 2개의 결합된 올리고뉴클레오타이드 가닥이 열에 의해 분리되고 있는 경우 증가된다. 올리고뉴클레오타이드의 열 변성은 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위해 이중 나선 구조를 풀도록 한다. 용액내 2개의 결합된 올리고뉴클레오타이드가 그것의 용융 온도 초과 가열되는 경우, 듀플렉스는 풀어져서 듀플렉스보다 더 많은 광을 흡수하는 2개의 단일 가닥을 형성한다. UV 흡광도가 온도의 함수로서 그래프화되는 경우, 에스자형 곡선은 듀플렉스가 해리하기 시작하는 지점에서 수득되고 에스자형 곡선의 중심은 T_m 으로서 정의된다.

[0051] 도 4는 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스가 가열에 의해 별개의 가닥으로 분리함에 따라 UV 흡광도가 증가하는 방법을 입증하는 그래프이다. 에스자형 곡선은 듀플렉스의 별개의 가닥으로의 해리를 반영하고, 에스자형 곡선의 중심은 듀플렉스의 T_m 이다. 이러한 곡선은 생리적 염 농도에서 20-뉴클레오타이드 DNA/RNA 듀플렉스의 용융 온도가 약 50°C인 것을 표시한다.

[0052] 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스가 듀플렉스의 단지 50%가 형성되는 용융 온도에서 가장 큰 매치 대 미스매치 특이성을 갖는다. 이러한 온도에서 오프-표적 폴리뉴클레오타이드에서 단일 미스매치는 듀플렉스의 결합 및 미결합이 고도의 협동성을 갖거나 가파른 에스자형 곡선을 보여주면 올리고뉴클레오타이드의 하이브리드화를 차단할 것이다. 유전자 편집 실험이 37°C에서 수행되면, 매치 대 미스매치의 최상의 식별력은 그것의 표적에 대한 결합이 37°C의 T_m 을 가질 가이드 RNA를 사용하여 수득될 것이다. 여기에서 사안은 이러한 양태가 단일-가닥 핵산의

열역학에만 기반된다는 것이고, 대조적으로 37℃ T_m을 가진 가이드 RNA는 그것의 이중-가닥 표적에 단지 부분적으로 결합할 것이고, 그렇게 함으로써 낮은 전체적인 활성 또는 유전자 편집을 제공한다. 그럼에도 불구하고, 활성을 모니터링하면서 증분적으로 그것의 표적에 가이드 RNA의 전체적인 T_m 저하는 특이성을 증가시킬 수 있다. 이러한 원리는, 20 뉴클레오타이드부터 17 뉴클레오타이드 길이로의 가이드 RNA 절단에 의해, Yanfang 등. (2014) Nat. Biotechnol. 32, 279-284에 의해 입증되었고; 이들은 온-표적 게놈 편집 효율성 희생 없이 특정 오프-표적 부위에서 특이성으로 5,000-배수 증가를 주장하였다. 생리적 염 조건에서, RNA/DNA 듀플렉스에서 RNA의 절단은 염기 쌍당 약 2℃만큼 그 듀플렉스의 T_m을 감소시킨다. gRNA내 가이드 서열의 17 뉴클레오타이드로의 절단은 약 6℃만큼 결합 에너지를 감소시켜 약 42℃의 듀플렉스 T_m을 초래할 것이다. 그러나, 가이드 서열이 20 뉴클레오타이드부터 17 뉴클레오타이드까지 절단되는 경우, 상당한 정보 함량은 손실되어 이로써 전체 게놈을 거쳐 17-nt 가이드 서열에 동일한 또는 유사한 오프-표적 부위의 증가된 수를 더욱 쉽게 찾을 수 있다. 더욱 유용한 접근법은 결합 및 미결합의 협동성을 보유하면서 화학적 변형을 통해 20-뉴클레오타이드 RNA/DNA 듀플렉스의 결합 에너지를 증가시키게 될 것이다.

[0053] CRISPR-Cas 게놈 편집용, 또는 표적 폴리뉴클레오타이드 절단 또는 니킹용 가이드 RNA는 두 피스가 crRNA(클러스터링된 반복 RNA) 및 tracrRNA(트랜스-활성화 클러스터링된 반복 RNA)로서 지칭되는 어느 한쪽 단일-가이드 RNA 또는 두-피스 이중-가이드 RNA로서 실체한다. 참조 상기도 2a 및 2b. 도 5a는 또한 단일-가이드 RNA 또는 두-피스 이중-가이드 RNA (501)을 설명한다(여기서 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절은 하이브리드화된 듀플렉스를 형성한다). 좌측부터 우측까지 이동하면서(즉, 가이드 RNA의 5' 말단부터 3' 말단까지), 도 5a는 일반적으로 가이드 RNA에서 (때때로 돌출부로서 지칭된) 확장 (503), 샘플링 및 잠금 영역 (505), Cas 단백질-결합 씨드 영역 (507)(전형적으로 10-nt 부분), 이중-가이드 줄기 (509) 또는 단일-가이드 줄기-루프 (511), 및 tracrRNA 영역 (513)을 도시한다. Cas9 단백질은 아마 (503)을 제외한 이들 gRNA 영역의 임의의 또는 모두를 결합시킬 수 있다. 가이드 서열은 잠금, 샘플링, 및 씨드 영역을 포함한다. 양쪽 단일-가이드 RNA 및 이중-가이드 RNA에 대하여, 가이드 RNA의 5' 말단에서 약 20 뉴클레오타이드의 가이드 서열은 표적 DNA와 안정한 듀플렉스를 결합 및 형성하는 것이다. 유사한 서열의 다른 부위와 경쟁 하이브리드화에 비해 이러한 하이브리드화 결합은 표적에 대하여 gRNA의 전체적인 특이성 및 따라서 게놈 편집의 특이성 또는 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의한 유전자 불활성화를 결정한다.

[0054] 그것의 표적 폴리뉴클레오타이드에 가이드 RNA의 결합은 가이드 서열의 3' 말단에 의해 개시된 씨드 RNA/DNA 듀플렉스의 Cas9-매개된 형성을 통해 발생한다. 일단 초기 씨드 듀플렉스가 형성되면, gRNA는 지퍼 같은 그것의 5' 말단을 향해 계속 하이브리드화할 수 있다.

[0055] 도 5b는, gRNA (501) 및 게놈성 DNA (515)로부터 씨드 듀플렉스 (517)의 초기 형성 후, 뉴클레오타이드의 결합이 샘플링 영역을 통해 순차적으로 진행되는 방법을 설명한다. 샘플링 영역은 씨드 영역에 인접한 영역이고, 이들 뉴클레오타이드의 하이브리드화 결합은 듀플렉스의 결합 에너지가 결합이 발생하고 있는 온도에 대략 맞먹는 지점까지 진행한다. 이 영역에서 결합 및 미결합의 속도는 Cas9 단백질의 상호작용에 의해 또한 제어되는 결합된 대 미결합된 RNA(예를 들어, (501) 대 (519) 또는 (501) 대 (521))의 더 큰 평형에 의해 제어된다. 생리적 염 농도에서 그리고 37℃에서 게놈성 DNA로 RNA/DNA 듀플렉스를 형성하는 가이드 RNA의 경우에서, 전형적인 샘플링 영역은, 15- 내지 16-뉴클레오타이드 RNA/DNA 듀플렉스가 대략 37℃의 T_m을 갖는다는 사실에 기반하여, 10-뉴클레오타이드 씨드 영역의 5 내지 6 뉴클레오타이드 바로 5' 미친다. 일단 결합된 뉴클레오타이드의 수가 T_m 역치를 능가하면, 결합은 순차적인 방식으로 잠금 영역을 통해 가이드 서열의 20 뉴클레오타이드가 결합되는 지점까지 계속하고, 결합은 표적-상보성 확장 또는 5' 돌출부가 가이드 서열의 5' 말단에서 존재하면 추가로 진행할 수 있다. 일단 결합이 잠금 영역을 달성하면, 결합된 RNA 대 미결합된 RNA(예를 들어, (501) 대 (523)) 사이의 평형은 변화하여 이로써 표적 폴리뉴클레오타이드의 그것의 미결합 또는 방출이 결합된 또는 하이브리드화된 상태의 방향으로 현재 상당히 놓여있는 결합된 대 미결합된 RNA의 전체적인 평형에 의해 부정적으로 영향을 받는다. 결합된 대 미결합된 RNA의 더 큰 평형이 특이성에서 갖는 효과는 하기에 의해 보여졌다: Slaymaker 등 (2016), "Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity", Science 351, 84-8. Slaymaker 등은 단백질의 핵산-결합 홈(또는 nt 홈)에서 양으로 하전된 아미노산을 중성으로 충전된 알라닌 잔기로 전환시킴으로써 오프-표적 인텔 형성을 감소시켰던 Cas9 단백질이 조작되었다는 것을 보고하였다. 이들 변화는 이중-가닥 표적 DNA에 대하여 가이드 RNA의 전체적인 Cas9-매개된 친화성을 감소시키고 친화성을 강제시켜 염기-쌍 인식을 포함하는 RNA/DNA 하이브리드화에 더욱 의존하도록 한다.

[0056] 도 5c는 개별 염기 쌍의 결합 에너지를 감소시키는 뉴클레오타이드의 화학적 변형이 아직 고수준의 협동성을 보유하는 방법이 5 또는 6 뉴클레오타이드를 넘어서 샘플링 영역을 확장시키기 위해 gRNA (525)의 씨드 및 샘플링

친화도를 감소시킬 수 있다. 이들의 예는 포스포노아세테이트, 티오포스포노아세테이트, 포스포노카복실레이트, 티오포스포노카복실레이트, 포스포노프로피오네이트, 티오포스포노프로피오네이트, 메틸포스포네이트, 메틸티오포스포네이트, 및 보라노포스포네이트이다.

[0064] 특정 구현예에서, 전체적인 가이드 RNA의 결합 에너지를 증가 또는 감소시키는 당 변형 또는 핵염기 변형은 다른 변형의 가이드 RNA에의 편입으로부터 결합 에너지를 조정 또는 추가 미세조정하기 위해 첨가될 수 있다. 예로서, 2'-O-메틸-티오포스포노아세테이트(MSP)의 편입은 미변형된 가이드 RNA에 비교된 경우 ≈ 1.5 도 만큼 가이드 RNA의 결합 에너지를 감소시킬 것이다. 2'-O-메틸 뉴클레오타이드가 가이드 서열에서 다른 곳에 편입되면 ≈ 0.2 도 만큼 전체적인 결합 에너지를 증가시킬 것이고 수득한 가이드 RNA는 미변형된 가이드 RNA에 비교된 경우 ≈ 1.3 도의 감소된 전체적인 결합 에너지를 가질 것이다. 특정 구현예에서, 당 변형은 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬, 예컨대 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로서 또한 공지된 2'-메톡시에톡시(2'-O-CH₂CH₂OCH₃)를 포함한다. 특정 구현예에서, 당 변형은 2'-할로, 예컨대 2'-F, 2'-Br, 2'-Cl, 또는 2'-I를 포함한다. 특정 구현예에서, 당 변형은 2'-NH₂를 포함한다. 특정 구현예에서, 당 변형은 2'-H(예를 들어, 2'-데옥시뉴클레오타이드)를 포함한다. 특정 구현예에서, 당 변형은 2'-아라비노 또는 2'-F-아라비노를 포함한다. 특정 구현예에서, 당 변형은 2'-LNA 또는 2'-ULNA를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 4'-티오리보실을 포함한다.

[0065] 특정 구현예에서, 전체적인 가이드 RNA의 결합 에너지를 증가 또는 감소시키는 뉴클레오타이드 당 변형 또는 핵염기 변형은 포스포디에스테르 결합이 변형된 뉴클레오타이드의 결합 에너지를 조절하기 위해 변형되는 동일한 뉴클레오타이드에서 편입될 수 있다. 예로서, 3'-포스포노카복실레이트 연결은 당 변형 예컨대 2'-O-메틸, 2'-F, 또는 2'-O-(2-메톡시에틸)과 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 당은 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬, 예컨대 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로서 또한 공지된 2'-메톡시에톡시(2'-O-CH₂CH₂OCH₃)를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-할로, 예컨대 2'-F, 2'-Br, 2'-Cl, 또는 2'-I를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-NH₂를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-H(예를 들어, 2'-데옥시뉴클레오타이드)를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-아라비노 또는 2'-F-아라비노를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-LNA 또는 2'-ULNA를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 4'-티오리보실을 포함한다.

[0066] III. 가이드 RNA

[0067] 하나 이상의 양태에서, 본 발명은 가이드 RNA 기능성을 갖는 화학적으로 변형된 가이드 RNA를 포함한다. 화학적으로 변형된 가이드 RNA는 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하고 특이성 향상보다 더 많은 기능 또는 상이한 기능을 갖는 다른 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0068] 비천연 또는 천연(예를 들어, 슈도우리딘, 이노신 또는 데옥시뉴클레오타이드)이든, 4개의 표준적 리보뉴클레오타이드, 즉 A, C, G, 및 U 이외의 임의의 뉴클레오타이드를 포함하는 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 가이드 RNA이다. 마찬가지로, 천연 포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 결합 이외의 임의의 백본 또는 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는 가이드 RNA는 화학적 변형을 보유하고 따라서 화학적으로 변형된 가이드 RNA이다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은 Cas 단백질 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드에 Cas 단백질 또는 gRNA:Cas 단백질 복합체 표적화를 포함한다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드 니킹을 포함한다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드 절단을 포함한다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은, 조작된 Cas 단백질을 가진 인공 CRISPR-Cas 시스템을 포함하여, Cas 단백질을 가진 CRISPR-Cas 시스템에서 가이드 RNA의 임의의 다른 공지된 기능이다. 특정 구현예에서, 유지된 기능성은 천연 가이드 RNA의 임의의 다른 기능이다.

[0069] A. 예시적 변형

[0070] 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형은 데옥시리보스 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노푸라노실 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-2'-플루오로리보푸라노실 뉴클레오타이드, 2'-O-페닐, 2'-S-티오편, 2'-메틸, 2'-에틸, 2'-프로필, 2'-알릴, 2'-알릴페닐, 2'-메틸하이드록시, 2'-메틸옥시메틸, 2'-O-카바메이트, 2'-O-에틸아미노, 2'-O-알릴아미노, 2'-O-프로필아미노, 또는 2'-O-치환된 페닐을 갖는 당, 또는 이들의 조합이다. 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형은 포스포노아세테이트, 티오포스포노아세테이트, 포스포노프로피오네이트, 티오포스포노프로피오네이트, 메틸포스포네이트, 메틸티오포스포네이트, 또는 보라노포스포네이트; 또는 임의의 전술

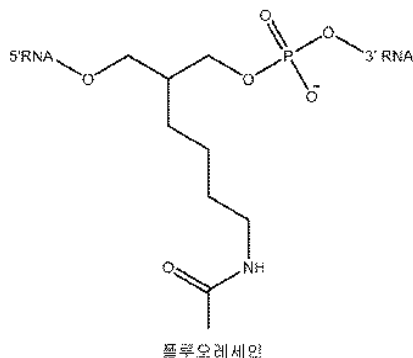
한 조합이다.

[0071] 특정 구현예에서, 가이드 RNA에 편입된 뉴클레오타이드 당 변형은 데옥시리보스, 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노푸라노실, 2'-데옥시-2'-플루오로리보푸라노실, 및 2'-O-페닐, 2'-S-티오펜, 2'-메틸, 2'-에틸, 2'-프로필, 2'-알릴, 2'-알릴페닐, 2'-메틸하이드록시, 2'-메틸옥시메틸, 2'-O-카바메이트, 2'-O-에틸아미노, 2'-O-알릴아미노, 2'-O-프로필아미노, 및 2'-O-치환된 페닐을 갖는 당으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA에 편입된 인터뉴클레오타이드 결합 변형은 하기로 구성되는 군으로부터 선택된다: 포스포로티오에이트 "P(S)"(P(S)), 포스포노카복실레이트($P(CH_2)_nCOOR$) 예컨대 포스포노아세테이트 "PACE"($P(CH_2COO^-)$), 티오포스포노카복실레이트($(S)P(CH_2)_nCOOR$) 예컨대 티오포스포노아세테이트 "티오포PACE"($(S)P(CH_2COO^-)$), 알킬포스포네이트(PC_{1-3} 알킬) 예컨대 메틸포스포네이트 -P(CH₃), 보라노포스포네이트(P(BH₃)), 및 포스포로디티오에이트(P(S)₂). 특정 구현예에서, 가이드 RNA에 편입된 인터뉴클레오타이드 결합 변형은 포스포노아세테이트, 티오포스포노아세테이트, 포스포노프로피오네이트, 티오포스포노프로피오네이트, 메틸포스포네이트, 메틸티오포스포네이트, 및 보라노포스포네이트로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0072] 특정 구현예에서, 가이드 RNA에 편입된 핵염기("염기") 변형은 하기로 구성되는 군으로부터 선택된다: 2-티오우라실("2-티오U"), 2-티오시토신("2-티오C"), 4-티오우라실("4-티오U"), 6-티오구아닌("6-티오G"), 2-아미노퓨린, 슈도우라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸시토신("5-메틸C"), 5-메틸우라실("5-메틸U"), 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-에틸닐시토신, 5-아미노알릴우라실("5-아미노알릴U"), 5-아미노알릴-시토신("5-아미노알릴C"), 무염기성 뉴클레오타이드, 비구조적 핵산("UNA"), 이소구아닌("이소G"), 이소시토신("이소C")["Enzymatic Incorporation of a New Base pair into DNA and RNA Extends the Genetic Alphabet". Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. A. (1990) Nature, 343, 33에서 기재된 바와 같음], 5-메틸-2-피리미딘(Rappaport, H. P. (1993) Biochemistry, 32, 3047에서 기재된 바와 같음), x(A,G,C,T,U) 및 y(A,G,C,T,U).

[0073] 특정 구현예에서, 하나 이상의 동위원소 변형은 뉴클레오타이드 당, 핵염기, 포스포디에스테르 결합 및/또는 뉴클레오타이드 포스페이트 상에 도입된다. 그와 같은 변형은 추적자로서 사용된 하나 이상의 ¹⁵N, ¹³C, ¹⁴C, 중수소, ³H, ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I 원자 또는 다른 원자 또는 요소를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다.

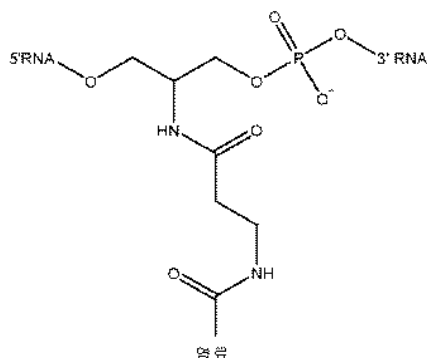
[0074] 특정 구현예에서, 가이드 RNA에 편입된 "말단" 변형은 하기로 구성되는 군으로부터 선택된다: PEG(폴리에틸렌글리콜), 탄화수소 링커(포함: 헤테로원자(O,S,N)-치환된 탄화수소 스페이서; 할로-치환된 탄화수소 스페이서; 케토-, 카복실-, 아미도-, 티오닐-, 카바모일-, 티오노카바모일-함유 탄화수소 스페이서), 스페르민 링커, 링커 예컨대 예를 들어 6-플루오레신-핵실에 부착된 형광성 염료를 포함하는 염료(예를 들어 플루오레신, 로다민, 시아닌), 켄처(예를 들어 다브실, BHQ) 및 다른 표지(예를 들어 바이오틴, 디곡시제닌, 아크리딘, 스트렙타비딘, 아비딘, 펩타이드 및/또는 단백질). 특정 구현예에서, "말단" 변형은 (데옥시뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드를 포함하는) 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 또 다른 분자, 펩타이드, 단백질, 당, 올리고당, 스테로이드, 지질, 염산, 비타민 및/또는 다른 분자에 가이드 RNA의 접합(또는 결합)을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA에 편입된 "말단" 변형은, 포스포디에스테르 결합으로서 편입되고 가이드 RNA에서 2개 뉴클레오타이드 사이 어디든지 편입될 수 있는, 링커 예컨대 예를 들어 2-(4-부틸아미도플루오레신)프로판-1,3-디올 비스(포스포디에스테르) 링커(아래 묘사됨)를 통해 가이드 RNA 서열에서 내부적으로 위치한다.



[0075]

[0076] 2-(4-부틸아미도폴루오레스세인)프로판-1,3-디올 비스(포스포디에스테르) 링커

[0077] 다른 링커는 예를 들어 예시로서, 비제한적으로 하기를 포함한다:

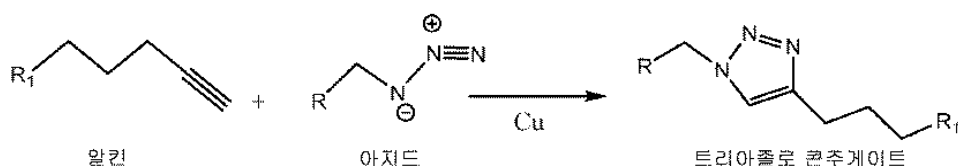


[0078]

[0079] 2-(3-디에-아미도)프로판아미도)프로판-1,3-디올 비스(포스포디에스테르) 링커

[0080] 특정 구현예에서, 말단 변형은 말단 작용기 예컨대 아민, 티올(또는 설프하이드릴), 하이드록실, 카복실, 카보닐, 티오닐, 티오카보닐, 카바모일, 티오카바모일, 포스포릴, 알켄, 알킨, 할로젠 또는 작용기-종결된 링커를 포함하고, 이들 중 어느 하나는 원하는 모이어티, 예를 들어 형광성 염료 또는 비-형광성 표지 또는 태그 또는 임의의 다른 분자 예컨대 예를 들어 (압타머를 포함하여, 데옥시뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드를 포함하는) 올리고뉴클레오타이드, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 당, 올리고당, 스테로이드, 지질, 염산, 비타민에 후속적으로 접합될 수 있다. 접합은, 비제한적으로 N-하이드록시석신이미드, 이소티오시아네이트, DCC(또는 DCI)를 통한 커플링, 및/또는 임의의 다른 표준 방법을 포함하여, 기술 분야에서 공지된 표준 화학을 이용한다.

[0081] 특정 구현예에서, 표지 또는 염료는 gRNA에서 변형된 뉴클레오타이드에 부착되거나 접합된다. 형광성 염료 또는 다른 모이어티 예컨대 비-형광성 표지 또는 태그(예를 들어 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 또는 동위원소 표지 예컨대 ^{15}N , ^{13}C , ^{14}C , 중수소, ^3H , ^{32}P , ^{125}I 및 기타 동종을 함유하는 모이어티) 또는 임의의 다른 분자 예컨대 예를 들어 (압타머를 포함하여 데옥시뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드를 포함하는) 올리고뉴클레오타이드, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 당, 올리고당, 스테로이드, 지질, 염산, 비타민 또는 다른 분자의 접합은 소위 "클릭" 화학 또는 소위 "스쿠아레이트" 접합 화학을 사용하여 유발될 수 있다. "클릭" 화학은 아자이드 모이어티와 알킨 모이어티의 [3+2] 고리화부가를 지칭하여, 하기 반응식에서 나타난 바와 같이 2개 모이어티 사이 트리아졸로 결합을 초래한다:

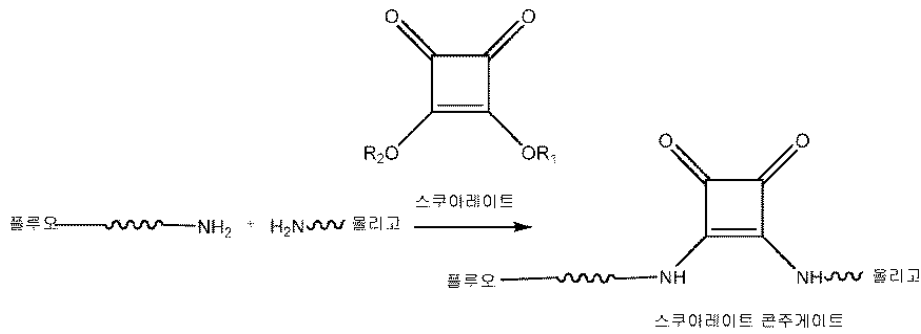


[0082]

[0083] 예를 들어 하기에서 기재된 바와 같음: El-Sagheer, A.H 및 Brown, T. "Click chemistry with DNA", Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 1388-1405 및 Mojibul, H.M. 및 XiaoHua, P., DNA-associated click chemistry, Sci. China Chem., 2014, 57:2, 215-31, 이들의 내용은 참고로 그 전체가 이로써 편입된다.

[0084] 특정 구현예에서, 접합은 알켄 모이어티와 π -공액 디엔 모이어티의 대안적인 고리화부가 예컨대 딜스-알더 [4+2] 고리화부가에 의해 유발될 수 있다.

[0085] "스쿠아레이트" 접합 화학은 스쿠아레이트 모이어티를 함유하는 스쿠아레이트 콘주게이트를 초래하기 위해 스쿠아레이트 유도체를 통해 아민을 각각 갖는 2개의 모이어티를 연결한다(참조 예를 들어, Tietze 등. (1991) Chem. Ber., 124, 1215-21, 이들의 내용은 참고로 그 전체가 이로써 편입된다). 예를 들어, 링커 아민을 함유하는 폴루오레스세인은 아래 반응식에서 기재된 바와 같이 스쿠아레이트 링커를 통해 아민을 함유하는 올리고리보뉴클레오타이드에 접합된다. 스쿠아레이트 링커의 예는 하기 반응식으로 묘사된다:



[0086]

[0087]

B. 하나 이상의 특이성-향상 변형을 가진 가이드 RNA

[0088]

일 양태에서, 본 기술은, 변형된 gRNA 및 임의로 안정성-향상 변형을 구성하는, 하나 이상의 특이성-향상 변형을 갖는 가이드 RNA를 제공한다.

[0089]

특정 구현예에서, 하나 이상의 특이성-향상 변형은 가이드 RNA의 가이드 서열 또는 crRNA 분절 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 crRNA의 가이드 서열 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 서열 또는 crRNA 분절의 5' 말단의 제1 오(5) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 서열 또는 crRNA 분절의 제1 사(4) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 서열 또는 crRNA 분절의 제1 삼(3) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 또한 crRNA 분절의 5'-돌출부 이내이다. 특정 구현예에서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N으로 구성되는 경우, N이 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 양의 또는 음의 정수인 경우, 하나 이상의 특이성-향상 변형은 뉴클레오타이드 4-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 5-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 10-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N 내지 14-N 또는 16-N 내지 19-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N 내지 14-N 또는 16-N 내지 18-N 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 뉴클레오타이드 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 16-N, 또는 임의의 이들의 조합에서이다.

[0090]

특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 gRNA의 가이드 서열 부분에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 특이성-향상 변형된 뉴클레오타이드 그리고 gRNA의 다른 부분 또는 분절에서 최대 100 추가의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 변형된 gRNA는 가이드 서열 부분에서 5' 확장 또는 돌출부를 포함하고, 확장은 gRNA의 가이드 서열 부분에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 특이성-향상 변형된 뉴클레오타이드에 더하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 특이성-향상 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고 gRNA의 다른 부분에서 최대 100 추가의 변형된 뉴클레오타이드를 임의로 포함하는 1 내지 20 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 구현예에서, gRNA에서 모든 뉴클레오타이드는 변형된다. 특정 구현예에서, 모든 변형은 동일하다. 특정 구현예에서, 모든 변형된 뉴클레오타이드는 변형의 동일한 유형을 갖는다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 상이하게 변형된 뉴클레오타이드의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 2 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 3 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 인접하여 배열된다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 변형된 뉴클레오타이드의 하나 이상의 인접 스트레치를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 적어도 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 또는 50 변형된 뉴클레오타이드의 인접 스트레치를 포함한다. 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 독립적으로 변형의 하나 이상의 유형을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA의 서열에서, 무 변형된 뉴클레오타이드가 인접하거나, 모두가 아닌 일부가 인접한다.

[0091]

특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 RNA의 5' 부분 이내이다. 가이드 RNA가 이중 가이드 RNA인 경우, 5' 부분 이내 화학적 변형은 가이드 RNA의 crRNA 분절의 5' 부분 이내 변형을 지칭하고, tracrRNA 분절의 5' 부분 이내 변형은 아니다. 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA인 경우, crRNA 분절에서 위치하는, 1개의 5' 부분을 갖는다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 오(5) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 삼(3) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 3' 부분 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 오(5) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 삼(3) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 내부 영역 이내(즉, 5' 말단과 3' 말단 사이)이다.

- [0092] 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 RNA의 5' 부분 또는 3' 부분에서, 특히, 예를 들어, 뉴클레아제에 의한 분해로부터 RNA를 보호하기 위해 또는 다른 목적으로 5' 부분의 제1 5 또는 10 뉴클레오타이드 이내 또는 3' 부분의 마지막 5 또는 10 뉴클레오타이드 이내 편입된다. 일부 다른 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 양쪽 5' 부분 및 3' 부분에서, 특히, 예를 들어, 뉴클레아제에 의한 분해로부터 RNA를 보호하기 위해 또는 다른 목적으로 5' 부분의 제1 5 또는 10 뉴클레오타이드 이내 또는 3' 부분의 마지막 5 또는 10 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, 변형의 1 초과 유형은 가이드 RNA의 양쪽 5' 부분 및 3' 부분에서 존재한다. 특정 구현예에서, 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서, 3' 말단에서, 그리고 내부 서열 이내 위치한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 또는 3' 부분에서 40 이하, 대안적으로 20 이하, 대안적으로 15 이하, 대안적으로 10 이하, 대안적으로 5 이하, 대안적으로 3 이하 데옥시리보뉴클레오타이드 잔기를 포함한다. 가이드 RNA가 이중 가이드인 경우, 각각의 RNA 분자는 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽에서 변형(들)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 말단(5', 3', 또는 양쪽)에서 연속 뉴클레오타이드, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 초과 연속 뉴클레오타이드는 변형된다.
- [0093] 보통, 가이드 서열은 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기에서 N은 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 정수이다. N은 -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 가이드 서열은 20 뉴클레오타이드 길이(N=0), 19 뉴클레오타이드 길이(N=1), 21 뉴클레오타이드 길이(N=-1), 또는 기타 동종일 수 있다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 (가이드 서열의 5'-말단부터 개시하는) 뉴클레오타이드 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 11-N, 14-N, 또는 16-N, 또는 이들의 조합에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함한다. 몇 개의 예는 아래 기재된다.
- [0094] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20으로 구성되고, 위치 4, 5, 7, 9, 10, 및 11로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 11에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 7에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 9에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.
- [0095] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 19로 구성되고, 위치 3, 4, 6, 8, 9, 및 10으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 8에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 9에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 3에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.
- [0096] 특정 구현예에서, 가이드 서열은 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 18로 구성되고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 및 9로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 3에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 7에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 8에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 9에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 2에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.
- [0097] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 17로 구성되고, 위치 1, 2, 4, 6, 7, 및 8로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 2에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 7에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 8에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 1에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열

의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.

[0098] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 16으로 구성되고, 위치 1, 3, 5, 6, 및 7로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 1에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 3에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 7에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.

[0099] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 15로 구성되고, 위치 2, 4, 5, 및 6으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 2에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.

[0100] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 21로 구성되고, 뉴클레오타이드 5, 6, 8, 10, 11, 및 12의 적어도 하나에서 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 12에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 8에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 11에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.

[0101] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 22로 구성되고, 뉴클레오타이드 6, 7, 9, 11, 12, 및 13의 적어도 하나에서 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 13에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 7에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 9에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 12에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 11에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6에서이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.

[0102] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, N이 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 양의 또는 음의 정수인, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N으로 구성되고, 4-N 내지 20-N으로부터 임의의 뉴클레오타이드에서 하나 이상의 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 뉴클레오타이드 4-N 내지 20-N으로부터 선택되는 2개 이상의 뉴클레오타이드에서 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 뉴클레오타이드 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 또는 16-N에서 하나 이상의 변형, 뿐만 아니라 4-N 내지 20-N(15-N 제외)으로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 적어도 또 다른 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 4-N 내지 20-N으로부터 선택되는 뉴클레오타이드는 5-N, 6-N, 7-N, 8-N, 9-N, 10-N, 16-N, 또는 17-N이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 하나 이상의 말단 변형을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 가이드 서열의 5' 확장 또는 돌출부 업스트림을 포함한다.

[0103] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20으로 구성되고, 위치 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 및 17로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 2개 이상의 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6 및 뉴클레오타이드 10에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 및 뉴클레오타이드 17에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 6 및 뉴클레오타이드 7에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10 및 뉴클레오타이드 17에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 및 뉴클레오타이드 16에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10 및 뉴클레오타이드 16에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 및

화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 1 및 뉴클레오타이드 2에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 및 뉴클레오타이드 12에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 및 뉴클레오타이드 11에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4 및 뉴클레오타이드 11에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 3 및 뉴클레오타이드 12에서이다.

[0109] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 14로 구성되고, 위치 1, 2, 3, 4, 10, 및 11로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 2개 이상의 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4 및 뉴클레오타이드 11에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 4 및 뉴클레오타이드 10에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 3 및 뉴클레오타이드 10에서이다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 가이드 서열의 뉴클레오타이드 2 및 뉴클레오타이드 11에서이다.

[0110] 특정 구현예에서, 화학적 변형은 말단 변형, 예컨대 5' 말단 변형 또는 3' 말단 변형을 포함한다. 말단 변형의 예는, 비제한적으로 (천연 포스페이트 또는 폴리포스페이트로서 또는 변형된 포스포네이트 기 예컨대 예를 들어, 알킬포스포네이트, 포스포노카복실레이트, 포스포노아세테이트, 보라노포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 기타 동종으로서) 인산화, 바이오티닐화, 접합하는 또는 접합된 분자, 링커, 염료, 표지, 태그, 작용 기(예컨대 예를 들어 비제한적으로 5'-아미노, 5'-티오, 5'-아미도, 5'카복시 및 기타 동종), 역전된 연결, 또는 에테르, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에스테르, 하이드록실, 아릴, 할로, 포스포디에스테르, 이환형, 복소환형 또는 다른 유기 작용 기를 포함할 수 있는 탄화수소 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 말단 변형은 디메톡시트리틸을 포함한다.

[0111] 특정 구현예에서, 화학적 변형은 변형된 염기를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "미변형된" 염기는 퓨린 염기 아데닌(A) 및 구아닌(G), 그리고 피리미딘 염기 티민(T), 시토신(C) 및 우라실(U)을 포함한다. 변형된 염기의 예는, 비제한적으로, 합성 및 천연 염기 예컨대 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노퓨린, 슈도우라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐우라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴-우라실, 및 5-아미노알릴-시토신을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형은 무염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형은 비표준 퓨린 또는 피리미딘 구조, 예컨대 Z 또는 P, 이소C 또는 이소G, UNA, 5-메틸피리미딘, x(A,G,C,T,U) 또는 y(A,G,C,T,U)를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 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 또는 50 변형된 염기를 포함한다. 다른 구현예에서, 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140 변형된 염기를 포함한다. 특정 구현예에서, gRNA에서 모든 염기는 변형된다.

[0112] 특정 구현예에서, 변형은 변형된 당을 포함한다. 변형된 당의 예는, 비제한적으로, 2' 위치에서 변형 또는 4' 위치에서 변형을 갖는 당을 포함한다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 당은 2'-O-C₁₋₄알킬, 예컨대 2'-O-메틸(2'-OMe)을 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬, 예컨대 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로서 또한 공지된 2'-메톡시에톡시(2'-O-CH₂CH₂OCH₃)를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-할로, 예컨대 2'-F, 2'-Br, 2'-Cl, 또는 2'-I를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-NH₂를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-H(예를 들어, 2'-테옥시뉴클레오타이드)를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-아라비노 또는 2'-F-아라비노를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 2'-LNA 또는 2'-ULNA를 포함한다. 특정 구현예에서, 당은 4'-티오리보실을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 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 또는 50 변형된 당을 포함한다. 다른 구현예에서, 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140 변형된 당을 포함한다. 특정 구현예에서, gRNA에서 모든 당은 변형된다.

[0113] 특정 구현예에서, 변형은 변형된 백본(즉, 천연 포스포디에스테르 이외의 인터뉴클레오타이드 결합)을 포함한다. 변형된 인터뉴클레오타이드 결합의 예는, 비제한적으로, 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 키랄 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 포스포로디티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 보라

노스포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, C_{1-4} 알킬 포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합 예컨대 메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 보라노스포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 예컨대 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 포스포노카복실레이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합 예컨대 포스포노아세테이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 예컨대 예를 들어 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노카복실레이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합 예컨대 티오포스포노아세테이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리 산 형태는 또한 포함된다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 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 또는 50 변형된 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 다른 구현예에서, 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140 변형된 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, gRNA에서 모든 인터뉴클레오타이드 연결은 변형된다.

[0114] 특정 구현예에서, 변형은 2'-OC₁₋₄알킬, 2'-H, 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬, 2'-F, 2'-NH₂, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 2'-LNA, 2'-ULNA, 4'-티오리보실, 2'-티오U, 2'-티오C, 4'-티오U, 6'-티오G, 2'-아미노A, 2'-아미노퓨린, 슈도우라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-MeC, 5-MeU, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 5-에티닐시토신, 5-에티닐우라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴-우라실, 5-아미노알릴-시토신, 무염기성 뉴클레오타이드, Z 뉴클레오타이드, P 뉴클레오타이드, UNA, 이소C, 이소G, 5-메틸-피리미딘, x(A,G,C,T,U) 뉴클레오타이드, y(A,G,C,T,U) 뉴클레오타이드, 3'-포스포로티오에이트 기, 3'-포스포노아세테이트 기, 3'-포스포노아세테이트 에스테르 기, 3'-티오포스포노아세테이트 기, 3'-티오포스포노아세테이트 에스테르 기, 3'-메틸포스포네이트 기, 3'-보라노스포스포네이트 기 또는 3'-포스포로디티오에이트 기, 또는 이들의 조합이거나 상기를 포함한다.

[0115] 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포노카복실레이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-데옥시-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-데옥시-3'-포스포노카복실레이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-할로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-할로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-할로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-할로-3'-포스포노카복실레이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-포스포노카복실레이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 Z 염기를 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 P 염기를 포함한다.

[0116] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 식 (I)에 의해 표시되는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다:

[0117] W-Y 또는 Y-W (I)

[0118] 여기서 W는 하나 이상의 안정성-향상 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 스트레치를 나타내고 Y는 올리고뉴클레오타이드의 미변형된 부분을 나타낸다.

[0119] 특정 구현예에서, W는 가이드 RNA의 5' 부분 이내이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 오(5) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 사(4) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 삼(3) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 뉴클레오타이드 4 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 13 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 13 및 14 또는 16 내지 18 이내

다.

[0120] 특정 구현예에서, W는 하기를 포함한다: 2'-O-C₁₋₄알킬, 2'-H, 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬, 2'-F, 2'-NH₂, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 2'-LNA, 2'-ULNA, 4'-티오리보실, 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노퓨린, 슈도우라실, 하이포잔틴, 7-테아자구아닌, 7-테아자-8-아자구아닌, 7-테아자아데닌, 7-테아자-8-아자아데닌, 5-MeC, 5-MeU, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐우라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴-우라실, 5-아미노알릴-시토신, 무염기성 뉴클레오타이드, Z 뉴클레오타이드, P 뉴클레오타이드, UNA, 이소C, 이소G, 5-메틸-피리미딘, x(A,G,C,T,U), y(A,G,C,T,U), 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노아세테이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합 메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 보라노포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 포스포로디티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 또는 이들의 조합.

[0121] 특정 구현예에서, W는 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 및 3'-포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 및 3'-포스포로티오에이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 및 3'-티오포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-F 및 3'-포스포로티오에이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-F 및 3'-포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-F 및 3'-티오포스포노아세테이트 기를 포함한다.

[0122] 특정 구현예에서, W는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 동일한 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, W는 다양하게 변형된 뉴클레오타이드의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, W는 2 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 3 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 미변형된 뉴클레오타이드가 중재할 수 있음에 따라, 변형된 뉴클레오타이드는 서열에서 인접해서 배열되지 않거나, 적어도 전적으로는 아니다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 인접해서 배열된다. 특정 구현예에서, W는 변형된 뉴클레오타이드의 하나 이상의 인접 스트레치를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 적어도 삼(3) 변형된 뉴클레오타이드의 인접 스트레치를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 적어도 사(4) 변형된 뉴클레오타이드의 인접 스트레치를 포함한다. 특정 구현예에서, W는 적어도 오(5) 변형된 뉴클레오타이드의 인접 스트레치를 포함한다.

[0123] 특정 구현예에서, 변형은 안정성-변경 변형이다. 안정성은 효소, 예컨대 뉴클레아제, 그리고 세포내 및 세포외 환경에서 실재하는 다른 서브스텐스에 의해 분해를 저항하는 gRNA의 능력을 지칭한다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비해 가이드 RNA의 뉴클레아제 저항을 증가시키고, 따라서 가이드 RNA 안정성을 향상시킨다. 특정 구현예에서, 안정성-변경 변형은 안정성-향상 변형이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-O-C₁₋₄알킬 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 2'-할로 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-F, 2'-Br, 2'-Cl, 또는 2'-I를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 2'-MOE 또는 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬을 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 2'-NH₂ 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 2'-H(또는 2'-데옥시) 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 2'-아라비노 또는 2'-F-아라비노를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 4'-티오리보실 당 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 3'-포스포로티오에이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 3'-포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 3'-티오포스포노아세테이트 기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 3'-메틸포스포네이트 기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 3'-보라노포스포네이트 기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 3'-포스포로디티오에이트 기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 미잠금된 핵산("ULNA") 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0124] 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 및 3'-포스포로티오에이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 및 3'-포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-O-메틸 및 3'-티오포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-플루오로 및

3'-포스포로티오에이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-플루오로 및 3'-포스포노아세테이트 기를 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성-향상 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서 2'-플루오로 및 3'-티오포스포노아세테이트 기를 포함한다.

[0125] 특정 구현예에서, 변형은 특이성-변경 변형이다. 일부 구현예에서, 특이성 향상은 온-표적 결합 및/또는 절단 향상, 또는 오프-표적 결합 및/또는 절단 감소, 또는 양쪽의 조합에 의해 달성될 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 특이성 감소는, 예를 들어, 온-표적 결합 및/또는 절단 감소, 또는 오프-표적 결합 및/또는 절단 증가, 또는 양쪽의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0126] 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 2'-O-메틸을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 2'-할로, 예컨대 2'-플루오로를 포함한다.

[0127] 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 2-티오우라실 염기(2-티오U)를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 2-티오C를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 4-티오U를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 6-티오G를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 2-아미노A를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 2-아미노퓨린을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 슈도우라실을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 하이포잔틴을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 7-데아자구아닌을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 7-데아자-8-아자구아닌을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 7-데아자아데닌을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 7-데아자-8-아자아데닌을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-메틸C를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-메틸U를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-하이드록시메틸시토신을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-하이드록시메틸우라실을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5,6-데하이드로우라실을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-프로피닐시토신을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-프로피닐우라실을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-에틸닐시토신을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-에틸닐우라실을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-알릴U를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-알릴C를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-아미노알릴U를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-아미노알릴C를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 무염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 Z 염기를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 P 염기를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 UNA 염기를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 이소C를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 이소G를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 5-메틸-피리미딘을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 x(A,G,C,T,U)를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 y(A,G,C,T,U)를 포함한다.

[0128] 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 보라노포스페이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 포스포로디티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 ULNA를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 LNA를 포함한다.

[0129] 특정 구현예에서, 변형은, 예를 들어, 변형 없이 가이드 RNA에 비해 가이드 RNA의 용융 온도(T_m) 변경에 의해 RNA 염기 짝짓기를 변경시킨다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 T_m 을 저하시킨다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비해 가이드 RNA의 T_m 을 상승시킨다.

[0130] 특정 구현예에서, gRNA는 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함하고, 가이드 서열은 변형 없이 유사한 듀플렉스에 비해 gRNA:표적 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스의 용융 온도(T_m) 변경에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드를 가진 가이드 서열의 염기 짝짓기를 변경시키는 하나 이상의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 유사한 듀플렉스에 비하여 gRNA:표적 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스의 T_m 을 저하시킨다.

[0131] 특정 구현예에서, 특이성-변경 변형은 염기 짝짓기 상호작용의 T_m 을 저하시킨다. 특정 구현예에서, 특이성-향상

변형은, 예를 들어 T_m 을 약 1°C 내지 약 13°C , 대안적으로 약 1°C 내지 약 6°C 저하시킴으로써, 가이드 RNA 및 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m 을 적어도 약 1°C , 대안적으로 적어도 약 2°C , 적어도 약 3°C , 적어도 약 4°C , 적어도 약 5°C , 및/또는 최대 약 6°C , 대안적으로 최대 약 8°C , 대안적으로 최대 약 10°C , 대안적으로 최대 약 13°C 만큼 저하시킨다. 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형은, 예를 들어 T_m 을 약 1°C 내지 약 13°C , 대안적으로 약 1°C 내지 약 6°C 저하시킴으로써, 가이드 RNA 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m 을 적어도 약 1°C , 대안적으로 적어도 약 2°C , 적어도 약 3°C , 적어도 약 4°C , 적어도 약 5°C , 및/또는 최대 약 6°C , 대안적으로 최대 약 8°C , 대안적으로 최대 약 10°C , 대안적으로 최대 약 13°C 만큼 저하시킨다.

[0132] 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 형질감염 효율을 변경시키는 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 형질감염 효율을 증가시킨다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 형질감염 효율을 감소시킨다. 특정 구현예에서, 변형은 세포에서 수동 확산시키기 위해 포스페이트에서 음이온성 전하를 중화시킨다. 특정 구현예에서, 전하-중화 변형은 포스포노아세테이트 알킬 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 예컨대 포스포노아세테이트 메틸 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. gRNA 개발에 관련된 추가 고려사항들은 전달성 및 면역자극성 특성을 포함한다. 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 세포에, 특히 진행 세포의 핵에 효율적인 및 적정가능한 형질감염성을 촉진시키는, 그리고 형질감염된 세포에서 면역자극성 특성을 감소시키는 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 원하는 gRNA 기능성을 허용하는데 충분한 지속기간 동안 의도된 세포, 조직, 체액 또는 유기체에 효과적인 전달 그리고 상기에서 유지를 촉진시키는 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 면역자극성 효과를 변경시키는 화학적 변형을 포함한다.

[0133] 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 양쪽 안정성 및 특이성을 향상시키는 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 양쪽 안정성 및 형질감염 효율을 향상시킨다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 양쪽 특이성 및 형질감염 효율을 향상시킨다. 특정 구현예에서, 변형은 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 전체적인 효능을 향상시킨다.

[0134] 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 1 초과의 특이성 스코어를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 1.1의 특이성 스코어를 갖는다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 1.1, 적어도 약 1.5, 적어도 약 2, 적어도 약 3, 적어도 약 4, 적어도 약 5, 적어도 약 6, 적어도 약 7, 적어도 약 8, 적어도 약 9, 적어도 약 10, 적어도 약 11, 적어도 약 12, 적어도 약 13, 적어도 약 14, 적어도 약 15, 적어도 약 20, 적어도 약 25, 적어도 약 30, 적어도 약 35, 적어도 약 40, 적어도 약 45, 적어도 약 50, 또는 적어도 약 55의 특이성 스코어를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 약 2 내지 약 60의 특이성 스코어를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 약 10 내지 약 60의 특이성 스코어를 갖는다.

[0135] 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 1%의 온 표적 절단을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 5%의 온 표적 절단을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 10%의 온 표적 절단을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체는 적어도 약 30%의 온 표적 절단을 갖는다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%의 온 표적 절단을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 약 25% 내지 약 99.9%의 온 표적 절단을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 약 50% 내지 약 99.9%의 온 표적 절단을 갖는다.

[0136] 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 1 초과의 온:오프 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 1.1:1의 온:오프 비를 갖는다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 1.1:1, 적어도 약 1.5:1, 적어도 약 2:1, 적어도 약 3:1, 적어도 약 4:1, 적어도 약 5:1, 적어도 약 6:1, 적어도 약 7:1, 적어도 약 8:1, 적어도 약 9:1, 적어도 약 10:1, 적어도 약 15:1, 적어도 약 20:1, 적어도 약 25:1, 적어도 약 30:1, 적어도 약 35:1, 적어도 약 40:1, 적어도 약 45:1, 적어도 약 50:1, 적어도 약 60:1, 적어도 약 70:1, 적어도 약 80:1, 적어도 약 90:1, 적어도

약 95:1, 또는 적어도 약 99:1의 온:오프 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 1.5:1 내지 약 99.9:1의 온:오프 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA는 적어도 약 10:1 내지 약 99.9:1의 온:오프 비를 갖는다.

[0137] C. 변형의 조합을 가진 가이드 RNA

[0138] 일 양태에서, 본 기술은 2 이상의 변형의 조합을 갖는 가이드 RNA를 제공한다. 특정 구현예에서, 2개의 변형은 동일한 뉴클레오타이드에서이다(예를 들어, 1개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 및 3'-포스포노아세테이트 모이어티를 포함한다). 다른 구현예에서, 2개의 변형은 2개의 상이한 뉴클레오타이드에서이다(예를 들어, 1개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 기를 갖고 또 다른 것은 3'-포스포노아세테이트 모이어티를 갖는다).

[0139] 특정 구현예에서, 가이드 RNA에서 각각의 변형은 동일하다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA에서 하나 이상의 변형은 가이드 RNA에서 하나 이상의 다른 변형과 상이하다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 변형의 상이한 유형의 조합을 포함하고, 조합에서 하나 이상의 유형은 가이드 RNA에서 여러 곳에 실재한다. 특정 구현예에서, 조합에서 하나 이상의 유형은 가이드 RNA에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 배 나타난다.

[0140] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 하나 이상의 유형은 2 이상의 변형된 뉴클레오타이드에서 나타난다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 하나 이상의 유형은 3 이상의 변형된 뉴클레오타이드에서 나타난다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 미변형된 뉴클레오타이드가 중재할 수 있음에 따라, 변형된 뉴클레오타이드는 서열에서 인접해서 배열되지 않거나, 적어도 전적으로는 아니다. 특정 구현예에서, 변형된 뉴클레오타이드는 인접해서 배열된다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 동일한 유형의 인접 변형된 뉴클레오타이드의 스트레치를 포함한다. 특정 구현예에서, 스트레치는 적어도 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, 또는 40 변형된 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0141] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 변형된 당을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 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, 또는 40 변형된 당을 포함한다. 다른 구현예에서, 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140 변형된 당을 포함한다. 특정 구현예에서, gRNA에서 모든 당은 변형된다.

[0142] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 변형된 백본(즉, 천연 포스포디에스테르 이외의 인터뉴클레오타이드 결합)을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 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, 또는 40 변형된 인터뉴클레오타이드 연결을 포함한다. 다른 구현예에서, 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140 변형된 인터뉴클레오타이드 연결을 포함한다. 특정 구현예에서, gRNA에서 모든 인터뉴클레오타이드 연결은 변형된다.

[0143] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 연속 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 연속 화학적 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 뉴클레오타이드 1 및 2, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 1 내지 6, 1 내지 7, 1 내지 8, 1 내지 9, 1 내지 10, 2 및 3, 2 내지 4, 2 내지 5, 2 내지 6, 2 내지 7, 2 내지 8, 2 내지 9, 또는 2 내지 10에서이다.

[0144] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-O-메틸, 2'-플루오로, 2'-아미노, 2'-데옥시, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 2-티오우라실, 2-아미노아데닌, 5-메틸시토신, 5-아미노알릴우라실, Z 염기, 3'-포스포로티오에이트, 3'-포스포노아세테이트, 3'-포스포노아세테이트 에스테르, 3'-티오포스포노아세테이트, 3'-티오포스포노아세테이트 에스테르, 3'-메틸포스포네이트, 3'-보라노포스포네이트, 3'-포스포로디티오에이트, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-O-메틸, 2'-데옥시, Z 염기, 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-F, 2-티오U, 4-티오U, 2-아미노A, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-아미노알릴U, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 "말단" 변형 예컨대 말단 포스페이트, PEG, 말단 아민, 말단 링커 예컨대 탄화수소 링커, 치환된 탄화수소 링커, 스쿠아레이트 링커, 트리알콜로 링커, 내부 링커 예컨대 2-(4-부틸아미도플루오레신)프로판-1,3-디올 비스(포스포디에스테르) 링커, 염료에 접합된 링커, 비-형광성

표지에 접합된 링커, 태그에 접합된 링커 또는 고정 지지체 예컨대 예를 들어 비드 또는 마이크로어레이에 접합된 링커이다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 2개는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 또는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 2개는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포노카복실레이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 티오포스포노카복실레이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 또는 이들의 조합을 포함한다. 다른 구현예에서, 조합에서 변형은 추가로 2-티오우라실, 2-티오시토신, 4-티오우라실, 6-티오구아닌, 2-아미노아데닌, 2-아미노퓨린, 슈도우라실, 이노신, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-테하이드로우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐우라실, 5-알릴우라실, 5-알릴시토신, 5-아미노알릴-우라실, 5-아미노알릴-시토신, 또는 무염기성 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0145] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-0-메틸-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-0-메틸-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-0-메틸-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-할로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-할로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-할로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 변형의 2개 이상의 또는 3개의 가능한 조합은 도 6 및 도 7 각각에서 표시되고 본 명세서에서 참고로 편입된다.

[0146] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 식 (III) 또는 식 (IV)로 표시되는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다:

[0147] W-Y-Q (III); 또는

[0148] Y-W-X-Q (IV)

[0149] 여기서 Q 및 W는 각각 독립적으로 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 스트레치를 표시하고 Y 및 X는 각각 독립적으로 올리고뉴클레오타이드의 미변형된 부분을 표시한다.

[0150] 특정 구현예에서, W는 가이드 RNA의 5' 부분 이내이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 오(5) 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 가이드 RNA의 5' 부분의 제1 삼(3) 뉴클레오타이드 이내이다. 특정 구현예에서, W는 가이드 RNA의 내부 영역 이내(즉, 5' 말단과 3' 말단 사이)이다. 특정 구현예에서, W는 적어도 부분적으로 뉴클레오타이드 4 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 5 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 10 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 13 내지 20 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 13 및 14 또는 16 내지 19 이내, 대안적으로 가이드 서열의 뉴클레오타이드 13 및 14 또는 16 내지 18 이내이다.

[0151] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 안정성 및 특이성을 향상시킨다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 안정성 및 형질감염 효율을 향상시킨다. 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 변형 없이 가이드 RNA에 비하여 가이드 RNA의 특이성 및 형질감염 효율을 향상시킨다.

[0152] 특정 구현예에서, 조합에서 변형의 적어도 하나는 가이드 RNA의 2차 구조를 변경시킨다. 이러한 변형은 가이드 RNA에서 임의의 RNA/RNA 내부 듀플렉스의 염기-쌍짓기를 변경시킨다. 이들 변형의 일부는 RNA/RNA 구조의 염기 쌍짓기를 증가시키거나 대안적으로 RNA/RNA 듀플렉스의 Tm을 증가시키고, 반면에 다른 변형은 RNA/RNA 듀플렉스 또는 듀플렉스의 염기 쌍짓기(또는 Tm)를 감소시킨다. 그와 같은 변형은 염기 변형된 뉴클레오타이드, 특히 UNA 뉴클레오타이드 예컨대 2-티오우리딘 및 2-아미노아데노신 쌍, Z/P 뉴클레오타이드 쌍, 이소C/이소G 쌍, 6-티오G/5-메틸피리미딘 쌍, 및 이전에 논의된 바와 같이 인터뉴클레오타이드 연결 또는 당에서 변형을 가진 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0153] 특정 구현예에서, 조합은 특이성을 증가시키는(즉, 오프-표적 효과를 감소시키는) 하나 이상의 변형 또는 일련

의 변형과 뉴클레아제 저항(즉, 안정성)을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합은 가이드 RNA에서 일부 염기 짝짓기의 T_m을 상승시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형과 뉴클레아제 저항(즉, 안정성)을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합은 가이드 RNA의 일부 염기 짝짓기의 T_m을 저하시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형과 뉴클레아제 저항(즉, 안정성)을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합은 뉴클레아제 저항(즉, 안정성)을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형, 가이드 RNA에서 일부 염기 짝짓기의 T_m을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형, 및 가이드 RNA에서 다른 곳에 일부 염기 짝짓기의 T_m을 감소시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합은 뉴클레아제 저항(즉, 안정성)을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형 및 가이드 RNA의 Cas 단백질에의 결합을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 조합은 뉴클레아제 저항(즉, 안정성)을 증가시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형 및 가이드 RNA의 Cas 단백질에의 결합을 감소시키는 하나 이상의 변형 또는 일련의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 변형의 상이한 유형의 조합을 포함한다.

[0154] D. 가이드 RNA 구조

[0155] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 CRISPR-관련-단백질과 복합체를 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, CRISPR-관련 단백질은, RNA-가이드된 폴리뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레아제 활성을 갖는, CRISPR-Cas 유형 II 시스템에 의해 제공되거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, CRISPR-관련 단백질은 Cas9, Cas9 돌연변이체, 또는 Cas9 변이체이다. 특정 구현예에서, CRISPR-관련 단백질은 연쇄상구균 파이오제네스로부터 Cas9 뉴클레아제이다. 특정 구현예에서, CRISPR-관련 단백질은 연쇄상구균 써모필루스로부터 Cas9 뉴클레아제이다. 특정 구현예에서, CRISPR-관련 단백질은 스타필로코쿠스 아우레스로부터 Cas9 뉴클레아제이다. 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA 또는 합성 가이드 RNA:CRISPR-관련 단백질 복합체는 변형된 뉴클레오타이드를 갖지 않는 천연 가이드 RNA 또는 복합체의 기능성을 유지시킨다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드 니킹을 포함한다. 특정 구현예에서, 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드 절단을 포함한다. 특정 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 시험관내 핵산 이내이다. 특정 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 생체내 또는 시험관내(예컨대 배양된 세포 또는 유기체로부터 단리된 세포에서) 세포의 게놈 이내이다. 특정 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 DNA내 프로토스페이서이다.

[0156] 특정 구현예에서, crRNA 분절은 25 내지 80 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, crRNA 분절은 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 표적 서열 또는 이의 부분에 상보성이다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 15 내지 30 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, crRNA 분절은 줄기 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 줄기 서열은 10 내지 50 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, crRNA 분절은 5'-돌출부 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 5'-돌출부 서열은 1 내지 10 뉴클레오타이드, 대안적으로 1 내지 5 뉴클레오타이드, 대안적으로 1, 2 또는 3 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, crRNA는 양쪽 (i) 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열 및 (ii) 줄기 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, crRNA는 (i) 5'-돌출부 서열, (ii) 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, 및 (iii) 줄기 서열을 포함한다. crRNA 분절이 줄기 서열을 포함하는 특정 구현예에서, tracrRNA 분절은 crRNA 분절의 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, tracrRNA 분절은 적어도 하나 더 듀플렉스 구조를 포함한다.

[0157] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 단일-가이드 RNA이고, 여기서 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절은 루프 L을 통해 연결된다. 특정 구현예에서, 루프 L은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 루프 L은 GNRA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 N은 A, C, G, 또는 U를 표시하고 R은 A 또는 G를 표시한다. 특정 구현예에서, 루프 L은 GAAA의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 1 초과 루프를 포함한다.

[0158] 가이드 RNA는 5' 부분(즉, 5' 절반) 및 3' 부분(즉, 3' 절반)을 포함한다. 특정 구현예에서, crRNA 분절은 tracrRNA 분절의 5'(즉, 업스트림)이다. 특정 구현예에서, tracrRNA 분절은 crRNA 분절에 비하여 5'이다.

[0159] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 2개 이상의 별개의 RNA 가닥, 예를 들어, crRNA 가닥 및 별개의 tracrRNA 가닥을 포함한다. 참조 예를 들어, 도 2a. 특정 구현예에서, 각각의 가닥은 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가닥이다. 특정 구현예에서, 가닥의 적어도 하나는 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가닥이다. 특정 구현예에서, 가닥은 Cas 단백질, 예컨대 Cas9에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합, 니킹, 또는 절단을 가이드하기 위해

함께 기능한다. 특정 구현예에서, crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 별개의 가닥에 있고 서로에 대해서 2개의 상보성 서열을 통해 하이브리드화하여 줄기 또는 듀플렉스를 형성한다.

[0160] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 crRNA 서열 및 tracrRNA 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA이다. 참고, 예를 들어, 도 2b. 특정 구현예에서, crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 루프 서열 또는 "루프"에 의해 연결된다. 특정 구현예에서, 단일-가이드 RNA는 5' 부분 및 3' 부분을 포함하고, 여기서 crRNA 서열은 tracrRNA 서열의 업스트림이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 tracrRNA 분절 없이 crRNA를 포함한다.

[0161] 특정 구현예에서, 2개 RNA 피스의 총 길이는 약 50 내지 220(예를 들어, 약 55 내지 200, 60 내지 190, 60 내지 180, 60 내지 170, 60 내지 160, 60 내지 150, 60 내지 140, 60 내지 130, 및 60 내지 120) 뉴클레오타이드 길이, 예컨대 약 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 또는 220 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 유사하게, 단일-가이드 RNA(예를 들어, 도 2b)는 약 50 내지 220(예를 들어, 약 55 내지 200, 60 내지 190, 60 내지 180, 60 내지 170, 60 내지 160, 60 내지 150, 60 내지 140, 60 내지 130, 및 60 내지 120) 뉴클레오타이드 길이, 예컨대 약 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 또는 220 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0162] 도 2a 및 2b에서 나타난 바와 같이, 합성 가이드 RNA는 하기를 포함한다: (i) (a) 핵산에서 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열(예를 들어, 분절 G_1-G_n , 여기에서 각각의 G는 가이드 서열에서 뉴클레오타이드를 표시한다), (b) 제2 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 하이브리드화할 수 있는 제1 줄기 서열(예를 들어, 분절 X_1-X_n , 여기에서 각각의 X는 제1 줄기 서열에서 뉴클레오타이드를 표시한다), 및, 임의로 (c) 5'-돌출부 서열(예를 들어, 분절 O_1-O_n , 여기에서 각각의 O는 돌출부 서열에서 뉴클레오타이드를 표시한다)을 포함하는 crRNA 서열, 및 (ii) 제2 줄기 서열을 포함하는 tracrRNA(예를 들어, 분절 Y_1-Y_n , 여기에서 각각의 Y는 제2 줄기 서열에서 뉴클레오타이드를 표시한다). tracrRNA 서열은 분절 T_1-T_n 을 추가로 포함하고, 여기에서 각각의 T는 tracrRNA 서열에서 뉴클레오타이드를 표시한다. 도 2a에서 도시된 합성 가이드 RNA는 하나 이상의 변형을 포함한다. 마찬가지로, 도 2b에서 도시된 합성 가이드 RNA는 하나 이상의 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 변형은 crRNA, tracrRNA, 또는 crRNA 분절, tracrRNA 분절, 및, 임의로, 루프를 포함하는 단일-가이드 RNA의 길이를 따라 임의의 지점에서 위치한다. 특정 구현예에서, 도 2a 및 2b에서 도시된 합성 가이드 RNA에서 O, G, X, Y, 또는 T에 의해 표시되는 임의의 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 도 2b에서 도시된 가이드 RNA는, N이 A, C, G, 또는 U를 표시하고, R이 A 또는 G를 표시하는, 서열 GNRA를 갖는 루프에 의해 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 연결되는 단일-가이드 RNA(sgRNA)를 표시한다.

[0163] 특정 구현예에서, 가이드 RNA의 crRNA 분절은 25 내지 70(예를 들어, 30 내지 60, 35 내지 50, 또는 40 내지 45) 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은 12 내지 30(예를 들어, 16 내지 25, 17 내지 20, 또는 15 내지 18) 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 구현예에서, crRNA의 5' 부분은 하이브리드화하지 않거나 표적 서열로 단지 부분적으로 하이브리드화한다. 예를 들어, crRNA 분절에서 5'-돌출부가 될 수 있다.

[0164] 특정 구현예에서, 단일-가이드 RNA는 crRNA 분절의 줄기 서열, tracrRNA 분절의 줄기 서열, 및, 임의로, crRNA 분절을 tracrRNA 분절에 공유적으로 연결시키는 루프를 포함하는 중심 부분을 포함한다. 특정 구현예에서, 단일-가이드 RNA의 중심 분절은 8 내지 60(예를 들어, 10 내지 55, 10 내지 50, 또는 20 내지 40) 뉴클레오타이드 길이이다.

[0165] 특정 구현예에서, 가이드 RNA의 tracrRNA 분절은 10 내지 130(예를 들어, 10 내지 125, 10 내지 100, 10 내지 75, 10 내지 50, 또는 10 내지 25) 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 구현예에서, tracrRNA 분절은 중심 분절에서 임의의 헤어핀 또는 듀플렉스 구조에 더하여 하나 이상의 헤어핀 또는 듀플렉스 구조를 포함한다.

[0166] E. 가이드 RNA의 합성

[0167] 특정 구현예에서, 단일-가이드 RNA를 포함하는, 가이드 RNA는 합성 유기 화학의 기술 분야를 사용하여 화학적 합성에 의해 생산된다. 비천연 또는 천연이든, 4개의 우세한 리보뉴클레오타이드, 즉 A, C, G, 및 U 이외의 임의의 뉴클레오타이드, 예컨대 슈도우리딘, 이노신 또는 데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 가이드 RNA는 RNA에서 임의의 4개의 우세한 뉴클레오타이드로부터 화학적으로/구조적으로 구별되는 뉴클레오타이드에서 화학적 변형 또는 치환을 갖는다.

[0168] 본 명세서에서 기재된 합성 가이드 RNA는 기술 분야(예컨대 TBDMS 화학, TOM 화학, ACE 화학 등)에서 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 합성 가이드 RNA는 하기에서 기재된 방법에 의해 TC 화

학을 사용하여 합성될 수 있다: Dellinger 등. (2011) J. Am. Chem. Soc. 133, 11540; 미국 특허 8,202,983; 및 미국 특허 출원 2010/0076183A1, 이들의 내용은 그것의 전체가 참고로 편입됨. "TC 화학"은, 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 미변형된 RNA 또는 변형된 RNA를 합성하기 위해, 티오노카바메이트 보호 기에 의해 2'-하이드록실 모이어티에서 보호된 RNA 단일사지 뉴클레오타이드 전구체의 사용 방법 및 조성물을 지칭한다. TC-RNA 화학을 사용하여 (200-mers 이상만큼 긴) 상대적으로 긴 RNA를 화학적으로 합성시키는 능력은 4개의 우세한 리보뉴클레오타이드(A, C, G 및 U)에 의해 가능해진 것을 능가할 수 있는 특별한 피처를 가진 가이드 RNA를 생산할 수 있게 한다. 본 명세서에서 기재된 일부 합성 가이드 RNA는 시험관내 전사 및 세포-기반 발현을 포함하는 기술 분야에서 공지된 방법을 사용하여 또한 제조될 수 있다. 예를 들어, 2'-플루오로 NTPs는 세포-기반 발현에 의해 생산된 합성 가이드 RNA에 편입될 수 있다.

[0169] 가이드 RNA의 합성은 또한, 비제한적으로 시아노겐 브로마이드 화학, R. Kumar 등. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129, 6859-64에 의해 공개된 바와 같이 "클릭" 화학, 또는 "Compositions and methods for conjugating oligonucleotides" 명칭의 WO2013/176844에서 K. Hill에 의해 기재된 바와 같이 스쿠아레이트 접합 화학을 포함하여, 효소에 의해 함께 후속적으로 결합되는, 또는 화학적 결합에 의해 화학적으로 결합되는 RNA 서열의 화학적 또는 효소적 합성에 의해 달성될 수 있다.

[0170] 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA의 제조 방법이 제공된다. 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 계놈에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계; 계놈에서 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 확인하는 단계; 하나 이상의 공유된 뉴클레오타이드 잔기를 확인하는 단계(여기서 상기 공유된 뉴클레오타이드 잔기는 양쪽 표적 폴리뉴클레오타이드 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드에서 존재함); 및 합성 가이드 RNA를 설계하는 단계(여기서 상기 가이드 서열은 특이성-향상 변형을 포함한다). 상기 방법은 설계된 가이드 RNA를 합성하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 오프-표적 폴리뉴클레오타이드는 오프-표적 부위 뿐만 아니라 그것의 중증도를 예측하기 위한 알고리즘 예컨대 <http://www.rgenome.net/Cas-OFFinder>; <https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter>; 또는 <http://crispr.mit.edu>에서 알아낸 것, 또는 Tsai 등. (2015) Nat. Biotechnol. 33, 187-97; Ran 등. (2015) Nature 520, 186-91; Frock 등. (2015) Nat. Biotechnol. 33, 179-86에서 개시된 바와 같이, 실제의 사례에서 오프-표적 부위의 활성화 확인 및 정량화용 다른 기술에 의해 확인된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 서열 사이 하나 이상의 식별 위치를 확인하는 단계(여기서 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 및 상기 오프-표적 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 식별 위치에서 상이한 뉴클레오타이드 잔기를 가짐), 및 표적 폴리뉴클레오타이드에서 하나 이상의 식별 위치에서 뉴클레오타이드를 매칭하는(즉, 상기에 상보적인) 뉴클레오타이드를 합성 가이드 RNA에서 포함하는 단계를 추가로 포함한다.

[0171] 아래에 추가로 기재된 바와 같이, 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 변형된 인터뉴클레오타이드 연결을 포함하는 것을 포함하는, 본 명세서에서 개시된 가이드 RNA는 시험관내 또는 생체내, 예컨대 무세포 검정에서, 온전한 세포에서, 또는 전체의 유기체에서 (비제한적으로 유전자 편집, 유전자 발현 조절, 표적 서열 절단, 및 표적 서열에 결합을 포함하는) 다양한 CRISPR-매개된 기능을 수행하는데 사용될 수 있다. 시험관내 또는 생체내 적용을 위하여, RNA는 기술 분야에서 공지된 임의의 방식으로 세포 또는 전체의 유기체에 전달될 수 있다.

[0172] 라이브러리 및 어레이

[0173] 일 양태에서, 본 발명은 다중 가이드 RNA의 세트 또는 라이브러리를 제공한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 본 명세서에서 개시된 2 이상의 가이드 RNA를 함유한다. 라이브러리는 약 10 내지 약 10^7 개별 구성원, 예를 들어, 약 10 내지 약 10^2 , 약 10^2 내지 약 10^3 , 약 10^3 내지 약 10^5 , 약 10^5 내지 약 10^7 구성원을 함유할 수 있다. 라이브러리의 개별 구성원은 적어도 가이드 서열에서 라이브러리의 다른 구성원, 즉, gRNA의 DNA 표적화 분절과 상이하다. 다른 한편으로, 특정 구현예에서, 라이브러리의 각각의 개별 구성원은 라이브러리의 모든 다른 구성원으로서 tracrRNA 분절에 대하여 동일한 또는 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 이런 식으로, 라이브러리는 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드에서 상이한 서열을 표적하는 구성원을 포함할 수 있다.

[0174] 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^2 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^3 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^4 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^5 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^6 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^7 비반복 가이드 서열을 포함한다.

리는 적어도 10^6 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^7 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^2 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^3 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^4 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^5 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^6 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^7 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적한다.

[0175] 특정 구현예에서, 라이브러리는 라이브러리에서 구성원의 서열을 거쳐 움직이는 점진적으로 이동된 윈도우에서 동일한 서열 및 동일한 변형을 갖는 가이드 RNA의 수집물을 포함한다. 특정 구현예에서, 윈도우는 집합적으로 RNA의 전체 길이를 포함한다.

[0176] 특정 구현예에서, 라이브러리는 고-처리량, 다중-표적 게놈성 조작 및 분석을 수행하게 한다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA의 DNA-표적화 분절만이 다양하였고, 반면에 Cas 단백질-결합 분절은 동일하다. 특정 구현예에서, 라이브러리의 제1 부분은 특정 Cas 단백질을 인식, 결합 및 유도하는 Cas-결합 분절을 갖는 가이드 RNA를 포함하고 라이브러리의 제2 부분은 상이한 Cas 단백질(예를 들어, 상이한 종으로부터 Cas 단백질)을 인식, 결합 및 유도하는 상이한 Cas-결합 분절을 포함하고, 그렇게 함으로써 라이브러리가 2 이상의 직교 Cas 단백질을 갖는 기능을 하게 한다. 특정 구현예에서, 제1 직교 Cas 단백질의 유도된 발현은 제1 직교 Cas 단백질과 상호작용하는 라이브러리의 부분을 이용한다. 특정 구현예에서, 제1 및 제2 직교 Cas 단백질의 유도된 발현은 제1 및 제2 직교 Cas 단백질, 각각과 상호작용하는 라이브러리의 부분을 이용한다. 특정 구현예에서, 제1 및 제2 직교 Cas 단백질의 유도된 발현은 상이한 시간에서 발생한다. 따라서, 라이브러리에서 명시된 바와 같이 다중 표적을 구체적으로 조종 또는 변형시킴으로써 대규모 유전자 편집 또는 유전자 조절을 실시할 수 있다.

[0177] 특정 구현예에서, 라이브러리는 "어레이된" 라이브러리, 즉 어드레스가능 배열에서 피처의 풀 또는 상이한 피처의 수집물이다. 예를 들어, 어레이의 피처는 선택적으로 절단될 수 있고 미세적정 플레이트에 전달될 수 있어서 이로써 플레이트에서 각각의 웰이 공지된 피처 또는 피처의 공지된 풀을 함유한다. 일부 다른 구현예에서, 라이브러리는 48-웰 또는 96-웰 미세적정 플레이트 포맷에서 또는 384-웰 플레이트에서 합성된다.

[0178] 특정 구현예에서, 본 발명의 가이드 RNA의 합성은 화학적 독립체가 결합할 수 있는 표면을 갖는 고형 지지체에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 합성되는 가이드 RNA는, 직접적으로 또는 간접적으로, 동일한 고형 지지체에 부착되고 어레이의 일부를 형성할 수 있다. "어레이"는 공간적으로 정의된 및 물리적으로 어드레스가능 방식으로 고형 지지체상에 각각 배열된 공지된 단량체성 서열의 별개의 분자의 수집물이고, 이로써 각각의 서열의 위치가 공지된다. 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된 "어레이", 또는 "마이크로어레이"는 그 영역과 관련된 특정 화학적 모이어티 또는 모이어티(예컨대 리간드, 예를 들어, 생고분자 예컨대 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 서열(핵산), 폴리펩타이드(예를 들어, 단백질), 탄수화물, 지질 등)를 갖는 어드레스가능 영역의 임의의 1-차원, 2-차원 또는 실질적으로 2-차원(뿐만 아니라 3차원) 배열을 포함한다. 어레이는 (피처가 부수적으로 그 피처의 비-표적을 검출할 수 있어도) 어레이에서 특정 예정된 위치(즉, "어드레스")에 영역(즉, 어레이의 "피처")이 특정 표적 또는 표적들의 부류를 검출할 수 있도록 상이한 모이어티(예를 들어, 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열)의 다중 영역을 갖는 경우 "어드레스가능"이다. 어레이 피처는 전형적으로 개입 공간에 의해 분리되지만, 분리될 필요는 없다. 어레이에서 함유될 수 있는 피처의 수는 크게 기질의 표면적, 피처의 크기 및 피처 사이 간격에 의해 결정될 것이다. 어레이는 최대 몇 수십만 이상 피처/cm², 예컨대 2,500 내지 200,000 피처/cm²의 밀도를 가질 수 있다. 피처는 기질에 공유결합될 수 있거나 아닐 수 있다.

[0179] 적합한 고형 지지체는 여러 가지의 형태 및 조성물을 가질 수 있고 자연 발생 물질, 합성으로 변형된 자연 발생 물질, 또는 합성 물질로부터 유도할 수 있다. 적합한 지지 물질의 예는, 비제한적으로, 실리카, 실리콘 및 산화 규소, 테플론, 유리, 다당류 예컨대 아가로스(예를 들어, Pharmacia제 Sepharose®) 및 텍스트란(예를 들어, Sephadex® 및 Sephacyl®, 또한 Pharmacia제), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알코올, 하이드록시에틸 메타크릴레이트 및 메틸 메타크릴레이트의 코폴리머, 및 기타 동종을 포함한다. 일부 구현예에서, 고형 지지체는 복수의 비드이다.

[0180] 기질 표면에서 합성되기 위한 가이드 RNA의 초기 모노머는 표면 친수성 기, 예를 들어, 실리카 기질에서 존재하

는 표면 하이드록실 모이어티에 차례로 결합되는 링커에 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 보편적인 링커는 사용된다. 일부 다른 구현예에서, 초기 모노머는 표면 하이드록실 모이어티, 표면 아민 또는 다른 반응성 작용기와 직접적으로 반응된다. 대안적으로, 가이드 RNA는 본 발명에 따라 먼저 합성될 수 있고, 기술 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 합성후 고체 기질에 부착될 수 있다. 따라서, 본 발명은 올리고뉴클레오타이드가 어느 한쪽 어레이에서 합성되거나, 합성후 어레이 기질에 부착되는 가이드 RNA의 어레이를 제조하는데 사용될 수 있다. 후속적으로, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA의 풀 또는 복수의 풀은 어레이 기질로부터 임의로 및 선택적으로 절단될 수 있고 라이브러리 또는 라이브러리들로서 사용될 수 있다.

[0181] F. crRNA

[0182] 본 발명은 또한, 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 가이드 RNA에 대하여 기재된 바와 같은 화학적 변형(들)을 포함하는 다양한 crRNA를 제공한다. crRNA는 다중-분절 가이드 RNA, 예컨대 이중 가이드에서 기능할 수 있다. 특정 구현예에서, crRNA는, 예를 들어, Cpf1 시스템에서 tracrRNA 분절 없이 가이드 RNA로서 기능한다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명은 (i) PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드인, 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, 및 (ii) 줄기 서열을 포함하는 합성 crRNA를 제공하고; 여기서 상기 가이드 서열은, N이 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고; 여기서 상기 가이드 서열은 하나 이상의 변형을 포함하고, crRNA는 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 더 높은 특이성 또는 변형 없이 상응하는 crRNA보다 더 높은 gRNA 기능성을 초래한다. 여기에서, crRNA가 가이드 RNA 또는 gRNA:cas 단백질 복합체에서 포함되는 경우, 가이드 RNA 또는 gRNA:cas 단백질이 crRNA가 변형이 부족한 상응하는 가이드 RNA 또는 gRNA:cas 단백질 복합체보다 더 높은 gRNA 기능성 또는 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 더 높은 특이성을 가지면, crRNA는 변형 없이 상응하는 crRNA보다 더 높은 gRNA 기능성 또는 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 더 높은 특이성을 초래한다.

[0183] 관심의 변형은, 뉴클레오타이드 4-N 내지 20-N에서, 또는 가이드 서열의 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 및 16-N으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드에서 비제한적으로 하나 이상의 변형을 포함하여, 본 개시내용내 다른 곳에 기재된다. 특정한 변형(들) 및 표적 폴리뉴클레오타이드의 다양한 구현예는 또한 본 명세서에서 기재된다.

[0184] IV. Cas 단백질

[0185] 상기에서 언급된 바와 같이, 기능적 CRISPR-Cas 시스템은 또한 원하는 활성, 예컨대 표적 결합 또는 표적 니킹/절단을 제공하는 단백질 성분(예를 들어, Cas 뉴클레아제일 수 있는, Cas 단백질)을 요구한다. 특정 구현예에서, 원하는 활성은 표적 결합이다. 특정 구현예에서, 원하는 활성은 표적 니킹 또는 표적 절단이다. 특정 구현예에서, 원하는 활성은 또한, 본 명세서에서 개시된 바와 같이, Cas 단백질에 공유적으로 융합되는 폴리펩타이드에 의해 제공된 기능을 포함한다. 특정 구현예에서, 원하는 활성은 또한, 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 뉴클레아제-결합된 Cas 단백질에 공유적으로 융합되는 폴리펩타이드에 의해 제공된 기능을 포함한다. 그와 같은 원하는 활성의 예는, 아래에 기재된 바와 같이, 전사 조절 활성(어느 한쪽 활성화 또는 억압), 후성유전적 변형 활성, 또는 표적 가시화/확인 활성을 포함한다. Cas 단백질은 시험관내 또는 생체내 시스템에 정제된 또는 비-정제된 (i) Cas 단백질 또는 (ii) Cas 단백질의 발현을 위하여 인코딩된 mRNA 또는 (iii) 단백질의 발현을 위하여 인코딩된 선형 또는 원형 DNA로서 도입될 수 있다. Cas 단백질 제공의 임의의 이들 3 방법은 당해 분야에서 잘 알려지고 Cas 단백질이 본 명세서에서 언급되는 경우 또는 Cas 단백질이 사용되는 경우 상호교환적으로 암시된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 mRNA 또는 DNA로부터 구성적으로 표현된다. 특정 구현예에서, mRNA 또는 DNA로부터 Cas 단백질의 발현은 유도성이거나 유도된다.

[0186] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 화학적으로 합성(참조 예를 들어, Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W.H. Freeman & Co., NY, 1983)되거나, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 추가의 안내를 위하여, 숙련가는 하기를 찾아볼 수 있다: Frederick M. Ausubel 등, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, 2003; 및 Sambrook 등, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

[0187] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 정제된 또는 단리된 형태로 제공된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 약 80%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99% 순도로 제공된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 조성물의 일부로서 제공된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 RNA-가이드된 뉴클레아제 반응용 조성물로서 사용하기에, 또는 상기 조성물로서 포함에 적합한 수성 조성물로 제공된다. 당해 분야의 숙련가는 그와 같은 뉴클레아제 반응 조성물에서 포함될 수 있는 다양한 서브스טר스를 잘 알고 있다.

- [0188] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 재조합성 폴리펩타이드로서 제공된다. 특정 예에서, 재조합성 폴리펩타이드는 융합 단백질로서 제조된다. 예를 들어, 특정 구현예에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 융합 파트너를 인코딩하는 또 다른 핵산, 예를 들어, 글루타티온-S-전달효소(GST), 6x-His 에피토프 태그, 또는 M13 유전자 3 단백질에 연결된다. 적합한 숙주 세포는 융합 단백질을 발현시키는데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 기술 분야에서 공지된 방법에 의해 분리된다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은, 예를 들어, 효소적 소화에 의해 추가로 처리되어, 융합 파트너를 제거 및 Cas 단백질을 수득할 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질:gRNA 복합체는 기술 분야에서 공지된 시험관내 번역-전사 시스템 또는 숙주 세포 시스템을 사용하여 재조합성 기술로 제조될 수 있다. 그와 같은 시스템 및 기술의 세부사항은 아래에 발견될 수 있다: 예를 들어, W0201/4144761 W02014/144592, W02013/176772, US2014/0273226, 및 US2014/0273233, 이들의 내용은 그것의 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨.
- [0189] 야생형 Cas 단백질
- [0190] 특정 구현예에서, Cas 단백질은, RNA-가이드된 폴리뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레아제 활성을 갖는, CRISPR-Cas 유형 I, 유형 II, 또는 유형 III 시스템에서 유래된 단백질을 포함한다. 적합한 Cas 단백질의 비-제한 예는 하기를 포함한다: Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e(또는 CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1(또는 CasA), Cse2(또는 CasB), Cse3(또는 CasE), Cse4(또는 CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 및 Cu1966. 참조 예를 들어, W02014/144761 W02014/144592, W02013/176772, US2014/0273226, 및 US2014/0273233, 이들의 내용은 그것의 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨.
- [0191] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 유형 II CRISPR-Cas 시스템에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은, W02014/144761에서 확인된 것을 포함하여, 박테리아 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 연쇄상구균 sp. 또는 스타필로코쿠스 sp. Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 연쇄상구균 써모필루스 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 연쇄상구균 파이오제네스 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 스타필로코쿠스 아우레스 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 연쇄상구균 써모필루스 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다.
- [0192] 특정 구현예에서, 야생형 Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 특정 구현예에서, 야생형 Cas9 단백질은 S. 파이오제네스(서열 번호: 115)로부터의 Cas9 단백질이다. 특정 구현예에서, 단백질 또는 폴리펩타이드는 서열 번호: 115의 단편을 포함할 수 있거나, 상기로 구성될 수 있거나, 상기로 본질적으로 구성될 수 있다.
- [0193] 보통, Cas 단백질은, 가이드 RNA와 상호작용하는, 하나 이상의 RNA 결합 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 핵산 결합 친화도 및/또는 특이성을 증가시키도록, 효소적 활성을 변경시키도록, 및/또는 단백질의 또 다른 특성을 변화시키도록 변형된다. 예를 들어, Cas 단백질의 뉴클레아제(즉, DNase, RNase) 도메인은 변형, 돌연변이, 결실, 또는 불활성화될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 단백질의 기능에 필수적이지 않은 도메인을 제거하도록 절단될 수 있다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 효과기 도메인의 활성을 최적화하도록 절단 또는 변형된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 살아있는 세포의 핵에 NLS-태깅된 Cas 단백질의 유입을 유효화하는 핵 국재화 서열(NLS)을 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 2 이상의 변형을 포함한다.
- [0194] 돌연변이체 Cas 단백질
- [0195] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 야생형 Cas 단백질(예컨대 Cas9)의 돌연변이체 또는 이의 단편일 수 있다. 다른 구현예에서, Cas 단백질은 돌연변이체 Cas 단백질에서 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas9 단백질의 아미노산 서열은 단백질의 하나 이상의 특성(예를 들어, 뉴클레아제 활성, 결합 친화도, 프로테아제에 대한 안정성 등)으로 변형될 수 있다. 대안적으로, RNA-가이드된 절단에서 관여되지 않은 Cas9 단백질의 도메인은 변형된 Cas9 단백질이 야생형 Cas9 단백질보다 더 작도록 단백질로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, Cas9 코딩 서열의 크기 감소는 야생형 서열을 달리 제공할 수 없는 형질감염 벡터, 예컨대 그 중에서도 AAV 벡터 이내 적합화하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 시스템은, 어느 한쪽 박테리아에서 인코딩된 또는 진핵 세포에서 발현을 위하여 코돈-최적화된 경우, S. 파이오제네스로부터 Cas9 단백질을 이용한다. 야생형 S. 파이오제네스 Cas9 단백질 서열의 아미노산 서열은 아래 보여진다(서열 번호: 115, www.uniprot.org/uniprot/Q99ZW2에서 이용가능).

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAE
 ATRLKRTARRRYTRRNRCYQLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLESFLVEEDKKHERMPIFG
 NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD
 VDKLFTIQLVQTYNQLFEENFINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGN
 LIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDOYADLFLAAKNLSDAI
 LLSIDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
 GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHGELH
 AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEE
 VVDKGASAQSFIERMTNEDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAPL
 SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKLI
 IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
 RLSRKLINGIRDKQSGKTYLDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
 HEHIANLAGSPAIKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENLVIEMARENQTTQKGQKNSRER
 MKRIEPEGIKELGSQLKEHPVENTQLONEKLYLYYLONGRDMYVDQELDINRLSDYDVBH
 IVFQSFELKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL
 TKAERGGLSELDRAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDGRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
 KLVSDPRKDFQFYKVRINNYYHARDAYLNAVVGITALIKKYFKLESEFVYGUYKVYDVVK
 MIAKSEGEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
 ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
 YSVLVVAKVEKQSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLTIKLPK
 YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYELKLGSPEDNQBQQLFVE
 QHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLKVLSAYNKHDKPIREQAENIHLFTLTNLGA
 PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQTSITGLYETRIDLSQLGGG

[0196]

[0197]

Cas9 단백질은 일반적으로 2개 이상의 뉴클레아제(예를 들어, DNase) 도메인을 갖는다. 예를 들어, Cas9 단백질은 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인 및 HNH-유사 뉴클레아제 도메인을 가질 수 있다. RuvC 및 HNH 도메인은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 이중-가닥 절단을 만들기 위해 표적 부위에서 양쪽 가닥을 컷팅하도록 함께 작업한다(Jinek 등, Science 337: 816-21). 특정 구현예에서, 돌연변이체 Cas9 단백질은 단 하나의 기능적 뉴클레아제 도메인(어느 한쪽 RuvC-유사 또는 HNH-유사 뉴클레아제 도메인)을 함유하도록 변형된다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 돌연변이체 Cas9 단백질은 변형되어 이로써 더 이상 기능적이지 않도록(즉, 뉴클레아제 활성이 부재하도록) 뉴클레아제 도메인 중 하나가 결실 또는 돌연변이된다. 뉴클레아제 도메인 중 하나가 불활성인 일부 구현예에서, 돌연변이체는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드(그와 같은 단백질은 "니카제"로 불림)로 도입될 수 있지만 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 절단할 수 없다. 예를 들어, RuvC-유사 도메인에서 아스파르트레이트 대 알라닌(D10A) 전환은 Cas9-유래된 단백질을 니카제로 전환시킨다. 마찬가지로, HNH 도메인에서 히스티딘 대 알라닌(H840A) 전환은 Cas9-유래된 단백질을 니카제로 전환시킨다. 마찬가지로, HNH 도메인에서 아르스파라긴 대 알라닌(N863A) 전환은 Cas9-유래된 단백질을 니카제로 전환시킨다.

[0198]

특정 구현예에서, 양쪽 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인 및 HNH-유사 뉴클레아제 도메인은 변형 또는 제거되어 이로써 돌연변이체 Cas9 단백질이 표적 폴리뉴클레오타이드를 니킹 또는 절단할 수 없다. 특정 구현예에서, Cas9-유래된 단백질의 모든 뉴클레아제 도메인은 변형 또는 제거되어 이로써 Cas9-유래된 단백질은 모든 뉴클레아제 활성이 부족하다. 특정 구현예에서, 야생형 대응물에 비하여 일부 또는 전부 뉴클레아제 활성이 부족한 Cas9 단백질은, 그럼에도 불구하고, 더 큰 또는 더 적은 정도로 표적 인식 활성을 유지시킨다.

[0199]

임의의 상기-기재된 구현예에서, 임의의 또는 모든 뉴클레아제 도메인은 공지된 방법, 예컨대 부위-지향된 돌연변이 유발, PCR-매개된 돌연변이 유발, 및 총 유전자 합성을 사용하여 하나 이상의 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이, 및/또는 치환 돌연변이, 뿐만 아니라 기술 분야에서 공지된 다른 방법에 의해 불활성화될 수 있다.

[0200]

특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 서열 번호: 115에 적어도 50%(예를 들어, 50% 내지 100%의 임의의 수, 포함, 예를 들어, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 및 99%) 동일하다. 특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 RNA 분자(예를 들어, sgRNA)에 결합한다. 특정 구현예에서, "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변이체"는 RNA 분자를 통해 특정 폴리뉴클레오타이드 서열에 표적화된다.

[0201]

융합 단백질

[0202]

특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질에 이중성인 폴리펩타이드 또는 또 다른 단백질에 융합되어 융합 단백질을 창출한다. 특정 구현예에서, 이중성 서열은 하나 이상의 효소기 도메인, 예컨대 절단 도메인, 전사 활성화 도메인, 전사 억제인자 도메인, 또는 후성유전적 변형 도메인을 포함한다. 효소기 도메인의 추가의 예는 핵 국제화 신호, 세포-투과 또는 전좌 도메인, 또는 마커 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 효소기 도메인은

융합 단백질의 N-말단, C-말단, 또는 내부 위치에서 위치한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질의 Cas 단백질은 Cas9 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, 융합 단백질의 Cas 단백질은 모든 뉴클레아제 도메인이 불활성화된 또는 결실된 변형된 또는 돌연변이된 Cas 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, 융합 단백질의 Cas 단백질은 뉴클레아제 활성이 부족한 변형된 또는 돌연변이된 Cas 단백질이거나 상기에서 유래된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질의 RuvC 및/또는 HNH 도메인은 변형 또는 돌연변이되어 이로써 이들이 더 이상 뉴클레아제 활성을 갖지 않는다.

[0203] 절단 도메인

[0204] 특정 구현예에서, 융합 단백질의 효과기 도메인은 절단 도메인이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "절단 도메인"은 DNA를 절단시키는 도메인을 지칭한다. 절단 도메인은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 취득될 수 있다. 절단 도메인이 유래될 수 있는 엔도뉴클레아제의 비-제한 예는 제한 엔도뉴클레아제 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함한다. 참조, 예를 들어, New England Biolabs Catalog or Belfort 등. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3379-88. DNA를 절단시키는 추가의 효소는 공지된다(예를 들어, 51 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제; 췌장 DNase I; 미구균 뉴클레아제; 효모 HO 엔도뉴클레아제). 참조 또한 Linn 등. (eds.) "Nucleases", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 하나 이상의 이들 효소(또는 이의 기능적 단편)는 절단 도메인의 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0205] 특정 구현예에서, 절단 도메인은 유형 II-S 엔도뉴클레아제에서 유래될 수 있다. 유형 II-S 엔도뉴클레아제는 구체적으로 엔도뉴클레아제의 DNA 인식 부위에서 전형적으로 몇 개의 염기 쌍 떨어져 있는 부위에서 DNA를 절단시키고, 이와 같이, 분리가능한 인식 및 절단 도메인을 갖는다. 이들 효소는 일반적으로 엇갈린 위치에서 DNA의 각각의 가닥을 절단하기 위해 이량체를 형성하도록 일시적으로 회합하는 모노머이다. 적합한 유형 II-S 엔도뉴클레아제의 비-제한 예는 BfiI, BpmI, BsaI, BsgI, BsmBI, BsmI, BspMI, FokI, MboI, 및 SapI를 포함한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질의 절단 도메인은 FokI 절단 도메인 또는 이의 단편 또는 유도체이다. 참조 Miller 등. (2007) Nat. Biotechnol. 25, 778-85; Szczpek 등. (2007) Nat. Biotechnol. 25, 786-93; Doyon 등. (2011) Nat. Methods, 8, 74-81.

[0206] 전사 활성화 도메인

[0207] 특정 구현예에서, 융합 단백질의 효과기 도메인은 전사 활성화 도메인이다. 보통, 전사 활성화 도메인은 유전자의 전사를 증가 및/또는 활성화시키기 위해 전사 조절 요소 및/또는 전사 조절 단백질(즉, 전사 인자, RNA 폴리머라제 등)과 상호작용한다. 특정 구현예에서, 전사 활성화 도메인은 단순 포진 바이러스 VP 16 활성화 도메인, (VP16의 사량체 유도체인) VP64, NF κ B p65 활성화 도메인, p53 활성화 도메인 1 및 2, CREB(cAMP 반응 인자 결합 단백질) 활성화 도메인, E2A 활성화 도메인, 또는 NFAT(활성화된 T-세포의 핵 인자) 활성화 도메인이다. 특정 구현예에서, 전사 활성화 도메인은 Gal4, Gcn4, MLL, Rtg3, Gln3, Oaf1, Pip2, Pdr1, Pdr3, Pho4, 또는 Leu3이다. 전사 활성화 도메인은 야생형일 수 있거나, 최초 전사 활성화 도메인의 변형된 또는 절단된 버전일 수 있다.

[0208] 전사 억제인자 도메인

[0209] 특정 구현예에서, 융합 단백질의 효과기 도메인은 전사 억제인자 도메인이다. 보통, 전사 억제인자 도메인은 전사 조절 요소 및/또는 전사 조절 단백질(즉, 전사 인자, RNA 폴리머라제 등)과 상호작용하여 유전자의 전사를 감소 및/또는 억제시킨다. 특정 구현예에서, 전사 억제인자 도메인은 유도성 cAMP 초기 억제인자(ICER) 도메인, Kruppel-관련 박스 A(KRAB-A) 억제인자 도메인, YY1 글리신 풍부 억제인자 도메인, Sp1-유사 억제인자, E(sp1) 억제인자, I κ B 억제인자, 또는 MeCP2이다.

[0210] 후성유전적 변형 도메인

[0211] 특정 구현예에서, 융합 단백질의 효과기 도메인은 후성유전적 변형 도메인이다. 보통, 후성유전적 변형 도메인은 히스톤 구조 및/또는 염색체 구조를 변형시킴으로써 유전자 발현을 변경시킨다. 특정 구현예에서, 후성유전적 변형 도메인은 히스톤 아세틸전달효소 도메인, 히스톤 탈아세틸화효소 도메인, 히스톤 메틸전달효소 도메인, 히스톤 탈메틸효소 도메인, DNA 메틸전달효소 도메인, 또는 DNA 탈메틸효소 도메인이다.

[0212] 추가의 도메인

[0213] 특정 구현예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 추가의 도메인을 추가로 포함한다. 적합한 추가의 도메인의 비-제한 예는 핵 국재화 신호(NLSs), 세포-투과 또는 전좌 도메인, 및 마커 도메인을 포함한다. NLS는 일반적으로 염

기성 아미노산의 스트레치를 포함한다. 참조, 예를 들어, Lange 등. (2007) J. Biol. Chem. 282, 5101-5. 예를 들어, 특정 구현예에서, NLS는 단일분절 서열, 예컨대 PKKKRKV(서열 번호: 116) 또는 PKKKRRV(서열 번호: 117)이다. 특정 구현예에서, NLS는 이분절 서열이다. 특정 구현예에서, NLS는 KRPAATKKAGQAKKKK(서열 번호: 118)이다.

[0214] 특정 구현예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 세포-투과 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포-투과 도메인은 HIV-1 TAT 단백질에서 유래된 세포-투과 펩타이드 서열이다. 예로서, TAT 세포-투과 서열은 GRKKRRQRRRPQPKKKRKV(서열 번호: 119)일 수 있다. 특정 구현예에서, 세포-투과 도메인은 TLM(PLSSIFSRIGDPPKKKKRKV; 서열 번호: 120), 인간 B형 간염 바이러스에서 유래된 세포-투과 펩타이드 서열이다. 특정 구현예에서, 세포-투과 도메인은 MPG(GALFLGLWGAAGSTMGAPKKKKRKV; 서열 번호: 121 또는 GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKKKKRKV; 서열 번호: 122)이다. 특정 구현예에서, 세포-투과 도메인은 Pep-1(KETWWETWWTEWSQPKKKKRKV; 서열 번호: 123), VP22, 단순 포진 바이러스로부터 세포 투과 펩타이드, 또는 폴리 아르기닌 펩타이드 서열이다.

[0215] 특정 구현예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 마커 도메인을 포함한다. 마커 도메인의 비-제한 예는 형광성 단백질, 정제 태그, 및 에피토프 태그를 포함한다. 특정 구현예에서, 마커 도메인은 형광성 단백질이다. 적합한 형광성 단백질의 비-제한 예는 하기를 포함한다: 녹색 형광성 단백질(예를 들어, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광성 단백질(예를 들어 YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광성 단백질(예를 들어 EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-Sapphire), 시안 형광성 단백질(예를 들어 ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), 적색 형광성 단백질(mKate, mKate2, mPlum, DsRed 모노머, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), 오렌지 형광성 단백질(mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) 및 임의의 다른 적합한 형광성 단백질. 특정 구현예에서, 마커 도메인은 정제 태그 및/또는 에피토프 태그이다. 예시적 태그는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 글루타티온-S-전달효소(GST), 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질, 티오레독신(TRX), 폴리(NANP), 탠덤 친화성 정제(TAP) 태그, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 바이오틴 카복실 담체 단백질(BCCP), 및 칼모둘린.

[0216] V. 용도 및 방법

[0217] 일 양태에서, 본 발명은 Cas 단백질로 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에서 기재된 가이드 RNA 또는 일련의 가이드 RNA 분자, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 이중-가닥 절단을 초래한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 단일-가닥 절단을 초래한다. 특정 구현예에서, 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는 복합체는 서열-표적화된 단일-가닥 DNA 절단, 즉, 니킹에 사용된다.

[0218] 일 양태에서, 본 발명은 Cas 단백질로 2 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에서 기재된 일련의 가이드 RNA 분자, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 이중-가닥 절단을 초래한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 단일-가닥 절단을 초래한다. 특정 구현예에서, 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는 복합체는 서열-표적화된 단일-가닥 DNA 절단, 즉, 니킹에 사용된다.

[0219] 일 양태에서, 본 발명은 Cas 단백질로 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에서 기재된 가이드 RNA 또는 일련의 가이드 RNA 분자 및 (ii) Cas 단백질을 접촉시켜, Cas 단백질로 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합을 초래하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 변이체이다. 특정 구현예에서, Cas 변이체는 대응물 야생형 Cas 단백질에 비하여 일부 또는 전부 뉴클레아제 활성이 부족하다.

[0220] 일 양태에서, 본 발명은 Cas 단백질로 2 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에서 기재된 일련의 RNA 분자 및 (ii) Cas 단백질을 접촉시켜, Cas 단백질로 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합을 초래하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 변이체이다. 특정 구현예에서, Cas 변이체는 대응물 야생형 Cas 단백질에 비하여 일부 또는 전부 뉴클레아제 활성이

부족하다.

[0221] 일 양태에서, 본 발명은 표적 폴리뉴클레오타이드에 Cas 단백질의 표적화 방법을 제공한다. 상기 방법은 Cas 단백질을 본 명세서에서 기재된 가이드 RNA 또는 일련의 가이드 RNA 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 가이드 RNA:Cas 단백질 복합체의 형성을 초래한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 야생형 Cas9 단백질이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질의 돌연변이체 또는 변이체이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 뉴클레아제 활성이 부족한 Cas 단백질(예를 들어, Cas 단백질의 뉴클레아제-결핍된 돌연변이체)이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 융합 단백질(예를 들어, (i) Cas 단백질 및 (ii) 이중성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질)의 일부이다.

[0222] 일 양태에서, 본 발명은 2 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드에 Cas 단백질의 표적화 방법을 제공한다. 상기 방법은 Cas 단백질을 본 명세서에서 기재된 일련의 가이드 RNA 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 가이드 RNA:Cas 단백질 복합체의 형성을 초래한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 야생형 Cas9 단백질이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질의 돌연변이체 또는 변이체이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 단일-가닥 니킹 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 뉴클레아제 활성이 부족한 Cas 단백질(예를 들어, Cas 단백질의 뉴클레아제-결핍된 돌연변이체)이다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 융합 단백질(예를 들어, (i) Cas 단백질 또는 및 (ii) 이중성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질)의 일부이다.

[0223] 일 양태에서, 본 발명은 합성 가이드 RNA의 선택 방법을 제공한다. 상기 방법은 가이드 서열에서 위치 또는 위치들이 MP 변형의 위치로 인해 특이성을 향상시키는 것을 확인하기 위해 gRNA의 가이드 서열 부분을 거쳐 MP 변형 "위킹"을 포함한다. 특이성 향상의 규모는 온-표적 대 오프-표적 절단 비, 표적 부위에서 절단 백분율 및 하나 이상의 오프-표적 부위에서 절단 백분율, 및/또는 특이성 스코어로 시험된 각각의 위치에 대하여 평가될 수 있고, 따라서 변형된 위치 또는 위치들이 gRNA의 특이성을 그리고 어느 정도까지 변경시키는지 결정한다. 가이드 서열을 거쳐 단일 MP의 증분적 위킹은 또한 시험된 위치 중에서 화학적 변형의 하나 이상의 조합에서 비롯하는 특이성에서 잠재적인 상승작용 향상용 위치를 확인할 수 있다.

[0224] 구현예에서, 본 방법은 하기 단계를 포함한다: 양쪽이 (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및 (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절의 동일한 서열을 포함하는, 적어도 제1 합성 가이드 RNA 및 제2 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계(여기서 제1 합성 가이드 RNA는 가이드 서열의 제1 위치에서 MP 변형을 포함하고, 제2 합성 가이드 RNA는 가이드 서열의 제2 위치에서 MP 변형을 포함함); Cas 단백질 및 제1 합성 가이드 RNA를 포함하는 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하고, 표적 폴리뉴클레오타이드를 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키고, 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계; Cas 단백질 및 제2 합성 가이드 RNA를 포함하는 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하고, 표적 폴리뉴클레오타이드를 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키고, 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계; 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합에서 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체 및 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체의 특이성을 결정하는 단계; 가이드 RNA의 어느 것이 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 더 큰 특이성을 갖는지를 확인하는 단계. 특정 구현예에서, 제1 및 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체는 경쟁적 검정에서, 예컨대 상이한 형광단으로 제1 및 제2 gRNA의 표지화에 의해 함께 시험된다. 특정 구현예에서, 제1 및 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체는 병렬적으로 또는 순차적으로 분석된 동등한 또는 분할된 샘플에서 개별적으로 시험된다.

[0225] 일 양태에서, 본 발명은 가이드 RNA, 예컨대 특이성-향상 변형을 포함하는 가이드 RNA 사용에 의해 수행된 CRISPR 기능의 특이성의 분석 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 샘플에서 표적 서열 및 하나 이상의 오프-표적 서열을 확인하는 단계(여기서 상기 표적 서열은 표적 폴리뉴클레오타이드에서 포함되고 상기 오프-표적 서열은 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드에서 포함됨), 가이드 RNA를 사용하여 CRISPR 기능을 수행하는 단계, 표적 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 하이브리드화하도록 설계되는 올리고뉴클레오타이드 미끼의 라이브러리 사용에 의해 표적 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 단계, 포획된 폴리뉴클레오타이드를 분리 및 분석하여 표적 및 오프-표적 서열이 CRISPR 기능으로 인해 변화되었는지 여부를 평가하는 단계. 표적 및 비-표적 서열 사이 변화의 상대 정도는 가이드 RNA에 의해 매개된 CRISPR 기능의 특이성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 포획된 폴리뉴클레오타이드는 서열분석에 의해 분석된다.

[0226] 폴리뉴클레오타이드 미끼는 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하도록 설계된 미끼 그리고 오프-표적 폴리

뉴클레오타이드에 하이브리드화하도록 설계된 미끼를 포함한다. 미끼가 표적(또는 오프-표적) 서열에 직접적으로 하이브리드화할 수 있다는 것, 또는 이들이 표적(또는 비-표적) 서열 근처 서열, 예컨대 표적(또는 오프-표적) 서열의 어느 한쪽 5' 또는 3', 또는 양쪽에서, 표적(또는 오프-표적) 서열의 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 또는 20 염기 쌍 이내 서열에 하이브리드화할 수 있다는 것이 고려된다. 일부 미끼는 부분적으로 표적(또는 오프-표적) 서열에 그리고 부분적으로 표적(또는 오프-표적) 서열의 외부에 하이브리드화할 수 있다. 일부 구현예에서, 미끼의 라이브러리는 양쪽 표적(또는 오프-표적) 서열에 하이브리드화하는 미끼 그리고 표적(또는 오프-표적) 서열 근처에서 하이브리드화하는 미끼를 포함한다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 표적(또는 오프-표적) 서열 근처 하이브리드화하는 미끼 뿐만 아니라, 표적(또는 오프-표적) 서열에 하이브리드화하는 미끼를 포함하거나, 그 반대의 경우도 있다. 일부 구현예에서, 미끼는 표적 서열 주위 중심에 있는 약 1000 bp의 영역, 뿐만 아니라 각각의 오프-표적 서열 주위 중심에 있는 약 1000 bp의 영역에 하이브리드화한다. 일부 구현예에서, 미끼는 바둑판식이다.

[0227] 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형은 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2' 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 2' 변형은 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 제1 및 제2 합성 가이드 RNA는 가이드 서열 부분에서 상이한 뉴클레오타이드 위치에 특이성-향상 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성은 온 표적 절단 활성, 오프 표적 절단 활성, 온:오프 비, 특이성 스코어, 또는 이들의 조합에 기반하여 결정된다. 특정 구현예에서, 본 방법은 하기 단계를 포함한다: 가이드 서열 부분에서 상이한 뉴클레오타이드 위치에 특이성-향상 변형을 포함하는 제1 내지 제20 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계, 각각의 합성 가이드 RNA를 사용하여 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계, 표적 폴리뉴클레오타이드를 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계, 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합하고 각각의 합성 가이드 RNA의 특이성을 측정하는 단계, 및 가장 큰 특이성 향상을 제공하는 하나 이상의 변형된 위치를 확인하는 단계. 특정 구현예에서, gRNA는 추가로 안정성-향상 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 안정성 향상 말단 변형은 gRNA의 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트(FP), 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트(FSP), 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트(FS), 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0228] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 형질감염에 의해 세포에 도입된다. RNA 형질감염용 기술은 당해 기술에 공지되어 있고 전기천공 및 리포펙션을 포함한다. RNA 형질감염용 효과적인 기술은 대부분 세포 유형에 좌우된다. 참조, 예를 들어, 상업적으로 수득된, 변형된 miRNA 또는 전구체 miRNA의 형질감염을 위하여 Oligofectamine(Invitrogen)을 사용하고 HTC-116 결장암 세포의 형질감염을 기재하는, Lujambio 등. (Spanish National Cancer Centre) Cancer Res. Feb. 2007, 참조 또한, 전사된 sgRNA(약 60 nt 길이)의 형질감염을 위하여 4D Nucleofection™(Lonza) 전기천공을 사용하고 K562 세포의 형질감염을 기재하는, Cho 등. (Seoul National Univ.) Nat. Biotechnol. Mar. 2013. RNA의 형질감염용 기술은 기술 분야에서 또한 공지된다. 예를 들어, 치료적 RNA는 (β -1 인테그린 단백질을 발현시키는 세포에 흡수를 용이하게 하기 위해) Invasin 단백질로 코팅된 비-병원성 E. 콜리에서 그리고 리스테리오리신 O 기공-형성 단백질을 발현시키기 위해 인코딩된 E. 콜리로 전달되어 shRNA가 E. 콜리로부터 세포질에 통과하게 한다. 참조 또한 Cho 등. (Seoul National Univ.) Nat. Biotechnol. Mar. 2013.

[0229] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 세포에 도입 또는 전달된다. 가이드 RNA의 전달에 사용될 수 있는 기술은 생분해성 폴리머, 리포솜, 또는 나노입자에 의해 캡슐화를 이용하는 것을 포함한다. 그와 같은 폴리머, 리포솜, 및 나노입자는 정맥내로 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 생체내 전달을 위하여, 가이드 RNA는 조직 부위에 주사될 수 있거나 전신으로 투여될 수 있다. 생체내 전달은 또한 베타-글루칸 전달 시스템, 예컨대 참고로 그 전체가 이로써 편입되는, 미국 특허 5,032,401 및 5,607,677, 및 미국 공개 2005/0281781에 기재된 것에 의해 영향받을 수 있다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 함유하는 전달 비히클은 특정 조직 또는 바디 구획에 표적화된다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 다른 조직에 대한 표적 외인성 RNA에, 합성 캐리어는 수용체 흡수용 세포-특이적 리간드 또는 애타머, 예를 들어, 종양 세포에서 고도로 발현되는 트랜스페린 수용체를 통해 흡수용 인간 트랜스페린 단백질로 작용화된 그리고 PEG로 코팅된 사이클로덱스트린 나노입자에서 케이스에 넣은 RNA로 장식된다. 추가 접근법은 아래 본 명세서에서 기재되거나 기술 분야에서 공지된다.

- [0230] 본 발명은 (본원에서 그 전체가 편입되는) Hendel 등. (2015) Nat. Biotechnol. 33:9, 985-9에서 기재된 바와 같이 인간 세포에서 시험되었다. 인용된 작업에서, 변형된 가이드 RNA는 K562 세포, 인간 1차 T 세포, 및 CD34+ 조혈 줄기 및 선조 세포(HSPC)에 도입되었다. 변형된 가이드 RNA는, 미변형된 가이드 RNA에 비교된 경우 인간 1차 T 세포 및 CD34+ HSPC를 포함하여, 인간 세포에서 게놈 편집 효율성을 상당히 향상시켰다.
- [0231] 다른 용도의 예는 아래 기재된 바와 같이 게놈성 편집 및 유전자 발현 조절을 포함한다.
- [0232] 게놈성 편집
- [0233] 일 양태에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내 DNA 서열을 변형시키기 위한 게놈성 편집 방법을 제공한다("시험관내"는, 제한된 없이, 무세포 시스템, 세포 용해물, 세포의 분리된 성분, 및 살아있는 유기체의 외부에서 세포를 포함한다). DNA 서열은 염색체 서열, 에피솜 서열, 플라스미드, 미토콘드리아 DNA 서열, 또는 기능적 유전자간 서열, 예컨대 항상제 서열 또는 비-코딩 RNA용 DNA 서열을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DNA 서열을 (i) 본 명세서에서 기재된 가이드 RNA 또는 일련의 가이드 RNA 분자, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, DNA 서열은 세포의 외부에서 접촉된다. 특정 구현예에서, DNA 서열은 세포 이내 게놈에서 위치하고 시험관내 또는 생체내 접촉된다. 특정 구현예에서, 세포는 유기체 또는 조직 이내이다. 특정 구현예에서, 세포는 인간 세포, 비-인간 포유동물 세포, 줄기 세포, 비-포유동물 척추동물 세포, 무척추동물 세포, 식물 세포, 단일 세포 유기체, 또는 배아이다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 DNA 서열에서 표적화된 부위에 Cas 단백질 표적화를 돕는다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 표적화된 부위에 DNA 서열의 하나 이상의 가닥을 절단시킨다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 표적화된 부위에 DNA 서열의 양쪽 가닥을 절단시킨다.
- [0234] 특정 구현예에서, 본 방법은 Cas 단백질을 세포 또는 또 다른 시스템에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 정제된 또는 비-정제된 단백질로서 도입된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 통해 도입된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 선형 또는 원형 DNA를 통해 도입된다. 특정 구현예에서, 세포 또는 시스템은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0235] 특정 구현예에서, 이중-가닥 절단은 오류유발, 비상동성 말단-연결("NHEJ") 복구 공정을 통해 복구될 수 있다. 특정 구현예에서, 이중-가닥 절단은 상동 지정 복구(HDR) 공정에 의해 복구될 수 있어서 이로써 공여체 폴리뉴클레오타이드에서 공여체 서열이 표적화된 DNA 서열에 통합될 수 있거나 상기와 교환될 수 있다.
- [0236] 특정 구현예에서, 본 방법은 하나 이상의 공여체 폴리뉴클레오타이드를 세포 또는 시스템에 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 DNA 서열에서 표적화된 부위의 어느 한쪽에서 서열과 실질적 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 상동성 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 상동 지정 복구, 예컨대 상동성 재조합을 통해 DNA 서열에 통합될 수 있거나 상기와 교환될 수 있다.
- [0237] 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 업스트림 상동성 서열 및 다운스트림 상동성 서열을 포함하고, 이들의 각각은, DNA 서열에서 표적화된 부위의, 업스트림 및 다운스트림, 각각 위치한 서열에 실질적 서열 동일성을 갖는다. 이들 서열 유사성은, 예를 들어, 공여체 폴리뉴클레오타이드와 표적화된 DNA 서열 사이 상동성 재조합을 허용하여 이로써 공여체 서열이 표적화된 DNA 서열에 통합될 수 있다(또는 상기와 교환될 수 있다).
- [0238] 특정 구현예에서, DNA 서열에서 표적 부위(들)는 돌연변이, 예를 들어, 점 돌연변이, 장애를 야기시킬 수 있거나 상기와 관련될 수 있는 역전 또는 전좌에 미치거나 상기에 인접한다. 특정 구현예에서, 본 방법은 (i) 돌연변이의 야생형 대응물 및 (ii) DNA 서열에서 표적화된 부위의 한쪽에 서열과 실질적 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 상동성 서열을 포함하는 하나 이상의 공여체 폴리뉴클레오타이드를 세포 또는 시스템에 도입시킴으로써 돌연변이를 보정하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 DNA 서열에서 표적화된 부위의 양쪽에 서열과 실질적 서열 동일성을 갖는 상동성 서열을 포함한다.
- [0239] 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 상동 지정 복구 공정, 예컨대 상동성 재조합을 통해 표적화된 DNA 서열에 통합될 수 있거나 상기와 교환될 수 있는 외인성 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 외인성 서열은, 임의로, 외인성 프로모터 제어 서열에 작동가능하게 연결되는, 단백질 코딩 유전자를 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 외인성 서열의 통합시, 세포는 통합된 유전자에 의해 인코딩된 단백질을 발현시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 외인성 서열은 표적화된 DNA 서열에 통합되어 이로써 수령체 세포 또는 시스템에서 그것의 발현이 외인성 프로모터 제어 서열에 의해 조절된다. 표적화된 DNA 서열에 외인성 유전자의 통합은 "녹인"으로 불린다. 다른 구현예에서, 외인성 서열은 전사 제어 서열, 또 다른 발현 제어 서열, RNA 코딩 서열, 및

기타 동종일 수 있다.

[0240] 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 표적화된 부위에서 또는 근처에서 DNA 서열의 한 부분에 본질적으로 동일한 서열을 포함하지만, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화를 포함한다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 공여체 서열은 표적화된 부위에서 또는 근처에서 DNA 서열의 변형된 또는 돌연변이된 버전을 포함하여 이로써, 표적화된 부위와 통합 또는 교환시, 표적화된 부위에서 수득한 서열이 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 또는 이들의 조합이다. 변형된 서열의 통합의 결과로서, 세포는 표적화된 DNA 서열로부터 변형된 유전자 생성물을 생산할 수 있다.

[0241] 특정 구현예에서, 본 방법은 다중 적용용이다. 특정 구현예에서, 본 방법은 가이드 RNA의 라이브러리를 세포 또는 시스템에 도입하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 100 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 1,000 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10,000 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 100,000 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 1,000,000 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 10 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 10 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 100 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 100 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 1,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 1,000 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 10,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 10,000 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 100,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 100,000 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 1,000,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 1,000,000 상이한 서열을 표적한다.

[0242] 인간 및 포유동물 세포에서 게놈성 편집

[0243] 본 발명의 구현예는 포유동물 세포에서 표적 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 DNA 서열을 변형시키기 위해 게놈성 편집 방법에서 유용하다.

[0244] 특정 구현예에서, DNA 서열은 염색체 서열이다. 특정 구현예에서, DNA 서열은 단백질-코딩 서열이다. 특정 구현예에서, DNA 서열은 기능적 유전자간 서열, 예컨대 향상제 서열 또는 비-코딩 서열이다. 특정 구현예에서, DNA는 인간 유전자의 일부이다. 일부 그와 같은 구현예에서, 인간 유전자는 클라트린 경쇄(CLT1) 유전자, 인간 인터류킨 2 수용체 감마(IL2RG) 유전자, 인간 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CLT4) 유전자, 인간 혈관 내피 성장 인자 A 유전자(VEGFA), 또는 겸상 적혈구 빈혈 및 지중해빈혈을 책임지는 돌연변이를 가질 수 있는 인간 헤모글로빈 베타(HBB) 유전자이다. 따라서, 특정 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 HBB 폴리뉴클레오타이드, VEGFA 폴리뉴클레오타이드, IL2RG 폴리뉴클레오타이드, CLTAI 폴리뉴클레오타이드, 또는 CLTA4 폴리뉴클레오타이드이다.

[0245] 특정 구현예에서, 합성 가이드 RNA는 HBB, IL2RG, CLTA1, VEGFA, 또는 CLTA4 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은, N이 -10 내지 0의 정수인, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N으로 구성되고, 가이드 서열은 뉴클레오타이드 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 또는 16-N에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열은 뉴클레오타이드 11-N에서 화학적 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열은 뉴클레오타이드 5-N에서 화학적 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열은 뉴클레오타이드 7-N에서 화학적 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열은 뉴클레오타이드 10-N에서 화학적 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열은 뉴클레오타이드 9-N에서 화학적 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열은 뉴클레오타이드 4-N에서 화학적 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, N은 0과 같다.

[0246] 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 19, 및 뉴클레

오타이드 3, 4, 6, 8, 9, 또는 10의 하나에 하나 이상의 화학적 변형으로 구성된다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 18, 및 뉴클레오타이드 2, 3, 5, 7, 8, 또는 9의 하나에 하나 이상의 화학적 변형으로 구성된다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 17, 및 뉴클레오타이드 1, 2, 4, 6, 7, 또는 8의 하나에 하나 이상의 화학적 변형으로 구성된다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 16, 및 뉴클레오타이드 1, 3, 5, 6, 또는 7의 하나에 하나 이상의 화학적 변형으로 구성된다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 15, 및 뉴클레오타이드 2, 4, 5, 또는 6의 하나에 하나 이상의 화학적 변형으로 구성된다. 특정 구현예에서, 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 14, 및 뉴클레오타이드 1, 3, 4, 또는 5의 하나에 하나 이상의 화학적 변형으로 구성된다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적 변형은 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 2'-변형은 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택된다.

- [0247] 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 그와 같은 구현예에서, 인간 세포는 1차 인간 세포이다. 추가 구현예에서, 1차 인간 세포는 인간 1차 T 세포이다. 인간 1차 T 세포는 자극될 수 있거나 미자극될 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 세포는 줄기/선조 세포, 예컨대 CD34+ 조혈 줄기 및 선조 세포(HSPC)이다. 특정 구현예에서, 인간 세포는 배양된 세포주 출신이고, 예를 들어 예컨대 상업적으로 수득될 수 있다. 예시적 세포주는 K562 세포, 인간 골수성 백혈병 라인을 포함한다.
- [0248] 특정 구현예에서, 세포는 살아있는 유기체 이내이다. 특정 다른 구현예에서, 세포는 살아있는 유기체의 외부이다.
- [0249] 본 방법은 DNA 서열을 (i) 본 명세서에서 기재된 가이드 RNA 또는 일련의 가이드 RNA 분자, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0250] 특정 구현예에서, 본 방법은 세포에 가이드 RNA를 도입 또는 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 가이드 RNA는 형질감염에 의해 세포에 도입된다. RNA 형질감염용 기술은 당해 기술에 공지되어 있고 전기천공 및 리포펙션을 포함한다. 다른 구현예에서, 가이드 RNA는 뉴클레오펙션에 의해 세포(및, 더 상세하게는, 세포 핵)에 도입된다. 뉴클레오펙션용 기술은 당해 기술에 공지되어 있고 뉴클레오펙션 디바이스 예컨대 Lonza Nucleofector 2b 또는 Lonza 4D-Nucleofector 및 관련된 시약을 이용할 수 있다.
- [0251] 특정 구현예에서, 본 방법은 세포에 Cas 단백질을 도입 또는 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, Cas 단백질은 정제된 또는 비-정제된 단백질로서 도입된다. 다른 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 통해 도입된다. 일부 그와 같은 구현예에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 형질감염에 의해 세포에 도입된다. 다른 구현예에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 뉴클레오펙션에 의해 세포(및, 더 상세하게는, 세포 핵)에 도입된다.
- [0252] 특정 구현예에서, 본 방법은 Cas 단백질이 가이드 RNA를 가진 복합체에서 세포에 도입되도록 리보핵단백질(RNP)-기반 전달을 이용한다. 예를 들어, Cas9 단백질은, gRNA 및 Cas 단백질의 공-전달을 허용하는, Cas9:gRNA 복합체에서 가이드 RNA와 복합체화될 수 있다. 예를 들어, Cas:gRNA 복합체는 세포에 뉴클레오펙션될 수 있다.
- [0253] 특정 구현예에서, 본 방법은 전체-RNA 전달 플랫폼을 이용한다. 예를 들어, 일부 그와 같은 구현예에서, Cas 단백질을 인코딩하는 가이드 RNA 및 mRNA는 동시에 또는 실질적으로 동시에(예를 들어, 공-형질감염 또는 공-뉴클레오펙션에 의해) 세포에 도입된다. 특정 구현예에서, Cas mRNA 및 변형된 gRNA의 공-전달은 Cas mRNA 및 미변형된 gRNA의 공-전달에 비교된 경우 더 높은 편집 빈도를 초래한다. 특히, 양쪽 5' 및 3' 말단에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 편집된 2'-O-메틸-3'-포스포티오에이트("MS"), 2'-O-메틸-3'-PACE("MP"), 또는 2'-O-메틸-3'-티오패("MSP")를 갖는 gRNA는 미변형된 gRNA에 비교된 경우 더 높은 편집 빈도를 제공한다.
- [0254] 특정 구현예에서, Cas 단백질을 인코딩하는 가이드 RNA 및 mRNA는 세포에 순차적으로 도입되고; 즉, Cas 단백질을 인코딩하는 가이드 RNA 및 mRNA는 세포에 상이한 시간에서 도입된다. 각각의 체계의 도입 사이 기간은 몇 분(또는 미만) 내지 몇 시간 또는 몇 일의 범위일 수 있다. 예를 들어, 일부 그와 같은 구현예에서, gRNA는 먼저 전달되고, 이어서 4, 8, 12 또는 24 시간 후 Cas mRNA가 전달된다. 다른 그와 같은 구현예에서, Cas mRNA는 먼저 전달되고, 이어서 4, 8, 12 또는 24 시간 후 gRNA가 전달된다. 일부 특정한 구현예에서, 먼저 변형된 gRNA의

전달, 이어서 Cas mRNA의 전달은 미변형된 gRNA의 전달 이어서 Cas mRNA의 전달에 비교된 경우 더 높은 편집 빈도를 초래한다.

[0255] 특정 구현예에서, gRNA는 Cas 단백질을 인코딩하는 DNA 플라스미드와 함께 세포에 도입된다. 일부 그와 같은 구현예에서, Cas 단백질을 인코딩하는 gRNA 및 DNA 플라스미드는 뉴클레오펙션에 의해 세포에 도입된다. 일부 특정한 구현예에서, RNP-기반 전달 플랫폼 또는 전체-RNA 전달 플랫폼은 1차 세포에서 DNA 플라스미드-기반 전달 시스템보다 더 낮은 세포독성을 제공한다.

[0256] 특정 구현예에서, 본 방법은, 인간 1차 T 세포 및 CD34+ HSPC를 포함하는, 인간 세포에서 상당히 향상된 게놈 편집 효율성을 제공한다.

[0257] 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는, 미변형된 gRNA에 비하여, 돌연변이유발 NHEJ 및 유전자 파괴를 나타낼 수 있는, 삽입 또는 결실(인델)의 빈도를 증가시킨다. 특히, 양쪽 5' 및 3' 말단에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 편입된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트("MS"), 2'-O-메틸-3'-PACE("MP"), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE("MSP")를 갖는 변형된 gRNA는 미변형된 gRNA에 비하여 인델의 빈도를 증가시킨다.

[0258] 특정 구현예에서, 인간 1차 T 세포에 변형된 gRNA 및 Cas mRNA의 공-전달은 미변형된 gRNA 및 Cas mRNA의 공-전달에 비교된 경우 인델의 빈도를 증가시킨다. 특히, 양쪽 5' 및 3' 말단에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 편입된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트("MS"), 2'-O-메틸-3'-PACE("MP"), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE("MSP")를 갖는 변형된 gRNA는 미변형된 gRNA에 비하여 인간 1차 T 세포에서 인델의 빈도를 증가시킨다.

[0259] 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 미변형된 gRNA에 비하여 gRNA 안정성을 개선시킨다. 일 예로서, 양쪽 5' 및 3' 말단에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 편입된 2'-O-메틸("M")을 갖는 gRNA는 뉴클레아제에 대한 안정성을 약간 개선시키고 미변형된 gRNA에 대하여 염기 짝짓기 열안정성을 또한 개선시킨다. 또 다른 예로서, 양쪽 5' 및 3' 말단에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 편입된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트("MS"), 2'-O-메틸-3'-PACE("MP"), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE("MSP")를 갖는 gRNA는 미변형된 gRNA에 비하여 뉴클레아제에 대한 안정성을 극적으로 개선시킨다. gRNA 말단 변형이 엑소뉴클레아제에 대한 세포내 안정성을 향상시키고, 따라서 Cas mRNA 및 gRNA가 세포 또는 세포 용해물에 공-전달 또는 순차적으로 전달되는 경우 게놈 편집의 증가된 효율을 가능하게 하는 것이 고려된다. 특정 구현예에서, 말단에서 안정성-향상 변형은 가이드 서열이 동일한 말단을 포함하면 특이성-향상 변형으로서 또한 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트(FP), 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트(FSP), 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트(FS), 2'-O-(2-메톡시에틸)-3'-포스포노아세테이트, 2'-O-(2-메톡시에틸)-티오포스포노아세테이트, 2'-O-(2-메톡시에틸)-3'-포스포로티오에이트, 또는 이들의 조합을 포함하는 말단 변형은 본 발명의 방법의 안정성 및 특이성을 증가시킨다. 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는, 차례로, 예를 들어, 상동성 재조합 또는 NHEJ에 의한 유전자 편집을 허용하는, 유전자 표적화를 자극시킨다. 특히, 양쪽 5' 및 3' 말단에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 편입된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트("MS"), 2'-O-메틸-3'-PACE("MP"), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE("MSP")를 갖는 gRNA는 미변형된 gRNA보다 상동성 재조합의 더 높은 수준을 자극시킨다.

[0260] 특정 구현예에서, 변형된 gRNA는 고 특이성을 보유한다. 특정 구현예에서, 온-표적 대 오프-표적 인델 빈도의 비는 미변형된 gRNA에 비교된 경우 변형된 gRNA로 향상된다. 특정 구현예에서, Cas 단백질을 가진 RNP 복합체에서 전달된 변형된 gRNA는 DNA 플라스미드-기반 전달 시스템에 비교된 상당히 더 나은 온-표적 대 오프-표적 비를 제공한다.

[0261] 유전자 발현 조절

[0262] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 가이드 RNA는 관심의 유전자의 전사 또는 발현 조절에 사용된다. 예를 들어, 특정 구현예에서, Cas 단백질(예를 들어, 뉴클레아제-결핍된 Cas9) 및 전사 활성제 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질은 유전자의 전사를 증가시키는데 사용된다. 유사하게, 특정 구현예에서, Cas 단백질(예를 들어, 뉴클레아제-결핍된 Cas9) 및 억제인자 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질은 유전자의 전사 방해에 의해 유전자 발현을 억대다운시키는데 사용된다.

[0263] 하나 이상의 양태에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내 관심의 유전자의 발현의 조절 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포 또는 또 다른 시스템에 (i) 본 명세서에서 기재된 합성 가이드 RNA, 및 (ii) 융합 단백질을 도입시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 Cas 단백질 및 효과기 도메인, 예컨대 전사 활성화 도

메인, 전사 억제인자 도메인, 또는 후성유전적 변형 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 돌연변이된 Cas 단백질, 예컨대 무효 뉴클레아제인 Cas9 단백질을 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 D10A, H840A 및/또는 N863A를 포함한다.

[0264] 특정 구현예에서, 융합 단백질은 세포 또는 시스템에 정제된 또는 비-정제된 단백질로서 도입된다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 세포 또는 시스템에 융합 단백질을 인코딩하는 mRNA를 통해 도입된다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 세포 또는 시스템에 융합 단백질을 인코딩하는 선형 또는 원형 DNA를 통해 도입된다.

[0265] 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 염색체 서열, 에피솜 서열, 플라스미드, 미토콘드리아 DNA 서열, 또는 기능적 유전자간 서열, 예컨대 향상제 또는 비-코딩 RNA용 DNA 서열을 포함하는 특정 표적 폴리뉴클레오타이드에 융합 단백질 유도를 돕는다. 특정 구현예에서, 효과기 도메인은 표적 폴리뉴클레오타이드의 서열의 발현을 조절한다. 유전자 발현 조절용 가이드 RNA는 기능적 RNA를 인코딩하는 임의의 원하는 내인성 유전자 또는 서열을 표적화하도록 설계될 수 있다. 게놈성 표적 서열은 내인성 유전자의 전사 개시 부위에 근접하여, 또는 대안적으로, 내인성 유전자의 번역 개시 부위에 근접하여 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 표적 서열은 종래에 일명 유전자의 "프로모터 근위" 영역인 DNA의 영역내이다. 특정 구현예에서, 표적 서열은 전사 개시 부위의 약 1,000 염기 쌍 업스트림 내지 전사 개시 부위의 약 1,000 염기 쌍 다운스트림의 영역에 위치한다. 특정 구현예에서, 표적 서열은 유전자의 전사용 개시 부위로부터 (예를 들어, 또 다른 염색체 상에서) 원격이다.

[0266] 특정 구현예에서, 본 방법은 다중 적용용이다. 특정 구현예에서, 본 방법은 가이드 RNA의 라이브러리를 세포 또는 시스템에 도입하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10, 적어도 100, 적어도 1,000, 적어도 10,000, 적어도 100,000, 또는 적어도 1,000,000 비반복 가이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 10 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 10 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 100 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 100 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 1,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 1,000 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 10,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 10,000 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 100,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 100,000 상이한 서열을 표적한다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 이내 적어도 1,000,000 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 적어도 1,000,000 상이한 서열을 표적한다.

[0267] 키트

[0268] 일 양태에서, 본 발명은, 표적 폴리뉴클레오타이드 결합, 니킹 또는 절단을 위하여 gRNA:Cas 단백질 복합체 생산 및/또는 그것의 활성 지지를 포함하는, 상기-기재된 방법 수행용 시약을 함유하는 키트를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 개시된 방법을 위하여, 하나 이상의 반응 성분, 예를 들어, 하나 이상의 가이드 RNA 및 Cas 단백질은 사용하기 위한 키트의 형태로 공급될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 및 본 명세서에서 기재된 하나 이상의 가이드 RNA 또는 가이드 RNA의 세트 또는 라이브러리를 포함한다. 특정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 다른 반응 성분을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 반응 성분의 적절한 양은 하나 이상의 컨테이너에서 제공되거나 기판 상에 유지된다.

[0269] 특정 구현예에서, 본 발명은 가이드 서열에서 상이한 위치에 변형 또는 상이한 변형을 제외하고 동일한 2개 이상의 합성 가이드 RNA를 포함하는 합성 가이드 RNA의 선택용 키트를 제공한다. 각각의 가이드 RNA는 (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및 (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절을 포함하고, 여기서 상기 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N(N은 -10 내지 10, 임의로 -10 내지 6의 정수이다), 및 가이드 서열에서 뉴클레오타이드에 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하고; 여기서 2개 이상의 합성 가이드 RNA는 가이드 서열에서 하나 이상의 상이한 위치에서 특이성-향상 변형을 가짐으로써 또는 하나 이상의 상이한 특이성-향상 변형을 가짐으로써 서로 상이하다. 상기 키트는 또한 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 키트에서 각각의 합성 가이드 RNA는 상이한 뉴클레오타이드에서 특이성-향상 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 일련의 합성 가이드 RNA를 포함하고, 각각의 것은 가이드 서열에서 상이한 뉴클레오타이드 위치에 변형을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 가이드 서열에서 뉴클레오타이드의 수로서 상이한 가이드 RNA의 동일한 수를 갖는다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9이다. 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형은 2'-O-메틸-3'-포스포노

아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 또는 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 특이성-향상 변형은 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 2'-변형은 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 가이드 RNA는 합성 단일 가이드 RNA이다.

[0270] 키트의 추가의 성분의 예는, 비제한적으로, 하나 이상의 상이한 폴리머라제, 하나 이상의 숙주 세포, 숙주 세포에 외래 핵산 도입용 하나 이상의 시약, 가이드 RNA 및/또는 Cas mRNA 또는 단백질의 발현 검출용 또는 표적 핵산의 상태 확인용 하나 이상의 시약(예를 들어, 프로브 또는 PCR 프라이머), 및 (1X 또는 더욱 농축된 형태로) 반응용 완충액, 형질감염 시약 또는 배양 배지를 포함한다. 특정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 하기 성분을 포함한다: 생화학적 및 물리적 지지체; 종결, 변형 및/또는 소화 시약; 삼투조절물질; 및 반응, 형질감염 및/또는 검출용 장치들.

[0271] 사용된 반응 성분은 여러 가지의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 성분(예를 들어, 효소, RNA, 프로브 및/또는 프라이머)은 수용액에 현탁될 수 있거나 비드에 또는 냉동건조된 또는 동결건조된 분말 또는 펠릿으로서 결합될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은, 재구성된 경우, 검정에서 사용하기 위한 성분의 완전한 혼합물을 형성한다. 본 발명의 키트는 임의의 적합한 온도에서 제공될 수 있다. 예를 들어, 액체에서 단백질 성분 또는 이의 복합체를 함유하는 키트의 저장을 위하여, 바람직하게는, 이들은 0°C 미만에서, 바람직하게는 약 -20°C에서, 가능하게는 글리세롤을 함유하는 냉동-저항성 용액 또는 다른 적합한 부동액에서 제공되고 유지된다.

[0272] 키트 또는 시스템은, 본 명세서에서 기재된 성분의 임의의 조합을, 하나 이상의 검정에 충분한 양으로 함유할 수 있다. 일부 적용에서, 하나 이상의 반응 성분은 개별, 전형적으로 일회용, 튜브 또는 동등한 컨테이너내 사전-측정된 단일 사용 양으로 제공될 수 있다. 그와 같은 배열로, RNA-가이드된 뉴클레아제 반응은 표적 핵산, 또는 표적 핵산을 함유하는 샘플 또는 세포를 개별 튜브에 직접적으로 첨가함으로써 수행될 수 있다. 키트에서 공급된 성분의 양은 임의의 적절한 양일 수 있고 생성물이 지향되는 시장에 좌우될 수 있다. 성분이 공급되는 컨테이너(들)는 공급된 형태, 예를 들어, 마이크로원심분리기 튜브, 미세적정 플레이트, 앰플, 병, 또는 필수 시험 장치, 예컨대 유체성 디바이스, 카트리지, 측면 유동, 또는 다른 유사한 디바이스를 유지할 수 있는 임의의 종래의 컨테이너일 수 있다.

[0273] 키트는 또한 컨테이너 또는 컨테이너들의 조합 유지용 포장재를 포함할 수 있다. 그와 같은 키트 및 시스템용 전형적인 포장재는 임의의 여러 가지의 배치형태에서(예를 들어, 바이알, 미세적정 플레이트 웰, 마이크로어레이, 및 기타 동종에서) 반응 성분 또는 검출 프로브를 유지시키는 고체 매트릭스(예를 들어, 유리, 플라스틱, 종이, 포일, 마이크로-입자 및 기타 동종)를 포함한다. 키트는 성분의 사용을 위하여 실재하는 형태로 기록된 지침을 추가로 포함할 수 있다.

[0274] 실시예

[0275] 실시예 1

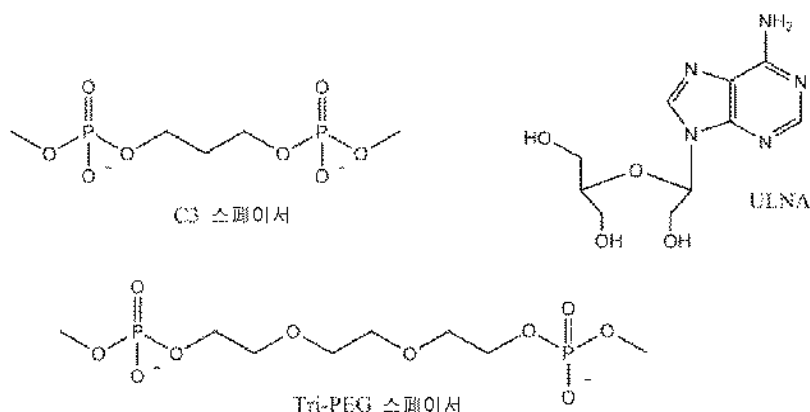
[0276] 생리적 염 조건에 결합 에너지에서 화학적 변형의 효과를 평가하기 위해, 20-뉴클레오타이드 가이드 서열을 가진 43-뉴클레오타이드 crRNA는 제조되었다. 듀플렉스는 DNA 올리고뉴클레오타이드의 각각의 말단에서 돌출하는 10 뉴클레오타이드를 포함하였던 상보성 40-뉴클레오타이드 DNA 올리고뉴클레오타이드와 crRNA 혼합에 의해 형성되었다. 듀플렉스의 용융 온도("Tm")는 측정되었다. 7개 추가의 43-nt crRNA는, 20-nt 가이드 서열에서 위치 10에 개입 또는 "스페이서" 뉴클레오타이드 및 샘플링 및 잠금 영역에서 몇 개의 순차적인 변형으로, 제조되었다. 도 6a는 변형의 유형 및 배치를 도시한다. 엑소뉴클레아제 저항 변형은 2'-O-메틸-3'-PACE("MP")이었고, 스페이서는 미변형된 RNA 뉴클레오타이드이었다. 듀플렉스는 상보성 40-nt DNA 올리고뉴클레오타이드 (603)과 각각의 변형된 crRNA (601)의 혼합에 의해 개별적으로 형성되었고, RNA 가닥에서 변형을 함유하는 각각의 RNA/DNA 듀플렉스 (605)의 용융 온도는 다양한 변형이 생리적 염 조건 하에 결합 에너지에서 가졌던 효과를 정량화하도록 측정되었다.

[0277] 변형이 듀플렉스 용융의 협동성에서 갖는 효과는 용융 곡선의 기울기 측정에 의해 정성적으로 평가될 수 있다: 더 큰 기울기는 미결합에서(그리고 따라서, 평형 가역성의 널리-확립된 원리에 따라, 또한 역 공정 동안 결합에서) 더 큰 협동성을 표시한다. 도 6b는 미변형된 gRNA에 대하여 용융 곡선을 도시하고, 도 6c 내지 6f는 20-nt 가이드 서열 부분에서 뉴클레오타이드 6 내지 9에 변형의 다양한 유형에 대하여 용융 곡선을 도시한다. 2'-O-메틸("M") 및 2'-O-메틸 포스포로티오에이트("MS")의 첨가는 약 0.2°C/변형만큼 결합 에너지를 증가시켰고, 반면

에 2'-O-메틸-3'-PACE("MP")는 1°C/변형만큼 T_m 또는 결합 에너지를 감소시켰고 2'-O-메틸-3'-티오PACE("MSP")는 1.4°C/변형만큼 T_m 을 감소시켰다. 도 7은 gRNA가 17, 18 또는 19 뉴클레오타이드로 절단되었거나 21 또는 22 뉴클레오타이드 길이로 연장되었던 경우 20-염기 쌍 gRNA/DNA 듀플렉스의 용융 온도에서 변화를 보여주는 그래프이다. 측정은 생리적 염 농도에서 수행되었다. 측정은 20-뉴클레오타이드 가이드 서열의 확장 또는 절단에 대하여 염기 쌍당 약 2°C의 용융 온도에서 변화를 표시하였다.

[0278] 실시예 2

[0279] 추가 용융 온도 측정은 crRNA의 가이드 서열에서 뉴클레오타이드 9에 링커 또는 링커-유사 변형을 함유하는 실험적 crRNA를 사용하여 수행되었다. 링커 또는 링커-유사 변형은 하기를 포함하였다: ULNA(미잠금된 핵산), 무염기성 스페이서, $-PO_4Y-(CR_2)_m-PO_4Y-$ 를 포함하는 알킬렌 스페이서, 또는 $(-PO_4Y-(CR_2CR_2O)_n-PO_3Y-)$ 를 포함하는 에틸렌 글리콜 스페이서(식 중, m은 2, 3 또는 4이고, n은 1, 2 또는 3이고, 각각의 R^3 은 H, 알킬 및 치환된 알킬로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되고, 각각의 Y는 H 또는 음전하이다). 예를 들어, 특정 구현예에서, 알킬렌 스페이서는 m이 3인 "C3 스페이서"이다. 다른 구현예에서, 에틸렌 글리콜 스페이서는 n이 3인 "트리-PEG 스페이서"이다. 이들 변형은 또한 하이브리드화의 협동성을 감소시키는 가닥에 더 많은 가요성을 제공함으로써 결합 에너지를 감소시킨다.



[0280]

[0281] 이들 용융 온도 측정의 결과는 표 1에서 보여진다:

[0282] 표 1

엔트리	crRNA 명칭	T_m
1	대조군 1XMP	50.2
2	rA-ULNA 9 1XMP	44.8
3	C3-스페이서 9 1XMP	40.9
4	트리-PEG-스페이서 9 1XMP	38.3

[0283]

[0284] 실시예 3 내지 7

[0285] DNA 표적 서열을 결합 및 절단시키는 화학적으로 합성된 가이드 RNA의 능력을 평가하기 위해 그리고 Cas9-매개된 절단에서 다양한 변형의 효과를 평가하기 위해, 시험관내 절단 검정은 사용되었다. 간단히, 표 2 및 7에서 제시된 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(온) 또는 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열(오프)을 포함하는 PAM-어드레스가능 DNA 작제물은 다양한 표적 유전자의 플라스미드-기인 인간 서열의 분취 PCR 증폭에 의해 제조되었다. 유전자를 선택적으로 편집하는 본 조성물 및 방법의 능력을 입증하기 위한 예시적 유전자로서, 인간 클라트린 경쇄 CLTA 유전자, 인간 헤모글로빈 베타(HBB) 유전자, 인간 인터류킨 2 수용체 하위단위 감마(IL2RG) 유전자, 및 인간 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CLT4) 유전자는 표적 유전자로서 사용되었다. 이들은 표적 유전자 평가 및 편집을 위하여 본 명세서에서 개시된 일반적인 접근법의 대표이다.

- [0286] 표 3 내지 6은 합성 가이드 RNA를 제시한다. 대부분의 가이드 RNA에서, 5' 말단에 제1 20 뉴클레오타이드는 표적 DNA에서 표적 서열에 상보성이다(이들 상보성 뉴클레오타이드는 가이드 서열을 구성한다). 일부 가이드 RNA에서, 돌출부 또는 확장은, 표적 서열에 상보성이 아닌, 가이드 서열의 5' 말단에 존재한다. 일부 가이드 RNA에서, 가이드 서열의 5' 말단은 절단되어서 이로써 뉴클레오타이드 1, 또는 1 및 2, 또는 1 및 2 및 3은 존재하지 않는다. 온-표적 작제물("온")은 20-nt 표적 서열을 포함한다. 오프-표적 작제물("오프")은, 1, 2 또는 3 뉴클레오타이드 차이로, 표적 DNA와 대부분의 동일한 20 뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, gRNA는 오프 표적 작제물의 서열에 대부분, 그러나 완전히는 아닌, 상보성이었다. 오프 표적 작제물은 인간 게놈에서 발생하도록 공지된 유전자 서열에 기반된다.
- [0287] gRNA는 Dellinger 등. (2011) J. Am. Chem. Soc, 133, 11540-56에서 기재된 절차에 따라 2'-O-티오노카바메이트-보호된 뉴클레오사이드 포스포르아미다이트를 사용하여 ABI 394 합성기(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 합성되었다. 2'-O-메틸 포스포르아미다이트는 2'-O-티오노카바메이트 보호된 포스포르아미다이트와 동일한 조건 하에서 RNA 올리고머에 편입되었다. 티오포스포노아세테이트(티오페이스)-변형된 RNA의 합성을 위하여 사용된 2'-O-메틸-3'-O-(디-이소-프로필아미노)포스포노아세트산-1,1-디메틸시아노-에틸 에스테르-5'-O-디메톡시트리틸 뉴클레오사이드는 본질적으로 공개된 방법에 따라 합성되었다. 참조 Dellinger 등. (2003) J. Am. Chem. Soc. 125, 940-50; 및 Threlfall 등. (2012) Org. Biomol. Chem. 10, 746-54.
- [0288] 모든 올리고뉴클레오타이드는 역상 고-성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 정제되었고 Agilent 6520 Q-TOF(비과시간) 질량 분광분석기(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에 커플링된 Agilent 1290 Infinity 시리즈 LC 시스템을 사용하여 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법(LC-MS)에 의해 분석되었다. sgRNA의 합성 및 정제용 수율은 LC-MS-유래된 총 이온 크로마토그램으로부터 수득된 질량 스펙트럼의 디콘볼루션을 사용하여 추정되었다. 100-mer sgRNA의 화학적 합성은 전형적으로 명목 1 마이크로몰 척도 합성으로부터 25 내지 35% 전장 생성물을 산출하였다. 이온쌍 완충액 조건을 사용하는 역상 HPLC 정제는 전형적으로 90% 내지 95%의 범위에서 최종 sgRNA의 추정된 순도를 가진 조 생성물로부터 20% 수율을 제공하였다.
- [0289] DNA 표적 작제물은, 볼드체 이탤릭체로 표적으로부터 오프-표적 서열에서 차이로, 표 2에서 제시된(또한 온-표적 서열로서 공지된 또는 "온"으로서 확인된) 표적 서열 및 오프-표적 서열("오프")을 포함하였고, PAM 서열(보여진 경우) 밑줄친다:

표 2

온-표적 또는 오프-표적 부위	DNA 서열	서열 번호
CLTA1 온	AGTCCTCATCTCCCTCAAGCAG G	1
CLTA1 오프1	AGTCCTCAACTCCCTCAAGCAG G	2
CLTA1 오프3	ACTCCTCATCCCCCTCAAGCCGG	3
CLTA4 온	GCAGATGTAGTGTTCACAGG G	4
CLTA4 오프1	GCAGATGTAGTATTCACAGG G	5
CLTA4 오프2	CCAGATGTAGCGTTTCACAGG G	6
CLTA4 오프3	GCAGATGTGTGTTTCACAGG G	7
HBB 온	CTTGCCCCACAGGGCAGTAACG G	8
HBB 오프1	TCAGCCCCACAGGGCAGTAAGG G	9
IL2RG 온	TGGTAATGATGGCTTCAACATG G	10
IL2RG 오프2	TGGTGAGGATGGCTTCAACACG	191

[0290]

	<u>G</u>	
IL2RG 오프3	TGGTAATGATG <u>G</u> 4CTTCAACATA	11
	<u>G</u>	
VEGFA 온	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTG <u>G</u>	192
	<u>G</u>	
VEGFA 오프2	TGTG <u>G</u> GTGAGTGTGTGCGTG <u>G</u>	193
	<u>G</u>	

[0291]

[0292]

HBB 오프1이 잠재적인 표적 서열의 제1 3 뉴클레오타이드에서 HBB 온과 상이한 것을 주목한다. 따라서, 17-nt 가이드 서열을 제공하기 위해 3 뉴클레오타이드에 의해 그것의 20-nt 가이드 서열의 5' 말단에서 절단된 gRNA는 HBB-온과 HBB-오프1 표적 서열 사이 식별할 수 없다. 실시예 3 내지 7에서 사용된 DNA 표적 작제물의 전체 서열은 아래 표 8에서 제시된다.

[0293]

표적 유전자 부위 대 공지된 오프-표적 부위의 절단의 비의 평가로, 20 뉴클레오타이드부터 18 또는 17 뉴클레오타이드까지 gRNA의 가이드 서열의 절단을 갖는 가이드 RNA가 비교 목적을 위하여 포함된다. Yanfang 등. (2014)에 의한 교시 및 결론에 대조적으로, 절단이 특정 오프-표적 부위의 절단에서 효과를 가졌지만 다른 오프-표적 부위에 절단에서 효과를 갖지 않았다는 것이 나타났다. Yanfang 등. (2014)의 교시에도 불구하고, 본 발명자들은 향상된 특이성을 가진 그리고 가이드 서열의 절단 없는 표적 폴리뉴클레오타이드의 CRISPR-Cas 절단, 니킹 또는 결합용 신규한 화합물 및 방법을 구하였고 확인하였다.

[0294]

20-μL 반응 용적에서, pH 7.6에서 50 nM sgRNA, 40 nM 재조합성 정제된 Cas9 단백질(S. 파이오제네스; Agilent) 및 0.8 mM MgCl₂의 존재 하에서 2.5 nM의 선형화된 DNA 표적은 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션되었다. 완료 시, 0.5 μL의 RNase It(Agilent)는 첨가되었고, 인큐베이션은 37 °C에서 5 분 동안 그리고 그 다음 70 °C에서 15 분 동안 계속되었다. 조 생성물은 Agilent Bioanalyzer 2200에서 분석용 DNA 1000 또는 DNA 7500 LabChip에 장입되었거나 Agilent TapeStation 2200 또는 4200에서 분석용 게놈성 DNA ScreenTape 또는 D5000 ScreenTape상에 장입되었다. 워크업 단계는, 절단을 위하여 분석되었던, 표적 DNA의 결합으로부터 Cas9를 방출시키는 역할을 한다.

[0295]

절단 수율은 식: $a/(a+b) \times 100$ (식 중 a는 2개의 절단 생성물의 밴드 강도의 합계이고 b는 존재하면 잔여 비절단된 DNA이다)에 의해 계산되었다. 100%의 절단 백분율은 모든 표적 DNA 작제물이, 검출의 한계 이내, 절단되었다는 것을 의미한다.

[0296]

실시예 3

[0297]

일련의 32 sgRNA는 인간 CLTA 유전자에서 "CLTA1" 유전자와 표적화를 위하여 제조되었다. 간단히, 개별 RNA 가닥은 합성되었고 HPLC 정제되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 HPLC 분석에 의해 전장 가닥 순도 및 질량 분광분석법 분석에 의해 화학적 조성물의 기준으로 품질관리 승인되었다. 표 3은 다양한 CLTA1 sgRNA의 서열을 제시한다. 표 3은 엔트리 1 내지 31로서 sgRNA의 서열을 보여주고, 상기 표는 하나 이상의 특이성-향상 변형을 함유하는 본 gRNA의 특정 구현예를 개시한다. 엔트리 1은 미변형되었고 비교예로서 제공한다. 엔트리 2는 뉴클레오타이드 1, 2 및 3에 가이드 서열에서 MS 변형을 함유한다. 엔트리 3은 뉴클레오타이드 1, 2 및 3에 가이드 서열에서 MSP 변형을 함유한다. 엔트리 4는 가이드 서열의 뉴클레오타이드 1에서 MSP 변형을 함유한다. 엔트리 5 및 6은 18-뉴클레오타이드 가이드 서열 또는 17-뉴클레오타이드 가이드 서열, 각각에 대해 그것의 20-nt 가이드 서열의 5' 말단에 절단된 gRNA를 갖는 비교할만한 예이다. 엔트리 7 및 8은 20-nt 가이드 서열의 5' 말단에 1- 또는 2-뉴클레오타이드 돌출부, 각각으로 미변형된 gRNA를 갖는 비교할만한 예이다. 엔트리 9, 10, 11, 12, 및 13은 뉴클레오타이드 1, 뉴클레오타이드 1 및 2, 뉴클레오타이드 1 내지 3, 뉴클레오타이드 1 내지 4, 및 뉴클레오타이드 1 내지 5, 각각에 가이드 서열에서 MP 변형을 함유한다. 엔트리 14 및 15는, 뉴클레오타이드가 일반적으로 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단부터 카운팅되는 것을 주목하는, sgRNA의 3' 말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 2 내지 5 또는 sgRNA의 3' 말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 2 내지 6, 각각에 gRNA의 tracrRNA 영역에서 MP 변형을 함유한다. 따라서, 엔트리 14 및 15에 대하여 기재된 계수는 일반 규칙에 예외이다. 엔트리 16 및 17은, MP-변형된 C 또는 G 뉴클레오타이드 돌출부, 각각과, 뉴클레오타이드 1 및 2에 20-nt 가이드 서열에서 MP 변형을 함유한다. 엔트리 18 및 19는, MP-변형된 UC 또는 AG 디뉴클레오타이드 돌출부, 각각과, 뉴클레오타이드 1 내지 3에 20-nt 가이드 서열에서 MP 변형을 함유한다. 엔트리 20 및 21은, MP-변형된 CUC 또는 GAG 트리뉴클레오타이드 돌출부, 각각과, 뉴클레오타이드 1 내지 4에 20-nt 가이드 서열에서 MP 변형, 플러스 sgRNA의 3'-말단에 gRNA의 tracrRNA 영역에서 MP 변형을 함유한다. 엔트리 22 내지 25는 뉴클레오타이드 20, 19, 18 또는 17, 각각에 가이드 서열에서 MP 변형을 함유한다. 엔트리 26은 뉴클레오타이드 18 및 17에 가이드 서열에서 MP

변형을 함유한다. 엔트리 27 내지 29는 뉴클레오타이드 19, 18 또는 17, 각각에 가이드 서열에서 M 변형을 함유한다. 엔트리 30은 뉴클레오타이드 18 및 17에 가이드 서열에서 M 변형을 함유한다. 엔트리 31은 뉴클레오타이드 1 및 20에 가이드 서열에서 M 변형을 함유한다. 엔트리 32는 뉴클레오타이드 1 내지 7, 9 내지 11, 13, 14 및 20에 20-nt 가이드 서열에서 M 변형, 플러스 sgRNA 서열의 나머지를 거쳐 몇 개의 선택 위치에, 구체적으로 뉴클레오타이드 30, 31, 33, 35, 36, 39, 42, 45, 47, 50, 60, 65, 66, 70, 71, 76, 77, 80 내지 82, 90, 93, 95, 96, 100, 101, 104, 및 106 내지 112에 M 변형을 함유한다.

35

[illegible]

五

$$N_2 = \text{뉴클레오타이드 N의 } 2'-\text{O-메틸-}3'-\text{포스포티오에이트 변형}$$
$$N^* = \text{뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-PACE 변형}$$
$$\text{N}^{\bullet} = \text{뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-티오PACE 생성}$$

이것은 3'-UTR에 있는 N⁶-메틸아데노신(N⁶-methyladenosine, m⁶A)의 존재가 mRNA의 안정성에 영향을 미친다는 것을 시사한다. m⁶A는 mRNA의 3'-UTR에 주로 존재하며, 이는 mRNA의 안정성과 번역 효율에 영향을 미친다. m⁶A는 mRNA의 3'-UTR에 주로 존재하며, 이는 mRNA의 안정성과 번역 효율에 영향을 미친다. m⁶A는 mRNA의 3'-UTR에 주로 존재하며, 이는 mRNA의 안정성과 번역 효율에 영향을 미친다.

[illegible]

[0298]

[0299]

도 8a는 Cas9-매개된 표적 폴리뉴클레오타이드 절단 대 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 절단에 관하여 표 3(서열 번호: 12 내지 42 및 124)으로부터 gRNA에서 화학적 변형의 영향을 도시한다. 더 상세하게는, CLTA1 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(온-표적 서열, 또는 "온") 및 비교할만한 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열(오프1 및 오프3)의 절단 백분율은 수치로 그리고 막대 그래프 형태로 보여진다. 도 8b는, 분석된 각각의 합성 sgRNA(서열 번호: 12 내지 42 및 124)에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된 비로, 도 8a에서 결과에서 유래된다. 분석된 sgRNA당 각각의 온-표적 절단 백분율에 각각의 비를 곱셈함으로써 수득된 특이성 스코어가 또한 계산된다. 도 8b의 엔트리 6, 12, 13, 20, 21, 및 31에서 음영된 값은 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(온1)에 대하여 실질적으로 감소된 절단 수율을 약간 초래한다. 중요하게는, 감소는 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열의 한쪽 또는 양쪽에 대하여 심지어 더 커서, 2.0 초과인 온:오프 절단

비를 산출하였다. 음영된 값은 특이성에서 적어도 2-배 향상이 수득될 수 있다는 것을 나타낸다. 이 실험에서 시험된 다양한 화학적 변형 및 조합 중에서, 2'-O-메틸-3'-PACE("MP") 변형은, 특히 가이드 서열에서 위치의 최적의 수에 편입된 경우, 높은 수준의 온-표적 절단을 유지하면서 오프-표적 절단 감소의 최대 원하는 효과를 제공하였다. 이들 예는 본 교시의 구현예로서 제공한다.

[0300] 실시예 4

[0301] 도 9a에서 표시되는 예에 대하여, 단일 또는 삼중 MP 변형은 변형된 위치가 온-표적 대 오프-표적 절단 활성에 의해 판단된 바와 같이 특이성에서 향상을 산출할 수 있는지를 보기 위해 20-nt 가이드 서열을 거쳐 "위킹"되었다. 표 4에서 열거된 바와 같이, 일련의 28 sgRNA(서열 번호: 43 내지 70)는 인간 CLTA 유전자에서 "CLTA4" 유전자와 표적화를 위하여 제조되었고, 여기에서 실험적 sgRNA는, 마지막(즉, 최고 3') 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는 sgRNA의 3' 말단에 tracrRNA 영역에서 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드에 그리고 또한 뉴클레오타이드 1에 MP 변형을 갖는 것에 더하여, 가이드 서열에서 하나 이상의 위치에 2'-O-메틸-3'-PACE("MP") 변형을 함유하였다. 따라서, 말단 인터뉴클레오타이드 연결에서 변형은 엑소뉴클레아제에 의한 분해에 대해 그와 같은 변형된 sgRNA를 보호하도록 설계되었다. 개별 RNA 가닥은 합성되었고 HPLC 정제되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 HPLC 분석에 의해 전장 가닥 순도 및 질량 분광분석법 분석에 의해 화학적 조성물을 기준으로 품질관리 승인되었다. CLTA4 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(온) 및 비교할만한 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열(오프1, 오프2 및 오프3)의 절단 백분율은 도 9a에서 수치로 그리고 막대 그래프 형태로 보여진다. 도 9b는, 분석된 각각의 합성 sgRNA(서열 번호: 43 내지 70)에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된 비로, 도 9a에서 결과에서 유래된다. "큰"으로 기록된 비는 오프-표적 DNA 폴리뉴클레오타이드의 절단이 그들 특정 검정에서 검출되지 않았다는 것을 나타낸다. 도 8b에 대하여 설명에서 상기 언급된 바와 같이, 특이성 스코어는 그것의 각각의 온-표적 절단 백분율에 비를 곱셈함으로써 계산된다. 도 9b에 의해 표시되는 예에서, 특이성 스코어 ≥ 2.0 은 미음영된 스코어에 비하여 특이성에서 향상을 나타낸다. 음영은 가이드 서열에서 MP 위치가 특이성에서 적어도 2-배 향상을 제공하였다는 것을 나타낸다. 엔트리 1 내지 18에서 MP 워크의 결과는 위킹된 MP 변형의 배치가 특이성에서 효과를 갖고, 엔트리 3 내지 18에 비하여 엔트리 1 및 2에서 나타난 바와 같이, 가이드 서열에서 다른 위치에 MP보다 가이드 서열의 5' 말단 근처에서 MP 변형이 특이성을 더욱 그렇게 향상시킨다는 것을 보여주는 분석된 오프-표적 부위에 따라 특이성 스코어의 각각의 세트에 대하여 추세는 분명하다는 것을 나타낸다. 이러한 추세는 CLTA1 표적 서열에 표적화된 gRNA에서 MP 변형에 대하여 관측된 특이성 향상 추세와 일치하고, 여기에서 CLTA1 sgRNA의 5' 말단에 첨가된 MP 변형은, 도 8b에서 엔트리 12 및 13 및 20 및 21내 음영된 스코어에 의해 나타난 바와 같이, 특이성을 향상시켰다. 모든 경우에서 아마 효과적이지 않아도, 특이성 개선용 일반 전략은 gRNA에서 가이드 서열의 5' 말단에 연속 포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 연결에 1, 2, 3, 4 또는 5 MP 변형을 편입시키는 것이다.

표 4

번호	sgRNA 명칭	5' → 3'	서열 번호
1	CIT44_5-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	43
2	CIT44_6-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	44
3	CIT44_7-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	45
4	CIT44_8-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	46
5	CIT44_9-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	47
6	CIT44_10-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	48
7	CIT44_11-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	49
8	CIT44_12-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	50
9	CIT44_13-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	51
10	CIT44_14-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	52
11	CIT44_15-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	53
12	CIT44_16-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	54
13	CIT44_17-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	55
14	CIT44_18-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	56
15	CIT44_19-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	57
16	CIT44_20-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	58
17	CIT44_21-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	59
18	CIT44_22-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	60
19	CIT44_23-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	61
20	CIT44_24-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	62
21	CIT44_25-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	63
22	CIT44_26-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	64
23	CIT44_27-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	65
24	CIT44_28-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	66
25	CIT44_29-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	67
26	CIT44_30-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	68
27	CIT44_31-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	69
28	CIT44_32-MP_1xMP	G*CAAGU*G*UAGUGUUUUCACAGUUUAGAGCUAUGUUGUUAAGAGUAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCUUGUUUAUACUUGAAUAGUGGACCCGAGGUCGUGUUCUUUUUU	70

변형
 N5 = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-포스포타타오이드 변형
 N6 = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-PACE 변형
 N7 = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-리오파스 변형
 N8 = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-리오파스 변형
 N9 = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-리오파스 변형
 N10 = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-리오파스 변형

실시예 5

도 10에 의해 표시되는 예에서, 단일 또는 삼중 MP 변형은 변형된 위치가 온-표적 대 오프-표적 절단 활성화에 의해 판단된 경우 특이성에서 향상을 산출할 수 있는지를 보기 위해 20-nt 가이드 서열에 걸쳐 "위킹"되었다. 표 5에서 열거된 바와 같이, 일련의 30 sgRNA(서열 번호: 71 내지 86 및 173 내지 186)는 인간 IL2RG 유전자에서 유전자와 표적화를 위하여 제조되었다. 실험적 sgRNA는, 뉴클레오타이드 1에서 그리고 또한 마지막(즉, 최고 3') 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는 sgRNA의 3' 말단에서 tracrRNA 영역내 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드에서 MP 변형을 갖는 것에 더하여, 가이드 서열에서 하나 이상의 위치에 2'-O-메틸-3'-PACE("MP") 변형을 함유하였다. 따라서, 말단 인터뉴클레오타이드 연결에서 변형은 엑소뉴클레아제에 대해 sgRNA를 보호하도록 설계되었다. 개별 RNA 가닥은 합성되었고 HPLC 정제되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 HPLC 분석에 의해 전장 가닥 순도 및 질량 분광분석법 분석에 의해 화학적 조성물을 기준으로 품질관리 승인되었다. IL2RG 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(온) 및 비교할만한 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열(오프3)의 절단 백분율은 도 10에서 수치로 보여진다. 상기 도는 또한 분석된 각각의 합성 sgRNA(서열 번호: 71 내지 86 및 173 내지 186)에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된 비를 도시한다. 특이성 스코어는 그것의 각각의 온-표적 절단 백분율에 비를 곱셈함으로써 계산된다. 특이성 스코어 ≥ 2.0 은 미음영된 스코어에 비하여 특이성에서 향상을 나타내도록 음영되고, 따라서 음영은 가이드 서열에서 MP 위치가 특이성에서

적어도 2-배 향상을 제공하였다는 것을 나타낸다. 도 10에서, 특이성에서 가장 큰 향상을 산출하였던 가이드 서열에서 위치는 더 어두운 음영에 의해 나타난다. 위치 7, 14 또는 16의 MP 변형으로부터 결과는 엔트리 6, 13 및 15, 각각에서 보여진다. 그와 같은 조성물을 갖는 가이드 RNA는 다른 통상적으로 사용된 조성물 예컨대 MP 변형이 부족한 gRNA에 비하여, 특히 임상적으로 중요한 IL2RG 유전자좌를 표적화하는 gRNA의 다양한 CRISPR-Cas 적용에 대하여 특이성 성능을 향상시킬 수 있다. 도 10에 의해 표시되는 예는 또한 위치 또는 위치들이 위킹된 MP 변형의 위치로 인해 특이성 향상을 산출하는 것을 확인하기 위해 gRNA의 가이드 서열 부분을 거쳐 MP 변형의 본 신규한 "위킹" 방법을 예시한다. 특이성 향상의 규모는 시험된 각각의 위치에 대하여 온-표적 대 오프-표적 절단 비에 의해 평가되고, 종사자는 MP-변형된 위치 또는 위치들이 gRNA의 전체적인 성능을 유익화할 것 같은 것을 결정하는 경우 각각의 설계에 대하여 측정된 온-표적 절단의 백분율에 나란히 그와 같은 값을 고려할 수 있다. 가이드 서열을 거쳐 단일 MP의 증분적 위킹은 또한 위크에 의해 시험된 위치에서 MP 변형의 하나 이상의 조합에서 비롯하는 특이성에서 잠재적인 상승작용 향상에 대하여 서열에서 위치를 확인할 수 있다.

표 5

엔트리	sgRNA 명칭	5' → 3'	서열 번호
1	IL2RG_2MP_1xMP	U*G*GUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	176
2	IL2RG_3MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	177
3	IL2RG_4MP_1xMP	U*G*G*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	178
4	IL2RG_5MP_1xMP	U*G*G*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	179
5	IL2RG_6MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	180
6	IL2RG_7MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	181
7	IL2RG_8MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	182
8	IL2RG_9MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	183
9	IL2RG_10MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	184
10	IL2RG_11MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	185
11	IL2RG_12MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	186
12	IL2RG_13MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	78
13	IL2RG_14MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	79
14	IL2RG_15MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	80
15	IL2RG_16MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	81
16	IL2RG_17MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	82
17	IL2RG_18MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	83
18	IL2RG_19MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	84
19	IL2RG_20MP_1xMP	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	85
20	IL2RG_1xMP (대조군)	U*G*G*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	86
21	IL2RG_4-6MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	173
22	IL2RG_5-7MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	174
23	IL2RG_8-9MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	175
24	IL2RG_7-9MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	71
25	IL2RG_8-10MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	72
26	IL2RG_9-11MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	73
27	IL2RG_10-12MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	74
28	IL2RG_11-13MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	75
29	IL2RG_12-14MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	76
30	IL2RG_13-15MP_1xMP	U*G*G*UUAUGAUGGCUU*CAACAGUUNUAGAGCUAGAGAAUAGCAAGUUA*AAUAGAGGCUAGUCCUGUUAUACAUCUUGAAAGAGGCAACCGAGUCGGUGCUU*U	77

변형
 N* = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-PAC 변형

실시예 6

변형 "위크"는 20-nt 가이드 서열에서 다양한 부위가 온-표적 부위의 실질적 절단 및 오프-표적 부위의 감소된 절단을 제공할 수 있는지를 보기 위해 도 11a에서 나타난 바와 같이 인간 HBB 유전자에 표적화된 가이드 서열을

거쳐 증분적 위치에 설치된 MP 변형으로 실시되었다. 일련의 65 sgRNA는 표 6에서 열거된 바와 같이 HBB 유전자 시험을 위하여 제조되었고, 여기에서 실험적 sgRNA는, 뉴클레오타이드 1에서 그리고 또한 마지막(즉, 최고 3') 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는 sgRNA의 3' 말단에 tracrRNA 영역에서 끝에서 두 번째 뉴클레오타이드에 MP 변형을 갖는 것에 더하여, 가이드 서열에서 하나 이상의 내부 뉴클레오타이드 위치에 2'-O-메틸-3'-PACE("MP") 변형을 함유하였다. 따라서, 말단 인터뉴클레오타이드 연결에서 변형은 엑소뉴클레아제에 의한 분해에 대해 sgRNA를 보호하도록 설계되었다. 개별 RNA 가닥은 합성되었고 HPLC 정제되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 HPLC 분석에 의해 전장 가닥 순도 및 질량 분광분석법 분석에 의해 화학적 조성물을 기준으로 품질관리 승인되었다. HBB 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(온) 및 비교할만한 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 서열(오프1)의 절단 백분율은 도 11a에서 수치로 보여진다. 상기 도는 또한 분석된 각각의 합성 sgRNA(서열 번호: 87 내지 103)에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드로 계산된 비를 도시한다. 특이성 스코어는 그것의 각각의 온-표적 절단 백분율에 비를 곱셈함으로써 계산된다. 특이성 스코어 ≥ 2.0 은 미음영된 스코어에 비하여 특이성에서 향상을 나타내도록 음영되고, 따라서 음영은 가이드 서열에서 MP 위치가 특이성에서 적어도 2-배 향상을 제공하였다는 것을 나타낸다. 도 11a에서, 특이성에서 가장 큰 향상을 산출하였던 가이드 서열에서 위치는 더 어두운 음영에 의해 나타나서, 엔트리 2, 6 및 8, 각각에서 나타난 바와 같이 위치 5, 9 또는 11의 MP 변형에서 비롯한다. 그와 같은 조성물을 갖는 가이드 RNA는 다른 통상적으로 사용된 조성물, 예컨대 MP 변형이 부족한 gRNA에 비하여, 특히 임상적으로 중요한 HBB 유전자좌를 표적화하는 gRNA의 다양한 CRISPR-Cas 적용에 대하여 특이성을 향상시킬 수 있다. 도 11a에 의해 표시되는 예는 또한 위치 또는 위치들이 워킹된 MP 변형의 위치로 인해 특이성 향상을 산출하는 것을 확인하기 위해 gRNA의 가이드 서열 부분을 거쳐 MP 변형의 우리의 "워킹" 방법을 또한 예시한다. 특이성 향상의 규모는 시험된 각각의 위치에 대하여 온-표적 대 오프-표적 절단 비에 의해 평가되고, 종사자는 MP-변형된 위치 또는 위치들이 gRNA의 전체적인 성능을 유익화할 것 같은 것을 결정하는 경우 각각의 설계에 대하여 측정된 온-표적 절단의 백분율에 나란히 그와 같은 값을 고려할 수 있다. 가이드 서열을 거쳐 단일 MP의 증분적 워킹은 또한 워크에 의해 시험된 위치에서 MP 변형의 하나 이상의 조합에서 비롯하는 특이성에서 잠재적인 상승작용 향상에 대하여 서열에서 위치를 확인할 수 있다.

[0308]

동일한 20-nt 가이드 서열을 갖는 HBB sgRNA를 사용하는 관련된 실험에서, 특이성은 생체내 20-염기 쌍 표적 서열이 도 11a에 대하여 시험관내 폴리뉴클레오타이드 작제물에서 시험된 바와 동일하였던 K562 세포내 계놈성 HBB 표적 유전자좌의 편집에 대하여 평가되었다. 도 11b는 Cas9 mRNA로 각각의 합성 sgRNA(서열 번호: 187-190)의 공-형질감염 그리고 도 11a에서 평가된 바와 같이 동일한 오프-표적 서열 오프1을 포함하는 3개의 오프-표적 유전자좌 및 표적 유전자좌의 절단 측정에 의해 K562 세포내 인간 HBB 유전자를 표적화하는 sgRNA내 변형의 다양한 유형의 영향을 도시한다. 비는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적(온) 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드(오프1)로 계산된다. 특이성 스코어는 그것의 각각의 온-표적 절단 백분율에 비를 곱셈함으로써 계산된다. 결과는 가이드 서열에서 PACE 변형이 시험된 변형의 다양한 유형에 대하여 특이성 스코어에 의해 평가된 경우 특이성에서, 특히 (오프1에서) 1차 오프-표적 활성화에 관하여 실질적 향상을 산출하였다는 것을 보여준다.

표 6

엔트리	sgRNA 명칭	5'→3'	서열 번호
1	HBB_4MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	87
2	HBB_5MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	88
3	HBB_6MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	89
4	HBB_7MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	90
5	HBB_8MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	91
6	HBB_9MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	92
7	HBB_10MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	93
8	HBB_11MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	94
9	HBB_12MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	95
10	HBB_13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	96
11	HBB_14MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	97
12	HBB_15MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	98
13	HBB_16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	99
14	HBB_17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	100
15	HBB_18MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	101
16	HBB_19MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	102
17	HBB_1xMP (대조군)	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	103
18	HBB_16.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	125
19	HBB_14.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	126
20	HBB_13.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	127
21	HBB_10.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	128
22	HBB_9.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	129
23	HBB_8.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	130
24	HBB_7.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	131
25	HBB_6.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	132
26	HBB_5.17MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	133
27	HBB_4.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	134
28	HBB_13.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	135
29	HBB_10.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	136
30	HBB_9.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	137
31	HBB_8.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	138
32	HBB_7.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	139
33	HBB_6.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	140
34	HBB_5.16MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	141
35	HBB_13.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	142
36	HBB_10.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	143
37	HBB_9.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	144
38	HBB_8.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	145
39	HBB_7.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	146
40	HBB_6.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	147
41	HBB_5.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	148
42	HBB_10.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	149
43	HBB_9.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	150
44	HBB_8.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	151
45	HBB_7.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	152
46	HBB_6.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	153
47	HBB_5.13MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	154
48	HBB_5.11MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	155
49	HBB_5.11MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	156
50	HBB_5.10MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	157
51	HBB_5.10MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	158
52	HBB_7.10MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	159
53	HBB_6.10MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	160
54	HBB_5.10MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	161
55	HBB_5.9MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	162
56	HBB_7.9MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	163
57	HBB_6.9MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	164
58	HBB_5.9MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	165
59	HBB_6.8MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	166
60	HBB_5.8MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	167
61	HBB_6.7MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	168
62	HBB_5.7MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	169
63	HBB_5.6MP_1xMP	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	170
64	HBB_untreated	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	171
65	HBB_3xMS	CTTGTGCTCCACAGGCGCAGUAGUUUAGAGAGCUAGAGAAUAGGCAAGUUAAAUAGAGCUAGUUCUGUUUACACUUUGAAAGAGUGGACCGAGUCCGUGUCUUUUU	172

변태

[309] = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-PAC 변형
[310] = 뉴클레오타이드 N의 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 변형

실시예 7

MP 변형으로 인한 온-표적 대 오프-표적 특이성 향상 결정에 대한 추가 실험은 어느 한쪽 시험관내 절단 검정을 사용하는 용액에서 또는 2 유형의 배양된 인간 세포에서 수행되었다. 2 세포 유형은 K562 세포 및 (또한 iPS 세포 또는 iPSCs로서 공지된) 유도된 만능 줄기 세포이었다. 배양된 세포는 제조합성 Cas9 단백질로 사전-복합체화된 MP-변형된 gRNA를 가진 개별 웰에서 형질감염되었다. 특이성은 배양된 세포내 20-염기 쌍 표적 서열이 도 11a 및 12a에서 평가된 경우 시험관내 폴리뉴클레오타이드 작제물에서 분석된 바와 동일한 게놈성 HBB 표적 유전자좌의 편집에 대하여 평가되었다. 도 12a의 엔트리 1 내지 17(서열 번호: 87 내지 103)은 도 11a와 동일한 결과를 도시한다. 도 12a에서 데이터는 최고부터 최저까지 특이성 스코어에 따라 등급화된다. 엔트리 18 내지 64(서열 번호: 125 내지 171)는, HBB 온-표적 및 HBB 오프1-표적, 각각을 표시하는, "온"으로 불리는 표적 폴리뉴클레오타이드의 시험관내 절단 및 "오프1"로 불리는 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 별도로 분석된 절단에 관하여 인간 HBB 유전자에서 서열에 표적화된 gRNA내 다양한 위치에서 추가의 MP 변형의 영향을 보여준다. 모든 엔트리에 대하여, 비는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드(온) 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드(오프1)로 계산되었다. 특이성 스코어는 그것의 각각의 온-표적 절단 백분율에 비를 곱셈함으로써 계산되었다. 엔트리 18 내지 64는 최고부터 최저까지 특이성 스코어에 따라 등급화된다. 최고 스코어를 가진 엔트리는 음영된다.

- [0312] 도 12b는 도 12a에 대하여 시험관내 폴리뉴클레오타이드 작제물에서 시험된 바와 동일한 20-염기 쌍 서열을 갖는 게놈성 HBB 표적 편집의 결과를 도시한다. 도 12b에 대하여, 게놈성 HBB 표적 부위는 시험된 인간 K562 세포 및 iPS 세포에서 내인성이다. 결과는 20-nt 가이드 서열에서 편집된 MP 변형의 수에 따라 그룹화된다. 도 12a에서 엔트리 1 내지 17 그리고 도 12b에서 엔트리 1 내지 12 및 22 내지 33은, 핵산외부분해 열화에 대해 그것을 보호하기 위해 각각의 sgRNA의 3' 말단에서 맨 마지막 인터뉴클레오타이드 결합에 또 다른 MP 그리고 5' 말단에서 맨 처음 인터뉴클레오타이드 결합에 MP 변형을 갖는 것에 더하여, 20-nt 가이드 서열에서 다양한 위치에 단일 내부 MP의 시험을 표시한다. 도 12b의 엔트리 1 내지 12 및 22 내지 33에 대하여, 시험된 sgRNA는 서열 번호: 88, 90, 92 내지 94, 96, 97, 99, 100, 103, 171 및 172이었다. 도 12b의 엔트리 13 내지 19 및 34 내지 40에 대하여, 시험된 sgRNA는 128, 129, 133, 141, 160, 165, 및 168이었다. 내부 MP 변형이 부족한, 예컨대 도 12a내 엔트리 14 그리고 도 12b내 엔트리 7 내지 9 및 29 내지 31에서 보여진 대조군의 결과는 이들 그룹화에서 포함된다. 결과의 다른 그룹화는, 도 12a내 엔트리 18 내지 64 그리고 도 12b내 엔트리 13 내지 19 및 34 내지 40에 대하여 보여진 바와 같이, 엑소뉴클레아제를 억제시키기 위해 sgRNA의 각각의 말단에서 단일 MP 변형을 갖는 것에 더하여, 20-nt 가이드 서열에서 다양한 위치에 2개의 내부 MP 변형을 갖는 sgRNA에 대하여 실시되었다. 다양한 그룹화는 진한 흑색 선에 의해 도에서 분리된다. 이들 도는 시험관내 최대 특이성 향상을 제공하는 내부 MP 위치가, 도 12a내 엔트리 1 및 2 그리고 도 12b내 엔트리 1 및 2 및 22 및 23에서 나타난 바와 같이, 양쪽 세포 유형에서 최대 향상을 제공하는 것과 동일하다는 것을 도시한다. 내부 MP 변형으로 인해 특이성 향상의 다음 하위 티어는, 도 12a내 엔트리 3 내지 5 그리고 도 12b내 엔트리 3 내지 5 및 24 내지 26에 대하여 도시된 바와 같이, 더 열은 음영에 의해 표시된다. HBB sgRNA에서 내부 MP 변형의 위치에서 비롯하는 특이성 향상의 상대 등급화는 도 12a의 엔트리 1 내지 17 그리고 도 12b의 엔트리 1 내지 12 및 22 내지 33에서 나타난 바와 같이 시험관내 및 생체내 검정을 거쳐 현저하게 일치한다.
- [0313] 한 쌍의 내부 MP 변형에 대한 결과는 도 12a내 엔트리 18 내지 64 그리고 도 12b내 엔트리 13 내지 19 및 34 내지 40에서 별도로 그룹화되고, 특이성 스코어에 의해 등급화된 경우 시험관내 및 생체내 이들 설계의 상대 성능은 다양한 검정 및 세포 유형을 거쳐 현저하게 일치한다. 특이성 향상 평가의 약간 상이한 방식은 단순히, 도 12a 및 12b에서 HBB 예에 대하여 온:오프1인, 온-표적 대 오프-표적 비를 고려하는 것이다. 이러한 대안적인 측정기준을 사용하여, 그룹화당 최고 내지 최저 비로 분류된, 측정된 비에 따라 도 12b에서 그룹화의 재-등급화는 도 12c에서 도시된다. 도에서 다양한 그룹화는 진한 흑색 선에 의해 분리된다. 도 12b에서 특이성 스코어에 대하여 우리의 관찰에 비교하여, 도 12c에서 표시된 경우 온:오프1 비에 의해 특이성의 더 단순한 평가는 양쪽 세포 유형을 거쳐 유사한 결과를 보여준다. 실시예 6 및 7은 특이성 향상이 HBB 유전자를 표적화하는 20-nt 가이드 서열에서 MP 변형의 위치에 의존적인 것을 입증한다.
- [0314] 표 5의 IL2RG sgRNA의 일부를 사용하는 실험에서, 특이성은 K562 세포내 게놈성 IL2RG 표적 유전자좌의 편집에 대하여 평가되었다. 또한, (아래 보여진) 표 7의 VEGFA sgRNA를 사용하여, 특이성은 K562 세포내 게놈성 VEGFA 표적 유전자좌의 편집에 대하여 평가되었다.

표 7

엔트리	sgRNA 명칭	5' → 3'	서열 번호
1	VEGFA_11MP_1xMP	<u>G</u> *GUGAGUGAGU <u>G</u> *GUGUGCGUGGUGUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUGCGGUCUU*U	194
2	VEGFA_10MP_1xMP	<u>G</u> *GUGAGUGAG <u>G</u> *UGUGUGCGUGGUGUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUGCGGUCUU*U	195
3	VEGFA_9MP_1xMP	<u>G</u> *GUGAGUGA <u>G</u> *GUGUGUGCGUGGUGUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUGCGGUCUU*U	196
4	VEGFA_7MP_1xMP	<u>G</u> *GUGAGU <u>G</u> *GAGUGUGCGUGGUGUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUGCGGUCUU*U	197
5	VEGFA_5MP_1xMP	<u>G</u> *GUGA <u>G</u> *GUGAGUGUGUGCGUGGUGUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUGCGGUCUU*U	198
6	VEGFA_1xMP (대조군)	<u>G</u> *GUGAGUGAGUGUGUGCGUGGUGUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG CACCGAGUGCGGUCUU*U	199

[0315]

[0316]

이런 식으로, 20-nt 가이드 서열은 생체내 시험되었다. 도 14는 K562 세포에서 IL2RG sgRNA 및 VEGFA sgRNA내 변형의 다양한 유형의 영향을 도시한다. 각각의 합성 sgRNA는 Cas9 mRNA로 공-형질감염되었고, 표적 유전자좌의 절단 그리고 오프-표적 유전자좌 오프2의 절단은 측정되었다. 비는 분석된 각각의 합성 sgRNA에 대하여 절단된 표적(온) 대 절단된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드(오프2)로 계산된다. 특이성 스코어는 그것의 각각의 온-표적 절단 백분율에 비를 곱셈함으로써 계산된다. 도 14에서 결과는 IL2RG 및 VEGFA를 표적화하는 합성 gRNA의 가이드 서열에서 변형이, 특히 (오프2에서) 오프-표적 활성화에 관하여, 시험된 변형의 다양한 유형에 대하여 특이성 스코어에 의해 평가된 경우 특이성에서 실질적 향상을 산출하였다는 것을 보여준다. 엔트리 1과 대조로, 엔트리 2는 IL2RG sgRNA의 양쪽 말단에서 MP 변형으로부터 수득한 상당한 특이성 향상을 보여주고, 여기에서 5' 및 3' 말단 인터뉴클레오타이드 연결은 변형된다. 엔트리 1 & 2와 대조로, 엔트리 3 & 4는 IL2RG 가이드 서열에서 내부 위치에, 즉 위치 5 또는 11, 각각에 MP 변형을 갖는 IL2RG sgRNA에 대하여 인상적인 특이성 향상을 보여준다. 게다가, 위치 5의 MP 변형은 도 14에서 엔트리 1 내지 4 중에서 특이성의 최대 향상을 제공하였다.

[0317]

엔트리 5와 대조로, 엔트리 6 내지 10은 VEGFA 가이드 서열에서 내부 위치에, 즉 위치 5, 7, 9, 10, 또는 11, 각각에 MP 변형을 갖는 VEGFA sgRNA에 대하여 상당한 특이성 향상을 보여준다. 엔트리 5 내지 10을 거쳐 향상을 비교하는 경우, 20-nt 가이드 서열의 위치 5에 MP 변형이 VEGFA에 대하여 특이성의 최대 향상을 제공하였다는 것이 엔트리 6에 대하여 주목할 만하다.

- [0318] 상이한 DNA 서열을 표적화하는 gRNA에서 가이드 서열을 거쳐 MP 워크 수행 및 실시예 4 내지 7에서 나타난 바와 같이 시험관내 온-표적 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 평가에 의해, 특이성 향상을 산출하였던 다양한 가이드 서열에서 MP-변형된 위치의 복합체 맵은 도 13에서 도시된다. 특히, 도 13은 도 9a, 9b, 10 및 11a로부터 시험관내 절단 결과의 비교를 도시한다. 도 13은 몇 개의 중요한 추세를 보여준다. 첫째, 도 13에서 모든 다른 엔트리에 대조적으로 엔트리 12에서 나타난 바와 같이, 그것의 20-nt 가이드 서열에서 위치 15에 MP 변형을 갖는 gRNA는 Cas9-매개된 절단 활성의 실질적 손실을 겪었다. 이것은 위치 15가 Cas9-매개된 절단에 대하여 MP 변형의 특히 불내성이었다는 것을 시사한다. 둘째, 음영된 특이성 스코어에 의해 표시된 바와 같이, 엔트리 1 및 2 내내 특이성 향상에 대한 추세가 있다. 이러한 추세는 다양한 20-nt 가이드 서열의 5' 말단에서 또는 근처에서 MP 변형 편입이 gRNA의 표적 특이성 향상을 위한 일반적으로 유용한 설계 전략일 수 있다는 것을 시사한다. 이러한 접근법의 유용성의 또 다른 예는 시험관내 CLTA1 유전자좌를 표적화하는 gRNA의 5' 말단에 MP 변형에 관한 도 8a 및 8b에서 제시된 결과에 대하여 실시예 3에서 상기 논의되었다. 일반적인 접근법의 유용성의 추가 예는 도 11b에서 나타난 바와 같이 형질감염된 인간 K562 세포에서 HBB 유전자를 표적화하는 gRNA의 5' 말단에 MSP 변형에 관한 실시예 6에서 상기 논의되었다. MP 변형의 특이성 효과에 관한 제3 예는 도 13의 엔트리 3에서 분명하고, 여기에서 상이하게 표적화된 20-nt 가이드 서열에서 위치 6의 MP 변형에서 비롯하는 특이성 스코어는, 상기 언급된 위치 15에 대하여 변칙적인 효과를 무시하고, MP 워크당 최저 스코어를 구성한다. CLTA4 오프3, IL2RG 오프3 및 HBB 오프1을 관여하는 MP 워크의 각각의 시리즈에 대하여, 위치 6의 MP 변형으로 인한 특이성 향상의 최하점은 동일한 가이드 서열에서 인접한 위치, 즉 (엔트리 1, 2 또는 4, 각각 내내 음영된 스코어로서 나타난) 위치 4, 5 또는 7의 MP 변형에서 비롯하는 특이성 스코어에 대조적으로 특히 현저하다.
- [0319] 실시예 3 내지 7은, gRNA에서 많은 서열 위치에 변형이 온-표적 폴리뉴클레오타이드의 표적-특정 절단을 예방하지 못하였음에 따라, 가이드 서열에서 특정 위치에 변형을 함유하는 gRNA가 활성 Cas 단백질 및 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의해 용인되는 것을 입증한다. 실시예 3 내지 7은 또한 본 gRNA, 복합체 및 방법이 적어도 1.2, 대안적으로 적어도 1.5, 대안적으로 적어도 2, 대안적으로 적어도 2.5, 대안적으로 적어도 3, 대안적으로 적어도 3.5, 대안적으로 적어도 4, 대안적으로 적어도 4.5, 대안적으로 적어도 5의 온-표적 대 오프-표적 비를 달성할 수 있고/있거나, 비가 최대 10, 12, 15 또는 20인 것을 입증한다. 많은 사례에서, 2'-O-메틸-3'-PACE("MP") 변형은 특이성 향상을 위하여 원하는 대로 온-표적 절단의 높은 수준을 보유하면서 오프-표적 절단 수준을 감소시킴으로써 비에서 긍정적인 효과를 가졌다.
- [0320] 이들 실험의 결과로서 가이드 서열을 거쳐 특정 부위에 결합 에너지를 감소시키는 다중 변형의 편입이 공지된 및 미공지된 오프-표적 절단 사건을 저하시킬 것이 계산된다.
- [0321] 상기에서 언급된 바와 같이, 실시예 3 내지 7에서 사용된 DNA 작제물의 전체 서열은 표 8에서 제시된다. PAM 서열과 함께, 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 오프-표적 서열은 볼드체로 나타나고, PAM 서열은 또한 밑줄친다.

표 8

CLTA1 온1-표적 (서열 번호: 104):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAG
TGCCACCTAAATTTGAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGACCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCC
ATTCAGGCTGCGCAACTTTGCTGATTAGGGCGCTCTTCGCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTC
GCAGGCCAAAGATGTCTCCCGCATGCGCTCAGTCCCTCATCTCCCTCAAGCAGGCCCTGCTGGTGCAC
TGAAGAGCCCACTAGGCTGCGGTAAAGATGACAGTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
GCGGGGACGAGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTGCGTC
GTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAATGTGTAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCCACTAGGCTGCGGTAAAGATACCAAGCGTTTCCCGCTTCCCGCTCGTGCCTGCTCCT
GTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAG
AGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCAGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTG
GCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC

CLTA1 오프1-표적 (서열 번호: 105):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAG
TGCCACCTAAATTTGAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA

[0322]

ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCCCATTCGCC
ATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTC
GCAGGGCAAAGAGGTCTCTGTATGCACT**AGTCCTCAACTCCCTCAAGCAGG**CGACCCCTTGGTGCA
CTGACAAACCGCTCTCGCGGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTACATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCAACGC
GCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTTTCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTG
GTTGCGGTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGCTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCT
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCCTGAAGTGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAT
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
CATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTG
GCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC

CLTA1 오프3-표적 (서열 번호: 106):

GCGTTTTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG
TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTT
TTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCCCATTCGCC

[0323]

ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTC
AGGAGAGGGGAGCCATGCTCATCTCCAGCCC**ACTCCTCATCCCCCTCAAGCCGGT**TCCCAGGCTGAGA
GGCTAAAGCTTGTCTTTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCG
CGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAAC
ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC
GTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
GCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
TCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC
CTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT
GAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
GTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC
TTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACAGCCA
GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCA
TCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTA
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGT
TGCCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAA
GATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC

CLTA4 온-표적 (서열 번호: 107):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAG
TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCC
ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTC
AAGAGCTTCACTGAGTAGGATTAAGATATT**GAGATGTAAGTTTCCACAGGGT**GGCTCTTCAGTGC

[0324]

ACCAGCGGAACCTGCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
GCGGGGAGAGGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCT
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGTTTTTTTTGTTTCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTT
CATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAAGTAAGTTG
GCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC

CLTA4 오프1-표적 (서열 번호: 108):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAG
TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCCGCGTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTGCGC
ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTC
AAGAGCTTCACTGAGTAGGATTAAGATATTG**CAGATGTAGTATTCCACAGGGT**GGCTCTTCAGTGC
ACCAGCGGAACCTGCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC

[0325]

GCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAATCATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTACGCCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTGTGTCAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAGTAAATCAATCTAAAGTATATATAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
CATCCATAGTTGCCGTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTCTGCCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAAGTAAGTTG
GCCGCAGTGTTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC

CLTA4 오프2-표적 (서열 번호: 109):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTGAACTACTACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAG
TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAAATCAGCTCATTT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAGAGTCCACTATTAAGAACGTTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCC
ATTACGGTGCAGCACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTC
AAGAGCTTCACTGAGTAGGATTAAGATATTCAGATGTAGCGTTTCCACAGGGTGGCTCTTCAGTGC
ACCAGCGGAACCTGCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTGTTCCCTTATGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
GCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAATCATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC

[0326]

CCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAGTAAGTTG
GCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC

CLTA4 오프3-표적 (서열 번호: 110):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAG
TGCCACCTAAATGTAAAGCGTTAATTTTGTAAAAATTCGGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAGCATATAAGCAACCTAAAGGGAGCCCGGATTAGAGCTTGACGGGGAAGCGCGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACCCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCCCATTCGCC
ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTC
AAGAGCTTCACTGAGTAGGATTAAGATATTG**CAGATGTTGTTCCACAGGGT**GGCTTTCAGTGC
ACCAGCGGAACCTGTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCCG
TTGCGCTCACTGCGCGCTTCCAGTCGGGAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
GCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGAGGCCGCTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGTTTTTTTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC

[0327]

GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACAGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTG
GCCGCAAGTTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC

HBB 온-표적 (서열 번호: 111):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG
TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCCGC
ATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGATGTGTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAAGCGCAAGGTTTCCAGTCAAGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTC
GGCTCACCACCAACTTCATCCACGTTACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCTCA
GGAGTCAGATGCACAGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCGCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCAACGC
GCGGGGAGAGGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTGCGGTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCT
GTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAT
AGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGATTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACTAGATCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTG
GCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC

[0328]

TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC
<p>HBB 오프1-표적 (서열 번호: 112):</p> <p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA AATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAG TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATT TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA GTGTTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTG CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCG AACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG GTACAGCTGCGCGTAACCAACACACCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTTCGCC ATTCAGGTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA AAGGGGGATGTGCTGAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAACGAGTTGTAAA ACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTC GGATAGGAAAGGTGAAGTCAGAGCAGTGCCTCAGCCCCACAGGGCAGTAAGGGCAGCCTTCCTCTA AATACCAGATTTCCCAAAGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTATAGTGGGGTTAATTGCG CGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC GTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC GCGCGGGGAGAGGGCGTTTTCGTATTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG TCGTTCCGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG GATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTTCCCTTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC CTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTC ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC CCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAATACTCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT GAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCG GTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT GTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCA GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG CCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCA TCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGTTTCCAACGATCAAGGCGAGTTA CATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGT TGCCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAA GATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT GCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC</p>
<p>IL2RG 온-표적 (서열 번호: 113):</p> <p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA</p>

[0329]

AATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
 CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAG
 TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
 TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
 GTGTTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGGACTCCAACGTCAAAAGGGCGAAAA
 ACCGCTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTG
 CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCG
 AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
 GTCACGCTGCGCGTAACACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCC
 ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
 AAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
 ACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTC
 GGGCAGCTGCAGGAATAAGAGGGATGTGAAT**TGGTAATGATGGCTTCAACA**TGG****CGCTTGCTCTTCA
 TTCCCTGGGTGTAGTCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTATAGTGAGGGTTAATTGCG
 CGTTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAAC
 ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
 GTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
 GCGCGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
 TCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
 GATAACGCAGGAAAGAATCATGTAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
 TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
 GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCTTGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC
 CTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
 ATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
 CCCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTTAAGACACG
 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
 GAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT
 GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
 GTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC
 TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
 AAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
 AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
 GTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
 CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACAGCCA
 GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
 CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCA
 TCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA
 CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAAGT
 TGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAA
 GATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
 GCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC

IL2R3 오프3-표적 (서열 번호: 114):

GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
 AATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
 CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAG
 TGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
 TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA

[0330]

```

GTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
ACCGTCTATCAGGGCGATGGGCCACTACGTGAACCATCACCTTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTG
CCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCG
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCC
ATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTC
CAATATTGAGAGTGAATGAAAAGTGTGAGCTGGTAATGATGACTTCAACATAGTCAGAACTCTTTGG
GCTGTTCCAAACATCAGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCGCG
GCTTGGCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
GCGGGGAGAGGGCGTTTGGGTATTGGGGCGCTTTCCTGCTCCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTC
GTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCT
GTTCCGACCTTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTGTAGGTCGTTCTGCTCCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTGAAAGTGGTGGCCTAACCTACCGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCAGCTGGTAGCGG
TGTTTITTTTGTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTACCTAGATCTTTTAAATTAATAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAACTAGTGAGGCACTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTTCACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAACTAAGTTG
GCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGATGCGGGCAGCCGAGTTGC
TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC

```

[0331]

[0332]

실시예 8

[0333]

이 실험은 본 개시내용에 따라 합성 gRNA를 사용하여 Cas9 절단에 의해 자극된 상동 지정 복구(HDR) 공정을 입증한다. 염색체(Chr11)의 양쪽 쌍에서 정상 HBB 유전자를 갖는 K562 세포는 제공되었다. 겸상 세포 질환(SCD) 돌연변이를 담지하는 HDR용 DNA 공여체 주형이 또한 제공되었다. 실험은 이중접합성 세포주를 창출하기 위해 SCD 돌연변이를 부가, 또는 녹-인하도록 K562 세포에서 HBB 유전자를 편집하도록 노력하였다. 그와 같은 세포주는 SCD 질환을 모델링하는데 유용할 것이다.

[0334]

화학적 변형과 함께 그리고 없이 sgRNA는 사용되었다. 더 상세하게는, 실험은 하기 20-nt 합성 가이드 RNA로 운영되었다: 미변형된 gRNA(미변형), 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(1xMP), 위치 5에서 그리고 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(5MP_1xMP), 위치 11에서 그리고 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(11MP_1xMP), 그리고 sgRNA:Cas9 복합체 대신에 완충액으로 처리된 모의-형질감염된 세포(모의). 각각의 sgRNA는 HBB 표적 부위에서 HDR용 복구 주형으로서 제공하기 위해 ssDNA 올리고와 함께 (전기천공을 통해) K562 세포에 형질감염용 Cas9 단백질과 별도로 사전-복합체화되었다. 각각의 그룹에서, 실험은 공여체 DNA 주형과 함께(도 15에서 공여체 +) 그리고 공여체 DNA 주형 없이(도 15에서 공여체 -) 운영되었다. 표적 부위는 sgRNA:Cas9 복합체에 의해 절단되어 이중-가닥 절단을 형성하였다. 절단은 HDR 공정에 의해 복구되어서 이로써 공여체 DNA 주형의 서열은 형질감염된 세포에서 내인성 DNA 회복 효소에 의해 사용되어 절단된 DNA 표적 서열의 복구를 유도하였다.

[0335]

복구 주형으로서 제공하기 위해 K562 세포에 형질감염된 단일-가닥 공여체 DNA 주형의 서열은 하기이었다:

[0336]

TCAGGGCAGGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACGTGTTCCTAGCAACCTC

[0337]

AAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTgt aGAGAAGTCTGCGGTTACTGCCCTGTGGGGCA

[0338]

AGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCC(서열 번호: 200).

[0339]

올리고뉴클레오타이드는 158 뉴클레오타이드 길이이고, 소문자 "gta"는 HDR에 의해 녹-인되는 SCD 돌연변이용

코돈이다. 형질감염된 세포는 배양되었고 형질감염후 48 시간에 후속적으로 수확되었다. 게놈성 DNA는 단리되었고, HBB 유전자좌 및 그것의 주요 오프-표적 유전자좌는 모두 심도 서열분석용 PCR에 의해 증폭되어 (i) Cas9-유도된 인텔(도 15에서 온 표적 인텔 및 오프 표적 인텔)의 형성, (ii) 부분적인 HDR(부분적인 온 표적 HDR), 및 (iii) SCD 코돈을 설치하는 전체 HDR(온 표적 HDR 및 오프 표적 HDR)을 포함하였던 편집 결과를 정량화시켰다. 편집의 모두 3 유형은 온-표적 부위(도 15에서 유전자좌 온)에서 측정되었고, 편집의 3 유형 중 2개는 Chr9 상의 게놈에서 주요 오프-표적 부위(도 15에서 유전자좌 오프)에 검출되었다.

[0340] 도 15는 인간 K562 세포에서 HBB 유전자의 상동 지정 복구(HDR)의 이들 실험으로부터 결과를 요약한다. "유전자좌 온"에 대하여, (좌에서 우로) 보고된 결과는 온 표적 HDR%, 부분적인 온 표적 HDR%, 및 온 표적 인텔%이다. "유전자좌 오프"에 대하여, (좌에서 우로) 보고된 결과는 오프 표적 HDR% 및 오프 표적 인텔%이다.

[0341] 이 실험은 특이성 향상용 화학적 변형, 특히 20-nt 가이드 서열에서 위치 5 및 위치 11에 MP 변형이 오프-표적 인텔의 형성을 상당히 실질적으로 감소시켰을 뿐만 아니라, 오프-표적 HDR 활성을 상당히 감소시켰다는 것을 입증하였다. 이 실험에서, 오프-표적 부위가 HDR 편집을 또한 경험하기 위해 ssDNA 회복 주형에 충분한 서열 유사성을 가졌다는 것이 주목되었다.

[0342] 실시예 9

[0343] 이 실험에서, 합성 가이드 RNA에 의한 오프-표적 활성은 2개의 상이한 그러나 상보성 방식으로 평가되었다. 몇 개의 화학적으로 합성된 가이드 RNA는 실시예 7 및 도 12b에 관하여 상기 기재된 동일한 생체내 검정을 사용하여 HBB 표적 부위 및 오프-표적 부위를 결합 및 절단시키는데 사용되었다. 따라서, 제1 평가를 위하여, 인간 K562 세포로부터 게놈성 DNA내 유전자좌 또는 종사자-명시된 폴리뉴클레오타이드 서열은 PCR에 의해 증폭되었고, 제2 평가를 위하여, 게놈성 DNA의 단편내 (종사자에 의해 명시된) 유전자좌 또는 약 1,000 폴리뉴클레오타이드 서열의 라이브러리는 상업적으로 입수가능한 유전자좌 농축 키트를 사용함으로써 농축되었다. 더 상세하게는, 제1 평가에서, 오프-표적 활성은 HBB에서 20-bp 표적 서열에 관하여 3 이하 미스매치를 갖는 그리고 표적 서열에 비하여 위치 21-23에 어느 한쪽 NGG 또는 NAG PAM 서열을 또한 갖는 인간 게놈에서 서열을 구성하는 16 오프-표적 부위를 증폭시키기 위해 게놈성 DNA에서 PCR을 수행함으로써 평가되었고; 그와 같은 PAM 서열은 Cas9 인식을 위하여 요구된다. 제2 평가에서, 오프-표적 활성은 표적 및 오프-표적 부위를 포획하기 위해 K562 세포로부터 게놈성 DNA상의 바이오티닐화된 올리고뉴클레오타이드 미끼(Agilent Technologies제 SureSelect Target Enrichment Kit)를 사용함으로써 평가되었다. 미끼는 HBB에서 20-bp 표적 서열에 관하여 5 이하 미스매치를 갖는 그리고 위치 21 내지 23에 어느 한쪽 NGG 또는 NAG PAM 서열을 또한 갖는 인간 게놈에서 서열(대략 960 서열 총계)을 선택적으로 포획하도록 설계되었다. 온-표적 서열 및 오프-표적 서열은 하기이었다.

표 9

HBB 온-표적 유전자좌 & 유사 오프-표적 유전자좌	인간 게놈에서 표적 부위 서열 밀집화된 PAM 서열; 이텔릭체로 미세매치; 소문자로 표시	인간 어센블리 GRCh38/hg38에서 게놈성 좌표	서열 번호
HBB 온	CTTGCCCCACAGGGCAGTAACGG	Chr11: 5,226,968-5,226,990	201
오프1	TCAGCCCCACAGGGCAGTAAGGG	Chr9: 101,833,584-101,833,606	202
오프2	CTTGCCCCACAGGGCAGTAAGGG	Chr17: 78,243,545-78,243,567	203
오프3	CCTC/TCCCCACAGGGCAGTAAGGG	Chr17: 68,628,098-68,628,120	204
오프4	CTTGCCCC/TAGAGGGCACTAAAGG	Chr11: 76,420,075-76,420,097	205
오프5	GCTGCCCCACAGGGCAGCAAGGG	Chr12: 124,319,282-124,319,304	206
오프6	CCTG/TCCCACAGGGCAGGAAGGG	Chr19: 33,890,015-33,890,037	207
오프7	GTGCCCCCACAGGGCAGGAATGG	ChrX: 75,786,405-75,786,427	208
오프8	CTGCCCCC/TAGGGCAGTCTGG	Chr2: 11,637,669-11,637,691	209
오프9	ATTGCCCCCACGGGGCAGTGACGG	Chr12: 93,155,409-93,155,431	210
오프10	CTTGACCCACAGAGCACTAAGGG	Chr19: 37,048,134-37,048,156	211
오프11	CTTGCCCCCAGAGGGC/TGTTAAGG	Chr2: 79,966,568-79,966,590	212
오프12	CTTGCCCCCACAGGGCAGTGAAGGG	Chr19: 48,638,948-48,638,970	213
오프13	CCTGCCCCCACAGGGCAGCCAAGG	Chr15: 87,945,584-87,945,606	214
오프14	CTcTGCCCCCACAGGGCAGGAAGGG	Chr5: 132,087,686-132,087,708	215
오프15	CTTGCCCCCACAGGGCAGTGCGGG	Chr16: 535,479-535,501	216
오프16	CTTGCCCCCACAGG/CA/TAATAG	Chr18: 45,734,262-45,734,284	217

[0344]

[0345] 양쪽 평가를 위하여, 하기 20-nt 합성 가이드 RNA는 사용되었다: 미변형된 gRNA(미변형), 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(1xMP), 위치 5에서 그리고 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(5MP_1xMP), 그리고 sgRNA:Cas9 복합체 대신에 완충액으로 처리된 모의-형질감염된 세포(모의). 제1 평가는 위치 11에서 그리고 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA를 또한 포함하였다(11MP_1xMP).

[0346] 인간 K562 세포는 이전의 실시예에서 사용된 동일한 절차를 사용하여 gRNA 및 Cas9로 형질감염되었다. 더 상세하게는, 인간 K562 세포는 ATCC로부터 획득되었고 10% 소 성장 혈청으로 보충된 RPMI 1640 배지(Thermo Fisher)에서 배양되었다. (계대 횟수 3 내지 9 이내) K562 세포는 제조자의 지침에 따라 Lonza 4D-Nucleofector(96-웰 서플 디바이스, 프로그램 FF-120)를 사용하여 뉴클레오펙션되었다. 뉴클레오펙션 조건은 20 μ L의 배지내 0.2 백만 세포를 가진 Lonza SF 세포주 키트(V4SC-2960), 125 pmole의 화학적으로 변형된 sgRNA, 및 50 pmole의 제조합성 Cas9 단백질(Thermo Fisher)을 이용하였다. 세포는 주위 산소 및 5% 이산화탄소내 37 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. 배양된 세포는 형질감염후 48 시간에 수확되었다.

[0347] 제2 평가를 위하여, 표적 농축 미끼를 포함하는 라이브러리는 HBB 표적 부위상의 대략 중심에 있는 게놈성 DNA의 1-Kbp 분절을 포획하기 위해 (또한 "타일링"으로서 지칭된) 중첩 서열 적용범위를 갖도록 (Agilent 제 SureSelect 농축 플랫폼을 사용하여) 설계되었다. 라이브러리는 또한 인간 게놈에서 960 별개의 오프-표적 부위

상의 중심에 있는 1-Kbp 분절을 포획하기 위해 유사하게-타일링된 미끼를 포함하였다. 960 오프-표적 부위는 HBB에서 표적화하는 CRISPR-Cas9용 20-bp 표적 서열에 관하여 5 이하 미스매치를 갖는 그리고 Cas9 인식 및 결합 등을 허용하도록 요구될 바와 같이 20-bp 오프-표적 서열을 인접하는 어느 한쪽 NGG 또는 NAG PAM 서열을 또한 갖는 인간 게놈에서 모든 서열을 구성한다고 여겨진다. 게놈성 DNA는 치료당 3중 샘플당 단리되었고, 각각의 단리물은 Agilent SureSelect HiSeq 프로토콜에 따라 가공되었다.

[0348] 양쪽 평가를 위하여, 증폭된 또는 포획된 DNA는 짝짓기된-말단 2x150-bp 서열분석 판독용 Illumina 시약을 사용하여 Illumina HiSeq 4000 시퀀서에서 서열분석되었다. HiSeq 미가공 데이터는 온- 또는 오프-표적 서열당 Cas9 절단 부위의 어느 한쪽에서 적어도 30 bp만큼 온- 또는 오프-표적 부위를 중첩시키지 않았던 판독을 폐기시킴으로써 사전가공되었다. 인간 게놈에 판독의 맵핑은 디폴트 파라미터에 설정된 BWA-MEM(bwa=0.7.10) 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 불일치된 짝짓기된-말단 맵핑, 저 품질 맵핑, 또는 2차 맵핑을 산출하는 판독은 분석으로부터 폐기되었다. 각각의 유지된 맵핑된 판독은 인텔을 갖는 것으로서 또는 Cas9 절단용 맵핑된 컷트 부위의 10 bp 이내 서열의 삽입 또는 결실(즉, 인델)을 가졌는지 여부에 따르지 않고 채점되었다. 온- 또는 오프-표적 부위에 따라 맵핑된 판독치는 이들이 인텔을 가졌는지 아닌지에 따라 비닝되었고, 빈당 판독의 계산은 온-표적 부위에서 그리고 마찬가지로 각각의 960 오프-표적 부위에서 형성된 %인텔을 계산하는데 사용되었다. %인텔 결과는 온:오프 표적 절단 비 및 특이성 스코어를 계산하는데 사용되었다(도시되지 않음).

[0349] 도 16은, 변형된 또는 미변형된 sgRNA에 대하여 HBB 온-표적 부위 및 16 유사한 오프-표적 부위에서 인텔 형성을 측정하였던, 제1 평가로부터 결과를 요약한다. PCR 앰플리콘의 심도 서열분석은 치료에 따라 단리된 게놈성 DNA를 사용하여 17 부위(온-표적 부위 및 16 오프-표적 부위)에 대하여 서열 판독을 생성하였다. 모든 변형된 또는 미변형된 gRNA는 온-표적 부위에서 인텔의 고 백분율을 초래하였다. 오프1 부위에서, 미변형된 gRNA 및 1xMP gRNA는 또한 인텔의 고 백분율을 생산하였고; 그에 반해서, 5MP_1xMP gRNA 및 11MP_1xMP gRNA는 인텔의 훨씬 더 낮은 백분율을 제공하였다. 오프5 부위에서, 5MP_1xMP gRNA 및 11MP_1xMP gRNA는 미변형된 gRNA 및 1xMP gRNA보다 인텔의 훨씬 더 낮은 백분율을 생산하였다. 다른 오프 부위에서, 모든 gRNA는 인텔의 초저 백분율을 생산하였다. 이러한 평가는 특이성 향상용 화학적 변형, 특히 20-nt 가이드 서열에서 위치 5 및 위치 11에 MP 변형이 HBB에서 20-bp 온-표적 서열에 관하여 3 이하 미스매치를 갖는 그리고 위치 21 내지 23에서 어느 한쪽 NGG 또는 NAG PAM 서열을 또한 갖는 인간 게놈내 서열에서 오프-표적 인텔의 형성을 상당히 실질적으로 감소시켰다는 것을 보여준다.

[0350] 도 17은 양쪽 평가로부터 증폭된 DNA 유전자좌(PCR) 또는 포획된 DNA 유전자좌(SureSelect)의 심도 서열분석 분석으로부터 결과를 요약한다. 도 17은 하기 20-nt 합성 가이드 RNA를 가진 실험으로부터 HBB 표적 부위(HBB 온) 및 3개의 오프-표적 부위(오프1, 오프5 및 오프9)에서 인텔 형성의 측정된 백분율을 도시한다: 미변형된 gRNA(HBB_미변형(PCR) 및 HBB_미변형(SureSelect)), 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(HBB_1xMP(PCR) 및 HBB_1xMP(SureSelect)), 위치 5에서 그리고 5' 및 3' 말단에서 MP 변형을 갖는 gRNA(HBB_5xMP(PCR) 및 HBB_5xMP(SureSelect)), 그리고 sgRNA:Cas9 복합체 대신에 완충액으로 처리된 모의-형질감염된 세포(모의(PCR) 및 모의(SureSelect)). 검출된 인텔의 백분율은, PCR에 의해 증폭된 별개의 DNA 유전자좌의 분석에서 발견된 바와 같이 인텔의 유사한 백분율을 발견하는 SureSelect 농축에 의해 포획된 DNA의 분석으로, 2 평가 사이 일치되었다. 모든 변형된 또는 미변형된 gRNA는 HBB 온 표적 부위에 인텔의 고 백분율을 초래하였다. 오프1 부위에서, 양쪽 HBB_미변형(PCR) 및 HBB_미변형(SureSelect) 실험 그리고 HBB_1xMP(PCR) 및 HBB_1xMP(SureSelect) 실험은 인텔의 고 백분율을 보여주었다. 그에 반해서, 5MP_1xMP gRNA 및 11MP_1xMP gRNA는 PCR 및 SureSelect 평가에 의해 인텔의 훨씬 더 낮은 백분율을 보여주었다. 오프5 부위에서, 5MP_1xMP gRNA(즉, HBB_5xMP gRNA(PCR) 및 HBB_5xMP gRNA(SureSelect))를 사용하는 양쪽 평가는 미변형된 gRNA 및 HBB_1xMP gRNA보다 인텔의 훨씬 더 낮은 백분율을 생산하였다. 오프9 부위에서, 시험된 모든 gRNA는 인텔의 초저 백분율을 가졌다. SureSelect 농축에 의해 평가된 잔여 957 오프-표적 유전자좌 중, 32개만이 0.1%의 검출 한계 초과 수준에서 인텔을 생산하였고(결과 도시되지 않음), 이들 중에서 최고 인텔%는 0.5% 미만이었다. 따라서, 특이성 향상용 화학적 변형 특히 20-nt 가이드 서열내 위치 5에서 MP 변형은 오프-표적 인텔의 형성을 상당히 실질적으로 감소시켰다. 그와 같은 특이성 향상은 표적화된 라이브러리 농축 키트 예컨대 SureSelect 사용에 의해 농축된 게놈성 유전자좌 또는 PCR에 의해 증폭된 게놈성 유전자좌를 평가함으로써 입증될 수 있다.

[0351] 예시적 구현예

[0352] 현재 개시된 요지에 따라 제공된 예시적 구현예는, 비제한적으로, 청구항 및 하기 구현예를 포함한다:

[0353] A1. 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA로서:

- [0354] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0355] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0356] 상기 가이드 서열이 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하고, 합성 가이드 RNA가 gRNA 기능을 갖는, 합성 가이드 RNA.
- [0357] A2. 구현예 A1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0358] A3. 구현예 A1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0359] A4. 구현예 A1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 강화시키고 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0360] A5. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA의 5' 말단 또는 3' 말단 또는 양쪽 말단에서 하나 이상의 안정성-향상 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0361] A6. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이 잠금 영역, 샘플링 영역, 및 씨드 영역을 포함하고, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 샘플링 영역에서 및/또는 씨드 영역에서 존재하는, 합성 가이드 RNA.
- [0362] A7. 구현예 A6에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 씨드 영역에서 및/또는 샘플링 영역에서 및/또는 잠금 영역에서 존재하는, 합성 가이드 RNA.
- [0363] A8. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0364] A9. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 화학적으로 변형된 핵염기를 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0365] A10. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 하나 이상의 뉴클레오타이드 당 모이어티에서 위치하는, 합성 가이드 RNA.
- [0366] A11. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 3'-포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 3'-포스포노아세테이트 메틸 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 3'-메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 3'-티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합, 3'-메틸티오포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 3'-보라노포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합, 또는 이들의 조합을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0367] A12. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, C3'-엔도 당 피커를 부여하는 2' 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0368] A13. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA:
- [0369] (a) 2'-데옥시리보오스, 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노푸라노실, 2'-데옥시-2'-플루오로리보푸라노실, 당 예컨대 2'-O-페닐, 2'-티오페닐, 2'-S-티오페닐, 2'-메틸, 2'-에틸, 2'-프로필, 2'-알릴, 2'-알릴페닐, 2'-메틸하이드록시, 2'-메틸옥시메틸, 2'-O-카바메이트, 2'-O-에틸아미노, 2'-O-알릴아미노, 2'-O-프로필아미노, 또는 2'-O-치환된 페닐을 갖는 리보오스, 또는 이들의 조합;
- [0370] (b) 포스포노아세테이트, 티오포스포노아세테이트, 포스포노프로피오네이트, 티오포스포노프로피오네이트, 메틸포스포네이트, 메틸티오포스포네이트, 또는 보라노포스포네이트; 또는 이들의 조합; 또는
- [0371] (c) (a) 및 (b)의 조합.
- [0372] A14. 구현예 A8, A9, A11 또는 A13 중 어느 하나에 있어서, 2'-O-메틸 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0373] A15. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 비구조적인 핵산("UNA"), 미잠금

된 핵산("ULNA"), 무염기성 뉴클레오타이드, 또는 $-PO_4Y-(CR^3_2)_m-PO_4Y-$ 를 포함하는 알킬렌 스페이서, 또는 $(-PO_4Y-(CR^3_2CR^3_2O)_n-PO_4Y-)$ (식 중, m 은 2, 3 또는 4이고, n 은 1, 2 또는 3이고, 각각의 R^3 은 H, 알킬 및 치환된 알킬로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되고, 각각의 Y 는 H 또는 음전하이다)를 포함하는 에틸렌 글리콜 스페이서인, 합성 가이드 RNA.

- [0374] A16. 구현예 A1 내지 A9, A11 내지 A13, 또는 A15 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 핵염기 변형을 포함하지 않는, 합성 가이드 RNA.
- [0375] A17. 구현예 A1 내지 A15 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노퓨린, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-에티닐시토신, 5-아미노알릴U, 5-아미노알릴C, 무염기성 뉴클레오타이드, UNA 염기, 이소C, 이소G, 5-메틸-피리미딘, $x(A,G,C,T,U)$, $y(A,G,C,T,U)$, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 핵염기인, 합성 가이드 RNA.
- [0376] A18. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 5-니트로인돌, 네불라린, 이노신, 디아미노퓨린, 무염기성 결합, 및 무염기성 형광단 결합 예컨대 3-O-일-2-(4-부틸아미도플루오레신)프로필-1-O-일-포스포디에스테르로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체인, 합성 가이드 RNA.
- [0377] A19. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이, 특이성-향상 변형 없이 듀플렉스의 T_m 에 비하여, 합성 가이드 RNA 및 표적 폴리뉴클레오타이드에 의해 형성된 제1 DNA/RNA 듀플렉스의 용융 온도(T_m)를 저하시키는 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0378] A20. 구현예 A19에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 변형당 약 0.5°C만큼, 대안적으로 변형당 약 0.5 내지 1.0°C만큼, 대안적으로 변형당 약 1.0 내지 2.0°C만큼, 대안적으로 변형당 2 내지 8°C만큼 T_m 을 저하시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0379] A21. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이 20 뉴클레오타이드를 포함하고 임의로 5'-돌출부 서열을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0380] A22. 구현예 A21에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20, 그리고 뉴클레오타이드 1에서, 대안적으로 뉴클레오타이드 1 및 2에서, 대안적으로 뉴클레오타이드 1, 2, 및 3에서, 대안적으로 뉴클레오타이드 1, 2, 3 및 4에서; 대안적으로 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 4 및 5에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하거나 상기로 구성되는, 합성 가이드 RNA.
- [0381] A23. 구현예 A21에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, N이 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 정수인, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N으로 구성되고, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 4-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 5-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 10-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N 내지 20-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N 내지 14-N 또는 16-N 내지 19-N 이내, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N 내지 14-N 또는 16-N 내지 18-N 이내인, 합성 가이드 RNA.
- [0382] A24. 구현예 A21에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, N이 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 양의 또는 음의 정수인, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N으로 구성되고, 가이드 서열이 뉴클레오타이드 11-N, 12-N, 13-N, 14-N, 16-N, 17-N, 18-N, 19-N 또는 20-N에서 위치한, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N, 14-N, 16-N, 17-N, 18-N, 19-N 또는 20-N에서 위치한, 대안적으로 뉴클레오타이드 13-N, 14-N, 16-N, 17-N, 또는 18-N에서 위치한 하나의 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0383] A25. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA의 5' 말단에서 뉴클레오타이드 1에 개시하는 하나 이상의 안정성-향상 변형 그리고 3' 말단에서 5개의 말단 뉴클레오타이드 이내 하나 이상의 안정성-향상 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0384] B1. 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 합성 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시킬 수 있는, 또는 절단 활성, 니킹 활성 및/또는 결합 활성을 갖는, gRNA:Cas 단백질 복합체.

- [0385] C1. 하기 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법:
- [0386] 표적 폴리뉴클레오타이드를 구현에 B1에 따라 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계, 및 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계.
- [0387] C2. 구현에 C1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA가 미변형된 gRNA에 비교하여 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합을 감소시키는, 방법.
- [0388] C3. 구현에 C2에 있어서, 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드가 CRISPR-관련 단백질에 의해 절단, 니킹 또는 결합되고, 절단, 니킹 또는 결합된 표적 폴리뉴클레오타이드 대 절단, 니킹 또는 결합된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 비가 적어도 1.2, 대안적으로 적어도 1.5, 대안적으로 적어도 2, 대안적으로 적어도 2.5, 대안적으로 적어도 3, 대안적으로 적어도 3.5, 대안적으로 적어도 4, 대안적으로 적어도 4.5, 대안적으로 적어도 5 또는 적어도 10, 12, 15 또는 20인, 방법.
- [0389] D1. 하기 단계를 포함하는, 합성 가이드 RNA의 제조 방법으로서:
- [0390] 표적 폴리뉴클레오타이드가 각각의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 게놈에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0391] 오프-표적 폴리뉴클레오타이드가 각각의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 게놈에서 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 확인하는 단계;
- [0392] 표적 폴리뉴클레오타이드의 서열을 오프-표적 폴리뉴클레오타이드의 서열과 정렬시켜 양쪽 서열의 하나 이상의 동일한 부분을 확인하는 단계;
- [0393] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 설계하는 단계;
- [0394] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0395] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0396] 가이드 서열이 확인된 동일한 부분 중 하나에 상보성인 그것의 서열의 한 부분 이내 특이성-향상 변형을 포함하는, 방법.
- [0397] D2. 구현에 D1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 방법.
- [0398] D3. 구현에 D1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 방법.
- [0399] D4. 구현에 D1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 강화시키고 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 방법.
- [0400] D5. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 설계된 가이드 RNA를 합성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0401] D6. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 오프-표적 폴리뉴클레오타이드가 오프-표적 부위를 예측하기 위한 알고리즘 예컨대 <http://www.rgenome.net/Cas-OFFinder>; <https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter>; 또는 <http://crispr.mit.edu>에서 발견된 것, 또는 실제의 사례에서 오프-표적 부위의 활성화의 확인 및 정량화용 다른 기술, 예컨대 Tsai 등. (2015) Nat. Biotechnol. 33, 187-97; Ran 등. (2015) 본질 520, 186-91; 및/또는 Frock 등. (2015) Nat. Biotechnol. 33, 179-86에서 개시된 것에 의해 확인되는, 방법.
- [0402] D7. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하는, 방법:
- [0403] 표적 폴리뉴클레오타이드와 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하나 이상의 식별 뉴클레오타이드 위치를 확인하는 단계로서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 및 상기 오프-표적 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 식별 위치에서 상이한 뉴클레오타이드를 갖는 단계, 및
- [0404] 표적 폴리뉴클레오타이드에서 하나 이상의 식별 위치에 뉴클레오타이드를 매칭하는 뉴클레오타이드를 합성 가이드 RNA에서 포함하는 단계.
- [0405] D8. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 특이성-향상 변형이, 특이성-향상 변형 없이 듀플렉스의 T_m 에 비하

여, 표적 폴리뉴클레오타이드 및 합성 가이드 RNA의 가이드 서열에 의해 형성된 제1 DNA/RNA 듀플렉스의 용융 온도("T_m")를 저하시키는, 방법.

- [0406] D9. 구현예 D8에 있어서, 특이성-향상 변형이 변형당 약 0.5℃만큼, 대안적으로 변형당 약 0.5-1℃만큼, 대안적으로 변형당 약 1-2℃만큼, 대안적으로 변형당 약 2-8℃만큼 제1 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m을 저하시키는, 방법.
- [0407] D10. 구현예 D8에 있어서, 특이성-향상 변형이, 예를 들어 약 1℃ 내지 약 13℃, 대안적으로 약 1℃ 내지 약 6℃의 T_m을 저하시킴으로써, 적어도 약 1℃, 적어도 약 2℃, 적어도 약 3℃, 적어도 약 4℃, 적어도 약 5℃, 및/또는 최대 약 6℃, 대안적으로 최대 약 8℃, 대안적으로 최대 약 10℃, 대안적으로 최대 약 13℃만큼 제1 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m을 저하시키는, 방법.
- [0408] D11. 구현예 D8에 있어서, 특이성-향상 변형이 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 및 합성 가이드 RNA의 가이드 서열에 의해 형성된 제2 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m을 저하시키는, 방법.
- [0409] D12. 구현예 D8에 있어서, 제1 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m이 제2 DNA/RNA 듀플렉스의 T_m보다 더 높은, 예를 들어 적어도 적어도 약 0.5℃ 더 높은, 대안적으로 적어도 약 1℃ 더 높은, 방법.
- [0410] E1. 하기 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법:
- [0411] 계놈에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0412] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공 및/또는 설계하는 단계로서;
- [0413] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0414] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0415] 상기 가이드 서열은 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계;
- [0416] 표적 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 서열의 DNA/RNA 듀플렉스의 용융 온도(T_m)를 계산하는 단계; 및
- [0417] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- [0418] T_m의 10℃ 이내, 대안적으로 T_m의 5℃ 이내 온도에서, 대안적으로 대략 T_m에서 gRNA:Cas 단백질 복합체와 표적 폴리뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계; 및
- [0419] 접촉에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계.
- [0420] F1. 하기 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법:
- [0421] 계놈에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0422] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공 및/또는 설계하는 단계로서;
- [0423] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0424] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0425] 상기 가이드 서열이 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계; 표적 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 서열의 DNA/RNA 듀플렉스의 용융 온도(T_m)가 25℃ 내지 49℃이도록 상기 변형 또는 변형들의 조합을 선택하는 단계;
- [0426] Cas 단백질 및 설계된 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- [0427] T_m의 12℃ 이내, 대안적으로 T_m의 8℃ 이내, 대안적으로 T_m의 5℃ 이내 온도에서, 대안적으로 대략 T_m에서 gRNA:Cas 단백질 복합체와 표적 폴리뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계; 및
- [0428] 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계.
- [0429] G1. 하기 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법:
- [0430] 계놈에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0431] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공 및/또는 설계하는 단계로서;

- [0432] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0433] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0434] 상기 가이드 서열은 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계;
- [0435] 표적 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 서열의 DNA/RNA 듀플렉스의 용융 온도(T_m)가 미변형된 gRNA/표적 듀플렉스의 T_m 보다 적어도 0.5 내지 1°C 더 낮은, 또는 적어도 1 내지 3°C 더 낮은 또는 적어도 1 내지 12°C 더 낮은 정도로 상기 변형 또는 변형들의 조합을 가이드 서열에서 선택 또는 포함하는 단계; 및
- [0436] Cas 단백질 및 설계된 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- [0437] T_m 의 12°C 이내, 대안적으로 T_m 의 8°C 이내, 대안적으로 T_m 의 5°C 이내 온도에서, 대안적으로 대략 T_m 에서 gRNA:Cas 단백질 복합체와 표적 폴리뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계; 및
- [0438] 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계.
- [0439] EFG2. 이전의 구현에 E1, F1 또는 G1 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 방법.
- [0440] EFG3. 구현에 E1, F1 또는 G1 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0441] EFG4. 구현에 E1, F1 또는 G1 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 강화시키고 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0442] H1. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 시험관내 발생하는, 방법.
- [0443] H2. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 세포에서 발생하는, 방법.
- [0444] H3. 구현에 H2에 있어서, 세포가 gRNA:Cas 단백질 복합체와 표적 폴리뉴클레오타이드의 접촉에 앞서 다중세포 공급원으로부터 단리되는, 방법.
- [0445] H4. 구현에 H3에 있어서, 공급원이 식물, 동물, 다중세포 원생생물, 또는 진균인, 방법.
- [0446] H5. 구현에 H2 내지 H4 중 어느 하나에 있어서, 세포, 또는 거기에서 유래된 세포가 gRNA:Cas 단백질 복합체와 표적 폴리뉴클레오타이드의 접촉 후 공급원에 되돌아오는, 방법.
- [0447] H6. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 생체내 발생하는, 방법.
- [0448] H7. 이전의 구현에의 임의의 구현에 중 어느 하나에 있어서, Cas 단백질이 Cas9인, 방법.
- [0449] H8. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 절단 또는 니킹이 유전자 편집을 초래하는, 방법.
- [0450] H9. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 유전자 발현의 변경을 초래하는, 방법.
- [0451] H10. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 표적 유전자의 기능적 녹아웃을 초래하는, 방법.
- [0452] H11. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 외인성 또는 내인성 주형 폴리뉴클레오타이드로 상동 지정 복구에 의해 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드를 복구하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0453] H12. 구현에 H11에 있어서, 외인성 또는 내인성 주형 폴리뉴클레오타이드가 절단 부위의 어느 한측에서 서열과 실질적 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 서열을 포함하는, 방법.
- [0454] H13. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 비-상동성 말단 연결에 의해 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드를 복구하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0455] H14. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 복구 단계가 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실, 또는 치환을 생산하는, 방법.
- [0456] H15. 구현에 H14에 있어서, 삽입, 결실, 또는 치환이 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자로부터 발현된

단백질에서 하나 이상의 아미노산 변화를 초래하는, 방법.

- [0457] I1. 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 2 이상의 합성 가이드 RNA를 포함하는, 합성 가이드 RNA 분자의 세트 또는 라이브러리.
- [0458] J1. 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 합성 가이드 RNA, 및 하나 이상의 다른 성분을 포함하는, 키트.
- [0459] K1. 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 2 이상의 합성 가이드 RNA를 포함하는, 다수의 RNA 분자.
- [0460] L1. 양쪽 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절을 포함하는 단일 RNA 가닥을 포함하는, 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0461] L2. 2개의 RNA 가닥을 포함하는, 그리고 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 상이한 RNA 가닥인, 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0462] L3. 합성 가이드 RNA가 단일-가이드 RNA이고, crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 루프 L을 통해 연결되는, 이전의 구현예 중 어느 하나에 따른 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0463] L4. 구현예 L3에 있어서, 루프 L이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 뉴클레오타이드를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0464] L5. 구현예 L3 또는 L4에 있어서, 루프 L이 GNRA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, N이 A, C, G, 또는 U를 표시하고 R이 A 또는 G를 표시하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0465] L6. 구현예 L3 내지 L5 중 어느 하나에 있어서, 루프 L이 GAAA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0466] L7. 구현예 L3 내지 L6 중 어느 하나에 있어서, 루프 L이 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0467] L8. 구현예 L3 내지 L7 중 어느 하나에 있어서, 루프 L이 형광성 염료를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0468] L9. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 동위원소 표지를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0469] L10. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 형광성 표지를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0470] L11. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트 (2'-O-메틸-3'-PACE) 뉴클레오타이드를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0471] L12. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2-티오U를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0472] L13. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 6-티오G를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0473] L14. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2-티오C를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0474] L15. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노푸라노실 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0475] L16. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-데옥시-2'-플루오로리보푸라노실 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0476] L17. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-페닐 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0477] L18. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-티오페닐 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.

- [0478] L19. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-S-티오페닐 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0479] L20. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-메틸 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0480] L21. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-에틸 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0481] L22. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-프로필 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0482] L23. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-알릴 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0483] L24. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-알릴페닐 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0484] L25. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-메틸하이드록시 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0485] L26. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-메틸옥시메틸 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0486] L27. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-카바메이트 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0487] L28. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-에틸아미노 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0488] L29. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-알릴아미노 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0489] L30. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-프로필아미노 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0490] L31. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA가 하나 이상의 2'-O-치환된 페닐 리보오스를 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0491] L32. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 합성 가이드 RNA의 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, N이 -10 내지 10(임의로 -10 내지 6)의 정수인, 뉴클레오타이드 1 내지 20-N으로 구성되고, 뉴클레오타이드 6-N 내지 14-N의 영역이 특이성-향상 변형(들)을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 세트 또는 라이브러리, 키트 또는 어레이.
- [0492] M1. 하기 단계를 포함하는, 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법:
- [0493] 표적 폴리뉴클레오타이드 이내 HBB 유전자좌에서 표적 서열을 선택하는 단계;
- [0494] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계로서;
- [0495] (a) (i) 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0496] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0497] 상기 가이드 서열은, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 가이드 서열은 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 및 16-N으로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계; 및
- [0498] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- [0499] 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계; 및

- [0500] 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계.
- [0501] M2. 구현예 M1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 11-N에서인, 방법.
- [0502] M3. 구현예 M1 또는 M2 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 5-N에서인, 방법.
- [0503] M4. 구현예 M1 내지 M3 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 7-N에서인, 방법.
- [0504] M5. 구현예 M1 내지 M4 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 10-N에서인, 방법.
- [0505] M6. 구현예 M1 내지 M5 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 9-N에서인, 방법.
- [0506] M7. 구현예 M1 내지 M6 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 4-N에서인, 방법.
- [0507] M8. 구현예 M1 내지 M7 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 가진 변형을 포함하는, 방법.
- [0508] M9. 구현예 M1 내지 M7 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 펌퍼, 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형, 및 이들의 조합을 부여하는 2'-변형으로부터 선택되는, 방법.
- [0509] M10. 구현예 M9에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 방법.
- [0510] M11. 구현예 M1 내지 M10 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 시험관내 발생하는, 방법.
- [0511] M12. 구현예 M1 내지 M10 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 세포에서 발생하는, 방법.
- [0512] M13. 구현예 M1 내지 M12 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이 그것의 5'말단, 3'말단, 또는 양쪽에서 변형, 임의로 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트(FP), 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트(FSP), 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트(FS), 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 안정성-향상 변형을 추가로 포함하는, 방법.
- [0513] M14. 구현예 M1 내지 M13 중 어느 하나에 있어서, Cas 단백질이 Cas9 또는 Cpf1인, 방법.
- [0514] M15. 구현예 M1 내지 M14 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 방법.
- [0515] M16. 구현예 M1 내지 M15 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 절단시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0516] M17. 구현예 M1 내지 M15 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 니킹시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0517] M18. 구현예 M1 내지 M15 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0518] M19. 구현예 M1 내지 M18 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 방법의 특이성을 증가시키는, 방법.
- [0519] N1. 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA로서:
- [0520] (a) (i) 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0521] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0522] 상기 가이드 서열은, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 가이드 서열은 위치 4-

N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 및 16-N으로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하고, 상기 합성 가이드 RNA가 gRNA 기능을 갖는, 합성 가이드 RNA.

- [0523] N2. 구현예 N1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 11-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0524] N3. 구현예 N1 또는 N2에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 5-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0525] N4. 구현예 N1 내지 N3 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 7-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0526] N5. 구현예 N1 내지 N4 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 10-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0527] N6. 구현예 N1 내지 N5 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 9-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0528] N7. 구현예 N1 내지 N6 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 4-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0529] N8. 구현예 N1 내지 N7 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0530] N9. 구현예 N1 내지 N8 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커, 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형, 및 이들의 조합을 부여하는 2'-변형으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0531] N10. 구현예 N9에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0532] N11. 구현예 N1 내지 N10 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0533] N12. 구현예 N1 내지 N10 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0534] N13. 구현예 N1 내지 N10 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 강화시키고 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0535] N14. 구현예 N1 내지 N13 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 합성 가이드 RNA.
- [0536] N15. 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20으로 구성되는, 구현예 N1 내지 N14 중 어느 하나에 따른, 방법.
- [0537] 01. 하기 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법:
- [0538] 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0539] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계로서;
- [0540] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0541] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0542] 상기 가이드 서열은, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 가이드 서열은 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 및 16-N으로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계; 및
- [0543] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- [0544] 표적 폴리뉴클레오타이드를 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계; 및

- [0545] 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계.
- [0546] 02. 구현예 01에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 VEGFA 폴리뉴클레오타이드, IL2RG 폴리뉴클레오타이드, CLTA1 폴리뉴클레오타이드, 및 CLTA4 폴리뉴클레오타이드로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0547] 03. 구현예 01 또는 02에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형 뉴클레오타이드 11-N에서인, 방법.
- [0548] 04. 구현예 01 내지 03 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형 뉴클레오타이드 5-N에서인, 방법.
- [0549] 05. 구현예 01 내지 04 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 7-N에서인, 방법.
- [0550] 06. 구현예 01 내지 05 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 10-N에서인, 방법.
- [0551] 07. 구현예 01 내지 06 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 9-N에서인, 방법.
- [0552] 08. 구현예 01 내지 07 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 4-N에서인, 방법.
- [0553] 09. 구현예 01 내지 08 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 가진 변형을 포함하는, 방법.
- [0554] 010. 구현예 01 내지 08 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함하는, 방법.
- [0555] 011. 구현예 010에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 방법.
- [0556] 012. 구현예 01 내지 011 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 방법의 특이성을 증가시키는, 방법.
- [0557] 013. 구현예 01 내지 012 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 시험관내 발생하는, 방법.
- [0558] 014. 구현예 01 내지 012 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 세포에서 발생하는, 방법.
- [0559] 015. 구현예 01 내지 014 중 어느 하나에 있어서, Cas 단백질이 Cas9 또는 Cpf1인, 방법.
- [0560] 016. 구현예 01 내지 015 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 방법.
- [0561] 017. 구현예 01 내지 016 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 절단시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0562] 018. 구현예 01 내지 016 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 니킹시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0563] 019. 구현예 01 내지 016 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0564] 020. 구현예 01 내지 019 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20으로 구성되는, 방법.
- [0565] P1. 하기 단계를 포함하는, 합성 가이드 RNA로서:
 - [0566] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
 - [0567] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0568] 가이드 서열이, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 가이드 서열은 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 및 16-N으로부터 선택되는 뉴클레오타이드에서 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하고, 합성 가이드 RNA가 gRNA 기능성을 갖는, 합성 가이드 RNA.

- [0569] P2. 구현예 P1에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 VEGFA 폴리뉴클레오타이드, IL2RG 폴리뉴클레오타이드, CLTA1 폴리뉴클레오타이드, 및 CLTA4 폴리뉴클레오타이드로 구성되는 군으로부터 선택되는, 합성 가이드.
- [0570] P3. 구현예 P1 또는 P2에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 11-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0571] P4. 구현예 P1 내지 P3 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 5-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0572] P5. 구현예 P1 내지 P4 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 7-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0573] P6. 구현예 P1 내지 P5 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 10-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0574] P7. 구현예 P1 내지 P6 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 9-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0575] P8. 구현예 P1 내지 P7 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 뉴클레오타이드 4-N에서인, 합성 가이드 RNA.
- [0576] P9. 구현예 P1 내지 P8 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0577] P10. 구현예 P1 내지 P9 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0578] P11. 구현예 P10에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0579] P12. 구현예 P1 내지 P11 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0580] P13. 구현예 P1 내지 P12 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0581] P14. 구현예 P1 내지 P13 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 강화시키고 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0582] P15. 구현예 P1 내지 P14 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 합성 가이드 RNA.
- [0583] P16. 구현예 P1 내지 P15 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20으로 구성되는, 합성 가이드 RNA.
- [0584] Q1. 하기 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합 방법으로서:
- [0585] 계놈에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0586] 하기를 포함하는 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계로서:
- [0587] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0588] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0589] 상기 가이드 서열은 2개 이상의 연속 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계; 및
- [0590] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- [0591] 표적 폴리뉴클레오타이드를 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계; 및
- [0592] 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계,
- [0593] 상기 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를

약화시키는, 방법.

- [0594] Q2. 구현예 Q1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1 및 2에서 변형을 포함하는, 방법.
- [0595] Q3. 구현예 Q1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 및 3에서 변형을 포함하는, 방법.
- [0596] Q4. 구현예 Q1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 및 4에서 변형을 포함하는, 방법.
- [0597] Q5. 구현예 Q1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 4, 및 5에서 변형을 포함하는, 방법.
- [0598] Q6. 구현예 Q1에 있어서, 가이드 서열이 5' 말단에서 연속 특이성-향상 변형을 포함하는, 방법.
- [0599] Q7. 구현예 Q1에 있어서, 연속 특이성-향상 변형이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 또는 4에서 개시하는, 방법.
- [0600] Q8. Q1 내지 Q7 중 어느 하나에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 폴리뉴클레오타이드, VEGFA 폴리뉴클레오타이드, IL2RG 폴리뉴클레오타이드, CLTA1 폴리뉴클레오타이드, 및 CLTA4 폴리뉴클레오타이드로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0601] Q9. Q1 내지 Q8 중 어느 하나에 있어서, 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0602] Q10. Q1 내지 Q8 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함하는, 방법.
- [0603] Q11. 구현예 Q10에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 방법.
- [0604] Q12. 구현예 Q1 내지 Q11 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 시험관내 발생하는, 방법.
- [0605] Q13. 구현예 Q1 내지 Q11 중 어느 하나에 있어서, 절단, 니킹 또는 결합이 세포에서 발생하는, 방법.
- [0606] Q14. 구현예 Q1 내지 Q13 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 절단시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0607] Q15. 구현예 Q1 내지 Q13 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 니킹시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0608] Q16. 구현예 Q1 내지 Q13 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0609] Q17. 구현예 Q1 내지 Q16 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 방법.
- [0610] Q18. 구현예 Q1 내지 Q17 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20을 포함하거나 상기로 구성되는, 방법.
- [0611] R1. 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA로서:
- [0612] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0613] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0614] 가이드 서열이 2개 이상의 연속 특이성-향상 변형을 포함하고 합성 가이드 RNA가 gRNA 기능성을 포함하고;
- [0615] 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0616] R2. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1 및 2에서 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.

- [0617] R3. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 및 3에서 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0618] R4. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 및 4에서 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0619] R5. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 4, 및 5에서 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0620] R6. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 5' 말단에서 연속 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0621] R7. 구현예 R1에 있어서, 연속 특이성-향상 변형이 가이드 서열의 5'-말단부터 카운팅된 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 또는 4에서 개시하는, 합성 가이드 RNA.
- [0622] R8. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 3개의 연속 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0623] R9. 구현예 R1에 있어서, 가이드 서열이 4개의 연속 특이성-향상 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0624] R10. 구현예 R1 내지 R9 중 어느 하나에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 폴리뉴클레오타이드, VEGFA 폴리뉴클레오타이드, IL2RG 폴리뉴클레오타이드, CLTA1 폴리뉴클레오타이드, 및 CLTA4 폴리뉴클레오타이드로 구성되는 군으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0625] R11. 구현예 R1 내지 R10 중 어느 하나에 있어서, 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0626] R12. 구현예 R1 내지 R10 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커, 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형, 및 이들의 조합을 부여하는 2'-변형으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0627] R13. 구현예 R12에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0628] R14. 구현예 R1 내지 R13 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0629] R15. 구현예 R1 내지 R13 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0630] R16. 구현예 R1 내지 R13 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 가이드 서열과 표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 강화시키고 가이드 서열과 오프-표적 폴리뉴클레오타이드 사이 하이브리드화를 약화시키는, 합성 가이드 RNA.
- [0631] R17. 구현예 R1 내지 R16 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 합성 가이드 RNA.
- [0632] R18. 구현예 R1 내지 R17 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 20을 포함하거나 상기로 구성되는, 방법.
- [0633] S1. 하기 단계를 포함하는, 합성 가이드 RNA의 선택 방법:
- [0634] 각각 하기를 포함하는, 적어도 제1 합성 가이드 RNA 및 제2 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계로서:
- [0635] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0636] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0637] 각각의 상기 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고,
- [0638] 상기 제1 합성 가이드 RNA는 가이드 서열 이내 제1 위치에 특이성-향상 변형을 포함하고, 제2 합성 가이드 RNA는 가이드 서열 이내 제2 위치에서 특이성-향상 변형을 포함하는, 단계;

- [0639] Cas 단백질 및 제1 합성 가이드 RNA를 포함하는 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계, 표적 폴리뉴클레오타이드를 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계, 및 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계;
- [0640] Cas 단백질 및 제2 합성 가이드 RNA를 포함하는 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계, 표적 폴리뉴클레오타이드를 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계, 및 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계;
- [0641] 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 니킹 또는 결합에서 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체 및 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체의 특이성을 결정하는 단계;
- [0642] 제1 gRNA:Cas 단백질 복합체 및 제2 gRNA:Cas 단백질 복합체가 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 더 큰 특이성을 갖는지를 확인하는 단계.
- [0643] S2. 구현예 S1에 있어서, 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0644] S3. 구현예 S2에 있어서, 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 또는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)를 포함하는, 방법.
- [0645] S4. 구현예 S1에 있어서, 하나 이상의 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함하는, 방법.
- [0646] S5. 구현예 S4에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 방법.
- [0647] S6. 구현예 S1 내지 S5 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 합성 가이드 RNA가 상이한 뉴클레오타이드에서 특이성-향상 변형을 포함하는, 방법.
- [0648] S7. 구현예 S1 내지 S6 중 어느 하나에 있어서, 특이성이 온 및/또는 오프 표적 절단, 결합, 또는 니킹 백분율, 온: 오프 비, 특이성 스코어, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.
- [0649] S8. 구현예 S1 내지 S7 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 가이드 서열 부분에서 상이한 뉴클레오타이드 위치에 특이성-향상 변형을 포함하는 제1 내지 제20 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계, 각각의 합성 가이드 RNA를 사용하여 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계, 표적 폴리뉴클레오타이드를 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계, 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단, 니킹 또는 결합시키는 단계 및 각각의 합성 가이드 RNA의 특이성을 측정하는 단계, 그리고 가장 큰 특이성 향상을 제공하는 하나 이상의 변형된 위치를 확인하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0650] S9. 구현예 S1 내지 S8 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이 5' 말단 및 3' 말단에 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트(FP), 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트(FSP), 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트(FS), 또는 이들의 조합을 갖는 변형을 추가로 포함하는, 방법.
- [0651] S10. 구현예 S1 내지 S9 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 절단시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0652] S11. 구현예 S1 내지 S9 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 니킹시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0653] S12. 구현예 S1 내지 S9 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 표적 HBB 폴리뉴클레오타이드를 결합시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0654] S13. 구현예 S1 내지 S12 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 방법.
- [0655] T1. 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA의 선택용 키트:
- [0656] 하기를 포함하는 2개 이상의 합성 가이드 RNA로서:
- [0657] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분

절; 및

- [0658] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0659] 상기 가이드 서열은, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고, 가이드 서열에서 뉴클레오타이드에 하나 이상의 특이성-향상 변형을 포함하고; 여기서 상기 2개 이상의 합성 가이드 RNA는 가이드 서열에서 하나 이상의 상이한 위치에 특이성-향상 변형을 가짐으로써 또는 하나 이상의 상이한 특이성-향상 변형을 가짐으로써 서로 상이한, 2개 이상의 합성 가이드 RNA; 및
- [0660] Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- [0661] T2. 구현에 T1에 있어서, 상기 키트가 적어도 20 합성 가이드 RNA를 포함하는, 키트.
- [0662] T3. 구현에 T1 또는 T2에 있어서, Cas 단백질이 Cas9 또는 Cpf1인, 키트.
- [0663] T4. 구현에 T1 내지 T3 중 어느 하나에 있어서, 특이성-향상 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP), 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 또는 2'-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP)를 포함하는, 키트.
- [0664] T5. 구현에 T1 내지 T3 중 어느 하나에 있어서, 특이성-향상 변형이 C3'-엔도 당 퍼커 및 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트 결합 변형을 부여하는 2'-변형을 포함하는, 키트.
- [0665] T6. 구현에 T5에 있어서, 2'-변형이 2'-F 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 키트.
- [0666] T7. 구현에 T1 내지 T6 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 합성 단일 가이드 RNA인, 키트.
- [0667] U1. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, gRNA:Cas 단백질 복합체가 특이성-향상 변형을 포함하고 1 초과, 바람직하게는 적어도 1.1, 더 바람직하게는 적어도 1.5, 더욱더 바람직하게는 적어도 2, 더욱더 바람직하게는 적어도 5, 더욱더 바람직하게는 적어도 10, 또는 최적으로 적어도 20의 특이성 스코어를 갖는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0668] U2. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, gRNA:Cas 단백질 복합체가 특이성-향상 변형을 포함하고 약 2 내지 약 60 또는 바람직하게는 약 10 내지 약 60의 특이성 스코어를 갖는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0669] U3. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, gRNA:Cas 단백질 복합체가 특이성-향상 변형을 포함하고 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 70%, 또는 최적으로 적어도 90%의 온 표적 절단을 갖는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0670] U4. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, gRNA:Cas 단백질 복합체가 특이성-향상 변형을 포함하고 약 25% 내지 99.9% 또는 바람직하게는 약 50% 내지 약 99.9%의 온 표적 절단을 갖는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0671] U5. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, gRNA:Cas 단백질 복합체가 특이성-향상 변형을 포함하고 1 초과, 바람직하게는 적어도 1.1:1, 더 바람직하게는 적어도 1.5:1, 더욱더 바람직하게는 적어도 3:1, 더욱더 바람직하게는 적어도 10:1, 더욱더 바람직하게는 적어도 20:1, 또는 최적으로 적어도 40:1의 온:오프 비를 갖는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0672] U6. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, gRNA:Cas 단백질 복합체가 특이성-향상 변형을 포함하고 약 1.5:1 내지 약 99.9:1 또는 바람직하게는 약 10:1 내지 약 99.9:1의 온:오프 비를 갖는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0673] W1. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 19로 구성되고, 위치 3, 4, 6, 8, 9, 및 10으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 중 하나에 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0674] W2. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 18로 구성되고, 위치 2, 3, 5, 7, 8, 및 9로부터 선택되는 뉴클레오타이드 중 하나에 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0675] W3. 이전의 구현에 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 17로 구성되고, 위치 1, 2, 4, 6, 7, 및 8로부터 선택되는 뉴클레오타이드 중 하나에 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.

- [0676] W4. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 16으로 구성되고, 위치 뉴클레오타이드 1, 3, 5, 6, 및 7로부터 선택되는 하나에 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0677] W5. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 15로 구성되고, 위치 2, 4, 5, 및 6으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 중 하나에 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0678] W6. 이전의 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열이, 가이드 서열의 5' 말단부터 카운팅된, 뉴클레오타이드 1 내지 14로 구성되고, 위치 1, 3, 4, 또는 5로부터 선택되는 뉴클레오타이드에 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA, 방법, 또는 키트.
- [0679] 아래 예시적 구현예에서, "X 구현예"는 수가 X로 시작하는 것의 모든 구현예를 의미한다. 마찬가지로, 아래 예시적 구현예에서, "X_n 구현예"은 수가 X_n으로 시작하는 것의 모든 구현예를 의미한다. 예로써, 임의의 청구항에서 인용된 바와 같이, "X9 구현예"는 현존하면 "X9", 및 "X9a" 최대 "X9z"를 의미한다.
- [0680] X. 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA로서:
- [0681] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드가 PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0682] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0683] 상기 가이드 서열이, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고;
- [0684] 상기 가이드 서열이 하나 이상의 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0685] X1. (i) 표적 폴리뉴클레오타이드가 PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, 및 (ii) 줄기 서열을 포함하는 합성 crRNA로서;
- [0686] 상기 가이드 서열이, N이 -10 내지 10의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고;
- [0687] 상기 가이드 서열이 하나 이상의 변형을 포함하는, 합성 crRNA.
- [0688] X1a. 구현예 X 또는 X1에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 1-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0689] X1b. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 2-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0690] X1c. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 3-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA
- [0691] X2. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 4-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0692] X3. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 5-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0693] X3a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 6-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0694] X4. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 7-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0695] X4a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 8-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0696] X5. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 9-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0697] X6. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 10-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.

- [0698] X7. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 11-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0699] X7a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 12-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0700] X7b. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 13-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0701] X7c. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 14-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0702] X7d. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 15-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0703] X7e. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 16-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0704] X7f. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 17-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0705] X7g. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 18-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0706] X7h. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 19-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0707] X7i. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 20-N에 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0708] X8. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 임의로 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P)을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0709] X8a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 포스포노카복실레이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 임의로 포스포노아세테이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0710] X8b. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 포스포노프로피오네이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0711] X9. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합, 임의로 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP)을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0712] X9a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 티오포스포노프로피오네이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0713] X9b. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 티오포스포노카복실레이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합, 임의로 티오포스포노아세테이트 에스테르 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0714] X9c. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0715] X9d. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 키랄 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0716] X9e. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 포스포로디티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0717] X9f. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 보라노포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결

합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.

- [0718] X9g. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 C₁₋₄ 알킬 포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0719] X9h. X9g 구현예에 있어서, 하나 이상의 변형이 메틸포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0720] X9i. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 메틸티오포스포네이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0721] X10. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 변형된 당을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0722] X10a. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-데옥시리보오스(2'-데옥시)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0723] X10b. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-NH₂인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0724] X10c. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-아라비노푸라노실(2'-아라비노)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0725] X10d. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노푸라노실(2'-F-아라비노)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0726] X10e. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-LNA인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0727] X10f. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-ULNA인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0728] X10g. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 4'-티오리보실인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0729] X10h. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-C₁₋₄알킬인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0730] X10i. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-C₁₋₃알킬-O-C₁₋₃알킬인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0731] X10j. 구현예 X10에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-페닐, 2'-티오페닐, 2'-S-티오페닐, 2'-메틸, 2'-에틸, 2'-프로필, 2'-알릴, 2'-알릴페닐, 2'-메틸하이드록시, 2'-메틸옥시메틸, 2'-O-카바메이트, 2'-O-에틸아미노, 2'-O-알릴아미노, 2'-O-프로필아미노, 및 2'-O-치환된 페닐로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0732] X10k. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 C3'-엔도 당 퍼커 배치형태를 부여하는 2'-변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0733] X11. 구현예 X10k에 있어서, 상기 2'-변형이 2'-O-메틸, 2'-플루오로, 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0734] X11a. 구현예 X11에 있어서, 상기 2'-변형이 2'-O-메틸인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0735] X11b. 구현예 X11에 있어서, 상기 2'-변형이 2'-데옥시-2'-플루오로리보푸라노실(2'-플루오로)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0736] X11c. 구현예 X11에 있어서, 상기 2'-변형이 2'-O-(2-메톡시에틸)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0737] X12. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP)를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0738] X13. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0739] X14. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 2'-O-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP)를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0740] X15. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 2'-O-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP)를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.

- [0741] X16. 구현예 X 또는 X1에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 4-N 내지 20-N으로부터 임의의 위치에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하고, 상기 변형이 가이드 서열의 위치 15-N에서가 아닌, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0742] X16a. 구현예 X 또는 X1에 있어서, 하나 이상의 변형이 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하고 위치 15-N이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 또는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)를 포함하지 않는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0743] X17. 구현예 X, X1, X16 및 X16a 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 4-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0744] X18. 구현예 X, X1, 및 X16 내지 X17 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 5-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0745] X19. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X18 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 6-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0746] X20. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X19 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 7-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0747] X21. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X20 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 8-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0748] X22. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X21 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 9-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0749] X23. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X22 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 10-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0750] X24. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X23 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 11-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0751] X25. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X24 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 12-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0752] X26. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X25 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 13-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0753] X27. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X26 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 14-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0754] X27a. 구현예 X, X1 및 X16a 내지 X26 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 15-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0755] X28. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X27 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 16-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드

RNA 또는 crRNA.

- [0756] X29. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X28 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 17-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0757] X30. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X29 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 18-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0758] X31. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X30 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 19-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0759] X32. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X31 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 20-N에 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0760] X33. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X32 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0761] X34. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X32 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0762] X35. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X33 중 어느 하나에 있어서, 상기 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합이 포스포노아세테이트 결합(P)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0763] X36. 구현예 X, X1 및 X16 내지 X33 중 어느 하나에 있어서, 상기 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합이 티오포스포노아세테이트 결합(SP)인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0764] X37. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 RNA의 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0765] X38. 구현예 X37에 있어서, 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸(M), 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합(S), 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 2'-O-메틸-3'-포스포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포스포노아세테이트(MSP) 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0766] X38a. 구현예 X37에 있어서, 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 상기 하나 이상의 변형이 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP), 2'-O-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP), 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0767] X39. 구현예 X 내지 X38a 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 폴리뉴클레오타이드 이 내 위치하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0768] X40. 구현예 X 내지 X38a 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 IL2RG 폴리뉴클레오타이드 이 내 위치하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0769] X41. 구현예 X 내지 X38a 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 VEGFA 폴리뉴클레오타이드 이 내 위치하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0770] X42. 구현예 X 내지 X38a 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 CLTA1 폴리뉴클레오타이드 이 내 위치하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0771] X43. 구현예 X 내지 X38a 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 CLTA4 폴리뉴클레오타이드 이 내 위치하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0772] X44. 구현예 X39에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 GCCCCACAGGGCAGTAA를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.

- [0773] X45. 구현예 X40에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 TAATGATGGCTTCAACA를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0774] X46. 구현예 X41에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 GAGTGAGTGTGTGCGTG를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0775] X47. 구현예 X42에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 CCTCATCTCCCTCAAGC를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0776] X48. 구현예 X43에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 GATGTAGTGTTCACAA를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0777] X48a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 변형된 염기를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0778] X48b. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노퓨린, 슈도우라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐우라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴U, 5-아미노알릴C, 무염기성 뉴클레오타이드, UNA 염기, 이소C, 이소G, 5-메틸-피리미딘, x(A,G,C,T,U), y(A,G,C,T,U), 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0779] X48c. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U 및 6-티오G로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0780] X48d. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 2-아미노A 및 2-아미노퓨린으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0781] X48e. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 슈도우라실 및 하이포잔틴으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0782] X48f. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 이노신인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0783] X48g. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 및 7-데아자-8-아자아데닌으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0784] X48h. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 5-메틸-시토신, 5-메틸-우라실 및 5-메틸-피리미딘으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0785] X48i. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸우라실, 5,6-데하이드로우라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐우라실, 5-에틸닐시토신 및 5-에틸닐우라실로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0786] X48j. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 5-알릴우라실, 5-알릴시토신, 5-아미노알릴우라실 및 5-아미노알릴시토신으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0787] X48k. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 무염기성 뉴클레오타이드인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0788] X48l. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 이소C 및 이소G로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0789] X48m. 구현예 X48a에 있어서, 변형된 염기가 UNA 염기인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA.
- [0790] X49. 하기 단계를 포함하는, CRISPR 기능의 특이성의 향상 방법:
- [0791] 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0792] 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 따라 하나 이상의 합성 가이드 RNA 또는 crRNA를 제공하는 단계;
- [0793] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA 또는 crRNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계; 및
- [0794] 표적 폴리뉴클레오타이드와 가이드 RNA 또는 crRNA 사이 하이브리드화, 뿐만 아니라 CRISPR 기능의 수행을 초래하기 위한 조건 하에서 gRNA:Cas 단백질 복합체와 표적 폴리뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계.

- [0795] X49a. 하기 단계를 포함하는, CRISPR 기능의 특이성의 향상 방법:
- [0796] 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0797] 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 따라 하나 이상의 합성 crRNA를 제공하는 단계;
- [0798] Cas 단백질 및 합성 crRNA를 포함하는 crRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계; 및
- [0799] 표적 폴리뉴클레오타이드를 crRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계.
- [0800] X49b. CRISPR 기능의 특이성의 분석 방법으로서, 상기 방법이 하기 단계를 포함하는, 방법:
- [0801] (1) 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드; 및 (2) 오프-표적 서열을 포함하는 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 샘플을 제공하는 단계;
- [0802] 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 따라 하나 이상의 합성 가이드 RNA 또는 crRNA를 표적 서열에 제공하는 단계;
- [0803] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA 또는 crRNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계로서, 여기서 상기 Cas 단백질이 단백질로서 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로서 제공되는, 단계;
- [0804] 상기 gRNA 또는 crRNA의 상기 표적 폴리뉴클레오타이드에의 하이브리드화 및 CRISPR 기능의 수행을 초래하기 위한 조건 하에서 gRNA:Cas 단백질 복합체와 샘플을 접촉시키는 단계;
- [0805] 올리고뉴클레오타이드 미끼의 라이브러리를 첨가하는 단계로서, 상기 미끼가, 표적 폴리뉴클레오타이드 및 상기 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하기 위해, 하나 이상의 오프-표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하도록 설계된 미끼 그리고 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하도록 설계된 미끼를 포함하는, 단계;
- [0806] 상기 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드 및 상기 포획된 오프-표적 폴리뉴클레오타이드를 분리 및 분석하여 CRISPR 기능에 의해 야기된 변화를 확인하고, 표적 폴리뉴클레오타이드 및 오프-표적 폴리뉴클레오타이드에서 상대적 변화를 결정하여, 그렇게 함으로써 상기 CRISPR 기능의 특이성을 평가하는 단계.
- [0807] X49c. 구현예 X49b에 있어서, 상기 샘플이 각각의 표적 서열을 포함하는 2 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.
- [0808] X49d. 구현예 X49b에 있어서, 상기 가이드 RNA가 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 따라 합성 crRNA이고 상기 gRNA:Cas 단백질 복합체가 crRNA:Cpf1 복합체인, 방법.
- [0809] X50. X49 구현예 중 어느 하나에 있어서, 접촉이 세포에서 수행되는, 방법.
- [0810] X51. 구현예 X50에 있어서, 세포가 1차 세포인, 방법.
- [0811] X52. 구현예 X49 내지 X51 중 어느 하나에 있어서, Cas 단백질이 단백질로서 또는 Cas 단백질을 발현시키는 폴리뉴클레오타이드로서 제공되는, 방법.
- [0812] X52a. 구현예 X49 내지 X52 중 어느 하나에 있어서, Cas 단백질이 Cas9인, 방법.
- [0813] X52b. 구현예 X49 내지 X52 중 어느 하나에 있어서, Cas 단백질이 Cpf1인, 방법.
- [0814] X53. X52 구현예 중 어느 하나에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 mRNA인, 방법.
- [0815] X54. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 상기 형성이 세포의 외부에서 수행되는, 방법.
- [0816] X55. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, CRISPR 기능이 유전자 편집인, 방법.
- [0817] X55a. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, CRISPR 기능이 유전자 편집이고 상동 지정 복구용 공여체 주형으로서 단일-가닥 또는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 방법.
- [0818] X56. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, CRISPR 기능이 CRISPRa인, 방법.
- [0819] X57. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, CRISPR 기능이 CRISPRi인, 방법.
- [0820] X57a. 포획된 폴리뉴클레오타이드를 분석하는 단계를 포함하는 구현예 X55 내지 X57 중 어느 하나에 있어서, 분석이 서열분석에 의해 수행되는, 방법.
- [0821] X57b. 구현예 X56 또는 X57에 있어서 유전자 발현 수준 측정에 의해, 임의로 qRT-PCR에 의해 상기 CRISPR 기능

을 분석하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

- [0822] X57c. 구현예 X57b에 있어서 유전자 발현 수준의 상기 측정이 마이크로어레이에서 수행되는, 방법.
- [0823] X58. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, CRISPR 기능이 유전자 발현의 조절인, 방법.
- [0824] X59. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 0이고, 가이드 서열이 20 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0825] X60. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 1이고, 가이드 서열이 19 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0826] X61. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 2이고, 가이드 서열이 18 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0827] X62. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 3이고, 가이드 서열이 17 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0828] X63. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 4이고, 가이드 서열이 16 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0829] X64. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 5이고, 가이드 서열이 15 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0830] X65. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 -1이고, 가이드 서열이 21 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0831] X66. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 -2이고, 가이드 서열이 22 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0832] X67. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 -3이고, 가이드 서열이 23 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0833] X68. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 -4이고, 가이드 서열이 24 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0834] X69. 구현예 X 내지 X58 중 어느 하나에 있어서, N이 -5이고, 가이드 서열이 25 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0835] X70. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 10 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0836] X71. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 9 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0837] X72. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 8 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0838] X73. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 7 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0839] X74. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 6 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0840] X75. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 5 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0841] X76. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 4 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0842] X77. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 3 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0843] X78. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열에서 2 이하 뉴클레오타이드가 변형을 포함하는, 합

성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.

- [0844] X79. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열의 제1 4 뉴클레오타이드가 모두 변형되면, 이들이 동일한 방식으로 변형되지 않는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0845] X80. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 서열의 제1 5 뉴클레오타이드가 모두 변형되면, 이들이 동일한 방식으로 변형되지 않는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0846] X81. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA인, 합성 가이드 RNA 또는 방법.
- [0847] X82. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 가이드 RNA가 변형 없이 상응하는 가이드 RNA보다 더 높은 gRNA 기능성 또는 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 더 높은 특이성을 갖는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0848] X83. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 2개 이상의 상이한 합성 가이드 RNA가 2개의 상이한 표적 폴리뉴클레오타이드에 대하여 제공되는, 방법.
- [0849] X84. 구현예 X83에 있어서, 2개의 상이한 표적 폴리뉴클레오타이드가 동일한 유전자에서 위치하는, 방법.
- [0850] X85. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, N이 -10 내지 6이고, 가이드 서열이 14 내지 30 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0851] X86. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, N이 -5 내지 6이고, 가이드 서열이 14 내지 25 뉴클레오타이드로 구성되는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0852] X87. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, N이 -4 내지 3이고, 가이드 서열이 17 내지 24 뉴클레오타이드인, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0853] X88. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP)를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0854] X89. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형이 2'-O-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP)를 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0855] X90. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 2'-데옥시-3'-포스포노아세테이트(DP)를 포함하는, 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에서 하나 이상의 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0856] X91. 이전의 X 구현예 중 어느 하나에 있어서, 2'-O-데옥시-3'-티오포스포노아세테이트(DSP)를 포함하는, 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에서 하나 이상의 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA 또는 crRNA 또는 방법.
- [0857] Y1. 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA로서:
- [0858] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드가 PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0859] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0860] 가이드 서열이, N이 -10 내지 10, 임의로 -10 내지 6의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고; 가이드 서열이 가이드 서열의 위치 4-N, 5-N, 7-N, 9-N, 10-N, 11-N, 14-N, 또는 16-N에 위치한 하나 이상의 변형, 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0861] Y2. 구현예 Y1에 있어서 상기 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA인, 합성 가이드 RNA.
- [0862] Y3. 구현예 Y1에 있어서 상기 하나 이상의 변형이 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 및 C3'-엔도 당 퍼커 배치형태 또는 이들의 조합을 부여하는 2'-변형으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0863] Y4. 구현예 Y3에 있어서 상기 2'-변형이 2'-O-메틸, 2'-플루오로, 및 2'-O-(2-메톡시에틸)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0864] Y5. 구현예 Y1에 있어서 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0865] Y6. 구현예 Y5에 있어서 상기 하나 이상의 변형이 가이드 서열의 위치 5-N 또는 11-N, 또는 이들의 조합에 위치

하는, 합성 가이드 RNA.

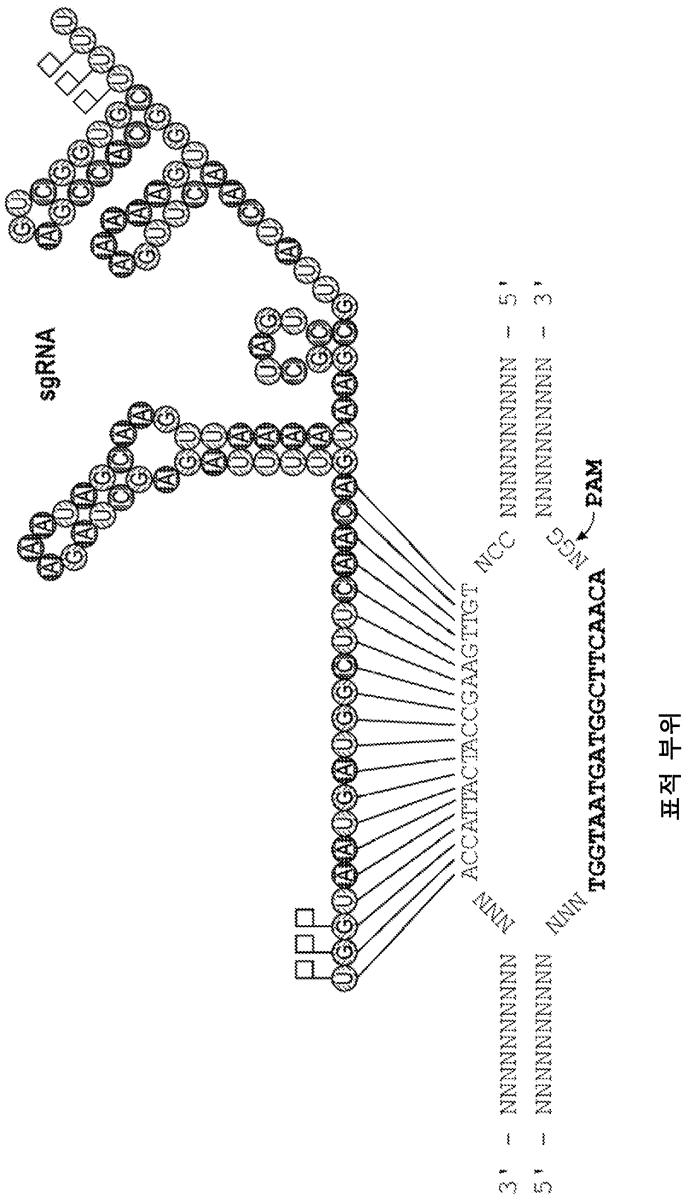
- [0866] Y7. 구현예 Y1에 있어서 상기 가이드 RNA의 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0867] Y8. 구현예 Y7에 있어서 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸(M), 포스포티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합(S), 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 2'-O-메틸-3'-포스포티오에이트(MS), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0868] Y9. 구현예 Y5에 있어서 2'-O-메틸(M), 포스포티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합(S), 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 2'-O-메틸-3'-포스포티오에이트(MS), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0869] Y10. 구현예 Y5에 있어서 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 유전자, IL2RG 유전자, 또는 VEGFA 유전자 내에 위치하는, 합성 가이드 RNA.
- [0870] Y11. 구현예 Y10에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 유전자의 GCCCCACAGGGCAGTAA, IL2RG 유전자의 TAATGATGGCTTCAACA, 또는 VEGFA 유전자의 GAGTGAGTGTGTGCGTG를 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0871] Y12. 구현예 Y10에 있어서, 상기 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA이고 상기 가이드 RNA의 5'-말단, 3'-말단 또는 양쪽 말단에 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸(M), 포스포티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합(S), 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 2'-O-메틸-3'-포스포티오에이트(MS), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0872] Y13. 하기를 포함하는, 합성 가이드 RNA로서:
- [0873] (a) (i) 표적 폴리뉴클레오타이드가 PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는, 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0874] (b) 줄기 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절,
- [0875] 가이드 서열이, N이 -10 내지 10, 임의로 -10 내지 6의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고;
- [0876] 가이드 서열이 가이드 서열의 위치 4-N 내지 20-N으로부터 임의의 위치에 하나 이상의 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 추가로 포함하고, 상기 변형이 가이드 서열의 위치 15-N에서가 아닌, 합성 가이드 RNA.
- [0877] Y14. 구현예 Y13에 있어서 상기 포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합이 포스포노아세테이트 결합(P) 및 티오포스포노아세테이트 결합(SP)으로부터 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0878] Y15. 구현예 Y13에 있어서 상기 가이드 RNA의 5'-말단, 3'-말단 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 가이드 RNA.
- [0879] Y16. 구현예 Y13에 있어서 상기 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA인, 합성 가이드 RNA.
- [0880] Y17. 구현예 Y15에 있어서 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸(M), 포스포티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합(S), 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 2'-O-메틸-3'-포스포티오에이트(MS), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA.
- [0881] Y18. PAM 부위에 인접한 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함하는 합성 crRNA로서, 상기 가이드 서열이, N이 -10 내지 10, 임의로 -10 내지 6의 정수인, 20-N 뉴클레오타이드로 구성되고; 가이드 서열이 가이드 서열의 위치 4-N 내지 20-N으로부터 임의의 위치에 하나 이상의 포스포노카복실레이트 또는 티오포스포노카복실레이트 인터뉴클레오타이드 결합 변형을 추가로 포함하고, 상기 변

형이 가이드 서열의 위치 15-N에서가 아닌, 합성 crRNA.

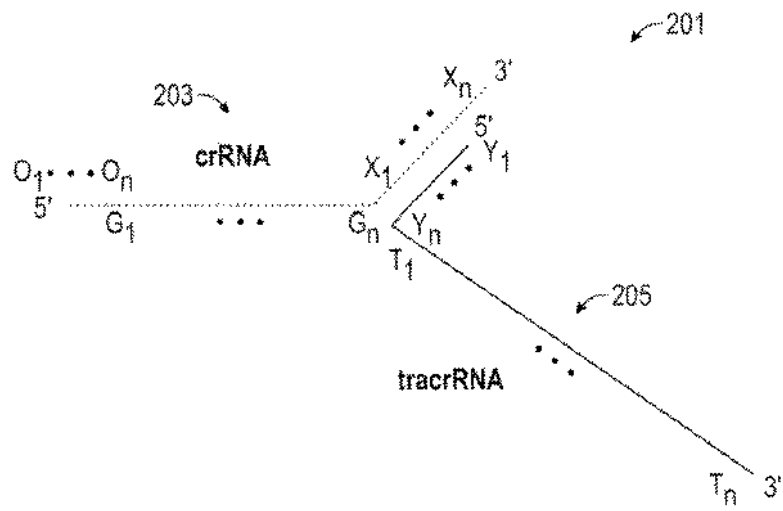
- [0882] Y19. 구현예 Y18에 있어서 상기 crRNA의 5'-말단, 3'-말단 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 합성 crRNA.
- [0883] Y20. 하기 단계를 포함하는, CRISPR 기능의 특이성의 향상 방법으로서:
- [0884] 표적 폴리뉴클레오타이드를 선택하는 단계;
- [0885] 구현예 Y13의 하나 이상의 합성 가이드 RNA를 제공하는 단계;
- [0886] Cas 단백질 및 합성 가이드 RNA를 포함하는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 형성하는 단계; 및
- [0887] 표적 폴리뉴클레오타이드를 gRNA:Cas 단백질 복합체와 접촉시키는 단계;
- [0888] 상기 Cas 단백질이 단백질로서 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로서 제공되는, 방법.
- [0889] Y21. 구현예 Y20에 있어서, 상기 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA인, 방법.
- [0890] Y22. 구현예 Y20에 있어서, 상기 가이드 RNA가 상기 가이드 RNA의 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는, 방법.
- [0891] Y23. 구현예 Y22에 있어서 5'-말단, 3'-말단, 또는 양쪽 말단에 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸(M), 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 결합(S), 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(P), 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합(SP), 2'-O-메틸-3'-포스포로아티오에이트(MS), 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP), 또는 이들의 조합으로부터 독립적으로 선택되는, 방법.
- [0892] Y24. 구현예 Y20에 있어서 상기 가이드 RNA가 포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합 및 티오포스포노아세테이트 인터뉴클레오타이드 결합 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.
- [0893] Y25. 구현예 Y20에 있어서 상기 가이드 RNA가 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트(MP) 및 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트(MSP)로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.
- [0894] Y26. 구현예 Y20에 있어서 상기 폴리뉴클레오타이드 표적의 상기 gRNA:Cas 단백질 복합체와의 상기 접촉이 세포에서 수행되는, 방법.
- [0895] Y27. 구현예 Y26에 있어서 상기 Cas 단백질이 Cas9 단백질인, 방법.
- [0896] Y28. 구현예 Y27에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 유전자, IL2RG 유전자, 또는 VEGFA 유전자 내에 위치하는, 방법.
- [0897] Y29. 구현예 Y28에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드가 HBB 유전자의 GCCCCACAGGGCAGTAA, IL2RG 유전자의 TAATGATGGCTTCAACA, 또는 VEGFA 유전자의 GAGTGAGTGTGTGCGTG를 포함하는, 방법.
- [0898] Y30. 구현예 Y20에 있어서 상기 형성이 세포의 외부에서 수행되는, 방법.
- [0899] 예시적 또는 바람직한 구현예의 전술한 설명은, 청구범위에 의해 정의된 바와 같이 본 발명을, 제한하는 것보다는, 예시하는 것으로서 고려될 수 있다. 용이하게 인식되는 바와 같이, 상기 제시된 특징의 수많은 변형 및 조합은 청구범위에서 제시된 바와 같이 본 발명에서 벗어남이 없이 이용될 수 있다. 그와 같은 변형은 본 발명의 범주로부터 벗어나는 것으로 고려되지 않고, 모든 그와 같은 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 포함되도록 의도된다. 본 명세서에서 인용된 모든 참조문헌은 그것의 전체가 참고로 편입된다.

도면

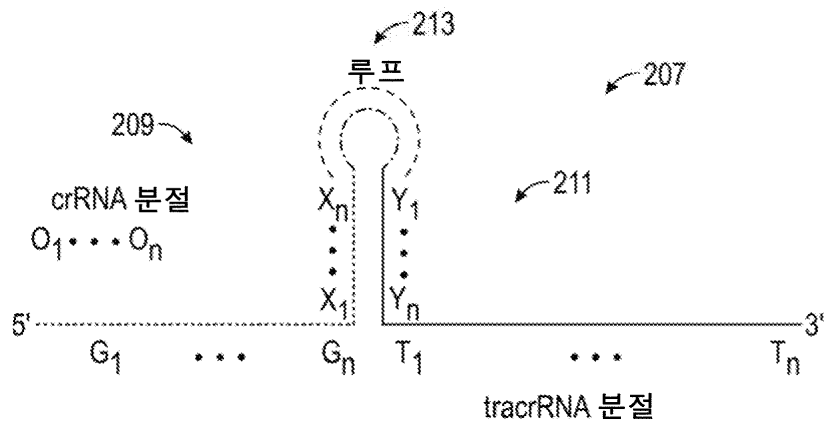
도면1



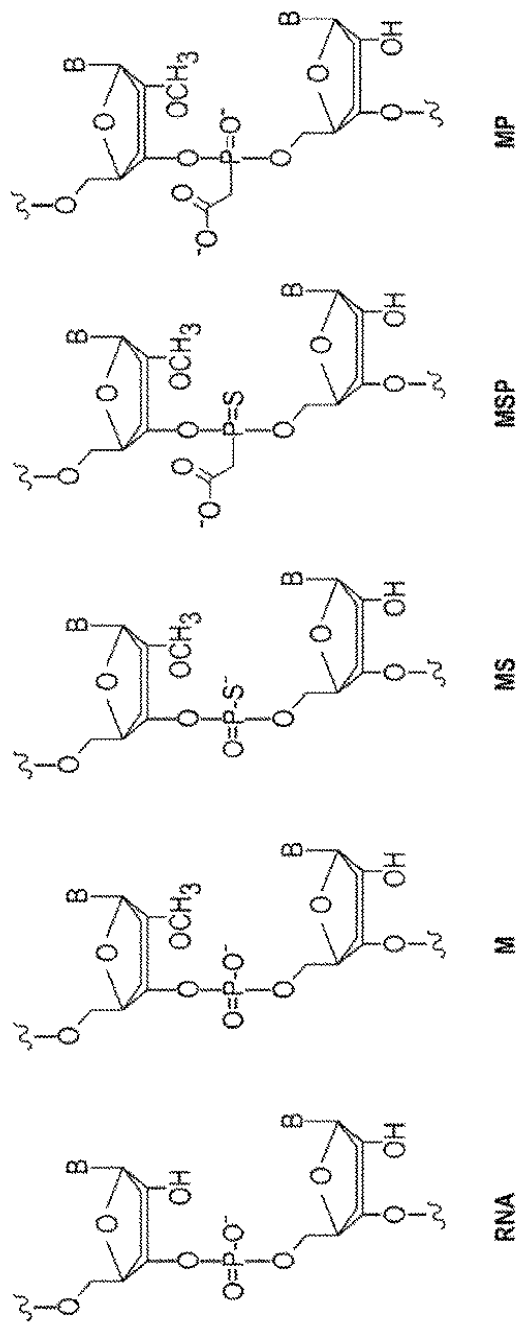
도면2a



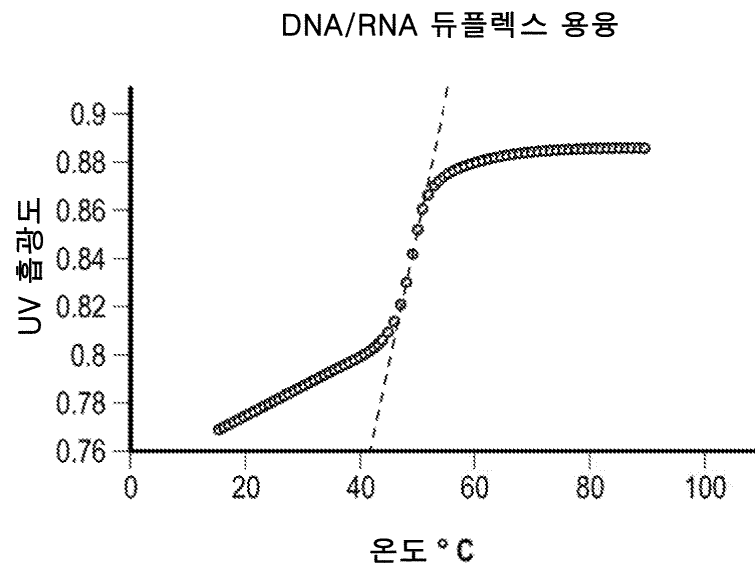
도면2b



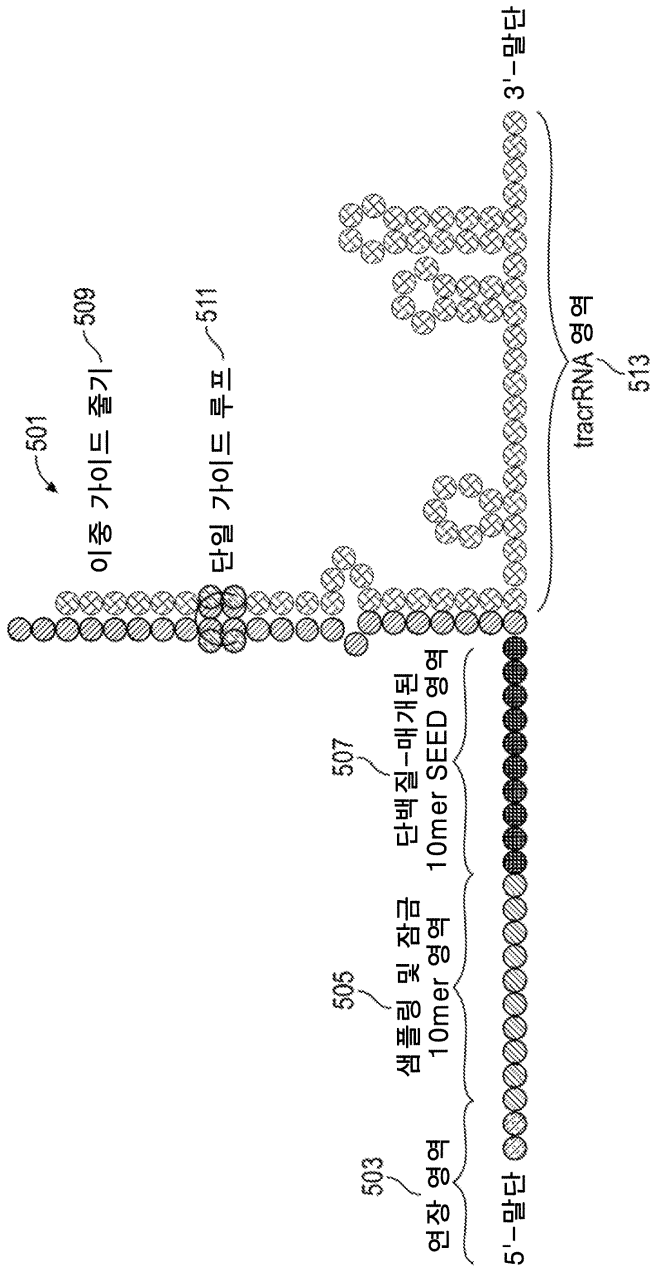
도면3



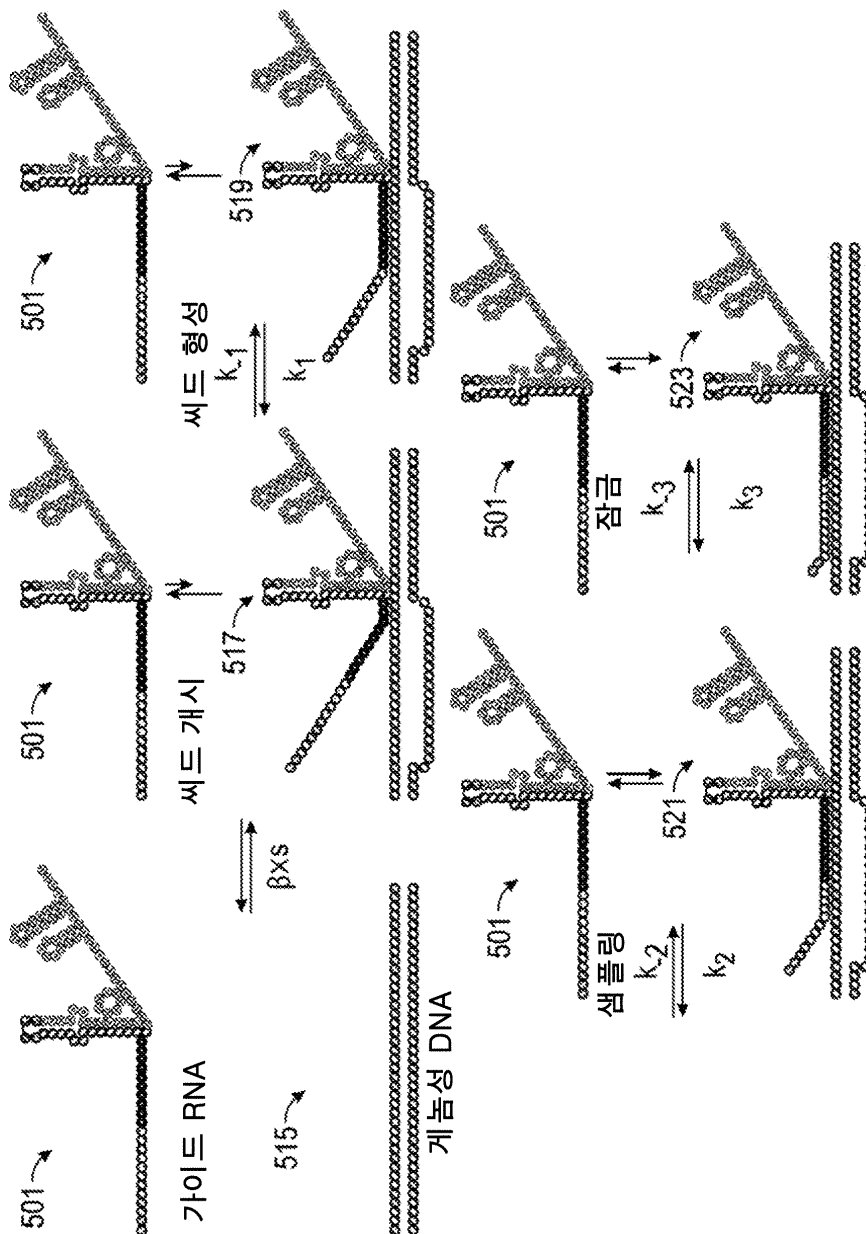
도면4



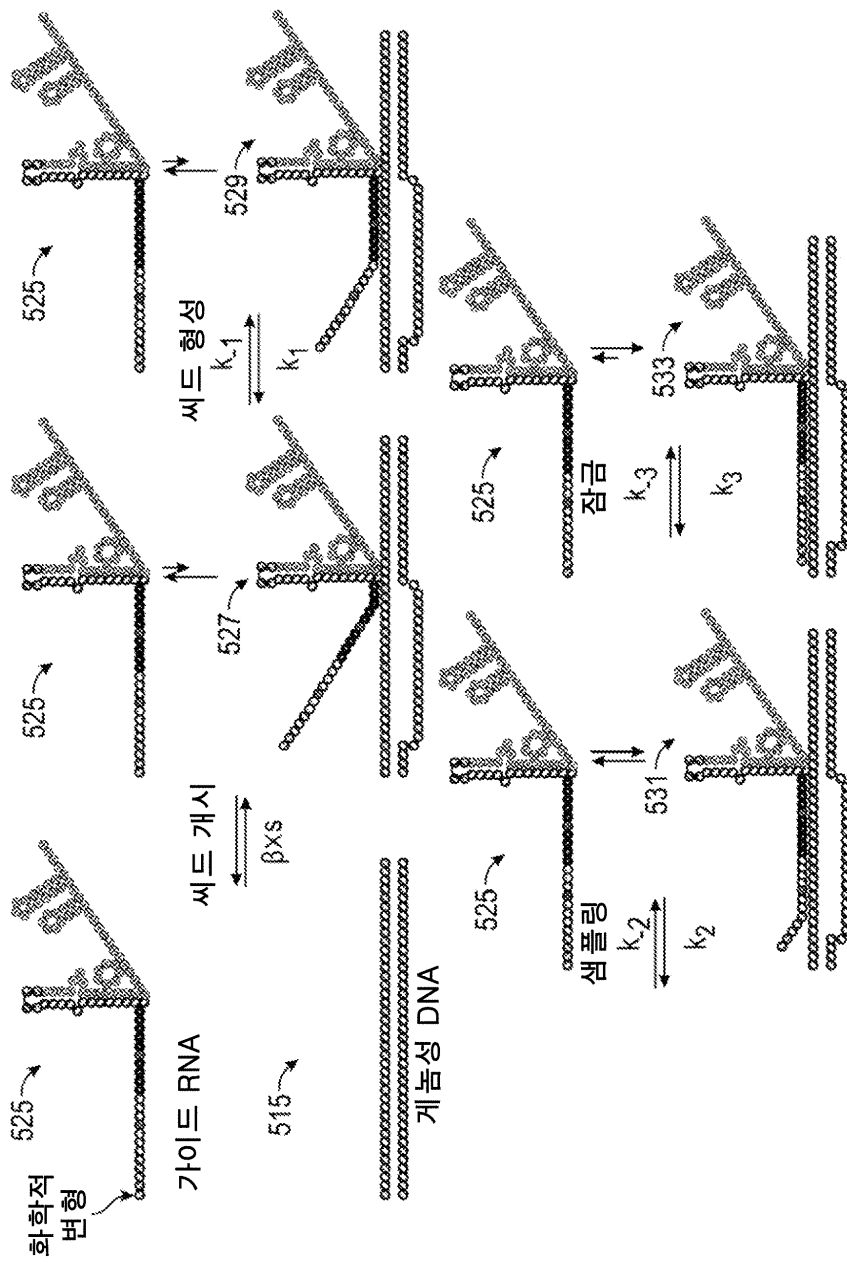
도면5a



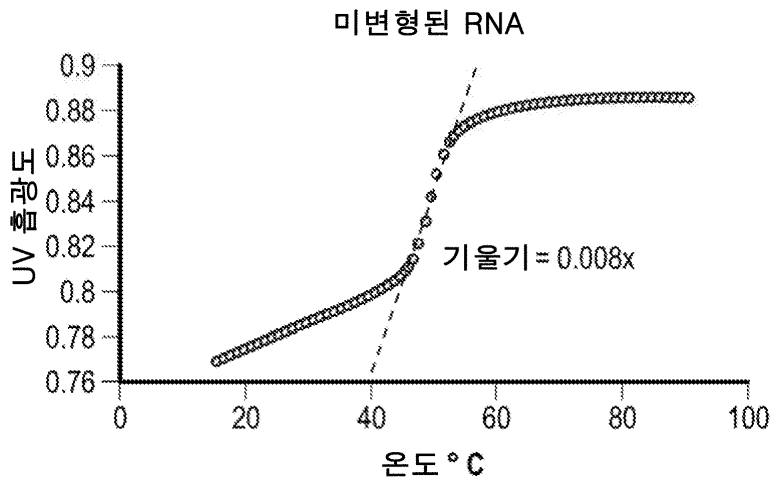
도면 5b



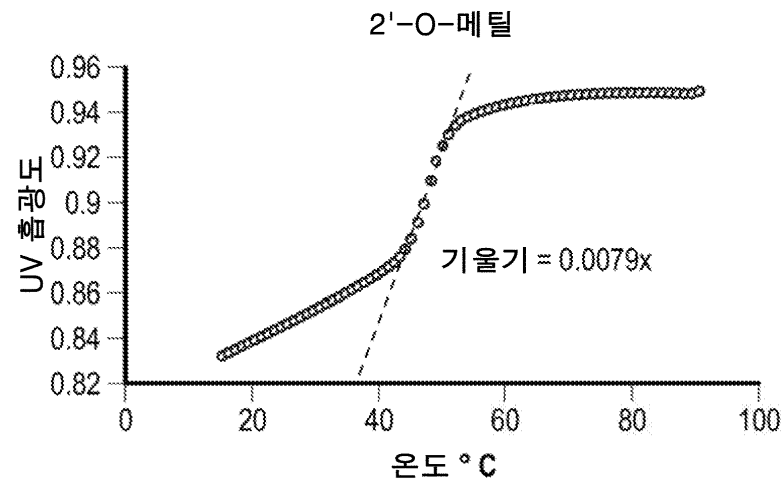
도면5c



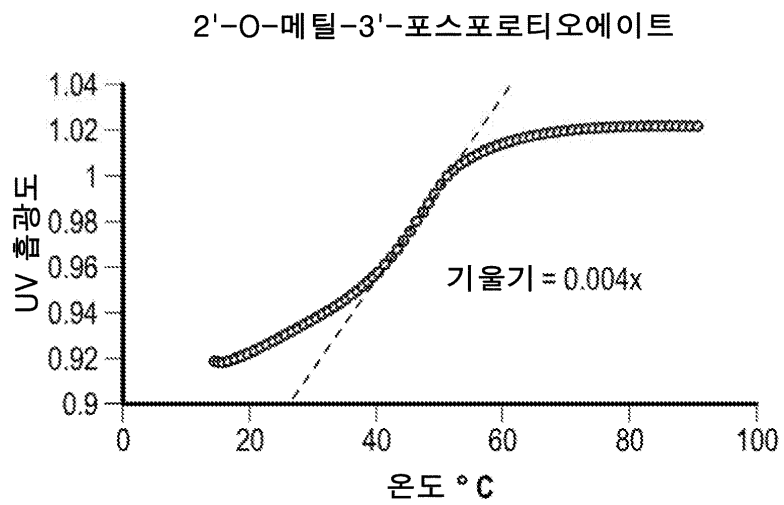
도면6b



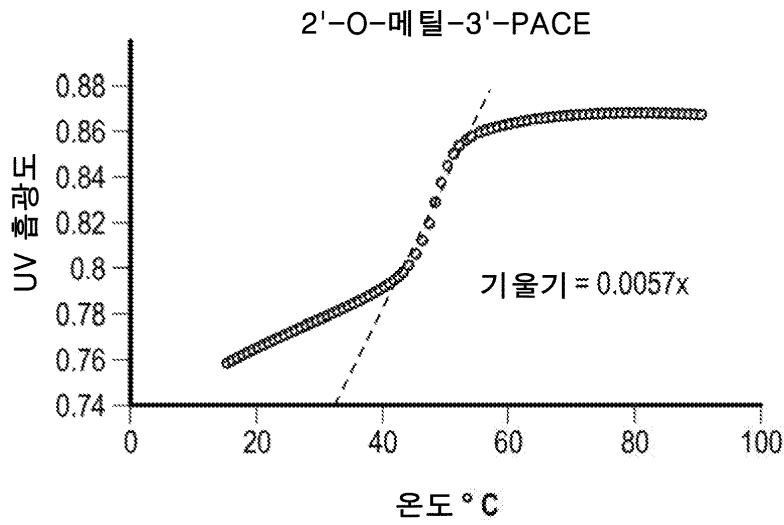
도면6c



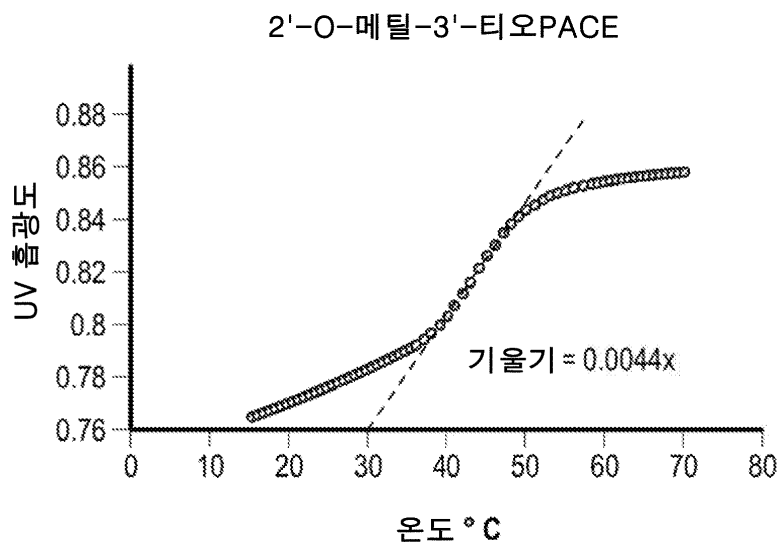
도면6d



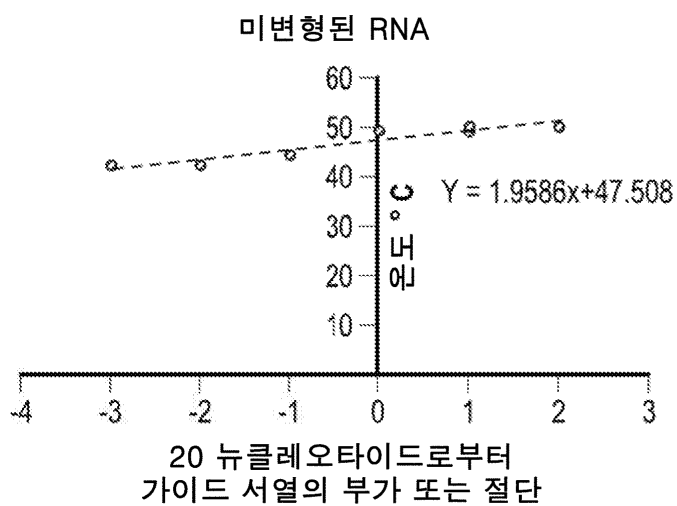
도면6e



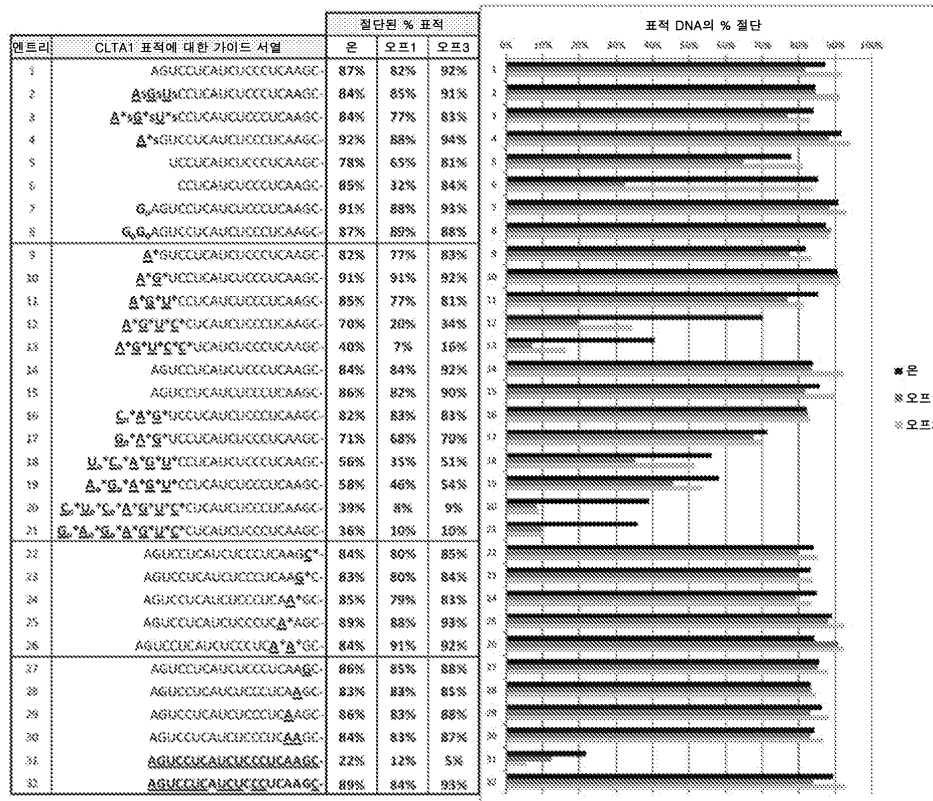
도면6f



도면7



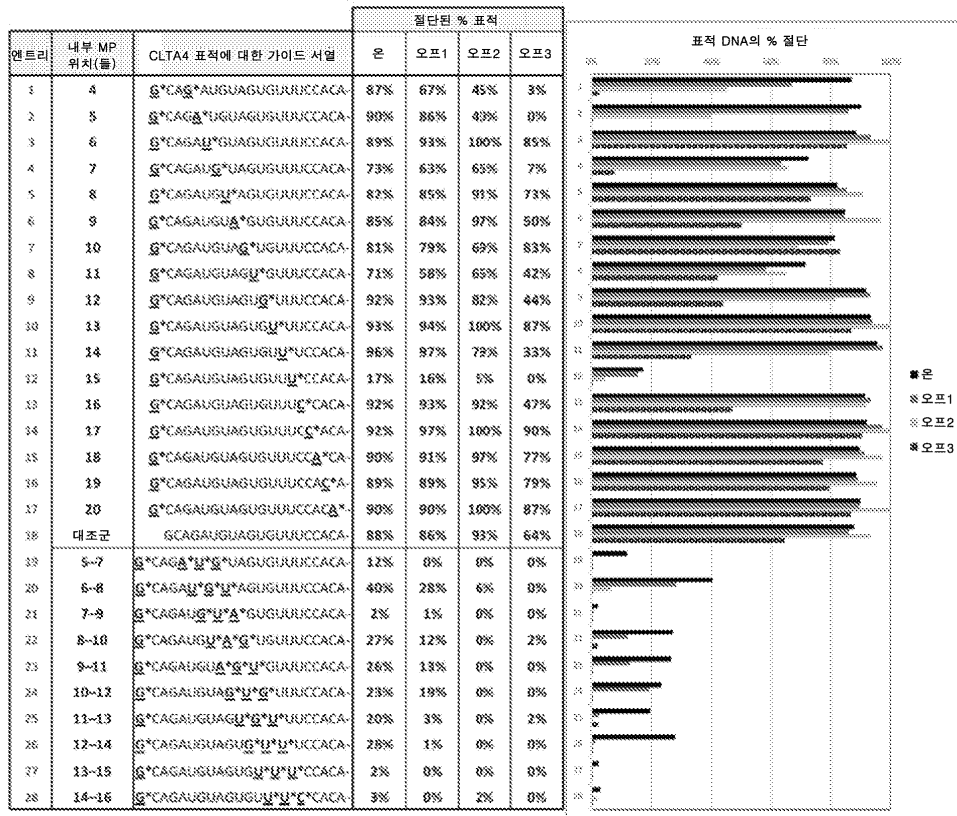
도면 8a



도면8b

CLTA1의 시험관내 절단에 대한 온- 대 오프-표적 절단 비 & 특이성 스코어					
엔트리	CLTA1 표적에 대한 가이드 서열	온 : 오프1 비	특이성 스코어	온 : 오프3 비	특이성 스코어
1	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.07	0.93	0.95	0.83
2	<u>A</u> s <u>G</u> s <u>U</u> sCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.00	0.84	0.93	0.78
3	<u>A</u> *s <u>G</u> *s <u>U</u> *sCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.09	0.92	1.01	0.85
4	<u>A</u> *sGUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.04	0.95	0.97	0.89
5	UCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.20	0.94	0.96	0.75
6	CCUCAUCUCCCUCAAGC-	2.63	2.24	1.02	0.87
7	G ₀ AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.03	0.93	0.98	0.89
8	G ₀ G ₀ AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	0.98	0.86	0.99	0.87
9	<u>A</u> *GUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.06	0.87	0.98	0.81
10	<u>A</u> * <u>G</u> *UCCUCAUCUCCCUCAAGC-	0.99	0.90	0.99	0.90
11	<u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> *CCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.11	0.95	1.05	0.90
12	<u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> * <u>C</u> *CUCAUCUCCCUCAAGC-	3.56	2.50	2.04	1.43
13	<u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> * <u>C</u> *UCAUCUCCCUCAAGC-	5.75	2.32	2.49	1.01
14	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.00	0.84	0.91	0.76
15	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.05	0.90	0.95	0.81
16	<u>C</u> ₀ * <u>A</u> * <u>G</u> *UCCUCAUCUCCCUCAAGC-	0.99	0.82	0.99	0.81
17	<u>G</u> ₀ * <u>A</u> * <u>G</u> *UCCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.06	0.75	1.02	0.73
18	<u>U</u> ₀ * <u>C</u> ₀ * <u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> *CCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.59	0.89	1.09	0.61
19	<u>A</u> ₀ * <u>G</u> ₀ * <u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> *CCUCAUCUCCCUCAAGC-	1.27	0.74	1.08	0.63
20	<u>C</u> ₀ * <u>U</u> ₀ * <u>C</u> ₀ * <u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> * <u>C</u> *CUCAUCUCCCUCAAGC-	4.70	1.84	4.32	1.69
21	<u>G</u> ₀ * <u>A</u> ₀ * <u>G</u> ₀ * <u>A</u> * <u>G</u> * <u>U</u> * <u>C</u> *CUCAUCUCCCUCAAGC-	3.69	1.33	3.50	1.26
22	AGUCCUCAUCUCCCUCAAG <u>C</u> *	1.05	0.88	0.99	0.83
23	AGUCCUCAUCUCCCUCAAG <u>C</u> *	1.04	0.87	0.99	0.83
24	AGUCCUCAUCUCCCUCA <u>A</u> *GC-	1.07	0.91	1.02	0.86
25	AGUCCUCAUCUCCCUCA <u>A</u> *AGC-	1.01	0.90	0.96	0.86
26	AGUCCUCAUCUCCCUCA <u>A</u> *AGC-	0.93	0.78	0.91	0.77
27	AGUCCUCAUCUCCCUCAAG <u>C</u> -	1.01	0.86	0.97	0.83
28	AGUCCUCAUCUCCCUCAAG <u>C</u> -	1.00	0.83	0.98	0.82
29	AGUCCUCAUCUCCCUCAAG <u>C</u> -	1.04	0.90	0.98	0.84
30	AGUCCUCAUCUCCCUCAAG <u>C</u> -	1.01	0.85	0.97	0.82
31	<u>AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC</u> -	1.76	0.39	4.11	0.90
32	<u>AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC</u> -	1.06	0.95	0.96	0.86

도면9a



도면 9b

엔트리	내부 MP 위치(들)	CLTA4 표적에 대한 가이드 서열	온 : 오프1 비	특이성 스코어	온 : 오프2 비	특이성 스코어	온 : 오프3 비	특이성 스코어
1	4	G* <u>CAG</u> *AUGUAGU <u>GUUU</u> CCACA-	1.3	1.1	1.9	1.7	34.5	30.0
2	5	G* <u>CAG</u> A*UGUAGU <u>GUUU</u> CCACA-	1.1	0.9	2.3	2.0	큰	165.9
3	6	G* <u>CAG</u> AU*GUAGU <u>GUUU</u> CCACA-	1.0	0.8	0.9	0.8	1.0	0.9
4	7	G* <u>CAG</u> AUG*UAGU <u>GUUU</u> CCACA-	1.1	0.8	1.1	0.8	9.7	7.1
5	8	G* <u>CAG</u> AUGU*AGU <u>GUUU</u> CCACA-	1.0	0.8	0.9	0.7	1.1	0.9
6	9	G* <u>CAG</u> AUGUA*GUG <u>UUUU</u> CCACA-	1.0	0.9	0.9	0.7	1.7	1.4
7	10	G* <u>CAG</u> AUGUAG*U <u>GUUU</u> CCACA-	1.0	0.8	1.2	1.0	1.0	0.8
8	11	G* <u>CAG</u> AUGUAGU* <u>GUUU</u> CCACA-	1.2	0.9	1.1	0.8	1.7	1.2
9	12	G* <u>CAG</u> AUGUAGUG* <u>UUUU</u> CCACA-	1.0	0.9	1.1	1.0	2.1	1.9
10	13	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGU* <u>UU</u> CCACA-	1.0	0.9	0.9	0.9	1.1	1.0
11	14	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUU* <u>U</u> CCACA-	1.0	0.9	1.2	1.2	2.9	2.8
12	15	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUUU* <u>U</u> CCACA-	1.1	0.2	3.7	0.6	큰	6.0
13	16	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUUUC* <u>CACA</u> -	1.0	0.9	1.0	0.9	2.0	1.8
14	17	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUUUC* <u>ACA</u> -	0.9	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9
15	18	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUUUCC <u>A</u> * <u>CA</u> -	1.0	0.9	0.9	0.8	1.2	1.0
16	19	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUUUCC <u>AC</u> * <u>A</u> -	1.0	0.9	0.9	0.8	1.1	1.0
17	20	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUUUCC <u>ACA</u> * <u>-</u>	1.0	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9
18	대조군	GCAGAU <u>GUAGUGUU</u> CCACA-	1.0	0.9	0.9	0.8	1.4	1.2
19	5-7	G* <u>CAG</u> A*U*G*UAGU <u>GUUU</u> CCACA-	큰	2.8	큰	2.8	큰	2.8
20	6-8	G* <u>CAG</u> AU*G*U*AGU <u>GUUU</u> CCACA-	1.4	0.6	6.4	2.6	큰	33.5
21	7-9	G* <u>CAG</u> AUG*U*A*GUG <u>UUU</u> CCACA-	2.5	0.1	큰	0.1	큰	0.1
22	8-10	G* <u>CAG</u> AUGU*A*G*UG <u>UUU</u> CCACA-	2.3	0.6	큰	14.9	12.4	3.3
23	9-11	G* <u>CAG</u> AUGUA*G*U*GU <u>UU</u> CCACA-	2.1	0.6	큰	14.3	큰	14.3
24	10-12	G* <u>CAG</u> AUGUAG*U*G* <u>UU</u> CCACA-	1.2	0.3	큰	11.1	큰	11.1
25	11-13	G* <u>CAG</u> AUGUAGU*G*U* <u>UU</u> CCACA-	7.6	1.5	큰	7.8	8.3	1.6
26	12-14	G* <u>CAG</u> AUGUAGUG*U*U* <u>U</u> CCACA-	20.8	5.8	큰	15.6	큰	15.6
27	13-15	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGU*U*U* <u>U</u> CCACA-	큰	0.1	큰	0.1	큰	0.1
28	14-16	G* <u>CAG</u> AUGUAGUGUU*U*G* <u>CACA</u> -	큰	0.2	1.4	0.0	큰	0.2

도면10

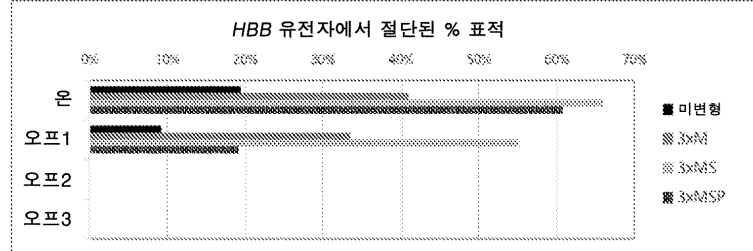
IL2RG의 시험관내 절단에 대한 온- 대 오프-표적 절단 비 & 특이성 스코어						
엔트리	내부 MP 위치(들)	IL2RG 표적에 대한 가이드 서열	절단된 % 표적		비	
			온	오프3	온 : 오프3	특이성 스코어
1	2	U*G*GUAUGAUGGCUUCAACA-	80%	75%	1.1	0.9
2	3	U*GG*UAAUGAUGGCUUCAACA-	85%	62%	1.4	1.2
3	4	U*GGU*AAUGAUGGCUUCAACA-	63%	8%	8.4	5.2
4	5	U*GGUA*UGAUGGCUUCAACA-	76%	31%	2.5	1.9
5	6	U*GGUA*UGAUGGCUUCAACA-	75%	69%	1.1	0.8
6	7	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	65%	3%	18.8	12.3
7	8	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	73%	53%	1.4	1.0
8	9	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	73%	32%	2.3	1.6
9	10	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	64%	48%	1.3	0.9
10	11	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	65%	18%	3.7	2.4
11	12	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	84%	10%	8.3	7.0
12	13	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	95%	21%	4.5	4.2
13	14	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	96%	10%	9.7	9.3
14	15	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	29%	8%	3.8	1.1
15	16	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	96%	9%	10.7	10.2
16	17	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	95%	12%	7.7	7.3
17	18	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	92%	17%	5.4	4.9
18	19	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	92%	25%	3.6	3.3
19	20	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	87%	61%	1.4	1.2
20	대조군	U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	84%	68%	1.2	1.0
21	4-6	U*GGU*AA*UGAUGGCUUCAACA-	15%			
22	5-7	U*GGU*AA*UGAUGGCUUCAACA-	11%			
23	6-8	U*GGUA*U*GAUGGCUUCAACA-	4%			
24	7-9	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	2%			
25	8-10	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	23%	3%	0.5	0.0
26	9-11	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	50%	4%	5.7	1.3
27	10-12	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	39%	4%	12.1	6.0
28	11-13	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	35%	6%	6.6	2.6
29	12-14	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	35%	3%	10.7	3.7
30	13-15	U*GGUAU*G*UGAUGGCUUCAACA-	19%	3%	5.6	1.1
		U*GGUAU*GAUGGCUUCAACA-	4%	4%	1.1	0.0

도면11a

HBB의 시험관내 절단에 대한 온- 대 오프-표적 절단 비 & 특이성 스코어						
엔트리	내부 MP 위치(들)	HBB 표적에 대한 가이드 서열	절단된 % 표적		비	특이성 스코어
			온	오프1	온 : 오프1	
1	4	C*UUG*CCCCACAGGGCAGUAA-	30%	3%	10.1	3.0
2	5	C*UUGC*CCCACAGGGCAGUAA-	53%	3%	16.7	8.9
3	6	C*UUGCC*CCACAGGGCAGUAA-	73%	37%	2.0	1.4
4	7	C*UUGCCC*CACAGGGCAGUAA-	39%	3%	14.1	5.5
5	8	C*UUGCCCC*ACAGGGCAGUAA-	40%	7%	6.1	2.4
6	9	C*UUGCCCCA*CAGGGCAGUAA-	59%	5%	11.9	7.0
7	10	C*UUGCCCCAC*AGGGCAGUAA-	58%	6%	10.1	5.9
8	11	C*UUGCCCCACA*GGGCAGUAA-	53%	3%	20.3	10.9
9	12	C*UUGCCCCACAG*GGCAGUAA-	75%	21%	3.6	2.7
10	13	C*UUGCCCCACAGG*GCAGUAA-	66%	20%	3.3	2.2
11	14	C*UUGCCCCACAGGG*CAGUAA-	76%	19%	3.9	3.0
12	15	C*UUGCCCCACAGGGC*AGUAA-	0%	2%	0.0	0.0
13	16	C*UUGCCCCACAGGGCA*GUAA-	65%	27%	2.4	1.6
14	17	C*UUGCCCCACAGGGCAG*UAA-	81%	47%	1.7	1.4
15	18	C*UUGCCCCACAGGGCAGU*AA-	76%	34%	2.2	1.7
16	19	C*UUGCCCCACAGGGCAGUA*A-	62%	23%	2.7	1.7
17	대조군	C*UUGCCCCACAGGGCAGUAA-	75%	38%	2.0	1.5

도면11b

엔트리	생체내 HBB 표적에 대한 가이드 서열	절단된 % 표적				오 : 오프1 비	특이성 스코어
		온	오프1	오프2	오프3		
1	CUUGCCCCACAGGGCAGUAA-	19%	9%	0%	0%	2.1	0.4
2	CUUGCCCCACAGGGCAGUAA-	41%	34%	0%	0%	1.2	0.5
3	CsUsUsGCCCCACAGGGCAGUAA-	66%	55%	0%	0%	1.2	0.8
4	C*sU*sU*sGCCCCACAGGGCAGUAA-	61%	19%	0%	0%	3.2	1.9



도면12a

엔트리	sgRNA 명칭	온 표적	오프1 표적	온 : 오프1 비	특이성 스코어	엔트리	sgRNA 명칭	온 표적	오프1 표적	온 : 오프1 비	특이성 스코어
1	HBB_11MP_1xMP	53%	3%	20.3	10.9	33	HBB_7,14MP_1xMP	48%	2%	20.7	9.8
2	HBB_5MP_1xMP	53%	3%	16.7	8.9	34	HBB_5,14MP_1xMP	46%	2%	19.8	9.2
3	HBB_9MP_1xMP	59%	5%	11.9	7.0	35	HBB_5,6MP_1xMP	58%	4%	13.5	7.9
4	HBB_10MP_1xMP	58%	6%	10.1	5.9	36	HBB_9,13MP_1xMP	54%	4%	12.8	7.0
5	HBB_7MP_1xMP	39%	3%	14.1	5.5	37	HBB_6,11MP_1xMP	43%	3%	16.7	7.2
6	HBB_14MP_1xMP	76%	19%	3.9	3.0	38	HBB_13,14MP_1xMP	75%	8%	9.6	7.2
7	HBB_4MP_1xMP	30%	3%	10.1	3.0	39	HBB_6,9MP_1xMP	61%	6%	10.2	6.2
8	HBB_12MP_1xMP	75%	21%	3.6	2.7	40	HBB_14,17MP_1xMP	23%	1%	23.3	5.4
9	HBB_8MP_1xMP	40%	7%	6.1	2.4	41	HBB_7,17MP_1xMP	53%	6%	9.3	4.9
10	HBB_13MP_1xMP	66%	20%	3.3	2.2	42	HBB_16,17MP_1xMP	21%	1%	20.9	4.4
11	HBB_18MP_1xMP	78%	34%	2.2	1.7	43	HBB_8,14MP_1xMP	36%	2%	16.0	5.7
12	HBB_19MP_1xMP	62%	23%	2.7	1.7	44	HBB_8,9MP_1xMP	27%	2%	17.5	4.7
13	HBB_16MP_1xMP	65%	27%	2.4	1.6	45	HBB_8,13MP_1xMP	42%	4%	9.4	3.9
14	HBB_1xMP (대조군)	75%	38%	2.0	1.5	46	HBB_7,13MP_1xMP	39%	4%	10.2	3.9
15	HBB_6MP_1xMP	73%	37%	2.0	1.4	47	HBB_8,16MP_1xMP	32%	3%	11.8	3.8
16	HBB_17MP_1xMP	81%	47%	1.7	1.4	48	HBB_10,14MP_1xMP	26%	2%	14.0	3.7
17	HBB_15MP_1xMP	0%	2%	0.0	0.0	49	HBB_7,16MP_1xMP	37%	4%	9.0	3.3
18	HBB_6,7MP_1xMP	50%	1%	50.0	25.0	50	HBB_7,9MP_1xMP	32%	3%	10.1	3.3
19	HBB_10,17MP_1xMP	50%	1%	49.5	24.5	51	HBB_5,8MP_1xMP	17%	1%	16.9	2.9
20	HBB_5,17MP_1xMP	46%	1%	46.1	21.3	52	HBB_6,14MP_1xMP	64%	14%	4.5	2.9
21	HBB_5,16MP_1xMP	45%	1%	45.1	20.4	53	HBB_6,13MP_1xMP	69%	16%	4.2	2.9
22	HBB_6,10MP_1xMP	61%	2%	34.5	20.9	54	HBB_5,13MP_1xMP	35%	5%	7.7	2.7
23	HBB_10,16MP_1xMP	40%	1%	39.6	15.7	55	HBB_6,16MP_1xMP	62%	17%	3.6	2.2
24	HBB_5,9MP_1xMP	65%	3%	23.5	15.3	56	HBB_7,10MP_1xMP	21%	2%	8.4	1.7
25	HBB_9,16MP_1xMP	36%	1%	38.1	14.6	57	HBB_6,17MP_1xMP	68%	37%	1.8	1.3
26	HBB_9,17MP_1xMP	37%	1%	37.5	14.0	58	HBB_8,10MP_1xMP	16%	2%	7.8	1.2
27	HBB_6,8MP_1xMP	45%	2%	26.7	12.0	59	HBB_1xMP (대조군)	69%	44%	1.6	1.1
28	HBB_9,10MP_1xMP	50%	2%	24.0	12.0	60	HBB_13,16MP_1xMP	10%	1%	9.9	1.0
29	HBB_10,13MP_1xMP	51%	2%	22.2	11.4	61	HBB_14,16MP_1xMP	9%	1%	9.0	0.8
30	HBB_9,14MP_1xMP	34%	1%	33.5	11.3	62	HBB_5,10MP_1xMP	16%	3%	5.1	0.8
31	HBB_9,17MP_1xMP	54%	3%	20.4	11.1	63	HBB_5,7MP_1xMP	18%	6%	2.9	0.5
32	HBB_13,17MP_1xMP	32%	1%	31.9	10.2	64	HBB_5,11MP_1xMP	4%	3%	1.5	0.1

도면12b

K562 세포에서						iPS 세포에서					
엔트리	sgRNA 명칭 또는 대조군의 유형	온 표적	오프1 표적	온 : 오프1 비	특이성 스코어	엔트리	sgRNA 명칭 또는 대조군의 유형	온 표적	오프1 표적	온 : 오프1 비	특이성 스코어
1	HBB_11MP_1xMP	69.6%	0.9%	80.2	55.8	22	HBB_11MP_1xMP	45.1%	0.5%	96.1	43.3
2	HBB_5MP_1xMP	81.2%	3.0%	26.9	21.8	23	HBB_5MP_1xMP	51.8%	1.8%	29.3	15.2
3	HBB_7MP_1xMP	53.5%	3.1%	17.2	9.2	24	HBB_7MP_1xMP	39.2%	2.0%	19.9	7.8
4	HBB_10MP_1xMP	66.7%	9.1%	7.3	4.9	25	HBB_10MP_1xMP	37.9%	6.1%	6.3	2.4
5	HBB_9MP_1xMP	65.0%	9.0%	7.2	4.7	26	HBB_9MP_1xMP	32.5%	4.9%	6.8	2.1
6	HBB_13MP_1xMP	61.5%	19.6%	3.1	1.9	27	HBB_13MP_1xMP	37.1%	19.7%	1.9	0.7
7	HBB_3xMS (대조군)	92.3%	52.6%	1.8	1.6	28	HBB_14MP_1xMP	25.2%	14.3%	1.8	0.4
8	HBB_미변형 (대조군)	84.3%	46.5%	1.8	1.5	29	HBB_3xMS (대조군)	31.3%	22.6%	1.4	0.4
9	HBB_1xMP (대조군)	78.5%	44.4%	1.8	1.4	30	HBB_1xMP (대조군)	34.0%	31.8%	1.1	0.4
10	HBB_14MP_1xMP	34.9%	12.3%	2.8	1.0	31	HBB_미변형 (대조군)	25.3%	19.6%	1.3	0.3
11	HBB_17MP_1xMP	34.4%	22.0%	1.6	0.5	32	HBB_16MP_1xMP	7.8%	6.2%	1.3	0.1
12	HBB_16MP_1xMP	9.1%	5.5%	1.7	0.2	33	HBB_17MP_1xMP	16.4%	17.3%	1.0	0.2
13	HBB_6,10MP_1xMP	64.4%	4.4%	14.6	9.4	34	HBB_6,10MP_1xMP	35.7%	2.0%	17.4	6.2
14	HBB_5,17MP_1xMP	25.8%	1.5%	17.4	4.5	35	HBB_5,17MP_1xMP	16.2%	0.6%	29.1	4.7
15	HBB_6,7MP_1xMP	29.5%	2.7%	10.8	3.2	36	HBB_5,16MP_1xMP	6.3%	0.1%	59.1	3.7
16	HBB_10,17MP_1xMP	24.9%	3.0%	8.3	2.1	37	HBB_6,7MP_1xMP	21.2%	2.1%	10.0	2.1
17	HBB_5,16MP_1xMP	6.5%	0.2%	27.6	1.8	38	HBB_10,17MP_1xMP	11.4%	1.1%	10.1	1.1
18	HBB_5,9MP_1xMP	12.6%	2.0%	6.3	0.8	39	HBB_5,9MP_1xMP	9.0%	1.4%	6.5	0.6
19	HBB_9,17MP_1xMP	6.5%	0.8%	7.8	0.5	40	HBB_9,17MP_1xMP	3.3%	0.6%	5.2	0.2
20	GFP 형질감염 대조군	0.1%	0.1%			41	GFP 형질감염 대조군	0.0%	0.0%		
21	모의 형질감염 대조군	0.2%	0.0%			42	모의 형질감염 대조군	0.0%	0.0%		

도면12c

K562 세포에서

엔트리	sgRNA 명칭 또는 대조군의 유형	온 표적	오프1 표적	온 : 오프1 비	특이성 스코어
1	HBB_11MP_1xMP	69.6%	0.9%	80.2	99.8
2	HBB_5MP_1xMP	81.2%	3.0%	26.8	21.8
3	HBB_7MP_1xMP	53.5%	3.1%	17.2	9.2
4	HBB_10MP_1xMP	66.7%	9.1%	7.3	4.9
5	HBB_9MP_1xMP	65.8%	9.8%	7.2	4.7
6	HBB_13MP_1xMP	61.5%	19.6%	3.1	1.9
7	HBB_14MP_1xMP	34.9%	12.3%	2.8	1.0
8	HBB_3xMS (대조군)	92.3%	52.6%	1.8	1.6
9	HBB_미변형 (대조군)	84.3%	46.5%	1.8	1.5
10	HBB_1xMP (대조군)	78.5%	44.4%	1.8	1.4
11	HBB_16MP_1xMP	9.1%	5.5%	1.7	0.2
12	HBB_17MP_1xMP	34.4%	22.0%	1.6	0.5
13	HBB_5_16MP_1xMP	6.5%	0.2%	27.6	1.8
14	HBB_5_17MP_1xMP	25.8%	1.5%	17.4	4.5
15	HBB_6_10MP_1xMP	64.4%	4.4%	14.6	9.4
16	HBB_6_7MP_1xMP	29.5%	2.7%	10.8	3.2
17	HBB_10_17MP_1xMP	24.9%	3.0%	8.3	2.1
18	HBB_9_17MP_1xMP	6.5%	0.8%	7.8	0.5
19	HBB_5_9MP_1xMP	12.6%	2.9%	6.3	0.8
20	GFP 형질감염 대조군	0.1%	0.1%		
21	모의 형질감염 대조군	0.2%	0.0%		

iPS 세포에서

엔트리	sgRNA 명칭 또는 대조군의 유형	온 표적	오프1 표적	온 : 오프1 비	특이성 스코어
22	HBB_11MP_1xMP	45.1%	0.5%	96.1	43.3
23	HBB_5MP_1xMP	51.8%	1.8%	29.3	15.2
24	HBB_7MP_1xMP	39.2%	2.0%	19.8	7.8
25	HBB_9MP_1xMP	32.5%	4.9%	6.6	2.1
26	HBB_10MP_1xMP	37.9%	6.1%	6.3	2.4
27	HBB_13MP_1xMP	37.1%	19.7%	1.9	0.7
28	HBB_14MP_1xMP	25.2%	14.3%	1.8	0.4
29	HBB_3xMS (대조군)	31.3%	23.6%	1.4	0.4
31	HBB_미변형 (대조군)	25.3%	19.6%	1.3	0.3
32	HBB_16MP_1xMP	7.8%	6.2%	1.3	0.1
33	HBB_1xMP (대조군)	34.0%	31.8%	1.1	0.4
33	HBB_17MP_1xMP	16.4%	17.3%	1.0	0.2
34	HBB_5_16MP_1xMP	6.3%	0.1%	59.1	3.7
35	HBB_5_17MP_1xMP	16.2%	0.6%	29.1	4.7
36	HBB_6_10MP_1xMP	35.7%	2.0%	17.4	6.2
37	HBB_10_17MP_1xMP	11.4%	1.1%	10.1	1.1
38	HBB_6_7MP_1xMP	21.2%	2.1%	10.0	2.1
39	HBB_9_9MP_1xMP	9.8%	1.4%	6.5	0.6
40	HBB_9_17MP_1xMP	3.3%	0.6%	5.2	0.2
41	GFP 형질감염 대조군	0.0%	0.0%		
42	모의 형질감염 대조군	0.0%	0.0%		

도면 13

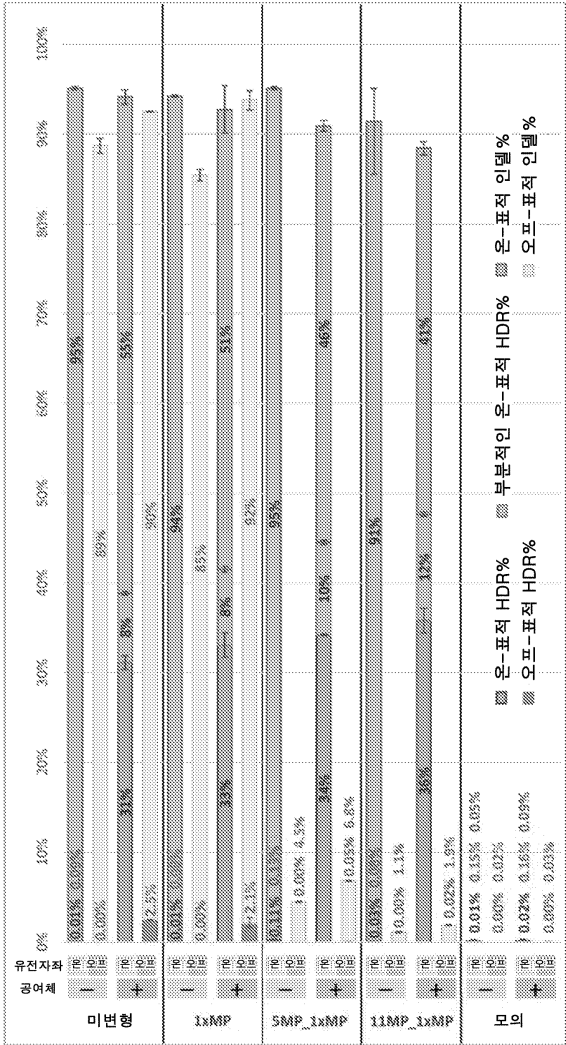
[illegible]

도면14

엔트리	표적	sgRNA 명칭	온	오프2	온 : 오프2	특이성
	유전자	또는 대조군의 유형	표적	표적	비	스코어
1	<i>IL2RG</i>	IL2RG_미변형 (대조군)	98.5%	5.228%	18.8	18.6
2	<i>IL2RG</i>	IL2RG_1xMP	97.8%	0.094%	1,040	1,020
3	<i>IL2RG</i>	IL2RG_5MP_1xMP	93.2%	0.005%	18,600	17,400
4	<i>IL2RG</i>	IL2RG_11MP_1xMP	87.1%	0.008%	10,900	9,500
5	<i>VEGFA</i>	VEGFA_1xMP	74.1%	10.82%	6.8	5.1
6	<i>VEGFA</i>	VEGFA_5MP_1xMP	75.7%	0.19%	398	302
7	<i>VEGFA</i>	VEGFA_7MP_1xMP	16.5%	0.02%	825	136
8	<i>VEGFA</i>	VEGFA_9MP_1xMP	42.0%	0.22%	191	80
9	<i>VEGFA</i>	VEGFA_10MP_1xMP	23.7%	0.08%	296	70
10	<i>VEGFA</i>	VEGFA_11MP_1xMP	23.9%	0.11%	217	52

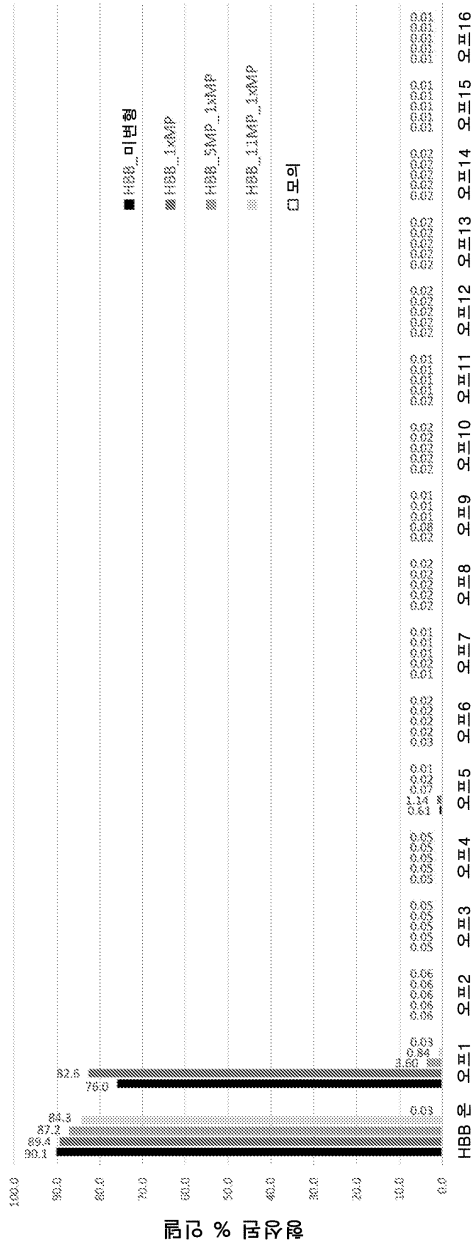
도면15

K562 세포에서 표적화하는 HBB에 대한 온- & 오프-표적 HDR & 인델 형성



도면16

K562 세포에서 HBB의 온-표적 편집 및 유사한 서열의 오프-표적 편집:
처리된 세포로부터 PCR-증폭된 유전자좌의 심도 서열분석

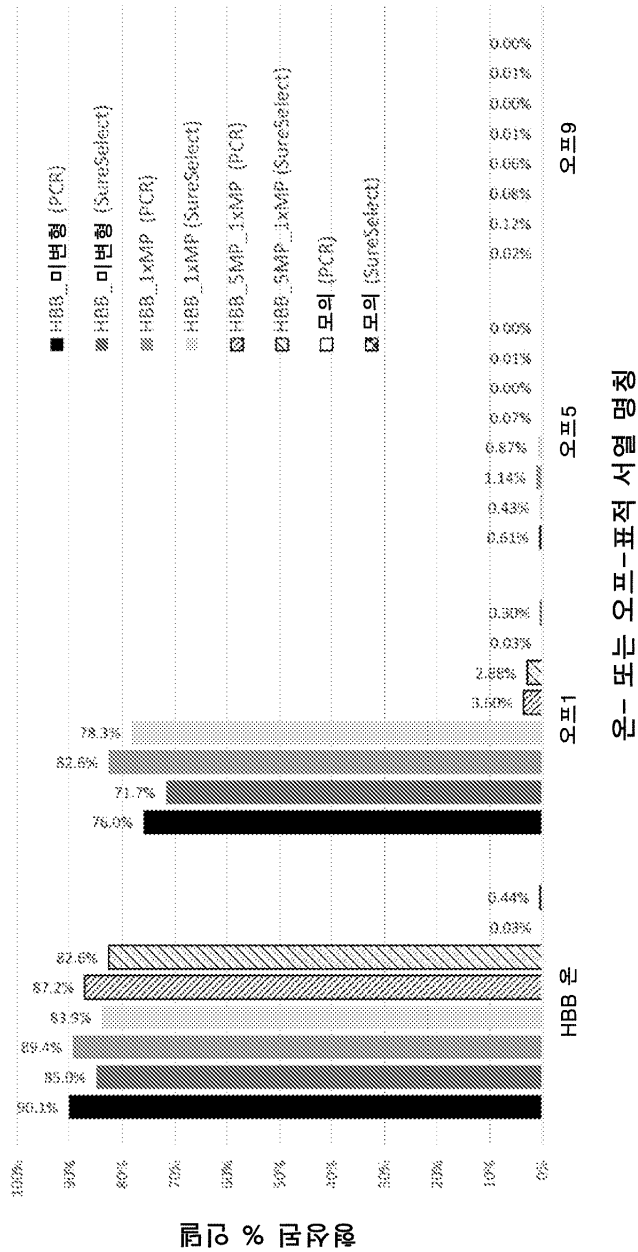


온-또는 오프-표적 서열 명칭

도면17

K562 세포에서 HBB의 온-표적 편집 및 유사한 서열의 오프-표적 편집:

PCR-증폭된 유전자좌의 심도 서열분석 대 SureSelect 서열 포획



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Agilent Technologies, Inc.

<120> High Specificity Genome Editing Using Chemically Modified Guide RNAs

<130> 20160085-03

<140> PCT/US2017/036648

<141> 2017-06-08

<150> US 62/347,553

<151> 2016-06-08
 <150> US 15/493,129
 <151> 2017-04-20
 <160> 217
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 1
 agtcctcatc tccctcaagc agg 23

 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 2
 agtcctcaac tccctcaagc agg 23

 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 3
 actcctcatc cccctcaagc cgg 23

 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 4
 gcagatgtag tgtttccaca ggg 23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 5
 gcagatgtag tatttcaca ggg 23
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 6
 ccagatgtag cgtttcaca ggg 23
 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 7
 gcagatgttg tgtttcaca ggg 23

 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 8
 cttgccccac agggcagtaa cgg 23
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 9

tcagcccccac agggcagtaa ggg 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

tggtaatgat ggcttcaaca tgg 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

tggtaatgat gacttcaaca tag 23

<210> 12

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 13

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (110)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphorothioate
 <400> 13
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 14
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-thiophosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (110)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-thiophosphonoacetate
 <400> 14
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 15
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-thiophosphonoacetate
 <220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-thiophosphonoacetate
 <400> 15
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 16

<211> 111
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 16
 uccucaucuc ccucaagcgu uaaagagcua ugcugguaac agcauagcaa guuuuuuuuaa 60
 ggcuaaguccg uuaucaacu u gaaaaagugg caccgagucg gugcuuuuuu u 111
 <210> 17
 <
 211> 110
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 17
 ccucaucucc cucaagcguu uaagagcuau gcugguaaca gcuaugcaag uuuuuuuuag 60
 gcuaaguccgu uaucaacuug aaaaaguggc accgagucgg ugcuuuuuuu 110
 <210> 18
 <211> 114
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 18
 gaguccuau cucccucaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuuaa 60
 uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114
 <210> 19
 <211> 115
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 19
 ggaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuuaa 60
 auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115
 <210> 20
 <211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 20

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 21

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 21

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 22

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 22

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 23

<211> 113

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 23
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 24
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 24
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 25
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

 <220><221> misc_feature
 <222> (109)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 25
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 26
 <211> 113

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (108)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 26
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113
 <210> 27
 <211> 114
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate modification of an overhanging
 nucleotide N
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(4)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 27
 caguccucau cucccucaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuuuu 60
 uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

 <210> 28
 <211> 114
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate modification of an overhanging
 nucleotide N

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 28

gaguccucau cuccucaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuaaa 60

uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

<210> 29

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate modification of an overhanging
nucleotide N

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 29

ucaguccuca ucuccuca gcuuuuaga gcuauugcugg uaacagcaua gcaaguuuuaa 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 30

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate modification of an overhanging
nucleotide N

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 30

agaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuaa 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 31

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate modification of an overhanging
nucleotide N

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(116)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 31

cucaguccuc aucucccuca agcguuuuag agcuaugcug gaaacagcau agcaaguuua 60

aaauaaggcua guccguuaua aacuugaaaa aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 116

<210> 32

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate modification of an overhanging
nucleotide N

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(116)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 32

gagaguccuc aucucccuca agcguuuuag agcuaugcug guaacagcau agcaaguuaa 60

aaauaaggcua guccguuauc aacuugaaaa aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 116

<210> 33

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 33

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 34

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 34

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 35

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 35

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 36

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 36

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 37

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(19)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 37

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 38

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methyl

<400> 38

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 39

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> 2'-O-methyl

<400> 39

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 40

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl

<400> 40

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 41

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 2'-O-methyl
 <400> 41
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 42
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 2'-O-methyl
 <400> 42
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 43
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 43
 gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 44

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 44

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaucuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 45

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 45

gcagauag uuuuccaca guuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaau 60

aagguaguc guuaucac uuaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 46

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(11)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 46

gcagauag uuuuccaca guuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaau 60

aagguaguc guuaucac uuaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 47

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(12)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 47

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 48

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(13)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 48

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 49

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 49

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 50

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 50

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 51

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(16)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 51

gcagauaguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 52

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(17)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 52

gcagauaguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 53

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 53
 gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113
 <210> 54
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 54
 gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113
 <210> 55
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 55

gcagaguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 56

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 56

gcagaguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 57

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 57

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 58

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 58

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 59

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 59
 gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 60
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 60
 gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 61
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 61

gcagauag uuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc guuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 62

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 62

gcagauag uuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc guuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 63

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 63

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cuuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 64

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 64

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cuuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 65

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 65

gcagauaguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 66

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 66

gcagauaguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 67

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 67
 gcagauag uuuuccaca guuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaau 60
 aaggcuagc guuaucac uuaaaaaa ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 68
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (112)..(113)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 68
 gcagauag uuuuccaca guuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaau 60
 aaggcuagc guuaucac uuaaaaaa ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113
 <210> 69
 <211> 113
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(113)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 69

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 70

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 70

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 71

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 71
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 72
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 72
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 73
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(12)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 73

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 74

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(13)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 74

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 75

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 75

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 76

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 76

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 77

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(16)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 77
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 78
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 78
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 79
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 79
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 80
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 80
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 81
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 81
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 82
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 82
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 83
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 83
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 84
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 84
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 85
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 85

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 86

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 86

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 87

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 87

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 88

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 88

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 89

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 89
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 90
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 90
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 91
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 91

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 92

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 92

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 93

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 93

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 94

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 94

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 95

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 95

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 96

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 96

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 97

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 97

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 98

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 98

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 99

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 99

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 100

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 100

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 101

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 101

cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 102

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 102

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 103
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 103

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 104
 <211> 2838
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 104

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60

cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120
 gtatttgtct catgagcggg tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa 240
 attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300
 aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgga 360
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600

aagtgtacgc gtcacgtgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca	660
gggcgcgtcc cattcgccat tcagctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc	720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt	780
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcgcaggcca aagatgtctc	900
ccgcatgcgc tcagtcctca tctccctcaa gcaggccctg ctggtgcact gaagagccac	960
cctgtgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcggcc acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc	1260
gcttctctgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	1560
cctgtttccg cctgccgtt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg	1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag	1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgccttata cggttaactat	1740
cgctttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1800
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac	1860
tacggctaca ctagaaggac agtatattgt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc	1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt	1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaa gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg	2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca	2160
atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtaggca	2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc cgtcgtgtag	2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac	2340
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc	2400
agaagtggct ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct	2460

agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
 gtggtgtcac gtcgctcggt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tectccgac 2640
 gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
 tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820
 aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 105
 <211> 2838
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 105

gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120
 gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaatgtga agcgtaata tttgtttaa 240
 attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300
 aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgga 360
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttggggg cgagggtccg 480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600
 aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca 660
 gggcgcgtec cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt 780
 aacgccaggg ttttccagt cagcaggtt taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcgcaggga aagaggtctc 900

ctgtatgcac tcagtcctca actccctcaa gcaggcgacc cttggtgcac tgacaaaccg 960
 ctctcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080

cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg agtgagctaa 1140
ctcacattaa ttgcgtttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260
gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320

cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctgagtcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag ccgaccgct gcgccttatc cgtaactat 1740

cgctctttagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
aggattagca gagcgaggta ttagggcgtt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgaagcc agttaccttc 1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggttag cgggtggttt 1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggcatg 2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgagga 2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag 2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc 2640
gttgtcagaa gtaagttggc gcgagtgtta tactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 106

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 106

```

gcgtttcttg gtagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca      60

cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg      120
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg      180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa      240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa      300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttgga      360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa cgtctatca      420
gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggggt cgaggtgccg      480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgatatt agagcttgac ggggaaagcc      540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc      600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca      660
gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc      720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt      780
aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcaggagagg gagccatgct      900

catctccagc ccactcctca tccccctcaa gccggtccca ggctgagagg ctaaagcttg      960
tctttgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc      1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca      1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatt agtgagctaa      1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag      1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc      1260
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct      1320

cactcaaagg cgtaaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg      1380
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc      1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga      1500
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct      1560

```

cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1620
 gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgtccaag 1680
 ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggttaactat 1740

 cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
 aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860
 tacggctaca ctagaaggac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 1980
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
 ttttctacgg ggctcgacgc tcagtgggaa gaaaactcac gttaagggat tttggcatg 2100
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 2160

 atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
 ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
 agaagtgggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
 gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

 cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 2640
 gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
 tctcttactg tcatgccatc cgtaaatgac ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
 tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat 2820
 aatacgcgc cacatagc 2838

 <210> 107
 <211> 2838
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 107

 gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60

 cagggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120
 gtattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg 180

ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa	240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgga	300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgaa	360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca	420
ggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg	480
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc	540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc	600
aagtgtagcg gtcacgtcg gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca	660
ggcgcgctcc cattcgccat tcaggtcg cgtaactgttg gaaggcgat cggcgcgcc	720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt	780
aacgccaggg ttttccagt cagcaggtg taaaacgac gccagtgc gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcaagagctt cactgagtag	900
gattaagata ttgcagatgt agtgtttcca cagggtggct cttcagtgc ccagcggaac	960
ctgctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgtcttcc	1260
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgtcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320
cactcaaagg cgttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct	1560
cctgttcga cctgccgt taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg	1620
gcgttttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag	1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgccttacc cggttaactat	1740
cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1800
aggattagca gagcgaggta ttaggcggg gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac	1860
tacggctaca ctagaaggac agtatattgt atctgcgtc tgctgaagcc agttacctc	1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgtggtag cgggtgtttt	1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2040

ttttctacgg ggctcgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2100
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 2160

 atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtig cctgactccc cgtcgtgtag 2280
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
 ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
 gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

 cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta gctccttcgg tcctccgac 2640
 gtgtcagaa gtaagtggc cgcaagtgtta tcaatcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
 tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat 2820
 aataccgcgc cacatagc 2838

 <210> 108
 <211> 2838
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 108

 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60

 cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120
 gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180
 ttccgcgcac atttccccga aaagtccac ctaaattgta agcgttaata tttgtttaa 240
 attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggcgc aaatcggtcaa 300
 aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttggaa 360
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggggt cgaggtgccg 480

 taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540
 ggcgaaactg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600
 aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca 660

gggcgcgctcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 720
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780
 aacgccaggg ttttccagc cagcaggttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgaatcgggc tcaagagctt cactgagtag 900

 gattaagata ttgcagatgt agtatattcca cagggtggct cttcagtgc ccagcggaac 960
 ctgctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaagt agtgagctaa 1140
 ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260
 gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320

 cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380
 tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 1440
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560
 cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg 1620
 gcgctttctc atagctcac ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680
 ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgt gcgccttacc cggtaactat 1740

 cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
 aggattagca gagcgaggta ttaggcggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 1860
 tacggctaca ctagaaggac agtatattgt atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 1920
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt 1980
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgggaa gaaaactcac gtaagggat tttggtcatg 2100
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

 atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtaggca 2220
 cctatctcag cgatctgct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac 2340
 ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520

gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 2640

gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaaatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820

aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 109

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 109

gcgttttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180

ttccgcgcac atttccccga aaagtccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300

aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagtttgga 360

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caactcaaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540

ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600

aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca 660

gggcgcgtcc cattcgccat tcagctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720

ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780

aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840

cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcgggcc tcaagagctt cactgagtag 900

gattaagata ttccagatgt agcgtttcca cagggtggct cttcagtga ccagcggaac 960

ctgctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020

ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca 1080

cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 1140

ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260
gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320

caactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg 1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgt gcgccttata cggtaactat 1740

cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860
tacggctaca ctagaaggac agtatcttgg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg 2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtig cctgactccc cgtcgtgtag 2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 2640
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 110

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 110

```

gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga      60

cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg      120
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg      180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa      240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa      300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttgaa      360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa cgtctatca      420
ggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggt cgaggcgccg      480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc      540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcggcgctga gggcgctggc      600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca      660
ggcgcgctcc cattcgccat tcagctgcg caactgttg gaaggcgat cgtgcggc      720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      780
aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcgggc tcaagagctt cactgagtag      900

gattaagata ttgcagatgt tgtgtttcca cagggtggct cttcagtga ccagcgaac      960
ctgctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttccttt agtgagggtt aattgcgcgc      1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca      1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa      1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccg gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag      1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc      1260
gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct      1320

cactcaaagg cgttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg      1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc      1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga      1500
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct      1560
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg      1620

```

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag 1680
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggttaactat 1740

cgctcttgagt ccaacccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860
tacggctaca ctagaaggac agtattttgg atctgcgctc tgcgaagcc agttaccttc 1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgggaa gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc cgtcgtgtag 2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 2640
gttgtcagaa gtaagttggc gcgagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgctc aatacgggat 2820
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 111
<211> 2838
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 111

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120
gttattgtct catgagcggg tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaaattgta agcgtaata ttttgtaaaa 240

attcgcgtta aatTTTTgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300
 aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttggaa 360
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggtt cgagggtgccg 480

 taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540
 ggcgaaactg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga ggggagccta gggcgctggc 600
 aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg gcccgctaca 660
 gggcgcttc cattcgccat tcaggtgcg caactgttg gaaggcgat cgggtcgggc 720
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt 780
 aacgccaggg ttttccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcggcctcac caccaacttc 900

 atccacgttc accttgcccc acaggcgagt aacggcagac ttctcctcag gagtcatg 960
 caccagcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca 1080
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg agtgagctaa 1140
 ctacattaa ttgcgttcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtccag 1200
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttc 1260
 gcttctcgc tactgactc gctgcgtcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320

 cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 1440
 catagctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct 1560
 cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgct ttctcccttc gggaagcgtg 1620
 gcgctttctc atagctcag ctgtaggtat ctgattcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680
 ctgggtgtg tgcacgaacc cccgttcag ccgaccgt gcgccttacc cggttaactat 1740

 cgtcttgagt ccaacccgtt aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
 aggtattgca gagcgaggta tgtaggcgtt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 1860
 tacggctaca ctagaaggac agtatgtgtt atctgcgtc tgctgaagcc agttaccttc 1920
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgtggttag cgggtgtttt 1980
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
 ttttctacgg ggtctgacg tcagtggaaac gaaaactcac gtaagggt tttggtcatg 2100

agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220

cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtig cctgactccc cgtcgtgtag 2280

ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400

agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460

agagtaagta gticgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520

gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tcctccgac 2640

gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820

aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 112

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 112

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120

gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180

ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgga 300

aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgaa 360

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggggt cgaggtgccg 480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540

ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600

aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgttaatg cgccgtaca 660

gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720

ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt	780
aacgccaggg ttttccagc cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcggatagga aaggtgaagt	900
cagagcagtg cticagcccc acagggcagc aagggcagcc ttcctctaaa taccagattc	960
ccaaagcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc	1260
gcttcctcgc tctactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320
cactcaaagg cgtaatacgt gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	1440
cataggtccc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	1560
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctt tttcccttc gggaagcgtg	1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag	1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag ccgaccgct gcgccttatc cggtaactat	1740
cgctttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1800
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	1860
tacggctaca ctagaaggac agtatattgt atctgcgctc tgcigaagcc agttaccttc	1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt	1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggtt tttggtcatg	2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca	2160
atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca	2220
cctatctcag cgatctgctt atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag	2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct gggcccagtg ctgcaatgat accgcgagac	2340
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc	2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct	2460
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc	2520

gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggta gctccttcgg tcctccgac 2640

gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaaatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820

aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 113

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 113

gcgttttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180

ttccgcgcac atttccccga aaagtccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300

aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttgga 360

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caactcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540

ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600

aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca 660

gggcgcgtcc cattcgccat tcagctgcg caactgttg gaaggcgat cgggtcgggc 720

ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780

aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840

cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcgggcagct gcaggaataa 900

gagggatgtg aatggtaatg atggcttcaa catggcgctt gctcttcatt ccctgggtgt 960

agtctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020

ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca 1080

cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 1140

ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260
gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320

caactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560
cctgttccga cctgccgt taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg 1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgccttacc cggtaactat 1740

cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
aggattagca gagcgaggta ttagggcgt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860
tacggctaca ctagaaggac agtatctgtg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt 1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg 2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtig cctgactccc cgtcgtgtag 2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
agagtaagta gtgcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
gtggtgtcac gtcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 2640
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtt tactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 114

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 114

```

gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga      60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg      120
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg      180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa      240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgga      300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttgaa      360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca      420
ggcgcatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggt cgaggcgccg      480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc      540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcggcgctga gggcgctggc      600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca      660
ggcgcgctcc cattcgccat tcagctgcg caactgttg gaaggcgat cggcgcggc      720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      780
aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcgggc tccaatatg agagtgaatg      900

aaaagtgtca gctgtaatg atgacttcaa catagtcaga actctttggg ctgttccaaa      960
catcagcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttccttt agtgagggtt aattgcgcgc      1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca      1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa      1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag      1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc      1260
gcttctctcg tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct      1320

cactcaaagg cgttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg      1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc      1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga      1500
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct      1560
cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg      1620

```

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag 1680
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatt cggttaactat 1740

cgctcttgagt ccaacccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860
tacggctaca ctagaaggac agtattttgt atctgcgctc tgcagaagcc agttaccttc 1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgggaa gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc cgtcgtgtag 2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340
ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg tcctccgac 2640
gttgtcagaa gtaagttggc gcgagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgctc aatacgggat 2820
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 115
<211> 1368
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic construct
<400> 115

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15
Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
 35 40 45
 Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 50 55 60
 Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
 85 90 95
 Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
 100 105 110
 His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
 115 120 125
 His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
 130 135 140
 Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 145 150 155 160
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp

275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys

 325 330 335
 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg

 385 390 395 400
 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp

 450 455 460
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys

 515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555 560
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
 645 650 655
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
 705 710 715 720
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
 725 730 735
 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
 740 745 750
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
 755 760 765
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile

770	775	780	
Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro			
785	790	795	800
Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu			
	805	810	815
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg			
	820	825	830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys			
	835	840	845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg			
	850	855	860
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys			
865	870	875	880
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys			
	885	890	895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp			
	900	905	910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr			
	915	920	925
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp			
	930	935	940
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser			
945	950	955	960
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg			
	965	970	975
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val			
	980	985	990
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe			
	995	1000	1005
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala			
1010	1015	1020	

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe

1025

1030

1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala

1040

1045

1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu

1055

1060

1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val

1070

1075

1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr

1085

1090

1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys

1100

1105

1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro

1115

1120

1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val

1130

1135

1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys

1145

1150

1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser

1160

1165

1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys

1175

1180

1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu

1190

1195

1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly

1205

1210

1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val

1220

1225

1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser

1235

1240

1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys

1250 1255 1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys

1265 1270 1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala

1280 1285 1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn

1295 1300 1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala

1310 1315 1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser

1325 1330 1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr

1340 1345 1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp

1355 1360 1365

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 116

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 117

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1 5

<210> 118

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 118

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 119

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400>

> 119

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro Lys Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Val

20

<210> 120

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 120

Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Pro Lys Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Val

<210> 121

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 121

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 122

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 122

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20 25

<210> 123

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 123

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 124

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(8)

<223> 2'-O-methyl

<220><

221> misc_feature

<222> (9)..(12)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (30)..(32)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (33)..(34)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(37)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (39)..(40)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (42)..(43)

 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (45)..(46)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (47)..(48)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (50)..(51)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (60)..(61)

<223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (65)..(67)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (70)..(72)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (76)..(78)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature

<222> (80)..(83)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (90)..(91)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (93)..(94)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (95)..(97)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (100)..(102)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (104)..(105)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> misc_feature
 <222> (106)..(113)
 <223> 2'-O-methyl
 <400> 124

aguccucauc uccucaagc guuaagagc uaucuggua acagcauagc aaguuaau

60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 125

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 125

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 126

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 126

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 127

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 127

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 128

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 128

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 129

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 129

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 130

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 130

cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 131

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 131

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 132

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 132

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 133

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 133
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 134
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 134
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 135

<211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 135
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 136
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 136
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 137
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 137
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 138
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <400> 138
 cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aagguuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 139
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 139
 cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aagguuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 140
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 140
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100
 <210> 141
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 141

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 142

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 142

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 143

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 143
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 144
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 144
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 145
 <211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 145

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 146

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 146

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 147

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 147

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 148

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 148
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 149
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 149
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

 <210> 150

<211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 150
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 151
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 151

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 152

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 152

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 153

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 153
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 154
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 154
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 155

<211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 155

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100

<210> 156
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 156
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 157
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 157
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 158
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <400> 158
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 159
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 159
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 160
 <211> 100
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 160

cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 161

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 161
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 162
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(10)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 162
 cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 163
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 163

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 164

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 164

cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 165

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <400> 165
 cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 166
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 166

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 167

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 167

cuugcccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 168

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 168
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 169
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 169
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 170
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 170
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 171
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 171
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 172
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> 2'-O-methyl phosphorothioate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl phosphorothioate
 <400> 172
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 173

<211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 173
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 174
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 174
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 175
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 175
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100
 <210> 176
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 176
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 177

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 177

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 178

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 178

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 179

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 179

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 180

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 180

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 181

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 181

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 182

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 182

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 183

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 183

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 184

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 184

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 185

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 185

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 186

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 186
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 187
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 187
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 188
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> 2'-O-methyl

 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 188
 cuugccccac agggcaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 189
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 189

cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 190

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-methyl-3'-thiophosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 190

cuugccccac agggcaguaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 191

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 191

tggtgaggat ggcttcaaca cgg 23

<210> 192

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 192

ggtgagtgag tgtgtgcgtg tgg 23

<210> 193

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 193

tgtgggtgag tgtgtgcgtg agg 23

<210> 194

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 194

ggugagugag ugugugcgug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 195

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 195
 ggugagugag ugugugcgug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 196
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 196
 ggugagugag ugugugcgug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 197
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 197
 ggugagugag ugugugcgug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 198
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <220><221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate
 <400> 198
 ggugagugag ugugugcgug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
 <210> 199
 <211> 100
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(100)

<223> 2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate

<400> 199

ggugagugag ugugugcgug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 200

<211> 158

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 200

tcaggcgaga gccatctatt gcttacattt gcttctgaca caactgtgtt cactagcaac 60

ctcaaacaga caccatgggtg cacctgactc ctgtagagaa gtctgcggtt actgccctgt 120

ggggcaaggt gaacgtggat gaagttgggtg gtgaggcc 158

<210> 201

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 201

cttgccccac agggcagtaa cgg 23

<210> 202

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 202

tcagccccac agggcagtaa ggg	23
<210> 203	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 203	
cttgccccag acagggcagt aaggg	25
<210> 204	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 204	
cctctccac agggcagtaa agg	23
<210> 205	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 205	
cttgccccta gagggcacta aagg	24
<210> 206	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 206	
gtgccccac agggcagcaa agg	23
<210> 207	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 207	
cctgtccac agggcaggaa ggg	23
<210> 208	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 208	
gtggcccccac agggcaggaa tgg	23
<210> 209	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 209	
ctcgccctc agggcagtag tgg	23
<210> 210	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 210	
attgccccac ggggcagtga cgg	23
<210> 211	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 211	
cttgccaccac agagcactaa ggg	23
<210> 212	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 212	
cttgccccag agggctgtta agg	23
<210> 213	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 213	
cttgccccac agggcactga ggg	23
<210> 214	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 214	
cctgccccac agggcagcca agg	23
<210> 215	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 215	
ctctgccccca caggccagga aggg	24
<210> 216	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 216	
cttgtccccca cagggcagtg gcgg	24
<210> 217	

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 217

cttgccccac aggtcattaa tag

23