(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0099412
(43) 공개일자 2025년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2025.05)
A61K 48/0058 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7020856(분할)
(22) 출원일자(국제) 2021년11월12일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7019155
원출원일자(국제) 2021년11월12일
심사청구일자 2024년11월12일
(85) 번역문제출일자 2025년06월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/059146
(87) 국제공개번호 WO 2022/104062
국제공개일자 2022년05월19일
(30) 우선권주장
63/113,131 2020년11월12일 미국(US)
63/233,664 2021년08월16일 미국(US)

(71) 출원인
프리시젼 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 노스캐롤라이나주 27701 스위트 에이-100 더램 디브렐 빌딩 302 이스트 페티그루 스트리트
(72) 발명자
오웬스, 개리
미국 27712 노스캐롤라이나 더럼 레이지리버 드라이브 4720
레이프, 자넬
미국 27587 노스캐롤라이나 웨이크 포레스트 비스타 델 라고 레인 505
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

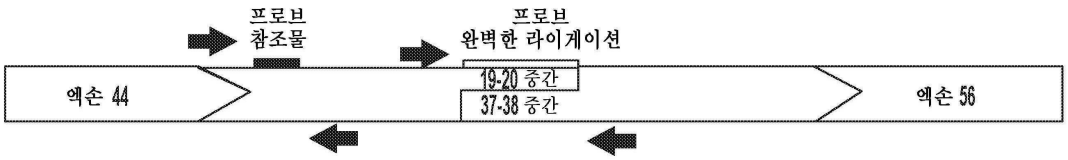
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **디스트로핀 유전자 내의 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제**

(57) 요 약

본 개시내용은 디스트로핀 유전자 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 포괄한다. 본 개시내용은 또한 이러한 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 유전자 변형된 세포를 제조하는 방법을 포괄한다. 추가로, 본 개시내용은 본 개시내용의 조작된 메가뉴클레아제 단백질 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물, 및 대상체에서 디스트로핀 유전자의 변형을 위한, 또는 뒤시엔느 근육이영양증의 치료를 위한 이러한 조성물의 용도를 포괄한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2830/42 (2013.01)
C12N 2830/48 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)
(72) 발명자
스미스, 제임스, 제퍼슨
미국 27560 노스캐롤라이나 모리스빌 위버 포레스트 웨이 1916
모리스, 존
미국 27612 노스캐롤라이나 롤리 오크 파크 로드 5037
터너, 케이틀린
미국 27712 노스캐롤라이나 더럼 팀버크릭 코트 5
루이스, 휘트니
미국 27565 노스캐롤라이나 옥스포드 도시 로드 5113
잔츠, 데렉
미국 27701 노스캐롤라이나 더럼 글로리아 애비뉴 1011

명 세 서

청구범위

청구항 1

디스트로핀 유전자 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제의 용도로서, 여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 상기 제1 서브유닛은 상기 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하고, 여기서 상기 제2 서브유닛은 상기 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 조작된 메가뉴클레아제, 분자 생물학 및 재조합 핵산 기술의 분야에 관한 것이다. 특정한 측면에서, 본 발명은 디스트로핀 유전자로부터의 엑손의 제거 및 뒤시엔느 근육 이영양증을 갖는 대상체의 치료에 유용한 조작된 메가뉴클레아제에 관한 것이다.

[0002] EFS-웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0003] 본 출원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2021년 11월 12일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P109070054WO00-SEQ-EPG로 명명되고, 279,819 바이트 크기이다.

배 경 기 술

[0004] 뒤시엔느 근육 이영양증 (DMD)은 전세계적으로 3500명의 소년마다 약 1명에게 영향을 미치는 희귀한 X-연관 근육 퇴행성 장애이다. 질환은 가장 널리 공지된 유전자인 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발된다. 디스트로핀 유전자는 X 염색체의 2.2 Mb에 걸쳐 있고, 79개의 엑손으로부터 유래된 14-kb 전사체를 우세하게 코딩한다. 골격근, 평활근 및 심근세포에서 발현되는 바와 같은 전장 디스트로핀 단백질은 3685개 아미노산이고, 427 kD의 분자량을 갖는다. 중증 뒤시엔느 표현형은 일반적으로 골격근 및 심장 근육으로부터의 전장 디스트로핀 단백질의 손실과 연관되며, 이는 쇠약 근육 변성 및, 궁극적으로는, 심부전으로 이어진다. 다수의 상이한 디스트로핀 유전자 돌연변이가 기재되어 있으며, 이들 중 다수는 중증 DMD 또는 보다 경도의 베커 근육 이영양증을 유발한다.

[0005] DMD의 치료를 위해 추구되고 있는 여러 치료 전략이 존재한다. 제1로, "유전자 대체" 전략은 활발한 연구 분야이다 (Oshima et al., (2009) J. Am. Soc. Gene Ther. 17:73-80; Liu et al., (2005) Mol. Ther. 11:245-56; Lai et al., (2006) Hum Gene Ther. 17:1036-42; Odom et al., (2008) Mol. Ther. 16:1539-45). 이러한 접근법은 바이러스 전달 벡터, 전형적으로 아데노-연관 바이러스 (AAV)를 사용하여 환자에게 디스트로핀 유전자의 기능적 카피를 전달하는 것을 수반한다. 그러나, 디스트로핀 유전자의 대형의 크기는 이를 통상의 바이러스 벡터의 제한된 운반 능력과 비상용성이게 만든다. 이는 유전자의 반복적인 중심 부분의 대부분을 제거하여 단지 최소로 기능적인 단백질만을 남긴, "마이크로-디스트로핀" 유전자의 사용을 필요로 한다. 그러나, "마이크로-디스트로핀"의 발현이 임상 이익에 충분한지는 명확하지 않다. 또한, 이러한 접근법은 삽입 돌연변이유발로 이어질 수 있는 환자 게놈 내로의 무작위 유전자 통합의 가능성, 및 전달 벡터에 대한 면역 반응에 대한 잠재력이 문제된다.

[0006] DMD를 치료하기 위한 제2 접근법은 건강한 근육 전구체 세포를 환자 근섬유 내로 이식하는 것을 수반한다 (Peault et al., (2007) Mol. Ther. 15:867-77; Skuk et al., (2007) Neuromuscul. Disord. 17:38-46). 이러한 접근법은 이식된 근모세포의 비효율적인 이동 및 환자에 의한 면역 거부에 대한 잠재력이 문제된다.

[0007] 제3 접근법은 PTC124를 사용한 넌센스 돌연변이의 억제를 수반한다 (Welch et al., (2007) Nature 447:87-91). 그러나, 이는 약물의 평생 투여를 필요로 할 것이고, 접근법은 아직 임의의 유의한 임상 이익을 나타내지 않는다.

[0008] DMD를 치료하기 위한 제4 접근법은 "엑손 스키핑"으로 불린다 (Williams et al., (2008) BMC Biotechnol. 8:35; Jearawiriyapaisarn et al., (2008) Mol Ther. 16:1624-29; Yokota et al., (2007) Acta Myol. 26:179-84; van Deutekom et al., (2001) Hum. Mol. Gen. 10:1547-54; Benedetti et al., (2013) FEBS J. 280:4263-80; Rodino-Klapac (2013) Curr Neurol Neurosci Rep. 13:332; Verhaart & Aartsma-Rus (2012) Curr Opin Neurol. 25:588-96). 일반적으로, 디스트로핀 유전자의 아미노 (N)- 및 카르복시 (C)-말단 부분은 근섬유에서 막 완전성을 유지시키는 "스캐폴드" 단백질로서의 그의 역할을 위해 필수적인 반면, 24개의 스펙트린-유사 반복부를 포함하는 중심 "로드 도메인"은 적어도 부분적으로 불필요하다. 실제로, 중증 뒤시엔느 표현형은 전형적으로, 필수 C-말단 도메인이 결여된 디스트로핀 단백질의 말단절단된 형태를 발생시키는 프레임시프트 및/또는 조기 종결 코돈을 도입하는 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이와 연관된다. 전체 엑손의 대형 결실을 포함한 중심 로드 도메인에서의 돌연변이는 전형적으로, 이것이 단백질의 C-말단 도메인이 무손상이도록 리딩 프레임을 유지시키는 경우에, 훨씬 더 경도의 베커 표현형을 발생시킨다.

[0009] DMD는 리딩 프레임 시프트를 발생시키는 1개 이상의 전체 엑손(들)의 결실에 의해 가장 빈번하게 유발된다. 예를 들어, 엑손 45는 뒤시엔느 환자에서 빈번하게 결실된다. 엑손 45는 176 bp 길이이고, 이는 3으로 나눌 수 없기 때문에, 엑손의 결실은 엑손 46-79를 잘못된 리딩 프레임으로 시프트한다. 148 bp 길이인 엑손 44에 대해서도 동일하게 언급될 수 있다. 그러나, 엑손 44 및 45가 결실되면, 결실의 총 크기는 324 bp이고, 이는 3으로 나눌 수 있다. 따라서, 둘 다의 엑손의 결실은 리딩 프레임 시프트를 초래하지 않는다. 이들 엑손은 디스트로핀 단백질의 비-필수 로드 도메인의 부분을 코딩하기 때문에, 단백질로부터 이를 결실시키는 것은 경도의 베커-유사 표현형을 발생시킬 것으로 예상된다. 따라서, 1개 이상의 엑손(들)의 결실로 인해 뒤시엔느 표현형을 갖는 환자는 잠재적으로, 리딩 프레임을 복원하기 위해 1개 이상의 인접한 엑손을 제거하는 것에 의해 치료될 수 있다. 이는 프로세싱된 전사체로부터 1개 이상의 특이적 엑손이 부재하도록 디스트로핀 pre-mRNA에서 스플라이스 수용자 부위를 차단하기 위해 변형된 올리고뉴클레오티드를 사용하는, "엑손 스키핑"의 원리이다. 상기 접근법은 질환-유도 넌센스 돌연변이를 보유하는 엑손 23을 스키핑함으로써 mdx 마우스 모델에서 디스트로핀 유전자 발현을 복원시키는 데 사용되었다 (Mann et al., (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98:42-47). 엑손 51의 스키핑을 유도하는 올리고뉴클레오티드 유사체는 또한 초기 인간 임상 시험에서 유망성을 제시하였다 (Benedetti et al., (2013) FEBS J. 280:4263-80). 이러한 접근법의 주요 제한은 (1) 엑손-스키핑 과정이 비효율적이어서, 비교적 낮은 수준의 기능적 디스트로핀 발현을 발생시키고; (2) 엑손-스키핑 올리고뉴클레오티드가 비교적 짧은 반감기를 가져서 효과가 일시적이므로, 반복적이고 평생의 투여를 필요로 한다는 것이다. 따라서, 엑손-스키핑 접근법은 임상 시험에서 일부 유망성을 보여주었지만, 질환 진행에서의 개선은 최소이고 가변적이었다.

[0010] 본 개시내용은 pre-mRNA보다 게놈 DNA의 수준에서 유전자 발현을 교정함으로써 현행 엑손-스키핑 접근법을 개선시킨다. 본 발명은 종종 메가뉴클레아제로 지칭되는, 조작된 부위-특이적 귀소 엔도뉴클레아제의 쌍을 사용하여 디스트로핀 코딩 서열로부터 특이적 엑손을 절제하는 것을 수반하는 DMD에 대한 영구적 치료이다. 이러한 엔도뉴클레아제의 쌍을 디스트로핀 유전자 내의 엑손에 플랭킹된 인트론 영역 내의 부위로 표적화함으로써, 게놈으로부터 개재 단편을 영구적으로 제거하는 것이 가능하다. 생성된 세포 및 그의 자손은, 비-필수 스펙트린 반복 도메인의 부분은 제거되었지만 필수 N- 및 C-말단 도메인은 무손상인 변형된 디스트로핀을 발현할 것이다.

[0011] 귀소 엔도뉴클레아제 또는 메가뉴클레아제는 식물 및 진균의 게놈에서 통상적으로 발견되는 15-40개의 염기-쌍 절단 부위를 인식하는 자연-발생 뉴클레아제의 군이다. 이는 기생충 DNA 요소, 예컨대 군 1 자기-스플라이싱 인트론 및 인테인과 빈번하게 회합된다. 이는 세포 DNA-복구 기구를 동원하는, 염색체 내 이중-가닥 파괴를 생성함으로써 숙주 게놈 내의 특이적 위치에서 상동 재조합 또는 유전자 삽입을 자연적으로 촉진한다 (Stoddard (2006) Q. Rev. Biophys. 38:49-95). 귀소 엔도뉴클레아제는 통상적으로 4가지의 패밀리: LAGLIDADG 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cys 박스 패밀리 및 HNH 패밀리로 그룹화된다. 이들 패밀리는 촉매 활성 및 인식 서열에 영향을 미치는 구조적 모티프에 의해 특징화된다. 예를 들어, LAGLIDADG 패밀리의 구성원은 보존된 LAGLIDADG 모티프의 1 또는 2개의 카피를 갖는 것으로 특징화된다 (문헌 [Chevalier et al., (2001) Nucleic Acids Res. 29:3757-74] 참조). LAGLIDADG 모티프의 단일 카피를 갖는 LAGLIDADG 귀소 엔도뉴클레아제는 동종이량체를 형성하는 반면, LAGLIDADG 모티프의 2개의 카피를 갖는 구성원은 단량체로서 발견된다.

[0012] I-CreI (서열식별번호: 1)는 조류 클라미도모나스 레인하르티이(Chlamydomonas reinhardtii)의 엽록체 염색체에서 22개의 염기쌍 인식 서열을 인식하여 이를 컷팅하는 귀소 엔도뉴클레아제의 LAGLIDADG 패밀리의 구성원이다. 야생형 I-CreI 절단 부위 선호도를 변형시키기 위해 유전자 선택 기술이 사용되었다 (Sussman et al., (2004) J. Mol. Biol. 342:31-41; Chames et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33:e178; Seligman et al., (2002)

Nucleic Acids Res. 30:3870-79, Arnould et al., (2006) J. Mol. Biol. 355:443-58). I-CreI 및 다른 귀소 엔도뉴클레아제를 포유동물, 효모, 식물, 박테리아, 및 바이러스 게놈 내의 부위를 비롯한, 광범위하게 분기된 DNA 부위를 표적화하도록 포괄적으로 재설계할 수 있는, 모노-LAGLIDADG 귀소 엔도뉴클레아제를 합리적으로 설계하는 방법이 기재되어 있다 (WO 2007/047859).

[0013] WO 2009/059195에 처음 기재된 바와 같이, I-CreI 및 그의 조작된 유도체는 정상적으로 이량체이지만, 제1 서브유닛의 C-말단을 제2 서브유닛의 N-말단에 연결하는 짧은 펩티드 링커를 사용하여 단일 폴리펩티드로 융합될 수 있다 (Li et al., (2009) Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot et al., (2009) Nucleic Acids Res. 37:5405-19). 따라서, 기능적 "단일-쇄" 메가뉴클레아제가 단일 전사체로부터 발현될 수 있다. 2개의 상이한 단일-쇄 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자를 동일한 세포에 전달함으로써, 2개의 상이한 부위를 동시에 절단하는 것이 가능하다. 이는 조작된 메가뉴클레아제에 의해 관찰되는 오프-타겟 컷팅의 극도로 낮은 빈도와 커플링되어 이를 본 개시내용에 바람직한 엔도뉴클레아제로 만든다.

발명의 내용

[0014] 본 개시내용은 디스트로핀 유전자 (예를 들어, 인간 디스트로핀 유전자) 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제, 뿐만 아니라 이러한 조작된 메가뉴클레아제를 포함하는 조성물 및 그의 사용 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제의 쌍은 제1 엑손의 상류의 인트론에서 제1 절단 부위 및 제2 엑손의 하류의 인트론에서 제2 절단 부위를 생성함으로써 디스트로핀 유전자로부터 다중 엑손을 제거하는 데 사용된다. 본원에 기재된 특정한 예에서, 제1 절단 부위는 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 5' 상류의 인트론에서 생성되는 한편, 제2 절단 부위는 엑손 55의 3' 하류의 인트론에서 생성된다. 이러한 과정은 2개의 절단 부위의 어닐링 및 게놈의 복구 후에 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55의 절제 및 제거를 가능하게 한다. 개시된 조작된 메가뉴클레아제에 의해 표적화된 인식 서열은 제1 및 제2 절단 부위가 서로 완벽하게 라이게이션될 수 있는 상보적인 4개의 염기쌍 3' 오버행을 갖도록 (즉, 하나의 오버행의 각각의 염기쌍이 다른 오버행 상의 그의 상보체와 쌍형성하도록), 동일한 4개의 염기쌍 중심 서열을 갖도록 선택된다. 이들 엑손 중 1개 이상이 결여된 돌연변이체 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55를 제거함으로써, 이러한 접근법은 디스트로핀 유전자의 정상 (즉, 야생형) 리딩 프레임의 복원을 발생시킨다. 이렇게 처리된 세포는 중심 스펙트린 반복 도메인의 부분은 부재하지만 N- 및 C-말단 도메인은 무손상인 단축 변형된 형태의 디스트로핀 단백질을 발현할 것이다. 이는 많은 경우에 질환의 중증도를 감소시킬 것이다. 일부 경우에, 이는 보다 경도의 베커 표현형을 생성할 것이다.

[0015] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 디스트로핀 유전자 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 제공하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하고, 여기서 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 인식 서열은 서열식별번호: 6을 포함한다.

[0017] 일부 이러한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함한다.

[0018] 일부 이러한 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은

서열식별번호: 38, 39, 또는 149 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함한다.

[0019] 일부 이러한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 236에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-37 중 어느 하나의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함한다.

[0020] 일부 이러한 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36, 39, 40, 43, 또는 44 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36-38 또는 40-44 중 어느 하나의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함한다.

[0021] 일부 이러한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 36-44 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 60-68 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 60-68 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0022] 일부 실시양태에서, 인식 서열은 서열식별번호: 10을 포함한다.

[0023] 일부 이러한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의

잔기 24-79를 포함한다.

[0024] 일부 이러한 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45-51 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함한다.

[0025] 일부 이러한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 239, 241 및 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 250에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45 또는 46 중 어느 하나의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함한다.

[0026] 일부 이러한 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함한다.

[0027] 일부 이러한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 45-52 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 69-76 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 69-76 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0028] 일부 실시양태에서, 인식 서열은 서열식별번호: 12를 포함한다.

[0029] 일부 이러한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32,

33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 64에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함한다.

[0030] 일부 이러한 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53-55, 57, 또는 58 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함한다.

[0031] 일부 이러한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53 또는 서열식별번호: 55의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-55 중 어느 하나의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 255에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56-59 중 어느 하나의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함한다.

[0032] 일부 이러한 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53 또는 55-59 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 54-59 중 어느 하나의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함한다.

[0033] 일부 이러한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 53-59 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 77-83 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 77-83 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0034] 각각의 상기 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 핵 국재화 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵 국재화 신호는 조작된 메가뉴클레아제의 N-말단에 있다. 일부 실시양태에서, 핵 국재화 신호는 서열식별번호: 3에 대해 적어도 80% 또는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵 국재화 신호는 서열식별번호: 3을 포함한다.

[0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 DNA 구축물을 제공한다.

[0037] 일부 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 바이러스를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 아데노바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 또는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 rh.74 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV9 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV8 캡시드를 갖는다.

[0038] 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 MCK 프로모터, C5-12 프로모터, spc 5-12 프로모터, MHCK7 프로모터, CK8 프로모터, SK-CRM4 프로모터, SP-301 프로모터, SP-817 프로모터, 또는 SP-905 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다.

[0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 바이러스를 제공한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 아데노바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 또는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 rh.74 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV9 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV8 캡시드를 갖는다.

[0041] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 MCK 프로모터, C5-12 프로모터, spc 5-12 프로모터, MHCK7 프로모터, CK8 프로모터, SK-CRM4 프로모터, SP-301 프로모터, SP-817 프로모터, 또는 SP-905 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다.

[0042] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 지질 나노입자를 포함하는 지질 나노입자 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.

[0043] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 재조합 DNA 구축물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 재조합 바이러스를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0047] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 지질 나노입자 조성물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0048] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 제1 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 여기서 제2 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이거나, 또는 여기서 제2 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다.

[0049] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 1에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다.

[0050] 표 1.

[0051] *

	SEQ ID NO: 6의 인식 서열		SEQ ID NO: 10의 인식 서열	
조합	제1 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:	제2 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:
1	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36x.63	45
2	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36x.63	45
3	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36x.63	45
4	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36x.63	45
5	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36x.63	45
6	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36x.63	45
7	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36x.63	45
8	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36x.63	45
9	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36x.63	45
10	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36x.81	46
11	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36x.81	46
12	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36x.81	46
13	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36x.81	46
14	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36x.81	46
15	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36x.81	46
16	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36x.81	46
17	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36x.81	46
18	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36x.81	46
19	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36L.195	47
20	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36L.195	47
21	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36L.195	47
22	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36L.195	47
23	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36L.195	47
24	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36L.195	47
25	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36L.195	47
26	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36L.195	47
27	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36L.195	47
28	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36L.282	48
29	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36L.282	48
30	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36L.282	48
31	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36L.282	48
32	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36L.282	48
33	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36L.282	48
34	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36L.282	48

	SEQ ID NO: 6의 인식 서열		SEQ ID NO: 10의 인식 서열	
조합	제1 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:	제2 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:
35	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36L.282	48
36	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36L.282	48
37	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36L.349	49
38	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36L.349	49
39	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36L.349	49
40	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36L.349	49
41	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36L.349	49
42	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36L.349	49
43	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36L.349	49
44	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36L.349	49
45	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36L.349	49
46	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36L.376	50
47	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36L.376	50
48	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36L.376	50
49	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36L.376	50
50	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36L.376	50
51	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36L.376	50
52	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36L.376	50
53	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36L.376	50
54	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36L.376	50
55	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36L.457	51
56	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36L.457	51
57	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36L.457	51
58	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36L.457	51
59	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36L.457	51
60	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36L.457	51
61	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36L.457	51
62	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36L.457	51
63	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36L.457	51
64	DMD 19-20x.13	36	DMD 35-36L.469	52
65	DMD 19-20x.87	37	DMD 35-36L.469	52
66	DMD 19-20L.249	38	DMD 35-36L.469	52
67	DMD 19-20L.302	39	DMD 35-36L.469	52
68	DMD 19-20L.329	40	DMD 35-36L.469	52
69	DMD 19-20L.374	41	DMD 35-36L.469	52
70	DMD 19-20L.375	42	DMD 35-36L.469	52

[0052]

	SEQ ID NO: 6의 인식 서열		SEQ ID NO: 10의 인식 서열	
조합	제1 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:	제2 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:
71	DMD 19-20L.431	43	DMD 35-36L.469	52
72	DMD 19-20L.458	44	DMD 35-36L.469	52

[0053]

[0054] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.195 (서열식별번호: 47) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-

36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다.

[0055] 특정 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 2에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다.

[0056] 표 2.

	SEQ ID NO: 6의 인식 서열		SEQ ID NO: 12의 인식 서열	
조합	제1 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:	제2 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:
1	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38x.15	46
2	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38x.15	46
3	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38x.15	46
4	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38x.15	46
5	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38x.15	46
6	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38x.15	46
7	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38x.15	46
8	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38x.15	46
9	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38x.15	46
10	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38x.66	47
11	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38x.66	47
12	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38x.66	47
13	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38x.66	47
14	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38x.66	47
15	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38x.66	47
16	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38x.66	47
17	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38x.66	47
18	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38x.66	47
19	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38x.79	48
20	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38x.79	48
21	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38x.79	48
22	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38x.79	48
23	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38x.79	48
24	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38x.79	48
25	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38x.79	48
26	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38x.79	48
27	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38x.79	48
28	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38L.166	49
29	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38L.166	49
30	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38L.166	49
31	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38L.166	49
32	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38L.166	49
33	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38L.166	49
34	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38L.166	49

[0057]

	SEQ ID NO: 6의 인식 서열		SEQ ID NO: 12의 인식 서열	
조합	제1 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:	제2 메가뉴클레아제	SEQ ID NO:
35	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38L.166	49
36	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38L.166	49
37	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38L.478	57
38	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38L.478	57
39	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38L.478	57
40	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38L.478	57
41	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38L.478	57
42	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38L.478	57
43	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38L.478	57
44	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38L.478	57
45	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38L.478	57
46	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38L.512	58
47	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38L.512	58
48	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38L.512	58
49	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38L.512	58
50	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38L.512	58
51	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38L.512	58
52	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38L.512	58
53	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38L.512	58
54	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38L.512	58
55	DMD 19-20x.13	36	DMD 37-38L.528	59
56	DMD 19-20x.87	37	DMD 37-38L.528	59
57	DMD 19-20L.249	38	DMD 37-38L.528	59
58	DMD 19-20L.302	39	DMD 37-38L.528	59
59	DMD 19-20L.329	40	DMD 37-38L.528	59
60	DMD 19-20L.374	41	DMD 37-38L.528	59
61	DMD 19-20L.375	42	DMD 37-38L.528	59
62	DMD 19-20L.431	43	DMD 37-38L.528	59
63	DMD 19-20L.458	44	DMD 37-38L.528	59

[0058]

[0059] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38L.166 (서열식별번호: 56) 또는 그의 변이체이다.

[0060] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 IRES 또는 2A 서열에 의해 분리된다. 특정 실시양태에서, 2A 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 서열이다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 (즉, 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물을 제공한다.

[0062] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 IRES 또는 2A 서열에 의해 분리된다. 특정 실시양태에서, 2A 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 서열이다.

[0063] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 MCK 프로모터, C5-12 프로모터, spc 5-12 프로모터, MHCK7 프로모터, CK8 프로모터, SK-CRM4 프로모터, SP-301 프로모터, SP-817 프로모터, 또는 SP-905 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 제1 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터 및 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 MCK 프로모터, C5-12 프로모터, spc 5-12 프로모터, MHCK7 프로모터, CK8 프로모터, SK-CRM4 프로모터, SP-301 프로모터, SP-817 프로모터, SP-905 프로모터, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 제1 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다.

[0065] 일부 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 바이러스를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 아데노바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 또는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 rh.74 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV9 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV8 캡시드를 갖는다.

[0066] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 (즉, 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는) 재조합 바이러스를 제공한다.

[0067] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 IRES 또는 2A 서열에 의해 분리된다. 특정 실시양태에서, 2A 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 서열이다.

[0068] 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 MCK 프로모터, C5-12 프로모터, spc 5-12 프로모터, MHCK7 프로모터, CK8 프로모터, SK-CRM4 프로모터, SP-301 프로모터, SP-817 프로모터, 또는 SP-905 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터 및 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 MCK 프로모터, C5-12 프로모터, spc 5-12 프로모터, MHCK7 프로모터, CK8 프로모터, SK-CRM4 프로모터, SP-301 프로모터, SP-817 프로모터, SP-905 프로모터, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 아데노바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 또는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 AAV이다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 rh.74 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV9 캡시드를 갖는다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, rh.74 캡시드는 서열식별번호: 182의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 캡시드는 서열식별번호: 183의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV8 캡시드를 갖는다.

[0070] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 (즉, 제1 조작된 메가뉴클레아제를

코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는) 지질 나노입자를 포함하는 지질 나노입자 조성물을 제공한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 재조합 DNA 구축물이다.

[0072] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 (즉, 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는) 제약 조성물을 제공한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 mRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 재조합 DNA 구축물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 기재된 재조합 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 기재된 지질 나노입자 조성물을 포함한다.

[0074] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내에 변형된 표적 서열을 갖는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 진핵 세포에서 발현되고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0075] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내에 변형된 표적 서열을 갖는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0076] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 진핵 세포에서 발현되는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 관심 서열을 포함하는 제2 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성하고, 여기서 관심 서열은 절단 부위에서 디스트로핀 유전자 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 서열은 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열과 상동인 핵산 서열을 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0077] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 및 관심 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성하고, 여기서 관심 서열은 절단 부위에서 디스트로핀 유전자 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열과 상동인 핵산 서열을 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0078] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내에 변형된 표적 서열을 갖는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 진핵 세포에서 발현되고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0079] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내에 변형된 표적 서열을 갖는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0080] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 진핵 세포에서 발현되는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 관심 서열을 포함하는 제2 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성하고, 여기서 관심 서열은 절단 부위에서 디스트로핀 유전자 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 서열은 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열과 상동인 핵산 서열을 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0081] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 및 관심 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성하고, 여기서 관심 서열은 절단 부위에서 디스트로핀 유전자 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열과 상동인 핵산 서열을 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0082] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내에 변형된 표적 서열을 갖는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 진핵 세포에서 발현되고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0083] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내에 변형된 표적 서열을 갖는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 진핵

세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0084] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 진핵 세포에서 발현되는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 관심 서열을 포함하는 제2 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성하고, 여기서 관심 서열은 절단 부위에서 디스트로핀 유전자 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 서열은 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열과 상동인 핵산 서열을 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0085] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포의 디스트로핀 유전자 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 및 관심 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 절단 부위를 생성하고, 여기서 관심 서열은 절단 부위에서 디스트로핀 유전자 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열과 상동인 핵산 서열을 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자, mRNA 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0086] 또 다른 측면에서, 본 발명은 변형된 디스트로핀 유전자를 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 제1 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제는 엑손 45의 5' 상류의 인트론 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 여기서 제2 조작된 뉴클레아제는 엑손 55의 3' 하류의 인트론 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제 및 제2 조작된 뉴클레아제는 진핵 세포에서 발현되고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제는 그의 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 제1 절단 부위를 생성하고, 여기서 제2 조작된 뉴클레아제는 그의 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 제2 절단 부위를 생성하고, 여기서 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 오버행을 갖고, 여기서 제1 절단 부위와 제2 절단 부위 사이의 개재 게놈 DNA는 디스트로핀 유전자로부터 절제되고, 여기서 디스트로핀 유전자는 어닐링되어 변형된 디스트로핀 유전자를 생성한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 1에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다. 이러한 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87

(서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.195 (서열식별번호: 47) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다.

[0088] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 이러한 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 2에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38L.166 (서열식별번호: 56) 또는 그의 변이체이다.

[0089] 일부 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위의 상보적 오버행 (예를 들어, 3' 오버행)은 서로 완벽하게 라이게이션된다.

[0090] 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 32 또는 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 변형된 디스트로핀 유전자에서 복원된 정상 리딩 프레임은 전장 야생형 디스트로핀 유전자와 비교하여 복원된다.

[0092] 일부 실시양태에서, 변형된 디스트로핀 유전자는 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 변형된 디스트로핀 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 변형된 디스트로핀 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제1 mRNA 및/또는 제2 mRNA는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는) mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 재조합 DNA 구축물

이다. 일부 실시양태에서, 제1 재조합 DNA 구축물 및/또는 제2 재조합 DNA 구축물은 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리뉴클레오티드는 1개 이상의 지질 나노입자에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 지질 나노입자에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 지질 나노입자에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 재조합 바이러스에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 재조합 바이러스에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 제1 재조합 및/또는 제2 재조합 바이러스는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는) 재조합 바이러스이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다. 일부 실시양태에서, mRNA는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는) mRNA이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 바이러스에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는) 재조합 바이러스이다.

[0095] 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0096] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체의 표적 세포에서 디스트로핀 유전자를 변형시키는 방법을 제공하며, 여기서 디스트로핀 유전자는 야생형으로부터의 디스트로핀 유전자의 리딩 프레임을 변경시키는 돌연변이를 특징으로 하고, 상기 방법은 제1 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 표적 세포에 전달하는 것을 포함하고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제는 엑손 45의 5' 상류의 인트론 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 여기서 제2 조작된 뉴클레아제는 엑손 55의 3' 하류의 인트론 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제 및 제2 조작된 뉴클레아제는 표적 세포에서 발현되고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제는 그의 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 제1 절단 부위를 생성하고, 여기서 제2 조작된 뉴클레아제는 그의 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 제2 절단 부위를 생성하고, 여기서 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 오버행을 갖고, 여기서 제1 절단 부위와 제2 절단 부위 사이의 개재 게놈 DNA는 디스트로핀 유전자로부터 절제되고, 여기서 디스트로핀 유전자는 어닐링되고, 여기서 디스트로핀 유전자의 정상 리딩 프레임은 전장 야생형 디스트로핀 유전자와 비교하여 복원된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 1에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다. 이러한 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-

36L.195 (서열식별번호: 47) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다.

[0098] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 2에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다. 이러한 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38L.166 (서열식별번호: 56) 또는 그의 변이체이다.

[0099] 일부 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위의 상보적 오버행 (예를 들어, 3' 오버행)은 서로 완벽하게 라이게이션된다.

[0100] 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 32 또는 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 변형된 디스트로핀 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 변형된 디스트로핀 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 베커 근육 이영양증 표현형으로 전환된다.

[0102] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 표적 세포에 전달하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제1 mRNA 및/또는 제2 mRNA는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는) 것이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제1 재조합 DNA 구축물 및/또는 제2 재조합 DNA 구축물은 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리뉴클레오티드는 1개 이상의 지질 나노입자에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 지질 나노입자에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 지질 나노입자에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티

드는 제1 재조합 바이러스에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 재조합 바이러스에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 제1 재조합 및/또는 제2 재조합 바이러스는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는) 재조합 바이러스이다.

[0103] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 표적 세포에 전달하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다. 일부 실시양태에서, mRNA는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는) mRNA이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 바이러스에 의해 표적 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는) 재조합 바이러스이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0105] 또 다른 측면에서, 본 발명은 DMD의 치료를 필요로 하는 대상체에서 DMD를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 DMD는 전장 야생형 디스트로핀 유전자에 비해 디스트로핀 유전자의 리딩 프레임을 변경시키는 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이를 특징으로 하고, 상기 방법은 제1 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제2 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 폴리뉴클레오티드의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제는 엑손 45의 인트론 5' 상류의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 제2 조작된 뉴클레아제는 엑손 55의 인트론 3' 하류의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 여기서 1개 이상의 폴리뉴클레오티드는 대상체의 표적 세포에 전달되고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제 및 제2 조작된 뉴클레아제는 표적 세포에서 발현되고, 여기서 제1 조작된 뉴클레아제는 그의 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 제1 절단 부위를 생성하고, 여기서 제2 조작된 뉴클레아제는 그의 인식 서열에서 디스트로핀 유전자 내에 제2 절단 부위를 생성하고, 여기서 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 오버행을 갖고, 여기서 제1 절단 부위와 제2 절단 부위 사이의 개재 게놈 DNA는 디스트로핀 유전자로부터 절제되고, 여기서 디스트로핀 유전자는 어닐링되고, 여기서 디스트로핀 유전자의 정상 리딩 프레임은 전장 야생형 디스트로핀 유전자와 비교하여 복원된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 1에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다. 이러한 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.195 (서열식별번호: 47) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에

기재된 DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49) 또는 그의 변이체이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 제1 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이고, 제2 조작된 뉴클레아제는 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제 및 제2 조작된 메가뉴클레아제는 표 2에 제공된 메가뉴클레아제 (및 본원에 기재된 그의 변이체)의 조합으로부터 선택된다. 이러한 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위는 상보적 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55) 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제1 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38) 또는 그의 변이체이고, 제2 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 DMD 37-38L.166 (서열식별번호: 56) 또는 그의 변이체이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 제1 절단 부위 및 제2 절단 부위의 상보적 오버행 (예를 들어, 3' 오버행)은 서로 완벽하게 라이게이션된다.

[0109] 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 32 또는 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 변형된 디스트로핀 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 변형된 디스트로핀 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 베커 근육 이영양증 표현형으로 전환된다.

[0111] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제1 mRNA 및/또는 제2 mRNA는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는) mRNA이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제1 재조합 DNA 구축물 및/또는 제2 재조합 DNA 구축물은 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 지질 나노입자에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 지질 나노입자에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제1 재조합 바이러스에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드는 제2 재조합 바이러스에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제1 재조합 및/또는 제2 재조합 바이러스는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는) 재조합

바이러스이다.

[0112] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 및 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다. 일부 실시양태에서, mRNA는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는) mRNA이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는) 재조합 DNA 구축물이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 바이러스에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 본원에 기재된 (즉, 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는) 재조합 바이러스이다.

[0113] 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0114] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열식별번호: 32 또는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열을 포함하는 세포 (예를 들어, 인간 근육 세포)의 게놈 내의 디스트로핀 유전자이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열을 포함하는 세포 (예를 들어, 인간 근육 세포) 내의 전구체 mRNA이다.

[0116] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함하는 세포 (예를 들어, 인간 근육 세포)의 게놈 내의 디스트로핀 유전자이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함하는 세포 (예를 들어, 인간 근육 세포) 내의 전구체 mRNA이다.

[0117] 또 다른 측면에서, 본 발명은 그의 게놈 내에 변형된 디스트로핀 유전자를 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 제공하며, 여기서 변형된 디스트로핀 유전자는 엑손 45-55가 결여되어 있고, 여기서 변형된 디스트로핀 유전자는 엑손 44와 엑손 56 사이의 인트론 내에 위치한 서열식별번호: 32에 제시된 핵산 서열 또는 서열식별번호: 34에 제시된 핵산 서열을 포함한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열식별번호: 32를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열식별번호: 34를 포함한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 근육 세포이다. 일부 실시양태에서, 근육 세포는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포), 골격근 세포 또는 심장 근육 세포이다.

[0120] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열식별번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 폴리펩티드는 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 변형된 디스트로핀 단백질이고, 여기서 상기 폴리펩티드는 디스트로핀 단백질의 C-말단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0121] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 발현하는 본원에 기재된 세포를 제공한다.

[0122] 일부 실시양태에서, 의약은 대상체에서 변형된 디스트로핀 유전자를 생산하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 의약은 DMD의 치료에 유용하다.

[0123] 또 다른 측면에서, 본 발명은 DMD를 치료하거나, 변형된 디스트로핀 단백질 (즉, 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 것)의 수준을 증가시키거나, 또는 DMD와 연관된 증상을 감소시키기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 본원에 개시

된 폴리뉴클레오티드, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 발현하는 본원에 기재된 세포의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0124] 도 1은 DMD 메가뉴클레아제 인식 서열의 대략적인 위치를 제공하고, 디스트로핀 유전자로부터 다중 엑손을 절제하기 위한 이중 메가뉴클레아제 접근법을 예시한 개략도이다. 제시된 바와 같이, DMD 19-20 인식 서열 및 DMD 35-36 인식 서열, 또는 DMD 19-20 인식 서열 및 DMD 37-38 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍은 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55의 제거를 발생시킨다. 이들 인식 서열의 쌍은 인트론 내에 위치하고, 동일한 4개의 염기쌍 중심 서열을 가지며, 상보적 오버행을 갖는 절단 부위를 생성한다. 따라서, 엑손의 제거 후에, 유전자는 엑손 44와 엑손 56 사이에 위치한 인트론 내에 있을 절단 부위에서 라이게이션된다. 전사후 스플라이싱 후에, 이러한 유전자 변형은 엑손 56과 인 프레임으로 엑손 44를 갖는 디스트로핀 mRNA를 생성하며, 이는 디스트로핀 유전자 리딩 프레임을 복원하고 베커 유형의 디스트로핀 발현을 발생시킨다. 또한, 조작된 메가뉴클레아제의 쌍이 DMD 19-20 인식 서열 및 DMD 29-30 인식 서열에 결합하여 이를 절단하여 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45의 제거를 발생시키는 대략적인 위치가 제시된다.

도 2는 인간 디스트로핀 유전자 내의 DMD 19-20 (서열식별번호: 6 및 7), DMD 29-30 (서열식별번호: 8 및 9), DMD 35-36 (서열식별번호: 10 및 11), 및 DMD 37-38 (서열식별번호: 12 및 13) 인식 서열에 대한 센스 및 안티센스 서열을 포함하는, 본 개시내용의 예시적인 인식 서열을 보여주는 개략도이다. 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제에 의해 표적화되는 각각의 DMD 인식 서열은 2개의 인식 절반-부위를 포함한다. 각각의 인식 절반-부위는 4개의 염기쌍 중심 서열에 의해 분리된 9개의 염기 쌍을 포함한다. 예를 들어, DMD 19-20 인식 서열은 4개의 염기 쌍 중심 서열 GTAT와 함께 5' DMD19 절반-부위 및 3' DMD20 절반-부위를 갖는다.

도 3. 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제는 2개의 서브유닛을 포함하며, 여기서 HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 제1 인식 절반-부위 (예를 들어, DMD19)에 결합하고, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 제2 인식 절반-부위 (예를 들어, DMD20)에 결합한다. 조작된 메가뉴클레아제가 단일-쇄 메가뉴클레아제인 실시양태에서, HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛으로서 위치할 수 있다. 마찬가지로, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛으로서 위치할 수 있다.

도 4a-4c. 도 4a는 DMD 19-20 메가뉴클레아제의 서열의 정렬을 제공한다. 도 4b는 DMD 35-36 조작된 메가뉴클레아제의 서열의 정렬을 제공한다. 도 4c는 DMD 37-38 조작된 메가뉴클레아제의 서열의 정렬을 제공한다. 별표는 모든 정렬된 뉴클레아제 사이의 보존된 잔기를 나타내고, 공간은 적어도 1개의 아미노산이 메가뉴클레아제 사이에서 상이함을 나타낸다.

도 5는 디스트로핀 유전자에서 발견되는 인식 서열을 표적화하는 조작된 메가뉴클레아제를 평가하기 위한 CHO 세포에서의 리포터 검정의 개략도이다. 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제의 경우, 리포터 카세트가 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합된 CHO 세포주가 생산되었다. 리포터 카세트는 5'에서 3' 순서로 SV40 초기 프로모터; GFP 유전자의 5' 2/3; 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열 (예를 들어, DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36, 또는 DMD 37-38 인식 서열); CHO-23/24 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열 (WO 2012/167192); 및 GFP 유전자의 3' 2/3을 포함하였다. 이러한 카세트로 안정적으로 형질감염된 세포는 DNA 파괴-유도제의 부재 하에 GFP를 발현하지 않았다. 각각의 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 형질도입에 의해 메가뉴클레아제가 도입되었다. 메가뉴클레아제 인식 서열 중 어느 하나에서 DNA 파괴가 유도된 경우, GFP 유전자의 중복 영역은 서로 재조합되어 기능적 GFP 유전자가 생산되었다. 이어서, GFP-발현 세포의 백분율이 유동 세포측정법에 의해, 메가뉴클레아제에 의한 게놈 절단의 빈도의 간접적인 척도로서 결정될 수 있었다.

도 6a-6f. 도 6a, 6b, 및 6g는 CHO 세포 리포터 검정에서 발현된 DMD 19-20 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 것에 대한 조작된 DMD 19-20 메가뉴클레아제의 효율을 제공한다. 도 6c는 CHO 세포 리포터 검정에서 발현된 DMD 29-30 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 것에 대한 조작된 DMD 29-30 메가뉴클레아제의 효율을 제공한다. 도 6d 및 도 6h는 CHO 세포 리포터 검정에서 발현된 DMD 35-36 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 것에 대한 조작된 DMD 35-36 메가뉴클레아제의 효율을 제공한다. 도 6e, 도 6f 및 도 6i는 CHO 세포 리포터 검정에서 발현된 DMD 37-38 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 것에 대한 조작된 DMD 37-38 메가뉴클레아제의 효율을 제공한다. 상대 활성 지수는 메가뉴클레아제의 독성을 설명하는, CHO-23/24 메가뉴클레아제를 발현하는 세포주에 대해 정규화된 시험 메가뉴클레아제를 발현하는 각각의 세포주에 대한 %GFP 양성 세포를 나타낸다.

도 7a-7d는 MRC5 세포에서 2종의 용량에서의, 표시된 인식 서열을 표적화하는 시험된 메가뉴클레아제의 삽입 및 결실 (indel)의 백분율 빈도를 보여주는 막대 그래프를 보여준다. 각각의 메가뉴클레아제를 메가뉴클레아제의

형질감염 후 3개의 시점 (제2일, 제5일 및 제8일)에 시험하였다. 도 7a는 DMD 19-20 메가뉴클레아제에 의한 편집의 백분율을 제공한다. 도 7b는 DMD 35-36 메가뉴클레아제에 의한 편집의 백분율을 제공한다. 도 7c는 DMD 37-38 메가뉴클레아제에 의한 편집의 백분율을 제공한다. 도 7d는 DMD 29-30 메가뉴클레아제에 의한 편집의 백분율을 제공한다.

도 8a 및 8b는 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열에 결합하여 이를 절단하도록 설계된 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 절단 후의 디스트로핀 유전자의 완벽한 라이게이션에 대한 PCR 생성물 및 서열분석 데이터를 제공한다. 도 8a는 상보적인 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열의 라이게이션을 증폭시키는 데 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 생성물의 겔 영상이다. 레인 5는 DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.63 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 6은 DMD 19-20x.87 및 DMD 35-36x.81 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 7은 DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.81 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 8은 DMD 19-20x.87 및 DMD 35-36x.63 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 M은 모의 대조군을 나타낸다. 도 8b는 개재 게놈 서열의 절단 및 절제 후 DMD 19-20 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제 인식 서열의 완벽한 라이게이션에 대한 대표적인 서열분석 데이터를 제공한다.

도 9a 및 9b는 DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열에 결합하여 이를 절단하도록 설계된 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 절단 후의 디스트로핀 유전자의 완벽한 라이게이션에 대한 PCR 생성물 및 서열분석 데이터를 제공한다. 도 8a는 상보적인 DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열의 라이게이션을 증폭시키는 데 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 생성물의 겔 영상이다. 레인 9는 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 10은 DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 11은 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.66 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 12는 DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.66 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 13은 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.79 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 14는 DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.79 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 M은 모의 대조군을 나타낸다. 도 9b는 개재 게놈 서열의 절단 및 절제 후 DMD 19-20 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제 인식 서열의 완벽한 라이게이션에 대한 대표적인 서열분석 데이터를 제공한다.

도 10은 DMD 19-20 및 DMD 29-30 인식 서열에 결합하여 이를 절단하도록 설계된 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 절단 후의 디스트로핀 유전자의 완벽한 라이게이션에 대한 PCR 생성물을 제공한다. 상보적인 DMD 19-20 및 DMD 29-30 인식 서열의 라이게이션을 증폭시키는 데 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 생성물의 겔 영상이 제시된다. 레인 1은 DMD 19-20x.13 및 DMD 29-30x.18 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 2는 DMD 19-20x.87 및 DMD 29-30x.40 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 3은 DMD 19-20x.13 및 DMD 29-30x.40 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 4는 DMD 19-20x.87 및 DMD 29-30x.18 메가뉴클레아제의 조합을 나타낸다. 레인 M은 모의 대조군을 나타낸다.

도 11은 절단 후 라이게이션 사건을 검출하기 위한 디지털 액적 PCR (ddPCR) 검정에 사용된 정방향 및 역방향 프라이머 및 참조물 및 완벽한 라이게이션 프라이머 세트에 대한 프로브의 대략적인 위치를 보여주는 개략도를 제공한다. 개략도는 DMD 19-20 및 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열을 예시한다.

도 12a-12c는 ddPCR에 의해 평가된 바와 같은, 엑손 45-55 또는 엑손 45 단독의 결실의 백분율을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 도 12a는 DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.63 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 35-36x.81 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.81 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 35-36x.63 메가뉴클레아제의 조합, 및 모의 대조군에 의한 엑손 결실 데이터를 제공한다. 도 12b는 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.66 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.66 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.79 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.79 메가뉴클레아제의 조합, 및 모의 대조군에 의한 엑손 결실 데이터를 제공한다. 도 12c는 DMD 19-20x.13 및 DMD 29-30x.18 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 29-30x.40 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.13 및 DMD 29-30x.40 메가뉴클레아제, DMD 19-20x.87 및 DMD 29-30x.18 메가뉴클레아제의 조합, 및 모의 대조군에 의한 엑손 45 단독에 대한 엑손 결실 데이터를 제공한다.

도 13은 조작된 메가뉴클레아제의 추가의 상이한 조합에 의한, ddPCR에 의해 평가된 완벽한 라이게이션 사건의 선 그래프를 제공한다.

도 14는 인간 골격근 근모세포 (HSMM)에서 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제의 쌍을 사용한, ddPCR에 의해 평가된 바와 같은 엑손 45-55의 결실의 백분율을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. HSMM 세포를 각각의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 20 ng, 40 ng, 80 ng, 또는 160 ng으로 형질감염

시켰다.

도 15는 DMD를 갖는 환자로부터의 불멸화 근모세포 세포주 (AB1098 세포)에서 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제의 쌍을 사용한, ddPCR에 의해 평가된 완벽한 라이게이션의 백분율을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. AB1098 세포를 각각의 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 또는 160 ng으로 형질감염시켰다.

도 16a-16c는 AB1098 세포에서 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제 각각을 코딩하는 mRNA의 10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 또는 160 ng, 또는 모의 대조군으로 처리한 후의 단백질 발현 데이터를 제공한다. 도 16a는 조작된 메가뉴클레아제의 조합 또는 모의 대조군으로 처리한 후의 디스트로핀 단백질 발현을 보여주는 그래프이다. 도 16b는 단축된 디스트로핀 단백질 밴드 (즉, 엑손 45-55에 의해 코딩된 아미노산이 결여됨)의 겔 영상을 정확한 크기에서 제공한다. 도 16c는 참조 빈쿨린 유전자 대비 디스트로핀 단백질의 양을 제공한다.

도 17은 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제 각각을 코딩하는 mRNA의 10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 또는 160 ng, 또는 모의 대조군으로의 형질감염 후의 AB1098 세포 mRNA에서의 엑손 44 내지 엑손 56의 RNA 스플라이싱을 보여주는 막대 그래프를 제공한다.

도 18은 HSMM 세포에서 표시된 쌍의 조작된 메가뉴클레아제를 사용한, ddPCR에 의해 평가된 바와 같은 완벽한 라이게이션의 백분율을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. HSMM 세포를 각각의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 40 ng으로 형질감염시켰다.

도 19는 조작된 뉴클레아제 (예를 들어, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제)의 오프-타겟 효과를 결정하는 데 이용된 올리고 포획 검정의 개략도를 제공한다. 제시된 바와 같이, 통합 카세트 또는 올리고는 조작된 뉴클레아제 절단에 기인할 수 있는 게놈 내의 이중 가닥 파괴와 어닐링한다. 이어서, DNA는 초음파처리에 의해 전단되고, 어댑터가 라이게이션되고, PCR 증폭된 후, 서열 분석에 의해 이중 가닥 파괴의 위치가 결정된다.

도 20은 HEK 293 세포에서 형질감염된 DMD 19-20x.13, DMD 19-20L.249, DMD 19-20L.329, DMD 19-20L.374, DMD 19-20L.375, DMD 19-20L.431, 및 DMD 19-20L.458 메가뉴클레아제에 의해 유도된 오프-타겟 컷팅을 확인하기 위한 올리고 (올리고뉴클레오티드) 포획 검정으로부터의 결과를 도시한 그래프를 제공한다. 원형 도트는 온-타겟 부위를 나타내고, 비-원형 도트는 오프-타겟 부위를 나타내며, X 축은 각각의 검출된 오프-타겟 부위에 대한 서열분석 판독물의 수를 표시한다. 도트의 음영은 온 타겟 부위와 각각의 검출된 오프-타겟 부위 사이의 염기-쌍 미스매치의 수를 나타낸다. 도트가 행의 상부에 더 가까이 위치할수록, 미스매치의 수는 더 적다.

도 21은 HEK 293 세포에서 형질감염된 DMD 35-36x.63, DMD 35-36L.195, DMD 35-36L.364, DMD 35-36L.372, DMD 35-36L.457, 및 DMD 35-36L.469 메가뉴클레아제에 의해 유도된 오프-타겟 컷팅을 확인하기 위한 올리고 포획 검정으로부터의 결과를 도시한 그래프를 제공한다. 원형 도트는 온-타겟 부위를 나타내고, 비-원형 도트는 오프-타겟 부위를 나타내며, X 축은 각각의 오프-타겟 부위에 대한 서열분석 판독물의 수를 표시한다. 도트의 음영 및 행의 상부에 대한 근접성은 온 타겟 부위와 각각의 검출된 오프-타겟 부위 사이의 염기-쌍 미스매치의 수를 나타낸다.

도 22는 표시된 조작된 DMD 19-20 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제의 쌍 각각에 의한 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열의 절단 후의 엑손 45-55에 인접한 게놈 DNA의 총 라이게이션의 백분율 (%)을 보여주는 막대 그래프를 제공한다.

도 23a는 DMD 19-20 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 AB1098 세포에서의 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55가 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질 수준에 대한 WES 단백질 강도 판독을 제공한다. 레인 1은 마커 대조군이고; 레인 2는 디스트로핀 단백질에 대한 심장 양성 대조군이고; 레인 3은 블랭크 대조군이고; 레인 4는 DMD 19-20L.374 및 DMD 35-36L.376 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 5는 DMD 19-20L.374 및 DMD 35-36L.457 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 6은 DMD 19-20L.374 및 DMD 35-36L.469 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 7은 DMD 19-20L.375 및 DMD 35-36L.376 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 8은 DMD 19-20L.375 및 DMD 35-36L.457 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 9는 DMD 19-20L.375 및 DMD 35-36L.469 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 10은 DMD 19-20L.431 및 DMD 35-36L.376 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 11은 DMD 19-20L.431 및 DMD 35-36L.457 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 12는 DMD 19-20L.431 및 DMD 35-36L.469 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 13은 DMD 19-20L.458 및 DMD 35-36L.376 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 14는 DMD 19-20L.458 및 DMD 35-36L.457 메가뉴클레아제의 조합이고; 레인 15는 DMD 19-20L.458 및 DMD 35-36L.469 메가뉴클레아제의

조합이고; 레인 16은 디스트로핀 단백질의 발현이 결여된 모의 AB1098 세포주 대조군이다. 도 23b는 표시된 조작된 DMD 19-20 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제의 쌍 각각에 대한, 빈쿨린 로딩 대조군에 대해 정규화된 WES 분석에 의한 단축 변형된 디스트로핀 단백질 수준을 보여주는 막대 그래프를 제공한다.

도 24a-24b. 도 24a는 표시된 조작된 DMD 19-20 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제의 쌍 각각에 의한 DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열의 절단 후의 엑손 45-55에 인접한 게놈 DNA의 총 라이게이션의 백분율 (%)을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 도 24b는 표시된 조작된 DMD 19-20 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제의 쌍 각각에 대한 백분율 (%) 디스트로핀 복원을, 뮤린 사두근 근육 조직 용해물의 그러한 조직으로부터 생성된 표준 곡선에 기초한 동등한 로드와 비교하여 보여주는 막대 그래프를 제공한다.

도 25a-25e는 상이한 근육-특이적 프로모터 조합을 이용한, DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열의 절단 후의 근육 조직 내의 엑손 45-55에 인접한 게놈 DNA의 완벽한 라이게이션의 백분율 (%)을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 도 25a는 사두근 조직에서의 퍼센트 완벽한 라이게이션을 보여준다. 도 25b는 심장 조직에서의 퍼센트 완벽한 라이게이션을 보여준다. 도 25c는 횡경막 조직에서의 퍼센트 완벽한 라이게이션을 보여준다. 도 25d는 가자미근 조직에서의 퍼센트 완벽한 라이게이션을 보여준다. 도 25e는 간 조직에서의 퍼센트 완벽한 라이게이션을 보여준다.

도 26a-26e는 DMD 19-20L.329 및 DMD 37-38L.219 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열의 절단 후의 근육 조직 내의 엑손 45-55에 인접한 게놈 DNA의 총 라이게이션의 백분율 (%)을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 도 26a는 사두근 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 26b는 심장 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 26c는 횡경막 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 25d는 가자미근 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 26e는 간 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다.

도 27a-27e는 총 AAV 양 ($2x10^{12}$ 또는 $4x10^{12}$)에 의해 표시되는 2가지의 상이한 투여량 수준에서의, DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열의 절단 후의 근육 조직 내의 엑손 45-55에 인접한 게놈 DNA의 총 라이게이션의 백분율 (%)을 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 도 27a는 사두근 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 27b는 심장 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 27c는 횡경막 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 27d는 전경골근 (TA) 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다. 도 27e는 간 조직에서의 퍼센트 총 라이게이션을 보여준다.

도 28a-28c는 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제로의 처리 후의 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55가 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질 수준에 대한 WES 단백질 강도 판독을 제공한다. 도 28a-28c의 레인 1-6은 인간 디스트로핀을 발현하는 마우스로부터의 전장 인간 디스트로핀의 단백질 밴드 강도의 표준 곡선을 나타내고; 레인 7-8은 $1x10^{14}$ VG/kg의 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 마우스로부터의 단축 변형된 디스트로핀의 단백질 밴드 강도를 나타내고; 레인 9-10은 $2x10^{14}$ VG/kg의 DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 마우스로부터의 단축 변형된 디스트로핀의 단백질 밴드 강도를 나타내고; 레인 11-12는 PBS로, 메가뉴클레아제 없이 처리된 마우스를 나타낸다. 도 28a는 심장 조직에서 표시된 투여량에서 검출된 변형된 단축 디스트로핀 수준을 나타내고; 도 28b는 횡경막 조직에서 표시된 투여량에서 검출된 변형된 단축 디스트로핀 수준을 나타내고; 도 28c는 사두근 조직에서 표시된 투여량에서 검출된 변형된 단축 디스트로핀 수준을 나타낸다.

도 29는 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열의 절단 후의 사두근, 심장 및 횡경막 근육 조직에서의 엑손 45-55에 인접한 게놈 DNA의 총 라이게이션의 백분율 (%)을 보여주는 그래프를 제공한다.

도 30a-30c는 상이한 근육 특이적 프로모터를 이용한, DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제로의 처리 후의 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55가 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질 수준에 대한 WES 단백질 강도 판독을 제공한다. 도 30a-30c의 레인 1은 래더를 나타내고; 레인 2-6은 인간 디스트로핀을 발현하는 마우스로부터의 전장 인간 디스트로핀의 밴드 강도를 나타내고; 레인 7은 CK8 근육-특이적 프로모터의 제어 하에 $1x10^{14}$ VG/kg의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 마우스에서의 단축 변형된 디스트로핀의 밴드 강도를 나타내고; 레인 8은 MHCK7 근육-특이적 프로모터의 제어 하에 $1x10^{14}$ VG/kg의 DMD

19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 마우스에서의 단축 변형된 디스트로핀의 밴드 강도를 나타내고; 레인 9는 DMD 19-20L.329 메가뉴클레아제가 CK8 근육-특이적 프로모터의 제어 하에 있고, DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제가 SPc5-12 근육 특이적 프로모터의 제어 하에 있는 경우의 $1x10^{14}$ VG/kg의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 마우스에서의 단축 변형된 디스트로핀의 밴드 강도를 나타내고; 레인 10-11은 PBS로 처리된 마우스를 나타낸다. 도 30a는 심장 조직에서 표시된 투여량에서 검출된 변형된 단축 디스트로핀 수준을 나타내고; 도 309b는 횡경막 조직에서 표시된 투여량에서 검출된 변형된 단축 디스트로핀 수준을 나타내고; 도 30c는 사두근 조직에서 표시된 투여량에서 검출된 변형된 단축 디스트로핀 수준을 나타낸다.

도 31은 사두근 (quad), 심장 및 횡경막 조직에서의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제 또는 PBS로 처리된 마우스에 대한, 빈쿨린 로딩 대조군에 대해 정규화된 WES 분석에 의한 변형된 단축 디스트로핀 단백질 수준을 보여주는 막대 그래프를 제공한다.

도 32는 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제의 조합 또는 PBS로 처리된 마우스로부터의 사두근 (quad), 심장 및 횡경막 근육 조직의 면역조직화학 영상화를 제공한다. 진한 염색은 인간 디스트로핀 검출을 나타내고, 이는 메가뉴클레아제의 조합으로 처리된 마우스에서만 관찰된다.

도 33a 및 33b는 PBS, 또는 AAV9 캡시드를 사용하여 hDMDdel52/mdx (hDMD) 마우스에 전달된 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제 쌍으로 처리된 후의 뮤린 사두근 조직의 형광 면역조직화학 영상화를 제공한다. 도 33a는 PBS-처리된 마우스로부터의 사두근 조직에서의 Pax7 발현의 영상화를 제공한다. 좌측 패널은 메가뉴클레아제 발현을 검출하는 1차 및 2차 항체를 사용한 임의의 배경 염색을 보여주는 대조군 영상이다. 중간 패널은 백색 화살촉에 의해 표시된 Pax7을 발현하는 세포를 보여주고; 우측 패널은 Pax7 (백색 화살촉) 및 메가뉴클레아제 발현을 검출하는 항체로부터의 임의의 배경 염색 둘 다를 보여준다. 도 33b는 메가뉴클레아제 처리된 마우스로부터의 사두근 조직에서의 메가뉴클레아제 및 Pax7 발현의 영상화를 제공한다. 좌측 패널은 메가뉴클레아제 단백질 및 Pax7을 발현하는 세포를 나타내는 전체 화살표와 함께, 백색 화살촉으로 표시된 메가뉴클레아제만을 발현하는 세포를 제공하고; 중간 패널은 백색 화살촉으로 표시된 Pax7만을 발현하는 세포 또는 전체 화살표로 표시된 Pax7 및 메가뉴클레아제 단백질을 발현하는 세포를 보여준다. 우측 패널은 화살촉으로 표시된 메가뉴클레아제 단백질 또는 Pax7을 발현하는 세포 또는 전체 화살표로 표시된 메가뉴클레아제 단백질 및 Pax7 둘 다를 발현하는 세포를 보여준다.

도 34는 변형된 디스트로핀 전사체의 mRNA 발현을 검출하는 데 사용된 베이스스코프(BaseScope) 검정의 개략도를 제공하며, 여기서 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55는 2개의 뉴클레아제의 발현 후에 결실되었다. 제1 뉴클레아제는 엑손 45의 바로 5'의 인트론에 위치한 인식 서열에 결합하여 이를 절단하고, 제2 뉴클레아제는 엑손 55의 바로 3'의 인트론에 위치한 인식 서열에 결합하여 이를 절단한다. 제시된 바와 같이, 이들 인트론에 위치한 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 뉴클레아제는 이중 가닥 파괴를 발생시키며, 이는 이어서 게놈의 직접적 재라이게이션에 의해 복구된다. 전사 및 스플라이싱 후에, 함께 스플라이싱된 엑손 44 및 엑손 56을 갖는 mRNA가 생산된다. 이어서, 이러한 엑손 44와 엑손 56 접합부 (E44-E56 접합부로 표시됨)를 인식하도록 설계된 프로브를 사용하여 근육 조직 절편에서 이러한 변형된 인간 디스트로핀 전사체를 검출한다.

도 35a 및 35b는 PBS 또는 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제 쌍으로 처리된 hDMDdel52/mdx (hDMD) 마우스로부터의 뮤린 사두근 조직의 베이스스코프 염색을 제공한다. 도 35a는 Pax7 전사체 발현에 대한 PBS 처리된 마우스로부터의 근육 조직의 베이스스코프 염색 및 변형된 인간 디스트로핀 전사체 발현을 검출하는 데 사용된 프로브에 대한 임의의 배경 염색을 보여준다. 도 35b는 Pax7 전사체 발현 및 변형된 인간 디스트로핀 전사체 발현에 대한, DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제 쌍으로 처리된 마우스로부터의 근육 조직의 베이스스코프 염색을 보여준다.

도 36은 증가하는 용량의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제를 사용하여 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 20 ng, 80 ng, 및 160 ng으로 디스트로핀 발현이 정상적으로 결여된 KM1328 환자 세포주를 전기천공한 후, 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55가 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질 수준에 대한 WES 단백질 강도 판독을 제공한다. 레인 1은 래더를 나타내고; 레인 2는 모의 대조군을 나타내고; 레인 3-5는 20 ng, 80 ng, 및 160 ng의 메가뉴클레아제 mRNA로 처리된 세포에서의 단축 변형된 디스트로핀의 밴드 강도를 나타내고; 레인 6은 전장 인간 디스트로핀의 밴드 강도를 나타낸다.

도 37은 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제를 사용하여 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 80 ng으로 디스트로핀이 정상적으로 결여된 AB1098 환자 세포주를 전기천공한 후, 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55

가 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질 수준에 대한 WES 단백질 강도 판독을 제공한다. 레인 1은 전장 인간 디스트로핀의 밴드 강도를 나타내고; 레인 2는 모의 대조군을 나타내고; 레인 3은 80 ng의 메가뉴클레아제 mRNA로 처리된 세포에서의 단축 변형된 디스트로핀의 밴드 강도를 나타낸다.

도 38a-38d는 PBS, 또는 AAVrH74 캡시드를 사용하여 hDMDdel52/mdx (hDMD) 마우스에 전달된 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제 쌍으로 처리된 후의 뮤린 사두근 조직의 형광 면역조직화학 영상화를 제공한다. 도 38a는 PBS 처리된 마우스로부터의 사두근 조직에서의 Pax7 발현의 영상화를 제공한다. 좌측 패널은 메가뉴클레아제 발현을 검출하는 1차 및 2차 항체를 사용한 임의의 배경 염색을 제공하는 대조군 영상이고; 별표는 비-특이적 배경 검출을 나타낸다. 중간 패널은 백색 화살촉에 의해 표시된 Pax7을 발현하는 세포를 보여주고; 우측 패널은 Pax7 (백색 화살촉) 및 별표에 의해 표시된 메가뉴클레아제 발현을 검출하는 항체로부터의 임의의 배경 염색 둘 다를 보여준다. 도 38b는 $1x10^{14}$ VG/kg의 투여량으로 메가뉴클레아제 처리된 마우스로부터의 사두근 조직에서의 메가뉴클레아제 및 Pax7 발현의 영상화를 제공하고; 도 38c는 $3x10^{13}$ VG/kg의 투여량으로 메가뉴클레아제 처리된 마우스로부터의 영상화를 제공하고; 도 38d는 $1x10^{13}$ VG/kg의 투여량으로 메가뉴클레아제-처리된 마우스로부터의 영상화를 제공한다. 도 38b-38d의 좌측 패널은 메가뉴클레아제만을 발현하는 세포를 제공하고; 중간 패널은 Pax7을 발현하는 세포를 보여주고; 도 38b-38d의 우측 패널은 메가뉴클레아제 단백질 또는 Pax7을 발현하는 세포 또는 전체 화살표로 표시된 메가뉴클레아제 단백질 및 Pax7 둘 다를 발현하는 세포를 보여준다. 별표는 비-특이적 배경 염색을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0125] 서열의 간단한 설명

[0126] 서열식별번호: 1은 클라미도모나스 레인하르티이로부터의 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0127] 서열식별번호: 2는 LAGLIDADG 모티프의 아미노산 서열을 제시한다.

[0128] 서열식별번호: 3은 핵 국재화 신호의 아미노산 서열을 제시한다.

[0129] 서열식별번호: 4는 야생형 디스트로핀 단백질 CCDS48091.1 (유전자 ID 1756)의 아미노산 서열을 제시한다.

[0130] 서열식별번호: 5는 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 야생형 디스트로핀 단백질 CCDS48091.1 (유전자 ID 1756)의 아미노산 서열을 제시한다.

[0131] 서열식별번호: 6은 DMD 19-20 인식 서열의 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0132] 서열식별번호: 7은 DMD 19-20 인식 서열의 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0133] 서열식별번호: 8은 DMD 29-30 인식 서열의 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0134] 서열식별번호: 9는 DMD 29-30 인식 서열의 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0135] 서열식별번호: 10은 DMD 35-36 인식 서열의 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0136] 서열식별번호: 11은 DMD 35-36 인식 서열의 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0137] 서열식별번호: 12는 DMD 37-38 인식 서열의 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0138] 서열식별번호: 13은 DMD 37-38 인식 서열의 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0139] 서열식별번호: 14는 DMD 19-20 인식 서열의 제1 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0140] 서열식별번호: 15는 DMD 19-20 인식 서열의 제1 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0141] 서열식별번호: 16은 DMD 29-30 인식 서열의 제1 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0142] 서열식별번호: 17은 DMD 29-30 인식 서열의 제1 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0143] 서열식별번호: 18은 DMD 35-36 인식 서열의 제1 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0144] 서열식별번호: 19는 DMD 35-36 인식 서열의 제1 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0145] 서열식별번호: 20은 DMD 37-38 인식 서열의 제1 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0146] 서열식별번호: 21은 DMD 37-38 인식 서열의 제1 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0147] 서열식별번호: 22는 DMD 19-20 인식 서열의 제2 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0148] 서열식별번호: 23은 DMD 19-20 인식 서열의 제2 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0149] 서열식별번호: 24는 DMD 29-30 인식 서열의 제2 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0150] 서열식별번호: 25는 DMD 29-30 인식 서열의 제2 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0151] 서열식별번호: 26은 DMD 35-36 인식 서열의 제2 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0152] 서열식별번호: 27은 DMD 35-36 인식 서열의 제2 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0153] 서열식별번호: 28은 DMD 37-38 인식 서열의 제2 절반-부위 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0154] 서열식별번호: 29는 DMD 37-38 인식 서열의 제2 절반-부위 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0155] 서열식별번호: 30은 라이게이션된 하이브리드 DMD 19-20/29-30 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0156] 서열식별번호: 31은 라이게이션된 하이브리드 DMD 19-20/29-30 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0157] 서열식별번호: 32는 라이게이션된 하이브리드 DMD 19-20/35-36 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0158] 서열식별번호: 33은 라이게이션된 하이브리드 DMD 19-20/35-36 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0159] 서열식별번호: 34는 라이게이션된 하이브리드 DMD 19-20/37-38 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0160] 서열식별번호: 35는 라이게이션된 하이브리드 DMD 19-20/37-38 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

[0161] 서열식별번호: 36은 DMD 19-20x.13 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0162] 서열식별번호: 37은 DMD 19-20x.87 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0163] 서열식별번호: 38은 DMD 19-20L.249 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0164] 서열식별번호: 39는 DMD 19-20L.302 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0165] 서열식별번호: 40은 DMD 19-20L.329 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0166] 서열식별번호: 41은 DMD 19-20L.374 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0167] 서열식별번호: 42는 DMD 19-20L.375 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0168] 서열식별번호: 43은 DMD 19-20L.431 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0169] 서열식별번호: 44는 DMD 19-20L.458 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0170] 서열식별번호: 45는 DMD 35-36x.63 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0171] 서열식별번호: 46은 DMD 35-36x.81 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0172] 서열식별번호: 47은 DMD 35-36L.195 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0173] 서열식별번호: 48은 DMD35-36L.282 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0174] 서열식별번호: 49는 DMD35-36L.349 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0175] 서열식별번호: 50은 DMD 35-36L.376 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0176] 서열식별번호: 51은 DMD 35-36L.457 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0177] 서열식별번호: 52는 DMD 35-36L.469 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0178] 서열식별번호: 53은 DMD 37-38x.15 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0179] 서열식별번호: 54는 DMD 37-38x.66 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0180] 서열식별번호: 55는 DMD 37-38x.79 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0181] 서열식별번호: 56은 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0182] 서열식별번호: 57은 DMD 37-38L.478 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0183] 서열식별번호: 58은 DMD 37-38L.512 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0184] 서열식별번호: 59는 DMD 37-38L.528 조작된 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

[0185] 서열식별번호: 60은 DMD 19-20x.13 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0186] 서열식별번호: 61은 DMD 19-20x.87 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0187] 서열식별번호: 62는 DMD 19-20L.249 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0188] 서열식별번호: 64는 DMD 19-20L.302 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0189] 서열식별번호: 64는 DMD 19-20L.329 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0190] 서열식별번호: 65는 DMD 19-20L.374 조작된 메가뉴클레아제의 핵산 서열을 제시한다.

[0191] 서열식별번호: 66은 DMD 19-20L.375 조작된 메가뉴클레아제의 핵산 서열을 제시한다.

[0192] 서열식별번호: 67은 DMD 19-20L.431 조작된 메가뉴클레아제의 핵산 서열을 제시한다.

[0193] 서열식별번호: 68은 DMD 19-20L.458 조작된 메가뉴클레아제의 핵산 서열을 제시한다.

[0194] 서열식별번호: 69는 DMD 35-36x.63 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0195] 서열식별번호: 70은 DMD 35-36x.81 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0196] 서열식별번호: 71은 DMD 35-36L.195 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0197] 서열식별번호: 72는 DMD35-36L.282 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0198] 서열식별번호: 73은 DMD35-36L.349 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0199] 서열식별번호: 74는 DMD35-36L.376 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0200] 서열식별번호: 75는 DMD35-36L.457 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0201] 서열식별번호: 76은 DMD35-36L.469 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0202] 서열식별번호: 77은 DMD 37-38x.15 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0203] 서열식별번호: 78은 DMD 37-38x.66 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0204] 서열식별번호: 79는 DMD 37-38x.79 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0205] 서열식별번호: 80은 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0206] 서열식별번호: 81은 DMD 37-38L.478 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0207] 서열식별번호: 82는 DMD 37-38L.512 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0208] 서열식별번호: 83은 DMD 37-38L.528 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 제시한다.

[0209] 서열식별번호: 84는 DMD 19-20x.13 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0210] 서열식별번호: 85는 DMD 19-20x.87 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0211] 서열식별번호: 86은 DMD 19-20L.249 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0212] 서열식별번호: 87은 DMD 19-20L.302 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0213] 서열식별번호: 88은 DMD 19-20L.329 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0214] 서열식별번호: 89는 DMD 19-20L.374 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0215] 서열식별번호: 90은 DMD 19-20L.375 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0216] 서열식별번호: 91은 DMD 19-20L.431 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0217] 서열식별번호: 92는 DMD 19-20L.458 조작된 메가뉴클레아제 DMD19 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0218] 서열식별번호: 93은 DMD 35-36x.63 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0219] 서열식별번호: 94는 DMD 35-36x.81 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0220] 서열식별번호: 95는 DMD 35-36L.195 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0221] 서열식별번호: 96은 DMD35-36L.282 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0222] 서열식별번호: 97은 DMD35-36L.349 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0223] 서열식별번호: 98은 DMD35-36L.376 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0224] 서열식별번호: 99는 DMD35-36L.457 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0225] 서열식별번호: 100은 DMD35-36L.469 조작된 메가뉴클레아제 DMD35 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0226] 서열식별번호: 101은 DMD 37-38x.15 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0227] 서열식별번호: 102는 DMD 37-38x.66 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0228] 서열식별번호: 103은 DMD 37-38x.79 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0229] 서열식별번호: 104는 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0230] 서열식별번호: 105는 DMD 37-38L.478 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0231] 서열식별번호: 106은 DMD 37-38L.512 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0232] 서열식별번호: 107은 DMD 37-38L.528 조작된 메가뉴클레아제 DMD37 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0233] 서열식별번호: 108은 DMD 19-20x.13 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0234] 서열식별번호: 109는 DMD 19-20x.87 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0235] 서열식별번호: 110은 DMD 19-20L.249 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0236] 서열식별번호: 111은 DMD 19-20L.302 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0237] 서열식별번호: 112는 DMD 19-20L.329 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0238] 서열식별번호: 113은 DMD 19-20L.374 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0239] 서열식별번호: 114는 DMD 19-20L.375 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0240] 서열식별번호: 115는 DMD 19-20L.431 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0241] 서열식별번호: 116은 DMD 19-20L.458 조작된 메가뉴클레아제 DMD20 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0242] 서열식별번호: 117은 DMD 35-36x.63 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0243] 서열식별번호: 118은 DMD 35-36x.81 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0244] 서열식별번호: 119는 DMD 35-36L.195 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0245] 서열식별번호: 120은 DMD35-36L.282 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0246] 서열식별번호: 121은 DMD35-36L.349 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0247] 서열식별번호: 122는 DMD35-36L.376 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0248] 서열식별번호: 123은 DMD35-36L.457 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0249] 서열식별번호: 124는 DMD35-36L.469 조작된 메가뉴클레아제 DMD36 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0250] 서열식별번호: 125는 DMD 37-38x.15 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0251] 서열식별번호: 126은 DMD 37-38x.66 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0252] 서열식별번호: 127은 DMD 37-38x.79 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0253] 서열식별번호: 128은 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0254] 서열식별번호: 129는 DMD 37-38L.478 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0255] 서열식별번호: 130은 DMD 37-38L.512 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0256] 서열식별번호: 131은 DMD 37-38L.528 조작된 메가뉴클레아제 DMD38 결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

[0257] 서열식별번호: 132는 링커 서열의 아미노산 서열을 제시한다.

[0258] 서열식별번호: 133은 DMD 19-20 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0259] 서열식별번호: 134는 DMD 19-20 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0260] 서열식별번호: 135는 DMD 19-20 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0261] 서열식별번호: 136은 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에서 참조물로서 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0262] 서열식별번호: 137은 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에서 참조물로서 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0263] 서열식별번호: 138은 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에서 참조물로서 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0264] 서열식별번호: 139는 DMD 37-38 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0265] 서열식별번호: 140은 DMD 37-38 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0266] 서열식별번호: 141은 DMD 37-38 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0267] 서열식별번호: 142는 DMD 35-36 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0268] 서열식별번호: 143은 DMD 35-36 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0269] 서열식별번호: 144는 DMD 35-36 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0270] 서열식별번호: 145는 DMD 29-30 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0271] 서열식별번호: 146은 DMD 29-30 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0272] 서열식별번호: 147은 DMD 29-30 인식 서열에서 INDEL을 검출하기 위한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0273] 서열식별번호: 148은 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0274] 서열식별번호: 149는 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0275] 서열식별번호: 150은 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0276] 서열식별번호: 151은 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0277] 서열식별번호: 152는 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0278] 서열식별번호: 153은 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0279] 서열식별번호: 154는 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0280] 서열식별번호: 155는 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0281] 서열식별번호: 156은 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0282] 서열식별번호: 157은 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0283] 서열식별번호: 158은 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0284] 서열식별번호: 159는 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 PCR 증폭 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0285] 서열식별번호: 160은 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0286] 서열식별번호: 161은 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0287] 서열식별번호: 162는 DMD 19-20과 DMD 37-38 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0288] 서열식별번호: 163은 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0289] 서열식별번호: 164는 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0290] 서열식별번호: 165는 DMD 19-20과 DMD 35-36 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0291] 서열식별번호: 166은 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0292] 서열식별번호: 167은 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 정방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0293] 서열식별번호: 168은 DMD 19-20과 DMD 29-30 라이게이션된 인식 서열에 대한 ddPCR 검정에 사용된 역방향 PCR 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0294] 서열식별번호: 169는 C5-12 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0295] 서열식별번호: 170은 뮤린 MCK 프로모터 및 인핸서 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0296] 서열식별번호: 171은 인간 MCK 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0297] 서열식별번호: 172는 야생형 MCK 인핸서 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0298] 서열식별번호: 173은 변형된 MCK 인핸서 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0299] 서열식별번호: 174는 spc 5-12 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0300] 서열식별번호: 175는 MHCK7 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0301] 서열식별번호: 176은 CK8 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0302] 서열식별번호: 177은 SK-CRM4 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0303] 서열식별번호: 178은 SP-301 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0304] 서열식별번호: 179는 SP-817 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0305] 서열식별번호: 180은 SP-905 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0306] 서열식별번호: 181은 근육 하이브리드 프로모터 서열의 핵산 서열을 제시한다.

[0307] 서열식별번호: 182는 rh.74 AAV 캡시드의 아미노산 서열을 제시한다.

[0308] 서열식별번호: 183은 AAV9 캡시드의 아미노산 서열을 제시한다.

[0309] 서열식별번호: 184는 정방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0310] 서열식별번호: 185는 역방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0311] 서열식별번호: 186은 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0312] 서열식별번호: 187은 정방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0313] 서열식별번호: 188은 역방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0314] 서열식별번호: 189는 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0315] 서열식별번호: 190은 정방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0316] 서열식별번호: 191은 역방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0317] 서열식별번호: 192는 프로브의 핵산 서열을 제시한다.

[0318] 서열식별번호: 193은 역방향 프라이머의 핵산 서열을 제시한다.

[0319] 발명의 상세한 설명

[0320] 1.1 참고문헌 및 정의

[0321] 본원에 언급된 특허 및 과학 문헌은 통상의 기술자에게 이용가능한 지식을 확립한다. 본원에 인용된 허여된 미국 특허, 허가된 출원, 공개된 외국 출원, 및 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 서열을 포함한 참조물은 각각이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0322] 본 개시내용은 상이한 형태로 구현될 수 있고, 본원에 제시된 실시양태로 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 이들 실시양태는 본 개시내용을 충실하고 완전하게 할 것이며, 본 발명의 범주를 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 충분히 전달하도록 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태와 관련하여 예시된 특색은 다른 실시양태에 포함될 수 있고, 특정한 실시양태와 관련하여 예시된 특색은 그러한 실시양태로부터 삭제될 수 있다. 또한, 본원에 제안된 실시양태에 대한 수많은 변경 및 부가는 본 개시내용에 비추어 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이며, 이는 본 발명으로부터 벗어나지 않는다.

[0323] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 본 발명의 설명에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0324] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0325] 본원에 사용된 단수형은 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 예를 들어, 단수형 세포는 단일 세포 또는 다수의 세포를 의미할 수 있다.

[0326] 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 단어 "또는"은 "및/또는"의 포괄적 의미로 사용되고, "어느 하나/또는"의 배타적 의미로 사용되지 않는다.

[0327] 본원에 사용된 용어 "뉴클레아제" 및 "엔도뉴클레아제"는 폴리뉴클레오티드 쇄 내의 포스포디에스테르 결합을 절단하는 자연 발생 또는 조작된 효소를 지칭하는 것으로 상호교환가능하게 사용된다. 조작된 뉴클레아제는, 비제한적으로, 조작된 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제, TALEN, 치밀 TALEN, CRISPR 시스템 뉴클레아제, 및 메가TAL을 포함할 수 있다. 또한, 그의 절단 부위에서 오버행을 생성할 수 있는 임의의 조작된 뉴클레아제가 고려된다.

[0328] 본원에 사용된 용어 "절단하다" 또는 "절단"은 본원에서 "절단 부위"로 지칭되는 표적 서열 내에 이중-가닥 파괴를 발생시키는, 표적 서열 내의 인식 서열의 백본 내의 포스포디에스테르 결합의 가수분해를 지칭한다.

[0329] 본원에 사용된 용어 "메가뉴클레아제"는 12개 초과의 염기 쌍인 인식 서열에서 이중-가닥 DNA에 결합하는 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열은 22개의 염기 쌍이다. 메가뉴클레아제는 I-CreI (서열식별번호: 1)로부터 유래된 엔도뉴클레아제일 수 있고, 이는 예를 들어 DNA-결합 특이성, DNA 절단 활성, DNA-결합 친화도 또는 이량체화 특성과 관련하여 천연 I-CreI에 비해 변형된 I-CreI의 조작된 변이체를 지칭할 수 있다. I-CreI의 이러한 변형된 변이체를 생산하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, WO 2007/047859, 이는 그 전문이 참조로 포함됨). 본원에 사용된 메가뉴클레아제는 이종이량체로서 이중-가닥 DNA에 결합한다. 메가뉴클레아제는 또한 DNA-결합 도메인의 쌍이 펩티드 링커를 사용하여 단일 폴리펩티드로 연결된 "단일-쇄 메가뉴클레아제"일 수 있다. 용어 "귀소 엔도뉴클레아제"는 용어 "메가뉴클레아제"와 동의어이다. 본 개시내용의 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 바와 같은 표적화된 세포에서 발현될 경우 실질적으로 비-독성이어서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 측정할 경우 세포 생존율에 대한 유해 효과 또는 메가뉴클레아제 절단 활성에서의 유의한 감소의 관찰 없이 세포는 형질감염되고 37℃에서 유지될 수 있다.

[0330] 본원에 사용된 용어 "단일-쇄 메가뉴클레아제"는 링커에 의해 연결된 뉴클레아제 서브유닛의 쌍을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 단일-쇄 메가뉴클레아제는 N-말단 서브유닛 - 링커 - C-말단 서브유닛의 구성을 갖는다. 2개의 메가뉴클레아제 서브유닛은 일반적으로 아미노산 서열이 비-동일할 것이고, 비-동일 DNA 서열에 결합할 것이다. 따라서, 단일-쇄 메가뉴클레아제는 전형적으로 가성-회문식 또는 비-회문식 인식 서열을 절단한다. 단일-쇄 메가뉴클레아제는, 실제로 이량체가 아니지만, "단일-쇄 이종이량체" 또는 "단일-쇄 이종이량체 메가뉴클레아제"로 지칭될 수 있다. 명확성을 위해, 달리 명시되지 않는 한, 용어 "메가뉴클레아제"는 이량체 또는 단일-쇄 메가뉴클레아제를 지칭할 수 있다.

[0331] 본원에 사용된 용어 "링커"는 2개의 뉴클레아제 서브유닛을 단일 폴리펩티드로 연결하는 데 사용되는 외인성 펩티드 서열을 지칭한다. 링커는 천연 단백질에서 발견되는 서열을 가질 수 있거나, 또는 어떠한 천연 단백질에서도 발견되지 않는 인공 서열일 수 있다. 링커는 가요성일 수 있고, 2차 구조가 결여될 수 있거나, 또는 생리학적 조건 하에 특이적 3차원 구조를 형성하는 성향을 가질 수 있다. 링커는, 비제한적으로, 미국 특허 번호 8,445,251, 9,340,777, 9,434,931, 및 10,041,053에 포괄되는 것을 포함할 수 있고, 이들 각각은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 잔기 154-195를 제시하는 서열식별번호: 132에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0332] 단백질과 관련하여 본원에 사용된 용어 "재조합" 또는 "조작된"은 단백질을 코딩하는 핵산 및 단백질을 발현하는 세포 또는 유기체에 유전자 조작 기술을 적용한 결과로서 변경된 아미노산 서열을 갖는 것을 의미한다. 핵산과 관련하여, 용어 "재조합" 또는 "조작된"은 유전자 조작 기술을 적용한 결과로서 변경된 핵산 서열을 갖는 것을 의미한다. 유전자 조작 기술은 PCR 및 DNA 클로닝 기술; 형질감염, 형질전환, 및 다른 유전자 전달 기술; 상동 재조합; 부위-지정 돌연변이유발; 및 유전자 융합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 정의에 따라, 자연-발생 단백질과 동일한 아미노산 서열을 갖지만 이종 숙주에서 클로닝 및 발현에 의해 생산된 단백질은 재조합 또는 조작된 것으로 간주되지 않는다.

[0333] 본원에 사용된 용어 "야생형"은 동일한 유형의 유전자의 대립유전자 집단에서 가장 통상의 자연 발생 대립유전자 (즉, 폴리뉴클레오티드 서열)를 지칭하며, 여기서 야생형 대립유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드는 그의 원래의 기능을 갖는다. 용어 "야생형"은 또한 야생형 대립유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드를 지칭한다. 야생형 대립유전자 (즉, 폴리뉴클레오티드) 및 폴리펩티드는 야생형 서열(들)에 비해 1개 이상의 돌연변이 및/또는 치환을 포함하는 돌연변이체 또는 변이체 대립유전자 및 폴리펩티드와 구별가능하다. 야생형 대립유전자 또는 폴리펩티드는 유기체에서 정상 표현형을 부여할 수 있는 반면, 돌연변이체 또는 변이체 대립유전자 또는 폴리펩티드는 일부 경우에 변경된 표현형을 부여할 수 있다. 야생형 뉴클레아제는 재조합 또는 비-자연 발생 뉴클레아

제와 구별가능하다. 용어 "야생형"은 또한 특정한 유전자의 야생형 대립유전자를 보유하는 세포, 유기체 및/또는 대상체, 또는 비교 목적으로 사용되는 세포, 유기체 및/또는 대상체를 지칭할 수 있다.

[0334] 본원에 사용된 용어 "유전자 변형된"은 게놈 DNA 서열이 재조합 기술에 의해 의도적으로 변형된 세포 또는 유기체, 또는 그의 조상을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "유전자 변형된"은 용어 "트랜스제닉"을 포괄한다.

[0335] 재조합 단백질과 관련하여 본원에 사용된 용어 "변형"은 참조 서열 (예를 들어, 야생형 또는 천연 서열)에 비해 재조합 서열에서의 아미노산 잔기의 임의의 삽입, 결실 또는 치환을 의미한다.

[0336] 본원에 사용된 용어 "인식 서열" 또는 "인식 부위"는 뉴클레아제에 의해 결합되고 절단되는 DNA 서열을 지칭한다. 메가뉴클레아제의 경우에, 인식 서열은 4개의 염기쌍에 의해 분리된 한 쌍의 역전된 9개의 염기쌍 "절반-부위"를 포함한다. 단일-쇄 메가뉴클레아제의 경우에, 단백질의 N-말단 도메인은 제1 절반-부위와 접촉하고, 단백질의 C-말단 도메인은 제2 절반-부위와 접촉한다. 메가뉴클레아제에 의한 절단은 4개의 염기쌍 3' 오버행을 생산한다. "오버행" 또는 "점착성 단부"는 이중-가닥 DNA 서열의 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생산될 수 있는 짧은 단일-가닥 DNA 절편이다. I-CreI로부터 유래된 메가뉴클레아제 및 단일-쇄 메가뉴클레아제의 경우에, 오버행은 22개의 염기쌍 인식 서열의 염기 10-13을 포함한다.

[0337] 본원에 사용된 용어 "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하는 세포의 염색체 DNA의 영역을 지칭한다.

[0338] 본원에 사용된 용어 "DNA-결합 친화도" 또는 "결합 친화도"는 참조 DNA 분자 (예를 들어, 인식 서열 또는 임의적 서열)와 비-공유 회합하는 뉴클레아제의 경향을 의미한다. 결합 친화도는 해리 상수, Kd에 의해 측정된다. 본원에 사용된 바와 같이, 참조 인식 서열에 대한 뉴클레아제의 Kd가 참조 뉴클레아제에 비해 통계적으로 유의한 퍼센트 변화만큼 증가 또는 감소되는 경우에 뉴클레아제는 "변경된" 결합 친화도를 갖는다.

[0339] 본원에 사용된 용어 "특이성"은 뉴클레아제가 오직 인식 서열로 지칭되는 염기 쌍의 특정한 서열에서만, 또는 오직 인식 서열의 특정한 세트에서만 이중-가닥 DNA 분자에 결합하여 이를 절단하는 능력을 의미한다. 인식 서열의 세트는 특정 보존된 위치 또는 서열 모티프를 공유할 것이지만, 1개 이상의 위치에서 축중성일 수 있다. 고도로 특이적인 뉴클레아제는 단지 1개 또는 극소수의 인식 서열을 절단할 수 있다. 특이성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0340] 본원에 사용된 용어 "디스트로핀 유전자"는 국립 생물 정보 센터 (NCBI) 유전자 ID 1756과 연관된 유전자, 뿐만 아니라 그의 자연 발생 변이체를 지칭한다. 용어 "디스트로핀"은 디스트로핀 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드를 지칭한다. 근육 세포 및 근육 전구체 세포에서 발현되는 디스트로핀 이소형은 Dp427m 디스트로핀 변이체로 공지되어 있다. 전장 야생형 Dp427m 디스트로핀 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 제시되어 있다. NCBI 참조 번호 NM_004006.3 및 NP_003997.2는 각각 디스트로핀 Dp427m mRNA 및 폴리펩티드를 제시한다. 본원에 기재된 일부 실시양태에서, 디스트로핀 유전자는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의해 편집되어, 엑손 45-55의 절제 및 후속해서 디스트로핀 유전자의 완벽한 라이게이션이 발생한다. 야생형 디스트로핀 유전자로부터의 엑손 45-55의 제거는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 디스트로핀 폴리펩티드를 생성할 수 있다.

[0341] 본원에 사용된 용어 "완벽한 라이게이션"은 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제의 쌍에 의한 절단 후, 디스트로핀 유전자 내의 제2 절단 부위의 상보적 3' 오버행의 모든 4개의 염기와 제1 절단 부위의 3' 오버행의 모든 4개의 염기의 라이게이션 (즉, 어닐링)을 지칭한다. 개시된 조작된 메가뉴클레아제에 의해 표적화된 인식 서열은 동일한 4개의 염기쌍 중심 서열 (예를 들어, GTAT)을 갖고, 따라서 제1 및 제2 절단 부위는 상보적인 4개의 염기쌍 3' 오버행을 가질 것이다. 따라서, 제1 3' 오버행의 각각의 염기쌍은 제2 3' 오버행 상의 그의 상보적 염기쌍과 쌍형성하고, DNA 리가제 효소를 통해 라이게이션이 일어난다. 이러한 완벽한 라이게이션으로부터 생성된 서열의 예가 서열식별번호: 32 (즉, DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열의 완벽한 라이게이션) 및 서열식별번호: 34 (즉, DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열의 완벽한 라이게이션)에 제시된다.

[0342] 본원에 사용된 용어 "베커 근육 이영양증 표현형"은 DMD와 비교하여 덜 중증인 형태의 근육 이영양증을 지칭한다. 베커 근육 이영양증을 갖는 개체는 여전히 디스트로핀 유전자 내에 돌연변이를 포함하지만, DMD를 갖는 개체와 비교하여 근육 세포 (예를 들어, 근육 전구체 세포, 골격근 세포, 및 심장 근육 세포)에서 보다 기능적인 디스트로핀 단백질을 발현하며, 이는 일반적으로 보다 우수한 임상 예후로 이어진다.

[0343] 본원에 사용된 용어 "상동 재조합" 또는 "HR"은 이중-가닥 DNA-파괴가 복구 주형으로서 상동 DNA 서열을 사용하여 복구되는 천연 세포 과정을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Cahill et al., (2006) Front. Biosci. 11:1958-

76] 참조). 상동 DNA 서열은 내인성 염색체 서열 또는 세포에 전달된 외인성 핵산일 수 있다.

[0344] 본원에 사용된 용어 "비-상동 단부-연결" 또는 "NHEJ"는 이중-가닥 DNA-파괴가 2개의 비-상동 DNA 절편의 직접 연결에 의해 복구되는 천연 세포 과정을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Cahill et al., (2006)] 참조). 비-상동 단부-연결에 의한 DNA 복구는 오류-유발성이며, 복구 부위에서 DNA 서열의 비주형 부가 또는 결실을 빈번하게 발생시킨다. 일부 경우에, 표적 인식 서열에서의 절단은 표적 인식 부위에서 NHEJ를 발생시킨다. 유전자의 코딩 서열 내의 표적 부위의 뉴클레아제-유도된 절단에 이어 비-상동 단부 연결 (NHEJ)에 의한 DNA 복구는 유전자 기능을 교란시키는 돌연변이, 예컨대 프레임시프트 돌연변이를 코딩 서열 내로 도입할 수 있다. 따라서, 세포의 집단 내의 유전자를 효과적으로 녹-아웃시키기 위해 조작된 뉴클레아제를 사용할 수 있다.

[0345] 본원에 사용된 용어 "상동성 아암" 또는 "뉴클레아제 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열"은 뉴클레아제에 의해 생성된 절단 부위 내로의 핵산 분자의 삽입을 촉진하는, 핵산 분자의 5' 및 3' 단부에 플랭킹되는 서열을 지칭한다. 일반적으로, 상동성 아암은 적어도 50개의 염기 쌍, 바람직하게는 적어도 100개의 염기 쌍, 및 최대 2000개 또는 그 초과의 염기 쌍의 길이를 가질 수 있고, 게놈 내의 그의 상응하는 서열에 대해 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 상동성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상동성 아암은 약 500개의 염기 쌍이다.

[0346] 아미노산 서열 및 핵산 서열 둘 다와 관련하여 본원에 사용된 용어인, 용어 "퍼센트 동일성", "서열 동일성", "백분율 유사성", "서열 유사성" 등은 정렬된 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 사이의 유사성을 최대화한 서열의 정렬에 기초한 2개의 서열의 유사성의 정도의 척도를 지칭하며, 이는 동일하거나 유사한 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 총 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 및 서열 정렬에서의 갭의 존재 및 길이의 함수이다. 다양한 알고리즘 및 컴퓨터 프로그램이 표준 파라미터를 사용하여 서열 유사성을 결정하는 데 이용가능하다. 본원에 사용된 서열 유사성은 아미노산 서열의 경우 BLASTp 프로그램 및 핵산 서열의 경우 BLASTn 프로그램을 사용하여 측정되며, 이들 둘 다는 국립 생물 정보 센터 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통해 이용가능하고, 예를 들어 문헌 [Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10; Gish & States (1993) Nature Genet. 3:266-72; Madden et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-41; Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; 및 Zhang et al., (2000) J. Comput. Biol. 7:203-14]에 기재되어 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 2개의 아미노산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTp 알고리즘에 대한 하기 파라미터에 기초한 점수이다: 워드 크기=3; 갭 개방 페널티=-11; 갭 연장 페널티=-1; 및 점수화 매트릭스=BLOSUM62. 본원에 사용된 바와 같은, 2개의 핵산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTn 알고리즘에 대한 하기 파라미터에 기초한 점수이다: 워드 크기=11; 갭 개방 페널티=-5; 갭 연장 페널티=-2; 매치 보상=1; 및 미스매치 패널티=-3.

[0347] 2종의 단백질 또는 아미노산 서열의 변형과 관련하여 본원에 사용된 용어 "상응하는"은 제1 단백질에서의 명시된 변형이 제2 단백질에서의 변형과 동일한 아미노산 잔기의 치환이고, 2종의 단백질이 표준 서열 정렬 (예를 들어, BLASTp 프로그램을 사용함)에 적용되는 경우에 제1 단백질에서의 변형의 아미노산 위치가 제2 단백질에서의 변형의 아미노산 위치에 상응하거나 그와 정렬되는 것을 나타내는 데 사용된다. 따라서, 제1 단백질에서 잔기 "X"의 아미노산 "A"로의 변형은, 잔기 X 및 Y가 서열 정렬에서 서로 상응하는 경우에 X 및 Y가 상이한 번호일 수 있다는 사실에도 불구하고 제2 단백질에서 잔기 "Y"의 아미노산 "A"로의 변형에 상응할 것이다.

[0348] 본원에 사용된 용어 "인식 절반-부위", "인식 서열 절반-부위", 또는 간단히 "절반-부위"는 동종이량체 또는 이종이량체 메가뉴클레아제의 단량체에 의해 또는 단일-쇄 메가뉴클레아제의 1개의 서브유닛에 의해 또는 단일-쇄 메가뉴클레아제의 1개의 서브유닛에 의해 인식되고 결합되는 이중-가닥 DNA 분자 내의 핵산 서열을 의미한다.

[0349] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 비교적 높은 가변성을 갖는 아미노산을 포함하는 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛 내의 국재화된 서열을 지칭한다. 초가변 영역은 약 50-60개의 인접 잔기, 약 53-57개의 인접 잔기, 또는 바람직하게는 약 56개의 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역의 잔기는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 위치 24-79 또는 위치 215-270에 상응할 수 있다. 초가변 영역은 인식 서열 내의 DNA 염기와 접촉하는 1개 이상의 잔기를 포함할 수 있고, 단량체 또는 서브유닛의 염기 선호도를 변경시키기 위해 변형될 수 있다. 초가변 영역은 또한 메가뉴클레아제가 이중-가닥 DNA 인식 서열과 회합하는 경우에 DNA 백본에 결합하는 1개 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 잔기는 DNA 백본 및 표적 인식 서열에 대한 메가뉴클레아제의 결합 친화도를 변경시키기 위해 변형될 수 있다. 본 발명의 상이한 실시양태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내는 1-20개의 잔기를 포함할 수 있고, 염기 선호도 및/또는 DNA-결합 친화도에 영향을 미치기 위해 변형될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내는 약 15-20개의 잔기를 포함하고, 염기 선호도 및/또는 DNA-결합 친화도에 영향을 미치기 위해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역

내의 가변 잔기는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 위치 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, 및 77 중 1개 이상에 상응한다. 특정 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 추가로 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 잔기 48, 50, 및 71-73에 상응할 수 있다. 다른 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 위치 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 259, 261, 262, 263, 264, 266 및 268 중 1개 이상에 상응한다. 특정 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 추가로 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 잔기 239, 241 및 263-265에 상응할 수 있다.

[0350] 디스트로핀 단백질 또는 mRNA 수준과 관련하여 용어 "증가시키다"는 참조 수준 또는 대조군과 비교할 경우 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 또는 그 초과의 디스트로핀 단백질 또는 mRNA 발현의 증가를 포함하여, 참조 수준에 비해 디스트로핀 단백질 또는 mRNA 발현 수준의 임의의 증가를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 단백질 또는 mRNA 수준의 증가는, 예를 들어, 야생형 디스트로핀 폴리펩티드 또는 유전자와 비교하여 적어도 1개의 엑손에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 부분(예를 들어, 엑손 45-55에 의해 코딩되는 부분)이 누락되거나 또는 엑손 45-55에 상응하는 mRNA의 부분이 누락된, 단축된 디스트로핀 폴리펩티드 또는 mRNA 전사체의 증가를 지칭한다.

[0351] 디스트로핀 단백질 또는 mRNA 수준과 관련하여 본원에 사용된 용어 "참조 수준"은, 예를 들어 치료 중인 대조군 세포, 대조군 세포 집단 또는 대상체에서 이전 시점에, 대조군 세포, 대조군 세포 집단 또는 대조군 대상체에서 측정된 바와 같은 디스트로핀 단백질 또는 mRNA의 수준 (예를 들어, 대조군 세포, 대조군 세포 집단 또는 대상체로부터 수득된 투여전 기준선 수준), 또는 미리 규정된 디스트로핀 단백질 또는 mRNA의 역치 수준 (예를 들어, 이전 실험을 통해 확인된 역치 수준)을 지칭한다.

[0352] 본원에 사용된 용어 "대조군" 또는 "대조군 세포"는 유전자 변형된 세포의 유전자형 또는 표현형에서의 변화를 측정하기 위한 참조 지점을 제공하는 세포를 지칭한다. 대조군 세포는, 예를 들어 (a) 야생형 세포, 즉, 유전자 변형된 세포를 생성하는 유전자 변경을 위한 출발 물질과 동일한 유전자형의 야생형 세포; (b) 유전자 변형된 세포와 동일한 유전자형의 세포이지만 널 구축물로 (즉, 관심 형질에 대해 공지된 효과를 갖지 않는 구축물로) 형질전환된 세포; 또는 (c) 유전자 변형된 세포와 유전자상 동일하지만 변경된 유전자형 또는 표현형의 발현을 유도할 조건 또는 자극 또는 추가의 유전자 변형에 노출되지 않은 세포를 포함할 수 있다. 대조군 대상체는, 예를 들어: 야생형 대상체, 즉, 대상체에서 변경된 유전자형 또는 표현형의 발현을 유도할 조건 또는 자극 또는 추가의 유전자 변형에 노출되지 않은, 유전자 변형된 대상체 (예를 들어, 디스트로핀 유전자에서 동일한 돌연변이를 갖는 대상체)를 생성하는 유전자 변경을 위한 출발 대상체와 동일한 유전자형의 야생형 대상체를 포함할 수 있다.

[0353] 본원에 사용된 용어 "재조합 DNA 구축물", "재조합 구축물", "발현 카세트", "발현 구축물", "키메라 구축물", "구축물" 및 "재조합 DNA 단편"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 단일 또는 이중-가닥 폴리뉴클레오티드이다. 재조합 구축물은 천연에서 함께 발견되지 않는, 비제한적으로 조절 및 코딩 서열을 포함하는 핵산 단편의 인공 조합물을 포함한다. 예를 들어, 재조합 DNA 구축물은 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 코딩 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되고 천연에서 발견되는 것과 상이한 방식으로 배열된 조절 서열 및 코딩 서열을 포함할 수 있다. 이러한 구축물은 그 자체로 사용될 수 있거나 또는 벡터와 함께 사용될 수 있다.

[0354] 본원에 사용된 용어 "벡터" 또는 "재조합 DNA 벡터"는 주어진 숙주 세포에서 폴리펩티드-코딩 서열을 전사 및 번역할 수 있는 복제 시스템 및 서열을 포함하는 구축물일 수 있다. 벡터가 사용되는 경우에, 벡터의 선택은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같이 숙주 세포를 형질전환시키는 데 사용될 방법에 좌우된다. 벡터는, 비제한적으로, 플라스미드 벡터 및 재조합 AAV 벡터, 또는 유전자를 표적 세포에 전달하는 데 적합한 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 벡터를 포함할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 단리된 뉴클레오티드 또는 핵산 서열 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포를 성공적으로 형질전환시키고, 선택하고, 증식시키기 위해 벡터 상에 존재해야 하는 유전 요소를 잘 알고 있다. 일부 실시양태에서, "벡터"는 또한 바이러스 벡터를 지칭한다. 바이러스 벡터는, 비제한적으로, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 AAV를 포함할 수 있다.

[0355] 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 요소 사이의 기능적 연결을 의미하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열과 조절 서열 (예를 들어, 프로모터) 사이의 작동 가능한 연결은 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열의 발현을 가능하게 하는 기능적 연결이다. 작동가능하게 연결된 요소는 인접할 수 있거나 또는 비-인접할 수 있다. 2개의 단백질 코딩 영역의

연결을 지칭하는 데 사용되는 경우에, 작동가능하게 연결된은 코딩 영역이 동일한 리딩 프레임 내에 있음을 의도한다.

[0356] 본원에 사용된 용어 "치료" 또는 "대상체를 치료하는"은 대상체에서 디스트로핀 단백질의 수준을 증가시킬 목적으로 DMD를 갖는 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이러한 조작된 메가뉴클레아제 또는 폴리뉴클레오티드의 쌍을 투여하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 디스트로핀 단백질의 단축된 버전 (예를 들어, 다중 엑손에 의해 코딩된 아미노산 누락)의 발현이 증가된다. 일부 실시양태에서, 엑손 45-55에 의해 코딩된 아미노산이 결여된 디스트로핀 단백질 버전의 발현이 증가된다. 이러한 치료는, 일부 실시양태에서, DMD 표현형을 베커 이영양증 표현형으로 이행시킨다.

[0357] 본원에 사용된 용어 "gc/kg" 또는 "유전자 카피/킬로그램"은 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 투여되는 대상체의 킬로그램 단위의 체중당 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열의 카피수를 지칭한다.

[0358] 본원에 사용된 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 유익하거나 바람직한 생물학적 및/또는 임상 결과를 가져오기에 충분한 양을 지칭한다. 치료 유효량은 사용되는 제제 또는 조성물, 질환 및 그의 중증도, 및 치료될 대상체의 연령, 체중, 신체 상태 및 반응성에 따라 달라질 것이다. 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 또는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 쌍, 또는 본원에 개시된 제약 조성물의 유효량은 디스트로핀 단백질 (예를 들어, 엑손 45-55에 의해 코딩된 아미노산이 결여된 단축된 디스트로핀 단백질)의 발현 수준을 증가시키고, DMD와 연관된 적어도 1종의 증상을 호전시킨다.

[0359] 본원에 사용된 용어 "지질 나노입자"는 평균 직경이 10 내지 1000 nm인 전형적으로 구형 구조를 갖는 지질 조성물을 지칭한다. 일부 제제에서, 지질 나노입자는 적어도 1개의 양이온성 지질, 적어도 1개의 비-양이온성 지질, 및 적어도 1개의 접합된 지질을 포함할 수 있다. 핵산, 예컨대 mRNA를 캡슐화하는 데 적합한 관련 기술 분야에 공지된 지질 나노입자가 본 발명에서의 사용을 위해 고려된다.

[0360] 본원에 사용된 바와 같이, 변수에 대한 수치 범위의 언급은 본 개시내용이 그러한 범위 내의 값 중 임의의 것과 동등한 변수로 실시될 수 있음을 의미하는 것으로 의도된다. 따라서, 본래 이산인 변수의 경우, 변수는 범위의 종점을 포함한 수치 범위 내의 임의의 정수 값과 동등할 수 있다. 유사하게, 본래 연속인 변수의 경우, 변수는 범위의 종점을 포함한 수치 범위 내의 임의의 실수 값과 동등할 수 있다. 예로서, 비제한적으로, 0 내지 2의 값을 갖는 것으로 기재된 변수는 변수가 본래 이산인 경우에 값 0, 1 또는 2를 취할 수 있고, 변수가 본래 연속인 경우에 값 0.0, 0.1, 0.01, 0.001, 또는 ≥0 및 ≤2의 임의의 다른 실수 값을 취할 수 있다.

[0361] 2.1 본 발명의 원리

[0362] 본 개시내용은, 부분적으로, DMD 표현형을 발생시키는 디스트로핀 유전자에서의 특정 결실이 유전자 내의 정상 리딩 프레임을 복원시키기 위해 디스트로핀 유전자 내의 엑손을 전략적으로 결실시키는 엔도뉴클레아제의 쌍을 이용하는 것에 의해 보상될 수 있다는 가설에 기초한다. DMD-라이덴 데이터베이스는 DMD를 유발하는 대부분의 돌연변이가 리딩 프레임에서 시프트를 유발하는 1개 이상의 전체 엑손의 결실임을 나타낸다. 많은 경우에, 리딩 프레임은 돌연변이 직전 또는 직후에 엑손을 제거함으로써 복원될 수 있다. 표 3에 제시된 바와 같이, 환자의 ~65%에서 나타나는 29개의 상이한 뒤시엔느-유발 돌연변이는 돌연변이에 인접한 단일 엑손을 결실시키는 것에 의해 보상될 수 있다.

[0363] 표 3.

환자에서 결실된 엑손(들)	결실시키기 위한 추가의 엑손	DMD-라이덴 데이터베이스에서의 빈도 (%)
44, 44-47	43	5
35-43, 45, 45-54	44	8
18-44, 44, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53	45	13
45	46	7
51, 51-55	50	5
50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63	51	15
51, 53, 53-55	52	3
45-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52	53	9

[0364]

[0365] 예를 들어, 환자의 대략 7%에서 발생하는 엑손 45의 결실로 인한 질환을 갖는 환자는 엑손 46을 결실시키는 치료에 의해 치료될 수 있다. 엑손 51 또는 엑손 45를 결실시킬 수 있는 치료는 각각 환자의 15% 및 13%를 치료하는 데 사용될 수 있었다.

[0366] 특히, 디스트로핀 유전자 내의 모든 DMD-관련 돌연변이의 50% 초과가 엑손 45 내지 55에 포괄된다. 따라서, 본 발명의 특정한 실시양태에서, 디스트로핀 유전자의 엑손 45 내지 55는 유전자의 정상 리딩 프레임을 복원하기 위해 제거될 것이다. 본원에 개시된 바와 같이, 엑손 제거는 엑손 45의 상류 및 엑손 55의 하류의 인트론에 한 쌍의 절단 부위를 생성하는, 근육 세포 또는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 심장 근육 세포 또는 골격근 세포)에서의 한 쌍의 조작된 메가뉴클레아제의 발현에 의해 달성되며, 이는 개재 게놈 영역의 절제를 가능하게 한다. 이러한 접근법 후, 유전자 변형된 세포 (예를 들어, 치료된 대상체 내의 근육 세포)는 마이크로-디스트로핀 접근법과 유사하게, 마이크로-디스트로핀 트랜스진을 발현할 필요는 없이, 베커 표현형으로부터의 단축된 디스트로핀 단백질의 양을 만들 수 있을 것이다. 이러한 단축된 디스트로핀은 다중-연속 치료 요법을 필요로 하는 다른 요법과 달리, 질환을 영구적으로 구제하기에 충분할 수 있다.

[0367] 따라서, 단일 처리는 대상체 내의 세포의 백분율로부터 엑손을 영구적으로 결실시킬 것으로 구상된다. 일부 실시양태에서, 이들 세포는 근모세포 (즉, 근육 세포), 또는 기능적 (또는 반-기능적) 디스트로핀을 발현하는 전체 근육 섬유를 복제 및 발생시킬 수 있는 다른 근육 전구체 세포일 것이다. 그러나, 엑손 결실의 빈도가 낮으면, 각각의 환자에 대해 다중 치료를 수행하는 것이 필요할 수 있다.

[0368] 2.2 디스트로핀 유전자 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 메가뉴클레아제

[0369] 인식 서열

[0370] 살아있는 세포의 게놈에서 DNA 파괴를 만들기 위해 부위-특이적 뉴클레아제를 사용하는 것이 가능하고, 이러한 DNA 파괴는 돌연변이유발 NHEJ 복구를 통해 또는 트랜스제닉 DNA 서열과의 상동 재조합을 통해 게놈의 영구적 변형을 발생시킬 수 있다는 것이 관련 기술분야에 공지되어 있다. NHEJ는 절단 부위에서 돌연변이유발을 일으켜 대립유전자의 불활성화를 발생시킬 수 있다. NHEJ-연관 돌연변이유발은 조기 정지 코돈의 생성, 이상 비-기능적 단백질을 생산하는 프레임시프트 돌연변이를 통해 대립유전자를 불활성화시킬 수 있거나, 또는 넌센스-매개 mRNA 붕괴와 같은 메카니즘을 촉발할 수 있다. NHEJ를 통해 돌연변이유발을 유도하기 위한 뉴클레아제의 사용은 야생형 대립유전자에 존재하는 특이적 돌연변이 또는 서열을 표적화하는 데 사용될 수 있다. 또한, 표적 유전자좌에서 이중-가닥 파괴를 유도하기 위한 뉴클레아제의 사용은 특히 게놈 표적에 상동인 서열이 플랭킹된 트랜스제닉 DNA 서열의 상동 재조합을 자극하는 것으로 공지되어 있다. 이러한 방식으로, 외인성 폴리뉴클레오티드가 표적 유전자좌 내로 삽입될 수 있다. 이러한 외인성 폴리뉴클레오티드는 임의의 관심 서열 또는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다.

[0371] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 DMD 19-20 인식 서열 (서열식별번호: 6), DMD 35-36 인식 서열 (서열식별번호: 10), 또는 DMD 37-38 인식 서열 (서열식별번호: 12)에 결합하여 이를 절단하도록 설계되었다. DMD 19-20 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 예시적인 메가뉴클레아제가 서열식별번호: 36-44에 제공된다. DMD 35-36 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 예시적인 메가뉴클레아제가 서열식별번호: 45-52에

제공된다. DMD 37-38 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 예시적인 메가뉴클레아제가 서열식별번호: 53-59에 제공된다. 각각의 인식 서열의 서열, 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제에 의해 절단된 경우에 생산된 4개의 염기 쌍 3' 오버행이 하기 표 4에 제공된다.

[0372] 표 4. 조작된 메가뉴클레아제 인식 서열

인식 서열	SEQ ID NO:	4 bp 3' 오버행
AAGGATTATGTATTACCTCCCG	6	GTAT
TAAGATTGGGTATGAGGGATAG	8	GTAT
CTACATGGTGTATCTGACTAAG	10	GTAT
CTGGCCGAAGTATAGGAATATG	12	GTAT

[0373]

[0374] 본 개시내용에 따른 디스트로핀 유전자를 변형시키기 위해, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제의 쌍이 동일한 세포에서 함께 사용된다. 이러한 조작된 메가뉴클레아제의 쌍은 엑손 45의 상류의 인트론에서 제1 절단 부위 및 엑손 55의 하류의 인트론에서 제2 절단 부위를 생성하여 개재 게놈 서열의 제거를 가능하게 하도록 설계되었다. 놀랍게도, 크기가 500,000 bp 초과인 디스트로핀 유전자로부터 이러한 게놈 영역의 절제는 높은 효율로 달성될 수 있는 것으로 관찰되었다. 또한, 메가뉴클레아제 인식 서열은 절단 후에 상보적인 4개의 염기쌍 3' 오버행을 갖는 것으로 선택되었고, 디스트로핀 유전자는 2개의 절단 부위의 3' 오버행의 완벽한 라이게이션에 의해 높은 빈도로 복구될 수 있는 것으로 관찰되었다. 본원에서 고려되는 이러한 완벽하게 라이게이션된 인식 서열은 하기 표 5에 제공된다.

[0375] 표 5. 라이게이션된 인식 서열

인식 서열 쌍	라이게이션된 인식 서열	SEQ ID NO:	제거된 엑손(들)
DMD 19/20 및 DMD 29/30	AAGGATTATGTATGAGGGATAG	30	45
DMD 19/20 및 DMD 35/36	AAGGATTATGTATCTGACTAAG	32	45-55
DMD 19/20 및 DMD 37/38	AAGGATTATGTATAGGAATATG	34	45-55

[0376]

[0377] 이들 인식 서열은 전사후 변형 세포 과정 동안 정상적으로 스플라이싱되는 인트론 서열 내에 있는 것으로 추가로 선택된다. 이는 돌연변이가 디스트로핀 유전자 및 코딩된 폴리펩티드 내로 도입될 가능성을 감소시킨다.

[0378] 예시적인 조작된 메가뉴클레아제

[0379] 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛, 및 HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛을 포함한다. 추가로, 제1 서브유닛은 인식 서열 내의 제1 인식 절반-부위 (예를 들어, DMD19 절반-부위)에 결합하고, 제2 서브유닛은 인식 서열 내의 제2 인식 절반-부위 (예를 들어, DMD20 절반-부위)에 결합한다.

[0380] 특정한 실시양태에서, 본 발명을 실시하는 데 사용되는 메가뉴클레아제는 단일-쇄 메가뉴클레아제이다. 단일-쇄 메가뉴클레아제는 링커 펩티드에 의해 연결된 N-말단 서브유닛 및 C-말단 서브유닛 (즉, 상기 논의된 제1 및 제2 서브유닛)을 포함한다. 2개의 서브유닛 각각은 인식 서열의 절반-부위를 인식하고 이에 결합하며, DNA 절단 부위는 2개의 서브유닛의 계면 근처의 인식 서열의 중간에 존재한다. 논의된 바와 같이, DNA 가닥 파괴는 메가뉴클레아제에 의한 DNA 절단이 한 쌍의 4개의 염기쌍 3' 단일-가닥 오버행을 생성하도록 4개의 염기 쌍만큼 오프셋된다.

[0381] 조작된 메가뉴클레아제가 단일-쇄 메가뉴클레아제인 실시양태에서, 제1 및 제2 서브유닛은, HVR1 영역을 포함하고 제1 절반-부위에 결합하는 제1 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 위치하고, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반-부위에 결합하는 제2 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 위치하도록 배향될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 제1 및 제2 서브유닛은, HVR1 영역을 포함하고 제1 절반-부위에 결합하는 제1 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 위치하고, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반-부위에 결합하는 제2 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 위치하도록 배향될 수 있다.

[0382] 본 발명의 예시적인 DMD 메가뉴클레아제가 서열식별번호: 36-59에 제공되고, 하기 표 6-8에 요약된다.

[0383] 표 6. DMD 19-20 인식 서열 (서열식별번호: 6)에 결합하여 이를 절단하는 예시적인 조작된 메가뉴클레아제.

메가뉴클레아제	AA SEQ ID	DMD19 서브유닛 잔기	DMD19 서브유닛 SEQ ID	*DMD19 서브유닛 %	DMD20 서브유닛 잔기	DMD20 서브유닛 SEQ ID	*DMD20 서브유닛 %
DMD 19-20x.13	36	7-153	84	100	198-344	108	100
DMD 19-20x.87	37	7-153	85	92.52	198-344	109	95.24
DMD 19-20L.249	38	7-153	86	91.16	198-344	110	95.92
DMD 19-20L.302	39	7-153	87	90.48	198-344	111	95.24
DMD 19-20L.329	40	7-153	88	91.16	198-344	112	96.6
DMD 19-20L.374	41	7-153	89	91.84	198-344	113	95.92
DMD 19-20L.375	42	7-153	90	91.84	198-344	114	95.92
DMD 19-20L.431	43	7-153	91	91.16	198-344	115	96.60
DMD 19-20L.458	44	7-153	92	91.84	198-344	116	96.60

[0384]

[0385] "DMD19 서브유닛 %" 및 "DMD 20 서브유닛 %"는 각각의 메가뉴클레아제의 DMD19-결합 및 DMD20-결합 서브유닛 영역과 DMD19-20x.13 메가뉴클레아제의 각각의 DMD19-결합 및 DMD20-결합 서브유닛 영역 사이의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0386] 표 7. DMD 35-36 인식 서열 (서열식별번호: 10)에 결합하여 이를 절단하는 예시적인 조작된 메가뉴클레아제.

메가뉴클레아제	AA SEQ ID	DMD35 서브유닛 잔기	DMD35 서브유닛 SEQ ID	*DMD35 서브유닛 %	DMD36 서브유닛 잔기	DMD36 서브유닛 SEQ ID	*DMD36 서브유닛 %
DMD 35-36x.63	45	7-153	93	100	198-344	117	100
DMD 35-36x.81	46	7-153	94	97.96	198-344	118	93.88
DMD 35-36L.195	47	7-153	95	100	198-344	119	93.20
DMD 35-36L.282	48	7-153	96	99.32	198-344	120	93.20
DMD 35-36L.349	49	7-153	97	100	198-344	121	93.20
DMD 35-36L.376	50	7-153	98	100	198-344	122	93.20
DMD 35-36L.457	51	7-153	99	99.32	198-344	123	92.52
DMD 35-36L.469	52	7-153	100	98.64	198-344	124	95.52

[0387]

[0388] "DMD35 서브유닛 %" 및 "DMD36 서브유닛 %"는 각각의 메가뉴클레아제의 DMD35-결합 및 DMD36-결합 서브유닛 영역과 DMD 35-36x.63 메가뉴클레아제의 각각의 DMD35-결합 및 DMD36-결합 서브유닛 영역 사이의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0389] 표 8. DMD 37-38 인식 서열 (서열식별번호: 12)에 결합하여 이를 절단하는 예시적인 조작된 메가뉴클레아제.

메가뉴클레아제	AA SEQ ID	DMD37 서브유닛 잔기	DMD37 서브유닛 SEQ ID	*DMD37 서브유닛 %	DMD38 서브유닛 잔기	DMD38 서브유닛 SEQ ID	*DMD38 서브유닛 %
DMD 37-38x.15	53	7-153	101	100	198-344	125	100
DMD 37-38x.66	54	7-153	102	98.64	198-344	126	96.60
DMD 37-38x.79	55	7-153	103	99.32	198-344	127	95.24
DMD 37-38.L166	56	7-153	104	91.84	198-344	128	94.56
DMD 37-38L.478	57	7-153	105	91.84	198-344	129	93.88
DMD 37-38L.512	58	7-153	106	91.84	198-344	130	94.56
DMD 37-38L.528	59	7-153	107	90.48	198-344	131	94.56

[0390]

[0391] "DMD37 서브유닛 %" 및 "DMD38 서브유닛 %"는 각각의 메가뉴클레아제의 DMD37-결합 및 DMD38-결합 서브유닛 영역과 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 각각의 DMD37-결합 및 DMD38-결합 서브유닛 영역 사이의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0392] 본 발명의 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 디스트로핀 유전자 내의 서열식별번호: 6을 포함하는 인식 서열 (즉, DMD 19-20 인식 서열)에 결합하여 이를 절단하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고 HVR1 영역을 포함하고, 여기서 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고 HVR2 영역을 포함한다. 예시적인 DMD 19-20 메가뉴클레아제가 하기에 기재된다.

[0393] DMD 19-20x.13 (서열식별번호: 36)

[0394] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별

번호: 36의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 24-79를 포함한다.

[0395] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 7-153을 포함한다.

[0396] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 36의 잔기 215-270을 포함한다.

[0397] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 36의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 36의 잔기 198-344를 포함한다.

[0398] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 36에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 50에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 50에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0399] DMD 19-20x.87 (서열식별번호: 37)

[0400] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를

포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 37의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 24-79를 포함한다.

[0401] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 37의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 7-153을 포함한다.

[0402] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 37의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 37의 잔기 215-270을 포함한다.

[0403] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 37의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 37의 잔기 198-344를 포함한다.

[0404] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 37에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 51에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 51에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0405] DMD 19-20L.249 (서열식별번호: 38)

[0406] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치

환을 갖는 서열식별번호: 38의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 24-79를 포함한다.

[0407] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 38의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 7-153을 포함한다.

[0408] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 38의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 38의 잔기 215-270을 포함한다.

[0409] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 38의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 38의 잔기 198-344를 포함한다.

[0410] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 38에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 52에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 52에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0411] DMD 19-20L.302 (서열식별번호: 39)

[0412] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 39의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 24-79를 포함한다.

[0413] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 39의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 7-153을 포함한다.

[0414] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 236에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 39의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 39의 잔기 215-270을 포함한다.

[0415] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 39의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 39의 잔기 198-344를 포함한다.

[0416] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 39에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 53에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 53에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0417] DMD 19-20L.329 (서열식별번호: 40)

[0418] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 40의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 24-79를 포함한다.

[0419] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부

실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 40의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 7-153을 포함한다.

[0420] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 40의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 215-270을 포함한다.

[0421] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 40의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 40의 잔기 198-344를 포함한다.

[0422] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 40에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 54에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 54에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0423] DMD 19-20L.374 (서열식별번호: 41)

[0424] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 40의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 41의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 24-79를 포함한다.

[0425] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 41의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 7-153을 포함한다.

[0426] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 41의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 41의 잔기 215-270을 포함한다.

[0427] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 41의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 41의 잔기 198-344를 포함한다.

[0428] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 41에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 65에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 65에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0429] DMD 19-20L.375 (서열식별번호: 42)

[0430] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 42의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 24-79를 포함한다.

[0431] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 42의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 7-153을 포함한다.

[0432] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산

서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 42의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 42의 잔기 215-270을 포함한다.

[0433] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 42의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 42의 잔기 198-344를 포함한다.

[0434] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 42에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 66에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 66에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0435] DMD 19-20L.431 (서열식별번호: 43)

[0436] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 43의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 24-79를 포함한다.

[0437] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 43의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 7-153을 포함한다.

[0438] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235,

237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 43의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 43의 잔기 215-270을 포함한다.

[0439] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 43의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 43의 잔기 198-344를 포함한다.

[0440] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 43에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 43의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 67에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 67에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0441] DMD 19-20L.458 (서열식별번호: 44)

[0442] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 44의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 24-79를 포함한다.

[0443] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 44의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 7-153을 포함한다.

[0444] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 44의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 44의 잔기 215-270을 포함한다.

[0445] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 44의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 44의 잔기 198-344를 포함한다.

[0446] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 44에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 44의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 68에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 68에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0447] 본 발명의 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 디스트로핀 유전자 내의 서열식별번호: 10을 포함하는 인식 서열 (즉, DMD 35-36 인식 서열)에 결합하여 이를 절단하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하고, 여기서 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함한다. 예시적인 DMD 35-36 메가뉴클레아제가 하기에 기재된다.

[0448] DMD 35-36x.63 (서열식별번호: 45)

[0449] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 24-79를 포함한다.

[0450] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 7-153을 포함한다.

[0451] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235,

237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 250에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 45의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 45의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 45의 잔기 198-344를 포함한다.

[0452] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 45에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 45의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 69에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 69에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0453] DMD 35-36x.81 (서열식별번호: 46)

[0454] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 46의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 24-79를 포함한다.

[0455] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 46의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 7-153을 포함한다.

[0456] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의

잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 46의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 46의 잔기 215-270을 포함한다.

[0457] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 46의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 46의 잔기 198-344를 포함한다.

[0458] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 46에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 46의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 70에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 70에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0459] DMD 35-36L.195 (서열식별번호: 47)

[0460] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 47의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 24-79를 포함한다.

[0461] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 47의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 7-153을 포함한다.

[0462] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의

잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 47의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 47의 잔기 215-270을 포함한다.

[0463] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 47의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 47의 잔기 198-344를 포함한다.

[0464] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 47에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 47의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 71에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 71에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0465] DMD 35-36L.282 (서열식별번호: 48)

[0466] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 48의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 24-79를 포함한다.

[0467] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 48의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 7-153을 포함한다.

[0468] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48

의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 48의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 48의 잔기 215-270을 포함한다.

[0469] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 48의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 48의 잔기 198-344를 포함한다.

[0470] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 48에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 48의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 72에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 72에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0471] DMD 35-36L.349 (서열식별번호: 49)

[0472] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 49의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 24-79를 포함한다.

[0473] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 49의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 7-153을 포함한다.

[0474] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 241에 상

응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 49의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 49의 잔기 215-270을 포함한다.

[0475] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 49의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 49의 잔기 198-344를 포함한다.

[0476] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 49에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 49의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 73에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 73에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0477] DMD 35-36L.376 (서열식별번호: 50)

[0478] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 50의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 24-79를 포함한다.

[0479] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 50의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 7-153을 포함한다.

[0480] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포

함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 50의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 50의 잔기 215-270을 포함한다.

[0481] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 50의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 50의 잔기 198-344를 포함한다.

[0482] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 50에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 74에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 74에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0483] DMD 35-36L.457 (서열식별번호: 51)

[0484] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 51의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 24-79를 포함한다.

[0485] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 51의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 7-153을 포함한다.

[0486] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을

갖는 서열식별번호: 51의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 51의 잔기 215-270을 포함한다.

[0487] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 51의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 51의 잔기 198-344를 포함한다.

[0488] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 51에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 75에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 75에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0489] DMD 35-36L.469 (서열식별번호: 52)

[0490] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 52의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 24-79를 포함한다.

[0491] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 52의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 7-153을 포함한다.

[0492] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 52의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 52의 잔기 215-270을 포함한다.

[0493] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 52의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 52의 잔기 198-344를 포함한다.

[0494] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 52에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 52의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 76에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 76에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0495] 본 발명의 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 디스트로핀 유전자 내의 서열식별번호: 12를 포함하는 인식 서열 (즉, DMD 37-38 인식 서열)에 결합하여 이를 절단하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하고, 여기서 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함한다. 예시적인 DMD 37-38 메가뉴클레아제가 하기에 기재된다.

[0496] DMD 37-38x.15 (서열식별번호: 53)

[0497] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 24-79를 포함한다.

[0498] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 7-153을 포함한다.

[0499] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53

의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 53의 잔기 215-270을 포함한다.

[0500] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 53의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 53의 잔기 198-344를 포함한다.

[0501] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 53에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 77에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 77에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0502] DMD 37-38x.66 (서열식별번호: 54)

[0503] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K, 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 64에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 54의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 24-79를 포함한다.

[0504] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 54의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 7-153을 포함한다.

[0505] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54

의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 54의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 54의 잔기 215-270을 포함한다.

[0506] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 54의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 54의 잔기 198-344를 포함한다.

[0507] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 54에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 54의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 78에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 78에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0508] DMD 37-38x.79 (서열식별번호: 55)

[0509] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 55의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 24-79를 포함한다.

[0510] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 55의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 7-153을 포함한다.

[0511] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 239에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 241에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 255에 상응하는 잔기를 포

함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 55의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 55의 잔기 215-270을 포함한다.

[0512] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 55의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 55의 잔기 198-344를 포함한다.

[0513] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 55에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 55의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 79에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 79에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0514] DMD 37-38L.166 (서열식별번호: 56)

[0515] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 56의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 24-79를 포함한다.

[0516] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 56의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 7-153을 포함한다.

[0517] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의

아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 56의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 56의 잔기 215-270을 포함한다.

[0518] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 56의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 56의 잔기 198-344를 포함한다.

[0519] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 56에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 80에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 80에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0520] DMD 37-38L.478 (서열식별번호: 57)

[0521] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 57의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 24-79를 포함한다.

[0522] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 57의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 7-153을 포함한다.

[0523] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 57의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 57의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식

별번호: 57의 잔기 215-270을 포함한다.

[0524] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 57의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 57의 잔기 198-344를 포함한다.

[0525] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 57에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 81에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 81에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0526] DMD 37-38L.512 (서열식별번호: 58)

[0527] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 58의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 24-79를 포함한다.

[0528] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 58의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 7-153을 포함한다.

[0529] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 58의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 58의 잔기 215-270을 포함한다.

[0530] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 58의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 58의 잔기 198-344를 포함한다.

[0531] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 58에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 58의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 82에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 82에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0532] DMD 37-38L.528 (서열식별번호: 59)

[0533] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 59의 잔기 24-79를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 24-79를 포함한다.

[0534] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 19에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 59의 잔기 7-153을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 7-153을 포함한다.

[0535] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 257에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 263에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 264에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 59의 잔기 215-270을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 59의 잔기 215-270을 포함한다.

[0536] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일

부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 210에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 271에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 330에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 최대 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 또는 30개의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 59의 잔기 198-344를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 59의 잔기 198-344를 포함한다.

[0537] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하는 단일-쇄 메가뉴클레아제이며, 여기서 링커는 상기 제1 서브유닛 및 상기 제2 서브유닛을 공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 59에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 83에 제시된 핵산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 83에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0538] 2.3 조작된 메가뉴클레아제의 전달 및 발현 방법

[0539] 상이한 측면에서, 본 발명은 세포의 디스트로핀 유전자 (예를 들어, 인간 디스트로핀 유전자) 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 데 유용한 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 제공한다. 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 세포에서 디스트로핀 유전자를 변형시키는 다양한 방법, 변형된 디스트로핀 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포를 제조하는 방법, 및 대상체의 표적 세포에서 디스트로핀 유전자를 변형시키는 방법을 제공한다. 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 일부 경우에 제약 조성물의 일부로서 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 DMD를 치료하는 방법을 제공한다.

[0540] 각각의 경우에, 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 디스트로핀 단백질을 발현할 수 있는 세포, 예컨대 근육 세포 또는 근육 전구체 세포 내로 도입되는 것이 구상된다. 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제는 단백질의 형태로, 또는 바람직하게는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서 세포 내로 전달될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 DNA (예를 들어, 원형 또는 선형화된 플라스미드 DNA, PCR 생성물, 또는 바이러스 게놈) 또는 RNA (예를 들어, mRNA)일 수 있다.

[0541] 검출 및 발현

[0542] 유전자 변형된 세포 또는 대상체에서의 변형된 디스트로핀 (즉, 엑손 45-55가 결여된 유전자, 또는 엑손 45-55에 의해 코딩된 아미노산이 결여된 단백질)의 발현은 관련 기술분야의 표준 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 이러한 변형된 디스트로핀의 수준은 디스트로핀 유전자 발현과 연관된 임의의 변수의 수준, 예를 들어, 디스트로핀 mRNA 수준 또는 디스트로핀 단백질 수준에 기초하여 평가될 수 있다. 이러한 변형된 디스트로핀의 증가된 수준 또는 발현은 참조 수준과 비교하여 이들 변수 중 1종 이상의 절대 수준 또는 상대 수준의 증가에 의해 평가될 수 있다. 이러한 변형된 디스트로핀 수준은 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플, 예컨대 조직 생검 또는 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액 또는 소변을 포함한 체액에서 측정될 수 있다. 임의로, 이러한 변형된 디스트로핀 수준은 샘플 내의 표준 단백질 또는 물질에 대해 정규화된다. 추가로, 이러한 변형된 디스트로핀 수준은 본원의 방법에 따른 치료 전, 치료 동안 또는 치료 후의 임의의 시간에 평가될 수 있다.

[0543] 다양한 측면에서, 본원에 기재된 방법은 유전자 변형된 세포, 표적 세포, 또는 대상체에서 변형된 디스트로핀 (즉, 엑손 45-55에 의해 코딩된 아미노산이 결여된 것)의 단백질 수준을 (예를 들어, 대상체로부터 수득된 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 샘플에서 측정된 바와 같이) 참조 수준 (즉, 야생형 세포 또는 대상체에서의 디스트로핀의 단백질 수준)의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 또는 그 초과로 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 방법은 이러한 변형된 디스트로핀 단백질의 수준을 디스트로핀의 참조 수준 (즉, 야생형 세포 또는 대상체에서의 디스트로핀의 단백질 수준)의 약 10% 내지 약 100% (예를 들어, 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90%, 90%-100%, 또는 그 초과)로 증가시키는 데 효과적이다.

[0544] 조작된 메가뉴클레아제의 세포 내로의 도입

[0545] 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 하기 본원에 추가로 상술된 것을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 다양한 상이한 메카니즘에 의해 게놈 DNA를 절단하기 위해 세포 내로 전달될 수 있다.

[0546] 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 단백질의 형태로, 또는 바람직하게는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서 세포 내로 전달될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 DNA (예를 들어, 원형 또는 선형화된 플라스미드 DNA, PCR 생성물, 또는 바이러스 게놈) 또는 RNA (예를 들어, mRNA)일 수 있다.

[0547] 조작된 메가뉴클레아제 코딩 서열이 DNA 형태로 전달되는 실시양태의 경우, 이는 메가뉴클레아제 유전자의 전사를 용이하게 하기 위해 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 본 발명에 적합한 포유동물 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 시토메갈로바이러스 초기 (CMV) 프로모터 (Thomsen et al., (1984) Proc Natl Acad Sci USA. 81:659-63) 또는 SV40 초기 프로모터 (Benoist & Chambon (1981) Nature 290:304-10) 뿐만 아니라 유도성 프로모터, 예컨대 테트라시클린-유도성 프로모터 (Dingermann et al., (1992) Mol Cell Biol. 12:4038-45)를 포함한다. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 또한 합성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 합성 프로모터는, 비제한적으로, JeT 프로모터 (WO 2002/012514)를 포함할 수 있다.

[0548] 구체적 실시양태에서, 본 발명의 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 조직-특이적 프로모터, 예컨대 근육-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 특정한 실시양태에서, 프로모터는 근육 전구체 세포 (예를 들어, 위성 세포 또는 줄기 세포)에서 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현할 수 있다. 예시적이고 비제한적인 근육 프로모터는 C5-12 (Liu et al., (2004) Hum Gene Ther. 15:783-92), 근육-특이적 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터 (Yuasa et al., (2002) Gene Ther. 9:1576-88), 또는 평활근 22 (SM22) 프로모터 (Haase et al., (2013) BMC Biotechnol. 13:49-54)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 169-181 중 어느 하나에 따른 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 169를 포함하는 C5-12 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 170을 포함하는 뮤린 MCK 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 171을 포함하는 인간 MCK 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 172를 포함하는 MCK 인핸서와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 173을 포함하는 변형된 MCK 인핸서와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 174를 포함하는 spc 5-12 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 175를 포함하는 MHCK7 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 176을 포함하는 CK8 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 177을 포함하는 SK-CRM4 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 178을 포함하는 SP-301 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 179를 포함하는 SP-817 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 180을 포함하는 SP-905 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 181을 포함하는 근육 하이브리드 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0549] 단일 폴리뉴클레오티드가 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 2개의 별개의 핵산 서열을 포함하는 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 유전자는 2개의 별개의 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 대안적 실시양태에서, 2개의 메가뉴클레아제 유전자는 단일 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 일부 예에서 이는 내부-리보솜 진입 부위 (IRES) 또는 2A 펩티드 서열에 의해 분리될 수 있다 (Szymczak & Vignali (2005) Expert Opin Biol Ther. 5:627-38). 이러한 2A 펩티드 서열은, 예를 들어 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 서열을 포함할 수 있다.

[0550] 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 DNA 구축물 또는 발현 카세트 상에서 전달된다. 예를 들어, 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트 (즉, "카세트")를 포함할 수 있다.

[0551] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 DNA 주형을 사용하여 세포 내로 도입된다. 단일-가닥 DNA는 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 서열의 상류 및/또는 하류에 5' 및/또는 3' AAV 역전된 말단 반복부 (ITR)를 추가로 포함할 수 있다. 단일-가닥 DNA는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 서열의 상류 및/또는 하류에 5' 및/또는 3' 상동성 아암을 추가로 포함할 수 있다.

[0552] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 선형화된 DNA 주형을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 이러한 선형화된 DNA 주형은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA는 원형 플라스미드 DNA가 세포 내로 도입되기 전에 선형화되도록 1종 이상의 제한 효소에 의해 소화될 수 있다.

[0553] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA가 세포로 전달되며, 이는 이것이 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자가 세포의 게놈 내로 통합될 가능성을 감소시키기 때문이다. 이러한 mRNA는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 시험관내 전사를 사용하여 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 7-메틸-구아노신, 항-역전 캡 유사체 (ARCA) (US 7,074,596), 클린캡(CleanCap)® 유사체, 예컨대 캡 1 유사체 (트릴링크(Trilink), 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 5' 캡핑되거나, 또는 백시니아 캡핑 효소 또는 유사한 것을 사용하여 효소적으로 캡핑된다. 일부 실시양태에서, mRNA는 폴리아데닐화될 수 있다. mRNA는 코딩된 조작된 메가뉴클레아제의 발현 및/또는 mRNA 자체의 안정성을 증진시키기 위해 다양한 5' 및 3' 비번역 서열 요소를 함유할 수 있다. 이러한 요소는, 예를 들어 번역후 조절 요소, 예컨대 우드척 간염 바이러스 번역후 조절 요소를 포함할 수 있다. mRNA는 뉴클레오시드 유사체 또는 자연 발생 뉴클레오시드, 예컨대 슈도우리딘, 5-메틸시티딘, N6-메틸아데노신, 5-메틸우리딘, 또는 2-티오우리딘을 함유할 수 있다. 추가의 뉴클레오시드 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 8,278,036에 기재된 것을 포함한다.

[0554] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 세포 흡수를 용이하게 하기 위해 세포 관통 펩티드 또는 표적화 리간드에 커플링된다. 관련 기술분야에 공지된 세포 관통 펩티드의 예는 폴리-아르기닌 (Jearawiriyapaisarn et al., (2008) Mol Ther. 16:1624-29), HIV 바이러스로부터의 TAT 펩티드 (Hudecz et al., (2005) Med. Res. Rev. 25:679-736), MPG (Simeoni et al., (2003) Nucleic Acids Res. 31:2717-24), Pep-1 (Deshayes et al., (2004) Biochemistry 43:7698-7706, 및 HSV-1 VP-22 (Deshayes et al., (2005) Cell Mol Life Sci. 62:1839-49)를 포함한다. 대안적 실시양태에서, 조작된 뉴클레아제, 또는 뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA가 표적 세포에 결합하여 내재화되도록 표적 세포 상에서 발현되는 특이적 세포-표면 수용체를 인식하는 항체에 공유적으로 또는 비-공유적으로 커플링된다. 대안적으로, 조작된 뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA는 이러한 세포-표면 수용체에 대한 천연 리간드 (또는 천연 리간드의 부분)에 공유적으로 또는 비-공유적으로 커플링될 수 있다. (McCall et al., (2014) Tissue Barriers. 2(4):e944449; Dinda et al., (2013) Curr. Pharm. Biotechnol. 14:1264-74; Kang et al., (2014) Curr. Pharm. Biotechnol. 15:220-30; 및 Qian et al., (2014) Expert Opin. Drug Metab Toxicol. 10:1491-508).

[0555] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 간의 목적하는 영역 (예를 들어, 간 동모양혈관 내피 세포 또는 조혈 내피 세포, 또는 이것으로 분화되는 전구 세포에 근접한 영역) 내의 주사 또는 이식을 위해 생분해성 히드로겔 내에 캡슐화된다. 히드로겔은 빈번한 주사를 필요로 하지 않으면서 표적 조직의 목적하는 영역에 치료 페이로드의 지속적이고 조정가능한 방출을 제공할 수 있고, 자극-반응성 물질 (예를 들어, 온도- 및 pH-반응성 히드로겔)은 환경적 또는 외부적으로 적용되는 신호에 반응하여 페이로드를 방출하도록 설계될 수 있다 (Derwent et al., (2008) Trans Am. Ophthalmol. Soc. 106:206-14).

[0556] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 나노입자에 공유적으로 또는 바람직하게는 비-공유적으로 커플링되거나 또는 이러한 나노입자 내에 캡슐화된다 (Sharma et al., (2014) Biomed. Res. Int. 2014:156010). 나노입자는 길이 규모가 <1 μm, 바람직하게는 <100 nm인 나노규모 전달 시스템이다. 이러한 나노입자는 금속, 지질, 중합체 또는 생물학적 거대분자로 구성된 코어를 사용하여 설계될 수 있고, 메가뉴클레아제 단백질, mRNA 또는 DNA의 다중 카피는 나노입자 코어에 부착되거나 또는 나노입자 코어로 캡슐화될 수 있다. 이는 각각의 세포에 전달되는 단백질

/mRNA/DNA의 카피 수를 증가시키고, 따라서 각각의 메가뉴클레아제의 세포내 발현을 증가시켜 표적 인식 서열이 컷팅될 가능성을 최대화한다. 이러한 나노입자의 표면은 그의 표면이 페이로드의 세포 전달 및 흡수를 증진시키는 추가의 기능성을 부여하는 코어-쉘 나노입자를 형성하도록 중합체 또는 지질 (예를 들어, 키토산, 양이온성 중합체, 또는 양이온성 지질)로 추가로 변형될 수 있다 (Jian et al., (2012) Biomaterials. 33:7621-30). 나노입자는 나노입자를 적절한 세포 유형으로 지시하고/거나 세포 흡수의 가능성을 증가시키기 위해 표적화 분자에 추가적으로 유리하게 커플링될 수 있다. 이러한 표적화 분자의 예는 세포-표면 수용체에 특이적인 항체 및 세포 표면 수용체에 대한 천연 리간드 (또는 천연 리간드의 부분)를 포함한다.

[0557] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 리포솜 내에 캡슐화되거나 또는 양이온성 지질을 사용하여 복합체화된다 (예를 들어, 리포펙타민(LIPOFECTAMINE)™, 라이프 테크놀로지스 코포레이션(Life Technologies Corp.), 캘리포니아주 칼스배드; 문헌 [Zuris et al., (2015) Nat. Biotechnol. 33:73-80; Mishra et al., (2011) J. Drug Deliv. 2011:863734] 참조). 리포솜 및 리포플렉스 제제는 페이로드를 분해로부터 보호하고, 표적 부위에서의 축적 및 체류를 증진시키고, 표적 세포의 세포 막과의 융합 및/또는 그의 파괴를 통해 세포 흡수 및 전달 효율을 촉진할 수 있다.

[0558] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 중합체 스캐폴드 (예를 들어, PLGA) 내에 캡슐화되거나 또는 양이온성 중합체 (예를 들어, PEI, PLL)를 사용하여 복합체화된다 (Tamboli et al., (2011) Ther Deliv. 2:523-36). 중합체 담체는 중합체 침식 및 약물 확산의 제어를 통해 조정가능한 약물 방출 속도를 제공하도록 설계될 수 있고, 높은 약물 캡슐화 효율은 목적하는 표적 세포 집단으로의 세포내 전달까지 치료 페이로드의 보호를 제공할 수 있다.

[0559] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 미셀로 자기-어셈블리되는 친양쪽성 분자와 조합된다 (Tong et al., (2007) J. Gene Med. 9:956-66). 중합체 미셀은 응집을 방지하고, 전하 상호작용을 차폐하고, 비특이적 상호작용을 감소시킬 수 있는 친수성 중합체 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)에 의해 형성된 미셀 쉘을 포함할 수 있다.

[0560] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 표적 세포로의 투여 및/또는 전달을 위해 에멀젼 또는 나노에멀젼 (즉, < 1nm의 평균 입자 직경을 가짐)으로 제제화된다. 용어 "에멀젼"은, 비제한적으로, 수불혼화성 상이 수성 상과 혼합될 경우 비극성 잔기 (예를 들어, 긴 탄화수소 쇄)는 물로부터 멀어지게 하고 극성 머리 기는 물을 향하게 구동하는 소수성 힘의 결과로서 형성될 수 있는 지질 구조를 포함한, 임의의 수중유, 유중수, 수중유중수, 또는 유중수중유 분산액 또는 액적을 지칭한다. 이들 다른 지질 구조는 단층, 소수층 및 다층 지질 소포, 미셀 및 층상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 에멀젼은 수성 상 및 친지성 상 (전형적으로 오일 및 유기 용매를 함유함)으로 구성된다. 에멀젼은 또한 빈번하게 1종 이상의 계면활성제를 함유한다. 나노에멀젼 제제는, 예를 들어 미국 특허 번호 6,015,832, 6,506,803, 6,635,676, 6,559,189 및 7,767,216에 기재된 바와 같이 널리 공지되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0561] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 다중기능적 중합체 접합체, DNA 덴드리머, 및 중합체 덴드리머에 공유 부착되거나 또는 그와 비-공유 회합된다 (Mastorakos et al., (2015) Nanoscale. 7:3845-56; Cheng et al., (2008) J. Pharm Sci. 97:123-43). 덴드리머 생성은 페이로드 용량 및 크기를 제어할 수 있고, 높은 페이로드 용량을 제공할 수 있다. 더욱이, 다중 표면 기의 디스플레이는 안정성을 개선시키고, 비특이적 상호작용을 감소시키고, 세포-특이적 표적화 및 약물 방출을 증진시키기 위해 활용될 수 있다.

[0562] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 바이러스 (즉, 재조합 바이러스 벡터)를 사용하여 세포 내로 도입된다. 이러한 재조합 바이러스는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 재조합 레트로바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 아데노바이러스, 및 재조합 AAV를 포함한다 (문헌 [Vannucci et al., (2013) New Microbiol. 36:1-22]에서 검토됨). 본 발명에 유용한 재조합 AAV는 바이러스의 표적 세포 유형 내로의 형질도입 및 표적 세포에서의 메가뉴클레아제 유전자의 발현을 가능하게 하는 임의의 혈청형을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV1, AAV2, AAV5 AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV12, 또는 AAVrh.74의 혈청형 (즉, 캡시드)을 갖는다. 상이한 AAV는 상이한 조직에 국재화되는 경향이 있는 것으로 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Wang et al., (2014) Expert Opin Drug Deliv 11:345-34.). AAV8과 밀접하게 관련된 AAVrh.74 혈청형은 골격근 및 심장 근육 조직을 포함한 근육 조직을 표적화하는 것으로 추가로 기재되어 있다 (Mendell et al., (2020) JAMA Neurol. 77:1122-31). 따

라서, 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV1이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV2이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV5이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV6이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV7이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV8이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV9이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV12이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAVrh.74이다. AAV는 또한 숙주 세포에서 제2-가닥 DNA 합성을 필요로 하지 않도록 자기-상보적일 수 있다 (McCarty et al., (2001) Gene Ther. 8:1248-54). 재조합 AAV에 의해 전달되는 폴리뉴클레오티드는 바이러스 게놈의 일부로서 좌측 (5') 및 우측 (3') 역전된 말단 반복부를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스는 표적 조직 내로 직접 주사된다. 대안적 실시양태에서, 재조합 바이러스는 순환계를 통해 전신 전달된다.

[0563] 한 실시양태에서, 메가뉴클레아제 유전자 전달에 사용되는 재조합 바이러스는 자기-제한 재조합 바이러스이다. 자기-제한 바이러스는 바이러스 게놈 내의 조작된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열의 존재로 인해 세포 또는 유기체에서 제한된 지속 시간을 가질 수 있다. 따라서, 자기-제한 재조합 바이러스는 프로모터, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 및 ITR 내의 메가뉴클레아제 인식 부위에 대한 코딩 서열을 제공하도록 조작될 수 있다. 자기-제한 재조합 바이러스는 메가뉴클레아제가 발현되고 게놈 내의 내인성 인식 서열에서 세포의 게놈을 컷팅할 수 있도록 메가뉴클레아제 유전자를 세포, 조직 또는 유기체에 전달한다. 전달된 메가뉴클레아제는 또한 자기-제한 재조합 바이러스 게놈 내의 그의 표적 부위를 발견하고, 이러한 표적 부위에서 재조합 바이러스 게놈을 컷팅할 것이다. 일단 컷팅되면, 바이러스 게놈의 5' 및 3' 단부가 노출되어 엑소뉴클레아제에 의해 분해될 것이고, 따라서 바이러스는 사멸되고 메가뉴클레아제의 생산은 중지될 것이다.

[0564] 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 재조합 바이러스 (예를 들어 AAV)에 의해 세포에 전달되는 경우에, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 바이러스 프로모터, 예컨대 재조합 바이러스로부터의 내인성 프로모터 (예를 들어, 렌티바이러스의 LTR) 또는 널리 공지된 시토메갈로바이러스- 또는 SV40 바이러스-초기 프로모터일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 표적 세포 (예를 들어, 근육 세포 또는 근육 전구체 세포)에서 우선적으로 유전자 발현을 구동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 근육-특이적 조직 프로모터의 예는 C5-12, 근육-특이적 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 또는 평활근 22 (SM22) 프로모터를 포함한, 이전에 기재된 근육-특이적 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 169-181 중 어느 하나에 따른 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 169를 포함하는 C5-12 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 170을 포함하는 뮤린 MCK 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 171을 포함하는 인간 MCK 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 172를 포함하는 MCK 인핸서와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 173을 포함하는 변형된 MCK 인핸서와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 174를 포함하는 spc 5-12 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 175를 포함하는 MHCK7 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 176을 포함하는 CK8 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 177을 포함하는 SK-CRM4 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 178을 포함하는 SP-301 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 179를 포함하는 SP-817 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 180을 포함하는 SP-905 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-특이적 프로모터는 서열식별번호: 181을 포함하는 근육 하이브리드 프로모터와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 단일 폴리뉴클레오티드가 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 2개의 별개의 핵산 서열을 포함하는 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 유전자는 2개의 별개의 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 대안적

실시양태에서, 2개의 메가뉴클레아제 유전자는 단일 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 일부 예에서 이는 내부-리보솜 진입 부위 (IRES) 또는 2A 펩티드 서열에 의해 분리될 수 있다 (Szymczak & Vignali (2005) Expert Opin Biol Ther. 5:627-38). 이러한 2A 펩티드 서열은, 예를 들어 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 서열을 포함할 수 있다.

[0565] 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 관심 서열을 코딩하는 외인성 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드와 조합하여 세포에 전달하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 세포에서 발현되고, 세포의 디스트로핀 유전자 내의 본원에 기재된 인식 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 6, 서열식별번호: 10, 또는 서열식별번호: 12)을 인식 및 절단하고, 절단 부위를 생성하며, 여기서 외인성 핵산 및 관심 서열은 (예를 들어, 상동 재조합에 의해) 절단 부위에서 게놈 내로 삽입된다. 일부 이러한 예에서, 폴리뉴클레오티드는 외인성 핵산 및 관심 서열의 게놈 내로의 상동 재조합을 촉진하기 위해 메가뉴클레아제 절단 부위에 플랭킹된 핵산 서열에 상동인 서열을 포함할 수 있다.

[0566] 외인성 핵산을 포함하는 이러한 폴리뉴클레오티드는 이전에 논의된 임의의 수단에 의해 대상체의 세포 내로 도입되고/거나 표적 세포로 전달될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 외인성 핵산 분자를 포함하는 이러한 폴리뉴클레오티드는 재조합 바이러스 (즉, 바이러스 벡터), 예컨대 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 재조합 아데노바이러스 또는 재조합 AAV에 의해 도입된다. 외인성 핵산 분자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 데 유용한 재조합 AAV는 바이러스의 세포 내로의 형질도입 및 외인성 핵산 분자 서열의 세포 게놈 내로의 삽입을 가능하게 하는 임의의 혈청형 (즉, 캡시드)을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 AAV1, AAV2, AAV5 AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV12, 또는 AAVrh.74의 혈청형을 갖는다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV1이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV2이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV5이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV6이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV7이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV8이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV9이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAV12이다. 일부 실시양태에서, AAV 혈청형은 AAVrh.74이다. 재조합 AAV는 또한 숙주 세포에서 제2-가닥 DNA 합성을 필요로 하지 않도록 자기-상보적일 수 있다. 재조합 AAV를 사용하여 도입된 외인성 핵산 분자에는 바이러스 게놈에서 5' (좌측) 및 3' (우측) 역전된 말단 반복부가 플랭킹될 수 있다.

[0567] 또 다른 특정한 실시양태에서, 외인성 핵산 분자는 단일-가닥 DNA 주형을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 단일-가닥 DNA는 외인성 핵산 분자를 포함할 수 있고, 특정한 실시양태에서 5' 및 3' 상동성 아암을 포함하여 상동 재조합에 의해 뉴클레아제 절단 부위 내로의 핵산 서열의 삽입을 촉진할 수 있다. 단일-가닥 DNA는 5' 상동성 아암의 5' 상류에 5' AAV ITR 서열, 및 3' 상동성 아암의 3' 하류에 3' AAV ITR 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0568] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 뉴클레아제 및/또는 본 발명의 외인성 핵산 분자를 코딩하는 유전자는 선형화된 DNA 주형으로의 형질감염에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 조작된 뉴클레아제 및/또는 외인성 핵산 분자를 코딩하는 플라스미드 DNA는, 예를 들어 원형 플라스미드 DNA가 세포 내로의 형질감염 전에 선형화되도록 1종 이상의 제한 효소에 의해 소화될 수 있다.

[0569] 세포에 전달되는 경우에, 본 발명의 외인성 핵산은 이전에 논의된 포유동물 프로모터 및 유도성 프로모터를 비롯한, 세포에서 코딩된 폴리펩티드의 발현에 적합한 임의의 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 본 발명의 외인성 핵산은 또한 합성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 합성 프로모터는, 비제한적으로, JeT 프로모터 (WO 2002/012514)를 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 본원에 논의된 근육-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0570] 투여

[0571] 표적 조직(들) 또는 표적 세포(들)는, 비제한적으로, 근육 세포, 예컨대 골격근 세포, 심장 근육 세포, 또는 횡경막의 근육 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 근육 전구 세포, 예컨대 골격근 전구 세포 또는 심장 근육 전구 세포이다. 이러한 근육 전구 세포는 관련 기술분야에 기재되어 있고, 대상체에 존재하거나 또는 또 다른 줄기 세포 집단, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포로부터 유래될 수 있다 (Tey et al., (2019) Front. Cell Dev. Biol. 7:284 및 Amini et al., (2017) J. Cardiovasc. Thorac. Res. 9:127-32).

[0572] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 시험관내 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티

드는 생체내 대상체의 세포에 전달된다. 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명의 메가뉴클레아제는 정제된 단백질로서 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, RNA 또는 DNA)로서 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 표적 조직으로의 직접 주사를 통해 표적 세포 (예를 들어, 근육 세포 또는 근육 전구 세포)에 공급된다. 대안적으로, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 순환계를 통해 전신 전달될 수 있다.

[0573] 방법의 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물, 예컨대 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 바이러스, 또는 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 지질 나노입자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 투여 경로는, 예를 들어 정맥내, 근육내, 복강내, 피하, 간내, 경점막, 경피, 동맥내 및 설하를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 바이러스, 또는 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 지질 나노입자는 표적 조직 (예를 들어, 근육 조직)에의 직접 주사를 통해 표적 세포 (예를 들어, 근육 세포 또는 근육 전구체 세포)에 공급된다. 다른 적합한 투여 경로는 필요에 따라 치료 의사에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0574] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 뉴클레아제, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 치료 유효량은 질환의 치료를 위해 그를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 적절한 경우에, 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 투여량 또는 투여 빈도는 투여 의사의 판단에 기초하여 치료 과정에 걸쳐 조정될 수 있다. 적절한 용량은, 다른 인자들 중에서도, 선택된 임의의 AAV의 특이성 (예를 들어, 혈청형 등), 선택된 임의의 지질 나노입자, 투여 경로, 치료되는 대상체 (즉, 대상체의 연령, 체중, 성별, 및 전반적 상태), 및 투여 방식에 좌우될 것이다. 따라서, 적절한 투여량은 환자마다 달라질 수 있다. 적절한 유효량은 관련 기술분야의 통상의 기술자 또는 치료 의사에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여량 치료는 단일 용량 스케줄일 수 있거나, 또는 다중 용량이 요구되는 경우에는 다중 용량 스케줄일 수 있다. 또한, 대상체는 적절한 만큼 많은 용량을 투여받을 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 적절한 용량 횟수를 용이하게 결정할 수 있다. 투여량은 대안적 투여 경로를 고려하거나 또는 임의의 부작용에 대한 치료 이익의 균형을 맞추기 위해 조정될 필요가 있을 수 있다.

[0575] 일부 실시양태에서, 방법은 분비-손상된 간독소를 코딩하거나, 또는 간독소로서 작용하지 않으면서 간세포 재생을 자극하는 tPA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 투여를 추가로 포함한다.

[0576] 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물이 투여되며, 여기서 코딩 핵산 서열은 약 $1x10^{10}$ gc/kg 내지 약 $1x10^{14}$ gc/kg (예를 들어, 약 $1x10^{10}$ gc/kg, 약 $1x10^{11}$ gc/kg, 약 $1x10^{12}$ gc/kg, 약 $1x10^{13}$ gc/kg, 또는 약 $1x10^{14}$ gc/kg)의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물이 투여되며, 여기서 코딩 핵산 서열은 약 $1x10^{10}$ gc/kg, 약 $1x10^{11}$ gc/kg, 약 $1x10^{12}$ gc/kg, 약 $1x10^{13}$ gc/kg, 또는 약 $1x10^{14}$ gc/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물이 투여되며, 여기서 코딩 핵산 서열은 약 $1x10^{10}$ gc/kg 내지 약 $1x10^{11}$ gc/kg, 약 $1x10^{11}$ gc/kg 내지 약 $1x10^{12}$ gc/kg, 약 $1x10^{12}$ gc/kg 내지 약 $1x10^{13}$ gc/kg, 또는 약 $1x10^{13}$ gc/kg 내지 약 $1x10^{14}$ gc/kg의 용량으로 투여된다. 이들 용량은 본원에 기재된 단일 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 단일 핵산 서열을 포함하는 단일 폴리뉴클레오티드의 투여에 관한 것일 수 있거나, 또는 대안적으로 본원에 기재된 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 본원에 기재된 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 단일 폴리뉴클레오티드에 관한 것일 수 있으며, 여기서 2개의 코딩 핵산 서열의 각각은 표시된 용량으로 투여되는 것으로 이해되어야 한다.

[0577] 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 mRNA를 포함하는 지질 나노입자 제제가 투여되며, 여기서 mRNA의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 mRNA를 포함하는 지질 나노입자 제제가 투여되며, 여기서 mRNA의 용량은 약 0.1 mg/kg, 약 0.25 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 0.75 mg/kg, 약 1.0 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2.0 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 또는 약 3.0 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 mRNA를 포함하는

지질 나노입자 제제가 투여되며, 여기서 mRNA의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 0.25 mg/kg, 약 0.25 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 0.75 mg/kg, 약 0.75 mg/kg 내지 약 1.0 mg/kg, 약 1.0 mg/kg 내지 약 1.5 mg/kg, 약 1.5 mg/kg 내지 약 2.0 mg/kg, 약 2.0 mg/kg 내지 약 2.5 mg/kg, 또는 약 2.5 mg/kg 내지 약 3.0 mg/kg이다.

[0578] 2.4 제약 조성물

[0579] 일부 실시양태에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 mRNA 또는 DNA일 수 있다. 일부 이러한 예에서, 제약 조성물 중의 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자에 의해 포함될 수 있거나, 또는 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)에 의해 포함될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 제약상 허용되는 담체 및 본 발명의 유전자 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 제공하며, 이는 표적 조직으로 전달될 수 있고, 여기서 세포는 본원에 개시된 바와 같은 조작된 메가뉴클레아제를 발현한다. 이러한 제약 조성물은, 예를 들어 전신 투여, 또는 표적 조직으로의 투여를 위해 제제화된다.

[0580] 본 발명의 다양한 실시양태에서, 제약 조성물은 대상체에서 DMD를 치료하고/거나, DMD 질환 표현형을 베커 근육이영양증 표현형으로 전환시키고/거나, DMD와 연관된 증상을 감소시키는 데 유용할 수 있다.

[0581] 이러한 제약 조성물은 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21st ed., Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005)]을 참조한다. 본 발명에 따른 제약 제제의 제조에서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이를 발현하는 세포는 전형적으로 제약상 허용되는 담체와 혼합되고, 생성된 조성물은 대상체에게 투여된다. 담체는 제제 중의 임의의 다른 성분과 상용성이라는 의미에서 허용되어야 하고, 대상체에게 유해하지 않아야 한다. 담체는 고체 또는 액체, 또는 둘 다일 수 있고, 화합물과 함께 단위-용량 제제로서 제제화될 수 있다.

[0582] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 대상체에서 질환의 치료에 유용한 1종 이상의 추가의 작용제 또는 생물학적 분자를 추가로 포함할 수 있다. 마찬가지로, 추가의 작용제(들) 및/또는 생물학적 분자(들)는 개별 조성물로서 공-투여될 수 있다.

[0583] 본원에 기재된 제약 조성물은 치료 유효량의 본원에 개시된 임의의 조작된 메가뉴클레아제, 또는 본원에 기재된 임의의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 본원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 본원에 기재된 용량 중 임의의 것 (예를 들어, 코딩 핵산 서열의 gc/kg 또는 mRNA의 mg/kg)으로 포함할 수 있다.

[0584] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 기재된 (즉, 바이러스 게놈 내에 패키징된) 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본원에 기재된 1개 이상의 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 기재된 상이한 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 본원에 기재된 2개 이상의 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)를 포함한다. 예를 들어, 제1 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)는 DMD 19-20 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)는 DMD 35-36 인식 서열 또는 DMD 37-38 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 동일한 세포 (예를 들어, 근육 세포)에서의 이러한 조작된 메가뉴클레아제의 쌍의 발현은 본 발명에 따른 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55의 절제를 가능하게 할 것이다.

[0585] 다른 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 기재된 2개의 별개의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 2개의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 (즉, 바이러스 게놈 내에 패키징됨)를 포함하는 본원에 기재된 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 바이러스 (예를 들어, 재조합 AAV)는 DMD 19-20 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열, 및 DMD 35-36 인식 서열 또는 DMD 37-38 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이러한 조작된 메가뉴클레아제의 쌍의 발현은 본 발명에 따른 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55의 절제를 가능하게 할

것이다.

[0586] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 지질 나노입자 내에 캡슐화된 본원에 기재된 1개 이상의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 지질 나노입자는 본원에 기재된 상이한 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 각각 포함하는 본원에 기재된 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 지질 나노입자 내의 제1 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)는 DMD 19-20 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩할 수 있고, 지질 나노입자 내의 제2 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)는 DMD 35-36 인식 서열 또는 DMD 37-38 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩할 수 있다. 동일한 세포 (예를 들어, 근육 세포)에서의 이러한 조작된 메가뉴클레아제의 쌍의 발현은 본 발명에 따른 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55의 절제를 가능하게 할 것이다. 대안적으로, 제약 조성물은 본원에 기재된 상이한 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 각각 포함하는 지질 나노입자의 2개의 개별 집단을 포함할 수 있으며, 여기서 지질 나노입자의 제1 집단은 DMD 19-20 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 본원에 기재된 제1 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 포함하고, 지질 나노입자의 제2 집단은 DMD 35-36 인식 서열 또는 DMD 37-38 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 본원에 기재된 제2 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 포함한다.

[0587] 다른 특정한 실시양태에서, 지질 나노입자는 본원에 기재된 2개의 별개의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 2개의 핵산 서열을 포함하는 본원에 기재된 1개의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 지질 나노입자는 DMD 19-20 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제1 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 서열, 및 DMD 35-36 인식 서열 또는 DMD 37-38 인식 서열에 대해 특이성을 갖는 본원에 기재된 제2 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA)를 포함할 수 있다. 동일한 세포 (예를 들어, 근육 세포)에서의 이러한 조작된 메가뉴클레아제의 쌍의 발현은 본 발명에 따른 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55의 절제를 가능하게 할 것이다.

[0588] 본 발명에서의 사용을 위해 고려되는 일부 지질 나노입자는 적어도 1개의 양이온성 지질, 적어도 1개의 비-양이온성 지질, 및 적어도 1개의 접합된 지질을 포함한다. 보다 특정한 예에서, 지질 나노입자는 약 50 mol% 내지 약 85 mol%의 양이온성 지질, 약 13 mol% 내지 약 49.5 mol%의 비-양이온성 지질, 및 약 0.5 mol% 내지 약 10 mol%의 지질 접합체를 포함할 수 있고, 이는 비-층상 (즉, 비-이중층) 형태를 갖는 방식으로 생산된다. 다른 특정한 예에서, 지질 나노입자는 약 40 mol% 내지 약 85 mol%의 양이온성 지질, 약 13 mol% 내지 약 49.5 mol%의 비-양이온성 지질, 및 약 0.5 mol% 내지 약 10 mol%의 지질 접합체를 포함할 수 있고, 이는 비-층상 (즉, 비-이중층) 형태를 갖는 방식으로 생산된다.

[0589] 양이온성 지질은, 예를 들어, 하기 중 1종 이상을 포함할 수 있다: 팔미토일-올레오일-노르-아르기닌 (PONA), MPDACA, GUADACA, ((6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트) (MC3), LenMC3, CP-LenMC3, γ-LenMC3, CP-γ-LenMC3, MC3MC, MC2MC, MC3 에테르, MC4 에테르, MC3 아미드, 범-MC3, 범-MC4 및 범 MC5, 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLenDMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C2-DMA; "XTC2"), 2,2-디리놀레일-4-(3-디메틸아미노프로필)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C3-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(4-디메틸아미노부틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C4-DMA), 2,2-디리놀레일-5-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥산 (DLin-K6-DMA), 2,2-디리놀레일-4-N-메틸페피아지노-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-MPZ), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 1,2-디리놀레일카르바모일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-C-DAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-(디메틸아미노)아세톡시프로판 (DLin-DAC), 1,2-디리놀레일옥시-3-모르폴리노프로판 (DLin-MA), 1,2-디리놀레오일-3-디메틸아미노프로판 (DLinDAP), 1,2-디리놀레일티오-3-디메틸아미노프로판 (DLin-S-DMA), 1-리놀레오일-2-리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-2-DMAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 (DLin-TMA.Cl), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 (DLin-TAP.Cl), 1,2-디리놀레일옥시-3-(N-메틸피페라지노)프로판 (DLin-MPZ), 3-(N,N-디리놀레일아미노)-1,2-프로판디올 (DLinAP), 3-(N,N-디올레일아미노)-1,2-프로판디오 (DOAP), 1,2-디리놀레일옥소-3-(2-N,N-디메틸아미노)에톡시프로판 (DLin-EG-DMA), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드 (DODAC), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA), 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DSDMA), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드 (DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP), 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤 (DC-Chol), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 브로민화암모늄

(DMRIE), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민-카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 디옥타데실아미도글리실 스페르민 (DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판 (CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시)-3-디메틸-1-(시스,시스-9',1-2'-옥타데카디엔옥시)프로판 (CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민 (DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카르바밀-3-디메틸아미노프로판 (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카르바밀-3-디메틸아미노프로판 (DLincarbDAP), 또는 그의 혼합물. 양이온성 지질은 또한 DLinDMA, DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), MC3, LenMC3, CP-LenMC3, γ-LenMC3, CP-γ-LenMC3, MC3MC, MC2MC, MC3 에테르, MC4 에테르, MC3 아미드, 범-MC3, 범-MC4, 범 MC5, 또는 그의 혼합물일 수 있다.

[0590] 다양한 실시양태에서, 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 50 mol% 내지 약 90 mol%, 약 50 mol% 내지 약 85 mol%, 약 50 mol% 내지 약 80 mol%, 약 50 mol% 내지 약 75 mol%, 약 50 mol% 내지 약 70 mol%, 약 50 mol% 내지 약 65 mol%, 또는 약 50 mol% 내지 약 60 mol%를 구성할 수 있다.

[0591] 다른 실시양태에서, 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 40 mol% 내지 약 90 mol%, 약 40 mol% 내지 약 85 mol%, 약 40 mol% 내지 약 80 mol%, 약 40 mol% 내지 약 75 mol%, 약 40 mol% 내지 약 70 mol%, 약 40 mol% 내지 약 65 mol%, 또는 약 40 mol% 내지 약 60 mol%를 구성할 수 있다.

[0592] 비-양이온성 지질은 예를 들어 1종 이상의 음이온성 지질 및/또는 중성 지질을 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 비-양이온성 지질은 하기 중성 지질 성분 중 1종을 포함한다: (1) 콜레스테롤 또는 그의 유도체; (2) 인지질; 또는 (3) 인지질 및 콜레스테롤 또는 그의 유도체의 혼합물. 콜레스테롤 유도체의 예는 콜레스타놀, 콜레스타논, 콜레스테논, 코프로스타놀, 콜레스테릴-2'-히드록시에틸 에테르, 콜레스테릴-4'-히드록시부틸 에테르, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 팔미토일올레이올-포스파티딜글리세롤 (POPG), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민, 디메틸-포스파티딜에탄올아민, 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민 (DEPE), 스테아로일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 난 포스파티딜콜린 (EPC), 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 중성 지질일 수 있다. 특정 실시양태에서, 인지질은 DPPC, DSPC, 또는 그의 혼합물이다.

[0593] 일부 실시양태에서, 비-양이온성 지질 (예를 들어, 1종 이상의 인지질 및/또는 콜레스테롤)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 60 mol%, 약 15 mol% 내지 약 60 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 60 mol%, 약 30 mol% 내지 약 60 mol%, 약 10 mol% 내지 약 55 mol%, 약 15 mol% 내지 약 55 mol%, 약 20 mol% 내지 약 55 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 약 30 mol% 내지 약 55 mol%, 약 13 mol% 내지 약 50 mol%, 약 15 mol% 내지 약 50 mol% 또는 약 20 mol% 내지 약 50 mol%를 구성할 수 있다. 비-양이온성 지질이 인지질 및 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체의 혼합물인 경우에, 혼합물은 입자 내에 존재하는 총 지질의 최대 약 40, 50, 또는 60 mol%를 구성할 수 있다.

[0594] 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질은 예를 들어 하기: 폴리에틸렌글리콜 (PEG)-지질 접합체, 폴리아미드 (ATTA)-지질 접합체, 양이온성-중합체-지질 접합체 (CPL), 또는 그의 혼합물 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 하나의 특정한 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 PEG-지질 접합체 또는 ATTA-지질 접합체를 포함한다. 특정 실시양태에서, PEG-지질 접합체 또는 ATTA-지질 접합체는 CPL과 함께 사용된다. 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질은, 예를 들어 PEG-디아실글리세롤 (DAG), PEG 디알킬옥시프로필 (DAA), PEG-인지질, PEG-세라미드 (Cer), 또는 그의 혼합물을 포함한 PEG-지질을 포함할 수 있다. PEG-DAA 접합체는 PEG-디 라우릴옥시프로필 (C12), PEG-디미리스틸옥시프로필 (C14), PEG-디팔미틸옥시프로필 (C16), PEG-디스테아릴옥시프로필 (C18), 또는 그의 혼합물일 수 있다.

[0595] 본 발명에 사용하기에 적합한 추가의 PEG-지질 접합체는 mPEG2000-1,2-디-O-알킬-sn3-카르보모일글리세리드 (PEG-C-DOMG)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. PEG-C-DOMG의 합성은 WO 2009/086558에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 추가의 PEG-지질 접합체는 비제한적으로 1-[8'-(1,2-디미리스토일-3-프로파녹시)-카르복스아미도-3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일-ω-메틸-폴리(에틸렌글리콜) (2KPEG-DMG)을 포함한다. 2KPEG-DMG의 합성은 미국 특허 번호 7,404,969에 기재되어 있다.

[0596] 일부 경우에, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질 (예를 들어, PEG-지질 접합체)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 0.1 mol% 내지 약 2 mol%, 약 0.5 mol% 내지 약 2 mol%, 약 1 mol% 내지 약 2 mol%, 약 0.6 mol% 내지

약 1.9 mol%, 약 0.7 mol% 내지 약 1.8 mol%, 약 0.8 mol% 내지 약 1.7 mol%, 약 1 mol% 내지 약 1.8 mol%, 약 1.2 mol% 내지 약 1.8 mol%, 약 1.2 mol% 내지 약 1.7 mol%, 약 1.3 mol% 내지 약 1.6 mol%, 약 1.4 mol% 내지 약 1.5 mol%, 또는 약 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2 mol% (또는 그의 임의의 분율 또는 그 내의 범위)를 구성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 경우에, PEG 모이어티는 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. 다른 경우에, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질 (예를 들어, PEG-지질 접합체)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 5.0 mol% 내지 약 10 mol%, 약 5 mol% 내지 약 9 mol%, 약 5 mol% 내지 약 8 mol%, 약 6 mol% 내지 약 9 mol%, 약 6 mol% 내지 약 8 mol%, 또는 약 5 mol%, 6 mol%, 7 mol%, 8 mol%, 9 mol%, 또는 10 mol% (또는 그의 임의의 분율 또는 그 내의 범위)를 구성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 경우에, PEG 모이어티는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다.

[0597] 다른 실시양태에서, 조성물은 적어도 1개의 양전하 캐리어, 및 양전하 캐리어와 상이한 적어도 1개의 음전하 캐리어를 함유하는 양쪽성 리포솜을 포함할 수 있으며, 리포솜의 등전점은 4 내지 8이다. 이러한 목표는 리포솜이 pH-의존성의, 변화하는 전하로 제조된다는 사실로 인해 달성된다.

[0598] 목적하는 특성을 갖는 리포솜 구조는, 예를 들어 막-형성 또는 막-기반 양이온 전하 캐리어의 양이 낮은 pH에서 음이온 전하 캐리어의 양을 초과하고, 보다 높은 pH에서 비가 역전되는 경우에 형성된다. 이는 이온화가능한 성분이 4 내지 9의 pKa 값을 갖는 경우에 항상 그러하다. 매질의 pH가 하락함에 따라, 모든 양이온 전하 캐리어는 더 하전되고, 모든 음이온 전하 캐리어는 그의 전하를 잃는다.

[0599] 양쪽성 리포솜에 유용한 양이온성 화합물은 상기 본원에서 이전에 기재된 양이온성 화합물을 포함한다. 비제한적으로, 강하게 양이온성인 화합물은 예를 들어 DC-Chol 3-β-[N-(N',N'-디메틸메탄) 카르바모일] 콜레스테롤, TC-Chol 3-β-[N-(N', N', N'-트리메틸아미노에탄) 카르바모일 콜레스테롤, BGSC 비스구아니디늄-스페르미딘-콜레스테롤, BGTC 비스-구아니디늄-트렌-콜레스테롤, DOTAP (1,2-디올레오일옥시프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드, DOSPER (1,3-디올레오일옥시-2-(6-카르복시-스페르밀)-프로필아미드, DOTMA (1,2-디올레오일옥시프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드) (리포펙틴(Lipofectin)®), DORIE 1,2-디올레오일옥시프로필)-3-디메틸히드록시에틸암모늄 브로마이드, DOSC (1,2-디올레오일-3-숙시닐-sn-글리세릴 콜린 에스테르), DOGSDSO (1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-숙시닐-2-히드록시에틸 디술피드 오미틴), DDAB 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, DOGS ((C18)2GlySper3+) N,N-디옥타데실아미도-글리콜-스페르민 (트랜스펙탐(Transfectam)®) (C18)2Gly+ N,N-디옥타데실아미도-글리신, CTAB 세틸트리메틸암모늄 브로마이드, CpyC 세틸피리디늄 클로라이드, DOEPC 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린 또는 다른 O-알킬-포스파티딜콜린 또는 에탄올아민, 리신, 아르기닌 또는 오르니틴으로부터의 아미드 및 포스파티딜 에탄올아민을 포함할 수 있다.

[0600] 약하게 양이온성인 화합물의 예는 비제한적으로 His-Chol (히스타미닐-콜레스테롤 헤미숙시네이트), Mo-Chol (모르폴린-N-에틸아미노-콜레스테롤 헤미숙시네이트), 또는 히스티디닐-PE를 포함한다.

[0601] 중성 화합물의 예는 비제한적으로 콜레스테롤, 세라미드, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 테트라에테르 지질, 또는 디아실 글리세롤을 포함한다.

[0602] 양쪽성 리포솜에 유용한 음이온성 화합물은 본원에서 이전에 기재된 비-양이온성 화합물을 포함한다. 비제한적으로, 약하게 음이온성인 화합물의 예는 CHEMS (콜레스테롤 헤미숙시네이트), 8 내지 25개의 탄소 원자를 갖는 알킬 카르복실산, 또는 디아실 글리세롤 헤미숙시네이트를 포함할 수 있다. 추가의 약하게 음이온성인 화합물은 아스파르트산, 또는 글루탐산 및 PE뿐만 아니라 PS의 아미드 및 글리신, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 세린, 시스테인, 트레오닌, 티로신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 다른 아미노산 또는 아미노디카르복실산과의 그의 아미드를 포함할 수 있다. 동일한 원리에 따르면, 히드록시카르복실산 또는 히드록시디카르복실산 및 PS의 에스테르도 또한 약하게 음이온성인 화합물이다.

[0603] 일부 실시양태에서, 양쪽성 리포솜은 접합된 지질, 예컨대 상기 본원에 기재된 것을 함유할 수 있다. 유용한 접합된 지질의 특정한 예는 비제한적으로 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티드산, PEG-세라미드 접합체 (예를 들어, PEG-CerC14 또는 PEG-CerC20), PEG-변형된 디알킬아민 및 PEG-변형된 1,2-디아실옥시프로판-3-아민을 포함한다. 특정한 예는 PEG-변형된 디아실글리세롤 및 디알킬글리세롤이다.

[0604] 일부 실시양태에서, 중성 지질은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 10 mol% 내지 약 60 mol%, 약 15 mol% 내지 약 60 mol%, 약 20 mol% 내지 약 60 mol%, 약 25 mol% 내지 약 60 mol%, 약 30 mol% 내지 약 60 mol%, 약 10 mol% 내지 약 55 mol%, 약 15 mol% 내지 약 55 mol%, 약 20 mol% 내지 약 55 mol%, 약 25 mol% 내지 약 55 mol%, 약 30 mol% 내지 약 55 mol%, 약 13 mol% 내지 약 50 mol%, 약 15 mol% 내지 약 50 mol% 또는 약 20

mol% 내지 약 50 mol%를 구성할 수 있다.

[0605] 일부 경우에, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질 (예를 들어, PEG-지질 접합체)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 0.1 mol% 내지 약 2 mol%, 약 0.5 mol% 내지 약 2 mol%, 약 1 mol% 내지 약 2 mol%, 약 0.6 mol% 내지 약 1.9 mol%, 약 0.7 mol% 내지 약 1.8 mol%, 약 0.8 mol% 내지 약 1.7 mol%, 약 1 mol% 내지 약 1.8 mol%, 약 1.2 mol% 내지 약 1.8 mol%, 약 1.2 mol% 내지 약 1.7 mol%, 약 1.3 mol% 내지 약 1.6 mol%, 약 1.4 mol% 내지 약 1.5 mol%, 또는 약 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2 mol% (또는 그의 임의의 분율 또는 그 내의 범위)를 구성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 경우에, PEG 모이어티는 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. 다른 경우에, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질 (예를 들어, PEG-지질 접합체)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 5.0 mol% 내지 약 10 mol%, 약 5 mol% 내지 약 9 mol%, 약 5 mol% 내지 약 8 mol%, 약 6 mol% 내지 약 9 mol%, 약 6 mol% 내지 약 8 mol%, 또는 약 5 mol%, 6 mol%, 7 mol%, 8 mol%, 9 mol%, 또는 10 mol% (또는 그의 임의의 분율 또는 그 내의 범위)를 구성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 경우에, PEG 모이어티는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다.

[0606] 중성 및 접합된 지질의 총량을 고려하여, 양쪽성 리포솜의 나머지 잔량은 다양한 비로 제제화된 양이온성 화합물 및 음이온성 화합물의 혼합물을 포함할 수 있다. 양이온성 대 음이온성 지질의 비는 핵산 캡슐화의 목적하는 특성, 제타 전위, pKa, 또는 하전된 지질 성분의 존재에 적어도 부분적으로 의존하는 다른 물리화학적 특성을 달성하기 위해 선택될 수 있다.

[0607] 일부 실시양태에서, 지질 나노입자는 간에서, 구체적으로 간세포 내에서 전달 및 흡수를 특이적으로 증진시키는 조성을 갖는다.

[0608] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 대상체에서 DMD의 치료에 유용한 1종 이상의 추가의 작용제를 추가로 포함할 수 있다.

[0609] 본 개시내용은 또한 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 이를 코딩하는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드, 또는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현하는 본원에 기재된 세포를 제공한다. 본 개시내용은 DMD를 치료하거나, 변형된 디스트로핀 단백질 (즉, 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 것)의 수준을 증가시키거나, 또는 DMD와 연관된 증상을 감소시키기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 이를 코딩하는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 또는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 발현하는 본원에 기재된 세포의 용도를 추가로 제공한다.

[0610] 2.5 재조합 바이러스를 생산하는 방법

[0611] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 재조합 바이러스, 예컨대 재조합 AAV를 제공한다. 재조합 AAV는 전형적으로 포유동물 세포주, 예컨대 HEK-293에서 생산된다. 바이러스 cap 및 rep 유전자는 전달될 치료 유전자(들) (예를 들어, 메가뉴클레아제 유전자)를 위한 공간을 만들기 위해 그의 자기-복제를 막도록 재조합 바이러스로부터 제거되기 때문에, 이를 패키징 세포주에 트랜스로 제공하는 것이 필요하다. 또한, 복제를 지지하는 데 필요한 "헬퍼" (예를 들어, 아데노바이러스) 성분을 제공하는 것이 필요하다 (Cots et al., (2013) Curr. Gene Ther. 13:370-81). 빈번하게, 재조합 AAV는 세포주가 "헬퍼" 성분을 코딩하는 제1 플라스미드, cap 및 rep 유전자를 포함하는 제2 플라스미드, 및 바이러스 내로 패키징될 개재 DNA 서열을 함유하는 바이러스 ITR을 포함하는 제3 플라스미드로 형질감염되는 삼중-형질감염을 사용하여 생산된다. 이어서, 캡시드 내에 감싸진 게놈 (ITR 및 관심 개재 유전자(들))을 포함하는 바이러스 입자는 동결-해동 사이클, 초음파처리, 세제, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 수단에 의해 세포로부터 단리된다. 이어서, 입자는 염화세슘 밀도 구배 원심분리 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제되고, 후속적으로 관심 유전자(들)는 세포, 조직 또는 유기체, 예컨대 인간 환자에게 전달된다.

[0612] 재조합 AAV 입자는 전형적으로 세포에서 생산 (제조)되기 때문에, 조작된 메가뉴클레아제가 패키징 세포에서 발현되지 않도록 보장하기 위해 본 발명을 실시하는 데 주의를 기울여야 한다. 본 발명의 재조합 바이러스 게놈이 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함할 수 있기 때문에, 패키징 세포주에서 발현된 임의의 메가뉴클레아제는 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있기 전에 바이러스 게놈을 절단할 수 있다. 이는 감소된 패키징 효율 및/또는 단편화된 게놈의 패키징을 유발할 것이다. 패키징 세포에서의 메가뉴클레아제 발현을 방지하는 데 여러 접근법이 사용될 수 있다.

[0613] 뉴클레아제는 패키징 세포에서 활성이 아닌 조직-특이적 프로모터의 제어 하에 놓일 수 있다. 조작된 메가뉴클

레아제의 발현을 위해 또는 관심 핵산 서열을 위해 본원에 기재된 임의의 조직 특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 근육 조직으로의 전달을 위해 재조합 바이러스가 개발된 경우에, 근육-특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 근육-특이적 프로모터의 예는 비제한적으로 본원의 다른 곳에 기재된 그러한 근육-특이적 프로모터를 포함한다.

[0614] 대안적으로, 재조합 바이러스는 메가뉴클레아제가 발현될 가능성이 없는 상이한 종으로부터의 세포에 패키징될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 입자는 비-포유동물 패키징 세포에서 활성이 아닌 포유동물 프로모터, 예컨대 널리 공지된 시토메갈로바이러스- 또는 SV40 바이러스-초기 프로모터를 사용하여 미생물, 곤충 또는 식물 세포에서 생산될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 입자는 문헌 [Gao et al., (2007) J. Biotechnol. 131:138-43]에 기재된 바와 같이 바큘로바이러스 시스템을 사용하여 곤충 세포에서 생산된다. 포유동물 프로모터의 제어 하의 메가뉴클레아제는 이들 세포에서 발현될 가능성이 없다 (Airenne et al., (2013) Mol. Ther. 21:739-49). 또한, 곤충 세포는 포유동물 세포와 상이한 mRNA 스플라이싱 모티프를 이용한다. 따라서, 포유동물 인트론, 예컨대 인간 성장 호르몬 (HGH) 인트론 또는 SV40 대형 T 항원 인트론을 메가뉴클레아제의 코딩 서열 내로 혼입시키는 것이 가능하다. 이들 인트론은 곤충 세포에서 pre-mRNA 전사체로부터 효율적으로 스플라이싱되지 않기 때문에, 곤충 세포는 기능적 메가뉴클레아제를 발현하지 않을 것이고, 전장 게놈을 패키징할 것이다. 대조적으로, 생성된 재조합 AAV 입자가 전달되는 포유동물 세포는 pre-mRNA를 적절하게 스플라이싱할 것이고, 기능적 메가뉴클레아제 단백질을 발현할 것이다. 췐은 곤충 패키징 세포에서 독성 단백질 바르나제 및 디프테리아 독소 단편 A의 발현을 감쇠시키기 위해 HGH 및 SV40 대형 T 항원 인트론을 사용하여, 이들 독소 유전자를 보유하는 재조합 AAV 벡터의 생산을 가능하게 하는 것을 보고하였다 (Chen (2012) Mol. Ther. Nucleic Acids. 1: e57).

[0615] 조작된 메가뉴클레아제 유전자는 메가뉴클레아제 발현에 소분자 유도인자가 요구되도록 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 Tet-On 시스템 (클론테크(Clontech); Chen et al., (2015) BMC Biotechnol. 15:4) 및 레오스위치(RheoSwitch) 시스템 (인트렉손(Intrexon); Sowa i (2011) Spine 36:E623-8)을 포함한다. 둘 다의 시스템, 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 유사한 시스템은 소분자 활성화제 (각각 독시시클린 또는 엑디손)에 반응하여 전사를 활성화시키는 리간드-유도성 전사 인자 (각각 Tet 리프레서 및 엑디손 수용체의 변이체)에 의존한다. 이러한 리간드-유도성 전사 활성화제를 사용하여 본 발명을 실시하는 것은 1) 상응하는 전사 인자에 반응하는 프로모터의 제어 하에 조작된 메가뉴클레아제 유전자를 위치시키는 단계이며, 메가뉴클레아제 유전자는 (a) 전사 인자에 대한 결합 부위(들)를 갖는 것인 단계; 및 2) 패키징된 바이러스 게놈에 전사 인자를 코딩하는 유전자를 포함시키는 단계를 포함한다. 전사 활성화제가 동일한 세포에 또한 제공되지 않으면 재조합 AAV 전달 후에 조작된 메가뉴클레아제가 표적 세포 또는 조직에서 발현되지 않을 것이기 때문에 후자의 단계가 필요하다. 이어서, 전사 활성화제는 동족 소분자 활성화제로 처리된 세포 또는 조직에서만 메가뉴클레아제 유전자 발현을 유도한다. 이러한 접근법은 소분자 유도제를 언제 및 어느 조직에 전달할 지를 선택함으로써 메가뉴클레아제 유전자 발현이 시공간적 방식으로 조절되는 것을 가능하게 하기 때문에 유리하다. 그러나, 유의하게 제한된 운반 능력을 갖는 바이러스 게놈에 유도인자를 포함시켜야 하는 요건은 이러한 접근법에 결점을 생성한다.

[0616] 또 다른 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 입자는 메가뉴클레아제의 발현을 방지하는 전사 리프레서를 발현하는 포유동물 세포주에서 생산된다. 전사 리프레서는 관련 기술분야에 공지되어 있고, Tet-리프레서, Lac-리프레서, Cro 리프레서, 및 람다-리프레서를 포함한다. 많은 핵 호르몬 수용체, 예컨대 엑디손 수용체는 또한 그의 동족 호르몬 리간드의 부재 하에 전사 리프레서로서 작용한다. 본 발명을 실시하기 위해, 패키징 세포는 전사 리프레서를 코딩하는 벡터로 형질감염/형질도입되고, 바이러스 게놈 (패키징 벡터) 내의 메가뉴클레아제 유전자는 리프레서가 프로모터를 침묵시키도록 리프레서에 대한 결합 부위를 포함하도록 변형된 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 전사 억제인자를 코딩하는 유전자는 다양한 위치에 놓일 수 있다. 이는 별개의 벡터 상에서 코딩될 수 있거나; ITR 서열 외부의 패키징 벡터 내로 혼입될 수 있거나; cap/rep 벡터 또는 아데노바이러스 헬퍼 벡터 내로 혼입될 수 있거나; 또는 구성적으로 발현되도록 패키징 세포의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 전사 리프레서 부위를 혼입시키기 위해 통상적인 포유동물 프로모터를 변형시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 창(Chang) & 로닌슨(Roninson)은 Lac 리프레서를 위한 오퍼레이터를 포함하도록 강한 구성적 CMV 및 RSV 프로모터를 변형시켰고, 변형된 프로모터로부터의 유전자 발현은 리프레서를 발현하는 세포에서 크게 감쇠되었음을 보여주었다 (Chang & Roninson (1996) Gene 183:137-42). 비-인간 전사 리프레서의 사용은 메가뉴클레아제 유전자의 전사가 리프레서를 발현하는 패키징 세포에서만 억제될 것이고, 생성된 재조합 AAV로 형질도입된 표적 세포 또는 조직에서는 억제되지 않을 것임을 보장한다.

[0617] 2.6 조작된 메가뉴클레아제 변이체

[0618] 본 발명의 실시양태는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 및 그의 변이체를 포괄한다. 본 발명의 추가 실시양태는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 이러한 폴리뉴클레오티드의 변이체를 포괄한다.

[0619] 본원에 사용된 "변이체"는 실질적으로 유사한 서열을 의미하는 것으로 의도된다. "변이체" 폴리펩티드는 "천연" 폴리펩티드로부터, 천연 단백질 내의 1개 이상의 내부 부위에서의 1개 이상의 아미노산의 결실 또는 부가 및/또는 천연 폴리펩티드 내의 1개 이상의 부위에서의 1개 이상의 아미노산의 치환에 의해 유래된 폴리펩티드를 의미하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 "천연" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 변이체가 유래되는 모 서열을 포함한다. 실시양태에 포괄되는 변이체 폴리펩티드는 생물학적으로 활성이다. 즉, 이는 천연 단백질의 목적하는 생물학적 활성; 즉, 본원에 기재된 디스트로핀 유전자 인식 서열 (예를 들어, DMD 19-20, DMD 35-36, 또는 DMD 37-38 인식 서열)에 결합하여 이를 절단하는 능력을 계속 보유한다. 이러한 변이체는, 예를 들어 인간 조작으로부터 생성될 수 있다. 실시양태의 천연 폴리펩티드 (예를 들어, 서열식별번호: 36-59)의 생물학적 활성 변이체, 또는 본원에 기재된 인식 절반-부위 결합 서브유닛의 생물학적 활성 변이체는 본원의 다른 곳에 기재된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정된 바와 같이 천연 폴리펩티드, 천연 서브유닛, 천연 HVR1 영역 및/또는 천연 HVR2 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 서열 동일성을 가질 것이다. 실시양태의 폴리펩티드 또는 서브유닛의 생물학적 활성 변이체는 약 1-40개만큼 적은 아미노산 잔기, 약 1-20개만큼 적은, 약 1-10개만큼 적은, 약 5개만큼 적은, 4, 3, 2개 또는 심지어 1개만큼 적은 아미노산 잔기가 폴리펩티드 또는 서브유닛과 상이할 수 있다.

[0620] 실시양태의 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 말단절단 및 삽입을 비롯한 다양한 방식으로 변경될 수 있다. 이러한 조작 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변이체는 DNA에서의 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 폴리뉴클레오티드 변경을 위한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92; Kunkel et al., (1987) Methods Enzymol. 154:367-82]; 미국 특허 번호 4,873,192; [Walker & Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York)] 및 그에 인용된 참고문헌을 참조한다. 관심 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 지침은 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 찾아볼 수 있다. 보존적 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 교환하는 것이 최적일 수 있다.

[0621] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 개시된 HVR1 및 HVR2 영역의 변이체를 포함할 수 있다. 모 HVR 영역은, 예를 들어 예시된 조작된 메가뉴클레아제의 잔기 24-79 또는 잔기 215-270을 포함할 수 있다. 따라서, 변이체 HVR은 본원에 예시된 조작된 메가뉴클레아제의 잔기 24-79 또는 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있어서, 변이체 HVR 영역은 조작된 메가뉴클레아제의 생물학적 활성 (즉, 인식 서열에 결합하여 이를 절단함)을 유지한다. 추가로, 본 발명의 일부 실시양태에서, 변이체 HVR1 영역 또는 변이체 HVR2 영역은 모 HVR 내의 특정 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 상응하는 잔기를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, "에 상응하는"은 변이체 HVR 내의 아미노산 잔기가 모 HVR 서열 내의 동일한 상대 위치에 (즉, 모 서열 내의 나머지 아미노산에 관함) 존재하는 같은 아미노산 잔기 (즉, 별개의 동일한 잔기)임을 의미한다. 예로서, 모 HVR 서열이 위치 26에서 세린 잔기를 포함하는 경우에, 잔기 26"에 상응하는 잔기를 포함하는" 변이체 HVR은 또한 모 위치 26에 상대적인 (즉, 상응하는) 위치에서 세린을 포함할 것이다.

[0622] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR1을 포함한다.

[0623] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도

86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR2를 포함한다.

[0624] 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 DNA 인식 도메인에 대한 실질적인 수의 아미노산 변형이 이전에 확인되었고(예를 들어, 미국 8,021,867), 이는 단독으로 또는 조합되어, 생성된 합리적으로-설계된 메가뉴클레아제가 야생형 효소와 상이한 절반-부위 특이성을 갖도록 DNA 인식 서열 절반-부위 내의 개별 염기에서 변경된 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제를 생성한다. 표 9는 인식 절반-부위의 각각의 절반-부위 위치 (-1 내지 -9)에 존재하는 염기에 기초하여 특이성을 증진시키기 위해 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛에서 이루어질 수 있는 잠재적 치환을 제공한다.

[0625] 표 9.

[0626]

	선호되는 센스-가닥 염기										
Posn.	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	**R70*** H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				**T46***			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70	E70	H70	**Q44***	C44*						

[0627]

	선호되는 센스-가닥 염기										
Posn.	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
	T44* A44* V44* I44* L44* N44*	D70 K44* R44*	D44* E44*								
-3	Q68 C24* **I24***	E68 F68 K24* R24*	**R68**	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 **Q26***			S26*
-5		E42	R42			**K28***	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						**S40** S28*
-7	**N30*** **Q38**	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33 **Y33**	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33		R32*	R33				

[0628]

	선호되는 센스-가닥 염기										
Posn.	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
				F33 C33							
-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32			**S32** N32 H32 Q32 T32

[0629] 볼드체 엔트리는 야생형 접촉 잔기이고, 본원에 사용된 바와 같은 "변형"을 구성하지 않는다. 별표는 잔기가 안티센스 가닥 상의 염기와 접촉함을 나타낸다.

[0630] DNA-결합 친화도 및/또는 활성을 조정하기 위해 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛에서 특정 변형이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛은 I-CreI 또는 서열식별번호: 36-59 (WO 2009/001159) 중 어느 하나의 위치 19에 상응하는 잔기에서 G, S 또는 A, I-CreI 또는 서열식별번호: 36-59 중 어느 하나의 위치 66에 상응하는 잔기에서 Y, R, K 또는 D, 및/또는 I-CreI 또는 서열식별번호: 36-59 (미국 특허 번호 8,021,867) 중 어느 하나의 위치 80에 상응하는 잔기에서 E, Q 또는 K를 포함할 수 있다.

[0631] 폴리뉴클레오티드의 경우에, "변이체"는 천연 폴리뉴클레오티드 내의 1개 이상의 부위에서 1개 이상의 뉴클레오티드의 결실 및/또는 부가를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 실시양태의 핵산의 변이체가 오픈 리

딩 프레임이 유지되도록 구축될 것임을 인식할 것이다. 폴리뉴클레오티드의 경우에, 보존적 변이체는 유전자 코드의 축중성으로 인해 실시양태의 폴리펩티드 중 1개의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함한다. 변이체 폴리뉴클레오티드는 합성적으로 유래된 폴리뉴클레오티드, 예컨대 예를 들어 부위-지정 돌연변이유발을 사용하여 생성되지만 실시양태의 재조합 뉴클레아제를 여전히 코딩하는 것을 포함한다. 일반적으로, 실시양태의 특정한 폴리뉴클레오티드의 변이체는 본원의 다른 곳에 기재된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정된 바와 같이 특정한 폴리뉴클레오티드에 대해 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 가질 것이다. 실시양태의 특정한 폴리뉴클레오티드 (즉, 참조 폴리뉴클레오티드)의 변이체는 또한 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 참조 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드 사이의 퍼센트 서열 동일성의 비교에 의해 평가될 수 있다.

[0632] 본원에 포괄되는 단백질 서열의 결실, 삽입 및 치환은 폴리펩티드의 특징에서 라디칼 변화를 생성할 것으로 예상되지 않는다. 그러나, 치환, 결실 또는 삽입의 정확한 효과를 미리 예측하는 것이 어려운 경우에, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 효과가 폴리펩티드를 그의 의도되는 활성에 대해 스크리닝하는 것에 의해 평가될 것임을 인지할 것이다. 예를 들어, 조작된 메가뉴클레아제의 변이체를 디스트로핀 유전자 내에서 발견되는 인식 서열에 우선적으로 결합하여 이를 절단하는 그의 능력에 대해 스크리닝할 것이다.

[0633] 실시예

[0634] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용 실험을 사용하여, 본원에 기재된 구체적 물질 및 절차에 대한 수많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 실시예에 이어지는 청구범위의 범주에 포괄되는 것으로 의도된다.

[0635] 실시예 1

[0636] 디스트로핀 유전자 내의 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 메가뉴클레아제의 특징화

[0637] 1. DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36, 및 DMD 37-38 인식 서열에 결합하여 이를 절단하는 메가뉴클레아제

[0638] 이들 실험은 디스트로핀 유전자의 절편의 제거를 가능하게 하는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍을 이용하도록 설계되었다. 2개의 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 2개의 위치를 동시에 편집하는 이러한 전략은 다중 엑손, 구체적으로 엑손 45 내지 55의 절제를 가능하게 한다. 일부 경우에, 단일 AAV 벡터 상에서 전달된 2개의 조작된 메가뉴클레아제는 엑손 45의 상류 및 엑손 55의 하류의 인트론 서열; 즉, 유전자의 엑손 45-55에 플랭킹된 인트론에서 이중-가닥 파괴를 만들 수 있다.

[0639] 본원에 기재된 바와 같이, 사용을 위해 선택된 조작된 메가뉴클레아제의 쌍은 동일한 4개의 염기 쌍 중심 서열을 갖는 인식 서열을 절단하도록 설계된다. 그 결과, 조작된 메가뉴클레아제에 의한 절단은 상보적 점착성 단부 (즉, 4개의 염기 쌍, 3' 오버행)를 남길 것이며, 이에 따라 게놈 서열은 50% 초과의 DMD-유발 돌연변이가 발견되는 엑손 45-55의 "핫 스팟"의 절제 후에 완벽하게 라이게이션될 것이다. 이들 엑손의 제거는 유전자로부터 게놈 서열의 500,000개 초과의 염기 쌍의 절제를 발생시키고, 유전자의 리딩 프레임을 야생형 대비 정상으로 되돌리고, 전임상 모델에서 치료상 적절한 것으로 밝혀진 보다 짧은 "베커" 디스트로핀을 생성한다. 도 1은 인식 서열의 대략적인 위치 및 엑손 44와 엑손 56 사이에 생성된 인트론의 라이게이션을 제공한다. 전사 동안 후속 스플라이싱은 엑손 44가 엑손 56과 인 프레임으로 존재하여 단축되었지만 기능적인 디스트로핀 단백질을 생성하는 mRNA 전사체를 제공한다.

[0640] 수백개의 잠재적 쌍의 조작된 메가뉴클레아제를 활성 및 효능에 대해 평가하였다. 이들 중에서, 디스트로핀 유전자 내에서 절단하고 유전 물질의 완벽한 라이게이션을 생성하는 능력에 대해 선택된 수를 추가로 특징화하였다.

[0641] 디스트로핀 유전자의 인트론 내의 DMD 19-20 (서열식별번호: 6), DMD 29-30 (서열식별번호: 8), DMD 35-36 (서열식별번호: 10), 및 DMD 37-38 (서열식별번호: 12) 인식 서열에 결합하여 이를 절단하도록 설계된 조작된 메가뉴클레아제는 본원에서 각각 DMD 19-20 메가뉴클레아제, DMD 29-30 메가뉴클레아제, DMD 35-36 메가뉴클레아제, 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제로 지칭된다. DMD 19-20 인식 서열은 엑손 45의 5' 상류의 인트론에 위치한다. DMD 29-30 인식 서열은 엑손 46의 5' 상류의 인트론에 위치한다. DMD 35-36 및 DMD 37-38 인식 서열 둘 다는 엑손 55의 3' 하류의 인트론에 위치한다.

[0642] 각각의 DMD 조작된 메가뉴클레아제는 SV40으로부터 유래된 N-말단 핵 국재화 신호, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛, 링커 서열, 및 제2 메가뉴클레아제 서브유닛을 포함한다. 각각의 DMD 메가뉴클레아제 내의 제1 서브유닛은 제1 DMD 인식 절반-부위에 결합하는 한편, 제2 서브유닛은 제2 DMD 인식 절반-부위에 결합한다. 예를 들어, DMD 19-20 메가뉴클레아제 내의 제1 서브유닛은 제1 DMD 인식 절반-부위에 결합하는 한편, 제2 서브유닛은 제2 DMD 19-20 인식 절반-부위에 결합한다 (도 1).

[0643] DMD 메가뉴클레아제 서브유닛 각각은 각각 HVR1 및 HVR2로 지칭되는 56개의 염기 쌍 초가변 영역을 포함한다. 각각의 DMD 메가뉴클레아제 결합 서브유닛의 HVR1 영역은 서열식별번호: 36-59의 잔기 24-79로 이루어진다. 각각의 DMD 메가뉴클레아제의 HVR2 영역은 서열식별번호: 36-59의 잔기 215-270으로 이루어진다.

[0644] 2. CHO 세포 리포터 검정에서 DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36 및 DMD 37-38 인식 서열의 절단

[0645] DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36, 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제가 그의 각각의 인간 인식 서열에 결합하여 이를 절단할 수 있는지 결정하기 위해, 각각의 조작된 메가뉴클레아제를 이전에 기재된 CHO 세포 리포터 검정을 사용하여 평가하였다 (WO 2012/167192 및 도 5 참조). 검정을 수행하기 위해, 세포의 게놈 내로 통합되는 비-기능적 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 발현 카세트를 보유하는 CHO 세포 리포터 세포주를 생산하였다. 각각의 세포주 내의 GFP 유전자에는 한 쌍의 인식 서열이 개재되어, 메가뉴클레아제에 의한 어느 하나의 인식 서열의 세포내 절단은 상동 재조합 사건을 자극하여 기능적 GFP 유전자를 생성할 것이다.

[0646] 본 연구를 위해 개발된 CHO 리포터 세포주에서, GFP 유전자 내로 삽입된 하나의 인식 서열은 인간 DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36, 및 DMD 37-38 인식 서열이었다. GFP 유전자 내로 삽입된 제2 인식 서열은 CHO-23/24 인식 서열이었고, 이는 "CHO-23/24"로 불리는 대조군 메가뉴클레아제에 의해 인식되어 절단된다.

[0647] CHO 리포터 세포를 DMD 19-20x.13, DMD 19-20x.87, DMD 19-20L.249, DMD 19-20L.374, DMD 19-20L.375, DMD 19-20L.431, DMD 19-20L.458, DMD 29-30x.18, DMD 29-30x.40, DMD 35-36x.63, DMD 35-36x.81, DMD 35-36L.376, DMD 35-36L.457, DMD 35-36L.469, DMD 37-38x.15, DMD 37-38x.66, DMD 37-38x.79, DMD 37-38L.166, DMD 37-38L.478, DMD 37-38L.512, 및 DMD 37-38L.528 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 형질감염시켰다. CHO 리포터 세포를 또한 CHO-23/24 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 형질감염시켰다. 각각의 검정에서, 리포펙타민(Lipofectamine)® 메신저맥스(MessengerMax) (써모피셔(ThermoFisher))를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 96-웰 플레이트에서 5e4개의 CHO 리포터 세포를 90 ng의 mRNA로 형질감염시켰다. 형질감염된 CHO 세포를 형질감염 2일, 5일, 및 7일 후에 유동 세포측정법에 의해 평가하여, GFP-양성 세포의 백분율을 비형질감염된 음성 대조군과 비교하여 결정하였다. 각각의 시점에서 수득된 데이터를 CHO-23/24 메가뉴클레아제를 사용하여 관찰된 %GFP 양성 세포에 대해 정규화하여 "활성 점수"를 결정하고, 가장 이른 시점으로부터의 정규화된 데이터를 가장 나중 시점의 것으로부터 차감하여 "독성 점수"를 결정하였다. 이어서, 활성 및 독성 점수를 함께 더하여 "활성 지수"를 결정하고, 이어서 이를 CHO-23/24 메가뉴클레아제의 활성 지수에 대해 정규화하여 세포주 사이의 데이터 ("정규화된 활성 지수")를 비교하였다.

[0648] 3. 결과

[0649] 도 6a-6i에 제시된 바와 같이, 각각의 메가뉴클레아제는 각각 그의 각각의 인식 서열에 결합하여 이를 절단할 수 있었다. 각각의 메가뉴클레아제는 양성 대조군 CHO 23-24 메가뉴클레아제만큼 높거나 또는 그보다 높은 수준의 GFP 발현을 제공하였다.

[0650] 4. 결론

[0651] 이들 연구는 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제가 세포에서 그의 각각의 인간 인식 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 6, 8, 10 및 12의 인식 서열)에 효율적으로 결합하여 이를 절단할 수 있다는 것을 입증하였다.

[0652] 실시예 2

[0653] DMD 메가뉴클레아제에 의해 유도된 삽입 및 결실의 특징화

[0654] 1. 방법

[0655] DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제를 각각 MRC5 세포에서 그의 각각의 인식 서열에서 삽입 또는 결실 ("indel")을 생성하는 그의 능력에 대해 평가하였다.

[0656] 이들 실험에서, 1e6 MRC5 세포를 론자 아막사(Lonza Amaxa) 4D 시스템을 사용하여 DMD 메가뉴클레아제 (DMD 19-20x.13, DMD 19-20x.87, DMD 29-30x.18, DMD 29-30x.40, DMD 35-36x.63, DMD 35-36x.81, DMD 37-38x.15,

DMD 37-38x.66, 또는 DMD 37-38x.79)를 코딩하는 2 ng 또는 100 ng mRNA 또는 GFP로 전기천공하였다. gDNA 제조를 위해 전기천공 2일 후에 세포를 수집하고, 베크만 쿨터(Beckman Coulter) 시토플렉스 S 세포측정기를 사용하여 형질감염 효율을 평가하였다. 형질감염 효율은 90%를 초과하였다. gDNA 추출을 위해 전기천공 5- 및 8-일 후의 추가의 시점에 수집하였다. gDNA를 마슈레이 나겔 뉴클레오스핀 블러드 퀵퓨어(Macherey Nagel NucleoSpin Blood QuickPure) 키트를 사용하여 제조하였다.

[0657] 디지털 액적 PCR을 이용하여, DMD 19-20 결합 부위에서 프라이머 P1, F1, 및 R1; DMD 37-38 결합 부위에서 프라이머 P3, F3 & R3; 결합 부위 주위의 앰플리콘을 생성하기 위해 35-36 표적 부위에서 프라이머 P4, F4 및 R4, DMD 29-30 결합 부위에서 프라이머 P5, F5 & R5, 뿐만 아니라 참조 앰플리콘을 생성하기 위해 프라이머 P2, F2, R2를 사용하여 표적 삽입 및 결실의 빈도 (indel%)를 결정하였다. 프로브용 1x ddPCR 수퍼믹스(Supermix) (dUTP 없음, 바이오라드(BioRad)), 250 nM의 각각의 프로브, 900 nM의 각각의 프라이머, 5 U의 HindIII-HF, 및 약 50 ng의 세포 gDNA를 함유하는 20 uL 반응물에서 증폭을 멀티플렉스화하였다. QX100 액적 생성기 (바이오라드)를 사용하여 액적을 생성하였다. 사이클링 조건은 하기와 같았다: 10분 동안 95℃ (2℃/s 경사)의 1 사이클, 30초 동안 94℃ (1℃/s 경사)의 44 사이클, 45초 동안 X℃ (1℃/s 경사) (하기 "X" 표적 부위 어닐링 온도 참조), 2분 동안 72℃ (0.2℃/s 경사), 10분 동안 98℃의 1 사이클, 4℃ 유지. QX200 액적 판독기 (바이오라드)를 사용하여 액적을 분석하고, 퀀타소프트(QuantaSoft) 분석 소프트웨어 (바이오라드)를 사용하여 데이터를 획득하고 분석하였다. 결합 부위 프로브에 대한 양성 카피의 수를 참조 프로브에 대한 양성 카피의 수로 나누고, 뉴클레아제-처리된 세포에서의 FAM+ 카피의 손실을 모의-형질감염된 세포와 비교함으로써 indel 빈도를 계산하였다.

[0658] 사이클링 어닐링 온도: DMD 19-20: 57℃; DMD 35-36 59℃; DMD 37-38 57℃; 및 DMD 29-30 62℃.

[0659] 표 10. 프라이머 및 프로브 세트

부위	프라이머 Seq Id No.	프라이머 서열
프로브 19-20	SEQ ID NO: 133	CGGGAGGTAATACATAATCC
19-20 F1	SEQ ID NO: 134	GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC
19-20 R1	SEQ ID NO: 135	TGGGCTACTGCAACTCTGTT
P2 참조	SEQ ID NO: 136	AGGACAAAAGAGGACGGTCTGCCCTGG
참조 F2	SEQ ID NO: 137	TAAGACCCAGCTTCACGGAG
참조 R2	SEQ ID NO: 138	TATGATCGCCTGTTCCTCCA
P3 37-38	SEQ ID NO: 139	CTGGCCGAAGTATAGGAA
37-38 F3	SEQ ID NO: 140	CGCAACATGTGACATAAAGAG
37-38 R3	SEQ ID NO: 141	TCTGGATATCCTCTTCTGGG
P4 35-36	SEQ ID NO: 142	CCTACATGGTGTATCTGAC
35-36 F4	SEQ ID NO: 143	GAACACCACCAGAAAAACAAG
35-36 R4	SEQ ID NO: 144	CACTTCCTGTAAGACAACCAG
P5 29-30	SEQ ID NO: 145	ATCCCTCATACCCAATC
29-30 F5	SEQ ID NO: 146	AAAAACCACGGTGCTGTTGA
29-30 R5	SEQ ID NO: 147	ATGGGGTCCGAGACTTTTCC

[0660]

[0661] 2. 결과

[0662] DMD 19-20, DMD 29-30, DMD 35-36 및 DMD 37-38 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제를 MRC5 세포주에서 indel을 생성하는 그의 능력에 대해 스크리닝하였다. DMD 19-20x.13 및 DMD 19-20x.87 메가뉴클레아제는 각각 낮은 mRNA 용량에서 indel 활성을 측정가능한 양으로 복귀시켰으며, DMD 19-20x.87 메가뉴클레아제는 이러한 단일 뉴클레아제 검정에서 보다 큰 효력을 나타내었다 (도 7a). DMD 35-36x.63 및 DMD 35-36x.81 메가뉴클레아제는 각각 낮은 mRNA 용량에서 MRC5 세포에서 게놈 편집을 30% 초과로 복귀시켰다 (도 7b). DMD 37-38x.15, DMD 37-38x.66, 및 DMD 37-38x.79 메가뉴클레아제는 낮은 mRNA 용량에서 게놈 편집을 >30%로 복귀시켰고, 시간의 경과에 따라 편집 감소는 없었다 (도 7c). DMD 29-30x.18 메가뉴클레아제는 초기에 높은 % indel을 가졌지만, 이는 제8일에 유의하게 감소되었고, DMD 29-30x.40 메가뉴클레아제는 제8일까지 안정한 보다 낮은 %의 indel을 가졌다 (도 7d).

[0663] 3. 결론

[0664] 이들 실험은 본 발명의 조작된 DMD 메가뉴클레아제가 배양된 세포에서 그의 인식 서열에서 indel을 생성할 수 있으며, 다수는 세포를 저농도의 mRNA로 형질감염시킨 경우에도 시간의 경과에 따라 안정한 높은 빈도의 indel을 생성할 수 있다는 것을 입증하였다.

[0665] 실시예 3

[0666] 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55를 제거하기 위한 메가뉴클레아제 쌍의 특징화

[0667] 1. 방법

[0668] 이들 실험은 DMD 19-20, DMD 35-36, 및 DMD 37-38 인식 서열을 표적화하는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍을 MRC5 세포의 게놈으로부터 디스트로핀 유전자의 엑손 45-55를 절제하는 그의 능력에 대해 평가하였다. 이를 달성하기 위해, MRC5 세포를 DMD 19-20 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제를 코딩하는 별개의 mRNA, 또는 DMD 19-20 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제를 코딩하는 별개의 mRNA로 형질감염시켰다. 시험된 DMD 19-20 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제의 쌍은 하기를 포함하였다: DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.63; DMD 19-20x.87 및 DMD 35-36x.81; DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.81; DMD 19-20x.87 및 DMD 35-36x.63. 시험된 DMD 19-20 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제의 쌍은 하기를 포함하였다: DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15; DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.15; DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.66; DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.66; DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.79; 및 DMD 19-20x.87 및 DMD 37-38x.79. 추가적으로, 이들 실험은 또한 DMD 19-20 및 DMD 29-30 메가뉴클레아제의 쌍을 MRC5 세포의 게놈으로부터 디스트로핀 유전자의 엑손 45만을 절제하는 그의 능력에 대해 평가하였다. 시험된 DMD 19-20 및 DMD 29-30 메가뉴클레아제의 쌍은 하기를 포함하였다: DMD 19-20x.13 및 DMD 29-30x.18; DMD 19-20x.87 및 DMD 29-30x.40; DMD 19-20x.13 및 DMD 29-30x.40; 및 DMD 19-20x.87 및 DMD 29-30x.18.

[0669] 1e6 MRC5 세포를 론자 아막사 4D 시스템을 사용하여 각각의 DMD 메가뉴클레아제를 코딩하는 40 ng mRNA 또는 GFP로 전기천공하였다. gDNA 제조를 위해 전기천공 2일 후에 세포를 수집하고, 베크만 쿨터 시토플렉스 S 세포 측정기를 사용하여 형질감염 효율을 평가하였다. 형질감염 효율은 90%를 초과하였다. gDNA를 마슈레이 나겔 뉴클레오스핀 블러드 퀵퓨어(Macherey Nagel NucleoSpin Blood QuickPure) 키트를 사용하여 제조하였다.

[0670] gDNA를 결실 부위에 걸쳐있는 프라이머 세트로 PCR 증폭시켜 임의의 결실 사건을 증폭시켰다. 하기 표의 하기 PCR 프라이머 세트를 사용하였다:

[0671] 표 11. 프라이머 세트

부위	프라이머 Seq Id No.	프라이머 서열
19-20과 35-36	SEQ ID NO: 148	GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC
	SEQ ID NO: 149	AGAGCATGCCATCTGAGTC
19-20과 35-36	SEQ ID NO: 150	GTGAAGTAGCAAAGCACCTG
	SEQ ID NO: 151	AGAGCATGCCATCTGAGTC
19-20과 29-30	SEQ ID NO: 152	GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC
	SEQ ID NO: 153	TTTGGTATGGGGTCCGAGAC
19-20과 29-30	SEQ ID NO: 154	GTGAAGTAGCAAAGCACCTG
	SEQ ID NO: 155	TTTGGTATGGGGTCCGAGAC
19-20과 37-38	SEQ ID NO: 156	GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC
	SEQ ID NO: 157	GATTCTCAGAAATGGAGTGACTG
19-20과 37-38	SEQ ID NO: 158	GTGAAGTAGCAAAGCACCTG
	SEQ ID NO: 159	GATTCTCAGAAATGGAGTGACTG

[0672]

[0673] Q5 Taq 폴리머라제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 상기 프라이머 및 dNTP (뉴 잉글랜드 바이오랩스)와 함께 사용하여 gDNA를 증폭시켰다. 사이클링 조건은 하기와 같았다: 4분 동안 98℃의 1 사이클, 10초 동안 98℃의 35 사이클, 20초 동안 X℃ (어닐링의 경우 상기 TM 참조), 1.5분 동안 72℃, 2분 동안 72℃의 1 사이클, 4℃ 유지. PCR 생성물을 2% 아가로스 겔 상에서 전개시키고, UV 카메라에 의해 가시화하였다. 나머지 PCR 생성물을 증폭 단계에서 사용된 것과 동일한 프라이머를 사용하여 생어 서열분석에 사용하였다. DNA 서열을 스냅진(SnapGene) 소프트웨어를 사용하여 분석하고, 예상 주형 파일과 비교하였다.

[0674] 디지털 액적 PCR을 이용하여, 19-20 표적 부위 및 29-30, 35-36, 또는 37-38에 대한 상응하는 DMD 뉴클레아제의 접합부에 걸쳐있는 프라이머 쌍 및 프로브를 이용하여 대형 결실의 빈도 (indel%)를 결정하였다. 본 검정은 19-20의 좌측 절반-부위와 29-30, 35-36 또는 37-38 뉴클레아제 부위의 상응하는 우측 절반-부위의 완벽한 라이게이션 사건을 측정한다. 각각의 이중 뉴클레아제 검정에 대해, 프라이머 P2, F2, R2를 사용하는 것과 동일한 실시예 2로부터의 참조 앰플리콘 검정을 포함시켜, 본 발명자들이 뉴클레아제 활성에 의해 영향을 받지 않는 영역에 대한 대형 결실의 비를 정량화하도록 하였다. 요약 개략도는 19-20과 37-38 이중 뉴클레아제 전달에 대한 이러한 검정을 예시하는 도 11에서 찾아볼 수 있다. DMD 19-20 및 DMD 37-38의 완벽한 라이게이션은 프라이머 P6, F6, 및 R6을 이용하였다. DMD 19-20 및 DMD 35-36의 완벽한 라이게이션은 프라이머 P7, F7 및 R7을 이용하였다. DMD 19-20과 29-30의 완벽한 라이게이션은 프라이머 및 프로브 P8, F8 및 R8을 이용하였다. 프로브용 1x ddPCR 수퍼믹스 (dUTP 없음, 바이오라드), 250 nM의 각각의 프로브, 900 nM의 각각의 프라이머, 5 U의

HindIII-HF, 및 약 50 ng의 세포 gDNA를 함유하는 20uL 반응물에서 증폭을 멀티플렉스화하였다. QX100 액적 생성기 (바이오라드)를 사용하여 액적을 생성하였다. 사이클링 조건은 하기와 같았다: 10분 동안 95℃ (2℃/s 경사)의 1 사이클, 30초 동안 94℃ (1℃/s 경사)의 44 사이클, 45초 동안 X℃ (1℃/s 경사) (하기 표적 부위에 따른 어닐링 온도 참조), 2분 동안 72℃ (0.2℃/s 경사), 10분 동안 98℃의 1 사이클, 4℃ 유지. QX200 액적 판독기 (바이오라드)를 사용하여 액적을 분석하고, 퀀타소프트(QuantaSoft) 분석 소프트웨어 (바이오라드)를 사용하여 데이터를 획득하고 분석하였다. 결합 부위 프로브에 대한 양성 카피의 수를 참조 프로브에 대한 양성 카피의 수로 나누고, 뉴클레아제-처리된 세포에서의 FAM+ 카피의 손실을 모의-형질감염된 세포와 비교함으로써 indel 빈도를 계산하였다.

[0675] 사이클링 어닐링 온도: DMD 19-20 - DMD 37-38은 53℃, DMD19-20 - DMD 37-38은 59℃, 및 DMD 19-20 - DMD 29-30은 55℃.

[0676] 표 12. 프라이머 및 프로브 세트

[0677]

부위	프라이머 Seq ID NO.	프라이머 서열
P6 19/38	SEQ ID NO: 160	ATCAGAAGGATTATGTATAGGAATA
19-20 F6	SEQ ID NO: 161	GGGTGGGTTGCTTTACCTCT
37-38 R6	SEQ ID NO: 162	TCTGGATATCCTCTTCTGGG
P7 19/36	SEQ ID NO: 163	GTGAAGTAGCAAAGCACCTG
19-20 F7	SEQ ID NO: 164	GTGAAGTAGCAAAGCACCTG
35-36 R7	SEQ ID NO: 165	AGTCACTTCCTAAGCTAAGACAACC
P8 19/30	SEQ ID NO: 166	CAGAAGGATTATGTATGAGGGATA
19-20 F8	SEQ ID NO: 167	GTGAAGTAGCAAAGCACCTG
29-30 R8	SEQ ID NO: 168	ATGGGGTCCGAGACTTTTCC

[0678] 2. 결과

[0679] 정확한 크기의 PCR 생성물을 19-20과 35-36 증폭에 대해 가시화하였고 (도 8a), 상응하는 서열 데이터는 19-20 / 35-36 뉴클레아제 결합 부위 사이의 완벽한 라이게이션을 보여주었다 (도 8b). 정확한 크기의 PCR 생성물을 또한 19-20과 37-38 증폭에 대해 가시화하였고 (도 9a), 상응하는 서열 데이터는 19-20 / 37-38 뉴클레아제 결합 부위 사이의 완벽한 라이게이션을 보여주었다 (도 9b). 또한, 정확한 크기의 PCR 생성물을 19-20과 29-30 증폭에 대해 가시화하였다 (도 10).

[0680] 모든 3가지의 결실 사건에 대한 디지털 액적 PCR (ddPCR) 검정은 19-20 인식 서열과 29-30, 35-36, 또는 37-38로부터의 상응하는 서열 사이의 완벽한 라이게이션을 깨끗한 모의 반응으로 측정하는 데 성공적이었다. DMD 19-20과 DMD 35-36에 대한 완벽한 라이게이션은 결실 및 라이게이션 사건이 6 내지 12% 범위임을 정량화하였다 (도 12a). DMD 19-20과 DMD 37-38에 대한 완벽한 라이게이션은 결실 및 라이게이션 사건이 9 내지 17.9% 범위임을 정량화하였고 (도 12b), DMD 19-20과 DMD 29-30에 대한 완벽한 라이게이션은 결실 및 라이게이션 사건이 1 내지 3% 범위임을 정량화하였다 (도 12c).

[0681] 3. 결론

[0682] 이들 결과는 다중 DMD 질환-연관 돌연변이와 연관된 핫 스팟 엑손의 제거와 함께 이중 편집에 대한 시험관내 개념 증명을 제공한다. 이들 편집 사건은 17.9%만큼 높은 것으로 측정되었다. 그러나, 이들 편집의 빈도, 및 엑손 45 단독 또는 엑손 45-55의 제거는 과소추정된 것으로, 이는 이러한 검정이 표적 부위에서 부차적 indel을 생성하는 라이게이션과는 대조적으로 완벽한 라이게이션 사건만을 고르기 때문이다. 또한, 이는 다중의 상이한 조작된 메가뉴클레아제 및 표적 부위로 다양한 성공 수준으로 달성될 수 있는 것으로 나타났다 (도 13). 예상외로, 이들 데이터는 DMD 19-20 및 DMD 29-30 메가뉴클레아제 쌍형성에 의한 단일 엑손 45의 제거와 비교하여, DMD 19-20 및 DMD 35-36/DMD 37-38 메가뉴클레아제 쌍형성에 의한 엑손 45-55 및 500,000 bp 초과의 유전자 서열의 제거의 경우에 완벽한 라이게이션의 백분율이 유의하게 더 높다는 것을 보여주었다 (도 12c 및 도 13).

[0683] 실시예 4

[0684] 1차 인간 골격근 근모세포에서 엑손 45-55의 제거 후 디스트로핀 유전자에서의 완벽한 라이게이션 사건의 분석

[0685] 1. 방법

[0686] 이들 실험에서, DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제의 편집 능력을 인간 골격근 근모세포, 인간 1차 근육 세포에서 평가하였다. 인간 골격근 근모세포를 론자 (HSMM CC-2580)로부터 구입하였다. 세포를 해동시키고, 골격근 세포 성장 배지-2 (SkGM-2) 중에 3500개 세포/cm^2로 시딩하고, 전기천공까지 70% 이

하의 전면생장률로 유지시켰다. 1e6개의 세포로 형질감염을 수행하였다. 세포를 론자 아막사 4D 시스템을 사용하여 각각의 DMD 메가뉴클레아제를 쌍 (DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 쌍)으로 코딩하는 mRNA 20, 40, 80 또는 160 ng 또는 GFP로 전기천공하였다. 전기천공 후에 세포를 6 웰 플레이트의 개별 웰 내의 성장 배지 중에 시딩하였다. 전기천공 1일 후, 분화시킬 세포는 2% 말 혈청을 함유하는 DMEMF12 (써모)로 교체한 한편, 미분화로 유지시킬 세포는 성장 배지 중에 유지시켰다. 세포를 DNA 및 단백질 추출 gDNA 단리를 위해 전기천공 2- 및 8-일 후에 수거하고, 디지털 액적 PCR을 이용하여 상기 실시예 3에 명시된 바와 같이 DMD 19-20 - DMD 37-38 완벽한 라이게이션에 대한 대형 결실 (indel%)의 빈도를 결정하였다.

[0687] 2. 결과

[0688] HSMM 세포주에서 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제 mRNA의 양이 증가함에 따라 대형 결실 / 완벽한 라이게이션에서 용량-의존성 증가가 관찰되었다 (도 14). 엑손 45-55의 절제 후의 완벽한 라이게이션은 저용량 내지 고용량 mRNA에 대해 14% 내지 27% 범위였다.

[0689] 3. 결론

[0690] 이중 전달 대형 결실의 이전 결과는 인간 MRC5 세포주에서 수행되었다. 대조적으로, 본 실험은 관련 근육 세포주에서 "핫 스팟" 영역을 함유하는 엑손을 절제하는 데 필요한 인식 부위에서 게놈을 편집하는 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제의 능력을 측정하였다. DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열을 표적화하는 증가하는 양의 조작된 메가뉴클레아제 mRNA는 500,000 bp 초과의 단편을 절제할 수 있었고, 디지털 액적 PCR에 의해 정량화된 바와 같이 최대 27%의 빈도로 유전자를 함께 다시 완벽하게 라이게이션시킬 수 있었다. 이들 데이터는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍을 사용한 대규모 편집 / 결실의 시험관내 개념 증명을 지지한다.

[0691] 실시예 5

[0692] DMD 환자로부터 단리된 불멸화 세포주에서 DMD 메가뉴클레아제의 쌍의 양을 증가시킨 후 시험관내 디스트로핀의 대형 결실 및 복원의 분석

[0693] 1. 방법

[0694] DMD 19-20 및 DMD 37-38 뉴클레아제의 쌍을 DMD 환자 세포주 AB1098에서 추가로 평가하였다. DMD 환자 근모세포 세포주를 근학 연구 센터 (소르본느 대학교(Sorbonne University))로부터 입수하였다. 이러한 세포주를 엑손 48-50이 결실된 환자의 척수근으로부터 불멸화하였고, 이는 결실된 엑손으로 인해 디스트로핀 단백질이 결핍된다.

[0695] 세포를 3000개 세포/cm^2로 시딩하고, 프로모셀(Promocell) 근육 성장 배지 (프로모셀)에서 성장시켰다. P5 전기천공 용액 (론자) 중 1e6개의 세포로 형질감염을 수행하였고, 론자 4D-뉴클레오펙터 X 유닛을 사용하여 EY100 프로그램으로 형질감염시켰다. 뉴클레아제 mRNA 용량은 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 메가뉴클레아제 각각에 대해 10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 또는 160 ng이었다. 전기천공 후에 세포를 6 웰 플레이트의 개별 웰 내의 성장 배지 중에 시딩하였다. 전기천공 1일 후, 분화시킬 세포는 DMEM (써모) 10ug/ml 인슐린, 및 50ug/ml 겐타마이신으로 교체한 한편, 미분화로 유지시킬 세포는 성장 배지 중에 유지시켰다. 세포를 DNA 및 단백질 추출을 위해 전기천공 2- 및 8-일 후에 수거하였다. gDNA 단리 및 디지털 액적 PCR을 이용하여 상기 실시예 3에 명시된 바와 같이 DMD 19-20 - DMD 37-38 완벽한 라이게이션에 대해 대형 결실의 빈도 (indel%)를 결정하였다. 단백질 추출을 위해, TrypLE를 사용하여 플레이트로부터 세포를 수거하고, 펠릿화한 다음, PBS로 헹구고, 프로테아제 억제제 (밀리포어(Millipore))를 함유하는 1xRIPA 완충제로 용해시켰다. BCA 검정 (써모)에 의해 단백질 농도를 결정하였다. WES (프로테인 심플(Protein simple))에 의한 분석을 위해, 용해물을 250ng/ul로 정규화하고, 표준 프로그램을 사용하여 66-440kDa 모듈 상에서 실행시켰다. 디스트로핀의 검출에 사용된 1차 항체는 1:1000의 ab154168이었다. 1차 항체 대 빈쿨린 (압캠(Abcam))을 로딩 대조군으로서 사용하였다 (1:200).

[0696] 2. 결과

[0697] 이러한 DMD 환자 세포주에서 DMD 19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 양이 증가함에 따라 대형 결실 / 완벽한 라이게이션에서 용량 의존성 증가가 관찰되었다. 완벽한 라이게이션은 4% 내지 29% (저용량 내지 고용량 mRNA) 범위였다 (도 15).

[0698] 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질의 발현을 WES 자동화 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정하였다. 최고 용량 160 ng (라인 F), 80 ng (라인 E), 40 ng (라인 D), 20 ng (라인 C),

10 ng (라인 B) 및 모의 (라인 A)에 의해, 변형된 디스트로핀의 양의 용량 의존성 증가가 WES 색도 판독에서 관찰되었다 (도 16a). WES 시스템은 생성된 색도 데이터를 보다 전통적인 웨스턴 블롯 도면으로 전환시켰고, 판독을 이중으로 하였다. 모의 비처리된 AB1098 세포에서는 디스트로핀이 검출되지 않았고, 용량 범위에 걸쳐 디스트로핀에 대한 밴드의 강도가 증가하였다 (도 16b). 디스트로핀 복원을 로딩 대조군 빈쿨린 단백질에 대해 정규화하고, 단백질 복원의 양을 로딩에 대비하여 계산하였다 (도 16c). 디스트로핀은 모의에서 측정되지 않았지만, 용량 곡선에 걸쳐 디스트로핀의 7-배 증가가 관찰되었다.

[0699] 3. 결론

[0700] 이들 실험은 디스트로핀 유전자에서 엑손 48 내지 50이 누락된 환자로부터 단리된 세포주에서 엑손 45 내지 55의 대형 결실을 보고한다. 이러한 세포주는 검출가능한 수준의 디스트로핀을 발현하지 않고, DMD 질환에 대한 우수한 시험관내 모델이다. 도 16의 WES 단백질 데이터는 단축 변형된 디스트로핀 단백질의 복원된 발현을 보여주며, 비처리된 모의 세포에서는 모든 조작된 메가뉴클레아제 용량 범위에 걸쳐 검출가능한 수준의 단백질 발현이 없다. 이는 엑손 45-55를 절제하고 디스트로핀 유전자를 베커 디스트로핀 표현형으로 전환시킴으로써 DMD 환자를 치료할 목적으로 이중 조작된 메가뉴클레아제를 사용하는 것의 추가의 확인 및 시험관내 개념 증명이다.

[0701] 실시예 6

[0702] RNA 스플라이스 메시지의 분석

[0703] 1. 방법

[0704] 본 연구는 환자 세포주 AB1098에서 DMD 19-20 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제의 쌍을 특징화하여 메가뉴클레아제 전달 후의 RNA 스플라이스 메시지를 검토하였다.

[0705] 세포를 실시예 5에 기재된 바와 같이 배양하고 전기천공하였다. 뉴클레아제 mRNA 용량의 용량은 각각의 메가뉴클레아제 (DMD 19-20L.249 및 DMD 37-36L.166)에 대해 10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 또는 160 ng이었다. 페놀 클로로포름 및 퓨어링크(Purelink) RNA 미니 키트 (써모)를 사용한 RNA 추출을 위해 세포를 제8일에 수거하였다. RNA 단리 후에, iSCRIPT cDNA 합성 키트 (바이오-라드)를 사용하여 cDNA 합성을 수행하고, ddPCR을 이용하여 엑손 44 내지 엑손 56의 스플라이싱의 빈도를 결정하였다. 처리된 세포의 디스트로핀 스플라이스 메시지를 써모 피셔로부터 구입한 유전자, 안키린 반복 도메인 함유 단백질 27 (ANKRD27)에 대한 참조 메시지 검정 (검정 # Hs01047624_g1)에 대해 정규화하였다.

[0706] CDNA 합성 조건: 25℃에서 5분 동안 프라이밍, 46℃에서 20분 동안 RT 및 95℃에서 1분 동안 불활성화. 10분 동안 95℃에서 ddPCR 사이클링 후, 95℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 1분의 45 사이클 및 98℃ 10분의 최종 불활성화.

[0707] 표 13. 프라이머 및 프로브 세트

[0708]

부위	프라이머 Seq Id No.	프라이머 서열
95 DMD 스플라이스 RNA For2	SEQ ID NO: 184	GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA
98 DMD RNA 스플라이스 Rev 2	SEQ ID NO: 185	GGCTGTTTTCATCCAGGTTGTG
96 DMD 4456 RNA 스플라이스 PB	SEQ ID NO: 186	TCTTAAGGACCTCCAAGG

[0709] 2. 결과

[0710] 환자 세포주에서 DMD19-20L.249 및 DMD 37-38L.166 조작된 메가뉴클레아제 mRNA의 양이 증가함에 따라 엑손 44 내지 엑손 56 스플라이스 메시지에서 용량-의존성 증가가 관찰되었다. 스플라이스 메시지 대 참조 유전자 메시지 비는 모의에서의 0.01% 내지 고용량 mRNA에서의 9.51% 범위였다 (도 17).

[0711] 3. 결론

[0712] 이들 실험은 DMD 환자로부터 단리된 세포주에서 디스트로핀 RNA 메시지의 엑손 45 내지 55의 대형 결실을 입증하였다. 이러한 세포주는 검출가능한 수준의 디스트로핀을 발현하지 않고, DMD 질환에 대한 우수한 시험관내 모델이다. 도 17의 스플라이스 메시지 데이터는 엑손 45 내지 55의 표적화된 결실을 보여준다. 이는 엑손 45-55를 절제하고 "베커" 디스트로핀 표현형을 복원함으로써 DMD 환자를 치료할 목적으로 이중 조작된 메가뉴클레아제 전략을 사용하는 것의 추가의 확인 및 시험관내 개념 증명이다.

[0713] 실시예 7

[0714] 1차 인간 골격근 근모세포에서 엑손 45-55의 제거 후 디스트로핀 유전자에서의 완벽한 라이게이션 사건의 분석

[0715] 1. 방법

[0716] 이들 실험은 실시예 4에 기재된 바와 같이 인간 골격근 근모세포, 인간 1차 근육 세포에서 디스트로핀 유전자의 엑손 45 내지 55를 절제하는 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제의 능력을 평가하였다. 세포를 해동시키고, 골격근 세포 성장 배지-2 (SkGM-2) 중에 3500개 세포/cm^2로 시딩하고, 전기천공까지 70% 이하의 전면생장률로 유지시켰다. 1e6개의 세포로 형질감염을 수행하였다. 세포를 론자 아막사 4D 시스템을 사용하여 각각의 DMD 메가뉴클레아제를 쌍으로 (DMD 19-20x.13 및 DMD 35-36x.63; DMD 19-20L.249 및 DMD 35-36L.195; DMD 19-20L.302 및 DMD 35-36L.282; DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.282; DMD 19-20L.302 및 DMD 35-36L.349; 또는 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349) 코딩하는 40 ng mRNA 또는 GFP로 전기천공하였다. 전기천공 후에 세포를 6 웰 플레이트의 개별 웰 내의 성장 배지 중에 시딩하였다. DNA를 위해 전기천공 2일 후에 세포를 수거하였다. gDNA 단리 및 디지털 액적 PCR을 이용하여 상기 실시예 3에 명시된 바와 같이 DMD 19-20 - DMD 35-36 완벽한 라이게이션에 대해 대형 결실의 빈도 (indel%)를 결정하였다.

[0717] 2. 결과

[0718] 도 18에 제시된 바와 같이, 조작된 메가뉴클레아제의 각각의 쌍은 이러한 1차 근모세포 세포주에서 엑손 45-55의 결실 및 디스트로핀 유전자의 완벽한 라이게이션을 입증하였다.

[0719] 3. 결론

[0720] 이들 결과는 디스트로핀 유전자 내의 DMD 19-20 및 DMD 35-36 인식 서열을 표적화하는 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제의 쌍이 디스트로핀 유전자로부터 엑손 45-55를 절제하고, 후속적으로 디스트로핀 유전자의 완벽한 라이게이션을 유도할 수 있다는 것을 추가로 입증한다. 이들 데이터는 실시예 4에 제공된 데이터와 일치하고, 조작된 메가뉴클레아제를 사용한 대규모 편집 및 결실의 시험관내 개념 증명을 추가로 지지한다.

[0721] 실시예 8

[0722] 추가의 DMD 19-20 메가뉴클레아제의 생성

[0723] 1. 방법

[0724] 메가뉴클레아제 효력 및 특이성을 증가시키기 위해 3회의 개발 라운드 후에 추가의 DMD 19-20 메가뉴클레아제를 생성하였다. 메가뉴클레아제 특이성을 올리고캡처 검정을 사용하여 측정하였다. 이는 게놈 내의 DSB에서의 합성 올리고뉴클레오티드 (올리고) 카세트의 통합에 의존하는 세포-기반 시험관내 검정이다. 올리고를 앵커로서 사용하여, 통합 부위의 어느 한 측면에 대한 게놈 DNA를 증폭시키고, 서열분석하고, 맵핑할 수 있다 (도 19). 이는 뉴클레아제의 잠재적 오프-타겟 편집 부위의 최소로 편향된 평가를 가능하게 한다. 이 기술은 GuideSeq (Tsai et al., (2015) Nat. Biotech. 33:187-97)로부터 민감도를 증가시키고 메가뉴클레아제에 의해 유도된 3' 상보적 오버행을 수용하기 위한 특이적 변형에 의해 적합화되었다. 올리고캡처 분석 소프트웨어는 서열을 불문한다. 즉, 뉴클레아제가 컷팅할 수 있는 DNA 서열에 관한 선험적 가정이 없다. 올리고캡처 검정에서, 세포를 뉴클레아제 mRNA 및 이중-가닥 DNA 올리고뉴클레오티드로 형질감염시킨다. 2일 후, 세포 게놈 DNA를 단리하고, 보다 작은 크기로 전단하였다. 올리고뉴클레오티드 어댑터를 전단된 DNA에 라이게이션하고, 폴리머라제 연쇄반응을 사용하여 하나의 단부에 어댑터 및 다른 단부에 포획된 올리고뉴클레오티드를 함유하는 임의의 DNA 조각을 증폭시켰다. 증폭된 DNA를 정제하고, 서열분석 라이브러리를 제조하고 서열분석하였다. 데이터를 필터링하고, 올리고뉴클레오티드를 포획한 유효한 부위에 대해 분석하여 잠재적 오프-타겟 부위를 확인하였다. 서열 판독물을 참조 게놈에 대해 정렬하고, 천개의-염기 쌍 윈도우 내의 그룹화된 서열을 잠재적 메가뉴클레아제 절단 부위에 대해 스캐닝하였다. HEK293 세포를 각각의 최적화 라운드 (라운드 1-3)에서 다중 DMD19-20 뉴클레아제에 대한 mRNA로 형질감염시키고, gDNA를 단리하고, 검정 설명에 상기 기재된 바와 같이 프로세싱하였다.

[0725] 2. 결과

[0726] 도 20에 제시된 바와 같이, HEK293 세포에서 각각의 DMD 19-20 메가뉴클레아제에 의해 생성된 각각의 오프-타겟 부위는 그러한 부위에서 포획되는 프로브 올리고에 대한 고유한 서열 판독물의 수에 기초하여 플롯팅되며, 좌측의 도트 클러스터는 낮은 판독물 카운트를 나타내고 우측을 향한 도트는 높은 판독물 카운트를 나타낸다. DMD 19-20 메가뉴클레아제의 특이성은 그래프의 중앙 영역에서 얼마나 많은 중간 부위가 발견되는지 및 그의 판독물

카운트가 얼마나 낮은지에 의해 판단될 수 있다. 보다 적은 도트는 전체적으로 보다 적은 검출된 잠재적 오프-타겟 부위와 상관관계가 있고, 좌측에 보다 가까운 도트는 보다 낮은 판독물 카운트 및 이것이 진정한 오프-타겟이라는 보다 적은 신뢰와 상관관계가 있다. 의도된 DMD 표적 부위는 가장 높은 판독물 카운트를 가져야 하며, 이는 원형 내의 DMD 19-20 메가뉴클레아제 도트에 포함시키기 위해 선택된 둘 다의 뉴클레아제에 대한 경우이고; 이는 또한 보다 어두운 청색 스팟에 의해 제시된 표적 부위 서열과 비교하여 보다 적은 서열 미스매치에 상응한다.

[0727] 3. 결론

[0728] 19-20 표적 부위에 대한 메가뉴클레아제 특이성은 3회의 개발 라운드에 걸쳐 증가하였다. 이들 메가뉴클레아제는 표적화된 오프-타겟을 특징화한 것을 정당화하는 특이성 프로파일을 가졌다.

[0729] 실시예 9

[0730] 추가의 DMD 35-36 메가뉴클레아제의 생성

[0731] 1. 방법

[0732] 메가뉴클레아제 효력 및 특이성을 증가시키기 위해 3회의 개발 라운드 후에 추가의 DMD 35-36 메가뉴클레아제를 생성하였다. 뉴클레아제 특이성을 실시예 8에 기재된 바와 같이 올리고캡처 검정을 사용하여 측정하였다.

[0733] 2. 결과

[0734] 도 21에 제시된 바와 같이, HEK293 세포에서 각각의 DMD 35-36 메가뉴클레아제에 의해 생성된 각각의 오프-타겟 부위는 그러한 부위에서 포획되는 프로브 올리고에 대한 고유한 서열 판독물의 수에 기초하여 플롯팅되며, 좌측의 도트 클러스터는 낮은 판독물 카운트를 나타내고 우측을 향한 도트는 높은 판독물 카운트를 나타낸다. DMD 35-36 메가뉴클레아제의 특이성은 그래프의 중앙 영역에서 얼마나 많은 중간 부위가 발견되는지 및 그의 판독물 카운트가 얼마나 낮은지에 의해 판단될 수 있다. 보다 적은 도트는 전체적으로 보다 적은 검출된 잠재적 오프-타겟 부위와 상관관계가 있고, 좌측에 보다 가까운 도트는 보다 낮은 판독물 카운트 및 이것이 진정한 오프-타겟이라는 보다 적은 신뢰와 상관관계가 있다. 의도된 DMD 표적 부위는 가장 높은 판독물 카운트를 가져야 하며, 이는 원형 내의 DMD35-36 메가뉴클레아제 도트에 포함시키기 위해 선택된 둘 다의 뉴클레아제에 대한 경우이고 이는 또한 보다 어두운 청색 스팟에 의해 제시된 표적 부위 서열과 비교하여 보다 적은 서열 미스매치에 상응한다.

[0735] 3. 결론

[0736] 35-36 표적 부위에 대한 메가뉴클레아제 특이성은 3회의 개발 라운드에 걸쳐 증가하였다. 이들 생성된 메가뉴클레아제는 표적화된 오프-타겟을 특징화한 것을 정당화하는 특이성 프로파일을 가졌다.

[0737] 실시예 10

[0738] DMD 메가뉴클레아제의 쌍을 사용한 DMD 환자 세포주에서의 디스트로핀 유전자의 편집

[0739] 1. 방법

[0740] 개선된 DMD 19-20, DMD 35-36 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제의 쌍을 DMD 환자 세포주 AB1098에서 추가로 평가하였다. DMD 환자 근모세포 세포주를 근학 연구 센터 (소르본느 대학교)로부터 입수하였다. 이러한 세포주를 엑손 48-50이 결실된 환자의 척수근으로부터 불멸화하였고, 이는 결실된 엑손으로 인해 디스트로핀 단백질이 결핍된다. 세포를 하기 표 14에 제시된 바와 같이 DMD 19-20 및 DMD 35-36 또는 DMD 19-20 및 DMD 37-38 인식 서열을 표적화하는 조작된 메가뉴클레아제의 쌍으로 형질도입하였다.

[0741] 표 14. 조작된 메가뉴클레아제의 쌍

EP	19-20 / 35-36 쌍
1	19-20 L.374/ 35-36 L.376
2	19-20 L.374/ 35-36 L.457
3	19-20 L.374/ 35-36 L.469
4	19-20 L.375/ 35-36 L.376
5	19-20 L.375/ 35-36 L.457
6	19-20 L.375/ 35-36 L.469
7	19-20 L.431/ 35-36 L.376
8	19-20 L.431/ 35-36 L.457
9	19-20 L.431/ 35-36 L.469
10	19-20 L.458/ 35-36 L.376
11	19-20 L.458/ 35-36 L.457
12	19-20 L.458/ 35-36 L.469
13	모의
14	19-20 L.374/ 37-38 L.478
15	19-20 L.374/ 37-38 L.512
16	19-20 L.374/ 37-38 L.528
17	19-20 L.375/ 37-38 L.528
18	19-20 L.375/ 37-38 L.528
19	19-20 L.375/ 37-38 L.528
20	19-20 L.431/ 37-38 L.528
21	19-20 L.431/ 37-38 L.528
22	19-20 L.431/ 37-38 L.528

[0742]

[0743] 세포를 3000개 세포/cm^2로 시딩하고, 프로모셀 근육 성장 배지 (프로모셀)에서 성장시켰다. P5 전기천공 용액 (론자) 중 1e6개의 세포로 형질감염을 수행하였고, 론자 4D-뉴클레오펙터 X 유닛을 사용하여 EY100 프로그램으로 형질감염시켰다. 메가뉴클레아제 mRNA 용량은 DMD 19-20, DMD 35-36, 및 DMD 37-38 메가뉴클레아제 각각에 대해 40 ng이었다. 전기천공 후에 세포를 6 웰 플레이트의 개별 웰 내의 성장 배지 중에 시딩하였다. 전기천공 1일 후, 분화시킬 세포는 DMEM (써모) 10 ug/ml 인슐린, 및 50 ug/ml 겐타마이신으로 교체한 한편, 미분화로 유지시킬 세포는 성장 배지 중에 유지시켰다. 세포를 DNA 및 단백질 추출을 위해 전기천공 2- 및 8-일 후에 수거하였다. gDNA를 단리하고, 디지털 액적 PCR을 이용하여 DMD 19-20 - DMD 35-36 및 DMD 19-20 - DMD 37-38 메가뉴클레아제에 대해 대형 결실의 빈도 (indel%)를 결정하였다. 총 라이게이션을 측정하기 위해 PCR 프라이머 및 프로브를 스위칭하여, 실시예 2에 기재된 바와 같이 시약, 사이클링 조건 및 참조 검정을 수행하였다. 본 ddPCR 검정은 19-20 결합 부위의 5' 정방향 프라이머 및 35-36 부위 또는 37-38 부위에 대한 3' 역방향 프라이머 및 라이게이션된 19-20/35-36 부위 또는 19-20/37-38 부위의 5'에 서열 51 염기 쌍에 특이적인 프로브를 사용하였다 (하기 표 15 참조). 각각의 이중 메가뉴클레아제 검정에 대해, 실시예 2로부터의 동일한 참조 앰플리콘 검정을 포함시켜, 메가뉴클레아제의 쌍에 의해 영향을 받지 않는 영역에 대한 대형 결실의 비의 정량화를 가능하게 하였다 (하기 표 15 참조).

[0744] 단백질 추출을 위해, TrypLE를 사용하여 플레이트로부터 세포를 수거하고, 펠릿화한 다음, PBS로 헹구고, 프로테아제 억제제 (밀리포어)를 함유하는 1xRIPA 완충제로 용해시켰다. BCA 검정 (써모)에 의해 단백질 농도를 결정하였다. WES (프로테인 심플)에 의한 분석을 위해, 용해물을 250ng/ul로 정규화하고, 표준 프로그램을 사용하여 66-440kDa 모듈 상에서 실행시켰다. 디스트로핀의 검출에 사용된 1차 항체는 1:50 만디S10(mandyS10)이었다. 1차 항체 대 빈쿨린 (압캠)을 로딩 대조군으로서 사용하였다 (1:100).

[0745] 표 15. 총 라이게이션 결정을 위한 ddPCR 검정에 사용된 프라이머

프라이머 명칭	프라이머 서열	SEQ ID NO.
143 DMDligfor4	GGGTGGGTTGCTTTACCTCTCTAG	SEQ ID NO: 187
145 DMD1936REV	TCACATCATGAGATTTAGTCACTTCC	SEQ ID NO: 188
141 DMD 38 revers2	GCTATCTGGATATCCTCTTCTGGG	SEQ ID NO: 193
134 DMDimpLIG 프로브	TTGCTACTTCACAGTAACCACATGG	SEQ ID NO: 189
P2 참조	AGGACAAAAGAGGACGGTCTGCCCTGG	SEQ ID NO: 136
참조 F2	TAAGACCCAGCTTCACGGAG	SEQ ID NO: 137
참조 R2	TATGATCGCCTGTTCCTCCA	SEQ ID NO: 138

[0746]

[0747] 2. 결과

[0748] 이러한 DMD 환자 세포주에서 DMD 19-20 및 DMD 35-36 또는 DMD 19-20 및 DMD 37-38 조작된 메가뉴클레아제의 상이한 쌍형성에 의해 다양한 수준의 대형 결실 / 총 라이게이션이 관찰되었다 (도 22 및 도 24a). 총 라이게이션은 DMD 19-20 및 DMD 35-36 쌍형성에 의하면 8% 내지 22.7% 범위였고 (도 22), DMD 19-20 및 DMD 37-38 쌍형성에 의하면 1% 약간 초과 내지 12% 범위였다 (도 24a).

[0749] 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질의 발현을 WES에 의해 측정하였다. WES 시스템은 생성된 색도 데이터를 보다 전통적인 웨스턴 블롯 도면으로 전환시켰고, 판독을 이중으로 하였다. 모의 비처리된 AB1098 세포에서 디스트로핀은 검출되지 않았다. DMD 19-20 및 DMD 35-36 조작된 메가뉴클레아제 쌍 각각에 대해서는 단축 변형된 디스트로핀이 검출되었다 (도 23a). 단축 변형된 디스트로핀 복원을 로딩 대조군 빈쿨린 단백질에 대해 정규화하고, 단백질 복원의 양을 로딩에 대비하여 계산하였다 (도 23b). 유사하게, 단축 변형된 디스트로핀이 DMD 19-20 및 DMD 37-38 조작된 메가뉴클레아제의 쌍형성에 의해 처리된 세포에 대해 검출되었고, 그러한 조직으로부터 생성된 표준 곡선에 기초하여 hDMD 마우스 사두근 근육으로부터의 용해물의 동등한 로드 (500 ng)의 상대 발현 수준과 비교하였다 (도 24b). 디스트로핀은 모의에서는 측정되지 않은 반면에, 단축 변형된 디스트로핀이 각각의 메가뉴클레아제 쌍에서 검출되었다.

[0750] 3. 결론

[0751] 이들 실험은 디스트로핀 유전자에서 엑손 48 내지 50이 누락된 환자로부터 단리된 세포주에서 엑손 45 내지 55의 대형 결실을 보고한다. 이러한 세포주는 검출가능한 수준의 디스트로핀을 발현하지 않고, DMD 질환에 대한 우수한 시험관내 모델이다. WES 단백질 데이터 (도 23a) 및 도 23b 및 24b의 정량화는 단축 변형된 디스트로핀 단백질의 복원된 발현을 보여주며, 비처리된 모의 세포에서는 모든 조작된 메가뉴클레아제 용량 범위에 걸쳐 검출가능한 수준의 단백질 발현이 없다. 이러한 단백질 정량화는 엑손 45-55를 절제하고 디스트로핀 유전자를 베커 디스트로핀 표현형으로 전환시킴으로써 DMD 환자를 치료할 목적으로 이중 조작된 메가뉴클레아제를 사용하는 것의 추가의 확인 및 시험관내 개념 증명이다.

[0752] 실시예 11

[0753] hDMD 마우스 연구 (TD066)에서의 생체내 디스트로핀 유전자의 편집

[0754] 1. 방법

[0755] DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 쌍의 전달에 의해 유도된 생체내 편집 및 인간 디스트로핀 단백질 복원을 조사하기 위해 hDMD 마우스에서 생체내 연구를 수행하였다. 마우스를 AAV9로 캡슐화된 3개의 상이한 구축물 ($1x10^{14}$ VG/kg)로 안와후 전신 주사에 의해 주사하였다. 제1 AAV는 5'에서 3'으로, A17-120 인핸서, 근육-특이적 프로모터 MHCK7, SV40 인트론 서열, DMD 19-20x.13 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG

P2A 절단 서열, DMD37-38x.15 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. 추가적으로, 2개의 AAV9 구축물을 2-카세트 접근법을 사용하여 조사하였으며, 여기서 각각의 뉴클레아제는 개별 근육 특이적 프로모터로부터 구동된다. 각각의 바이러스 게놈은 5' 단부의 ITR 바로 다음의 CK8 또는 MHCK7 근육 특이적 프로모터, 이어서 HBA2 5'UTR, DMD 19-20x.13 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, SV40 폴리아데닐화 신호, 이어서 근육 특이적 프로모터 SPc5-12, XBG 5' UTR 서열, DMD 37-38x.15 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, XBG 3' UTR 서열 및 BgH 폴리아데닐화 신호로 구성되었다. 주사 14일 후에, 마우스를 희생시키고, 분자 및 조직학적 분석을 위해 골격근 (사두근), 심장, 횡경막, 가자미근 및 간으로부터 조직 절편을 수집하였다. 실시예 10의 ddPCR 검정은 19-20 결합 부위의 5' 정방향 프라이머, 35-36 부위에 대한 3' 역방향 프라이머 및 라이게이션된 19-20/35-36 부위의 5'에 서열 51 염기 쌍에 특이적인 프로브를 사용하였다. 본 실시예에서 완벽한 라이게이션 검정은 대등한 정방향 및 역방향 프라이머 쌍 (19-20 결합 부위의 5' 정방향 프라이머, 35-36 부위에 대한 3' 역방향 프라이머; 표 16)과 함께 19-20 및 35-36 결합 부위의 완벽한 라이게이션에 특이적인 프로브 서열을 사용하였다.

[0756] 표 16. 완벽한 라이게이션 결정을 위한 ddPCR 검정에 사용된 프라이머

프라이머 명칭	프라이머 서열	SEQ ID NO.
49 DMD 19-20 F1	GGGTGGGTTGCTTTACCTCT	SEQ ID NO: 190
40-DMD 37-38 R	TCTGGATATCCTCTTCTGGG	SEQ ID NO: 191
89 DMD 1938 프로브	ATCAGAAGGATTATGTATAGGAATA	SEQ ID NO: 192
P2 참조	AGGACAAAAGAGGACGGTCTGCCCTGG	SEQ ID NO: 136
참조 F2	TAAGACCCAGCTTCACGGAG	SEQ ID NO: 137
참조 R2	TATGATCGCCTGTTCCTCCA	SEQ ID NO: 138

[0757]

[0758] 2. 결과

[0759] 단일 프로모터 MHCK7 P2A AAV는 모든 조직에 걸쳐 성공적인 완벽한 라이게이션 사건을 가졌으며; 평균적으로 사두근에서는 2.8%, 심장에서는 5.3%, 횡경막에서는 0.85%, 가자미근에서는 3.9% 및 간에서는 2.4%였다. CK8 / SPc5-12 이중 프로모터 AAV는 간을 제외한 모든 조직에서 성공적인 완벽한 라이게이션을 가졌고, 평균적으로 사두근에서는 5.5%, 심장에서는 5.9%, 횡경막에서는 2%, 가자미근에서는 1.45% 및 간에서는 0.3%였다. MHCK7 / SPC512 이중 프로모터 AAV는 최소의 완벽한 라이게이션 사건을 가졌고, 평균적으로 사두근에서는 0.2%, 심장에서는 1.7%, 횡경막에서는 0.04%, 가자미근에서는 1.45% 및 간에서는 0.08%였다 (도 25a-25e).

[0760] 3. 결론

[0761] 여기서 본 발명자들은 인간화 DMD 마우스 모델에서 핫 스팟 영역 (엑손 45-55)의 생체내 절제를 보고한다. 이중 프로모터 CK8 + SPc5-12 조합은 간에서 낮은 오프-기관 편집 및 사두근, 횡경막 및 심장에서 보다 높은 편집을 갖는 것으로 보인다.

[0762] 실시예 12

[0763] hDMD 마우스 연구 (TD069)에서의 생체내 디스트로핀 유전자의 편집

[0764] 1. 방법

[0765] DMD 19-20L.329 및 DMD 37-38L.219 메가뉴클레아제의 쌍의 전달에 의해 유도된 생체내 편집 및 인간 변형된 디스트로핀 단백질 복원을 조사하기 위해 hDMD 마우스에서 생체내 연구를 수행하였다. 마우스를 AAV9로 캡슐화된 4개의 상이한 구축물 ($1x10^{14}$ VG/kg)로 안와후 전신 주사에 의해 주사하였다. AAV의 제1 세트는 3' 하류 뉴클레아제를 다르게 하였지만, 둘 사이에서 모든 요소는 동등하게 유지되었다. 이들은 5'에서 3'으로, A17-120 인핸서, 근육-특이적 프로모터 CK8, SV40 인트론 서열, DMD 19-20L.329 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG P2A 절단 서열, DMD35-36L.349 또는 DMD37-38L.219 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아

데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. AAV의 다음 세트는 3' 하류 뉴클레아제를 다르게 하였지만, 둘 사이에서 모든 요소는 동등하게 유지되었다. 5'에서 3'으로, A17-120 인핸서, 근육-특이적 프로모터 CK8, DMD 19-20L.329 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG P2A 절단 서열, DMD35-36L.349 또는 DMD37-38L.219 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. 주사 14일 후에, 마우스를 희생시키고, 분자 및 조직학적 분석을 위해 골격근 (사두근), 심장, 횡경막, 가자미근 및 간으로부터 조직 절편을 수집하였다. ddPCR을 실시예 10에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0766] 2. 결과

[0767] A17-120 CK8 SV40 인트론 DMD19-20L.329 P2A DMD35-36L.349를 함유하는 AAV는 모든 조직에 걸쳐 성공적인 총 라이게이션 사건을 가졌고; 평균적으로 사두근에서는 3.3%, 심장에서는 5.7%, 횡경막에서는 2.6%, 가자미근에서는 0.6% 및 간에서는 4.1%였다. A17-120 CK8 SV40 인트론 DMD19-20L.329 P2A DMD37-38L.219를 함유하는 AAV는 모든 조직에 걸쳐 최소의 총 라이게이션 사건을 가졌고; 평균적으로 사두근에서는 0.7%, 심장에서는 1.6%, 횡경막에서는 1.4%, 가자미근에서는 0.3% 및 간에서는 1.3%였다. A17-120 CK8 DMD19-20L.329 P2A DMD35-36L.349를 함유하는 AAV는 모든 조직에 걸쳐 성공적인 총 라이게이션 사건을 가졌고; 평균적으로 사두근에서는 5.6%, 심장에서는 3.6%, 횡경막에서는 3.6%, 가자미근에서는 4.3% 및 간에서는 2.2%였다. A17-120 CK8 DMD19-20L.329 P2A DMD37-38L.219를 함유하는 AAV는 모든 조직에 걸쳐 최소의 총 라이게이션 사건을 가졌고; 평균적으로 사두근에서는 2.1%, 심장에서는 3.4%, 횡경막에서는 1.2%, 가자미근에서는 0.35% 및 간에서는 0.93%였다 (도 26a-26e).

[0768] 3. 결론

[0769] 여기서, 본 발명자들은 실시예 11에서 사용된 DMD 19-20 & DMD 35-36 메가뉴클레아제에 의한 엑손 45-55의 절제뿐만 아니라 DMD 37-38 표적 부위에서의 상이한 하류 뉴클레아제와 DMD 19-20 뉴클레아제의 쌍형성을 보고한다. 본 실험에서, 쌍형성된 DMD 19-20 메가뉴클레아제 및 DMD 35-36 메가뉴클레아제는 DMD19-20 및 DMD 37-38 쌍형성된 메가뉴클레아제보다 더 높은 수준의 편집을 가졌다. 프로모터 하류의 SV40 인트론의 첨가는 표적 조직에서 편집을 최소로 증가시켰고, 간에서 편집을 증가시켰다.

[0770] 실시예 13

[0771] hDMDdel52/C57 마우스 연구 (TD075)에서의 생체내 디스트로핀 유전자의 편집

[0772] 1. 방법

[0773] DMD 19-20x.13 및 DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제의 쌍의 전달에 의해 유도된 생체내 편집 및 단축 변형된 인간 디스트로핀 단백질 복원을 조사하기 위해 hDMDdel52/mdx (hDMD 마우스) 마우스에서 생체내 연구를 수행하였다. 마우스를 AAV9로 캡슐화된 1개의 구축물로 2가지의 용량, $1x10^{14}$ VG/kg 또는 $2x10^{14}$ VG/kg으로 안와후 전신 주사에 의해 주사하였다. AAV는 5'에서 3'으로, 근육-특이적 프로모터 CK8, SV40 인트론 서열, DMD 19-20x.13 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG P2A 절단 서열, DMD 37-38x.15 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. 주사 14일 후에, 마우스를 희생시키고, 분자, 단백질 및 조직학적 분석을 위해 골격근 (사두근), 심장, 횡경막, TA 및 간으로부터 조직 절편을 수집하였다. ddPCR을 실시예 10에 기재된 바와 같이 수행하였다. 실시예 10에 기재된 바와 같이 Wes™ 시스템 (프로테인심플)을 사용하여 뉴클레아제-처리된 동물의 사두근, 심장 및 횡경막에서 디스트로핀 단백질 발현을 평가하였다. 디스트로핀 발현을 하우스 키핑 단백질 빈쿨린에 대해 정규화하고, 전장 디스트로핀을 발현하는 hDMD 마우스로부터 단리된 디스트로핀 단백질의 표준 곡선에 대해 측정하였다. 뉴클레아제-처리된 마우스로부터의 조직 절편을 또한 IHC 분석에 적용하여 디스트로핀 및 메가뉴클레아제 단백질 발현을 가시화하였다.

[0774] 2. 결과

[0775] CK8, SV40 인트론, 및 DMD19-20x.13 P2A DMD37-38x.15를 함유하는 $1x10^{14}$ VG/kg의 용량의 AAV ($1x10^{12}$ 총 AAV)는 모든 조직에 걸쳐 성공적인 총 라이게이션 사건을 가졌고; 평균적으로 사두근에서는 4.3%, 심장에서는 3.6%, 횡경막에서는 1.9%, TA에서는 2.5%, 및 간에서는 0.6%였다. CK8, SV40 인트론, 및 DMD19-20x.13 P2A DMD37-38x.15를 함유하는 $2x10^{14}$ VG/kg의 용량의 AAV ($4x10^{12}$ 총 AAV)는 모든 조직에 걸쳐 성공적인 총 라이게이션 사건을 가졌고; 평균적으로 사두근에서는 3.4%, 심장에서는 2.7%, 횡경막에서는 3.9%, TA에서는 2.8% 및 간에서는 1.9%였다 (도 27a-27e). WES 단백질 분석으로부터의 표준 곡선에 의한 단백질 표준물로부터 hDMD 마우스에서의 상응하는 조직으로부터의 디스트로핀 단백질을 비교함으로써 디스트로핀 복원을 정량화하였다. 도 28a-28c에

제시된 바와 같이, 레인 1-6은 표준 곡선을 나타내고; 레인 7-8은 $1x10^{14}$ VG/kg의 DMD19-20x.13 및 DMD37-38x.15 메가뉴클레아제로 처리된 hDMD 마우스로부터의 근육 조직을 나타내고; 레인 9-10은 $2x10^{14}$ VG/kg의 DMD19-20x.13 및 DMD37-38x.15 메가뉴클레아제로 처리된 근육을 나타내고, 레인 11-12는 PBS로 처리된 마우스를 나타낸다. 표준 곡선에 기초하여, 처리된 마우스에서 평균적으로 심장에서 6.5% 디스트로핀, 횡경막에서 1.5% 디스트로핀 (저용량) 또는 3% 디스트로핀 (고용량), 및 사두근에서 4.5% 디스트로핀이 확인되었다 (도 28a-28c).

[0776] 3. 결론

[0777] 여기서, 본 발명자들은 인간 디스트로핀 유전자에서 결실을 갖는 인간화 DMD 마우스 모델에서 핫 스팟 영역 (엑손 45-55)의 생체내 절제를 보고한다. 이러한 유전자형은 질환 모델 또는 환자에서 발견할 수 있는 것의 예이다. 2가지 용량 수준에서 편집상 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 마우스 모델은 도 28a-28c의 레인 11 및 12에서 관찰되는 바와 같이 인간 디스트로핀을 만들지 않는다. 여기서, 본 발명자들은 돌연변이로 인해 인간 디스트로핀을 만들지 않는 생체내 모델에서 단축 변형된 인간 디스트로핀 복원의 개념 증명을 보고한다.

[0778] 실시예 14

[0779] hDMDdel52/MDX 마우스 연구 (TD073)에서의 생체내 디스트로핀 유전자의 편집

[0780] 1. 방법

[0781] 메가뉴클레아제의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 쌍의 전달에 의해 유도된 생체내 편집 및 단축 변형된 인간 디스트로핀 단백질 복원을 조사하기 위해 hDMDdel52/mdx (hDMD) 마우스에서 생체내 연구를 수행하였다. 마우스를 AAV9로 캡슐화된 3개의 상이한 구축물 ($1x10^{14}$ VG/kg)로 안와후 전신 주사에 의해 주사하였다. 제1 AAV는 5'에서 3'으로, A17-120 인핸서, 근육-특이적 프로모터 CK8, DMD 19-20L.329 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG P2A 절단 서열, DMD35-36L.349 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. 제2 AAV는 5'에서 3'으로, A17-120 인핸서, 근육-특이적 프로모터 MHCK7, DMD 19-20L.329 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG P2A 절단 서열, DMD35-36L.349 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. 제3 AAV는 5'에서 3'으로, 근육-특이적 프로모터 CK8, DMD 19-20L.329 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, SV40 폴리아데닐화 신호, 근육 특이적 프로모터 SPc5-12, DMD35-36L.349 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 BgH 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성되었다. 주사 14일 후에, 마우스를 희생시키고, 분자, 단백질 및 조직학적 분석을 위해 골격근 (사두근), 심장, 횡경막 및 간으로부터 조직 절편을 수집하였다. ddPCR 검정을 실시예 10에 기재된 바와 같이 수행하였다. 실시예 10에 기재된 바와 같이 Wes™ 시스템 (프로테인심플)을 사용하여 뉴클레아제-처리된 동물의 사두근, 심장 및 횡경막에서 디스트로핀 단백질 발현을 평가하였다. 디스트로핀 발현을 하우스 키핑 단백질 빈쿨린에 대해 정규화하고, 전장 디스트로핀을 발현하는 hDMD 마우스로부터 단리된 디스트로핀 단백질의 표준 곡선에 대해 측정하였다.

[0782] 뉴클레아제-처리된 마우스로부터의 사두근 조직 절편을 또한 IHC 분석에 적용하여 디스트로핀 및 메가뉴클레아제 단백질 발현을 가시화하였다. 간략하게, 사두근 조직을 왁스제거하고, 본드 RX(BOND RX) 상에서 40분 동안 ER1을 함유하는 HIER (열-유도 에피토프 회복)로 처리하였다. 슬라이드를 10% NGS PBST (0.1%트윈20을 함유하는 PBS) 중에서 MoM (마우스 온 마우스 차단 시약, 벡터(VECTOR)) 차단 시약으로 실온에서 1시간 동안 차단한 다음, 2% NGS를 함유하는 PBST 중 1:1500 희석된 토끼 모노클로날 항-메가뉴클레아제 항체 (PBI, Rab54) 및 마우스 모노클로날 항-Pax7 항체 (DSHB, 상청액, 1:5)와 함께 4℃에서 밤새 가습 챔버에서 인큐베이션하였다. 다음날, 샘플을 2차 항체 (염소-항-마우스 IgG1 알렉사647 (인비트로젠)), 염소-항-토끼 알렉사555 (인비트로젠), 1:500)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 5분 동안 DAPI 핵 대조염색하였다. 과량의 본드 RX 세척 완충제를 제거하고, 벡타쉴드 바이브런스 안티페이드 마운팅 배지를 사용하여 커버슬립을 마운팅하였다. 자이스 아포톰 2.0 상에서 영상화를 수행하였다.

[0783] Pax7 RNA 및 엑손 44 및 56의 디스트로핀 스플라이싱된 메시지의 공동-발현에 대한 베이스스코프 분석을 사두근 조직 절편 상에서 수행하였다. 이 기술은 직접 재라이게이션을 통한 게놈 복구 후에 생성되는, 엑손 44 및 엑손 56 접합부에 걸쳐있는 대략 50개의 염기 쌍인 검출가능한 RNA 프로브를 이용한다 (캘리포니아주 뉴어크 소재의 어드밴스드 셀 다이아그노스틱스(Advanced Cell Diagnostics) (ACD)로부터 입수함) (도 34). 슬라이드를 왁스제거하고, RNA스코프(RNAscope) 과산화수소 용액과 함께 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 스팀기에서

95℃에서 15분 동안 RNA스코프 1x 표적 회복 시약에서 표적 회복시키고, 실온에서 30분 동안 프로테아제 IV 처리하였다. 디스트로핀 엑손44-56 접합부 및 Pax7에 대한 프로브를 첨가하고, HybEZ 오븐에서 40℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음, 5xSSC에서 밤새 저장하였다. 베이스스코프 듀플렉스 검정 (ACD)을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 신호를 증진시키고, 이어서 헤마톡실린 염색하고, 라이카 GT450 디지털 스캐너 상에서 슬라이드를 영상화하였다.

[0784] 2. 결과

[0785] 총 라이게이션은 참조 부위에 비해 평균적으로 사두근에서 15%이고 심장 및 횡경막에서 ~4%였다 (도 29). 표준 곡선을 사용하여 hDMD 마우스에서 상응하는 조직으로부터의 디스트로핀 단백질을 비교함으로써 단축 변형된 디스트로핀 복원을 정량화하였다 (도 30a-30c). 처리된 마우스는 평균적으로 사두근에서 8.2%, 심장에서 4.2%, 및 횡경막에서 2.8%인 것으로 확인되었다 (도 31). PBS로 처리된 hDMD 마우스에서, 인간 디스트로핀 또는 메가뉴클레아제 발현은 사두근 조직에서 검출되지 않았다. 특히, DMD19-20L.329 및 DMD35-36L.349에 노출된 hDMD 마우스에서, 단축 변형된 인간 디스트로핀의 발현이 복원되었고, 메가뉴클레아제 단백질 염색이 인접한 조직 절편에 존재하였다 (도 32). 사두근 조직 절편의 면역형광 염색은 PBS 처리된 동물에서 뉴클레아제에 대한 최소 배경 염색 및 위성 세포의 분명한 Pax7 염색을 보여준다 (백색 화살촉) (도 33a). 뉴클레아제 처리된 동물에서는, 위성 세포에서의 뉴클레아제의 발현을 나타내는 Pax7 양성 세포 집단의 공동-염색이 존재한다 (도 33b). 베이스스코프 분석은 PBS 동물에서의 Pax7 단독과 비교하여 (도 35a) 처리된 동물에서의 Pax7 및 스플라이싱된 RNA 생성물 (엑손 44-56)의 공동-발현을 보여주었다 (도 35b).

[0786] 3. 결론

[0787] 본 연구는 DMD 질환 모델에서 엑손 45 내지 55의 절제 & 디스트로핀 단백질 회복에 대한 생체내 개념 증명을 입증하였다.

[0788] 실시예 15

[0789] DMD 환자 세포주에서의 디스트로핀 단백질 발현의 복원

[0790] 1. 방법

[0791] 이전에 본 발명자들은 엑손 48-50이 누락된 DMD 환자 세포주, AB1098에서 디스트로핀 단백질 복원뿐만 아니라 디스트로핀 발현을 보고하였다. 여기서 본 발명자들은 추가의 KM1328 DMD 환자 세포주에서 개선된 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제에 의한 유사한 결과를 보고한다. DMD 환자 근모세포 세포주를 근학 연구 센터 (소르본느 대학교)로부터 입수하였다. 이러한 세포주를 엑손 52가 결실된 환자의 척수근으로부터 불멸화하였고, 이는 결실된 엑손으로 인해 디스트로핀 단백질 결핍을 유발한다. 세포를 이전에 실시예 10에 기재된 바와 같이 전기천공하고, 배양하고, 수거하였다. 메가뉴클레아제 mRNA 용량은 20 ng, 80 ng 및 160 ng의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제였다. 비교를 위해, AB1098 환자 세포를 80 ng의 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 메가뉴클레아제로 형질감염시켰다. 이전에 실시예 10에 기재된 바와 같은 WES 시스템을 사용하여 단백질을 추출하고, 정량화하고, 분석하였다. 디스트로핀의 검출에 사용된 1차 항체는 1:50 만디S106이었다. 1차 항체 대 빈쿨린 (압캠)을 로딩 대조군으로서 사용하였다 (1:100).

[0792] 2. 결과

[0793] 엑손 45-55에 의해 코딩되는 아미노산이 결여된 단축 변형된 디스트로핀 단백질의 발현을 WES 자동화 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정하였다. 변형된 디스트로핀의 양에서 용량-의존성 증가가 관찰되었다. 단축 변형된 디스트로핀 단백질 밴드는 도 36의 레인 3-5 및 도 37의 레인 3에서 가시화될 수 있다. 비교를 위한 전장 디스트로핀에 대한 단백질 밴드는 도 36의 레인 6 및 도 37의 레인 1에서 가시화될 수 있다. 모의 비처리된 KM1328 세포에서는 디스트로핀이 검출되지 않았고, 용량 범위에 걸쳐 디스트로핀에 대한 밴드의 강도가 증가하였다 (도 36).

[0794] KM1328 세포에서 DMD 19-20L.329 및 DMD 35-36L.349 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA의 양이 증가함에 따라 대형 결실 / 완벽한 라이게이션에서 용량-의존성 증가가 관찰되었다. 이러한 라이게이션은 메가뉴클레아제 쌍의 증가하는 용량에서 단축 변형된 디스트로핀의 증가된 검출을 발생시켰다 (도 36). 유사하게, 단축 변형된 디스트로핀의 발현은 AB1098 세포에서 80 ng 용량의 메가뉴클레아제의 쌍에 의해 관찰되었다 (도 37).

[0795] 3. 결론

[0796] 이들 실험은 디스트로핀 유전자에서 결실을 갖는 다수의 DMD 세포주로부터 단리된 세포주에서 엑손 45 내지 55의 대형 결실을 보고한다. 이들 세포주는 검출가능한 수준의 디스트로핀을 발현하지 않고, DMD 질환에 대한 우수한 시험관내 모델이다. 도 36 및 도 37의 WES 단백질 데이터는 단축 변형된 디스트로핀 단백질의 복원된 발현을 보여주며, 비처리된 모의 세포에서는 모든 조작된 메가뉴클레아제 용량 범위에 걸쳐 검출가능한 수준의 단백질 발현이 없다. 이는 엑손 45-55를 절제하고 디스트로핀 유전자를 베커 디스트로핀 표현형으로 전환시킴으로써 DMD 환자를 치료할 목적으로 이중 조작된 메가뉴클레아제를 사용하는 것의 추가의 확인 및 시험관내 개념 증명이다.

[0797] 실시예 16

[0798] AAVrh74를 사용한 hDMDdel52/MDX 마우스 연구에서의 PAX 7 발현 근육 세포에서의 생체내 디스트로핀 유전자의 편집

[0799] 1. 방법

[0800] 본 생체내 연구는 5'에서 3'으로, A17-120 인핸서, 근육-특이적 프로모터 MHCK7, DMD 19-20L.329 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 푸린 GSG P2A 절단 서열, DMD35-36L.349 뉴클레아제에 대한 코딩 서열, WPRE 요소, 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 바이러스 게놈으로 구성된 AAV의 평가였다. DMD 19-20L.329 및 DMDL.349 메가뉴클레아제를 함유하는 AAVrh74를 hDMDdel52/mdx (hDMD) 마우스에서 1 x10^{14}, 3 x10^{13}, 1 x10^{13} 또는 5 x10^{12} VG/kg으로 안와후 전신 주사에 의해 전달된 PBS와 비교하였다. 주사 28일 후에, 마우스를 희생시키고, 분자, 단백질 및 조직학적 분석을 위해 골격근 (사두근), 심장, 횡경막 및 간으로부터 조직 절편을 수집하였다. 디지털 액적 PCR 검정을 실시예 10에 기재된 바와 같이 수행하였다. 실시예 10에 기재된 바와 같이 Wes™ 시스템 (프로테인 심플)을 사용하여 뉴클레아제-처리된 hDMDdel52/mdx 동물의 사두근, 심장 및 횡경막에서 디스트로핀 단백질 발현을 평가하였다. 디스트로핀 발현을 하우스 키핑 단백질 빈쿨린에 대해 정규화하고, 전장 디스트로핀을 발현하는 hDMD 마우스로부터 단리된 디스트로핀 단백질의 표준 곡선에 대해 측정하였다. 뉴클레아제-처리된 마우스로부터의 조직 절편을 또한 실시예 14에 요약된 바와 같이 형광 면역조직화학 분석에 적용하여 디스트로핀 및 메가뉴클레아제 단백질 발현을 가시화하였다.

[0801] 2. 결과

[0802] 사두근 조직 절편의 면역형광 염색은 PBS 처리된 동물에서 뉴클레아제에 대한 최소 배경 염색 및 위성 세포의 분명한 Pax7 염색을 보여준다 (백색 화살촉) (도 38a). 뉴클레아제 처리된 동물에서는, 위성 세포에서의 뉴클레아제의 발현을 나타내는 Pax7 양성 세포 집단의 공동-염색이 존재한다 (도 38b). 이러한 연구는 시험된 모든 용량: 1 x10^{14} VG/kg (도 38b), 3 x10^{13} VG/kg (도 38c), 및 1 x10^{13} VG/kg (도 38d)에 걸쳐 Pax7 양성 세포에서의 뉴클레아제의 발현을 밝혀내었다.

[0803] 3. 결론

[0804] 본 연구는 이중 메가뉴클레아제를 캡시드화한 AAVrh74를 사용하여 사두근 근육에서 위성 세포 집단을 편집하는 추가의 개념 증명을 제공한다. 연구는 조작된 메가뉴클레아제의 발현과 공지된 위성 마커인 Pax7의 공발현을 보여주었으며, 이는 메가뉴클레아제가 이러한 표적 집단에서 발현되고, 따라서 AAV9 캡시드를 사용하여 동일한 구축물로 실시예 14에 이전에 제시된 바와 같이 이들 세포를 잠재적으로 편집할 수 있음을 나타낸다.

[0805] 서열 목록

SEQ ID NO: 1
MNTKYNKEFLLYLAGFVDGDGSIIAQIKPNQSYKFKHQLSLAFQVTQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVRDRGSVSDYILSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIWRLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 2
LAGLIDADG

SEQ ID NO: 3
MAPKKKRKVH

SEQ ID NO: 4
MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLE
GLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLI
WNIILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGL
ALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD
KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSL
AQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFGSSLMESEVN
LDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGR
VGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMD
LQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVR
VNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKW
QRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSM
GKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQ
PSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKHAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELH
SWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQ
MVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQQLEQMTT
TAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSDLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMF
LDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLS
IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSE
FEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPA
LGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNT
QWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFEYKTP
DELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTTN
YQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKTTENIPGGAEEI
SEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFNSRWRELHEEAV
RRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDL
TSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFEQRLQE
SKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIV
QKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTE
WLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKT
VLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQ
ADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKL
VEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGVNLKEEDF
NKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQR
RKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEE
LNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETM
MVMTEDMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLK

[0806]

NIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQ
GRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGI
GQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQ
KNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILK
QLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQL
EKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVKETEIAVQAKQPDVEEILS
KGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPDLAPGLTTIGASPTQT
VTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRV
MVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERI
QNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPY
TVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENIN
ASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERL
LEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLD
NMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGG
DFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPE
ERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLRELQEATDELDLKL
RQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGI
QLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWER
AISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKAL
CLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVD
MCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRR
LGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQS
MVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAK
GHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEG
DNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISP
NESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQ
AEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQI
LEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQ
TSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

SEQ ID NO: 5
MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLE
GLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLI
WNIILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGL
ALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD
KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSL
AQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFGSSLMESEVN
LDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGR
VGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMD
LQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVR
VNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKW
QRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSM
GKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQ
PSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKHAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELH
SWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQ
MVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQQLEQMTT
TAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSDLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMF
LDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLS
IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSE
FEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPA

[0807]

LGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNT
QWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFEYKTP
DELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTTN
YQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKTTENIPGGAEEI
SEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFNSRWRELHEEAV
RRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDL
TSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFEQRLQE
SKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIV
QKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTE
WLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKT
VLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQ
ADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKL
VEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGVNLKEEDF
NKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQR
RKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEE
LNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETM
MVMTEDMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLK
NIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQ
GRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKDLQGEI
EAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLE
ASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKT
KEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEW
EKLNLHSADWQRKIDETLERLRELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQ
DHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQV
AVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDH
PKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQ
NDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVL
SFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGG
SNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAK
CNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVR
DFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSP
QLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSP
LSQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPE
MMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQ
AEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEV
MEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

SEQ ID NO: 6
AAGGATTATGTATTACCTCCCG

SEQ ID NO: 7
TTCCTAATACATAATGGAGGGC

SEQ ID NO: 8
TAAGATTGGGTATGAGGGATAG

SEQ ID NO: 9
ATTCTAACCCATACTCCCTATC

[0808] SEQ ID NO: 10

CTACATGGTGTATCTGACTAAG

SEQ ID NO: 11
GATGTACCACATAGACTGATTC

SEQ ID NO: 12
CTGGCCGAAGTATAGGAATATG

SEQ ID NO: 13
GACCGGCTTCATATCCTTATAC

SEQ ID NO: 14
AAGGATTAT

SEQ ID NO: 15
TTCCTAATA

SEQ ID NO: 16
TAAGATTGG

SEQ ID NO: 17
ATTCTAACC

SEQ ID NO: 18
CTACATGGT

SEQ ID NO: 19
GATGTACCA

SEQ ID NO: 20
CTGGCCGAA

SEQ ID NO: 21
GACCGGCTT

SEQ ID NO: 22
TACCTCCCG

SEQ ID NO: 23
ATGGAGGGC

SEQ ID NO: 24
GAGGGATAG

SEQ ID NO: 25
CTCCCTATC

SEQ ID NO: 26
CTGACTAAG

[0809]

SEQ ID NO: 27
GACTGATTC

SEQ ID NO: 28
AGGAATATG

SEQ ID NO: 29
TCCTTATAC

SEQ ID NO: 30
AAGGATTATGTATGAGGGATAG

SEQ ID NO: 31
TTCCTAATACATACTCCCTATC

SEQ ID NO: 32
AAGGATTATGTATCTGACTAAG

SEQ ID NO: 33
TTCCTAATACATAGACTGATTC

SEQ ID NO: 34
AAGGATTATGTATAGGAATATG

SEQ ID NO: 35
TTCCTAATACATATCCTTATAC

SEQ ID NO: 36
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYATIRPVQSTKFKHTLRLWFAVTQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDNGSVSWYYLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEVGQKTKRRWFLDKLVDEIGVGYVEDTGRASRYRLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 37
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIFAVIEPVQSAKFKHRLKLSFVVTQKTQRRWFLDK
LVDEIGVGYVYDQGSVSFYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSA
KESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAAS
SASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQL
RLFFEVGQTTRRRWFLDKLVDEIGVGYVFDKGSASMYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 38
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYASIMPIQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ

[0810]

LRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 39
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIIAFIMPSQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEIGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
SLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 40
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFIMPTQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 41
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQHMKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 42
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQHLKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 43
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQGLKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

[0811] SEQ ID NO: 44

MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFIMPDQAPKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQ
LRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 45
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIMPTQWTKFKHS
LLLRFRVTQSTRRRWFLDKLMDEIGVGYVSDQGRASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 46
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVIDSGSVSTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSA
KESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAAS
SASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQLVKFKHTLL
LRFRVTQATRRRWFLDKLVDEIGVGYVTDNGRASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKL
KQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSL
SEKKKSSP

SEQ ID NO: 47
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQLVKFKHTL
LLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 48
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTL
LLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 49
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTL
LLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLK

[0812]

LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 50
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTL
LLRFRVTQATKRRWFLDKLVDEIGVGYVSDVGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 51
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTL
LLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGVGYVSDRGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 52
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQELKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVADRGSVSEYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTL
LLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSQIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDS
LSEKKKSSP

SEQ ID NO: 53
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHV
LQLCFRVHQLTKRRWFLDKLVDEIGVGYVYDCGSASFYHLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 54
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLD
KLVDEIGAGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHV
LQLCFRVHQKTKRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGSASCYHLSEIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

[0813] SEQ ID NO: 55

MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHV
LQLCFRVHQSTRRRWFLDKLVDEIGAGYVYDHGSASLYSLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 56
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVASIAPAQDCKFKHRLRLRFFVSQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVSDSGSVSSYVLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSA
KESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAAS
SASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVL
QLCFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD
SLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 57
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVRDSGSVSSYDLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPS
AKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAA
SSASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHV
LQLHFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFL
KLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVL
DSLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 58
MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVRDSGSVSSYLLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSA
KESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAAS
SASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVL
QLCFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD
SLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 59
MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLD
KLVDEIGVGYVRDSGSVSSYNLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSA
KESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAAS
SASSSPGSGISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVL
QLCFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLK
LKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD
SLSEKKKSSP

SEQ ID NO: 60
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCTATGCCACGATCCGGCCTGTTCAAAGTACTAAGTTCAAGCA
CACTCTGCGGCTCTGGTTCGCGGTCACGCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACAATGGCAGCGTC
[0814] TCCTGGTACTATCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA

ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGGAGGACACGGGCAGGGCGAGCAGGTACCGGCTGTCCCAGATCAAGCC
TCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAG
GCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCG
GACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGAC
TCCAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCT
CCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 61
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCTTTGCCGTTATCGAGCCTGTTCAAAGTGCTAAGTTCAAGCA
CCGGCTGAAGCTCTCGTTCGTTGTCACTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACCAGGGCAGCGTC
TCCTTTTACAGGCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGGCA
GACGACAAGGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGTTTGACAAGGGCAGCGCGAGCATGTACCGGCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
[0815] GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 62
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCTATGCCAGTATCATGCCTATTCAAACGGCTAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAAGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
CCTATTACAGGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 63
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCATTGCCTTTATCATGCCTAGTCAGACGGCTAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAAGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
CCTATTACAGGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGATCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAAGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 64
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCATGGCCTTTATCATGCCTACTCAGACGGCTAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAAGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
[0816] CCTATTACAGGCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA

ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 65
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCATGGCCTTTATCTTGCCTGAGCAGCATATGAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAGGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
CCTATTACAGGCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 66
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCATGGCCTTTATCTTGCCTGAGCAGCATCTTAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAGGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
CCTATTACAGGCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
[0817] GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG

CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGATGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 67
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCATGGCCTTTATCTTGCCTGAGCAGGGTCTGAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAGGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
CCTATTACAGGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACCGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 68
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCATGGCCTTTATCATGCCTGATCAGGCGCCTAAGTTCAAGCA
CCGTCTGAGGCTCCAGTTCGCGGTCGCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTATGACTTTGGCAGCGTCT
CCTATTACAGGCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTGTGCCTGTATCGTGC
CTCGTCAAGATCGGAAGTTCAAGCACCAGCTGCGGCTCTTTTTCGAGGTCGGTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGAGGGACCTTGGCAGCGCGAGCACTTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
[0818] CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG

ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 69
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATG
CCGACGCAGTGGACGAAGTTCAAGCACTCGCTGTTGCTCCGGTTCCGGGTCACCC
AGTCGACAAGGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGATGGACGAGATTGGTGTGG
GTTACGTGTCTGACCAGGGCAGGGCGAGCTACTACACCCTGTCCGAGATCAAGC
CTCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCA
GGCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCC
GGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGA
CTCCAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTC
TCCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 70
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGATTGACTCGGGCAGCGTC
TCCACGTACCGGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCTAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC
CGTCGCAGCTGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCCGGGTCACCCA
GGCGACAAGGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGG
TTACGTGACGGACAACGGCAGGGCGAGCTACTACACCCTGTCCGAGATCAAGCC
TCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAG
GCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCG
GACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGAC
TCCAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCT
CCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

[0819] SEQ ID NO: 71

ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC
CGTCGCAGCTGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCCGGGTCTGCCA
GGCGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATTGGTGTGGG
TTACGTGTCTGACCAGGGCAGCGCGAGCTACTACACCCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 72
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC
CGTCGCAGGAGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCCGGGTCTGCCA
GGCGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATTGGTGTGGG
TTACGTGTCTGACCAGGGCAGCGCGAGCTACTACACCCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 73
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
[0820] AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA

ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC
CGTCGCAGGAGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCCGGGTCTGCCA
GGCGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATTGGTGTGGG
TTACGTGTCTGACCAGGGCAGCGCGAGCTACTACACCCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 74
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC
CGTCGCAGGAGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCAGGGTCACTCA
GGCGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATTGGTGTGGG
TTACGTGTCTGACGTTGGCAGCGCGAGCTATTACACCCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 75
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAACAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
[0821] GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC

CGTCGCAGGAGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCCGGGTCTGCCA
GGCGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATTGGTGTGGG
TTACGTGTCTGACCGTGGCAGCGCGAGCTATTACACCCTGTCCGAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 76
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCTATGCCTGTATCAAGCCTCATCAAGAGCTTAAGTTCAAGCA
CCAGCTGTTGCTCTATTTCGAGGTCTATCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGGCTGACCGTGGCAGCGTC
TCCGAGTACCGTCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTCTATCATTC
CGTCGCAGGAGGTTAAGTTCAAGCACACTCTGCTGCTCCGTTTCCGGGTCTGCCA
GGCGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATTGGTGTGGG
TTACGTGTCTGACCAGGGCAGCGCGAGCTACTACACCCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CAGGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 77
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCGTGGCCACTATCCGGCCGGGGCAGGAGCTGAAGTTCAAGC
ACGGTCTGCGGCTCAGGTTCTATGTCTGTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCT
CGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGACGGACAGTGGCAGCGT
CTCCCGTTACGAGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAGACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGT
CCGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCTGTTTCAGGGTCCACC
AGTTGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTAG
GTTACGTGTATGACTGCGGCAGCGCGAGCTTCTACCACCTGTCCCAGATCAAGCC
TCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAG
GCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCG
[0822] GACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGAC

TCCAAGACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCT
CCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 78
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCGTGGCCACTATCCGGCCGGGGCAGGAGCTGAAGTTCAAGC
ACGGTCTGCGGCTCAGGTTCTATGTCTGTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCT
CGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGCGGGTTACGTGACGGACAGTGGCAGCGT
CTCCCGTTACGAGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATCGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGT
CCGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCTGTTTCAGGGTCCACC
AGAAGACAAAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGG
GTTACGTGTATGACCACGGCAGCGCGAGCTGCTACCACCTGTCCGAGATCAAGC
CTCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCA
GGCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCC
GGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGA
CTCCCACACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTC
TCCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 79
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCGTGGCCACTATCCGGCCGGGGCAGGAGCTGAAGTTCAAGC
ACGGTCTGCGGCTCAGGTTCTATGTCTGTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCT
CGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGACGGACAGTGGCAGCGT
CTCCCGTTACGAGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGT
CCGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCTGTTTCAGGGTCCACC
AGTCGACAAGGCGCCGTTGGTTCCTAGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGCGG
GTTACGTGTATGACCACGGCAGCGCGAGCCTGTACAGCCTGTCCCAGATCAAGC
CTCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCA
GGCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCC
GGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGA
CTCCCACACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTC
TCCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 80
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
[0823] CTGACGGTTCCATCGTTGCCAGTATCGCTCCGGCTCAGGATTGTAAGTTCAAGCA

CAGGCTGAGGCTCCGTTTCTTTGTCTCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGTCTGACTCTGGCAGCGTCT
CCAGTTACGTTCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGTC
CGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCTGTTTCCGGGTCTTTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTAGG
TTACGTGTATGACCACGGCAGGGCGAGCATCTACCAGCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CCACACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 81
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCGTTGCCAGGATCGAGCCGGCTCAGGATTGTAAGTTCAAGCA
CAGGCTGAGGCTCCAGTTCTTTGTCTCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGCGGGACTCTGGCAGCGTC
TCCAGTTACGATCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA
CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGTC
CGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCCATTTCCGGGTCTTTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTAGG
TTACGTGTATGACCACGGCAGGGCGAGCATCTACCAGCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CCACACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 82
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACT
CTGACGGTTCCATCGTTGCCAGGATCGAGCCGGCTCAGGATTGTAAGTTCAAGCA
CAGGCTGAGGCTCCAGTTCTTTGTCTCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGCGGGACTCTGGCAGCGTC
TCCAGTTACTTGCTGTCCCAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTACA
ACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGAA
CAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGGG
[0824] TGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAAA

CCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCATC
TCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTCC
GAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCTG
CTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGTC
CGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCTGTTTCCGGGTCTTTCA
GAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTAGG
TTACGTGTATGACCACGGCAGGGCGAGCATCTACCAGCTGTCCCAGATCAAGCCT
CTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCAGG
CCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCCGG
ACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGACTC
CCACACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTCTCC
GAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 83
ATGAATACAAAATATAATAAAGAGTTCTTACTCTACTTAGCAGGGTTTGTAGACG
CTGACGGTTCCATCGTTGCCAGGATCGAGCCGGCTCAGGATTGTAAGTTCAAGCA
CAGGCTGAGGCTCCAGTTCTTTGTCTCTCAGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTC
GACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTGGGTTACGTGCGGGACTCTGGCAGCGTC
TCCAGTTACAATCTGTCCGAGATCAAGCCTTTGCATAATTTTTTAACACAACTAC
AACCTTTTCTAAAACTAAAACAAAAACAAGCAAATTTAGTTTTAAAAATTATTGA
ACAACTTCCGTCAGCAAAAGAATCCCCGGACAAATTCTTAGAAGTTTGTACATGG
GTGGATCAAATTGCAGCTCTGAATGATTCGAAGACGCGTAAAACAACTTCTGAA
ACCGTTCGTGCTGTGCTAGACAGTTTACCAGGATCCGTGGGAGGTCTATCGCCAT
CTCAGGCATCCAGCGCCGCATCCTCGGCTTCCTCAAGCCCGGGTTCAGGGATCTC
CGAAGCACTCAGAGCTGGAGCAGGTTCCGGCACTGGATACAACAAGGAATTCCT
GCTCTACCTGGCGGGCTTCGTCGACGGGGACGGCTCCATCTTTGCCTGTATCCGT
CCGTCGCAGAGGGCTAAGTTCAAGCACGTGCTGCAGCTCTGTTTCCGGGTCTTTC
AGAAGACACAGCGCCGTTGGTTCCTCGACAAGCTGGTGGACGAGATCGGTGTAG
GTTACGTGTATGACCACGGCAGGGCGAGCATCTACCAGCTGTCCCAGATCAAGC
CTCTGCACAACTTCCTGACCCAGCTCCAGCCCTTCCTGAAGCTCAAGCAGAAGCA
GGCCAACCTCGTGCTGAAGATCATCGAGCAGCTGCCCTCCGCCAAGGAATCCCC
GGACAAGTTCCTGGAGGTGTGCACCTGGGTGGACCAGATCGCCGCTCTGAACGA
CTCCCACACCCGCAAGACCACTTCCGAAACCGTCCGCGCCGTTCTAGACAGTCTC
TCCGAGAAGAAGAAGTCGTCCCCCTAA

SEQ ID NO: 84
KEFLLYLAGFVDSDGSIYATIRPVQSTKFKHTLRLWFAVTQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDNGSVSWYYLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD
KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 85
KEFLLYLAGFVDSDGSIFAVIEPVQSAKFKHRLKLSFVVTQKTQRRWFLDKLVDEIGV
GYVYDQGSVSFYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKF
LEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 86
KEFLLYLAGFVDSDGSIYASIMPIQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

[0825]

SEQ ID NO: 87
KEFLLYLAGFVDSDGSIIAFIMPSQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 88
KEFLLYLAGFVDSDGSIMAFIMPTQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 89
KEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQHMKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 90
KEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQHLKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 91
KEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQGLKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 92
KEFLLYLAGFVDSDGSIMAFIMPDQAPKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 93
KEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 94
KEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVIDSGSVSTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKF
LEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 95
KEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 96
KEFLLYLAGFVDSDGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

[0826]

SEQ ID NO: 97
KEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 98
KEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 99
KEFLLYLAGFVDSDGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 100
KEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQELKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVADRGSVSEYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 101
KEFLLYLAGFVDSDGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 102
KEFLLYLAGFVDADGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLDKLVDEIG
AGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 103
KEFLLYLAGFVDADGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 104
KEFLLYLAGFVDSDGSIVASIAPAQDCKFKHRLRLRFFVSQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVSDSGSVSSYVLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKF
LEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 105
KEFLLYLAGFVDSDGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDSGSVSSYDLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 106
KEFLLYLAGFVDSDGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDSGSVSSYLLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
[0827] FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 107
KEFLLYLAGFVDADGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDSGSVSSYNLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 108
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTKRRWFLDKLVDEIG
VGYVEDTGRASRYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 109
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQTTRRRWFLDKLVDEIG
VGYVFDKGSASMYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 110
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 111
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEIGQKTQRRWFLDKLVDEIGV
GYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKF
LEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 112
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 113
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 114
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 115
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 116
KEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

[0828]

SEQ ID NO: 117
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIMPTQWTKFKHSLLLRFRVTQSTRRRWFLDKLMDEIG
VGYVSDQGRASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 118
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQLVKFKHTLLLRFRVTQATRRRWFLDKLVDEIGV
GYVTDNGRASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKF
LEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 119
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQLVKFKHTLLLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGV
GYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFL
EVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 120
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGV
GYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFL
EVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 121
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGV
GYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFL
EVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 122
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVTQATKRRWFLDKLVDEIGV
GYVSDVGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFL
EVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 123
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGV
GYVSDRGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFL
EVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 124
KEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQATKRRWFLDKLVDEIGV
GYVSDQGSASYYTLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKF
LEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 125
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVHQLTKRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDCGSASFYHLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 126
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVHQKTKRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDHGSASCYHLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD

[0829]

SEQ ID NO: 127
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVHQSTRRRWFLDKLVDEIG
AGYVYDHGSASLYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 128
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 129
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLHFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 130
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 131
KEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVFQKTQRRWFLDKLVDEIG
VGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDK
FLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLD

SEQ ID NO: 132
SLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGSGISEALRAGAGSGTG

SEQ ID NO: 133
CGGGAGGTAATACATAATCC

SEQ ID NO: 134
GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC

SEQ ID NO: 135
TGGGCTACTGCAACTCTGTT

SEQ ID NO: 136
AGGACAAAAGAGGACGGTCTGCCCTGG

SEQ ID NO: 137
TAAGACCCAGCTTCACGGAG

SEQ ID NO: 138
TATGATCGCCTGTTCCTCCA

SEQ ID NO: 139
CTGGCCGAAGTATAGGAA

[0830] SEQ ID NO: 140

CGCAACATGTGACATAAAGAG

SEQ ID NO: 141
TCTGGATATCCTCTTCTGGG

SEQ ID NO: 142
CCTACATGGTGTATCTGAC

SEQ ID NO: 143
GAACACCACCAGAAAAACAAG

SEQ ID NO: 144
CACTTCCTGTAAGACAACCAG

SEQ ID NO: 145
ATCCCTCATACCCAATC

SEQ ID NO: 146
AAAAACCACGGTGCTGTTGA

SEQ ID NO: 147
ATGGGGTCCGAGACTTTTCC

SEQ ID NO: 148
GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC

SEQ ID NO: 149
AGAGCATGCCATCTGAGTC

SEQ ID NO: 150
GTGAAGTAGCAAAGCACCTG

SEQ ID NO: 151
AGAGCATGCCATCTGAGTC

SEQ ID NO: 152
GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC

SEQ ID NO: 153
TTTGGTATGGGGTCCGAGAC

SEQ ID NO: 154
GTGAAGTAGCAAAGCACCTG

SEQ ID NO: 155
TTTGGTATGGGGTCCGAGAC

SEQ ID NO: 156
[0831] GGGTGGGTTGCTTTACCTCTC

SEQ ID NO: 157
GATTCTCAGAAATGGAGTGACTG

SEQ ID NO: 158
GTGAAGTAGCAAAGCACCTG

SEQ ID NO: 159
GATTCTCAGAAATGGAGTGACTG

SEQ ID NO: 160
ATCAGAAGGATTATGTATAGGAATA

SEQ ID NO: 161
GGGTGGGTTGCTTTACCTCT

SEQ ID NO: 162
TCTGGATATCCTCTTCTGGG

SEQ ID NO: 163
GTGAAGTAGCAAAGCACCTG

SEQ ID NO: 164
GTGAAGTAGCAAAGCACCTG

SEQ ID NO: 165
AGTCACTTCCTAAGCTAAGACAACC

SEQ ID NO: 166
CAGAAGGATTATGTATGAGGGATA

SEQ ID NO: 167
GTGAAGTAGCAAAGCACCTG

SEQ ID NO: 168
ATGGGGTCCGAGACTTTTCC

SEQ ID NO: 169
CGGCCGTCCGCCTTCGGCACCATCCTCACGACACCCAAATATGGCGACGGGTGA
GGAATGGTGGGGAGTTATTTTTAGAGCGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGT
GTTGGCGCTCTAAAAATAACTCCCGGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGG
ACACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCT
CGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCCTCGATAAA
AGGCTCCGGGGCCGGCGGCGGCCCACGAGCTACCCGGAGGAGCGGGAGGCGCC
AAGCTCTAGA

SEQ ID NO: 170
CCATCCTGGTCTATAGAGAGAGTTCCAGAACAGCCAGGGCTACAGATAAACCCA
TCTGGAAAAACAAAGTTGAATGACCCAAGAGGGGTTCTCAGAGGGTGGCGTGTG
CTCCCTGGCAAGCCTATGACATGGCCGGGGCCTGCCTCTCTCTGCCTCTGACCCT
CAGTGGCTCCCATGAACTCCTTGCCCAATGGCATCTTTTTCCTGCGCTCCTTGGGT

[0832]

[0833]

TATTCCAGTCTCCCCTCAGCATTCCTTCCTCAGGGCCTCGCTCTTCTCTCTGCTCC
CTCCTTGCACAGCTGGCTCTGTCCACCTCAGATGTCACAGTGCTCTCTCAGAGGA
GGAAGGCACCATGTACCCTCTGTTTCCCAGGTAAGGGTTCAATTTTTAAAAATGG
TTTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTTCAAGACAGGGCTCCTCT
GTGTAGTCCTAACTGTCTTGAAACTCCCTCTGTAGACCAGGTCGACCTCGAACTC
TTGAAACCTGCCACGGACCACCCAGTCAGGTATGGAGGTCCCTGGAATGAGCGT
CCTCGAAGCTAGGTGGGTAAGGGTTCGGCGGTGACAAACAGAAACAAACACAGA
GGCAGTTTGAATCTGAGTGTATTTTGCAGCTCTCAAGCAGGGGATTTTATACATA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCAAACATTACATCTCTTAGAAACTATATCCAA
TGAAACAATCACAGATACCAACCAAAACCATTGGGCAGAGTAAAGCACAAAAAT
CATCCAAGCATTACAACTCTGAAACCATGTATTCAGTGAATCACAAACAGAACA
GGTAACATCATTATTAATATAAATCACCAAAATATAACAATTCTAAAAGGATGTA
TCCAGTGGGGGCTGTCGTCCAAGGCTAGTGGCAGATTTCCAGGAGCAGGTTAGT
AAATCTTAACCACTGAACTAACTCTCCAGCCCCATGGTCAATTATTATTTAGCAT
CTAGTGCCTAATTTTTTTTTATAAATCTTCACTATGTAATTTAAAACTATTTTAATT
CTTCCTAATTAAGGCTTTCTTTACCATATACCAAAATTCACCTCCAATGACACACG
CGTAGCCATATGAAATTTTATTGTTGGGAAAATTTGTACCTATCATAATAGTTTTG
TAAATGATTTAAAAAGCAAAGTGTTAGCCGGGCGTGGTGGCACACGCCTTTAATC
CCTGCACTCGGGAGGCAGGGGCAGGAGGATTTCTGAGTTTGAGGCCAGCCTGGT
CTACAGAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAACCCTGTCTCGAA
CCCCCCACCCCCCAAAAAAAGCAAAGTGTTGGTTTCCTTGGGGATAAAGTCATGT
TAGTGGCCCATCTCTAGGCCCATCTCACCCATTATTCTCGCTTAAGATCTTGGCCT
AGGCTACCAGGAACATGTAAATAAGAAAAGGAATAAGAGAAAACAAAACAGAG
AGATTGCCATGAGAACTACGGCTCAATATTTTTTCTCTCCGGCGAAGAGTTCCAC
AACCATCTCCAGGAGGCCTCCACGTTTTGAGGTCAATGGCCTCAGTCTGTGGAAC
TTGTCACACAGATCTTACTGGAGGTGGTGTGGCAGAAACCCATTCCTTTTAGTGT
CTTGGGCTAAAAGTAAAAGGCCCAGAGGAGGCCTTTGCTCATCTGACCATGCTG
ACAAGGAACACGGGTGCCAGGACAGAGGCTGGACCCCAGGAACACCTTAAACA
CTTCTTCCCTTCTCCGCCCCCTAGAGCAGGCTCCCCTCACCAGCCTGGGCAGAAA
TGGGGGAAGATGGAGTGAAGCCATACTGGCTACTCCAGAATCAACAGAGGGAGC
CGGGGGCAATACTGGAGAAGCTGGTCTCCCCCCAGGGGCAATCCTGGCACCTCC
CAGGCAGAAGAGGAAACTTCCACAGTGCATCTCACTTCCATGAATCCCCTCCTCG
GACTCTGAGGTCCTTGGTCACAGCTGAGGTGCAAAAGGCTCCTGTCATATTGTGT
CCTGCTCTGGTCTGCCTTCCACAGCTTGGGGGCCACCTAGCCCACCTCTCCCTAG
GGATGAGAGCAGCCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTG
GGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCC
CCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCT
CTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGATC
CAGGGTGAGGGGCAGGCTGAGGGCGGCCACTTCCCTCAGCCGCAGGTTTGTTTTC
CCAAGAATGGTTTTTCTGCTTCTGTAGCTTTTCCTGTCAATTCTGCCATGGTGGAG
CAGCCTGCACTGGGCTTCTGGGAGAAACCAAACCGGGTTCTAACCTTTCAGCTAC
AGTTATTGCCTTTCCTGTAGATGGGCGACTACAGCCCCACCCCCACCCCCGTCTC
CTGTATCCTTCCTGGGCCTGGGGATCCTAGGCTTTCACTGGAAATTTCCCCCCAG
GTGCTGTAGGCTAGAGTCACGGCTCCCAAGAACAGTGCTTGCCTGGCATGCATGG
TTCTGAACCTCCAACTGCAAAAAATGACACATACCTTGACCCTTGGAAGGCTGAG
GCAGGGGGATTGCCATGAGTGCAAAGCCAGACTGGGTGGCATAGTTAGACCCTG
TCTCAAAAAACCAAAAACAATTAAATAACTAAAGTCAGGCAAGTAATCCTACTC
GGGAGACTGAGGCAGAGGGATTGTTACATGTCTGAGGCCAGCCTGGACTACATA
GGGTTTCAGGCTAGCCCTGTCTACAGAGTAAGGCCCTATTTCAAAAACACAAACA
AAATGGTTCTCCCAGCTGCTAATGCTCACCAGGCAATGAAGCCTGGTGAGCATTA

GCAATGAAGGCAATGAAGGAGGGTGCTGGCTACAATCAAGGCTGTGGGGGACTG
AGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCC
AAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAG
ACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCAT
ACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTG
CCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACA
GCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAG
GGGCTGCCCCCGGGTCAC

SEQ ID NO: 171
CCTGAGTTTGAATCTCTCCAACTCAGCCAGCCTCAGTTTCCCCTCCACTCAGTCCC
TAGGAGGAAGGGGCGCCCAAGCGGGTTTCTGGGGTTAGACTGCCCTCCATTGCA
ATTGGTCCTTCTCCCGGCCTCTGCTTCCTCCAGCTCACAGGGTATCTGCTCCTCCT
GGAGCCACACCTTGGTTCCCCGAGGTGCCGCTGGGACTCGGGTAGGGGTGAGGG
CCCAGGGGCGACAGGGGGAGCCGAGGGCCACAGGAAGGGCTGGTGGCTGAAGG
AGACTCAGGGGCCAGGGGACGGTGGCTTCTACGTGCTTGGGACGTTCCCAGCCA
CCGTCCCATGTTCCCGGCGGGGGCCAGCTGTCCCCACCGCCAGCCCAACTCAGCA
CTTGGTTAGGGTATCAGCTTGGTGGGGGCGTGAGCCCAGCCCTGGGGCGCTCAGC
CCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCGCAAAGCATGCCTGGGTTCAGGGTGGGTAT
GGTGCCGGAGCAGGGAGGTGAGAGGCTCAGCTGCCCTCCAGAACTCCTCCCTGG
GGACAACCCCTCCCAGCCAATAGCACAGCCTAGGTCCCCCTATATAAGGCCACG
GCTGCTGGCCCTTCCTTTGGGTCAGTGTCACCTCCAGGATACAGACAGCCCCCCT
T

SEQ ID NO: 172
CCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAG
ATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCCCCAACACCTG
CTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATG
GAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGAT

SEQ ID NO: 173
CCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAG
ATGCCTGGTTATAATTAACCCCAACACCTGCTGCCCCCCCCCCCCCCAACACCTGC
TGCCTGAGCCTGAGCGGTTACCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACA
CCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGAT

SEQ ID NO: 174
TGGCCACCGCCTTCGGCACCATCCTCACGACACCCAAATATGGCGACGGGTGAG
GAATGGTGGGGAGTTATTTTTAGAGCGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTG
TTGGCGCTCTAAAAATAACTCCCGGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGA
CACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCTC
GGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCCTCGATAAAA
GGCTCCGGGGCCGGCGGCGGCCCACGAGCTACCCGGAGGAGCGGGAGGCGCCA
AGCTCTAGA

SEQ ID NO: 175
AAGCTTGCATGTCTAAGCTAGACCCTTCAGATTAAAAATAACTGAGGTAAGGGC
CTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGAGACGCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCCCATCGG
CCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCCAAGGACTAAAAAAAGGCCATGGAGCCAGA
[0834] GGGGCGAGGGCAACAGACCTTTCATGGGCAAACCTTGGGGCCCTGCTGTCTAGC

ATGCCCCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACAC
CCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCCCCAAC
ACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGAAGAT
CTTCGAACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCA
GGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAA
GGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAG
CAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCAC
GCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGC
TCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGC
TCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCACCTCCAC
AGCACAGACAGACACTCAGGAGCAGCCAGC

SEQ ID NO: 176
CTAGACTAGCATGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATG
CCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTG
CCTCTAAAAATAACCCTGCATGCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCG
CCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGG
CAGCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGG
GCACGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCT
GGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGG
GGCACAGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACACTC
AGGAGCCAGCCAGC

SEQ ID NO: 177
TTCTGAGTCCTCTAAGGTCCCTCACTCCCAACTCAGCCCCATGTCCTGTCAATTCC
CACTCAGTGTCTGATCTCCTTCTCCTCACCTTTCCCATCTCCCGTTTGACCCAGCT
TCCTGAGCTCTCCTCCCATTCCCCTTTTTGGAGTCCTCCTCCTCTCCCAGAACCCA
GTAATAAGTGGGCTCCTCCCTGGCCTGGACCCCCGTGGTAACCCTATAAGGCGAG
GCAGCTGCTGTCTGAGGCAGGGAGGGGCTGGTGTGGGAGGCTAAGGGCAGCTGC
TAAGTTTAGGGTGGCTCCTTCTCTCTTCTTAGAGACAACAGGTGGCTGGGGCCTC
AGTGCCCAGAAAAGAAAATGTCTTAGAGGTATCGGCATGGGCCTGGAGGAGGGG
GGACAGGGCAGGGGGAGGCATCTTCCTCAGGACATCGGGTCCTAGAGGACCTTG
CTTCCTAGCTGGGCCTTTCCTTCTCCTCTATAAATACCAGCTCTGGTATTTCGCCT
TGGCAGCTGTTGCTGCTAGGGAGACGGCTGGCTTGACATGCATCTCCTGACAAAA
CACAAACCCGTGGTGTGAGTGGGTGTGGGCGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAG
AGAGGGGGCGAGGGAGACAGGGGCGCAGGAGTCAGGCAAAGGCGATGCGGGGG
TGCGACTACACGCAGTTGGAAACAGTCGTCAGAAGATTCTGGAAACTATCTTGCT
GGCTATAAACTTGAGGGAAGCAGAAGGCCAACATTCCTCCCAAGGGAAACTGAG
GCTCAGAGTTAAAACCCAGGTATCAGTGATATGCATGTGCCCCGGCCAGGGTCA
CTCTCTGACTAACCGGTACCTACCCTACAGGCCTACCTAGAGACTCTTTTGAAAG
GATGGTAGAGACCTGTCCGGGCTTTGCCCACAGTCGTTGGAAACCTCAGCATTTT
CTAGGCAACTTGTGCGAATAAAACACTTCGGGGGTCCTTCTTGTTCATTCCAATA
ACCTAAAACCTCTCCTCGGAGAAAATAGGGGGCCTCAAACAAACGAAATTCTCT
AGCCCGCTTTCCCCAGGATAAGGCAGGCATCCAAATGGAAAAAAAGGGGCCGGC
CGGGGGTCTCCTGTCAGCTCCTTGCCCTGTGAAACCCAGCAGGCCTGCCTGTCTT
CTGTCCTCTTGGGGCTGTCCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCC
CCGCCCCCTCGCCTGTGGCCGCCCTTTTCCTGGCAGGACAGAGGGATCCTGCAGC
TGTCAGGGGAGGGGCGCCGGGGGGTGATGTCAGGAGGGCTACAAATAGTGCAG
ACAGCTAAGGGGCTCCGTCACCCATCTTCACATCCACTCCAGCCGGCTGCCCGCC
[0835] CGCTGCCTCCTCTGTGCGTCCGCCCAGCCAGCCTCGTCCACGCCGCCACC

SEQ ID NO: 178
ACCAACGACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCG
GACCCCTGAAAGGTGTGGCCCTCAATAAAAATCTCGCATATGGCGACGGCCCTTG
GCAGTACATCAAAACCTTTCAGGGCAATCACGATAACCGACCCCAGCCAATAGC
ACCAACGACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCG
GACCCCTGAAAGGTGTGGCACTCCTTACCACGGTCCGTATAGCCCAAACTACATG
ACGGTTCCCAGCCAATAGCCGCTCTAAAAATAACTCCCGGCAGCGGTATAAACC
CACAGCGCTCTAAAAATAACTCCCCCGGCAGCGGTATAGGGCCCCTCCCTGGGG
ACAGCCCCAACCTTTCAGGGCAATCACGGTCCGCCCGGTAAATGGCACCCTCAAT
AAAAATCTCGCATCCCTTTGGACTTCGGCCCCATTGACGTCAATGGGGTCCAAAA
AATATATCAGGGGCTTCAGGTTTCCCTACAAGGCCTGGGGACAACCCGATATGCC
TGGGTCCAAAAAATATATCAGGTGGTTCAGTCGT

SEQ ID NO: 179
ACAGGGGTCCGGAACGGCAGCGGTATAAACCCACAGTGGTTCAGTCGTCCGTCC
GTCGTCCACAACCGTCCAAAAAATATATCAGGAACTACATGACGGTTCACCAAC
GACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCGGACCCC
TGAAAGGTGTGGACCAACGACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACG
GACGACCCCTCGGACCCCTGAAAGGTGTGGGTCCAAAAAATATATCAGGGGACA
CCCGAGATGCCTGGTTAAACTACATGACGGTTCCCCCGACAGGGGTCCCTCCCCG
GGTAATAACTGCAGTTACCCG

SEQ ID NO: 180
ACCAACGACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCG
GACCCCTGAAAGGTGTGGCTTGGCAGTACATCAAGCCCATTGACGTCAATAATCT
TGGCAGTACATCAAACCAACGACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGA
CGGACGACCCCTCGGACCCCTGAAAGGTGTGGACCAACGACTGATTAACTCTAC
GTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCGGACCCCTGAAAGGTGTGGGTCC
AAAAAATATATCAGGCAAGGCCTGGGGACA

SEQ ID NO: 181
GCGGCCGCATCGATATTCGTAAACGCGTTCCTTGACACCTCTGTCTCCTCAGGTG
CCTGGCTCCCAGTCCCCAGAACGCCTCTCCTGTACCTTGCTTCCTAGCTGGGCCTT
TCCTTCTCCTCTATAAATACCAGCTCTGGTATTTCGCCTTGGCAGCTGTTGCTGCT
AGGGCGCGCCGTTTAAACCACGTGCTCGAGAGCAGCCACTACGGGTCTAGGCTG
CCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAAC
CCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCACAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCAC
CCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAA
ATAACCCTGTCGACACGTGTCTAGACTGATCAATCAAGGCTGTGGGGGACTGAG
GGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAA
AGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGAC
TCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATAC
AAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCC
CGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACAGC
CCCTCCTGGCTGATCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACTAGT
GGGCTGCCCTCAGTTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCC
AGCCAGGTACCCAGGTAGGGACTGGCCACCCCAGCCCACCTGTCCCAATGCTGA
[0836] CTTAGTGCAAGGCGAGCCAGCAAGGAGGGAGGACAGGTGGCAGTGGGGGGTGA

GGAGCATCTAAAAATAGCCACAAACTGAGTTCTTAAGTCTGAACCCGGTCTGCTC
GCAGGTACCGGTCCCAAAGGCCGCCACCGCTAGCGATATCGGATCCTCATGA

SEQ ID NO: 182
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTS
FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
PAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
GSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGY
STPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTI
ANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGR
SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSR
TQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW
TGATKYHLNGRDSLVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSV
MLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVY
LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGT
RYLTRNL

SEQ ID NO: 183
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTS
FGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQP
AKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVG
SSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYS
TPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTI
ANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVG
RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLS
KTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWP
GASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMI
TNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQ
GPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQ
YSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTR
YLTRNL

SEQ ID NO: 184
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA

SEQ ID NO: 185
GGCTGTTTTCATCCAGGTTGTG

SEQ ID NO: 186
TCTTAAGGACCTCCAAGG

SEQ ID NO: 187
GGGTGGGTTGCTTTACCTCTCTAG

SEQ ID NO: 188
[0837] TCACATCATGAGATTTAGTCACTTCC

SEQ ID NO: 189
TTGCTACTTCACAGTAACCACATGG

SEQ ID NO: 190
GGGTGGGTTGCTTTACCTCT

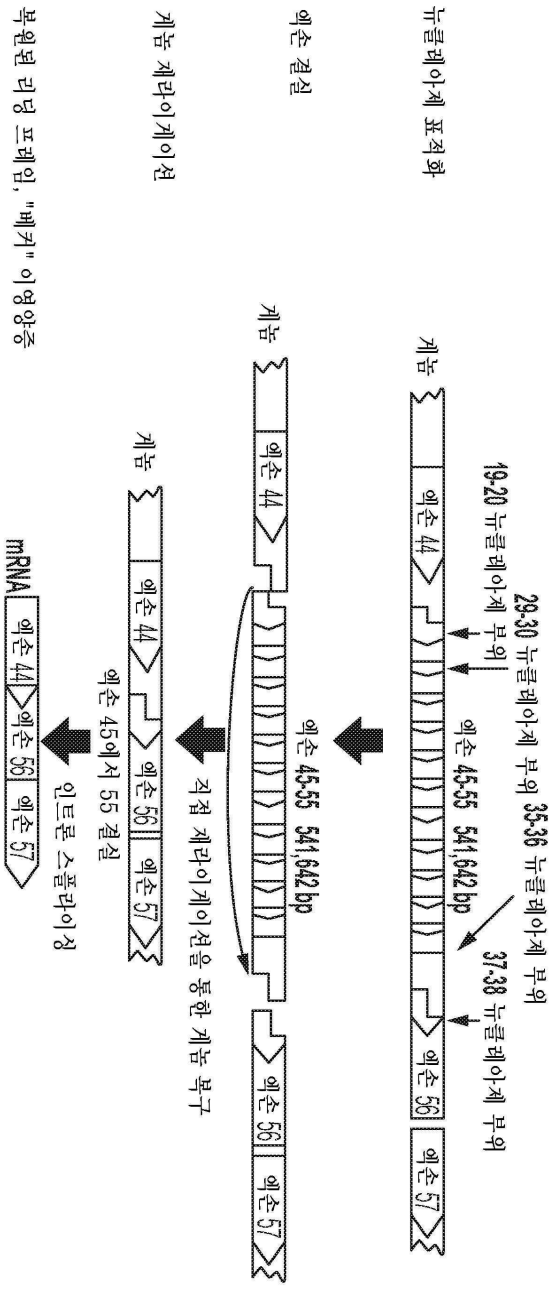
SEQ ID NO: 191
TCTGGATATCCTCTTCTGGG

SEQ ID NO: 192
ATCAGAAGGATTATGTATAGGAATA

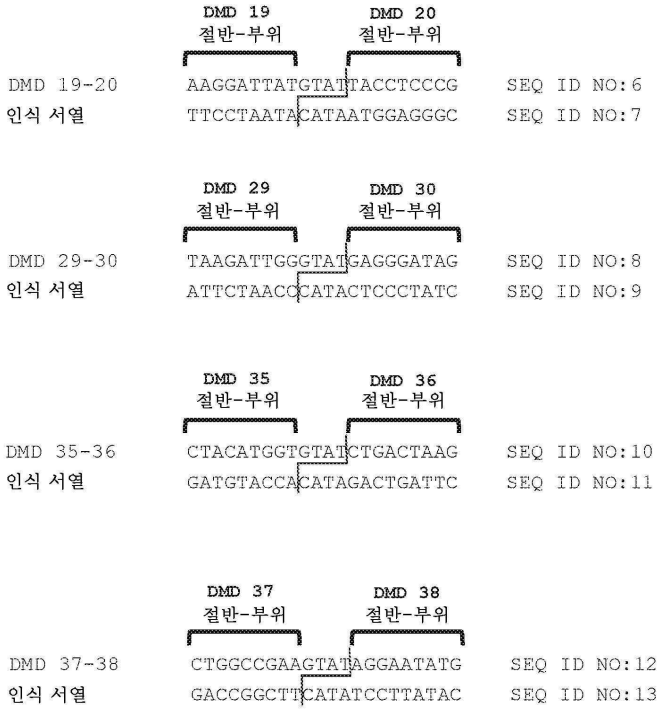
SEQ ID NO: 193
[0838] GCTATCTGGATATCCTCTTCTGGG

도면

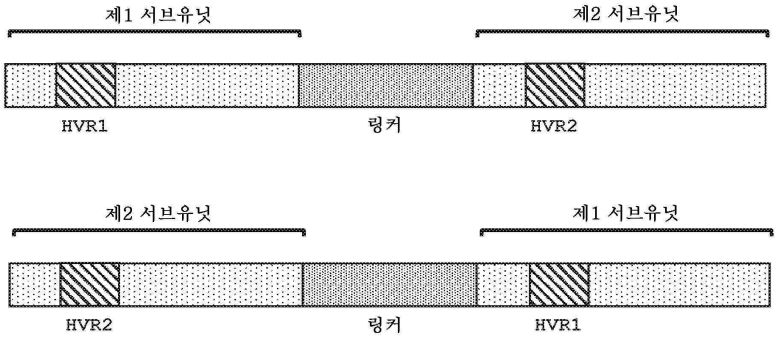
도면1


게놈
엑손 44
엑손 56
엑손 57
19-20 뉴클레아제 부위
29-30 뉴클레아제 부위
35-36 뉴클레아제 부위
37-38 뉴클레아제 부위
엑손 45-55 541,642 bp
뉴클레아제 표적화
엑손 결실
게놈 재라이게이션
복원된 리딩 프레임, "베커" 이영양증
직접 재라이게이션을 통한 게놈 복구
엑손 45에서 55 결실
인트론 스플라이싱
mRNA

도면2


DMD 19
절반-부위
DMD 20
절반-부위
DMD 19-20
AAGGATTATGTATTACCTCCCG
SEQ ID NO:6
인식 서열
TTCCTAATACATAATGGAGGGC
SEQ ID NO:7
DMD 29
절반-부위
DMD 30
절반-부위
DMD 29-30
TAAGATTGGGTATGAGGGATAG
SEQ ID NO:8
인식 서열
ATTCTAACCCATACTCCCTATC
SEQ ID NO:9
DMD 35
절반-부위
DMD 36
절반-부위
DMD 35-36
CTACATGGTGTATCTGACTAAG
SEQ ID NO:10
인식 서열
GATGTACCACATAGACTGATTC
SEQ ID NO:11
DMD 37
절반-부위
DMD 38
절반-부위
DMD 37-38
CTGGCCGAAGTATAGGAATATG
SEQ ID NO:12
인식 서열
GACCGGCTTCATATCCTTATAC
SEQ ID NO:13

도면3


제1 서브유닛
제2 서브유닛
HVR1
링커
HVR2
제2 서브유닛
제1 서브유닛
HVR2
링커
HVR1

도면4a

```
DMD 19-20x.13 (SEQ ID NO: 36)        MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYATIRPVQSTKFKHTLRLWFAVTQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20x.87 (SEQ ID NO: 37)        MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIFAVIEPVQSAKFKHRLKLSFVVTQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.249 (SEQ ID NO: 38)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYASIMPIQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.302 (SEQ ID NO: 39)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIIAFIMPSQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.329 (SEQ ID NO: 40)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFIMPTQTAKFKHRLKLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.374 (SEQ ID NO: 41)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQHMKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.375 (SEQ ID NO: 42)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQHLKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.431 (SEQ ID NO: 43)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFILPEQGLKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 19-20L.458 (SEQ ID NO: 44)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIMAFIMPDQAPKFKHRLRLQFAVAQKTQRRWFLDKLVD       60
                                     ************************** * * * *  **** * * * * ***************

DMD 19-20x.13 (SEQ ID NO: 36)        EIGVGYVYYDNGSVSWYYLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20x.87 (SEQ ID NO: 37)        EIGVGYVYYDQGSVSFYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.249 (SEQ ID NO: 38)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.302 (SEQ ID NO: 39)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.329 (SEQ ID NO: 40)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.374 (SEQ ID NO: 41)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.375 (SEQ ID NO: 42)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.431 (SEQ ID NO: 43)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 19-20L.458 (SEQ ID NO: 44)       EIGVGYVYYDFGSVSYYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
                                     ********** **** * ** ************************************************

DMD 19-20x.13 (SEQ ID NO: 36)        KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20x.87 (SEQ ID NO: 37)        KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.249 (SEQ ID NO: 38)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.302 (SEQ ID NO: 39)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.329 (SEQ ID NO: 40)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.374 (SEQ ID NO: 41)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.375 (SEQ ID NO: 42)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.431 (SEQ ID NO: 43)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 19-20L.458 (SEQ ID NO: 44)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
                                     ************************************************************

DMD 19-20x.13 (SEQ ID NO: 36)        GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
DMD 19-20x.87 (SEQ ID NO: 37)        GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQTT       240
DMD 19-20L.249 (SEQ ID NO: 38)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
DMD 19-20L.302 (SEQ ID NO: 39)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEIGQKT       240
DMD 19-20L.329 (SEQ ID NO: 40)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
DMD 19-20L.374 (SEQ ID NO: 41)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
DMD 19-20L.375 (SEQ ID NO: 42)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
DMD 19-20L.431 (SEQ ID NO: 43)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
DMD 19-20L.458 (SEQ ID NO: 44)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSICACIVPRQDRKFKHQLRLFFEVGQKT       240
                                     ************************************************************ ** *

DMD 19-20x.13 (SEQ ID NO: 36)        KRRWFLDKLVDEIGVGYVEDTGRASRYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20x.87 (SEQ ID NO: 37)        RRRWFLDKLVDEIGVGYVFDKGSASMYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.249 (SEQ ID NO: 38)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.302 (SEQ ID NO: 39)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.329 (SEQ ID NO: 40)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.374 (SEQ ID NO: 41)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.375 (SEQ ID NO: 42)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.431 (SEQ ID NO: 43)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 19-20L.458 (SEQ ID NO: 44)       QRRWFLDKLVDEIGVGYVRDLGSASTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
                                     ****************** * * ** **** ***********************************

DMD 19-20x.13 (SEQ ID NO: 36)        EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20x.87 (SEQ ID NO: 37)        EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.249 (SEQ ID NO: 38)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.302 (SEQ ID NO: 39)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.329 (SEQ ID NO: 40)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.374 (SEQ ID NO: 41)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.375 (SEQ ID NO: 42)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.431 (SEQ ID NO: 43)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 19-20L.458 (SEQ ID NO: 44)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
                                     ******************************* ************************
```

도면4b

```
DMD 35-36x.63 (SEQ ID NO: 45)        MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36x.81 (SEQ ID NO: 46)        MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36L.195 (SEQ ID NO: 47)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36L.282 (SEQ ID NO: 48)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36L.349 (SEQ ID NO: 49)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36L.376 (SEQ ID NO: 50)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36L.457 (SEQ ID NO: 51)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIYACIKPHQQLKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 35-36L.469 (SEQ ID NO: 52)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIYACIKPHQELKFKHQLLLYFEVYQKTQRRWFLDKLVD       60
                                     ****************** ************ ****************************

DMD 35-36x.63 (SEQ ID NO: 45)        EIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36x.81 (SEQ ID NO: 46)        EIGVGYVIDSGSVSTYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36L.195 (SEQ ID NO: 47)       EIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36L.282 (SEQ ID NO: 48)       EIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36L.349 (SEQ ID NO: 49)       EIGVGYVADRGSVSEVRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36L.376 (SEQ ID NO: 50)       EIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36L.457 (SEQ ID NO: 51)       EIGVGYVADRGSVSEYRLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 35-36L.469 (SEQ ID NO: 52)       EIGVGYVADRGSVSEYRLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
                                     ******* * **** **** ****************************************

DMD 35-36x.63 (SEQ ID NO: 45)        KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36x.81 (SEQ ID NO: 46)        KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36L.195 (SEQ ID NO: 47)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36L.282 (SEQ ID NO: 48)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36L.349 (SEQ ID NO: 49)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36L.376 (SEQ ID NO: 50)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36L.457 (SEQ ID NO: 51)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 35-36L.469 (SEQ ID NO: 52)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
                                     ************************************************************

DMD 35-36x.63 (SEQ ID NO: 45)        GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIMPTQWTKFKHSLLLRFRVTQST       240
DMD 35-36x.81 (SEQ ID NO: 46)        GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQLVKFKHTLLLRFRVTQAT       240
DMD 35-36L.195 (SEQ ID NO: 47)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQLVKFKHTLLLRFRVCQAT       240
DMD 35-36L.282 (SEQ ID NO: 48)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQAT       240
DMD 35-36L.349 (SEQ ID NO: 49)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQAT       240
DMD 35-36L.376 (SEQ ID NO: 50)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVTQAT       240
DMD 35-36L.457 (SEQ ID NO: 51)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQAT       240
DMD 35-36L.469 (SEQ ID NO: 52)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSTFASIIPSQEVKFKHTLLLRFRVCQAT       240
                                     ****************************************** * *  **** ******* * *

DMD 35-36x.63 (SEQ ID NO: 45)        RRRWFLDKLMDEIGVGYVSDQGRASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36x.81 (SEQ ID NO: 46)        KRRWFLDKLVDEIGVGYVTDNGRASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36L.195 (SEQ ID NO: 47)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36L.282 (SEQ ID NO: 48)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36L.349 (SEQ ID NO: 49)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36L.376 (SEQ ID NO: 50)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVSDVGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36L.457 (SEQ ID NO: 51)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVSDRGSASYYTLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
DMD 35-36L.469 (SEQ ID NO: 52)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVSDQGSASYYTLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII       300
                                     ******** ******** * * ******** ****************************

DMD 35-36x.63 (SEQ ID NO: 45)        EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36x.81 (SEQ ID NO: 46)        EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36L.195 (SEQ ID NO: 47)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36L.282 (SEQ ID NO: 48)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36L.349 (SEQ ID NO: 49)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36L.376 (SEQ ID NO: 50)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36L.457 (SEQ ID NO: 51)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
DMD 35-36L.469 (SEQ ID NO: 52)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSRTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP     354
                                     ********************************************************
```

도면4c

```
DMD 37-38x.15 (SEQ ID NO: 53)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 37-38x.66 (SEQ ID NO: 54)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 37-38x.79 (SEQ ID NO: 55)       MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIVATIRPGQELKFKHGLRLRFYVCQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 37-38L.166 (SEQ ID NO: 56)      MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVASIAPAQDCKFKHRLRLRFFVSQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 37-38L.478 (SEQ ID NO: 57)      MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 37-38L.512 (SEQ ID NO: 58)      MNTKYNKEFLLYLAGFVDSDGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLDKLVD       60
DMD 37-38L.528 (SEQ ID NO: 59)      MNTKYNKEFLLYLAGFVDADGSIVARIEPAQDCKFKHRLRLQFFVSQKTQRRWFLDKLVD       60
                                    ********************* ****** * * *  **** *** * * **************

DMD 37-38x.15 (SEQ ID NO: 53)       EIGVGYVYTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 37-38x.66 (SEQ ID NO: 54)       EIGAGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 37-38x.79 (SEQ ID NO: 55)       EIGVGYVTDSGSVSRYELSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 37-38L.166 (SEQ ID NO: 56)      EIGVGYVSDSGSVSSYVLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 37-38L.478 (SEQ ID NO: 57)      EIGVGYVRDSGSVSSYDLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 37-38L.512 (SEQ ID NO: 58)      EIGVGYVRDSGSVSSYLLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
DMD 37-38L.528 (SEQ ID NO: 59)      EIGVGYVRDSGSVSSYNLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPD       120
                                    *** *** ****** * ** ****************************************

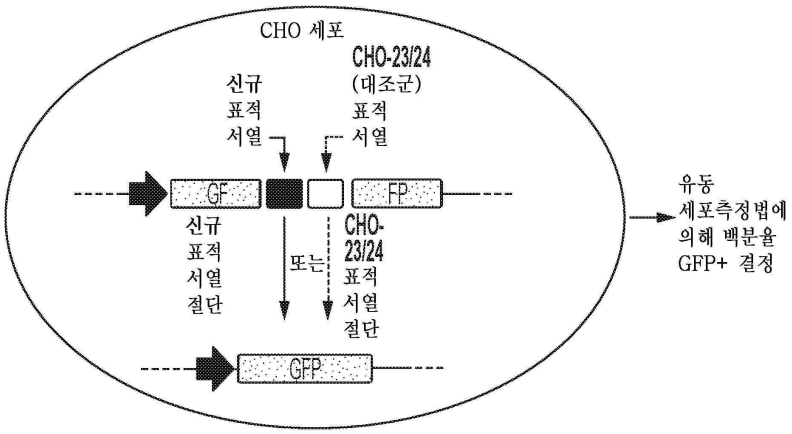
DMD 37-38x.15 (SEQ ID NO: 53)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 37-38x.66 (SEQ ID NO: 54)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 37-38x.79 (SEQ ID NO: 55)       KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 37-38L.166 (SEQ ID NO: 56)      KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 37-38L.478 (SEQ ID NO: 57)      KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 37-38L.512 (SEQ ID NO: 58)      KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
DMD 37-38L.528 (SEQ ID NO: 59)      KFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLPGSVGGLSPSQASSAASSASSSPGS       180
                                    ************************************************************

DMD 37-38x.15 (SEQ ID NO: 53)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVHQLT       240
DMD 37-38x.66 (SEQ ID NO: 54)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVHQKT       240
DMD 37-38x.79 (SEQ ID NO: 55)       GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVHQST       240
DMD 37-38L.166 (SEQ ID NO: 56)      GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVFQKT       240
DMD 37-38L.478 (SEQ ID NO: 57)      GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLHFRVFQKT       240
DMD 37-38L.512 (SEQ ID NO: 58)      GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVFQKT       240
DMD 37-38L.528 (SEQ ID NO: 59)      GISEALRAGAGSGTGYNKEFLLYLAGFVDGDGSIFACIRPSQRAKFKHVLQLCFRVFQKT       240
                                    ********************************************************* *** * *

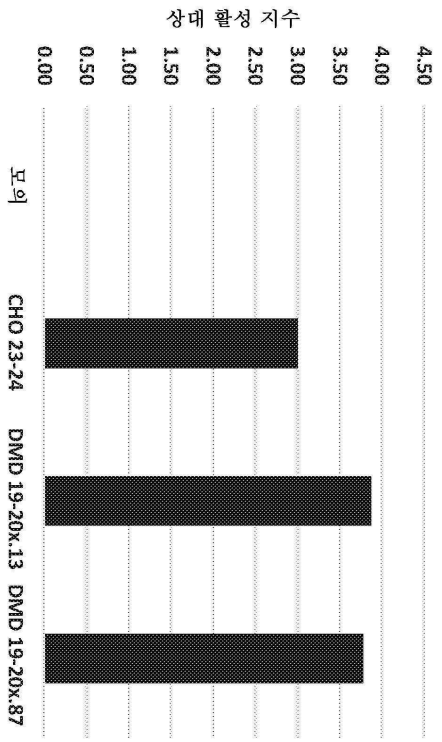
DMD 37-38x.15 (SEQ ID NO: 53)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVYVDCGSASFYHLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
DMD 37-38x.66 (SEQ ID NO: 54)       KRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGSASCYHLSEIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
DMD 37-38x.79 (SEQ ID NO: 55)       RRRWFLDKLVDEIGAGYVYDHGSASLYSLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
DMD 37-38L.166 (SEQ ID NO: 56)      QRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
DMD 37-38L.478 (SEQ ID NO: 57)      QRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
DMD 37-38L.512 (SEQ ID NO: 58)      QRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
DMD 37-38L.528 (SEQ ID NO: 59)      QRRWFLDKLVDEIGVGYVYDHGRASIYQLSQIKPLHNFLTQLQPFLKLKQKQANLVLKII      300
                                     ************ ***** * ** * ** ******************************

DMD 37-38x.15 (SEQ ID NO: 53)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
DMD 37-38x.66 (SEQ ID NO: 54)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
DMD 37-38x.79 (SEQ ID NO: 55)       EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
DMD 37-38L.166 (SEQ ID NO: 56)      EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
DMD 37-38L.478 (SEQ ID NO: 57)      EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
DMD 37-38L.512 (SEQ ID NO: 58)      EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
DMD 37-38L.528 (SEQ ID NO: 59)      EQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSHTRKTTSETVRAVLDSLSEKKKSSP      354
                                    ****************************** ************************
```

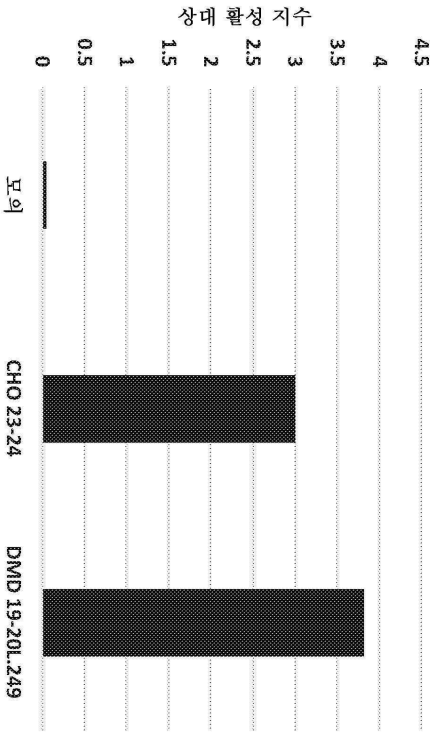
도면5



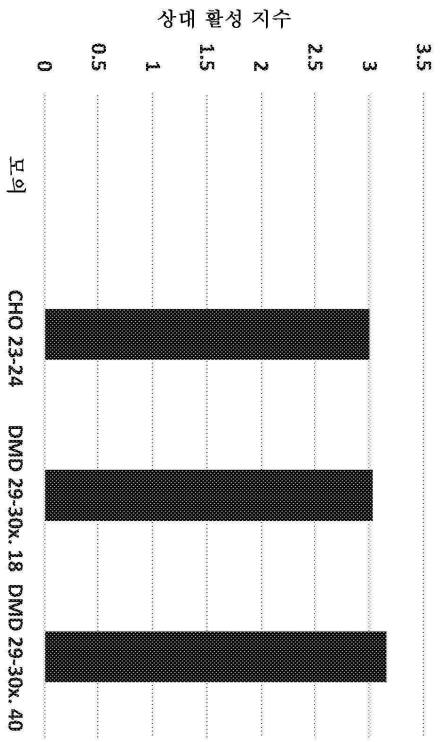
도면6a


상대 활성 지수
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
모의
CHO 23-24
DMD 19-20x.13
DMD 19-20x.87

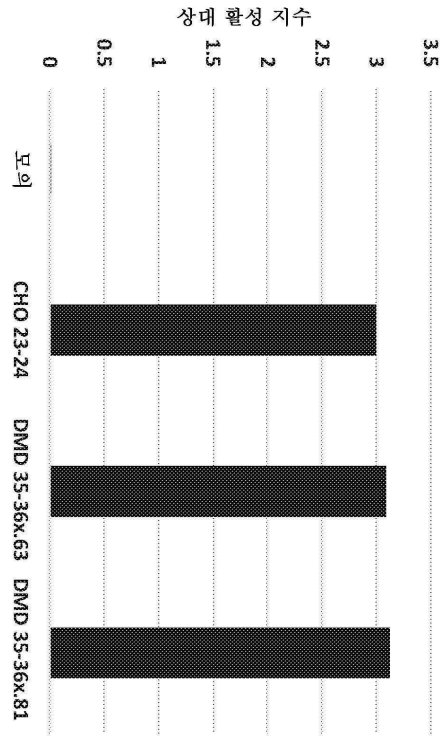
도면6b


상대 활성 지수
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
모의
CHO 23-24
DMD 19-20L.249

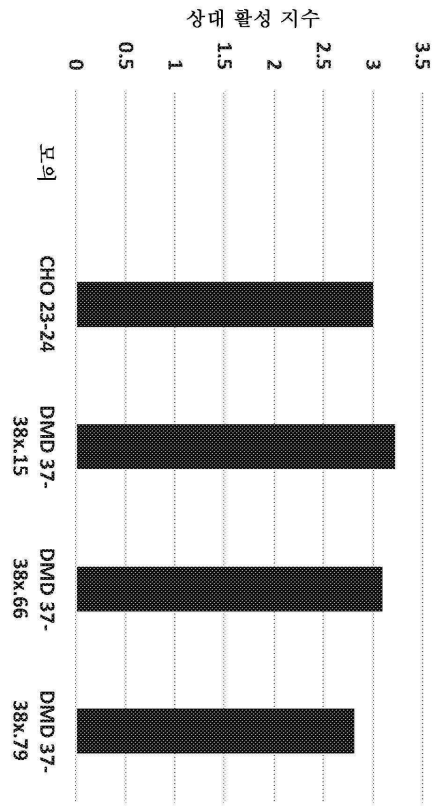
도면6c


상대 활성 지수
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
모의
CHO 23-24
DMD 29-30x. 18
DMD 29-30x. 40

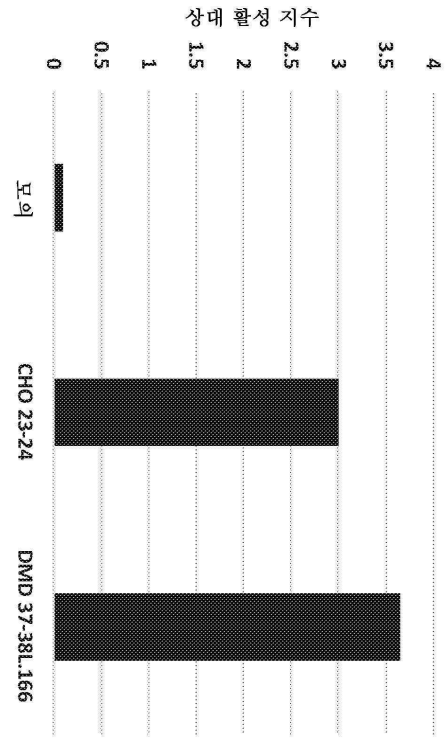
도면6d


상대 활성 지수
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
모의
CHO 23-24
DMD 35-36x.63
DMD 35-36x.81

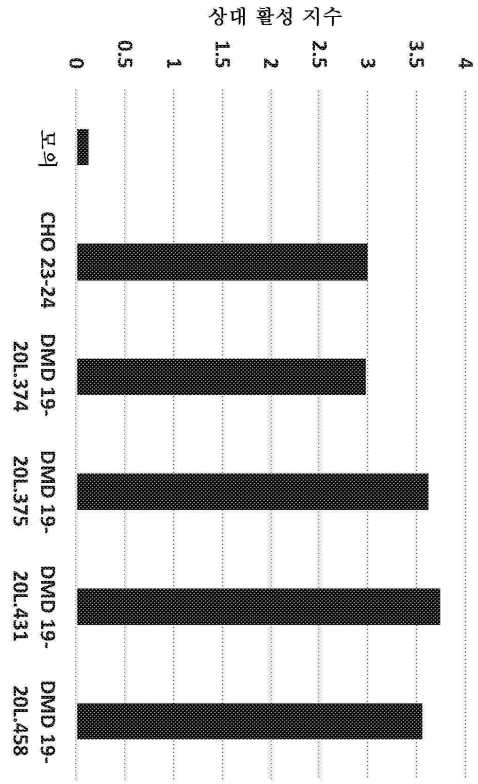
도면6e


상대 활성 지수
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
모의
CHO 23-24
DMD 37-38x.15
DMD 37-38x.66
DMD 37-38x.79

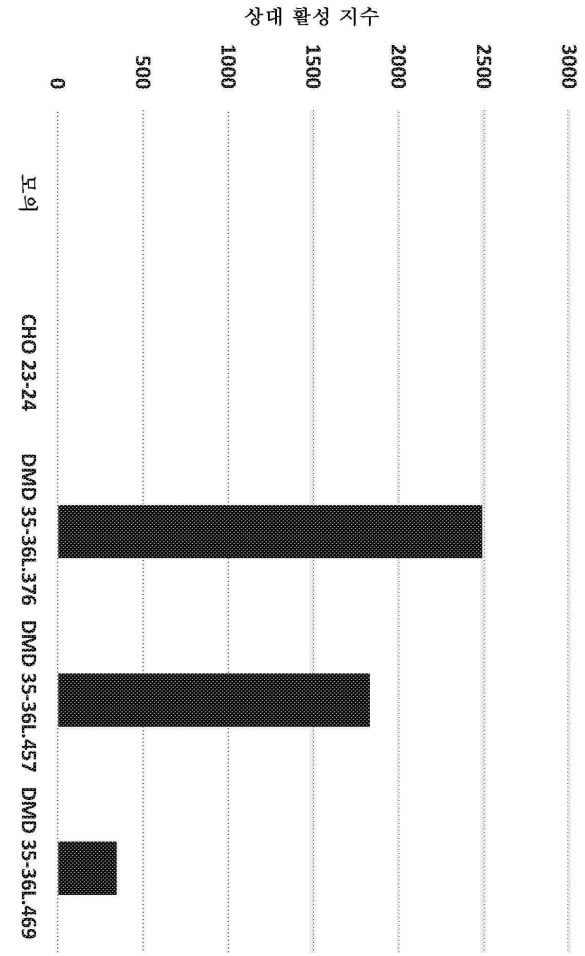
도면6f


상대 활성 지수
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
모의
CHO 23-24
DMD 37-38L.166

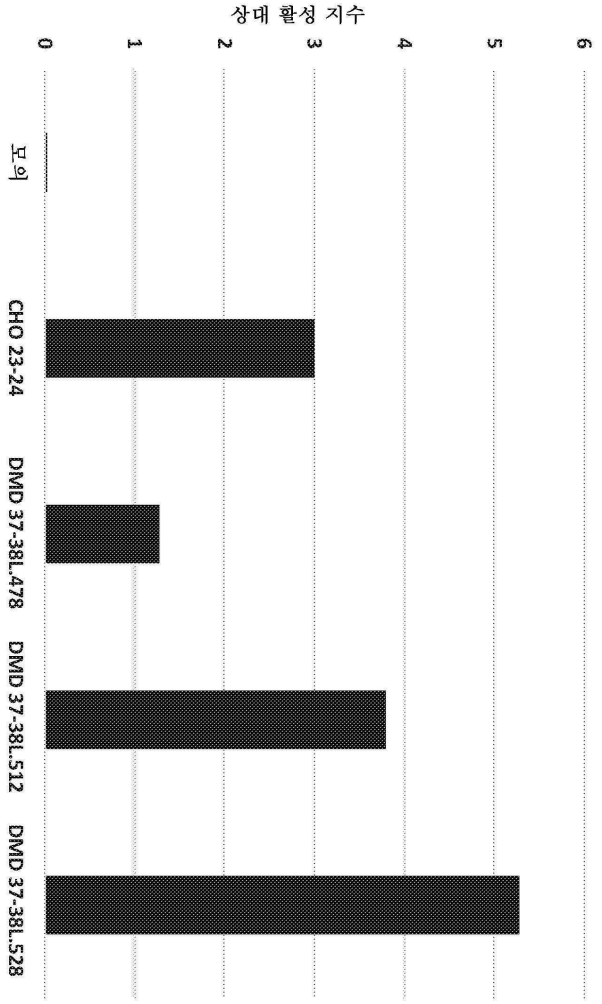
도면6g


상대 활성 지수
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
모의
CHO 23-24
DMD 19-20L.374
DMD 19-20L.375
DMD 19-20L.431
DMD 19-20L.458

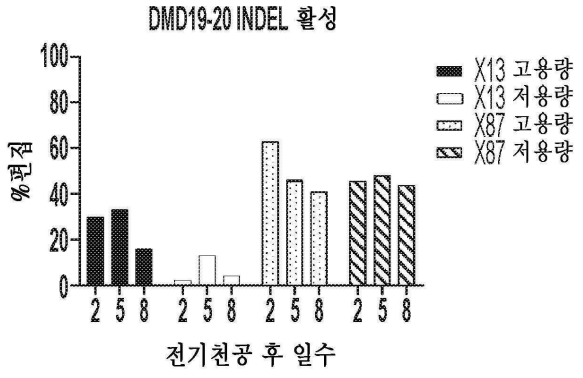
도면6h


상대 활성 지수
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
모의
CHO 23-24
DMD 35-36L.376
DMD 35-36L.457
DMD 35-36L.469

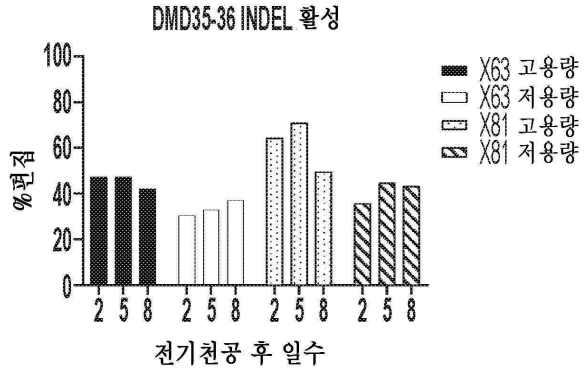
도면6i


상대 활성 지수
0
1
2
3
4
5
6
표식
CHO 23-24
DMD 37-38L478
DMD 37-38L512
DMD 37-38L528

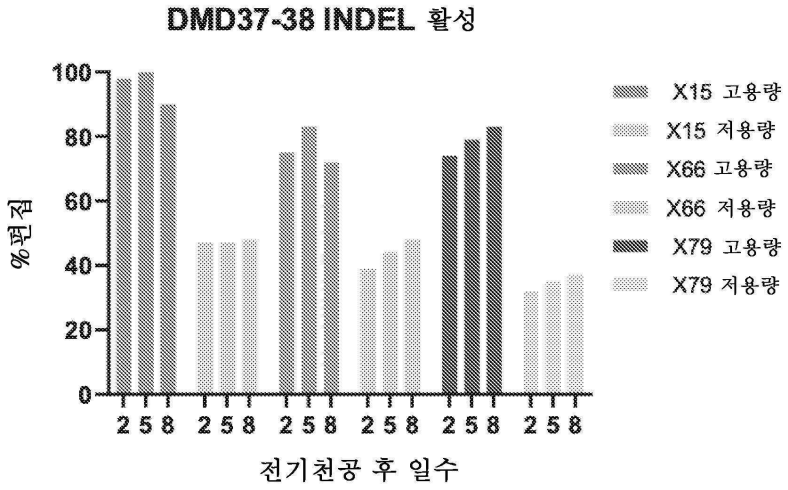
도면7a


DMD19-20 INDEL 활성
%편집
100
80
60
40
20
0
2 5 8 2 5 8 2 5 8 2 5 8
전기천공 후 일수
X13 고용량
X13 저용량
X87 고용량
X87 저용량

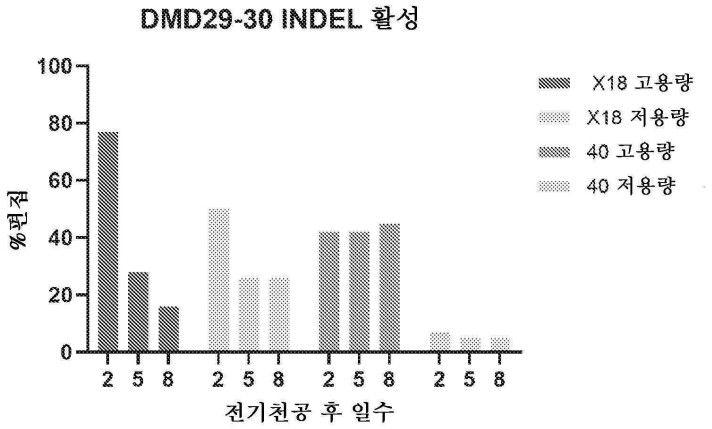
도면7b



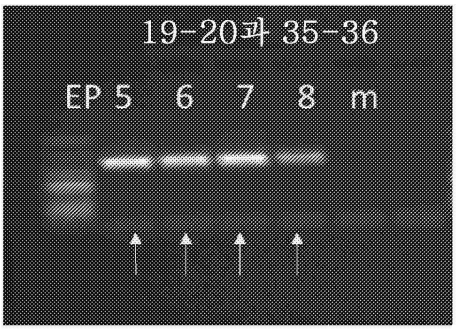
도면7c



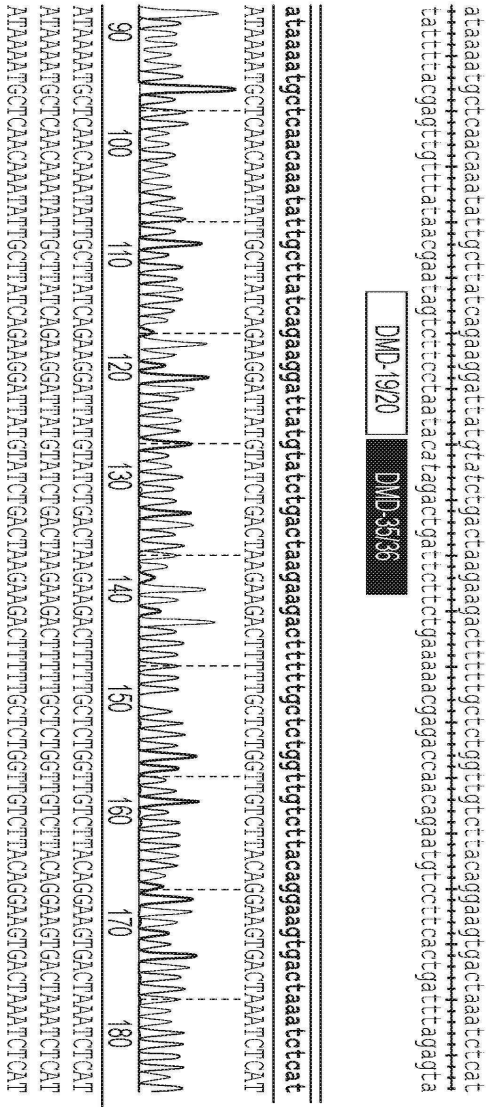
도면7d



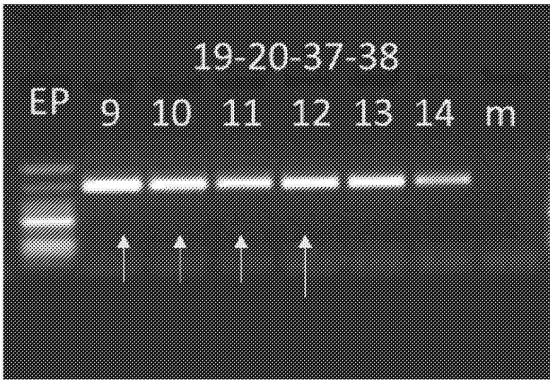
도면8a


19-20과 35-36
EP 5 6 7 8 m

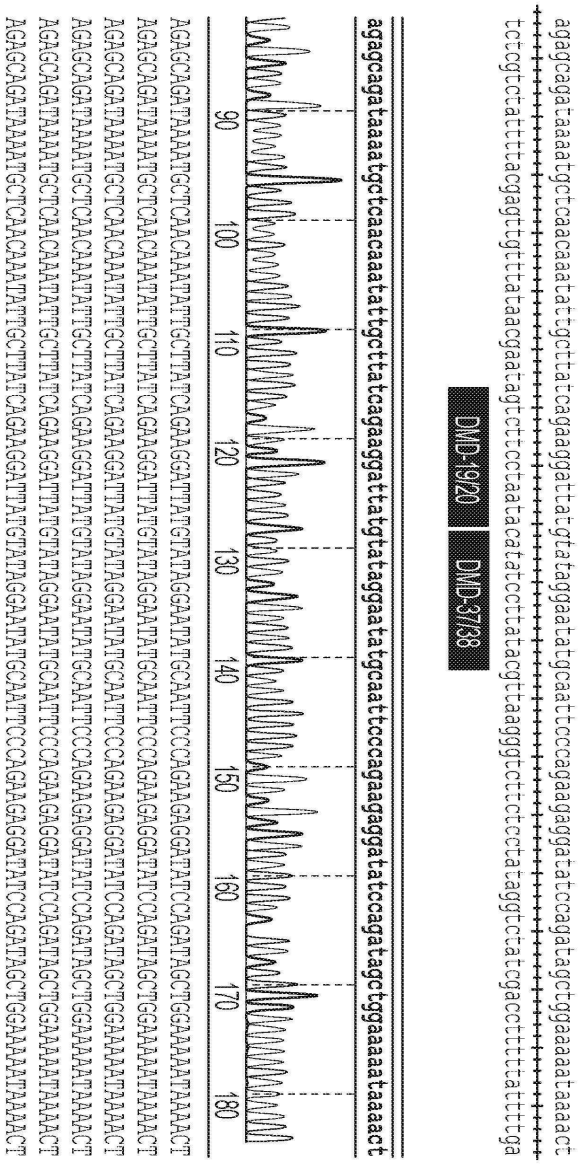
도면8b


DMD-19/20
DMD-35/36
90 100 110 120 130 140 150 160 170 180

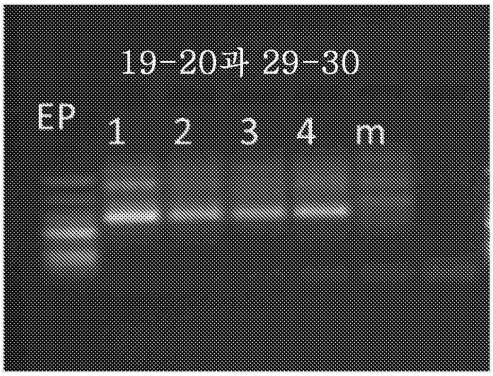
도면9a



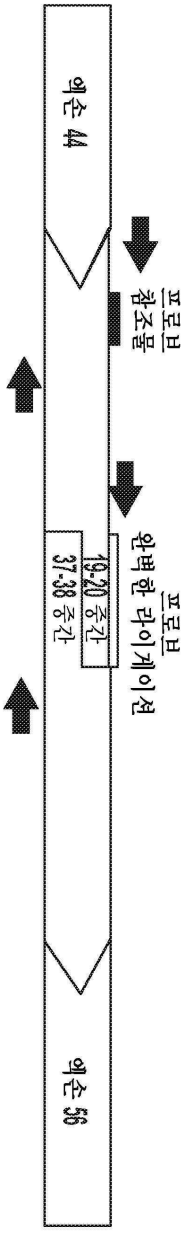
도면9b



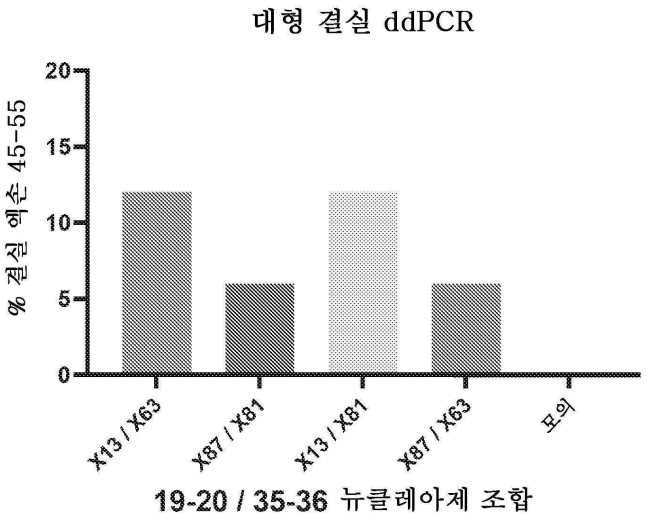
도면10


19-20과 29-30
EP
1
2
3
4
m

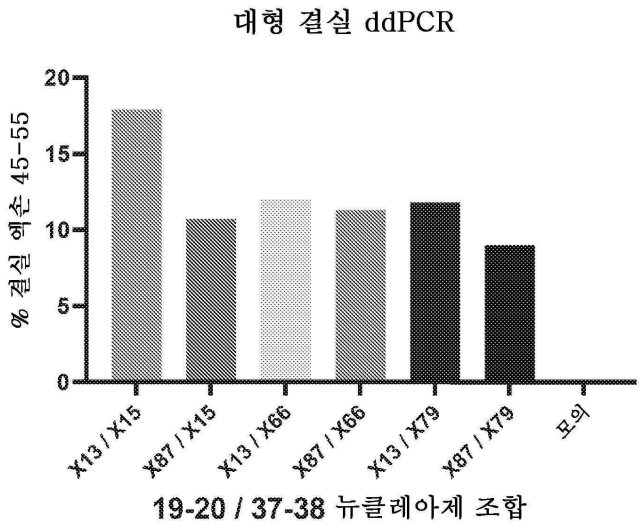
도면11


엑손 44
프로브
참조물
완벽한 라이게이션
프로브
19-20 중간
37-38 중간
엑손 56

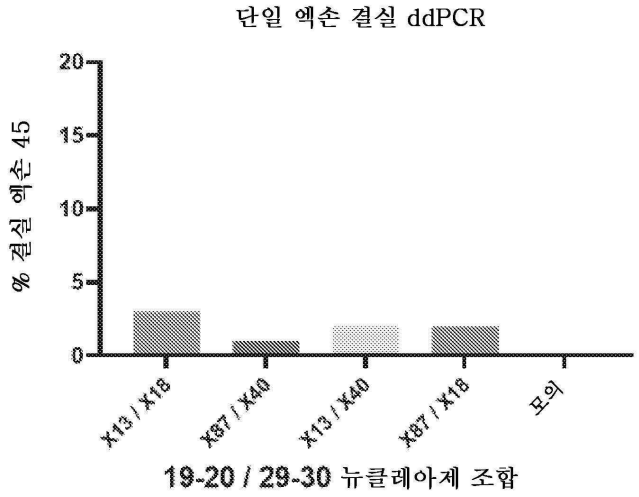
도면12a


대형 결실 ddPCR
% 결실 엑손 45-55
20
15
10
5
0
X13 / X63
X87 / X81
X13 / X81
X87 / X63
모의
19-20 / 35-36 뉴클레아제 조합

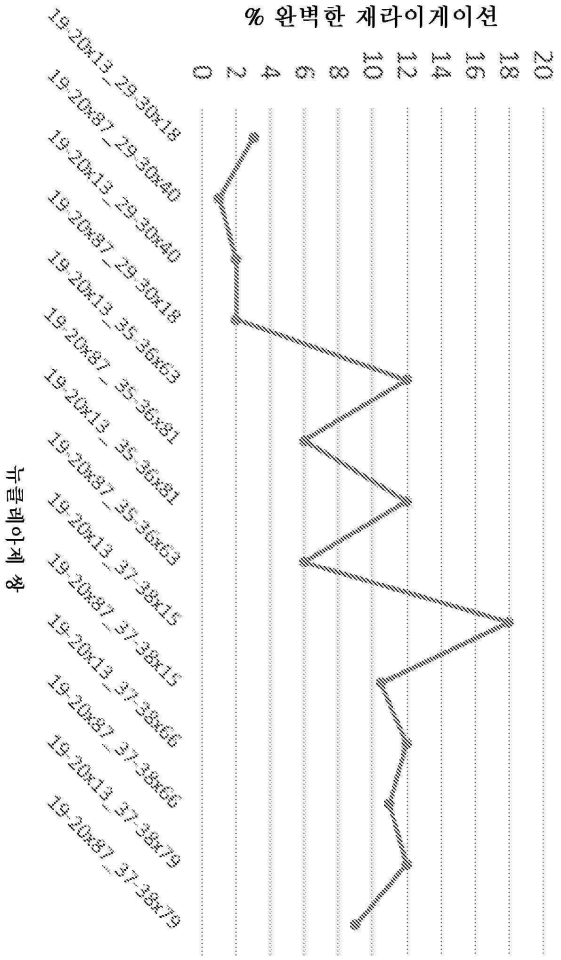
도면12b


대형 결실 ddPCR
% 결실 엑손 45-55
20
15
10
5
0
X13 / X15
X87 / X15
X13 / X66
X87 / X66
X13 / X79
X87 / X79
모의
19-20 / 37-38 뉴클레아제 조합

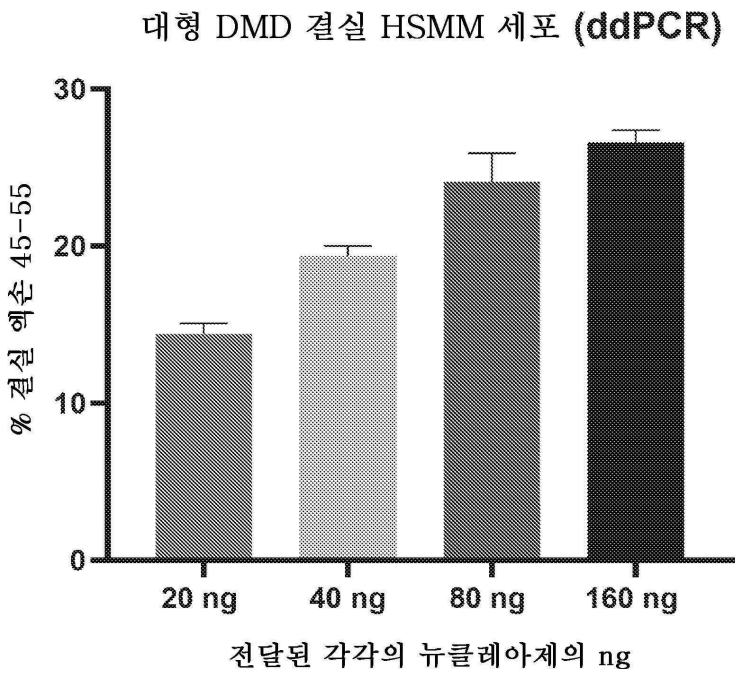
도면12c


단일 엑손 결실 ddPCR
% 결실 엑손 45
20
15
10
5
0
X13 / X18
X87 / X40
X13 / X40
X87 / X18
모의
19-20 / 29-30 뉴클레아제 조합

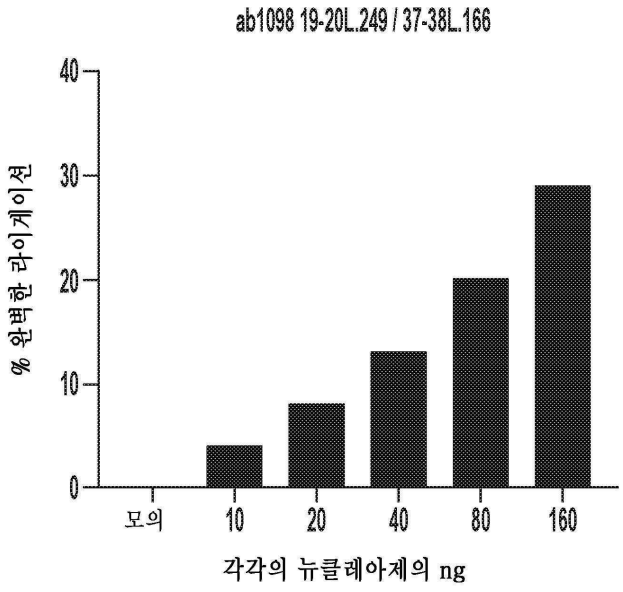
도면13


% 완벽한 재라이게이션
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
뉴클레아제 쌍
19-20x13_29-30x18
19-20x87_29-30x40
19-20x13_29-30x40
19-20x87_29-30x18
19-20x13_35-36x63
19-20x87_35-36x81
19-20x13_35-36x81
19-20x87_35-36x63
19-20x13_37-38x15
19-20x87_37-38x15
19-20x13_37-38x66
19-20x87_37-38x66
19-20x13_37-38x79
19-20x87_37-38x79

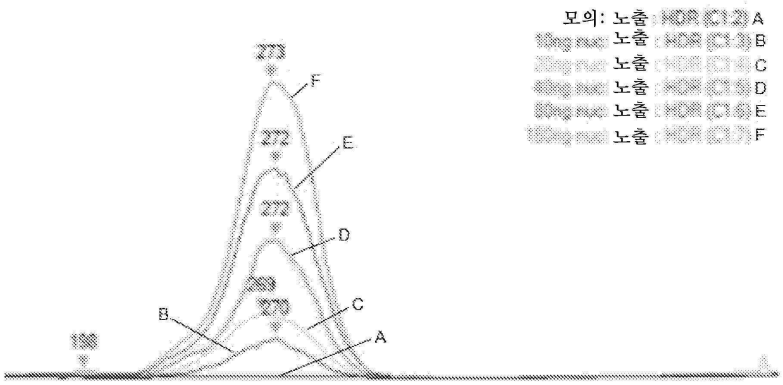
도면14


대형 DMD 결실 HSMM 세포 (ddPCR)
% 결실 엑손 45-55
30
20
10
0
20 ng
40 ng
80 ng
160 ng
전달된 각각의 뉴클레아제의 ng

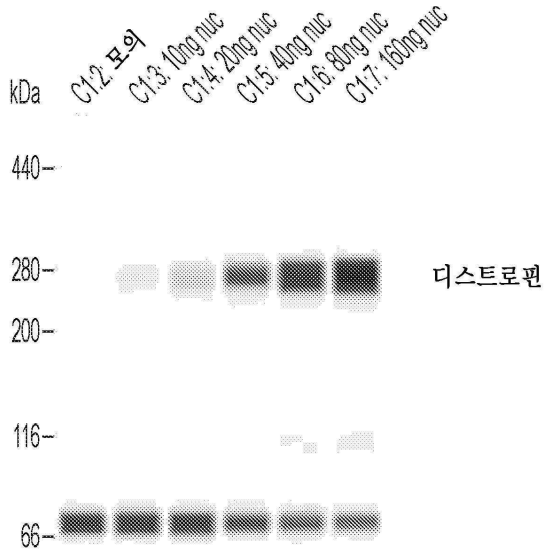
도면15


ab1098 19-20L.249 / 37-38L.166
% 완벽한 라이게이션
40
30
20
10
0
모의
10
20
40
80
160
각각의 뉴클레아제의 ng

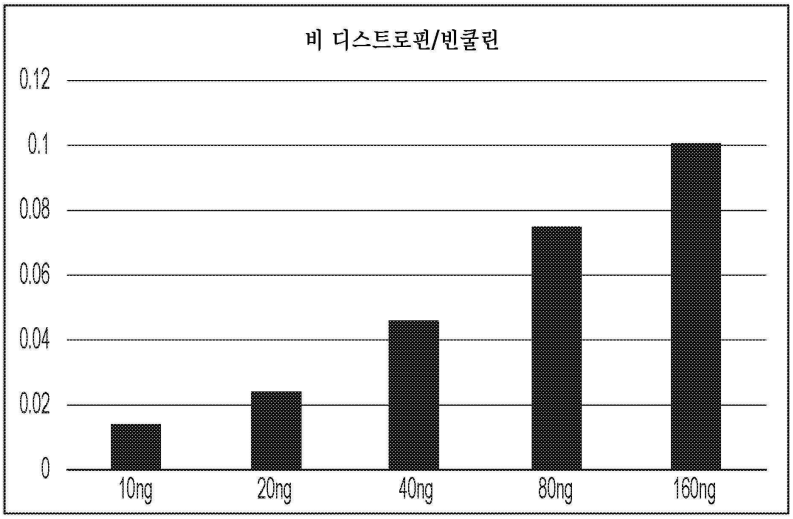
도면16a



도면16b

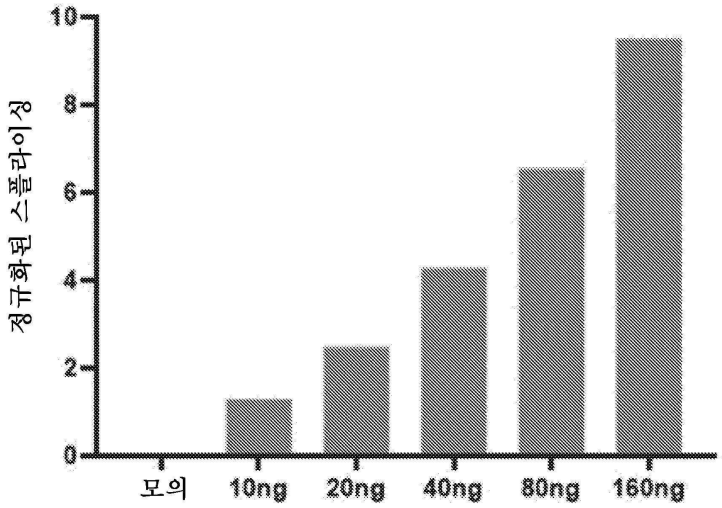


도면16c



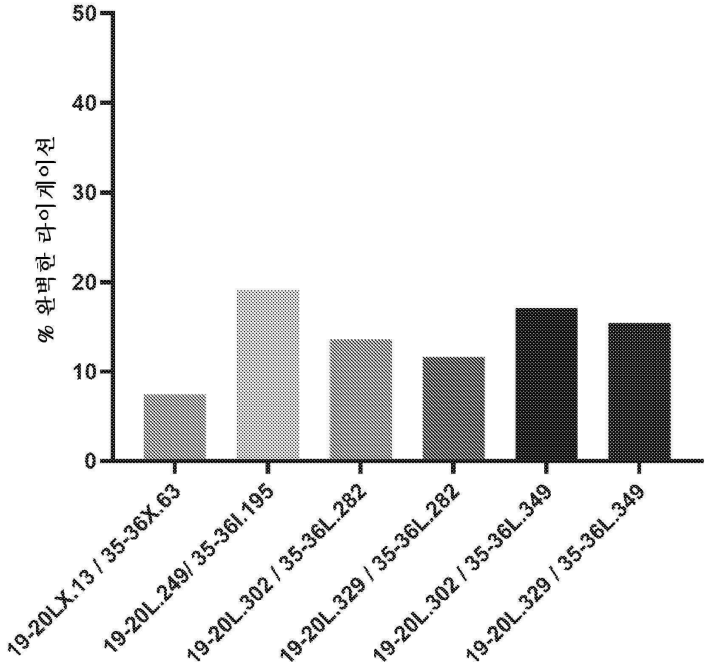
도면17

엑손 44 내지 56의 RNA 스플라이싱

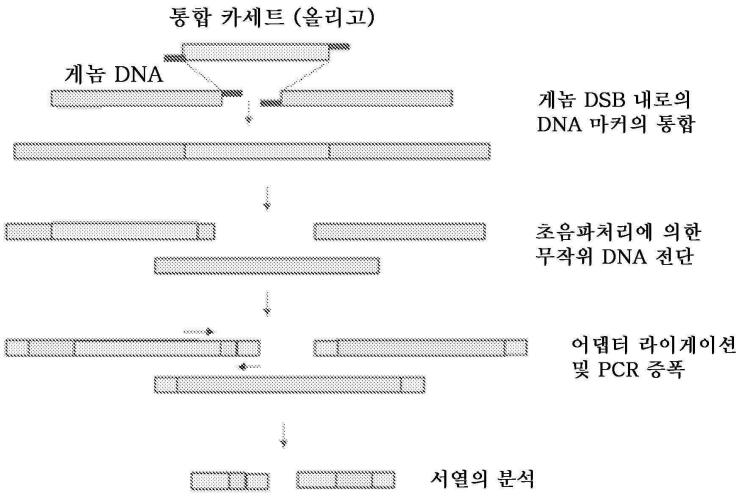


도면18

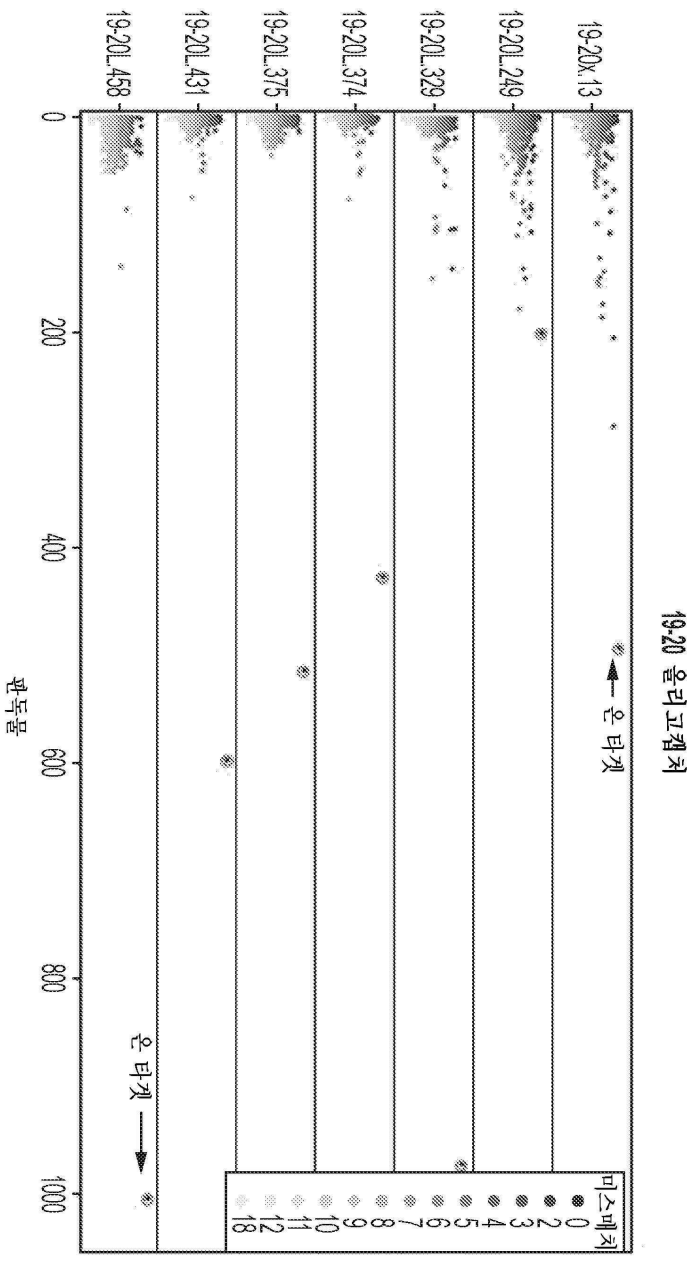
인간 근육 1차 세포주(ddPCR)



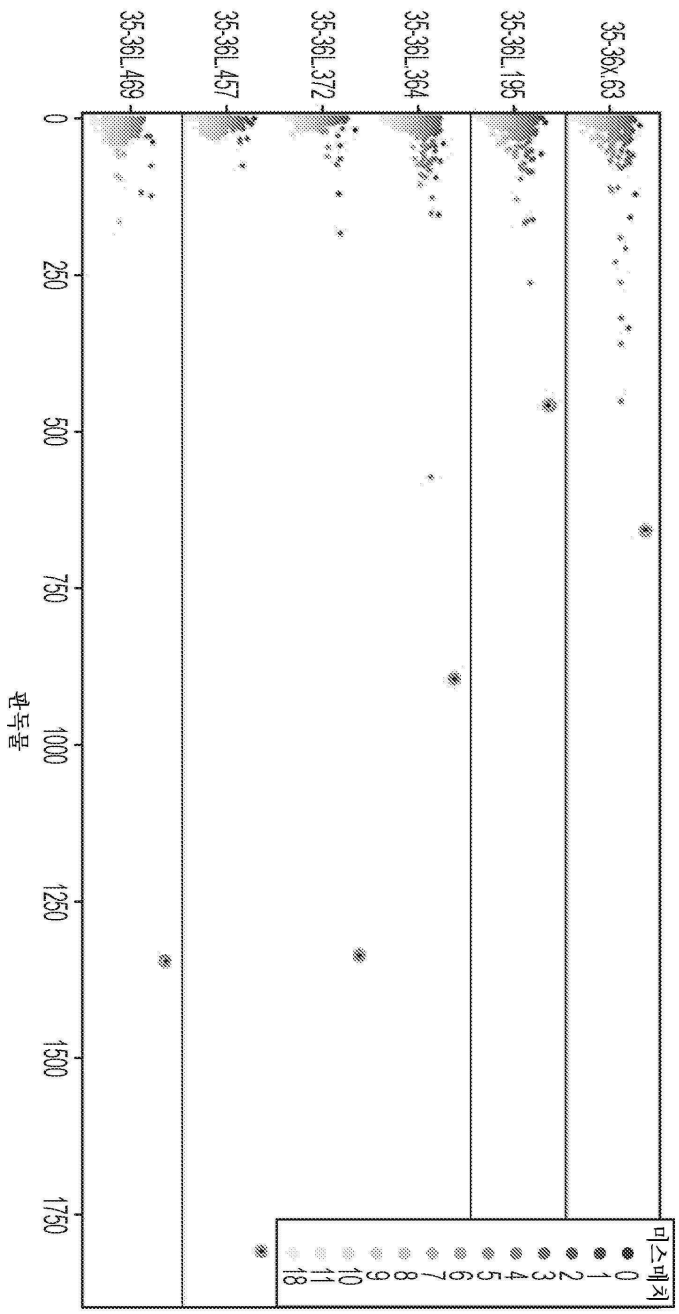
도면19


통합 카세트 (올리고)
게놈 DNA
게놈 DSB 내로의
DNA 마커의 통합
초음파처리에 의한
무작위 DNA 전단
어댑터 라이게이션
및 PCR 증폭
서열의 분석

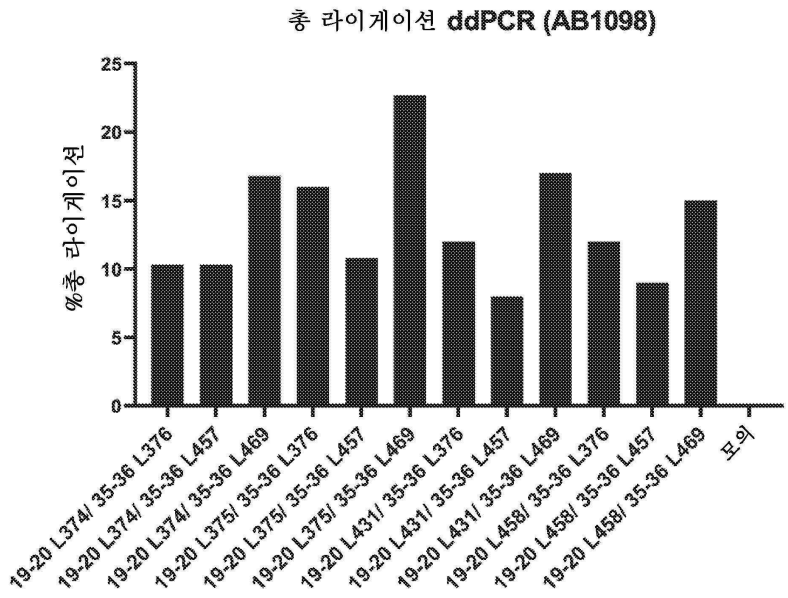
도면20


19-20 올리고캡처
19-20x.13
19-20L.249
19-20L.329
19-20L.374
19-20L.375
19-20L.431
19-20L.458
온 타겟
미스매치
0
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
18
0
200
400
600
800
1000
판독률
온 타겟

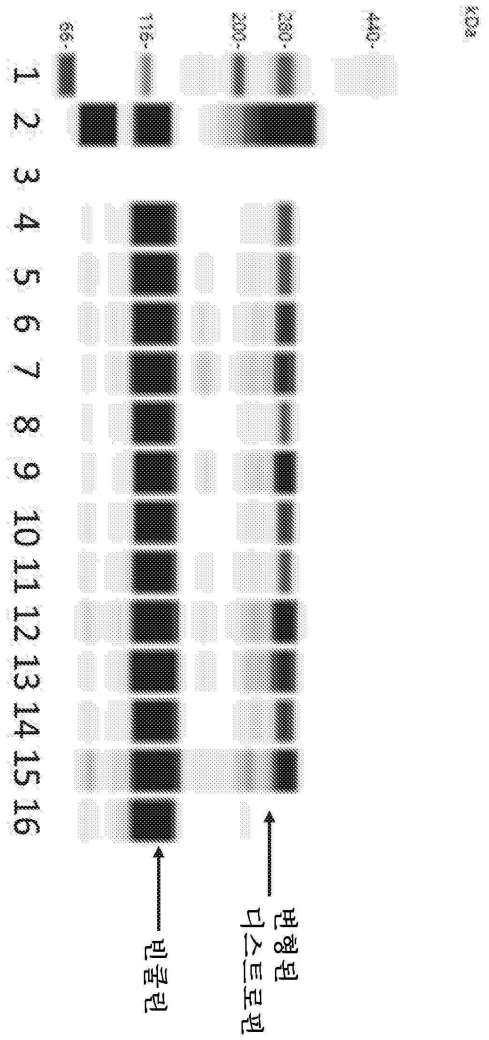
도면21


35-36x.63
35-36L.195
35-36L.364
35-36L.372
35-36L.457
35-36L.469
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
판독물
미스매치
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
18

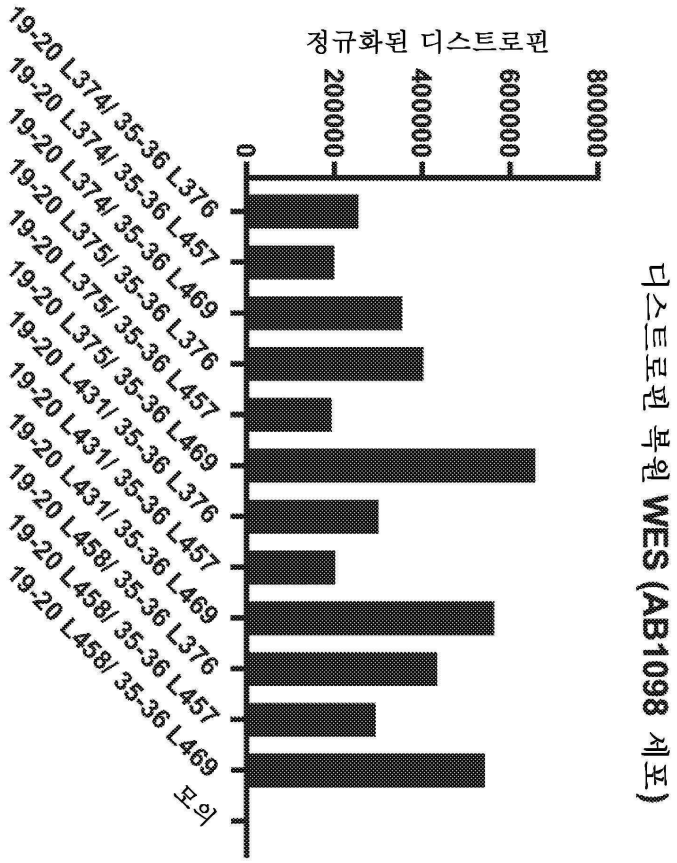
도면22


총 라이게이션 ddPCR (AB1098)
%총 라이게이션
25
20
15
10
5
0
19-20 L374/ 35-36 L376
19-20 L374/ 35-36 L457
19-20 L374/ 35-36 L469
19-20 L375/ 35-36 L376
19-20 L375/ 35-36 L457
19-20 L375/ 35-36 L469
19-20 L431/ 35-36 L376
19-20 L431/ 35-36 L457
19-20 L431/ 35-36 L469
19-20 L458/ 35-36 L376
19-20 L458/ 35-36 L457
19-20 L458/ 35-36 L469
모의

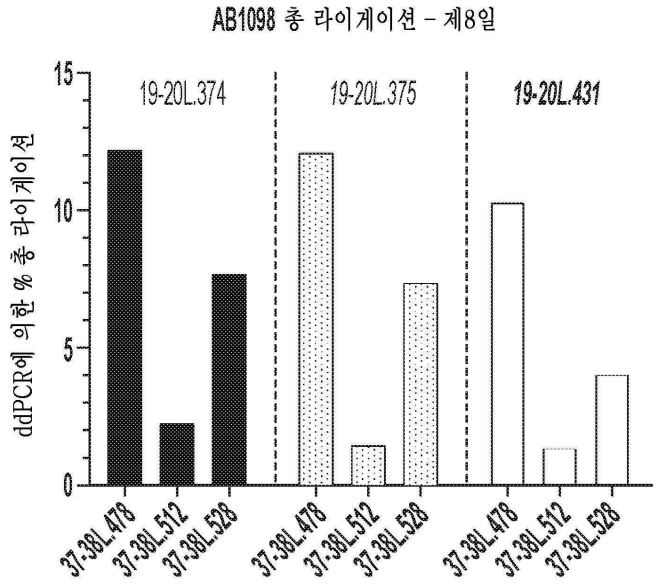
도면23a


kDa
440
230
200
116
66
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
변형된 디스트로핀
빈콜린

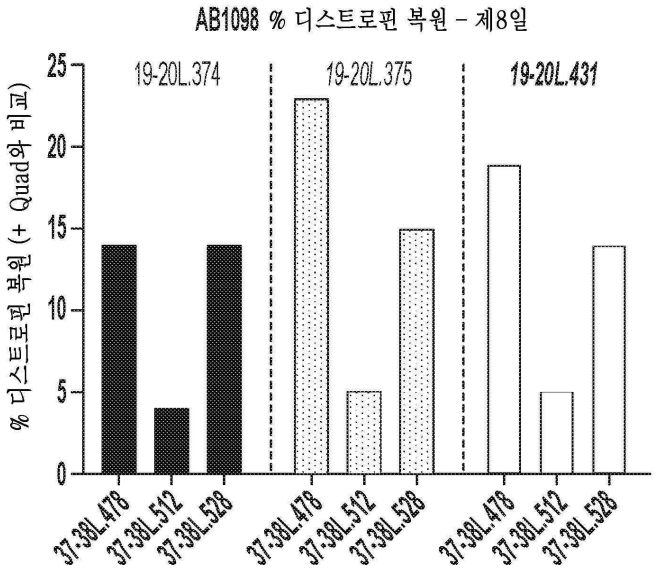
도면23b


정규화된 디스트로핀
0
200000
400000
600000
800000
19-20 L374/ 35-36 L376
19-20 L374/ 35-36 L457
19-20 L374/ 35-36 L469
19-20 L375/ 35-36 L376
19-20 L375/ 35-36 L457
19-20 L375/ 35-36 L469
19-20 L431/ 35-36 L376
19-20 L431/ 35-36 L457
19-20 L431/ 35-36 L469
19-20 L458/ 35-36 L376
19-20 L458/ 35-36 L457
19-20 L458/ 35-36 L469
모의
디스트로핀 복원 WES (AB1098 세포)

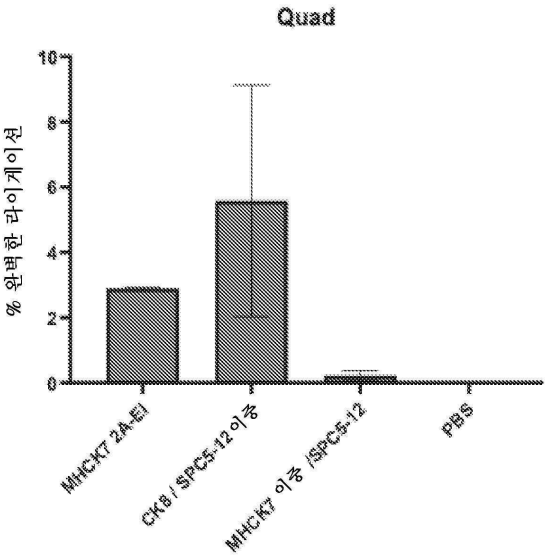
도면24a


AB1098 총 라이게이션 - 제8일
ddPCR에 의한 % 총 라이게이션
15
10
5
0
19-20L.374
19-20L.375
19-20L.431
37-38L.478
37-38L.512
37-38L.528
37-38L.478
37-38L.512
37-38L.528
37-38L.478
37-38L.512
37-38L.528

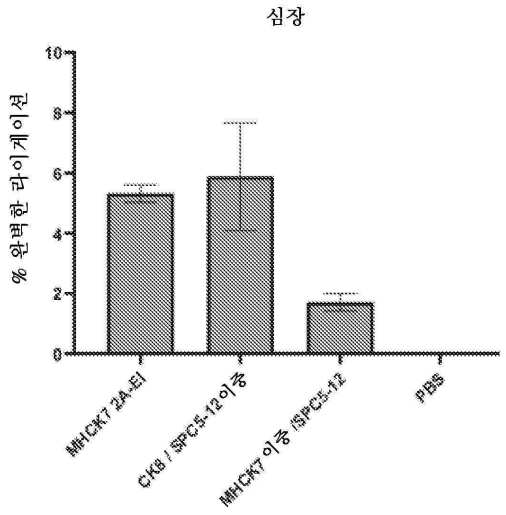
도면24b


AB1098 % 디스트로핀 복원 - 제8일
% 디스트로핀 복원 (+ Quad와 비교)
25
20
15
10
5
0
19-20L.374
19-20L.375
19-20L.431
37.38L.478
37.38L.512
37.38L.528
37.38L.478
37.38L.512
37.38L.528
37.38L.478
37.38L.512
37.38L.528

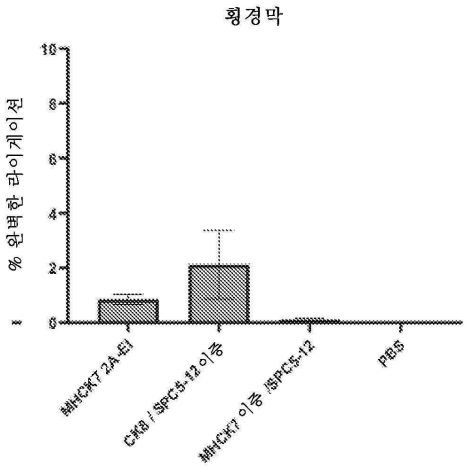
도면25a


Quad
% 완벽한 라이게이션
10
8
6
4
2
0
MHCK7 2A-EI
CK8 / SPC5-12 이중
MHCK7 이중 /SPC5-12
PBS

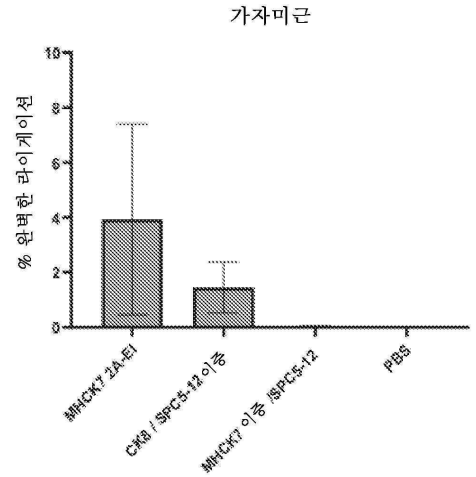
도면25b



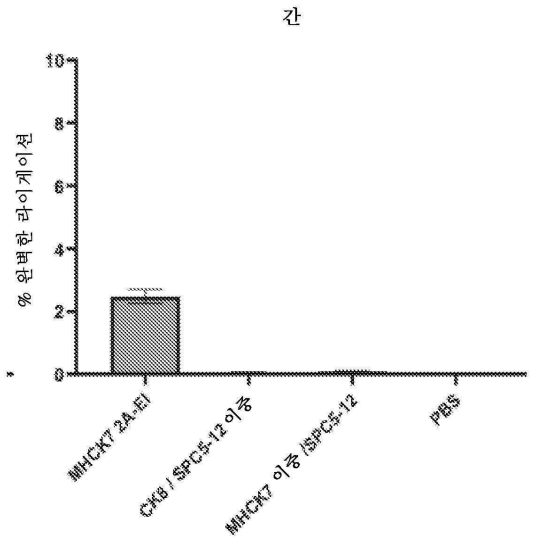
도면25c



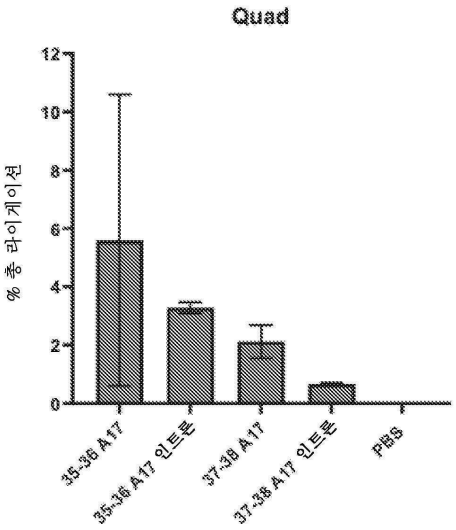
도면25d



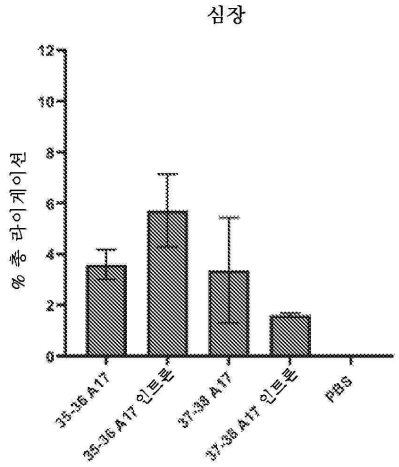
도면25e


간
% 완벽한 라이게이션
0
2
4
6
8
10
MHCK7 2A-EI
CK8 / SPC5-12 이중
MHCK7 이중 /SPC5-12
PBS

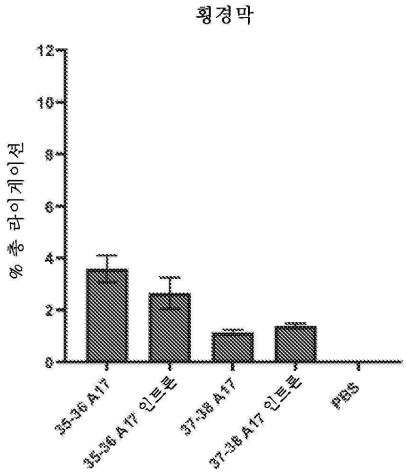
도면26a


Quad
% 총 라이게이션
0
2
4
6
8
10
12
35-36 A17
35-36 A17 인트론
37-38 A17
37-38 A17 인트론
PBS

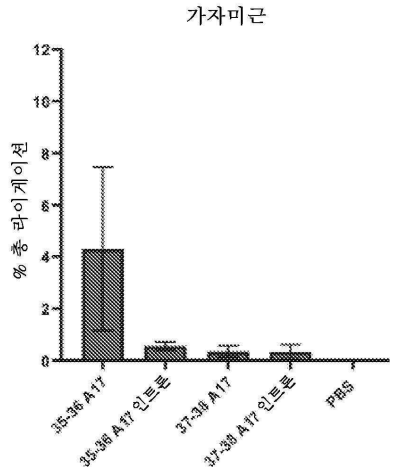
도면26b



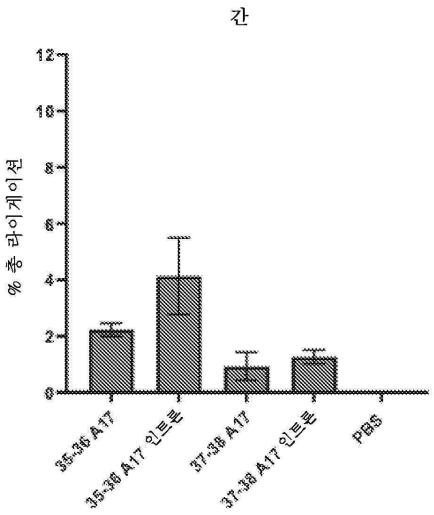
도면26c



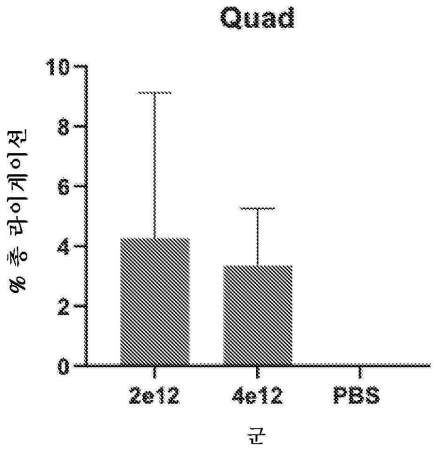
도면26d



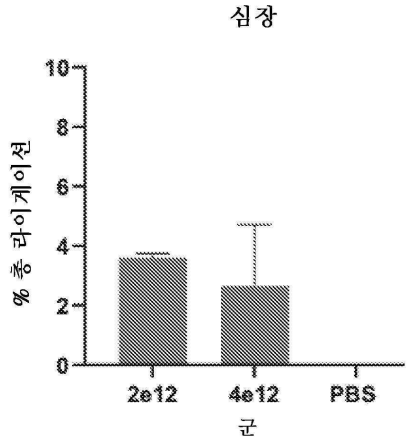
도면26e



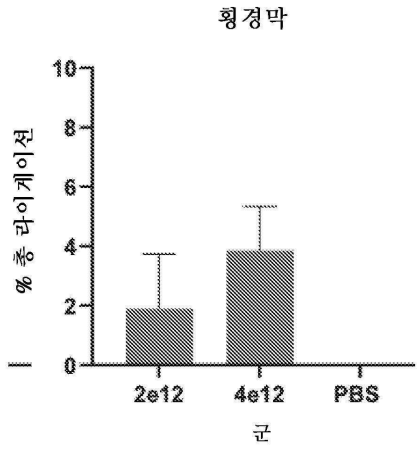
도면27a



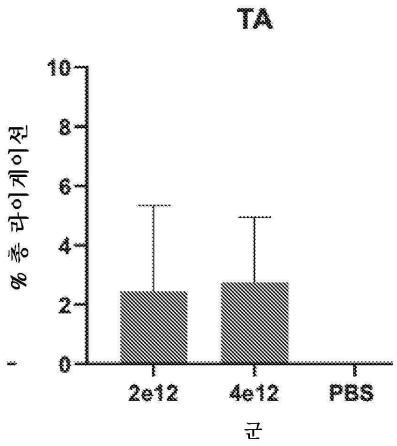
도면27b



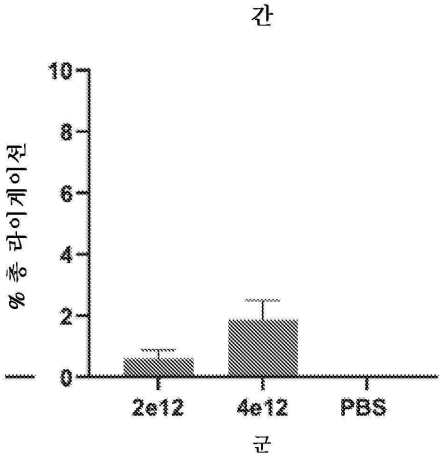
도면27c



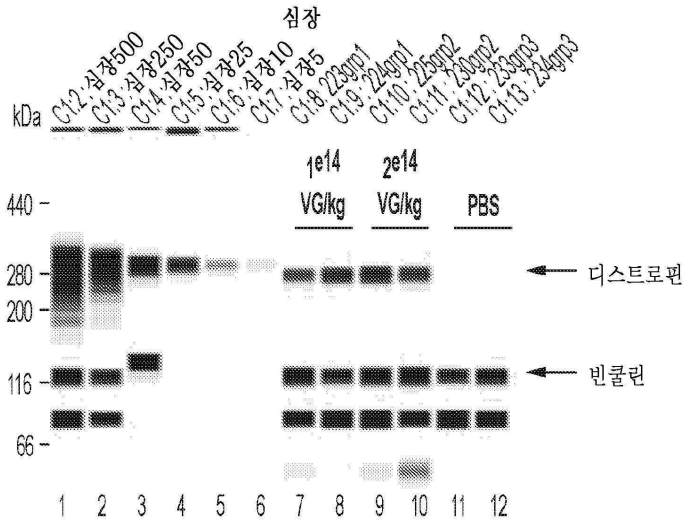
도면27d



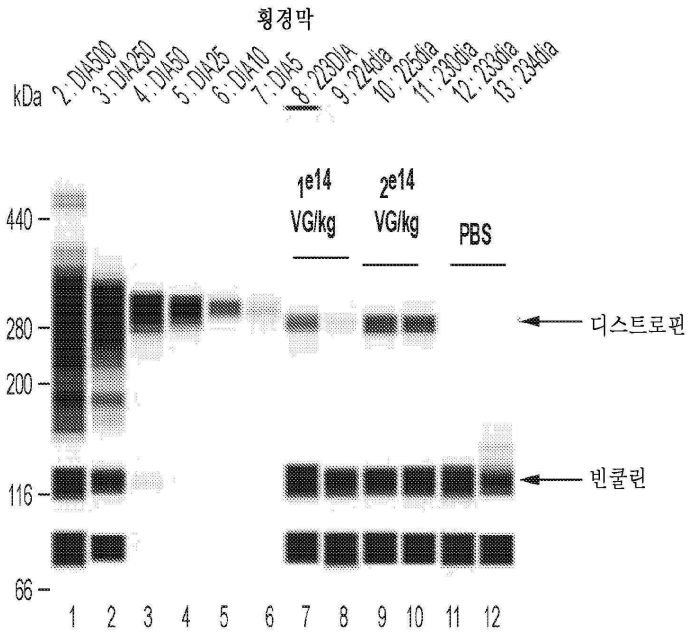
도면27e



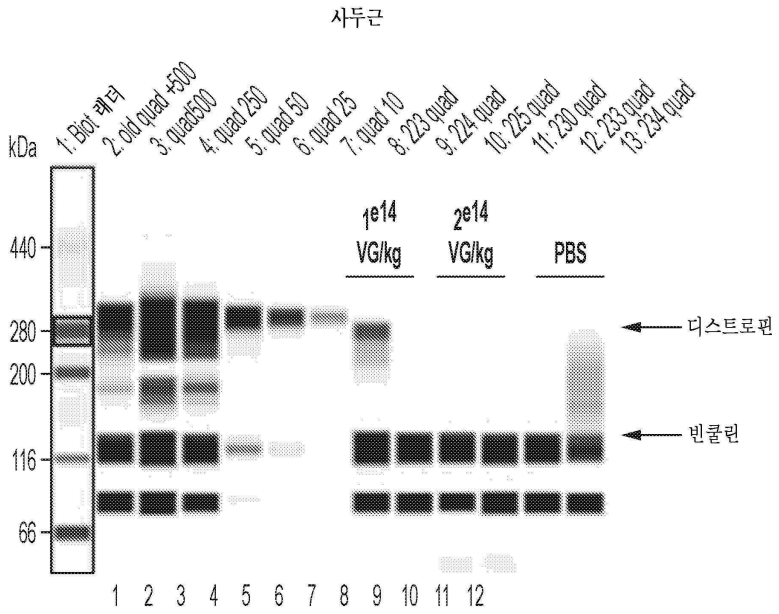
도면28a


심장
kDa
C1:2 :심장500
C1:3 :심장250
C1:4 :심장50
C1:5 :심장25
C1:6 :심장10
C1:7 :심장5
C1:8 :223grp1
C1:9 :224grp1
C1:10 :225grp2
C1:11 :230grp2
C1:12 :233grp3
C1:13 :234grp3
1e14 VG/kg
2e14 VG/kg
PBS
440
280
200
116
66
디스트로핀
빈쿨린
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

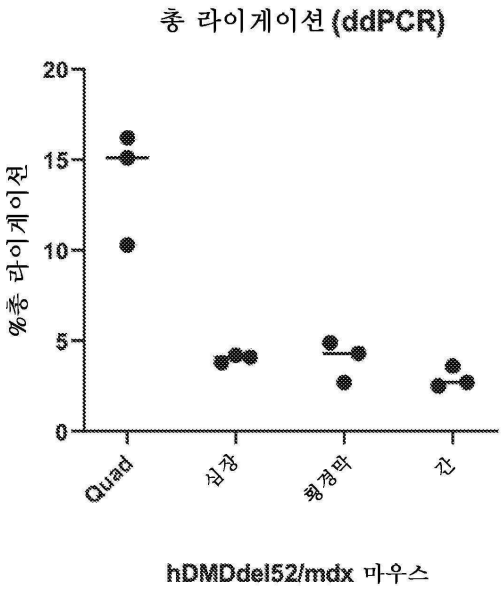
도면28b


횡경막
kDa
2: DIA500
3: DIA250
4: DIA50
5: DIA25
6: DIA10
7: DIA5
8: 223DIA
9: 224dia
10: 225dia
11: 230dia
12: 233dia
13: 234dia
1e14 VG/kg
2e14 VG/kg
PBS
440
280
200
116
66
디스트로핀
빈쿨린
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

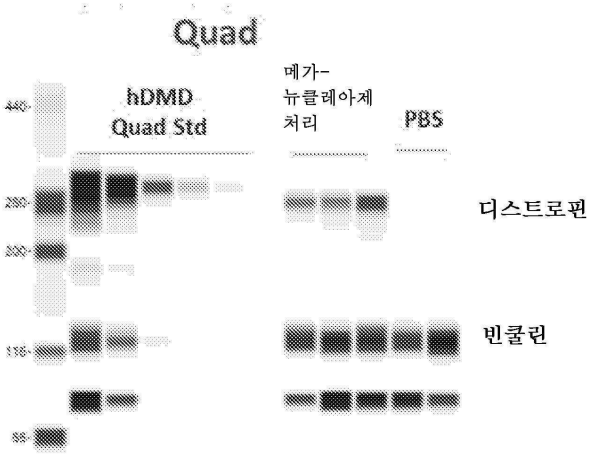
도면28c


사두근
kDa
1: Bio-Rad
2: old quad +500
3: quad500
4: quad 250
5: quad 50
6: quad 25
7: quad 10
8: 223 quad
9: 224 quad
10: 225 quad
11: 230 quad
12: 233 quad
13: 234 quad
1e14 VG/kg
2e14 VG/kg
PBS
440
280
200
116
66
디스트로핀
빈쿨린
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

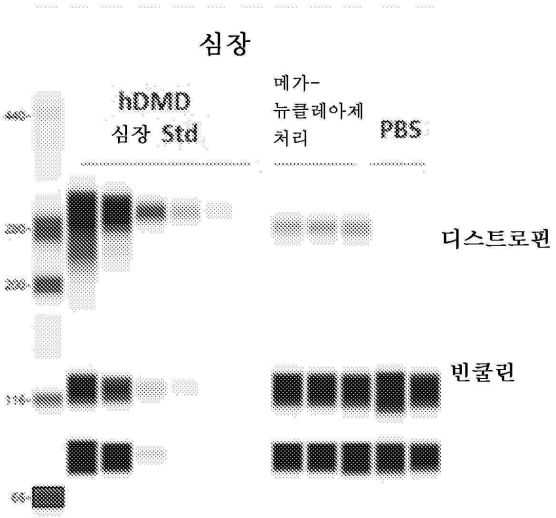
도면29


총 라이게이션 (ddPCR)
%총 라이게이션
20
15
10
5
0
Quad
심장
횡경막
간
hDMDdel52/mdx 마우스

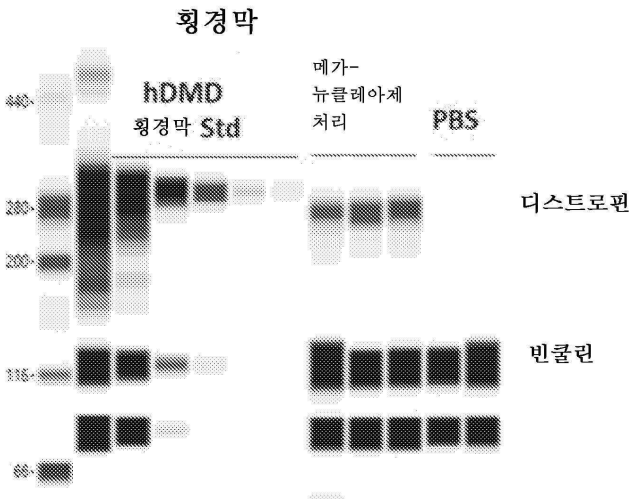
도면30a



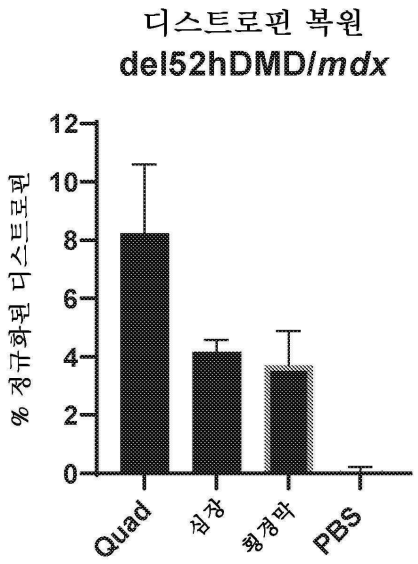
도면30b



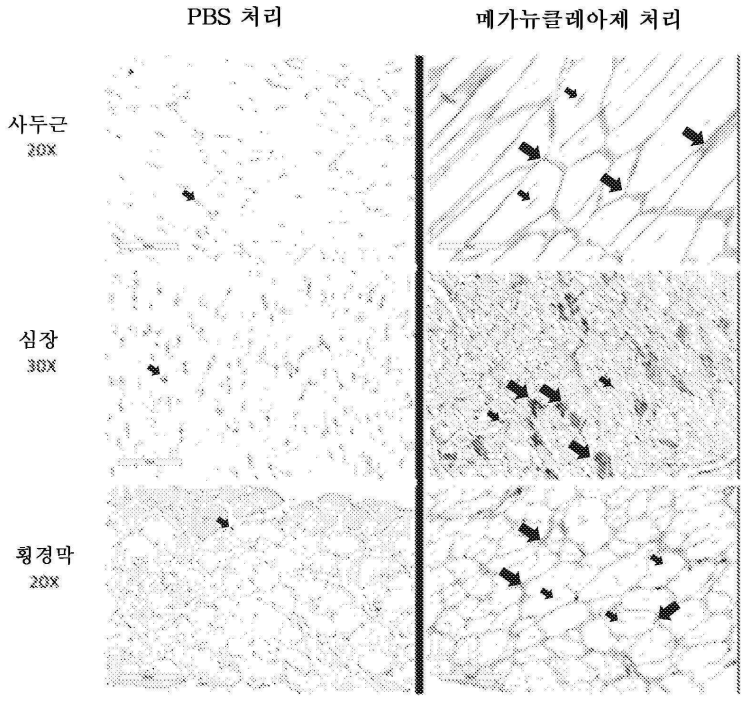
도면30c



도면31

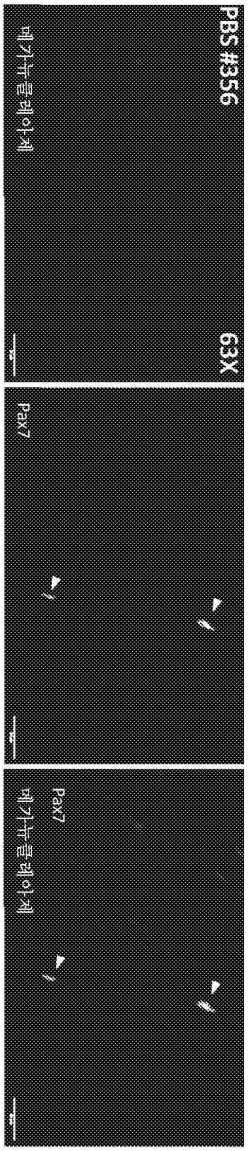


도면32

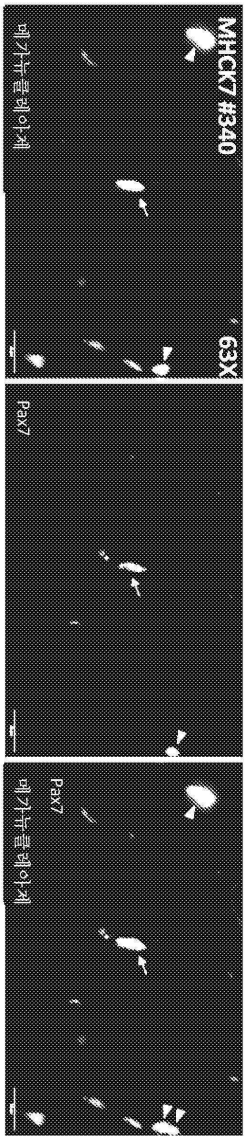


h디스트로핀 (큰 화살표) 뉴클레아제 (작은 화살표)

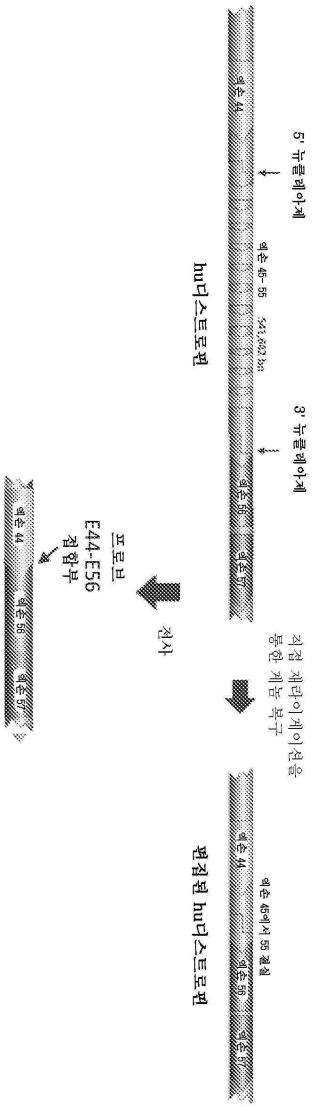
도면33a



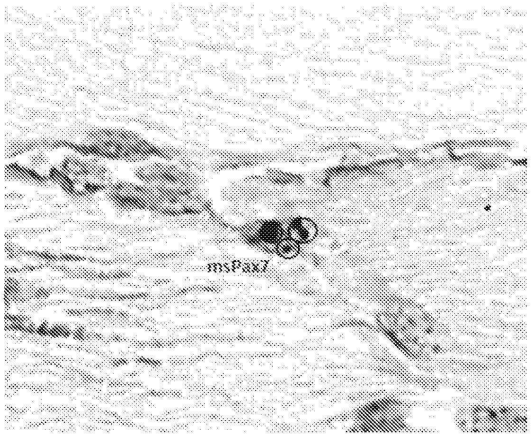
도면33b



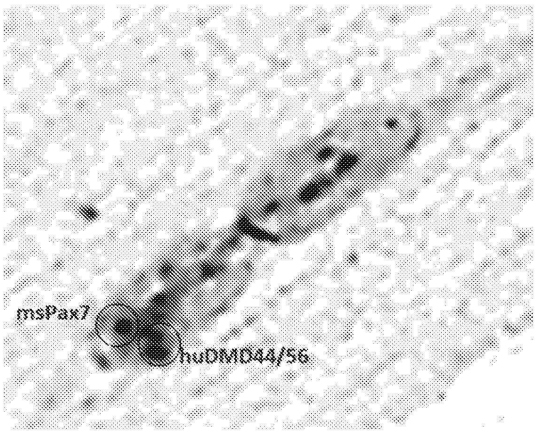
도면34


5' 뉴클레아제
3' 뉴클레아제
hu디스트로핀
프로브
E44-E56
결합부
절사
절결된 hu디스트로핀
잘린 제라이게이션을 통한 게놈 복구

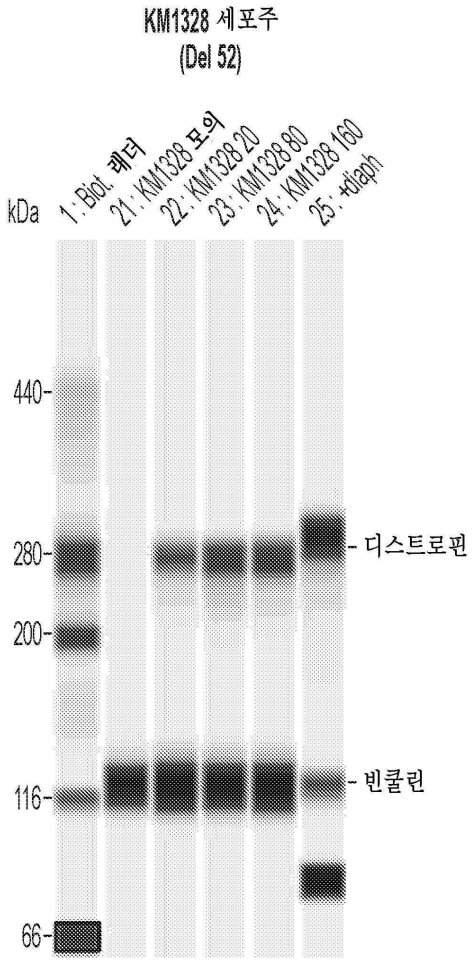
도면35a


msPax7

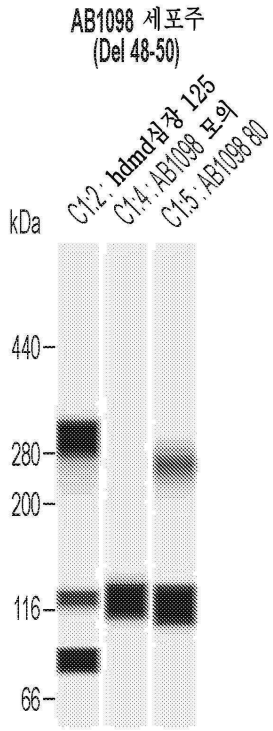
도면35b


msPax7
huDMD44/56

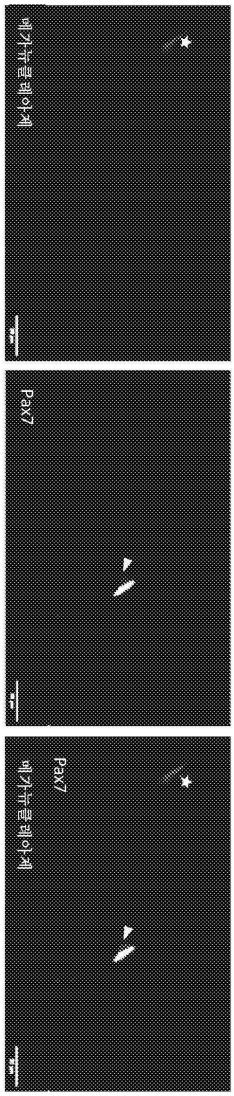
도면36


KM1328 세포주
(Del 52)
kDa
1: Biot. 래더
21: KM1328 포어
22: KM1328 20
23: KM1328 80
24: KM1328 160
25: +diaph
440-
280-
200-
116-
66-
디스트로핀
빈쿨린

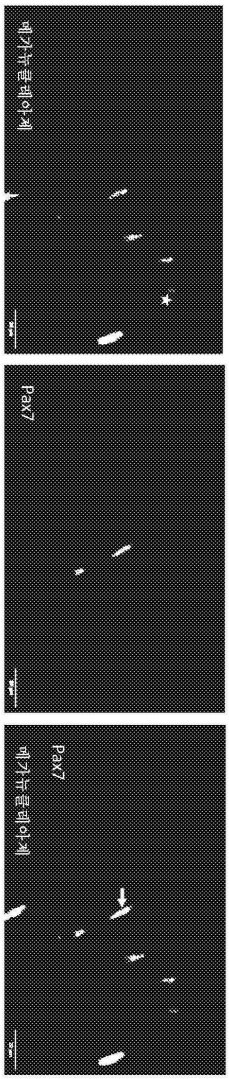
도면37


AB1098 세포주
(Del 48-50)
C1:2 : hdmd심장 125
C1:4 : AB1098 표의
C1:5 : AB1098 80
kDa
440
280
200
116
66

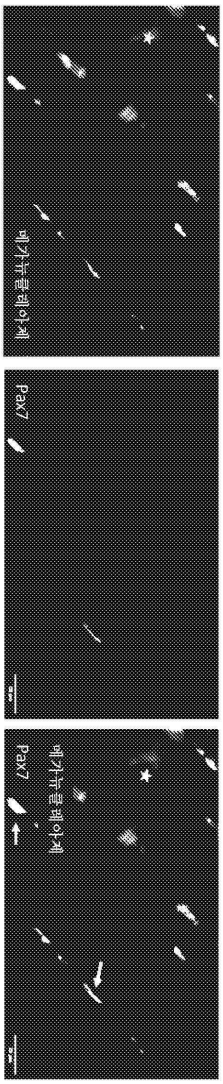
도면38a



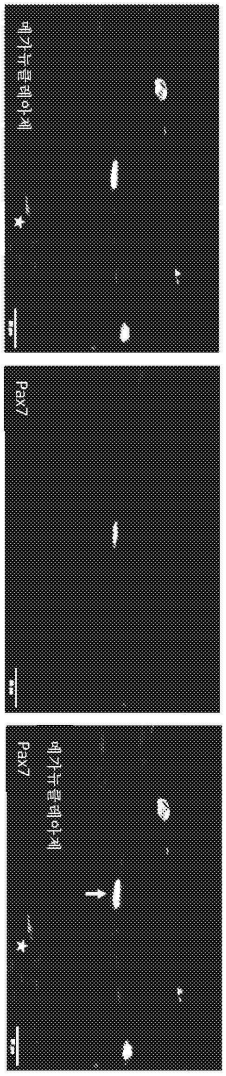
도면38b



도면38c



도면38d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Precision BioSciences, Inc.

<120> ENGINEERED MEGANUCLEASES HAVING SPECIFICITY FOR RECOGNITION SEQUENCES IN THE DYSTROPHIN GENE

<130> P1090.70054WO00

<140> PCT/US2021/059146

<141> 2021-11-12

<150> US 62/233,664

<151> 2021-08-16

<150> US 63/113,131

<151> 2020-11-12

<160> 193

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 163

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 1

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser

20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys

145 150 155 160

Ser Ser Pro

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 2

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 3

Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val His

1 5 10

<210> 4

<211> 3685

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val

1 5 10 15

Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe

20 25 30

Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg

35 40 45

Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys

50 55 60

Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala

65 70 75 80

Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser

85 90 95

Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp

100 105 110

Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met

115 120 125

Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val

130 135 140

Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr

145 150 155 160

Thr Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His

165 170 175

Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala

180 185 190

Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly

195 200 205

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

210 215 220

Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro

225 230 235 240

Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg

245 250 255

Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln Met

260 265 270

His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu Arg

275 280 285

Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Tyr Thr Gln Ala

290 295 300

Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser Pro Phe Pro Ser Gln

305 310 315 320

His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe Gly Ser Ser Leu Met Glu

325 330 335

Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu

340 345 350

Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile

355 360 365

Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly
370 375 380
Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu
385 390 395 400
Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu
405 410 415
Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu
420 425 430

Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val
435 440 445
Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu
450 455 460
Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly
465 470 475 480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu
485 490 495

Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His
500 505 510
Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala Thr Ala Ala
515 520 525
Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn Ile Cys
530 535 540
Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln Asp Ile Leu Leu Lys
545 550 555 560

Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Ala Trp Leu Ser
565 570 575
Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile His Thr Thr Gly Phe Lys Asp
580 585 590
Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Ala Val Leu Lys Ala
595 600 605
Asp Leu Glu Lys Lys Lys Gln Ser Met Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Lys

610 615 620

Gln Asp Leu Leu Ser Thr Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln Lys Thr
625 630 635 640
Glu Ala Trp Leu Asp Asn Phe Ala Arg Cys Trp Asp Asn Leu Val Gln
645 650 655
Lys Leu Glu Lys Ser Thr Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr Thr Thr
660 665 670
Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr Thr Val
675 680 685

Thr Thr Arg Glu Gln Ile Leu Val Lys His Ala Gln Glu Glu Leu Pro
690 695 700
Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Arg Gln Ile Thr Val Asp Ser Glu Ile
705 710 715 720
Arg Lys Arg Leu Asp Val Asp Ile Thr Glu Leu His Ser Trp Ile Thr
725 730 735
Arg Ser Glu Ala Val Leu Gln Ser Pro Glu Phe Ala Ile Phe Arg Lys
740 745 750

Glu Gly Asn Phe Ser Asp Leu Lys Glu Lys Val Asn Ala Ile Glu Arg
755 760 765
Glu Lys Ala Glu Lys Phe Arg Lys Leu Gln Asp Ala Ser Arg Ser Ala
770 775 780
Gln Ala Leu Val Glu Gln Met Val Asn Glu Gly Val Asn Ala Asp Ser
785 790 795 800
Ile Lys Gln Ala Ser Glu Gln Leu Asn Ser Arg Trp Ile Glu Phe Cys
805 810 815

Gln Leu Leu Ser Glu Arg Leu Asn Trp Leu Glu Tyr Gln Asn Asn Ile
820 825 830
Ile Ala Phe Tyr Asn Gln Leu Gln Gln Leu Glu Gln Met Thr Thr Thr
835 840 845
Ala Glu Asn Trp Leu Lys Ile Gln Pro Thr Thr Pro Ser Glu Pro Thr
850 855 860

Ala Ile Lys Ser Gln Leu Lys Ile Cys Lys Asp Glu Val Asn Arg Leu
865 870 875 880

Ser Asp Leu Gln Pro Gln Ile Glu Arg Leu Lys Ile Gln Ser Ile Ala
885 890 895

Leu Lys Glu Lys Gly Gln Gly Pro Met Phe Leu Asp Ala Asp Phe Val
900 905 910

Ala Phe Thr Asn His Phe Lys Gln Val Phe Ser Asp Val Gln Ala Arg
915 920 925

Glu Lys Glu Leu Gln Thr Ile Phe Asp Thr Leu Pro Pro Met Arg Tyr
930 935 940

Gln Glu Thr Met Ser Ala Ile Arg Thr Trp Val Gln Gln Ser Glu Thr
945 950 955 960

Lys Leu Ser Ile Pro Gln Leu Ser Val Thr Asp Tyr Glu Ile Met Glu
965 970 975

Gln Arg Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Gln Ser Ser Leu Gln Glu Gln
980 985 990

Gln Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu Ser Thr Thr Val Lys Glu Met Ser Lys
995 1000 1005

Lys Ala Pro Ser Glu Ile Ser Arg Lys Tyr Gln Ser Glu Phe Glu
1010 1015 1020

Glu Ile Glu Gly Arg Trp Lys Lys Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu
1025 1030 1035

His Cys Gln Lys Leu Glu Glu Gln Met Asn Lys Leu Arg Lys Ile
1040 1045 1050

Gln Asn His Ile Gln Thr Leu Lys Lys Trp Met Ala Glu Val Asp
1055 1060 1065

Val Phe Leu Lys Glu Glu Trp Pro Ala Leu Gly Asp Ser Glu Ile
1070 1075 1080

Leu Lys Lys Gln Leu Lys Gln Cys Arg Leu Leu Val Ser Asp Ile
1085 1090 1095

Gln Thr Ile Gln Pro Ser Leu Asn Ser Val Asn Glu Gly Gly Gln

1100 1105 1110

Lys Ile Lys Asn Glu Ala Glu Pro Glu Phe Ala Ser Arg Leu Glu

1115 1120 1125

Thr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Thr Gln Trp Asp His Met Cys Gln

1130 1135 1140

Gln Val Tyr Ala Arg Lys Glu Ala Leu Lys Gly Gly Leu Glu Lys

1145 1150 1155

Thr Val Ser Leu Gln Lys Asp Leu Ser Glu Met His Glu Trp Met

1160 1165 1170

Thr Gln Ala Glu Glu Glu Tyr Leu Glu Arg Asp Phe Glu Tyr Lys

1175 1180 1185

Thr Pro Asp Glu Leu Gln Lys Ala Val Glu Glu Met Lys Arg Ala

1190 1195 1200

Lys Glu Glu Ala Gln Gln Lys Glu Ala Lys Val Lys Leu Leu Thr

1205 1210 1215

Glu Ser Val Asn Ser Val Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Ala Gln

1220 1225 1230

Glu Ala Leu Lys Lys Glu Leu Glu Thr Leu Thr Thr Asn Tyr Gln

1235 1240 1245

Trp Leu Cys Thr Arg Leu Asn Gly Lys Cys Lys Thr Leu Glu Glu

1250 1255 1260

Val Trp Ala Cys Trp His Glu Leu Leu Ser Tyr Leu Glu Lys Ala

1265 1270 1275

Asn Lys Trp Leu Asn Glu Val Glu Phe Lys Leu Lys Thr Thr Glu

1280 1285 1290

Asn Ile Pro Gly Gly Ala Glu Glu Ile Ser Glu Val Leu Asp Ser

1295 1300 1305

Leu Glu Asn Leu Met Arg His Ser Glu Asp Asn Pro Asn Gln Ile

1310 1315 1320

Arg Ile Leu Ala Gln Thr Leu Thr Asp Gly Gly Val Met Asp Glu

1325 1330 1335

Leu Ile Asn Glu Glu Leu Glu Thr Phe Asn Ser Arg Trp Arg Glu
1340 1345 1350
Leu His Glu Glu Ala Val Arg Arg Gln Lys Leu Leu Glu Gln Ser
1355 1360 1365

Ile Gln Ser Ala Gln Glu Thr Glu Lys Ser Leu His Leu Ile Gln
1370 1375 1380
Glu Ser Leu Thr Phe Ile Asp Lys Gln Leu Ala Ala Tyr Ile Ala
1385 1390 1395
Asp Lys Val Asp Ala Ala Gln Met Pro Gln Glu Ala Gln Lys Ile
1400 1405 1410
Gln Ser Asp Leu Thr Ser His Glu Ile Ser Leu Glu Glu Met Lys
1415 1420 1425

Lys His Asn Gln Gly Lys Glu Ala Ala Gln Arg Val Leu Ser Gln
1430 1435 1440
Ile Asp Val Ala Gln Lys Lys Leu Gln Asp Val Ser Met Lys Phe
1445 1450 1455
Arg Leu Phe Gln Lys Pro Ala Asn Phe Glu Gln Arg Leu Gln Glu
1460 1465 1470
Ser Lys Met Ile Leu Asp Glu Val Lys Met His Leu Pro Ala Leu
1475 1480 1485

Glu Thr Lys Ser Val Glu Gln Glu Val Val Gln Ser Gln Leu Asn
1490 1495 1500
His Cys Val Asn Leu Tyr Lys Ser Leu Ser Glu Val Lys Ser Glu
1505 1510 1515
Val Glu Met Val Ile Lys Thr Gly Arg Gln Ile Val Gln Lys Lys
1520 1525 1530
Gln Thr Glu Asn Pro Lys Glu Leu Asp Glu Arg Val Thr Ala Leu
1535 1540 1545

Lys Leu His Tyr Asn Glu Leu Gly Ala Lys Val Thr Glu Arg Lys
1550 1555 1560
Gln Gln Leu Glu Lys Cys Leu Lys Leu Ser Arg Lys Met Arg Lys

1565 1570 1575

Glu Met Asn Val Leu Thr Glu Trp Leu Ala Ala Thr Asp Met Glu

1580 1585 1590

Leu Thr Lys Arg Ser Ala Val Glu Gly Met Pro Ser Asn Leu Asp

1595 1600 1605

Ser Glu Val Ala Trp Gly Lys Ala Thr Gln Lys Glu Ile Glu Lys

1610 1615 1620

Gln Lys Val His Leu Lys Ser Ile Thr Glu Val Gly Glu Ala Leu

1625 1630 1635

Lys Thr Val Leu Gly Lys Lys Glu Thr Leu Val Glu Asp Lys Leu

1640 1645 1650

Ser Leu Leu Asn Ser Asn Trp Ile Ala Val Thr Ser Arg Ala Glu

1655 1660 1665

Glu Trp Leu Asn Leu Leu Leu Glu Tyr Gln Lys His Met Glu Thr

1670 1675 1680

Phe Asp Gln Asn Val Asp His Ile Thr Lys Trp Ile Ile Gln Ala

1685 1690 1695

Asp Thr Leu Leu Asp Glu Ser Glu Lys Lys Lys Pro Gln Gln Lys

1700 1705 1710

Glu Asp Val Leu Lys Arg Leu Lys Ala Glu Leu Asn Asp Ile Arg

1715 1720 1725

Pro Lys Val Asp Ser Thr Arg Asp Gln Ala Ala Asn Leu Met Ala

1730 1735 1740

Asn Arg Gly Asp His Cys Arg Lys Leu Val Glu Pro Gln Ile Ser

1745 1750 1755

Glu Leu Asn His Arg Phe Ala Ala Ile Ser His Arg Ile Lys Thr

1760 1765 1770

Gly Lys Ala Ser Ile Pro Leu Lys Glu Leu Glu Gln Phe Asn Ser

1775 1780 1785

Asp Ile Gln Lys Leu Leu Glu Pro Leu Glu Ala Glu Ile Gln Gln

1790 1795 1800

Gly Val Asn Leu Lys Glu Glu Asp Phe Asn Lys Asp Met Asn Glu
1805 1810 1815
Asp Asn Glu Gly Thr Val Lys Glu Leu Leu Gln Arg Gly Asp Asn
1820 1825 1830
Leu Gln Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Lys Arg Glu Glu Ile Lys
1835 1840 1845

Ile Lys Gln Gln Leu Leu Gln Thr Lys His Asn Ala Leu Lys Asp
1850 1855 1860
Leu Arg Ser Gln Arg Arg Lys Lys Ala Leu Glu Ile Ser His Gln
1865 1870 1875
Trp Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln Ala Asp Asp Leu Leu Lys Cys Leu
1880 1885 1890
Asp Asp Ile Glu Lys Lys Leu Ala Ser Leu Pro Glu Pro Arg Asp
1895 1900 1905

Glu Arg Lys Ile Lys Glu Ile Asp Arg Glu Leu Gln Lys Lys Lys
1910 1915 1920
Glu Glu Leu Asn Ala Val Arg Arg Gln Ala Glu Gly Leu Ser Glu
1925 1930 1935
Asp Gly Ala Ala Met Ala Val Glu Pro Thr Gln Ile Gln Leu Ser
1940 1945 1950
Lys Arg Trp Arg Glu Ile Glu Ser Lys Phe Ala Gln Phe Arg Arg
1955 1960 1965

Leu Asn Phe Ala Gln Ile His Thr Val Arg Glu Glu Thr Met Met
1970 1975 1980
Val Met Thr Glu Asp Met Pro Leu Glu Ile Ser Tyr Val Pro Ser
1985 1990 1995
Thr Tyr Leu Thr Glu Ile Thr His Val Ser Gln Ala Leu Leu Glu
2000 2005 2010
Val Glu Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Leu Cys Ala Lys Asp Phe
2015 2020 2025

Glu Asp Leu Phe Lys Gln Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ile Lys Asp

2030 2035 2040

Ser Leu Gln Gln Ser Ser Gly Arg Ile Asp Ile Ile His Ser Lys

2045 2050 2055

Lys Thr Ala Ala Leu Gln Ser Ala Thr Pro Val Glu Arg Val Lys

2060 2065 2070

Leu Gln Glu Ala Leu Ser Gln Leu Asp Phe Gln Trp Glu Lys Val

2075 2080 2085

Asn Lys Met Tyr Lys Asp Arg Gln Gly Arg Phe Asp Arg Ser Val

2090 2095 2100

Glu Lys Trp Arg Arg Phe His Tyr Asp Ile Lys Ile Phe Asn Gln

2105 2110 2115

Trp Leu Thr Glu Ala Glu Gln Phe Leu Arg Lys Thr Gln Ile Pro

2120 2125 2130

Glu Asn Trp Glu His Ala Lys Tyr Lys Trp Tyr Leu Lys Glu Leu

2135 2140 2145

Gln Asp Gly Ile Gly Gln Arg Gln Thr Val Val Arg Thr Leu Asn

2150 2155 2160

Ala Thr Gly Glu Glu Ile Ile Gln Gln Ser Ser Lys Thr Asp Ala

2165 2170 2175

Ser Ile Leu Gln Glu Lys Leu Gly Ser Leu Asn Leu Arg Trp Gln

2180 2185 2190

Glu Val Cys Lys Gln Leu Ser Asp Arg Lys Lys Arg Leu Glu Glu

2195 2200 2205

Gln Lys Asn Ile Leu Ser Glu Phe Gln Arg Asp Leu Asn Glu Phe

2210 2215 2220

Val Leu Trp Leu Glu Glu Ala Asp Asn Ile Ala Ser Ile Pro Leu

2225 2230 2235

Glu Pro Gly Lys Glu Gln Gln Leu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Val

2240 2245 2250

Lys Leu Leu Val Glu Glu Leu Pro Leu Arg Gln Gly Ile Leu Lys

2255 2260 2265

Gln Leu Asn Glu Thr Gly Gly Pro Val Leu Val Ser Ala Pro Ile
2270 2275 2280
Ser Pro Glu Glu Gln Asp Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys Gln Thr
2285 2290 2295
Asn Leu Gln Trp Ile Lys Val Ser Arg Ala Leu Pro Glu Lys Gln
2300 2305 2310
Gly Glu Ile Glu Ala Gln Ile Lys Asp Leu Gly Gln Leu Glu Lys
2315 2320 2325

Lys Leu Glu Asp Leu Glu Glu Gln Leu Asn His Leu Leu Leu Trp
2330 2335 2340
Leu Ser Pro Ile Arg Asn Gln Leu Glu Ile Tyr Asn Gln Pro Asn
2345 2350 2355
Gln Glu Gly Pro Phe Asp Val Lys Glu Thr Glu Ile Ala Val Gln
2360 2365 2370
Ala Lys Gln Pro Asp Val Glu Glu Ile Leu Ser Lys Gly Gln His
2375 2380 2385

Leu Tyr Lys Glu Lys Pro Ala Thr Gln Pro Val Lys Arg Lys Leu
2390 2395 2400
Glu Asp Leu Ser Ser Glu Trp Lys Ala Val Asn Arg Leu Leu Gln
2405 2410 2415
Glu Leu Arg Ala Lys Gln Pro Asp Leu Ala Pro Gly Leu Thr Thr
2420 2425 2430
Ile Gly Ala Ser Pro Thr Gln Thr Val Thr Leu Val Thr Gln Pro
2435 2440 2445

Val Val Thr Lys Glu Thr Ala Ile Ser Lys Leu Glu Met Pro Ser
2450 2455 2460
Ser Leu Met Leu Glu Val Pro Ala Leu Ala Asp Phe Asn Arg Ala
2465 2470 2475
Trp Thr Glu Leu Thr Asp Trp Leu Ser Leu Leu Asp Gln Val Ile
2480 2485 2490
Lys Ser Gln Arg Val Met Val Gly Asp Leu Glu Asp Ile Asn Glu

2495 2500 2505

Met Ile Ile Lys Gln Lys Ala Thr Met Gln Asp Leu Glu Gln Arg
2510 2515 2520
Arg Pro Gln Leu Glu Glu Leu Ile Thr Ala Ala Gln Asn Leu Lys
2525 2530 2535
Asn Lys Thr Ser Asn Gln Glu Ala Arg Thr Ile Ile Thr Asp Arg
2540 2545 2550
Ile Glu Arg Ile Gln Asn Gln Trp Asp Glu Val Gln Glu His Leu
2555 2560 2565

Gln Asn Arg Arg Gln Gln Leu Asn Glu Met Leu Lys Asp Ser Thr
2570 2575 2580
Gln Trp Leu Glu Ala Lys Glu Glu Ala Glu Gln Val Leu Gly Gln
2585 2590 2595
Ala Arg Ala Lys Leu Glu Ser Trp Lys Glu Gly Pro Tyr Thr Val
2600 2605 2610
Asp Ala Ile Gln Lys Lys Ile Thr Glu Thr Lys Gln Leu Ala Lys
2615 2620 2625

Asp Leu Arg Gln Trp Gln Thr Asn Val Asp Val Ala Asn Asp Leu
2630 2635 2640
Ala Leu Lys Leu Leu Arg Asp Tyr Ser Ala Asp Asp Thr Arg Lys
2645 2650 2655
Val His Met Ile Thr Glu Asn Ile Asn Ala Ser Trp Arg Ser Ile
2660 2665 2670
His Lys Arg Val Ser Glu Arg Glu Ala Ala Leu Glu Glu Thr His
2675 2680 2685

Arg Leu Leu Gln Gln Phe Pro Leu Asp Leu Glu Lys Phe Leu Ala
2690 2695 2700
Trp Leu Thr Glu Ala Glu Thr Thr Ala Asn Val Leu Gln Asp Ala
2705 2710 2715
Thr Arg Lys Glu Arg Leu Leu Glu Asp Ser Lys Gly Val Lys Glu
2720 2725 2730

Leu Met Lys Gln Trp Gln Asp Leu Gln Gly Glu Ile Glu Ala His
2735 2740 2745

Thr Asp Val Tyr His Asn Leu Asp Glu Asn Ser Gln Lys Ile Leu
2750 2755 2760
Arg Ser Leu Glu Gly Ser Asp Asp Ala Val Leu Leu Gln Arg Arg
2765 2770 2775
Leu Asp Asn Met Asn Phe Lys Trp Ser Glu Leu Arg Lys Lys Ser
2780 2785 2790
Leu Asn Ile Arg Ser His Leu Glu Ala Ser Ser Asp Gln Trp Lys
2795 2800 2805

Arg Leu His Leu Ser Leu Gln Glu Leu Leu Val Trp Leu Gln Leu
2810 2815 2820
Lys Asp Asp Glu Leu Ser Arg Gln Ala Pro Ile Gly Gly Asp Phe
2825 2830 2835
Pro Ala Val Gln Lys Gln Asn Asp Val His Arg Ala Phe Lys Arg
2840 2845 2850
Glu Leu Lys Thr Lys Glu Pro Val Ile Met Ser Thr Leu Glu Thr
2855 2860 2865

Val Arg Ile Phe Leu Thr Glu Gln Pro Leu Glu Gly Leu Glu Lys
2870 2875 2880
Leu Tyr Gln Glu Pro Arg Glu Leu Pro Pro Glu Glu Arg Ala Gln
2885 2890 2895
Asn Val Thr Arg Leu Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Val Asn Thr
2900 2905 2910
Glu Trp Glu Lys Leu Asn Leu His Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys
2915 2920 2925

Ile Asp Glu Thr Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gln Glu Ala Thr
2930 2935 2940
Asp Glu Leu Asp Leu Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly
2945 2950 2955
Ser Trp Gln Pro Val Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp

2960 2965 2970

His Leu Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu

2975 2980 2985

Lys Glu Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr

2990 2995 3000

Thr Leu Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu

3005 3010 3015

Asp Leu Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp

3020 3025 3030

Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala

3035 3040 3045

Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg

3050 3055 3060

Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr

3065 3070 3075

Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln

3080 3085 3090

Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr

3095 3100 3105

Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu

3110 3115 3120

Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu

3125 3130 3135

Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys

3140 3145 3150

Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu

3155 3160 3165

Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu

3170 3175 3180

Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser

3185 3190 3195

Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp
3200 3205 3210
Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe
3215 3220 3225

Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln
3230 3235 3240
Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn
3245 3250 3255
Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys
3260 3265 3270
Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu
3275 3280 3285

Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala
3290 3295 3300
Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu
3305 3310 3315
Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn
3320 3325 3330
Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys
3335 3340 3345

Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr
3350 3355 3360
Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn
3365 3370 3375
Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly
3380 3385 3390
Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr
3395 3400 3405

Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala
3410 3415 3420
Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu

3425 3430 3435

His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser

3440 3445 3450

Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu

3455 3460 3465

His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser

3470 3475 3480

Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu

3485 3490 3495

Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu

3500 3505 3510

Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys

3515 3520 3525

Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro

3530 3535 3540

Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu

3545 3550 3555

Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu

3560 3565 3570

Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser

3575 3580 3585

Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu

3590 3595 3600

Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu

3605 3610 3615

Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly

3620 3625 3630

Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro

3635 3640 3645

Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu

3650 3655 3660

Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys
3665 3670 3675

Pro Met Arg Glu Asp Thr Met
3680 3685

<210> 5

<211> 3092

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val
1 5 10 15

Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe
20 25 30

Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg
35 40 45

Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala
65 70 75 80

Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser
85 90 95

Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp
100 105 110

Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met
115 120 125

Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val
130 135 140

Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr
145 150 155 160

Thr Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His
165 170 175

Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala

180 185 190

Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly

195 200 205

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

210 215 220

Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro

225 230 235 240

Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg

245 250 255

Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln Met

260 265 270

His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu Arg

275 280 285

Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Tyr Thr Gln Ala

290 295 300

Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser Pro Phe Pro Ser Gln

305 310 315 320

His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe Gly Ser Ser Leu Met Glu

325 330 335

Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu

340 345 350

Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile

355 360 365

Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly

370 375 380

Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu

385 390 395 400

Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu

405 410 415

Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu

420 425 430

Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val
435 440 445

Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu
450 455 460

Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly
465 470 475 480

Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu
485 490 495

Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His
500 505 510

Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala Thr Ala Ala
515 520 525

Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn Ile Cys
530 535 540

Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln Asp Ile Leu Leu Lys
545 550 555 560

Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Ala Trp Leu Ser
565 570 575

Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile His Thr Thr Gly Phe Lys Asp
580 585 590

Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Ala Val Leu Lys Ala
595 600 605

Asp Leu Glu Lys Lys Lys Gln Ser Met Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Lys
610 615 620

Gln Asp Leu Leu Ser Thr Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln Lys Thr
625 630 635 640

Glu Ala Trp Leu Asp Asn Phe Ala Arg Cys Trp Asp Asn Leu Val Gln
645 650 655

Lys Leu Glu Lys Ser Thr Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr Thr Thr
660 665 670

Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr Thr Val

675 680 685

Thr Thr Arg Glu Gln Ile Leu Val Lys His Ala Gln Glu Glu Leu Pro

690 695 700

Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Arg Gln Ile Thr Val Asp Ser Glu Ile

705 710 715 720

Arg Lys Arg Leu Asp Val Asp Ile Thr Glu Leu His Ser Trp Ile Thr

725 730 735

Arg Ser Glu Ala Val Leu Gln Ser Pro Glu Phe Ala Ile Phe Arg Lys

740 745 750

Glu Gly Asn Phe Ser Asp Leu Lys Glu Lys Val Asn Ala Ile Glu Arg

755 760 765

Glu Lys Ala Glu Lys Phe Arg Lys Leu Gln Asp Ala Ser Arg Ser Ala

770 775 780

Gln Ala Leu Val Glu Gln Met Val Asn Glu Gly Val Asn Ala Asp Ser

785 790 795 800

Ile Lys Gln Ala Ser Glu Gln Leu Asn Ser Arg Trp Ile Glu Phe Cys

805 810 815

Gln Leu Leu Ser Glu Arg Leu Asn Trp Leu Glu Tyr Gln Asn Asn Ile

820 825 830

Ile Ala Phe Tyr Asn Gln Leu Gln Gln Leu Glu Gln Met Thr Thr Thr

835 840 845

Ala Glu Asn Trp Leu Lys Ile Gln Pro Thr Thr Pro Ser Glu Pro Thr

850 855 860

Ala Ile Lys Ser Gln Leu Lys Ile Cys Lys Asp Glu Val Asn Arg Leu

865 870 875 880

Ser Asp Leu Gln Pro Gln Ile Glu Arg Leu Lys Ile Gln Ser Ile Ala

885 890 895

Leu Lys Glu Lys Gly Gln Gly Pro Met Phe Leu Asp Ala Asp Phe Val

900 905 910

Ala Phe Thr Asn His Phe Lys Gln Val Phe Ser Asp Val Gln Ala Arg

915 920 925

Glu Lys Glu Leu Gln Thr Ile Phe Asp Thr Leu Pro Pro Met Arg Tyr
930 935 940
Gln Glu Thr Met Ser Ala Ile Arg Thr Trp Val Gln Gln Ser Glu Thr
945 950 955 960
Lys Leu Ser Ile Pro Gln Leu Ser Val Thr Asp Tyr Glu Ile Met Glu
965 970 975

Gln Arg Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Gln Ser Ser Leu Gln Glu Gln
980 985 990
Gln Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu Ser Thr Thr Val Lys Glu Met Ser Lys
995 1000 1005
Lys Ala Pro Ser Glu Ile Ser Arg Lys Tyr Gln Ser Glu Phe Glu
1010 1015 1020
Glu Ile Glu Gly Arg Trp Lys Lys Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu
1025 1030 1035

His Cys Gln Lys Leu Glu Glu Gln Met Asn Lys Leu Arg Lys Ile
1040 1045 1050
Gln Asn His Ile Gln Thr Leu Lys Lys Trp Met Ala Glu Val Asp
1055 1060 1065
Val Phe Leu Lys Glu Glu Trp Pro Ala Leu Gly Asp Ser Glu Ile
1070 1075 1080
Leu Lys Lys Gln Leu Lys Gln Cys Arg Leu Leu Val Ser Asp Ile
1085 1090 1095

Gln Thr Ile Gln Pro Ser Leu Asn Ser Val Asn Glu Gly Gly Gln
1100 1105 1110
Lys Ile Lys Asn Glu Ala Glu Pro Glu Phe Ala Ser Arg Leu Glu
1115 1120 1125
Thr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Thr Gln Trp Asp His Met Cys Gln
1130 1135 1140
Gln Val Tyr Ala Arg Lys Glu Ala Leu Lys Gly Gly Leu Glu Lys
1145 1150 1155

Thr Val Ser Leu Gln Lys Asp Leu Ser Glu Met His Glu Trp Met

1160 1165 1170

Thr Gln Ala Glu Glu Glu Tyr Leu Glu Arg Asp Phe Glu Tyr Lys

1175 1180 1185

Thr Pro Asp Glu Leu Gln Lys Ala Val Glu Glu Met Lys Arg Ala

1190 1195 1200

Lys Glu Glu Ala Gln Gln Lys Glu Ala Lys Val Lys Leu Leu Thr

1205 1210 1215

Glu Ser Val Asn Ser Val Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Ala Gln

1220 1225 1230

Glu Ala Leu Lys Lys Glu Leu Glu Thr Leu Thr Thr Asn Tyr Gln

1235 1240 1245

Trp Leu Cys Thr Arg Leu Asn Gly Lys Cys Lys Thr Leu Glu Glu

1250 1255 1260

Val Trp Ala Cys Trp His Glu Leu Leu Ser Tyr Leu Glu Lys Ala

1265 1270 1275

Asn Lys Trp Leu Asn Glu Val Glu Phe Lys Leu Lys Thr Thr Glu

1280 1285 1290

Asn Ile Pro Gly Gly Ala Glu Glu Ile Ser Glu Val Leu Asp Ser

1295 1300 1305

Leu Glu Asn Leu Met Arg His Ser Glu Asp Asn Pro Asn Gln Ile

1310 1315 1320

Arg Ile Leu Ala Gln Thr Leu Thr Asp Gly Gly Val Met Asp Glu

1325 1330 1335

Leu Ile Asn Glu Glu Leu Glu Thr Phe Asn Ser Arg Trp Arg Glu

1340 1345 1350

Leu His Glu Glu Ala Val Arg Arg Gln Lys Leu Leu Glu Gln Ser

1355 1360 1365

Ile Gln Ser Ala Gln Glu Thr Glu Lys Ser Leu His Leu Ile Gln

1370 1375 1380

Glu Ser Leu Thr Phe Ile Asp Lys Gln Leu Ala Ala Tyr Ile Ala

1385 1390 1395

Asp Lys Val Asp Ala Ala Gln Met Pro Gln Glu Ala Gln Lys Ile
1400 1405 1410
Gln Ser Asp Leu Thr Ser His Glu Ile Ser Leu Glu Glu Met Lys
1415 1420 1425
Lys His Asn Gln Gly Lys Glu Ala Ala Gln Arg Val Leu Ser Gln
1430 1435 1440
Ile Asp Val Ala Gln Lys Lys Leu Gln Asp Val Ser Met Lys Phe
1445 1450 1455

Arg Leu Phe Gln Lys Pro Ala Asn Phe Glu Gln Arg Leu Gln Glu
1460 1465 1470
Ser Lys Met Ile Leu Asp Glu Val Lys Met His Leu Pro Ala Leu
1475 1480 1485
Glu Thr Lys Ser Val Glu Gln Glu Val Val Gln Ser Gln Leu Asn
1490 1495 1500
His Cys Val Asn Leu Tyr Lys Ser Leu Ser Glu Val Lys Ser Glu
1505 1510 1515

Val Glu Met Val Ile Lys Thr Gly Arg Gln Ile Val Gln Lys Lys
1520 1525 1530
Gln Thr Glu Asn Pro Lys Glu Leu Asp Glu Arg Val Thr Ala Leu
1535 1540 1545
Lys Leu His Tyr Asn Glu Leu Gly Ala Lys Val Thr Glu Arg Lys
1550 1555 1560
Gln Gln Leu Glu Lys Cys Leu Lys Leu Ser Arg Lys Met Arg Lys
1565 1570 1575

Glu Met Asn Val Leu Thr Glu Trp Leu Ala Ala Thr Asp Met Glu
1580 1585 1590
Leu Thr Lys Arg Ser Ala Val Glu Gly Met Pro Ser Asn Leu Asp
1595 1600 1605
Ser Glu Val Ala Trp Gly Lys Ala Thr Gln Lys Glu Ile Glu Lys
1610 1615 1620
Gln Lys Val His Leu Lys Ser Ile Thr Glu Val Gly Glu Ala Leu

1625 1630 1635

Lys Thr Val Leu Gly Lys Lys Glu Thr Leu Val Glu Asp Lys Leu
1640 1645 1650
Ser Leu Leu Asn Ser Asn Trp Ile Ala Val Thr Ser Arg Ala Glu
1655 1660 1665
Glu Trp Leu Asn Leu Leu Leu Glu Tyr Gln Lys His Met Glu Thr
1670 1675 1680
Phe Asp Gln Asn Val Asp His Ile Thr Lys Trp Ile Ile Gln Ala
1685 1690 1695

Asp Thr Leu Leu Asp Glu Ser Glu Lys Lys Lys Pro Gln Gln Lys
1700 1705 1710
Glu Asp Val Leu Lys Arg Leu Lys Ala Glu Leu Asn Asp Ile Arg
1715 1720 1725
Pro Lys Val Asp Ser Thr Arg Asp Gln Ala Ala Asn Leu Met Ala
1730 1735 1740
Asn Arg Gly Asp His Cys Arg Lys Leu Val Glu Pro Gln Ile Ser
1745 1750 1755

Glu Leu Asn His Arg Phe Ala Ala Ile Ser His Arg Ile Lys Thr
1760 1765 1770
Gly Lys Ala Ser Ile Pro Leu Lys Glu Leu Glu Gln Phe Asn Ser
1775 1780 1785
Asp Ile Gln Lys Leu Leu Glu Pro Leu Glu Ala Glu Ile Gln Gln
1790 1795 1800
Gly Val Asn Leu Lys Glu Glu Asp Phe Asn Lys Asp Met Asn Glu
1805 1810 1815

Asp Asn Glu Gly Thr Val Lys Glu Leu Leu Gln Arg Gly Asp Asn
1820 1825 1830
Leu Gln Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Lys Arg Glu Glu Ile Lys
1835 1840 1845
Ile Lys Gln Gln Leu Leu Gln Thr Lys His Asn Ala Leu Lys Asp
1850 1855 1860

Leu Arg Ser Gln Arg Arg Lys Lys Ala Leu Glu Ile Ser His Gln
1865 1870 1875

Trp Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln Ala Asp Asp Leu Leu Lys Cys Leu
1880 1885 1890
Asp Asp Ile Glu Lys Lys Leu Ala Ser Leu Pro Glu Pro Arg Asp
1895 1900 1905
Glu Arg Lys Ile Lys Glu Ile Asp Arg Glu Leu Gln Lys Lys Lys
1910 1915 1920
Glu Glu Leu Asn Ala Val Arg Arg Gln Ala Glu Gly Leu Ser Glu
1925 1930 1935

Asp Gly Ala Ala Met Ala Val Glu Pro Thr Gln Ile Gln Leu Ser
1940 1945 1950
Lys Arg Trp Arg Glu Ile Glu Ser Lys Phe Ala Gln Phe Arg Arg
1955 1960 1965
Leu Asn Phe Ala Gln Ile His Thr Val Arg Glu Glu Thr Met Met
1970 1975 1980
Val Met Thr Glu Asp Met Pro Leu Glu Ile Ser Tyr Val Pro Ser
1985 1990 1995

Thr Tyr Leu Thr Glu Ile Thr His Val Ser Gln Ala Leu Leu Glu
2000 2005 2010
Val Glu Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Leu Cys Ala Lys Asp Phe
2015 2020 2025
Glu Asp Leu Phe Lys Gln Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ile Lys Asp
2030 2035 2040
Ser Leu Gln Gln Ser Ser Gly Arg Ile Asp Ile Ile His Ser Lys
2045 2050 2055

Lys Thr Ala Ala Leu Gln Ser Ala Thr Pro Val Glu Arg Val Lys
2060 2065 2070
Leu Gln Glu Ala Leu Ser Gln Leu Asp Phe Gln Trp Glu Lys Val
2075 2080 2085
Asn Lys Met Tyr Lys Asp Arg Gln Gly Arg Phe Asp Arg Ser Val

2090 2095 2100

Glu Lys Trp Arg Arg Phe His Tyr Asp Ile Lys Ile Phe Asn Gln

2105 2110 2115

Trp Leu Thr Glu Ala Glu Gln Phe Leu Arg Lys Thr Gln Ile Pro

2120 2125 2130

Glu Asn Trp Glu His Ala Lys Tyr Lys Trp Tyr Leu Lys Asp Leu

2135 2140 2145

Gln Gly Glu Ile Glu Ala His Thr Asp Val Tyr His Asn Leu Asp

2150 2155 2160

Glu Asn Ser Gln Lys Ile Leu Arg Ser Leu Glu Gly Ser Asp Asp

2165 2170 2175

Ala Val Leu Leu Gln Arg Arg Leu Asp Asn Met Asn Phe Lys Trp

2180 2185 2190

Ser Glu Leu Arg Lys Lys Ser Leu Asn Ile Arg Ser His Leu Glu

2195 2200 2205

Ala Ser Ser Asp Gln Trp Lys Arg Leu His Leu Ser Leu Gln Glu

2210 2215 2220

Leu Leu Val Trp Leu Gln Leu Lys Asp Asp Glu Leu Ser Arg Gln

2225 2230 2235

Ala Pro Ile Gly Gly Asp Phe Pro Ala Val Gln Lys Gln Asn Asp

2240 2245 2250

Val His Arg Ala Phe Lys Arg Glu Leu Lys Thr Lys Glu Pro Val

2255 2260 2265

Ile Met Ser Thr Leu Glu Thr Val Arg Ile Phe Leu Thr Glu Gln

2270 2275 2280

Pro Leu Glu Gly Leu Glu Lys Leu Tyr Gln Glu Pro Arg Glu Leu

2285 2290 2295

Pro Pro Glu Glu Arg Ala Gln Asn Val Thr Arg Leu Leu Arg Lys

2300 2305 2310

Gln Ala Glu Glu Val Asn Thr Glu Trp Glu Lys Leu Asn Leu His

2315 2320 2325

Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys Ile Asp Glu Thr Leu Glu Arg Leu
2330 2335 2340
Arg Glu Leu Gln Glu Ala Thr Asp Glu Leu Asp Leu Lys Leu Arg
2345 2350 2355

Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly Ser Trp Gln Pro Val Gly Asp Leu
2360 2365 2370
Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp His Leu Glu Lys Val Lys Ala Leu
2375 2380 2385
Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu Lys Glu Asn Val Ser His Val Asn
2390 2395 2400
Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr Thr Leu Gly Ile Gln Leu Ser Pro
2405 2410 2415

Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp Leu Asn Thr Arg Trp Lys Leu
2420 2425 2430
Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala
2435 2440 2445
His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser
2450 2455 2460
Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro
2465 2470 2475

Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro
2480 2485 2490
Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val
2495 2500 2505
Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln
2510 2515 2520
Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp
2525 2530 2535

Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp
2540 2545 2550
Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu

2555 2560 2565

Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp

2570 2575 2580

Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr

2585 2590 2595

Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu

2600 2605 2610

Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln

2615 2620 2625

Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu

2630 2635 2640

Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val

2645 2650 2655

Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys

2660 2665 2670

Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe

2675 2680 2685

Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro

2690 2695 2700

Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala

2705 2710 2715

Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr

2720 2725 2730

Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe

2735 2740 2745

Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro Met

2750 2755 2760

Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp

2765 2770 2775

Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe

2780 2785 2790

Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu
2795 2800 2805

Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp
2810 2815 2820

Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp
2825 2830 2835

Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu
2840 2845 2850

Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro
2855 2860 2865

Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys
2870 2875 2880

Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro
2885 2890 2895

Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu
2900 2905 2910

Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln
2915 2920 2925

Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu
2930 2935 2940

Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln
2945 2950 2955

Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg
2960 2965 2970

Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp
2975 2980 2985

His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu
2990 2995 3000

Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val
3005 3010 3015

Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro

3020 3025 3030

Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly

3035 3040 3045

Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu

3050 3055 3060

Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg

3065 3070 3075

Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met

3080 3085 3090

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

aaggattatg tattacctcc cg 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ttcctaatac ataatggagg gc 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

taagattggg tatgagggat ag 22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

attctaaccc atactcccta tc 22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ctacatggtg tatctgacta ag 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gatgtaccac atagactgat tc 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ctggccgaag tataggaata tg 22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gaccggcttc atatccttat ac 22

<210> 14

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

aaggattat 9

<210> 15

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

ttcctaata 9

<210> 16

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

taagattgg 9

<210> 17

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

attctaacc 9

<210> 18

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

ctacatggt 9

<210> 19

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gatgtacca 9

<210> 20

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ctggccgaa 9

<210> 21

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gaccggctt 9

<210> 22

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tacctcccg 9

<210> 23

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atggagggc 9

<210> 24

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gagggatag 9

<210> 25

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

ctccctatc 9

<210> 26

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

ctgactaag 9

<210> 27

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gactgattc 9

<210> 28

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

aggaatatg 9

<210> 29

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

tccttatac 9

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 30

aaggattatg tatgagggat ag 22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 31

ttcctaatac atactcccta tc 22

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 32

aaggattatg tatctgacta ag 22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 33

ttcctaatac atagactgat tc 22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 34

aaggattatg tataggaata tg 22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 35

ttcctaatac atatccttat ac 22

<210> 36

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 36

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Arg Pro Val Gln Ser

20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Thr Leu Arg Leu Trp Phe Ala Val Thr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Asn Gly Ser Val Ser Trp Tyr Tyr Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Glu Asp Thr Gly Arg Ala Ser Arg Tyr Arg Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 37

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 37

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Phe Ala Val Ile Glu Pro Val Gln Ser

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Ser Phe Val Val Thr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gln Gly Ser Val Ser Phe Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Thr Thr

225 230 235 240

Arg Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Phe Asp Lys Gly Ser Ala Ser Met Tyr Arg Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 38

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 38

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Ser Ile Met Pro Ile Gln Thr

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 39

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 39

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15
Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ala Phe Ile Met Pro Ser Gln Thr
20 25 30
Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys
35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60
Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160
Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175
Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190
Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg
210 215 220
Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Ile Gly Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 40

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 40

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Met Ala Phe Ile Met Pro Thr Gln Thr

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 41

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 41

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Met Ala Phe Ile Leu Pro Glu Gln His

20 25 30

Met Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 42

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 42

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15
Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Met Ala Phe Ile Leu Pro Glu Gln His
20 25 30
Leu Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys

35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60
Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu
65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160
Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175
Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190
Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg
210 215 220
Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255
Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile
260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 43
<211> 354
<212
> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 43
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15
Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Met Ala Phe Ile Leu Pro Glu Gln Gly
20 25 30
Leu Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys
35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60
Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160
Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175
Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190
Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg
210 215 220
Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr
225 230 235 240
Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255
Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 44

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 44

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Met Ala Phe Ile Met Pro Asp Gln Ala

20 25 30

Pro Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Phe Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg

210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Arg Asp Leu Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 45

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 45

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Met Pro Thr Gln Trp Thr

210 215 220

Lys Phe Lys His Ser Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Thr Gln Ser Thr

225 230 235 240

Arg Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Met Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Ser Asp Gln Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile
260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350
Ser Pro

<210> 46
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 46
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15
Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln
20 25 30
Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60
Gly Tyr Val Ile Asp Ser Gly Ser Val Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Leu Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Thr Gln Ala Thr

225 230 235 240

Arg Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Thr Asp Asn Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 47

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 47

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Leu Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Ser Asp Gln Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 48

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 48

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Ser Asp Gln Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 49

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 49

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Ser Asp Gln Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 50

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 50

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Thr Gln Ala Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Ser Asp Val Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 51

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 51

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val

210 215 220

Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Ser Asp Arg Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile
260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 52
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 52
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15
Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Glu
20 25 30
Leu Lys Phe Lys His Gln Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys
35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60
Gly Tyr Val Ala Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160
Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175
Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190
Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val
210 215 220
Lys Phe Lys His Thr Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr
225 230 235 240
Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255
Tyr Val Ser Asp Gln Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Gln Ile

260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 53

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 53

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Thr Ile Arg Pro Gly Gln Glu

20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Gly Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Cys Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Thr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Glu Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val His Gln Leu Thr

225 230 235 240

Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Cys Gly Ser Ala Ser Phe Tyr His Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 54

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 54

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Val Ala Thr Ile Arg Pro Gly Gln Glu

```
            20                  25                  30
Leu Lys Phe Lys His Gly Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Cys Gln Lys

        35                  40                  45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala
    50                  55                  60
Gly Tyr Val Thr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Glu Leu Ser Gln
65                  70                  75                  80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
                85                  90                  95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

            100                 105                 110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
        115                 120                 125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
    130                 135                 140
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145                 150                 155                 160
Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

                165                 170                 175
Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
            180                 185                 190
Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
        195                 200                 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val His Gln Lys Thr

225                 230                 235                 240
Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
                245                 250                 255
Tyr Val Tyr Asp His Gly Ser Ala Ser Cys Tyr His Leu Ser Glu Ile
            260                 265                 270
```

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 55
<211> 354
<212
> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 55
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15
Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Val Ala Thr Ile Arg Pro Gly Gln Glu
20 25 30
Leu Lys Phe Lys His Gly Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Cys Gln Lys
35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60
Gly Tyr Val Thr Asp Ser Gly Ser Val Ser Arg Tyr Glu Leu Ser Gln
65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val His Gln Ser Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp His Gly Ser Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 56

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 56

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Ser Ile Ala Pro Ala Gln Asp

20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Arg Phe Phe Val Ser Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Ser Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Val Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp His Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 57

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 57

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Arg Ile Glu Pro Ala Gln Asp

20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Phe Val Ser Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Asp Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu His Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp His Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 58

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 58

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Gly Ser Ile Val Ala Arg Ile Glu Pro Ala Gln Asp

20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Phe Val Ser Gln Lys

35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Leu Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala

210 215 220

Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp His Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 59

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 59

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Ala Asp Gly Ser Ile Val Ala Arg Ile Glu Pro Ala Gln Asp
20 25 30

Cys Lys Phe Lys His Arg Leu Arg Leu Gln Phe Phe Val Ser Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Arg Asp Ser Gly Ser Val Ser Ser Tyr Asn Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205
Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala
210 215 220
Lys Phe Lys His Val Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr
225 230 235 240
Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255
Tyr Val Tyr Asp His Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile
260 265 270
Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 60
<211> 1065
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 60
atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatct atgccacgat ccggcctgtt caaagtacta agttcaagca cactctgcgg 120
ctctggttcg cggtcacgca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180
gagatcggtg tgggttacgt gtatgacaat ggcagcgtct cctggtacta tctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtggaggac 780

acgggcaggg cgagcaggta ccggctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 61

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 61

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatct ttgccgttat cgagcctgtt caaagtgcta agttcaagca ccggctgaag 120

ctctcgttcg ttgtcactca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgaccag ggcagcgtct ccttttacag gctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg gcagacgaca 720

aggcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgtttgac 780

aagggcagcg cgagcatgta ccggctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 62

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 62

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatct atgccagtat catgcctatt caaacggcta agttcaagca ccgtctgaag 120

ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780

cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 63

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 63

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatca ttgcctttat catgcctagt cagacggcta agttcaagca ccgtctgaag 120

ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgagatcgg tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780

cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccaag acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 64

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 64

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatca tggcctttat catgcctact cagacggcta agttcaagca ccgtctgaag 120

ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780

cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 65

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 65

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatca tggcctttat cttgcctgag cagcatatga agttcaagca ccgtctgagg 120

ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720
cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780
cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840
cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900
gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960
gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020
gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 66
<211> 1065
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 66
atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60
ggttccatca tggcctttat cttgcctgag cagcatctta agttcaagca ccgtctgagg 120
ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180
gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtccgag 240
atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300
caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420
cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480
ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540
gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600
ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660
cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720
cagcgccgat ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780

cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840
cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900
gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960
gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 67

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 67

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatca tggcctttat cttgcctgag cagggtctga agttcaagca ccgtctgagg 120

ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ccggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780

cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 68

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 68

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatca tggcctttat catgcctgat caggcgccta agttcaagca ccgtctgagg 120

ctccagttcg cggtcgctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtatgacttt ggcagcgtct cctattacag gctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctgtgcctg tatcgtgcct 660

cgtcaagatc ggaagttcaa gcaccagctg cggctctttt tcgaggtcgg tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgagggac 780

cttggcagcg cgagcactta ccgtctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 69

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 69

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcatgccg 660

acgcagtgga cgaagttcaa gcactcgctg ttgctccggt tccgggtcac ccagtcgaca 720

aggcgccgtt ggttcctcga caagctgatg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

cagggcaggg cgagctacta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 70

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 70

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gattgactcg ggcagcgtct ccacgtaccg gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atctagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcagctgg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tccgggtcac ccaggcgaca 720

aggcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgacggac 780

aacggcaggg cgagctacta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 71

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 71

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcagctgg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tccgggtctg ccaggcgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

cagggcagcg cgagctacta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 72

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 72

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcaggagg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tccgggtctg ccaggcgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

cagggcagcg cgagctacta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 73

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 73

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcaggagg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tccgggtctg ccaggcgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

cagggcagcg cgagctacta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 74

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 74

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcaggagg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tcagggtcac tcaggcgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

gttggcagcg cgagctatta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 75

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 75

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caacagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcaggagg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tccgggtctg ccaggcgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

cgtggcagcg cgagctatta caccctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 76

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 76

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatct atgcctgtat caagcctcat caagagctta agttcaagca ccagctgttg 120

ctctatttcg aggtctatca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt ggctgaccgt ggcagcgtct ccgagtaccg tctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctc tatcattccg 660

tcgcaggagg ttaagttcaa gcacactctg ctgctccgtt tccgggtctg ccaggcgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagattg gtgtgggtta cgtgtctgac 780

cagggcagcg cgagctacta caccctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccagg acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 77

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 77

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatcg tggccactat ccggccgggg caggagctga agttcaagca cggtctgcgg 120

ctcaggttct atgtctgtca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gacggacagt ggcagcgtct cccgttacga gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaagacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctctgtt tcagggtcca ccagttgaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtaggtta cgtgtatgac 780

tgcggcagcg cgagcttcta ccacctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactccaag acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 78

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 78

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatcg tggccactat ccggccgggg caggagctga agttcaagca cggtctgcgg 120

ctcaggttct atgtctgtca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg cgggttacgt gacggacagt ggcagcgtct cccgttacga gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattatcgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctctgtt tcagggtcca ccagaagaca 720

aagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtgggtta cgtgtatgac 780

cacggcagcg cgagctgcta ccacctgtcc gagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactcccac acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 79

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 79

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatcg tggccactat ccggccgggg caggagctga agttcaagca cggtctgcgg 120

ctcaggttct atgtctgtca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gacggacagt ggcagcgtct cccgttacga gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctctgtt tcagggtcca ccagtcgaca 720

aggcgccgtt ggttcctaga caagctggtg gacgagatcg gtgcgggtta cgtgtatgac 780

cacggcagcg cgagcctgta cagcctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactcccac acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 80

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 80

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatcg ttgccagtat cgctccggct caggattgta agttcaagca caggctgagg 120

ctccgtttct ttgtctctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gtctgactct ggcagcgtct ccagttacgt tctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctctgtt tccgggtctt tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtaggtta cgtgtatgac 780

cacggcaggg cgagcatcta ccagctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactcccac acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 81

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 81

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatcg ttgccaggat cgagccggct caggattgta agttcaagca caggctgagg 120

ctccagttct ttgtctctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gcgggactct ggcagcgtct ccagttacga tctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctccatt tccgggtctt tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtaggtta cgtgtatgac 780

cacggcaggg cgagcatcta ccagctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactcccac acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 82

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 82

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agactctgac 60

ggttccatcg ttgccaggat cgagccggct caggattgta agttcaagca caggctgagg 120

ctccagttct ttgtctctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gcgggactct ggcagcgtct ccagttactt gctgtcccag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctctgtt tccgggtctt tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtaggtta cgtgtatgac 780

cacggcaggg cgagcatcta ccagctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactcccac acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 83

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 83

atgaatacaa aatataataa agagttctta ctctacttag cagggtttgt agacgctgac 60

ggttccatcg ttgccaggat cgagccggct caggattgta agttcaagca caggctgagg 120

ctccagttct ttgtctctca gaagacacag cgccgttggt tcctcgacaa gctggtggac 180

gagatcggtg tgggttacgt gcgggactct ggcagcgtct ccagttacaa tctgtccgag 240

atcaagcctt tgcataattt tttaacacaa ctacaacctt ttctaaaact aaaacaaaaa 300

caagcaaatt tagttttaaa aattattgaa caacttccgt cagcaaaaga atccccggac 360

aaattcttag aagtttgtac atgggtggat caaattgcag ctctgaatga ttcgaagacg 420

cgtaaaacaa cttctgaaac cgttcgtgct gtgctagaca gtttaccagg atccgtggga 480

ggtctatcgc catctcaggc atccagcgcc gcatcctcgg cttcctcaag cccgggttca 540

gggatctccg aagcactcag agctggagca ggttccggca ctggatacaa caaggaattc 600

ctgctctacc tggcgggctt cgtcgacggg gacggctcca tctttgcctg tatccgtccg 660

tcgcagaggg ctaagttcaa gcacgtgctg cagctctgtt tccgggtctt tcagaagaca 720

cagcgccgtt ggttcctcga caagctggtg gacgagatcg gtgtaggtta cgtgtatgac 780

cacggcaggg cgagcatcta ccagctgtcc cagatcaagc ctctgcacaa cttcctgacc 840

cagctccagc ccttcctgaa gctcaagcag aagcaggcca acctcgtgct gaagatcatc 900

gagcagctgc cctccgccaa ggaatccccg gacaagttcc tggaggtgtg cacctgggtg 960

gaccagatcg ccgctctgaa cgactcccac acccgcaaga ccacttccga aaccgtccgc 1020

gccgttctag acagtctctc cgagaagaag aagtcgtccc cctaa 1065

<210> 84

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 84

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Thr Ile Arg Pro Val Gln Ser Thr Lys Phe Lys His Thr
20 25 30
Leu Arg Leu Trp Phe Ala Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Trp Tyr Tyr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 85

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 85

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Val Ile Glu Pro Val Gln Ser Ala Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Ser Phe Val Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gln
50 55 60
Gly Ser Val Ser Phe Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 86
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 86
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Ser Ile Met Pro Ile Gln Thr Ala Lys Phe Lys His Arg
20 25 30
Leu Lys Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 87
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 87
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Ile Ala Phe Ile Met Pro Ser Gln Thr Ala Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60
Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 88
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 88
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Met Ala Phe Ile Met Pro Thr Gln Thr Ala Lys Phe Lys His Arg
20 25 30
Leu Lys Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 89
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 89

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Met Ala Phe Ile Leu Pro Glu Gln His Met Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60
Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 90
<211> 147
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 90

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Met Ala Phe Ile Leu Pro Glu Gln His Leu Lys Phe Lys His Arg
20 25 30
Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 91

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 91

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Met Ala Phe Ile Leu Pro Glu Gln Gly Leu Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60
Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 92
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 92
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Met Ala Phe Ile Met Pro Asp Gln Ala Pro Lys Phe Lys His Arg
20 25 30
Leu Arg Leu Gln Phe Ala Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Phe
50 55 60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 93
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 93
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 94

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 94

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ile Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 95

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 95

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 96

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 96

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30
Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 97
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 97
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 98
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 98
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30
Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 99
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 99
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Gln Leu Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 100

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 100

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro His Gln Glu Leu Lys Phe Lys His Gln

20 25 30

Leu Leu Leu Tyr Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 101

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 101

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Val Ala Thr Ile Arg Pro Gly Gln Glu Leu Lys Phe Lys His Gly
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Thr Asp Ser
50 55 60
Gly Ser Val Ser Arg Tyr Glu Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 102

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 102

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Val Ala Thr Ile Arg Pro Gly Gln Glu Leu Lys Phe Lys His Gly
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala Gly Tyr Val Thr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Arg Tyr Glu Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 103
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 103
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Val Ala Thr Ile Arg Pro Gly Gln Glu Leu Lys Phe Lys His Gly
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Thr Asp Ser
50 55 60
Gly Ser Val Ser Arg Tyr Glu Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 104
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 104
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Val Ala Ser Ile Ala Pro Ala Gln Asp Cys Lys Phe Lys His Arg
20 25 30
Leu Arg Leu Arg Phe Phe Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 105
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 105

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Val Ala Arg Ile Glu Pro Ala Gln Asp Cys Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Arg Leu Gln Phe Phe Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser
50 55 60
Gly Ser Val Ser Ser Tyr Asp Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 106

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 106

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ser Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Val Ala Arg Ile Glu Pro Ala Gln Asp Cys Lys Phe Lys His Arg
20 25 30
Leu Arg Leu Gln Phe Phe Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Leu Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 107

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 107

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Ala Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Val Ala Arg Ile Glu Pro Ala Gln Asp Cys Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Arg Leu Gln Phe Phe Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Ser

50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Asn Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 108

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 108

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln

20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Lys Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Glu Asp Thr

50 55 60

Gly Arg Ala Ser Arg Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 109
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 109
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Thr Thr Arg Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Phe Asp Lys
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Met Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 110
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 110
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30
Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 111

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 111

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Glu Ile Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp

145

<210> 112

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 112

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30
Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 113
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 113

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln

20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 114
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 114
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30
Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 115
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 115
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 116

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 116

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Cys Ala Cys Ile Val Pro Arg Gln Asp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 117

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 117

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Met Pro Thr Gln Trp Thr Lys Phe Lys His Ser
20 25 30

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Thr Gln Ser Thr Arg Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Met Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Gln
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 118

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 118

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Leu Val Lys Phe Lys His Thr
20 25 30
Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Thr Gln Ala Thr Arg Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Thr Asp Asn
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 119
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 119
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Leu Val Lys Phe Lys His Thr
20 25 30

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Gln
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 120
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 120
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val Lys Phe Lys His Thr
20 25 30
Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Gln
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 121
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 121
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val Lys Phe Lys His Thr
20 25 30

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Gln
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 122

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 122

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Ile Pro Ser Gln Glu Val Lys Phe Lys His Thr

20 25 30

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Thr Gln Ala Thr Lys Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 123

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 123

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

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Arg
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 124

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 124

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

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Cys Gln Ala Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Gln
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145
<210> 125
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 125
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val
20 25 30

Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val His Gln Leu Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Cys
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Phe Tyr His Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 126
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 126
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val
20 25 30
Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val His Gln Lys Thr Lys Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Cys Tyr His Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 127
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 127

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val
20 25 30

Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val His Gln Ser Thr Arg Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala Gly Tyr Val Tyr Asp His
50 55 60
Gly Ser Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 128

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 128

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val
20 25 30
Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 129

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 129

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val

20 25 30

Leu Gln Leu His Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His

50 55 60

Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 130

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 130

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val

20 25 30

Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His

50 55 60

Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 131
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 131
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15
Ile Phe Ala Cys Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Val
20 25 30

Leu Gln Leu Cys Phe Arg Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His
50 55 60
Gly Arg Ala Ser Ile Tyr Gln Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125
Leu Asn Asp Ser His Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140
Val Leu Asp
145

<210> 132
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized

<400> 132
Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala
20 25 30
Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly Thr Gly
35 40

<210> 133
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 133
cgggaggtaa tacataatcc 20

<210> 134
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 134

gggtgggttg ctttacctct c 21

<210> 135

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 135

tgggctactg caactctgtt 20

<210> 136

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 136

aggacaaaag aggacggtct gccctgg 27

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 137

taagacccag cttcacggag 20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 138

tatgatcgcc tgttcctcca 20

<210> 139

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 139

ctggccgaag tataggaa 18

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 140

cgcaacatgt gacataaaga g 21

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 141

tctggatatc ctcttctggg 20

<210> 142

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 142

cctacatggt gtatctgac 19

<210> 143

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 143

gaacaccacc agaaaaacaa g 21

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 144

cacttcctgt aagacaacca g 21

<210> 145

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 145

atccctcata cccaatc 17

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 146

aaaaaccacg gtgctgttga 20

<210> 147

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 147

atggggtccg agacttttcc 20

<210> 148

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 148

gggtgggttg ctttacctct c 21

<210> 149

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 149

agagcatgcc atctgagtc 19

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 150

gtgaagtagc aaagcacctg 20

<210> 151

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 151

agagcatgcc atctgagtc 19

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 152

gggtgggttg ctttacctct c 21

<210> 153

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 153

tttggtatgg ggtccgagac 20

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 154

gtgaagtagc aaagcacctg 20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 155

tttggtatgg ggtccgagac 20

<210> 156

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 156

gggtgggttg ctttacctct c 21

<210> 157

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 157

gattctcaga aatggagtga ctg 23

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 158

gtgaagtagc aaagcacctg 20

<210> 159

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 159

gattctcaga aatggagtga ctg 23

<210> 160

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 160

atcagaagga ttatgtatag gaata 25

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 161

gggtgggttg ctttacctct 20

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 162

tctggatatc ctcttctggg 20

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 163

gtgaagtagc aaagcacctg 20

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 164

gtgaagtagc aaagcacctg 20

<210> 165

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 165

agtcacttcc taagctaaga caacc 25

<210> 166

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 166

cagaaggatt atgtatgagg gata 24

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 167

gtgaagtagc aaagcacctg 20

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 168

atggggtccg agacttttcc 20

<210> 169

<211> 335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 169

cggccgtccg ccttcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg gtgaggaatg 60

gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt tggcgctcta 120

aaaataactc ccgggagtta tttttagagc ggaggaatgg tggacaccca aatatggcga 180

cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg cattcctggg 240

ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg cggcccacga 300

gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctaga 335

<210> 170

<211> 3357

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<400> 170

ccatcctggt ctatagagag agttccagaa cagccagggc tacagataaa cccatctgga 60

aaaacaaagt tgaatgaccc aagaggggtt ctcagagggt ggcgtgtgct ccctggcaag 120

cctatgacat ggccggggcc tgcctctctc tgcctctgac cctcagtggc tcccatgaac 180

tccttgccca atggcatctt tttcctgcgc tccttgggtt attccagtct cccctcagca 240

ttccttcctc agggcctcgc tcttctctct gctccctcct tgcacagctg gctctgtcca 300

cctcagatgt cacagtgctc tctcagagga ggaaggcacc atgtaccctc tgtttcccag 360

gtaagggttc aatttttaaa aatggttttt tgtttgtttg tttgtttgtt tgtttgtttg 420

tttttcaaga cagggctcct ctgtgtagtc ctaactgtct tgaaactccc tctgtagacc 480

aggtcgacct cgaactcttg aaacctgcca cggaccaccc agtcaggtat ggaggtccct 540

ggaatgagcg tcctcgaagc taggtgggta agggttcggc ggtgacaaac agaaacaaac 600

acagaggcag tttgaatctg agtgtatttt gcagctctca agcaggggat tttatacata 660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa accaaacatt acatctctta gaaactatat ccaatgaaac 720

aatcacagat accaaccaaa accattgggc agagtaaagc acaaaaatca tccaagcatt 780

acaactctga aaccatgtat tcagtgaatc acaaacagaa caggtaacat cattattaat 840

ataaatcacc aaaatataac aattctaaaa ggatgtatcc agtgggggct gtcgtccaag 900

gctagtggca gatttccagg agcaggttag taaatcttaa ccactgaact aactctccag 960

ccccatggtc aattattatt tagcatctag tgcctaattt ttttttataa atcttcacta 1020

tgtaatttaa aactatttta attcttccta attaaggctt tctttaccat ataccaaaat 1080

tcacctccaa tgacacacgc gtagccatat gaaattttat tgttgggaaa atttgtacct 1140

atcataatag ttttgtaaat gatttaaaaa gcaaagtgtt agccgggcgt ggtggcacac 1200

gcctttaatc cctgcactcg ggaggcaggg gcaggaggat ttctgagttt gaggccagcc 1260

tggtctacag agtgagttcc aggacagcca gggctacaca gagaaaccct gtctcgaacc 1320

ccccaccccc caaaaaaagc aaagtgttgg tttccttggg gataaagtca tgttagtggc 1380

ccatctctag gcccatctca cccattattc tcgcttaaga tcttggccta ggctaccagg 1440

aacatgtaaa taagaaaagg aataagagaa aacaaaacag agagattgcc atgagaacta 1500

cggctcaata ttttttctct ccggcgaaga gttccacaac catctccagg aggcctccac 1560

gttttgaggt caatggcctc agtctgtgga acttgtcaca cagatcttac tggaggtggt 1620

gtggcagaaa cccattcctt ttagtgtctt gggctaaaag taaaaggccc agaggaggcc 1680

tttgctcatc tgaccatgct gacaaggaac acgggtgcca ggacagaggc tggaccccag 1740

gaacacctta aacacttctt cccttctccg ccccctagag caggctcccc tcaccagcct 1800

gggcagaaat gggggaagat ggagtgaagc catactggct actccagaat caacagaggg 1860

agccgggggc aatactggag aagctggtct ccccccaggg gcaatcctgg cacctcccag 1920

gcagaagagg aaacttccac agtgcatctc acttccatga atcccctcct cggactctga 1980

ggtccttggt cacagctgag gtgcaaaagg ctcctgtcat attgtgtcct gctctggtct 2040

gccttccaca gcttgggggc cacctagccc acctctccct agggatgaga gcagccacta 2100

cgggtctagg ctgcccatgt aaggaggcaa ggcctgggga cacccgagat gcctggttat 2160

aattaaccca gacatgtggc tgccccccgc cccccaacac ctgctgcctg agcctcaccc 2220

ccaccccggt gcctgggtct taggctctgt acaccatgga ggagaagctc gctctaaaaa 2280

taaccctgtc cctggtggat ccagggtgag gggcaggctg agggcggcca cttccctcag 2340

ccgcaggttt gttttcccaa gaatggtttt tctgcttctg tagcttttcc tgtcaattct 2400

gccatggtgg agcagcctgc actgggcttc tgggagaaac caaaccgggt tctaaccttt 2460

cagctacagt tattgccttt cctgtagatg ggcgactaca gccccacccc cacccccgtc 2520

tcctgtatcc ttcctgggcc tggggatcct aggctttcac tggaaatttc cccccaggtg 2580

ctgtaggcta gagtcacggc tcccaagaac agtgcttgcc tggcatgcat ggttctgaac 2640

ctccaactgc aaaaaatgac acataccttg acccttggaa ggctgaggca gggggattgc 2700

catgagtgca aagccagact gggtggcata gttagaccct gtctcaaaaa accaaaaaca 2760

attaaataac taaagtcagg caagtaatcc tactcgggag actgaggcag agggattgtt 2820

acatgtctga ggccagcctg gactacatag ggtttcaggc tagccctgtc tacagagtaa 2880

ggccctattt caaaaacaca aacaaaatgg ttctcccagc tgctaatgct caccaggcaa 2940

tgaagcctgg tgagcattag caatgaaggc aatgaaggag ggtgctggct acaatcaagg 3000

ctgtggggga ctgagggcag gctgtaacag gcttgggggc cagggcttat acgtgcctgg 3060

gactcccaaa gtattactgt tccatgttcc cggcgaaggg ccagctgtcc cccgccagct 3120

agactcagca cttagtttag gaaccagtga gcaagtcagc ccttggggca gcccatacaa 3180

ggccatgggg ctgggcaagc tgcacgcctg ggtccggggt gggcacggtg cccgggcaac 3240

gagctgaaag ctcatctgct ctcaggggcc cctccctggg gacagcccct cctggctagt 3300

cacaccctgt aggctcctct atataaccca ggggcacagg ggctgccccc gggtcac 3357

<210> 171

<211> 655

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 171

cctgagtttg aatctctcca actcagccag cctcagtttc ccctccactc agtccctagg 60

aggaaggggc gcccaagcgg gtttctgggg ttagactgcc ctccattgca attggtcctt 120

ctcccggcct ctgcttcctc cagctcacag ggtatctgct cctcctggag ccacaccttg 180

gttccccgag gtgccgctgg gactcgggta ggggtgaggg cccaggggcg acaggggggag 240

ccgagggcca caggaagggc tggtggctga aggagactca ggggccaggg gacggtggct 300

tctacgtgct tgggacgttc ccagccaccg tcccatgttc ccggcggggg ccagctgtcc 360

ccaccgccag cccaactcag cacttggtta gggtatcagc ttggtggggg cgtgagccca 420

gccctggggc gctcagccca tacaaggcca tggggctggg cgcaaagcat gcctgggttc 480

agggtgggta tggtgccgga gcagggaggt gagaggctca gctgccctcc agaactcctc 540

cctggggaca acccctccca gccaatagca cagcctaggt ccccctatat aaggccacgg 600

ctgctggccc ttcctttggg tcagtgtcac ctccaggata cagacagccc ccctt 655

<210> 172

<211> 206

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<400> 172

ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct 60

ggttataatt aacccagaca tgtggctgcc ccccccccc caacacctgc tgcctgagcc 120

tcacccccac cccggtgcct gggtcttagg ctctgtacac catggaggag aagctcgctc 180

taaaaataac cctgtccctg gtggat 206

<210> 173

<211> 211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 173

ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct 60

ggttataatt aaccccaaca cctgctgccc ccccccccc aacacctgct gcctgagcct 120

gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 180

cgctctaaaa ataaccctgt ccctggtgga t 211

<210> 174

<211> 334

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 174

tggccaccgc cttcggcacc atcctcacga cacccaaata tggcgacggg tgaggaatgg 60

tggggagtta tttttagagc ggtgaggaag gtgggcaggc agcaggtgtt ggcgctctaa 120

aaataactcc cgggagttat ttttagagcg gaggaatggt ggacacccaa atatggcgac 180

ggttcctcac ccgtcgccat atttgggtgt ccgccctcgg ccggggccgc attcctgggg 240

gccgggcggt gctcccgccc gcctcgataa aaggctccgg ggccggcggc ggcccacgag 300

ctacccggag gagcgggagg cgccaagctc taga 334

<210> 175

<211> 792

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 175

aagcttgcat gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60

aggggaggtg gtgtgagacg ctcctgtctc tcctctatct gcccatcggc cctttgggga 120

ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcga gggcaacaga 180

cctttcatgg gcaaaccttg gggccctgct gtctagcatg ccccactacg ggtctaggct 240

gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaacccaga 300

catgtggctg ccccccccc cccaacacct gctgcctcta aaaataaccc tgtccctggt 360

ggatcccctg catgcgaaga tcttcgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420

caggcttggg ggccagggct tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt 480

tcccggcgaa gggccagctg tcccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag 540

tgagcaagtc agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600

ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg 660

gcccctccct ggggacagcc cctcctggct agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac 720

ccaggggcac aggggctgcc ctcattctac caccacctcc acagcacaga cagacactca 780

ggagcagcca gc 792

<210> 176

<211> 450

<212> DNA

<213> artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 176

ctagactagc atgctgccca tgtaaggagg caaggcctgg ggacacccga gatgcctggt 60

tataattaac ccagacatgt ggctgccccc ccccccccaa cacctgctgc ctctaaaaat 120

aaccctgcat gccatgttcc cggcgaaggg ccagctgtcc cccgccagct agactcagca 180

cttagtttag gaaccagtga gcaagtcagc ccttggggca gcccatacaa ggccatgggg 240

ctgggcaagc tgcacgcctg ggtccggggt gggcacggtg cccgggcaac gagctgaaag 300

ctcatctgct ctcaggggcc cctccctggg gacagcccct cctggctagt cacaccctgt 360

aggctcctct atataaccca ggggcacagg ggctgccctc attctaccac cacctccaca 420

gcacagacag acactcagga gccagccagc 450

<210> 177

<211> 1417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 177

ttctgagtcc tctaaggtcc ctcactccca actcagcccc atgtcctgtc aattcccact 60

cagtgtctga tctccttctc ctcacctttc ccatctcccg tttgacccag cttcctgagc 120

tctcctccca ttccccttt tggagtcctc ctcctctccc agaacccagt aataagtggg 180

ctcctccctg gcctggaccc ccgtggtaac cctataaggc gaggcagctg ctgtctgagg 240

cagggagggg ctggtgtggg aggctaaggg cagctgctaa gtttagggtg gctccttctc 300

tcttcttaga gacaacaggt ggctggggcc tcagtgccca gaaaagaaaa tgtcttagag 360

gtatcggcat gggcctggag gaggggggac agggcagggg gaggcatctt cctcaggaca 420

tcgggtccta gaggaccttg cttcctagct gggcctttcc ttctcctcta taaataccag 480

ctctggtatt tcgccttggc agctgttgct gctagggaga cggctggctt gacatgcatc 540

tcctgacaaa acacaaaccc gtggtgtgag tgggtgtggg cggtgtgagt agggggatga 600

atcagagagg gggcgaggga gacaggggcg caggagtcag gcaaaggcga tgcgggggtg 660

cgactacacg cagttggaaa cagtcgtcag aagattctgg aaactatctt gctggctata 720

aacttgaggg aagcagaagg ccaacattcc tcccaaggga aactgaggct cagagttaaa 780

acccaggtat cagtgatatg catgtgcccc ggccagggtc actctctgac taaccggtac 840

ctaccctaca ggcctaccta gagactcttt tgaaaggatg gtagagacct gtccgggctt 900

tgcccacagt cgttggaaac ctcagcattt tctaggcaac ttgtgcgaat aaaacacttc 960

gggggtcctt cttgttcatt ccaataacct aaaacctctc ctcggagaaa atagggggcc 1020

tcaaacaaac gaaattctct agcccgcttt ccccaggata aggcaggcat ccaaatggaa 1080

aaaaaggggc cggccggggg tctcctgtca gctccttgcc ctgtgaaacc cagcaggcct 1140

gcctgtcttc tgtcctcttg gggctgtcca ggggcgcagg cctcttgcgg gggagctggc 1200

ctccccgccc cctcgcctgt ggccgccctt ttcctggcag gacagaggga tcctgcagct 1260

gtcaggggag gggcgccggg gggtgatgtc aggagggcta caaatagtgc agacagctaa 1320

ggggctccgt cacccatctt cacatccact ccagccggct gcccgcccgc tgcctcctct 1380

gtgcgtccgc ccagccagcc tcgtccacgc cgccacc 1417

<210> 178

<211> 579

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 178

accaacgact gattaactct acgtacgaaa cgtatgaaga cggacgaccc ctcggacccc 60

tgaaaggtgt ggccctcaat aaaaatctcg catatggcga cggcccttgg cagtacatca 120

aaacctttca gggcaatcac gataaccgac cccagccaat agcaccaacg actgattaac 180

tctacgtacg aaacgtatga agacggacga cccctcggac ccctgaaagg tgtggcactc 240

cttaccacgg tccgtatagc ccaaactaca tgacggttcc cagccaatag ccgctctaaa 300

aataactccc ggcagcggta taaacccaca gcgctctaaa aataactccc ccggcagcgg 360

tatagggccc ctccctgggg acagccccaa cctttcaggg caatcacggt ccgcccggta 420

aatggcaccc tcaataaaaa tctcgcatcc ctttggactt cggccccatt gacgtcaatg 480

gggtccaaaa aatatatcag gggcttcagg tttccctaca aggcctgggg acaacccgat 540

atgcctgggt ccaaaaaata tatcaggtgg ttcagtcgt 579

<210> 179

<211> 346

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 179

acaggggtcc ggaacggcag cggtataaac ccacagtggt tcagtcgtcc gtccgtcgtc 60

cacaaccgtc caaaaaatat atcaggaact acatgacggt tcaccaacga ctgattaact 120

ctacgtacga aacgtatgaa gacggacgac ccctcggacc cctgaaaggt gtggaccaac 180

gactgattaa ctctacgtac gaaacgtatg aagacggacg acccctcgga cccctgaaag 240

gtgtgggtcc aaaaaatata tcaggggaca cccgagatgc ctggttaaac tacatgacgg 300

ttcccccgac aggggtccct ccccgggtaa taactgcagt tacccg 346

<210> 180

<211> 301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 180

accaacgact gattaactct acgtacgaaa cgtatgaaga cggacgaccc ctcggacccc 60

tgaaaggtgt ggcttggcag tacatcaagc ccattgacgt caataatctt ggcagtacat 120

caaaccaacg actgattaac tctacgtacg aaacgtatga agacggacga cccctcggac 180

ccctgaaagg tgtggaccaa cgactgatta actctacgta cgaaacgtat gaagacggac 240

gacccctcgg acccctgaaa ggtgtgggtc caaaaaatat atcaggcaag gcctggggac 300

a 301

<210> 181

<211> 1033

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 181

gcggccgcat cgatattcgt aaacgcgttc cttgacacct ctgtctcctc aggtgcctgg 60

ctcccagtcc ccagaacgcc tctcctgtac cttgcttcct agctgggcct ttccttctcc 120

tctataaata ccagctctgg tatttcgcct tggcagctgt tgctgctagg gcgcgccgtt 180

taaaccacgt gctcgagagc agccactacg ggtctaggct gcccatgtaa ggaggcaagg 240

cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaacccaga catgtggctg ccccccccca 300

caacacctgc tgcctgagcc tcacccccac cccggtgcct gggtcttagg ctctgtacac 360

catggaggag aagctcgctc taaaaataac cctgtcgaca cgtgtctaga ctgatcaatc 420

aaggctgtgg gggactgagg gcaggctgta acaggcttgg gggccagggc ttatacgtgc 480

ctgggactcc caaagtatta ctgttccatg ttcccggcga agggccagct gtcccccgcc 540

agctagactc agcacttagt ttaggaacca gtgagcaagt cagcccttgg ggcagcccat 600

acaaggccat ggggctgggc aagctgcacg cctgggtccg gggtgggcac ggtgcccggg 660

caacgagctg aaagctcatc tgctctcagg ggcccctccc tggggacagc ccctcctggc 720

tgatcacacc ctgtaggctc ctctatataa cccaggggca ctagtgggct gccctcagtt 780

caccaccacc tccacagcac agacagacac tcaggagcca gccaggtacc caggtaggga 840

ctggccaccc cagcccacct gtcccaatgc tgacttagtg caaggcgagc cagcaaggag 900

ggaggacagg tggcagtggg gggtgaggag catctaaaaa tagccacaaa ctgagttctt 960

aagtctgaac ccggtctgct cgcaggtacc ggtcccaaag gccgccaccg ctagcgatat 1020

cggatcctca tga 1033

<210> 182

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 182

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
180 185 190

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
260 265 270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
290 295 300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385 390 395 400
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
405 410 415

Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
435 440 445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu

```
    450                 455                 460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
465                 470                 475                 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
                485                 490                 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
            500                 505                 510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
        515                 520                 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
    530                 535                 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545                 550                 555                 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
                565                 570                 575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
            580                 585                 590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
        595                 600                 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
    610                 615                 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625                 630                 635                 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
                645                 650                 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
            660                 665                 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
        675                 680                 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
    690                 695                 700
```

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 183
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 183
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

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

530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile

545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser

565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met

625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 184

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 184

gctgaacagt ttctcagaaa gaca 24

<210> 185

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 185

ggctgttttc atccaggttg tg 22

<210> 186

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 186

tcttaaggac ctccaagg 18

<210> 187

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 187

gggtgggttg ctttacctct ctag 24

<210> 188

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 188

tcacatcatg agatttagtc acttcc 26

<210> 189

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 189

ttgctacttc acagtaacca catgg 25

<210> 190

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 190

gggtgggttg ctttacctct 20

<210> 191

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 191

tctggatatc ctcttctggg 20

<210> 192

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 192

atcagaagga ttatgtatag gaata 25

<210> 193

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 193

gctatctgga tatcctcttc tggg 24