



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월05일

(11) 등록번호 10-2763527

(24) 등록일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/90 (2006.01)  
C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 15/113 (2013.01)  
C12N 15/907 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7002012(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년12월03일

심사청구일자 2024년02월15일

(85) 번역문제출일자 2024년01월18일

(65) 공개번호 10-2024-0013283

(43) 공개일자 2024년01월30일

(62) 원출원 특허 10-2017-7018311  
원출원일자(국제) 2015년12월03일

심사청구일자 2020년12월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/000143

(87) 국제공개번호 WO 2016/089433

국제공개일자 2016년06월09일

(30) 우선권주장  
62/087,211 2014년12월03일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2014093712 A1\*

WO2013142578 A1

US20140273226 A1

US20140273232 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

애질런트 테크놀로지스, 인크.

미국 캘리포니아주 95051 산타 클라라 스티븐스  
크릭 블러바드 5301

(72) 발명자

라이언 다니엘 이

미국 캘리포니아주 95051-7201 산타 클라라 스티  
븐스 크릭 블러바드 5301 엠에스: 1에이-피비

델링저 더글라스 제이

미국 캘리포니아주 75051-7201 산타 클라라 스티  
븐스 크릭 블러바드 5301 엠에스: 1에이-피비

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 29 항

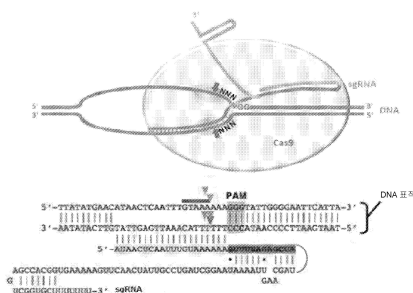
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA

## (57) 요약

본 발명은 변형된 가이드 RNA, 및 간헐적으로 반복되는 회문구조 염기서열 집합체(크리스퍼)/크리스퍼-결합된 (Cas) 시스템에서의 그의 용도에 관한 것이다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**C12N 9/22** (2013.01)  
*C12N 2310/312* (2013.01)  
*C12N 2310/315* (2013.01)  
*C12N 2310/346* (2013.01)  
*C12N 2310/3517* (2013.01)  
*C12N 2310/531* (2013.01)  
*C12N 2320/51* (2013.01)  
*C12N 2320/53* (2013.01)

(72) 발명자

**샘슨 제프리 알**

미국 캘리포니아주 75051-7201 산타 클라라 스티븐  
 스 크릭 블러바드 5301 엠에스: 1에이-피비

**카이지 로버트**

미국 캘리포니아주 75051-7201 산타 클라라 스티븐  
 스 크릭 블러바드 5301 엠에스: 1에이-피비

**마이언슨 조엘**

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

(30) 우선권주장

62/146,189 2015년04월10일 미국(US)  
 62/256,095 2015년11월16일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

합성 가이드 RNA로서,

5' 단부, 3' 단부, 및 폴리뉴클레오타이드 중 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함하는 crRNA를 포함하고,

상기 crRNA가, 상기 5' 단부, 상기 3' 단부, 또는 둘다로부터 5개 뉴클레오타이드 내에 위치하는 하나 이상의 변형을 포함하고, 상기 하나 이상의 변형이 2'-O-메틸, Z 염기, 2-티오유라실(2-티오U), 5-메틸유리딘, 2-아미노아데닌, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트(PACE) 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트(티오파스) 뉴클레오타이드간 결합, 3'-포스포로티오에이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-티오포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 및 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-데옥시 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택되고,

gRNA 기능을 갖는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 변형 중 하나 이상이 안정성-증대 변형을 포함하고, 상기 안정성-증대 변형이 2'-O-메틸, Z 염기, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트(PACE) 뉴클레오타이드간 결합, 또는 티오포스포노아세테이트(티오파스) 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함하는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 crRNA의 상기 5' 단부에 26개 미만의 연속적인 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

합성 가이드 RNA 중 시토신을 대체하는 Z 염기를 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

잠재적인 표적-외 서열과의 U-G 동요 짝짓기에 관여할 수 있는 유리딘에 상응하는 위치에 하나 이상의 2-티오유라실을 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 하나 이상의 변형이 3'-포스포로티오에이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-티오포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 및 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-데옥시 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택되는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

2개 이상의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 5' 단부, 상기 3' 단부, 또는 상기 5' 및 3' 단부 각각에 7개 이하의 연속적인 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

5' 단부 및 3' 단부 중 하나 이상에 하나 이상의 5-메틸유리딘 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 변형 중 하나 이상이 염기-짝짓기 열안정성을 변경시키는 하나 이상의 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 염기-짝짓기 열안정성을 변경시키는 변형 중 하나 이상이 염기-짝짓기 열안정성을 증대시키고, 2'-O-메틸, 2-티오유라실(2-티오U), 5-메틸유리딘, 및 2-아미노아데닌 중에서 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 염기-짝짓기 열안정성을 변경시키는 변형 중 하나 이상이 염기-짝짓기 열안정성을 감소시키고, 2-티오유라실, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 및 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합 중에서 독립적으로 선택되는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 13

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 2'-O-메틸-A-2'-O-메틸-U 염기쌍을 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 14

제 1 항에 있어서,

상기 변형 중 하나 이상이 특이성-변경 변형을 포함하는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 특이성-변경 변형이 가이드 서열 중에 위치하는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 특이성-변경 변형이 2'-O-메틸, 2-티오유라실, 5-메틸유리딘, 2-아미노아데닌, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합 또는 이들의 조합을 포함하는, 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 17



제 1 항에 있어서,

형광 염료 또는 표지를 포함하는 합성 가이드 RNA.

#### 청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항의 합성 가이드 RNA 및 크리스퍼(CRISPR)-연관된(Cas) 단백질을 포함하는 리보뉴클레오타이드단백질(RNP).

#### 청구항 19

DNA 서열, 관심 유전자 또는 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼(CRISPR)-연관된(Cas) 단백질 및 제 1 항에 따른 합성 가이드 RNA와 접촉시키고, 상기 DNA 서열, 상기 관심 유전자 또는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 편집하거나 조절하거나 절단함을 포함하는, DNA 서열을 변형시키기 위해 게놈을 편집하거나 관심 유전자 발현을 조절하거나 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단하는 시험관내 방법.

#### 청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 합성 가이드 RNA가 가이드 서열 전체를 통해 15개 이상의 2'-O-메틸 변형을 포함하는, 방법.

#### 청구항 21

제 19 항에 있어서,

상기 Cas 단백질이 이중-가닥 뉴클레아제(nuclease) 활성을 갖는, 방법.

#### 청구항 22

제 19 항에 있어서,

상기 Cas 단백질이 단일-가닥 틈 형성(nicking) 활성을 갖는, 방법.

#### 청구항 23

제 19 항에 있어서,

상기 Cas 단백질이 뉴클레아제 활성이 없는, 방법.

#### 청구항 24

제 19 항에 있어서,

상기 Cas 단백질이 융합(fusion) 단백질인, 방법.

#### 청구항 25

제 21 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 Cas 단백질이 mRNA로서 제공되는, 방법.

#### 청구항 26

제 19 항에 있어서,

상기 Cas 단백질이 단백질로서 제공되는, 방법.

#### 청구항 27

제 19 항에 있어서,

상기 Cas 단백질 및 상기 합성 가이드 RNA가 리보뉴클레오타이드단백질(RNP)로서 제공되는, 방법.

#### 청구항 28

제 19 항 내지 제 24 항, 제 26 항 및 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 접촉이 세포 내에서 일어나는, 방법.

## 청구항 29

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 합성 가이드 RNA, 또는

상기 합성 가이드 RNA 및 크리스퍼(CRISPR)-연관된(Cas) 단백질을 포함하는 하나 이상의 리보뉴클레오타이드단백질(RNP)

을 포함하는 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 간헐적으로 반복되는 회문구조 염기서열 집합체(크리스퍼(CRISPR)) 기술에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 고유 원핵생물 크리스퍼-Cas 시스템은 일정한 길이의 개재 가변 서열을 갖는 짧은 반복부의 배열(즉 간헐적으로 반복되는 회문구조 염기서열 집합체, 또는 "크리스퍼") 및 크리스퍼-결합된("Cas") 단백질을 포함한다. 전사된 크리스퍼 배열의 RNA는 상기 Cas 단백질의 부분집합에 의해 작은 가이드 RNA(일반적으로 하기에 논의되는 바와 같은 2개의 성분을 갖는다)로 가공된다. 적어도 3개의 상이한 시스템들: I형, II형 및 III형이 존재한다. 상기 RNA의 성숙한 crRNA로의 가공에 관련된 효소들은 상기 3개의 시스템에서 상이하다. 고유 원핵생물 시스템에서, 상기 가이드 RNA("gRNA")는 크리스퍼 RNA("crRNA") 및 트랜스-작용 RNA("tracrRNA")라 칭하는 2개의 짧은, 비-암호화 RNA 종들을 포함한다. 예시적인 시스템에서, 상기 gRNA는 Cas 뉴클레아제와 복합체를 형성한다. 상기 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체는 프로토스페이스어(protospacer) 인접 동기("PAM") 및 프로토스페이스어를 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드 서열(상기 gRNA의 일부에 상보적인 서열이다)에 결합한다. 상기 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체에 의한 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 인식 및 결합은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단을 유도한다. 상기 고유 크리스퍼-Cas 시스템은 원핵생물에서 면역 시스템으로서 기능하며, 이때 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체는 진핵생물 유기체에서 RNAi와 유사한 방식으로 외인성 유전 요소를 인식하고 침묵시키며, 이에 의해 외인성 유전 요소, 예를 들어 플라스미드 및 파지에 대한 내성을 부여한다.

[0003] 단일-가이드 RNA("sgRNA")가 천연 crRNA와 tracrRNA 간에 형성된 복합체를 대체할 수 있음이 입증되었다.

[0004] sgRNA를 포함한 gRNA의 개발과 관련된 고려사항은 특이성, 안정성 및 기능성을 포함한다. 특이성은 특정 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체가 목적하는 표적 서열에 결합하고/하거나 상기 서열을 절단하는 능력을 지칭하는 반면, 목적하는 표적으로부터 서열 및/또는 위치가 상이한 폴리뉴클레오타이드의 결합 및/또는 절단은 거의 또는 전혀 발생하지 않는다. 따라서, 특이성은 상기 gRNA:Cas 뉴클레아제 복합체의 표적-외 효과를 최소화함을 지칭한다. 안정성은 효소, 예를 들어 뉴클레아제, 및 세포-내 및 세포-외 환경에 존재하는 다른 물질들에 의한 분해에 저항하는 상기 gRNA의 능력을 지칭한다.

### 발명의 내용

[0005] 따라서, 핵산분해적 분해에 대한 증가된 내성, 표적 폴리뉴클레오타이드에 대한 증가된 결합 친화성, 및/또는 감소된 표적-외 효과를 갖는 반면, 그럼에도 불구하고 gRNA 기능성을 갖는, sgRNA를 포함한 gRNA를 제공할 필요가 있다. gRNA의 개발과 관련된 추가의 고려사항은 형질감염성 및 면역자극 성질을 포함한다. 따라서, 세포, 특히 진핵생물 세포의 핵내로의 효율적이고 적정 가능한 형질감염성을 갖고 형질감염된 세포에서 면역자극 성질을 최소로 갖거나 갖지 않는, sgRNA를 포함한 gRNA를 제공할 필요가 있다. gRNA에 대한 또 다른 중요한 고려사항은 목적하는 gRNA 기능성을 허용하기에 충분한 기간 동안 상기 gRNA를 목적하는 세포, 조직, 체액 또는 유기체내로 전달하고 여기에서 유지시키기에 유효한 수단을 제공하는 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0006] 도 1은 예시적인 크리스퍼-Cas 시스템의 도식적 모델을 도시하는 다이어그램 세트이다. 여기에 도시된 예시적

인 시스템은 Cas 뉴클레아제를 갖는 II형 시스템이다. 본 특정 예에서, 상기 Cas 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다. 상기 Cas9 뉴클레아제는 PAM 서열[여기에서 상기 PAM 서열은 NGG의 3-nt 서열(이때 N은 A, G, C 또는 T이다)이나, 다른 PAM 서열들도 존재하는 것으로 공지되어 있다]을 인식한다. 상기 sgRNA는 가이드 서열, crRNA 서열 또는 분절, 및 tracrRNA 서열 또는 분절을 포함한다. 상기 sgRNA의 가이드 서열은 상기 PAM 서열의 바로 상류의 DNA 표적과 하이브리드화한다. 여기에 도시된 예에서, Cas9는 상기 PAM 서열(화살표) 상류의 이중-가닥 끊김을 매개한다.

도 2a는 예시적인 크리스퍼-Cas9-매개된 절단 분석을 도시하는 다이어그램이다.

도 2b는 도 4의 데이터를 생성시키는데 사용되는 생화학적 절단 분석에 대한 성분들 및 그들의 농도를 도시하는 표이다.

도 2c는 상기 생화학적 절단 분석을 위한 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 뉴클레아제의 적정을 도시하는 다이어그램이다.

도 2d는 상기 생화학적 절단 분석을 위한 예시적인 sgRNA의 적정을 도시하는 다이어그램이다. 본 예에서 kanC1이라 명명하는 sgRNA는 가나마이신 내성 유전자 중의 상보성 서열에 표적화된다.

도 3은 시험관내에서 정제된 성분을 사용하는 상기 생화학적 절단 분석에 예시적인 조건 및 과정을 도시한다.

도 4는 상기 절단 분석에서 예시적인 변형된 가이드 RNA를 사용하여 획득된 데이터를 도시하는 표이다.

도 5a는 본 출원에 개시된 예시적인 가이드 RNA를 도시한다.

도 5b는 본 출원에 개시된 예시적인 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 도시한다.

도 6은 적어도 2개(예를 들어, 제1 변형 및 제2 변형)의 화학적 변형을 갖는 예시적인 가이드 RNA를 도시하는 표이다. 각각의 숫자는 지시되는 바와 같은 변형을 나타내며 각각의 "x"는 가이드 RNA 중의 변형들의 조합을 가리킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 제1 및 제2 변형은 단일 뉴클레오타이드상에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 제1 및 제2 변형은 별도의 뉴클레오타이드상에 존재한다.

도 7은 적어도 3개의 화학적 변형을 갖는 가이드 RNA의 예시적인 유형들을 도시한다. 도 7의 하부 부분은 다수 유형의 변형들을 나열한다. 도 7의 상부 부분의 표는 이중 변형("이중 변형", 2가지 유형의 변형의 조합)이 단일 변형("단일 변형", 한 가지 유형의 변형)과 어떻게 병행될 수 있는지를 가리킨다. "x"는 가이드 RNA에서 상응하는 이중 변형 및 단일 변형의 존재를 가리킨다.

도 8a 및 8b는 시험관내 시험에 대한 형광단-변형된 CTLA1 sgRNA를 도시한다. 도 8a에서, CTLA1에 대한 sgRNA의 RNA 서열을 도시하며, 형광 염료 또는 표지가 상기 sgRNA에 부착될 수 있는 위치를 포함한다. 도 8b는 문헌[Nishimasu et al., Cell (2014) 156, 1-15]에 보고된 바와 같은, Cas9:sgRNA 복합체의 X선 결정학에 의해 측정된 구조를 도시한다.

도 9a는 CTLA1 표적에 대한 특이성을 개선하고자 하는 노력으로 몇몇 위치(3, 9 및 11번 위치)에서 2-티오유리딘에 의해 변형된 CTLA1 sgRNA를 도시한다. 도 9b는 2-티오U에 의해 변형된 gRNA가, 표적-외 부위가 U-G 동요 짝짓기를 수반하는 경우, 상기 gRNA의 표적 특이성을 증가시킬 수 있음을 도시한다. 특히, CTLA1\_2-티오U+11은 표적-외 서열 CTLA1 OFF3(5' 가닥 중 11번째 위치에 T에서 C로의 돌연변이를 갖는다)의 훨씬 더 낮은 절단을 가졌다.

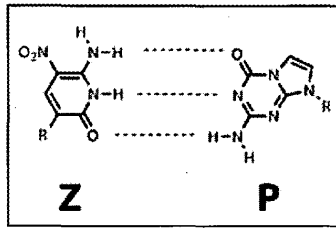
도 10은 가이드 RNA 스캐폴드 2차 구조를 도시하며, 문헌[Jiang et al., Science (2015) 345:6242, 1477-81]에 보고된 바와 같은, Cas9의 아미노산과 비공유 결합 상호작용을 나타낸다.

도 11a 및 11b는 인간 세포주에서 유전자 파괴가 높은 빈도의 인델(indel) 및 상동성 재조합(HR)과 함께, 문헌[Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33:9, 985-9]에 보고된 바와 같이, 본 명세서에 개시된 합성되고 화학적으로 변형된 sgRNA를 사용하여 성취될 수 있음을 보이는 실험 결과를 예시한다.

도 12a, 12b, 12c 및 12d는 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학적으로 변형된 sgRNA를 사용하여, 문헌[Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33:9, 985-9]에 보고된 바와 같이, 자극된 1차 인간 T 세포뿐만 아니라 CD34+ 조혈모세포 및 전구세포(HSPC)에서 높은 빈도의 유전자 파괴 또는 표적화된 게놈 편집을 성취할 수 있음을 나타내는 실험 결과를 예시한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0007] 본 발명은 적어도 부분적으로, gRNA에 대한 몇몇 화학적 변형이 크리스퍼-Cas 시스템에 의해 허용된다는 뜻밖의 발견에 근거한다. 특히, 상기 gRNA의 안정성을 증가시키고, gRNA 하이브리드화 상호작용의 열안정성을 변경시키고, 및/또는 Cas:gRNA 복합체형성의 표적-외 효과를 감소시키는 것으로 여겨지는 몇몇 화학적 변형들은 표적 폴리뉴클레오타이드의 틱 형성(nicking) 및/또는 절단에 대한 Cas:gRNA 결합의 효능을 실질적으로 손상시키지 않는다. 더욱 또한, 몇몇 화학적 변형들은, 세포, 특히 진핵생물 세포의 핵내로의 효율적이고 적정 가능한 형질감염성을 갖고 및/또는 형질감염된 세포에서 면역자극 성질을 최소로 갖거나 갖지 않는, sgRNA를 포함한 gRNA를 제공하는 것으로 여겨진다. 몇몇 화학적 변형들은 목적하는 gRNA 기능성을 허용하기에 충분한 기간 동안 목적하는 세포, 조직, 체액 또는 유기체내로 유효하게 전달되고 상기 중에서 유지될 수 있는, sgRNA를 포함한 gRNA를 제공하는 것으로 여겨진다.
- [0008] I. 정의
- [0009] 본 명세서에 사용되는 "가이드 RNA"란 용어는 일반적으로 Cas 단백질에 결합할 수 있고 상기 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA)내의 특정 위치에 표적화하는 것을 도울 수 있는 RNA 분자(또는 집합적으로 RNA 분자들의 그룹)를 지칭한다. 가이드 RNA는 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 "crRNA" 또는 "crRNA 분절"이란 용어는 폴리뉴클레오타이드-표적화 가이드 서열, 줄기 서열 및 임의로 5'-오버행 서열을 포함하는 RNA 분자 또는 그의 부분을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 "tracrRNA" 또는 "tracrRNA 분절"이란 용어는 단백질-결합 분절(예를 들어, 상기 단백질-결합 분절은 크리스퍼-결합된 단백질, 예를 들어 Cas9와 상호작용할 수 있다)을 포함하는 RNA 분자 또는 그의 부분을 지칭한다. 상기 "가이드 RNA"란 용어는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함하며, 이때 상기 crRNA 분절 및 상기 tracrRNA 분절은 동일한 RNA 분자 중에 위치한다. "가이드 RNA"란 용어는 또한 집합적으로 2개 이상의 RNA 분자들의 그룹을 포함하며, 이때 상기 crRNA 및 상기 tracrRNA 분절은 별도의 RNA 분자 중에 위치한다.
- [0010] "스캐폴드"란 용어는 실질적으로 동일하거나 천연 생물종들에 걸쳐 고도로 보존되는 서열을 포함하는 가이드 RNA 분자의 부분을 지칭한다. 스캐폴드는, 고유 crRNA 및 tracrRNA 중에 보존되지 않는 서열을 포함하는 임의의 비천연 부분을 제외하고, 상기 tracrRNA 분절 및 상기 crRNA 분절의 5' 단부 또는 그 부근의 폴리뉴클레오타이드-표적화 가이드 서열 이외의 crRNA 분절의 부분을 포함한다.
- [0011] "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드"란 용어는 DNA 분자, RNA 분자 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"란 용어는 비제한적으로 DNA 분자, 예를 들어 cDNA, 게놈 DNA 또는 합성 DNA 및 RNA 분자, 예를 들어 가이드 RNA, 전령 RNA 또는 합성 RNA를 포함한다. 더욱이, 본 명세서에 사용되는 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 단일-가닥 및 이중-가닥 형태를 포함한다.
- [0012] 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 "변형"이란 용어는 비제한적으로 (a) 단부 변형, 예를 들어 5' 단부 변형 또는 3' 단부 변형, (b) 염기의 교체 또는 제거를 포함한 핵염기(또는 "염기") 변형, (c) 2', 3' 및/또는 4' 위치의 변형을 포함한 당 변형, 및 (d) 포스포다이에스터 결합의 변형 또는 교체를 포함한 주쇄 변형을 포함한다. "변형된 뉴클레오타이드"란 용어는 일반적으로 상기 염기, 당, 및 뉴클레오타이드 포스포에이트를 포함한 포스포다이에스터 결합 또는 주쇄 부분 중 하나 이상의 화학 구조에 대한 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0013] "Z" 및 "P"란 용어는, 예를 들어 문헌["Artificially expanded genetic information system: a new base pair with an alternative hydrogen bonding pattern" Yang,Z., Hutter,D., Sheng,P., Sismour,A.M. and Benner,S.A. (2006) Nucleic Acids Res., 34, 6095-101](상기 문헌은 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은 스티븐 베너(Steven Benner)와 동료에 의해 개발된 뉴클레오타이드, 핵염기 또는 핵염기 유사체를 지칭한다.



[0014]

[0015]

용어 "xA", "xG", "xC", "xT", 또는 "x(A,G,C,T)" 및 "yA", "yG", "yC", "yT", 또는 "y(A,G,C,T)"는 문헌 ["Synthesis and Properties of Size-Expanded DNAs: Toward Designed, Functional Genetic Systems"; Andrew T. Krueger, Haige Lu, Alex H. F. Lee, and Eric T. Kool (2007) Acc. Chem. Res., 40, 141-50](상기 문헌은 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에서 크루에거(Krueger) 등에 의해 기재된 바와 같은 뉴클레오타이드, 핵염기, 또는 핵염기 유사체를 지칭한다.

[0016]

"비구조화 핵산" 또는 "UNA"란 용어는 US7371580(그의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은 뉴클레오타이드, 핵염기 또는 핵염기 유사체를 지칭한다. 비구조화 핵산, 또는 UNA 변형을 또한 "의사-상보성" 뉴클레오타이드, 핵염기 또는 핵염기 유사체라 지칭한다(예를 들어, 문헌[Lahoud et al. (1991) Nucl. Acids Res., 36: 10, 3409-19]을 참조하시오).

[0017]

"PACE" 및 "티오파스"란 용어는 각각 포스포노아세테이트 또는 티오포스포노아세테이트기를 함유하는 뉴클레오타이드간 포스포다이에스터 결합 유사체를 지칭한다. 이들 변형은 포스포노카복실레이트 부분, 포스포노카복실레이트 에스터 부분, 티오포스포노카복실레이트 부분 및 티오포스포노카복실레이트 에스터 부분을 포함한 광범위한 화합물 부류에 속한다. 이들 결합을 각각 화학식  $P(CR_1R_2)_nCOOR$  및  $(S)-P(CR_1R_2)_nCOOR$ (여기에서  $n$ 은 0 내지 6의 정수이고,  $R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로 H, 알킬 및 치환된 알킬로 이루어진 군 중에서 선택된다)에 의해 기재할 수 있다. 이들 변형 중 일부는 문헌[Yamada et al. "Synthesis and Biochemical Evaluation of Phosphonoformate Oligodeoxyribonucleotides" Christina M. Yamada, Douglas J. Dellinger and Marvin H. Caruthers (2006) 7. Am. Chem. Soc. 128: 15, 5251-61](상기 문헌은 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.

[0018]

본 명세서에 사용되는 "변형"은 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드, 즉 아데노신, 구아노신, 시티딘 및 유리딘 리보뉴클레오타이드에서 발견되는 것과 상이한 화학 부분 또는 화학 구조의 부분을 지칭한다. 상기 "변형"이란 용어는 변형의 유형을 지칭할 수도 있다. 예를 들어, "동일한 변형"은 동일한 유형의 변형을 의미하며, "변형된 뉴클레오타이드가 동일하다"는 변형된 뉴클레오타이드가 동일한 유형(들)의 변형을 갖는 반면 염기(A, G, C, U 등)는 상이할 수도 있음을 의미한다. 유사하게, "2개의 변형"을 갖는 가이드 RNA는 2개 유형의 변형(동일한 뉴클레오타이드 중에 있을 수도, 있지 않을 수도 있다)을 갖는 가이드 RNA이며, 각각의 유형은 상기 가이드 RNA 중의 다수의 뉴클레오타이드 중에 존재할 수 있다. 유사하게, "3개의 변형"을 갖는 가이드 RNA는 3개 유형의 변형(동일한 뉴클레오타이드 중에 있을 수도, 있지 않을 수도 있다)을 갖는 가이드 RNA이며, 각각의 유형은 다수의 뉴클레오타이드 중에 존재할 수 있다.

[0019]

본 명세서에 사용되는 "표적 폴리뉴클레오타이드" 또는 "표적"이란 용어는 표적 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있으며, 몇몇 실시태양에서, 이중-가닥 DNA이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 RNA이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "표적 핵산 서열" 또는 "표적 서열"은 크리스퍼 시스템을 사용하여 결합시키거나, 틸을 형성시키거나, 절단시키기를 원하는 특정 서열 또는 그의 보체를 의미한다.

[0020]

"하이브리드화" 또는 "하이브리드화하는"이란 용어는 전적으로 또는 부분적으로 상보성인 폴리뉴클레오타이드 가닥들이 함께 적합한 하이브리드화 조건하에서 이중-가닥 구조 또는 영역(여기에서 상기 2개의 구성 가닥들은 수소 결합에 의해 결합된다)을 형성하는 과정을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 "부분적인 하이브리드화"란 용어는 상기 이중-가닥 구조 또는 영역이 하나 이상의 별지 또는 불합치를 함유하는 경우를 포함한다. 수소 결합은 전형적으로 아데닌과 티민 또는 아데닌과 유라실(A와 T 또는 A와 U) 또는 시토신과 구아닌(C와 G) 사이에 형성되지만, 다른 비정규 염기쌍을 형성할 수도 있다(예를 들어, 문헌[Adams et al., "The Biochemistry of the Nucleic Acids," 11th ed., 1992]을 참조하시오). 변형된 뉴클레오타이드가, 하이브리드화를 허용하거나 촉진하는 수소 결합을 형성할 수도 있음이 고려된다.

[0021]

"절단" 또는 "절단하는"이란 용어는 폴리뉴클레오타이드의 리보실포스포다이에스터 주쇄 중의 공유 포스포다이

에스터 결합의 끊김을 지칭한다. 상기 "절단" 또는 "절단하는"이란 용어는 단일-가닥 끊김 및 이중-가닥 끊김을 모두 포함한다. 이중-가닥 절단은 2개의 별도의 단일-가닥 절단 사건의 결과로서 발생할 수 있다. 절단은 평활 단부 또는 엇갈린 단부를 생성시킬 수 있다.

[0022] "크리스퍼-결합된 단백질" 또는 "Cas 단백질"이란 용어는 야생형 Cas 단백질, 그의 단편, 또는 그의 돌연변이체 또는 변체를 지칭한다. "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"란 용어는 야생형 Cas 단백질의 단백질 또는 폴리펩타이드 유도체, 예를 들어 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입, 결실, 절두, 융합 단백질 또는 이들의 조합을 갖는 단백질을 지칭한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 실질적으로 상기 Cas 단백질의 뉴클레아제 활성을 유지한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 하나 또는 2개의 뉴클레아제 도메인이 모두 불활성이도록 돌연변이된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 뉴클레아제 활성을 갖는다. 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 그의 야생형 대응물의 뉴클레아제 활성 중 일부 또는 전부가 없다.

[0023] Cas 단백질의 "뉴클레아제 도메인"이란 용어는 DNA 절단에 대한 촉매 활성을 갖는 단백질내의 폴리펩타이드 서열 또는 도메인을 지칭한다. 뉴클레아제 도메인은 단일 폴리펩타이드쇄 중에 함유되거나, 절단 활성이 2개(또는 그 이상)의 폴리펩타이드의 결합으로부터 생성될 수 있다. 단일 뉴클레아제 도메인은 주어진 폴리펩타이드내 아미노산의 하나 초과와 단리된 신장부로 이루어질 수 있다. 이들 도메인의 예는 RuvC-형 동기(서열번호 1에서 아미노산 7-22, 759-766 및 982-989) 및 HNH 동기(aa 837-863)를 포함한다. 문헌[Gasiunas et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109:39, E2579-E2586] 및 WO2013176772를 참조하십시오.

[0024] "gRNA 기능성"을 갖는 합성 가이드 RNA는 천연 가이드 RNA의 기능들 중 하나 이상, 예를 들어 Cas 단백질과 결합하는 기능, 또는 Cas 단백질과 함께 상기 가이드 RNA에 의해 수행되는 기능을 갖는 것이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드와 결합함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 Cas 단백질 또는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 표적 폴리뉴클레오타이드에 표적화함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드에 틸을 형성시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 Cas 단백질과 회합하거나 결합함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 Cas 단백질을 갖는 크리스퍼-Cas 시스템, 예를 들어 조작된 Cas 단백질을 갖는 인공 크리스퍼-Cas 시스템에서 가이드 RNA의 임의의 다른 공지된 기능이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 천연 가이드 RNA의 임의의 다른 기능이다. 상기 합성 가이드 RNA는 gRNA 기능성을 천연 가이드 RNA보다 더 크거나 더 적은 정도로 가질 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 합성 가이드 RNA는 유사한 천연 가이드 RNA에 비해 하나의 성질에 관하여 더 큰 기능성을 갖고 또 다른 성질에 관하여 덜한 기능성을 가질 수 있다.

[0025] "단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질"은 야생형 Cas 단백질에 비해 dsDNA의 2개 가닥 중 하나를 절단하는 능력이 감소된 Cas 단백질(Cas 돌연변이체 또는 Cas 변체 포함)을 지칭한다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질은, RuvC 도메인(또는 HNH 도메인)의 기능을 감소시키고 결과적으로 표적 DNA의 하나의 가닥을 절단시키는 능력을 감소시키는 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)를 갖는다. 상기와 같은 변체의 예는 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9에서 D10A, H839A/H840A, 및/또는 N863A 치환을 포함하며, 다른 종들의 Cas9 효소 중 동일한 부위에서의 동일하거나 유사한 치환을 또한 포함한다.

[0026] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 서열의 "부분" 또는 "단편"이란 용어는 완전한 서열보다 작은 서열(예를 들어, 뉴클레오타이드 하위서열 또는 아미노산 하위서열)의 임의의 부분을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드의 부분은 임의의 길이, 예를 들어 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300 또는 500개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 가이드 서열의 일부는 상기 가이드 서열의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 예를 들어 상기 가이드 서열의 1/3, 또는 더 짧은, 예를 들어 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개 뉴클레오타이드의 길이일 수 있다.

[0027] 분자와 관련하여 "로부터 유래된"이란 용어는 모 분자 또는 상기 모 분자로부터의 정보를 사용하여 단리되거나 제조된 분자를 지칭한다. 예를 들어, Cas9 단일 돌연변이 니카제 및 Cas9 이중 돌연변이 삭제-뉴클레아제는 야생형 Cas9 단백질로부터 유래된다.

[0028] 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드(또는 2개 이상의 폴리펩타이드)와 관련하여 "실질적으로 동일한"이란 용어는 서열 비교 연산을 사용하거나 시각적 검사에 의해 최대의 상응성으로 비교 및 정렬했을 때, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 90-95%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 이상의 뉴클레오타이드(또는 아미노산) 서열 일치성을 갖는 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 바람직하게, 폴리



뉴클레오타이드들간의 "실질적인 일치성"은 상기 폴리뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 적어도 약 50개 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 100개 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 200개 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 300개 뉴클레오타이드 길이, 적어도 약 500개 뉴클레오타이드 길이로 존재하거나, 상기 폴리뉴클레오타이드의 전체 길이에 걸쳐 존재한다. 바람직하게, 상기 폴리펩타이드간의 "실질적인 일치성"은 상기 폴리펩타이드의 영역에 걸쳐 적어도 약 50개 아미노산 잔기, 적어도 약 100개 아미노산 잔기의 길이로 존재하거나, 상기 폴리펩타이드의 전체 길이에 걸쳐 존재한다.

[0029] 본 명세서에 개시되는 바와 같이, 다수의 값의 범위가 제공된다. 각각의 사이 값, 하한 단위의 1/10, 상기 범위의 상한과 하한 사이가 또한 구체적으로 고려되는 것으로 안다. 진술된 범위에 의해 포함되는 각각의 보다 작은 범위 또는 사이 값이 또한 구체적으로 고려된다. "약"이란 용어는 일반적으로, 지시된 수의 + 또는 - 10%를 지칭한다. 예를 들어, "약 10%"는 9% 내지 11%의 범위를 가리킬 수 있고, "약 20"은 18 내지 22를 의미할 수 있다. "약"의 다른 의미는 내용상 자명할 수 있다, 예를 들어 반올림, 따라서 예를 들어 "약 1"은 또한 0.5 내지 1.4를 의미할 수 있다.

[0030] II. 크리스퍼-매개된 서열-특이성 결합 및/또는 절단

[0031] 도 1에 DNA의 크리스퍼-Cas9-매개된 서열-특이성 절단의 다이어그램을 도시한다. 상기 가이드 RNA는, 5' 도메인, 내부에 위치한 염기-쌍 줄기, 및 3' 도메인내의 예시적인 20-뉴클레오타이드(20-nt) 가이드 서열(다른 가이드 서열은, 예를 들어 길이가 약 15 내지 약 30 nt일 수 있다)을 갖는 sgRNA로서 묘사된다. 상기 가이드 서열은 DNA 표적 중 예시적인 20-nt 표적 서열에 상보성이다. 상기 줄기는 crRNA 중 반복 서열에 상응하며 tracrRNA 중의 서열에 상보성이다. 상기 가이드 RNA의 3' 도메인은 Cas9 뉴클레아제에 결합하는 tracrRNA의 3' 도메인에 상응한다. 상기 Cas9:가이드 RNA 복합체는 Cas9에 의해 인식되는 PAM 서열의 바로 상류의 프로토스펙터이서 또는 표적 DNA 서열에 결합하고 이를 절단한다. 도 1에서, 3-nt PAM 서열을 예시하나; 4-nt 및 5-nt PAM 서열을 포함하여 다른 PAM 서열들이 공지되어 있다. 도 1에 예시된 시스템에서, DNA 중의 표적 서열의 2개의 가닥은 모두 화살표로 지시된 부위에서 Cas9에 의해 절단된다.

[0032] III. 가이드 RNA

[0033] 적어도 하나의 태양에서, 본 발명은 가이드 RNA 기능성을 갖는 화학적으로 변형된 가이드 RNA를 포함한다. 4개의 정규 리보뉴클레오타이드, 즉 A, C, G 및 U(비천연이든 천연이든 간에) 이외의 임의의 뉴클레오타이드(예를 들어, 슈도유리딘, 이노신 또는 데옥시뉴클레오타이드)를 포함하는 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 가이드 RNA이다. 마찬가지로 천연 포스포다이에스테르 뉴클레오타이드간 결합 이외의 임의의 주쇄 또는 뉴클레오타이드간 결합을 포함하는 가이드 RNA는 화학적 변형을 가지며, 따라서 화학적으로 변형된 RNA이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 Cas 단백질과의 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드와의 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 Cas 단백질 또는 gRNA:Cas 단백질 복합체를 표적 폴리뉴클레오타이드에 표적화함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드의 틸 형성을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 Cas 단백질을 갖는 크리스퍼-Cas 시스템, 예를 들어 조작된 Cas 단백질을 갖는 인공 크리스퍼-Cas 시스템에서 가이드 RNA의 임의의 다른 공지된 기능이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 유지되는 기능성은 천연 가이드 RNA의 임의의 다른 기능이다.

[0034] A. 예시적인 변형

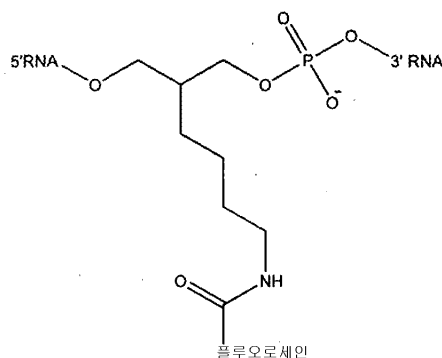
[0035] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA에 통합된 뉴클레오타이드 당 변형은 2'-O-C<sub>1-4</sub>알킬, 예를 들어 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-데옥시(2'-H), 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬, 예를 들어 2'-메톡시에틸("2'-MOE"), 2'-플루오로("2'-F"), 2'-아미노("2'-NH<sub>2</sub>"), 2'-아라비노실("2'-아라비노") 뉴클레오타이드, 2'-F-아라비노실("2'-F-아라비노") 뉴클레오타이드, 2'-잠금 핵산("LNA")뉴클레오타이드, 2'-열림 핵산("ULNA") 뉴클레오타이드, L 형태의 당("L-당") 및 4'-티오리보실 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA에 통합된 뉴클레오타이드간 결합 변형은 포스포로티오에이트 "P(S)"(P(S)), 포스포노카복실레이트(P(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR), 예를 들어 포스포노아세테이트 "PACE"(P(CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>)), 티오포스포노카복실레이트((S)P(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR), 예를 들어 티오포스포노아세테이트 "티오파스"(S)P(CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>)), 알킬포스포네이트(P(C<sub>1-3</sub>알킬)), 예를 들어 메틸포스포네이트-P(CH<sub>3</sub>), 보라노포스포네이트(P(BH<sub>3</sub>)) 및 포스포로다이티오에이트(P(S)<sub>2</sub>)로 이루어진 군 중에서 선

택된다.

[0036] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA에 통합된 핵염기("염기") 변형은 2-티오유라실("2-티오U"), 2-티오시토신("2-티오C"), 4-티오유라실("4-티오U"), 6-티오구아닌("6-티오G"), 2-아미노아데닌("2-아미노A"), 2-아미노퓨린, 슈도유라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸시토신("5-메틸C"), 5-메틸유라실("5-메틸U"), 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-데하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에티닐시토신, 5-에티닐유라실, 5-알릴유라실("5-알릴U"), 5-알릴시토신("5-알릴C"), 5-아미노알릴유라실("5-아미노알릴U"), 5-아미노알릴-시토신("5-아미노알릴C"), 비염기성 뉴클레오타이드, Z 염기, P 염기, 비구조화 핵산("UNA"), 아이소구아닌("아이소G"), 아이소시토신("아이소C") [문헌["Enzymatic Incorporation of a New Base pair into DNA and RNA Extends the Genetic Alphabet." Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. A. (1990) Nature, 343, 33]에 기재된 바와 같은), 5-메틸-2-피리미딘 [문헌[Rappaport, H. P. (1993) Biochemistry, 32, 3047]에 기재된 바와 같은], x(A,G,C,T) 및 y(A,G,C,T)로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0037] 몇몇 실시태양에서, 하나 이상의 동위원소 변형이 뉴클레오타이드 당, 핵염기, 포스포다이에스터 결합 및/또는 뉴클레오타이드 포스포에이트상에 도입된다. 상기과 같은 변형은 추적자로서 사용되는 하나 이상의  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ , 중수소,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  원자 또는 다른 원자 또는 원소를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다.

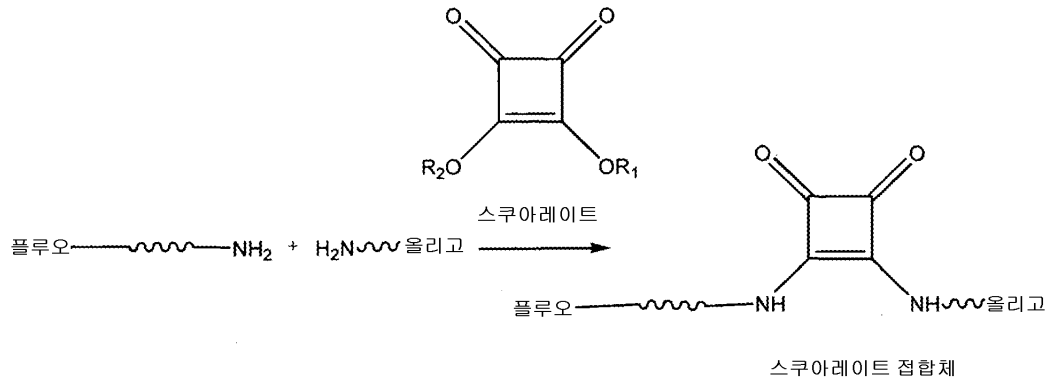
[0038] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA에 통합되는 "단부" 변형은 PEG(폴리에틸렌글리콜), 탄화수소 링커(헤테로 원자(O,S,N)-치환된 탄화수소 스페이서; 할로-치환된 탄화수소 스페이서; 케토-, 카복실-, 아미도-, 티오닐-, 카바모일-, 티오노카바모일-함유 탄화수소 스페이서 포함), 스페르민 링커, 링커에 부착된 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 시아닌)를 포함하는 염료, 예를 들어 6-플루오레세인-핵심, 소광제(예를 들어, 답 실, BHQ) 및 다른 표지(예를 들어, 비오틴, 디곡시제닌, 아크리딘, 스트렙트아비딘, 아비딘, 펩타이드 및/또는 단백질)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 몇몇 실시태양에서, "단부" 변형은 상기 가이드 RNA의, 올리고뉴클레오타이드(데옥시뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드 포함), 펩타이드, 단백질, 당, 올리고사카라이드, 스테로이드, 지질, 폴산, 비타민 및/또는 다른 분자를 포함하는 또 다른 분자에의 접합(또는 결합)을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA에 통합된 "단부" 변형은 링커, 예를 들어 2-(4-부틸아미도플루오레세인)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커(하기예 묘사됨)(이는 포스포다이에스터 결합으로서 통합되고 상기 가이드 RNA 중의 2개의 뉴클레오타이드 사이의 어디에나 통합될 수 있다)를 통해 상기 가이드 RNA 서열에 내부적으로 위치한다.



[0039] 2-(4-부틸아미도플루오로세인)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커







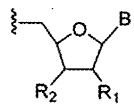
[0047]

[0048]

몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA에 통합되는 화학적 변형은 2'-O-C<sub>1-4</sub>알킬, 2'-H, 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬, 2'-F, 2'-NH<sub>2</sub>, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 4'-티오리보실, 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노퓨린, 슈도유라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-데하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에티닐시토신, 5-에티닐유라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴유라실, 5-아미노알릴-시토신, 비염기성 뉴클레오타이드("abN"), Z, P, UNA, 아이소C, 아이소G, 5-메틸-피리미딘, x(A,G,C,T) 및 y(A,G,C,T), 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 보라노포스페이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포로다이티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 4'-티오리보실 뉴클레오타이드, 잠금 핵산("LNA") 뉴클레오타이드, 열림 핵산("ULNA") 뉴클레오타이드, 알킬 스페이서, 헤테로알킬(N,O,S) 스페이서, 5'- 및/또는 3'-알킬 종결된 뉴클레오타이드, 유니캡, 자연으로부터 알려진 5'-말단 캡, xRNA 염기("xDNA" 염기와 유사함), yRNA 염기("yDNA" 염기와 유사함), PEG 치환체, 또는 염료 또는 비-형광 표지(또는 태그) 또는 상술한 바와 같은 다른 부분에 대한 접합된 링커로 이루어진 군 중에서 선택된다. 예시적인 변형된 뉴클레오타이드를 또한 표 2에 묘사한다.

[0049]

[표 2]



$R_1 = \text{OH}$  또는 2'변형  
 $R_2 = \text{OH}$  또는 뉴클레오타이드간 결합  
 $B = \text{염기}$

[0050]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
A1	OH	OH	유리딘
A2	OMe	OH	유리딘
A3	F	OH	유리딘
A4	Cl	OH	유리딘
A5	Br	OH	유리딘
A6	I	OH	유리딘
A7	NH <sub>2</sub>	OH	유리딘
A8	H	OH	유리딘
A9	OH	포스포다이에스터	유리딘
A10	OMe	포스포다이에스터	유리딘
A11	F	포스포다이에스터	유리딘
A12	Cl	포스포다이에스터	유리딘
A13	Br	포스포다이에스터	유리딘
A14	I	포스포다이에스터	유리딘
A15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	유리딘
A16	H	포스포다이에스터	유리딘
A17	OH	포스포노아세테이트	유리딘
A18	OMe	포스포노아세테이트	유리딘
A19	F	포스포노아세테이트	유리딘
A20	Cl	포스포노아세테이트	유리딘
A21	Br	포스포노아세테이트	유리딘
A22	I	포스포노아세테이트	유리딘
A23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	유리딘
A24	H	포스포노아세테이트	유리딘
A25	OH	티오포스포노아세테이트	유리딘
A26	OMe	티오포스포노아세테이트	유리딘
A27	F	티오포스포노아세테이트	유리딘
A28	Cl	티오포스포노아세테이트	유리딘
A29	Br	티오포스포노아세테이트	유리딘
A30	I	티오포스포노아세테이트	유리딘
A31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	유리딘
A32	H	티오포스포노아세테이트	유리딘
A33	OH	포스포로티오에이트	유리딘
A34	OMe	포스포로티오에이트	유리딘
A35	F	포스포로티오에이트	유리딘
A36	Cl	포스포로티오에이트	유리딘
A37	Br	포스포로티오에이트	유리딘
A38	I	포스포로티오에이트	유리딘
A39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	유리딘
A40	H	포스포로티오에이트	유리딘
A41	OH	포스포로다이티오에이트	유리딘
A42	OMe	포스포로다이티오에이트	유리딘
A43	F	포스포로다이티오에이트	유리딘
A44	Cl	포스포로다이티오에이트	유리딘

[0051]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
A45	Br	포스포로티오에이트	유리딘
A46	I	포스포로티오에이트	유리딘
A47	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	유리딘
A48	H	포스포로티오에이트	유리딘
A49	OH	메틸포스포네이트	유리딘
A50	OMe	메틸포스포네이트	유리딘
A51	F	메틸포스포네이트	유리딘
A52	Cl	메틸포스포네이트	유리딘
A53	Br	메틸포스포네이트	유리딘
A54	I	메틸포스포네이트	유리딘
A55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	유리딘
A56	H	메틸포스포네이트	유리딘
A57	OH	보라노포스포네이트	유리딘
A58	OMe	보라노포스포네이트	유리딘
A59	F	보라노포스포네이트	유리딘
A60	Cl	보라노포스포네이트	유리딘
A61	Br	보라노포스포네이트	유리딘
A62	I	보라노포스포네이트	유리딘
A63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	유리딘
A64	H	보라노포스포네이트	유리딘
B1	OH	OH	아데노신
B2	OMe	OH	아데노신
B3	F	OH	아데노신
B4	Cl	OH	아데노신
B5	Br	OH	아데노신
B6	I	OH	아데노신
B7	NH <sub>2</sub>	OH	아데노신
B8	H	OH	아데노신
B9	OH	포스포다이에스터	아데노신
B10	OMe	포스포다이에스터	아데노신
B11	F	포스포다이에스터	아데노신
B12	Cl	포스포다이에스터	아데노신
B13	Br	포스포다이에스터	아데노신
B14	I	포스포다이에스터	아데노신
B15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	아데노신
B16	H	포스포다이에스터	아데노신
B17	OH	포스포노아세테이트	아데노신
B18	OMe	포스포노아세테이트	아데노신
B19	F	포스포노아세테이트	아데노신
B20	Cl	포스포노아세테이트	아데노신
B21	Br	포스포노아세테이트	아데노신
B22	I	포스포노아세테이트	아데노신
B23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	아데노신
B24	H	포스포노아세테이트	아데노신

[0052]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
B25	OH	티오포스포노아세테이트	아데노신
B26	OMe	티오포스포노아세테이트	아데노신
B27	F	티오포스포노아세테이트	아데노신
B28	Cl	티오포스포노아세테이트	아데노신
B29	Br	티오포스포노아세테이트	아데노신
B30	I	티오포스포노아세테이트	아데노신
B31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	아데노신
B32	H	티오포스포노아세테이트	아데노신
B33	OH	포스포로티오에이트	아데노신
B34	OMe	포스포로티오에이트	아데노신
B35	F	포스포로티오에이트	아데노신
B36	Cl	포스포로티오에이트	아데노신
B37	Br	포스포로티오에이트	아데노신
B38	I	포스포로티오에이트	아데노신
B39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	아데노신
B40	H	포스포로티오에이트	아데노신
B41	OH	포스포로다이티오에이트	아데노신
B42	OMe	포스포로다이티오에이트	아데노신
B43	F	포스포로다이티오에이트	아데노신
B44	Cl	포스포로다이티오에이트	아데노신
B45	Br	포스포로다이티오에이트	아데노신
B46	I	포스포로다이티오에이트	아데노신
B47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	아데노신
B48	H	포스포로다이티오에이트	아데노신
B49	OH	메틸포스포네이트	아데노신
B50	OMe	메틸포스포네이트	아데노신
B51	F	메틸포스포네이트	아데노신
B52	Cl	메틸포스포네이트	아데노신
B53	Br	메틸포스포네이트	아데노신
B54	I	메틸포스포네이트	아데노신
B55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	아데노신
B56	H	메틸포스포네이트	아데노신
B57	OH	보라노포스포네이트	아데노신
B58	OMe	보라노포스포네이트	아데노신
B59	F	보라노포스포네이트	아데노신
B60	Cl	보라노포스포네이트	아데노신
B61	Br	보라노포스포네이트	아데노신
B62	I	보라노포스포네이트	아데노신
B63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	아데노신
B64	H	보라노포스포네이트	아데노신
C1	OH	OH	시티딘
C2	OMe	OH	시티딘
C3	F	OH	시티딘
C4	Cl	OH	시티딘

[0053]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
C5	Br	OH	시티딘
C6	I	OH	시티딘
C7	NH <sub>2</sub>	OH	시티딘
C8	H	OH	시티딘
C9	OH	포스포다이에스터	시티딘
C10	OMe	포스포다이에스터	시티딘
C11	F	포스포다이에스터	시티딘
C12	Cl	포스포다이에스터	시티딘
C13	Br	포스포다이에스터	시티딘
C14	I	포스포다이에스터	시티딘
C15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	시티딘
C16	H	포스포다이에스터	시티딘
C17	OH	포스포노아세테이트	시티딘
C18	OMe	포스포노아세테이트	시티딘
C19	F	포스포노아세테이트	시티딘
C20	Cl	포스포노아세테이트	시티딘
C21	Br	포스포노아세테이트	시티딘
C22	I	포스포노아세테이트	시티딘
C23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	시티딘
C24	H	포스포노아세테이트	시티딘
C25	OH	티오포스포노아세테이트	시티딘
C26	OMe	티오포스포노아세테이트	시티딘
C27	F	티오포스포노아세테이트	시티딘
C28	Cl	티오포스포노아세테이트	시티딘
C29	Br	티오포스포노아세테이트	시티딘
C30	I	티오포스포노아세테이트	시티딘
C31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	시티딘
C32	H	티오포스포노아세테이트	시티딘
C33	OH	포스포로티오에이트	시티딘
C34	OMe	포스포로티오에이트	시티딘
C35	F	포스포로티오에이트	시티딘
C36	Cl	포스포로티오에이트	시티딘
C37	Br	포스포로티오에이트	시티딘
C38	I	포스포로티오에이트	시티딘
C39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	시티딘
C40	H	포스포로티오에이트	시티딘
C41	OH	포스포로다이티오에이트	시티딘
C42	OMe	포스포로다이티오에이트	시티딘
C43	F	포스포로다이티오에이트	시티딘
C44	Cl	포스포로다이티오에이트	시티딘
C45	Br	포스포로다이티오에이트	시티딘
C46	I	포스포로다이티오에이트	시티딘
C47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	시티딘
C48	H	포스포로다이티오에이트	시티딘

[0054]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
C49	OH	메틸포스포네이트	시티딘
C50	OMe	메틸포스포네이트	시티딘
C51	F	메틸포스포네이트	시티딘
C52	Cl	메틸포스포네이트	시티딘
C53	Br	메틸포스포네이트	시티딘
C54	I	메틸포스포네이트	시티딘
C55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	시티딘
C56	H	메틸포스포네이트	시티딘
C57	OH	보라노포스포네이트	시티딘
C58	OMe	보라노포스포네이트	시티딘
C59	F	보라노포스포네이트	시티딘
C60	Cl	보라노포스포네이트	시티딘
C61	Br	보라노포스포네이트	시티딘
C62	I	보라노포스포네이트	시티딘
C63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	시티딘
C64	H	보라노포스포네이트	시티딘
D1	OH	OH	구아노신
D2	OMe	OH	구아노신
D3	F	OH	구아노신
D4	Cl	OH	구아노신
D5	Br	OH	구아노신
D6	I	OH	구아노신
D7	NH <sub>2</sub>	OH	구아노신
D8	H	OH	구아노신
D9	OH	포스포다이에스터	구아노신
D10	OMe	포스포다이에스터	구아노신
D11	F	포스포다이에스터	구아노신
D12	Cl	포스포다이에스터	구아노신
D13	Br	포스포다이에스터	구아노신
D14	I	포스포다이에스터	구아노신
D15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	구아노신
D16	H	포스포다이에스터	구아노신
D17	OH	포스포노아세테이트	구아노신
D18	OMe	포스포노아세테이트	구아노신
D19	F	포스포노아세테이트	구아노신
D20	Cl	포스포노아세테이트	구아노신
D21	Br	포스포노아세테이트	구아노신
D22	I	포스포노아세테이트	구아노신
D23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	구아노신
D24	H	포스포노아세테이트	구아노신
D25	OH	티오포스포노아세테이트	구아노신
D26	OMe	티오포스포노아세테이트	구아노신
D27	F	티오포스포노아세테이트	구아노신
D28	Cl	티오포스포노아세테이트	구아노신

[0055]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
D29	Br	티오포스포노아세테이트	구아노신
D30	I	티오포스포노아세테이트	구아노신
D31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	구아노신
D32	H	티오포스포노아세테이트	구아노신
D33	OH	포스포로티오에이트	구아노신
D34	OMe	포스포로티오에이트	구아노신
D35	F	포스포로티오에이트	구아노신
D36	Cl	포스포로티오에이트	구아노신
D37	Br	포스포로티오에이트	구아노신
D38	I	포스포로티오에이트	구아노신
D39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	구아노신
D40	H	포스포로티오에이트	구아노신
D41	OH	포스포로다이티오에이트	구아노신
D42	OMe	포스포로다이티오에이트	구아노신
D43	F	포스포로다이티오에이트	구아노신
D44	Cl	포스포로다이티오에이트	구아노신
D45	Br	포스포로다이티오에이트	구아노신
D46	I	포스포로다이티오에이트	구아노신
D47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	구아노신
D48	H	포스포로다이티오에이트	구아노신
D49	OH	메틸포스포네이트	구아노신
D50	OMe	메틸포스포네이트	구아노신
D51	F	메틸포스포네이트	구아노신
D52	Cl	메틸포스포네이트	구아노신
D53	Br	메틸포스포네이트	구아노신
D54	I	메틸포스포네이트	구아노신
D55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	구아노신
D56	H	메틸포스포네이트	구아노신
D57	OH	보라노포스포네이트	구아노신
D58	OMe	보라노포스포네이트	구아노신
D59	F	보라노포스포네이트	구아노신
D60	Cl	보라노포스포네이트	구아노신
D61	Br	보라노포스포네이트	구아노신
D62	I	보라노포스포네이트	구아노신
D63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	구아노신
D64	H	보라노포스포네이트	구아노신
E1	OH	OH	2-티오유리딘
E2	OMe	OH	2-티오유리딘
E3	F	OH	2-티오유리딘
E4	Cl	OH	2-티오유리딘
E5	Br	OH	2-티오유리딘
E6	I	OH	2-티오유리딘
E7	NH <sub>2</sub>	OH	2-티오유리딘
E8	H	OH	2-티오유리딘

[0056]



#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
E9	OH	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E10	OMe	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E11	F	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E12	Cl	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E13	Br	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E14	I	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E16	H	포스포다이에스터	2-티오유리딘
E17	OH	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E18	OMe	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E19	F	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E20	Cl	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E21	Br	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E22	I	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E24	H	포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E25	OH	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E26	OMe	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E27	F	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E28	Cl	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E29	Br	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E30	I	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E32	H	티오포스포노아세테이트	2-티오유리딘
E33	OH	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E34	OMe	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E35	F	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E36	Cl	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E37	Br	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E38	I	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E40	H	포스포로티오에이트	2-티오유리딘
E41	OH	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E42	OMe	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E43	F	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E44	Cl	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E45	Br	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E46	I	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E48	H	포스포로다이트오에이트	2-티오유리딘
E49	OH	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E50	OMe	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E51	F	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E52	Cl	메틸포스포네이트	2-티오유리딘

[0057]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
E53	Br	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E54	I	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E56	H	메틸포스포네이트	2-티오유리딘
E57	OH	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E58	OMe	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E59	F	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E60	Cl	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E61	Br	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E62	I	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
E64	H	보라노포스포네이트	2-티오유리딘
F1	OH	OH	4-티오유리딘
F2	OMe	OH	4-티오유리딘
F3	F	OH	4-티오유리딘
F4	Cl	OH	4-티오유리딘
F5	Br	OH	4-티오유리딘
F6	I	OH	4-티오유리딘
F7	NH <sub>2</sub>	OH	4-티오유리딘
F8	H	OH	4-티오유리딘
F9	OH	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F10	OMe	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F11	F	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F12	Cl	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F13	Br	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F14	I	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F16	H	포스포다이에스터	4-티오유리딘
F17	OH	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F18	OMe	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F19	F	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F20	Cl	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F21	Br	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F22	I	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F24	H	포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F25	OH	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F26	OMe	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F27	F	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F28	Cl	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F29	Br	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F30	I	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘
F32	H	티오포스포노아세테이트	4-티오유리딘

[0058]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
F33	OH	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F34	OMe	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F35	F	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F36	Cl	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F37	Br	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F38	I	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F40	H	포스포로티오에이트	4-티오유리딘
F41	OH	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F42	OMe	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F43	F	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F44	Cl	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F45	Br	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F46	I	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F48	H	포스포로다이티오에이트	4-티오유리딘
F49	OH	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F50	OMe	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F51	F	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F52	Cl	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F53	Br	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F54	I	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F56	H	메틸포스포네이트	4-티오유리딘
F57	OH	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F58	OMe	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F59	F	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F60	Cl	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F61	Br	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F62	I	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
F64	H	보라노포스포네이트	4-티오유리딘
G1	OH	OH	2-아미노아데노신
G2	OMe	OH	2-아미노아데노신
G3	F	OH	2-아미노아데노신
G4	Cl	OH	2-아미노아데노신
G5	Br	OH	2-아미노아데노신
G6	I	OH	2-아미노아데노신
G7	NH <sub>2</sub>	OH	2-아미노아데노신
G8	H	OH	2-아미노아데노신
G9	OH	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G10	OMe	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G11	F	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G12	Cl	포스포다이에스터	2-아미노아데노신

[0059]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
G13	Br	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G14	I	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G16	H	포스포다이에스터	2-아미노아데노신
G17	OH	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G18	OMe	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G19	F	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G20	Cl	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G21	Br	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G22	I	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G24	H	포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G25	OH	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G26	OMe	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G27	F	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G28	Cl	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G29	Br	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G30	I	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G32	H	티오포스포노아세테이트	2-아미노아데노신
G33	OH	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G34	OMe	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G35	F	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G36	Cl	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G37	Br	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G38	I	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G40	H	포스포로티오에이트	2-아미노아데노신
G41	OH	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G42	OMe	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G43	F	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G44	Cl	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G45	Br	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G46	I	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G48	H	포스포로다이트오에이트	2-아미노아데노신
G49	OH	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G50	OMe	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G51	F	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G52	Cl	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G53	Br	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G54	I	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신
G56	H	메틸포스포네이트	2-아미노아데노신

[0060]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
G57	OH	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G58	OMe	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G59	F	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G60	Cl	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G61	Br	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G62	I	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
G64	H	보라노포스포네이트	2-아미노아데노신
H1	OH	OH	7-데아자구아노신
H2	OMe	OH	7-데아자구아노신
H3	F	OH	7-데아자구아노신
H4	Cl	OH	7-데아자구아노신
H5	Br	OH	7-데아자구아노신
H6	I	OH	7-데아자구아노신
H7	NH <sub>2</sub>	OH	7-데아자구아노신
H8	H	OH	7-데아자구아노신
H9	OH	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H10	OMe	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H11	F	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H12	Cl	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H13	Br	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H14	I	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H16	H	포스포다이에스터	7-데아자구아노신
H17	OH	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H18	OMe	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H19	F	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H20	Cl	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H21	Br	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H22	I	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H24	H	포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H25	OH	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H26	OMe	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H27	F	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H28	Cl	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H29	Br	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H30	I	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H32	H	티오포스포노아세테이트	7-데아자구아노신
H33	OH	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H34	OMe	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H35	F	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H36	Cl	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신

[0061]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
H37	Br	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H38	I	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H40	H	포스포로티오에이트	7-데아자구아노신
H41	OH	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H42	OMe	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H43	F	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H44	Cl	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H45	Br	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H46	I	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H48	H	포스포로다이트오에이트	7-데아자구아노신
H49	OH	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H50	OMe	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H51	F	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H52	Cl	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H53	Br	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H54	I	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H56	H	메틸포스포네이트	7-데아자구아노신
H57	OH	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H58	OMe	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H59	F	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H60	Cl	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H61	Br	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H62	I	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
H64	H	보라노포스포네이트	7-데아자구아노신
I1	OH	OH	이노신
I2	OMe	OH	이노신
I3	F	OH	이노신
I4	Cl	OH	이노신
I5	Br	OH	이노신
I6	I	OH	이노신
I7	NH <sub>2</sub>	OH	이노신
I8	H	OH	이노신
I9	OH	포스포다이에스터	이노신
I10	OMe	포스포다이에스터	이노신
I11	F	포스포다이에스터	이노신
I12	Cl	포스포다이에스터	이노신
I13	Br	포스포다이에스터	이노신
I14	I	포스포다이에스터	이노신
I15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	이노신
I16	H	포스포다이에스터	이노신

[0062]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B.
I17	OH	포스포노아세테이트	이노신
I18	OMe	포스포노아세테이트	이노신
I19	F	포스포노아세테이트	이노신
I20	Cl	포스포노아세테이트	이노신
I21	Br	포스포노아세테이트	이노신
I22	I	포스포노아세테이트	이노신
I23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	이노신
I24	H	포스포노아세테이트	이노신
I25	OH	티오포스포노아세테이트	이노신
I26	OMe	티오포스포노아세테이트	이노신
I27	F	티오포스포노아세테이트	이노신
I28	Cl	티오포스포노아세테이트	이노신
I29	Br	티오포스포노아세테이트	이노신
I30	I	티오포스포노아세테이트	이노신
I31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	이노신
I32	H	티오포스포노아세테이트	이노신
I33	OH	포스포로티오에이트	이노신
I34	OMe	포스포로티오에이트	이노신
I35	F	포스포로티오에이트	이노신
I36	Cl	포스포로티오에이트	이노신
I37	Br	포스포로티오에이트	이노신
I38	I	포스포로티오에이트	이노신
I39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	이노신
I40	H	포스포로티오에이트	이노신
I41	OH	포스포로다이티오에이트	이노신
I42	OMe	포스포로다이티오에이트	이노신
I43	F	포스포로다이티오에이트	이노신
I44	Cl	포스포로다이티오에이트	이노신
I45	Br	포스포로다이티오에이트	이노신
I46	I	포스포로다이티오에이트	이노신
I47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	이노신
I48	H	포스포로다이티오에이트	이노신
I49	OH	메틸포스포네이트	이노신
I50	OMe	메틸포스포네이트	이노신
I51	F	메틸포스포네이트	이노신
I52	Cl	메틸포스포네이트	이노신
I53	Br	메틸포스포네이트	이노신
I54	I	메틸포스포네이트	이노신
I55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	이노신
I56	H	메틸포스포네이트	이노신
I57	OH	보라노포스포네이트	이노신
I58	OMe	보라노포스포네이트	이노신
I59	F	보라노포스포네이트	이노신
I60	Cl	보라노포스포네이트	이노신

[0063]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
I61	Br	보라노포스포네이트	이노신
I62	I	보라노포스포네이트	이노신
I63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	이노신
I64	H	보라노포스포네이트	이노신
J1	OH	OH	5-메틸시티딘
J2	OMe	OH	5-메틸시티딘
J3	F	OH	5-메틸시티딘
J4	Cl	OH	5-메틸시티딘
J5	Br	OH	5-메틸시티딘
J6	I	OH	5-메틸시티딘
J7	NH <sub>2</sub>	OH	5-메틸시티딘
J8	H	OH	5-메틸시티딘
J9	OH	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J10	OMe	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J11	F	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J12	Cl	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J13	Br	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J14	I	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J16	H	포스포다이에스터	5-메틸시티딘
J17	OH	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J18	OMe	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J19	F	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J20	Cl	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J21	Br	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J22	I	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J24	H	포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J25	OH	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J26	OMe	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J27	F	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J28	Cl	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J29	Br	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J30	I	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J32	H	티오포스포노아세테이트	5-메틸시티딘
J33	OH	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J34	OMe	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J35	F	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J36	Cl	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J37	Br	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J38	I	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘
J40	H	포스포로티오에이트	5-메틸시티딘

[0064]



#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
J41	OH	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J42	OMe	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J43	F	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J44	Cl	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J45	Br	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J46	I	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J48	H	포스포로다이트오에이트	5-메틸시티딘
J49	OH	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J50	OMe	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J51	F	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J52	Cl	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J53	Br	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J54	I	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J56	H	메틸포스포네이트	5-메틸시티딘
J57	OH	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J58	OMe	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J59	F	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J60	Cl	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J61	Br	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J62	I	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
J64	H	보라노포스포네이트	5-메틸시티딘
K1	OH	OH	5-아미노알릴유리딘
K2	OMe	OH	5-아미노알릴유리딘
K3	F	OH	5-아미노알릴유리딘
K4	Cl	OH	5-아미노알릴유리딘
K5	Br	OH	5-아미노알릴유리딘
K6	I	OH	5-아미노알릴유리딘
K7	NH <sub>2</sub>	OH	5-아미노알릴유리딘
K8	H	OH	5-아미노알릴유리딘
K9	OH	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K10	OMe	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K11	F	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K12	Cl	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K13	Br	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K14	I	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K16	H	포스포다이에스터	5-아미노알릴유리딘
K17	OH	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K18	OMe	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K19	F	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K20	Cl	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘

[0065]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
K21	Br	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K22	I	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K24	H	포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K25	OH	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K26	OMe	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K27	F	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K28	Cl	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K29	Br	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K30	I	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K32	H	티오포스포노아세테이트	5-아미노알릴유리딘
K33	OH	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K34	OMe	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K35	F	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K36	Cl	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K37	Br	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K38	I	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K40	H	포스포로티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K41	OH	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K42	OMe	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K43	F	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K44	Cl	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K45	Br	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K46	I	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K48	H	포스포로다이티오에이트	5-아미노알릴유리딘
K49	OH	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K50	OMe	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K51	F	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K52	Cl	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K53	Br	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K54	I	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K56	H	메틸포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K57	OH	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K58	OMe	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K59	F	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K60	Cl	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K61	Br	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K62	I	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘
K64	H	보라노포스포네이트	5-아미노알릴유리딘

[0066]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
L1	OH	OH	5-메틸유리딘
L2	OMe	OH	5-메틸유리딘
L3	F	OH	5-메틸유리딘
L4	Cl	OH	5-메틸유리딘
L5	Br	OH	5-메틸유리딘
L6	I	OH	5-메틸유리딘
L7	NH <sub>2</sub>	OH	5-메틸유리딘
L8	H	OH	5-메틸유리딘
L9	OH	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L10	OMe	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L11	F	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L12	Cl	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L13	Br	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L14	I	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L15	NH <sub>2</sub>	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L16	H	포스포다이에스터	5-메틸유리딘
L17	OH	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L18	OMe	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L19	F	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L20	Cl	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L21	Br	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L22	I	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L23	NH <sub>2</sub>	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L24	H	포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L25	OH	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L26	OMe	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L27	F	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L28	Cl	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L29	Br	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L30	I	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L31	NH <sub>2</sub>	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L32	H	티오포스포노아세테이트	5-메틸유리딘
L33	OH	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L34	OMe	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L35	F	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L36	Cl	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L37	Br	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L38	I	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L39	NH <sub>2</sub>	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L40	H	포스포로티오에이트	5-메틸유리딘
L41	OH	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L42	OMe	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L43	F	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L44	Cl	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘

[0067]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
L45	Br	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L46	I	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L47	NH <sub>2</sub>	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L48	H	포스포로다이티오에이트	5-메틸유리딘
L49	OH	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L50	OMe	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L51	F	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L52	Cl	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L53	Br	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L54	I	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L55	NH <sub>2</sub>	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L56	H	메틸포스포네이트	5-메틸유리딘
L57	OH	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L58	OMe	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L59	F	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L60	Cl	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L61	Br	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L62	I	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L63	NH <sub>2</sub>	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘
L64	H	보라노포스포네이트	5-메틸유리딘

[0068]

[0069]

본 명세서에 기재된 바와 같이 몇몇 비천연 염기쌍(예를 들어, 아이소G 및 아이소C, Z 염기 및 P 염기; 문헌 [Zhang et al. (2015) J. Am. Chem. Soc.]을 참조하시오)이 상기 가이드 RNA 2차 구조의 열안정성에 영향을 미치는데 유리할 수 있다. 상기 변형을 사용하여 상기 가이드 RNA 스캐폴드와 가이드 RNA 서열의 다른 도메인과의 잘못접합을 방지할 수 있다.

[0070]

최근의 가이드 RNA:Cas9 단백질 구조 정보(도 10, 문헌[Jiang et al. 2015, Science]에 보고된 바와 같은) 및 생체내/시험관내 기능적 돌연변이 연구(예를 들어, 문헌[Briner et al. 2014, Mol. Cell, 56, 333-9]을 참조하시오)는 상기 가이드 RNA 스캐폴드가 우세하게 구조적으로 보존됨을 가리킨다. 이는 Cas9에 의한 기능성을 위해 가이드 RNA의 보존된 도메인의 정확한 접합의 중요성을 보장한다. 도 10은 Cas9의 아미노산과 상호작용을 나타내는, 상기 가이드 RNA 스캐폴드 2차 구조를 도시한다. 상기 가이드 RNA 절소 염기의 대부분은 Cas9 단백질과의 결합 상호작용에 관여하지 않는다.

[0071]

상기 sgRNA 스캐폴드의 인접 서열은 잘못 접합 및 따라서 오기능의 가능성을 증가시킨다. 상기 20 nt 가이드 표적화 서열, 상기 스캐폴드 영역의 5'은 각 표적에 대해 사용자-특이적이며, 따라서 잘못 접합의 가능성은 가변성이거나 표적-특이적이다. 또한, 다수의 최근 등장한 크리스퍼-Cas 응용은 상기 스캐폴드, 예를 들어 크리스퍼디스플레이(문헌[Schechner et al., Nat. Methods 2015]) 및 크리스퍼-i/-a(문헌[Chen et al., Cell 2013])(이들은 적합하게 기능하기 위해서 정확하고 독립적으로 접합 필요가 있는 리보스위치 또는 앵타머이다)의 3'에 기능성 서열을 달고 있다. 주어진 sgRNA의 각각의 기능성 도메인(즉 표적화 가이드, 스캐폴드, 앵타머)이 모듈식으로, 독립적인 방식으로 확실히 접하도록, 상기 구조적으로 보존된 스캐폴드 염기쌍을 비천연의, 직교 염기쌍(예를 들어, 아이소G 및 아이소C; Z 염기 및 P 염기)으로 치환하고, 일부 실시태양에서, 독점적으로 비천연의, 직교 염기쌍으로 치환시킬 수 있다. 이는 상기 sgRNA 스캐폴드 서열이 상기 표적-확정기 가이드 서열의 요소 또는 상기 가이드 RNA에 통합된 다른 비-고유 도메인, 예를 들어 상기 가이드 RNA상의 임의의 앵타머 서열 또는 임의의 비-고유 5' 또는 3' 오버행과 2차 구조로 안정하게 상호작용하지 않을 것임을 보장한다. 한편으로, 상기 언급된 비천연의, 직교 염기쌍을, 존재할 수도 있는 임의의 비-고유 오버행 또는 앵타머에 통합시키고, 따라서 상기 스캐폴드 서열(들)의 잘못 접합을 수반하는 2차 구조를 방지할 수 있었다.

[0072]

B. 적어도 하나의 변형을 갖는 가이드 RNA

[0073]

하나의 태양에서, 본 기술은 변형된 gRNA를 구성하는, 적어도 하나의 변형을 갖는 가이드 RNA를 제공한다.

[0074]

몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 모든 뉴클레오타이드가 변형된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 모두 동

일하다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 모두 동일한 유형의 변형을 갖는다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 상이하게 변형된 뉴클레오타이드의 조합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 2개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 3개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 연속적으로 배열된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 변형된 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다. 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 독립적으로 하나 이상 유형의 변형을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 변형된 뉴클레오타이드는 상기 변형된 gRNA의 서열에서 연속적이지 않거나, 일부 그러나 전부가 연속적이지는 않다.

[0075] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있다.

[0076] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은, 예를 들어 뉴클레아제에 의한 분해로부터 상기 가이드 RNA를 보호하기 위해서 또는 다른 목적을 위해서 상기 가이드 RNA의 5' 부분 또는 3' 부분에, 특히 상기 5' 부분의 처음 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 또는 상기 3' 부분의 마지막 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 통합된다. 일부 다른 실시태양에서, 상기 변형은, 예를 들어 뉴클레아제에 의한 분해로부터 상기 가이드 RNA를 보호하기 위해서 또는 다른 목적을 위해서 상기 가이드 RNA의 5' 부분 및 3' 부분 모두에, 특히 상기 5' 부분의 처음 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 및 상기 3' 부분의 마지막 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 하나 초과 유형의 변형이 상기 가이드 RNA의 5' 부분 및 3' 부분 모두에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 단부, 3' 단부, 및 내부 서열내에 위치한다. 몇몇 실시태양에서, 가이드 RNA는 상기 가이드 RNA의 5' 또는 3' 부분 중의 40개 이하, 한편으로 20개 이하, 한편으로 15개 이하, 한편으로 10개 이하, 한편으로 5개 이하, 한편으로 3개 이하의 데옥시리보뉴클레오타이드 잔기를 포함한다.

[0077] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 crRNA 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 crRNA의 가이드 서열내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 crRNA 분절의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 crRNA 분절의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 crRNA 분절의 5'-오버행내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA인 경우, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 고리내에 위치한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 고리 L 영역내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상술한 바와 같이, 예를 들어 2-(3-염료/표지/태그-아미도)프로판아미도)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커 또는 상기 고리 또는 L 영역 중의 뉴클레오타이드의 변형된 염기에의 접합에 의해 2개의 뉴클레오타이드 사이에 통합된 링커에 접합된 염료, 비-형광 표지 또는 태그를 포함한다.

[0078] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 단부 변형, 예를 들어 5' 단부 변형 또는 3' 단부 변형을 포함한다. 단부 변형의 예는 비제한적으로 인산화(천연 포스페이트 또는 폴리포스페이트로서 또는 변형된 포스포네이트기, 예를 들어 알킬포스포네이트, 포스포노카복실레이트, 포스포노아세테이트, 보라노포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트 등으로서), 비오틴화, 접합성 또는 접합된 분자, 링커, 염료, 표지, 태그, 작용기(예를 들어, 비제한적으로 5'-아미노, 5'-티오, 5'-아미도, 5'카복시 등), 역전된 결합, 또는 에테르, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에스터, 하이드록실, 아릴, 할로, 포스포다이에스터, 바이사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 다른 유기 작용기를 포함할 수 있는 탄화수소 부분을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단부 변형은 다이메톡시트리틸을 포함한다.

[0079] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 변형된 염기를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 "변형되지 않은" 염기는 퓨린 염기 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 피리미딘 염기 티민(T), 시토신(C) 및 유라실(U)을 포함한다. 변형된 염기의 예는 비제한적으로 합성 및 천연 염기, 예를 들어 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노P,



슈도유라실, 하이포잔틴, 7-테아자구아닌, 7-테아자-8-아자구아닌, 7-테아자아데닌, 7-테아자-8-아자아데닌, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-테하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐유라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴-유라실, 및 5-아미노알릴-시토신을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 비염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 비표준 퓨린 또는 피리미딘 구조, 예를 들어 Z 또는 P, 아이소C 또는 아이소G, UNA, 5-메틸피리미딘, x(A,G,C,T) 또는 y(A,G,C,T)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 염기를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 염기가 변형된다.

[0080] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 변형된 당을 포함한다. 변형된 당의 예는 비제한적으로 2' 위치의 변형 또는 4' 위치의 변형을 갖는 당을 포함한다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-O-C<sub>1-4</sub>알킬, 예를 들어 2'-O-메틸(2'-OMe)을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬, 예를 들어 2'-메톡시 에톡시(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)(또한 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로서 공지됨)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-할로, 예를 들어 2'-F, 2'-Br, 2'-Cl 또는 2'-I를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-NH<sub>2</sub>를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-H(예를 들어, 데옥시뉴클레오타이드)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-아라비노 또는 2'-F-아라비노를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 2'-LNA 또는 2'-ULNA를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 당은 4'-티오리보실을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 당을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 당이 변형된다.

[0081] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 변형된 주쇄(즉 천연 포스포다이에스터 이외의 뉴클레오타이드간 결합)를 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드간 결합의 예는 비제한적으로 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 키랄 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포로다이트오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, C<sub>1-4</sub>알킬 포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노카복실레이트 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노카복실레이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 포스포노아세테이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노카복실레이트 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노카복실레이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 티오포스포노아세테이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리산 형태들이 또한 포함된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 뉴클레오타이드간 결합이 변형된다.

[0082] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 2'-O-C<sub>1-4</sub>알킬, 2'-H, 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬, 2'-F, 2'-NH<sub>2</sub>, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 2'-LNA, 2'-ULNA, 4'-티오리보실, 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노P, 슈도유라실, 하이포잔틴, 7-테아자구아닌, 7-테아자-8-아자구아닌, 7-테아자아데닌, 7-테아자-8-아자아데닌, 5-MeC, 5-MeU, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-테하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐유라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴유라실, 5-아미노알릴-시토신, 비염기성 뉴클레오타이드, Z, P, UNA, 아이소C, 아이소G, 5-메틸-피리미딘, x(A,G,C,T), y(A,G,C,T), 3'-포스포로티오에이트기, 3'-포스포노아세테이트기, 3'-포스포노아세테이트 에스테르기, 3'-티오포스포노아세테이트기, 3'-티오포스포노아세테이트 에스테르기, 3'-메틸포스포네이트기, 3-보라노포스포네이트기, 3'-포스포로다이트오에이트기, 또는 이들의 조합이다.

[0083] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 몇몇 실시태

양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 Z 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-할로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-할로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다.

[0084] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 하기 화학식 I에 의해 나타내는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다:

[0085] [화학식 I]

[0086] W-Y 또는 Y-W

[0087] 상기 식에서,

[0088] W는 적어도 하나의 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 신장부를 나타내고;

[0089] Y는 상기 올리고뉴클레오타이드의 변형되지 않은 부분을 나타낸다.

[0090] 몇몇 실시태양에서, W는 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있다.

[0091] 몇몇 실시태양에서, W는 단부 변형, 예를 들어 상술한 바와 같은 5' 단부 변형 또는 3' 단부 변형을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단부 변형은 다이메톡시트리틸을 포함한다.

[0092] 몇몇 실시태양에서, W는 상술한 바와 같은 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 염기를 포함한다. 다른 실시태양에서, W는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 염기가 변형된다.

[0093] 몇몇 실시태양에서, W는 상술한 바와 같은 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 당을 포함한다. 다른 실시태양에서, W는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 당이 변형된다.

[0094] 몇몇 실시태양에서, W는 상술한 바와 같은 변형된 주쇄(즉 포스포다이에스터 이외의 뉴클레오타이드간 결합)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 1 초과, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 다른 실시태양에서, W는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 뉴클레오타이드간 결합이 변형된다.

[0095] 몇몇 실시태양에서, W는 2'-O-C<sub>1-4</sub>알킬, 2'-H, 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬, 2'-F, 2'-NH<sub>2</sub>, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 2'-LNA, 2'-ULNA, 4'-티오리보실, 2-티오U, 2-티오C, 4-티오U, 6-티오G, 2-아미노A, 2-아미노P, 슈도유라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-MeC, 5-MeU, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-데하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐유라실, 5-알릴U, 5-알릴C, 5-아미노알릴유라실, 5-아미노알릴-시토신, 비

염기성 뉴클레오타이드, Z, P, UNA, 아이소C, 아이소G, 5-메틸-피리미딘, x(A,G,C,T), y(A,G,C,T), 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 메틸포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포로다이티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0096] 몇몇 실시태양에서, W는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-티오포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-F 및 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-F 및 3'-포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-F 및 3'-티오포스포노아세테이트기를 포함한다.

[0097] 몇몇 실시태양에서, W는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 동일한 변형을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 다양하게 변형된 뉴클레오타이드들의 조합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 2개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 3개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는, 하나 이상의 변형되지 않은 뉴클레오타이드들은 개입할 수 있기 때문에, 상기 서열 중에 연속적으로 배열되지 않거나, 적어도 전적으로 배열되지 않는 다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 연속적으로 배열된다. 몇몇 실시태양에서, W는 변형된 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 3개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 4개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 5개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다.

[0098] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 하기 화학식 II에 의해 나타내는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다:

[0099] [화학식 II]

[0100]  $M_mN_n$

[0101] 상기 식에서,

[0102] 각각의 N은 독립적으로 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내고;

[0103] 각각의 M은 변형된 뉴클레오타이드를 나타내며 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 3'-티오패스 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S)-리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드, Z 뉴클레오타이드 및 2'-데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고;

[0104] 각각의 M은 상기 가이드 RNA의 서열의 임의의 위치에 있고;

[0105] 임의의 주어진 M은 임의의 다른 M과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 N은 임의의 다른 N과 동일하거나 상이하며;

[0106] 각각의 m 및 n은 0 내지 219의 정수로부터 독립적으로 선택되나, 단  $50 < m+n \leq 220$ 이고, m은 0이 아니다.

[0107] 일부 실시태양에서,  $m+n < 150$ 이다.

[0108] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-F, 2-티오유라실, 4-티오유라실, 2-아미노아데닌, 하이포잔틴, 5-메틸시토신, 5-메틸유라실, 5-알릴아미노유라실, 스쿠아레이트 결합, 트리아아졸로 결합, 및 2-(4-부틸아미도 플루오레세인)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 결합으로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되는 하나 이상의 부분으로 변형된다. 일부 실시태양에서, M은 링커를 통해 부착된 염료를 포함한다.

[0109] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S)-리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다.





이다. 몇몇 실시태양에서, m은 4이다. 몇몇 실시태양에서, m은 5이다.

- [0117] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 안정성-변경 변형이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 뉴클레아제 내성을 증가시키며, 따라서 상기 가이드 RNA 안정성을 증대시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-변경 변형은 안정성-증대 변형이다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 2'-O-메틸 또는 2'-O-C<sub>1-4</sub>알킬 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 2'-할로 뉴클레오타이드, 예를 들어 2'-F, 2'-Br, 2'-Cl 또는 2'-I를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 2'-MOE 또는 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 2'-NH<sub>2</sub> 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 2'-H(또는 2'-데옥시) 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 2'-아라비노 또는 2'-F-아라비노를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 4'-티오리보실 당 부분을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 3'-포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 3'-티오포스포노아세테이트기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 3'-메틸포스포네이트기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 3'-보라노포스페이트기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 3'-포스포다이트오에이트기를 함유하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 잠금 핵산("LNA") 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 열림 핵산("ULNA") 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0118] 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-티오포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-플루오로 및 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-플루오로 및 3'-포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 안정성-증대 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-플루오로 및 3'-티오포스포노아세테이트기를 포함한다.
- [0119] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 특이성-변경 변형이다. 일부 실시태양에서, 특이성 증대는 표적-상 결합 및/또는 절단을 증대시키거나 표적-외 결합 및/또는 절단을 감소시키거나, 이 둘 모두의 병행에 의해 성취될 수 있다. 일부 다른 실시태양에서, 특이성 감소는, 예를 들어 표적-상 결합 및/또는 절단을 감소시키거나 표적-외 결합 및/또는 절단을 증가시키거나, 이 둘 모두의 병행에 의해 성취될 수 있다.
- [0120] 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 2'-O-메틸을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 2'-할로, 예를 들어 2'-플루오로를 포함한다.
- [0121] 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 2-티오유라실 염기(2-티오U)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 2-티오C를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 4-티오U를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 6-티오G를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 2-아미노A를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 2-아미노퓨린을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 슈도유라실을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 하이포잔틴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 7-데아자구아닌을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 7-데아자-8-아자구아닌을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 7-데아자아데닌을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 7-데아자-8-아자아데닌을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-메틸C를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-메틸U를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-하이드록시메틸시토신을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-하이드록시메틸유라실을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5,6-데하이드로유라실을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-프로피닐시토신을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-프로피닐유라실을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-에틸닐시토신을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-에틸닐유라실을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-알릴U를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-알릴C를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-아미노알릴U를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-

아미노알릴C를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 비염기성 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 Z 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 P 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 UNA 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 아이소C를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 아이소G를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 5-메틸-피리미딘을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 x(A,G,C,T)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 y(A,G,C,T)를 포함한다.

[0122] 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 포스포다이트오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 ULNA를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 LNA를 포함한다.

[0123] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 RNA 염기 짝짓기를, 예를 들어 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 용점(T<sub>m</sub>)을 변경시킴으로써 변경시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 T<sub>m</sub>을, 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 가이드 RNA의 T<sub>m</sub>을, 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상승시킨다.

[0124] 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형은, DNA/DNA 염기쌍이 RNA/DNA 듀플렉스 중의 각각의 대응물보다 더 낮은 T<sub>m</sub>을 가짐이 당해 분야에 주지되어 있는 바와 같이, 2'-데옥시이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형은 2-티오유라실이며, 상기 G-U 동요 쌍의 T<sub>m</sub>을 약간 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형은, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합 또는 포스포다이트오에이트 뉴클레오타이드간 결합이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 약 0.5 °C까지 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형은, 보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 약 0.5 내지 0.8 °C까지 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형은, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 약 1.3 °C까지 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형은, 열람 핵산("ULNA")이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 약 5 내지 8 °C까지 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용을 낮추는 변형은 2'-O-메틸-3'-메틸포스포네이트이다.

[0125] 몇몇 실시태양에서, 상기 특이성-변경 변형은 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 2'-O-메틸이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 약 0.5 내지 0.7 °C까지 상승시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 2'-F이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 약 1 °C까지 상승시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 2-티오유라실이며, 상기 A-U 쌍의 T<sub>m</sub>을 상승시킨다(그리고, 상기 나타낸 바와 같이, G-U 동요 쌍의 T<sub>m</sub>을 약간 낮춘다). 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 4-티오유라실이며, 상기 G-U 동요 쌍의 T<sub>m</sub>을 상승시키고 A-U 쌍의 T<sub>m</sub>을 약간 상승시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 2-아미노-아데닌이며, 상기 U와의 염기 짝짓기의 T<sub>m</sub>을 변형당 약 1 °C까지 상승시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 5-메틸-유라실(5-메틸U)이다(예를 들어, 문헌[Wang & Kool (1995) Biochemistry, 34, 4125-32]을 참조하시오). 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 5-메틸-시토신(5-메틸C)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형은 잠금 핵산("LNA")이며, 상기 T<sub>m</sub>을 변형당 2 내지 10 °C까지 상승시킨다.

[0126] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 형질감염 효율을 변경시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 형질감염 효율을 증가시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 형질감염 효율을 감소시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 세포내로의 수동 확산을 허용하도록 포스포에이트상의 음이온성 전하를 중화시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 전하-중화 변형은 포스포노아세테이트 알킬 에스터

뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 포스포노아세테이트 메틸 에스터 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다.

- [0127] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 면역자극 효과를 변경시킨다. 처음에, 메틸화되지 않은 세균성 DNA 및 그의 합성 유사체는 TLR9에 대한 리간드인 것으로 밝혀졌다 (문헌[Hemmi et al. (2000) Nature, 408, 740-5]을 참조하시오). 상기 TLR9의 자극을 예를 들어 C 및 G 잔기를 변형시킴으로써 다이뉴클레오타이드 동기에서 경감시킬 수 있다. 5-메틸시토신, 2-아미노시토신, 2-티오시토신, 5-메틸아이소시토신, P 핵염기(6-(β-D-2'-데옥시리보퓨라노실)-3,4-다이하이드로-8H-피리미도[4,5-c][1,2]옥사진-7-온), 및 2'-O-메틸시토신의 사용은 모두 TLR9 자극의 상실 또는 감소를 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 6-티오구아닌, 2,6-다이아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 잔토신, 이노신, 7-테아자잔토신, 아이소구아닌, 8-옥소구아닌, 네블라린, 8-브로모구아닌, K-핵염기(2-아미노-N-메톡시아데노신), 및/또는 2'-O-메틸구아닌의 사용은 TLR9 자극의 상실 또는 감소를 생성시킬 수 있다. 일부 실시태양에서, 포스포다이에스터 변형의 사용은 상기 TLR9 응답을 낮추거나 제거할 수 있다. 전형적으로, 합성적으로 통합된 포스포로티오에이트는, 합성 RNA에서 각 포스포로티오에이트의 2개의 입체이성질체의 존재로부터 생성되는 것으로 생각되는 바와 같이, 상기 TLR9 응답을 제한된 정도로 감소시킬 수 있다. 그러나, CpG 동기가 없는 포스포로티오에이트-변형된 DNA는 TLR9를 다소 적은 정도로 자극하는 것으로 나타났다. 상기 인상의 음전하는 TLR9에 의한 인식에 중요한 요소이며 따라서 알킬포스포네이트를 사용하는 음전하의 제거는 TLR9 자극의 상실 또는 감소를 생성시킬 수 있다. 5' 및 3' 말단 서열 중의 데옥시뉴클레오사이드간의 포스포노아세테이트(PACE) 뉴클레오타이드간 결합의 사용은 상기 TLR9 응답을 현저하게 증가시킬 수 있으나; 5' 및 3' 말단 서열 중의 데옥시뉴클레오사이드간의 티오포스포노아세테이트(티오페ACE) 뉴클레오타이드간 결합의 사용은 TLR9 자극의 상실 또는 감소를 생성시킬 수 있다. 몇몇 실시태양에서, C3'-엔드 형태에 유리한 당 변형, 예를 들어 2'-O-메틸 변형의 사용은 5' 및 3' 말단에 통합되어 상기 TLR9 응답을 감소시킬 수 있다. TLR7 및 TLR8을, 7-테아자구아닌을 함유하는 분자에 의해서 및 단일-가닥 RNA에 의해서 자극할 수 있다(예를 들어, 문헌[Heil et al. (2004) Science, 303, 1526-9]을 참조하시오). TLR3은 바이러스-유래된 이중-가닥 RNA에 대한 세포 면역응답에 관련되었다. 몇몇 실시태양에서, 상기 TLR 응답을, 예를 들어 2'-O-메틸 변형, 황을 함유하는 변형된 포스포다이에스터 결합, 또는 뉴클레오타이드간 음전하를 감소시키는 변형, 예를 들어 메틸포스포네이트 및/또는 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합을 사용함으로써 경감시킬 수 있다.
- [0128] 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 안정성 및 특이성을 증대시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 안정성 및 형질감염 효율을 증대시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 특이성 및 형질감염 효율을 증대시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 전체적인 효능을 증대시킨다.
- [0129] C. 변형들의 조합을 갖는 가이드 RNA
- [0130] 하나의 태양에서, 본 발명의 기술은 2개 이상의 변형의 조합을 갖는 가이드 RNA를 제공한다.
- [0131] 몇몇 실시태양에서, 상기 2개의 변형은 동일한 뉴클레오타이드상에 있다(예를 들어, 하나의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 및 3'-티오포스포노아세테이트 부분을 포함한다). 다른 실시태양에서, 상기 2개의 변형은 2개의 상이한 뉴클레오타이드상에 있다(예를 들어, 하나의 뉴클레오타이드는 2-티오U 염기를 갖고 또 다른 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸기를 갖는다).
- [0132] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA 중의 각각의 변형은 동일하다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA 중의 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA 중의 적어도 하나의 다른 변형과 상이하다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA내의 단일 뉴클레오타이드는 2개 이상의 변형을 갖는다.
- [0133] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 상이한 유형의 변형들의 조합을 포함하며, 상기 조합 중 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA 중의 다수의 장소에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20회 존재한다.
- [0134] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형들의 적어도 하나의 유형이 2개 이상의 변형된 뉴클레오타이드 중에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형들의 적어도 하나의 유형이 3개 이상의 변형된 뉴클레오타이드 중에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는, 하나 이상의 변형되지 않은 뉴클레오타이드들이 개입할 수 있기 때문에, 상기 서열 중에 연속적으로 배열되지 않거나, 적어도 전적으로 배열되지 않는



않는다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 연속적으로 배열된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 동일한 유형의 연속적인 변형된 뉴클레오타이드의 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 신장부는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40개의 변형된 뉴클레오타이드를 갖는다.

[0135] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있다.

[0136] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은, 예를 들어 뉴클레아제에 의한 분해로부터 상기 RNA를 보호하기 위해서 또는 다른 목적을 위해서 상기 가이드 RNA의 5' 부분 또는 3' 부분에, 특히 상기 5' 부분의 처음 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 또는 상기 3' 부분의 마지막 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 통합된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 5' 부분에 있고 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은, 예를 들어 뉴클레아제에 의한 분해로부터 상기 RNA를 보호하기 위해서 또는 다른 목적을 위해서 상기 가이드 RNA의 3' 부분에, 특히 상기 5' 부분의 처음 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 및 상기 3' 부분의 마지막 5 또는 10개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 가이드 RNA는 상기 가이드 RNA의 5' 부분 중의 20개 이하, 한편으로 15개 이하, 한편으로 15개 이하, 한편으로 10개 이하, 한편으로 5개 이하, 한편으로 3개 이하의 테옥시리보뉴클레오타이드 잔기를 포함한다.

[0137] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 crRNA 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 crRNA의 가이드 서열내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나의 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0138] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있고 상기 조합 중 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0139] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있고 상기 조합 중 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0140] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있고 상기 조합 중 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0141] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있고, 상기 조합 중 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있고, 상기 조합 중 변형의 제3 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제3 유형은 상기 가이드 RNA의

3' 부분의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제3 유형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0142] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형은 상기 가이드 RNA의 crRNA 분절내에 있고 상기 조합 중 변형의 제2 유형은 상기 tracr 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA의 가이드 서열내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0143] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형 및 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 crRNA 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA의 가이드 서열내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0144] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 제1 유형 및 제2 유형은 상기 가이드 RNA의 crRNA 분절내에 있고 상기 조합 중 변형의 제3 유형은 상기 tracr 분절내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA의 가이드 서열내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제1 유형은 상기 crRNA 분절의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제3 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 5개 뉴클레오타이드 내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형의 제3 유형은 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다.

[0145] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 단부 변형, 예를 들어 상술한 바와 같은 5' 단부 변형 또는 3' 단부 변형을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단부 변형은 다이메톡시트리틸을 포함한다.

[0146] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개의 변형된 염기를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 염기가 변형된다.

[0147] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개의 변형된 당을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 당이 변형된다.

[0148] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 변형된 주쇄(즉 천연 포스포다이에스터 이외의 뉴클레오타이드간 결합)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 변형된 gRNA는 적어도 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130 또는 140개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, gRNA 중의 모든 뉴클레오타이드간 결합이 변형된다.

[0149] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-O-메틸, 2'-플루오로, 2'-아미노, 2'-데옥시, 2'-아라비노, 2'-F-아라비노, 2-티오유라실, 2-아미노아데닌, 5-메틸시토신, 5-아미노알릴유라실, Z 염기, 3'-포스포로티오에이트, 3'-포스포노아세테이트, 3'-포스포노아세테이트 에스터, 3'-티오포스포노아세테이트, 3'-티오포스포노아세테이트 에스터, 3'-메틸포스포네이트, 3'-보라노스포네이트, 3'-포스포로다이트오에이트, 또는 이들의 조합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-O-메틸, 2'-데옥시, Z 염기, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-F, 2-티오U, 4-티오U, 2-아미노A, 5-메틸C, 5-메틸U, 5-아미노알릴U, 또는 이들의 조합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 "단부" 변형, 예를 들어 말단 포스페이트, PEG,

말단 아민, 말단 링커, 예를 들어 탄화수소 링커, 치환된 탄화수소 링커, 스쿠아레이트 링커, 트라이아졸로 링커, 내부 링커, 예를 들어 2-(4-부틸아미도플루오레세인)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커, 염료에 접합된 링커, 비-형광 표지에 접합된 링커, 태그에 접합된 링커 또는 고체 지지체, 예를 들어 비드 또는 미세배열에 접합된 링커이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 2개는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 2개는 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포노카복실레이트 뉴클레오타이드간 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 포스포노카복실레이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 티오포스포노카복실레이트 뉴클레오타이드간 결합, 2'-0-메틸 뉴클레오타이드 및 티오포스포노카복실레이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 조합 중 변형은 2-티오유라실, 2-티오시토신, 4-티오유라실, 6-티오구아닌, 2-아미노아데닌, 2-아미노퓨린, 슈도유라실, 이노신, 7-테아자구아닌, 7-테아자-8-아자구아닌, 7-테아자아데닌, 7-테아자-8-아자아데닌, 5-메틸시토신, 5-메틸유라실, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-테하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐유라실, 5-알릴유라실, 5-알릴시토신, 5-아미노알릴-유라실, 5-아미노알릴-시토신, 또는 비염기성 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[0150] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-0-메틸-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-0-메틸-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-0-메틸-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-할로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-할로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-할로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트를 포함한다. 적어도 2개 또는 3개의 변형의 가능한 조합들을 각각 도 6 및 도 7에 나타내며, 이들은 본 명세서에 참고로 인용된다.

[0151] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 하기 화학식 III 또는 화학식 IV에 의해 나타내는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다:

[0152] [화학식 III]

[0153] W-Y-Q

[0154] [화학식 IV]

[0155] Y-W-X-Q

[0156] 상기 식에서,

[0157] Q 및 W는 각각 독립적으로 적어도 하나의 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드들의 신장부를 나타내고;

[0158] Y 및 X는 각각 독립적으로 상기 올리고뉴클레오타이드의 변형되지 않은 부분을 나타낸다.

[0159] 몇몇 실시태양에서, W는 상기 가이드 RNA의 5' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 5' 부분의 처음 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, W는 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있다.

[0160] 몇몇 실시태양에서, Q는 상기 가이드 RNA의 3' 부분내에 있다. 몇몇 실시태양에서, Q는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, Q는 적어도 부분적으로 상기 가이드 RNA의 3' 부분의 마지막 3개 뉴클레오타이드내에 있다. 몇몇 실시태양에서, Q는 상기 가이드 RNA의 내부 영역내에(즉 5' 단부와 3' 단부 사이에) 있다.

[0161] 몇몇 실시태양에서, W는 상술한 바와 같은 단부 변형, 예를 들어 5' 단부 또는 3' 단부 변형을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단부 변형은 다이메톡시트리틸을 포함한다.



- [0162] 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 상술한 바와 같은 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 염기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 하나 초과, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 변형된 염기를 포함한다.
- [0163] 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 상술한 바와 같은 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 당을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 하나 초과, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 변형된 당을 포함한다.
- [0164] 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 상술한 바와 같은 변형된 주쇄(즉 포스포다이에스터 외에 뉴클레오타이드간 결합)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 하나 초과, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다.
- [0165] 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 2'-F 뉴클레오타이드, 2'-아미노 뉴클레오타이드, 2'-데옥시 뉴클레오타이드, 2-티오유리딘 뉴클레오타이드, 2-아미노아데노신 뉴클레오타이드, 6-티오구아노신 뉴클레오타이드, 5-메틸시티딘 뉴클레오타이드, 5-아미노알릴유리딘 뉴클레오타이드, Z 뉴클레오타이드, 3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 3'-포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 5'-포스포노아세테이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 3'-티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 3'-티오포스포노아세테이트 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 3'-메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 3'-보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 3'-포스포로다이트오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0166] 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-포스포노아세테이트기 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-O-메틸 및 3'-티오포스포노아세테이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-F 및 3'-포스포로티오에이트기를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-F 및 3'-포스포노아세테이트기 결합 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 동일한 뉴클레오타이드상에 2'-F 및 3'-티오포스포노아세테이트기를 포함한다.
- [0167] 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나내의 각각의 변형된 뉴클레오타이드는 동일한 변형 또는 변형들을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W는 Q 중의 변형된 뉴클레오타이드와 상이한 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 2개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 3개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는, 하나 이상의 변형되지 않은 뉴클레오타이드들이 개입할 수 있기 때문에, 상기 서열 중에 연속적으로 배열되지 않거나, 적어도 전적으로 배열되지는 않는다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형된 뉴클레오타이드는 연속적으로 배열된다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 변형된 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 적어도 3개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 적어도 4개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, W 및 Q 중 적어도 하나는 적어도 5개의 변형된 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부를 포함한다.
- [0168] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 하기 화학식 V 또는 화학식 VI의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다:
- [0169] [화학식 V]

- [0170]  $M_m N_n M'_m N'_n$
- [0171] [화학식 VI]
- [0172]  $M_m N_n M'_m N'_n M''_m$
- [0173] 상기 식에서,
- [0174] 각각의 M은 독립적으로 변형된 리보뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0175] 각각의 N은 독립적으로 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0176] 각각의 M'은 독립적으로 변형된 리보뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0177] 각각의 N'은 독립적으로 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0178] 각각의 M''은 독립적으로 변형된 리보뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0179] m은 0 내지 40의 정수이고, n은 0 내지 130의 정수이고, m'은 0 내지 10의 정수이고, n'은 0 내지 130의 정수이고, m''은 0 내지 10의 정수이나, 단  $m+m'+m'' \geq 1$  이상이고  $50 < m+n+m'+n'+m'' \leq 150$ 이다.
- [0180] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드, 및 2'-데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서,  $m > 1$ 일 때, 임의의 주어진 M은 임의의 다른 M과 동일하거나 상이하다. 몇몇 실시태양에서,  $m > 1$ 일 때, 각각의 M은 동일한 변형 또는 변형들을 포함한다.
- [0181] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드, 및 2'-데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서,  $m' > 1$ 일 때, 임의의 주어진 M'은 임의의 다른 M'과 동일하거나 상이하다. 몇몇 실시태양에서,  $m' > 1$ 일 때, 각각의 M'은 동일한 변형 또는 변형들을 포함한다.
- [0182] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M''은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드, 및 2'-데옥시뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M''은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M''은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다. 몇몇 실시태양에서,  $m'' > 1$ 일 때, 임의의 주어진 M''은 임의의 다른 M''과 동일하거나 상이하다. 몇몇 실시태양에서,  $m'' > 1$ 일 때, 각각의 M''은 동일한 변형 또는 변형들을 포함한다.
- [0183] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드이고; m은 1 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n은 10 내지 130의 정수 중에서 선택되고; 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시뉴클레오타이드 및 Z 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; m'은 1 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N'은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n'은 0 내지 130의 정수 중에서 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-티오패스 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은

Z 뉴클레오타이드이다.

- [0184] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드이고; m은 1 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n은 10 내지 130의 정수 중에서 선택되고; 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시뉴클레오타이드 및 Z 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; m'은 1 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n'은 0 내지 130의 정수 중에서 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 Z 뉴클레오타이드이다.
- [0185] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드이고; m은 1 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n은 10 내지 130의 정수 중에서 선택되고; 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시뉴클레오타이드 및 Z 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; m'은 1 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n'은 0 내지 130의 정수 중에서 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M'은 Z 뉴클레오타이드이다.
- [0186] 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시뉴클레오타이드 및 Z 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; m은 0 내지 10의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n은 10 내지 15의 정수 중에서 선택되고; 각각의 M'은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드이고; m'은 1 내지 5의 정수 중에서 선택되고; 각각의 N은 A, U, C 및 G로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고; n'은 0 내지 130의 정수 중에서 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-티오PACE 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, 각각의 M은 2'-O-메틸-3'-P(S) 리보뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시태양에서, m은 0이고; n은 10 내지 15의 정수 중에서 선택되고, m'은 1 내지 5의 정수 중에서 선택되고; n'은 0 내지 130 중에서 선택된다.
- [0187] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 안정성-변경 변형이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 뉴클레아제 내성을 증가시키며, 따라서 상기 가이드 RNA의 안정성을 증대시킨다.
- [0188] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상술한 바와 같은 안정성-증대 변형이다.
- [0189] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상술한 바와 같은 특이성-변경 변형이다.
- [0190] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 RNA 염기 짝짓기를 변경시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상술한 바와 같은 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 낮춘다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상술한 바와 같은 염기 짝짓기 상호작용의 T<sub>m</sub>을 상승시킨다.
- [0191] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 형질감염 효율을 변경시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 형질감염 효율을 증가시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 형질감염 효율을 감소시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 포스포노아세테이트 알킬 에스터 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 포스포노아세테이트 메틸 에스터 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다.
- [0192] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 안정성 및 특이성을 증대시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는

가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 안정성 및 형질감염 효율을 증대시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 변형이 없는 가이드 RNA에 비해 상기 가이드 RNA의 특이성 및 형질감염 효율을 증대시킨다.

[0193] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합 중 변형의 적어도 하나는 상기 가이드 RNA의 2차 구조를 변경시킨다. 상기 변형은 상기 가이드 RNA 중의 RNA/RNA 내부 듀플렉스 중 어느 하나의 염기-짝짓기를 변경시킨다. 이들 변경 중 일부는 상기 RNA/RNA 구조의 염기 짝짓기를 증가시키거나 한편으로 상기 RNA/RNA 듀플렉스의 T<sub>m</sub>을 증가시키는 반면, 다른 변형들은 상기 RNA/RNA 듀플렉스 또는 듀플렉스들의 염기 짝짓기(또는 T<sub>m</sub>)를 감소시킨다. 상기와 같은 변형은 염기 변형된 뉴클레오타이드, 특히 UNA 뉴클레오타이드, 예를 들어 2-티오유리딘 및 2-아미노아데노신 쌍, Z/P 뉴클레오타이드 쌍, 아이소C/아이소G 쌍, 6-티오G/5-메틸피리미딘 쌍, 및 이전에 논의된 바와 같은 당 또는 뉴클레오타이드간 결합상에 변형을 갖는 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0194] 몇몇 실시태양에서, 상기 조합은 적어도 하나의 변형에 의해 뉴클레아제 내성(즉 안정성)을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트 또는 특이성을 증가시키는(즉 표적-외 효과를 감소시키는) 변형들의 세트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합은 적어도 하나의 변형에 의해 뉴클레아제 내성(즉 안정성)을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트 또는 상기 가이드 RNA 중의 일부 염기 짝짓기의 T<sub>m</sub>을 상승시키는 변형들의 세트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합은 적어도 하나의 변형에 의해 뉴클레아제 내성(즉 안정성)을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트 또는 상기 가이드 RNA의 일부 염기 짝짓기의 T<sub>m</sub>을 낮추는 변형들의 세트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합은 적어도 하나의 변형에 의해 뉴클레아제 내성(즉 안정성)을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트, 상기 가이드 RNA 중의 일부 염기 짝짓기의 T<sub>m</sub>을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트, 및 상기 가이드 RNA 중의 어딘가의 일부 염기 짝짓기의 T<sub>m</sub>을 감소시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합은 뉴클레아제 내성(즉 안정성)을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트 및 Cas 단백질에 대한 상기 가이드 RNA의 결합을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 조합은 뉴클레아제 내성(즉 안정성)을 증가시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트, 및 Cas 단백질에 대한 상기 가이드 RNA의 결합을 감소시키는 적어도 하나의 변형 또는 변형들의 세트를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 상이한 유형의 변형들의 조합을 포함한다.

[0195] D. 가이드 RNA 구조

[0196] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 크리스퍼-결합된 단백질과 복합체를 형성할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 크리스퍼-결합된 단백질은 RNA-가이드 폴리뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레아제 활성을 갖는 크리스퍼-Cas II 유형 시스템에 의해 제공되거나 상기로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 크리스퍼-결합된 단백질은 Cas9, Cas9 돌연변이체, 또는 Cas9 변체이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 크리스퍼-결합된 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 크리스퍼-결합된 단백질은 스트렙토코커스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*)로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 크리스퍼-결합된 단백질은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 합성 가이드 RNA 또는 합성 가이드 RNA:크리스퍼-결합된 단백질 복합체는 천연 가이드 RNA 또는 변형된 뉴클레오타이드를 갖지 않는 복합체의 기능을 유지한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드에의 결합을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드의 틸 형성성을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 기능성은 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 시험관내에서 핵산내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 생체내 또는 시험관내(예를 들어, 배양된 세포 또는 유기체로부터 분리된 세포 내)에서 세포의 게놈내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 DNA 중의 프로토스페이서이다.

[0197] 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA는 25 내지 80개 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA 분절은 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 서열은 표적 서열 또는 그의 일부에 상보성이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 서열은 15 내지 30개 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA는 줄기 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 줄기 서열은 10 내지 50개 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA 분절은 5'-오버행 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 5'-오버행 서열은 1 내지 10개 뉴클레오타이드, 한편으로 1 내지 5개 뉴클레오타이드, 한편으로 1, 2 또는 3개 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA는 (i) 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열 및 (ii) 줄기 서열 모두를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA는



(i) 5'-오버행 서열, (ii) 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열 및 (iii) 줄기 서열을 포함한다. 상기 crRNA 분절이 줄기 서열을 포함하는 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA 분절은 상기 crRNA 분절의 줄기 서열에 부분적으로 또는 전적으로 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA 분절은 적어도 하나 이상의 듀플렉스 구조를 포함한다.

[0198] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 단일의 가이드 RNA이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 단일의 가이드 RNA이며, 여기에서 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 고리 L을 통해 연결된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 고리 L은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 고리 L은 GNRA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기에서 N은 A, C, G 또는 U를 나타내고 R은 A 또는 G를 나타낸다. 몇몇 실시태양에서, 상기 고리 L은 GAAA의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 하나 초과와 고리를 포함한다.

[0199] 상기 가이드 RNA는 5' 부분(즉 5' 절반) 및 3' 부분(즉 3' 절반)을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA 분절은 상기 tracrRNA 분절의 5'(즉 상류)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA 분절은 상기 crRNA 분절에 대해 5'이다.

[0200] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 2개 이상의 별도의 RNA 가닥, 예를 들어 crRNA 가닥 및 별도의 tracrRNA 가닥을 포함한다. 예를 들어, 도 5a를 참조하시오. 몇몇 실시태양에서, 상기 가닥들은 각각 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가닥이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가닥들 중 적어도 하나는 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가닥이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가닥들은 함께 Cas 단백질, 예를 들어 Cas9에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합, 틸 형성 또는 절단을 가이드하는 기능을 한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 별도의 가닥상에 있으며 2개의 상보성 서열을 통해 서로 하이브리드화하여 줄기 또는 듀플렉스를 형성한다.

[0201] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 crRNA 서열 및 tracrRNA 서열을 포함하는 단일의 가이드 RNA이다. 예를 들어, 도 5b를 참조하시오. 몇몇 실시태양에서, 상기 crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 고리 서열 또는 "고리"에 의해 연결된다. 몇몇 실시태양에서, 단일의 가이드 RNA는 5' 부분 및 3' 부분을 포함하며, 여기에서 상기 crRNA 서열은 상기 tracrRNA 서열의 상류이다.

[0202] 몇몇 실시태양에서, 상기 2개의 RNA 조각의 총 길이는 약 50 내지 220(예를 들어, 약 55 내지 200, 60 내지 190, 60 내지 180, 60 내지 170, 60 내지 160, 60 내지 150, 60 내지 140, 60 내지 130, 및 60 내지 120)개 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 약 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 또는 220개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 유사하게, 단일의 가이드 RNA(예를 들어, 도 5b)는 약 50 내지 220(예를 들어, 약 55 내지 200, 60 내지 190, 60 내지 180, 60 내지 170, 60 내지 160, 60 내지 150, 60 내지 140, 60 내지 130, 및 60 내지 120)개 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 약 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 또는 220개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0203] 도 5a 및 5b에 도시된 바와 같이, 합성 가이드 RNA는 (i) (a) 핵산 중 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열(예를 들어, 분절  $G_1-G_n$ , 이때 각각의 G는 상기 가이드 서열 중의 뉴클레오타이드를 나타낸다), (b) 제 2 줄기 서열에 부분적으로 또는 전적으로 하이브리드화할 수 있는 제1 줄기 서열(예를 들어, 분절  $X_1-X_n$ , 이때 각각의 X는 상기 제1 줄기 서열 중의 뉴클레오타이드를 나타낸다), 및 임의로 (c) 5'-오버행 서열(예를 들어, 분절  $O_1-O_n$ , 이때 각각의 O는 상기 오버행 서열 중의 뉴클레오타이드를 나타낸다)를 포함하는 crRNA 서열, 및 (ii) 제2 줄기 서열(예를 들어, 분절  $Y_1-Y_n$ , 이때 각각의 Y는 상기 제2 줄기 서열 중의 뉴클레오타이드를 나타낸다)를 포함하는 tracrRNA 서열을 포함한다. 상기 tracrRNA 서열은 분절  $T_1-T_n$ (이때 각각의 T는 상기 tracrRNA 서열 중의 뉴클레오타이드를 나타낸다)을 추가로 포함한다. 도 5a에 도시된 합성 가이드 RNA는 하나 이상의 변형을 포함한다. 마찬가지로, 도 5b에 도시된 합성 가이드 RNA는 하나 이상의 변형을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 변형은 상기 crRNA, tracrRNA, 또는 crRNA 분절, tracrRNA 분절 및 임의로 고리를 포함하는 단일 가이드 RNA의 길이를 따라 임의의 지점에 위치한다. 몇몇 실시태양에서, 도 5a 및 5b에 도시된 합성 가이드 RNA 중의 O, G, X, Y 또는 T에 의해 나타내는 임의의 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 도 5b에 도시된 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 나타내며, 이때 crRNA 분절 및 tracrRNA 분절은 서열 GNRA를 갖는 고리에 의해 연결되고, 여기에서 N은 A, C, G, 또는 U를 나타내고, R은 A 또는 G를 나타낸다.

[0204] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA의 crRNA 분절은 25 내지 70(예를 들어, 30 내지 60, 35 내지 50 또는 40 내지 45)개 뉴클레오타이드 길이이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 서열은 12 내지 30(예를 들어, 16 내지

25, 17 내지 20 또는 15 내지 18)개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시태양에서, 상기 crRNA의 5' 부분은 표적 서열과 하이브리드화하지 않거나 단지 부분적으로 하이브리드화한다. 예를 들어, 상기 crRNA 분절상에 5'-오버행이 존재할 수 있다.

[0205] 몇몇 실시태양에서, 상기 단일 가이드 RNA는 상기 crRNA 분절의 줄기 서열, 상기 tracrRNA 분절의 줄기 서열, 및 임의로 상기 crRNA 분절을 상기 tracrRNA 분절에 공유적으로 연결시키는 고리를 포함하는 중심 부분을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단일 가이드 RNA의 중심 분절은 8 내지 60(예를 들어, 10 내지 55, 10 내지 50, 또는 20 내지 40)개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0206] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA의 tracrRNA 분절은 10 내지 130(예를 들어, 10 내지 125, 10 내지 100, 10 내지 75, 10 내지 50 또는 10 내지 25)개 뉴클레오타이드 길이이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA 분절은 상기 중심 분절 중의 임의의 헤어핀 또는 듀플렉스 구조 외에 하나 이상의 헤어핀 또는 듀플렉스 구조를 포함한다.

[0207] 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA는 참조 tracrRNA, 예를 들어 자연에 존재하는 성숙한 tracrRNA에 비해 절두된다. 일련의 길이가 별도의 유형(도 5a) 및 키메릭 sgRNA 유형(도 5b) 모두에서 기능하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, tracrRNA는 그의 3' 단부로부터 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 nt까지 절두될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA 분자는 그의 5' 단부로부터 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 또는 80 nt까지 절두될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA 분자는 5' 및 3' 단부 모두로부터, 예를 들어 상기 5' 단부로부터 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20 nt까지, 및 상기 3' 단부로부터 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 nt까지 절두될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jinek et al. (2012) Science, 337, 816-21]; 문헌[Mali et al. (2013) Science, 33P:6121, 823-6]; 문헌[Cong et al. (2013) Science, 539:6121, 819-23]; 및 문헌[Hwang et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31:3, 227-9]; 문헌[Jinek et al. (2013) eLife, 2, e00471]을 참조하시오. 몇몇 실시태양에서, 상기 tracrRNA는 절두되지 않는다.

[0208] 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 crRNA 분절 또는 tracrRNA 분절 또는 둘 다 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 crRNA 분절의 가이드 서열 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 crRNA 분절의 줄기 서열 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 crRNA 분절의 5'-오버행 서열 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 tracrRNA 분절의 줄기 서열 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 가이드 RNA의 고리 서열 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 부분 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 개시된 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 부분 및 상기 가이드 RNA의 3' 부분 중에 있다.

[0209] E. 가이드 RNA의 합성

[0210] 몇몇 실시태양에서, 단일 가이드 RNA(sgRNA; 도 1 및 5B를 참조하시오)를 포함한 가이드 RNA를 합성 유기 화학의 기술을 사용하여 화학 합성에 의해 생성시킨다. 4개의 우세한 리보뉴클레오타이드, 즉 A, C, G 및 U 이외의 임의의 뉴클레오타이드(천연이든 비천연이든), 예를 들어 슈도유리딘, 이노신 또는 데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 가이드 RNA는, RNA 중의 상기 4개의 우세한 뉴클레오타이드 중 어느 하나와 화학적으로/구조적으로 상이한 뉴클레오타이드에 화학적 변형 또는 치환을 갖는다.

[0211] 본 명세서에 기재된 합성 가이드 RNA를 화학적으로 합성할 수 있다. 예를 들어, 상기 합성 가이드 RNA를 문헌[Dellinger et al. (2011) J. Am. Chem. Soc, 133, 11540], 미국특허 제 8,202,983 호 및 미국특허 출원 제 2010/0076183A1 호(이들의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 방법에 의해 TC 화학을 사용하여 합성할 수 있다. "TC 화학"은 티오노카바메이트 보호기에 의해 2' 하이드록실 부분상에서 보호된 RNA 단량체성 뉴클레오타이드 전구체를 사용하여, 변형되지 않은 RNA 또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 RNA를 합성하는 조성물 및 방법을 지칭한다. TC-RNA 화학을 사용하여 비교적 긴 RNA(200머 이상 정도로 긴)를 화학적으로 합성하는 능력은 우리로 하여금 상기 4개의 우세한 리보뉴클레오타이드(A,C,G 및 U)에 의해 가능한 것들을 능가할 수 있는 특별한 특징들을 갖는 가이드 RNA를 생성할 수 있게 한다. 본 명세서에 기재된 일부 합성 가이드 RNA를 또한, 시험관내 전사 및 세포-기반 발현을 포함하는 당해 분야에 공지된 방법들을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 2'-플루오로 NTP를 세포-기반 발현에 의해 생성된 합성 가이드 RNA에 통합시킬 수 있다.

- [0212] 가이드 RNA의 합성을 또한 효소에 의해 후속적으로 함께 결합되거나, 화학적 결합, 예를 들어 비제한적으로 시아노젠 브로마이드 화학, 문헌[R. Kumar et al. (2007) J. Am. Chem. Soc, 129, 6859-64]에 공개된 바와 같은 "클릭" 화학, 또는 "올리고뉴클레오타이드의 접합을 위한 조성물 및 방법"이란 표제하의 케이 힐(K. Hill)의 WO2013176844에 기재된 바와 같은 스쿠아레이트 접합 화학에 의해 화학적으로 결합되는 RNA 서열의 화학적 또는 효소적 합성에 의해 수행할 수 있다.
- [0213] 하기에 추가로 기재되는 바와 같이, 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함하는 가이드 RNA를 포함한, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA를 사용하여 다양한 크리스퍼-매개된 기능(비제한적으로 유전자 편집, 유전자 발현의 조절, 표적 서열의 절단, 및 표적 서열에의 결합을 포함한다)을 시험관내 또는 생체내에서, 예를 들어 무세포 분석에서, 완전 세포에서, 또는 전체 기관에서 수행할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 적용을 위해서, 상기 RNA를 당해 분야에 공지된 임의의 방식으로 세포 또는 전체 기관내로 전달할 수 있다.
- [0214] 라이브러리 및 배열
- [0215] 하나의 태양에서, 본 발명은 다수의 가이드 RNA의 세트 또는 라이브러리를 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 본 명세서에 개시된 2개 이상의 가이드 RNA를 함유한다. 상기 라이브러리는 약 10 내지 약  $10^7$ 의 개별적인 구성원, 예를 들어 약 10 내지 약  $10^2$ , 약  $10^2$  내지 약  $10^3$ , 약  $10^3$  내지 약  $10^5$ , 약  $10^5$  내지 약  $10^7$ 의 구성원을 함유할 수 있다. 상기 라이브러리의 개별적인 구성원은 적어도 상기 가이드 서열 중의 상기 라이브러리의 다른 구성원, 즉 상기 gRNA의 DNA 표적화 분절과 상이하다. 다른 한편으로, 몇몇 실시태양에서, 라이브러리의 각각의 개별적인 구성원은 상기 라이브러리의 모든 다른 구성원들과 동일하거나 실질적으로 동일한 tracrRNA 분절에 대한 뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 이러한 방식으로, 상기 라이브러리는 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 중의 상이한 서열을 표적화하는 구성원들을 포함할 수 있다.
- [0216] 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^2$ 개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^3$ 개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^4$ 개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^5$ 개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^6$ 개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^7$ 개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 10개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^2$ 개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^3$ 개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^4$ 개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^5$ 개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^6$ 개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도  $10^7$ 개의 상이한 폴리뉴클레오타이드를 표적화한다.
- [0217] 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 상기 라이브러리 중의 구성원들의 서열을 가로질러 움직이는 점진적으로 이동하는 창 중에 동일한 서열 및 동일한 변형을 갖는 가이드 RNA의 컬렉션을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 창은 집합적으로 상기 RNA의 전체 길이를 포함한다.
- [0218] 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 대량 처리, 다중-표적 게놈 조작 및 분석의 수행을 허용한다. 몇몇 실시태양에서, 단지 상기 가이드 RNA의 DNA-표적화 분절만이 변하는 반면, Cas 단백질-결합 분절은 동일하다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리의 제1 부분은 특정한 Cas 단백질을 인식하고, 결합하고 지시하는 Cas-결합 분절을 갖는 가이드 RNA를 포함하고, 상기 라이브러리의 제2 부분은 상이한 Cas 단백질(예를 들어, 상이한 종들로부터의 Cas 단백질)을 인식하고, 결합하고 지시하는 상이한 Cas-결합 분절을 포함하며, 이에 의해 상기 라이브러리는 2개 이상의 직교하는 Cas 단백질들과 함께 기능할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 제1 직교 Cas 단백질의 유도 발현은 상기 제1 직교 Cas 단백질과 상호작용하는 라이브러리의 부분을 사용한다. 몇몇 실시태양에서, 제1 및 제2 직교 Cas 단백질의 유도 발현은 각각 상기 제1 및 제2 직교 Cas 단백질과 상호작용하는 라이브러리의 부분들을 사용한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 제1 및 제2 직교 Cas 단백질의 유도 발현은 상이한 횟수로 발



생한다. 상응하게, 상기 라이브러리에 명시된 다수의 표적을 특이적으로 조작하거나 변형시킴으로써 대규모 유전자 편집 또는 유전자 조절을 수행할 수 있다.

[0219] 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 "배열된" 라이브러리, 즉 어드레스 가능한 배열의 상이한 특징들 또는 특징들의 풀의 컬렉션이다. 예를 들어, 배열의 특징들을 선택적으로 가르고, 미세적정 플레이트 중의 각 웰이 공지된 특징 또는 공지된 특징들의 풀을 함유하도록 상기 플레이트로 옮길 수 있다. 일부 다른 실시태양에서, 상기 라이브러리를 48-컬럼 또는 96-컬럼 미세적정 플레이트 포맷 또는 384-컬럼 플레이트에서 합성한다.

[0220] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 가이드 RNA의 합성을, 화학적 존재가 결합될 수 있는 표면을 갖는 고체 지지체상에서 수행할 수 있다. 일부 실시태양에서, 합성되는 가이드 RNA들을 동일한 고체 지지체에 직접적으로 또는 간접적으로 부착시키고 배열의 부분을 형성할 수 있다. "배열"은, 각 서열의 위치를 알도록 각각 공간적으로 한정되고 물리적으로 어드레스 가능한 방식으로 배열된 공지된 단량체성 서열의 별도의 분자들의 컬렉션이다. 본 명세서에서 호환 가능하게 사용되는 "배열" 또는 "미세배열"은 특정한 화학적 부분 또는 부분들(예를 들어, 리간드, 예를 들어 생물중합체, 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 서열(핵산), 폴리펩타이드(예를 들어, 단백질), 탄수화물, 지질 등)이 결합된, 어드레스 가능한 영역들의 임의의 1차원, 2차원 또는 실질적으로 2차원(뿐만 아니라 3차원)의 배열을 포함한다. 배열은 상기 배열상의 특정한 소정의 위치(즉 "어드레스")의 영역(즉 상기 배열의 "특징")이 특정 표적 또는 표적들의 부류를 검출하도록(특징이 상기 특징의 비-표적을 우연히 검출할 수도 있다) 상이한 부분(예를 들어, 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열)의 다수의 영역을 가질 때 "어드레스 가능하다". 배열 특징은 전형적으로는 중재 공간에 의해 분리된다(필요한 것은 아니다). 배열상에 함유될 수 있는 특징들의 수는 주로 기재의 표면적, 특징의 크기 및 특징들간의 간격에 의해 결정될 것이다. 배열은  $\text{cm}^2$ 당 수십만 개 또는 더 많은 특징들의 밀도, 예를 들어 2,500 내지 200,000 특징/ $\text{cm}^2$ 를 가질 수 있다. 상기 특징들을 기재에 공유 결합시킬 수도, 공유 결합시키지 않을 수도 있다.

[0221] 적합한 고체 지지체는 다양한 형태 및 조성을 가질 수 있으며 천연 물질, 합성적으로 변형된 천연 물질, 또는 합성 물질로부터 유래된다. 적합한 지지체 물질의 예는 비제한적으로 실리카, 규소 및 규소 산화물, 테플론, 유리, 폴리사카라이드, 예를 들어 아가로스(예를 들어, 파마시아(Pharmacia)로부터의 세파로스(등록상표)) 및 텍스트란(예를 들어, 파마시아로부터의 세파텍스(등록상표) 및 세파실(등록상표)), 폴리아크릴아미드, 폴리스타이렌, 폴리비닐 알콜, 하이드록시에틸 메트아크릴레이트 및 메틸 메트아크릴레이트의 공중합체 등을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 고체 지지체는 다수의 비드이다.

[0222] 상기 기재 표면상에서 합성되는 가이드 RNA의 초기 단량체를 링커에 결합시킬 수 있으며, 차례로 이는 표면 친수성기, 예를 들어 실리카 기재상에 존재하는 표면 하이드록실 부분에 결합된다. 일부 실시태양에서, 보편적인 링커가 사용된다. 일부 다른 실시태양에서, 상기 초기 단량체를 예를 들어 표면 하이드록실 부분과 직접 반응시킨다. 한편으로, 가이드 RNA를 본 발명에 따라 먼저 합성하고, 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 합성-후 고체 기재에 부착시킬 수 있다. 따라서, 본 발명을 사용하여 가이드 RNA의 배열을 제조할 수 있으며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 상기 배열상에서 합성되거나, 합성-후 배열 기재에 부착된다. 후속적으로, 상기 가이드 RNA 또는 가이드 RNA의 풀 또는 다수의 풀을 상기 배열 기재로부터 임의로 및 선택적으로 절단하고 라이브러리 또는 라이브러리들로서 사용할 수 있다.

[0223] IV. Cas 단백질

[0224] 상기에 언급한 바와 같이, 기능성 크리스퍼-Cas 시스템은 또한 목적하는 활성, 예를 들어 표적 결합 또는 표적 틸 형성/절단을 제공하는 단백질 성분(예를 들어, Cas 단백질(상기는 Cas 뉴클레아제일 수도 있다))을 필요로 한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 목적하는 활성은 표적 결합이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 목적하는 활성은 표적 틸 형성 또는 표적 절단이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 목적하는 활성은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은, Cas 단백질에 공유적으로 융합된 폴리펩타이드에 의해 제공되는 기능을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 목적하는 활성은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은, 뉴클레아제-결핍 Cas 단백질에 공유적으로 융합된 폴리펩타이드에 의해 제공되는 기능을 포함한다. 상기와 같은 목적하는 활성의 예는 하기에 기재되는 바와 같은, 전사 조절 활성(활성화 또는 억제), 후성적 변형 활성, 또는 표적 가시화/식별 활성을 포함한다. 상기 Cas 단백질을 정제되거나 정제되지 않은 (i) Cas 단백질 또는 (ii) 상기 Cas 단백질의 발현을 암호화하는 mRNA 또는 (iii) 상기 단백질의 발현을 암호화하는 선형 또는 환상 DNA로서 시험관내 또는 생체내 시스템에 도입시킬 수 있다. 상기 Cas 단백질을 제공하는 상기 3가지 방법 중 어느 하나는 당해 분야에 주지되어 있으며 본 명세서에서 Cas 단백질 또는 Cas 단백질의 용도를 언급할 때 호환 가능하게 의미된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 mRNA 또는 DNA로부터 구성적으로 발현된다. 몇몇 실시태양에서, mRNA 또는 DNA로부터 Cas 단백질의 발

현은 유도성이거나 유도된다.

- [0225] 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 화학적으로 합성하거나(예를 들어, 문헌[Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Principles," W.H. Freeman & Co., NY, 1983]을 참조하시오), 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 재조합 DNA 기술에 의해 생성시킨다. 추가적인 지침을 위해서, 숙련가들은 문헌[Frederick M. Ausubel et al, "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, 2003]; 및 문헌[Sambrook et al, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001]을 고려할 수 있다.
- [0226] 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 정제되거나 단리된 형태로 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99% 순도로 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 조성물의 부분으로서 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 RNA-가이드 뉴클레아제 반응을 위한 조성물로서 사용하기에 또는 상기 조성물에 포함시키기에 적합한 수성 조성물 중에 제공한다. 당해 분야의 숙련가들은 상기와 같은 뉴클레아제 반응 조성물 중에 포함될 수 있는 다양한 물질을 잘 알고 있다.
- [0227] 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 재조합 폴리펩타이드로서 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 재조합 폴리펩타이드를 융합 단백질로서 제조한다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 암호화하는 핵산을 융합 짝, 예를 들어 글루타치온-s-트랜스퍼라제(GST), 6x-His 에피토프 태그, 또는 M13 유전자 3 단백질을 암호화하는 또 다른 핵산에 결합시킨다. 적합한 숙주 세포를 사용하여 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질을 당해 분야에 공지된 방법에 의해 단리한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질을, 예를 들어 효소 절단에 의해 추가로 처리하여 상기 융합 짝을 제거하고 Cas 단백질을 수득할 수 있다. 한편으로, Cas 단백질:가이드 RNA 복합체를 숙주 세포 시스템 또는 당해 분야에 공지된 시험관내 번역-전사 시스템을 사용하여 재조합 기술로 제조할 수 있다. 상기와 같은 시스템 및 기술에 대한 상세한 내용을 예를 들어 W02014144761 W02014144592, W02013176772, US20140273226, 및 US20140273233(이들의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에서 찾을 수 있다.
- [0228] 야생형 Cas 단백질
- [0229] 몇몇 실시태양에서, Cas 단백질은 크리스퍼-Cas I형, II형 또는 III형 시스템으로부터 유래된 단백질을 포함하며, 상기 시스템은 RNA-가이드 폴리뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레아제 활성을 갖는다. 적합한 Cas 단백질의 비제한적인 예는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e(또는 CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1(또는 CasA), Cse2(또는 CasB), Cse3(또는 CasE), Cse4(또는 CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 및 Cu1966을 포함한다. 예를 들어, W02014144761 W02014144592, W02013176772, US20140273226, 및 US20140273233(이들의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)을 참조하시오.
- [0230] 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 II형 크리스퍼-Cas 시스템으로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 W02014144761에 나타난 것들을 포함하여, 세균성 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 스트렙토코커스 스페이즈 또는 스태필로코커스 스페이즈 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 스트렙토코커스 써모필루스 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 스태필로코커스 아우레우스 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 스트렙토코커스 써모필루스 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다.
- [0231] 몇몇 실시태양에서, 상기 야생형 Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 야생형 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스로부터의 Cas9 단백질(서열번호 1)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단백질 또는 폴리펩타이드는 서열번호 1의 단편을 포함하거나, 상기 단편으로 이루어지거나, 상기 단편으로 필수적으로 이루어진다.
- [0232] 일반적으로, Cas 단백질은 적어도 하나의 RNA 결합 도메인을 포함하며, 상기 도메인은 가이드 RNA와 상호작용한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 변형시켜, 상기 단백질의 핵산 결합 친화성 및/또는 특이성을 증가시키고, 효소 활성을 변경시키고, 및/또는 또 다른 성질을 변화시킨다. 예를 들어, 상기 Cas 단백질의 뉴클레

아제(즉, DNase, RNase) 도메인을 변형시키거나, 돌연변이시키거나, 결실시키거나 불활성화시킬 수 있다. 한편으로, 상기 Cas 단백질을 절두시켜, 상기 단백질의 기능에 필수적이지 않은 도메인을 제거할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 절두시키거나 변형시켜 효과기 도메인의 활성을 최적화시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 핵 국소화 서열(NLS)-태그된 Cas 단백질의 살아있는 세포의 핵내로의 수입을 수행하는 NLS를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 2개 이상의 변형을 포함한다.

[0233] 돌연변이 Cas 단백질

[0234] 일부 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 야생형 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)의 돌연변이체 또는 그의 단편일 수 있다. 다른 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 돌연변이 Cas 단백질로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 상기 Cas9 단백질의 아미노산 서열을 변형시켜 상기 단백질의 하나 이상의 성질(예를 들어, 뉴클레아제 활성, 결합 친화성, 프로테아제에 대한 안정성 등)을 변경시킬 수 있다. 한편으로, RNA-가이드 절단에 관련되지 않은 Cas9 단백질의 도메인을, 변형된 Cas9 단백질이 야생형 Cas9 단백질보다 작도록 상기 단백질로부터 제거할 수 있다. 예를 들어, 상기 Cas9 암호화 서열의 크기를 감소시키는 것은 상기 서열을 형질감염 벡터, 예를 들어 특히 AAV 벡터내에 적합하도록 할 수 있다(그렇지 않으면 상기 벡터는 야생형 서열을 수용할 수 없다). 일부 실시태양에서, 본 발명의 시스템은 세균에서 암호화되거나 진핵생물 세포에서의 발현에 대해 코돈-최적화된 스트렙토코커스 피오게네스로부터의 Cas9 단백질을 사용한다. 하기에 야생형 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9 단백질 서열(서열번호 1, [www.uniprot.org/uniprot/Q99ZW2](http://www.uniprot.org/uniprot/Q99ZW2)에서 입수할 수 있다)의 아미노산 서열을 나타낸다.

```
MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAE
ATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD
VDKLFIQLVQTYNQLFEEFNPIASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGFLGN
LIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAI
LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIHQIHLGELH
AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE
VVDKGASAQSFIERMTNFDKLNPNKVLKPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNAQLGTYHDLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDQSGKTIIDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSL
HEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER
MKRIEEGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDH
IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL
TKAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTLIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRK
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIWDKGRDF
ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLKGSPEDEQKQLFVE
QHKHYLDEIIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD
```

[0235]

[0236] Cas9 단백질은 일반적으로 2개 이상의 뉴클레아제(예를 들어, DNase) 도메인을 갖는다. 예를 들어, Cas9 단백질은 RuvC-형 뉴클레아제 도메인 및 HNH-형 뉴클레아제 도메인을 가질 수 있다. 상기 RuvC 및 HNH 도메인은 함께 표적 부위 중의 2개의 가닥을 모두 절단하여 표적 폴리뉴클레오타이드 중에 이중-가닥 끊김을 생성시킨다(문헌[Jinek et al., Science, 337:816-821]). 몇몇 실시태양에서, 돌연변이 Cas9 단백질을 단지 하나의 기능성 뉴클레아제 도메인(RuvC-형 또는 HNH-형 뉴클레아제 도메인)을 함유하도록 변형시킨다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 상기 돌연변이 Cas9 단백질을, 상기 뉴클레아제 도메인들 중 하나가 더 이상 기능적이지 않도록(즉 상기 뉴클레아제 활성이 존재하지 않는다) 결실되거나 돌연변이되도록 변형시킨다. 상기 뉴클레아제 도메인들 중 하나가 불활성인 일부 실시태양에서, 상기 돌연변이체는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드에 틈을 도입시킬 수 있지만(상기와 같은 단백질을 "니카제"라 칭한다) 상기 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 절단할 수는 없다. 예를 들어, RuvC-형 도메인에서 아스파테이트의 알라닌(D10A)으로의 전환은 상기 Cas9-유래된 단백질을 니카제로 전환시킨다. 마찬가지로, HNH 도메인에서 히스티딘의 알라닌(H840A)으로의 전환은 상기 Cas9-유래된 단백질을 니카제로 전환시킨다. 마찬가지로, HNH 도메인에서 아스파라긴의 알라닌(N863A)으로의 전환은 상기 Cas9-유래된 단백질을 니카제로 전환시킨다.

- [0237] 몇몇 실시태양에서, 상기 RuvC-형 뉴클레아제 도메인 및 HNH-형 뉴클레아제 도메인을 모두, 돌연변이 Cas9 단백질이 표적 폴리뉴클레오타이드에 틸을 형성시키거나 상기를 절단할 수 없도록 변형시키거나 제거한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas9-유래된 단백질의 모든 뉴클레아제 도메인을, 상기 Cas9-유래된 단백질이 모든 뉴클레아제 활성이 없도록 변형시키거나 제거한다. 그럼에도 불구하고, 몇몇 실시태양에서, 야생형 대응물에 비해 일부 또는 모든 뉴클레아제 활성이 없는 Cas9 단백질은 표적 인식 활성을 더 크거나 더 적은 정도로 유지시킨다.
- [0238] 상술한 실시태양들 중 어느 하나에서, 상기 뉴클레아제 도메인 중 일부 또는 전부를 주지된 방법, 예를 들어 부위-지향된 변이도입, PCR-매개된 변이도입, 및 전체 유전자 합성뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 방법들을 사용하여 하나 이상의 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이 및/또는 치환 돌연변이에 의해 불활성화시킬 수 있다.
- [0239] 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 서열번호 1과 적어도 50%(예를 들어, 50% 내지 100%(양끝 포함) 사이의 임의의 수, 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 및 99%) 일치한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 RNA 분자(예를 들어, sgRNA)에 결합한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 "Cas 돌연변이체" 또는 "Cas 변체"는 상기 RNA 분자를 통해 특정한 폴리뉴클레오타이드 서열에 표적화된다.
- [0240] 융합 단백질
- [0241] 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 상기 Cas 단백질과 비상동성인 또 다른 단백질 또는 폴리펩타이드에 융합시켜 융합 단백질을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 비상동 서열은 하나 이상의 효과기 도메인, 예를 들어 절단 도메인, 전사·활성화 도메인, 전사 억제 도메인, 또는 후성적 변형 도메인을 포함한다. 상기 효과기 도메인의 추가적인 예는 핵 국소화 신호, 세포-침투 또는 전좌 도메인, 또는 마커 도메인을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 효과기 도메인은 상기 융합 단백질의 N-말단, C-말단 또는 내부 위치에 위치한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 Cas 단백질은 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 Cas 단백질은 모든 뉴클레아제 도메인이 불활성화되거나 결실된 변형된 또는 돌연변이된 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 Cas 단백질은 뉴클레아제 활성이 결여된 변형되거나 돌연변이된 Cas9 단백질이거나 상기 단백질로부터 유래된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질의 RuvC 및/또는 HNH 도메인은 이들이 더 이상 뉴클레아제 활성을 갖지 못하도록 변형되거나 돌연변이된다.
- [0242] 절단 도메인
- [0243] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 효과기 도메인은 절단 도메인이다. 본 명세서에 사용되는 "절단 도메인"은 DNA를 절단하는 도메인을 지칭한다. 상기 절단 도메인은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 획득될 수 있다. 절단 도메인을 이끌어낼 수 있는 엔도뉴클레아제의 비제한적인 예는 제한 엔도뉴클레아제 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함한다. 예를 들어, 문헌[New England Biolabs Catalog] 또는 문헌[Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3379-88]을 참조하십시오. DNA를 절단하는 추가적인 효소들(예를 들어, 51 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제; 채장 DNase I; 마이크로코커스 뉴클레아제; 효모 HO 엔도뉴클레아제)이 공지되어 있다. 또한 문헌[Linn et al. (eds.) "Nucleases," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993]을 참조하십시오. 상기 효소들 중 하나 이상(또는 그의 기능성 단편들)을 절단 도메인의 공급원으로서 사용할 수 있다.
- [0244] 몇몇 실시태양에서, 상기 절단 도메인은 II-S형 엔도뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. II-S형 엔도뉴클레아제는 특이적으로, 상기 엔도뉴클레아제의 DNA 인식 부위로부터 떨어져 있는 전형적으로 다수의 염기쌍인 부위에서 DNA를 절단하며, 그 자체로서 분리 가능한 인식 및 절단 도메인을 갖는다. 상기 효소는 일반적으로, 일시적으로 결합하여 이량체를 형성하여 엇갈린 위치에서 DNA의 각 가닥을 절단하는 단량체이다. 적합한 II-S형 엔도뉴클레아제의 비제한적인 예는 BfiI, BpmI, BsaI, BsgI, BsmBI, BsmI, BspMI, FokI, MboI, 및 SapI를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 절단 도메인은 FokI 절단 도메인 또는 그의 단편 또는 유도체이다. 문헌[Miller et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25, 778-85]; 문헌[Szczepk et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25, 786-93]; 문헌[Doyon et al. (2011) *Nat. Methods*, 8, 74-81]을 참조하십시오.
- [0245] 전사 활성화 도메인
- [0246] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 효과기 도메인은 전사 활성화 도메인이다. 일반적으로, 전사 활성화 도메인은 전사 조절 요소 및/또는 전사 조절 단백질(즉 전사 인자, RNA 폴리머라제 등)과 상호작용하여 유전자의 전사를 증가시키고/시키거나 전사를 활성화시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 전사 활성화 도메인은 헤르페스 단순 바이러스 VP16 활성화 도메인, VP64(VP16의 사량체성 유도체이다), NFκB p65 활성화 도메인, p53 활성



화 도메인 1 및 2, CREB(cAMP 응답 요소 결합 단백질) 활성화 도메인, E2A 활성화 도메인, 또는 NFAT(활성화된 T-세포의 핵 인자) 활성화 도메인이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 전사 활성화 도메인은 Gal4, 'Gcn4, MLL, Rtg3, Gln3, Oaf1, Pip2, Pdr1, Pdr3, Pho4, 또는 Leu3이다. 상기 전사 활성화 도메인은 야생형이거나, 원래 전사 활성화 도메인의 변형되거나 절단된 버전일 수 있다.

[0247] 전사 억제인자 도메인

[0248] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 효과기 도메인은 전사 억제인자 도메인이다. 일반적으로 전사 억제인자 도메인은 전사 통제 요소 및/또는 전사 조절 단백질(즉 전사 인자, RNA 폴리머라제 등)과 상호작용하여 유전자의 전사를 감소시키고/시킴거나 방지한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 전사 억제인자 도메인은 유도성 cAMP 조기 억제인자(ICER) 도메인, 크루펠-결합된 박스 A(KRAB-A) 억제인자 도메인, YY1 글리신 풍부 억제인자 도메인, Sp1-형 억제인자, E(sp1) 억제인자, IκB 억제인자, 또는 MeCP2이다.

[0249] 후성적 변형 도메인

[0250] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질의 효과기 도메인은 후성적인 변형 도메인이다. 일반적으로, 후성적인 변형 도메인은 히스톤 구조 및/또는 염색체 구조를 변형시킴으로써 유전자 발현을 변경시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 후성적인 변형 도메인은 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 도메인, 히스톤 데아세틸라제 도메인, 히스톤 메틸트랜스퍼라제 도메인, 히스톤 데메틸라제 도메인, DNA 메틸트랜스퍼라제 도메인, 또는 DNA 데메틸라제 도메인이다.

[0251] 추가적인 도메인들

[0252] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질은 적어도 하나의 추가적인 도메인을 추가로 포함한다. 적합한 추가적인 도메인의 비제한적인 예는 핵 국소화 신호(NLS), 세포-침투 또는 전좌 도메인, 및 마커 도메인을 포함한다. NLS는 일반적으로 염기성 아미노산의 신장부를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Lange et al. (2007) J. Biol. Chem., 282, 5101-5]을 참조하십시오. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 상기 NLS는 단분입자 서열, 예를 들어 PKKKRKV(서열번호 2) 또는 PKRRV(서열번호 3)이다. 몇몇 실시태양에서, NLS는 이분입자 서열이다. 몇몇 실시태양에서, NLS는 KRPAATKKAGQAKKK(서열번호 4)이다.

[0253] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질은 적어도 하나의 세포-침투성 도메인을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포-침투성 도메인은 HIV-1 TAT 단백질로부터 유래된 세포-침투성 펩타이드 서열이다. 일례로서, 상기 TAT 세포-침투성 서열은 GRKKRRQRRPPQPKKKRKV(서열번호 5)일 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포-침투성 도메인은 TLM(PLSSIFSRIGDPPKKKKRKV; 서열번호 6), 인간 B형 간염 바이러스로부터 유래된 세포-침투성 펩타이드 서열이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포-침투성 도메인은 MPG(GALFLGLWGAAGSTMGAPKKRKV; 서열번호 7 또는 GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV; 서열번호 8)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포-침투성 도메인은 Pep-1(KETWWETWWTEWSQPKKKRKV; 서열번호 9), VP22, 헤르페스 단순 바이러스로부터의 세포 침투성 펩타이드, 또는 폴리아르기닌 펩타이드 서열이다.

[0254] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질은 적어도 하나의 마커 도메인을 포함한다. 마커 도메인의 비제한적인 예는 형광 단백질, 정제 태그, 및 에피토프 태그를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 마커 도메인은 형광 단백질이다. 적합한 형광 단백질의 비제한적인 예는 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, GFP-2, 태그GFP, 터보GFP, EGFP, 에머랄드, 아자미 그린, 단량체성 아자미 그린, CopGFP, AceGFP, Zs그린1), 황색 형광 단백질(예를 들어, YFP, EYFP, 시트린, 비너스, YPet, PhiYFP, Zs엘로우1), 청색 형광 단백질(예를 들어, EBFP, EBFP2, 아주라이트, mKalamal, GFPuv, 사파이어, T-사파이어), 시안 형광 단백질(예를 들어, ECFP, 세룰린, CyPet, Am시안1, 미도리이시-시안), 적색 형광 단백질(mKate, mKate2, m플럼, Ds레드 단량체, m체리, mRFP1, Ds레드-익스프레스, Ds레드2, Ds레드-단량체, Hc레드-탠덤, Hc레드1, As레드2, eqFP61 1, m라스베리, m스트로베리, J레드), 오렌지 형광 단백질(m오렌지, mKO, 쿠사비라-오렌지, 단량체성 쿠사비라-오렌지, m탄제린, td토마토) 및 임의의 다른 적합한 형광 단백질들을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 마커 도메인은 정제 태그 및/또는 에피토프 태그이다. 예시적인 태그는 비제한적으로 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST), 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질, 티오레독신(TRX), 폴리(NANP), 탠덤 친화성 정제(TAP) 태그, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, 소프트태그(Softag) 1, 소프트태그 3, 스트렙(Strep), SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, SI, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 비오틴 카복실 담체 단백질(BCCP), 및 칼모듈린을 포함한다.

[0255] V. 용도 및 방법

[0256] 하나의 태양에서, 본 발명은 Cas 단백질에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 방법을 제공한다. 상기 방법

은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 또는 가이드 RNA 분자들의 세트, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중에 이중-가닥 끊김을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중에 단일-가닥 끊김을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 가이드 RNA 및 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질을 포함하는 복합체를 서열-표적화된 단일-가닥 DNA 절단, 즉 틸 형성에 사용한다.

[0257] 하나의 태양에서, 본 발명은 Cas 단백질에 의한 2개 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 분자들의 세트, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중에 이중-가닥 끊김을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중에 단일-가닥 끊김을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 가이드 RNA 및 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질을 포함하는 복합체를 서열-표적화된 단일-가닥 DNA 절단, 즉 틸 형성에 사용한다.

[0258] 하나의 태양에서, 본 발명은 Cas 단백질과 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 또는 가이드 RNA 분자들의 세트, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시켜 상기 표적 폴리뉴클레오타이드와 상기 Cas 단백질과의 결합을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 Cas 변체이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 변체는 대응하는 야생형 Cas 단백질에 비해 일부 또는 모든 뉴클레아제 활성이 없다.

[0259] 하나의 태양에서, 본 발명은 Cas 단백질과 2개 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드를 (i) 본 명세서에 기재된 RNA 분자들의 세트, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시켜 상기 표적 폴리뉴클레오타이드와 상기 Cas 단백질과의 결합을 생성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 Cas 변체이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 변체는 대응하는 야생형 Cas 단백질에 비해 일부 또는 모든 뉴클레아제 활성이 없다.

[0260] 하나의 태양에서, 본 발명은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오타이드에 표적화하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 또는 가이드 RNA 분자들의 세트와 접촉시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 가이드 RNA:Cas 단백질 복합체를 형성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 야생형 Cas9 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질의 돌연변이체 또는 변체이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 뉴클레아제 활성이 없는 Cas 단백질(예를 들어, Cas 단백질의 뉴클레아제-결핍 돌연변이체)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 융합 단백질(예를 들어, (i) Cas 단백질 및 (ii) 비상동 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질)의 부분이다.

[0261] 하나의 태양에서, 본 발명은 Cas 단백질을 2개 이상의 표적 폴리뉴클레오타이드에 표적화하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 분자들의 세트와 접촉시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 가이드 RNA:Cas 단백질 복합체를 형성시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 야생형 Cas9 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질의 돌연변이체 또는 변체이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 단일-가닥 틸 형성 활성을 갖는 Cas 단백질이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 뉴클레아제 활성이 없는 Cas 단백질(예를 들어, Cas 단백질의 뉴클레아제-결핍 돌연변이체)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 융합 단백질(예를 들어, (i) Cas 단백질 및 (ii) 비상동 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질)의 부분이다.

[0262] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA를 형질감염에 의해 세포에 도입시킨다. RNA 형질감염 기법은 당해 분야에 공지되어 있으며 일렉트로포레이션 및 리포펙션을 포함한다. RNA 형질감염에 유효한 기법은 대개 세포 유형에 따라 변한다. 예를 들어, 문헌[Lujambio et al. (Spanish National Cancer Centre) Cancer Res. Feb. 2007](HTC-116 결장암 세포의 형질감염 및 상업적으로 수득된, 변형된 miRNA 또는 전구체 miRNA의 형질감염을 위한 올리고펙타민(인비트로젠)의 용도를 기재한다)을 참조하시오. 또한 문헌[Cho et al. (Seoul National Univ.) Nat. Biotechnol. Mar. 2013](K562 세포의 형질감염 및 전사된 sgRNA(약 60 nt 길이)의 형질감염을 위한 4D 뉴클레오펙션(Nucleofection)(상표)(론자(Lonza)) 일렉트로포레이션의 용도를 기재한다)을 참조하시오. RNA의 형질감염 기법은 또한 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 치료학적 RNA를 인배신(Invasin) 단백질( $\beta$ -1 인테그린 단백질을 발현하는 세포내로의 흡수를 촉진하기 위해서)로 코팅된 비-병원성 에스케리키아 콜라

이 중에서, 에스케리키아 콜라이로부터 세포질내로의 shRNA의 통과를 허용하기 위해 리스테리올리신 O 기공-형성 단백질을 발현하도록 암호화된 에스케리키아 콜라이와 함께 전달하였다. 또한 문헌[Cho et al. (Seoul National Univ.) Nat. Biotechnol. Mar. 2013]을 참조하시오.

[0263] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA를 세포내에 도입시키거나 전달한다. 가이드 RNA의 전달에 사용될 수 있는 기술은 생분해성 중합체, 리포솜 또는 나노입자에 의한 캡슐화를 사용하는 것들을 포함한다. 상기과 같은 중합체, 리포솜 및 나노입자를 정맥내로 전달할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 생체내 전달을 위해, 가이드 RNA를 조직 부위에 주사하거나 전신적으로 투여할 수 있다. 생체내 전달을 또한 베타-글루칸 전달 시스템, 예를 들어 미국특허 제 5,032,401 호 및 미국특허 제 5,607,677 호, 및 미국특허 공보 제 2005/0281781 호(이들은 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 것들에 의해 수행할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 함유하는 전달 비히클을 특정한 조직 또는 신체 구획에 표적화한다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 외인성 RNA를 다른 조직에 표적화하기 위해서, 합성 담체를 세포-특이성 리간드 또는 수용체 흡수용 앵타머, 예를 들어 PEG로 코팅되고 트랜스페린 수용체(중양 세포에서 고도로 발현된다)를 통한 흡수를 위해 인간 트랜스페린 단백질로 기능화된 사이클로텍스트린 나노입자 중에 싸인 RNA로 장식한다. 추가적인 접근법들은 본 명세서에서 하기에 기재되거나 당해 분야에 공지되어 있다.

[0264] 본 발명을 문헌[Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33:9, 985-9](내용 전체가 본 출원에 인용된다)에 기재된 바와 같이 인간 세포에서 시험하였다. 상기 인용된 연구에서, 변형된 가이드 RNA를 K562 세포, 인간 1차 T 세포, 및 CD34+ 조혈모세포 및 전구세포(HSPC)에 도입시켰다. 상기 변형된 가이드 RNA는 변형되지 않은 가이드 RNA에 비해, 인간 1차 T 세포 및 CD34+ HSPC를 포함한 인간 세포에서 게놈 편집 효율을 현저하게 증대시켰다.

[0265] 도 11a 및 11b는 인간 세포주에서 유전자 파괴가 인텔의 높은 빈도에 의해서 또는 본 명세서에 개시된 합성되고 화학적으로 변형된 sgRNA를 사용하는 절단-자극된 상동성 재조합에 의해 성취될 수 있음을 보이는 실험 결과를 예시한다. 변이도입성 NHEJ에 의한 유전자 파괴를, PCR 앵플리콘의 심층 서열분석(도 12a)에 의해서 또는 합성 sgRNA와 함께 Cas9에 의해 유도된 K562 세포 중 3개의 유전자좌 IL2RG, HBB 및 CCR5에서의 HR에 의한 유전자 편집(도 12b)에 의해 측정하였다. 상기 합성 sgRNA를 100만 세포당 1  $\mu$ g(밝은 음영) 또는 20  $\mu$ g(어두운 음영)으로 전달하였다. Cas9는 플라스미드(2  $\mu$ g)로부터 발현되었으며 HR 실험의 경우 5  $\mu$ g의 GFP-암호화 공여 플라스미드가 포함되었다. 양성 대조군으로서 상기 sgRNA 및 Cas9 단백질을 모두 암호화하는 2  $\mu$ g의 sgRNA 플라스미드가 사용되었다(회색 막대). 막대는 평균값 + s.e.m.을 나타낸다, n=3.

[0266] 도 12a, 12b, 12c 및 12d는 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학적으로 변형된 sgRNA를 사용하여, 자극된 1차 인간 T 세포 및 CD34+ 조혈모세포 및 전구세포(HSPC)에서 유전자 파괴 또는 표적화된 게놈 편집의 높은 빈도를 성취할 수 있음을 나타내는 실험 결과를 예시한다.

[0267] 도 12a는 10  $\mu$ g의 합성 CCR5 sgRNA 및 15  $\mu$ g의 Cas9 mRNA 또는 1  $\mu$ g의 Cas9-암호화 플라스미드로 뉴클레오펙션된 1차 인간 T 세포로부터의 결과를 예시한다. 상기 sgRNA 및 Cas9 단백질을 모두 암호화하는 1  $\mu$ g의 sgRNA 플라스미드를 비교를 위해 포함시켰다. 막대는, 상기 sgRNA 표적 부위에 걸쳐 있고 대조군 참조로서 모의-처리된 샘플을 사용하는 PCR 앵플리콘의 TIDE(분해에 의한 인텔의 추적) 분석에 의해 측정된 바와 같은, 3개의 상이한 공여체들에 대한 평균 인텔 빈도 + s.e.m.을 나타내며, n=6이다. 변형되지 않거나 M-변형된 sgRNA와 함께 Cas9 mRNA의 전달 및 상기 sgRNA 및 Cas9 모두를 암호화하는 플라스미드의 뉴클레오펙션은 배경 이상의 대립유전자 변형 빈도를 생성시키지 않았다. Cas9에 대한 DNA 발현 플라스미드와 MSP-변형된 sgRNA의 동시-형질감염은 9.3% 인텔 빈도를 생성시켰다. 상기 MS- 또는 MSP-변형된 sgRNA와 Cas9 mRNA는 각각 48.7% 및 47.9% 인텔 빈도를 생성시켰다.

[0268] 도 12b는 자극된 T 세포로부터의 결과를 예시한다. 상기 세포는 상기과 같이, 그러나 2.5 몰 과잉의 상기 지시된 합성 CCR5·sgRNA와 복합체화된 15  $\mu$ g Cas9 단백질로 뉴클레오펙션되었다. 인텔 빈도를 TIDE 분석에 의해 측정하였다. 막대는 3개의 상이한 공여체에 대한 평균 인텔 빈도 + s.e.m.을 나타내며, n=6이다. 상기 변형되지 않은 sgRNA에 대한 상기 MS-변형된 sgRNA의 인텔 빈도의 2.4배 개선(30.7% 대 12.8%)이, Cas9 단백질과 복합체화되어 전달시 화학적으로 변형된 sgRNA에 대해 관찰되었다. 이러한 결과는 화학적으로 변형된 sgRNA를 Cas9 단백질과 복합체화되어 전달시 자극된 T 세포의 게놈 편집에 사용할 수 있음을 확립시킨다.

[0269] 도 12c는 인간 말초 혈액 CD34+ HSPC로부터의 결과를 예시한다. 500,000개의 동원된 세포를 IL2RG 또는 HBB를 표적화하는 10  $\mu$ g의 상기 지시된 합성 sgRNA 및 15  $\mu$ g의 Cas9 mRNA 또는 1  $\mu$ g의 Cas9 플라스미드 1로 뉴클레오펙션시켰다. 상기 sgRNA 및 Cas9 단백질을 모두 암호화하는 1  $\mu$ g의 sgRNA 플라스미드를 비교를 위해 포함시켰



다. 막대는 T7 엔도뉴클레아제 절단 분석에 의해 측정된 바와 같은, 평균 인텔 빈도 + s.e.m., n=3을 나타내었다. 인텔은 Cas9 mRNA와 동시-형질감염시 변형되지 않거나 M-변형된 sgRNA를 사용하여 어느 한 유전자좌에서도 검출되지 않았다. 그러나, 상기 IL2RG MS- 및 MSP-변형된 sgRNA는 각각 17.5% 및 17.7% 인텔 빈도를 나타내었고, 상기 HBB MS- 및 MSP-변형된 sgRNA의 경우 각각 23.4% 및 22.0%를 나타내었다.

[0270] 도 12d는 자극된 T 세포 또는 동원된 인간 말초 혈액 CD34+·HSPC로부터의 결과를 예시한다. 100만개의 세포를 15  $\mu$ g의 Cas9 mRNA 및 10  $\mu$ g의 상기 지시된 합성 CCR5 sgRNA로 뉴클레오펙션시켰다. 최근의 연구는 2개의 sgRNA의 동시 사용이 인간 1차 T 세포 및 CD34+ HSPC에서 유전자 파괴를 개선시킬 수 있음을 나타내었다. 예를 들어, 문헌[Mandal et al. (2014) Cell Stem Cell, 15, 643-52]을 참조하시오. MS- 및 MSP-변형된 CCR5 sgRNA를 만달(Mandal) 연구에서 보고된 서열들('D' 및 'Q'라 칭함)(205 염기쌍을 분리 절단시킨다)로 화학적으로 합성하였다. 각각의 sgRNA의 양은 함께 사용시 5  $\mu$ g이었다. 단일 sgRNA를 갖는 샘플에 대한 인텔 빈도를 상기와 같은 TIDE 분석에 의해 측정하였으며 2개의 sgRNA를 갖는 샘플에 대한 대립유전자 파괴 빈도를 클로닝된 PCR 산물의 서열분석에 의해 측정하였다. 막대는 평균 인텔 빈도 + s.e.m., n=3을 나타낸다. T 세포에서, 'D' sgRNA는 단독으로 상기 MS- 및 MSP-변형된 sgRNA에 대해 각각 56.0% 및 56.3% 인텔을 생성시켰고, 'Q' sgRNA는 각각 62.6% 및 69.6% 인텔을 생성시켰다. 함께 사용시 대립유전자 변형의 빈도는, 우리가 상기 MS- 및 MSP-변형된 sgRNA에 대해 각각 73.9% 및 93.1% 인텔로 관찰한 바와 같이 증가하였으며, 상기 중 변형 사건의 대부분은 상기 2개의 sgRNA 표적 부위들간의 결실이었다. CD34+ HSPC에서, 전체적인 빈도가 더 낮았지만 관찰은 유사하였다. 'D' sgRNA의 경우, 상기 MS- 및 MSP-변형된 sgRNA에 대해 각각 9.8% 및 11.2%의 대립유전자 변형 빈도, 및 상기 'Q' sgRNA에 대해 17.8% 및 19.2%가 관찰되었다. 함께 사용시 상기 MS- 및 MSP-변형된 sgRNA에 대한 빈도는 각각 37.8% 및 43.0%까지 증가하였다. 이는 상기 2개의 화학적으로 변형된 sgRNA의 사용이 1차 인간 T 세포 및 CD34+ HSPC에서 유전자 파괴를 촉진하는데 매우 유효한 방식임을 나타낸다.

[0271] 다른 사용 예들은 하기에 기재하는 바와 같은 게놈 편집 및 유전자 발현 조절을 포함한다.

[0272] 게놈 편집

[0273] 하나의 태양에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내("생체내"는 비제한적으로 무세포 시스템, 세포 용해물, 세포의 분리된 성분, 및 살아있는 유기체 밖의 세포를 포함한다)에서 DNA 서열을 변형시키기 위한 게놈 편집 방법을 제공한다. 상기 DNA 서열은 염색체 서열, 에피솜 서열, 플라스미드, 미토콘드리아 DNA 서열, 또는 기능성 유전자간 서열, 예를 들어 인핸서 서열 또는 비-암호화 RNA에 대한 DNA 서열을 포함할 수 있다. 상기 방법은 상기 DNA 서열을 (i) 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 또는 가이드 RNA 분자들의 세트, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA 서열을 세포 밖에서 접촉시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA 서열을 세포내의 게놈 중에 위치시키고 시험관내 또는 생체내에서 접촉시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포는 유기체 또는 조직내에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포는 인간 세포, 비-인간 포유동물 세포, 줄기 세포, 비-포유동물 척추동물 세포, 무척추동물 세포, 식물 세포, 단세포 유기체 또는 배아이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질을 상기 DNA 서열 중 표적화된 부위에 표적화하는 것을 돕는다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 상기 표적화된 부위에서 상기 DNA 서열의 적어도 하나의 가닥을 절단한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 상기 표적화된 부위에서 상기 DNA 서열의 2개의 가닥을 모두 절단한다.

[0274] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 세포 또는 또 다른 시스템에 도입시킴을 추가로 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 정제된 또는 정제되지 않은 단백질로서 도입된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 통해 도입된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 상기 Cas 단백질을 암호화하는 선형 또는 환상 DNA를 통해 도입된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포 또는 시스템은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0275] 몇몇 실시태양에서, 이중-가닥 끊김을 실수유발, 비-상동성 단부-결합("NHEJ") 수복 과정을 통해 수복할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 이중-가닥 끊김을, 공여 폴리뉴클레오타이드 중의 공여 서열이 표적화된 DNA 서열에 통합되거나 상기와 교환될 수 있도록 상동성-지시된 수복(HDR) 과정에 의해 수복할 수 있다.

[0276] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 적어도 하나의 공여 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 또는 시스템내에 도입시킴을 추가로 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 폴리뉴클레오타이드는 상기 DNA 서열 중의 표적화된 부위의 어느 한쪽 상의 서열과 실질적인 서열 일치성을 갖는 적어도 하나의 상동 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 폴리뉴클레오타이드는 상동성-지시된 수복, 예를 들어 상동성 재조합을 통해 DNA 서열에 통합되거나 상기 서열과 교환될 수 있는 공여 서열을 포함한다.

- [0277] 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 폴리뉴클레오타이드는 상류 상동 서열 및 하류 상동 서열을 포함하며, 이들은 각각 상기 DNA 서열 중의 표적화된 부위의 상류 및 하류에 각각 위치한 서열들에 대해 실질적인 서열 일치성을 갖는다. 이러한 서열 유사성은, 예를 들어, 상기 공여 서열이 상기 표적화된 DNA 서열에 통합될 수 있도록(또는 상기 서열과 교환될 수 있도록) 상기 공여 폴리뉴클레오타이드와 표적화된 DNA 서열간의 상동성 재조합을 허용한다.
- [0278] 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA 서열 중의 표적 부위(들)는 질환을 야기하거나 상기 질환과 관련될 수 있는 돌연변이, 예를 들어 점 돌연변이, 전좌 또는 역위에 걸쳐있거나 이에 인접한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 세포 또는 시스템에 (i) 돌연변이의 야생형 대응물 및 (ii) 상기 DNA 서열 중의 표적화된 부위의 한쪽 상의 서열과 실질적인 서열 일치성을 갖는 적어도 하나의 상동성 서열을 포함하는 적어도 하나의 공여 폴리뉴클레오타이드를 도입시킴으로써 상기 돌연변이를 교정함을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 폴리뉴클레오타이드는 상기 DNA 서열 중의 표적화된 부위의 한쪽 상의 서열과 실질적인 서열 일치성을 갖는 상동 서열을 포함한다.
- [0279] 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 폴리뉴클레오타이드는 상동성-지시된 수복 과정, 예를 들어 상동성 재조합을 통해 상기 표적화된 DNA 서열에 통합되거나 상기 서열과 교환될 수 있는 외인성 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 외인성 서열은, 임의로 외인성 프로모터 조절 서열과 작동적으로 연결되는 단백질 암호화 유전자를 포함한다. 따라서, 몇몇 실시태양에서, 상기 외인성 서열의 통합시, 세포는 상기 통합된 유전자에 의해 암호화된 단백질을 발현할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 외인성 서열을, 수용 세포 또는 시스템에서의 그의 발현이 상기 외인성 프로모터 조절 서열에 의해 조절되도록 상기 표적화된 DNA 서열에 통합시킨다. 상기 표적화된 DNA 서열내 외인성 유전자의 통합을 "녹인(knock in)"이라 칭한다. 다른 실시태양에서, 상기 외인성 서열은 전사 조절 서열, 또 다른 발현 조절 서열, RNA 암호화 서열 등일 수 있다.
- [0280] 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 폴리뉴클레오타이드는, 표적화된 부위 또는 그 부근에서 DNA 서열의 일부와 필수적으로 동일하지만 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변화를 포함하는 서열을 포함한다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, 상기 공여 서열은, 상기 표적화된 부위와 통합 또는 교환시, 상기 표적화된 부위에 생성되는 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변화를 포함하도록 상기 표적화된 부위 또는 그 부근에서 상기 DNA 서열의 변형되거나 돌연변이된 버전을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변화는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 또는 이들의 조합이다. 상기 변형된 서열의 통합의 결과로서, 상기 세포는 상기 표적화된 DNA 서열로부터 변형된 유전자 산물을 생성시킬 수 있다.
- [0281] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 다중복합체 적용을 위한 것이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 가이드 RNA의 라이브러리를 세포 또는 시스템에 도입시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 1,000개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 10,000개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100,000개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 1,000,000개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 10개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 10개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 100개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 1000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 1000개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 10,000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 10,000개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100,000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 100,000개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 1,000,000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 1,000,000개의 상이한 서열을 표적화한다.
- [0282] 인간 및 포유동물 세포에서 게놈 편집
- [0283] 본 발명의 실시태양은 포유동물 세포에서 표적 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 DNA 서열을 변형시키기 위한 게놈 편집 방법에 유용하다.
- [0284] 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA 서열은 염색체 서열이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA 서열은 단백질-암호화 서

열이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA 서열은 기능성 유전자간 서열, 예를 들어 인헨서 서열 또는 비-암호화 서열이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 DNA는 인간 유전자의 부분이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 인간 유전자는 클라트린 경쇄(CLT1A1) 유전자, 인간 인터류킨 2 수용체 감마(IL2RG) 유전자, 인간 세포독성 T-림프구-관련된 단백질 4(CLT4A) 유전자, 인간 프로토키라틴 알파 4(PCDHA4) 유전자, 인간 분절발생 호메오박스 1(EN1) 유전자, 인간 헤모글로빈 베타(HBB) 유전자(겸상 적혈구 빈혈 및 지중해 빈혈의 원인 돌연변이를 가질 수 있다), 또는 인간 케모킨(C-C 동기) 수용체 5(CCR5) 유전자(HIV의 공-수용체를 암호화한다)이다.

[0285] 몇몇 실시태양에서, 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 인간 세포는 1차 인간 세포이다. 추가의 실시태양에서, 상기 1차 인간 세포는 인간 1차 T 세포이다. 상기 인간 1차 T 세포는 자극되거나 자극되지 않을 수도 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 인간 세포는 줄기/전구세포, 예를 들어 CD34+ 조혈모세포 및 전구세포(HSPC)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 인간 세포는 배양된 세포주, 예를 들어 상업적으로 입수될 수 있는 세포주로부터 유래한다. 예시적인 세포주는 K562 세포, 인간 골수성 백혈병 세포주를 포함한다.

[0286] 몇몇 실시태양에서, 상기 세포는 살아있는 유기체내에 있다. 몇몇 다른 실시태양에서, 상기 세포는 살아있는 유기체 밖에 있다.

[0287] 상기 방법은 상기 DNA 서열을 (i) 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 또는 가이드 RNA 분자들의 세트, 및 (ii) Cas 단백질과 접촉시킴을 포함한다.

[0288] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 가이드 RNA를 상기 세포내로 도입하거나 전달함을 추가로 포함한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 가이드 RNA를 형질감염에 의해 세포내에 도입시킨다. RNA 형질감염 기법은 당해 분야에 공지되어 있으며 일렉트로포레이션 및 리포펙션을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 가이드 RNA를 뉴클레오펙션에 의해 세포(및 보다 특히 세포 핵)내로 도입시킨다. 뉴클레오펙션 기법은 당해 분야에 공지되어 있으며 뉴클레오펙션 장치, 예를 들어 론자 뉴클레오펙터 2b 또는 론자 4D-뉴클레오펙터 및 관련 시약들을 사용할 수 있다.

[0289] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 상기 세포에 도입시키거나 전달함을 추가로 포함한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 정제되거나 정제되지 않은 단백질로서 도입시킨다. 다른 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 통해 도입시킨다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 뉴클레오펙션에 의해 세포내로 도입시킨다. 다른 실시태양에서, 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 뉴클레오펙션에 의해 세포(및 보다 특히 세포 핵)내로 도입시킨다.

[0290] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 상기 Cas 단백질이 상기 가이드 RNA와의 복합체 중에서 상기 세포내로 도입되도록 리보뉴클레오타이드(RNP)-기반 전달을 사용한다. 예를 들어, Cas9 단백질을 Cas9:gRNA 복합체 중의 가이드 RNA와 복합체화시킬 수 있으며, 이는 상기 gRNA와 Cas 단백질의 동시-전달을 허용한다. 예를 들어, 상기 Cas:gRNA 복합체를 세포내에 뉴클레오펙션시킬 수 있다.

[0291] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 모든-RNA 전달 플랫폼을 사용한다. 예를 들어, 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 상기 세포내에 동시에 또는 실질적으로 동시에 (예를 들어, 동시-형질감염 또는 동시-뉴클레오펙션에 의해) 도입시킨다. 몇몇 실시태양에서, Cas mRNA 및 변형된 gRNA의 동시-전달은 Cas mRNA 및 변형되지 않은 gRNA의 동시-전달에 비해 더 높은 편집 효율을 생성시킨다. 특히, 5' 및 3' 단부 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 통합된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE(MSP)를 갖는 gRNA는 변형되지 않은 gRNA에 비해 보다 높은 편집 빈도를 제공한다.

[0292] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 세포에 연속적으로 도입시킨다; 즉, 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA를 상기 세포에 상이한 시점에서 도입시킨다. 각 작용제 도입 사이의 기간은 수분(이하) 내지 수시간 또는 수일의 범위일 수 있다. 예를 들어, 일부 상기와 같은 실시태양에서, gRNA를 먼저 전달한 다음, Cas mRNA를 4, 8, 12 또는 24시간 후에 전달한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, Cas mRNA를 먼저 전달한 다음, gRNA를 4, 8, 12 또는 24시간 후에 전달한다. 일부 특정한 실시태양에서, 변형된 gRNA를 먼저 전달한 다음 Cas mRNA를 전달하는 것은, 변형되지 않은 gRNA를 전달한 다음 Cas mRNA를 전달하는 것에 비해 더 높은 편집 효율을 생성시킨다.

[0293] 몇몇 실시태양에서, 상기 gRNA를 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 플라스미드와 함께 상기 세포내에 도입시킨다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 gRNA 및 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 플라스미드를 뉴클레오

펙션에 의해 상기 세포내에 도입시킨다. 일부 특정한 실시태양에서, RNP-기반 전달 플랫폼 또는 모든-RNA 전달 플랫폼은 DNA 플라스미드-기반 전달 시스템보다 1차 세포에서 더 낮은 세포독성을 제공한다.

[0294] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 인간 1차 T 세포 및 CD34+HSPC를 포함한 인간 세포에서 현저하게 증대된 게놈 편집 효율을 제공한다.

[0295] 몇몇 실시태양에서, 변형된 gRNA는 변형되지 않은 gRNA에 비해, 삽입 또는 결실(인델)의 빈도를 증가시킨다(이는 변이도입 NHEJ 및 유전자 파괴를 가리킬 수 있다). 특히, 5' 및 3' 단부 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 통합된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE(MSP)를 갖는 변형된 gRNA는 변형되지 않은 gRNA에 비해 인델의 빈도를 증가시킨다.

[0296] 몇몇 실시태양에서, 변형된 gRNA 및 Cas mRNA의 인간 1차 T 세포로의 동시-전달은 변형되지 않은 gRNA 및 Cas mRNA의 동시-전달에 비해 상기 인델의 빈도를 증가시킨다. 특히, 5' 및 3' 단부 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 통합된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE(MSP)를 갖는 변형된 gRNA는 변형되지 않은 gRNA에 비해 인간 1차 T 세포에서 인델의 빈도를 증가시킨다.

[0297] 몇몇 실시태양에서, 변형된 gRNA는 변형되지 않은 gRNA에 비해 gRNA 안정성을 개선시킨다. 일례로서, 5' 및 3' 단부 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 통합된 2'-O-메틸(M)을 갖는 gRNA는 변형되지 않은 gRNA보다 뉴클레아제에 대한 안정성을 적절히 개선시키며 염기 짝짓기 열안정성을 또한 개선시킨다. 또 다른 예로서, 5' 및 3' 단부 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 통합된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE(MSP)를 갖는 gRNA는 변형되지 않은 gRNA에 비해 뉴클레아제에 대한 안정성을 대단히 개선시킨다. gRNA 단부 변형이 엑소뉴클레아제에 대한 세포내 안정성을 증대시키며, 따라서 Cas mRNA 및 gRNA를 인간 세포내로 동시-전달하거나 연속 전달할 때 게놈 편집의 증가된 효능이 가능할 수 있음이 고려된다.

[0298] 몇몇 실시태양에서, 변형된 gRNA는 유전자 표적화를 자극하며, 이는 차례로 예를 들어 상동성 재조합 또는 NHEJ에 의한 유전자 편집을 허용한다. 특히, 5' 및 3' 단부 모두에서 3개의 말단 뉴클레오타이드에 통합된 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트(MS), 또는 2'-O-메틸-3'-티오PACE(MSP)를 갖는 gRNA는 변형되지 않은 gRNA보다 더 높은 수준의 상동성 재조합을 자극한다.

[0299] 몇몇 실시태양에서, 변형된 gRNA는 높은 특이성을 유지한다. 몇몇 실시태양에서, 표적-상 대 표적-외 인델 빈도의 비는 변형되지 않은 gRNA에 비해 변형된 gRNA에 대해 개선된다. 몇몇 실시태양에서, Cas 단백질과의 RNP 복합체 중에서 전달된 변형된 gRNA는 DNA 플라스미드-기반 전달 시스템에 비해 현저하게 더 양호한 표적-상:표적-외 비를 제공한다.

[0300] 유전자 발현 조절

[0301] 몇몇 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 가이드 RNA를 관심 유전자의 전사 또는 발현의 조절에 사용한다. 예를 들어, 몇몇 실시태양에서, Cas 단백질(예를 들어, 뉴클레아제-결핍 Cas9) 및 전사 활성화 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 사용하여 유전자의 전사를 증가시킨다. 유사하게, 몇몇 실시태양에서, Cas 단백질(예를 들어, 뉴클레아제-결핍 Cas9) 및 억제인자 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 사용하여 상기 유전자의 전사를 간섭함으로써 유전자 발현을 낮추는시킨다.

[0302] 적어도 하나의 태양에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내에서 관심 유전자의 발현을 조절하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포 또는 또 다른 시스템내에 (i) 본 명세서에 기재된 합성 가이드 RNA 및 (ii) 융합 단백질을 도입시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질은 Cas 단백질 및 효과기 도메인, 예를 들어 전사 활성화 도메인, 전사 억제인자 도메인, 또는 후성적 변형 도메인을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질은 돌연변이된 Cas 단백질, 예를 들어 삭제 뉴클레아제인 Cas9 단백질을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 Cas 단백질은 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 D10A, H840A 및/또는 N863A를 함유한다.

[0303] 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질을 정제되거나 정제되지 않은 단백질로서 상기 세포 또는 시스템에 도입시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질을 상기 융합 단백질을 암호화하는 mRNA를 통해 상기 세포 또는 시스템에 도입시킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기 융합 단백질을 상기 융합 단백질을 암호화하는 선형 또는 환상 DNA를 통해 상기 세포 또는 시스템에 도입시킨다.

[0304] 몇몇 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 상기 융합 단백질이, 염색체 서열, 에피솜 서열, 플라스미드, 미토콘드리아 DNA 서열, 또는 기능성 유전자간 서열, 예를 들어 인센서 또는 비-암호화 RNA에 대한 DNA 서열을 포함하는 특정한 표적 폴리뉴클레오타이드로 향하는 것을 돕는다. 몇몇 실시태양에서, 상기 효과기 도메인은 상기 표적



폴리뉴클레오타이드 중 서열의 발현을 조절한다. 유전자 발현을 조절하기 위한 가이드 RNA를, 기능성 RNA를 암호화하는 임의의 목적하는 내인성 유전자 또는 서열을 표적화하도록 설계할 수 있다. 게놈 표적 서열을 상기 내인성 유전자의 전사 출발 부위의 부근에서, 또는 한편으로 상기 내인성 유전자의 번역 개시 부위의 부근에서 선택할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 서열은 전통적으로 유전자의 "프로모터 근위" 영역이라 지칭되는 DNA의 영역 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 서열은 전사 출발 부위의 상류 약 1,000개 염기쌍 내지 상기 전사 출발 부위의 하류 약 1,000개 염기쌍의 영역 중에 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 표적 서열은 상기 유전자의 전사 출발 부위로부터 멀리 있다(예를 들어, 또 다른 염색체상에).

[0305] 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 복합체 적용을 위한 것이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 방법은 가이드 RNA의 라이브러리를 세포 또는 시스템에 도입시킴을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100개, 적어도 1,000개, 적어도 10,000개, 적어도 100,000개 또는 적어도 1,000,000개의 독특한 가이드 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 10개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 10개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 100개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 1000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 1000개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 10,000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 10,000개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 100,000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 100,000개의 상이한 서열을 표적화한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 라이브러리는 적어도 1,000,000개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드내의 적어도 1,000,000개의 상이한 서열을 표적화한다.

[0306] 키트

[0307] 하나의 태양에서, 본 발명은 gRNA:Cas 단백질 복합체를 생성시키고/시키거나 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합, 틸 형성 또는 절단을 위한 그의 활성을 지지함을 포함한, 상술한 방법을 수행하기 위한 시약을 함유하는 키트를 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 방법들을 위한 상기 반응 성분들 중 하나 이상, 예를 들어 하나 이상의 가이드 RNA 및 Cas 단백질을, 사용을 위한 키트의 형태로 공급할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 키트는 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 암호화하는 핵산, 및 본 명세서에 기재된 하나 이상의 가이드 RNA 또는 가이드 RNA들의 세트 또는 라이브러리를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 키트는 하나 이상의 다른 반응 성분을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 적합한 양의 하나 이상의 반응 성분을 하나 이상의 용기에 제공하거나 기재상에서 유지시킨다.

[0308] 상기 키트의 추가적인 성분의 예는 비제한적으로 하나 이상의 상이한 폴리머라제, 하나 이상의 숙주 세포, 외래 핵산을 숙주 세포에 도입시키기 위한 하나 이상의 시약, 상기 가이드 RNA 및/또는 Cas mRNA 또는 단백질의 발현을 검출하기 위한 또는 표적 핵산의 상태를 확인하기 위한 하나 이상의 시약(예를 들어, 탐침 또는 PCR 프라이머), 및 완충제, 형질감염 시약 또는 반응용 배양 배지(1X 이상 농축된 형태로)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 키트는 하기의 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 생화학적 및 물리적 지지체; 종결, 변형 및/또는 절단 시약; 삼투물질; 및 반응, 형질감염 및/또는 검출용 기구.

[0309] 상기 사용되는 반응 성분들을 다양한 형태로 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 성분들(예를 들어, 효소, RNA, 탐침 및/또는 프라이머)을 수용액에 현탁시키거나 비드에 결합시키거나 동결 건조된 분말 또는 펠릿으로서 존재할 수 있다. 후자의 경우, 상기 성분들은 제조성 시 배열에 사용하기 위한 성분들의 완전한 혼합물을 형성한다. 본 발명의 키트를 임의의 적합한 온도에서 제공할 수 있다. 예를 들어, 액체 중에 단백질 성분 또는 그의 복합체를 함유하는 키트의 보관을 위해서, 상기를 가능하게는 글리세롤 또는 다른 적합한 부동제를 함유하는 동결-저장 용액 중에서, 0 °C 이하, 바람직하게는 약 -20 °C에서 제공하고 유지시킨다.

[0310] 키트 또는 시스템은 적어도 하나의 분석에 충분한 양으로, 본 명세서에 기재된 성분들의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 일부 용도에서, 하나 이상의 반응 성분을 개별적인, 전형적으로 일회용의 튜브 또는 등가의 용기 중에서 사전-측정된 단일 사용량으로 제공할 수 있다. 상기와 같은 배열의 경우, RNA-가이드 뉴클레아제 반응을, 표적 핵산, 또는 표적 핵산을 함유하는 샘플 또는 셀을 개별적인 튜브에 직접 가함으로써 수행할 수 있다. 상기 키트에 공급되는 성분의 양은 임의의 적합한 양일 수 있으며 상기 생성물이 향하는 시장에 따라 변할 수 있다. 상기 성분들을 공급하는 용기(들)는 상기 공급된 형태를 유지할 수 있는 임의의 통상적인 용기, 예를 들어 미세 원심분리기 튜브, 미세적정 플레이트, 앰플, 병, 또는 일체형 시험 장치, 예를 들어 유동성 장치, 카트리

지, 측면 유동, 또는 다른 유사한 장치일 수 있다.

- [0311] 상기 키트는 또한 상기 용기 또는 용기들의 조합을 유지하기 위한 패키징 물질을 포함할 수 있다. 상기와 같은 키트 및 시스템에 전형적인 패키징 물질은 상기 반응 성분들 또는 검출 탐침들을 임의의 다양한 형태(예를 들어, 바이알, 미세적정 플레이트 웰, 미세배열 등 중에서)로 유지하는 고체 기질(예를 들어, 유리, 플라스틱, 종이, 호일, 미세입자 등)을 포함한다. 상기 키트는 또한 상기 성분들의 용도를 유형의 형태로 기록한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0312] 실시예
- [0313] 실시예 1
- [0314] DNA 표적 서열을 표적화하고 절단하는 화학 합성된 가이드 RNA의 능력을 평가하기 위해서, 시험관내 절단 분석을 개발하였다. 간단히, 도 3에 도시된 바와 같이, 약 4 kb PAM-어드레스 가능한 DNA 표적을, 플라스미드-기재 인간 서열(여기에서 인간 클라트린 경쇄 CLTA 유전자로부터의 서열)의 예비 PCR 증폭에 의해 제조하였다. 20- $\mu$ L 반응 부피에서, 50 fmole의 선형화된 DNA 표적을 50 nM sgRNA, 39 nM 재조합 정제된 Cas9 단백질(스트랩토코커스 피오게네스; 에이질런트(Agilent)) 및 10 mM  $MgCl_2$ 의 존재하에 pH 7.6에서, 37 °C에서 30분 동안 배양하였다. 종료 시, 0.5  $\mu$ L의 RNase It(에이질런트)를 가하고, 37 °C에서 5분 및 이어서 70 °C에서 15분 동안 배양을 계속하였다. 후속으로 0.5  $\mu$ L의 프로테아제 K(Mol. Bio. 등급, NEB)를 가하고 37 °C에서 15분 동안 배양하였다. 분액을 DNA 7500 랩칩(LabChip)에 로딩하고 바이오어널라이저(Bioanalyzer) 2200에서 분석하였다. 후처리 단계로 Cas9를 결합으로부터 표적 DNA로 방출시켰으며, 이를 절단에 대해 분석하였다.
- [0315] 도 4에 나열된 바와 같은 일련의 가이드 RNA를 화학적으로 합성하였다. 간단히, 개별적인 RNA 가닥을 합성하고 HPLC 정제하였다. 모든 올리고뉴클레오타이드는, HPLC 분석에 의한 화학적 순도 및 질량 분광분석에 의한 완전 길이 가닥 순도를 토대로 품질 조절 승인되었다. 이들 각각의 가이드 RNA를 인간 CLTA 유전자를 표적화하도록 설계하였다.
- [0316] 상기 결과를 도 4에 나타낸다. 도 4의 표 1에 나타낸 바와 같이, 하나를 제외한 모든 화학 합성된 가이드 RNA는 CLTA-암호화된 DNA 표적 서열을 표적화하고 현저한 절단물로 절단하였다. 상기 하나의 예외는 "CLTA\_37\_테옥시" 가이드 RNA였으며, 이는 그의 5' 단부에 37개 테옥시리보뉴클레오타이드의 연속적인 서열을 가졌다.
- [0317] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 다양한 화학 변형들을 가이드 RNA의 서열 중의 특정한 위치에서 시험하였다. 놀랍게도, 상기 가이드 RNA의 가이드 서열(a.k.a. 상기 가이드 RNA 중의 스페이서 서열) 중의 시험 위치들은, 변형이 표적-결합 서열 중에 예시된 경우에조차, 상기 가이드 RNA 중의 단일 뉴클레오타이드내 다수의 변형들의 조합을 포함하여 상기 시험된 변형의 대부분을 허용하였다.
- [0318] 상기 결과는 특정 위치에 변형을 함유하는 가이드 RNA가, 상기 변형이 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 표적-특이적 절단을 방지하지 않았으므로, 활성 Cas 단백질 및 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의해 허용됨을 밝혀내었다. 도 4의 표 1에 나열된 모든 가이드 RNA 서열에서, 5' 단부의 처음 20개 뉴클레오타이드는 표적 DNA 중의 표적 서열에 상보성이다. 시험되고 특정 위치에서 허용되는 것으로 밝혀진 변형은 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드(=2'OMe), 2'-테옥시리보뉴클레오타이드, 라세미 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합(들)(=P(S)), 3'-포스포노아세테이트(=PACE), 3'-티오포스포노아세테이트(=티오페), Z 뉴클레오타이드, 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0319] 본 명세서에서 개시되고 시험된 화학 변형들은, 특히 시험된 위치(도 4의 표 1에 나열된 바와 같은)에서, 다양한 가이드 RNA 중의 동등한 위치들에서 허용될 것으로 생각된다. 몇몇 실시태양에서, 본 명세서에 개시되고 시험된 화학 변형들은 가이드 RNA 중의 임의의 위치에서 허용된다.
- [0320] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 몇몇 성질들을 개선시키고자 가이드 RNA에 통합시켰다. 상기와 같은 성질들은 상기 가이드 RNA의 개선된 뉴클레아제 내성, gRNA:Cas 단백질 복합체의 감소된 표적-외 효과(또한 개선된 특이성으로서 공지됨), 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 틸 형성 또는 결합시 gRNA:Cas 단백질 복합체의 개선된 효능, 개선된 형질감염 효율, 및/또는 개선된 세포 소기관 국소화, 예를 들어 핵 국소화를 포함한다.
- [0321] 변형된 RNA의 용도는 공지되어 있지만(예를 들어, 몇몇 용도에서 핵산분해적 분해를 차단하기 위한), RNA 서열 중 모든 위치에서 변형을 간단히 통합시킬 수 없고, 특히 상기 RNA 서열이 단백질 또는 효소와 복합체를 형성하여 몇몇 기능을 발휘하는 것이 필요한 경우, 기능을 예상할 수 없음은 널리 공지되어 있다. 따라서, 상기 가이드

드 RNA가 크리스퍼-Cas 시스템에서 충분히 또는 개선된 기능을 수행하면서 다양한 뉴클레오타이드 위치들에서 화학 변형들을 허용할 수 있는지의 여부를 예견할 수 없었다. 실제로, 상기 가이드 RNA는, 특히 시험된 다수의 위치들에서, 예시되고 시험된 정도로 특정한 변형을 허용할 수 있음은 예상되지 않았다.

[0322] 실시예 2

[0323] DNA 표적 서열을 표적화하고 절단하는 화학 합성된 가이드 RNA의 능력을 평가하기 위해서, 실시예 1에 기재된 바와 유사한 시험관내 절단 분석을 사용하였다. 표적 DNA 구조물은 상기 표적 DNA와 하나 이상의 뉴클레오타이드만큼 상이한 표적-외 DNA 구조물과 함께, 인간 DNA 표적(클라트린 경쇄(CLT1A1) 유전자, 인간 인터류킨 2 수용체 감마(IL2RG) 유전자, 인간 세포독성 T-림프구-관련된 단백질 4(CLT4) 유전자, 인간 프로토카데린 알파 4(PCDHA4) 유전자, 및 인간 분절발생 호메오박스 1(EN1) 유전자로부터의 서열)에 대한 것이었다.

[0324] 표 3은 가이드 RNA 구조물의 표적화 및 절단 능력을 평가하는데 사용되는 DNA 구조물과 함께, 상기 가이드 RNA 구조물들 및 그들의 서열을 제시한다. 표 3에 나열된 모든 가이드 RNA 서열에서, 5' 단부의 처음 20개 뉴클레오타이드는 표적 DNA 중의 표적 서열에 상보성이다. 온(ON) 표적 구조물은 20 nt 표적 서열을 포함한다. 오프(OFF) 표적 구조물은 1, 2 또는 3개 뉴클레오타이드 차이와 함께, 상기 표적 DNA와 동일한 20개 뉴클레오타이드의 대부분을 포함한다. 상응하게, 상기 가이드 RNA는 대개, 전부는 아니지만, 상기 오프 표적 구조물의 서열에 상보성이다. 상기 오프 표적 구조물은 인간 게놈 중에 존재하는 것으로 공지된 유전자 서열을 기본으로 한다.



엔트리 #	가이드 RNA 구조물	표적 DNA 구조물	RNA 서열(5' → 3')	RNA 길이
2-조각 이중-가이드 스케폴드				
변형되지 않은 이중-가이드 RNA (dgRNA)				
1	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAACACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCGACCGAGUGGUGCUUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
2	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAACACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCGACCGAGUGGUGCUUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
3	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAACACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCGACCGAGUGGUGCUUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
4	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC + (서열번호 25) GGAACCAUUCAAAACACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCGACCGAGUGGUGCUUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
5	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAACACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCGACCGAGUGGUGCUUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
6	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAACACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCGACCGAGUGGUGCUUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
7	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 표적	AGUCCUCAUCUCCUCCAAGCGUUUAAAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCC CAAAC (서열번호 25) +	56 + 86

[ 3 ]

[0325]

[0326]

			GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
8	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 표적	AGUCCUCAUUCUCCUCCAGCGUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGGUCC CAAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
9	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 표적	AGUCCUCAUUCUCCUCCAGCGUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGGUCC CAAAAC (서열번호 25) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
10	IL2RG crRNA + tracrRNA	IL2RGmg ON- 표적	UGGUAUAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGGUCC CCAAAC (서열번호 27) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 28)	56 + 86
행광단-결합된 dgRNA				
11	CLTA1 crRNA + tracrRNA, 아미노알릴- U57+Cy5	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUUCUCCUCCAGCGUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGGUCC CAAAAC (서열번호 29) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGlaminoallylU+Cy5)AAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 30)	56 + 86
2'오메틸-변형된 dgRNA				
12	IL2RG crRNA_5',3'- 3x(2'OMe) + tracrRNA_5',3'- 3x(2'OMe)	IL2RGmg ON- 표적	UGGUAUAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGGUCC CCAAAC (서열번호 31) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 32)	56 + 86
2'오메틸, 3'포스포로티오에이트-변형된 dgRNA				
13	IL2RG crRNA_5',3'- 3x(2'OMe,3'P(s)) + tracrRNA_5',3'- 3x(2'OMe,3'P(s))	IL2RGmg ON- 표적	UGGUAUAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGG UCCCAAsAsAc (서열번호 33) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CAACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 34)	56 + 86
2'오메틸, 3'포스포로티오PACE-변형된 dgRNA				
14	IL2RG crRNA_5',3'- 3x(2'OMe, 3'티오PACE) + tracrRNA_5',3'-	IL2RGmg ON- 표적	UGGUAUAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAAGACUAUGCUUUUUGAAUGG GUCCCAAsAc (서열번호 35) + GGAACCAUUCAAAAAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CAACUUGUAAAAAGUGGACCGAGUGCGUUGUUUUU (서열번호 36)	56 + 86

	3x(2'OMe, 3'티오파스)		UAUCAACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUU <sup>5'</sup> U <sup>3'</sup> U <sup>5'</sup> U <sup>3'</sup> U <sup>5'</sup> U <sup>3'</sup> (서열 번호 36)	
15	IL2RG_cRNA_5',3'- 1x(2'OMe, 3'티오파스) + tracrRNA, 5',3'- 1x(2'OMe, 3'티오파스)	IL2RGmg ON- 표적	U <sup>5'</sup> sgGUAAGUGGCUCAACAGUUUUAGAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAA <sup>5'</sup> sc (서열번호 37) + G <sup>5'</sup> sgAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUU CAACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU <sup>5'</sup> U <sup>3'</sup> U <sup>5'</sup> U <sup>3'</sup> U <sup>5'</sup> U <sup>3'</sup> (서열번호 38)	56 + 86
2-티오파스-변형된 dgRNA)				
16	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86
17	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86
18	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86
19	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86
20	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86
21	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86
22	CLTA1_2티오파스+3 cRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 표적	AG(2sU)CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAAAGCUAGUCGUUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUUUAAUAAAGCUAGUCGGUUUUUCA ACUUGUAAAGUGGACCGAGUCGGUCUUUUUU (서열번호 29)	56 + 86

23	CLTA1_2E1오U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 표적	AG(2sU)CCUCCUCCUCCGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 39) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
24	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
25	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
26	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
27	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
28	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
29	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
30	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
31	CLTA1_2E1오U+9 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 표적	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCCAAAC (서열번호 40) + GGAACCAUUCAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCGACCGAGUGCGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86

32	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	<b>CLTA1 ON1-</b> 표적	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
33	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	<b>CLTA1 ON1-</b> 표적	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
34	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	<b>CLTA1 OFF1-</b> 표적	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
35	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	<b>CLTA1 OFF1-</b> 표적	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
36	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	<b>CLTA1 OFF2-</b> 표적	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
37	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	"	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
38	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	<b>CLTA1 OFF3-</b> 표적	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
39	<b>CLTA1_2</b> 에오U+11 crRNA + tracrRNA	"	AGUCCUCAUC(2sU)CCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUUUUUGAAUGGU CCCAAAAC (서열번호 41) + GGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGUAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 26)	56 + 86
단일-가이드 스케폴드				
변형되지 않은 단일-가이드 RNA (sgRNA)				



40	CLTA1 sgrNA (배치 #1)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
41	CLTA1 sgrNA (배치 #1)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
42	CLTA1 sgrNA (배치 #2)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
43	CLTA1 sgrNA (배치 #2)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
44	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
45	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
46	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
47	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
48	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
49	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
50	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
51	CLTA1 sgrNA (배치 #3)	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113

52	CLTA1 sgRNA (△)	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUAGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 42)	113
53	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUAUAGCAAGUUAUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGCGUUUU (서열번호 43)	100
54	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUAUAGCAAGUUAUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGCGUUUU (서열번호 43)	100
55	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUAUAGCAAGUUAUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGCGUUUU (서열번호 43)	100
56	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUAUAGCAAGUUAUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGCGUUUU (서열번호 43)	100
57	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUAUAGCAAGUUAUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGCGUUUU (서열번호 43)	100
58	CLTA4 sgRNA	CLTA4 ON-표적	GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUAGGAAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGCUUUUUU (서열번호 44)	113
59	CLTA4 sgRNA	CLTA4 ON-표적	GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUAGGAAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGCUUUUUU (서열번호 44)	113
60	CLTA4 sgRNA	CLTA4 ON-표적	GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUAGGAAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGCUUUUUU (서열번호 44)	113
61	CLTA4 sgRNA	CLTA4mg ON- 표적	GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUAGGAAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGCUUUUUU (서열번호 44)	113
62	CLTA4 sgRNA	CLTA4mg ON- 표적	GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUAGGAAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGCUUUUUU (서열번호 44)	113
63	CLTA4 sgRNA	CLTA4mg OFF3- 표적	GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUAGGAAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGCUUUUUU (서열번호 44)	113

64	CLTA1_절두면_180H	CLTA1mg ON1- 표적	UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUUUU (서열번호 45)	111
65	CLTA1_절두면_180H	CLTA1mg ON1- 표적	UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUUUU (서열번호 45)	111
66	CLTA1_절두면_180H	CLTA1mg OFF1- 표적	UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUUUU (서열번호 45)	111
67	CLTA1_절두면_180H	CLTA1mg OFF3- 표적	UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUUUU (서열번호 45)	111
68	CLTA1_절두면_170H	CLTA1mg ON1- 표적	CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUUUU (서열번호 46)	110
69	CLTA1_절두면_170H	CLTA1mg ON1- 표적	CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUUUU (서열번호 46)	110
70	CLTA1_절두면_170H	CLTA1mg OFF1- 표적	CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUUUU (서열번호 46)	110
71	CLTA1_절두면_180H	CLTA1mg OFF3- 표적	CCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGCAAAG UUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUUUU (서열번호 46)	110
72	CLTA1_1kExtraG	CLTA1mg ON1- 표적	GAGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUU (서열번호 47)	114
73	CLTA1_1kExtraG	CLTA1mg ON1- 표적	GAGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUU (서열번호 47)	114
74	CLTA1_1kExtraG	CLTA1mg OFF1- 표적	GAGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUU (서열번호 47)	114
75	CLTA1_1kExtraG	CLTA1mg OFF3- 표적	GAGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUAAGAGCUAUGCGUGGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUU (서열번호 47)	114

76	CLTA1_2kextrag	CLTA1mg ON1- 표적	GGAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUU (서열번호 48)	115
77	CLTA1_2kextrag	CLTA1mg ON1- 표적	GGAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUU (서열번호 48)	115
78	CLTA1_2kextrag	CLTA1mg OFF1- 표적	GGAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUU (서열번호 48)	115
79	CLTA1_2kextrag	CLTA1mg OFF3- 표적	GGAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUU (서열번호 48)	115
80	CLTA1_63U,64U	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAUUCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 49)	113
81	CLTA1_63A,64A	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAUUCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 50)	113
82	CLTA1_63A,64A,70U,71U	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGACUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAUUCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 51)	113
83	CLTA1_시스-차단(1-5)_폴리U_sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	GGACUUUUUUUAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU (서열번호 52)	111
84	CLTA1_시스-차단(1-5)_폴리U_sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	GGACUUUUUUUAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU (서열번호 52)	111
85	CLTA1_시스-차단(1-5)_폴리U_sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	GGACUUUUUUUAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU (서열번호 52)	111
86	CLTA1_시스-차단(1-5)_폴리U_sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	GGACUUUUUUUAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU (서열번호 52)	111
87	CLTA1_시스-차단(1-10)_폴리U_sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	GAUAGGAGCUUUUUUAGUCCUCAUCCUCCCAAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG AAUAGCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU (서열번호 53)	116

88	CLTA1_시스-차단(1-10) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	GAUGAGGACUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUCUUU (서열번호 53)	116
89	CLTA1_시스-차단(1-10) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	GAUGAGGACUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUCUUU (서열번호 53)	116
90	CLTA1_시스-차단(1-10) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	GAUGAGGACUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUCUUU (서열번호 53)	116
91	CLTA1_시스-차단(16-20) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	GCUUUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUCUUU (서열번호 54)	111
92	CLTA1_시스-차단(16-20) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	GCUUUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUCUUU (서열번호 54)	111
93	CLTA1_시스-차단(16-20) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	GCUUUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUCUUU (서열번호 54)	111
94	CLTA1_시스-차단(16-20) _폴리U_sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	GCUUUUUUUUUAGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUCUUU (서열번호 54)	111
DMT-변형되지 않은 sgRNA				
95	CLTA1_DMT-ON sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	(dm1)AGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUUGCUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUCUUUUU (서열번호 55)	113
96	CLTA1_DMT-ON/OFF sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUUGCUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 56)	113
형광단-변형된 sgRNA				
97	CLTA1_IntfI_sg고리	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUUGCUG(F1)AACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUCUUUUU (서열번호 57)	113
98	CLTA1_IntfI_sg고리	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUACUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUUGCUG(F1)AACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUCUUUUU (서열번호 57)	113



99	CLTA1_IntFl_sg고리	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 57)	113
100	CLTA1_IntFl_sg고리	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 57)	113
101	CLTA1_IntFl_sg고리	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 57)	113
102	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe)	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 58)	113
103	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe)	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 58)	113
104	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe)	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 58)	113
105	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe)	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 58)	113
106	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC GCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGA GUCGGUGCUUUUUUU (서열번호 59)	113
107	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC GCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGA GUCGGUGCUUUUUUU (서열번호 59)	113
108	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC GCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGA GUCGGUGCUUUUUUU (서열번호 59)	113
109	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC GCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGA GUCGGUGCUUUUUUU (서열번호 59)	113
110	CLTA1_IntFl_sg고리_5'3' -3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCCAUCCUCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGG(F)AACAGCAUAGC GCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGCCACCGA GUCGGUGCUUUUUUU (서열번호 60)	113



122	CLTA1_2'OMe+20 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 67)	113
123	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 68)	113
124	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 68)	113
125	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 68)	113
126	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 68)	113
127	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 68)	113
128	CLTA1_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 69)	113
129	CLTA1_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 69)	113
130	CLTA1_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 69)	113
131	CLTA1_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 69)	113
132	CLTA1_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 69)	113
133	CLTA1_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 70)	113

134	CLTA1_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 70)	113
135	CLTA1_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 70)	113
136	CLTA1_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 70)	113
137	CLTA1_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 70)	113
138	CLTA1_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 71)	113
139	CLTA1_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 71)	113
140	CLTA1_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 71)	113
141	CLTA1_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 71)	113
142	CLTA1_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 71)	113
143	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (서열번호 72)	113
144	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe) sgRNA	CLTA4mg ON- 표적	GCAGAUGUAGUGUUUCCACACUUAUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAAGUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC CGUGCUUUUUU (서열번호 73)	113
145	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe) sgRNA	CLTA4mg OFF5- 표적	GCAGAUGUAGUGUUUCCACACUUAUUAAGACUUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAAGUUAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC CGUGCUUUUUU (서열번호 73)	113

146	CLTA1_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 74)	113
147	CLTA1_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 74)	113
148	CLTA1_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 74)	113
149	CLTA1_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 74)	113
150	CLTA1_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 74)	113
151	CLTA1_5'-26x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGC AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC CGUGCUUUUUUU (서열번호 75)	113
152	CLTA1_5'-37x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGC AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC CGUGCUUUUUUU (서열번호 76)	113
153	CLTA1_41x(2'OMeC/U) QBS	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 77)	113
154	CLTA1_47x(2'OMeC/U) QBS	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 78)	113
155	CLTA1_47x(2'OMeC/U) QBS	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 79)	113
156	CLTA1_47x(2'OMeC/U) QBS	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 79)	113
157	CLTA1_47x(2'OMeC/U) QBS	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCACUCCGCCCAAGCGUUUAAGAGCUAUAGCUGGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 79)	113



158	CLTA1_47x(2'OMeG/U)_ QB3	CLTA1mg OFF-3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAUUGUGGUAAACAAGCAUAGCA AGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUC GGUGCUUBUBUBU (서열번호 79)	113
159	CLTA1_47x(2'OMeG/A)_ QB3	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAUUGUGGUAAACAAGCAUAGCA AGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUC GGUGCUUBUBUBU (서열번호 80)	113
160	CLTA1_47x(2'OMeG/A)_ QB3	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAUUGUGGUAAACAAGCAUAGCA AGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGA)AAAAAGUGGCAACCGAGUC GGUGCUUBUBUBU (서열번호 80)	113
161	CLTA1_47x(2'OMeG/A)_ QB3	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAUUGUGGUAAACAAGCAUAGCA AGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUC GGUGCUUBUBUBU (서열번호 80)	113
162	CLTA1_47x(2'OMeG/A)_ QB3	CLTA1mg OFF-1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAUUGUGGUAAACAAGCAUAGCA AGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUC GGUGCUUBUBUBU (서열번호 80)	113
163	CLTA1_47x(2'OMeG/A)_ QB3	CLTA1mg OFF-3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAUUGUGGUAAACAAGCAUAGCA AGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUC GGUGCUUBUBUBU (서열번호 80)	113
164	CLTA1_43x(2'OMeG/A)_ Bos	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAAUUAAGCAAAGUUBAAAUAA AGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUBU (서열번호 81)	100
165	CLTA1_43x(2'OMeG/A)_ Bos	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAAUUAAGCAAAGUUBAAAUAA AGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUBU (서열번호 81)	100
166	CLTA1_43x(2'OMeG/A)_ Bos	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAAUUAAGCAAAGUUBAAAUAA AGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUBU (서열번호 81)	100
167	CLTA1_43x(2'OMeG/A)_ Bos	CLTA1mg OFF-1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAAUUAAGCAAAGUUBAAAUAA AGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUBU (서열번호 81)	100
168	CLTA1_43x(2'OMeG/A)_ Bos	CLTA1mg OFF-3- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUBUAAAGAGCUAAUUAAGCAAAGUUBAAAUAA AGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUBU (서열번호 81)	100
169	CLTA4 sgRNA_5'-3'- 3x(2'OMe)	CLTA4 ON-표적	GCAAGAGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGAGCUAUUGCGGAAAAAGCAAGCAUAGC AAGUUBAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUCUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUC CGUGCUUBUBUBU (서열번호 82)	113



			UGCUUUUUUU (서열번호 87)	
182	CLTA1_5'-37x(2'대옥시) 표적	CLTA1 ON1- 표적	AGTCTCATCTCCCTCAAGCGGTTTAAGAGCTATGCTGGUAACAGCAUAGCAAG UUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUUUU (서열번호 88)	113
2'대옥시, 3'PACe-변형된 sgRNA				
183	CLTA4_2'대옥시3'PACe+1 5 표적	CLTA4mg ON- 표적	GCAAGUAGUAGUUGU*CCACAGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UGCGUGCUUUUUUU (서열번호 89)	113
184	CLTA4_2'대옥시3'PACe+1 5 표적	CLTA4mg OFF5- 표적	GCAAGUAGUAGUUGU*CCACAGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UGCGUGCUUUUUUU (서열번호 89)	113
2'대옥시, 3'PACe-변형된 sgRNA				
185	5'- 1x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1mg ON1- 표적	A*GUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAGC AAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 90)	113
186	5'- 1x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1mg ON1- 표적	A*GUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAGC AAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 90)	113
187	5'- 2x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1 ON1- 표적	A*G*UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UGCGUGCUUUUUUU (서열번호 91)	113
188	5'- 2x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1 ON1- 표적	A*G*UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UGCGUGCUUUUUUU (서열번호 91)	113
189	5'- 2x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1mg ON1- 표적	A*G*UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UGCGUGCUUUUUUU (서열번호 91)	113
190	5'- 2x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1mg ON1- 표적	A*G*UCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UGCGUGCUUUUUUU (서열번호 91)	113
191	5'- 3x(2'OMe,3'PACe)_CLTA1 sgRNA 표적	CLTA1mg ON1- 표적	G*G*G*G*G*GUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCGUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG GAGUGCGUGCUUUUUUU (서열번호 92)	115

192	5'- 3x(2'OMe,3'PACE)_CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	G*G*A*GUCUCCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACC GAUGCGGUGCUUUUUU (서열번호 92)	115
193	5'- 4x(2'OMe,3'PACE)_CLTA1 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	A*G*U*G*CUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACC AGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 93)	113
194	5'- 4x(2'OMe,3'PACE)_CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	A*G*U*G*CUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACC AGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 93)	113
195	5'- 4x(2'OMe,3'PACE)_CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	A*G*U*G*CUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACC AGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 93)	113
196	5'- 5x(2'OMe,3'PACE)_CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	G*G*A*G*U*CCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAG CAUAGCAAGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 94)	115
197	5'- 5x(2'OMe,3'PACE)_CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	G*G*A*G*U*CCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAG CAUAGCAAGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 94)	115
198	CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACCAGUC GGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 95)	113
199	CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACCAGUC GGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 95)	113
200	CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACCAGUC GGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 95)	113
201	CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACCAGUC GGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 95)	113
202	CLTA1_3'- 5x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACCAGUC GGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 96)	113
203	CLTA1_3'-	CLTA1 ON1-	AGUCCUCAUCCUCCUCAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAGCAUAGCA	113





	오버행_CLTA1		ACCGAGUCGGGUCUUUUUUU (서열번호 99)	
215	5'- 5x(2'OMe,3'PAC)_plus2 NC_오버행_CLTA1	CLTA1 ON1- 표적	A*G,A*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACA GCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGC ACCGAGUCGGGUCUUUUUUU (서열번호 100)	115
216	5'- 5x(2'OMe,3'PAC)_plus2 NC_오버행_CLTA1	CLTA1mg ON1- 표적	A*G,A*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACA GCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGC ACCGAGUCGGGUCUUUUUUU (서열번호 100)	115
217	5'- 5x(2'OMe,3'PAC)_plus2 NC_오버행_CLTA1	CLTA1mg ON1- 표적	A*G,A*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACA GCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGC ACCGAGUCGGGUCUUUUUUU (서열번호 100)	115
218	5'- 7x(2'OMe,3'PAC)_plus3 오버행_CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PAC)	CLTA1 ON1- 표적	G*U,G*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUU*U*U*U (서열번호 101)	116
219	5'- 7x(2'OMe,3'PAC)_plus3 오버행_CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PAC)	CLTA1mg ON1- 표적	G*U,G*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 101)	116
220	5'- 7x(2'OMe,3'PAC)_plus3 오버행_CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PAC)	CLTA1mg ON1- 표적	G*U,G*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 101)	116
221	5'- 7x(2'OMe,3'PAC)_plus3 NC_오버행_CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PAC)	CLTA1 ON1- 표적	G*Δ,G*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 101)	116
222	5'- 7x(2'OMe,3'PAC)_plus3 NC_오버행_CLTA1_3'- 4x(2'OMe,3'PAC)	CLTA1mg ON1- 표적	G*Δ,G*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 101)	116
223	5'- 7x(2'OMe,3'PAC)_plus3 NC_오버행_CLTA1_3'-	CLTA1mg ON1- 표적	G*Δ,G*G*U*CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUU*U*U*U*U (서열번호 101)	116

	4x(2'OMe,3'PACe)			
224	CLTA1_2'OMe,3'PACe+20 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 102)	113
225	CLTA1_2'OMe,3'PACe+20 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 102)	113
226	CLTA1_2'OMe,3'PACe+20 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 102)	113
227	CLTA1_2'OMePACe+19 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 103)	113
228	CLTA1_2'OMePACe+19 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 103)	113
229	CLTA1_2'OMePACe+19 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 103)	113
230	CLTA1_2'OMePACe+19 sgRNA	CLTA1mg OFF1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 103)	113
231	CLTA1_2'OMePACe+19 sgRNA	CLTA1mg OFF3- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 103)	113
232	CLTA1_2'OMePACe+18 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 104)	113
233	CLTA1_2'OMePACe+18 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 104)	113
234	CLTA1_2'OMePACe+18 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGUGGCUUUUUU (서열번호 104)	113
235	CLTA1_2'OMePACe+17 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC*GUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU	113

				CGGUGCUUUUUUU (서열번호 105)	
236	CLTA1_2'OMePACE+17 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적		AGUCCUCAUCCUCCUCA*AGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC AAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 105)	113
237	CLTA1_2'OMePACE+17 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적		AGUCCUCAUCCUCCUCA*AGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC AAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 105)	113
238	CLTA1_2'OMePACE+17,1 8 sgRNA	CLTA1 ON1- 표적		AGUCCUCAUCCUCCUCA*AGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 106)	113
239	CLTA1_2'OMePACE+17,1 8 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적		AGUCCUCAUCCUCCUCA*AGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 106)	113
240	CLTA1_2'OMePACE+17,1 8 sgRNA	CLTA1mg ON1- 표적		AGUCCUCAUCCUCCUCA*AGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 106)	113
2'OMeTA1,3'포스포로티오에이트-변형된 sgRNA					
241	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1 ON1- 표적		ASGUSUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 107)	113
242	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg ON1- 표적		ASGUSUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 107)	113
243	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg ON1- 표적		ASGUSUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 107)	113
244	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg OFF1- 표적		ASGUSUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 107)	113
245	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1mg OFF3- 표적		ASGUSUCCUCAUCCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGC CAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG UCGGUGCUUUUUUU (서열번호 107)	113
246	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4 표적		GSASGAGUAGUUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUUGGAACAGCAUA GCAAGUUUAUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAG GUCGUGCUUUUUUU (서열번호 107)	113

247	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 107)	113
248	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 107)	113
249	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 107)	113
250	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 107)	113
251	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg OFF- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 107)	113
252	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S)),3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 108)	113
253	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S)),3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 108)	113
254	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S)),3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA GCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 108)	113
255	CLTA4_5',3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA AGCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 109)	113
256	CLTA4_5',3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA AGCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 109)	113
257	CLTA4_5',3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg OFF- 표적	GsGAsGAUGUAGUGUUBUCCACAGUUBUAAAGACUAGCUGGAAACAGCAUA AGCAAGUUBUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUBUACAACUUGAAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUBU <sub>3'</sub> U <sub>5'</sub> (서열번호 109)	113

2'OMe, 3'포스포로티오에이트-변형된 sgRNA

258	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1 ON1- 표적	A*sg*slu*scuccauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGUCUUU*slu*slu*slu (서열번호 110)	113
259	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sg*slu*scuccauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGUCUUU*slu*slu*slu (서열번호 110)	113
260	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sg*slu*scuccauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGUCUUU*slu*slu*slu (서열번호 110)	113
261	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg OFF1- 표적	A*sg*slu*scuccauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGUCUUU*slu*slu*slu (서열번호 110)	113
262	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg OFF3- 표적	A*sg*slu*scuccauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGUCUUU*slu*slu*slu (서열번호 110)	113
263	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUU*slu (서열번호 111)	113
264	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUU*slu (서열번호 111)	113
265	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg OFF1- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUU*slu (서열번호 111)	113
266	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg OFF3- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUU*slu (서열번호 111)	113
267	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1 ON1- 표적	A*sg*slu*scuccauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG	75
268	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG	74
269	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG	75
270	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'티오파스)	CLTA1mg ON1- 표적	A*sguccuauucuccucaaagcguuuaagagcuauGCCUGUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG	77



271	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA1mg ON-1- 표적	G* <sup>5</sup> aGUCUCCAUCCUCCCAAGCCGUAAGAGCUAUGCGGUAACAGCAUA GCAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> c (서열번호 114)	78
272	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4 ON-표적	G* <sup>5</sup> c <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> GAUGUAUGUUAUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCGGAAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACC GAGUGCGUGCUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> Δ (서열번호 115)	113
273	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4 ON-표적	G* <sup>5</sup> c <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> GAUGUAUGUUAUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCGGAAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACC GAGUGCGUGCUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> Δ (서열번호 115)	113
274	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4 ON-표적	G* <sup>5</sup> c <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> GAUGUAUGUUAUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCGGAAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACC GAGUGCGUGCUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> Δ (서열번호 115)	113
275	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4mg OFF- 표적	G* <sup>5</sup> c <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> GAUGUAUGUUAUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCGGAAACAGCA UAGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACC GAGUGCGUGCUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ* <sup>5</sup> Δ (서열번호 115)	113
276	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4mg ON- 표적	G* <sup>5</sup> cAGAUAGUUAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG UCGUGCGUUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ (서열번호 116)	113
277	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4mg ON- 표적	G* <sup>5</sup> cAGAUAGUUAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG UCGUGCGUUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ (서열번호 116)	113
278	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4mg ON- 표적	G* <sup>5</sup> cAGAUAGUUAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG UCGUGCGUUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ (서열번호 116)	113
279	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'터오페)	CLTA4mg OFF- 표적	G* <sup>5</sup> cAGAUAGUUAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG CAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG UCGUGCGUUUU <sup>Δ</sup> * <sup>5</sup> Δ (서열번호 116)	113
2-아미노A-변형된 sgRNA(변형되지 않은 대조군 포함)				
280	EN1	EN1mg ON- 표적	GAUGUUGUCCGAUGAAAAAGUUAAGAGCUAUGCGGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAGAGU CGUGCGUUUU (서열번호 117)	113
281	EN1	EN1mg OFF- 표적	GAUGUUGUCCGAUGAAAAAGUUAAGAGCUAUGCGGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAGAGU CGUGCGUUUU (서열번호 117)	113
282	EN1_2아미노A+16	EN1mg ON- 표적	GAUGUUGUCCGAUGAA(2a)AAGUUAAGAGCUAUGCGGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAAGUCCGUAUUAUCAUUGAAAAAGUGGCACCAG	113

			AGUCCGGUCUUUUUUUU (서열번호 118)	
283	EN1_20+1노A+16	EN1mg OFF- 표적	GAUGUUGUCGAUGAA(2aA)AAGUUGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUCAAACUUGAAAAAGUGGACCCG AGUCGGUCUUUUUU (서열번호 118)	113
284	PCDH44	PCDH44mg ON- 표적	GAUUUAGACGGAAGAUUGAAAGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUCAAACUUGAAAAAGUGGACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 119)	113
285	PCDH44	PCDH44mg OFF- 표적	GAUUUAGACGGAAGAUUGAAAGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUCAAACUUGAAAAAGUGGACCGAGU CGGUGCUUUUUUU (서열번호 119)	113
286	PCDH44_20+1노A+15	PCDH44mg ON- 표적	GAUUUAGACGGAAGG(2aA)UUGAAAGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUCAAACUUGAAAAAGUGGACCCG AGUCGGUCUUUUUU (서열번호 120)	113
287	PCDH44_20+1노A+15	PCDH44mg OFF- 표적	GAUUUAGACGGAAGG(2aA)UUGAAAGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAU AGCAAGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUCAAACUUGAAAAAGUGGACCCG AGUCGGUCUUUUUU (서열번호 120)	113
5-메틸U-변형된 sgRNA				
288	CLTA4_21x(5-MeU)	CLTA4mg ON- 표적	GCAGA(5mU)G(5mU)A(5mU)G(5mU)(5mU)(5mU)CCACAGUUUAAGAGC(5mU)A(5mU)G(5mU)G(5mU)AACACGCA(5mU)AGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUAUCAAAC(5mU)GAAAAAG(5mU)GGCACCGAGUGG(5mU)G(5mU)(5mU)(5mU)(5mU)(5mU)U (서열번호 121)	113
289	CLTA4_21x(5-MeU)	CLTA4mg OFF- 표적	GCAGA(5mU)G(5mU)A(5mU)G(5mU)(5mU)(5mU)CCACAGUUUAAGAGC(5mU)A(5mU)G(5mU)G(5mU)AACACGCA(5mU)AGCAAGUUUAAAUAAAGCUAGUCCGUAUCAAAC(5mU)GAAAAAG(5mU)GGCACCGAGUGG(5mU)G(5mU)(5mU)(5mU)(5mU)(5mU)U (서열번호 121)	113
Z 염기-변형된 sgRNA				
290	CLTA1_ZZ_70,71	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUZZGUAUUAUCAACUUGAAAAAGUGGACCGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 122)	113
291	CLTA1_ZZ_95,96	CLTA1 ON1- 표적	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGGUGUAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAZGAGUC GGUGCUUUUUUU (서열번호 122)	113
잘못 점함에 불리하도록 변형된 sgRNA				
292	CLTA1_opti_short_5',3'-	CLTA1mg ON1-	A*GUCUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGUAUAGCAAGUUUAAA	100

	1x(2'OMe, 3'티오파스)_2'OMe_54,5 7	표적	UAAGGUUAUCCGUUAUCAACAAGAAAUUGUGCCAGUCGGUCU <sub>U</sub> *su (서열번호 123)	
293	CLTA1_opti_short_5',3'- 1x(2'OMe, 3'티오파스)_2'OMe_64,5 7	CLTA1mg ON1- 표적	A*GUGCCUCAUCCUCCUCCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACAACAUAAG CAAGUUUAUAUAAGGUUAUCCGUUAUCAACAAGAAAUUGUGCCAGUCGGUCU <sub>U</sub> *su (서열번호 124)	113
	N = 2'OMe			
	N = 2'티오파스			
	N5 = 3'P(S)			
	N* = 3'-PASE			
	N*s = 3-티오파스			
	N* = 2'OMe,3'-PASE			
	N*s = 2'OMe,3-티오파스			
	Ns = 2'OMe,3'P(S)			
	N <sub>0</sub> = 5'-오버행(5에서 20-nt 가이드 서열까지); "NC"는 상기 오버행이 포로토스페에서 인접 서열에 상보성이 아님을 의미한다			
	{2su} = 2-티오파스			
	{2aa} = 2-아미노A			
	{5mu} = 5-메틸U			
	Z = Z 염기			
	IntE = RNA 서열 중의 내부 위치에 통합된 형광단			

CLTA1 ON1- 표적:	AGAATTTAACTGTGGTCACATTTGCTTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATC TTACGCAAGTTCGATGAGTATGCCAGTCACTTTCAATTTGGTTGAATGTTCCCGTG ACATGCGAGTTCTGTGCGACCATGTGCCGCGGATTGAATTCCTCAAGGGTGGTGATA GATGCTACGGTGGTGATGCGCATGCGCTCAGTCCTCATCTCCCTCAAGCAGGCCCC GCTGGTGGGTGCGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGTGGTCGTGTCAAGCAAC TGTCACGCTCCACCCTCGAGGTCGTAACATAAACGTAAGGCACGAGTAAACA AGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTCGCCATTAGTCTGA (서열번호 10)
CLTA1 OFF1- 표적:	AGAATTTAACTGTGGTCACATTTGCTTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATC TTACGCAAGTTCGATGAGTATGCCAGTCACTTTCAATTTGGTTGAATGTTCCCGTG ACATGCGAGTTCTGTGCGACCATGTGCCGCGGATTGAATTCCTCAAGGGTGGTGATA GATGCTACGGTGGTGATGCGTATGCACTCAGTCCTCAACTCCCTCAAGCAGGCGAC CCCTGGGGGTGCGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGTGGTCGTGTCAAGCAAC TGTCACGCTCCACCCTCGAGGTCGTAACATAAACGTAAGGCACGAGTAAACA AGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTCGCCATTAGTCTGA (서열번호 11)
CLTA1 OFF2- 표적:	AGAATTTAACTGTGGTCACATTTGCTTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATC TTACGCAAGTTCGATGAGTATGCCAGTCACTTTCAATTTGGTTGAATGTTCCCGTG ACATGCGAGTTCTGTGCGACCATGTGCCGCGGATTGAATTCCTCAAGGGTGGTGATA GATGCTACGGTGGTGATGCAATAAATTTAGCCCTCATTTCCCTCAAGCAGGGGTT ACTTTAGGGTGGGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGTGGTCGTGTCAAGCAAC TGTCACGCTCCACCCTCGAGGTCGTAACATAAACGTAAGGCACGAGTAAACA AGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTCGCCATTAGTCTGA (서열번호 12)
CLTA1 OFF3- 표적:	AGAATTTAACTGTGGTCACATTTGCTTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATC TTACGCAAGTTCGATGAGTATGCCAGTCACTTTCAATTTGGTTGAATGTTCCCGTG ACATGCGAGTTCTGTGCGACCATGTGCCGCGGATTGAATTCCTCAAGGGTGGTGATA GATGCTACGGTGGTGATGCTCTCCAGCCCACTCCTCATCCCCCTCAAGCGGTCCC AGGCTGGGGTGGGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGTGGTCGTGTCAAGCAAC TGTCACGCTCCACCCTCGAGGTCGTAACATAAACGTAAGGCACGAGTAAACA AGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTCGCCATTAGTCTGA (서열번호 13)
CLTA1mg ON1- 표적:	GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG GCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG TTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAC CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGG GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAA AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACG CTGCGCGTAACACCACACCCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA TTCGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACG CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATA CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTCGCAGGCCAAAGATG TCTCCCGCATGCGCTCAGTCCTCATCTCCCTCAAGCAGGCCCTGCTGGTGCACTGA

[0354]

	AGAGCCACCCTGTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTC CAGTCGGGAAACCTGTCTGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAG AGGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT CGGTCGTTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA TCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA CTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCC GACCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAG CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTTAA CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCA CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGACGA AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGA TCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACT TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT ATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGG AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCG GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGG TCTTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGCGGAAGCTAGAG TAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATC AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTTACTCATGGTTATGGGA GCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열 번호 14)
CLTA1mg OFF1- 표적:	GCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG GCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG TTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAC CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAA AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACG CTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA TTCGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATA CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTCGCAGGGCAAGAGG TCTCCTGTATGCACTCAGTCCTCAACTCCCTCAAGCAGGCGACCTTGGTGCACTG

[0355]



	<p>ACAAACCGCTCCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTC CAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG AGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCT CGGTGCTTGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA CTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCC GACCTTGGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGGC TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAG CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGACGA AAACTCACGTTAAGGGATTGTTGGTCAAGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGA TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACT TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT ATTTCTGTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGG AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGG TCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAG TAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATC AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCA GCACGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG TGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT GCCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 15)</p>
CLTA1mg_OFF3 표적:	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG TTAATATTTTGTAAAAATTGCGGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTTAAC CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGCGGATGGCCCACTACGTGAACCATCA CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAA AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACG CTGCGCGTAACACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA TTCGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATA CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTCAGGAGAGGGAGCCA TGCTCATCTCCAGCCCACTCTCATCCCCCTCAAGCCGCTCCAGGCTGAGAGGCT</p>

[0356]

	AAAGCTTGTCTTTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA TCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTC CAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAG AGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT CGGTCGTTGCGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA TCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA CTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCC GACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGGC TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAG CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTCTGACGCTCAGTGGAAACGA AAACTCAGTTAAGGGATTGTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGA TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT ATTTCTGTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCG GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAACTGG TCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAG TAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGCTTCCCAACGATC AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTC CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTTCACTCATGGTTATGGCA GCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT GCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 16)
CLTA4 ON- 표적:	GCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACG ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAACATGGGGATCATGTAAC TCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTG ACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAA CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGT TGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAT CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGT AAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAAGTGT CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTT AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG TGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT GAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTA CCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAC TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACGTCTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAG

[0357]

	<p>GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT TACCACTGGCTGCTTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACAC AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATC TTTATAGTCCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC TCGTGAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTT CCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATT CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGA ACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAA ACCGCCTCTCCCCGCGCTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTC CCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCAT TAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGT GAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCG CAATTAACCCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGACACC AGTTGCATTTCGATTCTGTGTTGTAATTGTCCAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCGGC AGATGTAGTGTTCACAGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTG GAGCTCCAATTGCCCCATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTT TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGACGCA CATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCCACCGATCGCCCTTC CCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTGTT AAAATTGCGGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAA TCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTT CCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCG AAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTT TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGGA TTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGC GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCA CCACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGG GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGA GTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTGTC CTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTG AGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC (서열번호 17)</p>
CLTA4mg ON- 표적:	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT TTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG TTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAC CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGG GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAA AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGG AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACG CTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA TTCGCCATTACAGGTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG</p>

[0358]

	<p>CCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGGTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTCAAGAGCTTCACTGA  GTAGGATTAAGATATTGCAGATGTAGTGTTCACAGGGTGGCTCTTCAGTGCACC  AGCGGAACCTGCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG  AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCC  GACCTGCGCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGC  TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTGTAGGTGTTCCGCTCCAAG  CTGGGTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG  TGGTGGCCTAACTACGCGTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  GAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGA  AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAAGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGA  TCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTCTGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCGAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGG  TCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATC  AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 18)</p>
CLTA4mg OFF5- 표적:	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG  GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCAT  TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG  TTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAAC  CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG  GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA  ACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA  CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTGCAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAA  AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  AAGGGAAGAAAGCGAAAGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACAG  CTGCGCGTAACACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA  TTCGCCATTACGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC  TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG</p>

[0359]



	<p>CCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGGTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTCTCTGAATAGAGTTG  GGAAGAGATGCATACAACATATGTAGTATTTCCACAGGGAATACAATGGACAAATG  ACCTCAAGAGCAGGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGG  GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCTGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAG  AGGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTA AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTCTCC  GACCTTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGC  TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGTAGGTGTTTCCGCTCAAG  CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG  TGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  GAAGCCAGTTACCTTCCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA  AAACTCACGTTAAGGGATTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGA  TCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTTCGTTTCCATAGTTGCTGACTCCCGTCTGTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGG  TCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTCCGGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGTTTCCCAACGATC  AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTGCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 19)</p>
IL2RGmg_ON 표적:	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG  GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT  TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG  TTAATATTTTGTAAAATTGCGGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAC  CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGG  GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA  ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA  CCCTAATCAAGTTTTTTGGGTGCGAGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAA  AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGGTAGCGGTACG  CTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA  TTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC  TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG</p>

[0360]



	<p>CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGGTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTCGGGCAGCTGCAGGA  ATAAGAGGGATGTGAATGGTAATGATGGCTTCAACATGGCGCTTGCTCTTCATTCC  CTGGGTGTAGTCTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  GTGCCAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCTGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG  AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTCCGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCC  GACCTGCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCG  TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTGCGGTGTAGGTGTTGCTCCAAG  CTGGGTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA  CTATCCTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG  TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA  AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA  TCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGG  TCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTATTGAGCTCCGTTCCCAACGATC  AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 20)</p>
EN1mg_ON 표적:	<p>GCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG  CGGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCAT  TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG  TTAATATTTGTTAAAATTGCGGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAC  CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGG  GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA  ACGTCAAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA  CCCTAATCAAGTTTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTTAA  AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACCG  CTGCGCGTAACCACCACACCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCA  TTCCGCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC  TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG</p>

[0361]

	<p>CCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTCCTCCTTACTGCAGC  CGAAGTCCGGCCTCAGGATGTTGTGCGATGAAAAAGTTGGTGGTGCGGTGCAGCTGG  GCCGCTGGCTGCGGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  GTGCCATAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG  AGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCC  GACCTGCGCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGC  TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGTAGGTGTTCCGCTCCAAG  CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG  TGGTGGCCTAACTACGCGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA  AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA  TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTCTGTTTATCCATAGTTGCGCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGG  TCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGCGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGTTCCCAACGATC  AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 21)</p>
<p>EN1mg_OFF  표적:</p>	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG  GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCAT  TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG  TTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAAC  CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG  GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCA  ACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA  CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAA  AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACG  CTGCGCGTAACACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCA  TTCCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTCGC  TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG</p>

[0362]

	<p>CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGGTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTCGTCCTTTTCGCCGGC  CGAACTCGGGCCGAGGATGTTGTCGATGAAGAAGTTGGTGATGCGGTGCGGGTGC  TGGTGGTTGCCGGGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCTGCGAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG  AGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTC  GACCTCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAG  CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG  TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGTCT  GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTCTGACGCTCAGTGAACGA  AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA  TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTCTGTCATCCATAGTTGCGTCACTCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGG  TCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCACAAGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATC  AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC (서열번호 22)</p>
PCDHA4mg_ ON 표적:	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG  GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCAT  TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG  TTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAC  CAATAGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG  GTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA  ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA  CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAA  AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACCG  CTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCA  TTCCGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC  TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG</p>

[0363]

	<p>CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCCTCGGAACATTGGTAAT  TAACTTAACGCCTCAGATTTAGACGAAGGATTGAATGGGACATTGTTTATTCAT  TCTCGAATGATACGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  GTGCCAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAG  AGGCGGTTTGGGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCC  GACCTGCGCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGC  TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTGCGTGTAGGTGCTTCCGCTCAAG  CTGGGTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG  TGGTGGCCTAATACGCTTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  GAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACCAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGA  AACTCAGCTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGA  TCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTGCTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGTCTGTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTG  TCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGTTCCCAACGATC  AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGC (서열번호 23)</p>
PCDHA4mg_ OFF 표적:	<p>GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG  GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCAT  TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCG  TTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAAC  CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG  GTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA  ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCA  CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAA  AGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAAGCGGTACG  CTGCGCGTAACACACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCA  TTCGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC  TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACG</p>

[0364]



	<p>CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATA  CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACGATCGATGCGGCCTCGGAACGCTGGTGAT  TCATCCCAATGCCTCAGATTTAGACGAAGGCTTGAATGGGGATATTATTTACTCCT  TCTCCAGTGATGTGCGCGTGATATGCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGG  TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA  TCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTC  CAGTCGGGAAACCTGTCTGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAG  AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  CGGTGCTTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA  TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAA  GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  CTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCC  GACCTGCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGC  TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAG  CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGAGCCA  CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAG  TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  GAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA  CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA  GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGA  AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGA  TCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT  TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT  ATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGG  AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG  GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGG  TCCTGCACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG  TAAGTAGTTTCGCGAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC  GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC  AAGCGAGTTACATGATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC  CTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCA  GCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC (서열번호 24)</p>
--	--

[0365]

[0366]

20-μL 반응 부피에서, 50 fmole의 선형화된 DNA 표적을 50 nM sgRNA, 39 nM 재조합 정제된 Cas9 단백질(스트렙토코커스 피오게네스; 에이질런트) 및 10 mM 또는 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>의 존재하에 pH 7.6에서, 37 °C에서 30분 동안 배양하였다. 종료 시, 0.5 μL의 RNase It(에이질런트)를 가하고, 37 °C에서 5분 및 이어서 70 °C에서 15분 동안 배양을 계속하였다. 후속으로 0.5 μL의 프로테이나제 K(Mol. Bio. 등급, NEB)를 가하고 37 °C에서 15분 동안 배양하였다. 분액을 DNA 1000 또는 DNA 7500 랩칩에 로딩하고 바이오어널라이저 2200에서 분석하거나, 한편으로 제노믹 DNA 스크린테이프(Genomic DNA ScreenTape)에 로딩하고 테이프스테이션(TapeStation)상에서 분석하였다. 후처리 단계로 Cas9를 표적 DNA의 결합으로부터 방출시켰으며, 이를 절단에 대해 분석하였다. 절단 수율을 식  $a/(a+b) \times 100$ (여기에서 a는 2개의 절단 생성물의 밴드 강도의 합이고 b는 나머지 절단되지 않은 DNA(존재하는 경우)이다)에 의해 계산하였다. 100%의 절단율은 표적 DNA 구조물이 전부 절단되었음을 의미한다.

[0367]

일련의 가이드 RNA를 화학적으로 합성하였다. 상기 가이드 RNA 올리고머를 문헌[DeUnger et al. (2011) J. Am. Chem. Soc., 133, 11540-56]에 기재된 과정에 따라 2'-O-티오노카바메이트-보호된 뉴클레오사이드 포스포아미다이트를 사용하여 ABI 394 합성기(라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)상에서 합성하였다. 2'-O-메틸 포스포아미다이트를 상기 2'-O-티오노카바메이트 보호된 포스포아미다이트와 동일한 조건하에서 RNA 올리고머내에 통합시켰다. 티오포스포아세테이트(티오파CE)-변형된 RNA의 합성에 사용된 2'-O-메틸-3'-O-(다이아미소프로필아미노)포스포노아세트산-1,1-다이메틸시아노에틸 에스터-5'-O-다이메톡시트리틸 뉴클레오사이드를 필수적으로 공개된 방법에 따라 합성하였다. 문헌[DeUnger et al. (2003) J. Am. Chem. Soc., 125, 940-50]; 및 문헌[Threlfall et al. (2012) Org. Biomol. Chem., 10, 746-54]을 참조하시오. 포스포티오에이트-함유 올리고머의 경우, 상기 결합 반응 후 요오드 산화 단계를, 피리딘-아세트나이트릴 (3:2) 혼합물 중의 3-((N,N-다이메틸아미노메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-다이티아졸-5-티온의 0.05M 용액을 6분 동안 사용하는 황화 단계로 교체하였다.

[0368]

상기 모든 올리고뉴클레오타이드를 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 정제하고 에이질런트 6520 Q-TOF(비행시간) 질량 분광계(에이질런트 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재)에 결합된





















에이질런트 1290 인피니티 시리즈 LC 시스템을 사용하여 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)에 의해 분석하였다. 상기 sgRNA의 합성 및 정제 수율을 LC-MS-유래된 전체 이온 크로마토그램으로부터 획득된 질량 스펙트럼의 디콘볼루션을 사용하여 평가하였다. 상기 100-머 sgRNA의 화학 합성은 전형적으로 공칭 1 마이크로몰 규모 합성으로부터 25 내지 35% 완전길이 생성물을 제공하였다. 이온 짝짓기 완충제 조건을 사용하는 역상 HPLC 정제는 상기 조 생성물로부터 전형적으로 90% 내지 95% 범위의 최종 sgRNA의 추정 순도와 함께 20% 수율을 제공하였다.

[0369] 상기 결과를 표 4에 나타낸다. "절단된 표적%"는 절단된 표적 DNA 구조물의 비율을 가리킨다. 실험을 몰 과잉의 무표적 경쟁자 DNA(tcDNA)(표적 DNA와 잠재적으로 경쟁하며, 따라서 분석시 상기 첨가된 비특이적인 DNA의 잠재적인 영향을 볼 수 있었다)의 첨가와 함께 또는 상기 첨가 없이 실행하였다.

[0370] [표 4]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
<b>2-조각 이중-가이드 스캐폴드</b>						
<b>변형되지 않은 이중-가이드 RNA (dgRNA)</b>						
1	0.8	N	99%	—		

[0371]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
2	0.8	Y	99%	5%		
3	0.8	N	96%	—		
4	0.8	Y	100%	5%		
5	0.8	N	96%	—		
6	0.8	Y	0%	5%		
7	0.8	N	99%	—		
8	0.8	Y	100%	5%		
9	10	N	94%, 93%	—		
10	0.8	Y	88%	—		
형광단-결합된 dgRNA						
11	10	N	92%, 93%	—	94%, 93%	—
2'오메틸-변형된 dgRNA						
12	0.8	Y	87%	—	88%	—
2'오메틸,3'포스포로티오에이트-변형된 dgRNA						
13	0.8	Y	87%	—	88%	—
2'오메틸,3'포스포로티오PACE-변형된 dgRNA						
14	0.8	Y	89%	—	88%	—
15	0.8	Y	86%	—	88%	—
2-티오U-변형된 dgRNA						
16	0.8	N	96%	—	99%	—
17	0.8	Y	95%	5%	99%	5%
18	0.8	N	95%	—	96%	—
19	0.8	Y	100%	5%	100%	5%
20	0.8	N	97%	—	96%	—
21	0.8	Y	0%	5%	0%	5%
22	0.8	N	98%	—	99%	—
23	0.8	Y	99%	5%	100%	5%
24	0.8	N	94%	—	99%	—
25	0.8	Y	83%	5%	99%	5%
26	0.8	N	93%	—	96%	—
27	0.8	Y	94%	5%	100%	5%
28	0.8	N	90%	—	96%	—
29	0.8	Y	0%	5%	0%	5%
30	0.8	N	95%	—	99%	—
31	0.8	Y	94%	5%	100%	5%
32	0.8	N	92%	—	99%	—
33	0.8	Y	84%	5%	99%	5%
34	0.8	N	90%	—	96%	—
35	0.8	Y	94%	5%	100%	5%
36	0.8	N	70%	—	96%	—

[0372]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
37	0.8	Y	0%	5%	0%	5%
38	0.8	N	96%	—	99%	—
39	0.8	Y	59%	5%	100%	5%
단일-가이드 스케폴드						
변형되지 않은 단일-가이드 RNA (dgRNA)						
40	10	N	93%	—		
41	10	N	94%	—		
42	10	N	94%	—		
43	10	N	92%	—		
44	10	N	90%, 92%	—		
45	10	N	92%	—		
46	10	N	93%	—		
47	0.8	N	86%	—		
48	0.8	N	87%	—		
49	0.8	Y	87%	—		
50	0.8	N	82%	—		
51	0.8	N	92%	—		
52	10	N	60%	—		
53	0.8	N	90%	—		
54	0.8	N	90%	—		
55	0.8	Y	79%	—		
56	0.8	N	79%	—		
57	0.8	N	94%	—		
58	10	N	73%	—		
59	0.8	N	84%	—		
60	0.8	Y	≥ 85%	—		
61	0.8	Y	89%	—		
62	0.8	N	87%, 82%	—		
63	0.8	N	23%, 22%	—		
64	0.8	N	78%	—		
65	0.8	Y	76%	—		
66	0.8	N	65%	—		
67	0.8	N	81%	—		
68	0.8	N	85%	—		
69	0.8	Y	71%	—		
70	0.8	N	32%	—		
71	0.8	N	84%	—		
72	0.8	N	91%	—		
73	0.8	Y	79%	—	87%	—

[0373]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
74	0.8	N	88%	—	87%	—
75	0.8	N	93%	—	87%	—
76	0.8	N	87%	—	87%	—
77	0.8	Y	79%	—	87%	—
78	0.8	N	89%	—	87%	—
79	0.8	N	88%	—	87%	—
80	0.8	N	3%	—	86%	—
81	0.8	N	5%	—	86%	—
82	0.8	N	89%	—	86%	—
83	0.8	N	68%	—	87%	—
84	0.8	Y	50%	—	87%	—
85	0.8	N	69%	—	87%	—
86	0.8	N	69%	—	87%	—
87	0.8	N	76%	—	87%	—
88	0.8	Y	42%	—	87%	—
89	0.8	N	72%	—	87%	—
90	0.8	N	78%	—	87%	—
91	0.8	N	85%	—	87%	—
92	0.8	Y	51%	—	87%	—
93	0.8	N	82%	—	87%	—
94	0.8	"	83%	—	87%	—
DMT-변형된 sgRNA						
95	10	N	93%	—	92%	—
96	10	N	93%	—	92%	—
형광단-변형된 sgRNA						
97	10	N	91%, 91%	—	90%, 92%	—
98	0.8	N	86%	—	87%	—
99	0.8	Y	77%	—	87%	—
100	0.8	N	87%	—	87%	—
101	0.8	N	86%	—	87%	—
102	0.8	N	91%	—	87%	—
103	0.8	Y	82%	—	87%	—
104	0.8	N	90%	—	87%	—
105	0.8	N	92%	—	87%	—
106	0.8	N	91%	—	87%	—
107	0.8	Y	82%	—	87%	—
108	0.8	N	90%	—	87%	—
109	0.8	N	91%	—	87%	—
110	0.8	N	92%	—	87%	—
111	0.8	Y	84%	—	87%	—

[0374]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
112	0.8	N	92%	—	87%	—
113	0.8	N	89%	—	87%	—
114	0.8	N	84%, 84%	—	87%, 82%	—
115	0.8	N	12%, 6%	—	23%, 22%	—
116	0.8	N	93%, 90%	—	87%, 82%	—
117	0.8	N	8%, 9%	—	23%, 22%	—
3'포스포로티오에이트-변형된 sgRNA						
118	10	N	95%	—	90%, 92%	—
119	10	N	94%	—	90%, 92%	—
120	10	N	97%	—	90%, 92%	—
121	10	N	94%	—	90%, 92%	—
2'오메틸-변형된 sgRNA						
122	10	N	91%	—	94%	—
123	10	N	92%	—	93%	—
124	0.8	N	86%	—	87%	—
125	"	Y	77%	—	87%	—
126	"	N	85%	—	87%	—
127	0.8	N	88%	—	87%	—
128	10	N	92%	—	94%	—
129	0.8	N	83%	—	87%	—
130	0.8	Y	78%	—	87%	—
131	0.8	N	83%	—	87%	—
132	0.8	N	85%	—	87%	—
133	10	N	92%	—	94%	—
134	0.8	N	86%	—	87%	—
135	0.8	Y	78%	—	87%	—
136	0.8	N	83%	—	87%	—
137	0.8	N	88%	—	87%	—
138	10	N	91%	—	94%	—
139	0.8	N	84%	—	87%	—
140	0.8	Y	81%	—	87%	—
141	0.8	N	83%	—	87%	—
142	0.8	N	87%	—	87%	—
143	10	N	89%	—	92%	—
144	0.8	N	91%, 88%	—	87%, 82%	—
145	0.8	N	24%, 25%	—	23%, 22%	—
146	10	N	93%, 92%	—	90%, 92%	—
147	0.8	N	22%	—	87%	—
148	0.8	Y	3%	—	87%	—
149	0.8	N	12%	—	87%	—
150	0.8	N	5%	—	87%	—

[0375]



엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
151	10	N	0%, 0%	—	90%, 92%	—
152	10	N	0%, 0%	—	90%, 92%	—
153	0.8	N	85%	—	86%	—
154	0.8	N	87%	—	86%	—
155	0.8	N	89%	—	87%	—
156	0.8	Y	78%	—	87%	—
157	0.8	N	84%	—	87%	—
158	0.8	N	93%	—	87%	—
159	0.8	N	90%	—	86%	—
160	0.8	N	90%	—	87%	—
161	0.8	Y	86%	—	87%	—
162	0.8	N	90%	—	87%	—
163	0.8	N	91%	—	87%	—
164	0.8	N	92%	—	90%	—
165	0.8	N	89%	—	87%	—
166	0.8	Y	80%	—	87%	—
167	0.8	N	90%	—	87%	—
168	0.8	N	94%	—	87%	—
169	0.8	N	90%	—	84%	—
170	0.8	Y	≥ 85%	—	≥ 85%	—
171	0.8	N	7%	—	84%	—
172	0.8	Y	0%	—	≥ 85%	—
173	10	N	15%	—	73%	—
174	0.8	N	85%	—	84%	—
175	0.8	Y	75%	—	≥ 85%	—
176	10	N	86%	—	73%	—
177	0.8	"	0%	—	84%	—
178	0.8	Y	0%	—	≥ 85%	—
179	10	N	15%	—	73%	—
2'데옥시-변형된 sgRNA						
180	10	N	27%, 19%	—	90%, 92%	—
181	10	N	0%, 0%	—	90%, 92%	—
182	10	N	0%, 0%	—	90%, 92%	—
2'데옥시,3'PACE-변형된 sgRNA						
183	0.8	N	72%, 77%	—	87%, 82%	—
184	0.8	N	8%, 9%	—	23%, 22%	—
2'오메틸,3'PACE-변형된 sgRNA						
185	0.8	N	82%	—	87%	—
186	0.8	Y	72%	—	87%	—
187	10	Y	95%	—	93%	—

[0376]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
188	10	Y	95%	—	94%	—
189	0.8	Y	91%	—	87%	—
190	0.8	Y	84%	—	87%	—
191	0.8	Y	85%	—	87%	—
192	0.8	Y	77%	—	87%	—
193	10	Y	88%	—	94%	—
194	0.8	Y	70%	—	87%	—
195	0.8	Y	56%	—	87%	—
196	0.8	Y	40%	—	87%	—
197	0.8	Y	23%	—	87%	—
198	10	Y	88%	—	93%	—
199	10	Y	89%	—	94%	—
200	0.8	Y	84%	—	87%	—
201	0.8	Y	75%	—	87%	—
202	10	Y	90%	—	93%	—
203	10	Y	90%	—	94%	—
204	0.8	Y	86%	—	87%	—
205	0.8	Y	82%	—	87%	—
206	10	Y	88%	—	93%	—
207	0.8	Y	82%	—	87%	—
208	0.8	Y	78%	—	87%	—
209	10	Y	77%	—	93%	—
210	0.8	Y	71%	—	87%	—
211	"	Y	69%	—	"	—
212	10	N	80%	—	93%	—
213	0.8	N	56%	—	87%	—
214	0.8	Y	41%	—	"	—
215	10	Y	78%	—	93%	—
216	0.8	Y	58%	—	87%	—
217	0.8	Y	44%	—	"	—
218	10	Y	80%	—	93%	—
219	0.8	Y	39%	—	87%	—
220	0.8	Y	13%	—	"	—
221	10	Y	74%	—	93%	—
222	0.8	Y	36%	—	87%	—
223	0.8	Y	19%	—	87%	—
224	10	Y	86%	—	93%	—
225	0.8	Y	84%	—	87%	—
226	0.8	Y	80%	—	"	—
227	10	Y	88%	—	93%	—
228	0.8	Y	83%	—	87%	—

[0377]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
229	0.8	Y	82%	—	87%	—
230	0.8	N	80%	—	87%	—
231	0.8	N	84%	—	87%	—
232	10	N	88%	—	93%	—
233	0.8	N	85%	—	87%	—
234	0.8	Y	73%	—	87%	—
235	10	Y	82%	—	93%	—
236	0.8	Y	89%	—	87%	—
237	0.8	Y	76%	—	87%	—
238	10	Y	65%	—	93%	—
239	0.8	Y	84%	—	87%	—
240	0.8	Y	56%	—	87%	—
2'오메틸,3'포스포로티오에이트-변형된 sgRNA						
241	10	N	92%	—	92%	—
242	0.8	N	84%	—	87%	—
243	0.8	Y	88%	—	87%	—
244	0.8	N	85%	—	87%	—
245	0.8	N	91%	—	87%	—
246	0.8	N	91%	—	84%	—
247	0.8	Y	≥ 85%	—	≥ 85%	—
248	0.8	N	84%	—	84%	—
249	0.8	Y	90%	—	89%	—
250	0.8	N	90%, 87%	—	87%, 82%	—
251	0.8	N	16%, 19%	—	23%, 22%	—
252	0.8	N	93%	—	89%	—
253	0.8	N	90%, 90%	—	87%, 82%	—
254	0.8	N	17%, 22%	—	23%, 22%	—
255	0.8	N	93%	—	89%	—
256	0.8	N	91%, 91%	—	87%, 82%	—
257	0.8	N	13%, 16%	—	23%, 22%	—
2'오메틸,3'포스포로티오PACE-변형된 sgRNA						
258	10	N	89%	—	92%	—
259	0.8	N	84%	—	87%	—
260	0.8	Y	80%	—	87%	—
261	0.8	N	77%	—	87%	—
262	0.8	N	83%	—	87%	—
263	0.8	N	92%	—	87%	—
264	0.8	Y	79%	—	87%	—
265	0.8	N	88%	—	87%	—
266	0.8	N	94%	—	87%	—
267	10	N	74%	—	93%	—

[0378]

엔트리#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	% 절단된 표적	%CV	% 절단 대 대조군	%CV 대조군
268	0.8	N	11%	—	86%	—
269	0.8	N	15%	—	"	—
270	0.8	N	49%	—	"	—
271	0.8	N	31%	—	"	—
272	0.8	N	91%	—	84%	—
273	0.8	Y	77%	—	≥ 85%	—
274	0.8	N	90%, 91%	—	87%, 82%	—
275	0.8	N	9%, 8%	—	23%, 22%	—
276	0.8	N	90%	—	84%	—
277	0.8	Y	≥ 85%	—	≥ 85%	—
278	0.8	N	86%, 88%	—	87%, 82%	—
279	0.8	N	11%, 7%	—	23%, 22%	—
2-아미노A-변형된 sgRNA (변형되지 않은 대조군 포함)						
280	0.8	Y	88%, 88%	—		
281	0.8	Y	76%, 75%	—		
282	0.8	Y	87%, 91%	—	88%, 88%	—
283	0.8	Y	90%, 90%	—	76%, 75%	—
284	0.8	Y	85%, 87%	—		
285	0.8	Y	88%, 88%	—		
286	0.8	Y	93%, 96%	—	85%, 87%	—
287	0.8	Y	82%, 79%	—	88%, 88%	—
5-메틸U-변형된 sgRNA						
288	0.8	N	86%, 83%	—	87%, 82%	—
289	0.8	N	11%, 11%	—	23%, 22%	—
Z 염기-변형된 sgRNA						
290	10	N	19%	—	92%	—
291	10	N	93%	—	"	—
잘못 접합에 불리하도록 변형된 sgRNA						
292	0.8	N	93%	—	90%	—
293	0.8	N	93%	—	86%	—

[0379]

[0380]

상기 결과는 특정 위치에 변형을 함유하는 가이드 RNA가, 상기 변형이 표적-상 폴리뉴클레오타이드의 표적-특이적 절단을 방지하지 않으므로, 활성 Cas 단백질 및 gRNA:Cas 단백질 복합체에 의해 허용됨을 밝혀내었다. 상기 시험되고 특정 위치에서 허용되는 것으로 밝혀진 변형은 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드(=2'OMe), 2'-테옥시리보뉴클레오타이드, 라세미 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 3'-포스포노아세테이트(=PACE), 3'-티오포스포노아세테이트(=티오페이스), Z 뉴클레오타이드, 2-티오유라실, 2-아미노아데닌, 5-메틸유라실, Cy5 형광단에 결합된 5-아미노알릴유라실, 2-(4-부틸아미도플루오레세인)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0381]

본 명세서에 개시되고 시험된 화학 변형들은, 특히 시험된 위치에서(표 3 및 4에 나열된 바와 같은), 다양한 가이드 RNA 중의 동등한 위치에서 허용될 것으로 생각된다.

[0382]

본 명세서에 개시된 바와 같이, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 몇몇 성질들을 개선시키고자 가이드 RNA에 통합시켰다. 상기와 같은 성질들은 상기 가이드 RNA의 개선된 뉴클레아제 내성(또한 개선된 안정성으로서 공지됨), gRNA:Cas 단백질 복합체의 감소된 표적-외 효과(또한 개선된 특이성으로서 공지됨), 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단, 틀 형성 또는 결합시 gRNA:Cas 단백질 복합체의 개선된 효능, 개선된 형질감염 효율, 및/또는 개선된 세포 소기관 국소화를 포함한다.

[0383]

표 3 및 4의 분석 결과는 (1) 가이드 RNA에서, 다수의 위치가 다양한 화학 변형을 허용할 수 있고; (2) 가이드 RNA의 5' 및 3' 단부가 광범위하게 다양한 단부-보호 변형을 허용할 것이며, 상기와 같은 변형이 외부핵산분해성 RNA 분해를 억제하기 위해 유용하고; (3) 2-티오U를 사용하여 G-U 동요 짝짓기를 수반하는 표적-외 상호작용을 저지할 수 있고, 이에 의해 표적-외 하이브리드화 상호작용을 억제함으로써 가이드 짝짓기의 특이성을 증가시키고; (4) 5'-연장이 일반적으로 잘-허용되고; (5) 가이드 RNA의 표면 노출된 영역(공개된 결정 구조로부터 추측되는 바와 같은)이 U의 5-메틸U로의 광범위한 변형(이는 잠재적으로 상기 변형된 RNA를 변형되지 않은 RNA에 의해 자극되는 바와 같은 면역 반응을 보다 잘 회피할 수 있게 한다)을 허용하고; (6) RNA 접합의 경우, G-C 쌍이

A-U 쌍보다 더 강하고 더 안정성임을 가리킨다. 적어도 하나의 가이드 RNA는 일부 G-C 쌍의, 변형되지 않은 A-U 쌍보다 열역학적으로 더 안정한 2'-O-메틸A-2'-O-메틸U 쌍으로의 교체를 허용한다.

- [0384] 보다 특히, 본 실시예는 2'-O-메틸 변형이 이중-가이드 RNA(표 3 및 4에서 엔트리 12에 의해 나타내는 바와 같은) 및 단일-가이드 RNA(엔트리 143-146, 169-170)의 5' 및 3' 단부에서 허용되고, 따라서 gRNA를 엔도뉴클레아제에 대해 안정화시키는 단부-보호를 허용함을 나타낸다. 2'-O-메틸 변형은 대부분(전부는 아니지만)의 위치에서 허용되며, 따라서 엔도뉴클레아제(엔트리 146, 153-168, 174-179)를 포함한 다양한 뉴클레아제들에 대한 안정화를 허용한다. 그러나, 본 실시예는 또한 가이드 RNA 중의 모든 위치가 2'-O-메틸을 허용하는 것은 아님(엔트리 151-152 및 171-173에 의해 나타난 바와 같이)을 입증하며, 이는 상기 5' 단부에 너무 많은 연속적인 2'-O-메틸 변형(예를 들어, 26개 이상의 연속적인 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오타이드), 또는 5'-말단 20머 가이드 서열의 하류(3') C 및 U 뉴클레오타이드의 너무 많은 2'-O-메틸 변형은 허용되지 않음(예를 들어, 엔트리 154-156 중의 시험된 위치들에 의해 밝혀진 바와 같이 엔트리 171-173 중의 서열 위치 +56 및 +69번에서 하나 또는 2개의 2'-O-메틸유라실 모두의 억제 효과)을 암시한다.
- [0385] 본 실시예는 상기 20머 가이드 서열 전체를 통한 2'-O-메틸 변형이 10 mM  $Mg^{+2}$ 를 함유하는 완충제 중에서 시험관 내 사용 중 허용되지만(엔트리 146), 상기와 같은 광범위한 변형은 세포 중에 존재하는 바와 같은 생리 조건하에서 잘 허용되지 않음(엔트리 147-150)을 나타낸다. 따라서, 일부 실시태양에서, 상기 20머 가이드 서열 전체를 통해 15개 이상, 한편으로 17개 이상, 한편으로 18개 이상, 한편으로 20개의 2'-O-메틸 변형을 포함하는 gRNA를 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험관내 방법, 예를 들어 시험관내에서 DNA 서열을 변형시키기 위한 게놈 편집, 시험관내에서 관심 유전자의 발현 조절, 시험관내에서 DNA 표적 서열의 절단, 및 다른 용도에 사용한다.
- [0386] 본 실시예는 2'-데옥시 변형의 광범위 통합이 충분히 허용되지 않으며 실질적으로 완전히 억제될 수도 있음(엔트리 180-182)을 나타낸다. 그러나, 2'-데옥시 변형은 일부 위치에서 잘-허용될 수 있으며(엔트리 183), 따라서 상기와 같은 변형은 뉴클레아제 억제에 유용할 수 있다.
- [0387] 본 실시예는 또한 형광단 또는 염료 표지가 크리스퍼-Cas9 가이드 RNA 중의 3개의 공지된 줄기-고리의 모든 고리에서 허용됨을 나타낸다(엔트리 116). 상기와 같은 표지는 또한 상기 가이드 서열상의 5' 오버행에서 허용되고(엔트리 114), sgRNA 중의 추가적인 위치에서 허용되며(엔트리 114), 이중-가이드 용도에 사용되는 tracrRNA 중의 고리에서 허용된다(엔트리 11). 본 실시예에서, 2개의 상이한 유형의 형광단이 시험되었다: 뉴클레오타이드를 필수적으로 대신하는 포스포다이에스터-결합된 형광단(리보스 고리 없음)(엔트리 114 & 116), 및 가이드 RNA 중에 통합된 5-아미노알릴U에 공유 결합된 염료 표지(Cy5)(엔트리 11).
- [0388] 본 실시예는 또한 Z 염기가 합성 가이드 RNA에서, 특히 일부 C가 Z 염기로 교체된 합성 가이드 RNA의 변형으로서 허용됨을 나타낸다(엔트리 290-291). 본 실시예는 또한 다수의 다른 염기들이 표 3 및 4에 나타난 바와 같이, 다양한 위치들에서 허용됨을 나타낸다.
- [0389] 본 실시예는 또한 가이드 RNA의 5' 및 3' 단부가 광범위하게 다양한 단부-보호 변형을 허용할 수 있음을 나타낸다. 상기와 같은 변형을 사용하여 외부핵산분해성 RNA 분해를 억제할 수 있다. 상기와 같은 변형의 허용을 위한 지지체를 문헌[Hendel et al., Nat. Biotechnol.(2015)33:9, 985-9]에서 찾을 수 있다. 가이드 RNA의 5' 및 3' 단부에서 변형을 위한 추가적인 지지체는 표 3 및 4 중의 엔트리 143-144, 185-223, 241-257, 258-266 및 272-279에 의해 제공된다. 일부 실시태양에서, 상기 가이드 RNA는 5' 단부 또는 3' 단부 또는 각각의 5' 및 3' 단부에서 7개 이하의 변형된 뉴클레오타이드, 한편으로 6개 이하, 한편으로 5개 이하, 한편으로 4개 이하, 한편으로 3개 이하, 한편으로 2개 이하, 한편으로 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 이중-가이드 RNA가 유사하게 보호될 수 있다(엔트리 12-15).
- [0390] 본 실시예는 또한 2-티오U를 사용하여 G-U 동요 짝짓기를 수반하는 표적-외 상호작용을 저지할 수 있고, 이에 의해 표적-외 하이브리드화 상호작용을 억제함으로써 가이드 짝짓기의 특이성을 증가시킬 수 있음을 나타낸다(엔트리 16-39). 상기 가이드 RNA와 CLTA1 표적-외 3(또한 "CLTA1 오프3-표적" 또는 "CLTA1 오프3"라 칭한다)간의 하이브리드화에 관련된 염기쌍들 중 하나는 G-U 동요 쌍이다. 상기 가이드 RNA 중의 상응하는 U를 2-티오U로 교체하는 것은 절단을 100%(엔트리 8)에서 59%(엔트리 39)로 감소시킨다. 다른 U를 2-티오U로 교체하는 것(예를 들어, 서열 위치 +3 또는 +9에서, 엔트리 23 및 31)은 같은 효과를 갖지 못하는데, 그 이유는 상기 U가 상기 시험된 각각의 표적-외 부위에 완전히 하이브리드화될 때 G-U 동요 짝짓기를 수반하지 않기 때문이다. 상응하게, 2-티오U는 표적-외 부위가 G-U 동요 짝짓기를 수반할 때 가이드 RNA의 표적 특이성을 증가시킬 수 있



다.

- [0391] 본 실시예에는 또한 상기 가이드 서열에 부착된 5'-오버행 서열이 일반적으로 잘-허용됨을 나타낸다(엔트리 83-95, 114 및 206-223 참조). 예를 들어, 5' 단부의 별키한 다이메톡시트리틸(dmt)기는 잘 허용되었다(엔트리 95). dmt의 크로마토그래피 성질을 사용하여 합성 중 일반적으로 생성되는 불완전하게 연장되는 부산물로부터 완전길이 합성 RNA의 정제를 촉진할 수 있다. 따라서, 일부 실시태양에서, 상기 합성 가이드 RNA는, 예를 들어 상기 가이드 서열에 상보성이고 3' 단부에서 상기 가이드 서열의 5' 단부에 중합체 링커, 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 또는 유사한 포스포다이에스터-기재 링커(여기에서 상기 링커는 5개 이상, 한편으로 6 또는 7개의 연속적인 유리딘 뉴클레오타이드일 수 있다)에 의해 공유적으로 결합되는 15개 이하 뉴클레오타이드의 짧은 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5'-오버행 서열을 포함한다.
- [0392] 본 실시예에는 또한 상기 가이드 RNA의 표면 노출된 영역(달리 공개된 결정 구조로부터 추측되는 바와 같은)이 유라실 뉴클레오타이드의 5-메틸유라실(5-메틸U)(엔트리 288)로의 광범위한 변형(이는 상기 변형된 RNA가 변형되지 않은 RNA에 의해 자극되는 바와 같은 면역 응답을 보다 잘 회피할 수 있게 한다)을 허용함을 나타낸다. 특히, 합성 가이드 RNA의 5' 및 3' 단부는 잠재적으로 면역자극성이며, 본 실시예에는 5' 및 3' 단부가 5-메틸U 변형을 허용함을 나타낸다.
- [0393] 본 실시예에는 또한 합성 가이드 RNA가, 일부 G-C 쌍의, 변형되지 않은 A-U 쌍(엔트리 292-293에서 비-말단 -2'-0-메틸U 및 상보적인 -2'-0-메틸A 변형을 참조하십시오)보다 열역학적으로 더 안정한 2'-0-메틸A-2'-0-메틸U 쌍으로의 교체를 허용함을 나타낸다. 이는, 접힌 RNA의 경우 G-C 쌍이 A-U 쌍보다 더 강하고 더 안정하기 때문에 유리하다. 합성 가이드 RNA에서 G-C 쌍의 상기와 같은 열안정화된 A-U 쌍으로의 교체는, 통상적으로 사용되는 RNA 접힘 연산에 의해 예측될 수 있는 바와 같이, 의도하지 않는 G-C 쌍(들)을 수반하는 잘못 접힌 구조물을 방지함으로써 활성 구조물의 개선된 접힘을 허용한다.
- [0394] 예시적인 실시태양
- [0395] 본 명세서에 개시된 발명의 요지에 따라 제공된 예시적인 실시태양들은 비제한적으로 특허청구범위 및 하기의 실시태양들을 포함한다:
- [0396] A1. (i) 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0397] 상기 줄기 서열에 부분적으로 또는 전적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절
- [0398] 을 포함하는 합성 가이드 RNA로,
- [0399] 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고, gRNA 기능성을 갖는 상기 합성 가이드 RNA.
- [0400] A2. 실시태양 A1의 합성 가이드 RNA로, 2'-데옥시 부분을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0401] A3. 실시태양 A1 또는 A2의 합성 가이드 RNA로, 2'-플루오로, 2'-클로로, 2'-브로모 및 2'-요오도 중에서 선택된 2'-할로 부분을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0402] A4. 실시태양 A1 내지 A3 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 포스포로티오에이트기를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0403] A5. 실시태양 A1 내지 A4 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, PACE기를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0404] A6. 실시태양 A1 내지 A5 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 티오페이시드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0405] A7. 실시태양 A2 내지 A6 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-O-메틸 부분을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0406] A8. 실시태양 A1 내지 A7 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2-티오유라실을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0407] A9. 실시태양 A1 내지 A8 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 4-티오유라실을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0408] A10. 실시태양 A1 내지 A9 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2-아미노아데닌을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0409] A11. 실시태양 A1 내지 A10 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 하이포잔틴을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0410] A12. 실시태양 A1 내지 A11 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 5-메틸시토신을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0411] A13. 실시태양 A1 내지 A12 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 5-메틸유라실을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0412] A14. 실시태양 A1 내지 A13 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 5-아미노알릴-유라실을 포함하는 합성 가이드

RNA.

- [0413] A15. 실시태양 A1 내지 A14 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, Z 리보뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0414] A16. 실시태양 A1 내지 A15 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, Z 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0415] A17. 실시태양 A1 내지 A16 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 스쿠아레이트 접합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0416] A18. 실시태양 A1 내지 A17 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 염료 링커를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0417] A19. 실시태양 A18의 합성 가이드 RNA로, 염료 링커가 2-(4-부틸아미도플루오레세인)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커인 합성 가이드 RNA.
- [0418] A20. 실시태양 A1 내지 A19 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-O-메틸 및 3'-포스포로티오에이트를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0419] A21. 실시태양 A1 내지 A20 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-O-메틸 및 3'-PACE를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0420] A22. 실시태양 A1 내지 A21 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-O-메틸 및 3'-티오페이스를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0421] A23. 실시태양 A1 내지 A22 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-데옥시 및 3'-PACE를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0422] A24. 실시태양 A1 내지 A23 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 5-메틸시티딘을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0423] A25. 실시태양 A1 내지 A24 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 메틸포스포네이트를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0424] A26. 실시태양 A1 내지 A25 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, PACE의 에스터를 포함하며, 상기 에스터가 임의로 메틸 에스터인 합성 가이드 RNA.
- [0425] A27. 실시태양 A1 내지 A26 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, crRNA 분절 및 tracrRNA 분절을 모두 포함하는 단일 RNA 가닥을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0426] A28. 실시태양 A1 내지 A26 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2개의 RNA 가닥을 포함하고, crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 상이한 RNA 가닥 중에 있는 합성 가이드 RNA.
- [0427] A29. 실시태양 A1 내지 A28 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 각각의 RNA 가닥의 5' 단부, 3' 단부, 또는 5' 단부와 3' 단부 모두에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0428] A30. 실시태양 A1 내지 A29 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 가이드 서열 중에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0429] A31. 실시태양 A1 내지 A30 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 가이드 서열에 대해 5'에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0430] A32. 실시태양 A1 내지 A31 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 줄기 서열 중에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0431] A33. 실시태양 A1 내지 A32 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 스캐폴드 영역 중에 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0432] A34. 실시태양 A1 내지 A33 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 스캐폴드 영역 중에 하나 이상의 비천연, 직교 염기쌍을 포함하고, 상기 염기쌍이 아이소G-아이소C 및 Z 염기-P 염기 중에서 독립적으로 선택되는 합성 가이드 RNA.
- [0433] A35. 실시태양 A1 내지 A34 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-아미노기를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0434] A36. 실시태양 A1 내지 A35 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 포스포로다이티오에이트 결합기를 포함하는 합

성 가이드 RNA.

- [0435] A37. 실시태양 A1 내지 A36 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 보라노포스포네이트 결합기를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0436] A38. 실시태양 A1 내지 A37 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 열람 핵산 변형(ULNA)을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0437] A39. 실시태양 A1 내지 A38 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 잠금 핵산 변형(LNA)을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0438] A40. 실시태양 A1 내지 A39 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 비구조화된 핵산 변형(UNA)을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0439] A41. 실시태양 A1 내지 A40 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 슈도U를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0440] A42. 실시태양 A1 내지 A41 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-MOE를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0441] A43. 실시태양 A1 내지 A42 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-아라비노를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0442] A44. 실시태양 A1 내지 A43 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 4'-티오리보스를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0443] A45. 실시태양 A1 내지 A44 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 스쿠아레이트 결합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0444] A46. 실시태양 A1 내지 A45 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 트라이아자올로 결합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0445] A47. 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 또는 틸 형성 방법으로, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼-결합된 단백질 및 실시태양 A1 내지 A46 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA와 접촉시키고, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단하거나 틸 형성시킴을 포함하는 방법.
- [0446] A48. 실시태양 A47의 방법에서, 절단 또는 틸 형성이 시험관내에서 발생하는 방법.
- [0447] A49. 실시태양 A47의 방법에서, 절단 또는 틸 형성이 세포에서 발생하는 방법.
- [0448] A50. 실시태양 A47의 방법에서, 절단 또는 틸 형성이 생체내에서 발생하는 방법.
- [0449] A51. 실시태양 A47 내지 A50 중 어느 하나의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이 Cas9인 방법.
- [0450] A52. 실시태양 A47 내지 A51 중 어느 하나의 방법에서, 절단 또는 틸 형성이 유전자 편집을 생성시키는 방법.
- [0451] A53. 실시태양 A47 내지 A52 중 어느 하나의 방법에서, 절단 또는 틸 형성이 유전자 발현의 변경을 생성시키는 방법.
- [0452] A54. 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합 방법으로, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼-결합된 단백질 및 실시태양 A1 내지 A53 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA와 접촉시킴을 포함하는 방법.
- [0453] A55. 실시태양 A54의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이, 절단 또는 틸 형성 활성을 갖지 않는 돌연변이체를 포함하는 방법.
- [0454] A56. 실시태양 A54 또는 A55의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이, 크리스퍼 시스템 중에 자연적으로 존재하지 않는 단백질 성분을 포함하는 융합 단백질인 방법.
- [0455] A57. 실시태양 A54 내지 A56 중 어느 하나의 방법에서, 표적 폴리뉴클레오타이드의 발현의 변화를 생성시키는 방법.
- [0456] A58. 실시태양 A54 내지 A57 중 어느 하나의 방법에서, 표적 폴리뉴클레오타이드를 태그하기에 유용한 방법.
- [0457] 추가의 예시적인 실시태양
- [0458] B1. (a) (i) 폴리뉴클레오타이드 중 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0459] (b) 상기 줄기 서열에 부분적으로 또는 전적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절

- [0460] 을 포함하는 합성 가이드 RNA로,
- [0461] 하나 이상의 변형을 포함하고, gRNA 기능성을 갖는 상기 합성 가이드 RNA.
- [0462] B2. 실시태양 1의 합성 가이드 RNA로, 2'-O-메틸 부분, 2'-데옥시 부분, Z 염기, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0463] B3. 실시태양 1 또는 2의 합성 가이드 RNA로, 3'-포스포로티오에이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-포스포노카복실레이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-티오포스포노카복실레이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-티오포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-데옥시 뉴클레오타이드, 3'-티오포스포노아세테이트기를 갖는 2'-데옥시 뉴클레오타이드, 및 Z 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0464] B4. 실시태양 1 내지 3 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-플루오로리보실, 2-티오유라실 염기, 4-티오유라실 염기, 2-아미노아데닌 염기, 하이포잔틴 염기, 5-메틸시토신 염기, 5-메틸유라실 염기, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 5-아미노알릴유라실 염기, 스쿠아레이트 결합, 트라이아졸로 결합, 뉴클레오타이드에 접합된 염료, 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0465] B5. 실시태양 1 내지 4 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2'-MOE, 2'-아미노, 2'-F-아라비노, 2'-LNA, 2'-ULNA, 3'-메틸포스포네이트, 3'-보라노포스포네이트, 3'-포스포로다이티오에이트, 2'-OMe-3'-P(S)<sub>2</sub>, 2'-OMe-3'-P(CH<sub>3</sub>), 2'-OMe-3'-P(BH<sub>3</sub>), 4'-티오리보실, L-당, 2-티오시토신, 6-티오구아닌, 2-아미노퓨린, 슈도유라실, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-하이드록시메틸시토신, 5-하이드록시메틸유라실, 5,6-데하이드로유라실, 5-프로피닐시토신, 5-프로피닐유라실, 5-에틸닐시토신, 5-에틸닐유라실, 5-알릴유라실, 5-알릴시토신, 5-알릴아미노시토신, P 핵염기, 아이소시토신(아이소C), 아이소구아닌(아이소G), UNA, x(A,G,C,T), y(A,G,C,T), 비염기성 뉴클레오타이드, PEG, 탄화수소 링커, 할로-치환된 탄화수소 링커, 헤테로원자(O,N,S)-치환된 탄화수소 링커, (케토, 카복시, 아미도, 티오닐, 카바모일, 또는 티오노카바모일)-함유 탄화수소 링커, 스펜트린 링커, 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0466] B6. 실시태양 1 내지 5 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 안정성-중대 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0467] B7. 실시태양 1 내지 6 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2개 이상의 변형을 포함하고; 제1 변형이 안정성-중대 변형이고 제2 변형이 특이성-변경 변형인 합성 가이드 RNA.
- [0468] B8. 실시태양 6 또는 7의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 가이드 서열 중에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0469] B9. 실시태양 6 또는 7의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 가이드 서열의 상류에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0470] B10. 실시태양 6 또는 7의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 crRNA 분절의 처음 5개 및/또는 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0471] B11. 실시태양 6 또는 7의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 tracrRNA 분절 중에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0472] B12. 실시태양 6 또는 7의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 tracrRNA 분절의 처음 5개 및/또는 마지막 5개 뉴클레오타이드내에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0473] B13. 실시태양 6 내지 12 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 2'-O-메틸 부분, 2'-플루오로 부분, 또는 2'-데옥시 부분을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0474] B14. 실시태양 6 내지 13 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-중대 변형이 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 보라노포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 포스포로다이티오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함하는 합성 가이드 RNA.

- [0475] B15. 실시태양 6 내지 14 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-증대 변형이 3'-포스포노아세테이트 또는 3'-티오포스포노아세테이트를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0476] B16. 실시태양 6 내지 15 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-증대 변형이 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트 뉴클레오타이드 또는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0477] B17. 실시태양 6 내지 16 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-증대 변형이 2'-플루오로-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드, 2'-플루오로-3'-포스포노아세테이트 뉴클레오타이드 또는 2'-플루오로-3'-티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0478] B18. 실시태양 1 내지 17 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 특이성-변경 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0479] B19. 실시태양 18의 합성 가이드 RNA에서, 특이성-변경 변형이 가이드 서열 중에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0480] B20. 실시태양 18 또는 19의 합성 가이드 RNA에서, 특이성-변경 변형이 2-티오유라실, 4-티오유라실 또는 2-아미노아데닌을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0481] B21. 실시태양 18 내지 20 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 특이성-변경 변형이 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드간 결합, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 결합, 보라노스포에이트 뉴클레오타이드간 결합, 또는 포스포로다이트오에이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0482] B22. 실시태양 18 내지 21 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 특이성-변경 변형이 3'-포스포노아세테이트 또는 3'-티오포스포노아세테이트를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0483] B23. 실시태양 1 내지 22 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 형광 염료 또는 표지를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0484] B24. 실시태양 1 내지 23 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 하나 이상의 동위원소 표지를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0485] B25. 실시태양 1 내지 24 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 가이드 RNA가 올리고뉴클레오타이드, 앵타머, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 스테로이드, 지질, 폴산, 비타민, 당 또는 올리고사카라이드에 접합되는 합성 가이드 RNA.
- [0486] B26. 실시태양 1 내지 25 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 상기 합성 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA이며, crRNA 분절 및 tracrRNA 분절이 고리 L을 통해 결합되는 합성 가이드 RNA.
- [0487] B27. 실시태양 26의 합성 가이드 RNA에서, 고리 L이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0488] B28. 실시태양 26 또는 27의 합성 가이드 RNA에서, 고리 L이 GNRA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기에서 N이 A, C, G 또는 U를 나타내고, R이 A 또는 G를 나타내는 합성 가이드 RNA.
- [0489] B29. 실시태양 26 내지 28 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 고리 L이 GAAA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0490] B30. 실시태양 26 내지 29 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 고리 L이 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0491] B31. 실시태양 30의 합성 가이드 RNA에서, 고리 L이 형광 염료를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0492] B32. 실시태양 31의 합성 가이드 RNA에서, 염료가 2-(4-부틸아미도-염료)프로판-1,3-다이올 비스(포스포다이에스터) 링커에 접합되는 합성 가이드 RNA.
- [0493] B33. 실시태양 1 내지 32 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, crRNA 분절이 가이드 RNA의 5' 단부에 있는 합성 가이드 RNA.
- [0494] B34. 실시태양 1 내지 33 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, tracrRNA 분절이 가이드 RNA의 3' 단부에 있는 합성 가이드 RNA.



- [0495] B35. 실시태양 1 내지 34 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, crRNA 분절이 25 내지 70 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0496] B36. 실시태양 1 내지 35 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 가이드 서열이 15 내지 30 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0497] B37. 실시태양 1 내지 36 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 줄기 서열이 10 내지 50 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0498] B38. 실시태양 1 내지 37 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 하나 이상의 트라이아졸로 결합(들)을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0499] B39. 실시태양 1 내지 38 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 하나 이상의 스쿠아레이트 결합(들)을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0500] B40. 실시태양 1 내지 39 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 하기의 뉴클레오타이드 조성을 포함하는 합성 가이드 RNA:
- [0501]  $M_m N_n$
- [0502] 상기 식에서,
- [0503] 각각의 N은 독립적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드를 나타내고;
- [0504] 각각의 M은 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-P(S)-리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-PACE 리보뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-티오파스 리보뉴클레오타이드, 및 2'-테옥시뉴클레오타이드 중에서 선택되고;
- [0505] 각각의 M은 상기 가이드 RNA의 서열 중 임의의 위치에 있고;
- [0506] m은 1 내지 220의 정수이고, n은 0 내지 219의 정수이며,  $50 < m+n \leq 220$ 이다.
- [0507] B41. 실시태양 38의 합성 가이드 RNA에서,  $m+n < 150$ 이고, m 및 n은 각각 0 내지 150의 정수 중에서 독립적으로 선택되나, 단 m은 0이 아니다.
- [0508] B42. 실시태양 1 내지 41 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 하기의 뉴클레오타이드 조성을 포함하는 합성 가이드 RNA:
- [0509]  $M_m N_n M'_m N'_n M''_m$
- [0510] 상기 식에서,
- [0511] 각각의 M, M' 및 M''은 독립적으로 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고, 각각의 N 및 N'은 독립적으로 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내며;
- [0512] 임의의 주어진 M은 임의의 다른 M과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 N은 임의의 다른 N과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 M'은 임의의 다른 M'과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 N'은 임의의 다른 N'과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 M''은 임의의 다른 M''과 동일하거나 상이하고;
- [0513] m은 0 내지 40의 정수이고, n은 2 내지 130의 정수이고, m'은 0 내지 10의 정수이고, n'은 0 내지 50의 정수이고, m''은 0 내지 10의 정수이나, 단  $m+m'+m''$ 은 1 이상이다.
- [0514] B43. 실시태양 1 내지 42 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, crRNA 분절이 하기의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 합성 가이드 RNA:
- [0515]  $M_m N_n M'_m N'_n$
- [0516] 상기 식에서,
- [0517] M 및 M'은 각각 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고, N 및 N'은 각각 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내며;
- [0518] 임의의 주어진 M은 임의의 다른 M과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 N은 임의의 다른 N과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 M'은 임의의 다른 M'과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진 N'은 임의의 다른 N'과 동일

하거나 상이하고;

- [0519]  $n$  및  $n'$ 은 각각 독립적으로 0 내지 50의 정수 중에서 선택되고,  $m$  및  $m'$ 은 각각 독립적으로 0 내지 25의 정수 중에서 선택되나, 단  $m+m'$ 은 1 이상이다.
- [0520] B44. 실시태양 1 내지 43 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 가이드 서열이 하기의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 합성 가이드 RNA:
- [0521]  $M_m N_n M'_m N'_n$ .
- [0522] 상기 식에서,
- [0523]  $M$  및  $M'$ 은 각각 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고,  $N$  및  $N'$ 은 각각 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내며;
- [0524] 임의의 주어진  $M$ 은 임의의 다른  $M$ 과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진  $N$ 은 임의의 다른  $N$ 과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진  $M'$ 은 임의의 다른  $M'$ 과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진  $N'$ 은 임의의 다른  $N'$ 과 동일하거나 상이하고;
- [0525]  $m$ ,  $n$ ,  $m'$  및  $n'$ 은 각각 독립적으로 0 내지 40의 정수 중에서 선택되나, 단  $m+m'$ 은 1 이상이다.
- [0526] B45. 실시태양 1 내지 44 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, tracrRNA 분절이 하기의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 합성 가이드 RNA:
- [0527]  $N_n M_m N'_n M'_m$ .
- [0528] 상기 식에서,
- [0529]  $M$  및  $M'$ 은 각각 변형된 뉴클레오타이드를 나타내고,  $N$  및  $N'$ 은 각각 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드를 나타내며;
- [0530] 임의의 주어진  $M$ 은 임의의 다른  $M$ 과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진  $N$ 은 임의의 다른  $N$ 과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진  $M'$ 은 임의의 다른  $M'$ 과 동일하거나 상이하고, 임의의 주어진  $N'$ 은 임의의 다른  $N'$ 과 동일하거나 상이하고;
- [0531]  $n$ 은 0 내지 130의 정수이고,  $m$ 은 0 내지 40의 정수이고,  $n'$ 은 0 내지 130의 정수이고,  $m'$ 은 0 내지 40의 정수이나, 단  $m+m'$ 은 1 이상이다.
- [0532] B46. 실시태양 40 내지 43 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서,  $m$ ,  $m'$ ,  $m+m'$  또는  $m+m'+m''$ 이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20인 합성 가이드 RNA.
- [0533] B47. 실시태양 40 내지 43 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서,  $m$ ,  $m'$ ,  $m+m'$  또는  $m+m'+m''$ 이 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인 합성 가이드 RNA.
- [0534] B48. 실시태양 40 내지 45 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서,  $n$ 이 16, 17, 18 또는 19인 합성 가이드 RNA.
- [0535] B49. 실시태양 40 내지 45 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서,  $n$ ,  $n'$ , 또는  $n+n'$ 이 75 내지 115의 정수인 합성 가이드 RNA.
- [0536] B50. 실시태양 40 내지 47 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 각각의  $M$ 이 2'-변형된 뉴클레오타이드, 3'-변형된 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되는 합성 가이드 RNA.
- [0537] B51. 실시태양 48의 합성 가이드 RNA에서, 2'-변형된 뉴클레오타이드가 2'-데옥시 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 2'-플루오로 뉴클레오타이드, 및 2'-O-C<sub>1-3</sub>알킬-O-C<sub>1-3</sub>알킬 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택되는 합성 가이드 RNA.
- [0538] B52. 실시태양 48의 합성 가이드 RNA에서, 3'-변형된 뉴클레오타이드가 3'-포스포노아세테이트 뉴클레오타이드 및 3'-티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택되는 합성 가이드 RNA.
- [0539] B53. 실시태양 48의 합성 가이드 RNA에서, 2'-변형된 뉴클레오타이드 및 3'-변형된 뉴클레오타이드의 조합이 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸-3'-포스포노아세테이트 뉴클레오타이드, 또는 2'-O-메틸-3'-티오포스포노아세테이트 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.

- [0540] B54. 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 방법으로, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼-결합된 단백질 및 실시태양 1 내지 53 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA와 접촉시키고 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단시킴을 포함하는 방법.
- [0541] B55. 실시태양 52의 방법으로, 표적 폴리뉴클레오타이드를 외인성 크리스퍼-결합된 단백질과 접촉시킴을 또한 포함하는 방법.
- [0542] B56. 실시태양 53의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이 Cas9인 방법.
- [0543] B57. 실시태양 52 내지 54 중 어느 하나의 방법에서, 절단이 표적 유전자의 기능성 녹아웃을 생성시키는 방법.
- [0544] B58. 실시태양 52 내지 55 중 어느 하나의 방법으로, 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드를 외인성 또는 내인성 주형 폴리뉴클레오타이드에 의한 상동성-지시된 수복에 의해 수복함을 또한 포함하는 방법.
- [0545] B59. 실시태양 56의 방법에서, 외인성 또는 내인성 주형 폴리뉴클레오타이드가 절단 부위의 어느 한 쪽상의 서열과 실질적인 서열 일치성을 갖는 하나 이상의 서열을 포함하는 방법.
- [0546] B60. 실시태양 52 내지 57 중 어느 하나의 방법으로, 절단된 표적 폴리뉴클레오타이드를 비-상동성 단부 결합에 의해 수복함을 또한 포함하는 방법.
- [0547] B61. 실시태양 56 내지 58 중 어느 하나의 방법에서, 수복 단계가 표적 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환을 생성시키는 방법.
- [0548] B62. 실시태양 59의 방법에서, 삽입, 결실 또는 치환이 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자로부터 발현된 단백질 중에 하나 이상의 아미노산 변화를 생성시키는 방법.
- [0549] B63. 실시태양 52 내지 60 중 어느 하나의 방법에서, 표적 폴리뉴클레오타이드를 시험관내에서 크리스퍼-결합된 단백질 및 합성 가이드 RNA와 접촉시키는 방법.
- [0550] B64. 실시태양 52 내지 61 중 어느 하나의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질 및 합성 가이드 RNA와 접촉된 표적 폴리뉴클레오타이드가 시험관내 또는 생체내에서 세포의 계능내에 있는 방법.
- [0551] B65. 실시태양 62의 방법에서, 세포를, 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼-결합된 단백질 및 합성 가이드 RNA와 접촉시키기 전에 다세포 공급원으로부터 단리시키는 방법.
- [0552] B66. 실시태양 63의 방법에서, 공급원이 식물, 동물, 다세포 원생생물, 또는 진균인 방법.
- [0553] B67. 실시태양 62 내지 64 중 어느 하나의 방법에서, 세포 또는 그로부터 유래된 세포를, 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼-결합된 단백질 및 합성 가이드 RNA와 접촉시킨 후에 공급원으로 다시 복귀시키는 방법.
- [0554] B68. 세포에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 변형시키는 방법으로, 상기 세포내에 실시태양 1 내지 51 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA를 도입시키고 상기 세포내에 크리스퍼-결합된 단백질 또는 상기 세포에서 크리스퍼-결합된 단백질을 발현하는 핵산을 도입시킴을 포함하는 방법.
- [0555] B69. 실시태양 66의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이 Cas9인 방법.
- [0556] B70. 세포에서 하나 이상의 유전자 산물의 발현을 변경시키는 방법으로, 상기 세포내에 실시태양 1 내지 51 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA를 도입시키고 상기 세포내에 크리스퍼-결합된 단백질 또는 상기 세포에서 크리스퍼-결합된 단백질을 발현하는 핵산을 또한 도입시킴을 포함하며, 여기에서 상기 세포가 표적 서열을 갖고 상기 유전자 산물을 암호화하는 DNA 분자를 함유하고 발현하는 방법.
- [0557] B71. 실시태양 68의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이 Cas9인 방법.
- [0558] B72. 실시태양 69의 방법에서, 크리스퍼-결합된 단백질이 DNA 분자를 절단하는 방법.
- [0559] B73. 실시태양 1 내지 51 중 어느 하나의 2개 이상의 합성 가이드 RNA를 포함하는 RNA 분자들의 세트 또는 라이브러리.
- [0560] B74. 실시태양 1 내지 51 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA 또는 실시태양 71의 RNA 분자들의 세트 또는 라이브러리를 포함하는 키트.
- [0561] B75. 실시태양 72의 키트로, 크리스퍼-결합된 단백질 또는 상기 크리스퍼-결합된 단백질을 암호화하는 핵산을 또한 포함하는 키트.

- [0562] B76. 실시태양 73의 키트에서, 크리스퍼-결합된-단백질이 Cas9인 키트.
- [0563] B77. 실시태양 1 내지 76 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA, 방법 또는 키트에서, 합성 가이드 RNA가 단부 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA, 방법 또는 키트.
- [0564] B78. 실시태양 1 내지 77 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 단일 RNA 가닥 또는 2개의 별도의 상보성 RNA 가닥을 갖고, 각각의 RNA 가닥의 양쪽 단부에서 하나 이상의 안정성-증대 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0565] C1. (a) (i) 폴리뉴클레오타이드 중 표적 서열에 하이브리드화할 수 있는 가이드 서열, (ii) 줄기 서열을 포함하는 crRNA 분절; 및
- [0566] (b) 상기 줄기 서열에 부분적으로 또는 전적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tracrRNA 분절
- [0567] 을 포함하는 합성 가이드 RNA로,
- [0568] 하나 이상의 변형을 포함하고, gRNA 기능성을 갖는 상기 합성 가이드 RNA.
- [0569] C2. 실시태양 C1의 합성 가이드 RNA에서, 변형 중 하나 이상이 안정성-증대 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0570] C3. 실시태양 C2의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-증대 변형 중 하나 이상이 가이드 서열 중에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0571] C4. 실시태양 C2의 합성 가이드 RNA에서, 안정성-증대 변형이 2'-O-메틸 부분, Z 염기, 2'-데옥시 뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합, 포스포노아세테이트(PACE) 뉴클레오타이드간 결합, 또는 티오포스포아세테이트(티오포PACE) 뉴클레오타이드간 결합, 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0572] C5. 실시태양 C1 내지 C4 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 가이드 RNA의 5' 단부에 26개 미만의 연속적인 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0573] C6. 실시태양 C1 내지 C5 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 합성 가이드 RNA 중 시토신을 대체하는 Z 염기를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0574] C7. 실시태양 C1 내지 C6 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 잠재적인 표적-외 서열과의 U-G 동요 짝짓기에 관여할 수 있는 유리딘에 상응하는 위치에 하나 이상의 2-티오유라실을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0575] C8. 실시태양 C1 내지 C7 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 3'-포스포로티오에이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 3'-티오포스포노아세테이트기를 갖는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드, 및 3'-포스포노아세테이트기를 갖는 2'-데옥시 뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0576] C9. 실시태양 C1 내지 C8 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 2개 이상의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0577] C10. 실시태양 C1 내지 C9 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 50개 이하의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0578] C11. 실시태양 C1 내지 C10 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 단일 RNA 가닥 또는 2개의 별도의 RNA 가닥, 및 각각의 RNA 가닥의 5' 단부, 각각의 RNA 가닥의 3' 단부, 또는 각각의 RNA 가닥의 5' 단부 및 3' 단부 모두에 하나 이상의 변형을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0579] C12. 실시태양 C1 내지 C11 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 5' 단부, 3' 단부, 또는 5' 및 3' 단부 각각에 7개 이하의 연속적인 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0580] C13. 실시태양 C1 내지 C12 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 5' 단부, 3' 단부, 및 줄기-고리 중 하나 이상에 하나 이상의 5-메틸유리딘 뉴클레오타이드를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0581] C14. 실시태양 C1 내지 C13 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 변형 중 하나 이상이 염기-짝짓기 열안정성을 변경시키는 합성 가이드 RNA.
- [0582] C15. 실시태양 C14의 합성 가이드 RNA에서, 하나 이상의 변형이 염기-짝짓기 열안정성을 증대시키는 합성 가이드 RNA.
- [0583] C16. 실시태양 C15의 합성 가이드 RNA에서, 하나 이상의 변형이 2-티오유라실(2-티오U), 4-티오유라실(4-티오U), 2-아미노아데닌, 2'-O-메틸, 2'-플루오로, 5-메틸유리딘, 5-메틸시티딘, 및 잠금 핵산 변형(LNA) 중에서 독립적으로 선택되는 합성 가이드 RNA.

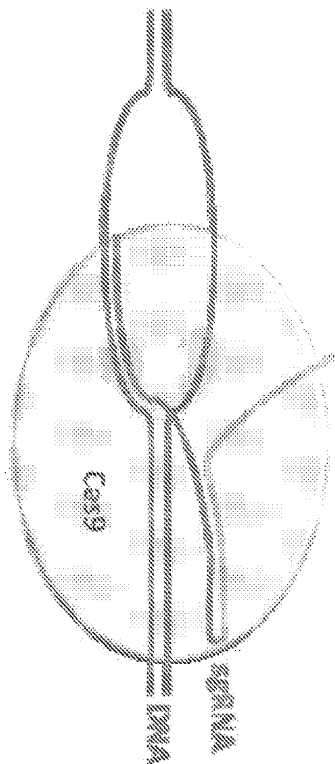
- [0584] C17. 실시태양 C15의 합성 가이드 RNA로, 하나 이상의 변형이 염기-짝짓기 열안정성을 감소시키는 합성 가이드 RNA.
- [0585] C18. 실시태양 C17의 합성 가이드 RNA로, 하나 이상의 변형이 2'-티오유라실, 2'-데옥시, 포스포로티오에이트 결합, 포스포로다이트오에이트 결합, 보라노포스포네이트 결합, 포스포노아세테이트 결합, 티오포스포노아세테이트 결합, 및 열람 핵산 변형(ULNA) 중에서 독립적으로 선택되는 합성 가이드 RNA.
- [0586] C19. 실시태양 C1 내지 C18 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 하나 이상의 2'-O-메틸A-2'-O-메틸U 염기쌍을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0587] C20. 실시태양 C1 내지 19 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 변형 중 하나 이상이 특이성-변경 변형인 합성 가이드 RNA.
- [0588] C21. 실시태양 C20의 합성 가이드 RNA로, 특이성-변경 변형이 가이드 서열 중에 위치하는 합성 가이드 RNA.
- [0589] C22. 실시태양 C1 내지 C21 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA에서, 특이성-변경 변형이 2'-티오유라실, 4-티오유라실, 2'-아미노아데닌, 2'-O-메틸, 2'-플루오로, LNA, 포스포로티오에이트 결합, 포스포로다이트오에이트 결합, 보라노포스포네이트 결합, 포스포노아세테이트 결합, 티오포스포노아세테이트 결합, ULNA, 2'-데옥시, 5-메틸유리딘, 5-메틸시티딘 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0590] C23. 실시태양 C1 내지 C22 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA로, 형광 염료 또는 표지를 포함하는 합성 가이드 RNA.
- [0591] C24. 실시태양 C23의 합성 가이드 RNA에서, 형광 염료 또는 표지가 합성 가이드 RNA의 줄기-고리에 결합되는 합성 가이드 RNA.
- [0592] C25. DNA 서열을 변형시키기 위한 게놈 편집, 또는 관심 유전자 발현의 조절, 또는 표적 폴리뉴클레오타이드의 절단 방법으로, 상기 DNA 서열, 상기 관심 유전자, 또는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 크리스퍼-결합된 단백질 및 실시태양 C1 내지 C24 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA와 접촉시키고, 상기 DNA 서열, 상기 관심 유전자 또는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 편집하거나 조절하거나 절단함을 포함하는 방법.
- [0593] C26. 실시태양 C25의 방법에서, 합성 가이드 RNA가 가이드 서열 전체를 통해 15개 이상의 2'-O-메틸 변형을 포함하는, 시험관내에서 수행되는 방법.
- [0594] C27. 실시태양 C1 내지 C26 중 어느 하나의 2개 이상의 합성 가이드 RNA를 포함하는 RNA 분자들의 세트 또는 라이브러리.
- [0595] C28. 실시태양 C1 내지 C27 중 어느 하나의 합성 가이드 RNA를 포함하는 키트.
- [0596] C29. 실시태양 C1 내지 C28 중 어느 하나의 2개 이상의 합성 가이드 RNA를 포함하는 RNA 분자들의 배열.
- [0597] 상기 예시적인 또는 바람직한 실시태양들의 기재는 특허청구범위에 의해 한정되는 바와 같은 본 발명을 제한하기보다는 예시하는 것으로서 간주해야 한다. 쉽게 이해되는 바와 같이, 상기에 제시된 특징들의 다수의 변화 및 조합을 특허청구범위에 제시된 바와 같은 본 발명으로부터 벗어남이 없이 사용할 수 있다. 상기와 같은 변화는 본 발명의 범위로부터 이탈로서 간주되지 않으며, 모든 상기와 같은 변화를 하기 특허청구범위의 범위내에 포함하고자 한다. 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌들은 내용 전체가 참고로 인용된다.





도면2a

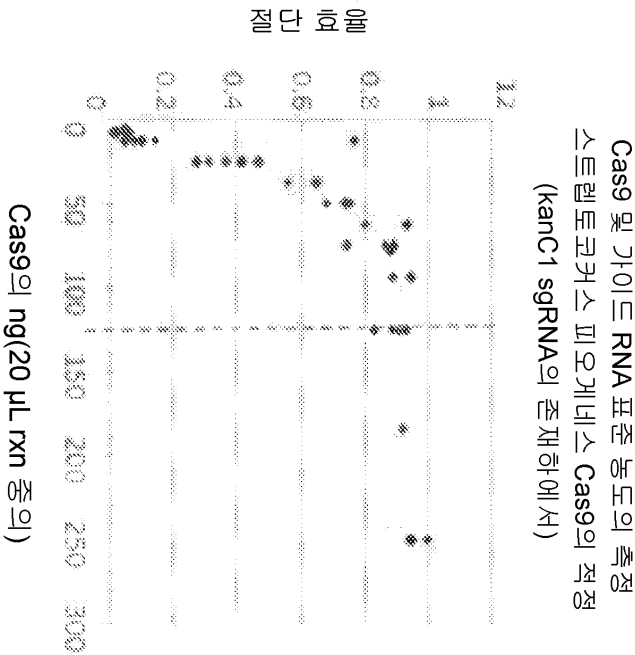
사용된 버전 1.0 sgRNA 디자인



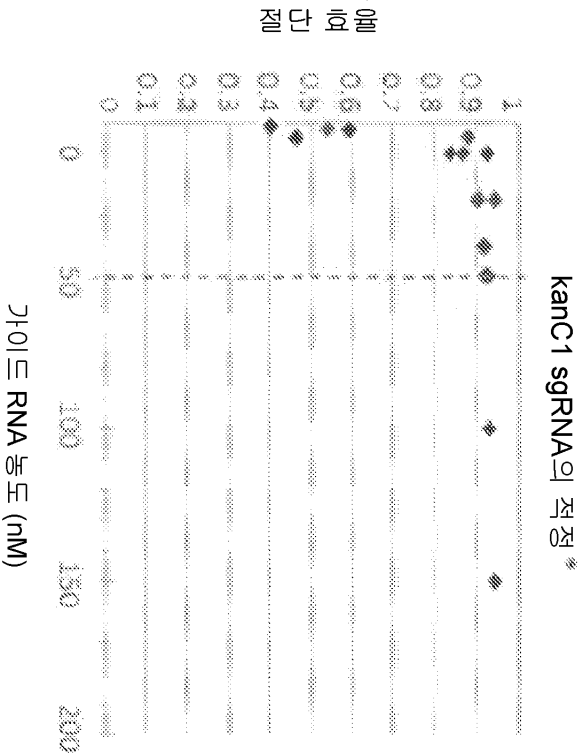
도면2b

제기 중 반응 온도		28°C, 37°C
반응 부피		20 $\mu$ L
Cas9 단백질	40 nM (1.25 ng/20 $\mu$ L rxn)	
가이드 RNA	50 nM	
표적 DNA	2.6 nM	
TrisHCl pH 7.6	100 mM	
NaCl	50 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	

도면2c



도면2d



표준 절단 조건:

모액	부피 ( $\mu$ l)	농도	화합량
10x 완충제	2.0	1x	16 20
125 ng/ $\mu$ l Cas9 wt 단백질	1.0	40 nM	우리의 단백질 제제 중 모든 ng의 Cas9가 활성인 경우
1 $\mu$ M 가이드 RNA	1.0	50 nM	
25 ng/ $\mu$ l 선형화된 CLTA 표적 ddH <sub>2</sub> O (DEPC 처리된)	4.0	2.5 nM	
	12.0		1
	20.0		

예온된 수어사이클러(SureCycler)에서:

- (i) 37 °C에서 30분 동안 배양
  - (ii) +RNase 억제제, 37 °C에서 5분 동안, 이어서 70 °C에서 15분 동안 배양
  - (iii) +프로테아제 K, 37 °C에서 15분 동안 배양
- 생물분석기상에서 조 생성물 분석.

도면4a

반전 카이드 RNA의 명칭	길이 [bp]	시퀀스내에서 결단된 표적%	[시퀀스 → 3']
Cas9에 의해 이용되지 않는 합리적 변형			
CTTAA 변형되지 않은 대조군	118	95%	
2xCGAGAGAG, CTTAA	113	94%	
4xCGAGAGAG, CTTAA	113	88%	
CTTAA, 4xCGAGAGAG	113	91%	
CTTAA, 5xCGAGAGAG	113	91%	
CTTAA, 2xCGAGAG, 2x	113	98%	
CTTAA, 3xCGAGAG, 13	113	93%	
CTTAA, 2xCGAGAG, 18	113	91%	
CTTAA, 2xCGAGAG, 17	113	93%	
CTTAA, 2xCGAGAG, 17, 18	113	98%	
CTTAA, 20, 대목시	113	7%	
CTTAA, 20, 2xCGAGAG	113	89%	
CTTAA, 27, 2xCGAGAG	113	88%	
CTTAA, 5, NS	113	98%	
CTTAA, 2, NS	113	94%	
CTTAA, 5, NS	113	100%	
CTTAA, 8, NS	113	94%	
3xCGAG, CTTAA, 3xCGAG	113	99%	
3xCGAG, 2xCGAG, CTTAA, 3xCGAG	113	92%	
3xCGAG, 2xCGAG, CTTAA, 3xCGAG, 2xCGAG	113	89%	



도면4b

[illegible]

2003

2024-2025 3rd Grade Mathematics

[illegible]

2010年12月10日

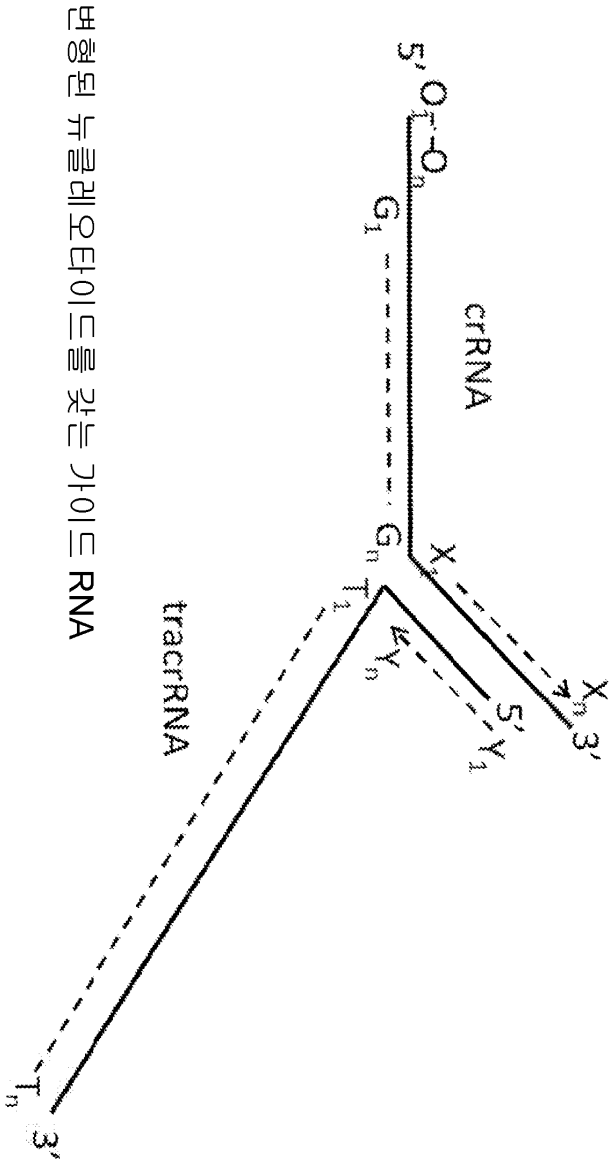
**Z**

Book 9: [The Book of the Dead](#) (1998) by a

[illegible]

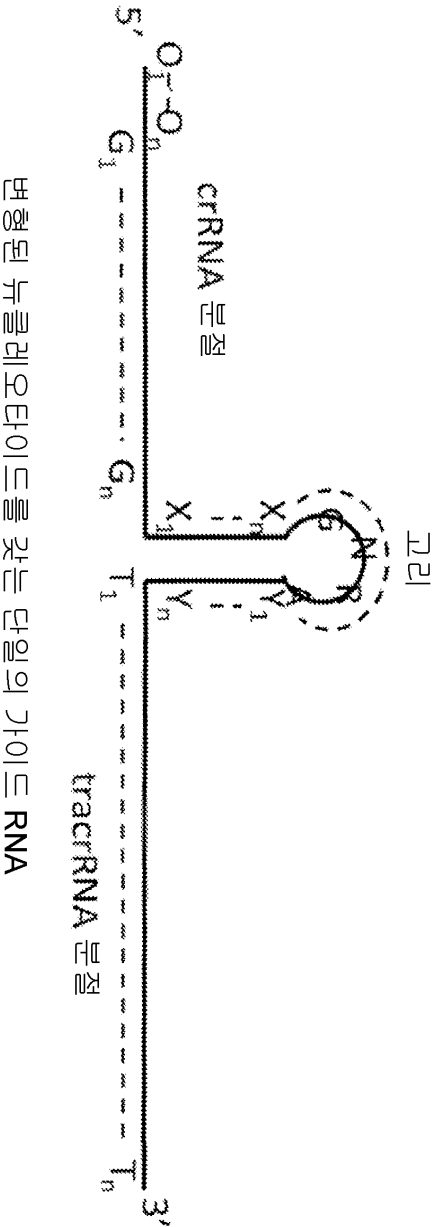
*Book 7: Discontinuity*

도면5a



변형된 뉴클레오타이드를 갖는 가이드 RNA

도면5b



변형된 뉴클레오타이드를 갖는 단일의 가이드 RNA

도면6

1. 2-OMe	11. O-PS 결합	21. 2-아미노퓨린	31. 5-에티닐 (U/C)	39. 비염기성 뉴클레오타이드
2. 2-H	12. PAC 결합	22. 수도유라실	32. 5-에티닐 (U/C)	40. PAC
3. 2-AOM 유사체	13. 티오PAC 결합	23. 하이포잔틴	33. 5-아미노알릴 (U/C)	41. 탄화수소 스페이서
4. 2-플루오로 유사체	14. 메틸포스포네이트	24. 7-데아자(A/G)	34. 5-메틸-2-피리미딘	42. 링커-염료
5. 2'-아미노 유사체	15. 보라노포스포네이트	25. 7-데아자-8-아자	35. 2-PP 염기	43. 스페르민-변형
6. 2-아라비노 유사체	16. 포스포로다이티오에이트	26. 5-메틸 (U/C)	36. 8-(A/G/C/T)	
7. 2'-F-아라비노 유사체	17. 2-티오(U/C)	27. 5-하이드록시메틸 (U/C)	37. 7-(A/G/C/T)	
8. 2-UNA 유사체	18. 4-티오유라실	28. 5-6-데하이드로유라실	38. 아이소(C/G)	
9. 2-UNA 유사체	19. 6-티오구아닌	29. 5-프로피닐 (U/C)		
10. 4-티오리보실 부분	20. 2-아미노아데닌			

도면7

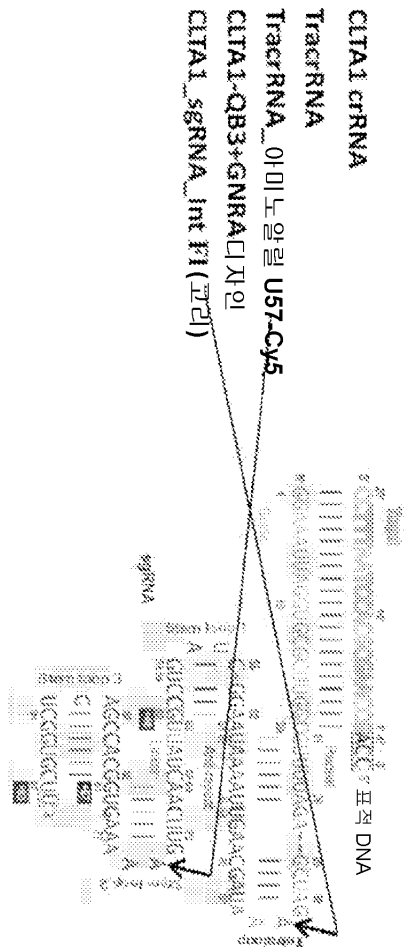
단량변형		단	인 결합	염기 변형	기타
이중변형	단/단	X	X	X	X
	단/P 결합	X	X	X	X
	단/염기	X	X	X	X
	단/기타	X	X	X	X
	P 결합/P 결합	X	X	X	X
	P 결합/염기	X	X	X	X
	P 결합/기타	X	X	X	X
	염기/염기	X	X	X	X
	염기/기타	X	X	X	X
	기타/기타	X	X	X	X

\*염기 변형은 염기쌍 변형을 포함한다

단 변형("단"): 2'-O-메틸 (2'-OMe) (2'-OC<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 알킬), 2'-H, 2'-MOE (2'-OC<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> 알킬 -OC<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> 알킬), 2'-F, 2'-아미노, 2'-아라비노, 2'-f-아라비노 2'-UNA, 2'-UNLA, 4'-티오리보실 뉴클레오타이드 뉴클레오타이드간 결합 및 3' 및/또는 5' 말단 뉴클레오타이드 변형("인 결합" 또는 "P 결합"): -P(S) (포스포리티오에이트), -PACE(포스포노아세테이트, 포스포노카복실레이트), -티오프ACE(티오포스포노아세테이트, 티오포스포노아세테이트, 티오포스포노카복실레이트)-PCH<sub>3</sub>(메틸포스포네이트, 알킬포스포네이트), -P(BH)<sub>2</sub>(보라노포스포네이트), -P(S)<sub>2</sub>(포스포다이트오에이트) 염기 변형: 2-티오유라실, 2-티오시토신, 4-티오유라실, 6-티오구아닌, 2-아미노아데닌, 2-아미노퓨린, 슈도유라실, 하이포잔틴, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-데아자-8-아자아데닌, 5-메틸유라실, 5-하이드록시메틸시토신, 5-아미노알릴-유라실, 5-아미노알릴-시토신 및 비염기성 뉴클레오타이드, 5-염기쌍 변형: ZIP 뉴클레오타이드, UNA, 아이소C/아이소G, 6-티오G/5-메틸-파리미딘, x(A,G,C,T) 및 y(A,G,C,T). 기타: 단부 변형 및/또는 스페이스염기(단부 또는 내부) 변형: PEG, 탄화수소 스페이스, (포함: 헥테로원자(O,S,N)-치환된 탄화수소 스페이스, 할로-치환된-탄화수소 스페이스), (케토, 카복시, 아미도, 티오닐, 카바모일, 티오카바모일)-함유 탄화수소 스페이스), 스페르민, 하기를 포함하는 염료 링크: 6-플루오레세인, 포스포아미다이트 등, 스쿠아레이트 결합, 틸스-알더 결합, 또는 "클릭" 화학 결합.

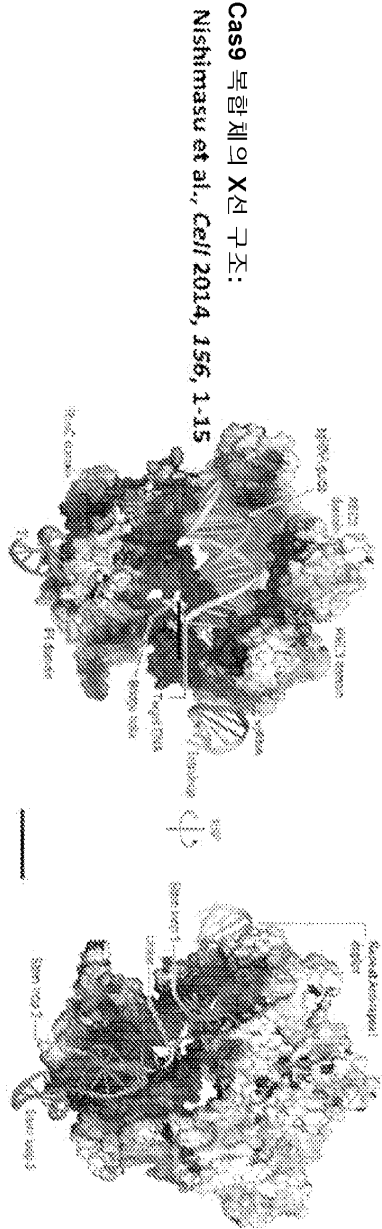


시험관내 시험을 위한 형광단-변형된 **CLTA1 sgRNA**



도면8a

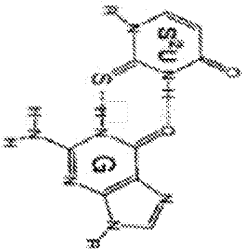
도면8b



특이성을 개선시키기 위한 화학적 변형의 사용

표적명	CLTA1 표적-상 또는 표적-외 부위	게놈 좌표	코스미드 점수	MIT 디자인 점수
CLTA1 ON1	AGTCCCTCATCTCTCCCTCAAGCAGG TCAGGAGTAGAGGAGGTCTCC	Chr9:36211735-36211757	0	100.0
CLTA1 OFF1	AGTCCCTCAACTCTCCCTCAAGCAGG TCAGGAGTTGAGGAGGTCTCTCC	Chr8:15688928-15688950	0.35	61.1
CLTA1 OFF2	AGCCCTCATTTCTCCCTCAAGCAGG TCGGGAGTAAGGAGGTCTCTCC	Chr3:54189084-54189106	0.65	6.4
CLTA1 OFF3	ACTCCTCATCTCCCTCTCAAGCCTCG TCAGGAGTAGGGGAGGTCTGGCTC	Chr15:88845439-88845461	0.83	4.5

예: • CLTA1\_2E1오U+11 crRNA: 5' AGUCCUCAUC (2sU) CCCUCAAGCCUUUAAGACCUAUGCCUGUUUUGA  
AUGGUCCCAAAAC 3'  
• CLTA1\_2E1오U+9  
• CLTA1\_2E1오U+3

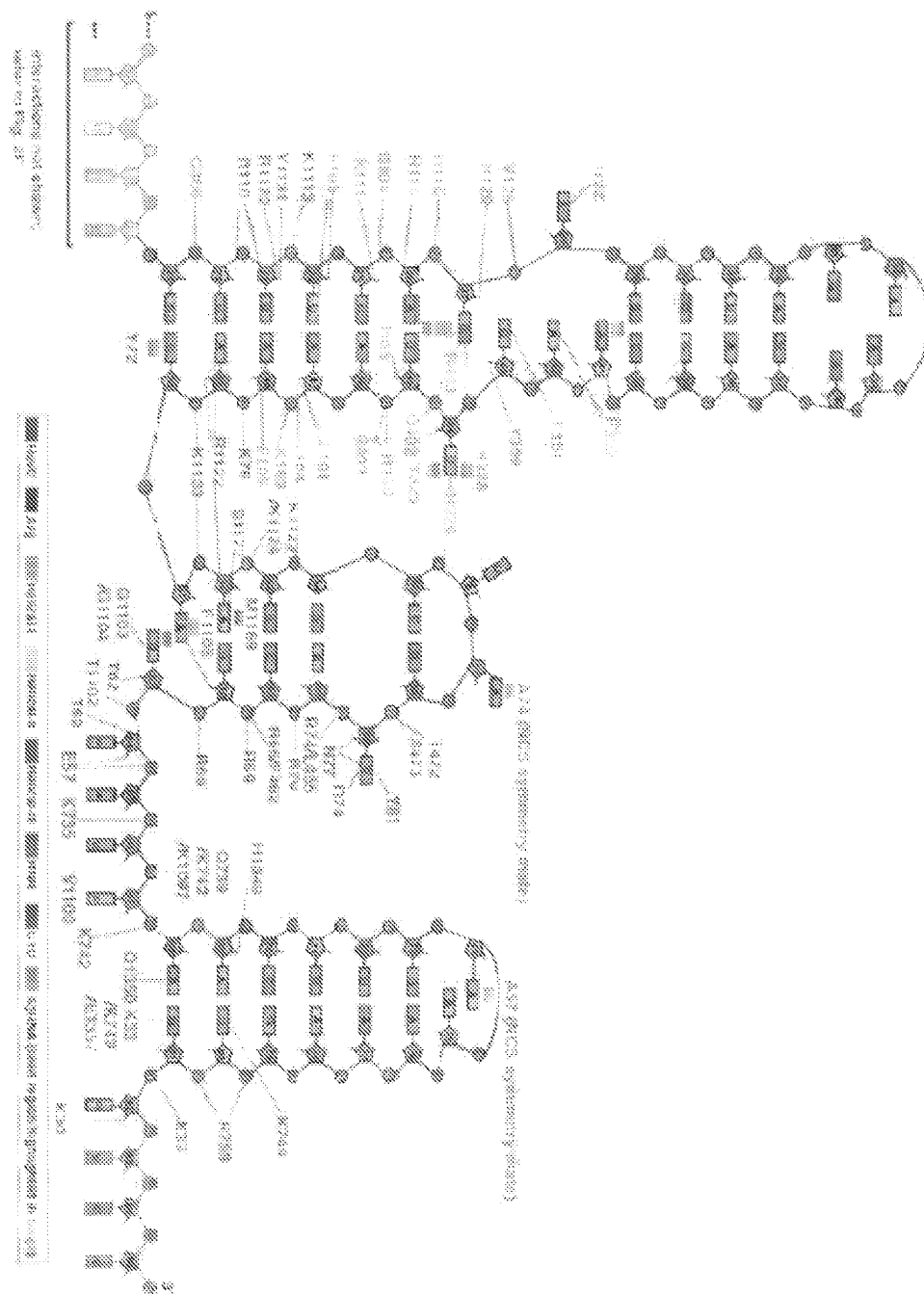


2-티오U 중의 황은 G와 H-결합하여 특이성을 낮추는 동요 쌍을 형성할 수 없다.

도면9a

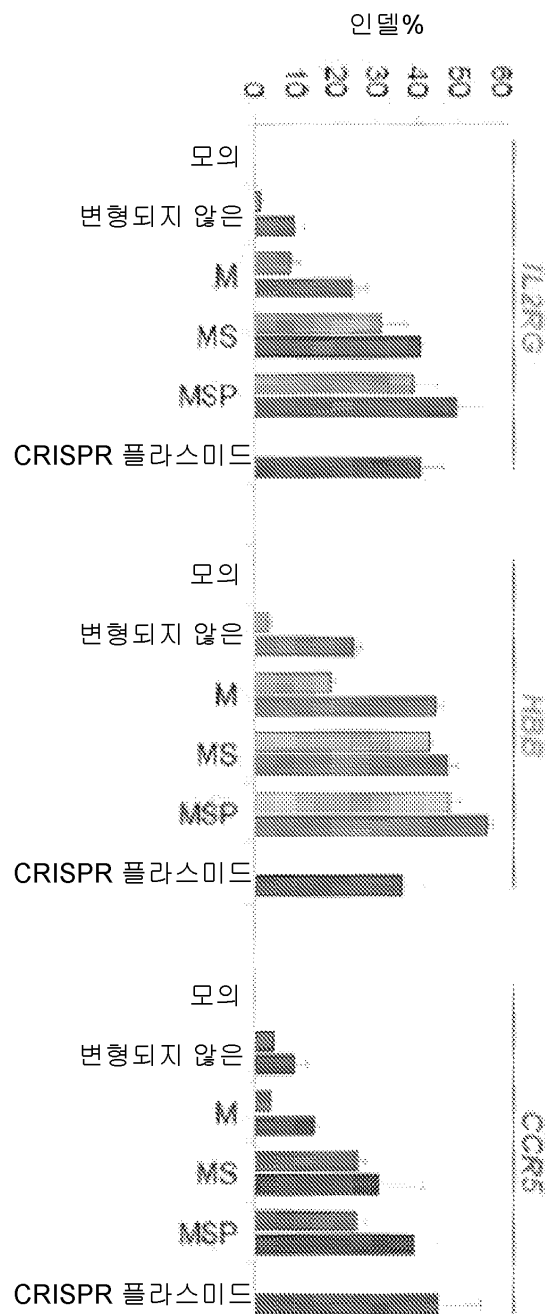


도면 10

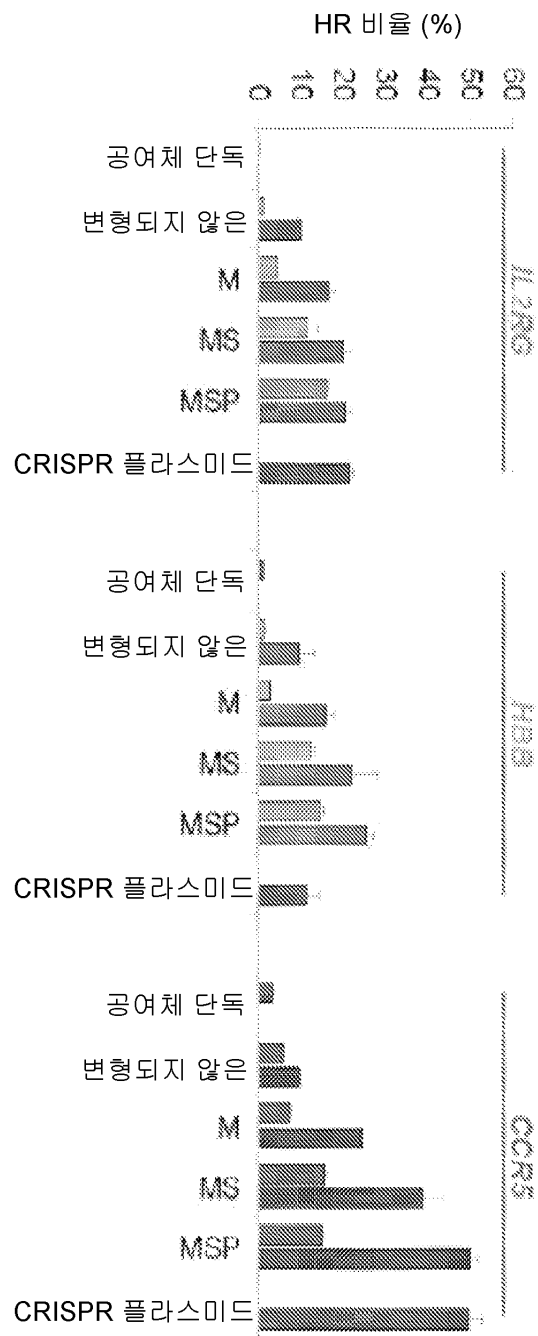




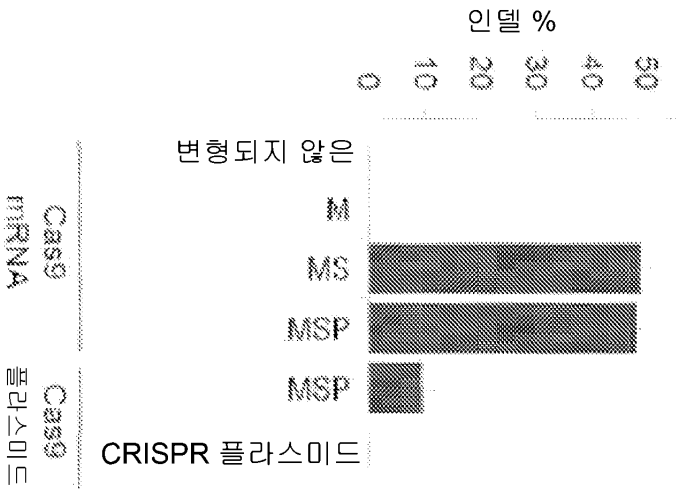
도면11a



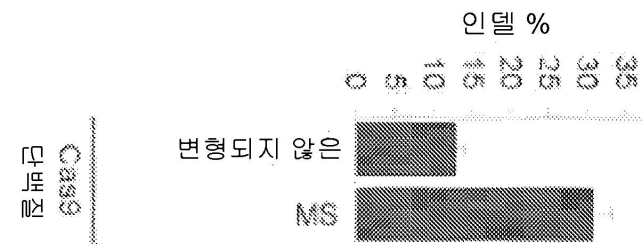
도면11b



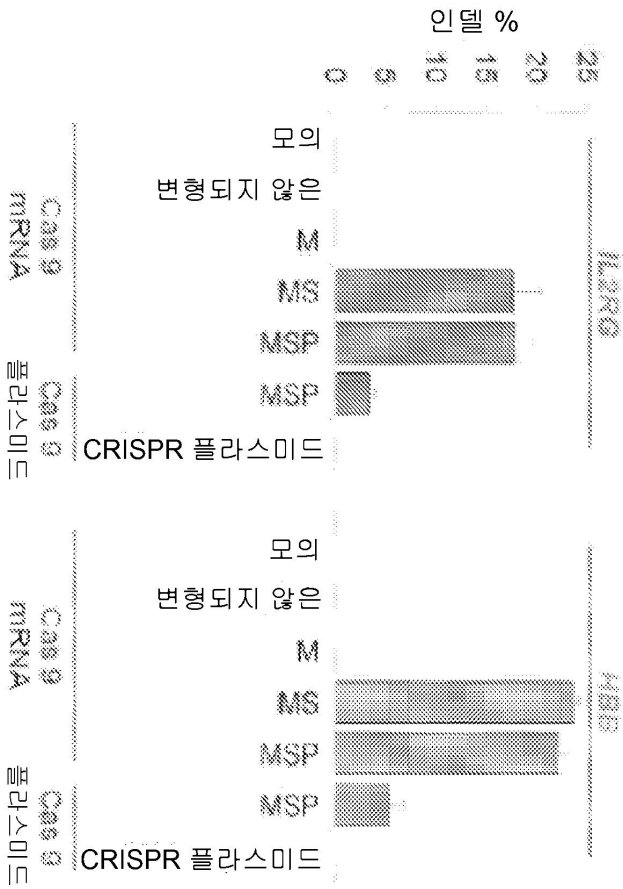
도면12a



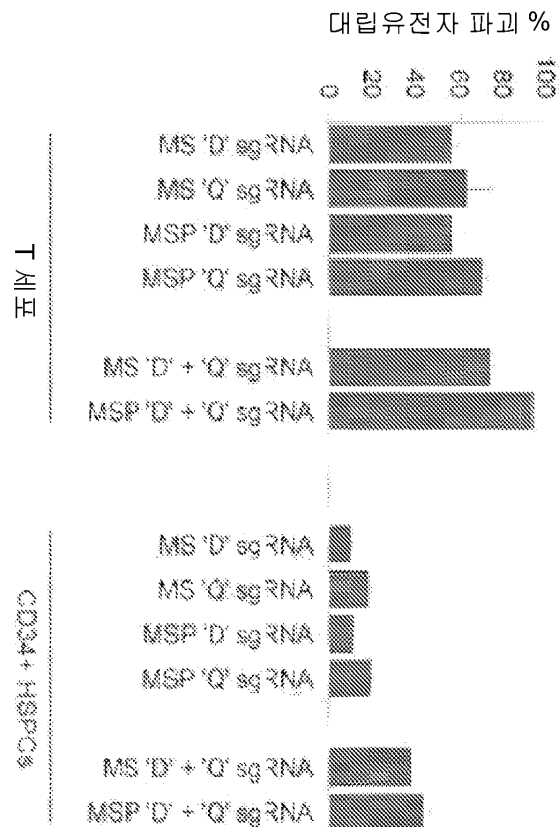
도면12b



도면12c



도면12d



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> Agilent Technologies, Inc.
- <120> GUIDE RNA WITH CHEMICAL MODIFICATIONS
- <130> 20150013-04
- <140> PCT/US2015/000143
- <141> 2015-12-03
- <150> US 62/087,211
- <151> 2014-12-03
- <150> US 62/146,189
- <151> 2015-04-10
- <150> US 62/256,095
- <151> 2015-11-16
- <160> 127
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1



<211> 1368

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 1

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

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn

210	215	220	
Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn			
225	230	235	240
Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe			
245	250	255	
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp			
260	265	270	
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp			
275	280	285	
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp			
290	295	300	
Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser			
305	310	315	320
Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys			
325	330	335	
Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe			
340	345	350	
Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser			
355	360	365	
Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp			
370	375	380	
Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg			
385	390	395	400
Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu			
405	410	415	
Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe			
420	425	430	
Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile			
435	440	445	
Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp			
450	455	460	

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu  
465 470 475 480  
Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr  
485 490 495  
Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser  
500 505 510  
Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys  
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln  
530 535 540  
Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr  
545 550 555 560  
Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp  
565 570 575  
Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly  
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp  
595 600 605  
Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr  
610 615 620  
Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala  
625 630 635 640  
His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr  
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp  
660 665 670  
Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe  
675 680 685  
Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe  
690 695 700  
Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu

705	710	715	720
His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly			
	725	730	735
Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly			
	740	745	750
Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln			
	755	760	765
Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile			
	770	775	780
Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro			
785	790	795	800
Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu			
	805	810	815
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg			
	820	825	830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys			
	835	840	845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg			
	850	855	860
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys			
865	870	875	880
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys			
	885	890	895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp			
	900	905	910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr			
	915	920	925
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp			
	930	935	940
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser			
945	950	955	960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg  
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val  
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe  
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala  
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe  
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala  
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu  
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val  
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys  
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro  
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val  
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys  
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser  
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys  
1175 1180 1185

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



1190                      1195                      1200  
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly  
1205                      1210                      1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val  
1220                      1225                      1230  
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
1235                      1240                      1245  
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys  
1250                      1255                      1260  
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys  
1265                      1270                      1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala  
1280                      1285                      1290  
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn  
1295                      1300                      1305  
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala  
1310                      1315                      1320  
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
1325                      1330                      1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr  
1340                      1345                      1350  
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
1355                      1360                      1365

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 2

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1                      5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 3

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1 5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<220><221> misc\_feature

<223> tat protein

<400> 5

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

1 5 10 15

Lys Arg Lys Val

20

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<220><221> misc\_feature

<223> middle S protein, partial

<400> 6

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

1 5 10 15

Arg Lys Val

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

1 5 10 15

Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 8

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20 25

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 9

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 10

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 10

agaatttaac tgtggtcaca ttgtctttat cgactggctt catctcacag ctcattcttac 60  
gcaagttcga tgagtatgcc agtcactttc aatttggttg aatgttcccg tgacatgcga 120  
gttctgtcga ccatgtgccg cggattgaat tcctcaaggg tggatgata tgctacggtg 180

gtgatgcga tgcgtcagt cctcatctcc ctcaagcagg ccccgctggt gggtcggagt 240  
ccctagttaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
ggtcgtaaca taaactact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggtat 360  
agactgacgg agagctcgcc attagtctga 390

<210> 11

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 11

agaatttaac tgtggtcaca ttgtctttat cgactggctt catctcacag ctcattcttac 60  
gcaagttcga tgagtatgcc agtcactttc aatttggttg aatgttcccg tgacatgcga 120

gttctgtcga ccatgtgccg cggattgaat tcctcaaggg tggatgata tgctacggtg 180  
gtgatgcga tgcactcagt cctcaactcc ctcaagcagg cgacccttg gggtcggagt 240  
ccctagttaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
ggtcgtaaca taaactact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggtat 360  
agactgacgg agagctcgcc attagtctga 390

<210> 12

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 12

agaatttaac tgtggtcaca ttgtctttat cgactggctt catctcacag ctcattcttac 60

gcaagttcga tgagtatgcc agtcactttc aatttggttg aatgttcccg tgacatgcga 120  
gttctgtcga ccatgtgccg cggattgaat tcctcaaggg tggatgata tgctacgggtg 180  
gtgatgcaat aaatttcagc cctcatttcc ctcaagcagg gggtacttta gggtcggagt 240  
ccctagttaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
ggtcgtaaca taaacgtact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggtat 360  
agactgacgg agagctcgcc attagtctga 390

<210> 13

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 13

agaatttaac tgtggtcaca ttgtctttat cgactggctt catctcacag ctcatcttac 60  
gcaagttcga tgagtatgcc agtcactttc aatttggttg aatgttcccg tgacatgcga 120  
gttctgtcga ccatgtgccg cggattgaat tcctcaaggg tggatgata tgctacgggtg 180  
gtgatgctct ccagccact cctcatccc ctcaagccgg tcccaggctg gggtcggagt 240  
ccctagttaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
ggtcgtaaca taaacgtact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggtat 360  
agactgacgg agagctcgcc attagtctga 390

<210> 14

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 14

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60  
cacggaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa 240  
attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgga 300  
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgaa 360  
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 480  
 taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccattt agagcttgac ggggaaagcc 540  
 ggcgaaactg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600  
 aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 660  
 gggcgctcc cattcgccat tcagctgcg caactgttg gaaggcgat cggcgccggc 720  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
  
 aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840  
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcgcaggcca aagatgtctc 900  
 ccgcatgcgc tcagtctca tctccctcaa gcaggccctg ctggtgcact gaagagccac 960  
 cctgtgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca 1080  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 1140  
 ctacattaa ttgcgttcg ctactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200  
  
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc 1260  
 gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 1440  
 cataggtcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560  
 cctgttccga cctgccgt tactcgatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg 1620  
  
 gcgctttctc atagctcag ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680  
 ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag ccgaccgt gcgccttacc cggtaactat 1740  
 cgtcttgagt ccaacccgtt aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggttagca gagcgaggta ttaggcggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 1860  
 tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc tgcgaagcc agttaccttc 1920  
 ggaaaaagag ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt 1980  
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
  
 ttttctacgg ggctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gtttaagggt tttggcatg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatagta aacttggct gacagttacc aatgttaat cagtgggca 2220  
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag 2280



ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340  
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460

agagtaagta gticgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
gtggtgtcac gtcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tcctccgac 2640  
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760  
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgtcttt gcccgcgctc aatacgggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 15

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 15

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60  
cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa 240  
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300  
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgaa 360

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 480  
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540  
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600  
aagtgtagcg gtcacgtcg gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 660  
gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720  
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780

aacgccaggg ttttccagc cagcagttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840  
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcgcagggca aagaggtctc 900

ctgtatgcac tcagtctca actccctcaa gcaggcgacc cttggtgcac tgacaaaccg 960  
 ctctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatt agtgagctaa 1140  
 ctacacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200  
  
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260  
 gcttctctcg tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggatcagct 1320  
 cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1440  
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560  
 cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg 1620  
  
 gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctctagttcg ttaggtcgt tcgctccaag 1680  
 ctgggctgtg tgcagcaacc cccgcttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 1740  
 cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 1860  
 tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc tgcgaagcc agttacctc 1920  
 ggaaaaagag ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtaggttt 1980  
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
  
 tttctacgg ggctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gtaagggtat ttgggtcatg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220  
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc cgtcgttag 2280  
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac 2340  
 ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460  
  
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
 gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580  
 cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc 2640  
 gtgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgtcttt gcccgcgctc aatacgggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 16

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 16

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60  
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa 240  
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300  
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttgc cagtttgtaa 360

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 480  
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgatatt agagcttgac ggggaaagcc 540  
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcggcgctca gggcgctggc 600  
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca 660  
gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720  
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt 780

aacgccaggg ttttccagt cagcagttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840  
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcgggcc tcaggagagg gagccatgct 900  
catctccagc ccactctca tccccctcaa gccggtccca ggctgagagg ctaaagcttg 960  
tctttgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080  
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaagt agtgagctaa 1140  
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200

ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtatttg gcgctcttcc 1260  
gttctctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	1440
cataggtcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aacccgacag gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgtctt	1560
cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg	1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgtccaag	1680
ctgggtgtg tgcacgaacc cccgttcag ccgaccgt gcgccttacc cggtaactat	1740
cgtcttgagt ccaacccgt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1800
aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac	1860
tacggctaca ctagaaggac agtatattgt atctgcgtc tgcgaagcc agttacctc	1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt	1980
ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg	2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca	2160
atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtggagca	2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag	2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac	2340
ccacgtcac cggtccaga ttatcagca ataaaccage cagccggaag ggccgagcgc	2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct	2460
agagtaagta gttgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc	2520
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggtc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg	2580
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac	2640
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat	2700
ttctttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag	2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat	2820
aataccgcgc cacatagc	2838

<210> 17

<211> 2995

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 17

gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac 60  
 tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc 120  
 gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg 180  
 aaggagctaa ccgtttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg 240  
 gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca 300  
 atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttcccggcaa 360

caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt 420  
 ccggtcggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 480  
 attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg 540  
 agtcaggcaa ctatgatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt 600  
 aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 660  
 catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaaatc 720  
 ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 780

tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 840  
 ccagcgttgg ttgttttccc ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc 900  
 ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagt aggccaccac 960  
 ttcaagaact ctgtagcacc gccacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 1020  
 ctgcccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggtttgact caagacgata gttaccggat 1080  
 aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 1140  
 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga 1200

gggagaaagg cggacaggt tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 1260  
 gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 1320  
 cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 1380  
 aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgtcacat gttctttcct 1440  
 gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct 1500  
 cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca 1560  
 atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 1620

tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 1680  
 taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc 1740  
 ggataacaat ttacacaggg aaacagctat gaccatgatt acgccaagcg cgcaattaac 1800  
 cctcactaaa gggaacaaaa gctgggtacc gggccccccc tcgacaccag ttgcattcga 1860

ttcctgtttg taattgtcca attcctgcag cccgggggat cggcagatgt agtgtttcca 1920  
caggggatcc actagtctta gageggccgc caccgcggtg gagctccaat tcgccctata 1980  
gtgagtcgta ttacgcgcgc tcaactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 2040

ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata 2100  
gcgaagaggc cgcaccgat cgcccttccc aacagttagc cagcctgaat ggcgaatgga 2160  
aattgtaagc gttataatit ttgttaaaatt cgcgttaaat tttgtttaa tcagctcatt 2220  
ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat 2280  
agggttagt gttgttccag tttggaacaa gaggccacta ttaaagaacg tggactccaa 2340  
cgtcaaaggc gaaaaaacg tctatcaggc cgtggccca ctacgtgaac catcaccta 2400  
atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta aaggagccc 2460

ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc 2520  
gaaaggagcg ggcgctaggc cgctggcaag ttagcggtc acgtgcgcg taaccaccac 2580  
acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggc cgcgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 2640  
gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aataattca aatatgtatc cgctcatgag 2700  
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca 2760  
tttccgtgtc gcccttattc cttttttgc ggcatittgc cttcctgttt ttgctcacc 2820  
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 2880

cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 2940  
aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtt ttatcccgta ttgac 2995

<210> 18  
<211> 2838  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<400> 18

gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60  
cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata tttgtttaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300  
aatcccttat aaatcaaaa aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa 360



caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa cgtctatca	420
ggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggt cgaggtgccg	480
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc	540
ggcgaacgtg gcgaaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcggcgcta gggcgctggc	600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgttaatg cgccgtaca	660
ggcgcgctcc cattgccat tcaggtgcg caactgttg gaaggcgat cgtgcggc	720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt	780
aacgccagg tttccagt cagcagctt taaaacgac gccagtgac gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcggcc tcaagagctt cactgagtag	900
gattaagata ttgcagatgt agtgtttcca cagggtggct cttcagtga ccagcggaac	960
ctgctgcgc tgatatgac ctccagctt ttgtccctt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca	1080
cacaacatac gagccgaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccg gctttcagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgtcttcc	1260
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgtcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320
cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggcaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgttttc	1440
cataggtcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct	1560
cctgttccga cctgccgt taccggatac ctgtccgct ttctcccttc gggaagcgtg	1620
gcgtttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag	1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag ccgaccgt gcgccttacc cggtaactat	1740
cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac	1800
aggattagca gagcgaggtg ttagggcgt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	1860
tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgtc tgctgaagcc agttacctc	1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgttggtttt	1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2040
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gtttaaggat ttgtgtcatg	2100
agattatcaa aaaggtctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca	2160
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca	2220

cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 2640  
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
tctcttactg tcatgccatc cgtaaatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 19  
<211> 2838  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<400> 19

gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 60  
cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgtaata ttttgttaaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggcgc aaatcggcaa 300  
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttgga 360  
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
gggcgatggc ccaactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggtg cgagggtgccg 480  
taaagcacta aatcggaaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540  
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600  
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgttaatg cgccgtaca 660

gggcgcgtcc cattcgccat tcagctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720  
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840

cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgaatgcggcc tctctgaata gagttgggaa 900

gagatgcata caacataatgt agtatattcca caggaataac aatggacaaa tgacctcaag 960

agcaggcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020

ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080

cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 1140

ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200

ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260

gcttcctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320

cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1440

cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1560

cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct tttcccttc gggaagcgtg 1620

gcgctttctc atagctcac ctgtaggtat ctcaagtccg ttaggtcgt tcgctccaag 1680

ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgt gcgccttacc cggtaacat 1740

cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800

aggattagca gagcgaggta ttagggcgt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 1860

tacggctaca ctagaaggac agtatttgtt atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 1920

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt 1980

tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040

ttttctacgg ggtctgacgc tcaagtgaac gaaaactcac gttaaaggat tttggtcatg 2100

agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160

atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtaggca 2220

cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280

ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400

agaagtggtc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460

agagtaagta gtgcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520

gtggtgtcac gtcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttcca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tctccgac 2640

gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtggtt tcaactcatg ttatggcagc actgcataat 2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag	2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat	2820
aataccgcgc cacatagc	2838
<210> 20	
<211> 2838	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 20	
gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca	60
cacggaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg	120
gttattgtct catgagcgga tacatatctg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata tttgtttaa	240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggcgc aaatcggcaa	300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgga	360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caactcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca	420
gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttggggc cgaggcgccg	480
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc	540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcggcgctga gggcgctggc	600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca	660
gggcgcgtcc cattgccat tcagctgcg caactgttg gaaggcgat cggcgcggc	720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt	780
aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcgggc tcgggcagct gcaggaataa	900
gagggatgtg aatggtaatg atggtctcaa catggcgctt gctcttcatt ccctgggtgt	960
agtctgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcggcc accgcggggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc	1260
gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320

cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1440  
cataggtcc gcccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtctt 1560  
cctgttccga cctgcccgtt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg 1620  
gcgttttctc atagctcacg ctgtagggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1680  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaactat 1740  
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860  
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 1980  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg 2100  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaatatgaag ttttaaatca 2160  
atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460  
agagtaagta gtccgccagt taatagtgtg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggt tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580  
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tectccgac 2640  
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 21  
<211> 2838  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct

<400> 21

gcgttttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga	60
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg	120
gttattgtct catgagcggg tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa	240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa	300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgga	360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca	420
gggcgatggc ccaactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggtg cgaggcgccg	480
taaagcacta aatcggaaac ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc	540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc	600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca	660
gggcgcgtcc cattcgccat tcaggtgctg ccaactgttg gaagggcgat cggcgccggc	720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt	780
aacgccaggg ttttccagc cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcttccttac tgcagccgaa	900
gtccggcctc aggatgttgt cgatgaaaaa gttagtggtg cgggtgcagct gggccgctgg	960
ctgcggcgcg tgatatcgac ctccagcttt tgttccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtatttg gcgctcttc	1260
gcttctctcg tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgttttc	1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct	1560
cctgttccga cctgccgtt taccggatac ctgtccgctt tttcccttc gggaagcgtg	1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgattcgg tgtaggtcgt tcgctccaag	1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaactat	1740
cgtctttagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1800



aggattagca gagcgaggta ttaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860  
 tacggctaca ctagaaggac agtatattggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 1980  
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220  
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc cgtcgtgtag 2280  
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460  
 agagtaagta gticgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
 gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggc tcattcagct ccggttcca acgatcaagg 2580  
 cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tectccgac 2640  
 gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtt tcatctatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
 tctcttactg tcatgccac cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 22  
 <211> 2838  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 22

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgga 60  
 cacggaaatg ttgaatactc atactcttc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
 gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaaattgta agcgttaata tttgtttaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300  
 aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa 360  
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgagggtgccg 480  
 taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540  
 ggcgaaactg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600  
 aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 660  
  
 gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
 aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840  
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcgtccttcc gccggccgaa 900  
 ctcgggccgc aggatgttgt cgatgaagaa gttggtgatg cgggtcgggg gctgggtggt 960  
 gccgggcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080  
  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 1140  
 ctacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 1260  
 gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1440  
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
  
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtctt 1560  
 cctgttccga cctgccgct taccggatac ctgtccgctt tcttcccttc gggaagcgtg 1620  
 gcgctttctc atagctcac ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1680  
 ctgggtgtg tgcacgaacc cccgttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 1740  
 cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcgaggta ttaggcggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 1860  
 tacggctaca ctagaaggac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920  
  
 ggaaaaagag ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgtggttag cgggtgtttt 1980  
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
 ttttctacgg ggctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaaggat tttggcatg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgttaat cagtgaggca 2220  
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag 2280

ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400

agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460

agagtaagta gticgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520

gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tcctccgac 2640

gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtt tcatctatgg ttatggcagc actgcataat 2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcatcttgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820

aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 23

<211> 2838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 23

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120

gttattgtct catgagcggg tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180

ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa 240

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 300

aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgga 360

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggc cgaggtgccg 480

taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540

ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 600

aagtgtagcg gtcacgtcgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 660

gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 720

ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780

aacgccaggg ttttccagc cagcaggttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 840

cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tcggaacatt ggtaattaaa 900

cttaacgcct cagatttaga cgaaggattg aatggggaca ttgtttattc attctcgaat	960
gatacgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctccactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc	1260
gcttctctcg tctactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggatcagct	1320
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1380
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	1440
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1500
aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	1560
cctgttccga cctgccgct taccggatac ctgtccgctt tttcccttc gggaagcgtg	1620
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctccagtccg tgtaggtcgt tcgctccaag	1680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaactat	1740
cgtctttagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	1800
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	1860
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgaagcc agttacctc	1920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt	1980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2040
ttttctacgg ggctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaagggt tttggcatg	2100
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca	2160
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca	2220
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag	2280
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac	2340
ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc	2400
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct	2460
agagtaagta gttgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc	2520
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg	2580
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc	2640
gtgtcagaa gtaagtggc cgcaagtgtta tctcatgg ttatggcagc actgcataat	2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag	2760
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat	2820
aataccgcgc cacatagc	2838
<210> 24	
<211> 2838	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 24	
gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca	60
cacggaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg	120
gttattgtct catgagcgga tacatatctg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	180
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac cttaaattga agcgtaata tttgtttaa	240
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggcgc aaatcggcaa	300
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagtttgga	360
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caactcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca	420
gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttggggc cgaggcgccg	480
taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc	540
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcggcgctga gggcgctggc	600
aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca	660
gggcgcgtcc cattgccat tcagctgcg caactgttg gaaggcgat cggcgcggc	720
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt	780
aacgccaggg ttttccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata	840
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatcgggc tcggaacgt ggtgattcat	900
cccaatgcct cagatttaga cgaaggcttg aatggggata ttatttactc cttctccagt	960
gatgtgcgcg tgatatgcag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	1020
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca	1080
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa	1140
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag	1200
ctgcattaat gaatcggcc acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc	1260
gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1320

cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1440  
cataggtcc gcccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtctt 1560  
cctgttccga cctgcccgtt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg 1620  
gcgttttctc atagctcacg ctgtagggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1680  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag ccgaccgct gcgccttata cggtaactat 1740  
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860  
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 1920

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 1980  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat ttgggtcatg 2100  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaatatgaag ttttaaatca 2160  
atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 2220  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340

ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 2460  
agagtaagta gtgcgccagt taatagttag cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tectccgac 2640  
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 2760

tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 25  
<211> 56  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct



<400> 25	
aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaucguguu ugaauaggucc caaaac	56
<210> 26	
<211> 86	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 26	
ggaaccuuc aaaacagcau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuau aacuuguaaa	60
aguggcaccg agucggugcu uuuuuu	86
<210> 27	
<211> 56	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 27	
ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uaucguguu ugaauaggucc caaaac	56
<210> 28	
<211> 86	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 28	
ggaaccuuc aaaacagcau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuau aacuuguaaa	60
aguggcaccg agucggugcu uuuuuu	86
<210> 29	
<211> 56	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 29	
aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaucguguu ugaauaggucc caaaac	56
<210> 30	

<211> 86  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (57)..(57)  
 <223> u is 5-(3-Aminoallyl)-uridine-5'-triphosphate, labeled with Cyanine5  
 <400> 30  
 ggaaccauuc aaaacagcau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60  
 aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 31  
 <211> 56  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-methyl  
 <222> (1)..(3)  
 <220><221> 2'-O-methyl  
 <222> (53)..(55)  
 <400> 31  
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uaucguguu ugaauagguc caaaac 56  
 <210> 32  
 <211> 86  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl  
 <222> (1)..(3)  
 <220><221> 2'-O-Methyl  
 <222> (83)..(85)  
 <400> 32  
 ggaaccauuc aaaacagcau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60  
 aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 33

<211> 56

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220><221> 2'-O-Methyl

<222> (53)..(55)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (53)..(56)

<400> 33

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 34

<211> 86

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (83)..(85)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (83)..(86)

<400> 34

ggaaccuauuc aaaacagcau agcaaguuaa aauaaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 35

<211> 56

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (53)..(55)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (53)..(56)

<400> 35

ugguaaугau ggcucaaca guuuuagagc uaugcугuuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 36

<211> 86

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (83)..(85)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (83)..(86)

<400> 36

ggaaccauuc aaaacagcau agcaaguuua aauaaggcua guccгuuauв aacuугuaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 37

<211> 56

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (55)..(55)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (55)..(56)  
 <400> 37  
 ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauuggucc caaaac 56  
 <210> 38  
 <211> 86  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (85)..(85)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (85)..(86)  
 <400> 38  
 ggaaccuauuc aaaacagcau agcaaguuuu aauaaggcua guccguuauuc aacuuguuaaa 60  
 aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86  
 <210> 39  
 <211> 56  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2-thiouridine nucleotide

<222> (3)..(3)

<400> 39

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuguuu ugaauaggucc caaaac 56

<210> 40

<211> 56

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2-thiouridine nucleotide

<222> (9)..(9)

<400> 40

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuguuu ugaauaggucc caaaac 56

<210> 41

<211> 56

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2-thiouridine nucleotide

<222> (11)..(11)

<

400> 41

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuguuu ugaauaggucc caaaac 56

<210> 42

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 42

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 43

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct



<400> 43  
aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 44  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct

<400> 44  
gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaaau 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 45  
<211> 111  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct

<400> 45  
uccucaucuc ccucaagcgu uuaagagcua ugcugguaac agcauagcaa guuuaaaaua 60

ggcuaguccg uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg gugcuuuuuu u 111

<210> 46  
<211> 110  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct

<400> 46  
ccucaucucc cucaagcguu uaagagcuau gcugguaaca gcuaagcaag uuuuaaaag 60  
gcuaguccgu uaucaacuug aaaaaguggc accgagucgg ugcuuuuuuu 110

<210> 47  
<211> 114  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct

<400> 47

gaguccuau cucccucaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuuuaa 60

uaaggcuagu ccguuuauca cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

<210> 48

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 48

ggaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuuaa 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 49

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 49

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaaucuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 50

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 50

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaaacuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 51

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 51

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaaacuaguu uguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 52

<211> 111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 52

ggacuuuuuu uaguccucau cucccucaag cguuuuagag cuagaaauag caaguuuuuu 60

uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu u 111

<210> 53

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 53

gaugaggacu uuuuuuaguc cucaucucc ucaagcguu uagagcuaga aaugcaagu 60

uaaaauaagg cuaguccguu aucaacuuga aaaaguggca ccgagucggu gcuuuu 116

<210> 54

<211> 111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 54

gcuuguuuuu uaguccucau cucccucaag cguuuuagag cuagaaauag caaguuuuuu 60

uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu u 111

<210> 55

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> a is 5'-dimethoxytrityl-adenosine

<222> (1)..(1)

<400

> 55

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 56

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 56

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 57

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> fluorophore

<222> (39)..(39)

<220><221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> n is a, c, g, or u, unknown or other

<400> 57

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 58

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl

<222> (1)..(3)

<220><221> fluorophore

<222> (39)..(39)

<220><221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> n is a, c, g, or u, unknown or other

<220><221> 2'-O-Methyl

<222> (110)..(112)

<400> 58

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 59

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220>

><221> fluorophore

<222> (39)..(39)

<220><221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> n is a, c, g, or u, unknown or other

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (110)..(112)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (110)..(113)

<400> 59

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 60

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ 

- > synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (3)$ 

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (4)$ 

<220><221> fluorophore

<222> (39)..(39)

<220><221> misc\_feature

$$\langle 222 \rangle \quad (39) \dots (39)$$

<223> n is a, c, g, or u, unknown or other

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (109), ., (111)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (109)..(112)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

$\langle 222 \rangle$  (110).. $\langle 112 \rangle$

<400> 60

aguccucauc ucccucaagc guuuaaagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 61

<211> 102

<212> RNA

### <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

$$\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (1)$$

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

 $\langle 222 \rangle$  (1).. $\langle 2 \rangle$ 

<220><221> fluorophore

$$\langle 222 \rangle \quad (2) \dots (2)$$

<220><221> misc\_feature

$$\langle 222 \rangle \quad (2) \dots (2)$$

<223> n is a, c, g, or u, unknown or other

<220><221> fluorophore  
 <222> (68)..(68)  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (68)..(68)  
 <223> n is a, c, g, or u  
 <220><221> fluorophore  
 <222> (100)..(100)  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (100)..(100)  
 <223> n is a, c, g, or u  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (101)..(101)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (101)..(102)  
 <400> 61  
 ungacagugu aguguuuucca caguuuuaga gcuaguaaau gcaaguuuua auaaggcuag 60  
 uccguuanca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcun uu 102  
 <210> 62  
 <211> 100  
 <212> RNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> fluorophore  
 <222> (34)..(34)  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (34)..(34)  
 <223> n is a, c, g, or u, unknown or other  
 <220><221> fluorophore  
 <222> (74)..(74)



<220><221> misc\_feature  
 <222> (74)..(74)  
 <223> n is a, c, g, or u, unknown or other  
 <220><221> fluorophore  
 <222> (90)..(90)

<220><221> misc\_feature  
 <222> (90)..(90)  
 <223> n is a, c, g, or u, unknown or other  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (99)..(99)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (99)..(100)  
 <400> 62

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuuuuuu aaggcuaguc 60  
 cguuaucaac uugnaaaagu ggcaccgagn cggugcuuuu 100

<210> 63  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (1)..(3)  
 <400> 63

aguccucauc uccucaagc guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 64  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> phosphorothioate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(4)  
 <400> 64

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 65  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage  
<222> (1)..(5)  
<400> 65

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 66  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage  
<222> (109)..(113)

<400> 66

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 67  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
<222> (20)..(20)  
<400> 67

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 68

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (19)..(19)

<400> 68

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 69

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (18)..(18)

<400> 69

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 70

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (17)..(17)

<400> 70

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 71

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (17)..(18)

<400> 71

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 72

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (110)..(112)

<400> 72

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 73

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (110)..(112)

<400> 73

gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 74

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(20)

<400> 74

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 75

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(26)

<400> 75

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210>

76

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(37)

<400> 76

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 77

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(7)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222>  
 > (9)..(11)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (13)..(14)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (20)..(20)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (30)..(31)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (33)..(33)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (35)..(36)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (42)..(42)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (45)..(45)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (76)..(77)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222>  
 (80)..(82)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (90)..(90)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (95)..(96)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (100)..(101)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (104)..(104)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (106)..(112)  
 <400> 77

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu

60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu

113

<210> 78

<211> 113

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(7)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (9)..(11)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (17)..(17)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (27)..(28)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (30)..(30)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (32)..(33)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (36)..(36)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (39)..(39)

<

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (42)..(42)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (44)..(44)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (47)..(47)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (57)..(57)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (62)..(63)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide



<222> (67)..(68)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (73)..(74)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (77)..(78)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (87)..(87)  
 <  
 220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (90)..(90)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (92)..(93)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (97)..(98)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (101)..(101)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (103)..(109)  
 <400> 78  
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
 <210> 79  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(7)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (9)..(11)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (17)..(17)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (27)..(28)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (30)..(30)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (32)..(33)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (36)..(36)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (39)..(39)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
  
 <222> (42)..(42)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (44)..(44)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (47)..(47)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (57)..(57)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (62)..(63)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (67)..(68)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (73)..(74)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (77)..(78)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (87)..(87)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
  
 <222> (90)..(90)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (92)..(93)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (97)..(98)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (101)..(101)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (103)..(109)

<400> 79

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 80

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (8)..(8)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (17)..(18)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (21)..(21)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (26)..(26)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (28)..(29)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (32)..(32)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (34)..(34)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (37)..(38)

<220>

><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (40)..(41)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (43)..(44)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (46)..(46)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (48)..(49)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (51)..(52)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (58)..(58)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (61)..(64)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (67)..(67)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (78)..(79)

<220>

><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (83)..(89)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (91)..(92)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (94)..(94)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (97)..(99)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (102)..(103)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (105)..(105)

<400> 80

aguccucauc uccucaagc guuuuagagc uaucguggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210>

81

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(3)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (8)..(8)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (17)..(18)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (21)..(21)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (26)..(26)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (28)..(29)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (32)..(33)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
  
 <222> (35)..(36)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (38)..(39)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (41)..(42)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (46)..(46)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (48)..(48)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (51)..(54)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (57)..(57)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (68)..(69)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (73)..(79)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (81)..(82)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (84)..(84)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (87)..(89)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (92)..(93)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (95)..(95)

<400> 81

aguccucauc uccucaagc guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 82

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (110)..(112)

<400> 82

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 83

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (6)..(6)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (8)..(8)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (11)..(11)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (13)..(17)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (30)..(31)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (33)..(33)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (35)..(36)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (39)..(39)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (42)..(42)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (45)..(45)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222>  
 > (47)..(47)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (50)..(50)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (56)..(56)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (60)..(60)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (65)..(66)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (69)..(71)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (76)..(77)



<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (80)..(82)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (90)..(90)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222>

> (93)..(93)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (95)..(96)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (100)..(101)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (104)..(104)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (106)..(112)

<400> 83

gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 84

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(5)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (26)..(29)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (32)..(33)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (35)..(36)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (38)..(39)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (41)..(42)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (46)..(46)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (48)..(49)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (52)..(54)

<220>

><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (57)..(57)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (68)..(69)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (73)..(79)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (81)..(82)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (84)..(84)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (87)..(89)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (92)..(93)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (95)..(95)

<400> 84

gcagauaguag uguuuccaca guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 85

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (6)..(6)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (8)..(8)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (11)..(11)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (13)..(17)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (25)..(25)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (30)..(31)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (34)..(34)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (37)..(37)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (40)..(40)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (50)..(50)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (55)..(56)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (59)..(61)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (66)..(67)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (70)..(72)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (80)..(80)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (83)..(83)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (85)..(86)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (90)..(91)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (94)..(94)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (96)..(99)  
 <400> 85  
 gcagauagug uguuuccaca guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100  
 <210>  
 86  
 <211> 113  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-deoxy-nucleotide  
 <222> (1)..(20)  
 <400> 86  
 agtcctcadc tccctcaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
 <210> 87  
 <211> 113  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-deoxy-nucleotide  
 <222> (1)..(26)  
 <400> 87  
 agtcctcadc tccctcaagc gttaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
 <210> 88  
 <211> 113  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-deoxy-nucleotide  
 <222> (1)..(37)  
 <400> 88  
 agtcctcatc tcctcaagc gtttaagagc tatgctggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113  
 <210> 89  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-deoxy-nucleotide  
 <222> (15)..(15)  
 <220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (15)..(16)  
 <400> 89  
 gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113  
 <210> 90  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <400> 90  
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113  
 <210> 91  
 <211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(2)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(3)

<400> 91

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 92

<211> 113

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<400> 92

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 93

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(4)

<220>

><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(5)

<400> 93

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 94

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(5)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(6)

<400> 94

ggaguccuca ucuccucaaa gcguuuuaga gcuaucgugg uaacagcaua gcaaguuuuaa 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 95

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (109)..(112)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (109)..(113)

<400> 95

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 96

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (108)..(112)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage



<222> (108)..(113)

<400> 96

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 97

<211> 114

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 5'-overhang (5' to the 20-nt guide sequence)

<222> (1)..(1)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<400> 97

caguccucau ccccucaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuuuu 60

uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

<210> 98

<211> 114

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 5'-overhang (5' to the 20-nt guide sequence)

<222> (1)..(1)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<400> 98

gaguccucau ccccucaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuuuu 60

uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

<210> 99

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 5'-overhang (5' to the 20-nt guide sequence)

<222> (1)..(2)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(5)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(6)

<400> 99

ucaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuaa 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 100

<211> 115

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 5'-overhang (5' to the 20-nt guide sequence)

<222> (1)..(2)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(5)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(6)

<400> 100

agaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuaa 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 101

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 5'-overhang (5' to the 20-nt guide sequence)

<222> (1)..(3)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(7)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(8)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (112)..(115)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (112)..(116)

<400> 101

cucaguccuc aucucccuca agcguuuaag agcuaugcug gaaacagcau agcaaguuaa 60

aaauaaggcua guccguuauc aacuugaaaa aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 116

<210> 102

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (20)..(20)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (20)..(21)

<400> 102

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 103

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (19)..(20)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (19)..(20)

<400> 103

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 104

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221>

2'-O-Methyl nucleotide

<222> (18)..(18)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (18)..(19)

<400> 104

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 105

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (17)..(17)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (17)..(18)

<400> 105

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 106

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (17)..(18)

<220><221> phosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (17)..(19)

<400> 106

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 107

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (110)..(112)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (110)..(113)

<400> 107

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 108

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage

<222> (1)..(4)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (108)..(112)

<220><221> phosphorothioate internucleotide linkage  
 <222> (108)..(113)  
 <400> 108  
 gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 109  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(5)  
 <220><221> phosphorothioate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(6)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (108)..(112)  
 <220><221> phosphorothioate internucleotide linkage  
 <222> (108)..(113)  
 <400> 109  
 gcagauag uuuuuccaca guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 110  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (110)..(112)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (110)..(113)  
 <400> 110  
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 111  
 <211> 113  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (112)..(112)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (112)..(113)  
 <400> 111  
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 112  
 <211> 75  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(3)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(4)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (72)..(74)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (72)..(75)



<400> 112  
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuu 75

<210> 113  
 <211> 77  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (76)..(76)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (76)..(77)

<400> 113  
 aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60  
 aaggcuaguc cguuuau 77

<210> 114  
 <211> 78  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (1)..(1)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (1)..(2)  
 <220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
 <222> (77)..(77)  
 <220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
 <222> (77)..(78)  
 <400> 114

gaguccuau cuccucaag cguuuagag cuagcuggu aacagcauag caaguuaaa 60  
uaaggcuagu ccguuau 78

<210> 115  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
<222> (1)..(3)  
<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
<222> (1)..(4)  
<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
<222> (110)..(112)  
<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
<222> (110)..(113)  
<400> 115

gcagauguag uguuuccaca guuuagagc uagcuggaa acagcauagc aaguuaaa 60  
aaggcuaguc cguuauaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu uuu 113

<210> 116  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
<222> (1)..(1)  
<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
<222> (1)..(2)  
<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide  
<222> (112)..(112)  
<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage  
<222> (112)..(113)  
<400> 116

gcagauguag uguuuccaca guuuagagc uagcuggaa acagcauagc aaguuaaa 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 117

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 117

gauguugucg augaaaaagu guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 118

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2-aminoadenosine

<222> (15)..(15)

<400> 118

gauguugucg augaaaaagu guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 119

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 119

gauuuagacg aaggauugaa guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 120

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2-aminoadenosine

<222> (15)..(15)

<400> 120

gauuuagacg aaggauugaa guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 113

<210> 121

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 5-methylUridine

<222> (6)..(6)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (8)..(8)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (11)..(11)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (13)..(15)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (31)..(31)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (33)..(33)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (36)..(36)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (39)..(39)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (47)..(47)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (81)..(82)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (90)..(90)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (104)..(104)

<220><221> 5-methylUridine

<222> (107)..(112)

<400> 121

gcagauagug uguuuccaca guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 122

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> Z base

<222> (70)..(71)

<223> Z base

<220><221> misc\_feature

<222> (70)..(71)

<223> n is a, c, g, or u, or unknown or other

<400> 122

aguccucauc uccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuagun nguaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 123

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(1)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(2)

<220><221> 2'-O-Methyl-nucleotide

<222> (54)..(54)

<220><221> 2'-O-Methyl-nucleotide

<222> (57)..(57)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (99)..(99)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (99)..(100)

<400> 123

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaguaauagc aaguuuuuuu aagguuuuau 60

cguuuaucaac aagaaaauugu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 124

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(1)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(2)

<220><221> 2'-O-Methyl-nucleotide

<222> (64)..(64)

<220><221> 2'-O-Methyl-nucleotide

<222> (67)..(67)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (112)..(112)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (112)..(113)

<400> 124

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aagguuuuau cguuuaucaac aagaaaauugu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 125

<211> 113

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> Z base

<222> (95)..(96)

<223> Z base

<220><221> misc\_feature

<222> (95)..(96)

<223> n is a, c, g, or u, or unknown or other

<400> 125

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcannagau cggugcuuuu uu 113

<210> 126

<211> 74

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(1)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(2)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (73)..(73)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (73)..(74)

<400> 126

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu 60

aaggcuaguc cguu 74

<210> 127

<211> 75

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (1)..(1)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (1)..(2)

<220><221> 2'-O-Methyl nucleotide

<222> (74)..(74)

<220><221> thiophosphonoacetate internucleotide linkage

<222> (74)..(75)

<400> 127

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuau 60

aaggcuaguc cguua 75