



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0169697
(43) 공개일자 2024년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/34 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/34 (2013.01)
C12N 15/11 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-7036719
(22) 출원일자(국제) 2023년04월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/059142
(87) 국제공개번호 WO 2023/194537
국제공개일자 2023년10월12일
(30) 우선권주장
63/328,912 2022년04월08일 미국(US)
63/432,466 2022년12월14일 미국(US)

(71) 출원인
글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 디벨로
프먼트 리미티드
영국 에스지1 2엔와이 스티버지니 건넬스 우드 로
드 지에스케이 메디슨즈 리서치 센터
(72) 발명자
크라메리, 안드레아스
영국 에스지1 2엔와이 하트퍼드셔 스티버니지 건
넬스 우드 로드 지에스케이 내
윌리스트, 더글라스
미국 19426 펜실베니아 칼리지빌 사우스 칼리지빌
로드 1250 지에스케이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 오승현

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 올리고뉴클레오타이드를 포함한 폴리뉴클레오타이드의 신규 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 생산을 위해 효소를 사용하는 신규 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 방법은 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 요법에 사용하기 위한 것의 생산에 사용하기에 적합하다.

대표도



(72) 발명자

호스포드, 조셉

영국 에스지1 2엔와이 하트퍼드셔 스티버니지 건넬
스 우드 로드 지에스케이

튜, 데이비드

영국 에스지1 2엔와이 하트퍼드셔 스티버니지 건넬
스 우드 로드 지에스케이

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법으로서,

- 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시켜 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 1개를, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계;
- 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드(들) 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오타이드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계; 및
- 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물 및 주형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스를 변성시킴으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 d)는, 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물 및 주형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스를 변성시키기 전에, 조건을 변화시켜 불순물 폴리뉴클레오타이드 및 주형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스를 변성시키고, 임의의 불순물 폴리뉴클레오타이드(들)를 분리하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 5' 포스페이트, 5' 티오포스페이트, 5' 디티오포스페이트 또는 5' 메틸포스페이트를 포함하고, 임의로 여기서 서열 갭의 3' 단부의 절편 폴리뉴클레오타이드가 5' 포스페이트, 5' 포스포로티오에이트, 5' 포스포로디티오에이트 또는 5' 메틸포스페이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀이 (i) 자연 발생 뉴클레오시드 트리포스페이트; (ii) 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트 또는 (iii) 자연 발생 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트로 이루어진 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 변형, 핵염기의 변형 및/또는 백본의 변형을 포함하고, 임의로 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 N1-메틸-슈도우리딘인

방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 리가제가 절편 폴리뉴클레오티드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드의 3' 단부 및/또는 5' 단부를 인접한 절편 폴리뉴클레오티드 또는 인접한 연장된 절편 폴리뉴클레오티드에 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 형성하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)에서 리가제가 2개의 올리고뉴클레오티드를 함께 라이게이션시킬 수 있으며, 여기서 연결될 접합부 뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 다는 변형된 뉴클레오티드인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 주형이 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물로부터 상기 주형이 분리되도록 하는 특성을 갖는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 주형 폴리뉴클레오티드를 재순환시키는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 주형 폴리뉴클레오티드가 재순환된 주형 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 반연속식 또는 연속식인 방법.

청구항 14

이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법으로서, 2개의 상보적 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 어닐링시키는 것을 포함하며, 이 중 적어도 1개는 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 것이고, 임의로 둘 다가 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 것인 방법.

청구항 15

적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법으로서,

- 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시켜 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 중 적어도 1개를, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;
- 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드(들) 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오티드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계;
- 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물 및 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시킴으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계; 및
- 단계 a)에서의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 주형 폴리뉴클레오티드로서 사용하고, 단계 a) 내지 c)를 반복하여 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계

를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 포함한 폴리뉴클레오타이드의 생산을 위해 폴리머라제 및 리가제를 사용하는 신규 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 방법은 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한 변형된 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 요법에 사용하기 위한 것의 생산에 사용하기에 적합하다.

배경 기술

[0002] 예를 들어 포스포아미다이트 화학을 통한 폴리뉴클레오타이드 및 변형된 폴리뉴클레오타이드, 특히 올리고뉴클레오타이드 및 변형된 올리고뉴클레오타이드의 화학적 합성은 널리 확립되어 있고, 이는 수십년 동안 이들 규정된 서열 생체중합체를 합성하기 위해 선택된 방법이었다. 합성 방법은 통상적으로 고체-지지된 합성 (흔히 고체-상 합성으로 지칭됨)으로서 실행되며, 여기서 단일 뉴클레오타이드는 순차적으로 첨가되고, 각각의 뉴클레오타이드의 첨가는 후속 단계를 위한 준비에 있어서 성장하고 있는 올리고뉴클레오타이드 ("올리고")의 첨가 및 탈보호를 위해 여러 화학적 단계의 사이클을 필요로 한다. 뉴클레오타이드의 순차적 첨가의 종료 시, 올리고는 고체 상 지지체로부터 방출되고, 추가의 탈보호가 이루어지고, 이어서 조 올리고뉴클레오타이드는 칼럼 크로마토그래피에 의해 추가로 정제된다.

[0003] 이러한 방법은 상용적인 것으로 간주될 수 있고 자동화될 수 있지만, 특히 목표가, 캡머, siRNA, miRNA 및 압타머를 포함한 안티센스 분자와 같은 올리고뉴클레오타이드 치료제 및 치료 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 치료제에 필요한 바와 같이, 대규모로 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 것인 경우에, 이러한 방법론에는 여러 단점이 존재한다. 이들 단점은 배치 크기를 제한하는 고체-지지된 화학의 규모 확대 제한, 및 대량의 올리고뉴클레오타이드를 정제하기 위한 크로마토그래피의 사용에 있어서의 작업적 제한을 포함한다. 이들 제한은 규모 확대를 비용이 많이 들고 시간이 오래 걸리게 하며, 다중 합성 라운드가 필요하게 한다. 추가적으로, 합성되는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 길이에 따라 오류가 축적되어, 보다 긴 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드 산물의 규모 확대에 추가의 작업적 제한이 생긴다.

[0004] 따라서, 화학적 합성 및 고체-지지된 합성 둘 다를 감소시키거나 또는 이상적으로는 둘 다를 제거하고, 올리고뉴클레오타이드 및 보다 긴 폴리뉴클레오타이드를 생산하기 위해 효율적으로, 비용 효과적으로, 그리고 보다 큰 규모로 작동할 수 있는 합성을 수행하면서, 서열에서의 오류는 최소화할 필요가 있다.

[0005] WO2018/011067은 올리고뉴클레오타이드의 풀이 상보적 주형 및 라이게이션 방법을 사용하여 지시된 방식으로 함께 라이게이션되는 신규 라이게이션 방법을 개시한다. WO2019/121500은 라이게이션 방법에 사용될 수 있는, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 생산에서 효소, 특히 단일 가닥 리가제 및 트랜스퍼라제를 사용하는 신규 방법을 개시한다.

[0006] 단일 가닥 리가제 및 트랜스퍼라제를 사용하여 각각의 뉴클레오타이드를 쉘에 첨가하는 방법은 복잡하고, 한 번에 1개의 뉴클레오타이드를 첨가하여 순차적으로 수행되어야 하며, 첨가를 용이하게 하기 위해 각각의 라운드에서 탈보호 단계가 요구되며, 이는 시간 소모적이다. 이어서, 풀 내의 개별 올리고뉴클레오타이드는 각각, 최종 올리고뉴클레오타이드 산물을 생산하기 위해 주형을 사용하여 정확한 배향으로 서로 라이게이션되어야 한다. 보다 큰 폴리뉴클레오타이드로의 이러한 방법의 규모 확대는 한 번에 1개의 뉴클레오타이드를 첨가함으로써 다수의 짧은 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 것이 필요하다는 것을 의미하고, 이는 이어서 최종 산물을 생산하기 위해 정확한 배향으로 라이게이션되어야 한다. 본질적으로, 최종 산물의 모든 단일 뉴클레오타이드는, 라이게이션되어 최종 산물을 생성하는 보다 작은 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 데 있어서 한 번에 1개씩 첨가되어야 하며, 이는 효율을 감소시키고 긴 제조 공정을 필요로 한다. 이에 따른 오류 도입의 위험은 더 높아진다. 따라서, 산물 서열에서의 오류를 최소화하면서 올리고뉴클레오타이드 및 보다 큰 폴리뉴클레오타이드의 생산 효율을 증가시키기 위해 복잡성을 감소시키는 대안적 및/또는 개선된 방법을 제공할 필요가 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명의 제1 측면에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 방법은

[0008] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는

조건 하에 접촉시켜 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 겹이 형성되는 것인 단계;

[0009] b) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 중 적어도 1개를, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0010] c) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드(들) 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오티드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계; 및

[0011] d) 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물 및 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시킴으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계

[0012] 를 포함한다.

[0013] 본 발명의 제2 측면에서, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 방법은 2개의 상보적 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 어닐링시키는 것을 포함하고, 이 중 적어도 1개는 본원에 개시된 바와 같은 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 생산 방법에 의해 생산되었고, 임의로 둘 다가 본원에 개시된 바와 같은 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 생산 방법에 의해 생산되었다.

[0014] 본 발명의 제3 측면에서, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 방법은

[0015] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시켜 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 겹이 형성되는 것인 단계;

[0016] b) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 중 적어도 1개를, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0017] c) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드(들) 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오티드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계;

[0018] d) 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물 및 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시킴으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계; 및

[0019] e) 단계 a)에서의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 주형 폴리뉴클레오티드로서 사용하고, 단계 a) 내지 c)를 반복하여 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계

[0020] 를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 절편 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시켜 산물을 형성하는 단계 및 조건을 변화시켜 불순물을 제거하는 단계를 포함하는, 폴리머라제를 사용하여 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 것을 보여주는 개략적 예이다.

도 2는 다중 주형 구성의 개략적 예이다.

도 3a는 겹 충전 반응 출발 물질, 즉 주형 및 2개의 절편 올리고뉴클레오티드 (프라이머 N은 폴리머라제에 대한 프라이머로서 작용하고 3'블록 1은 스톱퍼로서 작용함)를 보여주는 HPLC 트레이스를 예시한다.

도 3b는 겹 충전 반응 후의 산물 형성을 보여주는 HPLC 트레이스를 예시한다. 프라이머 N+5는 5 bp 겹을 충전시키기 위해 폴리머라제 및 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용한 프라이머 N의 성공적인 연장을 나타낸다.

도 4는 어닐링된 5' 프라이머를 갖는 주형, 및 별개로 5' 프라이머로서 작용하는 헤어핀 루프를 갖는 주형을 보여주는 개략적 예이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 정의
- [0023] 본원에 사용된 "폴리뉴클레오티드"는 공유 결합을 통해 서로 연결된 2개 이상의 뉴클레오티드 단량체, 즉 뉴클레오티드 잔기의 중합체를 의미한다. 단일 폴리뉴클레오티드 분자는, 예를 들어 쉘 구조 내에 뉴클레오티드의 14개 이상의 단량체를 포함할 수 있다. DNA 및 RNA는 폴리뉴클레오티드의 예이다. 폴리뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 무한수의 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 치료상, 예를 들어 치료 mRNA (mRNA 백신으로서 사용될 수 있음), 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, miRNA, 압타머, CRISPR 가이드 RNA, 및 DNA 및 RNA 편집 효소를 동원하고 가이드하는 올리고뉴클레오티드, 예컨대 A에서 I로의 RNA 염기-편집 올리고뉴클레오티드 (AIMer)를 생산하는 데 유용하다.
- [0024] 본원에 사용된 용어 "치료 폴리뉴클레오티드"는, 예를 들어 인간 또는 동물의 상태 또는 질환의 예방 또는 치료에서 치료 용도를 갖는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드 잔기 또는 연결을 함유한다. 치료 폴리뉴클레오티드는 안티센스, 스플라이스-스위칭 또는 엑손-스킵핑, 면역자극, 예를 들어 마이크로RNA (miRNA) 및 소형 간섭 RNA (siRNA)를 통한 RNA 간섭 (RNAi), 및 DNA 및 RNA 편집 효소의 동원 및 가이드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 상이한 메카니즘 중 1종을 통해 작용한다. 치료 폴리뉴클레오티드는 압타머일 수 있다. 치료 폴리뉴클레오티드는 항상은 아니지만 통상적으로, 규정된 서열을 가질 것이다. 치료 폴리뉴클레오티드는 치료 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0025] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "치료 폴리뉴클레오티드"는 각각 "올리고뉴클레오티드" 및 "치료 올리고뉴클레오티드"를 포괄한다.
- [0026] 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드" 또는 간단히 "올리고"는 뉴클레오티드 잔기의 중합체를 의미한다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로 3 내지 30개 뉴클레오티드 범위의 용어 "폴리뉴클레오티드"보다 더 짧은 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 통상적으로 사용된다. 이들은 데옥시리보뉴클레오티드 (여기서 생성되는 올리고뉴클레오티드는 DNA임), 리보뉴클레오티드 (여기서 생성되는 올리고뉴클레오티드는 RNA임), 변형된 뉴클레오티드, 또는 그의 혼합물일 수 있다.
- [0027] 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 전적으로 자연에서 발견되는 바와 같은 뉴클레오티드 잔기 (즉, "천연 뉴클레오티드" 또는 "자연 발생 뉴클레오티드")로 구성될 수 있거나, 또는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드, 또는 뉴클레오티드 사이의 변형된 적어도 1개의 연결을 함유할 수 있다. 자연 발생 뉴클레오티드의 예는 데옥시아데노신 모노포스페이트, 데옥시시티딘 모노포스페이트, 데옥시구아노신 모노포스페이트, 데옥시티미딘 모노포스페이트, 데옥시우리딘 모노포스페이트, 아데노신 모노포스페이트, 시티딘 모노포스페이트, 구아노신 모노포스페이트, 티미딘 모노포스페이트 및 우리딘 모노포스페이트를 포함한다. 변형된 뉴클레오티드는 자연 발생 뉴클레오티드가 아니다 (즉, 비-자연 뉴클레오티드임). 변형된 뉴클레오티드는 변형된, 예를 들어 화학적으로 변형된 자연 발생 뉴클레오티드일 수 있다. 변형된 뉴클레오티드는 변형된 백본, 당 및/또는 핵염기를 포함할 수 있다. 2'OMe 또는 C5 피리미딘 변형과 같이 특정 변형은 자연에서, 즉 자연 발생 뉴클레오티드에서 산발적으로 발생하는 것으로 인정되지만, 본 개시내용에서 이들은 변형된 뉴클레오티드로 간주된다. 올리고뉴클레오티드를 비롯한 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 또 다른 분자, 예를 들어 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 또는 그의 다중체 (GalNAc 클러스터)에 접합될 수 있다.
- [0028] 본원에 사용된 용어 "치료 올리고뉴클레오티드"는, 예를 들어 인간 또는 동물의 상태 또는 질환의 예방 또는 치료에서 치료 용도를 갖는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드 잔기 또는 연결을 함유한다. 치료 올리고뉴클레오티드는 안티센스, 스플라이스-스위칭 또는 엑손-스킵핑, 면역자극, 및 예를 들어 마이크로RNA (miRNA) 및 소형 간섭 RNA (siRNA)를 통한 RNA 간섭 (RNAi)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 상이한 메카니즘 중 1종을 통해 작용한다. 치료 올리고뉴클레오티드는 압타머일 수 있다. 치료 올리고뉴클레오티드는 항상은 아니지만 통상적으로, 규정된 서열을 가질 것이다. 치료 올리고뉴클레오티드는 치료 폴리뉴클레오티드의 예이다.
- [0029] 본원에 사용된 용어 "주형"은 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 주형은 표적 (또는 산물) 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 서열에 100% 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 주형은 표적 (또는 산물) 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 서열에 100% 상보적인 서열로 이루어질 수 있다. 주형은 산물 서열과 비교하여 더 긴 서열일 수 있다. 주형은 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물을 생산하는 데 사용되지 않는 서열을 포함할 수 있다. 주형이 산물 서열과 비교하여 서열상 더 긴 경우, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고

뉴클레오타이드 산물의 생산 및/또는 길이를 제어하기 위해 스톱퍼가 사용될 수 있다. 주형이 산물 서열과 비교하여 서열상 더 긴 경우, 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물의 생산 및/또는 길이를 제어하기 위해 프라이머가 사용될 수 있다. 주형이 산물 서열과 비교하여 서열상 더 긴 경우, 이는 헤어핀 루프를 포함할 수 있다. 헤어핀 루프는 프라이머로서 작용할 수 있다. 주형은 헤어핀 루프 내의 절편 중 하나를 포함할 수 있다. 이러한 경우에, 산물은 뉴클레아제, 니카제, DNA자임에 의한 절단 또는 화학적 방법을 통해 주형으로부터 방출될 수 있다. 주형은 산물 서열과 비교하여 더 짧은 서열일 수 있다. 주형이 산물 서열과 비교하여 서열상 더 짧은 경우, 적어도 1개의 절편은 절편이 주형에 어닐링될 때 주형을 오버행할 것이다. 주형은 100% 미만으로 상보적인 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어질 수 있다. 주형 서열은 각각의 상보적 뉴클레오타이드가 표적 서열 내의 변형된 뉴클레오타이드의 비변형된 형태에 상보적하도록 한 것일 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "상보적"은 100% 상보적을 의미한다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "산물"은 특정 서열 및 변형 세트를 갖는 목적하는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 의미하며, 본원에서 또한 "표적 폴리뉴클레오타이드" 또는 "표적 올리고뉴클레오타이드"로도 지칭된다. "산물 서열"은 "표적 폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "표적 올리고뉴클레오타이드 서열"과 상호교환가능하게 사용되고, 산물의 염기 서열을 지칭한다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀"은 각각 서열상 다를 수 있고, 표적 서열보다 더 짧을 수 있고, 표적 서열과 동일한 서열을 갖지 않을 수 있는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 군을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 합성의 산물일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 비-무작위일 수 있다 (즉, 무작위로 선택된 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 군이 아님, 그러나 본 발명의 방법에 따라 최종 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하기 위한 목적으로 특이적으로 설계되고 선택됨). 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물의 절편일 수 있다. 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 서열이 상이할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 산물 서열의 절편을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 산물 서열의 절편으로 이루어질 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물의 절편을 특이적으로 포함하도록 조작될 수 있다. 산물 서열의 적어도 1개의 절편은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 폴리머라제, 예컨대 DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제를 사용한 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 합성의 산물일 수 있다. 1개 이상 또는 모든 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 화학적 합성, 예를 들어 고체-지지된 또는 용액 상 합성을 사용하여, 예컨대 포스포르아미다이트 화학을 통해 제조될 수 있거나, 또는 효소적 합성, 또는 그의 조합을 사용하여 제조될 수 있다. 효소적 합성은 폴리머라제, 단일 가닥 리가제 및/또는 트랜스퍼라제 또는 그의 조합의 사용을 수반할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 화학적 합성, 예를 들어 고체 지지된 또는 용액 상 합성을 사용한, 예컨대 포스포르아미다이트 화학을 통한, 또는 효소적 합성, 또는 그의 조합을 사용한 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 합성의 산물일 수 있다. 효소적 합성은 폴리머라제, 단일 가닥 리가제 및/또는 트랜스퍼라제 또는 그의 조합의 사용을 수반할 수 있다.

[0032] 본원에 사용된 용어 "어닐링"은 서열 특이적 방식으로의 상보적 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 혼성화, 예를 들어 왓슨(Watson) 및 크릭(Crick) 염기-쌍형성의 수소 결합을 통한 2개의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 쌍형성을 의미하여, 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 ("듀플렉스")를 형성한다. "어닐링을 허용하는 조건"은 혼성화된 상보적 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 T_m 에 좌우될 것이고, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다. 예를 들어, 어닐링을 위한 온도는 혼성화된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 T_m 미만일 수 있다. 대안적으로, 어닐링을 위한 온도는 혼성화된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 T_m 에 근접할 수 있고, 예를 들어 $\pm 1, 2$ 또는 3°C 일 수 있다. 어닐링을 위한 온도는 일반적으로 혼성화된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 T_m 보다 10°C 초과로 높지 않다.

[0033] 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드와 관련하여 본원에 사용된 용어 "변성"은 상보적 가닥이 더 이상 어닐링되지 않는 것, 즉 왓슨 및 크릭 염기-쌍형성이 파괴되고 가닥이 해리되는 것을 의미하는 것으로 사용된다. 변성은 조건을 변화시킨 결과로서, 예를 들어 온도를 상승시키거나, pH를 변화시키거나, 또는 완충

이트, 2'-데옥시우리딘-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-아데노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-시티딘-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-구아노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-티미딘-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-우리딘-(α -티오)-트리포스페이트 및 그의 변형된 염기 변이체를 포함한다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 데옥시아데노신 트리포스페이트, 데옥시시티딘 트리포스페이트, 데옥시구아노신 트리포스페이트, 데옥시티미딘 트리포스페이트, 데옥시우리딘 트리포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 시티딘 트리포스페이트, 구아노신 트리포스페이트, 티미딘 트리포스페이트, 우리딘 트리포스페이트, 변형된 데옥시아데노신 트리포스페이트, 변형된 데옥시시티딘 트리포스페이트, 변형된 데옥시구아노신 트리포스페이트, 변형된 데옥시티미딘 트리포스페이트, 변형된 데옥시우리딘 트리포스페이트, 변형된 아데노신 트리포스페이트, 변형된 시티딘 트리포스페이트, 변형된 구아노신 트리포스페이트, 변형된 티미딘 트리포스페이트, 변형된 우리딘 트리포스페이트, 2'-데옥시아데노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-데옥시시티딘-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-데옥시구아노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-데옥시티미딘-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-데옥시우리딘-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-아데노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-시티딘-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-구아노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-티미딘-(α -티오)-트리포스페이트 및 2'-우리딘-(α -티오)-트리포스페이트 중 1개 이상을 포함할 수 있다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 아데노신 트리포스페이트, 시티딘 트리포스페이트, 구아노신 트리포스페이트, 우리딘 트리포스페이트, 변형된 아데노신 트리포스페이트, 변형된 시티딘 트리포스페이트, 변형된 구아노신 트리포스페이트, 변형된 우리딘 트리포스페이트, 2'-아데노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-시티딘-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-구아노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 및 2'-우리딘-(α -티오)-트리포스페이트 중 1개 이상을 포함할 수 있다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 데옥시아데노신 트리포스페이트, 데옥시시티딘 트리포스페이트, 데옥시구아노신 트리포스페이트, 데옥시티미딘 트리포스페이트, 변형된 데옥시시티딘 트리포스페이트, 변형된 데옥시구아노신 트리포스페이트, 변형된 데옥시티미딘 트리포스페이트, 2'-데옥시아데노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-데옥시시티딘-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-데옥시구아노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 및 2'-데옥시티미딘-(α -티오)-트리포스페이트 중 1개 이상을 포함할 수 있다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 아데노신 트리포스페이트, 시티딘 트리포스페이트, 구아노신 트리포스페이트, 및 변형된 우리딘 트리포스페이트를 포함할 수 있다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 아데노신 트리포스페이트, 시티딘 트리포스페이트, 구아노신 트리포스페이트, 및 N1-메틸-슈도우리딘 트리포스페이트를 포함할 수 있다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 2'-아데노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-시티딘-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 2'-구아노신-5'-(α -티오)-트리포스페이트, 및 2'-변형된 우리딘-(α -티오)-트리포스페이트를 포함할 수 있다.

[0040] 비변형된 뉴클레오티드를 또 다른 비변형된 뉴클레오티드에 연결할 수 있는 폴리머라제, 비변형된 뉴클레오티드를 변형된 뉴클레오티드에 (즉, 변형된 5' 뉴클레오티드를 비변형된 3' 뉴클레오티드에, 및/또는 비변형된 5' 뉴클레오티드를 변형된 3' 뉴클레오티드에) 연결할 수 있는 폴리머라제, 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오티드를 또 다른 변형된 뉴클레오티드에 연결할 수 있는 폴리머라제가 본 개시내용의 범주 내에 있다. 임의로, 폴리머라제는 비변형된 뉴클레오티드를 또 다른 비변형된 뉴클레오티드에 연결할 수 있다. 비변형된 뉴클레오티드는 후속적으로 변형될 수 있다. 뉴클레오티드의 변형의 예는 본원에 개시되어 있고, 당 분야에서의 변형, 핵염기의 변형, 및 백본의 변형을 포함하는 군으로부터 선택된 변형을 포함한다.

[0041] 변형은 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE 및 2'-아미노로 이루어진 군으로부터 임의로 선택된 당 모이어티의 2' 위치에 존재할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 PMO, LNA, c-Et, PNA, BNA, 또는 L-리보핵산을 포함할 수 있다. 변형은 핵염기에 존재할 수 있고, 임의로 5-메틸 피리미딘, 7-데아자구아노신 및 무염기성 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 변형은 백본에 존재할 수 있고, 임의로 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포아미데이트 및 포스포로디아미데이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0042] 추가적으로, 변형된 뉴클레오티드를 혼입시킬 수 있는 예시적인 조작된 DNA 및 RNA 폴리머라제는 문헌 ["Engineering and application of polymerases for synthetic genetics", Houlihan et al., Current Opinion in Biotechnology 2017, 48; 168-179]에 개시된 것을 포함한다. 예를 들어, DNA 및 RNA 폴리머라제는, 임의로 E664K 및 Y409G의 돌연변이를 포함하는 써모코쿠스 고르고나리우스(Thermococcus gorgonarius) (Tgo) 복제 DNA 폴리머라제의 폴리머라제 섬(thumb) 서브도메인에 돌연변이를 갖는 폴리머라제를 포함하여, 2' 당 변형을 수용하도록 조작될 수 있다. 이러한 폴리머라제는, 예를 들어 DNA, RNA, 잠금 핵산, 또는 2'-OMe RNA 변형된 뉴클레오티드, 또는 그의 조합으로부터 프라이밍된 슈도우리딘, 5-메틸-C, 2'-플루오로, 또는 2'-아지디오-변형된 NTP의 포함을 제공한다.

[0043] 2' 당 변형을 수용하도록 조작된 추가의 예시적인 RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제를 포함한다. 예를 들어

Y639F의 돌연변이를 포함하는 T7 RNA 폴리머라제는, 예를 들어 2' 플루오로 피리미딘 및 2' 아미노 피리미딘의 포함을 제공할 수 있다.

[0044] Taq 폴리머라제의 Stoffel 단편의 변이체 (SM19)는 2' 당 변형을 수용하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 위치 614에서의 음으로 하전된 아미노산의 도입 및 E615G의 돌연변이는 2' 당 변형의 포함을 제공한다. SM19는 폴리머라제 SFM4-3 및 SFM4-9로 추가로 진화될 수 있다. 예를 들어, SFM4-3은 완전히 변형된 2'OMe 60 뉴클레오타이드 서열을 전사할 수 있다.

[0045] 해양 시아노파지 Syn5로부터의 고온성 RNA 폴리머라제는 2' 당 변형을 수용하도록 조작될 수 있다.

[0046] Y409G, I521L, F545L, 및 E664K의 돌연변이를 포함하는 Tgo 폴리머라제는 3'테옥시- 또는 3'OMe 뉴클레오타이드의 혼입에 의해 위치이성질체 2'-5' 연결을 갖는 DNA 및 RNA를 합성할 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "리가제"는, 예를 들어 하나의 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 (또는 절편)의 3' 단부 및 동일한 또는 또 다른 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 (또는 절편)의 5' 단부 사이의 포스포디에스테르 결합의 형성에 의해 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 분자의 연결, 즉 공유 연결을 촉매하는 효소를 의미한다. 이들 효소는 종종 DNA 리가제 또는 RNA 리가제로 지칭되고, 보조인자: ATP (진핵, 바이러스 및 고세균 DNA 리가제) 또는 NAD (원핵 DNA 리가제)를 이용한다. 모든 유기체에서의 그의 발생에도 불구하고, DNA 리가제는 광범위한 아미노산 서열, 분자 크기 및 특성을 나타낸다 (Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 21, 4051-4058). 이들은 통상적으로 국제 생화학 및 분자 생물학 연합에 의해 정의된 바와 같은 효소 부류 EC 6.5의 구성원, 즉 인산 에스테르 결합을 형성하는 데 사용되는 리가제이다. 비변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 또 다른 비변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 리가제, 비변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 (즉, 변형된 5' 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 비변형된 3' 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에, 및/또는 비변형된 5' 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 변형된 3' 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에) 연결할 수 있는 리가제, 뿐만 아니라 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 또 다른 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 리가제가 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0048] 본원에 사용된 용어 "단일 가닥 리가제" 또는 "ss리가제"는 (i) 5'-인산화된 단일 가닥 RNA의 단일 가닥 수용자 RNA 가닥의 3'-OH에 대한 ATP-의존성 라이게이션 및 (ii) 단일 잔기 (변형된 잔기를 포함함), 예를 들어 뉴클레오타이드-3', 5'-비스포스페이트, 3', 5'-비스티오포스페이트 또는 3'-포스페이트-5' 티오포스페이트의 RNA 또는 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 3' 단부에 대한 라이게이션을 촉매할 수 있는 효소, 예를 들어 RNA 리가제를 의미한다 (Modified Oligoribonucleotides: 17 (11), 2077-2081, 1978). ss리가제의 예는 T4 RNA 리가제이며, 이는 또한 특정 조건 하에 DNA 기질 상에서도 작용하는 것으로 밝혀졌다 (Nucleic Acids research 7(2), 453-464, 1979). T4 박테리오파지로 감염된 에스케리키아 콜라이에서 T4 RNA 리가제의 천연 기능은 바이러스 공격에 대한 박테리아 방어 메카니즘에 의해 유발된 박테리아 tRNA에 대한 단일 가닥 브레이크를 복구하는 것이다. 비변형된 뉴클레오타이드를 비변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 ss리가제, 비변형된 뉴클레오타이드를 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 ss리가제, 변형된 뉴클레오타이드를 비변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 ss리가제, 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오타이드를 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 ss리가제가 본 개시내용의 범주 내에 있다. 본 개시내용에 따른 ss리가제는 라이게이션이 일어나기 위해 주형 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 필요로 하지 않는 리가제이며, 즉 리가제의 라이게이션 활성은 주형-비의존성이다.

[0049] 본원에 사용된 "접합부 뉴클레오타이드"는 또 다른 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 연결될, 하나의 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 단부에 존재하는 뉴클레오타이드이다. 예를 들어, 2개의 절편, 5'-절편 및 3'-절편이 함께 라이게이션될 경우에, 2개의 접합부 뉴클레오타이드는 1) 5'-절편의 3'-단부의 뉴클레오타이드 및 2) 3'-절편의 5'-단부의 뉴클레오타이드이다.

[0050] 본원에 사용된 "트랜스퍼라제"는 하나의 뉴클레오타이드와 또 다른 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 주형 비의존성 연결을 촉매하는 효소를 의미한다. 본원에 기재된 바와 같은 트랜스퍼라제는 말단 뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 (TdT)를 포함하며, 이는 또한 DNA 뉴클레오타이드 엑소트랜스퍼라제 (DNTE) 또는 말단 트랜스퍼라제로도 공지되어 있다. TdT는 미성숙, 프리-B, 프리-T-림프성 세포에서 발현되는 특수화된 DNA 폴리머라제이며, 여기서 이는 V-D-J 항체 유전자 접합부 다양성을 가능하게 한다. TdT는 DNA 분자의 3' 말단에 대한 뉴클레오타이드의

첨가를 촉매한다. 본원에 기재된 바와 같은 트랜스퍼라제는 비-자연 발생 또는 돌연변이체 TdT를 포함한다. 비변형된 뉴클레오티드를 비변형된 올리고뉴클레오티드에 연결할 수 있는 트랜스퍼라제, 비변형된 뉴클레오티드를 변형된 올리고뉴클레오티드에 연결할 수 있는 트랜스퍼라제, 변형된 뉴클레오티드를 비변형된 올리고뉴클레오티드에 연결할 수 있는 트랜스퍼라제, 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오티드를 변형된 올리고뉴클레오티드에 연결할 수 있는 트랜스퍼라제가 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0051] 본원에 사용된 "열안정성 리가제", "열안정성 폴리머라제" 또는 "열안정성 트랜스퍼라제"는 각각, 승온, 즉 인간 체온 초과, 즉 37℃ 초과에서 활성인 리가제, 폴리머라제 또는 트랜스퍼라제이다. 열안정성 리가제, 열안정성 폴리머라제 또는 열안정성 트랜스퍼라제는, 예를 들어 40℃ 내지 65℃; 또는 40℃ 내지 90℃ 등에서 활성일 수 있다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "프라이머"는 본 개시내용의 절편 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 출발점으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열을 의미한다. 폴리머라제는 프라이머를 필요로 할 수 있고, 예를 들어 DNA 폴리머라제는 프라이머를 필요로 할 수 있다. 프라이머는 적어도 3개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 절편 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 프라이머로서 사용하는 것은 본 개시내용의 범주 내에 있다. 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 프라이머로서 작용할 수 있다. 프라이머는 폴리머라제가 뉴클레오티드의 연결을 촉매하기 전에 주형에 결합될 수 있다. 프라이머는 제거되지 않을 수 있다. 프라이머는 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 주형의 일부를 형성할 수 있다. 예를 들어, 주형은 프라이머를 포함하는 헤어핀 루프를 포함할 수 있다. 프라이머는 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 일부를 형성할 수 있다.

[0053] 본원에 사용된, "블록" 또는 "3'-플랭킹 올리고뉴클레오티드"로도 공지되어 있는 용어 "스토퍼"는 폴리머라제가 추가의 뉴클레오티드를 연결하는 것을 정지시키거나 막는 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열을 의미한다. 스토퍼는 폴리머라제 연장을 종결시킬 수 있다. 스토퍼, 예를 들어 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 중 1개는 5' 포스페이트, 5' 티오포스페이트 (포스포로티오에이트 결합을 생성할 수 있음), 5' 아미도포스페이트 (포스포아미데이트 결합을 생성할 수 있음), 5' 디아미도포스페이트 (포스포로디아미데이트 결합을 생성할 수 있음), 5' 아미도티오포스페이트, 5' 아미도디티오포스페이트, 5' 디아미도티오포스페이트 또는 5' 디티오포스페이트 (포스포로디티오에이트 결합을 생성할 수 있음)를 포함할 수 있다. 5' 포스페이트, 5' 티오포스페이트, 5' 아미도포스페이트, 5' 디아미도포스페이트, 5' 디티오포스페이트, 5' 아미도티오포스페이트, 5' 아미도디티오포스페이트 또는 5' 디아미도티오포스페이트가 리가제와의 라이게이션에 필요할 수 있다. 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 중 1개 이상이 스토퍼로서 작용할 수 있다.

[0054] 본 개시내용의 방법은 비-복제성 mRNA 및 바이러스 유래 자기-중복 RNA를 비롯한 RNA 및/또는 DNA (그 안에 변형을 포함함)를 생성하는 데 사용될 수 있다. 이러한 RNA는, 예를 들어 백신 제조에서 유용성을 갖는다.

[0055] 용어 "RNA"는 리보핵산에 대한 통상적인 약어이다. 이는 핵산 분자, 즉 뉴클레오티드 단량체로 이루어진 중합체이다. 이들 뉴클레오티드는 통상적으로 아데노신-모노포스페이트, 우리딘-모노포스페이트, 구아노신-모노포스페이트 및 시티딘-모노포스페이트 단량체 또는 그의 유사체이며, 이들은 소위 백본을 따라 서로 연결된다. 백본은 제1의 당, 즉 리보스와 제2의 인접한 단량체의 포스페이트 모이어티 사이의 포스포디에스테르 결합에 의해 형성된다. 단량체의 구체적 순서, 즉 당/포스페이트-백본에 연결된 염기의 순서를 RNA-서열이라 부른다. 용어 "RNA"는 일반적으로 장쇄 RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 단일 가닥 RNA (ssRNA), 이중 가닥 RNA (dsRNA), 선형 RNA (linRNA), 원형 RNA (circRNA), 메신저 RNA (mRNA), RNA 올리고뉴클레오티드, 소형 간섭 RNA (siRNA), 소형 헤어핀 RNA (shRNA), 안티센스 RNA (asRNA), CRISPR/Cas9 가이드 RNA, 리보스위치, 번역자극 RNA (isRNA), 리보자임, 압타머, 리보솜 RNA (rRNA), 전달 RNA (tRNA), 바이러스 RNA (vRNA), 레트로바이러스 RNA 또는 레플리콘 RNA, 소형 핵 RNA (snRNA), 소형 핵소체 RNA (snoRNA), 마이크로RNA (miRNA), 및 Piwi-상호작용 RNA (piRNA)로 이루어진 군으로부터 선택된 분자 또는 분자 종을 지칭한다. 임의로, 본 개시내용의 문맥에 임의의 유형의 치료 RNA가 포함된다. "치료 RNA"는 의학적 목적을 위해 인간 또는 동물 신체에서 사용하기에 적합한 RNA에 관한 것으로 이해되어야 하고, 예를 들어 이는 특히 파라미터, 예컨대 순도, 완전성에 관하여, 뿐만 아니라 현행 우수 제조 관리기준 (cGMP) 조건을 준수해야 하는 기저 생산 방법과 관련하여 임상 등급을 갖는다. 치료 RNA는 예를 들어 상태 또는 질환의 예방 또는 치료에서 치료 용도를 가질 수 있다.

[0056] 용어 "메신저 RNA" (mRNA)는 한 유형의 RNA 분자를 지칭한다. 생체내에서, DNA의 전사는 통상적으로 소위 미성숙 RNA를 생성하며, 이는 통상적으로 mRNA로 약칭되는 소위 메신저 RNA로 프로세싱되어야 한다. 예를 들어 진

핵 유기체에서의 미성숙 RNA의 프로세싱은 다양한 상이한 전사후 변형, 예컨대 스플라이싱, 5'-캡핑, 폴리아데닐화, 핵 또는 미토콘드리아로부터의 유출 등을 포함한다. 이들 프로세스를 합한 것은 또한 mRNA의 성숙으로 불린다. 성숙 mRNA는 통상적으로 특정한 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열로 번역될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다. 전형적으로, 성숙 mRNA는 5' 캡, 5' 비번역 영역 (5' UTR), 오픈 리딩 프레임, 3' 비번역 영역 (3' UTR) 및 단독중합체 테일, 예를 들어 폴리-A 또는 폴리-C 서열을 포함한다. 본 개시내용의 문맥에서, mRNA는 인공 분자, 즉 자연에서 발생하지 않는 분자일 수 있다. 이는 본 개시내용의 문맥에서 mRNA가, 자연에서 이러한 조합으로 발생하지 않는, 5' UTR, 오픈 리딩 프레임, 3' UTR 및 폴리-A 서열의 조합을 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

- [0057] 치료 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 의도된 치료 용도에 따라, 치료 mRNA의 투여량 및 치료 지속기간은 수자릿수만큼 달라질 수 있다. 백신의 경우, 요구되는 면역 반응을 도출하는 데 나노그램 또는 마이크로그램 범위의 항원의 발현이 충분할 수 있다. 그러나, 성장 인자, 호르몬 또는 항체의 경우, 치료 용량은 마이크로그램 내지 밀리그램, 또는 잠재적으로 최대 그램 양의 단백질의 범위일 수 있다. mRNA 용량-의존성 독성은 이러한 많은 단백질 양을 달성하기 위한 규모 확대에 대한 제한 인자일 가능성이 있고, 따라서 변형-특이적 독성 없이 증가된 mRNA 안정성으로 이어지는 변형이 가치가 있다 (Aditham et al., ACS Chem. Biol., December 2021, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00569>).
- [0058] 치료 환경에서 mRNA의 임의의 적용을 위해, 신뢰할 수 있는 방식으로 재현될 수 있는 규정된 서열 및 구조를 갖는 mRNA를 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, mRNA의 5' UTR (예를 들어, 캡 구조를 함유함) 및 3' UTR (예를 들어, 단독중합체 테일, 예컨대 폴리-A 테일을 함유함)은 mRNA 안정성 및 번역 효율의 조절에 수반되는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 5' 캡 구조 및 3' 테일은 진핵 세포에서 mRNA의 효율적인 번역 및 단백질 합성을 위한 중요한 특색이다. 따라서, mRNA 생산 방법은 이러한 주요 기능적 특색에 대해 제어될 수 있다. 폴리 A 테일에 3' 말단 PS 연결을 포함시키는 것은 주로 mRNA를 안정화시킴으로써 인간 HeLa 세포주에서 2-4배만큼 단백질 생산을 증가시키는 것으로 나타났다 (Aditham et al., ACS Chem. Biol., December 2021).
- [0059] mRNA는 변형된 캡을 가질 수 있다. mRNA는 7mG(5')ppp(5')N,pN2p (캡 0), 7mG(5')ppp(5')NImpNp (캡 1), 7mG(5')-ppp(5')NImpN2mp (캡 2) 또는 m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up (캡 4)를 가질 수 있다.
- [0060] 또한, 비-캡핑된 RNA는 전형적으로 선천성 면역계를 자극하는 것으로 공지된 5'-말단 트리포스페이트 기를 함유한다. 따라서, 비-캡핑된 RNA는 대상체에서 바람직하지 않은 면역 반응을 생성할 수 있다. 따라서, 제약 mRNA 산물은 비-캡핑된 5'-트리포스페이트 RNA의 존재에 대해 제어되어야 한다.
- [0061] 통상적인 mRNA-기반 백신은 관심 항원을 코딩하고 5' 및 3' UTR을 함유하는 반면, 자기-증폭 RNA는 항원 뿐만 아니라 세포내 RNA 증폭 및 풍부한 단백질 발현을 가능하게 하는 바이러스 복제 기구를 코딩한다. 메신저 RNA 분자는 전형적으로 적합한 DNA 주형의 RNA 시험관내 전사에 의해 생산된다. 5' 캡 구조 및 3' 단독중합체 테일 (예를 들어 폴리-A 테일)은 전형적으로 RNA 시험관내 전사 동안 도입되고, 예를 들어 DNA 주형 내에 코딩될 수 있거나, 또는 RNA 시험관내 전사 후 효소적 방법을 통해 도입된다.
- [0062] 본 개시내용의 방법은 시험관내 전사에 의해 자기-복제 RNA를 제조하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, DNA-의존성 RNA 폴리머라제 (예컨대 박테리오파지 T7, T3 또는 SP6 RNA 폴리머라제)는 DNA 주형으로부터 자기-복제 RNA를 전사하는 데 사용될 수 있다.
- [0063] 효소적 방법을 통한 적절한 캡핑 및 폴리-A 테일 첨가 반응은 본 개시내용의 방법을 사용한 RNA 생산 후에 필요에 따라 사용될 수 있거나 또는 DNA 주형 내에 코딩될 수 있다.
- [0064] 폴리머라제는 이들이 혼입시키는 뉴클레오타이드 (즉, 그의 뉴클레오시드 트리포스페이트 기질)에 대한 정확한 요건을 가질 수 있다. 그러한 요건은 코딩된 레플리카제의 요건과 매칭되어, 전사된 RNA가 그의 자기-코딩된 레플리카제에 대한 기질로서 기능하는 것을 보장할 수 있다.
- [0065] 방법은 비-복제 mRNA를 제조하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, DNA 또는 RNA 폴리머라제를 사용하여 DNA 또는 RNA 주형으로부터 비-복제 mRNA를 전사시킬 수 있다. 이용될 수 있는 폴리머라제는 본원에 기재되어 있다. 예시적인 폴리머라제는 DNA 폴리머라제 I 또는 T7 RNA 폴리머라제를 포함하며, 이는 본원에 기재된 바와 같이 추가로 돌연변이될 수 있다.
- [0066] 방법에서, RNA는 변형되고/거나 안정화된 RNA일 수 있다.

- [0067] "안정화된 RNA"는 생체내 분해에 대해 개선된 저항성을 나타내는 RNA 및/또는 생체내 개선된 안정성을 나타내는 RNA, 및/또는 생체내 개선된 번역가능성을 나타내는 RNA로서 정의된다.
- [0068] 안정화는, 예를 들어 생산된 RNA의 변형된 포스페이트 백본에 의해 달성될 수 있다. 백본 변형은 RNA에 함유된 뉴클레오타이드의 백본의 포스페이트가 화학적으로 변형된 변형이다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 뉴클레오타이드는 예를 들어 포스포로티오에이트 변형된 포스페이트 백본을 함유하며, 임의로 포스페이트 백본에 함유된 포스페이트 산소 중 적어도 1개는 황 원자에 의해 대체된다.
- [0069] 안정화된 RNA는 예를 들어 포스페이트 유사체, 예컨대 예를 들어, 알킬 및 아릴 포스포네이트, 또는 알킬포스포트리에스테르를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 백본 변형은 전형적으로, 어떠한 제한도 암시하지 않으면서, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트 및 포스포로티오에이트로 이루어진 군으로부터의 변형을 포함한다.
- [0070] "변형된 RNA"는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "변형된 뉴클레오타이드 잔기" 또는 "변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드"는 자연 발생 뉴클레오타이드 잔기 또는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드와 상이한 그의 화학의 적어도 1종의 측면을 함유하는 뉴클레오타이드 잔기 또는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 이러한 변형은 당 모이어티의 변형, 핵염기의 변형 및/또는 백본의 변형과 같이 뉴클레오타이드 잔기의 임의의 부분에서 이루어질 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드 잔기는 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 일부를 형성할 수 있다. 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA일 수 있다.
- [0072] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 뉴클레오타이드의 많은 합성 유도체가 존재한다는 것을 인지할 것이다.
- [0073] 추가적으로, G, C, U, T, A와 상이한 임의의 뉴클레오타이드는 "변형된 뉴클레오타이드"로 간주될 수 있다. 뉴클레오타이드의 변형의 예가 본원에 개시된다.
- [0074] 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 PMO, LNA, c-Et, PNA, BNA, 또는 L-리보핵산을 포함할 수 있다.
- [0075] 본 개시내용과 관련하여 백본 변형은 핵산에 함유된 뉴클레오타이드의 백본의 포스페이트가 화학적으로 변형된 변형이다. 본 개시내용과 관련하여 당 변형은 뉴클레오타이드(들)의 당의 화학적 변형이다. 본 개시내용과 관련하여 염기 변형은 뉴클레오타이드(들)의 염기 모이어티의 화학적 변형이다. 이와 관련하여, 뉴클레오타이드 변형은 전사 및/또는 번역에 적용가능한 뉴클레오타이드 유사체로부터 선택된다.
- [0076] 관련 기술분야에 공지된 변형된 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 2'-아미노-6-클로로퓨린리보시드-5'-트리포스페이트, 2'-아미노퓨린-리보시드-5'-트리포스페이트; 2'-아미노아데노신-5'-트리포스페이트, 2'-아미노-2'-데옥시시티딘-트리포스페이트, 2'-티오시티딘-5'-트리포스페이트, 2'-티오우리딘-5'-트리포스페이트, 2'-플루오로티미딘-5'-트리포스페이트, 2'-0-메틸-이노신-5'-트리포스페이트 4'-티오우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-아미노알릴시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-아미노알릴우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-브로모시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-브로모우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-브로모-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-브로모-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-아이오도시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-아이오도-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-아이오도우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-아이오도-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-메틸시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-메틸우리딘-5'-트리포스페이트, 5'-프로피닐-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 5'-프로피닐-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트, 6'-아자시티딘-5'-트리포스페이트, 6'-아자우리딘-5'-트리포스페이트, 6'-클로로퓨린리보시드-5'-트리포스페이트, 7'-데아자아데노신-5'-트리포스페이트, 7'-데아자구아노신-5'-트리포스페이트, 8'-아자아데노신-5'-트리포스페이트, 8'-아지도아데노신-5'-트리포스페이트, 벤즈이미다졸-리보시드-5'-트리포스페이트, N1-메틸아데노신-5'-트리포스페이트, N1-메틸구아노신-5'-트리포스페이트, N6-메틸아데노신-5'-트리포스페이트, O6-메틸구아노신-5'-트리포스페이트, 슈도우리딘-5'-트리포스페이트, 또는 퓨로마이신-5'-트리포스페이트, 크산토신-5'-트리포스페이트를 포함한다.
- [0077] 관련 기술분야에 공지된 염기-변형된 뉴클레오타이드는 5'-메틸시티딘-5'-트리포스페이트, 7'-데아자구아노신-5'-트리포스페이트, 5'-브로모시티딘-5'-트리포스페이트, 및 슈도우리딘-5'-트리포스페이트, 피리딘-4-온 리보뉴클레오타이드, 5'-아자-우리딘, 2'-티오-5'-아자-우리딘, 2'-티오우리딘, 4'-티오-슈도우리딘, 2'-티오-슈도우리딘, 5'-히드록시우리딘, 3'-메틸우리딘, 5'-카르복시메틸-우리딘, 1'-카르복시메틸-슈도우리딘, 5'-프로피닐-우리딘, 1'-프로피닐-슈도우리딘, 5'-타우리노메틸우리딘, 1'-타우리노메틸-슈도우리딘, 5'-타우리노메틸-2'-티오-우리딘, 1'-타우리노메틸-4'-티오-우리딘, 5'-메틸-우리딘, 1'-메틸-슈도우리딘, 4'-티오-1'-메틸-슈도우리딘, 2'-티오-1'-메틸-슈도우리딘, 1'-메틸-1'-데아자-슈도우리딘, 2'-티오-1'-메틸-1'-데아자-슈도우리딘, 디히드로우리딘, 디히드로슈도우리딘,

2-티오-디히드로우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 2-메톡시우리딘, 2-메톡시-4-티오-우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, 5-아자-시티딘, 슈도이소시티딘, 3-메틸-시티딘, N4-아세틸시티딘, 5-포르밀시티딘, N4-메틸시티딘, 5-히드록시메틸시티딘, 1-메틸-슈도이소시티딘, 피콜로-시티딘, 피콜로-슈도이소시티딘, 2-티오-시티딘, 2-티오-5-메틸-시티딘, 4-티오-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-슈도이소시티딘, 4-티오-1-메틸-1-데아자-슈도이소시티딘, 1-메틸-1-데아자-슈도이소시티딘, 제블라린, 5-아자-제블라린, 5-메틸-제블라린, 5-아자-2-티오-제블라린, 2-티오-제블라린, 2-메톡시-시티딘, 2-메톡시-5-메틸-시티딘, 4-메톡시-슈도이소시티딘, 및 4-메톡시-1-메틸-슈도이소시티딘, 2-아미노퓨린, 2, 6-디아미노퓨린, 7-데아자-아데닌, 7-데아자-8-아자-아데닌, 7-데아자-2-아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2-아미노퓨린, 7-데아자-2,6-디아미노퓨린, 7-데아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린, 1-메틸아데노신, N6-메틸아데노신, N6-이소펜테닐아데노신, N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신, 2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신, N6-글리시닐카르바모일아데노신, N6-트레오닐카르바모일아데노신, 2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데노신, N6,N6-디메틸아데노신, 7-메틸아데닌, 2-메틸티오-아데닌, 및 2-메톡시-아데닌, 이노신, 1-메틸-이노신, 와이오신, 와이부토신, 7-데아자-구아노신, 7-데아자-8-아자-구아노신, 6-티오-구아노신, 6-티오-7-데아자-구아노신, 6-티오-7-데아자-8-아자-구아노신, 7-메틸-구아노신, 6-티오-7-메틸-구아노신, 7-메틸이노신, 6-메톡시-구아노신, 1-메틸구아노신, N2-메틸구아노신, N2,N2-디메틸구아노신, 8-옥소-구아노신, 7-메틸-8-옥소-구아노신, 1-메틸-6-티오-구아노신, N2-메틸-6-티오-구아노신, 및 N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신, 5'-0-(1-티오포스페이트)-아데노신, 5'-0-(1-티오포스페이트)-시티딘, 5'-0-(1-티오포스페이트)-구아노신, 5'-0-(1-티오포스페이트)-우리딘, 5'-0-(1-티오포스페이트)-슈도우리딘, 6-아자-시티딘, 2-티오-시티딘, 알파-티오-시티딘, 슈도-이소-시티딘, 5-아미노알릴-우리딘, 5-아이오도-우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5,6-디히드로우리딘, 알파-티오-우리딘, 4-티오우리딘, 6-아자-우리딘, 5-히드록시-우리딘, 데옥시-티미딘, 5-메틸-우리딘, 피콜로-시티딘, 이노신, 알파-티오-구아노신, 6-메틸-구아노신, 5-메틸-시티딘, 8-옥소-구아노신, 7-데아자-구아노신, N1-메틸-아데노신, 2-아미노-6-클로로-퓨린, N6-메틸-2-아미노-퓨린, 슈도-이소-시티딘, 6-클로로-퓨린, N6-메틸-아데노신, 알파-티오-아데노신, 8-아지도-아데노신, 7-데아자-아데노신, 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, N1-에틸슈도우리딘, 2-티오우리딘, 4'-티오우리딘, 5-메틸우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-5-아자-우리딘, 2-티오-디히드로슈도우리딘, 2-티오-디히드로우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 5-아자-우리딘, 디히드로슈도우리딘, 2'-0-메틸 우리딘, 슈도우리딘 (y), N1-메틸슈도우리딘, 5-메틸시토신, 및 5-메톡시우리딘을 포함한다.

[0078] 통상의 기술자는 시험관내 전사된 (IVT) mRNA가 형질감염 시 강한 면역 반응을 촉발하고, 이는 단백질 생산을 억제한다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 톨-유사 수용체 인식의 차단을 통해 면역 독성을 감소시키고, 다음으로 면역 효율을 증가시키기 위해 우리딘의 슈도우리딘 또는 N1-메틸 슈도우리딘으로의 100% 대체가 치료 mRNA에서 널리 사용된다.

[0079] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 코딩 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 코딩 서열은 슈도우리딘 변형된 코딩 서열이고, 즉 코딩 서열에서 모든 우리딘이 슈도우리딘으로 대체된 것이다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개 또는 1개 초과, 또는 모든 우리딘이 슈도우리딘에 의해 대체된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 코딩 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 코딩 서열은 N1-메틸슈도우리딘-변형된 코딩 서열이고, 즉 코딩 서열에서 모든 우리딘이 N1-메틸슈도우리딘으로 대체된 것이다. N1-메틸슈도우리딘 및 1-메틸슈도우리딘은 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개 또는 1개 초과, 또는 모든 우리딘이 N1-메틸슈도우리딘에 의해 대체된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 코딩 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 코딩 서열은 코돈-변형된 코딩 서열이다. 적어도 1개의 코딩 서열은 코돈-변형된 코딩 서열일 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 코돈-변형된 코딩 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열은 상응하는 야생형 코딩 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열과 비교하여 변형되지 않고, 즉 아미노산 서열은 동일하다.

[0080] 용어 "코돈-변형된 코딩 서열"은 상응하는 야생형 코딩 서열과 비교하여 적어도 1개의 코돈 (1개의 아미노산을 코딩하는 뉴클레오타이드 트리플렛)이 상이한 코딩 서열에 관한 것이다. 적합하게는, 코돈 변형된 코딩 서열은 생체내 분해에 대한 개선된 저항성 및/또는 생체내 개선된 안정성 및/또는 생체내 개선된 번역가능성을 나타낼 수 있다. 코돈 변형은 유전자 코드의 축중성을 이용할 수 있으며, 여기서 다중 코돈은 동일한 아미노산을 코딩할 수 있고, 생체내 적용을 위해 코딩 서열을 최적화하기 위해 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0081] 당 모이어티에서의 변형은 당 모이어티의 2' 위치에서의 변형, 비시클릭 당 또는 4'-CH(CH₃)-O-2' 기, 및 그의

조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 당 모이어티의 2' 위치에서의 변형은 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE, 및/또는 2'-아미노를 포함할 수 있다.

[0082] 변형된 핵염기의 예는 시토신, 예컨대 5-메틸 시토신, 5-메틸 피리미딘, 7-데아자구아노신 및 무염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 핵염기의 추가의 예는 m5C (5-메틸시티딘), m5U (5-메틸우리딘), m6A (N6-메틸아데노신), s2U (2-티오우리딘), Um (2'-O-메틸우리딘), m1A (1-메틸아데노신); m2A (2-메틸아데노신); Am (2'-O-메틸아데노신); ms2m6A (2-메틸티오-N6-메틸아데노신); i6A (N6-이소펜테닐아데노신); ms2i6A (2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신); io6A (N6-(시스-히드록시이소펜테닐)아데노신); ms2io6A (2-메틸티오-N6-(시스-히드록시이소펜테닐) 아데노신); g6A (N6-글리시닐카르바모일아데노신); t6A (N6-트레오닐 카르바모일아데노신); ms2t6A (2-메틸티오-N6- 트레오닐 카르바모일아데노신); m6t6A (N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데노신); hn6A(N6.-히드록시노르발릴카르바모일 아데노신); ms2hn6A (2-메틸티오-N6-히드록시노르발릴 카르바모일아데노신); Ar(p) (2'-O-리보실아데노신 (포스페이트)); I (이노신); mi 1 (1-메틸이노신); m'1m (1,2'-O-디메틸이노신); m3C (3-메틸시티딘); Cm (2T-O-메틸시티딘); s2C (2-티오시티딘); ac4C (N4-아세틸시티딘); f5C (5-포닐시티딘); m5Cm (5,2-O-디메틸시티딘); ac4Cm (N4아세틸2T0메틸시티딘); k2C (리시딘); m1G (1-메틸구아노신); m2G (N2-메틸구아노신); m7G (7-메틸구아노신); Gm (2'-O-메틸구아노신); m22G (N2,N2-디메틸구아노신); m2Gm (N2,2'-O-디메틸구아노신); m22Gm (N2,N2,2'-O-트리메틸구아노신); Gr(p) (2'-O-리보실구아노신 (포스페이트)); yW (와이부토신); o2yW (퍼옥시와이부토신); OHyW (히드록시와이부토신); OHyW* (불충분하게 변형된 히드록시와이부토신); imG (와이오신); mimG (메틸구아노신); Q (퀘우오신); oQ (에폭시퀘우오신); galQ (갈락토실-퀘우오신); manQ (만노실-퀘우오신); preQo (7-시아노-7-데아자구아노신); preQi (7-아미노메틸-7-데아자구아노신); G (아르카에오신); D (디히드로우리딘); m5Um (5,2'-O-디메틸우리딘); s4U (4-티오우리딘); m5s2U (5-메틸-2-티오우리딘); s2Um (2-티오-2'-O-메틸우리딘); acp3U (3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘); ho5U (5-히드록시우리딘); mo5U (5-메톡시우리딘); cmo5U (우리딘 5-옥시아세트산); mcmo5U (우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르); chm5U (5-(카르복시히드록시메틸)우리딘); mchm5U (5-(카르복시히드록시메틸)우리딘 메틸 에스테르); mcm5U (5-메톡시카르보닐 메틸우리딘); mcm5Um (5-메톡시카르보닐메틸-2-O-메틸우리딘); mcm5s2U (5-메톡시카르보닐메틸-2-티오우리딘); nm5s2U (5-아미노메틸-2-티오우리딘); mnm5U (5-메틸아미노메틸우리딘); mnm5s2U (5-메틸아미노메틸-2-티오우리딘); mnm5se2U (5-메틸아미노메틸-2-셀레노우리딘); ncm5U (5-카르바모일메틸 우리딘); ncm5Um (5-카르바모일메틸-2'-O-메틸우리딘); cmnm5U (5-카르복시메틸아미노메틸우리딘); cnmm5Um (5-카르복시메틸아미노메틸-2-L-O메틸우리딘); cmnm5s2U (5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘); m62A (N6,N6-디메틸아데노신); Tm (2'-O-메틸이노신); m4C (N4-메틸시티딘); m4Cm (N4,2-O-디메틸시티딘); hm5C (5-히드록시메틸시티딘); m3U (3-메틸우리딘); cm5U (5-카르복시메틸우리딘); m6Am (N6,T-O-디메틸아데노신); rn62Am (N6,N6,O-2-트리메틸아데노신); m2'7G (N2,7-디메틸구아노신); m2'2'7G (N2,N2,7-트리메틸구아노신); m3Um (3,2T-O-디메틸우리딘); m5D (5-메틸디히드로우리딘); ε5Cm (5-포르밀-2'-O-메틸시티딘); m1Gm (1,2'-O-디메틸구아노신); m'Am (1,2-O-디메틸 아데노신) 이리노메틸우리딘); tm5s2U (S-타우리노메틸-2-티오우리딘); imG-14 (4-데메틸 구아노신); imG2 (이소구아노신); 및 ac6A (N6-아세틸아데노신), 하이포크산틴, 이노신, 8-옥소-아데닌, 7-그의 치환된 유도체, 디히드로우라실, 슈도우라실, 2-티도우라실, 4-티도우라실, 5-아미도우라실, 5-(C1-C6)-알킬우라실, 5-메틸우라실, 5-(C2-C6)-알케닐우라실, 5-(C2-C6)-알킬닐우라실, 5-(히드록시메틸)우라실, 5-클로로우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-히드록시시토신, 5-(C1-C6)-알킬시토신, 5-메틸시토신, 5-(C2-C6)-알케닐시토신, 5-(C2-C6)-알킬닐시토신, 5-클로로시토신, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, N2-디메틸구아닌, 7-데아자구아닌, 8-아자구아닌, 7-데아자-7-치환된 구아닌, 7-데아자-7-(C2-C6)알킬닐구아닌, 7-데아자-8-치환된 구아닌, 8-히드록시구아닌, 6-티오구아닌, 8-옥소구아닌, 2-아미노퓨린, 2-아미노-6-클로로퓨린, 2,4-디아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 8-아자퓨린, 치환된 7-데아자퓨린, 7-데아자-7-치환된 퓨린 및 7-데아자-8-치환된 퓨린을 포함한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 피리미딘 핵염기, 예컨대 슈도우리딘 및/또는 5-메틸시토신 잔기를 포함할 수 있다.

[0083] 백본에서의 변형은 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트 및 포스포로디티오에이트를 포함할 수 있다. 적어도 1개 또는 각각의 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결일 수 있다.

[0084] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오시드 사이에 포스포디에스테르 연결만을 포함할 수 있지만, 다른 예에서 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디아미데이트 및 포스포로디티오에이트 및/또는 메틸포스포네이트 연결을 함유할 수 있다.

[0085] 변형은 N1-메틸슈도우리딘을 포함할 수 있다.

[0086] 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 5-메틸시토신, 및 5-메톡시우리딘은 폴리머라제를 사용한 혼입을 위해 우리딘

대신에 뉴클레오시드 트리포스페이트 풀에서 사용될 수 있다.

- [0087] 본원에 사용된 용어 "갭머"는 2개의 외부 "날개 영역" (5'-날개 및 3'-날개)이 플랭킹된 내부 "중심 영역"을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 의미하며, 여기서 중심 영역은 RNase H 절단을 지지하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하고, 각각의 날개 영역은 중심 영역 내의 뉴클레오타이드와 화학적으로 구별되는 1개 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 갭머는 안티센스 폴리뉴클레오타이드이다. 갭머는 중심 영역, 중심 영역의 5' 단부에 위치한 5' 날개 영역, 및 중심 영역의 3' 단부에 위치한 3' 날개 영역을 포함한다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 "지지체 물질"은 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 주형 또는 프라이머의 분자량을 증가시켜, 예를 들어 불순물 및/또는 산물이 반응 혼합물로부터 분리될 때 잔류되도록 하는 고분자량 화합물 또는 물질을 의미한다.
- [0089] 본원에 사용된, 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 쌍별 BLASTN 정렬이 수행된 후에 대상 핵산 서열이 질의 핵산 서열과 100% 질의 적용범위를 갖는 경우에 BLASTN 알고리즘에 의해 계산되는, 백분율로 표현된 "동일성" 값이다. 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTN 정렬은 국립 생물학회 센터 웹사이트 상에서 이용가능한 BLASTN 알고리즘의 디폴트 세팅을 사용하여 수행되며, 낮은 복잡성 영역에 대한 필터는 턴 오프된다. 중요하게는, 질의 핵산 서열은 본원의 하나 이상의 청구항에서 확인되는 핵산 서열에 의해 기재될 수 있다. 질의 서열은 대상 서열과 100% 동일할 수 있거나, 또는 대상 서열과 비교하여 특정 정수 이하의 뉴클레오타이드 변경을 포함하여 % 동일성이 100% 미만일 수 있다. 예를 들어, 질의 서열은 대상 서열과 적어도: 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일하다.
- [0090] 본원에 사용된, 측정가능한 값, 예컨대 양, 시간 기간 등을 언급하는 경우의 용어 "약"은, 명시된 값으로부터 $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ 및 $\pm 0.1\%$ 를 포함한 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ 의 변동을 본원에 개시된 실시양태를 수행하기에 적절한 그러한 변동으로서 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0091] 실시양태
- [0092] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0093] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시켜 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0094] b) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 1개를, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계; 및
- [0095] c) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드(들) 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오타이드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계; 및
- [0096] d) 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물 및 주형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스를 변성시킴으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0097] 를 포함한다.
- [0098] 단계 (b) 및 (c)는 공동으로 이루어질 수 있다. 특정 상황에서, 단계 (a), (b) 및 (c)는 공동으로 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 단계 b)에서 언급된 폴리머라제 또는 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 단계 (a) 동안 존재한다. 한 실시양태에서, 단계 b)에서 언급된 폴리머라제는 단계 (a) 동안 존재하고, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되어 있다면, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀을 첨가하여 폴리머라제가 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 1개를 연장시키고 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키도록 할 수 있다. 대안적 실시양태에서, 단계 b)에서 언급된 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 단계 (a) 동안 존재하고, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되어 있다면, 폴리머라제를 첨가하여 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 1개를 연장시키고 적어도 1개의 서열 갭을 충전시킨다.

- [0099] 단계 d)는, 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물 및 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시키기 전에, 조건을 변화시켜 불순물 폴리뉴클레오티드 및 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시키고, 임의의 불순물 폴리뉴클레오티드(들)를 분리하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0100] 한 실시양태에서, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 뉴클레오티드 트리포스페이트의 풀은 (i) 자연 발생 뉴클레오티드 트리포스페이트; (ii) 변형된 뉴클레오티드 트리포스페이트 또는 (iii) 자연 발생 뉴클레오티드 트리포스페이트 및 변형된 뉴클레오티드 트리포스페이트로 이루어진다.
- [0101] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0102] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- [0103] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 풀을 제공하는 단계;
- [0104] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오티드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0105] d) 뉴클레오티드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오티드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0106] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 형성하는 단계;
- [0107] f) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 분리하는 단계
- [0108] 를 포함한다.
- [0109] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0110] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- [0111] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 풀을 제공하는 단계;
- [0112] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오티드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0113] d) 뉴클레오티드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오티드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0114] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 형성하는 단계;
- [0115] f) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 분리하는 단계
- [0116] 를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드 중 적어도 1개는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 포함하고/거나 뉴클레오티드 트리포스페이트의 풀은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0117] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0118] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- [0119] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 풀을 제공하는 단계;

- [0120] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0121] d) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0122] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;
- [0123] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및
- [0124] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0125] 를 포함한다.
- [0126] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0127] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;
- [0128] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 풀을 제공하는 단계;
- [0129] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0130] d) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0131] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;
- [0132] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및
- [0133] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0134] 를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하고/거나 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0135] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0136] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;
- [0137] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 풀을 제공하는 단계;
- [0138] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0139] d) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0140] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;
- [0141] f) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및

- [0142] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0143] 를 포함한다.
- [0144] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0145] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;
- [0146] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 풀을 제공하는 단계;
- [0147] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 겹이 형성되는 것인 단계;
- [0148] d) 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키는 단계;
- [0149] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;
- [0150] f) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및
- [0151] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0152] 를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하고/거나 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0153] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0154] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;
- [0155] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 풀을 제공하는 단계;
- [0156] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 겹이 형성되는 것인 단계;
- [0157] d) 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키는 단계;
- [0158] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;
- [0159] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및
- [0160] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0161] 를 포함한다.
- [0162] 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 포함할 수 있다.
- [0163] 단계 d)는 3개의 별개의 단계, 즉 d1) 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀을 제공하는 단계, d2) 폴리머라제를 제공하는 단계, 및 d3) 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키는 단계로 추가로 나눌 수 있다.
- [0164] 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방

법을 제공하며, 방법은

- [0165] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;
- [0166] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 풀을 제공하는 단계;
- [0167] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0168] d) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀을 제공하는 단계;
- [0169] e) 폴리머라제를 제공하는 단계;
- [0170] f) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0171] g) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;
- [0172] h) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및
- [0173] i) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계
- [0174] 를 포함한다.
- [0175] 단계 a) 내지 i) 중 2개 이상은 공동으로 이루어질 수 있고, 임의로 단계 f) 및 g)가 공동으로 이루어질 수 있다. 단계 a) 내지 i) 중 2개 이상은 순차적으로 이루어질 수 있고, 임의로 단계 f) 및 g)가 순차적으로 이루어질 수 있다.
- [0176] 상기 기재된 방법 중 임의의 것에서, 방법은 주형을 재순환시키는 추가의 단계 (단계 j)를 추가적으로 포함할 수 있다. 방법은 재순환되는 주형으로 이전 단계 (단계 a) 내지 i) 또는 단계 a) 내지 j))를 반복하는 또 다른 단계 (단계 k)를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0177] 본 개시내용은 또한 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0178] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열 및
- [0179] i) 폴리머라제에 대한 프라이머로서 작용하는 헤어핀 루프,
- [0180] ii) 폴리머라제에 대한 스톱퍼로서 작용하는 헤어핀 루프, 또는
- [0181] iii) 하나의 헤어핀 루프는 폴리머라제에 대한 프라이머로서 작용하고 다른 헤어핀 루프는 폴리머라제에 대한 스톱퍼로서 작용하는, 주형 폴리뉴클레오타이드의 양쪽 단부의 헤어핀 루프
- [0182] 를 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;
- [0183] b) 주형 폴리뉴클레오타이드를 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시켜 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계이며, 여기서 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드와 헤어핀 루프의 단부 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0184] c) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 헤어핀 루프의 단부를, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 헤어핀 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계;
- [0185] d) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드(들) 및/또는 연장된 절편/헤어핀 폴리뉴클레오타이드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오타이드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계;
- [0186] e) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 주형 폴리뉴클레오타이드로부터 절단하는 단계; 및
- [0187] f) 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물 및 주형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스를 변성시

김으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계를 포함한다. 절단 단계는 뉴클레아제, 니카제, DNA자임에 의해, 또는 화학적 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [0188] 본 개시내용은 또한 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 2개의 상보적 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 어닐링시키는 것을 포함하고, 이 중 적어도 1개는 본 개시내용의 방법에 의해 생산된 것이고, 임의로 둘 다가 본 개시내용의 방법에 의해 생산된 것이다.
- [0189] 본 개시내용은 또한, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0190] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시켜 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 어닐링된 주형 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0191] b) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 상기 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 중 적어도 1개를, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키도록 연장시켜 적어도 1개의 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;
- [0192] c) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드(들) 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드(들)를 라이게이션시켜 주형 폴리뉴클레오티드에 결합된 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 듀플렉스로 형성하는 단계;
- [0193] d) 임의로, 조건을 변화시켜 단일 가닥 주형 폴리뉴클레오티드 및 불순물 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시키고, 임의의 불순물 폴리뉴클레오티드(들)를 주형 폴리뉴클레오티드로부터 분리하는 단계;
- [0194] e) 조건을 변화시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물 및 주형 폴리뉴클레오티드를 포함하는 듀플렉스를 변성시킴으로써, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계; 및
- [0195] f) 단계 a)에서의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 주형 폴리뉴클레오티드로서 사용하고, 단계 a) 내지 c) 또는 단계 a) 내지 d)를 반복하여 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계
- [0196] 를 포함한다.
- [0197] 이론에 얽매이지는 않지만, 이들 방법은 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 생산의 단계 및 라이게이션 방법 단계가 동일한 주형을 사용하도록 함으로써 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 생산의 복잡성을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 공동 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 연장 및 라이게이션은 폴리뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 산물의 생산 시 추가로 발생할 수 있다. 이들 방법은 최종 산물의 키랄성을 제어하는 것을 보조할 수 있고, 라이게이션 단계의 수를 감소시켜 전체 반응 시간을 감소시킬 수 있다.
- [0198] 본 개시내용은 또한 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 본 개시내용의 방법에 의해 생산된 2개의 상보적 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 어닐링을 허용하는 조건 하에 혼합된다.
- [0199] 대안적으로, 본 개시내용은 또한 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물은 주형으로서 작용하고/거나 주형으로서 사용된다.
- [0200] 예를 들어, 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0201] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- [0202] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 풀을 제공하는 단계;
- [0203] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오티드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0204] d) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키

는 단계;

- [0205] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 형성하는 단계;
- [0206] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계;
- [0207] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 분리하는 단계; 및
- [0208] h) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 단계 a)에서의 주형으로서 사용하고, 단계 a) 내지 e) 또는 단계 a) 내지 f)를 반복하여 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계
- [0209] 를 포함한다.
- [0210] 임의로, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 정제된다.
- [0211] 예를 들어, 본 개시내용은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0212] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- [0213] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 풀을 제공하는 단계;
- [0214] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오티드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 어닐링된 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 겹이 형성되는 것인 단계;
- [0215] d) 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오티드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키는 단계;
- [0216] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 형성하는 단계;
- [0217] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계;
- [0218] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 변성시키고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 분리하는 단계; 및
- [0219] h) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 단계 a)에서의 주형으로서 사용하고, 단계 a) 내지 e) 또는 단계 a) 내지 f)를 반복하여 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계
- [0220] 를 포함하고, 여기서 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 포함하고/거나 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0221] 임의로, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 정제된다.
- [0222] 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 모든 절편 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 포함한다.
- [0223] 특정 실시양태에서, 단계 (d)에서의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 내의 적어도 1개의 뉴클레오시드 트리포스페이트가 변형된다. 특정 실시양태에서, 단계 (d)에서의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 내의 A, T, C, G 및/또는 U가 변형된다. 특정 실시양태에서, 단계 (d)에서의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 내의 모든 뉴클레오시드 트리포스페이트가 변형된다.
- [0224] 일부 실시양태에서, 단계 I에서 사용되는 리가제는 각각의 절편 폴리뉴클레오티드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드의 3' 및/또는 5' 단부를 각각의 인접한 절편 폴리뉴클레오티드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드에 라이게이션시켜 산물 폴리뉴클레오티드 가닥을 형성하는 데 사용된다. 단계 (e)에서 사용되는 리가제는 RNA 및/또는 DNA 리가제일 수 있다.
- [0225] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드의 풀은 효소적 합성, 화학적 합성, 임의로 교체 지지된 합성 또는 용액

상 합성, 또는 그의 조합에 의해 생산된다. 폴리뉴클레오타이드의 풀은 단일 가닥 리가제, 트랜스퍼라제, 폴리머라제 또는 그의 조합을 사용한 효소적 합성에 의해 생산될 수 있다.

- [0226] 일부 실시양태에서, 변형은 변형된 당 모이어티, 핵염기의 변형 및 백본의 변형으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 변형, 핵염기의 변형 및/또는 백본의 변형을 포함한다. 다시 말해서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티, 변형된 핵염기 및/또는 변형된 백본을 포함한다.
- [0227] 본 발명의 방법에 사용되는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 당 변형, 즉 리보실 모이어티의 변형된 버전, 예컨대 2'-O-변형된 RNA, 예컨대 2'-O-알킬 또는 2'-O-(치환된)알킬, 예를 들어 2'-O-메틸, 2'-O-(2-시아노에틸), 2'-O-(2-메톡시)에틸 (2'-MOE), 2'-O-(2-티오메틸)에틸, 2'-O-부틸, 2'-O-프로파르길, 2'-O-알릴, 2'-O-(3-아미노)프로필, 2'-O-(3-(디메틸아미노)프로필), 2'-O-(2-아미노)에틸, 2'-O-(2-(디메틸아미노)에틸); 2'-데옥시 (DNA); 2'-O-(할로알콕시)메틸 (Arai K. et al., Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285), 예를 들어 2'-O-(2-클로로에톡시)메틸 (MCEM), 2'-O-(2,2-디클로로에톡시)메틸 (DCEM); 2'-O-알콕시카르보닐, 예를 들어 2'-O-[2-(메톡시카르보닐)에틸] (MOCE), 2'-O-[2-(N-메틸카르바모일)에틸] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-디메틸카르바모일)에틸] (DCME); 2'-할로, 예를 들어 2'-F, FANA (2'-F 아라비노실 핵산); 카르바당 및 아자당 변형; 3'-O-알킬, 예를 들어 3'-O-메틸, 3'-O-부틸, 3'-O-프로파르길; 및 그의 유도체를 포함할 수 있다.
- [0228] 본 발명의 한 실시양태에서, 당 변형은 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메틸 (2'-OMe), 2'-O-메톡시에틸 (2'-MOE), 및 2'-아미노로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, 변형은 2'-MOE이다.
- [0229] 다른 당 변형은 "가교된" 또는 "비시클릭" 핵산 (BNA), 예를 들어 잠금 핵산 (LNA), 크실로-LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, cEt (2'-O,4'-C 구속성 에틸) LNA, cMOEt (2'-O,4'-C 구속성 메톡시에틸) LNA, 에틸렌-가교된 핵산 (ENA), 트리시클로 DNA; 비잠금 핵산 (UNA); 시클로헥세닐 핵산 (CeNA), 알트리올 핵산 (ANA), 핵시톨 핵산 (HNA), 플루오린화된 HNA (F-HNA), 피라노실-RNA (p-RNA), 3'-데옥시피라노실-DNA (p-DNA); 모르폴리노 (예를 들어 PMO, PPMO, PMO플러스, PMO-X에서와 같음); 및 그의 유도체를 포함한다.
- [0230] 본 개시내용의 방법에 사용되는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 다른 변형, 예컨대 펩티드-염기 핵산 (PNA), 붕소 변형된 PNA, 피롤리딘-기반 옥시-펩티드 핵산 (POPNA), 글리콜- 또는 글리세롤-기반 핵산 (GNA), 트레오스-기반 핵산 (TNA), 비-시클릭 트레오니놀-기반 핵산 (aTNA), 통합된 염기 및 백본을 갖는 올리고뉴클레오타이드 (ONIB), 피롤리딘-아미드 올리고뉴클레오타이드 (POM); 및 그의 유도체를 포함할 수 있다.
- [0231] 본 발명의 한 실시양태에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO), 잠금 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교된 핵산 (BNA), 예컨대 (S)-cEt-BNA, 또는 스피에겔머 (SPIEGELMER)로도 공지되어 있는 L-리보핵산을 포함한다.
- [0232] 추가 실시양태에서, 변형은 핵염기에 존재한다. 염기 변형은 천연 퓨린 및 피리미딘 염기 (예를 들어 아데닌, 우라실, 구아닌, 시토신, 및 티민)의 변형된 버전, 예컨대 이노신, 하이포크산틴, 오로트산, 아그마티딘, 리시딘, 2-티오피리미딘 (예를 들어 2-티오우라실, 2-티오티민), G-클램프 및 그의 유도체, 5-치환된 피리미딘 (예를 들어 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-할로우라실, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-아미노메틸우라실, 5-히드록시메틸우라실, 5-아미노메틸시토신, 5-히드록시메틸시토신, 슈퍼 T), 2,6-디아미노퓨린, 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-아자-2, 6-디아미노퓨린, 8-아자-7-데아자구아닌, 8-아자-7-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자-2, 6-디아미노퓨린, 슈퍼 G, 슈퍼 A, 및 N4- 에틸시토신, 또는 그의 유도체; N2-시클로펜틸구아닌 (cPent-G), N2-시클로펜틸-2-아미노퓨린 (cPent-AP), 및 N2-프로필-2-아미노퓨린 (Pr-AP), 또는 그의 유도체; 및 축중성 또는 범용 염기, 예컨대 2, 6-디플루오로톨루엔 또는 무 염기, 예컨대 무염기성 부위 (예를 들어 1-데옥시리보스, 1,2-디데옥시리보스, 1-데옥시-2-O-메틸리보스; 또는 고리 산소가 질소로 대체된 피롤리딘 유도체 (아자리보스))를 포함한다. 슈퍼 A, 슈퍼 G 및 슈퍼 T의 유도체의 예는 US6683173에서 찾아볼 수 있다. cPent-G, cPent-AP 및 Pr-AP는 siRNA에 혼입된 경우에 번역자극 효과를 감소시키는 것으로 밝혀졌다 (Peacock H. et al., J. Am. Chem. Soc. (2011), 133, 9200).
- [0233] 본 발명의 한 실시양태에서, 핵염기 변형은 5-메틸 피리미딘, 7-데아자구아노신 및 무염기성 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 변형은 5-메틸 시토신이다.
- [0234] 본 개시내용의 방법에 사용되는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 백본 변형, 예를 들어 RNA에 존재하는 포스포디에스테르의 변형된 버전, 예컨대 포스포로티오에이트 (PS), 포스포로디티오에이트 (PS2), 포스포노아세테이트 (PACE), 포스포노아세트아미드 (PACA), 티오포스포노아세테이트, 티오포스포노아세트아미드, 포스

포로티오에이트 전구약물, H-포스포네이트, 메틸 포스포네이트, 메틸 포스포노티오에이트, 메틸 포스페이트, 메틸 포스포로티오에이트, 에틸 포스페이트, 에틸 포스포로티오에이트, 보라노포스페이트, 보라노포스포로티오에이트, 메틸 보라노포스페이트, 메틸 보라노포스포로티오에이트, 메틸 보라노포스포네이트, 메틸보라노포스포노티오에이트, 및 그의 유도체를 포함할 수 있다. 다른 변형은 포스포르아미다이트, 포스포르아미데이트, '3'→P5' 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트, 포스포로티오디아미데이트, 술폰메이트, 디메틸렌술폰옥시드, 술폰에이트, 트리아졸, 옥살릴, 카르바메이트, 메틸렌이미노 (MMI), 및 티오아세트아미도 핵산 (TANA); 및 그의 유도체를 포함한다.

[0235] 추가 실시양태에서, 변형은 백본에 존재하고, 포스포로티오에이트 (PS), 포스포르아미데이트 (PA), 포스포로디아미데이트 및 포스포로티오에이트 (PS2)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO)이다. PMO는 포스포로디아미데이트 연결이 존재하는 메틸렌모르폴린 고리의 백본을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 포스포로티오에이트 (PS) 백본을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 백본에 적어도 1개의 포스포로티오에이트 (PS) 결합을 갖는다.

[0236] 본 발명의 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 본원에 개시된 바와 같은 2개 이상의 변형의 조합을 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 올리고뉴클레오타이드 및 그의 구성성분 뉴클레오타이드의 많은 합성 유도체가 존재한다는 것을 인지할 것이다.

[0237] 변형은 당 모이어티의 2' 위치에서의 변형, 비시클릭 당 또는 4'-(CH₂)₃-O-2' 기, 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 당 모이어티의 2' 위치에서의 변형은 2'-MOE를 포함할 수 있다. 변형된 핵염기는 시토신, 임의로 5-메틸 시토신을 포함할 수 있다. 핵염기에서의 변형은 5-메틸 피리미딘, 7-테아자구아노신 및 무염기성 뉴클레오타이드를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 백본에서의 변형은 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트 및 포스포디티오에이트를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0238] 실시양태에서, 각각의 폴리뉴클레오타이드 절편은 연결된 2'-데옥시뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오시드로 구성될 수 있다. 실시양태에서, 적어도 1개 또는 각각의 뉴클레오시드간 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결일 수 있다.

[0239] 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물은 DNA 폴리뉴클레오타이드 산물, RNA 폴리뉴클레오타이드 산물, 또는 그의 조합일 수 있다. RNA 폴리뉴클레오타이드 산물은 mRNA일 수 있다. 실시양태에서, 뉴클레오타이드 변형은 1개 이상의 우라실 잔기의 치환을 포함할 수 있다. 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드는 1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시-우라실, 1-에틸-슈도우라실, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실, 5-메틸-시티딘, 5-메틸-시토신, N6-메틸아데노신 또는 7-메틸구아노신, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물은 각각의 U 잔기가 N1-메틸-슈도우리딘인 mRNA이다. 한 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물은 각각의 U 잔기가 N1-메틸-슈도우리딘이고 백본이 포스포로티오에이트 백본인 mRNA이다.

[0240] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 사용된 폴리머라제는 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 사용된 폴리머라제는 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 사용된 폴리머라제는 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있고, 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있다.

[0241] 실시양태에서, 단계 (d)에서 사용된 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제 또는 그의 조합일 수 있다.

[0242] 방법의 단계는 순차적 순서로 수행될 수 있다. 방법의 단계는 청구범위를 실행불가능하게 만들지 않는 한 재순서화될 수 있다. 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀을 제공하고, 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 것이 개별 단계로서 이루어지는 경우에, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀은, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드가 주형에 어닐링된 후에 폴리머라제가 첨가되는 한, 임의의 선행 단계에서 제공될 수 있다. 대안적으로, 폴리머라제는, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드가 주형에 어닐링된 후에 뉴클레오시드 트리포스페이트의 풀이 첨가되는 한, 임의의 선행 단계에서 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 단계가 공동으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 단계 a) 내지 g) 중 2개 이상이 공동으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 단계가 순차적으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 단계 a) 내지 g) 중 2개 이상이 순차적으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 방법의 단계 (d) 및 (e)는 공동으로 이루어진다. 다른 실시양태에서, 방법의 단계 (d) 및 (e)는 순차적으로 이루어진다.

- [0243] 실시양태에서, 주형 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 서열에 상보적인 서열로 이루어질 수 있다.
- [0244] 실시양태에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 헤어핀 루프의 일부이다. 용어 헤어핀 루프 및 스템 루프는 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 헤어핀 루프는 비대칭일 수 있다. 헤어핀 루프는 DNA 헤어핀 루프일 수 있다. 헤어핀 루프는 RNA 헤어핀 루프일 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드가 헤어핀 루프를 포함하는 경우에, 폴리머라제는 중합을 개시하기 위해 프라이머를 필요로 하지 않을 수 있다. 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 효소를 사용하여 헤어핀 루프와 산물 폴리뉴클레오티드 가닥 사이에 단일 가닥 커트를 도입한 후 (예를 들어, 니카제를 사용함), 어닐링된 주형 폴리뉴클레오티드 및 산물 폴리뉴클레오티드 가닥이 변성 주형 및 헤어핀 루프로부터 방출될 수 있다.
- [0245] 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 3 내지 40개 뉴클레오티드 길이, 3 내지 35개 뉴클레오티드 길이, 또는 3 내지 30개 뉴클레오티드 길이, 임의로 10 내지 35개 뉴클레오티드 길이, 10 내지 30개 뉴클레오티드 길이, 3 내지 15개 뉴클레오티드 길이, 13 내지 35개 뉴클레오티드 길이, 15 내지 35개 뉴클레오티드 길이, 13 내지 30개 뉴클레오티드 길이, 15 내지 30개 뉴클레오티드 길이, 13 내지 25개 뉴클레오티드 길이, 15 내지 25개 뉴클레오티드 길이, 13 내지 20개 뉴클레오티드 길이, 15 내지 20개 뉴클레오티드 길이, 17 내지 25개 뉴클레오티드 길이, 20 내지 25개 뉴클레오티드 길이, 또는 20 내지 30개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 한 실시양태에서, 산물은 20개 뉴클레오티드 길이이고,
- [0246] (i) 7개 뉴클레오티드 길이의 5'-절편, 6개 뉴클레오티드 길이의 중심 절편 및 7개 뉴클레오티드 길이의 3'-절편;
- [0247] (ii) 6개 뉴클레오티드 길이의 5'-절편, 8개 뉴클레오티드 길이의 중심 절편 및 6개 뉴클레오티드 길이의 3'-절편;
- [0248] (iii) 5개 뉴클레오티드 길이의 5'-절편, 10개 뉴클레오티드 길이의 중심 절편 및 5개 뉴클레오티드 길이의 3'-절편;
- [0249] (iv) 4개 뉴클레오티드 길이의 5'-절편, 12개 뉴클레오티드 길이의 중심 절편 및 4개 뉴클레오티드 길이의 3'-절편; 또는
- [0250] (v) 3개 뉴클레오티드 길이의 5'-절편, 14개 뉴클레오티드 길이의 중심 절편 및 3개 뉴클레오티드 길이의 3'-절편을 포함하는 3개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 중심 영역, 중심 영역의 5' 단부에 위치하는 5' 날개 영역, 및 중심 영역의 3' 단부에 위치하는 3' 날개 영역을 포함하는 잭머 안티센스 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 이는 고도로 서열 특이적인 올리고뉴클레오티드 산물을 생산하는 것이 중요한 치료 올리고뉴클레오티드 생산에서 특히 유용하다.
- [0251] 실시양태에서, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드는
- [0252] (i) 7개 뉴클레오티드 길이인 5'-절편 및 7개 뉴클레오티드 길이인 3'-절편;
- [0253] (ii) 6개 뉴클레오티드 길이인 5'-절편 및 6개 뉴클레오티드 길이인 3'-절편;
- [0254] (iii) 5개 뉴클레오티드 길이인 5'-절편 및 5개 뉴클레오티드 길이인 3'-절편;
- [0255] (iv) 4개 뉴클레오티드 길이인 5'-절편 및 4개 뉴클레오티드 길이인 3'-절편; 또는
- [0256] (v) 3개 뉴클레오티드 길이인 5'-절편 및 3개 뉴클레오티드 길이인 3'-절편을 포함한다.
- [0257] 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 30 내지 20,000개 뉴클레오티드 길이, 임의로 30 내지 10,000개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 5,000개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 4,000개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 3,000개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 2,000개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 1,000개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 500개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 400개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 300개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 200개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 100개 뉴클레오티드 길이, 30 내지 50개 뉴클레오티드 길이, 또는 30 내지 40개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 이들 산물은 예를 들어 고도로 서열 특이적 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 것이 중요한 치료 mRNA 생산에 있어서 유용하다.
- [0258] 추가 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 30개 초과 뉴클레오티드 길이이다. 또 다른 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물은 35개 초과 뉴클레오티드 길이이다. 또 다른 실시양태에서, 길이

는 적어도 40개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 45개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 55개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 60개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 60개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 80개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 90개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 100개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 120개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 140개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 160개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 180개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 200개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 250개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 300개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 350개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 400개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 450개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 500개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 600개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 700개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 800개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 900개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1000개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1100개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1200개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1300개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1400개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1500개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1600개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 1800개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 2000개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 2500개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 3000개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 4000개 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이는 적어도 5000개 뉴클레오타이드, 또는 5000개 초과 뉴클레오타이드이다.

[0259] 실시양태에서, 주형은 산물로부터 상기 주형이 분리되고 후속 반응을 위해 재순환되도록 하는 특성을 갖는다. 방법은 주형을 재순환시키는 최종 단계를 포함할 수 있다. 방법은 j) 주형을 재순환시키는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 후속 반응에 사용하기 위해 주형을 재순환시키는 최종 단계를 포함할 수 있다. 방법은 j) 후속 반응에 사용하기 위해 주형을 재순환시키는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 주형을 재순환시키고 방법을 반복하는 최종 단계를 포함할 수 있다. 방법은 주형을 재순환시키고 방법의 1개 이상의 단계를 반복하는 최종 단계를 포함할 수 있다. 방법은 j) 주형을 재순환시키는 단계 및 k) 단계 a) 내지 i)를 반복하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 j) 주형을 재순환시키는 단계 및 k) 단계 a) 내지 k)를 반복하는 단계를 포함할 수 있다.

[0260] 본원에 기재된 방법은 반연속식 또는 연속식일 수 있다.

[0261] 산물이 그램-규모 또는 킬로그램-규모 또는 그 초과 규모로 생산되고/거나 방법이 적어도 1 L의 반응 부피로 수행되는 방법이 제공된다. 산물이 그램-규모, 킬로그램-규모 또는 그 초과 규모로 생산되는 방법이 제공된다. 적어도 200 mL의 반응 부피에서 수행되는 방법이 제공된다. 적어도 500 mL의 반응 부피에서 수행되는 방법이 제공된다. 적어도 1 L의 반응 부피에서 수행되는 방법이 제공된다. 적어도 2 L의 반응 부피에서 수행되는 방법이 제공된다. 적어도 5 L의 반응 부피에서 수행되는 방법이 제공된다.

[0262] 생성된 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물은 적어도 90% 순수, 적어도 95% 순수, 또는 적어도 98% 순수할 수 있다.

[0263] 방법은 치료 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 데 사용될 수 있다. 실시양태에서, 방법은 단일 가닥 치료 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 방법이다. 실시양태에서, 방법은 이중 가닥 치료 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 방법이다. 이들 방법은, 예를 들어 고도로 서열 특이적인 올리고뉴클레오타이드 산물을 생산하는 것이 중요한 치료 올리고뉴클레오타이드 생산에 유용하다. 산물은 또한 예를 들어 고도로 서열 특이적 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 것이 중요한 치료 mRNA 생산에 있어서 유용하다.

[0264] 주형 및 불순물 듀플렉스를 변성시키고/거나 주형 및 산물 듀플렉스를 변성시키는 것이 온도 증가에 의해 발생하는 것인 방법이 제공된다. 실시양태에서, 변성은 pH 변화의 결과로서 발생할 수 있다. 실시양태에서, 변성은 완충 용액 중 염 농도를 변화시킴으로써 발생할 수 있다.

[0265] 절편 올리고뉴클레오타이드가 3 내지 15개 뉴클레오타이드 길이인 방법이 제공된다. 실시양태에서, 절편은 5 내지 10개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 절편은 5 내지 8개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양

태에서, 절편은 4, 5, 6, 7 또는 8개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 3개의 절편 올리고뉴클레오타이드: 7개 뉴클레오타이드 길이인 5'-절편, 6개 뉴클레오타이드 길이인 중심 절편 및 7개 뉴클레오타이드 길이인 3'-절편이 존재하며, 이는 함께 라이게이션될 경우 20개 뉴클레오타이드 길이인 올리고뉴클레오타이드 ("20-량체")를 형성한다. 실시양태에서, 3개의 절편 올리고뉴클레오타이드: 6개 뉴클레오타이드 길이인 5'-절편, 8개 뉴클레오타이드 길이인 중심 절편 및 6개 뉴클레오타이드 길이인 3'-절편이 존재하며, 이는 함께 라이게이션될 경우 20개 뉴클레오타이드 길이인 올리고뉴클레오타이드 ("20-량체")를 형성한다. 실시양태에서, 3개의 절편 올리고뉴클레오타이드: 5개 뉴클레오타이드 길이인 5'-절편, 10개 뉴클레오타이드 길이인 중심 절편 및 5개 뉴클레오타이드 길이인 3'-절편이 존재하며, 이는 함께 라이게이션될 경우 20개 뉴클레오타이드 길이인 올리고뉴클레오타이드 ("20-량체")를 형성한다. 실시양태에서, 3개의 절편 올리고뉴클레오타이드: 4개 뉴클레오타이드 길이인 5'-절편, 12개 뉴클레오타이드 길이인 중심 절편 및 4개 뉴클레오타이드 길이인 3'-절편이 존재하며, 이는 함께 라이게이션될 경우 20개 뉴클레오타이드 길이인 올리고뉴클레오타이드 ("20-량체")를 형성한다. 실시양태에서, 4개의 절편 올리고뉴클레오타이드: 5개 뉴클레오타이드 길이인 5'-절편, 5개 뉴클레오타이드 길이인 5'-중심 절편, 5개 뉴클레오타이드 길이인 중심-3'-절편, 및 5개 뉴클레오타이드 길이인 3'-절편이 존재하며, 이는 함께 라이게이션될 경우 20개 뉴클레오타이드 길이인 올리고뉴클레오타이드 ("20-량체")를 형성한다.

[0266] 산물이 3 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인 방법이 제공된다. 실시양태에서, 산물은 13 내지 40개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 산물은 15 내지 40개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 산물은 13 내지 35개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 산물은 15 내지 35개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 산물은 15 내지 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 실시양태에서, 산물은 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 20개 뉴클레오타이드 길이, "20-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 21개 뉴클레오타이드 길이, "21-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 22개 뉴클레오타이드 길이, "22-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 23개 뉴클레오타이드 길이, "23-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 24개 뉴클레오타이드 길이, "24-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 25개 뉴클레오타이드 길이, "25-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 26개 뉴클레오타이드 길이, "26-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 27개 뉴클레오타이드 길이, "27-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 28개 뉴클레오타이드 길이, "28-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 29개 뉴클레오타이드 길이, "29-량체"이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 산물은 30개 뉴클레오타이드 길이, "30-량체"이다. 이러한 산물은, 예를 들어 캡머 생산에서 유용성을 갖는다. 한 실시양태에서, 이러한 3 내지 40개 뉴클레오타이드 길이의 단일 가닥 산물은 치료 안티센스 캡머이다. 한 실시양태에서, 이러한 3 내지 40개 뉴클레오타이드 길이의 산물은 치료 이중 가닥 산물, 예컨대 siRNA 및 miRNA이다. 한 실시양태에서, 이러한 3 내지 40개 뉴클레오타이드 길이의 산물은 DNA 및/또는 RNA 편집 효소를 동원하고 가이드하는 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 RNA 염기-변형 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 Aimer이다.

[0267] 산물이 최대 10,000개 뉴클레오타이드 길이인 방법이 제공된다. 실시양태에서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물은 10 내지 10,000개 뉴클레오타이드 길이, 임의로 10 내지 5,000개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 1,000개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 500개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 400개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 300개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 200개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 100개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 또는 10 내지 40개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 이러한 산물은, 예를 들어 치료 mRNA 폴리뉴클레오타이드로서 유용성을 갖는다.

[0268] 주형이 산물로부터 분리되도록 하는 특성이, 주형이 지지체 물질에 부착되는 것인 방법이 제공된다. 실시양태에서, 지지체 물질은 가용성 지지체 물질이다. 실시양태에서, 가용성 지지체 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 가용성 유기 중합체, DNA, 단백질, 덴드리머, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 실시양태에서, 지지체 물질은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 실시양태에서, 지지체 물질은 불용성 지지체 물질이다. 실시양태에서, 지지체 물질은 고체 지지체 물질이다. 실시양태에서, 고체 지지체 물질은 유리 비드, 중합체 비드, 섬유성 지지체, 막, 스트랩타비딘 코팅된 비드 및 셀룰로스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 실시양태에서, 고체 지지체 물질은 스트랩타비딘 코팅된 비드이다. 실시양태에서, 고체 지지체 물질은 반응 용기 자체의 일부, 예를 들어 반응 벽이다.

[0269] 주형의 반복 카피가 단일 부착 지점을 통해 연속식 방식으로 지지체 물질에 부착되는 방법이 제공된다. 주형의 반복 카피는 예를 들어 도 2에 제시된 바와 같이 링커에 의해 분리될 수 있다. 주형의 반복 카피는 직접 반복일 수 있고, 즉 이들은 링커에 의해 분리되지 않는다.

- [0270] 실시양태에서, 주형은 다중 부착 지점에서 지지체 물질에 부착된다.
- [0271] 주형이 산물로부터 분리되도록 하는 특성이, 주형의 분자량인 방법이 제공된다. 예를 들어, 주형 서열의 반복 카피는 링커 서열의 존재 또는 부재 하에 단일 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 상에 존재할 수 있다.
- [0272] 주형 또는 주형 및 지지체 물질을, 예를 들어 하기 상술된 바와 같이, 후속 반응에 사용하기 위해 재순환시키는 방법이 제공된다. 연속식 또는 반연속식 유동 방법을 사용하여 반응을 수행하는 방법이 제공된다.
- [0273] 실시양태에서, 방법은 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드, 임의로 치료 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 대규모 제조를 위한 것이다. 본 개시내용의 문맥에서, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 대규모 제조는 1 리터 이상의 규모로의 제조를 의미하며, 예를 들어 방법은 1 L 이상의 반응기에서 수행된다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 문맥에서, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 대규모 제조는 산물의 그램-규모의 제조, 특히 산물의 10 그램 이상의 생산을 의미한다. 실시양태에서, 산물은 그램-규모 또는 킬로그램-규모로 생산되고/거나 방법은 적어도 1 L의 반응기에서 수행된다. 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 양은 그램-규모이다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 그램 이상이다. 실시양태에서, 생산된 올리고뉴클레오티드 산물의 양은 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 그램 이상이다. 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 양은 500 그램 이상이다. 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물은 킬로그램-규모이다. 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 양은 1 kg 이상이다. 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 양은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kg 이상이다. 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물의 양은 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 kg 이상이다.
- [0274] 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 10 그램 내지 100 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 10 그램 내지 50 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 100 그램 내지 100 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 100 그램 내지 50 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 500 그램 내지 100 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 500 그램 내지 50 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 1 kg 내지 50 kg이다. 실시양태에서, 생산된 산물의 양은 10 kg 내지 50 kg이다.
- [0275] 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 제조는 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 L 반응기에서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 리터 이상의 규모로 일어난다. 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 제조는 예를 들어 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 L 반응기에서 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 리터 이상의 규모로 일어난다. 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 제조는 예를 들어 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 L 반응기에서 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 리터 이상의 규모로 일어난다.
- [0276] 실시양태에서, 반응기 부피는 약 10,000 L, 약 5000 L, 약 2000 L, 약 1000 L, 약 500 L, 약 125 L, 약 50 L, 약 20 L, 약 10 L, 또는 약 5 L이다.
- [0277] 실시양태에서, 반응기 부피는 5 내지 10,000 L, 10 내지 5000 L, 20 내지 2000 L, 또는 50 내지 1000 L이다.
- [0278] 폴리머라제 및 리가제를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 생산하는 방법이 제공된다. 2개 이상의 상보적 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열, 예를 들어 절편이 결합되는 주형 폴리뉴클레오티드가 사용된다. 폴리머라제는 상보적 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열 사이의 각각의 갭을 충전시키는 데 사용된다. 인접한 서열은 리가제를 사용하여 함께 융합된다. 유리하게는, 전체 방법은 완전히 효소적일 수 있어서, 방법의 복잡성을 감소시키고 효율을 증가시킬 수 있다. 2개 이상의 상보적 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 폴리머라제에 의해 도입되는 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이는 짧은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 10 내지 30개 뉴클레오티드 길이) 또는 긴 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 30 내지 10,000개 뉴클레오티드 길이)일 수 있는 치료 폴리뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드의 생산을 가능하게 한다. 2개 이상의 상보적 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열은 주형 폴리뉴클레오티드에 결합될 수 있고, 폴리머라제는 각각의 상보적 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열 사이의 각각의 갭을 충전시킬 수 있다. 이어서, 리가제를 사

용하여 각각의 인접한 서열을 함께 라이게이션시킬 수 있다.

[0279] 최종 단일 가닥 산물은 본원에 기재된 방법을 사용하여 주형으로부터 분리될 수 있다. 임의로, 주형은 주형이 후속 반응을 위해 재순환되도록 하는, 본원에 기재된 바와 같은 특성을 가질 수 있다.

[0280] 한 예에서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 함유하는, 통상적으로 10 내지 30개 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 올리고뉴클레오타이드인 갭머를 생산하는 방법이 제공된다. 일반적으로, 갭머는 비-변형된 뉴클레오타이드 잔기를 함유하는 중심 영역 및 중심 영역의 양쪽에 2개의 날개 영역 (5' 및 3' 날개)을 함유하며, 상기 날개 영역은 각각 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 함유한다. 한 실시양태에서, 폴리머라제는 갭머의 중심 영역을 생산하는 데 사용된다. 한 예에서, 5'-절편은 갭머의 중심 영역을 생산하기 위한 폴리머라제에 대한 프라이머로서 사용될 수 있고, 3'-절편은 폴리머라제에 대한 스톱퍼로서 사용될 수 있다. 이어서, 리가제를 사용하여 중심 절편을 3'-절편에 융합시켜 갭머 산물을 생성할 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리머라제는 갭머의 중심 영역의 일부를 생산하는 데 사용된다. 한 실시양태에서, 5'-절편은 갭머의 절편을 생산하기 위한 폴리머라제에 대한 프라이머로서 사용될 수 있고, 3'-절편은 폴리머라제에 대한 스톱퍼 서열로서 사용될 수 있다. 5'-절편은 날개 영역을 포함하거나 또는 그로 이루어질 수 있다. 5'-절편은 날개 영역의 일부를 포함할 수 있다. 3'-절편은 날개 영역을 포함하거나 또는 그로 이루어질 수 있다. 3'-절편은 날개 영역의 일부를 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 생산 라운드의 횟수를 감소시킴으로써 방법의 복잡성이 유의하게 감소된다. 한 실시양태에서, 중심 영역은 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된 데옥시뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 즉 중심 영역에는 당 변형이 없고, 그러나 백본은 완전 포스포로티오에이트 백본이며, 폴리머라제는 갭머의 중심 영역을 생산하는 데 사용된다. 한 실시양태에서, 5'-절편은 프라이머이고, 3'-절편은 스톱퍼이고, 각각의 절편은 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된 2'-MOE 당 변형된 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 한 실시양태에서, 갭머의 중심 영역은 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된 데옥시뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 폴리머라제는 갭머의 중심 영역을 생산하는 데 사용되고; 5'-절편은 프라이머이고, 3'-절편은 스톱퍼이고, 각각의 절편은 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된 2'-MOE 당 변형된 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 한 실시양태에서, 갭머는 완전 포스포로티오에이트 백본, 완전 2'MOE 당 변형된 5' 날개, 완전 2'MOE 당 변형된 3' 날개, 완전 데옥시리보스인 중심 영역을 갖고, 상기 갭머는 프라이머로서 5' 날개에 상응하는 5'-절편, 스톱퍼로서 3' 날개에 상응하는 3'-절편, 및 중심 영역을 생산하기 위한 폴리머라제 및 데옥시뉴클레오시드 알파-티오텐리포스페이트의 풀을 사용하여 생산된다. 한 실시양태에서, 갭머는 5-10-5 갭머이다.

[0281] 전통적인 폴리뉴클레오타이드 제조 방법, 예를 들어 고체-상 합성에서, 단일 뉴클레오타이드가 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드에 주형 비의존성 방식으로 첨가되어, 규정된 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 합성이 가능하게 된다. 이러한 접근법은 단일 염기를 반복적으로 첨가함으로써 전체 올리고뉴클레오타이드 산물을 생산하는 데 사용될 수 있다. 그러나, 각각의 합성 사이클이 100% 수율로 실행되지 않는 한, 서열 결실 오류가 최종 산물에 혼입될 것이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드가 합성 사이클에서 99% 수율로 1개의 뉴클레오타이드만큼 연장되는 경우에, 나머지 1%는 후속 합성 사이클에서 반응하는 데 이용가능할 것이지만, 형성된 산물은 목적 산물보다 1개의 뉴클레오타이드가 더 짧을 것이다. 사이클의 수가 증가함에 따라, 오류율은 악화되고, 따라서 이러한 예에서, 99% 사이클 수율은 20량체의 생산의 경우 20%의 단일 염기 단축된 서열의 형성을 초래할 것이다.

[0282] 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드에 단일 뉴클레오타이드를 첨가할 수 있는 리가제 또는 트랜스퍼라제를 사용한, 단일 뉴클레오타이드의 첨가에 의해 합성된 짧은 서열, 전형적으로 5 내지 8개 뉴클레오타이드 길이만을 사용하여 이를 극복하고자 한 시도는 이것이 보다 적은 오류 축적 사이클에 노출됨에 따라 긴 서열보다 더 높은 순도를 갖는 짧은 서열을 생성하였다. 이들 짧은 서열은 상보적 DNA 주형 상에 어셈블리된 다음, 함께 연결된다. 리가제와 함께 상보적 주형을 사용하는 것은 정확한 길이 및 정확한 서열 둘 다를 갖는 짧은 올리고뉴클레오타이드만이 어셈블리되는 것을 보장한다. 그러나, 이러한 방법은 각각의 짧은 서열을 생성하기 위해 각각의 뉴클레오타이드를 또 다른 뉴클레오타이드에 첨가하고, 이어서 이를 조합하는 다중 라운드의 합성을 여전히 필요로 한다. 이는 시간 소모적이고 복잡하다.

[0283] 따라서, 본 개시내용의 방법은 높은 전체 수율 및 높은 전체 서열 충실도로 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하기 위한 보다 효율적인 방법을 생성한다.

[0284] 본 개시내용에 따르면, 폴리머라제를 리가제와 조합하여 사용함으로써, 반복 라운드의 화학적 합성 없이 효율적인 방법으로 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산할 수 있다.

[0285] 오류의 순차적 축적이 또한 회피된다. 첫째로, 산물 서열의 적어도 2개의 절편을 사용하고, 폴리머라제를 사용

하여 캡을 충전하는 것에 의해, 이는 다수의 보다 짧은 서열로 최종 산물을 구성하는 것을 가능하게 하고, 오류가 도입될 수 있는 예를 들어 고체 상 합성에 의한 합성의 보다 적은 라운드를 제공한다. 폴리머라제는 또한 높은 서열 충실도를 가지며, 이는 오류 혼입의 기회를 감소시킨다. 이는 상업적 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드 생산을 위한 방법의 규모-확대에 대한 제한을 추가로 감소시킨다.

[0286] 둘째로, 후속 라이게이션에 의한 상보적 폴리뉴클레오타이드 주형 상에서의 최종 산물의 어셈블리는 절편이 최종 산물에 요구되는 정확한 길이 및 서열을 가지고 정확한 순서 및 키랄성으로 어셈블리되는 것을 보장한다. 이는 고도로 정확하고 개별맞춤화된 최종 산물이 생성되게 할 수 있다.

[0287] 예시적 실시양태에서, 방법은 완전-효소적이며, 이는 감소된 합성 라운드 및 증가된 효율을 가능하게 한다. 실제로, 폴리머라제 및 리가제 단계는 공동으로 일어날 수 있어서, 최종 산물이 방법의 1 라운드에서 생산될 수 있다. 폴리머라제 및 리가제 단계가 공동으로 일어나는 경우, 이는 "원-포트"로 공지될 수 있다.

[0288] 또 다른 예시적 실시양태에서, 방법은 주형의 3' 단부에 상보적인 폴리머라제에 대한 짧은 프라이머 서열을 (본원에 기재된 바와 같은 주형 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드와 조합하여) 사용함으로써 추가로 단순화되고 추가의 효율을 발생시킨다. 이어서, 폴리머라제는 주형을 따라 프라이머 서열을 연장시킨다. 주형의 5' 단부에 상보적인 스톱퍼를 사용하여 폴리머라제를 정지시킬 수 있다. 정지 순서는 정확한 양의 뉴클레오타이드 트리포스페이트가 반응에 첨가될 경우 생략될 수 있다. 이는 요구되는 뉴클레오타이드의 첨가 라운드의 수 및 요구되는 라이게이션의 수를 감소시켜, 높은 전체 수율 및 높은 전체 서열 충실도를 갖는 보다 효율적인 방법을 발생시킨다.

[0289] 실시양태에서, 폴리머라제는 본원에 기재된 바와 같이 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 서열의 파괴를 감소시키거나 방지하기 위해 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성 및 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성 둘 다를 제거하도록 변형된다.

[0290] 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드 산물은 mRNA이고, 코딩 영역은 우리딘 잔기가 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘으로 대체된 경우를 제외하고, 비변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리머라제는 mRNA의 코딩 영역의 일부 또는 전부를 생산하는 데 사용된다. 한 실시양태에서, 5'-UTR, 3'-UTR, 또는 5'-UTR 및 3'-UTR 둘 다는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 포스포로티오에이트 연결은 5'-UTR에서 시티딘 또는 시티딘 및 우리딘 둘 다에서 포함된다. 한 실시양태에서, 폴리-A 테일은 3'-5' 엑소뉴클레아제에 대해 감수성이 낮은 1개 이상의 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리-A 테일은 1개 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리-A 테일은 그의 3'-단부에 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리-A 테일은 그의 3' 단부에 적어도 6개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0291] 본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 1개의 변형된 당 모이어티, 핵염기의 변형, 및/또는 백본의 변형을 가질 수 있다.

[0292] 실시양태에서, 1개 이상의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 가질 수 있다. 실시양태에서, 모든 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는다. 다른 실시양태에서, 1개 이상의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖지 않을 수 있다. 실시양태에서, 폴리머라제는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 연장된 서열에 혼입시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 폴리머라제는 비-변형된 뉴클레오타이드 잔기를 연장된 서열에 혼입시킬 수 있다.

[0293] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 가질 수 있고, 폴리머라제는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 연장된 서열에 혼입시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 가질 수 있고, 폴리머라제는 비-변형된 뉴클레오타이드 잔기를 연장된 서열에 혼입시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖지 않을 수 있고, 폴리머라제는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 연장된 서열에 혼입시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖지 않을 수 있고, 폴리머라제는 비-변형된 뉴클레오타이드 잔기를 연장된 서열에 혼입시킬 수 있다.

[0294] 실시양태에서, 산물은 캡머일 수 있다. 실시양태에서, 날개 영역 (임의로 5'- 및/또는 3'-절편 올리고뉴클레오

티드)은 백본 및 당 변형을 포함할 수 있고, 중심 영역은 백본 변형을 포함할 수 있지만, 당 변형은 포함하지 않는다. 실시양태에서, 날개 영역은 적어도 1개의 당 변형을 포함할 수 있거나 또는 완전히 변형된 당으로 이루어질 수 있다. 실시양태에서, 깃머의 5' 및 3' 날개는 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 실시양태에서, 깃머의 중심 영역은 당 모이어티의 2' 위치에 수소를 함유하는 뉴클레오타이드, 즉 DNA-유사한 것을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 실시양태에서, 깃머의 5' 및 3' 날개는 2'MOE 변형된 뉴클레오타이드로 이루어지고, 깃머의 중심 영역은 당 모이어티의 2' 위치에 수소를 함유하는 뉴클레오타이드 (즉, 데옥시뉴클레오타이드)로 이루어진다. 실시양태에서, 깃머의 5' 및 3' 날개는 2'MOE 변형된 뉴클레오타이드로 이루어지고, 깃머의 중심 영역은 당 모이어티의 2' 위치에 수소를 함유하는 뉴클레오타이드 (즉, 데옥시뉴클레오타이드)로 이루어지고, 모든 뉴클레오타이드 사이의 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 한 실시양태에서, 깃머는 발리포르센, 베피로비르센, 쿠스티르센, 다플루시란, 도니달로르센, 에플론테르센, 프렌로시르센, 이노테르센, 라데미르센, 미포메르센, 올레자르센, 토미네르센, 올레프네르센, 볼라네소르센, 및 질가네르센으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 깃머는 5-10-5 깃머이다. 한 실시양태에서, 깃머는 6-8-6 깃머이다. 한 실시양태에서, 깃머는 4-12-4 깃머이다. 한 실시양태에서, 깃머는 7-6-7 깃머이다.

[0295] 생성된 산물이 90% 초과로 순수한 방법이 제공된다. 실시양태에서, 산물은 95% 초과로 순수할 수 있다. 실시양태에서, 산물은 96% 초과로 순수할 수 있다. 실시양태에서, 산물은 97% 초과로 순수할 수 있다. 실시양태에서, 산물은 98% 초과로 순수할 수 있다. 실시양태에서, 산물은 99% 초과로 순수할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 순도는 임의의 적합한 방법, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 또는 질량 분광측정법 (MS), 특히 액체 크로마토그래피-MS (LC-MS), HPLC-MS 또는 모세관 전기영동 질량 분광측정법 (CEMS)을 사용하여 결정될 수 있다.

[0296] 한 실시양태에서, 생산된 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 알리카포르센, Apc001PE, AS1411, 발리포르센, 베피로비르센, BIIB080, BIIB094, BIIB101, BIIB105, BIIB115, BIIB121, BIIB132, 카시메르센, 심텔리르센, CpG1018, CpG7909, 쿠스티르센, 다플루시란, 도니달로르센, 트리사페르센, 에플론테르센, 에테플리르센, 페소메르센, 포미베르센, 프렌로시르센, 글로디르센, 이메텔스타트, 이노테르센, ION224, ION260, ION306, ION363, ION455, ION464, ION532, ION541, ION582, ION839, ION859, ION904, IONIS-AGT-L_{Rx}, IONIS-FB-L_{Rx}, IONIS-MAPT_{Rx}, 라데미르센, 렉사네르센, 미포메르센, 몽게르센, 누시네르센, NOX-E36, 올레자르센, 폐갑타닙, 펠라카르센, 프렉시게베르센, 레나디르센, RG6048, 루고네르센, 사파블루르센, 세포파르센, 수보디르센, 토페르센 소듐, 토미네르센, 올레프네르센, 올테부르센, 베슬레테플리르센, 빌톨라르센, 볼라네소르센, WVE-003, WVE-004, WVE-006, WVE-N531, 및 질가네르센으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0297] 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드이다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 알리카포르센, 발리포르센, 베피로비르센, BIIB080, BIIB094, BIIB101, BIIB105, BIIB115, BIIB121, BIIB132, 심텔리르센, 카시메르센, 쿠스티르센, 다플루시란, 도니달로르센, 트리사페르센, 에플론테르센, 에테플리르센, 페소메르센, 포미베르센, 프렌로시르센, 글로디르센, 이메텔스타트, 이노테르센, ION224, ION260, ION306, ION363, ION455, ION464, ION532, ION541, ION582, ION839, ION859, ION904, IONIS-AGT-L_{Rx}, IONIS-FB-L_{Rx}, IONIS-MAPT_{Rx}, 라데미르센, 렉사네르센, 미포메르센, 몽게르센, 누시네르센, 올레자르센, 펠라카르센, 프렉시게베르센, 레나디르센, RG6048, 루고네르센, 사파블루르센, 세포파르센, 수보디르센, 토페르센 소듐, 토미네르센, 올레프네르센, 올테부르센, 베슬레테플리르센, 빌톨라르센, 볼라네소르센, WVE-003, WVE-004, WVE-N531, 및 질가네르센으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0298] 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 압타머이다. 한 실시양태에서, 압타머는 폐갑타닙, Apc001PE, AS1411 또는 NOX-E36이다.

[0299] 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 mRNA, 예컨대 Cas-9이다. 한 실시양태에서, 생산된 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 mRNA 백신이다. 한 실시양태에서, mRNA는 1종 이상의 면역원을 코딩한다. 추가 실시양태에서, 이들 면역원은 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) 면역원, 엡스타인-바르 바이러스 당단백질 면역원, 시토메갈로바이러스 당단백질 면역원, 코로나바이러스 스파이크 폴리펩티드 면역원, 인플루엔자 바이러스 면역원, 수두 대상포진 바이러스 당단백질 면역원, 인간 유두종바이러스 16 (HPV16) E6 면역원, HPV 16 E7 면역원, 또는 플라비바이러스 면역원으로부터 선택될 수 있다. 추가 실시양태에서, 그러한 면역원은 코로나바이러스 스파이크 단백질, 인플루엔자 항원, 및 RSV 항원 예컨대 단백질 f 또는 단백질 g로부터 선택될 수 있다.

- [0300] 한 실시양태에서 mRNA는 AZD8601, BNT111, BNT112, BNT113, BNT115, BNT116, BNT122, BNT131, BNT141, BNT142, BNT151, BNT152, BNT153, BNT161, BNT162b2, BNT163 BNT164, BNT165, LUNAR-CF, LUNAR-COV19, LUNAR-FLU, LUNAR-GSDIII, LUNAR-OTC, MEDI1191, mRNA-1273, mRNA-0184, mRNA-1010, mRNA-1020, mRNA-1030, mRNA-1011, mRNA-1012, mRNA-1045, mRNA-1073, mRNA-1189, mRNA-1195, mRNA-1215, mRNA-1230, mRNA-1273, mRNA-1273.211, mRNA-1273.213, mRNA-1273.214, mRNA-1273.222, mRNA-1273.351, mRNA-1273.529, mRNA-1273.617, mRNA-1283, mRNA-1287, mRNA-1345, mRNA-1365, mRNA-1468, mRNA-1574, mRNA-1608, mRNA-1644, mRNA-1647, mRNA-1653, mRNA-1893, mRNA2752, mRNA-3139, mRNA-3283, mRNA-3351, mRNA-3705, mRNA-3745, mRNA-3927, mRNA-4157, mRNA-4359, mRNA-5671, mRNA-6981, 및 VX-522로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, mRNA는 mRNA-1045, mRNA-1230, mRNA-1345, mRNA-1365, EBV mRNA-1189, mRNA-1195, mRNA-1647, BNT162b2, LUNAR-COV19, mRNA-1073, mRNA-1273.213, mRNA-1273.214, mRNA-1273.222, mRNA-1273.351, mRNA-1273.529, mRNA-1273.617, mRNA-1283, mRNA-1287, mRNA-1345, BNT161, mRNA-1468, BNT113, 및 mRNA-1893으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, mRNA는 mRNA-1045, mRNA-1230, mRNA-1345, mRNA-1365, BNT162b2, LUNAR-COV19, mRNA-1073, mRNA-1273.213, mRNA-1273.214, mRNA-1273.222, mRNA-1273.351, mRNA-1273.529, mRNA-1273.617, mRNA-1283, mRNA-1287, mRNA-1345, BNT161, 및 LUNAR-FLU로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0301] 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 산물은 아주반트이다. 한 실시양태에서, 아주반트는 CpG 올리고뉴클레오티드이다. 한 실시양태에서, 아주반트는 CpG1018 또는 CpG7909이다.
- [0302] 실시양태에서, 산물은 치료 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드이다.
- [0303] 실시양태에서, 방법은 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 생산할 수 있으며, 여기서 2개의 상보적 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생산된 다음, 어닐링을 허용하는 조건 하에 혼합되며, 이러한 조건은 통상의 기술자에게 용이하게 명백하다. 한 실시양태에서, 산물은 siRNA이다. 한 실시양태에서, siRNA는 ALN-AAT02, ALN-APP, ALN-TTRsc04, ALN-HBV02, ALN-HSD, ALN-KHK, ALN-PNP, ARO-AAT, ARO-ANG3, AOC 1001, AOC 1020, AOC 1044, ARO-APOC3, ARO-C3, ARO-COV, ARO-DUX4, ARO-ENaC2, ARO-MUC5AC, ARO-MMP7, ARO-PNPLA3, ARO-RAGE, 벨세시란, 썬디시란, 코스도시란, 다플루시란, DCR-AUD, DCR-CM3, DCR-CM4, DCR-COMP1, DCR-COMP2, DCR-LIV2, DCR-LLY11, DCR-LLY12, DCR-NOV01, DCR-NOV02, 엘레브시란, 파지르시란, 피투시란, 기보시란, HZN-457, 인클리시란, JNJ-3989, 루마시란, LY3561774, LY3819469, 네도시란, 올파시란, 파티시란, 레부시란, RG6346, RIM730, SLN124, SLN501, SLN-HAN-1, SLN-MNK-2, SLN-MNK-3, SLN-AZ-1, SLN-AZ-2, STP122G, STP125G, STP135G, STP136G, STP144G, STP145G, STP146G, STP152G, STP155G, STP237G, STP247G, STP251G, STP355, STP369, STP702, STP779, STP705, STP707, 테프라시란, 티바니시란, 부트리시란, 제를라시란, 질레베시란, 및 지프카시란으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 산물은 miRNA 또는 miRNA 모방체이다. 한 실시양태에서, miRNA 모방체는 램라르센이다.
- [0304] 본원에 개시된 본 발명은 올리고뉴클레오티드 결합의 특성을 이용하여 그의 개선된 생산 방법을 제공한다. 표적 서열에 대해 100% 상보성을 갖는 주형 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 산물이 특정 조건 하에 방출 및 분리될 수 있도록 반응 조건을 제어함으로써, 고도의 순도를 갖는 산물을 수득할 수 있다.
- [0305] 산물 (또는 불순물): 주형 듀플렉스를 변성시키고 주형으로부터 산물 (또는 불순물)을 분리함
- [0306] 주형으로부터 산물 (또는 임의의 불순물)을 방출하는 것은 주형 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 가닥과 파단될 산물 (또는 불순물) 사이의 왓슨-크릭 염기 쌍형성을 필요로 한다 (즉, 듀플렉스를 변성시킴). 이어서, 산물 (또는 불순물)을 주형으로부터 분리할 수 있으며, 이는 2개의 개별 단계로서, 또는 1개의 조합 단계로서 일어날 수 있다.
- [0307] 방법이 칼럼 반응기에서 수행되는 경우, 산물 (또는 불순물)의 방출 및 분리는 1개의 단계로서 일어날 수 있다. pH 또는 염 농도를 변경시키거나 또는 염기 쌍형성을 파괴하는 화학적 작용제 (예컨대 포름아미드 또는 우레아)를 함유하는 완충제 중에서의 실행은 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 가닥의 변성을 유발할 것이고, 산물 (또는 불순물)은 완충제 중에서 용리될 것이다.
- [0308] 방법이 다른 반응 용기에서 수행되는 경우에, 산물 (또는 불순물)의 방출 및 분리는 2-단계 방법으로서 일어날 수 있다. 먼저, 왓슨-크릭 염기 쌍을 파괴하여 가닥을 변성시킨 다음, 산물 (또는 불순물)을 주형으로부터 분리하고, 예를 들어 반응 용기로부터 제거한다. 산물의 방출 및 분리가 2-단계 방법으로 수행되는 경우에, 왓슨-크릭 염기 쌍의 파단은 완충제 조건 (pH, 염)을 변경시킴으로써 또는 화학적 파괴제 (포름아미드, 우레아)를 도입함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 온도를 상승시키는 것은 또한 2개의 가닥의 해리, 즉 변성을 유발

할 것이다. 이어서, 산물 (또는 불순물)을 분자량-기반 분리, 전하-기반 분리, 소수성-기반 분리, 특이적 서열-기반 분리 또는 이들 방법의 조합을 포함한 방법을 통해 분리 (및 또한 원하는 경우에 반응 용기로부터 제거) 할 수 있다.

[0309] 방법이 연속식 또는 반연속식 유동 반응기에서 수행되는 경우에, 산물 (또는 불순물)의 방출 및 분리는 1 단계 또는 2 단계로 수행될 수 있다. 예를 들어, 1 단계로 산물 (또는 불순물)을 방출 및 분리하는 것은 온도를 증가시켜 2개의 가닥의 해리를 유발하고, 방출된 가닥을 온도를 상승시키는 데 사용된 반응기의 동일한 부분에서 분자량을 기준으로 분리함으로써 영향을 받을 수 있다. 2 단계로 산물 (또는 불순물)을 방출 및 분리하는 것은 반응기의 한 부분에서 온도를 증가시켜 2개의 가닥의 해리를 유발하고 반응기의 상이한 부분에서 분자량을 기준으로 방출된 가닥을 분리함으로써 영향을 받을 수 있다.

[0310] 불순물을 주형으로부터 특이적으로 방출 및 분리하되, 산물은 주형 상에 잔류시킴

[0311] 부정확한 뉴클레오티드가 쉘 연장 동안 올리고뉴클레오티드 가닥 내로 혼입되는 경우 또는 쉘 연장 반응이 조기에 종결되는 경우에 불순물이 발생한다. 불순물은 또한, 반응이 절편 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 라이게이션시키는 단계를 포함하고 라이게이션 단계 중 1개 이상이 일어나는 데 실패한 경우에 발생한다.

[0312] 왓슨-크릭 염기 쌍형성의 특성은 산물의 방출 전에 주형에 결합된 임의의 불순물을 특이적으로 방출하는 데 이용될 수 있다. 각각의 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 특이적 조건 하에 해리될 것이고, 그러한 조건은 100% 상보성을 갖는 서열과 비교하여 100% 상보성을 갖지 않는 서열에 대해 상이하다. 이러한 조건을 결정하는 것은 통상의 기술자의 이해 범위 내에 있다.

[0313] 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 변성시키는 통상의 방식은 온도를 상승시키는 것이다. 염기 쌍의 절반이 해리되는, 즉 듀플렉스의 50%가 단일 가닥 상태로 존재하는 온도는 용융 온도, T_m 으로 불린다. 용융 온도를 결정하는 가장 신뢰성 있고 정확한 수단은 실험적 수단이다. 그러나, 이는 번거롭고, 통상적으로 필요하지 않다. 여러 식을 사용하여 T_m 값을 계산할 수 있고 (Nucleic Acids Research 1987, 15 (13): 5069-5083; PNAS 1986, 83 (11): 3746-3750; Biopolymers 1997, 44 (3): 217-239), 시약 공급업체 및 대학교에 의해 호스팅된 온-라인에서 수많은 용융 온도 계산기를 찾아볼 수 있다. 주어진 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 서열에 대해, 모든 포스포로티오에이트 연결을 갖는 변이체는 모든 포스포디에스테르 연결을 갖는 변이체보다 더 낮은 온도에서 용융될 것으로 공지되어 있다. 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에서 포스포로티오에이트 연결의 수를 증가시키는 것은 그의 의도된 표적에 대한 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 T_m 을 낮추는 경향이 있다.

[0314] 반응 혼합물로부터 불순물을 특이적으로 분리하기 위해, 먼저 산물:주형 듀플렉스의 용융 온도를 계산한다. 이어서, 반응 용기를 제1 온도, 예를 들어 산물:주형 듀플렉스의 용융 온도보다 낮은 온도, 예를 들어 용융 온도보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10°C 낮은 온도로 가열한다. 이러한 가열 단계는 주형으로부터 산물이 아닌, 즉 주형에 대해 100% 상보성이 아닌 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 변성을 유발한다. 이어서, 이들 변성된 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 상기 개시된 방법 중 1종, 예를 들어 분자량-기반 분리, 전하-기반 분리, 소수성-기반 분리, 특이적 서열-기반 분리 또는 이들 방법의 조합을 사용하여 반응 용기로부터 제거할 수 있다. 이어서, 반응 용기를 제2의 보다 높은 온도, 예를 들어 계산된 용융 온도보다 높은 온도, 예를 들어 용융 온도보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10°C 높은 온도로 상승시켜, 주형으로부터 산물의 변성을 유발할 것이다. 이어서, 산물을 상기 개시된 방법 중 1종, 예를 들어 분자량-기반 분리, 전하-기반 분리, 소수성-기반 분리, 특이적 서열-기반 분리 또는 이들 방법의 조합을 사용하여 분리 (및 반응 용기로부터 제거)할 수 있다.

[0315] 파괴제가 pH 또는 염 농도의 변화를 유발하는 작용제이거나 또는 화학적 파괴제인 경우에 유사한 방법이 사용될 수 있다. 파괴제를 산물이 해리되는 농도 바로 아래까지 농도를 증가시켜, 주형으로부터 산물이 아닌 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 변성을 유발한다. 이어서, 이들 불순물을 상기 개시된 방법 중 1종을 사용하여 반응 용기로부터 제거할 수 있다. 이어서, 파괴제의 농도를 산물이 주형으로부터 해리되는 농도 초과로 증가시킨다. 이어서, 산물을 상기 개시된 방법 중 1종을 사용하여 반응 용기로부터 제거할 수 있다.

[0316] 상기 개시된 바와 같은 방법으로부터 수득된 산물은 추가의 정제 단계의 필요 없이 높은 정도의 순도를 갖는다. 예를 들어, 수득된 산물은 95% 초과로 순수하다.

[0317] 주형의 특성

- [0318] 일부 실시양태에서, 주형은 산물이 제거될 때 주형이 반응 용기 내에 잔류되도록 하는 특성을 가질 수 있어서, 그것이 산물 중의 불순물이 되는 것을 방지할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 이러한 잔류는 주형을 지지체 물질에 커플링시키는 것에 의해 달성된다. 이러한 커플링은 높은 분자량을 갖는 주형-지지체 복합체를 생성하고, 따라서 불순물 및 산물이 예를 들어 여과에 의해 제거될 때 반응 용기 내에 잔류될 수 있다. 주형은 고체 지지체 물질, 예컨대 중합체 비드, 섬유성 지지체, 막, 스트렙타비딘 코팅된 비드 및 셀룰로스에 커플링될 수 있다. 주형은 또한 가용성 지지체 물질, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 가용성 유기 중합체, DNA, 단백질, 덴드리머, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 및 탄수화물에 커플링될 수 있다.
- [0319] 각각의 지지체 물질은 주형이 부착될 수 있는 다수의 지점을 가질 수 있고, 각각의 부착 지점은 부착된 다수의 주형을 가질 수 있다.
- [0320] 주형은 지지체 물질에 부착되지 않고 그 자체가 고분자량일 수 있고, 예를 들어 도 2에 제시된 방식으로, 예를 들어 링커에 의해 분리된, 다중 카피의 주형을 갖는 분자일 수 있다.
- [0321] 주형이 반응 용기 내에 잔류하는 능력은 또한, 주형이 회수됨으로써 또는 연속식 또는 반연속식 유동 방법에서의 사용에 의해 후속 반응을 위해 재순환되도록 한다. 이는, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드 생산, 예컨대 캡머 생산, 및 치료 mRNA 생산에 유용하다.
- [0322] 주형의 특성은 주형 및 산물의 분리, 또는 주형 결합된 산물 및 불순물의 분리를 가능하게 할 수 있다. 분자량-기반 분리, 전하-기반 분리, 소수성-기반 분리, 특이적 서열-기반 분리 또는 이들 방법의 조합이 사용될 수 있다.
- [0323] 주형이 고체 지지체에 부착되는 경우에, 산물로부터 주형의 분리 또는 주형에 결합된 산물로부터 불순물의 분리는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백한 바와 같이 적절한 조건 하에 고체 지지체를 세척함으로써 달성된다. 주형이 가용성 지지체에 커플링되거나 또는 그 자체가 반복 주형 서열로 구성된 경우에, 산물로부터의 주형의 분리 또는 불순물로부터의 주형 결합된 산물의 분리는 분자량-기반 분리에 의해, 예를 들어 보다 큰 분자는 필터에 의해 잔류되고 보다 작은 분자는 통과하도록 필터 물질을 선택한 한외여과 또는 나노여과와 같은 기술을 사용함으로써 달성될 수 있다. 주형 산물 복합체로부터 불순물의 단일 분리 단계 또는 주형으로부터 산물의 분리가 충분히 효율적이지 않은 경우에, 분리 효율을 증가시키고, 이에 따라 목적하는 순도를 충족시키는 산물을 생성하기 위해 다수의 순차적 여과 단계가 사용될 수 있다.
- [0324] 산업적 생산 규모에서 효율적이고 적용가능한 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 분리 방법을 제공하는 것이 바람직하다. 문헌 ["Therapeutic oligonucleotides: The state of the art in purification technologies" Sanghvi et al., Current Opinion in Drug Discovery (2004) Vol. 7 No. 8]은 올리고뉴클레오타이드 정제를 위해 사용되는 방법을 검토한다.
- [0325] WO 01/55160 A1은 오염물과 이민 연결을 형성한 후, 크로마토그래피 또는 다른 기술에 의해 이민-연결된 불순물을 제거함으로써 올리고뉴클레오타이드를 정제하는 것을 개시한다. 문헌 ["Size Fractionation of DNA Fragments Ranging from 20 to 30000 Base Pairs by Liquid/Liquid chromatography" Muller et al., Eur. J. Biochem (1982) 128-238]은 뉴클레오타이드 서열의 분리를 위해 PEG/덱스트란 상이 침착되어 있는 미세결정질 셀룰로스의 고체 칼럼의 사용을 개시한다. 문헌 ["Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction chromatography." Easter et al., The Analyst (2010); 135(10)]은 고체 실리카 지지체 상을 이용하는 HPLC의 변형을 사용한 올리고뉴클레오타이드의 분리를 개시한다. 문헌 ["Fractionation of oligonucleotides of yeast soluble ribonucleic acids by countercurrent distribution" Doctor et al., Biochemistry (1965) 4(1) 49-54]은 건조 DEAE-셀룰로스로 패킹된 건조 고체 칼럼의 사용을 개시한다. 문헌 ["Oligonucleotide composition of a yeast lysine transfer ribonucleic acid" Madison et al.; Biochemistry, 1974, 13(3)]은 뉴클레오타이드 서열의 분리를 위한 고체 상 크로마토그래피의 사용을 개시한다.
- [0326] 액체-액체 크로마토그래피는 공지된 분리 방법이다. 문헌 ["Countercurrent Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase" Billardello, B.; Berthod, A; Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry 38; Berthod, A., Ed.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam (2002) pp 177-200]은 액체-액체 크로마토그래피의 유용한 일반적 설명을 제공한다. 다양한 액체-액체 크로마토그래피 기술이 공지되어 있다. 하나의 이러한 기술은 액체-액체 향류 크로마토그래피 (본원에서 "CCC"로 명명됨)이다. 또 다른 공지된 기술은 원심분리 분배 크로마토그래피 (본원에서 "CPC"로 명명됨)이다.
- [0327] 상기 개시된 방법 및 WO 2013/030263에 제시된 그러한 방법은 산물 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드

를 예를 들어 주형 및/또는 불순물로부터 분리하는 데 사용될 수 있다.

[0328] 폴리머라제

[0329] 실시양태에서, 사용되는 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제 또는 그의 조합일 수 있다. 폴리머라제는 돌연변이체 폴리머라제일 수 있다. 폴리머라제는 조작된 폴리머라제일 수 있다. 폴리머라제는 데옥시리보뉴클레오타이드와 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드와 리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드와 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드와 리보뉴클레오타이드의 연결을 촉매할 수 있다. 폴리머라제는 가닥-대체 활성이 결여될 수 있다. 폴리머라제는 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여될 수 있다. 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성의 결여는 스톱퍼의 파괴를 방지할 수 있다. 폴리머라제는 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성을 가질 수 있다. 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성은 전형적으로 폴리머라제가 오혼입된 뉴클레오타이드를 제거할 수 있게 하여 높은 충실도 합성을 보장한다. 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성은 교정 능력으로 공지될 수 있다. 폴리머라제는 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여될 수 있다. 상이한 폴리머라제 특성은 필요에 따라 조합될 수 있으며, 예를 들어 폴리머라제는 가닥-대체 활성이 결여될 수 있고/거나 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여될 수 있고/거나 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 폴리머라제는 가닥-대체 활성이 결여될 수 있고/거나 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여될 수 있고/거나 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여될 수 있다. 폴리머라제는 DNA 및/또는 RNA 폴리머라제를 포함할 수 있다. 폴리머라제는 DNA-의존성 DNA 폴리머라제 (즉, DNA 주형을 사용하여 DNA를 합성하는 폴리머라제)일 수 있다. 폴리머라제는 DNA-의존성 RNA 폴리머라제 (즉, DNA 주형을 사용하여 RNA를 합성하는 폴리머라제)일 수 있다. DNA 폴리머라제는 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드를 연결할 수 있다. RNA 폴리머라제는 리보뉴클레오타이드 및/또는 데옥시리보뉴클레오타이드를 연결할 수 있다. 폴리머라제는 프라이머 연장 폴리머라제일 수 있다. DNA 폴리머라제는 프라이머 연장 폴리머라제일 수 있다. RNA 폴리머라제는 프라이머 연장 폴리머라제일 수 있다. DNA 및/또는 RNA 폴리머라제는 야생형 폴리머라제일 수 있다. DNA 및/또는 RNA 폴리머라제는 돌연변이체 DNA 및/또는 RNA 폴리머라제일 수 있다. DNA 및/또는 RNA 폴리머라제는 조작된 DNA 및/또는 RNA 폴리머라제일 수 있다. 폴리머라제는 변형된 뉴클레오타이드를 연결할 수 있다. DNA 및/또는 RNA 폴리머라제는 변형된 뉴클레오타이드를 연결할 수 있다. 폴리머라제는 주형 가닥을 따라 적어도 1개의 서열 갭을 충전시킬 수 있다. 폴리머라제는 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 풀을 사용하여 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시킬 수 있다. DNA 폴리머라제는 전형적으로 프라이머 및 주형을 필요로 한다. 예시적인 폴리머라제는 야생형 에스케리키아 파지 T7 폴리머라제, 야생형 스폴로부스 스파타리쿠스 폴리머라제, 돌연변이체 써모코쿠스 종 (균주 90N-7) 폴리머라제, 야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제, 야생형 써무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 및 야생형 써모코쿠스 코다카렌스 폴리머라제를 포함한다.

[0330] 비변형된 뉴클레오타이드를 또 다른 비변형된 뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 폴리머라제, 비변형된 뉴클레오타이드를 변형된 뉴클레오타이드에 (즉, 변형된 5' 뉴클레오타이드를 비변형된 3' 뉴클레오타이드에, 및/또는 비변형된 5' 뉴클레오타이드를 변형된 3' 뉴클레오타이드에) 연결할 수 있는 폴리머라제, 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오타이드를 또 다른 변형된 뉴클레오타이드에 연결할 수 있는 폴리머라제가 본 개시내용의 범주 내에 있다. 폴리머라제는 비변형된 뉴클레오타이드를 또 다른 비변형된 뉴클레오타이드에 연결할 수 있다. 각각의 비변형된 뉴클레오타이드는 후속적으로 변형될 수 있다. 뉴클레오타이드의 변형의 예는 본원에 개시되어 있고, 변형된 당 모이어티, 핵염기의 변형, 백본의 변형, 1개 이상의 우라실 잔기의 치환 및 그의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된 변형을 포함한다.

[0331] 추가적으로, 변형된 뉴클레오타이드를 혼입시킬 수 있는 예시적인 조작된 DNA 및 RNA 폴리머라제는 문헌 ["Engineering and application of polymerases for synthetic genetics", Houlihan et al., Current Opinion in Biotechnology 2017, 48; 168-179]에 개시된 것을 포함한다.

[0332] 실시양태에서, DNA 및/또는 RNA 폴리머라제는, 임의로 E664K 및 Y409G의 돌연변이를 포함하는 써모코쿠스 고르고나리우스 복제 DNA 폴리머라제의 폴리머라제 섬 서브도메인에 돌연변이를 갖는 폴리머라제를 포함하여, 2' 당 변형을 수용하도록 조작될 수 있다. 이러한 폴리머라제는, 예를 들어 DNA, RNA, 잠금 핵산, 또는 2'-OMe RNA 변형된 뉴클레오타이드, 또는 그의 조합으로부터 프라이밍된 슈도우리딘, 5-메틸-C, 2'-플루오로, 또는 2'-아지디오-변형된 NTP의 포함을 제공한다.

[0333] 실시양태에서, 2' 당 변형을 수용하도록 조작된 RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제를 포함한다. 예를 들어 Y639F의 돌연변이를 포함하는 T7 RNA 폴리머라제는, 예를 들어 2' 플루오로 피리미딘 및 2' 아미노 피리미딘의 포함을 제공할 수 있다.

- [0334] 실시양태에서, 2' 당 변형을 수용하도록 조작된 Taq 폴리머라제의 스톱 펄스 단편의 변이체 (SM19)가 사용된다. 예를 들어, 614에서의 음으로 하전된 아미노산의 도입 및 E615G의 돌연변이는 2' 당 변형의 포함을 제공한다. SM19는 폴리머라제 SFM4-3 및 SFM4-9로 추가로 진화될 수 있다. 예를 들어, SFM4-3은 완전히 변형된 2'-OMe 60 뉴클레오타이드 서열을 전사할 수 있다.
- [0335] 실시양태에서, 2' 당 변형을 수용하도록 조작된 해양 시아노박지 Syn5로부터의 고온성 RNA 폴리머라제가 사용된다.
- [0336] 실시양태에서, Y409G, I521L, F545L, 및 E664K의 돌연변이를 포함하는 Tgo 폴리머라제가 사용되며, 이는 3'-테옥시- 또는 3'-OMe 뉴클레오타이드의 혼입에 의해 위치이성질체 2'-5' 연결을 갖는 DNA 및 RNA를 합성할 수 있다.
- [0337] 구획화된 자기-복제 방법은 변형된 뉴클레오타이드를 혼입하도록 폴리머라제를 진화시키는 데 유용하다. 문헌 ["Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication", Ghadessy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001, 98:4552-4557]은 예시적인 구획화된 자기-복제 방법을 기재한다.
- [0338] 리가제
- [0339] 실시양태에서, 리가제는 ATP 의존성 리가제일 수 있다. ATP 의존성 리가제는 크기가 30 내지 >100kDa 범위이다. 실시양태에서, 리가제는 NAD 의존성 리가제일 수 있다. NAD 의존성 효소는 고도로 상동성이고, 60 내지 90 kDa, 임의로 70-80 kDa의 단량체 단백질이다. 실시양태에서, 리가제는 열안정성 리가제일 수 있다. 열안정성 리가제는 고온성 박테리아로부터 유래될 수 있다.
- [0340] 실시양태에서, 리가제는 주형-의존성 리가제일 수 있다. 실시양태에서, 라이게이션은 주형 상에서 일어난다. 실시양태에서, 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시키는 것은 주형 상에서 리가제를 사용하여 일어나며, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 형성된다. 실시양태에서, 리가제는 듀플렉스-작용 리가제일 수 있다. 듀플렉스는 듀플렉스 DNA일 수 있다. 듀플렉스는 RNA:DNA 하이브리드 듀플렉스일 수 있다. 듀플렉스는 듀플렉스 RNA일 수 있다. 리가제는 DNA 리가제일 수 있다. 리가제는 RNA 리가제일 수 있다.
- [0341] 실시양태에서, 리가제는 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드의 연결을 촉매할 수 있다. 실시양태에서, 리가제는 2개의 절편 올리고뉴클레오타이드의 연결을 촉매할 수 있다. 리가제는 자연 발생 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 및 자연 발생 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드의 연결을 촉매할 수 있다. 리가제는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 및 자연 발생 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드의 연결을 촉매할 수 있다. 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드는 연결부의 3' 단부에 위치할 수 있다. 자연 발생 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드는 연결부의 5' 단부에 위치할 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드는 연결부에 위치할 수 있거나 또는 위치하지 않을 수 있으며, 즉 접합부 뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 다는 변형된 뉴클레오타이드이거나 또는 어느 것도 변형된 뉴클레오타이드가 아니다. 리가제는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 및 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드의 연결을 촉매할 수 있다. 통상의 기술자는 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 내의 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드의 위치가 라이게이션 효율을 증가시키도록 적합화될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0342] 리가제는 야생형 리가제일 수 있다. 리가제는 돌연변이체 리가제일 수 있다. 리가제는 조작된 리가제일 수 있다. DNA 및/또는 RNA 리가제는 야생형 DNA 및/또는 RNA 리가제일 수 있다. DNA 및/또는 RNA 리가제는 돌연변이체 DNA 및/또는 RNA 리가제일 수 있다. DNA 및/또는 RNA 리가제는 조작된 DNA 및/또는 RNA 리가제일 수 있다. 통상의 기술자는 라이게이션을 필요로 하는 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상기 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드 내의 변형의 수 및/또는 유형 및/또는 위치에 기초하여 적절한 리가제가 선택될 수 있다는 것을 인지할 것이다.
- [0343] 예시적인 리가제는 야생형 엔테로박테리아 파지 T3 리가제 및 야생형 박테리오파지 T4 DNA 리가제를 포함한다.
- [0344] 실시양태에서, 리가제는 예를 들어 비드 상에 고정될 수 있다.

- [0345] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 풀
- [0346] 본 개시내용의 방법의 "폴리뉴클레오타이드의 풀"을 생성하는 데 사용되는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 산물 서열의 적어도 2개의 절편을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법의 풀을 생성하는 데 사용되는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 산물 서열의 적어도 2개의 상이한 절편을 포함할 수 있다. 산물 서열의 적어도 2개의 절편은 서열상 상이할 수 있다. 적어도 2개의 절편은 각각 산물 서열의 상이한 영역에 상응한다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 풀은 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함한다.
- [0347] 따라서, 풀은 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 비-균질 세트이다. 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 서열상 상이하고, 표적 서열보다 더 짧을 수 있으며, 표적 서열과 동일한 서열을 갖지 않을 수 있다.
- [0348] 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 효소적 합성, 화학적 합성, 임의로 고체-지지된 합성 또는 용액-상 합성 또는 그의 조합에 의해 생산될 수 있다. 효소적 합성은 단일 가닥 리가제, 트랜스퍼라제, 폴리머라제 또는 그의 조합을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0349] 다른 예에서, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 중 1개 이상 또는 모두는 화학적 합성을 사용하여 생산될 수 있다. 다른 예에서, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 중 1개 이상 또는 모두는 효소적 합성, 예를 들어 폴리머라제, 단일 가닥 리가제 또는 트랜스퍼라제, 또는 그의 조합의 사용과 조합하여 화학적 합성을 사용하여 생산될 수 있다. 다른 예에서, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 중 1개 이상 또는 모두는 절편 올리고뉴클레오타이드 중 1개 이상을 생산하기 위해 폴리머라제의 사용과 조합하여 화학적 합성, 단일 가닥 리가제 및/또는 트랜스퍼라제를 사용하여 생산될 수 있다. 다른 예에서, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 중 1개 이상 또는 모두는 완전 효소적 합성 방법으로 단일 가닥 리가제, 트랜스퍼라제, 폴리머라제, 또는 그의 조합을 사용하여 생산될 수 있다. 단순화된 방법으로, 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 중 2개 이상 또는 모두의 풀의 생산을 위해 단일 가닥 리가제 및 폴리머라제가 완전 효소적 방법으로 사용될 수 있다.
- [0350] 올리고뉴클레오타이드 생산의 예에서, 올리고뉴클레오타이드의 풀은 화학적 합성 및/또는 효소적 합성을 사용하여 (예를 들어 단일 가닥 리가제, 트랜스퍼라제 및/또는 폴리머라제를 사용하여) 생산되고, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드; 및 화학적 합성 및/또는 효소적 합성을 사용하여 (예를 들어 단일 가닥 리가제, 트랜스퍼라제 및/또는 폴리머라제를 사용하여) 생산되고, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 상이한 3'-절편 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0351] 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 프라이머로서 작용할 수 있다. 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 스톱퍼로서 작용할 수 있다. 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 프라이머 및 스톱퍼로서 작용할 수 있다. 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 프라이머 및 스톱퍼로서 작용할 수 있으며, 여기서 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 양쪽에는 서열 갭이 존재한다.
- [0352] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 임의의 방법에서, 적어도 3개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 40개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드는 적어도 5개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 임의로 뉴클레오타이드 중 1개 이상은 변형된 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드에서 변형된 뉴클레오타이드는 슈도우리딘,

N1-메틸슈도우리딘, 5-Me, 2'-F, 2'OMe 또는 2'MOE이다.

[0353] 한 실시양태에서, 적어도 3개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 40개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 5 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드는 적어도 5개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드는 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 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 임의로 뉴클레오타이드 중 1개 이상은 변형된 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드에서 변형된 뉴클레오타이드는 슈도우리딘, N1-메틸슈도우리딘, 5-Me, 2'-F, 2'OMe 또는 2'MOE이다.

[0354] 한 실시양태에서, 3 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드와 함께, 3 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드와 함께, 3 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 5 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드와 함께, 5 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 5 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 스톱퍼 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드와 함께, 5 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 프라이머 절편 올리고뉴클레오타이드인 절편 올리고뉴클레오타이드가 제공될 수 있다.

[0355] 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 효소적 생산

[0356] 1) 폴리머라제

[0357] 폴리머라제는 짧은 올리고뉴클레오타이드 (프라이머)의 단부 뉴클레오타이드의 3'-히드록실 기를 첨가되는 뉴클레오타이드의 5'-포스페이트에 주형 의존성 방식으로 연결하는 것을 촉매할 수 있다. 첨가되는 뉴클레오타이드 (즉, 뉴클레오타이드 트리스포스페이트의 풀 내의 뉴클레오타이드 트리스포스페이트)는 비-변형된 것, 즉 자연 발생된 것일 수 있거나, 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 것일 수 있다. 별도의 주형 및 프라이머가 사용될 수 있거나 또는 자기-프라이밍 주형이 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 후속적으로 변형되거나 또는 추가로 변형될 수 있다.

[0358] 2) 단일 가닥 리가제, 예를 들어 RNA 리가제

[0359] 단일 가닥 리가제는 짧은 올리고뉴클레오타이드 (프라이머)의 3'-OH에 대한, 예를 들어 3',5' 뉴클레오타이드 비스포스페이트, 3',5' 뉴클레오타이드 티오포스페이트 (예를 들어, 3',5' 비스티오포스페이트 또는 3'-포스페이트-5'-티오포스페이트 또는 3'-티오포스페이트-5'-포스페이트) 또는 3',5' 뉴클레오타이드 디티오포스페이트 (예를 들어, 3',5' 비스티디오포스페이트 또는 3'-포스페이트-5'-디티오포스페이트 또는 3'-디티오포스페이트-5'-포스페이트)의 ATP 구동된 첨가를 주형-비의존성 방식으로 촉매한다. 통상의 기술자는 당 분야에서의 3' 위치에서 디포스페이트 (또는 디티오포스페이트) 또는 트리포스페이트 (또는 1개 이상의 산소 원자가 황에 의해 치환된 다른 올리고포스페이트)가 또한 사용될 수 있지만, 추가의 포스페이트 (또는 티오포스페이트) 모이어티가 요구되지는 않는다는 것을 인지할 것이다. 동등하게 변형된 디뉴클레오타이드, 트리뉴클레오타이드 또는 테트라뉴클레오타이드가 상기 언급된 개별 뉴클레오타이드 대신 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 통상적으로 최소 3개 뉴클레오타이드 길이이다. 이러한 첨가 반응의 결과인 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 출발 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드보다 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 길다 (또는 디뉴클레오타이드, 트리뉴클레오타이드 또는 테트라뉴클레오타이드가 사용된 경우, 각각 출발 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드보다 2, 3 또는 4개의 뉴클레오타이드만큼 더 길다). 도입된 뉴클레오타이드는 비-변형된 것, 즉 자연 발생된 것일 수 있거나, 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 것일 수 있다. 이제 새로운 3' 위치가 인산화된다. 후속 뉴클레오타이드를 첨가하기 위해, 성장하는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 3' 포스페이트를 가수분해에

의해 제거하여 3'-OH를 생성한다. 이러한 가수분해는 전형적으로 포스파타제 효소를 사용하여 수행된다.

[0360] 예를 들어, 단일 가닥 리가제는 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 방법에 사용될 수 있으며, 여기서 단일 가닥 리가제를 사용하는 방법은 2-단계 반응: 첨가 및 탈보호를 포함하는 절편 합성을 위한 3'-연장을 포함한다. 예시적인 첨가 단계는 단일 가닥 핵산 프라이머의 3'-OH에 대한 뉴클레오타이드-3',5'-비스(티오)포스페이트의 ATP 의존성 라이게이션 및 이어서 포스파타제에 의한 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 상의 3'-포스페이트의 탈보호를 수반한다. 또 다른 예에서, 단일 가닥 리가제는 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 방법에 사용될 수 있으며, 여기서 방법은 절편 서열을 생산하기 위한 예시적인 3'-연장 (첨가 및 탈보호)에 이어서 절편을 방출시키기 위한 부위-특이적 뉴클레아제 (예를 들어 엔도뉴클레아제 V - 이노신 다음에, 즉 이노신에 대해 3'의 제2 포스포디에스테르 결합에서 1개의 염기를 절단함)를 사용한 쇠 절단을 포함한다.

[0361] 3) 트랜스퍼라제

[0362] 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 (TdT) 효소는, 예를 들어 3'-O-아지도메틸, 3'-아미녹시 또는 3'-O-알릴기에 의해 보호된 3'-보호된 뉴클레오타이드 트리포스페이트가 짧은 올리고뉴클레오타이드 (프라이머)의 3'-OH에 첨가되는 것을 주형-비의존성 방식으로 촉매한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 통상적으로 최소 3개의 뉴클레오타이드 길이이다. 도입된 뉴클레오타이드는 비-변형된 것, 즉 자연 발생된 것일 수 있거나, 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 것일 수 있다.

[0363] 적합한 방법은, 예를 들어 EP2796552, US8808989, WO16128731 A1 및 WO16139477 A1에 제시되어 있다.

[0364] 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 상기 기재된 방법에서 사용되는 프라이머 올리고뉴클레오타이드는

[0365] (1) 원하는 경우에 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 일부로서 잔류될 수 있거나, 또는

[0366] (2) 목적하는 산물의 분리를 허용하고 추가의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위한 재순환의 가능성을 허용하도록 산물 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드로부터 절단될 수 있다. 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드로부터의 프라이머의 절단은 절단이 효과적이면서 또한 정확하도록 서열 특이적 뉴클레아제 및 적절한 프라이머 및 절편 설계를 사용하여 수행될 수 있다.

[0367] 본 발명은 하기 조항에 의해 예시된다:

[0368] 1. 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 생산하는 방법으로서,

[0369] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0370] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 풀을 제공하는 단계;

[0371] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오타이드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오타이드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 주형 폴리뉴클레오타이드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드 사이에 적어도 1개의 서열 겹이 형성되는 것인 단계;

[0372] d) 뉴클레오타이드의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오타이드의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 겹을 충전시키는 단계;

[0373] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오타이드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 형성하는 단계;

[0374] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변성시키고, 불순물을 분리하는 단계; 및

[0375] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 변성시키고, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물을 분리하는 단계

[0376] 를 포함하는 방법.

[0377] 2. 조항 1에 있어서, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 것인 방법.

[0378] 3. 조항 1 또는 조항 2에 있어서, 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오타이드가 5' 포스페이트, 5' 포스포로티오에이트, 5' 포스포로디티오에이트 또는 5' 메틸포스포네이트를 포함하는 것인 방법.

- [0379] 4. 조항 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 단계 (d)에서 뉴클레오타이드의 풀이 (i) 천연 뉴클레오타이드; (ii) 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드 또는 (iii) 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 방법.
- [0380] 5. 조항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 변형, 핵염기의 변형 및/또는 백본의 변형을 포함하는 것인 방법.
- [0381] 6. 조항 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 2' 위치에서의 변형, 비시클릭 당 또는 4'-CH(CH₃)-O-2' 기, 또는 그의 조합을 포함하는 것인 방법.
- [0382] 7. 조항 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE, 또는 2'-아미노를 포함하는 것인 방법.
- [0383] 8. 조항 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 변형된 시토신, 5-메틸시토신, 5-메틸 피리미딘, 7-테아자구아노신 또는 무염기성 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 방법.
- [0384] 9. 조항 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트 또는 포스포로디티오에이트를 포함하는 것인 방법.
- [0385] 10. 조항 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시-우라실, 1-에틸-슈도우라실, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실, 5-메틸-시티딘, 5-메틸-시토신, N6-메틸아데노신 또는 7-메틸구아노신을 포함하는 것인 방법.
- [0386] 11. 조항 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 1-메틸-슈도우리딘을 포함하는 것인 방법.
- [0387] 12. 조항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드가 PMO, LNA, c-Et, PNA, BNA, 또는 L-리보핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0388] 13. 조항 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 단계 (e)에서 리가제가 각각의 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드의 3' 및/또는 5' 단부를 각각의 인접한 절편 폴리뉴클레오타이드 또는 인접한 연장된 절편 폴리뉴클레오타이드에 라이게이션시켜 산물 폴리뉴클레오타이드 가닥을 형성하는 것인 방법.
- [0389] 14. 조항 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 단계 (e)에서 리가제가 RNA를 RNA에, DNA를 DNA에, RNA를 DNA에 및/또는 DNA를 RNA에 라이게이션시킬 수 있는 것인 방법.
- [0390] 15. 조항 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 단계 (e)에서 리가제가 RNA 및/또는 DNA 리가제인 방법.
- [0391] 16. 조항 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 단계 (d)에서 폴리머라제가 가닥-대체 활성이 결여되어 있는 것인 방법.
- [0392] 17. 조항 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 단계 (d)에서 폴리머라제가 5'에서 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있는 것인 방법.
- [0393] 18. 조항 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 단계 (d)에서 폴리머라제가 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖거나 또는 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있는 것인 방법.
- [0394] 19. 조항 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 폴리머라제가 DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제인 방법.
- [0395] 20. 조항 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제가 조작된 또는 돌연변이체 DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제인 방법.
- [0396] 21. 조항 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 단계 a) 내지 g) 중 2개 이상이 공동으로 이루어지고, 임의로 단계 d) 및 e)가 공동으로 이루어지는 것인 방법.
- [0397] 22. 조항 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 단계 a) 내지 g) 중 2개 이상이 순차적으로 이루어지고, 임의로 단계 d) 및 e)가 순차적으로 이루어지는 것인 방법.
- [0398] 23. 조항 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 주형이 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물로부터 상기 주형이 분리되도록 하는 특성을 갖는 것인 방법.
- [0399] 24. 조항 23에 있어서, 주형이 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물로부터 분리되도록 하는 특성이, 주형이 지지체 물질에 부착된다는 것인 방법.

- [0400] 25. 조항 24에 있어서, 지지체 물질이 가용성 지지체 물질이고, 임의로 지지체 물질이 폴리에틸렌 글리콜, 가용성 유기 중합체, DNA, 단백질, 텐드리머, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0401] 26. 조항 24에 있어서, 지지체 물질이 불용성 지지체 물질이고, 임의로 지지체 물질이 유리 비드, 중합체 비드, 섬유성 지지체, 막, 스트렙타비딘 코팅된 비드, 셀룰로스 및 반응 벽으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 임의로 여기서 반응 벽은 반응 용기의 일부인 방법.
- [0402] 27. 조항 24 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 주형의 다중 반복 카피가 단일 부착 지점을 통해 연속식 방식으로 지지체 물질에 부착된 것인 방법.
- [0403] 28. 조항 23 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 주형이 산물로부터 분리되도록 하는 특성이, 주형의 분자량인 방법.
- [0404] 29. 조항 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, h) 주형을 재순환시키는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0405] 30. 조항 29에 있어서, i) 단계 a) 내지 g) 또는 단계 a) 내지 h)를 재순환된 주형을 사용하여 반복하는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0406] 31. 조항 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 반연속식 또는 연속식인 방법.
- [0407] 32. 조항 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 주형 폴리뉴클레오타이드가 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물에 상보적인 서열로 이루어진 것인 방법.
- [0408] 33. 조항 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 3 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 임의로 10 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 3 내지 15개 뉴클레오타이드 길이, 15 내지 20개 뉴클레오타이드 길이, 20 내지 25개 뉴클레오타이드 길이, 또는 20 내지 30개 뉴클레오타이드 길이인 방법.
- [0409] 34. 조항 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 20개 뉴클레오타이드 길이이고, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오타이드가
- [0410] (i) 7개 뉴클레오타이드 길이인 5' 절편 및 7개 뉴클레오타이드 길이인 3' 절편;
- [0411] (ii) 6개 뉴클레오타이드 길이인 5' 절편 및 6개 뉴클레오타이드 길이인 3' 절편;
- [0412] (iii) 5개 뉴클레오타이드 길이인 5' 절편 및 5개 뉴클레오타이드 길이인 3' 절편;
- [0413] (iv) 4개 뉴클레오타이드 길이인 5' 절편 및 4개 뉴클레오타이드 길이인 3' 절편; 또는
- [0414] (v) 3개 뉴클레오타이드 길이인 5' 절편 및 3개 뉴클레오타이드 길이인 3' 절편
- [0415] 을 포함하는 것인 방법.
- [0416] 35. 조항 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 캡머인 방법.
- [0417] 36. 조항 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 30 내지 20,000개 뉴클레오타이드 길이, 임의로 30 내지 10,000개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 5,000개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 1,000개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 500개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 400개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 300개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 200개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 100개 뉴클레오타이드 길이, 30 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 또는 30 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인 방법.
- [0418] 37. 조항 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 DNA 폴리뉴클레오타이드 산물, RNA 폴리뉴클레오타이드 산물, 또는 DNA 및 RNA 하이브리드 폴리뉴클레오타이드 산물인 방법.
- [0419] 38. 조항 37에 있어서, RNA 폴리뉴클레오타이드 산물이 mRNA인 방법.
- [0420] 39. 조항 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 산물이 그래프, 킬로그램 또는 그 초과 규모의 규모로 생산되고/거나 방법이 적어도 1 L의 반응 부피로 수행되는 것인 방법.
- [0421] 40. 조항 1 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 생성된 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 산물이 적어도 80% 순수하고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물이 적어도 90% 순수하고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물이 적어도 95% 순수하고, 임의로 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 산물이 적어도 98% 순수한 것인 방법.

- [0422] 41. 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법으로서, 조항 1 내지 40 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 2개의 상보적 단일 가닥 폴리뉴클레오티드를 어닐링을 허용하는 조건 하에 혼합하는 것인 방법.
- [0423] 42. 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드 잔기를 갖는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 방법으로서,
- [0424] a) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물에 상보적인 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- [0425] b) 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 풀을 제공하는 단계;
- [0426] c) 단계 (a)의 주형 폴리뉴클레오티드를 단계 (b)의 폴리뉴클레오티드의 풀과, 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드에 어닐링되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 단계이며, 여기서 적어도 2개의 절편 폴리뉴클레오티드 사이에 적어도 1개의 서열 갭이 형성되는 것인 단계;
- [0427] d) 뉴클레오티드의 풀 및 폴리머라제를 제공하고, 뉴클레오티드의 풀 및 폴리머라제를 사용하여 적어도 1개의 절편 폴리뉴클레오티드를 연장시켜, 적어도 1개의 서열 갭을 충전시키는 단계;
- [0428] e) 리가제를 사용하여 절편 폴리뉴클레오티드 및/또는 연장된 절편 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시켜 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 형성하는 단계;
- [0429] f) 임의로, 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 임의의 불순물을 변형시키고, 불순물을 분리하는 단계;
- [0430] g) 조건을 변화시켜 어닐링된 주형 및 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 변형시키고, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 분리하는 단계; 및
- [0431] h) 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 단계 a)에서의 주형으로서 사용하고, 단계 a) 내지 e)를 반복하여 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물을 생산하는 단계
- [0432] 를 포함하는 방법.
- [0433] 43. 조항 42에 있어서, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물이 정제되는 것인 방법.
- [0434] 44. 조항 41 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 산물이 siRNA인 방법.
- [0435] 45. 조항 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 폴리뉴클레오티드 산물이 치료 폴리뉴클레오티드 산물인 방법.
- [0436] 46. 조항 37 또는 38에 있어서, RNA 폴리뉴클레오티드 산물이 1종 이상의 번역원을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0437] 47. 조항 46에 있어서, 번역원이 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) 번역원, 엡스타인-바르 바이러스 당단백질 번역원, 시토메갈로바이러스 당단백질 번역원, 코로나바이러스 스파이크 폴리펩티드 번역원, 인플루엔자 바이러스 번역원, 수두 대상포진 바이러스 당단백질 번역원, 인간 유두종바이러스 16 (HPV16) E6 번역원, HPV 16 E7 번역원, 또는 플라비바이러스 번역원으로부터 선택된 것인 방법.
- [0438] 48. 조항 46 또는 47에 있어서, 번역원이 코로나바이러스 스파이크 단백질, 인플루엔자 항원, 및 RSV 항원, 예컨대 단백질 f 또는 단백질 g로부터 선택된 것인 방법.
- [0439] 실시예
- [0440] 약어
- [0441] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피
- [0442] LCMS 액체 크로마토그래피 질량 분광측정법
- [0443] SEC 크기 배제 크로마토그래피
- [0444] TEAA 트리에틸암모늄 아세테이트
- [0445] PO 포스포디에스테르
- [0446] PS 포스포티오에이트
- [0447] * 포스포티오에이트
- [0448] /3Phos/ 3' 포스포이트 기

[0449]	/5Phos/	5' 포스페이트 기
[0450]	/Me-dC/	5-메틸시토신
[0451]	/5Biosg/	5' 비오틴
[0452]	EDTA	에틸렌디아민테트라아세트산
[0453]	dATP	데옥시아데노신 트리포스페이트
[0454]	dCTP	데옥시시티딘 트리포스페이트
[0455]	dGTP	데옥시구아노신 트리포스페이트
[0456]	dTTP	데옥시티미딘 트리포스페이트
[0457]	dATP α S	2'-데옥시아데노신-5'-(α-티오)-트리포스페이트
[0458]	dCTP α S	2'-데옥시시티딘-5'-(α-티오)-트리포스페이트
[0459]	dGTP α S	2'-데옥시구아노신-5'-(α-티오)-트리포스페이트
[0460]	dTTP α S	2'-데옥시티미딘-5'-(α-티오)-트리포스페이트
[0461]	ATP	아데노신 트리포스페이트
[0462]	MgCl ₂	염화마그네슘
[0463]	트리스	2-아미노-2-(히드록시메틸)프로판-1,3-디올
[0464]	TBuAA	트리부틸암모늄 아세테이트
[0465]	2'MOE	2'-O-메톡시-에틸
[0466]	2'OMe	2'-O-메틸
[0467]	2'F	2' 플루오로
[0468]	LNA	잠금 핵산
[0469]	CTP	시티딘 트리포스페이트
[0470]	GTP	구아노신 트리포스페이트
[0471]	UTP	우리딘 트리포스페이트
[0472]	mA	2'-O-메틸 아데노신
[0473]	mC	2'-O-메틸 시티딘
[0474]	mG	2'-O-메틸 구아노신
[0475]	mU	2'-O-메틸 우리딘
[0476]	rA	2'-히드록실 아데노신
[0477]	rC	2'-히드록실 시티딘
[0478]	rG	2'-히드록실 구아노신
[0479]	rU	2'-히드록실 아데노신
[0480]	fA	2' 플루오로 아데노신
[0481]	fC	2' 플루오로 시티딘
[0482]	fG	2' 플루오로 구아노신
[0483]	fU	2' 플루오로 우리딘

- p>[0484] eA 2'-0-메톡시-에틸 아데노신
-
- p>[0485] eC 2'-0-메톡시-에틸 5-메틸시토신
-
- p>[0486] eG 2'-0-메톡시-에틸 구아노신
-
- p>[0487] eT 2'-0-메톡시-에틸 티미딘
-
- p>[0488]
- Ψ
- TP 슈도우리딘-5'-트리포스페이트
-
- p>[0489] m1
- Ψ
- TP N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트
-
- p>[0490]
- Ψ
- 슈도우리딘
-
- p>[0491] m1
- Ψ
- N1-메틸슈도우리딘
-
- p>[0492] ATP
- α
- S 아데노신-5'-(
- α
- 티오)-트리포스페이트
-
- p>[0493] CTP
- α
- S 시티딘-5'-(
- α
- 티오)-트리포스페이트
-
- p>[0494] GTP
- α
- S 구아노신-5'-(
- α
- 티오)-트리포스페이트
-
- p>[0495] UTP
- α
- S 우리딘-(
- α
- 티오)-트리포스페이트
-
- p>[0496] 실시예 1: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오티드 주형 상의 27bp 2'H 올리고뉴클레오티드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오티드 프라이머 갭 충전으로부터의 5bp 2'H 올리고뉴클레오티드 합성
-
- p>[0497] 목적: 비변형된 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트를 사용하여 비변형된 DNA 올리고뉴클레오티드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 기술의 일반적 적용가능성을 보여주기 위함.
-
- p>[0498] 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 39 내지 43)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.
-
- p>[0499] 반응물을 표 1에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오티드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 50
- μ
- L 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 쉐칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 10 mM EDTA로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 11의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다. 도 3a는 반응 출발 물질의 크로마토그램을 보여준다. 도 3b는 산물 형성 반응의 크로마토그램을 보여준다.

[0500] 표 1.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 39 내지 44		1.0
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	12.5
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	2.0
3'블록 1 (2'H) - SEQ ID NO: 3	0.04	1.5
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTP	0.5	2.5
dTTP	0.5	2.5
트리스 (pH 7.5)	50	2.5
MgCl ₂	10	0.5
물		20.0
최종 반응물 부피 (μL)		50

[0501]

[0502] 반응물로부터의 결과:

[0503] 표 2.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 에스케리키아 파지 T7 폴리머라제 - 'Pol1'	39	17.01
야생형 슐폴로부스 슐파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	54.42
돌연변이체 썬모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	41	67.75
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	81.21
야생형 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'Pol5'	43	56.57

[0504]

[0505] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 5'-프라이머 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 11 피크의 면적 %

[0506] 워터스 엑스브리지(Waters XBridge) 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

[0507] 완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7

[0508] 완충제 B: 25% 아세트니트릴/75% H₂O 중 100 mM TEAA, pH 7

[0509] 결론: 유전자상 다양한 세트의 프라이머-연장 폴리머라제는 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 염기 충전을 수행하는 것으로 나타났다. 최고의 예는 높은 산물 형성 (80 면적% 초과) 및 낮은 (20 면적% 미만) 불완전 반응 또는 부산물 형성을 갖는다.

[0510] 실시예 2: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 27bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리

고뉴클레오티드 프라이머 갭 충전으로부터의 원-포트 5bp 2'H 올리고뉴클레오티드 합성 및 라이게이션에 의한 42-bp 산물의 합성

[0511] 목적: 비변형된 DNA 올리고뉴클레오티드 절편 및 비변형된 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 갭 충전 및 라이게이션을 입증하여 기술의 일반적 적용가능성을 보여주기 위함.

[0512] 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 39 내지 43)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0513] 반응물을 표 3에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오티드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제 및 리가제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 50 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 10 mM EDTA로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 38의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0514] 표 3.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 39 내지 44		1.0
리가제 - SEQ ID NO: 45		2.5
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	12.5
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	2.0
3'블록 1 (2'H) - SEQ ID NO: 3	0.04	1.5
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTP	0.5	2.5
dTTP	0.5	2.5
ATP	1	5
트리스 (pH 7.5)	50	2.5
MgCl ₂	10	0.5
물		12.5
최종 반응물 부피 (μL)		50

[0515]

[0516] 반응물로부터의 결과:

[0517] 표 4.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 에스케리키아 파지 T7 폴리머라제 - 'Pol1'	39	5.18
야생형 솔폴로부스 솔파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	81.22
돌연변이체 씨모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	41	88.71
야생형 엔테로막테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	95.16
야생형 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'Pol5'	43	41.19

[0518]

[0519] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 38 피크의 면적 %

[0520] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행 하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

[0521] 완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7

[0522] 완충제 B: 25% 아세트오니트릴/75% H₂O 중 100 mM TEAA, pH 7

[0523] 결론: 유전자상 다양한 세트의 프라이머-연장 폴리머라제는 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 염기 충진을 수행하는 것으로 나타났고, 리가제는 탠덤 반응을 수행하여 전장 올리고뉴클레오타이드를 제공할 수 있다. 최고의 예는 높은 산물 형성 (95 면적% 초과) 및 낮은 (5 면적% 미만) 불완전 반응 또는 부산물 형성을 갖는다.

[0524] 실시예 3: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 6bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 합성

[0525] 목적: 비변형된 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 비변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (스토퍼/블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 기 (2'OH)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0526] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40, 41 및 42)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0527] 반응물을 표 5에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 25 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 10 mM EDTA로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 12의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0528] 표 5.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NOs: 40, 41 및 42		1.3
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	6.3
5'프라이머 (2'OH) - SEQ ID NO: 2	0.04	1.0
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	1.0
dATP	0.5	1.3
dCTP	0.5	1.3
dGTP	0.5	1.3
dTTP	0.5	1.3
트리스 (pH 7.5)	50	1.3
MgCl ₂	10	0.2
물		9.0
최종 반응물 부피 (μL)		25

[0529]
[0530] 반응물로부터의 결과:

[0531] 표 6.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 솔폴로부스 솔파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	24.44
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	41	8.20
야생형 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Pol6'	42	11.34

[0532]
[0533] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 12 피크의 면적 %

[0534] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행 하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

[0535] 완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7

[0536] 완충제 B: 25% 아세토니트릴/75% H₂O 중 100 mM TEAA, pH 7

[0537] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2'-OH 당 변형된 5' 프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오티드 사이의 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 최고의 예시적인 폴리머라제는 24 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0538] 실시예 4: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오티드 주형 상의 17bp 2'H 5-메틸시토신 염기 올리고뉴클레오티드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오티드 프라이머 갭 충전으로부터의 15bp 2'H 올리고뉴클레오티드 합성

[0539] 목적: 비변형된 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 1개의 변형된 올리고뉴클레오티드 절편과 1개의 비변형된 올리고뉴클레오티드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오티드 치료제에서 통상적으로

보이는 염기 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0540] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40, 42 및 44)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0541] 반응물을 표 7에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 25 µL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 킬링한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 10 mM EDTA로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 21의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0542] 표 7.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (µL)
폴리머라제 - SEQ ID NOS: 40, 42 및 44		1.3
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	6.3
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	1.0
3'블록 3 (2'H) - SEQ ID NO: 5	0.04	1.0
dATP	0.5	1.3
dCTP	0.5	1.3
dGTP	0.5	1.3
dTTP	0.5	1.3
트리스 (pH 7.5)	50	1.3
MgCl ₂	10	0.2
물		9.0
최종 반응물 부피 (µL)		25

[0543]

[0544] 반응물로부터의 결과:

[0545] 표 8.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 솔폴로부스 솔파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	59.60
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	76.61
야생형 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Pol6'	44	79.10

[0546]

[0547] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 21 피크의 면적 %

[0548] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 µm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 µl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

- [0549] 완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7
- [0550] 완충제 B: 25% 아세트니트릴/75% H₂O 중 100 mM TEAA, pH 7
- [0551] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 내에 함유된 적어도 염기 변형을 갖는 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 최고의 예시적인 폴리머라제는 79 면적% 초과로 산물을 형성한다.
- [0552] 실시예 5: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 6bp 2'H 완전 PS 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성
- [0553] 목적: 변형된 테옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트에 의한 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 백본 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.
- [0554] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40, 41 및 42)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.
- [0555] 반응물을 표 9에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 5 μL 500 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 12의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.
- [0556] 표 9.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO 40, 41 및 42		1.0
주형: (2'H)- SEQ ID NO 1	0.04	12.5
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO 2	0.04	1.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO 4	0.04	1.9
dATPaS	0.5	2.5
dCTPaS	0.5	2.5
dGTPaS	0.5	2.5
dTTPaS	0.5	2.5
트리스 (pH 7.5)	50	2.5
MgCl ₂	10	0.5
물		19.8
최종 반응물 부피 (μL)		50

- [0557]
- [0558] 반응물로부터의 결과:

[0559] 표 10.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 술폴로부스 술파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	8.25
돌연변이체 쉼모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	41	30.54
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	33.58

[0560]

[0561] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 12 피크의 면적 %

[0562]

워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 µm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 µl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

[0563]

완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7

[0564]

완충제 B: 25% 아세트니트릴/75% H2O 중 100 mM TEAA, pH 7

[0565]

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 백본 변형된 염기 충전을 수행하는데 사용될 수 있다는 개념 증명. 완전히 포스포로티오에이트 변형된 백본을 합성함으로써 갭을 충전한다. 최고의 예시적인 폴리머라제는 33 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0566]

실시예 6: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 6bp 2'H 데옥시구아노신 PS 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성

[0567]

목적: 변형된 데옥시구아노신 트리포스페이트를 사용하되, 비변형된 데옥시아데노신 트리포스페이트, 비변형된 데옥시시티딘 트리포스페이트 및 비변형된 데옥시티미딘 트리포스페이트를 사용하여 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 모듈 백본 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0568]

올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40, 41 및 42)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0569]

반응물을 표 11에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 5 µL 500 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 12의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0570] 표 11.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NOS: 40, 41 및 42		1.0
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	12.5
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	1.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	1.9
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTPaS	0.5	2.5
dTTP	0.5	2.5
트리스 (pH 7.5)	50	2.5
MgCl ₂	10	0.5
물		19.8
최종 반응물 부피 (μL)		50

[0571]

[0572] 반응물로부터의 결과:

[0573] 표 12.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 솔폴로부스 솔파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	59.39
돌연변이체 썬모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	41	43.07
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	89.77

[0574]

[0575] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 12 피크의 면적 %

[0576] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

[0577] 완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7

[0578] 완충제 B: 25% 아세트니트릴/75% H2O 중 100 mM TEAA, pH 7

[0579] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 특정 백본 변형된 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 목적하는 염기 사이에 포스포로티오에이트 변형된 백본 연결을 합성함으로써 겹을 충전한다. 최고의 예시적인 폴리머라제는 89 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0580] 실시예 7: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 프라이머 겹 충전으로부터의 6bp 2'H 데옥시티미딘 PS 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성

[0581] 목적: 변형된 데옥시티미딘 트리포스페이트를 사용하되, 비변형된 데옥시아데노신 트리포스페이트, 비변형된 데

옥시시티딘 트리포스페이트 및 비변형된 데옥시구아노신 트리포스페이트를 사용하여 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 모듈 백본 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0582] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40, 41 및 42)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0583] 반응물을 표 13에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 5 µL 500 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 12의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0584] 표 13.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (µL)
폴리머라제 - SEQ ID NOs: 40, 41 및 42		1.0
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	12.5
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	1.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	1.9
dATP	0.5	2.5
dCTP	0.5	2.5
dGTP	0.5	2.5
dTTPaS	0.5	2.5
트리스 (pH 7.5)	50	2.5
MgCl ₂	10	0.5
물		19.8
최종 반응물 부피 (µL)		50

[0585]

반응물로부터의 결과:

[0586]

[0587] 표 14.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 솔폴로부스 솔파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	53.39
돌연변이체 썬모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	41	29.36
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	78.44

[0588]

[0589] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 12 피크의 면적 %

[0590] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 µm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5

μl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

[0591] 완충제 A: 100 mM TEAA, pH 7

[0592] 완충제 B: 25% 아세트니트릴/75% H₂O 중 100 mM TEAA, pH 7

[0593] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 특정 백본 변형된 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 목적하는 염기 사이에 포스포로티오에이트 변형된 백본 연결을 합성함으로써 겅을 충전한다. 최고의 예시적인 폴리머라제는 89 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0594] 실시예 8: 42-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 17bp 2'H 5-메틸시토신 염기 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 프라이머 겅 충전으로부터의 원-포트 15bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 42-bp 산물의 합성

[0595] 목적: 1개의 변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 및 1개의 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 및 비변형된 테옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트에 의한 겅 충전 및 라이게이션을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 염기 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0596] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머 연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40, 42 및 44)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0597] 반응물을 표 15에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제 및 리가제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 25 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 10 mM EDTA로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 38의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0598] 표 15.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 40, 42 및 44		1.3
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.5
주형: (2'H)- SEQ ID NO: 1	0.04	6.3
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	1.0
3'블록 3 (2'H) - SEQ ID NO: 5	0.04	1.0
dATP	0.5	1.3
dCTP	0.5	1.3
dGTP	0.5	1.3
dTTP	0.5	1.3
ATP	1	2.5
트리스 (pH 7.5)	50	1.3
MgCl ₂	10	0.2
물		6.0
최종 반응물 부피 (μL)		25

[0599]

반응물로부터의 결과:

표 16.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 술폴로부스 술파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	60.77
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	81.33
야생형 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Pol6'	44	79.90

*산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 5 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 38 피크의 면적 %

워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 35-71% 완충제 B의 구배를 18분에 걸쳐 실행한 후, 7분 동안 95% 완충제 B까지 단계적으로 증가시켰다.

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 중 1개 내에 함유된 적어도 1개의 염기 변형을 갖는 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 또한, 리가제는 탠덤 라이게이션 반응을 수행하여 합성된 단편으로부터 전장 올리고뉴클레오타이드를 제공할 수 있다. 최고의 예시적인 폴리머라제 및 리가제는 81 면적% 초과로 산물을 형성한다.

실시예 9: 45-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 2'H 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 원-포트 6bp 2'F 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 42-bp 산물의 합성

목적: 비변형된 데옥시티미딘 트리포스페이트를 사용하되, 변형된 데옥시아데노신 트리포스페이트, 변형된 데옥시시티딘 트리포스페이트 및 변형된 데옥시구아노신 트리포스페이트를 사용하여 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 67, 69, 73, 77 및 87)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

반응물을 표 17에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제 및 리가제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 킬링한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 38의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0610] 표 17.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 67, 69, 73, 77 및 87)		1.0
RNase 억제제		1.0
리가제 - SEQ ID NO: 45		4.0
주형 XXL: (2'H) - SEQ ID NO: 46	0.04	0.8
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
2'-F-dATP	0.5	1.0
2'-F-dGTP	0.5	1.0
2'-F-dCTP	0.5	1.0
dTTP	0.5	1.0
ATP	1	2.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		3.9
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0611]

[0612] 반응물로부터의 결과:

[0613] 표 18.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Kod-V2'	67	72.16
돌연변이체 썬모코쿠스 리토탈리스 폴리머라제 - 'Vent-V1'	69	90.10
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V5'	73	75.43
돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V4'	77	77.19
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V12'	87	71.60

[0614]

[0615] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 4 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 38 피크의 면적 %

[0616] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

- [0617] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7
- [0618] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7
- [0619] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 특정 당 변형된 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 목적하는 염기에서 2'-플루오로 변형을 혼입시킴으로써 갭을 충전한다. 또한, 리가제는 탠덤 라이게이션 반응을 수행하여 합성된 단편으로부터 전장 올리고뉴클레오타이드를 제공할 수 있다. 최고의 예시적인 폴리머라제 및 리가제는 90.1 면적% 초과로 산물을 형성한다.
- [0620] 실시예 10: 45-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 2'H 사이의 10bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 원-포트 6bp 2'H 데옥시시티딘 Me-dC 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 42-bp 산물의 합성
- [0621] 목적: 변형된 데옥시시티딘 트리포스페이트를 사용하되, 비변형된 데옥시아데노신 트리포스페이트, 비변형된 데옥시구아노신 트리포스페이트 및 비변형된 데옥시티미딘 트리포스페이트를 사용하여 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 모듈 염기 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.
- [0622] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 42, 44 및 86)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.
- [0623] 반응물을 표 19에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제 및 리가제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 키펠한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 38의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0624] 표 19.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 42, 44 및 86		1.0
RNAse 억제제		1.0
리가제 - SEQ ID NO: 45		1.0
주형 XXL: (2'H) - SEQ ID NO: 46	0.04	0.8
5'프라이머 (2'H) - SEQ ID NO: 2	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
dATP	0.5	1.0
dGTP	0.5	1.0
5-me-dCTP	0.5	1.0
dTTP	0.5	1.0
ATP	1	2.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		6.9
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0625]

[0626] 반응물로부터의 결과:

[0627] 표 20.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Pol6'	44	98.48
야생형 엔테로막테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	91.26
야생형 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo'	86	94.55

[0628]

[0629] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 2 + 서열식별번호: 4 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 38 피크의 면적 %

[0630] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0631] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0632] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0633] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오티드 사이의 특정 변형된 염기 충전을 수행하는

데 사용될 수 있다는 개념 증명. 목적하는 염기에서 5-메틸시토신 변형을 혼입시킴으로써 갭을 충전한다. 또한, 리가제는 탠덤 라이게이션 반응을 수행하여 합성된 단편으로부터 전장 올리고뉴클레오타이드를 제공할 수 있다. 최고의 예시적인 폴리머라제 및 리가제는 98 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0634] 실시예 11: 45-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 10bp 2'F 변형된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 6bp 2'F 완전 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성

[0635] 목적: 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트에 의한 변형 및 비변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0636] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머 연장 폴리머라제 (서열식별번호: 80, 84 및 89)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0637] 반응물을 표 21에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 캔칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 12의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0638] 표 21.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 80, 84 및 89		1.0
RNase 억제제		1.0
주형 XXL: (2'H) - SEQ ID NO 46	0.04	0.8
5'프라이머 (2'F) - SEQ ID NO 49	0.04	0.8
3'블록 5 (2'H) - SEQ ID NO 54	0.04	0.8
2'-F-dATP	0.5	1.0
2'-F-dGTP	0.5	1.0
2'-F-dCTP	0.5	1.0
2'-F-dUTP	0.5	1.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		9.9
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0639]

[0640] 반응물로부터의 결과:

[0641] 표 22.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V4'	80	10.59
돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V5'	84	14.83
돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V6'	89	12.68

[0642]

[0643] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 49 + 서열식별번호: 7 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 12 피크의 면적 %

[0644]

워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 µm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 µl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0645]

완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0646]

완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0647]

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2'-플루오로로 변형된 올리고뉴클레오타이드 프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 목적하는 염기 위치에서 2'-플루오로로 당 변형을 혼입시킴으로써 갭을 충전한다. 최고의 예시적인 폴리머라제는 14 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0648]

실시에 12: 53-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 8bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성

[0649]

목적: 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 비변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 당기 (2'OH)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0650]

올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0651]

반응물을 표 23에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 55℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 µL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 20의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0652] 표 23.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		1.0
RNase 억제제		1.0
주형 NoRXL: (2'H) - SEQ ID NO: 47	0.04	0.8
5'프라이머 N+6 (2'OH) - SEQ ID NO: 51	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		9.9
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0653]

[0654] 반응물로부터의 결과:

[0655] 표 24.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	27.10

[0656]

[0657] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 51 + 서열식별번호: 11 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 20 피크의 면적 %

[0658]

워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행 하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0659]

완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0660]

완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0661]

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 RNA 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 갭 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제는 27 면적%의 산물 형성을 제공하였다.

[0662]

실시에 13: 53-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OMe 변형된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 8bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성

[0663]

목적: 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 비변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는

당 기 (2'OMe)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0664] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 60)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0665] 반응물을 표 25에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 55℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 킨칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 20의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0666] 표 25.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 60		1.0
RNAse 억제제		1.0
주형 NoRXL: (2'H) - SEQ ID NO: 47	0.04	0.8
5'프라이머 N+6 (2'OMe+r) - SEQ ID NO: 53	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		9.9
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0667]

[0668] 반응물로부터의 결과:

[0669] 표 26.

유전자 명칭	SE D ID NO:	산물로 의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V5'	60	32.75

[0670]

[0671] *산물의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 53 + 서열식별번호: 11 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 20 피크의 면적 %

[0672] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0673] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0674] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0675] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 당 변형된 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 갭 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제는 32 면적% 산물을 형성한다.

[0676] 실시예 14: 100-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 54bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성

[0677] 목적: 100-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 및 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 비변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 보다 긴 갭 충전을 입증하여 기술의 일반적 적용가능성을 보여주기 위함.

[0678] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 56, 60, 84, 89 및 93)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0679] 반응물을 표 27에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 55℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 µL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 55의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0680] 표 27.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (µL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 56, 60, 84, 89 및 93		1.0
RNase 억제제		1.0
주형 100mer: (2'H) - SEQ ID NO: 48	0.04	0.8
5'프라이머 N+6 (2'OH) - SEQ ID NO: 51	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		9.9
최종 반응물 부피 (µL)		20

[0681]

[0682] 반응물로부터의 결과:

[0683] 표 28.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n'	56	41.07
돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V5'	60	39.81
돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V5'	84	57.59
돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V6'	89	57.58
돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V1'	93	43.54

[0684]

[0685] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 51 + 서열식별번호: 11 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 55 피크의 면적 %

[0686]

위터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 60-85% 완충제 B의 구배를 15분에 걸쳐 실행한 후, 5분 동안 60% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0687]

완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0688]

완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0689]

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 RNA 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 보다 긴 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 최고의 예시적인 폴리머라제는 57 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0690]

실시예 15: 100-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OMe 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 54bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성

[0691]

목적: 100-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 및 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 비변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 보다 긴 갭 충전을 입증하여 기술의 일반적 적용가능성을 보여주기 위함.

[0692]

올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 1 내지 38 & 46 내지 54)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 60, 83, 84 및 89)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0693]

반응물을 표 12에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 55℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 μL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 키템한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 55의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0694] 표 29.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 60, 83, 84 및 89		1.0
RNAse 억제제		1.0
주형 100mer: (2'H) - SEQ ID NO: 48	0.04	0.8
5'프라이머 N+6 (2'OMe+r) - SEQ ID NO: 53	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
ATP	0.5	1.0
CTP	0.5	1.0
GTP	0.5	1.0
UTP	0.5	1.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		9.9
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0695]

[0696] 반응물로부터의 결과:

[0697] 표 30.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 씨모코쿠스 중 폴리머라제 - '9n-V5'	60	26.80
돌연변이체 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V9'	83	20.20
돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V5'	84	27.18
돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V6'	89	33.12

[0698]

[0699] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 53 + 서열식별번호: 11 내지 38 피크 vs. 서열식별번호: 55 피크의 면적 %

[0700] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 60-85% 완충제 B의 구배를 15분에 걸쳐 실행한 후, 5분 동안 60% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0701] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0702] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0703] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 당 변형된 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오티드 사이

의 보다 긴 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 최고의 예시적인 폴리머라제는 33 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0704] 실시예 16: 22-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 7bp 2'MOE 올리고뉴클레오타이드 3'블록 2 사이의 9bp 2'MOE 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 원-포트 6bp 2'H 완전 PS 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 22-bp 산물의 합성

[0705] 목적: PS 변형된 테옥시리보뉴클레오타이드에 의한 2'MOE 변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 갭머 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 백본 변형 및 당 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0706] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 96 내지 98)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 41)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0707] 반응물을 표 31에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제 및 리가제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 µL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 쉐칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 99의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0708] 표 31.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (µL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 41		1.0
리가제 - SEQ ID NO: 45		1.0
주형 H: (2'H) - SEQ ID NO: 96	0.04	0.8
쇼트머 1 (2'MOE) - SEQ ID NO: 97	0.04	0.8
쇼트머 3 (2'MOE) - SEQ ID NO: 98	0.04	0.8
dATPaS	0.5	1.0
dCTPaS	0.5	1.0
dGTPaS	0.5	1.0
dTTPaS	0.5	1.0
ATP	1	2.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
물		8.4
최종 반응물 부피 (µL)		20

[0709]

[0710] 반응물로부터의 결과:

[0711] 표 32.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 종 (균주 90N-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	1	13.2

[0712]

[0713] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 97 + 서열식별번호: 98 + 서열식별번호: 100 vs. 서열식별번호: 99 피크의 면적 %

[0714]

워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 µm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 µl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0715]

완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0716]

완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트ونی트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0717]

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 2'MOE 올리고뉴클레오티드 사이의 특정 백본 변형된 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 목적하는 염기 사이에 PS 변형을 혼입시킴으로써 갭을 충전한다. 또한, 리가제는 탠덤 라이게이션 반응을 수행하여 합성된 단편으로부터 전장 올리고뉴클레오티드를 제공할 수 있다. 예시적인 폴리머라제 및 리가제는 13.2 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0718]

실시에 17: 22-bp 2'H 올리고뉴클레오티드 주형 상의 7bp 2'MOE 올리고뉴클레오티드 3'블록 2'H 사이의 9bp 2'MOE 올리고뉴클레오티드 프라이머 갭 충전으로부터의 원-포트 6bp 2'H 올리고뉴클레오티드 합성 및 라이게이션에 의한 22-bp 산물의 합성

[0719]

목적: 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트에 의한 2'MOE 변형된 올리고뉴클레오티드 절편 사이의 갭 충전을 입증하여 갭머 올리고뉴클레오티드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0720]

올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 96 내지 98)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 40 내지 42)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0721]

반응물을 표 33에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오티드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제 및 리가제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 µL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 99의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0722] 표 33.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 40 내지 42		1.0
리가제 - SEQ ID NO: 45		1.0
주형 H: (2'H) - SEQ ID NO: 96	0.04	0.8
쇼트머 1 (2'MOE) - SEQ ID NO: 97	0.04	0.8
쇼트머 3 (2'MOE) - SEQ ID NO: 98	0.04	0.8
dATP	0.5	1.0
dCTP	0.5	1.0
dGTP	0.5	1.0
dTTP	0.5	1.0
ATP	1	2.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
물		8.4
최종 반응물 부피 (μL)		20

[0723]

[0724] 반응물로부터의 결과:

[0725] 표 34.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
야생형 솔폴로부스 솔파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'	40	30.1
돌연변이체 썬모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'	41	64.0
야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'	42	52.2

[0726]

[0727] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 97 + 서열식별번호: 98 + 서열식별번호: 100 vs. 서열식별번호: 99 피크의 면적 %

[0728] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0729] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0730] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0731] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2개의 플랭킹 2'MOE 올리고뉴클레오타이드 사이의 특정 염기 충전을 수행하는데 사용될 수 있다는 개념 증명. 또한, 리가제는 탠덤 라이게이션 반응을 수행하여 합성된 단편으로부터 전장 올리고뉴클레오타이드를 제공할 수 있다. 최고의 예시적인 폴리머라제 및 리가제는 64 면적% 초과로 산물을 형성한다.

[0732] 실시예 18: 53-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 3' 블록 사이의 16bp 2'OMe 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 8bp 2'OMe 올리고뉴클레오타이드 합성

[0733] 목적: 53-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형을 사용하여 2'OMe 변형된 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 비 변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 2'OMe 당 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트에 의한 갭 충전을 입증하여 기술의 일반적 적용가능성을 보여주기 위함.

[0734] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 4, 47 및 52)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 62 및 87)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0735] 반응물을 표 35에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, 폴리머라제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 55℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 60 µL 100 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, SEC를 사용하여 반응물을 물로 완충제 교환하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 20의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0736] 표 35.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (µL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 62 및 87		1.0
주형 NoRXL: (2'H) - SEQ ID NO: 47	0.04	0.8
5'프라이머 N+6 (2'OMe) - SEQ ID NO: 52	0.04	0.8
3'블록 2 (2'H) - SEQ ID NO: 4	0.04	0.8
2'OMe ATP	0.5	1.0
2'OMe CTP	0.5	1.0
2'OMe GTP	0.5	1.0
2'OMe UTP	0.5	1.0
트리스 (pH 7.5)	50	1.0
MgCl ₂	10	0.2
KCl	50	0.5
물		10.9
최종 반응물 부피 (µL)		20

[0737]

[0738] 반응물로부터의 결과:

[0739] 표 36.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 써모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Kod-V1'	62	12.0
돌연변이체 써모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V12'	87	15.8

[0740]

[0741] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 서열식별번호: 52 + 서열식별번호: 11 내지 38 피크 vs.

서열식별번호: 20 피크의 면적 %

- [0742] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 60-85% 완충제 B의 구배를 15분에 걸쳐 실행한 후, 5분 동안 60% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.
- [0743] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트오니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7
- [0744] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트오니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7
- [0745] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2'OMe 당 변형된 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 2'OMe 당 변형된 뉴클레오타이드 트리포스페이트에 의한 염기 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 최고의 예시적인 폴리머라제는 15 면적% 초과로 산물을 형성한다.
- [0746] 실시예 19: 895-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 850bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 892bp 산물의 생산
- [0747] 목적: 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 보다 긴 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 기 (2'OH)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.
- [0748] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 51, 76 & 101)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.
- [0749] 반응물을 표 37에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, RNase 억제제를 첨가하였다. 이후, 폴리머라제 및 리가제를 이어서 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1 uL의 DNase 1을 첨가하고, 반응물을 25℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 4 μL 10 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 쉐칭한 다음, 서열식별번호: 102의 존재에 대해 겔 전기영동에 의해 반응물을 분석하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 101의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0750] 표 37.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		0.25
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.12
RNAse 억제제		0.12
주형-900mer: (2'H) - SEQ ID NO: 76	0.001	1.25
5'프라이머 N+6 (2'OH) - SEQ ID NO: 51	0.001	0.05
3'블록 6 (2'OH) - SEQ ID NO: 101	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
UTP	0.2	0.0125
트리스 (pH 7.5)	50	0.12
MgCl ₂	10	0.25
KCl	50	0.06
물		0.16
최종 반응물 부피 (μL)		2.5

[0751]

[0752] 반응물로부터의 결과:

[0753] 표 38.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 고르고나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	18.61

[0754]

[0755] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 반응물 서열식별번호: 101 피크 vs. 음성 대조군 서열식별번호: 101 피크의 면적 %

[0756] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0757] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TbuAA, pH 7

[0758] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TbuAA, pH 7

[0759] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 RNA 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 겹충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제 및 탠덤 라이게이션은 18.6 면적%의 산물 형성을 제공하였다.

[0760] 실시예 20: 895-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'Ome 올리고뉴클레오타이드 프라이머 겹충전으로부터의 850bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한

892bp 산물의 생산

[0761] 목적: 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 2'Ome 함유 올리고뉴클레오티드 절편 (프라이머)과 RNA 올리고뉴클레오티드 절편 (블록) 사이의 겹 충전을 입증하여 보다 긴 올리고뉴클레오티드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 기 (2'OH)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0762] 올리고뉴클레오티드 (서열식별번호: 53, 76 & 101)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0763] 반응물을 표 39에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오티드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, RNase 억제제를 첨가하였다. 이후, 폴리머라제 및 리가제를 이어서 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1 uL의 Dnase 1을 첨가하고, 반응물을 25℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 4 μL 10 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, 서열식별번호: 103의 존재에 대해 겔 전기영동에 의해 반응물을 분석하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 101의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0764] 표 39.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		0.25
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.12
RNase 억제제		0.12
주형-900mer: (2'H) - SEQ ID NO: 76	0.001	1.25
5'프라이머 N+6 (2'Ome+r) - SEQ ID NO: 53	0.001	0.05
3'블록 6 (2'OH) - SEQ ID NO: 101	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
UTP	0.2	0.0125
트리스 (pH 7.5)	50	0.12
MgCl ₂	10	0.25
KCl	50	0.06
물		0.16
최종 반응물 부피 (μL)		2.5

[0765]

[0766] 반응물로부터의 결과:

[0767] 표 40.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	36.52

[0768]

[0769] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 반응물 서열식별번호: 101 피크 vs. 음성 대조군 서열식별번호: 101 피크의 면적 %

[0770] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 µm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 µl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0771] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트오니트릴 중 5 mM TbuAA, pH 7

[0772] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트오니트릴 중 5 mM TbuAA, pH 7

[0773] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2'Ome 함유 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 갭 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제 및 탠덤 라이게이션은 36.52 면적%의 산물 형성을 제공하였다.

[0774] 실시예 21: 895-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH PS 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 850bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 892bp 산물의 생산

[0775] 목적: 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 포스포로티오에이트 함유 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 보다 긴 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 당 기 (2'OH)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0776] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 76, 101 & 104)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0777] 반응물을 표 41에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, RNase 억제제를 첨가하였다. 이후, 폴리머라제 및 리가제를 이어서 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1 µL의 Dnase 1을 첨가하고, 반응물을 25℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 4 µL 10 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 토크한 다음, 서열식별번호: 105의 존재에 대해 겔 전기영동에 의해 반응물을 분석하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 101의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0778] 표 41.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		0.25
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.12
RNase 억제제		0.12
주형-900mer: (2'H) - SEQ ID NO: 76	0.001	1.25
5'프라이머 N+6_2'OH_PS (2'OH)- SEQ ID NO: 104	0.001	0.05
3'블록 6 (2'OH) - SEQ ID NO: 101	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
UTP	0.2	0.0125
트리스 (pH 7.5)	50	0.12
MgCl ₂	10	0.25
KCl	50	0.06
물		0.16
최종 반응물 부피 (μL)		2.5

[0779]

[0780] 반응물로부터의 결과:

[0781] 표 42

유전자 명칭	SED ID NO:	산물의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	10.78

[0782]

[0783] *산물의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 반응물 서열식별번호: 101 피크 vs. 음성 대조군 서열식별번호: 101 피크의 면적 %

[0784] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0785] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TbuAA, pH 7

[0786] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TbuAA, pH 7

[0787] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 2'OH 포스포로티오에이트 함유 5'프라이머로부터 연장된 2개의 플랭킹 올리고뉴클레오타이드 사이의 갭 충전을 수행하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제 및 탠덤 라이게이션은 10.78 면적%의 산물 형성을 제공하였다.

[0788] 실시예 22: 895-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH

올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 슈도우리딘을 함유하는 850bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 892bp 산물의 생산

[0789] 목적: 슈도우리딘 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 염기 변형 (Ψ)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0790] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 51, 76 & 101)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0791] 반응물을 표 43에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, RNase 억제제를 첨가하였다. 이후, 폴리머라제 및 리가제를 이어서 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1 uL의 Dnase 1을 첨가하고, 반응물을 25℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 4 μ L 10 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, 서열식별번호: 106의 존재에 대해 겔 전기영동에 의해 반응물을 분석하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 101의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0792] 표 43.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μ L)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		0.25
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.12
RNase 억제제		0.12
주형-900mer: (2'H) - SEQ ID NO: 76	0.001	1.25
5'프라이머 N+6 (2'OH) - SEQ ID NO: 51	0.001	0.05
3'블록 6 (2'OH) - SEQ ID NO: 101	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
Ψ TP	0.2	0.0125
트리스 (pH 7.5)	50	0.12
MgCl ₂	10	0.25
KCl	50	0.06
물		0.16
최종 반응물 부피 (μ L)		2.5

[0793]

[0794] 반응물로부터의 결과:

표 44.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이제 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	24.4

*산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 반응물 서열식별번호: 101 피크 vs. 음성 대조군 서열식별번호: 101 피크의 면적 %

워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트오니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트오니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 겐 충전을 수행하여 슈도우리딘 함유 서열을 형성하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제 및 탠덤 라이게이션은 24.4 면적%의 산물 형성을 제공하였다.

실시예 23: 895-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 프라이머 겐 충전으로부터의 N1-메틸슈도우리딘을 함유하는 850bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 892bp 산물의 생산

목적: N1-메틸슈도우리딘 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 겐 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 염기 변형 (m1Ψ)에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 51, 76 & 101)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

반응물을 표 45에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, RNase 억제제를 첨가하였다. 이후, 폴리머라제 및 리가제를 이어서 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1 uL의 DNase 1을 첨가하고, 반응물을 25℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 4 μL 10 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 키텔한 다음, 서열식별번호: 107의 존재에 대해 겐 전기영동에 의해 반응물을 분석하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 101의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0806] 표 45.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		0.25
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.12
RNAse 억제제		0.12
주형-900mer: (2'H) - SEQ ID NO: 76	0.001	1.25
5'프라이머 N+6 (2'OH) - SEQ ID NO: 51	0.001	0.05
3'블록 6 (2'OH) - SEQ ID NO: 101	0.001	0.05
ATP	0.2	0.0125
CTP	0.2	0.0125
GTP	0.2	0.0125
m1ΨTP	0.2	0.0125
트리스 (pH 7.5)	50	0.12
MgCl ₂	10	0.25
KCl	50	0.06
물		0.16
최종 반응물 부피 (μL)		2.5

[0807]

[0808] 반응물로부터의 결과:

[0809] 표 46.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	21.64

[0810]

[0811] *산물의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 반응물 서열식별번호: 101 피크 vs. 음성 대조군 서열식별번호: 101 피크의 면적 %

[0812] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.

[0813] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0814] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7

[0815] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 갭 충전을 수행하여 N1-메틸슈도우리딘 함유 서열을 형성하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제 및 탠덤 라이게이션은 21.64 면적%의 산물 형성을 제공하였다.

[0816] 실시예 24: 895-bp 2'H 올리고뉴클레오타이드 주형 상의 26bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 3'블록 사이의 16bp 2'OH 올리고뉴클레오타이드 프라이머 갭 충전으로부터의 850bp 2'OH PS 변형된 올리고뉴클레오타이드 합성 및 라이게이션에 의한 892bp 산물의 생산

[0817] 목적: 변형된 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (프라이머)과 RNA 올리고뉴클레오타이드 절편 (블록) 사이의 갭 충전을 입증하여 올리고뉴클레오타이드 치료제에서 통상적으로 보이는 백본 변형에 대한 기술의 적용을 보여주기 위함.

[0818] 올리고뉴클레오타이드 (서열식별번호: 51, 76 & 101)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하였다. 프라이머-연장 폴리머라제 (서열식별번호: 95)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다. 이중 가닥 리가제 (서열식별번호: 45)를 상업적으로 입수가 가능한 공급원으로부터 획득하여, 직접 사용하였다.

[0819] 반응물을 표 45에 따라 설정하였다. 반응물 내에 함유된 올리고뉴클레오타이드를 95℃로 가열하고 0.1℃/초로 15℃로 냉각시킴으로써 어닐링시켰다. 이어서, RNase 억제제를 첨가하였다. 이후, 폴리머라제 및 리가제를 이어서 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 1 uL의 DNase 1을 첨가하고, 반응물을 25℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이어서, 4 μL 10 mM EDTA의 첨가에 의해 반응물을 켄칭한 다음, 서열식별번호: 108의 존재에 대해 겔 전기영동에 의해 반응물을 분석하였다. 이어서, 반응물을 서열식별번호: 101의 존재에 대해 HPLC에 의해 분석하였다.

[0820] 표 47.

	반응물 중 최종 농도 (mM)	반응물당 부피 (μL)
폴리머라제 - SEQ ID NO: 95		0.25
리가제 - SEQ ID NO: 45		0.12
RNase 억제제		0.12
주형-900mer: (2'H) - SEQ ID NO: 76	0.001	1.25
5'프라이머 N+6 (2'OH) - SEQ ID NO: 51	0.001	0.05
3'블록 6 (2'OH) - SEQ ID NO: 101	0.001	0.05
ATPaS	0.2	0.0125
CTPaS	0.2	0.0125
GTPaS	0.2	0.0125
UTPaS	0.2	0.0125
트리스 (pH 7.5)	50	0.12
MgCl ₂	10	0.25
KCl	50	0.06
물		0.16
최종 반응물 부피 (μL)		2.5

[0821]

[0822] 반응물로부터의 결과:

[0823] 표 48.

유전자 명칭	SED ID NO:	산물로의 전환 (%)*
돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'	95	4.95

[0824]

[0825] *산물로의 전환 (%) - 파장 260 nm에서의 반응물 서열식별번호: 101 피크 vs. 음성 대조군 서열식별번호: 101

피크의 면적 %

- [0826] 워터스 엑스브리지 펩티드 BEH C18 칼럼 (300 Å, 3.5 μm, 2.1 mm X 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/분으로 실행하면서 HPLC 분석을 수행하였고, 260 nm에서 흡광도를 모니터링하였다. 칼럼을 50℃에서 유지시켰다. 샘플 5 μl를 주입하고, 40-95% 완충제 B의 구배를 25분에 걸쳐 실행한 후, 4분 동안 40% 완충제 B까지 단계적으로 감소시켰다.
- [0827] 완충제 A: 90% H₂O/10% 아세트오니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7
- [0828] 완충제 B: 20% H₂O/80% 아세트오니트릴 중 5 mM TBuAA, pH 7
- [0829] 결론: 프라이머-연장 폴리머라제가 겐 충전을 수행하여 포스포로티오에이트 변형된 서열을 형성하는 데 사용될 수 있다는 개념 증명. 폴리머라제 및 탠덤 라이게이션은 21.64 면적%의 산물 형성을 제공하였다.
- [0830] 전체 결론
- [0831] 본 발명자들은 상보적 주형 상에 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 절편을 어셈블리시키고, 폴리머라제를 사용하여 절편을 연장시켜 겐을 충전하고, 절편을 함께 라이게이션시키고, 산물 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 불순물 및 그의 상보적 주형 둘 다로부터 분리함으로써, 다양한 치료상 적절한 변형을 갖는 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 비롯한 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 대규모 치료 폴리뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 제조에 적합하고 확장가능한 효율적인 방법으로 합성하는 것이 가능하다는 것을 밝혀내었다.
- [0832] 상보적 서열을 특이적으로 인식하고 상보적 서열의 충실도 및 상보적 서열의 길이 둘 다를 반영한 친화도로 상보적 서열에 결합하도록 핵산, 예를 들어 DNA 또는 RNA의 고유 특성을 사용함에 있어서, 본 발명자들은 크로마토그래피의 필요 없이 고순도의 폴리뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드를 생산할 수 있었으며, 이는 생산 방법의 효율 및 방법의 확장성 둘 다를 개선시켰다. 분리 방법 동안 주형을 비변화된 상태로 회수함으로써, 본 발명자들은 추가의 합성 라운드 동안 주형을 재사용할 수 있었고, 따라서 형성되는 산물 올리고뉴클레오타이드의 모든 당량에 대해 1 당량의 주형을 만들어야 하는 경제적 결과를 피할 수 있었다. 또한, 일부 실시양태에서, 고체-상 방법에 의해 부과되는 규모 확대 제약을 피하면서 용액 중 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 것이 가능하다.
- [0833] 마지막으로, 야생형 폴리머라제가 효과적이지만, 폴리머라제의 변형 (돌연변이체 또는 조작된 폴리머라제를 생성함)을 이용하여 효율, 주형 회수를 증가시킬 수 있거나, 또는 변형된 뉴클레오타이드를 혼입시킬 수 있다. 유사하게, 야생형 리가제가 효과적이지만, 리가제의 적절한 돌연변이 및 진화에 의해 라이게이션 효율은 증가될 수 있고, 적절하게 변형된 리가제는 다중 변형을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위한 효과적인 촉매이다.

[0834] 서열 목록

SEQ ID NO:	서열 식별자
1	/5Biosg/GCTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGCACCGAGGAGT - '주형'
2	ACTCCTCGGT - '5'프라이머 N'
3	/5phos/AGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC - '3'블록 1'
4	/5phos/GTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC - '3'블록 2'
5	/5Phos/GCACCAAAGC/Me-dC/ATTAGC - '3'블록 3'
6	/5Phos/GC/Me-dC/ATTAGC - '3'블록 4'
7	ACTCCTCGGTG - '프라이머 N+1'
8	ACTCCTCGGTGC - '프라이머 N+2'
9	ACTCCTCGGTGCC - '프라이머 N+3'
10	ACTCCTCGGTGCCT - '프라이머 N+4'
11	ACTCCTCGGTGCCTC - '프라이머 N+5'
12	ACTCCTCGGTGCCTCA - '프라이머 N+6'
13	ACTCCTCGGTGCCTCAG - '프라이머 N+7'
14	ACTCCTCGGTGCCTCAGT - '프라이머 N+8'
15	ACTCCTCGGTGCCTCAGTC - '프라이머 N+9'
16	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCT - '프라이머 N+10'
17	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTG - '프라이머 N+11'
18	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGC - '프라이머 N+12'
19	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCT - '프라이머 N+13'
20	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTT - '프라이머 N+14'

[0835]

21	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTC - '프라이머 N+15'
22	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCG - '프라이머 N+16'
23	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGC - '프라이머 N+17'
24	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCA - '프라이머 N+18'
25	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCAC - '프라이머 N+19'
26	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACC - '프라이머 N+20'
27	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCA - '프라이머 N+21'
28	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAA - '프라이머 N+22'
29	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAA - '프라이머 N+23'
30	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAG - '프라이머 N+24'
31	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGC - '프라이머 N+25'
32	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCC - '프라이머 N+26'
33	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCA - '프라이머 N+27'
34	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCAT - '프라이머 N+28'
35	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATT - '프라이머 N+29'
36	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTA - '프라이머 N+30'
37	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAG - '프라이머 N+31'
38	ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC - '프라이머 N+32'
39	야생형 에스케리키아 파지 T7 폴리머라제 - 'Pol1'
40	야생형 스탕돌로부스 스탕파타리쿠스 폴리머라제 - 'Pol2'
41	돌연변이체 썬모코쿠스 종 (균주 9oN-7) 폴리머라제 - 'Pol3'
42	야생형 엔테로박테리아 파지 T4 폴리머라제 - 'Pol4'
43	야생형 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'Pol5'
44	야생형 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Pol6'

[0836]

45	야생형 <i>엔테로박테리아 파지 T3</i> 리가제 - 'Lig1'
46	/5Biosg/GCTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGCACCGAGGAGT*T*T*T- '주형 XXL'
47	CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACCTGATGACTGAGGCACCGAGGAGT*T*T*T- '주형 NoRXL'
48	C*T*A*A*T*GGCTTTGGTGCGAAGCAGACCTCTTCACCTTTGCTCACCATTTGTAGTCCATCGGATATATCTCCTTCGGATCCTGAGGCACCGAGGAG*T*T*T*T - '주형-100mer'
49	ACTCCfUfCfGfGfU - '5'프라이머 N_2'F'
50	ACTCCTCGGTGCCTCA - '5'프라이머 N+6_2'H'
51	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrA - '5'프라이머 N+6_2'OH'
52	mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCmUmCmA - '5'프라이머 N+6_2'OMe'
53	mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrA - '5'프라이머 N+6_2'OMe+r'
54	GTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC - '3'블록 5'
55	ACTCCTCGGTGCCTCAGGATCCGAAGGAGATATATCCGATGGACTACAAATGGTGAGCAAA GGTGAAGAG - '프라이머 N+60'
56	야생형 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n'
57	돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V2'
58	돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V16'
59	돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V9'
60	돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V5'
61	돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V1'
62	돌연변이체 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Kod-V1'
63	돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V3'
64	야생형 썬모코쿠스 리토탈리스 폴리머라제 - 'Vent'
65	돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V2'

[0837]

66	돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V2'
67	돌연변이체 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Kod-V2'
68	돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V4'
69	돌연변이체 썬모코쿠스 리토랄리스 폴리머라제 - 'Vent-V1'
70	돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V10'
71	돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V3'
72	돌연변이체 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Kod-V3'
73	돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V5'
74	돌연변이체 썬모코쿠스 리토랄리스 폴리머라제 - 'Vent-V2'
75	돌연변이체 썬무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V3'
76	CTAATGGCTTTGGTGCAGAGCACTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGCTTC CTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCTCGAGTTACTTATACAGTTCATCCATACCACCG GTACTATGGCGACCTTCTGCAGTTCATACTGTTCAACAATGGTATAATCCTCGTTGTGGC TGGTGATATCCAGTTTGATATTAACATTATATGCACCAGGCAGCTGAACCGGCTTTTGGC TTTGATAGTGTTTTAACTTCTGCATCATAATGACCGCCATCTTTCAGCTTCAGACGCTGTT TAATTTACCTTTTCAGTGCGCCATCTTCCGGATACATACGTTGCTGCTTGCCTCCCAACCC ATGGTCTTTTTCTGCATAACCGACCATCACTCGGAAAATTCGTGCCACGCAGTTTAACTTT ATAGATAAAATTCACCATCTGCAGGCTGCTATCCTGTGTAAACGGTAACAACACCACCATCTT CAAAATTCATCACAGTTCCCATTTAAACCTTCCGGAAAGCTCAGTTTCAGATAATCCGGG ATATCTGCCGGATGTTTAAATAGGCTTTGCTACCATACATAAACTGCGGACTCAGAATATC CCATGCAACCGGCAGCGGACCATTTTGGTAACTTTTCAGTTTTCGGTCTGGGTGCCTTCA TACGGACGACCTTCGCCTTCACCTTCAATTTCAAATTCGTGGCCATTAACGCTACCTTCCAT ATGAACTTTGAAGCGCATGAATTTCTTGATGATGGCCATATTATCCTCTTCACCTTTGCTCA CCATGCTAGCCATATGGCTGCCGCGCGCACCCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGAT GGCTGCTGCCATTGAGGCACCGAGAGTTTTT - '주형-900mer'
77	돌연변이체 썬모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V4'
78	돌연변이체 썬모코쿠스 코다카렌시스 폴리머라제 - 'Kod-V5'
79	돌연변이체 썬모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V6'

[0838]

80	돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V4'
81	돌연변이체 씨모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V7'
82	야생형 피로코쿠스 푸리오수스 폴리머라제 - Pfu
83	돌연변이체 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V9'
84	돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V5'
85	돌연변이체 씨모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V8'
86	야생형 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo'
87	돌연변이체 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V12'
88	돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V8'
89	돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V6'
90	돌연변이체 씨모코쿠스 종 폴리머라제 - '9n-V9'
91	돌연변이체 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V1'
92	돌연변이체 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V14'
93	돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V1'
94	돌연변이체 씨무스 아쿠아티쿠스 폴리머라제 - 'KT-V7'
95	돌연변이체 씨모코쿠스 고르코나리우스 폴리머라제 - 'Tgo-V8'
96	/5Biosg/GCA CTT CGC TTC ACC TCT CTG C*T*T* T - '주형 H'
97	eGeCeAeGeAeGeAGG - '쇼트머 1 (2'MOE)'
98	/5phos/GAeAeGeTeGeC - '쇼트머 3 (2'MOE)'
99	eGeCeAeGeAeGeAGGTGAAGCGAeAeGeTeGeC - '산물 (2'MOE)'
100	eGeCeAeGeAeGeAGGTGAAGC - '쇼트머 1+2 (2'MOE)'
101	/5Phos/rGrU rCrUrG rCrUrU rCrGrC rArCrC rArArA rGrCrC mA*mU*mU* mA*mG*mC - '3'블록 6'
102	rArCrUrCrCrUrCrGrUrGrCrUrCrArArUrGrGrGrCrArGrCrArGrCrArUrCrArUrCrArUrC rArUrCrArUrCrArCrArGrCrArGrGrGrCrCrUrGrGrUrGrCrGrCrGrGrCrArGrCrCrArU

[0839]

	rArUrGrGCrUArGrCraUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGrUrGrArGrArGrGrArUrArArUrAr UrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCrUrUrCrArArArGrUrUrCrArUr ArUrGrGrArArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUrGrGrCrCrArCrGrArArUrUrUrGrArArArUrUrGrA rArGrGrUrGrArArGrGrCrGrArArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUrArUrGrArArGrGrCrArCrCrCrArGra rCrCrGrCrArArArArCrUrGrArArArGrUrUrArCrCrArArArGrGrUrGrGrUrCrCrGrCrUrGrCrCrG rUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGrUrCrCrGrCrArGrUrUrUrArUrGrUrArUrGr GrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUrArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrGr GrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUrUrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUrUrArArArUrG rGrGrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrUrUrGrArArGrArUrGrGrUrGrGrUrGrUrUrUrUr ArCrCrGrUrUrArArCrArCrGrGrArUrArGrCrArGrCrCrUrGrCrArGrArUrGrGrUrGrArArUrUr UrArUrCrUrArUrArArArGrUrUrArArArCrUrGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArArUrUrUrCrCrGrAr GrUrGrArUrGrGrUrCrCrGrGrUrUrArUrGrCrArGrArArArArGrArCrCrArUrGrGrGrUrUrGrG rGrArArGrCrArArGrCrArGrCrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrGrArArGrArUrGrCrGrC rArCrUrGrArArArGrGrUrGrArArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCrUrGrArArAg rArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrUrArUrGrArUrGrCrArGrArGrUrUrArArArArCrArCrCrUrArC rArArArGrCrCrArArArArArGrCrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArArA rUrGrUrUrArArArUrArUrCrArArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrArGrCrCrArArArCrGrArGrG rArUrUrArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArArGrG rCrGrCrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGrArUrGrArArCrUrGrUrArUrArArGrUr ArArCrUrCrGrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrArArArCrArArGrCrCrGrArArArGrGrAr ArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrArGrCrArArUrArArGrUrCrU rGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC - '산물-892mer 1'
103	mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrArArUrGrGrCrArGrCrArGrCrCrArUr CrArUrCrArUrCrArUrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGrCrGrGrG CrArGrCrCrArUrArUrGrGrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGrUrGrArArGrArGrG rArUrArArUrArUrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCrUrUrCrArArA rGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUrGrGrCrCrArCrGrArArUrUrGr ArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrGrCrGrArArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUrArUrGrArArGrGrC rArCrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArArCrUrGrArArArGrUrUrArCrCrArArArGrGrUrGrGrUrCrCr GrCrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGrUrCrCrGrCrArGrUrUrUrA rUrGrUrArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUrArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArU rArUrCrCrGrGrArUrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUrUrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUr UrUrArArArUrGrGrGrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrUrUrGrArArGrArUrGrGrUrGrGu rGrUrUrGrUrUrArCrCrGrUrUrArCrArCrArGrGrArUrArGrCrArGrCrCrUrGrCrArGrGrArUrGr GrUrGrArArUrUrUrArUrCrUrArUrArArArGrUrUrArArArCrUrGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArArUr UrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUrCrCrGrGrUrUrArUrGrCrArGrArArArArGrArCrCrArUr

[illegible]

[0841]

[illegible]

	ΨrAm1ΨrCrCrGrGrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrCm1ΨrGrArArArCm1ΨrGrArGrCm1Ψm1Ψm1 ΨrCrCrGrGrArArGrGm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrArArAm1ΨrGrGrGrArArCrGm1ΨrGm1ΨrGrAm 1ΨrGrArAm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrGrArArGrAm1ΨrGrGm1ΨrGrGm1ΨrGm1Ψm1ΨrGm1Ψ m1ΨrArCrCrGm1Ψm1ΨrArCrArCrArGrGrAm1ΨrArGrCrArGrCm1ΨrGrCrArGrGrAm1Ψ rGrGm1ΨrGrArAm1Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrCm1ΨrAm1ΨrArArGrAm1Ψm1ΨrArArCm1Ψ rGrCrGm1ΨrGrGrCrArCrGrArAm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrCrCrGrArGm1ΨrGrAm1ΨrGrGm1Ψr CrCrGrGm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrCrArGrArArArArGrArCrCm1ΨrGrGrGm1Ψm1ΨrGrGrG rArArGrCrArArGrCrArGrCrGrArArArCm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrCrCrGrGrArArGrAm1Ψ rGrGrCrGrCrArCm1ΨrGrArArArGrGm1ΨrGrArArAm1Ψm1ΨrArArArCrArGrCm1ΨrCm 1ΨrGrArArGrCm1ΨrGrArArArGrAm1ΨrGrGrCrGrGm1ΨrCrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrAm1Ψr GrCrArGrArGrAm1Ψm1ΨrArArArCrCrArCrCm1ΨrArCrArArGrCrCrArArArArGrCrCr GrGm1Ψm1ΨrCrArGrCm1ΨrGrCm1ΨrGrGm1ΨrGrCm1ΨrAm1ΨrArAm1ΨrGm1Ψ m1ΨrArAm1ΨrAm1ΨrCrArArCm1ΨrGrGrAm1ΨrAm1ΨrCrArCrArGrCrCrArCrArArCr GrArGrGrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrArCrCrAm1Ψm1ΨrGm1Ψm1ΨrGrArArCrArGm1ΨrAm1Ψr GrArArCrGm1ΨrGrCrArGrArArGrGm1ΨrCrGrCrCm1ΨrArGm1ΨrArCrCrGrGm1ΨrGrG m1ΨrAm1ΨrGrGrAm1ΨrGrArArCm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrArArGm1ΨrArArCm1ΨrCrGrArGr ArGrAm1ΨrCrCrGrGrCm1ΨrGrCm1ΨrArArCrArArGrCrCrGrArArArGrGrArGrCm1 ΨrGrArGm1Ψm1ΨrGrGrCm1ΨrGrCm1ΨrGrCrArCrCrGm1ΨrGrArGrCrArAm1ΨrArA rGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmA*mU*mU*mA*mG*mC - '산물- 892mer 5'
108	rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArA*rU*rG*rG*rG*rC*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rC*rA*r U*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rG*rG*rC *rC*rU*rG*rG*rU*rG*rC*rC*rG*rC*rG*rC*rG*rG*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rU*rA*rU*rG* rG*rC*rU*rA*rG*rC*rA*rU*rG*rG*rU*rG*rA*rG*rC*rA*rA*rG*rG*rU*rG*rA*rA*r G*rA*rG*rG*rA*rU*rA*rA*rU*rA*rU*rG*rG*rC*rC*rA*rU*rC*rA*rU*rC*rA*rA*rA*rG *rA*rA*rU*rU*rC*rA*rU*rG*rC*rG*rC*rU*rU*rC*rA*rA*rG*rU*rU*rC*rA*rU*rA*r U*rG*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rA*rG*rC*rG*rU*rU*rA*rA*rU*rG*rG*rC*rC*rA*rC*rG*rA *rA*rU*rU*rU*rG*rA*rA*rA*rU*rU*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rG*rA*rG*rG*rC*rG*rA* rA*rG*rG*rU*rC*rG*rU*rC*rC*rG*rU*rA*rU*rG*rA*rA*rG*rG*rC*rA*rC*rC*rC*rA*r G*rA*rC*rC*rG*rC*rA*rA*rA*rA*rC*rU*rG*rA*rA*rA*rG*rU*rU*rA*rC*rC*rA*rA*rA* rG*rG*rU*rG*rG*rU*rC*rC*rG*rC*rU*rG*rC*rC*rG*rU*rU*rU*rG*rC*rA*rU*rG*rG*r G*rA*rU*rA*rU*rU*rC*rU*rG*rA*rG*rU*rC*rG*rC*rA*rG*rU*rU*rU*rA*rU*rG*rU *rA*rU*rG*rG*rU*rA*rG*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rU*rA*rU*rG*rU*rU*rA*rA*rA*rC*r A*rU*rC*rC*rG*rG*rC*rA*rG*rA*rU*rA*rU*rC*rC*rG*rG*rA*rU*rU*rA*rU*rC*rU *rG*rA*rA*rA*rC*rU*rG*rA*rG*rC*rU*rU*rU*rC*rG*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rU*rU* rU*rA*rA*rA*rU*rG*rG*rG*rA*rA*rC*rG*rU*rG*rU*rG*rA*rU*rG*rA*rA*rU*rU*rU*r

[0843]

U*rG*rA*rA*rG*rA*rU*rG*rG*rU*rG*rG*rU*rG*rU*rG*rU*rA*rC*rC*rG*rU*r U*rA*rC*rA*rC*rA*rG*rG*rA*rU*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rC*rU*rG*rC*rA*rG*rA*rU *rG*rG*rU*rG*rA*rA*rU*rU*rA*rU*rC*rU*rA*rU*rA*rA*rG*rU*rU*rA*rA*rA* rC*rU*rG*rC*rG*rU*rG*rG*rC*rA*rC*rG*rA*rA*rU*rU*rU*rC*rC*rG*rA*rG*rU*r G*rA*rU*rG*rG*rU*rC*rC*rG*rG*rU*rU*rA*rU*rG*rC*rA*rG*rA*rA*rA*rA*rG*rA *rC*rC*rA*rU*rG*rG*rG*rU*rU*rG*rG*rA*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rA*rG*rC*rG* rA*rA*rC*rG*rU*rA*rU*rG*rU*rA*rU*rC*rC*rG*rG*rA*rA*rG*rA*rU*rG*rC*rG*r C*rA*rC*rU*rG*rA*rA*rA*rG*rG*rU*rG*rA*rA*rA*rU*rU*rA*rA*rC*rA*rG*rC*rG *rU*rC*rU*rG*rA*rA*rG*rC*rU*rG*rA*rA*rA*rG*rA*rU*rG*rG*rC*rG*rG*rU*rC*rA* rU*rU*rA*rU*rG*rA*rU*rG*rC*rA*rG*rA*rA*rG*rU*rA*rA*rA*rC*rC*rA*rC*rC *rU*rA*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rC*rA*rA*rA*rA*rG*rC*rC*rG*rG*rU*rU*rC*rA*rG*r C*rU*rG*rC*rC*rU*rG*rG*rU*rG*rC*rA*rU*rA*rU*rA*rA*rU*rG*rU*rU*rA*rA*rU*rA *rU*rC*rA*rA*rA*rC*rU*rG*rA*rU*rA*rU*rC*rA*rC*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rC*rA*r A*rC*rG*rA*rG*rG*rA*rU*rU*rA*rU*rA*rC*rC*rA*rU*rU*rG*rU*rU*rG*rA*rA*rC*rA *rG*rU*rA*rU*rG*rA*rA*rC*rG*rU*rG*rC*rA*rG*rA*rA*rG*rG*rU*rC*rG*rC*rC*rA* rU*rA*rG*rU*rA*rC*rC*rG*rG*rU*rG*rG*rU*rA*rU*rG*rG*rA*rU*rG*rA*rA*rC*rU*r G*rU*rA*rU*rA*rA*rG*rU*rA*rA*rC*rU*rC*rG*rA*rG*rA*rG*rA*rU*rC*rC*rG*rG*rC *rU*rG*rC*rU*rA*rA*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rC*rG*rA*rA*rG*rG*rA*rA*rG*rC*r U*rG*rA*rG*rU*rU*rG*rG*rC*rU*rG*rC*rU*rG*rC*rC*rA*rC*rC*rG*rC*rU*rG*rA*rG *rC*rA*rA*rU*rA*rArGrUrCrUrUrCrGrCrArCrArArGrCrCmA*mU*mU*mA*m G*mC - '산물-892mer 6'

[0844]

SEQ ID NO:1

/5Biosg/GCTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGCACCGAGGAGT

SEQ ID NO:2

ACTCCTCGGT

SEQ ID NO:3

/5phos/AGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC

SEQ ID NO:4

/5phos/GTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC

SEQ ID NO:5

/5Phos/GCACCAAAGC/Me-dC/ATTAGC

SEQ ID NO:6

/5Phos/GC/Me-dC/ATTAGC

SEQ ID NO:7

ACTCCTCGGTG

[0845]

SEQ ID NO:8
ACTCCTCGGTGC

SEQ ID NO:9
ACTCCTCGGTGCC

SEQ ID NO:10
ACTCCTCGGTGCCT

SEQ ID NO:11
ACTCCTCGGTGCCTC

SEQ ID NO:12
ACTCCTCGGTGCCTCA

SEQ ID NO:13
ACTCCTCGGTGCCTCAG

SEQ ID NO:14
ACTCCTCGGTGCCTCAGT

SEQ ID NO:15
ACTCCTCGGTGCCTCAGTC

SEQ ID NO:16
ACTCCTCGGTGCCTCAGTCT

SEQ ID NO:17
ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTG

SEQ ID NO:18
ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGC

SEQ ID NO:19
ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCT

[0846]

SEQ ID NO:20

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTT

SEQ ID NO:21

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTC

SEQ ID NO:22

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCG

SEQ ID NO:23

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGC

SEQ ID NO:24

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCA

SEQ ID NO:25

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCAC

SEQ ID NO:26

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACC

SEQ ID NO:27

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCA

SEQ ID NO:28

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAA

SEQ ID NO:29

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAA

SEQ ID NO:30

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAG

SEQ ID NO:31

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGC

[0847]

SEQ ID NO:32

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCC

SEQ ID NO:33

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCA

SEQ ID NO:34

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCAT

SEQ ID NO:35

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATT

SEQ ID NO:36

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTA

SEQ ID NO:37

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAG

SEQ ID NO:38

ACTCCTCGGTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC

SEQ ID NO:39

MIVSDIEANALLESVTKFHCGVIYDYSTA EYVSYP SDFGAYLDALEAEVARGGLIVFHNGHKYDVP
 ALTKLAKLQLNREFHLPRENCIDTLVLSRLIHSNLKDTDMGLLRSGKLPGRFGSHALEAWGYRLGEMKGEY
 KDDFKRMLEE QGEEYVDGMEWWNFNEEMMDYNVQDVVTKALLEKLLSDKHYPPEIDFTDVGYTTFW
 ESLEAVDIEHRAAWLLAQERNGF PDKAIEELYVELAARRSELLRKL TETFGSWYQPKGGTEMFCHPRTG
 KPLPKYPRIKTPKVG GIFFKPKNKAQREGREPCELDTREYVAGAPYTPVEHVFNPSRDHIQKKLQEAGWV
 PTKYTDKGAPVVDDEVLEGV RVDDPEKQAAIDLIKEYLMIQKRIGQSAEGDKAWLRYVAEDGKIHG SVNPN
 GAVTGRATHAFPNLAQIPGVRSPYGEQCRAAFGA EHHLDGITGKPWWQAGIDASGLELRCLAHFMARFDNG
 EYAHEILNGDIHTKNQIAAELPTRDNAKTFIYGFLYGAGDEKIGQIVGAGKERGKELKKKFLENTPAIAALRES
 IQQTLVESSQWVAGEQQVKWKR RWIKGLDGRKVHVRSPHAALNTLLQSAGALICKLWIIKTEEMLV EKG
 LKHGWDGDFAYMAWVHDEIQVGCRT EETIAQVVIETAQEAMRWVGDHWNFRCLLDTEGKMGP NWAICH

SEQ ID NO:40

[0848]

MIVLFVDFDYFYAQVEEVNPSLKGKPVVVCVFSGRFEDSGAVATANYEARFGVKAGIPIVEAKKIL
PNAVYLPMPKEVYQQVSSRIMNLLREYSEKIEIASIDEAYLDISDKVRDYREAYNLGLEIKNKILEKEKITVTVG
ISKNVKFAKIAADMAKPNGIKVIDDEEVKRLIRELDIADVPGIGNITAEKLLKGLINKLVDTLSIEFDKLGKMGIG
EAKAKYLISLARDEYNPIRTRVRKISIGRIVTMKRNSRNLEEIKPYLFRAIEESYYKLDKRIPKAIHVAVTEDL
DIVSRGRTPPHGISKETAYSESVKLLQKILEEDERKIRRIGVRFSKFIEAIGLDKFFDT

SEQ ID NO:41

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTWVKVKRA
EKVQKFLGRPIEVWKLNFHPQDVPVPAIRDRIRAHPAVVDIYDYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAI
ATLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVWSTEKEMIKRFLRVREKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGKFTLGRDGSSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYLEAVYEAVFGPKPEK
VYAEETIAQAWESGGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNPKDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKFKCDPFGFIPSLLDLLEERQKIKRKMATVDPLEKLLDYRQLIKILANSFYGYGYAKARWY
CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGKVLADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADEFDPTKHRY
DAEYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLVKVGKK

SEQ ID NO:42

MKEFYISIIETVGNINIVERYIDENGKERTREVEYLPTMFRHCKEESKYKDIYGKNCAPQKFPMSMKDAR
DWMKRMEDIGLEALGMNDFKLAYSIDTYGSEIVYDRKFVRVANCIEVTGDKFPDPMKAEYEIDAITHYDSI
DDRIFYVFDLLNSMYGSVSKWDALAAKLDCEGGDEVQEILDRVIYMPFDNERDMLMEYINLWEQKRAIF
TGWNIIEGFDVPYIMNRVKMILGERSMKRFSPIGRVKSCLIQNMYSKEIYSIDGVSILDYLDLYKKFAFTNLP
SFSLESVAQHETKKGKLPYDGPINKLRETNHQRYISYNIIDVESVQAIDKIRGFIDLVLMSYYAKMPFSGVMS
PIKTWDAIIFNSLKGHEKVIPQQGSHVQSFPGAFFVPEPKIARRYIMSFDLTSLYPSIIRQVNIISPETIRGQFK
VHPIHEYIAGTAPKPSDEYSCSPNGWMYDKHQEGEIPKEIAKVFFQRKDWKKMFAEEMNAEAIKKIIMKGA
GSCSTKPEVERYVKFSDDFLNELSNYTESVLNSLIEEKEAATLANTNQLNRKILINSYLGALGNIHFYYDLR
NATAITIFGQVGIQWIARKINEYLNKVCCTNDEDFIAAGDTSVYVCVDKVIKVGGLDRFKEQNDLVEFMNQ
FGKKKMEPMIDVAYRELCDYMNREHLMHMDREAISCPPLGSKGVGGFWKAKKRYALNVYDMEDKRFAP
HLKIMGMETQQSSTPKAVQEALEESIRRLIQEGEESVQEYYKNFEKEYRQLDYKVIAEVKTANDIAKYDDKG
WPGFKCFFHIRGVLTYYRAVSGLVAPILDGNKVMVLPREGNPFQDKCIAWPSGTLPKEIRSDVLSWIDH
STLFQKSFVKPLAGMCESAGMDYEEKASLDLFLG

SEQ ID NO:43

MALEEAPWPPPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL

[0849]

YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDILHPRGTGRHLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNIPIVTRPLGQIRRAFIIEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPIYEEAQAFIERYFQSFPKVRRAWIEKTLEEGRRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSVEREAERMAFNMPVQGTAAADLMKLMVKLFPRLEEMGARMMLLQVHDELVLLEAPK
ERAEEAVARLAKEVMIEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:44

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKEGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVE
KVQKKFLGRPVEVWVKLYFTHPQDVPAPDRKIREHPAVIDIYEDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIE
TLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDLITYNGDNFDF
AYLKKRCEKLGINFALGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKKEK
VYAEITTAWETGENLERVARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRKA
YERNELAPNPKDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNRGCKEYDVA
PQVGHRFCKDFPGFIPSLLDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLLDYRQRAIKILANSYYGYGYARARWYCK
ECAESVTAWGREYITMTIKEIEEKYGFVYISDTDGFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEG
FYKRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKGDVKEAVRIVKEVTEKLSKYEV
PPEKLVIEHQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDFEDPTKHKYDA
EYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT

SEQ ID NO:45

MNIFNTNPFKAVSFVESAVKKALETSGYLIADCKYDGVGRNIVVDNVAEAAWLSRVSKFIPALEHLN
GFDKRWQQLNDDRCIFPDGFMLDGELMVKGVDFTNGSGLLRTKWVKRDNMGFHLTNVPTKLTGPKGREVI
DGKFEFHLDPKRLSVRLYAVMPIHIAESGEDYDVQNLLMPYHVEAMRSLLEYFPEIEWLIAETYEVYDMDSL
TELYEEKRAEGHEGLIVKDPQGIYKRGKSGWWKLKPECEADGIIQGVNWWGTEGLANEGKVIGFSVLLETGR
LVDANNISRALMDEFTSNVKAHGEDFYNGWACQVNYMEATPDGSLRHPSEKFRGTEDNPQEKM

SEQ ID NO:46

/5Biosg/GCTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGCACCGAGGAGTTTT

SEQ ID NO:47

CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACCTGATGACTGAGGCACCGAGGAGTTTTT

SEQ ID NO:48

CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACCTCTTCACCTTTGCTCACCATTGTAGTCCATCGGATATATCTCC
TTCGGATCCTGAGGCACCGAGGAGTTTTT

[0850]

SEQ ID NO:49

ACTCCrUfCfGfGfU

SEQ ID NO:50

ACTCCTCGGTGCCTCA

SEQ ID NO:51

rArCrUrCrCrUrCrGrUrGrCrCrUrCrA

SEQ ID NO:52

mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCmUmCmA

SEQ ID NO:53

mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrA

SEQ ID NO:54

GTCTGCTTCGCACCAAAGCCATTAGC

SEQ ID NO:55

ACTCCTCGGTGCCTCAGGATCCGAAGGAGATATATCCGATGGACTACAAATGGTGAGCAAAGGT
GAAGAG

SEQ ID NO:56

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKVTAKRHGTVVKVKRA
EKVQKFLGRPIEVWKLYFNHPQDVPARDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDI
ETLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPHYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPKEK
VYAEETIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKFKCDFPGFIPSLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLLDYRQRAIKILANSFYGYGYAKARWY
CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADEFDPTKHRY
DAEYYIENQVLPAYERILKAFGYRKEDLRYQTKQVGLGAWLVKVGKK

SEQ ID NO:57

[0851]

MILDTDYITEDGKPVIRIFKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
 EKVKKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIHEPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
 ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDL PYVDVSTEEKEMIKRFLKVVEKDPDLITYNGDNFD
 FAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
 VYAEIEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
 AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCGEYDV
 APQVGHKFCKDFPGFIPSLLDLLEERQKVKKMKATIDPIEKKLDYRQRLIGILANSFYGYGYAKARWYC
 KECAESVTAWGRQYLETITREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
 GFYKRGFVFTKKKYAVIDEEDKITTVGLEIVRVDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
 VPPEKLVIYEQITRDLDKYATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKSGRIGDRAIPDEFDPAKHRYD
 AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:58

MILDTDYITEDGKPVIRIFKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
 EKVKKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIHEPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDI
 ETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDL PYVDVSTEEKEMIKRFLKVVEKDPDLITYNGDNFD
 FAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
 VYAEIEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
 AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
 APQVGHKFCKDFPGFIPSLLDLLEERQKVKKMKATIDPIEKKLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWYC
 KECAESVTAWGRQYIETITREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
 GFYKRGFATKKKYAVIDEEDKITTRGLKMVRWDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
 EVPEQLVIYQIPITKQLHDYRARGPHVSVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVPKGSGRIGDRAIPDEFDPAKHKY
 DAGYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:59

MALEEAPWPPPEGAFFGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
 VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFAYLWGRLEGEERLLWL
 YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAI
 GKTEKTGKRSTSAAALEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
 DPNLQNPVRTPLGQRIRRAFAEEGWLLVALDYSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
 PREAVNPMMRRAKTINFGVLYGMSAHRLSQVLAIPYEEAQAFIERYFQSFPKVRWIEKTLLEGRRRRGYVE
 TLFGRRRYVPDLEARVKSVRNAAERRAFNMPVQGTADLMKLMVKLFPRLEEMGARMMLLQVHDELVLEAP
 KERAEEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:60

[0852]

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRA
 EKVKQKFLGRPIEVWKLYFNHPQDQPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAT
 ATLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVSTEKEMIKRFLRVVREKDPDLITYNGDNFD
 FAYLKKRCEELGIKFTLGRDGGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPKEK
 VYAEIEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
 AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYD
 VAPEVGHKFKCDFPGFIPSLLDLLEERQKIKRKMATVDPLEKLLDYRQLIKILANSFYGYGYAKARWY
 CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
 EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDEEAVRIVKEVTEKLSKY
 EVPPEKLVIIHKQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPTKHRY
 DAEYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:61

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRA
 EKVKQKFLGRPIEVWKLYFNHPQDQPAIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAT
 ATLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVSTEKEMIKRFLRVVREKDPDLITYNGDNFD
 FAYLKKRCEELGIKFTLGRDGGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPKEK
 VYAEIEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
 AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYD
 VAPEVGHKFKCDFPGFIPSLLDLLEERQKIKRKMATVDPLEKLLDYRQLIKILANSFYGYGYAKARWY
 CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLRATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
 EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDEEAVRIVKEVTEKLSKY
 EVPPEKLVIIHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPTKHRY
 DAEYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:62

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTWVTVKRVE
 KVQKKFLGRPVEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIE
 TLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDLITYDGNFDF
 AYLKKRCEKLGINFALGRDGGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEK
 VYAEIETTAWETGENLERVARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRKA
 YERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVA
 PQVGHRFCKDFPGFIPSLLDLLEERQKIKKKMKATIDPIERKLLDYRQLIKILANSYGYGYARARWYCK
 ECAESVTAWGREYITMTIKEEYKFKVIYSDDGFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEG
 FYKRGFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRNWSEIAKETQARVLEALLKGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYEV
 PPEKLVIIHKQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPTKHRYDA
 EYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT

[0853]

SEQ ID NO:63

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
EKVKKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEFEAEGLMISYADEEGARVITWKNIDLPHYVDVSTEKEMIKRFLKVVEKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKK
VYAEETIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCGEYDV
APQVGHKCFKDFPGFIPSLGLLEERQKVKKMKMATIDPIEKLLDYRQRLIGILANSFYGYGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYLETITREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTVGLEIVRVDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
VPPEKLYIEQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKSGSGRIGDRAIPDEFDPKAKHRYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:64

MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGFEKIELDPHFQPYIYALLKDDSAIEEIKAIKGERHGKTVRVLDAV
KVRKKFLGREVEVWKLI FEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFDIE
TFYHEGDEFGKEIIMISYADEEEARVITWKNIDLPHYVDVVSNEREMIKRFVQVVEKDPDVIITYNGDNFDL
PYLIKRAEKLGVRLVLRDKEHPEPKIQRMGDSFAVEIKGRIFDLPVVRRTINLPTYTLEAVYEAVLGKTKS
KLGAEETIAIWEETESMKKLAQYSMEDARATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSTGNLVEWYLLRV
AYARNELAPNKPDEEYKRRRLRTTYLGGYVKEPEKGLWENIYLDFRSLYPSIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYD
VAPIVGYRFCKDFPGFIPSLGDLIAMRQDIKKMKSTIDPIEKMLDYRQRAIKLLANSYYGYMGYPKARWY
SKECAESVTAWGRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYADTDGFYATIPGEKPELIKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYE
GFYLRGFFVTKKRYAVIDEGRITTRGLEVVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKEGSVEKAVEVVRDVVEKIAKY
RVPLEKLYIHEQITRDLKDYKAIGPHVAIAKRLAARGIKVKPGTIISYIVLKSGSGKISDRVILLTEYDPRKHKYD
PDYYIENQVLPVLRILEAFGYRKEDLRYQSSKQTGLDAWLKR

SEQ ID NO:65

MALEEAPWPPPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNIPTVPLGQIRRAFIAEEGWLLVALDYSQEGRLVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPEYEEAQAFIERYFQSFPKVRWIEKTEEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSVRKRAERMAFNMPVQGTAAADLMKLA MVKLFPRLEEMGARMMLQVHDELVLEAPK
ERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

[0854]

SEQ ID NO:66

MILDTDYITENGKPVIRVFKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRA
EKVQKKFLGRPIEVWKLYFNHPQDVPAlRDRIRAHPAVVDIYEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAl
ATLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGIKFTLGRDSEPKIQRMGDRFAVEVKGRlHFDLYPVlRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPKEK
VYAEElAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEaQLSRLlGQSLWDVSRsSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNlVYLDfRSLYPSlIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKfCKDFPGFIPSLlGDLLERQKIKRKMkATVDPLEKLLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWY
CKEaESVTAWGREYlEMVIRELEEKFGKVLyADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEKLVlHEQITRDlRDKYATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKSGSGRIGDRAIPaDEFDPTKHRY
DAEYIENQVLPaVERILKAFGYRKEDLRYQKTQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:67

MILDTDYITEDGKPVIRlFKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVVTVKRVE
KVQKKFLGRPVEVWKLYFTHPQDVPAlRDKIREHPAVIDIYEDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFAlA
TLYHEGEEFAEGPIlMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVSTEREMIKRFLRVKEKDPDVLITYNGDNFDf
AYLKKRCEKlGINfALGRDSEPKIQRMGDRFAVEVKGRlHFDLYPVlRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEK
VYAEElTTAWETGENLERVARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEaQLSRLlGQSLWDVSRsSTGNLVEWFLLRKA
YERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENlVYLDfRSLYPSlIITHNVSPDTLNREGCKEYDVA
PQVGHRfCKDFPGFIPSLlGDLLERQKlKKMKATIDPIERKLLDYRQRRIKILANSYGYGYARARWYCK
EaESVTAWGREYITMTlKEIEEKYGKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEG
FYKRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKDGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYEV
PPEKLVlHIQITRDlRDKYATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKSGSGRIGDRAIPFDEFDPTKHKYDA
EYIENQVLPaVERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT

SEQ ID NO:68

MILDTDYITEDGKPVIRlFKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVRA
EKVKKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKlKEHPAVVDIYEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAl
ATLYHEGEEFAEGPIlMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVEKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKlGVKfILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRlHFDLYPVlRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKEK
VYAEElAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEaQLSRLVGQSLWDVSRsSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENlVYLDfRSLYPSlIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHKfCKDFPGFIPSLlGDLLERQKVKKMKATIDPIEKLLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWYC
KEaESVTAWGRQYIETIREIEEKFGKVLyADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE

[0855]

VPPEKLVIEQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKSGSRIGDRAIPDEFDPKHKYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:69

MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGFEKIELDPHFQPYIYALLKDDSAIEEIKAIKGERHKGKTVRVLDAV
KVRKKFLGREVEVWKLIFEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFAIA
TFYHEGDEFKGGEIIMISYADEEEARVITWKNIDLPHYVDVVSNEREMIKRFVQVKEKDPDVITYNGDNFDL
PYLIKRAEKLGVRLVLRDKEHPEPKIQRMGDSFAVEIKGRIHFDLPVVRRTINLPTYTLEAVYEAVLGKTKS
KLGAEETAAIWETEESMKKLAQYSMEDARATYELGKEFFPMEAEKALIGQSVWDVSRSTGNLVEWYLLRV
AYARNELAPNKPDEEEYKRRRLRTTYLGGYVKEPEKGLWENIYLDFRSLVPSIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYD
VAPIGVYRFCKDFPGFIPSLGDLIAMRQDIKKMKSTIDPIEKKMLDYRQRLIKLLANSYYGYMGYPKARWY
SKECAESVTAWGRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYADTDGFYATIPGEKPELIKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYE
GFYLRGFFVTKKRYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKEGVSVEKAVEVVRDWEKIAKY
RVPLEKLVIEHQITRDLKDYKAIGPHVAIAKRLAARGIKVKPGTIISYIVLKSGSKISDRVILLTEYDPRKHKYD
PDYYIENQVLPVLRILEAFGYRKEDLRYQSSKQTGLDAWLKR

SEQ ID NO:70

MALEEAPWPPPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLHAHEATGVRLDVAYLRLALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHAVEIKILQYRELTKLKSTYIDPLPELIHPRTGRHLTRFNQTATATGRSSS
DPNLQNPVTRPLGQIRRAFAIEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPEYEEAQAFIERYFQSFPKVRWIEKTLEEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSVERAAERMAFNMPVQGTAAADMKLAMVKLFPRLEEMGARMMLQVHDELVLEAPK
ERAEAVALAKEVMGEGVPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKV

SEQ ID NO:71

MILDTDYITENGKPVIRVFKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTWVKVKRA
EKVQKFLGRPIEVWKLIFNHPQDVPAPDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFI
ATLYHEGEEFGTGPIIMISYADGSEARVITWKKIDLPHYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGPKPEK
VYAEETIAQAWESGELERVARYSMEDAKVTELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKFCDFPGFIPSLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKKLDYRQRRIKILANSFYGYGYAKARWY
CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKRYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY

[0856]

EVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKSGSRIGDRAIPDEFDPTKHRY
DAEYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:72

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKKITAERHGTVTVKRVE
KVQKKFLGRPVEVWKLIFYTHPQDQPAIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVSTEREMIKRFLRVKEKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRCEKLGINFALGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEK
VYAEIITAWETGENLERVARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRKA
YERNELAPNKPDEKELARRRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLGPSIITHNVSPDTLNREGCKEYDVA
PQVGHRFCKDFPGFIPSLGLDLEERQKIKKKMKATIDPIERKLLDYRQRLIKILANSYGYGYARARWYCK
ECAESVTAWGREYITMTIKEEEKYGFVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEG
FYKRGFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKGDGDEKAVRIVKEVTEKLSKYEY
PPEKLVIEHQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKSGSRIGDRAIPDEFDPTKHRYDA
EYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT

SEQ ID NO:73

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
EKVKKFLGRPIEVWKLIFYTHPQDQPAIRDKIREHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGKFLGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKEK
VYAEIIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHRFCKDFPGFIPSLGLDLEERQKVKKMKATIDPIEKKLLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFATKKKYAVIDEEDKITTRGLKMVRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEQLVIYQPIITQLHDYRARGPHVSAKRLAARGIKIRPGTVISYIVPKGSGRIGDRAIPDEFDPAKHKY
DAGYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:74

MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGFEKIELDPHFQPYIYALLKDDSAIEEIKAIKGERHGKTVRVLDAV
KVRKKFLGREVEVWKLIFEHPQDVPAMRGKIREHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFAIA
TFYHEGDEFGKEIIMISYADEEEARVITWKNIDLPYVDVVSNEREMIKRFVQVVEKDPDVIITYNGDNFDL
PYLIKRAEKLGVRLVLRDKEHPEPKIQRMGDSFAVEIKGRIHFDLPVVRRTINLPTYTLEAVYEAVLGKTKS
KLGAEETIAIWETEESMKLAQYSMEDARATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSTGNLVEWYLLRV
AYARNELAPNKPDEEYKRRRLTTYLGGYVKEPEKGLWENIYLDFRSLVPSIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYD
VAPIVGYRCKDFPGFIPSLGLDIAMRQDIKKMKSTIDPIEKKMLDYRQRAIKLLANSYGYMGYPKARWY

[0857]

SKECAESVTAWGRHYIEMTIREIEEKFGFKVLYADTDGFYATIPGEKPELIKKAKEFLNYINSKLPGLLELEYE
GFYLRGFFVTKKRYAVIDEEGRITTRGLEVVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKEGSVEKAVEVVRDVVEKIAKY
RVPLEKLVIEHQITRDLKDYKAIGPHVAIAKRLAARGIKVKPGTIISYIVLKSGSGKISDRVILLTEYDPRKHKYD
PDYYIENQVLPVAVLRILEAFGYRKEDLRYQSSKQTGLDAWLKR

SEQ ID NO:75

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDELGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLPDHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNPVTRPLGQRIRRAFIAEVGWLLVLDYSQMLRVLHLSDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPIYEEAQAFIERYQSFVKVRAWIEKTLLEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSVEAAERMAFNMPVQGTAAADLMKMLAMVKLFPRLEEMGARMMLQVHDELVLEAPK
ERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:76

CTAATGGCTTTGGTGCGAAGCAGACTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGCTTCCTT
TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGATCTCTCGAGTTACTTATACAGTTACCCATACCACCGGTAATGGCG
ACCTTCTGCACGTTACTGTTCAACAATGGTATAATCCTCGTTGGCTGGTGATATCCAGTTTGATA
TTAACAATTATATGCACCGAGCAGTGAACCGCTTTTGGCTTTGTAGGTGGTTTAACTTCTGCATCAT
AATGACCGCCATCTTTCAGCTTCAGACGCTGTTAATTTACCTTTTCAGTGCGCCATCTTCGGATACATA
CGTTCGCTGCTGCTTCCCAACCATGGTCTTTTCTGCATAACCGGACCATCACTCGGAAAATTCGTGC
CACGCAGTTTAACTTTATAGATAAATTCACCATCCTGCAGGCTGCTATCCTGTGTAAACGTAACAACACC
ACCATCTTCAAAATTCATCACAGTTCCCATTTAAACCTTCCGGAAGCTCAGTTTCAGATAATCCGGGA
TATCTGCCGGATGTTTAAATAGGCTTTGCTACCATACATAAACTGCGGACTCAGAATATCCCATGCAAA
CGGCAGCGGACCACCTTTGGTAACTTTAGTTTTCGCGTCTGGGTGCCTTCATACGGACGACCTTCGCCT
TCACCTTCAATTTCAAATTCGTGGCCATTAAACGCTACCTTCATATGAATTTGAAGCGCATGAATTTCTT
GATGATGGCCATATTATCCTCTTACCTTTGCTCACCATGCTAGCCATATGGCTGCCGCGCGCACCAGG
CCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATTGAGGCACCGAGGAGTTTTT

SEQ ID NO:77

MILDTDYITENGPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRA
EKVQKFLGRPIEVWKLYFNHPQDVPAIRDRIRAHPAVVDIYEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFAI
ATLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKRCCELGIKFTLGRDSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYLEAVYEAVFGPKPEK
VYAEETAAWESGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNRREGCKEYD

[0858]

VAPEVGHKFKCDFPGFIPSLLDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKLLDYRQRIKILANSFYGYGYAKARWY
CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEKGKITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEKLVIIHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPTKHY
DAEYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:78

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEEVKITAERHGTVTVKRVE
KVQKKFLGRPVEVWKLYFTHPQDVPDIRDKIREHPAVIDIYEYDIPFAKRYLIDKGLVPMEGDEELKMLAFDIE
TLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNVDLPYVDVSTEREMIKRFLRVVKEKDPDLITYDGDNDF
AYLKKRCEKLGINFALGRDSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGQPKEK
VYAEIITAWETGENLERVARYSMEDAKVTYELGKEFLPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLRKA
YERNELAPNKPDEKELARRQSYEGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYDVA
PQVGHKFKCDFPGFIPSLLDLLEERQKIKKMKATIDPIERKLLDYRQRIKILANSYGYGYARARWYCK
ECAESVTAWGREYITMTIKEEYKGYKVIYSDTDGFFATIPGADAETVKKKAMEFLKYINAKLPGALELEYEG
FYKRGFFVTKKKYAVIDEKGKITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLEALLKGDVEKAVRIVKEVTEKLSKYEV
PPEKLVIIHQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPTKHKYDA
EYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTRQVGLSAWLKPKGT

SEQ ID NO:79

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKITAERHGTTVRVVRA
EKVKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGKVFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKEK
VYAEIIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLRKA
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHKFKCDFPGFIPSLLDLLEERQKVKKMKATIDPIEKLLDYRQRIKILANSFYGYGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYIETIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYQ
VPPQQLAIYQPIITRALQDYKAKGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGKIGDRAIPDEFDPAKHKYD
AEYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:80

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEETARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDELGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS

[0859]

DPNLQNPVTRPLGQRIRRTFIAEEGRQLVALDYSQTGLRVLHLSGDENLIRVFQEGRDHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAKTIINFGVLYGMSAHRLSQELAIPEEAAQAFIERYFQSFQKVRWIEKLEEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSREAAERMAFNMPVQGTADLMKLMVKLFPRLEEMGARMMLLQVHDELVLAPK
ERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:81

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTWVKVKRA
EKVQKFLGRPIEVWKLYFNHPQDVPDIRAHPAVVDIYEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDI
ETLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDLPYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGPKPEK
VYAEIAQAWESGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRGGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSQYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKFKDFPGFIPSLGDLLEERQKIKRKMKATVDPLEKLLDYRQRAIKILANSFYGYGYAKARWY
CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEKGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPAEFDPTKHRY
DAEYYIENQVLPAYERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:82

MILDVDYITEEGKPVIRLFFKKENGKFKIEHDRTFRPYIYALLRDDSKIEEVKKITGERHGKIVRIVDVE
KVEKFLGKPIVWVKLYLEHPQDVPITREKVREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGEEELKILAFDIET
LYHEGEEFGKPIIMISYADENEAKVITWKNIDLPYVEVSSEREMIKRFLRIREKDPDIIVTYNGDSFDFPYL
AKRAEKLGIKLTIGRDGSEPKMQRIGDMTAVEVKGRIFDLYHVITRTINLPTYTLEAVYEAIFGPKPEKVYAD
EIAKAWESGENLERVAKYSMEDAKATYELGKEFLPMEIQLSRLVGQPLWDVSRSTGNLVEWFLLRKAYERN
EVAPNKPSEEEYQRRRLRESYTGGFVKEPEKGLWENIVYLDFRALYPSIIITHNVSPDTLNLEGCKNYDIAPQV
GHKFKCDIPGFIPSLGHLLEERQKIKTKMKETQDPIEKILLDYRQKAIKLLANSFYGYGYAKARWYCKECAE
SVTAWGRKYIELVWKELEEKFGFKVLYIDTDGLYATIPGGESEEEKKALEFVKYINSKLPGLLELEYEGFYKR
GFFVTKKRYAVIDEKGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLETILKHGDVEEAVRIVKEVIQKLANYEIPPEK
LAIYEQITRPLHEYKAIGPHVAVAKKLAAGVKIKPGMVIGYIVLRGDGPISNRAIAEEYDPKKHKYDAEYYIE
NQVLPVLRILEGFGYRKEDLRYQKTRQVGLTSWLNIIKS

SEQ ID NO:83

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRRA
EKVKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVEKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGKVFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKPEK
VYAEIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK

[0860]

AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHKFKDFPGFIPSLLDLEERQKVKKMKATIDPIEKKLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYIETIIREIEEFKGFVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEY
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
VPTQHLVIHQITRALNDYKAIGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPKHKYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGRYKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:84

MALEEAPWPPPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDGLPAI
GKTEKTGKRSTSAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNPVTRPLGQRIRRAFAIEEGWLLVALDYSQEGLRVLAHLSGDENLIRVFQEGRIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAIPIYEEAQAFIERYFQSFKVRWIEKTEEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSVEREAERMAFNMPVQGTAAIDLMLAMVKLFPRLEEMGARMLLQVHDELVLEAPK
ERAFAVARLAKEVMGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:85

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRA
EKVQKFLSRPIEVWKLYFNHPQDVPAPDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDI
ETLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVITWKKIDL PYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGKFTLGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLDAVYEVVFGKPKKEK
VYAEIEAQAWKSGEGLERVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKFKDFPGFIPSLLDLEERQKIKRKMATVDPLEKKLLDYRQRAIKILANSFYGYGYAKARWY
CKECAESVTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYIKPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKC
EVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPKTHRY
DAEYYIENQVLPAPERILKAFGRYKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:86

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRRA
EKVKKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDVPAPDRDKIHEPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDI
ETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDL PYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLVKIFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
VYAEIEAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDV

[0861]

APQVGHKFCDFPGFIPSLGLLEERQKVKKMKATIDPIEKLLDYRQRAIKILANSFYGGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYIETIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
VPPEKLVIEYQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPKHKYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:87

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
EKVKKKFLGRPIEVWKLIFTHPQDVPDIRDKIKEHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVEKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGKVLGREGSEPIQRMGDRFAVEVKGRIFHDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
VYAEIEAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHKFCDFPGFIPSLGLLEERQKVKKMKATIDPIEKLLDYRQRIKILANSFYGGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYIETIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
VPPEKLVIEYQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPKHKYD
EYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:88

MALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDELGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNIPVRTPLGQIRRAFIIEEGWLLVALDYSQEGRLVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVNPMMRRAAKTINFGVLYGMSAHLRSQKLAIPYEEAQAFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVE
TLFGRRRYVPDLEARVKSVRNAAERRAFNMPVQGTAAADLMKLMVKLFPRLLEEMGARMMLQVHDELVLEAP
KERAEEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:89

MALGEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDELGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNIPVRTPLGQIRRAFIIEEGWLLVALDYSQEGRLVLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHLRSQVLAIPYEEAQAFIERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVET

[0862]

LFGRRRYVPDLEARVKSVEREAERMAFNMPVQGTAAIDMLKMLAMVKLFPRLEEMGARMMLQVHDELVLLEAPK
ERAFAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:90

MILDTDYITENGKPVIRVFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKVTAKRHGTVVKVKRA
EKVQKFLGRPIEVWKLYFNHPQDVPDIRDRIRAHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELTMLAFDI
ETLYHEGEEFGTGPILMISYADGSEARVVTWKKIDLPYVDVSTEKEMIKRFLRVREKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRCEELGIKFTLGRDGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPKEK
VYAEETIAQAWESGEGLELVARYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYKRNELAPNKPDERELARRRGYAGGYVKEPERGLWDNIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCKEYD
VAPEVGHKFKCDFPGFIPSLGDLLEERQKIKRKMATVDPLEEKLLDYRQRAIKFLANSFYGYGYAKARWY
CKEAEVSTAWGREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINPKLPGLLELEY
EGFYVRGFFVTKKKYAVIDEKGKITRGLIVRRDWSEFAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKY
EVPPEKLVIEHQITRDLRDYKATGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPTKHRY
DAEYYIENQVLPAPERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLKVKGKK

SEQ ID NO:91

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
EKVKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIHEPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGKVFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
VYAEETIAQAWETGEGLELVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCGEYDV
APQVGHKFKCDFPGFIPSLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYLETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITRGLIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
VPPEKLVIEHQITRDLKDYKATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPDEFDPAKHRYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:92

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTRVVRA
EKVKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIHEPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFDI
ETLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGKVFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
VYAEETIAQAWETGEGLELVARYSMEDAKVTYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHKFKCDFPGFIPSLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLLDYRQRLIKILANSFYGYGYAKARWYC

[0863]

KECAESVTAWGRQYIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYQ
VPPQQLAIYQPTTRALQDYKAKGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKSGSGKIGDRAIPFDEFDPAKHKYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

SEQ ID NO:93

MALEEAPWPPPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAI
GKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQNIPVRTPLGQIRRAFIAEEGWLLVALDYSQEGRLVLAHLSDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVDPLMRRAKTINFVLYGMSAHRLSQELAIPIYEEAQAFIERYFQSFPKVRAWIEKLEEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSRRRAERMAFNMPVQGTADLMKLMVKLFPRLEEMGARMMLQVHDELVEAPK
ERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:94

MALEEAPWPPPEGAFVGVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLS
VLALREGLGLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWL
YREVERPLSAVLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAI
GKTEKTGKRSTSAALAEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSS
DPNLQSIPIVRTPLGQIRRAFIAEEGWLLVALDYSQEGRLVLAHLSDENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGV
PREAVNPLMRRAKTINFVLYGMSAHRLSQKLAIPYEEAQAFIERYFQSFPKVRAWIEKLEEGRRRGYVET
LFGRRRYVPDLEARVKSRRQAERAFNMPVQGTADLMKLMVKLFPRLEEMGARMMLQVHDELVEAPK
ERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVGIGEDWLSAKE

SEQ ID NO:95

MILDTDYITEDGKPVIRIFKKENGFEKIDYDRNFEPYIYALLKDDSAIEDVKKITAERHGTTVRVVRA
EKVKKKFLGRPIEVWKLYFTHPQDQPAIRDKIKEHPAVVDIYEDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKMLAFAI
ATLYHEGEEFAEGPILMISYADEEGARVITWKNIDLPYVDVSTEKEMIKRFLKVVKEKDPDVLITYNGDNFD
FAYLKKRSEKLGVKFILGREGSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIHFDLYPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGQPKKEK
VYAEETIAQAWETGEGLERVARYSMEDAKVYELGKEFFPMEAQLSRLVGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRK
AYERNELAPNKPDERELARRRESYAGGYVKEPERGLWENIVYLDFRSLGPSIIITHNVSPDTLNREGCEEYDV
APQVGHKFKCDFPGFIPSLGDLLEERQKVKKKMKATIDPIEKKLLDYRQLIKILANSFYGYGYAKARWYC
KECAESVTAWGRQYIETTIREIEEKFGFKVLYADTDGFFATIPGADAETVKKKAKEFLDYINAKLPGLLELEYE
GFYKRGFFVTKKKYAVIDEEDKITTRGLEIVRRDWSEIAKETQARVLEAILKHGDVEEAVRIVKEVTEKLSKYE
VPPEKLVYKQITRDLDKYATGPHVAVAKRLAARGIKIRPGTVISYIVLKSGSGKIGDRAIPFDEFDPAKHKYD
AEYYIENQVLPAPERILRAFGYRKEDLRYQKTRQVGLGAWLKPKT

[0864]

rGrUrArUrGrGrArUrGrArArCrUrGrUrArUrArGrUrArArCrUrCrGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrA
rArCrArArGrCrCrGrArArArGrGrArArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrArCrCrGrCrUrGrAr
GrCrArArUrArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

SEQ ID NO:103

mAmCmUmCmCmUmCmGmGmUmGmCmCrUrCrArArUrGrGrCrArGrCrArGrCrCrArUrCrAr
UrCrArUrCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGrCrGrCrGrCrArGrCrCrArUr
ArUrGrGrCrUrArGrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArGrUrGrArArGrGrArUrArArUrUrGrGrCrCrAr
UrCrArUrCrArArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCrUrUrCrArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArGrGrUrArGr
CrGrUrUrArArUrGrGrCrCrArCrGrArArUrUrGrArArUrUrGrArArGrUrGrArArGrCrGrArArGrUr
CrGrUrCrGrUrArUrGrArGrGrCrArCrCrArGrArCrCrGrCrArArArCrUrGrArArGrUrUrArCrCrAr
rArGrUrUrGrUrCrCrGrCrUrGrCrGrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGrUrCrCrGrCrArG
rUrUrArUrGrUrArUrGrGrUrArGrCrArArGrCrCrUrArUrGrUrUrArArArCrArUrCrGrGrCrArGrArUrA
rUrCrCrGrGrArUrUrArUrCrUrGrArArCrUrGrArGrCrUrUrCrCrGrGrArGrGrUrUrUrArArUrG
rGrGrArArCrGrUrGrUrGrArUrGrArArUrUrGrArArGrUrGrUrGrGrUrUrGrUrUrArCrCrGrUr
UrArCrArCrArGrGrArUrArGrCrArGrCrCrUrGrCrArGrArUrGrGrUrGrArUrUrUrCrUrArUrArAr
GrUrUrArArArCrUrGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrCrCrGrGrUrUrAr
UrGrCrArGrArArArGrArCrCrArUrGrGrUrUrGrGrArGrCrArArGrCrGrArArCrGrUrArUr
GrUrArUrCrCrGrGrArArGrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArGrGrUrGrArArUrArArCrArGrCrGrUr
CrUrGrArArGrCrUrGrArArGrArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrUrArUrGrCrArGrArGrUrUrArArAr
CrCrArCrCrUrArCrArArGrCrCrArArArArGrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrGrUrGrCrArUrArU
rArArUrGrUrUrArArUrArUrCrArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrArGrCrCrArArCrGrArGrArUrUr
ArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArGrUrCrGrCrCrArUrArGr
UrArCrCrGrGrUrGrGrUrArUrGrGrArUrGrArCrUrGrUrArUrArGrUrArArCrUrCrGrArGrArUrCrCr
GrGrCrUrGrCrUrArArCrArArGrCrCrGrArArGrGrArArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrUrGrCrCr
ArCrCrGrCrUrGrArGrCrArArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

SEQ ID NO:104

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrA

SEQ ID NO:105

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArArUrGrGrGrCrArGrCrArGrCrCrArUrCrArUrCrArUr
rCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGrCrGrCrCrArUrArUrGrGrCrUrAr
GrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArGrGrUrGrArArGrArGrArUrArArUrUrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArAr
ArGrArArUrUrCrArUrGrCrGrCrUrUrCrArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUr
GrGrCrCrArCrGrArArUrUrGrArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrGrUrCrGrUrCrGrUr
ArUrGrArArGrGrCrArCrCrArGrArCrCrGrCrArArArCrUrGrArArGrUrUrArCrCrArArGrGrUrGrGrU

[0866]

rCrCrGrCrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGrUrCrCrGrCrArGrUrUrArUrGrU
rArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrUrArUrGrUrUrArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrArUrCrCrGrGrAr
UrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUrUrUrCrCrGrGrArGrGrUrUrUrArArArUrGrGrArArCrGrUr
GrUrGrArUrGrArUrUrUrGrArArGrArUrGrGrUrGrGrUrGrUrUrArCrCrGrUrUrArCrArCrArGrG
rArUrArGrCrArGrCrUrGrCrArGrGrArUrGrGrUrGrArUrUrUrArUrCrUrArUrArArGrUrUrArArCrU
rGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUrCrCrGrGrUrUrArUrGrCrArGrArA
rArArGrArCrCrArUrGrGrUrUrGrGrGrArArGrCrArGrCrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrG
rArArGrArUrGrGrCrCrArCrUrGrArArArGrUrGrArArUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArGrCrUr
GrArArArGrArUrGrGrCrGrUrCrArUrUrGrArUrGrCrArGrArGrUrUrArArArCrCrArCrUrArCr
ArArArGrCrCrArArArArGrCrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArArArGrUrUrAr
ArUrArUrCrArArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrArGrCrArCrArCrGrArGrGrArUrUrArUrArCrCrArUrU
rGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArGrUrCrGrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrG
rGrUrArUrGrGrArUrGrArCrUrGrUrArUrArGrUrArArCrUrCrGrArGrArGrArUrCrCrGrGrCrUrGrCrUrA
rArCrArArGrCrCrCrGrArArGrGrArArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrAr
GrCrArArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

SEQ ID NO:106

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArAψrGrGrCrArGrCrArGrCrCrAψrCrAψrCrAψrCrAψrC
rAψrCrArCrArGrCrArGrCrGrGrCrCψrGrGψrGrCrCrGrCrGrCrGrCrArGrCrCrAψrAψrGrCψrArGrCr
AψrGrGψrGrArGrCrArArArGrGψrGrArArGrArGrGψrArAψrAψrGrGrCrCψrCrAψrCrArArArGrArA
ψrCrAψrGrCrGrCψrCrArArArGrGψrCrAψrAψrGrGrArArGrGψrArGrCrGψrArAψrGrGrCrCrArCrG
rArAψrψrGrArArAψrGrArArGrGψrGrArArGrCrGrArArGrGψrCrGψrCrCrGψrAψrGrArArGrGrCrAr
CrCrCrArGrArCrCrGrCrArArArCψrGrArArArGψrArCrCrArArArGrGψrGrGψrCrCrGrCψrGrCrCrGψ
ψrGrCrAψrGrGrAψrAψrCψrGrArGψrCrCrGrCrArGψrψrAψrGψrAψrGrGψrArGrCrArArGrCr
CψrAψrGψrArArArCrAψrCrCrGrCrArGrAψrAψrCrCrGrGrAψrAψrCψrGrArArArCψrGrArGrC
ψrψrCrCrGrGrArArGrGψrψrArArAψrGrGrGrArCrGψrGψrGrAψrGrArAψrψrGrArArGrAψrGr
GψrGrGψrGψrGψrArCrCrGψrArCrArCrArGrAψrArGrCrArGrCrCψrGrCrArGrAψrGrGψrGrA
rAψrψrAψrCψrAψrArArArGψrArArArCψrGrCrGψrGrGrCrArCrGrArAψrψrCrCrGrArGψrGrAψr
GrGψrCrCrGrGψrAψrGrCrArGrArArArGrArCrAψrGrGrGψrGrGrGrArGrCrArArGrCrArGrCr
rGrArArCrGψrAψrGψrAψrCrCrGrGrArGrAψrGrGrCrCrArCψrGrArArGrGψrGrArArAψrArArAr
CrArGrCrGψrCψrGrArArGrCψrGrArArArGrAψrGrGrCrGrGψrCrAψrAψrGrAψrGrCrArGrArArGψrA
rArArArCrCrArCψrArCrArArGrCrCrArArArArGrCrCrGrGψrψrCrArGrCψrGrCrCψrGrGψrGrCrAψ
rAψrArAψrGψrArAψrAψrCrArArArCψrGrGrAψrAψrCrArCrArGrCrCrArCrArArCψrGrArGrAψrA
ψrArCrCrAψrGψrGrArArArGrAψrGrArArCrGψrGrCrArGrArArGrGψrCrGrCrArAψrArGψrArCr
CrGrGψrGrGψrAψrGrGrAψrGrArArCψrGψrAψrArArGrAψrArArCψrCrGrArGrArAψrCrCrGrCrCψrGr
CψrArArCrArArGrCrCrGrArArGrGrArArGrCψrGrArGψrGrGrCψrGrCrCrArCrCrGrCψrGr
ArGrCrArAψrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

[0867]

SEQ ID NO:107

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArAm1ΨrGrGrCrArGrCrArGrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrA
m1ΨrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrArArGrCrArGrCrGrCrCm1ΨrGrGm1ΨrGrCrCrGrCrGrCrArGrCr
CrAm1ΨrAm1ΨrGrGrCm1ΨrArGrCrAm1ΨrGrGm1ΨrGrArGrCrArArGrGm1ΨrGrArGrArGrGrAm1
ΨrArAm1ΨrAm1ΨrGrGrCrCrAm1ΨrCrAm1ΨrCrArArGrArAm1Ψm1ΨrCrAm1ΨrGrCrGrCm1Ψm1Ψ
rCrArArGrAm1Ψm1ΨrCrAm1ΨrAm1ΨrGrGrArArGrGm1ΨrArGrCrGm1Ψm1ΨrArAm1ΨrGrCrCrAr
CrGrArAm1Ψm1Ψm1ΨrGrArArAm1Ψm1ΨrGrArArGrGm1ΨrGrArArGrCrGrArArGrGm1ΨrCrGm1Ψ
rCrCrGm1ΨrAm1ΨrGrArArGrGrCrArCrCrArGrArCrCrGrCrArArArCm1ΨrGrArArGrAm1Ψm1ΨrAr
CrCrArArArGrGm1ΨrGrGm1ΨrCrCrGrCm1ΨrGrCrCrGm1Ψm1Ψm1ΨrGrCrAm1ΨrGrGrAm1ΨrAm
1Ψm1ΨrCm1ΨrGrArGm1ΨrCrCrGrCrArGm1Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrGrGm1ΨrArGrCrArA
rArGrCrCm1ΨrAm1ΨrGm1Ψm1ΨrArArArCrAm1ΨrCrCrGrGrCrArGrAm1ΨrAm1ΨrCrCrGrGrAm1Ψ
m1ΨrAm1ΨrCm1ΨrGrArArArCm1ΨrGrArGrCm1Ψm1Ψm1ΨrCrCrGrGrArArGrGm1Ψm1Ψm1Ψm1Ψ
rArArAm1ΨrGrGrGrArArCrGm1ΨrGm1ΨrGrAm1ΨrGrArAm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrGrArArGrAm1ΨrGrG
m1ΨrGrGm1ΨrGm1Ψm1ΨrGm1Ψm1ΨrArCrCrGm1Ψm1ΨrArCrArCrArGrGrAm1ΨrArGrCrArGrCrC
m1ΨrGrCrArGrGrAm1ΨrGrGm1ΨrGrArAm1Ψm1Ψm1ΨrAm1ΨrCm1ΨrAm1ΨrArArGrAm1Ψm1ΨrA
rArArCm1ΨrGrCrGm1ΨrGrGrCrArCrGrArAm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨrCrCrGrArGm1ΨrGrAm1ΨrGrGm1Ψr
CrCrGrGm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrCrArGrArArArArGrArCrCrAm1ΨrGrGrGm1Ψm1ΨrGrGrGrArGrCrAr
ArGrCrArGrCrGrArArCrGm1ΨrAm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrCrCrGrGrArArGrAm1ΨrGrGrCrGrCrArCm1ΨrGr
ArArArGrGm1ΨrGrArArAm1Ψm1ΨrArArArCrArGrCm1ΨrCm1ΨrGrArArGrCm1ΨrGrArArGrAm1
ΨrGrGrCrGrGm1ΨrCrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrGrAm1ΨrGrCrArGrArGrAm1Ψm1ΨrArArArCrArCrCm1
ΨrArCrArArGrCrCrArArArArGrCrCrGrGm1Ψm1ΨrCrArGrCm1ΨrGrCrCm1ΨrGrGm1ΨrGrCrAm1
ΨrAm1ΨrArAm1ΨrGm1Ψm1ΨrArAm1ΨrAm1ΨrCrArArArCm1ΨrGrGrAm1ΨrAm1ΨrCrArCrArGrC
rCrArCrArCrGrArGrGrAm1Ψm1ΨrAm1ΨrArCrCrAm1Ψm1ΨrGm1Ψm1ΨrGrArArCrArGm1ΨrAm1
ΨrGrArArCrGm1ΨrGrCrArGrArArGrGm1ΨrCrGrCrCrAm1ΨrArGm1ΨrArCrCrGrGm1ΨrGrGm1ΨrAm1
ΨrGrGrAm1ΨrGrArArCm1ΨrGm1ΨrAm1ΨrArArGm1ΨrArArCm1ΨrCrGrArGrArGrAm1ΨrCrCrGrGrC
m1ΨrGrCm1ΨrArArCrArArGrCrCrGrArArGrGrArArGrCm1ΨrGrArGm1Ψm1ΨrGrGrCm1ΨrGrC
m1ΨrGrCrCrArCrCrGrCm1ΨrGrArGrCrArAm1ΨrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrArArGrCrCm
AmUmUmAmGmC

SEQ ID NO:108

rArCrUrCrCrUrCrGrGrUrGrCrCrUrCrArArUrGrGrGrCrArGrCrArGrCrCrArUrCrArUrCrArU
rCrArUrCrArCrArGrCrArGrCrGrCrCrUrGrGrUrGrCrCrGrCrGrCrGrCrArGrCrCrArUrArUrGrGrCrUrAr
GrCrArUrGrGrUrGrArGrCrArArArGrGrUrGrArGrArGrArUrArArUrUrGrGrCrCrArUrCrArUrCrArAr
ArGrArArUrCrArUrGrCrGrCrUrUrCrArArArGrUrUrCrArUrArUrGrGrArGrGrUrArGrCrGrUrUrArArUr
GrGrCrCrArCrGrArArUrUrGrArArArUrUrGrArArGrGrUrGrArArGrCrGrArGrGrUrCrGrUrCrCrGrUr
ArUrGrArArGrGrCrArCrCrArGrArCrCrGrCrArArArCrUrGrArArGrUrUrArCrCrArArArGrGrUrGrGrU

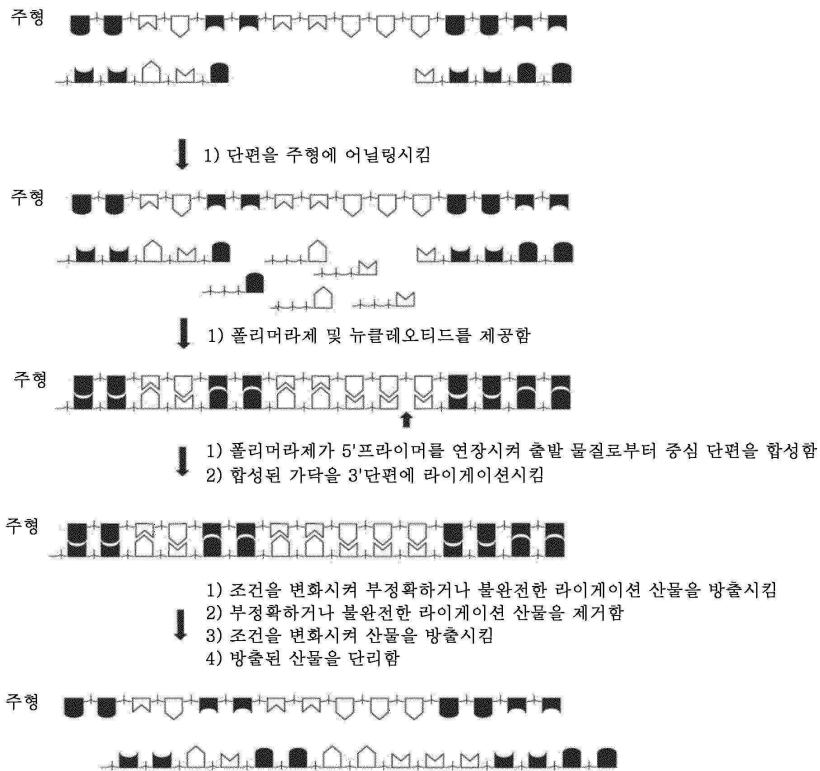
[0868]

rCrCrGrCrUrGrCrCrGrUrUrUrGrCrArUrGrGrGrArUrArUrUrCrUrGrArGrUrCrCrGrCrArGrUrUrUrArGrU
rArUrGrGrUrArGrCrArArArGrCrCrUrArUrGrUrUrArArArCrArUrCrCrGrGrCrArGrArUrUrCrCrGrGrAr
UrUrArUrCrUrGrArArArCrUrGrArGrCrUrUrUrCrCrGrGrArArGrGrUrUrUrArArArUrGrGrArArCrGrUr
GrUrGrArUrGrArArUrUrUrGrArArGrArUrGrGrUrGrGrUrUrGrUrUrArCrCrGrUrUrArCrArCrArGrG
rArUrArGrCrArGrCrCrUrGrCrArGrGrArUrGrGrUrGrArArUrUrArUrCrUrArUrArArGrUrUrArArArCrU
rGrCrGrUrGrGrCrArCrGrArArUrUrUrCrCrGrArGrUrGrArUrGrGrUrCrCrGrGrUrArUrGrCrArGrArArA
rArArGrArCrCrArUrGrGrGrUrUrGrGrGrArArGrCrArArGrCrGrArArCrGrUrArUrGrUrArUrCrCrGrG
rArArGrArUrGrGrCrGrCrArCrUrGrArArArGrGrUrGrArArArUrUrArArArCrArGrCrGrUrCrUrGrArArGrCrUr
GrArArArGrArUrGrGrCrGrGrUrCrArUrUrArUrGrArUrGrCrArGrArGrUrUrArArArCrCrArCrCrUrArCr
ArArArGrCrCrArArArArGrCrCrGrGrUrUrCrArGrCrUrGrCrCrUrGrGrUrGrCrArUrArUrArUrGrUrUrAr
ArUrArUrCrArArArCrUrGrGrArUrArUrCrArCrCrArCrArCrGrArGrGrArUrUrArUrArCrCrArUrU
rGrUrUrGrArArCrArGrUrArUrGrArArCrGrUrGrCrArGrArGrGrUrCrGrCrCrArUrArGrUrArCrCrGrGrUrG
rGrUrArUrGrGrArUrGrArArCrUrGrUrArUrArGrUrArArCrUrCrGrArGrArGrArUrCrCrGrCrUrGrCrUrA
rArCrArArGrCrCrCrGrArArArGrGrArArGrCrUrGrArGrUrUrGrGrCrUrGrCrCrArCrCrGrCrUrGrAr
GrCrArArUrArArGrUrCrUrGrCrUrUrCrGrCrArCrCrArArArGrCrCmAmUmUmAmGmC

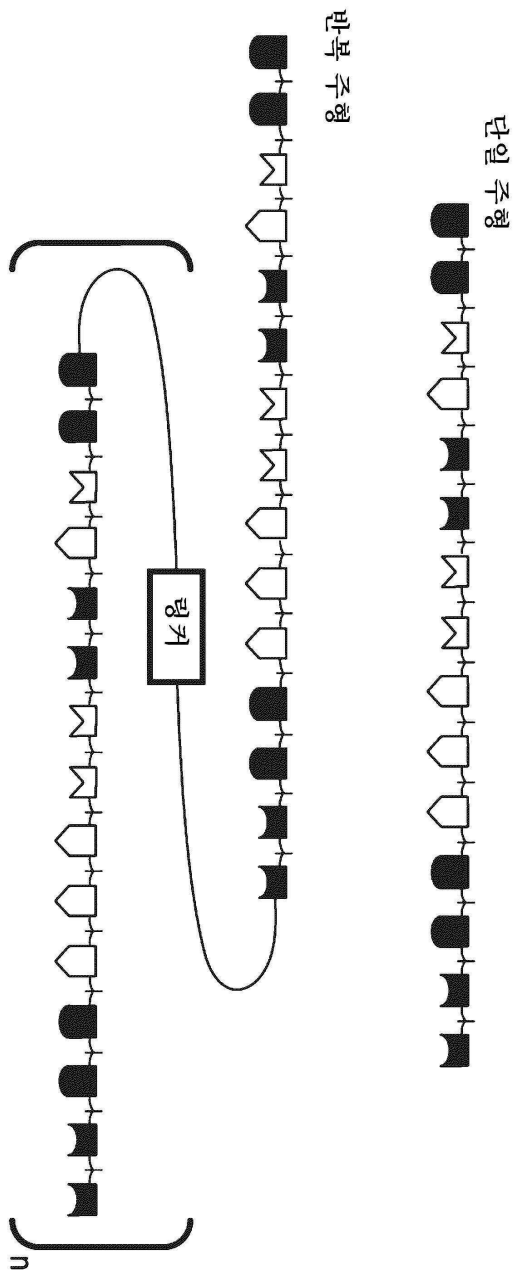
[0869]

도면

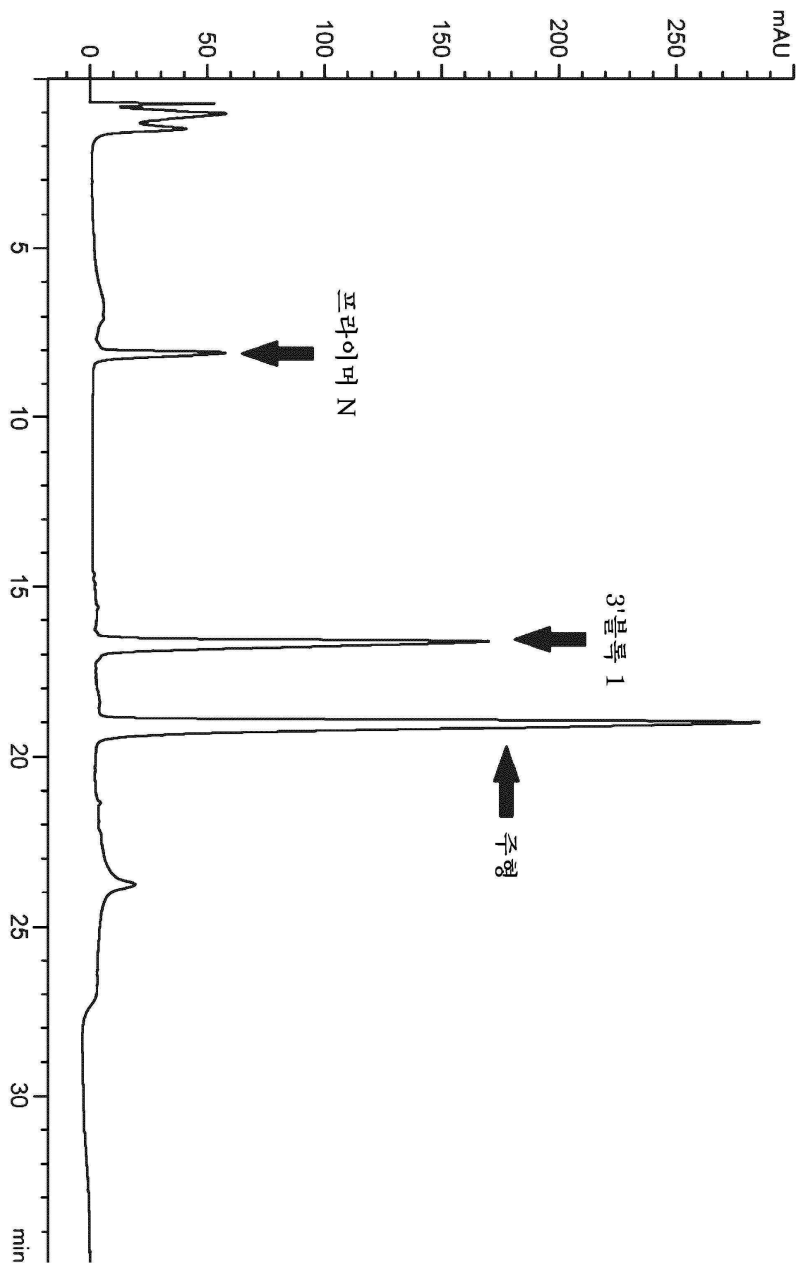
도면1



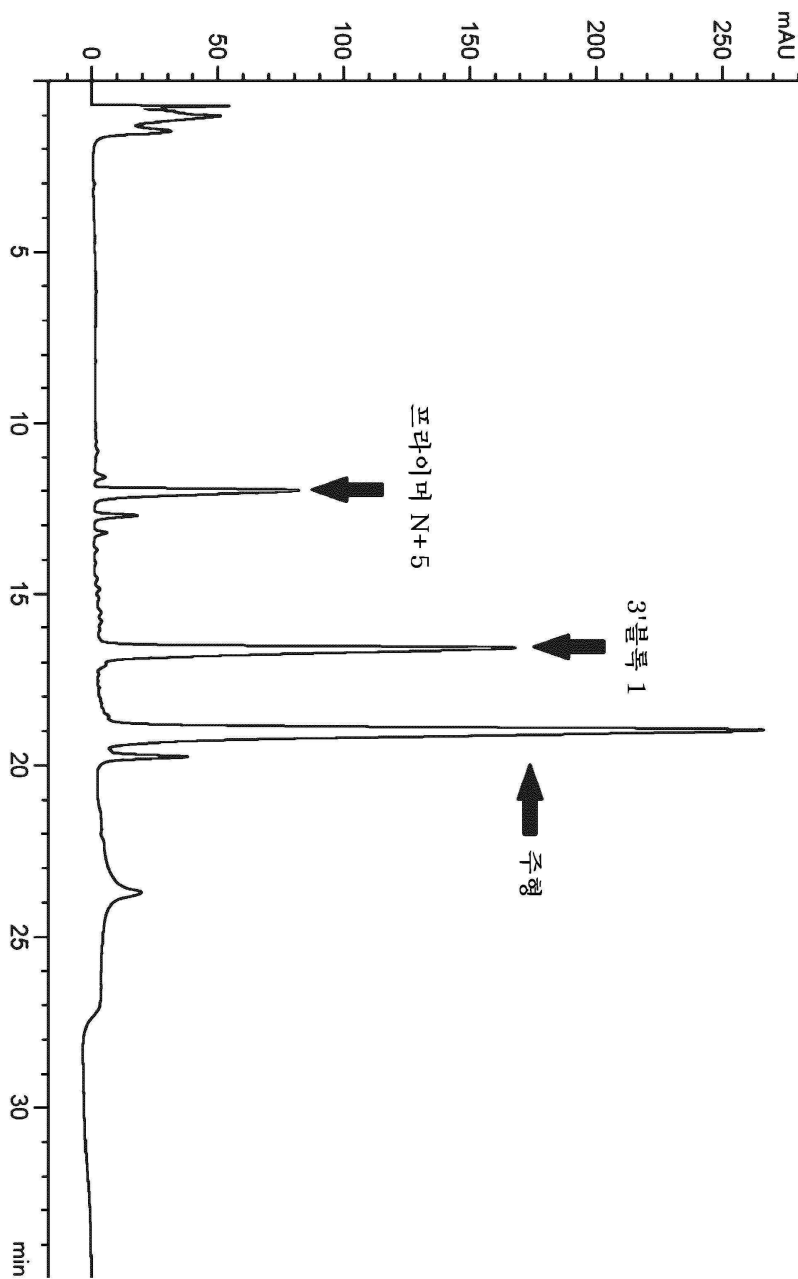
도면2



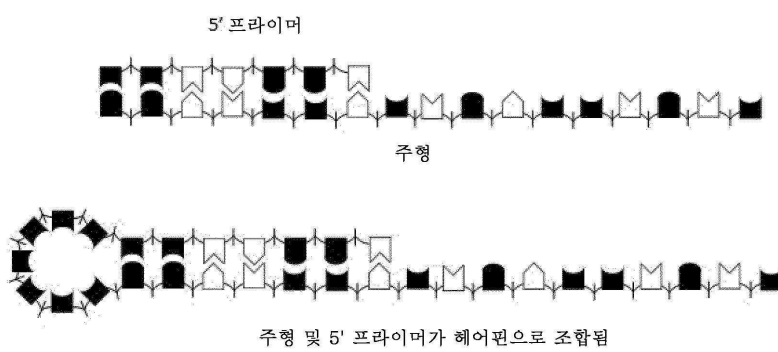
도면3a



도면3b



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.