



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0149727
(43) 공개일자 2021년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) C12P 19/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/10 (2013.01)
C12P 19/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7032102
(22) 출원일자(국제) 2020년03월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/021955
(87) 국제공개번호 WO 2020/185811
국제공개일자 2020년09월17일
(30) 우선권주장
62/816,734 2019년03월11일 미국(US)

(71) 출원인
모더나티엑스, 인크.
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지
스퀘어 200
(72) 발명자
엘리히, 조셉
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지
스퀘어 200
라비더우, 에이미, 이.
미국 02451 매사추세츠주 월섬 폰트 스트리트 121
유닛 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 65 항

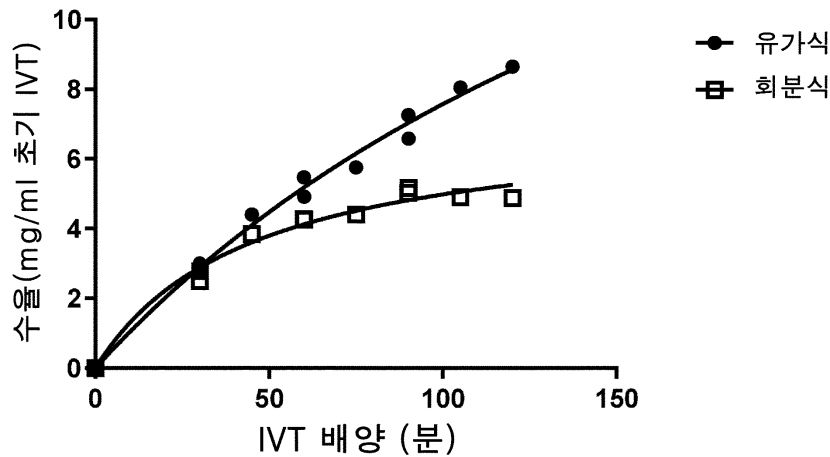
(54) 발명의 명칭 유가식(FED-BATCH) 시험관내 전사 공정

(57) 요약

본 개시는 관심대상의 리보핵산(RNA)을 시험관 내에서 전사하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이와 같은 방법은 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP)의 소모율을 결정하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도24

시간 경과에 따른 IVT 생산성



(72) 발명자

샤마시킨, 마이클

미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지
스퀘어 200

필롯, 로잘리

미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지
스퀘어 200

프리츠, 브라이언

미국 02062 매사추세츠주 노우드 콘코드 애비뉴 88

보체코브스키, 피터

미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 테크놀로지
스퀘어 200

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 시험관 내 전사(IVT) 반응에서 백분율(%) 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP) 소모를 결정하는 방법:

- (a) 알려진 초기 NTP 농도, 관심대상의 리보핵산(RNA)을 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA) 및 RNA 중합효소를 포함하는 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계;
- (b) 일정 기간에 걸쳐 별개의 간격으로 개별 NTP 농도를 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 반응 혼합물 중 각 NTP에 대한 백분율(%) 소모를 계산하는 단계.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 NTP가 아데노신 트리포스페이트(ATP), 사이티딘 트리포스페이트(CTP), 우리딘 트리포스페이트(UTP) 및 구아노신 트리포스페이트(GTP)를 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 단계(b)가 (i) 개별 NTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나누는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 일정 기간에 걸쳐 별개의 간격으로 개별 NTP 농도를 측정함으로써 상기 개별 NTP 소모율이 계산되고; 및 일정 기간에 걸쳐 별개의 간격으로 총 NTP 농도를 측정함으로써 상기 총 NTP 소모율이 계산되는, 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 NTP 중 적어도 하나의 농도가 임계 농도 미만으로 떨어질 때까지 상기 개별 NTP 농도 및 총 NTP 농도 측정치가 수집되는, 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 임계 농도가 영(0) 밀리몰(mM)보다 높고, 선택적으로 상기 임계 농도가 5 mM 내지 20 mM이고 및 선택적으로 상기 임계 농도가 초기 NTP 농도의 5%~75% 내에 속하는, 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 알려진 초기 NTP 농도가 [ATP], [CTP], [UTP] 및 [GTP] 각각의 등몰 NTP 농도를 포함하는, 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 알려진 초기 NTP 농도가 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP]의 비, 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP]의 비를 포함하는, 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 알려진 초기 NTP 농도가 2:1:1:4의 [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP] 비를 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 NTP가 화학적으로 변형된 NTP, 자연적으로 발생하는 NTP, 또는 합성 NTP인, 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 IVT 반응이 20~40분의 시간 간격에 걸쳐 수행되는, 방법.

청구항 12

하기를 포함하는, 관심대상의 리보핵산(RNA)의 유가식 시험관 내 전사(IVT) 방법:

(a) 관심대상의 RNA를 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA), RNA 중합효소 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP)를 포함하는 초기 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계; 및

(b) 시간 경과에 따라, 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 NTP를 포함하는 공급 원료 혼합물을 전달하되, 각 NTP가 각 NTP에 대해 별도로 계산된 백분율 소모값을 기준으로 한 몰비로 상기 공급 원료 혼합물에 존재하고, 상기 백분율 소모값이 관심대상의 RNA에 특이적이며, 상기 공급 원료 혼합물이 상기 반응 혼합물 중 총 NTP 농도를 0 mM 보다 높게 유지시키는 양으로 전달되고,

그에 의해, 관심대상의 전사된 RNA를 생산하는 단계.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 NTP가 아데노신 트리포스페이트(ATP), 사이티딘 트리포스페이트(CTP), 우리딘 트리포스페이트(UTP) 및 구아노신 트리포스페이트(GTP)를 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물이 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 대 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP]비를 포함하는, 방법.

청구항 15

청구항 12에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물이 2:1:1:4의 [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP] 비를 포함하는, 방법.

청구항 16

청구항 12에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 각 NTP에 대해 계산된 백분율(%) 소모값과 상이한 몰비 등가물로 존재하는, 방법.

청구항 17

청구항 12에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 각 NTP에 대해 등몰 농도로 존재하는, 방법.

청구항 18

청구항 12에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 1~10 mM, 1~6 mM, 2~6 mM 또는 3~6 mM의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 19

청구항 12에 있어서, 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 각 NTP의 농도가 그것의 상응하는 초기 NTP 농도의 5% 내지 200%, 5%~100%, 5%~75%, 20%~100%, 20%~75% 또는 25%~50%의 범위 내로 유지되는, 방법.

청구항 20

청구항 12에 있어서, 반응 혼합물이 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP] 비로 유지되는, 방법.

청구항 21

청구항 12에 있어서, 반응 혼합물이 2:1:1:4의 [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP] 비로 유지되는, 방법.

청구항 22

하기를 포함하는, 관심대상의 리보핵산(RNA)의 유가식 시험관 내 전사(IVT)의 방법:

(a) 관심대상의 RNA를 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA), RNA 중합효소 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP)를 포함하는 초기 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하되, 상기 NTP가 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 포함하는 단계; 및

(b) 시간 경과에 따라, 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 NTP를 포함하는 공급 원료 혼합물을 전달하되, 각 NTP가 각 NTP에 대해 별도로 계산된 백분율 소모값을 기준으로 한 몰비로 상기 공급 원료 혼합물에 존재하고, 상기 백분율 소모값이 관심대상의 RNA에 특이적이며 및 상기 공급 원료 혼합물이 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키는 양으로 전달됨으로써,

관심대상의 전사된 RNA를 생산하는 단계.

청구항 23

청구항 12에 있어서, 상기 NTP가 화학적으로 변형된 NTP, 자연발생적인 NTP, 또는 합성 NTP인, 방법.

청구항 24

청구항 12에 있어서, 공급 원료 혼합물이 시간 경과에 따라 볼루스(bolus) 원료 공급을 사용하여 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 공급 원료 혼합물이 10~250분마다, 선택적으로 20~200분마다 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법.

청구항 26

청구항 12에 있어서, 공급 원료 혼합물이 시간 경과에 따라 연속 원료 공급을 사용하여 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 공급 원료 혼합물이 하기의 연속 흐름 속도로 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법:

(i) 2~8 mL/분, 선택적으로 4~6 mL/분; 또는

(ii) 초기 부피 1 mL당 0.0030~0.007 mL/분, 선택적으로 초기 부피 1 mL당 0.0040~0.0060 mL/분.

청구항 28

청구항 12에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 각 NTP에 대해 계산된 백분율(%) 소모값과 동등한 몰비로 존재하는, 방법.

청구항 29

청구항 12에 있어서, 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 총 NTP 농도가 하한치인 0.5 mM보다 높게 유지되고, 선택적으로 10 mM 내지 20 mM으로 유지되는, 방법.

청구항 30

청구항 12에 있어서, 상기 초기 및/또는 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 RNA 캡 유사체를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 RNA 캡 유사체가 화학적으로 변형된 RNA 캡 유사체, 자연적으로 발생하는 RNA 캡 유사체 또는 합성 RNA 캡 유사체인, 방법.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 상기 RNA 캡 유사체가 (i) 선택적으로 캡 1, 캡 2, 캡 3, 또는 캡 4 구조체를 포함하는 트리뉴클레오타이드 캡 유사체에서 선택되는 트리뉴클레오타이드 RNA 캡 유사체, 또는 (ii) 선택적으로 캡 5, 캡

6, 캡 7, 또는 캡 8 구조체를 포함하는 트리뉴클레오타이드 캡 유사체에서 선택되는 테트라뉴클레오타이드 RNA 캡 유사체인, 방법.

청구항 33

청구항 30에 있어서, 상기 초기 및 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 15:1, 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [RNA 캡 유사체]:[퓨린] 비를 포함하는, 방법.

청구항 34

청구항 12에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율이 회분식 IVT 반응을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 큰, 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율이 회분식 IVT 반응을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 적어도 100% 큰, 방법.

청구항 36

청구항 12에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율이 초기 반응 부피가 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30 mg/mL일 때보다 큰, 방법.

청구항 37

청구항 12에 있어서, 상기 초기 및 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 완충제 및/또는 마그네슘을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 완충제가 트리스-HCl이고, 선택적으로 상기 완충제가 20 내지 60 mM 트리스-HCl이고, 선택적으로 상기 완충제가 40 mM 트리스-HCl인, 방법.

청구항 39

청구항 30에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 90%, 선택적으로 적어도 95%가 상기 RNA 캡 유사체를 포함하는, 방법.

청구항 40

청구항 30에 있어서, 캡 유사체 대 ATP 비, 또는 캡 유사체 대 GTP 비가 0.6보다 크고, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 90%가 캡 유사체를 포함하는, 방법.

청구항 41

청구항 39에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA가 길이가 적어도 2000개의 뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 42

청구항 30에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 90%가 IVT 반응 시작 후 180분 및/또는 360분 경에 상기 RNA 캡 유사체를 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 12에 있어서, 상기 초기 및/또는 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 IVT 반응 동안 RNA 캡 유사체로 보충되지 않는, 방법.

청구항 44

청구항 12에 있어서, 초기 반응 혼합물 중 DNA 농도가 0.025~0.075 mg/mL, 선택적으로 0.05 mg/mL인, 방법.

청구항 45

청구항 12에 있어서, DNA 농도가 IVT 반응 동안, 0.01 mg/mL 보다 높게, 선택적으로 0.01~0.05 mg/mL의 농도로 유지되는, 방법.

청구항 46

청구항 12에 있어서, IVT 반응에서 관심대상의 전사된 RNA 대 DNA의 몰비가 무가식(non-fed batch) 대조군 방법의 전사된 RNA 대 DNA의 몰비보다 적어도 2배 또는 적어도 3배 더 큰, 방법.

청구항 47

청구항 23에 있어서, UTP가 1-메틸슈도우리딘 및 1-에틸슈도우리딘에서 선택되는 변형된 UTP인, 방법.

청구항 48

청구항 12에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA가 메신저 RNA(mRNA)인, 방법.

청구항 49

청구항 12에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA가 길이가 100개 초과 뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 50

청구항 12에 있어서, 총 IVT 반응 시간이 150~1000분인, 방법.

청구항 51

청구항 12에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 50% 또는 적어도 70%가 IVT 반응 시작 후 420분 경에 폴리A 꼬리를 포함하는, 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 폴리A 꼬리가 A₁₀₀ 폴리A 꼬리인, 방법.

청구항 53

청구항 30에 있어서, 초기 반응 혼합물이 관심대상의 RNA의 제1 코딩 위치에 존재하는 NTP의 농도보다 적어도 10% 또는 적어도 20% 더 큰 RNA 캡 유사체 농도를 포함하는, 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 관심대상의 RNA의 제1 코딩 위치에 존재하는 NTP가 ATP 또는 GTP인, 방법.

청구항 55

청구항 12에 있어서, RNA 중합효소가 T7 RNA 중합효소인, 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 C-말단에 추가적인 글라이신을 포함하는, 방법.

청구항 57

청구항 55에 있어서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 G47A 치환을 포함하는, 방법.

청구항 58

청구항 55에 있어서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 G47A 치환과 C-말단에 추가적인 글라이신을 포함하는, 방법.

청구항 59

청구항 30에 있어서, RNA 캡 유사체가 디뉴클레오타이드 캡, 트리뉴클레오타이드 캡, 또는 테트라뉴클레오타이드 캡인, 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, RNA 캡 유사체가 트리뉴클레오타이드 서열 GAG, 선택적으로 GpppA₂ OmePG를 포함하는, 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서, RNA 캡 유사체가 테트라뉴클레오타이드 서열 GGAG를 포함하는, 방법.

청구항 62

청구항 12에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

청구항 62에 따른 방법에서 단리된 관심대상의 RNA.

청구항 64

청구항 12에 따른 방법에 의해 생산된 리보핵산(RNA).

청구항 65

청구항 63에 있어서, 양이온 지질 나노입자로 만들되, 선택적으로 상기 양이온 지질 나노입자가 이온화성 양이온 지질 20~60%, 양이온 이외의 지질 5~25%, 스테롤 25~55% 및 PEG-변형 지질 0.5~15%의 물비를 포함하는, RNA.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2019년 3월 11일 출원된 미국 가출원 제62/816,734호의 35 U.S.C. § 119(e) 하의 혜택을 주장하며, 그 전체가 본원에 참조로 통합되었다.

배경 기술

[0003]

시험관 내 전사(IVT)는 박테리오파지 DNA-의존 리보핵산(RNA) 중합효소(예를 들면, SP6, T3 및 T7)를 사용하여 템플릿-유도 mRNA 전사체를 합성한다. IVT 반응은 보통 '회분식(batch)' 반응인데, 그 이유는 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP), 마그네슘, RNA 중합효소, 데옥시리보핵산(DNA) 및 파이로포스파타제를 비롯한 여러 시약이 반응을 시작할 때 조합되기 때문이다. 이 후에, 상기 구성성분들이 배양되고, 상기 뉴클레오타이드들 중 적어도 하나가 고갈될 때까지 상기 반응이 진행된다. 따라서, 상기 반응은 RNA 전사체(생산물)의 낮은 수율을 유발할 수 있는 적어도 하나의 제한적인 시약을 가진다. IVT 반응의 다른 잠재적 단점에는, 예를 들어, 상기 반응 중에 생산된 무산된(절두) 전사체, 끊어짐 없는(run-on) 전사체, 3' 이질성을 생산하는 폴리A 꼬리 변종, 돌연변이가 된 전사체 및/또는 이중가닥 오염물질이 포함된다.

발명의 내용

[0004]

요약

[0005]

본 개시는, 일부 구현예에서, 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식(FED-BATCH) 시험관 내 전사(IVT) 방법과, 그 중에서도, 리보핵산(RNA), 예컨대 메신저 RNA(mRNA)의 높은 수율, 높은 무결성, 높은 전사율을 가능하게 하는 조성물을 제공한다. 놀랍게도, 일부 구현예에서, 사전에 알려진 IVT 방법에 의해 생산된 RNA 전사체보다 수율이

적어도 100% 더 높은, 길이가 적어도 2000개 이상의 뉴클레오타이드인 RNA 전사체가 합성될 수 있고, 여기서 이들의 적어도 90%가 공동-전사적 캡핑을 사용하여 올바르게 캡핑된다. 특정 구현예에서, 본 개시의 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응에는 4가지 뉴클레오타이드, CTP, GTP, UTP 및 ATP가 포함되고, 이들 각각의 상대적 몰비는 반응물의 사용을 최대화하고 및/또는 RNA 생산물의 속성을 변경하기 위해 바꿀 수 있다. 중요한 점은, IVT 반응 중에 어떤 뉴클레오타이드도 속도를 제한하지 않도록, 상기 4가지 뉴클레오타이드의 비가 그들의 소모율에 따라 균형이 결정된다는 것이다. 이롭게도 그리고 앞서 기술된 유가식 방법과 달리, 본 발명의 공정은 RNA 생산물 서열의 사전 지식이 필요하거나 또는 표적 RNA 생산물의 알려진 서열에 의존하지 않는다.

[0006] 본 공정은, 일부 구현예에서, 알려진 초기 농도의 CTP, GTP, UTP 및 ATP(예를 들면, 등몰 농도, 예를 들면, 5 mM)로 관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA에 대해 초기 회분식 IVT 반응을 수행하는 단계 및 상기 NTP 중 적어도 하나의 농도가 20~40분의 시간 과정에 걸쳐 임계 수준 미만으로 떨어질 때까지 실제 반응 중에 각 뉴클레오타이드의 농도의 감소율을 측정하는 단계를 포함한다. 이어서, 측정된 농도 및 수집된 시간이 반응 중에 CTP, GTP, UTP 및 ATP 소모율(개별 NTP 소모율)을 계산하기 위해 사용될 수 있다. 다중 시점과 관련하여, 이것은 상기 데이터의 선형 그래프(linear fit)의 기울기일 수 있다(예를 들면, 도 1a 참조). 상기 개별 NTP 소모율(CTP, GTP, UTP 및 ATP의 경우)을 모두 합하여, 모든 뉴클레오타이드의 소모율(총 NTP 소모율)을 결정한다(예를 들면, 도 1b 참조). 이어서 상기 개별 NTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나눔으로써, 각 NTP에 대한 백분율(%) 소모값이 결정된다.

[0007] 백분율 소모값은 IVT 반응을 위해, 그리고 "공급 원료" 혼합물을 위해 초기 "마스터" 반응 혼합물을 만드는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 회분식 반응에서 모든 NTP의 비제한적인 소모를 허용하기 위해, 상기 초기 반응 혼합물은 각각의 NTP(ATP, UTP, GTP 및 CTP)에 대해 계산된 백분율(%) 소모값에 상응하는 몰비로 NTP를 함유할 수 있다.

[0008] 일부 구현예에서, 초기 NTP 농도는 [ATP], [CTP], [UTP] 및 [GTP] 각각의 등몰 NTP 농도(예를 들면, 1:1:1:1의 몰비)를 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 초기 NTP 농도는 [ATP], [CTP], [UTP] 및 [GTP] 각각의 비-등몰 NTP 농도(예를 들면, 2:1:1:4의 몰비)를 표현한다. 일부 구현예에서, [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP]의 몰비는 1:1:1:1 내지 2:1:1:4이다. 일부 구현예에서, [ATP]:[CTP]의 몰비는 2:1이다. 일부 구현예에서, [ATP]:[UTP]의 몰비는 2:1이다. 일부 구현예에서, [ATP]:[GTP]의 몰비는 1:2이다. 일부 구현예에서, [CTP]:[UTP]의 몰비는 1:1이다. 일부 구현예에서, [CTP]:[GTP]의 몰비는 1:4이다. 일부 구현예에서, [UTP]:[GTP]의 몰비는 1:4이다. 일부 구현예에서, 초기 NTP 농도는 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 1:1 내지 2:1의 [GTP]:[CTP]비를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 NTP 농도는 2:1 내지 4:1의 [ATP]:[UTP]비 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP]비를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 NTP 농도는 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 4:1의 [GTP]:[CTP]비를 포함한다.

[0010] 이와 같은 % 소모값은 실험에 의거하여 결정되고, 관심대상의 RNA에 특이적이다. IVT 반응 동안, 반응 혼합물은 NTP를 포함하되, 이들 각각이 각NTP에 대해 계산된 % 소모값을 근거로 일정 몰비로 공급 혼합물에 존재하는 공급 원료로 보충될 수 있다. 일부 구현예에서, 공급 원료 혼합물은 반응 혼합물 중 총 NTP 농도를 0 mM보다 높게, 하지만 적어도 초기 NTP 농도의 5% 내지 50%로 유지시키는 양으로 보충된다. 일부 구현예에서, 공급 원료 혼합물은 반응 혼합물 중 총 NTP 농도를 0 mM보다 높게, 하지만 적어도 초기 NTP 농도의 5% 내지 100%, 또는 적어도 5% 내지 200%로 유지시키는 양으로 보충된다. 일부 구현예에서, 공급 원료 혼합물은 반응 혼합물 중 총 NTP 농도를 5 mM 내지 20 mM 및/또는 초기 NTP 농도의 5%~75%로 유지시키는 양으로 보충된다. 일부 구현예에서, 공급 원료 혼합물은 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 내지 2:1(예를 들면, 2:1)의 [ATP]:[UTP] 비를 유지시키는 양으로 보충된다. 일부 구현예에서, 공급 원료 혼합물은 1:1 내지 4:1(예를 들면, 4:1)의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키는 양으로 보충된다. IVT 반응의 개선이 트리뉴클레오타이드라고 일컫는 캡 유사체의 개발 및 편입을 야기해왔다(PCT/US2018/046989 참조, 본원에 참조로 편입됨). 이로써 RNA 생산물의 공동-전사 캡핑이 가능해지고, RNA를 캡핑하기 위한 추후 공정 단계의 필요성이 사라진다. 이와 같은 트리뉴클레오타이드가 상기 반응 혼합물에서 단일-뉴클레오타이드보다 우선적으로 RNA 생산물의 5' 단부에 포함되지만, 캡 유사체 대신 일부 개수의 퓨린(ATP 및 GTP)이 편입될 수도 있다. 이와 같은 이벤트가 캡핑되지 않은 RNA 생산물의 생성을 야기하는데, 이는 바람직하지 못한 불활성 생산물 변종이다. 우리의 연구는 트리뉴클레오타이드-대-퓨린 비를 ≥ 1 로 유지함으로써 상기 생산물 중 캡핑되지 않은 RNA에 비해 캡핑된 RNA의 농도가 허용가능한 수준으로 유지되기에 충분할 수 있음을 보여준 바 있다.

[0011] 공동-전사 캡핑을 사용하여 IVT 반응을 수행할 때, mRNA를 생성시키는 반응에서 총 뉴클레오타이드와 비교시 캡

유사체의 소모가 매우 낮다. 캡핑된 RNA 생산물 1몰당 캡 유사체 1몰만이 소모되는 반면, 캡핑된 RNA 생산물 1몰당 뉴클레오타이드 5,000 몰 이상이 소모된다(실제 소모는 생산물 서열 및 길이에 기반하여 달라진다). 결과적으로, IVT 반응에서 NTP가 소모된 후에, 값 비싼 캡 유사체의 과다하게 많은 양이 소모되지 않은 채 남는다. 회분식 반응에서, 이와 같은 캡 유사체(예를 들면 트리뉴클레오타이드 캡핑 시약)의 낮은 활용이 좀 더 값 비싸고 낭비되는 공정에 기여한다.

[0012] 본 개시의 유가식 공정은 플라스미드 DNA, 상기 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드 또는 테트라뉴클레오타이드 캡핑 시약) 및 기타 값 비싼 시약의 이용률을 개선하면서, RNA 생산의 높은 캡핑률(%)과 mRNA 수율을 유지시킨다. 예를 들어, 본 개시에서, NTP 및 마그네슘이 활성 IVT 반응에 첨가되어, 반응물의 고갈을 방지하고 추가적인 DNA 또는 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드)를 제공하지 않고도 RNA 생산물의 수율을 개선할 수 있다. 또 다른 예에서, NTP가 더 낮은 초기 농도로 첨가될 수 있고, 그래서 반응 전반에서 이와 같이 낮은 수준에서 유지될 수 있으며, 이로써 더 낮은 농도의 캡 유사체가 캡핑 효능을 손상시키지 않으면서 사용되는 것이 가능해진다. 사전에 기술된 IVT 회분식 및 유가식 공정에 비해, 본원에 제공된 실험에 의거하여 %소모가 균형을 이룬 유가식 IVT는, 일부 구현예에서, 공동-전사 캡핑과 함께, 사용된 캡 유사체의 양에 비해 캡핑된 RNA 수율에서 2배 초과 개선율을 보여준 바 있다. 게다가, 본원에 제공된 유가식 IVT 공정에 사용된 유입 DNA 대비 생산된 RNA의 물비가 크게 증가된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유가식 IVT 공정에서 사용된 유입 DNA 대비 생산된 RNA의 물비는 무가식(non-fed batch) 또는 회분식 공정에 비해 2배 또는 심지어 3배 증가된다.

[0013] 따라서, 일부 양태에서, IVT 반응에서 백분율(%) NTP 소모를 결정하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (a) 초기 NTP 농도, 관심대상의 mRNA를 인코딩하는 DNA, RNA 중합효소 및 파이로포스파타제를 포함하는 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계 및 (b) 상기 반응 혼합물 중 각 NTP에 대해 백분율(%) 소모값을 계산하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계 (b)는 (i) 총 NTP 소모율(총 NTP 농도/시간)에 대한 개별 NTP 소모율(개별 NTP 농도/시간)을 계산하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 알려진 초기 NTP 농도는 등물 NTP 농도이다.

[0014] 일부 양태에서, (a) 관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA, RNA 중합효소 및 NTP(및 선택적으로 마그네슘 및/또는 파이로포스파타제)를 포함하는 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계 및 (b) 시간 경과에 따라 상기 IVT 반응 혼합물에 NTP(및 선택적으로 마그네슘 및/또는 파이로포스파타제)를 포함하는 공급 원료 혼합물을 전달하되, 각 NTP가 관심대상의 특정RNA 중 각 NTP에 대해 계산된 % 소모값을 기준으로 한 물비로 존재하는데, 상기 % 소모값이 관심대상의 RNA에 특이적이고, 공급 원료 혼합물이 반응 혼합물 중 총 NTP 농도를 0보다 높게 유지시키는 양으로 전달되는 단계를 포함하는, 관심대상의 RNA의 유가식 IVT 방법이 또한 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 반응 혼합물 중 각 NTP는 각 NTP에 대해 계산된 백분율(%) 소모값과 등가인 물비로 존재한다.

[0015] 일부 구현예에서, NTP는 백분율 소모를 사용하여 균형이 결정된다. 다른 구현예에서, NTP는 생산물의 속성을 변경하기 위해, 또는 상이한 NTP의 활용을 개선하기 위해, 상이한 비로 유지된다. 예를 들어, 상기 백분율 소모가 사용되어 반응 전체에 걸쳐 원하는 조건을 유지할 수 있다.

[0016] 공급 원료 혼합물은 시간 경과에 따라, 예를 들면, 10~250분마다, 선택적으로 20~200분마다 볼루스 또는 연속 공급을 사용하여 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달될 수 있다. 연속 공급은 연속 흐름 속도, 예를 들면, 2~8 mL/분 또는 4~6 mL/분으로 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물로 공급 원료 혼합물의 전달을 수반한다.

[0017] 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 추가로 RNA 캡 유사체를 포함함으로써, 상기 RNA 캡 유사체를 편입한 전사된 RNA(예를 들면, 상기 전사된 RNA의 적어도 90% 또는 적어도 95%가 상기 RNA 캡 유사체를 포함함)를 생산한다. 초기 및/또는 진행 중인 IVT 반응 혼합물은 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 15:1, 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [RNA 캡 유사체]:[퓨린] 비를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도 1a~1b.** 뉴클레오타이드 실험 기반 균형 시험의 예. 시험관 내 전사(IVT) 반응이 알려진 초기 뉴클레오타이드 농도로 수행되었다. 시간 경과에 따라, CTP, GTP, UTP 및 ATP의 농도(**도 1a**) 및 총 뉴클레오타이드 농도(**도 1b**)가 측정되었다. 각 뉴클레오타이드의 소모%가 개별 NTP의 소모율(예를 들어, **도 1a**에서 결정되는 바와 같음)를 총 NTP 소모율(예를 들어, **도 1b**에서 결정되는 바와 같음)로 나눔으로써 계산되었다.

도 2. NTP 및 캡 유사체 농도의 모니터링. 260 nm로 설정된, UV 광 검출기가 장착된 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC-UV)를 사용하여, 시간 경과에 따라 NTP 및 트리뉴클레오타이드 농도가 모니터링될 수 있다. 상기 방

법이 또한 사용되어 개별 NTP 농도 또는 총 NTP 농도를 계산할 수 있다.

도 3a~3b. 2개의 샘플 구성물, RNA #1(**도 3a**) 및 RNA #2(**도 3b**)에 대해 실험 기반 뉴클레오타이드의 균형 시험의 예. 시간 경과에 따라, CTP, GTP, UTP 및 ATP의 농도 및 상기 총 뉴클레오타이드 농도가 측정되었다. 각 뉴클레오타이드의 % 소모가 개별 NTP 소모율을 상기 총 NTP 소모에 의해 나눔으로써 계산되었다.

도 4a~4b. 상이한 공정 요건을 달성하기 위해 RNA #1에 대한 % 소모값에서 생성된 2개의 NTP 마스터 혼합물의 예. **도 4a**의 회분식 IVT는 4가지 뉴클레오타이드 시약 모두 대략적으로 동시에 0 mM에 도달하고, 그럼으로써 시약의 활용도를 최대화함을 보여준다. **도 4b**의 회분식 IVT 반응은, 총 [NTP]가 10 mM일 경우, 4가지 뉴클레오타이드 시약 모두 동시에 2.5 mM에 도달함을 보여준다. 무엇보다, 후자의 시나리오는 원하는 생산물 프로파일을 생성하거나 또는 특이적 시약을 완전히 활용하기 위해 상기 반응 동안 NTP의 특이적 비를 요구하는 유가식 IVT 반응을 개발하는 데 유용하다.

도 5a~5b 및 6a~6b. 유가식 공급 일정의 결정. 관심대상의 DNA(**도 5a** 및 **5b**에 각각 나타낸 RNA #1 및 RNA #2), 실험에 의거하여 뉴클레오타이드의 균형이 결정된 마스터 혼합체 및 상기 예측된 NTP 소모율을 기반으로 한 초기 공급 일정을 사용하여, 정찰형(scouting) 유가식 IVT 반응이 시행되었다. 상기 실험 전반에 걸쳐, 뉴클레오타이드의 총 농도는 IVT 반응에 원료를 공급하기 직전 및 직후의 시점에 측정되었다(**도 5a~5b**). RNA #1 또는 RNA #2 중 하나를 생성하는 반응의 각 공급 사이의 소모율을 계산하기 위해(**도 6a~6b**) 상기 농도와 시간이 사용되었다.

도 7a~7c. RNA #1의 정찰형 유가식 IVT의 경우, 뉴클레오타이드 소모율이 [DNA](**도 7a**), [mRNA](**도 7b**), 또는 반응 시간(**도 7c**) 중 하나에 대해 플롯팅되었다. 곡선으로의 피팅(Fitting)(선형 그래프(fit)로 도시됨)이 유가식 IVT 반응 시행 전반에 걸쳐 뉴클레오타이드 소모율의 실험 기반 모형을 제공한다.

도 8~10. RNA #1에 대한 IVT 반응 모델화. RNA #1에 대한 반응 모형을 생성하여 NTP 또는 트리뉴클레오타이드 반응물의 농도(**도 8**), RNA 생산물의 형성(**도 9**) 및 % 꼬리 달린 RNA 생산물(**도 10**)을 추정하기 위해, 추가적인 구조물-특이적 매개변수, 예컨대 마스터 혼합체 중 CTP, GTP, UTP 및 ATP 비, CTP, GTP, UTP 및 ATP의 소모율, 캡 유사체의 초기 농도, 꼬리 달린 RNA 생산물의 초기 % 및 시간 경과에 따른 꼬리 달린 RNA 생산물 %의 속도가 사용되었다.

도 11a~11b 및 12a~12b. RNA #1 및 RNA #2의 정의된 유가식 IVT 반응에 대해 측정된 [NTP]. **도 11a~11b**는 RNA #1에 대한 유가식 IVT 반응 동안, 측정된 총 [NTP] 및 개별[NTP]를 보여준다. **도 12a~12b**는 RNA #2에 대한 유가식 IVT 반응 동안 측정된 총 [NTP] 및 개별[NTP]를 보여준다.

도 13a~13b 및 14a~14b. RNA #1 및 RNA #2의 정의된 유가식 IVT 반응에 대한 측정된 RNA 생산물 수율. **도 13a~13b**는 RNA #1 및 RNA #2에 대한 총 RNA 및 꼬리 달린 RNA의 측정된 농도를 보여준다. **도 14a~14b**는 RNA #1 및 RNA #2에 대한 초기 IVT 반응 부피 대 총 RNA 및 꼬리 달린 RNA의 측정된 질량을 보여준다.

도 15. RNA #1 및 RNA #2의 정의된 유가식 IVT 반응에 대한 측정된 % 꼬리 달린 RNA.

도 16a~b. **도 16a**의 그래프는 RNA #1 및 RNA #2에 대한 % 캡핑된 RNA 생산물을 보여준다. **도 16b**는 RNA #1에 대해 시간 경과에 따라 측정된 % 캡핑된 RNA 생산물을 보여준다.

도 17a~17b. RNA #3에 대한 예시적인 볼루스(**도 17a**) 및 연속(**도 17b**) 유가식 IVT 반응 동안 측정된 총 뉴클레오타이드 농도.

도 18a~18b 및 19a~19b. RNA #3의 볼루스 및 연속 유가식 IVT 반응에 대해 측정된 RNA 생산물 수율. **도 18a~18b**는 볼루스(**도 18a**) 및 연속(**도 18b**) 공정에 대해 꼬리 달린 RNA의 측정된 농도를 보여준다. **도 19a~19b**는 볼루스(**도 19a**) 및 연속(**도 19b**) 공정에 대한 초기 IVT 반응 부피 대비 꼬리 달린 RNA의 측정된 질량을 보여준다.

도 20a~20b. RNA #3에 대한 볼루스(**도 20a**) 및 연속(**도 20b**) 유가식 IVT 반응 동안 측정된 % 꼬리 달린 RNA 생산물.

도 21a~21b. RNA #3에 대한 볼루스(**도 21a**) 및 연속(**도 21b**) 유가식 IVT 반응 동안 측정된 % 캡핑된 RNA 생산물.

도 22. 연속 유가식의 경우 반응 전반에 걸쳐 측정된 평균 A/GTP-대-트리뉴클레오타이드 비.

도 23. 회분식 IVT 반응과 비교하여 유가식 IVT 반응 전체에 걸쳐 측정된 [ATP].

도 24. 2시간 반응 기간에 걸쳐, 회분식 IVT 반응과 비교하여 유가식 IVT 반응의 경우 총 RNA(mg/mL 초기 IVT)의 측정된 수율.

도 25는 2시간 반응 기간 후, 회분식 IVT 반응과 비교하여, 유가식 IVT 반응 후 % 캡핑된 RNA 생산물을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 단일 회분의 총 생산물 수율을 개선하고 높은 생산물 품질을 유지하는 한편, 반응물의 활용을 증가시키기 위해 개발된, 실험에 의거하여 균형이 결정되는 유가식 시험관 내 전사(IVT) 플랫폼이 본원에 제공된다. 반응 구성성분의 활용도가 낮고, 높은 비율의 NTP가 미사용되고, 고농도의 RNA 캡 유사체 또는 트리뉴클레오타이드 캡핑 시약이 필요한 기존의 IVT 방법과는 달리, 본 개시의 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 방법은 반응에 존재하는 값비싼 시약의 사용을 최대화하여, 생산물 무결성을 손상시키지 않으면서 생산물 수율을 증가시킨다. 이와 같이 개선된 유가식 IVT 공정은, 일부 구현예에서, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화(initial nucleotide empirical balancing reaction)으로 시작되는데, 이는 초기 반응에서 각 유형의 NTP에 대해, 전사될 RNA에 특이적인 백분율(%) 소모값을 계산하는 데 사용된다. 이와 같이 실험에 의거하여 결정된 값은 이어서 효율적인 고수율 RNA 생산을 위한 추후 유가식 IVT 반응에서 뉴클레오타이드 비의 균형을 결정하는 데 사용된다.
- [0020] 본원에 사용되는 백분율 소모는 일반적으로 관심대상의 RNA를 인코딩하는 소정의 DNA에 대한 모든 NTP의 소모율과 비교하여, 개별 NTP의 상대적 소모율을 가리킨다. 일부 구현예에서, 소모율 백분율은 개별 NTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나눔으로써 결정된다. 일부 구현예에서, 개별 NTP 소모율은 시간 경과에 따른 개별 NTP 농도의 측정치(예를 들면, 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화의 과정에 걸친)이고 총 NTP 소모율은 시간 경과에 따른 총 NTP 농도의 측정치(예를 들면, 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화의 과정에 걸친)이다.
- [0021] 본원에 사용되는 실험에 기반한 NTP 균형화는 일반적으로 관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA에 대해 각 NTP의 백분율 소모를 결정하기 위해 사용되는 공정을 가리킨다. 이 공정은 알려진 초기 농도의 CTP, GTP, UTP 및 ATP로 회분식 IVT 반응을 수행하는 단계 및, 상기 반응의 과정, 예를 들면, 20~40분에 걸쳐, 실제 반응 동안 NTP 중 적어도 하나의 농도가 임계 수준, 예를 들면, 1~5 mM 또는 출발 농도의 20~50% 아래로 떨어질 때까지 뉴클레오타이드의 농도의 감소 속도를 측정하는 단계를 수반한다. 상기 수집된 측정 농도 및 시간은 이어서 상기 반응 동안 CTP, GTP, UTP 및 ATP 소모의 백분율 소모를 계산하는 데 사용될 수 있다.
- [0022] 본원에 사용되는 회분식 IVT는 일반적으로 상기 반응의 모든 성분, 예를 들면, NTP, 중합효소, 염 및/또는 DNA가, 예를 들면, 반응이 시작될 때, 상기 반응 혼합물에 단 1회 첨가되는 시험관 내 전사 반응을 가리킨다. 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 명시된 조건에서, 예를 들면, 온도, 기간 동안, 상기 전사된 RNA 생산물이 수집된 후, 유지된다.
- [0023] 본원에 사용되는 유가식 IVT는 일반적으로 상기 활성 반응 혼합물이 반응 구성성분, 예를 들면, NTP, 중합효소, 염 및/또는 DNA로 보충되어, 시간이 경과함에 따라 상기 반응이 진행되면서, 제한적인 시약의 고갈을 방지하거나 또는 불안정한 구성성분의 분해를 막는, 시험관 내 전사 반응을 가리킨다. 일부 구현예에서, 상기 반응에 첨가되는 상기 혼합물은 공급 원료라 불린다. 일부 구현예에서, 반응 구성성분 또는 공급 원료가 볼루스 공급을 사용하여 활성 반응 혼합물에 보충된다. 일부 구현예에서, 볼루스 공급은 별개의 부피량의 반응 구성성분 또는 공급 원료를 정의된 시간 간격으로 활성 반응 혼합물에 첨가하는 것, 예를 들면, 20분마다 공급 원료 5 mL를 반응 혼합물에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 구성성분 또는 공급 원료가 연속 공급을 사용하여 활성 반응 혼합물에 보충된다. 일부 구현예에서, 연속 공급은 정의된 기간에 걸쳐 반응 구성성분 공급 원료의 연속 흐름 속도에 의해 반응 구성성분 또는 공급 원료를 활성 반응 혼합물에 첨가하는 것, 예를 들면, 2~8 mL/분, 2~6 mL/분, 또는 4~6 mL/분의 연속 흐름 속도로 또는 초기 부피 1 mL당 0.0030~0.007 mL/분, 초기 부피 1 mL당 0.0040~0.0060 mL/분, 초기 부피 1 mL당 0.0050~0.0080 mL/분, 또는 초기 부피 1 mL당 0.0060~0.0090 mL/분의 연속 흐름 속도로 공급 원료를 첨가하는 것을 포함한다.
- [0024] 본원에 사용되는 정찰형 유가식 IVT는 일반적으로 시간 경과에 따른 반응 속도를 모델화하고, 다운스트림 유가식 IVT 반응에서 적절한 공급 부피 및 시간을 정하기 위해 사용되는 볼루스 공급을 사용하는 초기 유가식 IVT 반응을 가리킨다.

- [0025] 본원에 사용되는 백분율 꼬리 달린 RNA는 일반적으로 3' 폴리A 꼬리를 함유한 전사된 RNA 생산물의 상대적 풍부도를 가리킨다. 일부 구현예에서, 3' 폴리A 꼬리는 A₁₀₀ 폴리A 꼬리(즉, 알라닌 잔기 100개로 이루어짐)이다. 일부 구현예에서, 백분율 꼬리 달린 RNA(3' 폴리A 꼬리를 포함하는 전사된 RNA 생산물의 백분율)은 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%보다 크다. 일부 구현예에서, 백분율 꼬리 달린 RNA는 90%, 95%, 97%, 또는 99%보다 크다. 일부 구현예에서, 백분율 꼬리 달린 RNA(3' 폴리A 꼬리를 포함하는 전사된 RNA 생산물의 백분율)은 20~100%, 20~90%, 20~80%, 20~70%, 20~60%, 20~50%, 20~40%, 20~30%, 25~75%, 30~50%, 40~60%, 50~70%, 45~60%, 55~70%, 60~80%, 60~100%, 75~100%, 50~95%, 75~95%, 80~100%, 80~90%, 90~95%, 95~100%, 90~99%, 또는 95~99%이다.
- [0026] 본원에 사용되는 캡핑된 RNA의 백분율은 일반적으로 그것의 5' 말단에 편입된 캡 유사체를 함유한 전사된 RNA 생산물의 상대적 풍부도를 가리킨다. 일부 구현예에서, 캡 유사체는 RNA 캡 유사체이다. 일부 구현예에서, RNA 캡 유사체는 디뉴클레오타이드, 트리뉴클레오타이드, 또는 테트라뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 캡핑된 RNA 백분율(5' 캡 유사체를 포함하는 전사된 RNA 생산물의 백분율)은 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%보다 크다. 일부 구현예에서, 캡핑된 RNA 백분율은 90%, 95%, 97%, 또는 99%보다 크다. 일부 구현예에서, 캡핑된 RNA 백분율은 20~100%, 20~90%, 20~80%, 20~70%, 20~60%, 20~50%, 20~40%, 20~30%, 25~75%, 30~50%, 40~60%, 50~70%, 45~60%, 55~70%, 60~80%, 60~100%, 75~100%, 50~95%, 75~95%, 80~100%, 80~90%, 90~95%, 95~100%, 90~99%, 또는 95~99%이다.
- [0027] 일부 구현예에서, RNA 캡 유사체가 전사 동안 RNA 서열의 5' 단부를 우선적으로 개시하는 IVT 반응 혼합물에 첨가된다. 이로써 "공동-전사 캡핑" IVT 반응이 가능해지는데, 여기서 상기 IVT 혼합물은 RNA 캡을 포함한다. "공동-전사 캡핑" IVT 반응을 가능케 하는 RNA 캡 유사체의 예에는 7-메틸구아노신(m7G) 및 3'-O-me-7-meGpppG이 포함된다.
- [0028] 본원에 사용되는, 유가식 적용에 사용하기 위한 초기 IVT 반응 혼합물은 일반적으로 유가식 IVT 반응을 시작할 때 그리고 추가적인 반응 구성성분 또는 공급 원료로 보충되기 전에 IVT 반응 혼합물을 가리킨다. 일부 구현예에서, 초기 IVT 반응 혼합물은 NTP(예를 들면, 자연발생적인 및/또는 변형된 NTP, 예를 들면, ATP, UTP, GTP 및 CTP), 완충제(예를 들면, 트리스 및/또는 굿스(Good's) 완충제), 보조인자(예를 들면, 마그네슘), RNA 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드 캡 유사체), RNA 중합효소(예를 들면, T7 RNA 중합효소), 세제(예를 들면, 트리톤 X-100, 관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA, 환원제제(예를 들면, 디티오프레이톨(DTT) 또는 트리스(2-카복시에틸)포스파인(TCEP)), 작은 분자 첨가제(예를 들면, 스퍼미딘) 및/또는 효소 첨가제(예를 들면, 무기 포스파타제(PPIase))를 포함한다.
- [0029] 본원에 사용되는, 유가식 적용에 사용하기 위한 진행 중인 IVT 반응 혼합물은 일반적으로 시작 반응 조건 후 IVT 반응 혼합물을 가리킨다. 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 구성성분, 예를 들면, NTP 및 RNA 캡 유사체의 농도는 시간이 경과하면서 변화한다. 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응 혼합물은 NTP(예를 들면, 자연발생적인 및/또는 변형된 NTP, 예를 들면, ATP, UTP, GTP 및 CTP), 완충제(예를 들면, 트리스 및/또는 굿스 완충제), 보조인자(예를 들면, 마그네슘), RNA 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드 캡 유사체), RNA 중합효소(예를 들면, T7 RNA 중합효소), 세제(예를 들면, 트리톤 X-100, 관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA, 환원제제(예를 들면, DTT, TCEP), 작은 분자 첨가제(예를 들면, 스퍼미딘), 효소 첨가제(예를 들면, 무기 포스파타제 또는 PPIase) 및/또는 관심대상의 전사된 RNA를 포함한다.
- [0030] 본원에 사용되는, 관심대상의 RNA 중 제 1 코딩 위치는 일반적으로 촉진자 서열(예를 들면, T7 RNA 중합효소 촉진자) 이후 전사된 제 1 뉴클레오타이드를 가리킨다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 코딩 위치는 임의의 NTP, 예를 들면, ATP, UTP, GTP, 또는 CTP이다.
- [0031] 본원에 사용되는, 관심대상의 RNA는 일반적으로 IVT 반응에서 DNA에 의해 인코딩되는 RNA 분자를 가리킨다. 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA는 관심대상의 전사된 RNA이며, 여기서 관심대상의 전사된 RNA는 IVT 반응, 예를 들면, 유가식 IVT 반응에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA는 mRNA, 선택적으로 5' 캡, 5' 미변역 영역(5' UTR), 관심대상의 단백질을 인코딩하는 열린판독틀(ORF), 3' 미변역 영역(3' UTR) 및/또는 폴리A 꼬리를 포함하는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 5' 캡 유사체는 5' 트리뉴클레오타이드 캡이다.
- [0032] 뉴클레오타이드 실험 기반 균형 시험
- [0033] 일부 양태에서, 시험관 내 전사(IVT) 반응의 백분율(%) 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP) 소모를 결정하는 방법이 본원에 제공된다. NTP 백분율(%) 소모(좀 더 간단하게 "% 소모"로도 불림)는 하기 방정식을 사용하여 계

산되는, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화의 각 NTP에 대해 획득된 값이다:

- [0034] % 소모 =(개별 NTP 소모율) /(총 NTP 소모율),
- [0035] 이로써 상기 개별 NTP 소모율은 시간 경과에 따른(뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화의 과정에 걸친) 개별 NTP 농도의 측정치이고, 총 NTP 소모율은 시간 경과에 따른(뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화의 과정에 걸친) 총 NTP 농도의 측정치이다.
- [0036] 따라서, 개별 ATP 소모율은 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 동안, 상기 반응 중 ATP 농도 또는 또 다른 NTP의 농도가 임계 수준, 예를 들면, 5 mM 내지 20 mM 미만으로 떨어질 때까지 다양한 시점에 소모된 ATP의 농도를 측정함으로써 계산되고; 개별 UTP 소모율은 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 동안 상기 반응 중 UTP 농도, 또는 또 다른 NTP의 농도가 임계 수준, 예를 들면, 5 mM 내지 20 mM 미만으로 떨어질 때까지 다양한 시점에 소모된 UTP의 농도를 측정함으로써 계산되고; 개별 GTP 소모율은 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 동안, 상기 반응 중 GTP농도, 또는 또 다른 NTP의 농도가 임계 수준, 예를 들면, 5 mM 내지 20 mM 미만으로 떨어질 때까지 다양한 시점에 소모된 GTP의 농도를 측정함으로써 계산되고; 및 개별 CTP 소모율은 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 동안, 상기 반응 중 CTP농도, 또는 또 다른 NTP의 농도가 임계 수준, 예를 들면, 5 mM 내지 20 mM 미만으로 떨어질 때까지 다양한 시점에 소모된 CTP의 농도를 측정함으로써 계산된다.
- [0037] 총 NTP 소모율은 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 동안 다양한 시점에 소모된 모든(예를 들면, 4가지 모두) NTP의 농도를 측정함으로써 계산된다.
- [0038] 이어서 ATP에 대한 % 소모값은 개별 ATP 소모율을 총 NTP 소모율로 나눔으로써 계산된다. 이와 마찬가지로, UTP에 대한 백분율 소모값은 개별 UTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나눔으로써 계산되고; GTP에 대한 백분율 소모값은 개별 GTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나눔으로써 계산되고; 및 CTP에 대한 백분율 소모값은 개별 CTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나눔으로써 계산된다.
- [0039] 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화는, 일부 구현예에서, DNA(예를 들면, 관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA 플라스미드), RNA 중합효소(예를 들면, T7 중합효소) 및 NTP의 혼합물을 포함한다. 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화에서, NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP 및 CTP 각각)의 출발 농도는 알려져 있다(미리 결정된다). 일부 구현예에서, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화는 또한 완충제(예를 들면, 트리스 HCl), 마그네슘(예를 들면, 아세트산마그네슘), 파이로포스파타제 및/또는 디티오프레이톨(DTT)을 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화는 또한 RNA 캡 유사체, 예컨대 본원의 다른 곳에서 논의된 트리뉴클레오타이드 캡 유사체(예를 들면, GAG)를 포함한다.
- [0040] 일부 구현예에서, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화에서 개별 NTP 각각의 농도는 0 밀리몰(mM)보다 높게 유지된다. 다시 말해, NTP 농도(개별 및 총)가 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 동안, 상기 NTP 농도 중 하나가 특정 임계 수준 아래로 떨어질 때까지, (NTP 소모율을 계산하기 위해) 수집된다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 1 mM 내지 50 mM, 1 mM 내지 40 mM, 1 mM 내지 30 mM, 1 mM 내지 20 mM, 1 mM 내지 10 mM, 2 mM 내지 50 mM, 2 mM 내지 40 mM, 2 mM 내지 30 mM, 2 mM 내지 20 mM, 2 mM 내지 10 mM, 3 mM 내지 50 mM, 3 mM 내지 40 mM, 3 mM 내지 30 mM, 3 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 10 mM, 4 mM 내지 50 mM, 4 mM 내지 40 mM, 4 mM 내지 30 mM, 4 mM 내지 20 mM, 4 mM 내지 10 mM, 5 mM 내지 50 mM, 5 mM 내지 40 mM, 5 mM 내지 30 mM, 5 mM 내지 20 mM, 또는 5 mM 내지 10 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 10 mM 내지 20 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 또는 20 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 2 mM 내지 10 mM의 하한치 초과, 2 mM 내지 9 mM의 하한치 초과, 2 mM 내지 8 mM의 하한치 초과, 2 mM 내지 7 mM의 하한치 초과, 2 mM 내지 6 mM의 하한치 초과, 또는 2 mM 내지 6 mM의 하한치 초과이다.
- [0041] 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 초기 NTP 농도의 5% 내지 200% 내에 속한다. 예를 들어, 상기 임계 수준은 초기 NTP 농도의 5% 내지 175% 내에, 5% 내지 150% 내에, 5% 내지 125% 내에, 5% 내지 100% 내에, 5% 내지 75% 내에, 5% 내지 50% 내에, 또는 5% 내지 25% 내에 속할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 초기 NTP 농도의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200% 내에 속한다. 상기 초기 NTP 농도는 전사가 시작되기 전에(모든 IVT 반응 구성성분이 조합되었으나 상기 중합효소가 활성화되기 전) IVT 반응에서의 총 NTP 농도이다.

- [0042] 따라서, 일부 구현예에서, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화의 초기 NTP 농도는 알려져 있다. 일부 구현예에서, 상기 알려진 초기 NTP 농도는 등물 NTP 농도이다. 다시 말해, 각 NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP 및 UTP)가 동등한 몰비(1:1:1:1)로 상기 반응에 존재한다. 다른 구현예에서, 상기 알려진 초기 NTP 농도는 등물 NTP 농도가 아니다. 예를 들어, 하나 이상의 NTP(예를 들면, ATP 및/또는 UTP)가 다른 NTP의 과잉 속에 존재할 수 있다.
- [0043] 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 반응의 시간대는 달라질 수 있다. 하지만 유리하게는, 상기 반응 시간은 10 내지 60분으로 짧을 수 있다. 일부 구현예에서, 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 반응 시간은 10 내지 50분, 10 내지 40분, 10 내지 30분, 10 내지 20분, 20 내지 60분, 20 내지 50분, 20 내지 40분, 20 내지 30분, 30 내지 60분, 30 내지 50분, 또는 30 내지 40분이다. 일부 구현예에서, 상기 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화 반응 시간은 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 또는 60분이다. NTP 중 임의의 하나의 농도가 임계 수준 아래로 떨어지는 시기에 따라, 더 긴 반응 시간이 사용될 수 있다.
- [0044] **실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 시험관 내 전사 반응**
- [0045] 앞서 기술된 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화는 관심대상의 RNA를 인코딩하는 특정 DNA에 특이적이고, 초기 반응에서 계산된 상기 백분율(%) 소모값은 특정 관심대상의 RNA의 합성을 위한 추후 유가식 IVT 반응에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA의 유가식 IVT의 방법은 (a) 관심대상의 RNA를 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA), RNA 중합효소 및 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP)를 포함하는 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계 및 (b) 시간 경과에 따라 상기 IVT 반응 혼합물에 NTP를 포함하는 공급 원료 혼합물을 전달하되, 각 NTP가 각 NTP에 대해 계산된 백분율 소모값을 기준으로 한 몰비로 존재하고, 상기 백분율 소모값이 관심대상의 RNA에 특이적이며 및 상기 공급 원료 혼합물이 상기 반응 혼합물에서 총 NTP 농도를 0보다 높게 유지시키는 양으로 전달되는 단계를 포함한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 상기 공급 원료 혼합물은 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비를 유지시키는 양으로 전달된다. 일부 구현예에서, 상기 공급 원료 혼합물은 2:1의 [ATP]:[UTP] 비를 유지시키는 양으로 전달된다. 일부 구현예에서, 상기 공급 원료 혼합물은 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키는 양으로 전달된다. 일부 구현예에서, 상기 공급 원료 혼합물은 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키는 양으로 전달된다. 일부 구현예에서, 상기 공급 원료 혼합물은 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키는 양으로 전달된다.
- [0047] 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응 혼합물은, 일부 구현예에서, 하기에서 선택된 구성성분을 포함한다: 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA) 중합효소, 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP), RNA 캡 유사체, 완충제, 마그네슘, 파이로포스파타제 및 환원제(예를 들면 디티오프레이톨). 상기 공급 원료 혼합물은, 반면에, NTP, RNA 중합효소, 완충제, 마그네슘, 파이로포스파타제 및/또는 환원제를 포함하지만, 일반적으로 DNA 및 RNA 캡 유사체를 포함하지 않는다. 상기 IVT 반응에 사용되는 정확한 조건은 필요한 RNA의 양에 따라, 예를 들어, 특정 적용에 따라 달라진다. 이와 마찬가지로, 총 전사 반응 시간이 달라질 수 있는데, 다만 일부 구현예에서, 상기 총 전사 반응 시간이 종래의 IVT 반응 시간보다 길다. 일부 구현예에서, 상기 총 전사 반응 시간은 100분 내지 1000분이다. 예를 들어, 상기 총 전사 반응 시간은 100~800, 100~600, 100~400, 150~1000, 150~800, 150~600, 150~400, 200~1000, 200~800, 200~600, 200~400, 200~800, 200~600, 200~400, 300~1000, 300~800, 300~600, 300~400, 300~800, 300~600, 300~400, 400~1000, 400~800, 400~600, 400~400, 400~800, 400~600, 500~1000, 500~800, 500~600, 500~500, 500~800, 또는 500~600분일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 총 전사 반응 시간은 적어도 100, 적어도 150, 적어도 200, 적어도 250, 적어도 300, 적어도 350, 적어도 400, 적어도 450, 적어도 500, 적어도 550, 적어도 600, 적어도 650, 적어도 700, 적어도 750, 적어도 800, 적어도 850, 적어도 900, 적어도 950, 또는 적어도 1000분이다.
- [0048] **관심대상의 RNA를 인코딩하는 DNA**
- [0049] 상기 DNA는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 DNA는 플라스미드 또는 다른 벡터 상에 존재한다. DNA는 관심대상의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. DNA가, 일부 구현예에서, 관심대상의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에서 5'에 위치한, 또는 이것에 작동가능하게 연결된, RNA 중합효소 촉진자(예를 들면, T7 RNA 중합효소 촉진자)를 포함한다. DNA가 또한 상기 폴리뉴클레오타이드의 3' 단부에 위치한 폴리아데닐화(polyA) 꼬리를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

- [0050] 상기 DNA의 길이 및 그에 따라 관심대상의 RNA의 길이가 달라질 수 있다. 예를 들어, 상기 DNA(및/또는 관심대상의 RNA)는 길이가 200개의 뉴클레오타이드 내지 10,000개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 DNA(및/또는 관심대상의 RNA)는 길이가 200~500개, 200~1000개, 200~1500개, 200~2000개, 200~2500개, 200~3000개, 200~3500개, 200~4000개, 200~4500개, 200~5000개, 200~5500개, 200~6000개, 200~6500개, 200~7000개, 200~7500개, 200~8000개, 200~8500개, 200~9000개, 또는 200~9500개의 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 상기 DNA(및/또는 관심대상의 RNA)는 길이가 적어도 200개, 적어도 300개, 적어도 400개, 적어도 500개, 적어도 600개, 적어도 700개, 적어도 800개, 적어도 900개, 적어도 1000개, 적어도 2000개, 적어도 3000개, 마침내 4000개, 적어도 5000개, 적어도 6000개, 적어도 7000개, 적어도 8000개, 적어도 9000개, 또는 적어도 10,000개의 뉴클레오타이드이다.
- [0051] 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응 동안 DNA로 보충되지 않는다. 다시 말해, 일부 구현예에서, 전체 IVT 반응에 걸쳐, 존재하는 유일한 DNA는 전사 시작 전에 반응 혼합물에 존재하는 것이다(추가적인 DNA가 IVT 반응에 첨가되지 않는다).
- [0052] 일부 구현예에서, 초기 또는 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 DNA의 농도는 약 0.01~0.10 mg/mL, 0.01~0.09 mg/mL, 0.01~0.075 mg/mL, 0.025~0.075mg/mL, 0.01~0.05 mg/mL, 0.02~0.08 mg/mL, 0.02~0.06 mg/mL, 0.03~0.055 mg/mL, 0.04~0.05 mg/mL, 또는 0.05 mg/mL이다. 일부 구현예에서, DNA의 농도는 전체 IVT 반응 동안 0.01 mg/mL를 초과하는 농도로 유지된다. 일부 구현예에서, DNA의 농도는 전체 IVT 반응 동안 약 0.01~0.10 mg/mL, 0.01~0.09 mg/mL, 0.01~0.075 mg/mL, 0.025~0.075mg/mL, 0.01~0.05 mg/mL, 0.02~0.08 mg/mL, 0.02~0.06 mg/mL, 0.03~0.055 mg/mL, 또는 0.04~0.05 mg/mL의 농도로 유지된다.
- [0053] **RNA 생산물**
- [0054] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 관심대상의 전사된 RNA 메신저 RNA(mRNA)이다. 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA의 제 1 위치에 존재하는 NTP는 ATP이다. 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA의 제 1 위치에 존재하는 NTP는 GTP이다. 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA의 제 1 위치에 존재하는 NTP는 UTP이다. 일부 구현예에서, 관심대상의 RNA의 제 1 위치에 존재하는 NTP는 CTP이다.
- [0055] 일부 구현예에서, 상기 방법은 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응 혼합물에서 RNA(예를 들면, mRNA)를 단리(예를 들면, 정제)하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 나노 입자에서 상기 단리된 RNA를 만드는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 나노입자는 지질 나노입자, 예컨대 양이온 지질 나노입자이다. 상기 지질 나노입자는 예를 들어, 이온화성 아미노 지질 20~60%, 양이온 이외의 지질 5~25%, 스테롤 25~55% 및 PEG-변형 지질 0.5~15%의 몰비를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본원에 참조로 편입된, 2017년 4월 27일에 공개된 WO 2017/070624를 참조할 수 있다.
- [0056] 일부 구현예에서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 회분식 IVT 반응 또는 방법 또는 종래의 유가식 방법(NTP 소모에 대해 실험에 의거하여 균형이 결정되지 않은 유가식 방법)을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 크다. Kerr 등, Biotechnol. Prog. 15:174-184(1999) 참조. 예를 들어, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 회분식 IVT 반응 또는 방법을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 20% 내지 200% 더 크다. 일부 구현예에서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 회분식 IVT 반응 또는 방법을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 20%~175%, 20%~150%, 20%~125%, 20%~100%, 20%~75%, 20%~50%, 30%~200%, 30%~175%, 30%~150%, 30%~125%, 30%~100%, 30%~75%, 30%~50%, 40%~200%, 40%~175%, 40%~150%, 40%~125%, 40%~100%, 40%~75%, 또는 40%~50% 더 크다. 일부 구현예에서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 회분식 IVT 반응 또는 방법을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 100% 더 크다.
- [0057] 일부 구현예에서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 초기 반응 부피 5 mg/mL보다 크다. 일부 구현예에서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 초기 반응 부피 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mg/mL보다 크다. 일부 구현예에서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율은 초기 반응 부피의 5~10 mg/mL, 초기 반응 부피의 5~15 mg/mL, 초기 반응 부피의 10~20 mg/mL, 초기 반응 부피의 15~25 mg/mL, 초기 반응 부피의 20~30 mg/mL, 초기 반응 부피의 25~35 mg/mL, 또는 초기 반응 부피의 30~40 mg/mL이다.
- [0058] 일부 구현예에서, 관심대상의 꼬리 달린 RNA의 백분율(%) (폴리아 꼬리를 포함하는 RNA 전사체의 백분율)은 유가식 반응에서 반응 시간(분)인 150분, 180, 210, 240, 270, 300, 330 및/또는 360분에 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과이다.
- [0059] **RNA 중합효소**

- [0060] 본원에 제공된 바와 같이 사용될 수 있는 RNA 중합효소의 예에는, 비제한적으로, T7 RNA 중합효소, T3 RNA 중합효소 및 SP6 RNA 중합효소 및 동족체, 오솔로그(orthologs) 및 이들의 변종이 포함된다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 T7 중합효소 변종이다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소는, 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해, 변형되어 E42(예를 들면, E42R), S43(예를 들면, S43A), Y44(예를 들면, Y44A), E45(예를 들면, E45R/L), M46(예를 들면, M46A), G47(예를 들면, G47A), A255(예를 들면, A255K/Q/Y/I), R257(예를 들면, R257A), A258(예를 들면, A258R/E/L), G259(예를 들면, G259A), A260(예를 들면, A260R/E/L), L261(예를 들면, L261A) 및 A262(예를 들면, A262R/E/L)에서 선택되는 적어도 한 위치에서 높은 나선형 경향 아미노산의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 T7 RNA 중합효소는 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 아미노산 치환(적어도 하나의 높은 나선형 경향 아미노산 치환 이외에)을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본 개시는 본원에 제공된 바와 같이 하나 이상의 높은 나선형 경향 아미노산 치환으로의 기준(예를 들면, 현재 구입가능한 및/또는 상업적으로 구입가능한) T7 RNA 중합효소 변종의 추가적인 변형을 아우른다.
- [0061] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종(예를 들면, T7 RNA 중합효소 변종)은 그것의 C 말단에 추가적인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 추가적인 아미노산은 글라이신(G)이다. 일부 구현예에서, 상기 추가적인 아미노산은 알라닌(A)이다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종(예를 들면, T7 RNA 중합효소 변종)은 그것의 C 말단에 적어도 2개(예를 들면, 2, 3, 4, 5개 이상)의 추가적인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종(예를 들면, T7 RNA 중합효소 변종)이, 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해, 변형되어 E42(예를 들면, E42R), S43(예를 들면, S43A), Y44(예를 들면, Y44A), E45(예를 들면, E45R/L), M46(예를 들면, M46A), G47(예를 들면, G47A), A255(예를 들면, A255K/Q/Y/I), R257(예를 들면, R257A), A258(예를 들면, A258R/E/L), G259(예를 들면, G259A), A260(예를 들면, A260R/E/L), L261(예를 들면, L261A) 및 A262(예를 들면, A262R/E/L)에서 선택되는 적어도 하나의 위치에서 높은 나선형 경향 아미노산의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 그것의 C 말단에 추가적인 아미노산을 포함한다.
- [0062] 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 E42(예를 들면, E42R), S43(예를 들면, S43A), Y44(예를 들면, Y44A), E45(예를 들면, E45R/L), M46(예를 들면, M46A) 및 G47(예를 들면, G47A)에서 선택되는 한 위치에서 높은 나선형 경향 아미노산의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하도록 변형된 서열번호: 1 또는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환이 G47A를 포함한다.
- [0063] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 추가적인 C-말단 아미노산이 포함된 RNA 중합효소를 포함한다. 상기 추가적인 C-말단 아미노산은, 일부 구현예에서, 글라이신, 알라닌, 트레오닌, 프롤린, 글루타민, 세린에서 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 추가적인 C-말단 아미노산(예를 들면, 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 884 예)은 글라이신이다.
- [0064] 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 C-말단에 추가적인 글라이신을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가, 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해, G47A 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 C-말단에 G47A 치환 및 추가적인 글라이신을 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, (a) 위치 350, 351, 387, 394, 425, 427, 437, 441, 632, 811 및 880에서 선택되는 위치에 아미노산 치환이, 그리고 (b) C-말단 단부에 추가적인 아미노산 치환 및/또는 아미노산 변형이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 350에 아미노산 치환 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 350에 라이신(K)(E350K) 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 350에 아스파라긴(N)(E350N) 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함된 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 350(E350A)에 알라닌(A) 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함된 RNA 중합효소를 포함하

는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 441에 아르기닌(K441R) 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 632에 아미노산 치환 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 811에 아미노산 치환 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 880에 아미노산 치환 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 야생형 RNA 중합효소에 비해, 위치 47에 아미노산 치환(예를 들면, G47A), 위치 880에 타이로신(F880Y) 및/또는 C-말단 단부(위치 884)에 추가적인 아미노산(예를 들면, G)이 포함되는 RNA 중합효소를 포함하되, 상기 야생형 RNA 중합효소는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, RNA 중합효소 변종이, 서열번호: 1~4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 RNA 중합효소에 비해, E350, D351, K387, N437, K441, D506, R632, D653, S628, P657, F880 및 G884로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 아미노산 치환이 포함되는 RNA 중합효소를 포함한다.

[0078] 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 E350에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 D351에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 K387에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 N437에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 K441에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 D506에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 R632에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 D653에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 S628에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 P657에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 F880에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 G884에 아미노산 치환을 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 E350, D351, K387, N437, K441, D506, R632, D653, S628, P657, F880 및 G884로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0080] 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 하기로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 아미노산 치환을 포함한다: E350 및 D351; E350 및 K387; E350 및 N437; E350 및 K441; E350 및 D506; E350 및 R632; E350 및 D653; E350 및 S628; E350 및 P657; E350 및 F880; E350 및 G884; D351 및 K387, D351 및 N437; D351 및 K441; D351 및 D506; D351 및 R632; D351 및 D653; D351 및 S628; D351 및 P657; D351 및 F880; D351 및 G884; K387 및 N437; K387 및 K441; K387 및 D506; K387 및 R632; K387 및 D653; K387 및 S628; K387 및 P657; K387 및 F880; 및 K387 및 G884; N437 및 K441; N437 및 D506; N437 및 R632; N437 및 D653; N437 및 S628; N437 및 P657; N437 및 F880; N437 및 G884; K441 및 D506; K441 및 R632; K441 및 D653; K441 및 S628; K441 및 P657; K441 및 F880; K441 및 G884; D506 및 R632; D506 및 D653; D506 및 S628; D506 및 P657; D506 및 F880; D506 및 G884; R632 및 D653; R632 및 S628; R632 및 P657; R632 및 F880; R632 및 G884; D653 및 S628; D653 및 P657; D653 및 F880; D653 및 G884; S628 및 P657; S628 및 F880; S628 및 G884; P657 및 F880; P657 및 G884; 및 F880 및 G884.

[0081] 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소는 하기로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 아미노산 치환을 포함한다: K387, D653 및 G884; E350, D351 및 K387; 및 D653, P657 및 R632. 일부 구현예에서, 상기 E350에 아미노산 치환은 E350A, E350K, E350N 및 E350W로 이루어진 군에서 선택되되, 선택적으로 상기 E350에 아미노산 치환은 E350N이다. 일부 구현예에서, D351에 아미노산 치환은 D351V이다. 일부 구현예에서, K387에 아미노산 치환은 K387H, K387N 및 K387S으로 이루어진 군에서 선택되고, 선택적으로 상기 K387에 아미노산 치환은 K387N이다. 일부 구현

예에서, N437에 아미노산 치환은 N437F, N437I, N437T 및 N437Y로 이루어진 군에서 선택되고, 선택적으로 상기 N437에 아미노산 치환은 N437F이다. 일부 구현예에서, 상기 K441에 아미노산 치환은 K441R이다. 일부 구현예에서, 상기 D506에 아미노산 치환은 D506F, D506L, D506R, D506W 및 D506Y로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 R632에 아미노산 치환은 R632K 또는 R632T이다.

[0082] 일부 구현예에서, 상기 D653에 아미노산 치환은 D653A, D653F, D653G, D653H, D653I, D653K, D653L, D653M, D653N, D653P, D653Q, D653R, D653S, D653T, D653V, D653W 및 D653Y로 이루어진 군에서 선택되고, 선택적으로 상기 D653에 아미노산 치환은 D653W이다. 일부 구현예에서, 상기 S628에 아미노산 치환은 S628W이다. 일부 구현예에서, 상기 P657에 아미노산 치환은 P657A, P657R 및 P657W로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 F880에 아미노산 치환은 F880Y이다. 일부 구현예에서, 상기 G884에 아미노산 치환은 G884A, G884S, G884T 및 G884P 로 이루어진 군에서 선택된다.

[0083] 일부 구현예에서, RNA 중합효소가, 서열번호: 1~4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 RNA 중합효소에 비해, 위치 E350, D351, K387 및 D653 로 이루어진 군에서 선택되는 위치들 중 두 자리에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소가 E350 및 D351에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소가 E350 및 K387에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 중합효소가 K387 및 D653에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 위치 E350에 아미노산 치환은 E350W, E350A, E350K, 또는 E350N이다. 일부 구현예에서, 상기 위치 D351에 아미노산 치환은 D351V이다. 일부 구현예에서, 상기 위치 K387에 아미노산 치환은 K387N, K387S, 또는 K387H이다. 일부 구현예에서, 상기 위치 D653에 아미노산 치환은 D653T 또는 D653K이다.

[0084] 일부 구현예에서, RNA 중합효소가, 서열번호: 1~4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 RNA 중합효소에 비해, 위치 E350 및 K387에 아미노산 치환을 포함하되, 선택적으로 상기 치환은 E350W 및 K387N이다.

[0085] 일부 구현예에서, RNA 중합효소가, 서열번호: 1~4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 RNA 중합효소에 비해, 위치 E350 및 D351에 아미노산 치환을 포함하되, 선택적으로 상기 치환은 E350W 및 D351V이다.

[0086] 일부 구현예에서, RNA 중합효소가, 서열번호: 1~4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 RNA 중합효소에 비해, 위치 K387 및 D653에 아미노산 치환을 포함하되, 선택적으로 상기 치환은 K387N 및 D653T이다.

[0087] 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 9의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 10의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, T7 RNA 중합효소가 서열번호: 12의 아미노산 서열을 포함한다.

[0088] **T7 RNA 중합효소 서열**

[0089] **야생형 T7 RNA 중합효소**

[0090] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKAKRGKRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHF KKNVEEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCEIML IESTGMVSLHRQAGVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPVEYKAINIAQNTAWKINKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPNMDWRGRVYAVSMFN PQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNNLLPSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVT RSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHWVTPDGPFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS LKRTTVVAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF A(서열번호: 1)

[0091] **C-말단 G T7 RNA 중합효소**

[0092] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKAKRGKRPT

AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSDNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVPWQYKPKI QTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLKFVRETMDVTYESCVDLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 2)

[0093] G47A T7 RNA 중합효소

[0094] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKAKRGKRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSDNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVPWQYKPKI QTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLKFVRETMDVTYESCVDLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 3)

[0095] G47A; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0096] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKAKRGKRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSDNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVPWQYKPKI QTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLKFVRETMDVTYESCVDLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 4)

[0097] G47A; E350K; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0098] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKAKRGKRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSDNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVPWQYKPKI QTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLKFVRETMDVTYESCVDLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 5)

[0099] G47A; E350N; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0100] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKAKRGKRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSDNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVNDIPAIEEELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVPWQYKPKI QTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFG

TIPADAANLFKAVRETMVDITYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 6)

[0101] G47A; E350A; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0102] >MNTINIAKNDSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVADIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKTTVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDITYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 7)

[0103] G47A; E350W; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0104] >MNTINIAKNDSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVADIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKTTVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDITYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 8)

[0105] G47A; D351V; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0106] >MNTINIAKNDSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEVIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKTTVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDITYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 9)

[0107] G47A; K487S; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0108] >MNTINIAKNDSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRSDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSRLRKTTVWAHEKYGIESFALIHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDITYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG(서열번호: 10)

[0109] G47A; K387H; C-말단 G T7 RNA 중합효소

[0110] >MNTINIAKNDSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCIEMLESTGMVSLHRQAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMPYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRHDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFWPYNMWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF

CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCG IQHFSAML RDEVGGRVNL PSETVQDIYGI VAKKVNE ILQADAINGTDNEVVTVTDENTGE ISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVWQYKPK IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSE IDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT TVVWAHEKYGIESFAL IHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG (서열번호: 11)

[0111] **G47A; K387N; C-말단 G T7 RNA 중합효소**

[0112] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNV EQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCI EML IESTGMVSLHRQAGVVGQDSEI ELAPEYAEA IATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMP EYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPA IEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRNDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFPYNM DWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCG IQHFSAML RDEVGGRVNL PSETVQDIYGI VAKKVNE ILQADAINGTDNEVVTVTDENTGE ISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVWQYKPK IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSE IDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT TVVWAHEKYGIESFAL IHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG (서열번호: 12)

[0113] **G47A; E350W; D351V; C-말단 G T7 RNA 중합효소**

[0114] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMAEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNV EQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCI EML IESTGMVSLHRQAGVVGQDSEI ELAPEYAEA IATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMP EYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVWVIPA IEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFPYNM DWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCG IQHFSAML RDEVGGRVNL PSETVQDIYGI VAKKVNE ILQADAINGTDNEVVTVTDENTGE ISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVWQYKPK IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSE IDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT TVVWAHEKYGIESFAL IHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG (서열번호: 13)

[0115] **E350W; D351V; T7 RNA 중합효소**

[0116] >MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL PKMIARINDWFEEVKA KRGRPT
AFQFLQEI KPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNV EQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS
WHKEDSIHVGVRCI EML IESTGMVSLHRQAGVVGQDSEI ELAPEYAEA IATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKAL
MRYEDVYMP EYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVWVIPA IEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANK
FANHKAIFPYNM DWRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPF
CFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGCSCG IQHFSAML RDEVGGRVNL PSETVQDIYGI VAKKVNE ILQADAINGTDNEVVTVTDENTGE ISEKVKL
GTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDK
KTGEILRKRCVHVWTPDGFVWQYKPK IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSE IDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT TVVWAHEKYGIESFAL IHDSFG
TIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFAFAG (서열번호: 14)

[0117] 일부 구현예에서, 상기 RNA 중합효소(예를 들면, T7 RNA 중합효소 변종)는 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식
IVT 반응 혼합물에 0.01 mg/ml 내지 1 mg/ml의 농도로 존재한다. 예를 들어, 상기 RNA 중합효소는 반응 혼합물
에 0.01 mg/mL, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 또는 1.0 mg/ml의 농도로 존재할 수 있다.

[0118] **뉴클레오사이드 트리포스페이트**

[0119] 본 개시의 NTP는 자연발생적인 NTP, 합성 NTP 및/또는 변형된 NTP일 수 있다. 반응 혼합물에 자연발생적인 NTP,
합성 NTP, 변형된 NTP, 또는 이들의 임의의 조합이 포함될 수 있다. 따라서, 반응 혼합물의 NTP는 미변형된 및/
또는 변형된 아데노신 트리포스페이트(ATP), 변형된 및/또는 미변형된 우리딘 트리포스페이트(UTP), 변형된 및/
또는 미변형된 구아노신 트리포스페이트(GTP) 및/또는 변형된 및/또는 미변형된 사이티딘 트리포스페이트(CTP)
를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 NTP에는 변형된 핵염기가 포함된다. 본원에 제공된 바와 같이 사용
될 수 있는 변형된 핵염기의 비제한적인 예에는 슈도우리딘(ψ), 1-메틸슈도우리딘(m ψ), 1-에틸슈도우리딘,
2-티오우리딘, 4'-티오우리딘, 2-티오-1-메틸-1-데아자-슈도우리딘, 2-티오-1-메틸-슈도우리딘, 2-티오-5-아자-
우리딘, 2-티오-디하이드로슈도우리딘, 2-티오-디하이드로우리딘, 2-티오-슈도우리딘, 4-메톡시-2-티오-슈도우
리딘, 4-메톡시-슈도우리딘, 4-티오-1-메틸-슈도우리딘, 4-티오-슈도우리딘, 5-아자-우리딘, 디하이드로슈도우

리딘, 5-메틸우리딘, 5-메톡시우리딘(mo5U) 및 2'-O-메틸 우리딘이 포함된다. 일부 구현예에서, NTP의 혼합물(및 따라서 RNA 전사체)에 앞서 말한 변형된 핵염기 중 적어도 2개(예를 들면, 2, 3, 4개 이상)의 조합이 포함된다. 일부 구현예에서, NTP의 혼합물이 1-메틸슈도우리딘(m₁ψ)을 포함한다. 일부 구현예에서, NTP의 혼합물이 1-에틸슈도우리딘을 포함한다.

[0120] 일부 구현예에서, 유가식 IVT 반응 혼합물 중 각 NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP 및 CTP)가 각 NTP에 대해 계산된 백분율(%) 소모값(예를 들면, 초기 뉴클레오타이드 실험 기반 균형 반응 중 계산됨)에 상응하는 몰비로 존재한다. 예를 들어, 초기 뉴클레오타이드 실험 기반 균형 반응에서 관심대상의 특정 RNA에 대해 계산된 ATP, UTP, GTP 및 CTP에 대한 백분율 소모값이 총 NTP 농도가 20 mM인 IVT 반응 혼합물에서 각각 35%, 20%, 25% 및 20%라면(동일한 관심대상의 RNA를 전사하는 경우), ATP, UTP, GTP 및 CTP에 대해 상응하는 몰비는 각각 7 mM, 4 mM, 5 mM 및 4 mM이다.

[0121] 일부 구현예에서, 유가식 IVT 반응 혼합물 중 각각의 개별(그리고 따라서 총) NTP 농도가 상기 반응의 전반에 걸쳐 0 밀리몰(mM)보다 높게 유지된다. 예를 들어, 상기 NTP 농도는 1 mM 내지 50 mM, 1 mM 내지 40 mM, 1 mM 내지 30 mM, 1 mM 내지 20 mM, 1 mM 내지 10 mM, 2 mM 내지 50 mM, 2 mM 내지 40 mM, 2 mM 내지 30 mM, 2 mM 내지 20 mM, 2 mM 내지 10 mM, 3 mM 내지 50 mM, 3 mM 내지 40 mM, 3 mM 내지 30 mM, 3 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 10 mM, 4 mM 내지 50 mM, 4 mM 내지 40 mM, 4 mM 내지 30 mM, 4 mM 내지 20 mM, 4 mM 내지 10 mM, 5 mM 내지 50 mM, 5 mM 내지 40 mM, 5 mM 내지 30 mM, 5 mM 내지 20 mM, 또는 5 mM 내지 10 mM로 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 NTP 농도는 10 mM 내지 20 mM에 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 NTP 농도는 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 또는 20 mM로(또는 적어도 그렇게) 유지된다. 일부 구현예에서, 상기 NTP 농도는 2 mM 내지 10 mM의 하한치보다 높게, 2 mM 내지 9 mM의 하한치보다 높게, 2 mM 내지 8 mM의 하한치보다 높게, 2 mM 내지 7 mM의 하한치보다 높게, 2 mM 내지 6 mM의 하한치보다 높게, 또는 2 mM 내지 6 mM의 하한치보다 높게 유지된다.

[0122] 일부 구현예에서, 각각의 개별(및 따라서 총) NTP 농도가 유가식 IVT 반응 전반에 걸쳐 초기 NTP 농도의 5% 내지 200% 내에 속한다. 예를 들어, 상기 NTP 농도는 초기 NTP 농도의 5% 내지 175%, 5% 내지 150%, 5% 내지 125%, 5% 내지 100%, 5% 내지 75%, 5% 내지 50%, 또는 5% 내지 25% 내로 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 NTP 농도는 초기 NTP 농도의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200% 내로 유지될 수 있다. 상기 초기 NTP 농도는 전사가 시작되기 전 IVT 반응에서의 총 NTP 농도이다. 본원에 사용되는 [NTP](즉, NTP 주위의 꺾쇠 괄호)는 일반적으로, 꺾쇠 괄호로 담은 NTP의 농도를 가리킨다. 예를 들어 [ATP]는 일반적으로 ATP의 농도를 가리키고; [GTP]는 일반적으로 GTP의 농도를 가리키고; [CTP]는 일반적으로 CTP의 농도를 가리키고; [UTP]는 일반적으로 UTP의 농도를 가리킨다.

[0123] IVT 반응 혼합물에 존재하는 NTP 및 캡 유사체의 농도가 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 각 퓨린 NTP 및 RNA 캡 유사체("캡 유사체")는 상기 반응에서 등몰(1:1) 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 상기 반응 중 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드 캡) 대 각 퓨린 NTP의 몰비는 1:1보다 크다. 예를 들어, 상기 반응 중 캡 유사체 대 NTP의 몰비는 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 50:1, 또는 100:1 일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 반응 중 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드 캡) 대 각 NTP의 몰비는 1:1 미만이다. 예를 들어, 상기 반응 중 캡 유사체(예를 들면, 트리뉴클레오타이드 캡) 대 각 NTP의 몰비는 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 또는 1:100일 수 있다.

[0124] IVT 반응 중 개별 NTP의 상대적 농도 역시 달라질 수 있다. 예를 들어, ATP가 GTP, CTP 및 UTP의 과잉 속에 사용될 수 있다. 다른 예로서, GTP가 ATP, CTP 및 UTP의 과잉 속에 사용될 수 있고, CTP가 ATP, GTP 및 UTP의 과잉 속에 사용될 수 있고, 또는 UTP가 ATP, GTP 및 CTP의 과잉 속에 사용될 수 있다.

[0125] 일부 구현예에서, 초기 IVT 반응 혼합물 중 NTP의 상대적 농도가 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP]비를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 초기 IVT 반응 혼합물 중 NTP의 상대적 농도가 2:1의 [ATP]:[UTP]비를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 IVT 반응 혼합물 중 NTP의 상대적 농도가 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [GTP]:[CTP]비를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 IVT 반응 혼합물 중 NTP의 상대적 농도가 4:1의 [GTP]:[CTP]비를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 IVT 반응 혼합물 중 NTP의 상대적 농도가 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 포함한다.

[0126] 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 총 NTP 농도가 0.5 mM의 하한치보다 높게 유지된다. 일부 구현

예에서, 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 총 NTP 농도가 0.5~20 mM, 1~20 mM, 0.5~5 mM, 2~8 mM, 2~5 mM, 5~10 mM, 5~30 mM, 5~20 mM, 10~20 mM, 또는 5~15 mM로 유지된다. 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 총 NTP 농도가 약 10~20 mM, 약 8~16, 약 6~14 mM, 또는 약 10~15 mM로 유지된다.

[0127] **RNA 캡 유사체**

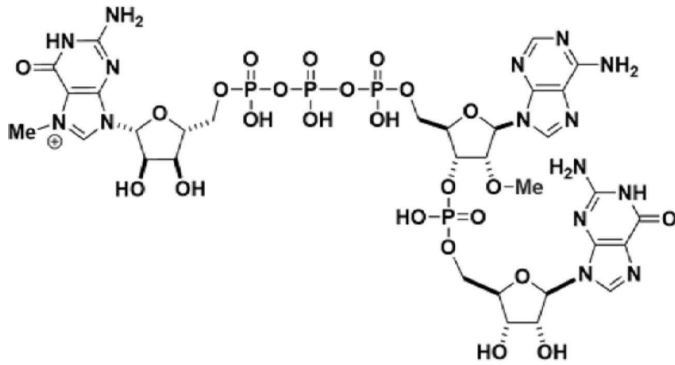
[0128] 일부 구현예에서, 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응은 상기 IVT 반응 혼합물이 RNA 캡을 포함하는 "공동-전사 캡핑" IVT 반응이다. 다시 말해, mRNA가 별도의 캡핑 반응에 대한 필요성 없이, "1 포트(one-pot)" 반응에서 생산된다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 IVT 반응 혼합물에는 RNA 캡 유사체가 포함된다. RNA 캡 유사체가 일반적으로 mRNA 안정성 및 번역 효율을 향상시킨다. 전통적인 캡 유사체에는 GpppG, m⁷GpppG 및 m²,2,7GpppG가 포함된다. 일부 구현예에서, 본 개시의 RNA 캡 유사체가 디뉴클레오타이드 캡, 트리뉴클레오타이드 캡, 또는 테트라뉴클레오타이드 캡이다.

[0129] 일부 구현예에서, 상기 캡 유사체는 트리뉴클레오타이드 캡이다. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 하기 서열에서 선택되는 서열을 포함한다: GAA, GAC, GAG, GAU, GCA, GCC, GCG, GCU, GGA, GGC, GGG, GGU, GUA, GUC, GUG 및 GUU.

[0130] 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 하기 서열에서 선택되는 서열을 포함한다: m⁷GpppApA, m⁷GpppApC, m⁷GpppApG, m⁷GpppApU, m⁷GpppCpA, m⁷GpppCpC, m⁷GpppCpG, m⁷GpppCpU, m⁷GpppGpA, m⁷GpppGpC, m⁷GpppGpG, m⁷GpppGpU, m⁷GpppUpA, m⁷GpppUpC, m⁷GpppUpG 및 m⁷GpppUpU. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 하기 서열에서 선택되는 서열을 포함한다: m⁷G₃·OMepppApA, m⁷G₃·OMepppApC, m⁷G₃·OMepppApG, m⁷G₃·OMepppApU, m⁷G₃·OMepppCpA, m⁷G₃·OMepppCpC, m⁷G₃·OMepppCpG, m⁷G₃·OMepppCpU, m⁷G₃·OMepppGpA, m⁷G₃·OMepppGpC, m⁷G₃·OMepppGpG, m⁷G₃·OMepppGpU, m⁷G₃·OMepppUpA, m⁷G₃·OMepppUpC, m⁷G₃·OMepppUpG 및 m⁷G₃·OMepppUpU. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 하기 서열에서 선택되는 서열을 포함한다: m⁷G₃·OMepppA₂·OMeP, m⁷G₃·OMepppA₂·OMePC, m⁷G₃·OMepppA₂·OMePG, m⁷G₃·OMepppA₂·OMePU, m⁷G₃·OMepppC₂·OMeP, m⁷G₃·OMepppC₂·OMePC, m⁷G₃·OMepppC₂·OMePG, m⁷G₃·OMepppC₂·OMePU, m⁷G₃·OMepppG₂·OMeP, m⁷G₃·OMepppG₂·OMePC, m⁷G₃·OMepppG₂·OMePG, m⁷G₃·OMepppG₂·OMePU, m⁷G₃·OMepppU₂·OMeP, m⁷G₃·OMepppU₂·OMePC, m⁷G₃·OMepppU₂·OMePG 및 m⁷G₃·OMepppU₂·OMePU. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 하기 서열에서 선택되는 서열을 포함한다: m⁷GpppA₂·OMeP, m⁷GpppA₂·OMePC, m⁷GpppA₂·OMePG, m⁷GpppA₂·OMePU, m⁷GpppC₂·OMeP, m⁷GpppC₂·OMePC, m⁷GpppC₂·OMePG, m⁷GpppC₂·OMePU, m⁷GpppG₂·OMeP, m⁷GpppG₂·OMePC, m⁷GpppG₂·OMePG, m⁷GpppG₂·OMePU, m⁷GpppU₂·OMeP, m⁷GpppU₂·OMePC, m⁷GpppU₂·OMePG 및 m⁷GpppU₂·OMePU.

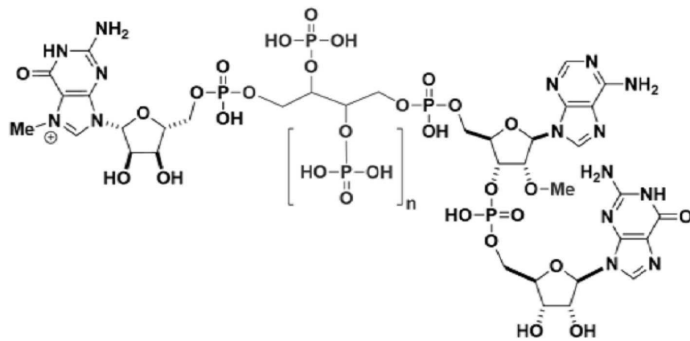
[0131] 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 하기 서열에서 선택되는 서열을 포함한다: GAG, GCG, GUG 및 GGG. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 서열 GAG를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 m⁷GpppA₂·OMePG를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 m⁷GpppmA₂·OMePG를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 m⁷GpppmA₂·OMePG를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 캡은 m⁷GpppeA₂·OMePG를 포함한다.

[0132] 일부 구현예에서, 트리뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



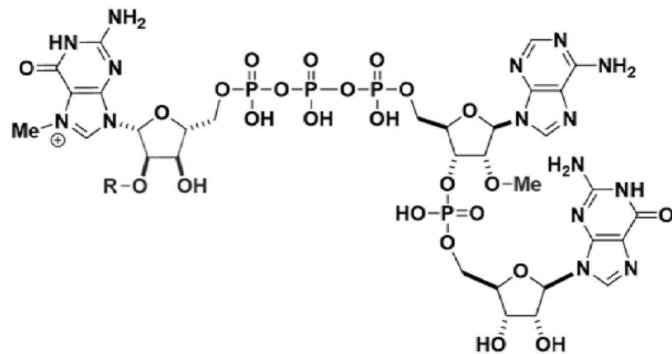
[0133] (캡 1)

[0134] 다른 구현예에서, 트리뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



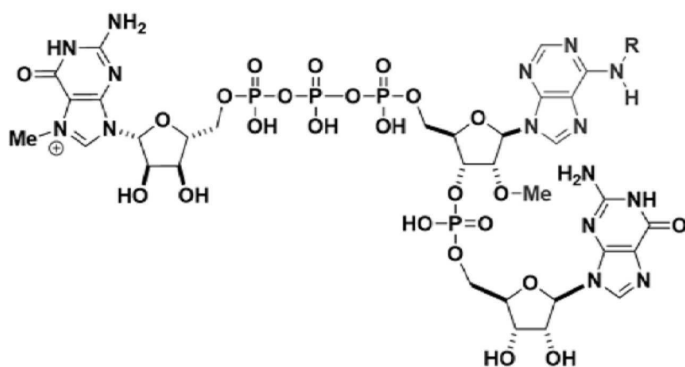
[0135] (캡 2)

[0136] 그 밖의 다른 구현예에서, 트리뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



[0137] (캡 3)

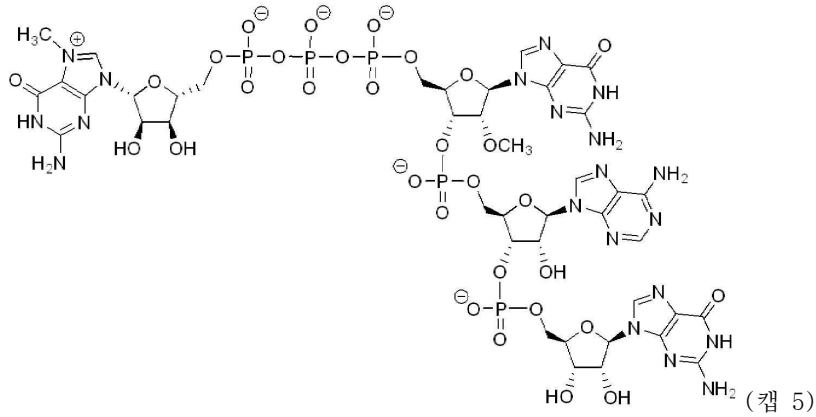
[0138] 여전히 다른 구현예에서, 트리뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



[0139] (캡 4)

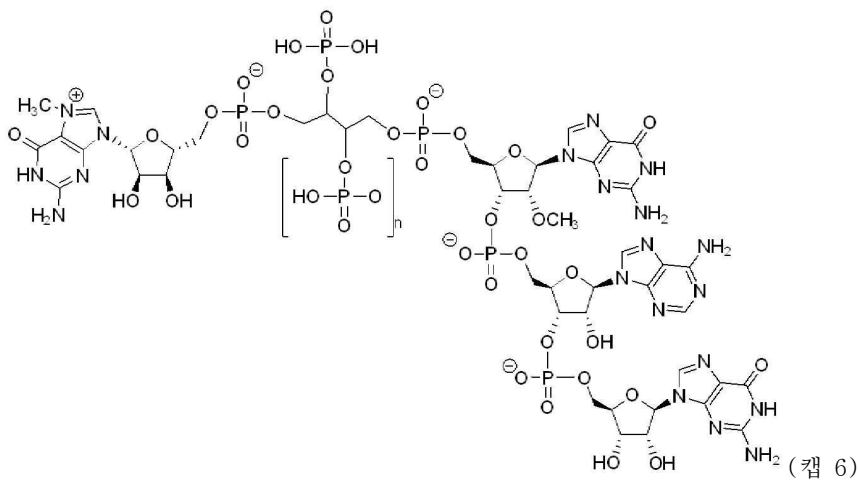
[0140] 일부 구현예에서, 상기 캡 유사체는 테트라뉴클레오타이드 캡 유사체이다. 일부 구현예에서, 상기 캡 유사체는 GGAG 서열을 포함하는 테트라뉴클레오타이드 캡 유사체이다.

[0141] 일부 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



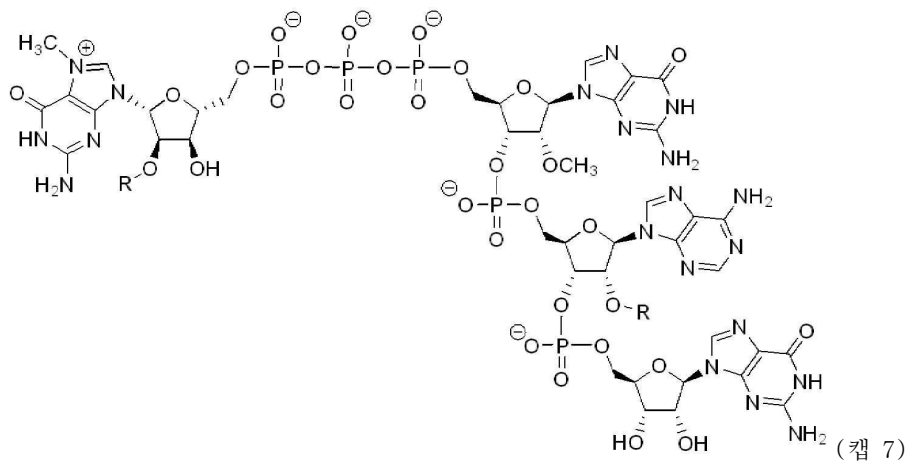
[0142] 다른 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:

[0143] 다른 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



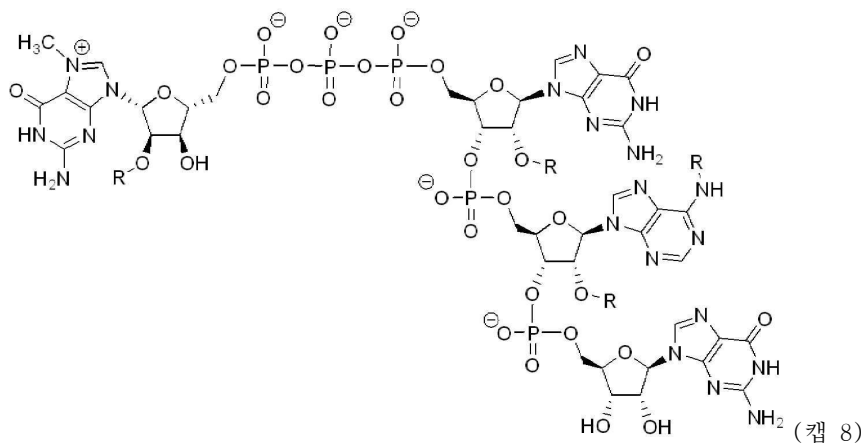
[0144] 그 밖의 다른 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:

[0145] 그 밖의 다른 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



[0146] 그 밖의 다른 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:

[0147] 그 밖의 다른 구현예에서, 테트라뉴클레오타이드 캡이 하기 구조를 포함한다:



[0148]

[0149]

일부 구현예에서, R는 알킬(예를 들면, C₁~C₆ 알킬)이다. 일부 구현예에서, R는 메틸기(예를 들면, C₁ 알킬)이다. 일부 구현예에서, R는 에틸기(예를 들면, C₂ 알킬)이다. 일부 구현예에서, R는 수소이다.

[0150]

일부 구현예에서, 본 개시의 방법에 의해 생산된 RNA의 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100, 또는 90% 내지 100%가 캡핑된다(RNA 캡 유사체, 예를 들면, $m^7GpppA_2 \cdot OmePG$ 를 포함한다). 예를 들어, 본 개시의 방법에 의해 생산된 RNA의 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과가 캡핑된다(RNA 캡 유사체, 예를 들면, $m^7GpppA_2 \cdot OmePG$ 를 포함한다). 일부 구현예에서, 본 개시의 방법에 의해 생산된 RNA의 100%가 캡핑된다(RNA 캡 유사체, 예를 들면, $m^7GpppA_2 \cdot OmePG$ 를 포함한다).

[0151]

일부 구현예에서, 관심대상의 RNA의 캡핑률(RNA 캡 유사체를 포함하는 RNA 전사체의 백분율)가 유가식 반응에서 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 및/또는 360분에 80% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과이다.

[0152]

일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 관심대상의 RNA의 전사 동안 RNA 캡 유사체로 보충되지 않는다. 다시 말해, 전체 IVT 반응 전반에 걸쳐, 존재하는 유일한 RNA 캡 유사체는 전사 시작 전 반응 혼합물에 있었던 것이다 (추가적인 RNA 캡 유사체가 IVT 반응에 첨가되지 않는다).

[0153]

일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물이 최고 백분율 소모값을 갖는 NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP, 또는 CTP(변형된 또는 미변형된))의 농도보다 적어도 10%(예를 들면, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%) 더 큰 출발 RNA 캡 유사체 농도(전사 시작 전 RNA 캡 유사체의 농도)를 포함한다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물이 최고 백분율 소모값을 갖는 NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP, 또는 CTP(변형된 또는 미변형된))의 농도보다 더 큰 출발 RNA 캡 유사체 농도를 포함한다.

[0154]

일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물이 최고 백분율 소모값을 갖는 퓨린(변형된 또는 미변형된)의 농도보다 적어도 10%(예를 들면, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%) 더 큰 출발 RNA 캡 유사체 농도(전사 시작 전 RNA 캡 유사체의 농도)를 포함한다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물이 최고 백분율 소모값을 갖는 퓨린(변형된 또는 미변형된)의 농도보다 더 큰 출발 RNA 캡 유사체 농도를 포함한다.

[0155]

일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물이 관심대상의 RNA의 제 1 코딩 위치에 존재하는 개별 NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP, 또는 CTP(변형된 또는 미변형된))의 농도보다 적어도 10%(예를 들면, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 100%) 더 큰 출발 RNA 캡 유사체 농도(전사 시작 전 RNA 캡 유사체의 농도)를 포함한다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물이 관심대상의 RNA의 제 1 코딩 위치에 존재하는 NTP(예를 들면, ATP, UTP, GTP, 또는 CTP(변형된 또는 미변형된))의 농도보다 10%~100%, 10%~50%, 10%~40%, 또는 10%~30% 더 큰 출발 RNA 캡 유사체 농도(전사 시작 전 RNA 캡 유사체의 농도)를 포함한다.

[0156]

일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물, 예를 들면, 초기 및 진행 중인 IVT 반응 혼합물은 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 15:1, 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [RNA 캡 유사체]:[퓨린] 비를 포함한다. 일부 구현예에서, 퓨린 뉴클레오타이드(예를 들면, ATP 및 GTP)의 농도 대비 RNA 캡 유사체의 농도는 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 15:1, 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1이다.

[0157] **추가적인 IVT 반응 구성성분**

[0158] 일부 구현예에서, 상기 IVT 반응 혼합물은 완충제, 예를 들면, 트리스, 인산염 또는 굿스 완충제를 포함한다. 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응 혼합물에 사용되는 완충제의 농도는 예를 들어, 적어도 10 mM, 적어도 20 mM, 적어도 30 mM, 적어도 40 mM, 적어도 50 mM, 적어도 60 mM, 적어도 70 mM, 적어도 80 mM, 적어도 90 mM, 적어도 100 mM 또는 적어도 110 mM 인산염일 수 있다. 일부 구현예에서, 인산염의 농도는 20~60 mM 또는 10~100 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 완충제는 트리스-HCl을 포함한다. 예를 들어, 상기 완충제는 10~100 mM, 10~80 mM, 10~60 mM, 20~100 mM, 20~18 mM, 20~60 mM 트리스-HCl을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 완충제는 40 mM 트리스-HCl을 포함할 수 있다.

[0159] 일부 구현예에서, 상기 유가식 IVT 반응 혼합물은 환원제 또는 환원 제제, 예컨대 디티오프레이톨(DTT) 또는 트리스(2-카복시에틸)포스포인(TCEP)을 함유한다. IVT 반응 혼합물에 사용된 DTT의 농도는, 예를 들어, 적어도 1 mM, 적어도 5 mM, 또는 적어도 50 mM일 수 있다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물에 사용되는 DTT의 농도는 1~50 mM 또는 5~50 mM이다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물에 사용되는 DTT의 농도는 5 mM이다. IVT 반응 혼합물에 사용되는 TCEP의 농도는, 예를 들어, 적어도 1 mM, 적어도 5 mM, 또는 적어도 50 mM일 수 있다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물에 사용되는 TCEP의 농도는 1~50 mM 또는 5~50 mM이다. 일부 구현예에서, IVT 반응 혼합물에 사용되는 TCEP의 농도는 2 mM이다.

[0160] 일부 구현예에서, 상기 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응 혼합물은 마그네슘을 함유한다. 일부 구현예에서, IVT 반응에 존재하는 NTP 대 마그네슘 이온(Mg^{2+} ; 예를 들면, $Mg(OAc)_2$)의 몰비가 1:1 내지 1:5이다. 예를 들어, NTP 대 마그네슘 이온의 몰비는 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 또는 1:5일 수 있다.

[0161] **공급 일정**

[0162] 유가식 IVT 반응은 전형적으로 규칙적인 공급 일정을 포함한다. 규칙적인 공급 일정이 IVT 반응 내의 NTP 농도를 원하는 수준으로, 예를 들면, 임계 수준보다 높게, 예를 들면, 초기 NTP 농도의 5%, 10%, 20%, 30%, 또는 50% 초과로 유지하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 공급 일정에 사용되는 시간대 및/또는 양은 정찰형 유가식 IVT 반응을 사용하여 결정된다. 일부 구현예에서, IVT 반응에 공급이 과잉되면(즉, 임의의 소정의 NTP가 반응 도중 지나치게 많이 첨가되면), 풀린 대비 캡 유사체의 비가 1:1 미만으로 감소될 수 있는데, 과잉 공급은 캡핑된 RNA 생산물의 낮은 %를 야기할 수 있다. 다른 구현예에서, IVT 반응에 공급이 부족하면(즉, 임의의 소정의 NTP가 반응 도중 충분히 첨가되지 않으면), 하나 이상의 뉴클레오타이드가 임계 수준 아래로, 예를 들면, 0 mM으로 고갈될 수 있고, 전사된 RNA의 총 수율이 낮을 수 있다. 일부 구현예에서, 공급 일정이 공급 원료의 볼루스 공급을 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 공급 일정이 공급 원료의 연속 공급을 수반할 수 있다.

[0163] 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응에 공급 원료의 볼루스 공급은 10~250분, 20~200분, 10~175 분, 10~100분, 10~20분, 10~30분, 30~60분, 30~100분, 30~150분, 50~100분, 50~150분, 100~300분, 100~250분, 또는 100~150분마다 1회 별도의 부피 또는 양의 공급 원료를 첨가하는 것을 수반한다. 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응에 공급 원료의 볼루스 공급은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300분마다 1회 별도의 부피 또는 양의 공급 원료를 첨가하는 것을 수반한다. 일부 구현예에서, 볼루스 공급에 수반된 별도의 부피가 1~20 mL, 5~20 mL, 10~50 mL, 25~100 mL, 50~500 mL, 250~1000 mL 이상이다. 일부 구현예에서, 볼루스 공급에 수반된 별도의 부피가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 또는 1000 mL이다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 NTP 농도를 앞서 기술된 바와 같이 임계 수준보다 높게, 예를 들면, 초기 NTP 농도의 5% 내지 200%, 5%~100%, 5%~75%, 20%~100%, 20%~75%, 또는 25%~50%의 범위 내에 유지시키기에 충분한 임의의 양이다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비를 유지시키기에 충분한 임의의 양이다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 2:1의 [ATP]:[UTP]비를 유지시키기에 충분한 임의의 양이다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키기에 충분한 임의의 양이다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키기에 충분한 임의의 양이다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키기에 충분한 임의의 양이다.

[0164] 일부 구현예에서, IVT 반응이 전체 반응 동안 1번, 2번 또는 3번 공급 원료의 볼루스 공급으로 보충된다. 일부 구현예에서, IVT 반응이 전체 반응 동안 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10번 이상 공급 원료의 볼루스 공급으로 보충된다.

일부 구현예에서, IVT 반응이 전체 반응 동안 1~5, 2~5, 2~10, 3~10, 3~7, 4~8, 5~10, 5~15번 이상 공급 원료의 볼루스 공급으로 보충된다.

[0165] 일부 구현예에서, 진행 중인 IVT 반응에 공급 원료의 연속 공급은 시간 경과에 따라, 예를 들면, 전체 IVT 반응의 전반에 걸쳐, 공급 원료의 연속 또는 고정 첨가를 수반한다. 일부 구현예에서, 연속 공급 일정이 동일한 관심대상의 RNA의 볼루스 공급 일정을 기반으로, 예를 들면, 반응 동안 일정 기간에 걸쳐 첨가된 총 부피 또는 양을 상기 부피 또는 양이 첨가되는 총 시간으로 나눔으로써, 결정된다. 일부 구현예에서, 연속 공급은 1~50 mL/분, 2~25 mL/분, 2~10 mL/분, 2~8 mL/분, 4~6 mL/분, 3~6 mL/분의 연속 흐름 속도, 또는 임의의 작동가능한 흐름 속도로 진행 중인 IVT 반응에 공급 원료의 고정 첨가를 수반한다. 일부 구현예에서, 연속 공급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 mL/분의 연속 흐름 속도로 진행 중인 IVT 반응에 공급 원료의 고정 첨가를 수반한다. 일부 구현예에서, 연속 공급은 초기 부피 1 mL당 0.0030~0.007 mL/분, 초기 부피 1 mL당 0.0040~0.0060 mL/분, 초기 부피 1 mL당 0.0050~0.0080 mL/분, 또는 초기 부피 1 mL당 0.0060~0.0090 mL/분의 연속 흐름 속도로 진행 중인 IVT 반응에 공급 원료의 고정 첨가를 수반한다. 일부 구현예에서, 연속 공급에 사용되는 공급 원료 중 NTP의 농도는 NTP 농도를 앞서 기술된 바와 같이 임계 수준보다 높게, 예를 들면, 초기 NTP 농도의 5% 내지 200%, 5%~100%, 5%~75%, 20%~100%, 20%~75%, 또는 25%~50%의 범위 내에 유지시키기에 충분하다. 일부 구현예에서, 연속 공급은 시간 경과에 따라 정확하게 일관된 흐름 속도(부피)를 전달하기 위해 연동 펌프를 사용하여 수행된다.

[0166] 일부 구현예에서, 연속 또는 볼루스 공급에 사용되는 공급 원료 중 NTP의 농도는 NTP 농도를 임계 수준보다 높게 유지시키기에 충분하다. 일부 구현예에서, 공급 원료의 별도의 양은 NTP 농도를 임계 수준보다 높게 유지시키기에 충분한 임의의 양이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 1 mM 내지 50 mM, 1 mM 내지 40 mM, 1 mM 내지 30 mM, 1 mM 내지 20 mM, 1 mM 내지 10 mM, 2 mM 내지 50 mM, 2 mM 내지 40 mM, 2 mM 내지 30 mM, 2 mM 내지 20 mM, 2 mM 내지 10 mM, 3 mM 내지 50 mM, 3 mM 내지 40 mM, 3 mM 내지 30 mM, 3 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 10 mM, 4 mM 내지 50 mM, 4 mM 내지 40 mM, 4 mM 내지 30 mM, 4 mM 내지 20 mM, 4 mM 내지 10 mM, 5 mM 내지 50 mM, 5 mM 내지 40 mM, 5 mM 내지 30 mM, 5 mM 내지 20 mM, 또는 5 mM 내지 10 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 10 mM 내지 20 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 또는 20 mM이다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 2 mM 내지 10 mM의 하한치, 2 mM 내지 9 mM의 하한치, 2 mM 내지 8 mM의 하한치, 2 mM 내지 7 mM의 하한치, 2 mM 내지 6 mM의 하한치, 또는 2 mM 내지 6 mM의 하한치보다 높다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 초기 NTP 농도의 5% 내지 200% 내에 속한다. 예를 들어, 상기 임계 수준은 초기 NTP 농도의 5% 내지 175%, 5% 내지 150%, 5% 내지 125%, 5% 내지 100%, 5% 내지 75%, 5% 내지 50%, 또는 5% 내지 25% 내에 속할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 임계 수준은 초기 NTP 농도의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200% 내에 속한다.

[0167] 유가식 IVT의 결과는 일관되게 반응 전반에 걸쳐 반응 속도의 감소(NTP의 소모 및 RNA의 생성 모두)를 보여주었다. 결과적으로, 공급의 속도 역시 반응 전반에 걸쳐 달라져야 한다. 만약 전체 기간에 걸쳐 감소하는 반응 속도로 IVT에 공급하기 위해 (앞서 기술된) 신호 연속 공급 속도가 사용되었다면, 상기 반응은 상기 속도가 가장 빠를 때인 상기 반응의 시작 시점에 공급이 부족하게 될 것이고, 속도가 가장 느릴 때인 반응의 종료 시점에 공급이 과잉될 것이다. 공급 부족 및 공급 과잉의 위험을 방지하기 위해, 상기 반응은 상기 반응의 명시된 시간 간격 동안 사용되는 둘 이상의 연속 공급 속도로 나뉘질 수 있다. 요구되는 뚜렷한 공급 속도 및 전환 시간의 수는 유가식 IVT 전반에 걸쳐 관찰되는 반응 속도의 감소에 따라 달라질 수 있다.

[0168] **정찰형 유가식 IVT 반응**

[0169] 적절한 공급 일정을 결정하기 위해, 정찰형 유가식 IVT 반응이 수행될 수 있는데, 여기서 정의된 시간 간격으로, 그리고 정의된 부피 또는 양만큼, 공급 원료를 활성 IVT 반응에 첨가하기 위해 볼루스 공급이 사용된다. 일부 구현예에서, 이와 같은 초기 공급 조건은 상이한 RNA 서열을 인코딩하는 다른 DNA를 이용한 유가식 IVT 반응의 사전 결과를 기반으로 선택되는데, 고품질 생산물 또는 수율을 생산하기 위한 의도는 아니다. 일부 구현예에서, 상기 정찰형 IVT 반응에는 각 볼루스 공급 직전에 활성 유가식 IVT에서 시점을 샘플링하는 단계가 포함된다. 이들 샘플 각각에서 측정된 NTP 농도가 이어서 시간 경과에 따라 전사되는 독특한 DNA의 경우 IVT 반응에서 NTP 소모의 속도를 계산하는 데 사용될 수 있다. 공급 일정은 이어서 관찰된 NTP 소모를 일치시키고 반응 전반에 걸쳐 표적 NTP 농도를 유지시키기 위해 조절될 수 있다. 일부 구현예에서, 이와 같은 별도의 공급 시

간 및 부피가 유가식 IVT 반응을 위한 볼루스 공급 일정을 구성한다.

[0170] **추가적인 구현예**

- [0171] 1. *시험관 내 전사*(IVT) 반응의 백분율(%) 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP) 소모를 결정하는, 하기를 포함하는 방법:
- [0172] (a) 알려진 초기 NTP 농도, 관심대상의 리보핵산(RNA)을 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA) 및 RNA 중합효소를 포함하는 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계;
- [0173] (b) 일정 기간에 걸쳐 별개의 간격으로 개별 NTP 농도를 측정하는 단계; 및
- [0174] (c) 반응 혼합물 중 각 NTP의 백분율(%) 소모값을 계산하는 단계.
- [0175] 2. 제 1 항에 있어서, 상기 NTP가 아데노신 트리포스페이트(ATP), 사이티딘 트리포스페이트(CTP), 우리딘 트리포스페이트(UTP) 및 구아노신 트리포스페이트(GTP)를 포함하는, 방법.
- [0176] 3. 제 1 항에 있어서, 단계 (b)가 (i) 개별 NTP 소모율을 총 NTP 소모율로 나누는 단계를 포함하는, 방법.
- [0177] 4. 제 3 항에 있어서, 상기 개별 NTP 소모율이 일정 기간에 걸쳐 별개의 간격으로 개별 NTP 농도를 측정함으로써 계산되고; 및 상기 총 NTP 소모율이 일정 기간에 걸쳐 별개의 간격으로 총 NTP 농도를 측정함으로써 계산되는, 방법.
- [0178] 5. 제 4 항에 있어서, NTP의 적어도 하나의 농도가 임계 농도 아래로 떨어질 때까지 상기 개별 NTP 농도 및 총 NTP 농도 측정치가 수집되는, 방법.
- [0179] 6. 제 5 항에 있어서, 상기 임계 농도가 0 밀리몰(mM)보다 높되, 선택적으로 상기 임계 농도가 5 mM 내지 20 mM 이고, 선택적으로 상기 임계 농도가 초기 NTP 농도의 5%~75% 내에 속하는, 방법.
- [0180] 7. 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알려진 초기 NTP 농도가 [ATP], [CTP], [UTP] 및 [GTP] 각각의 등몰 NTP 농도를 포함하는, 방법.
- [0181] 8. 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알려진 초기 NTP 농도가 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 포함하는, 방법.
- [0182] 9. 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알려진 초기 NTP 농도가 2:1:1:4의 [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP] 비를 포함하는, 방법.
- [0183] 10. 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NTP가 화학적으로 변형된 NTP, 자연적으로 발생하는 NTP, 또는 합성 NTP인, 방법.
- [0184] 11. 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IVT 반응이 20 내지 40분의 시간 간격에 걸쳐 수행되는, 방법.
- [0185] 12. 하기를 포함하는, 관심대상의 리보핵산(RNA)의 유가식 *시험관 내 전사*(IVT)의 방법:
- [0186] (a) 관심대상의 RNA를 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA), RNA 중합효소 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP)를 포함하는 초기 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하는 단계; 및
- [0187] (b) 시간 경과에 따라 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 NTP를 포함하는 공급 원료 혼합물을 전달하되, 각 NTP가 각 NTP에 대해 별도로 계산된 백분율 소모값을 기준으로 한 몰비로 상기 공급 원료 혼합물에 존재하고, 상기 백분율 소모값이 관심대상의 RNA에 특이적이며 및 상기 공급 원료 혼합물이 상기 반응 혼합물 중 총 NTP 농도를 0 mM보다 높게 유지시키는 양으로 전달됨으로써, 관심대상의 전사된 RNA를 생산하는 단계.
- [0188] 13. 제 12 항에 있어서, 상기 NTP가 아데노신 트리포스페이트(ATP), 사이티딘 트리포스페이트(CTP), 우리딘 트리포스페이트(UTP) 및 구아노신 트리포스페이트(GTP)를 포함하는, 방법.
- [0189] 14. 제 12 항 또는 제 13 항에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물이 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 포함하는, 방법.
- [0190] 15. 제 12 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물이 2:1:1:4의 [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP] 비를 포함하는, 방법.
- [0191] 16. 제 12 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 각 NTP에 대해

계산된 백분율(%) 소모값과 다른 몰비 증가물로 존재하는, 방법.

- [0192] 17. 제 12 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 각 NTP에 대해 등몰 농도로 존재하는, 방법.
- [0193] 18. 제 12 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 1~10 mM, 1~6 mM, 2~6 mM, 또는 3~6 mM의 농도로 존재하는, 방법.
- [0194] 19. 제 12 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 각 NTP의 농도가 이것의 상응하는 초기 NTP 농도의 5% 내지 200%, 5%~100%, 5%~75%, 20%~100%, 20%~75%, 또는 25%~50%의 범위 내에 속하는, 방법.
- [0195] 20. 제 12 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 혼합물이 1:1 내지 4:1, 선택적으로 1:1 내지 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및/또는 1:1 내지 4:1의 [GTP]:[CTP]비로 유지되는, 방법.
- [0196] 21. 제 12 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 혼합물이 2:1:1:4의 [ATP]:[UTP]:[CTP]:[GTP] 비로 유지되는, 방법.
- [0197] 22. 하기를 포함하는, 관심대상의 리보핵산(RNA)의 유가식 시험관 내 전사(IVT)의 방법:
- [0198] (a) 관심대상의 RNA를 인코딩하는 데옥시리보핵산(DNA), RNA 중합효소 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트(NTP)를 포함하는 초기 반응 혼합물로 IVT 반응을 수행하되, 상기 NTP가 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 포함하는 단계; 및
- [0199] (b) 시간 경과에 따라, 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 NTP를 포함하는 공급 원료 혼합물을 전달하되, 각 NTP가 각 NTP에 대해 별도로 계산된 백분율 소모값을 기준으로 한 몰비로 상기 공급 원료 혼합물에 존재하고, 상기 백분율 소모값이 관심대상의 RNA에 특이적이며, 및 상기 공급 원료 혼합물이 2:1의 [ATP]:[UTP] 비 및 4:1의 [GTP]:[CTP] 비를 유지시키는 양으로 전달됨으로써, 관심대상의 전사된 RNA를 생산하는 단계.
- [0200] 23. 제 12 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NTP가 화학적으로 변형된 NTP, 자연발생적인 NTP, 또는 합성 NTP인, 방법.
- [0201] 24. 제 12 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공급 원료 혼합물이 시간 경과에 따라 볼루스 공급을 사용하여 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법.
- [0202] 25. 제 24 항에 있어서, 상기 공급 원료 혼합물이 10~250분마다, 선택적으로 20~200분마다 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법.
- [0203] 26. 제 12 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공급 원료 혼합물이 시간 경과에 따라 연속적 원료 공급을 사용하여 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법.
- [0204] 27. 제 26 항에 있어서, 상기 공급 원료 혼합물이 하기의 연속 흐름 속도로 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물에 전달되는, 방법:
- [0205] (i) 2~8 mL/분, 선택적으로 4~6 mL/분; 또는
- [0206] (ii) 초기 부피 1 mL당 0.0030~0.007 mL/분, 선택적으로 초기 부피 1 mL당 0.0040~0.0060 mL/분.
- [0207] 28. 제 12 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 상기 초기 반응 혼합물 중 각 NTP가 각 NTP에 대해 계산된 백분율(%) 소모값과 동등한 몰비로 존재하는, 방법.
- [0208] 29. 제 12 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 진행 중인 IVT 반응 혼합물 중 총 NTP 농도가 하한치인 0.5 mM보다 높게 유지되고, 선택적으로 10 mM 내지 20 mM로 유지되는, 방법.
- [0209] 30. 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 초기 및/또는 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 추가로 RNA 캡 유사체를 포함하는, 방법.
- [0210] 31. 제 30 항에 있어서, 상기 RNA 캡 유사체가 화학적으로 변형된 RNA 캡 유사체, 자연적으로 발생하는 RNA 캡 유사체, 또는 합성 RNA 캡 유사체인, 방법.
- [0211] 32. 제 30 항 또는 제 31 항에 있어서, 상기 RNA 캡 유사체가 (i) 선택적으로, 캡 1, 캡 2, 캡 3, 또는 캡 4 구조체를 포함하는 트리뉴클레오타이드 캡 유사체에서 선택되는 트리뉴클레오타이드 RNA 캡 유사체 또는 (ii)

선택적으로, 캡 5, 캡 6, 캡 7, 또는 캡 8 구조체를 포함하는 트리뉴클레오타이드 캡 유사체에서 선택되는, 테트라뉴클레오타이드 RNA 캡 유사체.

- [0212] 33. 제 30 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 초기 및 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 1:1 내지 20:1, 1:1 내지 15:1, 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 3:1, 또는 1:1 내지 2:1의 [RNA 캡 유사체]:[퓨린] 비를 포함하는, 방법.
- [0213] 34. 제 12 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율이 회분식 IVT 반응을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 큰, 방법.
- [0214] 35. 제 34 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율이 회분식 IVT 반응을 사용하여 전사된 RNA의 수율보다 적어도 100% 큰, 방법.
- [0215] 36. 제 12 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 수율이 초기 반응 부피인 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30 mg/mL보다 큰, 방법.
- [0216] 37. 제 12 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 초기 및 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 완충제 및/또는 마그네슘을 추가로 포함하는, 방법.
- [0217] 38. 제 37 항에 있어서, 상기 완충제가 트리스-HCl이고, 선택적으로 상기 완충제가 20 내지 60 mM 트리스-HCl이고, 선택적으로 상기 완충제가 40 mM 트리스-HCl인, 방법.
- [0218] 39. 제 30 항 내지 제 3387 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 90%, 선택적으로 적어도 95%가 상기 RNA 캡 유사체를 포함하는, 방법.
- [0219] 40. 제 30 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 캡 유사체 대 ATP 비, 또는 캡 유사체 대 GTP 비가 0.6보다 크고, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 90%가 캡 유사체를 포함하는, 방법.
- [0220] 41. 제 39 항 또는 제 40 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA 길이가 적어도 2000개의 뉴클레오타이드인, 방법.
- [0221] 42. 제 30 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 90%가 IVT 반응 후 180 분 및/또는 360분 경에 RNA 캡 유사체를 포함하는, 방법.
- [0222] 43. 제 12 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 초기 및/또는 진행 중인 IVT 반응 혼합물이 IVT 반응 동안 RNA 캡 유사체로 보충되지 않는, 방법.
- [0223] 44. 제 12 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 있어서, 초기 반응 혼합물 중 DNA 농도가 0.025~0.075 mg/mL, 선택적으로 0.05 mg/mL인, 방법.
- [0224] 45. 제 12 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 농도가 IVT 반응 동안 0.01 mg/mL보다 높은 농도, 선택적으로 0.01~0.05 mg/mL의 농도로 유지되는, 방법.
- [0225] 46. 제 12 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 있어서, IVT 반응에서 관심대상의 전사된 RNA 대 상기 DNA의 물비가 무가식(non-fed batch) 대조군 방법의 전사된 RNA 대 DNA의 물비보다 적어도 2배 또는 적어도 3배 더 큰, 방법.
- [0226] 47. 제 23 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서, UTP가 1-메틸슈도우리딘 및 1-에틸슈도우리딘에서 선택되는 변형된 UTP인, 방법.
- [0227] 48. 제 12 항 내지 제 47 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA가 메신저 RNA(mRNA)인, 방법.
- [0228] 49. 제 12 항 내지 제 48 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA 길이가 100개 초과 뉴클레오타이드인, 방법.
- [0229] 50. 제 12 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 총 IVT 반응 시간이 150~1000분인, 방법.
- [0230] 51. 제 12 항 내지 제 50 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA의 적어도 50% 또는 적어도 70%가 IVT 반응 시작 후 420분 경에 폴리A 꼬리를 포함하는, 방법.
- [0231] 52. 제 51항에 있어서, 상기 폴리A 꼬리가 A₁₀₀ 폴리A 꼬리인, 방법.
- [0232] 53. 제 30 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서, 초기 반응 혼합물이 관심대상의 RNA의 제1 코딩 위치에

존재하는 NTP의 농도보다 적어도 10% 또는 적어도 20% 더 큰 RNA 캡 유사체 농도를 포함하는, 방법.

- [0233] 54. 제 53 항에 있어서, 관심대상의 RNA의 제1 코딩 위치에 존재하는 NTP가 ATP 또는 GTP인, 방법.
- [0234] 55. 제 1 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 중합효소가 T7 RNA 중합효소인, 방법.
- [0235] 56. 제 55 항에 있어서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 C-말단에 추가적인 글라이신을 포함하는, 방법.
- [0236] 57. 제 55 항에 있어서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 G47A 치환을 포함하는, 방법.
- [0237] 58. 제 55 항에 있어서, T7 RNA 중합효소가 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 G47A 치환 및 C-말단에 추가적인 글라이신을 포함하는, 방법.
- [0238] 59. 제 30 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 캡 유사체가 디뉴클레오타이드 캡, 트리뉴클레오타이드 캡, 또는 테트라뉴클레오타이드 캡인, 방법.
- [0239] 60. 제 59 항에 있어서, RNA 캡 유사체가 트리뉴클레오타이드 서열 GAG, 선택적으로 GpppA₂-OmepG를 포함하는, 방법.
- [0240] 61. 제 60 항에 있어서, RNA 캡 유사체가 테트라뉴클레오타이드 서열 GGAG를 포함하는, 방법.
- [0241] 62. 제 12 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심대상의 전사된 RNA를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0242] 63. 제 62 항에 따른 방법에서 분리된 관심대상의 RNA.
- [0243] 64. 제 12 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 리보핵산(RNA).
- [0244] 65. 제 63 항 또는 제 64 항에 있어서, 양이온 지질 나노입자에 만들되, 선택적으로 양이온 지질 나노입자가 이온화성 양이온 지질 20~60%, 양이온 이외의 지질 5~25%, 스테롤 25~55% 및 PEG-변형 지질 0.5~15%의 몰비를 포함하는, RNA.

[0245] 실시예

- [0246] 본 개시는 하기 실시예에 의해 추가적으로 설명된다. 이들 실시예는 본 개시의 이해를 돕기 위해 제공되는 것으로, 이를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다.
- [0247] 본 개시의 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 시험관 내 전사(IVT) 반응은, 부분적으로, 하기를 기준으로 한다:
- [0248] 뉴클레오타이드의 실험 기반 균형 시험
- [0249] · 주어진 DNA에 대한 각 뉴클레오타이드의 백분율 소모를 결정한다
- [0250] · 상기 백분율 소모를 사용하여 IVT 반응 및 공급 원료에 사용하기 위한 뉴클레오타이드 마스터 혼합체를 만든다
- [0251] 공급 일정 및 공급 원료 구성성분을 결정한다
- [0252] · 공급 일정은 시간 경과에 따른 반응 속도의 변화를 수용한다
- [0253] · 공급은 캡 유사체 대 최고 퓨린 NTP 농도의 비가 ≥ 1 이 되도록 한다
- [0254] · 공급 원료 레시피는 물품의 비용을 최소화하면서 수율 및 생산물 품질을 최대화한다

[0255] 실시예 1. 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화

- [0256] 본 실시예에서, 유가식 IVT 반응은 4가지 뉴클레오타이드 CTP, GTP, UTP 및 ATP를 사용한다. 우리는 각 뉴클레오타이드의 상대적 몰비는 반응물의 활용을 극대화하거나 또는 RNA 생산물의 속성을 변화시키기 위해 바꿀 수 있음을 보여준 바 있다. 본원에서, 우리는 유가식 IVT 전반에 걸쳐 각각의 농도가 유지되도록 하기 위해 각자의 소모율에 따라 4가지 뉴클레오타이드의 비를 균형화하기 위한 플랫폼을 제공한다.
- [0257] 새로운 RNA 생산물을 인코딩하는 DNA가 획득된 경우, 백분율 소모를 계산하기 위해 하기 단계들이 수행된다:
- [0258] (1) CTP, GTP, UTP 및 ATP의 알려진 초기 농도로 회분식 IVT 반응을 수행하고, 상기 반응 동안 각 뉴클레오타이드

드의 농도를 측정한다. 모든 측정 시점 동안 모든 뉴클레오타이드가 >0 mM으로 유지되도록 하고, 그렇지 않으면 해당 시간에 수집된 데이터를 폐기한다. 도 1a~1b에 나타낸 데이터의 경우, 모든 뉴클레오타이드는 초기 농도가 5 mM이었고, 최대 30분 동안 이들의 농도를 측정하였다.

(2) 수집된 측정 농도 및 시간을 사용하여 반응 동안 CTP, GTP, UTP 및 ATP 소모의 속도를 계산한다. 여러 시점의 경우, 이것은 상기 데이터의 선형 그래프(linear fit)의 기울기일 수 있다(도 1a).

(3) CTP, GTP, UTP 및 ATP의 속도를 합산하여 모든 뉴클레오타이드에 대한 총 소모율을 계산한다(도 1b).

(4) 각 개별 뉴클레오타이드의 속도를 모든 (총) 뉴클레오타이드의 속도로 나누어 CTP, GTP, UTP 및 ATP에 대한 백분율 소모값을 계산한다.

관련 값이 표 1에 제공되었다.

표 1. 백분율 소모의 실험적 결정

	기울기 (mM/분)	기울기 (mM/시)	백분율 소모	서열 중 % 풍부도
CTP	-0.086	-5.18	22.9%	22.9%
GTP	-0.092	-5.49	24.2%	23.8%
UTP	-0.064	-3.84	16.9%	17.9%
ATP	-0.136	-8.15	36.0%	35.4%
총	-0.378	-22.67	-	

상기 백분율 소모값이 사용되어 회분식 IVT 반응을 위한 반응 혼합물, 또는 유가식 IVT 반응을 위한 NTP 마스터 혼합물 및 공급 원료 혼합물을 만들 수 있다. 예를 들어, 모든 뉴클레오타이드가 회분식 반응에서 동일한 시간에 완전히 소모되도록 하기 위해, NTP 마스터 혼합체는 상기 백분율 소모값에 등가인 NTP 물비를 함유할 수 있다. 대안적으로, 유가식 반응의 경우, 대신 모든 뉴클레오타이드의 합계가 10 mM, 또는 상기 NTP가 남아 있는, > 0 mM의 어떤 농도일 경우, 모든 뉴클레오타이드가 등가 농도가 되도록 NTP 마스터 혼합물을 만드는 것이 바람직할 수 있다. 마침내, 반응 전반에 걸쳐 뉴클레오타이드의 특이적 비를 유지하여, 원하는 생산물 프로파일을 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 백분율 소모값의 사용으로 작업자는 이와 같은 임의의 공정 요건을 달성할 수 있다.

실험에 의거하여 결정된 백분율 소모값은 원하는 RNA 서열에서 각 NTP의 관찰된 풍부도 %와 다르다. 이와 더불어, 백분율 소모를 계산하는 것은 구조체 서열에 대한 사전 지식을 요구하지 않는다.

도 2에 나타낸 바와 같이, 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC®)가 NTP 및 RNA 캡 유사체 농도를 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 이와 같은 정보는, 이어서, 개별 NTP 농도 및/또는 총 NTP 농도를 계산하기 위해 사용될 수 있다. 하기 조건이 예로서 제공된다:

컬럼: ACQUITY UPLC 올리고뉴클레오타이드 BEH C18 컬럼, 130 Å, 1.7 μm, 2.1mm X 150mm(부품 번호 186005516)

컬럼 온도: 40°C

흐름 속도: 0.4 mL/분

이동상 A: 100mM 트리에틸암모늄 아세테이트(TEAA)

이동상 B: 100mM 트리에틸암모늄 아세테이트(TEAA), 25% 아세트로나이트릴

예시적인 IVT 마스터 혼합물 및 공급 원료 혼합물 레시피가 도 1a~1b에 제공된 데이터를 기반으로, 표 2 및 표 3에 하기와 같이 제공된다:

표 2. IVT 마스터 혼합물

IVT 마스터 혼합물

구성성분	농도	비고
총 뉴클레오타이드	20 mM	% 소모로 결정됨
아세트산 마그네슘	30 mM	
트리뉴클레오타이드	최고 퓨린(ATP 또는 GTP)으로 결정됨	캐핑을 개선하기 위해 과량이 첨가될 수 있음
RNA 중합효소	0.04 mg/mL	
DNA	0.05 mg/mL	
파이로포스파타제	1 U/mL	
디티오프레이틀(DTT)	5 mM	
트리스 HCl, pH 8.0	40 mM	

표 3. 공급 원료 혼합물

구성성분	농도	비고
총 뉴클레오타이드	60 mM	%소모로 결정됨
아세트산 마그네슘	60 mM	
RNA 중합효소	0.04 mg/mL	
파이로포스파타제	1 U/mL	
디티오프레이틀(DTT)	5 mM	
트리스 HCl, pH 8.0	40 mM	

실시예 2. 소모율에 의한 실험에 의거한 NTP 균형화

2개의 구조물, RNA #1 및 RNA #2를 인코딩하는 DNA에 대해 초기 뉴클레오타이드의 실험에 기반한 균형화를 수행하였다. 각 DNA에 대한 개별 NTP 농도를 보여주는 그래프가 도 3a 및 3b에 나타나 있다. 실시예 1에 설명된 대로 하기 백분율(%) 소모값을 결정하였다:

표 3. 백분율 조성물의 실험적 결정 (RNA #1 및 RNA #2)

	% CTP	% GTP	% UTP	% ATP
RNA #1	22.8%	24.2%	17.0%	35.9%
RNA #2	24.3%	26.9%	17.8%	31.1%

유가식 IVT 반응에서 NTP 비의 맞춤조절

CTP, GTP, UTP 및 ATP에 대한 백분율 소모값은 진행 중인 반응 동안 초기 IVT 반응 혼합물에서, 또는 IVT 반응이 완료된 후 남아 있을 때 NTP 비를 조절하기 위해, 사용될 수 있다. 일 예에서, RNA #1을 제조하는 공정이 상기 반응의 종료 시점에 4가지 NTP 시료 모두의 완전한 활용을 요구할 수도 있다. 이 경우에, 상대적 뉴클레오타이드 비가 상기 실험 기반 백분율 소모값과 동일하게 설정된, RNA #1에 대한 회분식 IVT 반응을 수행하였다. 도 4a에 나타난 그래프는 이와 같은 반응 동안 NTP 농도를 보여준다. 4가지 뉴클레오타이드는 모두 동일한 시간에 0 mM의 농도에 접근함으로써, 이들 구성성분의 활용을 극대화한다.

다른 시나리오는 상기 공정이 유가식 또는 회분식 작업 동안, 특이적 생산물 프로파일을 생산하거나 또는 특이적 시약의 완전한 활용을 보장하기 위해, NTP의 특이적 비를 유지할 것을 요구할 수도 있다. 예를 들어, 상기 공정은 상기 유가식 IVT 반응이 유지되는 범위에서, 예컨대 총 [NTP]가 10 mM일 경우, [CTP], [GTP], [UTP], [ATP]가 동등하기를 요구할 수 있다. 이와 같은 경우에, 뉴클레오타이드 마스터 혼합물의 조정된 조성을 계산하

여 본 공정의 요건을 완수하기 위해 실험에 의거하여 결정된 백분율 소모값을 사용하였다(표 4). 도 4b 에 나타낸 그래프는 10mM의 총 NTP에서 동등해지는 모든 NTP에 특이적인 뉴클레오타이드 마스터 혼합물을 사용하는, RNA #1를 인코딩하는 DNA를 사용하는 회분식 IVT 반응을 보여준다(표 4). 상기 도면에 나타난 바와 같이, 4가지 뉴클레오타이드 시약 모두 같은 시간에 2.5 mM에 도달하거나, 또는 총 NTP 농도가 10 mM이었다.

표 4. IVT 반응 동안 NTP의 맞춤조절된 농도를 위한 NTP 마스터 혼합물

	% CTP	% GTP	% UTP	% ATP
모든 NTP가 총 NTP 0 mM에서 동등함				
RNA #1	22.8%	24.2%	17.0%	35.9%
RNA #2	24.3%	26.9%	17.8%	31.1%
모든 NTP가 총 NTP 10 mM에서 동등함				
RNA #1	23.9%	24.6%	21.0%	30.5%
RNA #2	24.6%	25.9%	21.4%	28.0%

트리뉴클레오타이드(GAG) 캡핑 효율 검사

GAG:NTP 비의 영향을 평가하기 위해 IVT 검사를 수행하였는데, 여기서 NTP는 ATP 또는 GTP였다. 이와 같은 실험의 설정(도 22)에서, 0.6보다 큰 GAG:ATP 또는 GAG:GTP 비가 90%를 초과하는 캡이 있는 mRNA를 생성하였다. 0.6보다 큰 GAG:ATP 또는 GAG:GTP 비를 가진 RNA 캡 유사체를 사용하여, 최적의 캡 함량을 가진 mRNA를 생산하였다. 따라서, 유가식 IVT는 0.6보다 큰 GAG:ATP 또는 GAG:GTP의 비를 유지하도록 설계하였다.

실시예 3. 공급 일정의 설정

유가식 IVT 공정의 중요한 측면은 원하는 범위에서 시약을 유지하기 위해, 주어진 공급 원료 및 IVT 반응 혼합물에 대해 첨가의 적절한 시간대를 결정하는 것이다. 이를 위해, 실험에 의거하여 균형을 이룬 뉴클레오타이드 마스터 혼합물(실시예 1 및 2에서 유래됨)과 DNA에 대해 예측된 NTP 소모율을 기준으로 한 초기 공급 일정을 사용하여 관심대상의 DNA로 정찰형 유가식 IVT 반응을 수행하였다. 이와 같은 초기 공급 일정은, 하기에 기술된 바와 같이, 상기 정찰형 유가식 IVT 반응의 결과 및 분석 후 개정되곤 한다.

정찰형 유가식 IVT 반응 전반에 걸쳐, 각 공급의 경우 IVT 반응에 공급 원료 혼합물의 첨가 직전 및 직후에 뉴클레오타이드의 총 농도를 결정하였다(도 5a~b). 이후에, 이와 같은 총 농도 측정 및 공급 시간을 사용하여 상기 반응의 각 공급 사이에 독특한 총 뉴클레오타이드 소모율을 계산하였다(도 6a~b). 도 7a~c에 나타낸 바와 같이, 상기 뉴클레오타이드 소모율을 [DNA], [mRNA], 또는 반응 시간(본 실시예에서는, [DNA]를 사용하였다)에 대해 플롯팅하였다. 이와 같은 플롯을 곡선으로 피팅하는 것(선형 모형 도시됨)이 유가식 IVT 반응 전반에 걸친 뉴클레오타이드 소모율의 실험 기반 모형을 제공하였다. 이와 같은 NTP 소모 모형 매개변수를 몇 가지 추가적인 매개변수(하기)와 통합함으로써, RNA#1에 대해 사용한 주어진 공급 원료 및 IVT 반응 혼합물에 대한 완전한 공급 일정을 결정하였다(표 5 참조).

- 초기 [DNA]
- 최소 뉴클레오타이드 농도
- 초기 뉴클레오타이드 농도
- 공급 원료 뉴클레오타이드 농도
- 제1 공급 부피 분획(공급의 부피 / 초기 반응의 부피)
- 총 반응 시간 또는 첨가된 총 뉴클레오타이드 중 하나

표 5. RNA#1에 대한 계산된 공급원료 첨가 시간

공급 번호	경과 반응 시간(분)
1	48.5
2	80.5
3	115.0
4	152.0
5	192.5
6	236.5
7	285.0

실시예 4. 반응 모델화

뉴클레오타이드 실험 기반 균형 시험을 완료하고(실시예 1 및 2), 주어진 DNA, 공급 원료 및 IVT 반응 혼합물에 대해 공급 일정을 설정한 후(실시예 3), 여러 실험에 의거하여 결정된 반응 매개변수를 유가식 IVT 반응에 대해 사용자가 선택한 매개변수와 조합하여 유가식 IVT 반응 모형을 형성하였다:

실험에 의거하여 결정된 반응 매개변수

- CTP, GTP, UTP 및 ATP의 소모% (실시예 1에서)
- NTP 소모 곡선-적합(curve-fit) 매개변수(실시예 3에서)
- 초기 꼬리 달린 생산물의 % (실시예 3에서 관찰됨)
- 꼬리 달린 생산물의 % 속도 대 시간(실시예 3에서 관찰됨)

사용자 선택 반응 매개변수

- 초기 IVT 반응을 위한 뉴클레오타이드 마스터 혼합체에서 CTP, GTP, UTP 및 ATP의 비
- 공급 원료를 위한 뉴클레오타이드 마스터 혼합체에서 CTP, GTP, UTP 및 ATP의 비
- 초기 [DNA] 또는 반응 부피(NTP 소모 곡선 적합(curve-fit)을 위해 사용된 경우)
- 트리뉴클레오타이드의 초기 농도
- 최소 뉴클레오타이드 농도
- 초기 뉴클레오타이드 농도
- 공급 원료 뉴클레오타이드 농도
- 제 1 공급 부피 분획(공급의 부피/초기 반응 부피)
- 총 반응 시간 또는 첨가된 총 뉴클레오타이드 중 하나

도 9~11에 나타난 바와 같이, 상기 반응 모형은 총 및 개별 뉴클레오타이드의 농도(도 9), RNA 생산물의 수율(도 10), % 꼬리 달린 RNA(도 11)를 추정할 수 있다. 이와 더불어, 상기 모형은 ([퓨린]을 [트리뉴클레오타이드]에 비교함으로써) RNA 생산물에서 기대되는 캡핑 % 및 임의의 DNA에 대한 최적의 반응 시간에 대한 지표를 제공하였다.

실시예 5. RNA #1 및 RNA #2에 대한 유가식 IVT 공정 검사

RNA #1 및 RNA #2에 대해 실험에 의거하여 균형을 이룬 유가식 IVT 반응을 수행하였다. 속도 분석을 기준으로 RNA #1 및 RNA #2 둘 다의 공급 일정을 설정하였다(도 6a~b 및 7a~c). 각 구조물에 대해 하기와 같은 초기 IVT 조건을 사용하였다:

초기 IVT 반응 레시피:

- 40 mM 트리스 HCl, pH 8.0

- [0322] · 20 mM 총 뉴클레오타이드(10 mM NTP로 실험에 의거하여 균형이 결정됨)
- [0323] · 30 mM 아세트산 마그네슘
- [0324] · RNA 캡 유사체(트리뉴클레오타이드)가 1.2*[ATP]와 동일하다
- [0325] · 0.04 mg/mL RNA 중합효소
- [0326] · 0.02% 트리톤 X-100(w/v)
- [0327] · 0.05 mg/mL 플라스미드
- [0328] · 5 mM DTT
- [0329] · 1 mM 스퍼미딘
- [0330] · 1 U/mL PPIase
- [0331] 실험 상세내용:
- [0332] · 온도: 37℃
- [0333] · 출발 반응 부피: 500 μ L
- [0334] · 엔드-오버-엔드(End-over-end) 혼합
- [0335] 공급 원료 레시피:
- [0336] · 40 mM 트리스 HCl, pH 8.0
- [0337] · 60 mM 총 뉴클레오타이드(10mM NTP로 실험에 의거하여 균형이 결정됨)
- [0338] · 60 mM 아세트산 마그네슘
- [0339] · 0.04 mg/mL RNA 중합효소
- [0340] · 0.02% 트리톤 X-100
- [0341] · 5 mM DTT
- [0342] · 1 mM 스퍼미딘
- [0343] · 1 U/mL PPIase
- [0344] 공급 일정:
- [0345] · 고정 공급 부피: 71.4 μ L
- [0346] · 공급 시간:
- [0347] o RNA #1: 60, 85, 115, 150, 185, 220, 260분(7번 공급)
- [0348] o RNA #2: 60, 100, 140, 180, 220, 270 분(6번 공급)
- [0349] · 총 반응 시간: 360분(6시간)
- [0350] · 최종 IVT 반응 부피:
- [0351] o RNA #1(7번 공급): 1000 μ L
- [0352] o RNA #2(6번 공급): 928 μ L
- [0353] 분석 산출량:
- [0354] · RNA 생산물 수율
- [0355] · NTP 및 RNA 캡 유사체 농도를 모니터링하기 위한 초고성능 액체 크로마토그래피
- [0356] · % 꼬리 달린 RNA
- [0357] · % 캡핑된 RNA

[0358] 도 11~16에 나타난 바와 같이, RNA #1 및 RNA #2에 대해 유가식 IVT 반응 전반에 걸쳐 상기 뉴클레오타이드 농도, 수율 및 생산물 품질을 평가하였다. 도 11a~b 및 도 12a~b는 RNA #1 및 RNA #2 각각에 대해 유가식 IVT 반응 동안 측정된 총 [NTP] 및 개별 [NTP]를 보여준다. 도 13a 및 13b는 RNA #1 및 RNA #2에 대해 각각 총 RNA 및 꼬리 달린 RNA의 측정 농도를 보여준다. 도 14a~b는 RNA #1 및 RNA #2에 대해 총 RNA 및 꼬리 달린 RNA의 측정 질량 대 초기 IVT 반응 부피를 보여준다. 도 15는 RNA #1 및 RNA #2에 대해 % 꼬리 달린 RNA 생산물을 보여준다. 도 16a는 RNA #1 및 RNA #2에 대해 캡핑된 mRNA 생산물의 %를 보여주고, 도 16b는 RNA #1에 대해 시간 경과에 따른 % 캡핑된 RNA 생산물을 보여준다. 실험 결과는 동일한 매개변수를 사용한 IVT 모형 산출량과 비교하여, 상기 반응의 결과를 검증하거나 또는 상기 모형으로 개선될 수 있다. 상기 구조물-특이적 매개변수 역시, 미래의 구조물에 대한 공정을 개발하기 위해 기록되고 사용될 수 있다.

[0359] 실시예 6. RNA #3에 대해 2가지 흐름 속도를 가진 연속 유가식

[0360] 실시예 3, 4 및 5에서, 각 유가식 IVT 반응은 볼루스 공급을 사용하여 수행하였고, 여기서 공급 원료 혼합물은 반응 동안 명시된 시간에 고정-부피 볼루스 첨가로 첨가하였다. 이와 같은 공정이 각 공급에 대한 반응 동안 뉴클레오타이드 농도의 차이를 야기하였다(도 11a~b 및 12a~b). 이와 같은 차이를 최소화하고, 별개의 볼루스 공급을 위해 요구되는 추가적인 제조 통제에 대한 필요성을 감소시키기 위해, 공급 일정을 연속 공급 포맷으로 전환하였다.

[0361] 연속 유가식 IVT 공정의 예를 도 17~22에 나타내었는데, 여기서 볼루스 유가식 반응이 RNA #3을 인코딩하는 DNA에 대한 연속 유가식 반응과 비교된다. 표 6 및 7은 RNA #3을 검사하기 위해 사용한 볼루스 및 연속 공급 IVT 반응 모드에 대한 공정 매개변수를 보여준다. 본 공정의 볼루스 공급 방식에는 18개의 공정 매개변수가 필요하고, 초기 반응 부피는 1L였고, 각 볼루스 공급의 부피는 14.28 mL이었다. 표 6 참조. 대조적으로, 상기 연속 공급 모드에서는, 5개의 공정 매개변수가 필요하였다. 표 7 참조. 상기 연속 공급 일정은 하기와 같은 5개의 공급 매개변수를 함유하였다: 시작 시간, 흐름 속도 1, 흐름 속도 1에서 흐름 속도 2로의 변환 시간, 흐름 속도 2 및 중단 시간(표 7). 상기 2개의 흐름 속도를 사용하여, IVT 반응 도중 발생하는 뉴클레오타이드 소모율의 임의의 차이를 수용하였다.

[0362] 표 6. RNA#3에 대한 볼루스 공급 일정을 위한 공정 매개변수

초기 반응 부피*: 1L 각 공급 부피 14.28 mL	
공급 번호	공급 시간(분)
1	27.0
2	45.0
3	65.0
4	88.0
5	114.0
6	144.0
7	180.0
8	226.0
9	288.0
Stop 반응	480.0

* 모든 부피는 1 L 반응에 정규화됨

[0363]

표 7. RNA#3에 대한 연속 공급 일정을 위한 공정 매개변수

초기 반응 부피*: 1L 중단 IVT 반응: 365.0 분			
실행	시간(분)	흐름 속도(mL/분)	흐름 속도 (초기 부피 1 mL 당 mL/분)
시작 공급	30	5.76	초기 부피 1 mL 당 0.0058 mL/분
변환 공급	150	4.00	초기 부피 1 mL 당 0.0040 mL/분
중단 공급	301		

* 모든 부피는 1 L 반응에 정규화됨

도 17a~17b의 그래프는 RNA #3에 대한 IVT 반응 전반에 걸쳐 총 뉴클레오타이드 농도가 볼루스 유가식 반응의 경우보다 연속 유가식 반응의 경우에 훨씬 더 일관적임을 보여준다. **도 18a~18b** 및 **19a~19b**는 연속 및 볼루스 유가식 IVT 반응의 경우에 비교될 만한 RNA 생산물 수율을 보여준다.

RNA #3의 전반적인 생산물 품질은 볼루스 유가식과 비교하여 연속 유가식 IVT 반응의 경우에 약간 개선되었다. **도 20a~20b**의 그래프는 RNA #3에 대한 꼬리 달린 RNA 생산물의 백분율이 비교될 만하지만, 볼루스 유가식 대신 연속을 사용할 경우 개선됨을 보여준다. **도 21a~21b**의 그래프는 연속 유가식 IVT 반응의 경우 캡핑이 약간 더 나았음을 보여준다. 이와 같은 관찰은 연속 유가식의 경우 반응 전반에 걸쳐 더 낮은 평균 A/GTP-대-트리뉴클레오타이드 비에 의해 설명될 수 있다. **도 22** 참조.

실시예 7: 테트라뉴클레오타이드 캡 유사체를 사용한 유가식 IVT

본 실시예에서, 유가식 IVT 반응을 수행하여 테트라뉴클레오타이드 캡 유사체가 있는 볼루스 공급을 사용하여 RNA를 합성하였다. 관심대상의 RNA(표 8), GGAG 테트라뉴클레오타이드 캡 유사체, T7 RNA 중합효소, 파이로포스파타제, 완충제 및 RNA #4를 인코딩하는 DNA로 균형이 결정된 물비로 존재하는 뉴클레오타이드를 사용하여 초기 IVT 혼합물을 형성하였다. 테트라뉴클레오타이드 캡 유사체 대 ATP의 초기 물비는 1.3:1이었다. 상기 공급 원료 마스터 혼합체는 뉴클레오타이드, T7 RNA 중합효소, 파이로포스파타제 및 완충제로 구성되었다. 상기 반응은 30 분 간격으로 3회 공급 원료 마스터 혼합체를 사용하여 공급을 받았는데, 이것은 최소 8 mM NTP를 목표로 삼았고; 상기 반응은 2시간 동안 진행되었다.

동일한 초기 IVT 혼합물을 사용하는 회분식 IVT 반응을 대조군 실험으로 수행하였다. 상기 대조군 회분식 반응에는 반응이 시작된 후, 공급이 이루어지지 않았다.

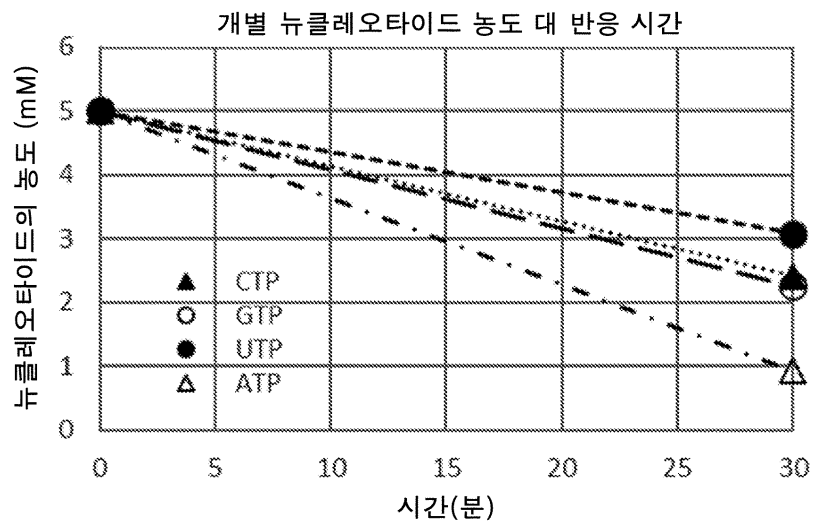
표 8. 초기 IVT 혼합물 중 뉴클레오타이드의 농도

	CTP	GTP	UTP	ATP
총 RNA 대비 농도	29.90%	24.20%	15.50%	30.40%

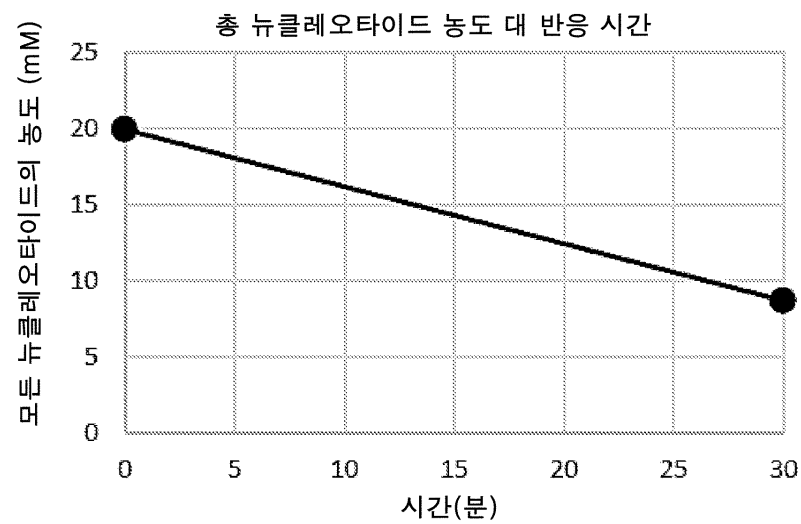
도 23~25에 나타난 바와 같이, 유가식 IVT 반응 및 대조군 회분식 반응에 대해 ATP 농도, 총 RNA 수율 및 캡핑 백분율을 평가하였다. 유가식 반응은 캡핑 효율이 높은(캡 유사체를 포함하는 RNA가 ~90%) RNA를 제공하였다. 놀랍게도, 상기 유가식 IVT 반응은 유의미하게 대조군 회분식 반응보다 더 나은 성과를 야기했는데, 대략 RNA의 수율이 1.8배 높았다(대조군 회분식 반응은 초기 부피가 ~5 mg/mL인데 비해, 유가식 반응은 초기 부피가 ~9 mg/mL임).

도면

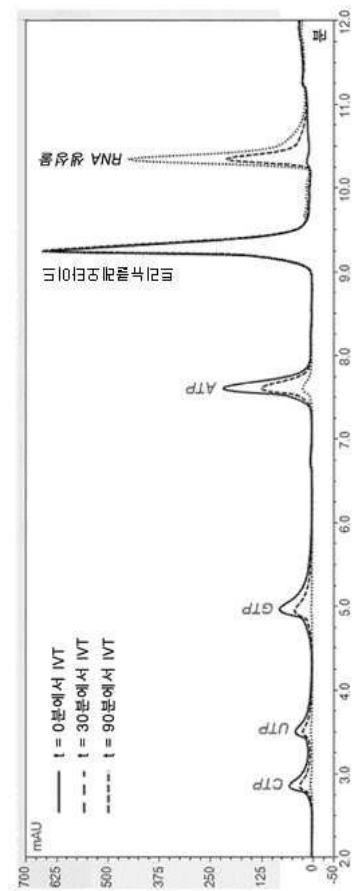
도면1a



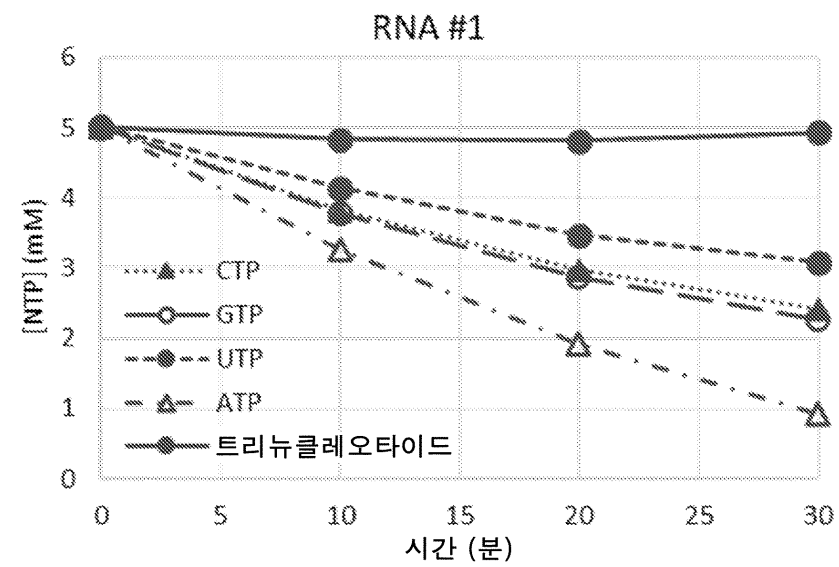
도면1b



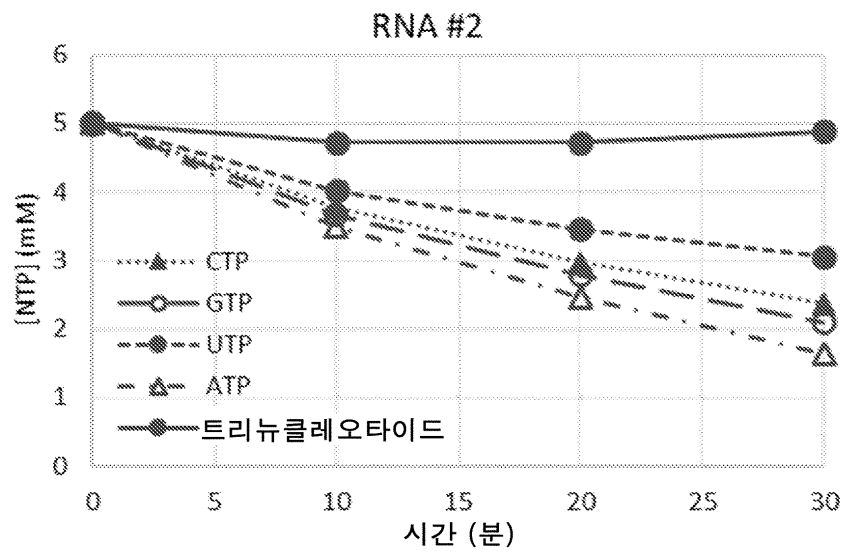
도면2



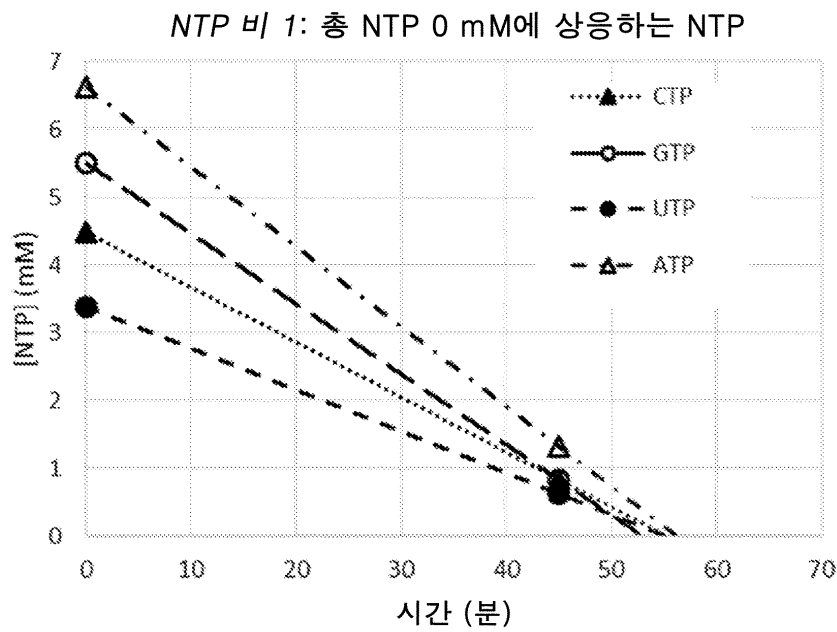
도면3a



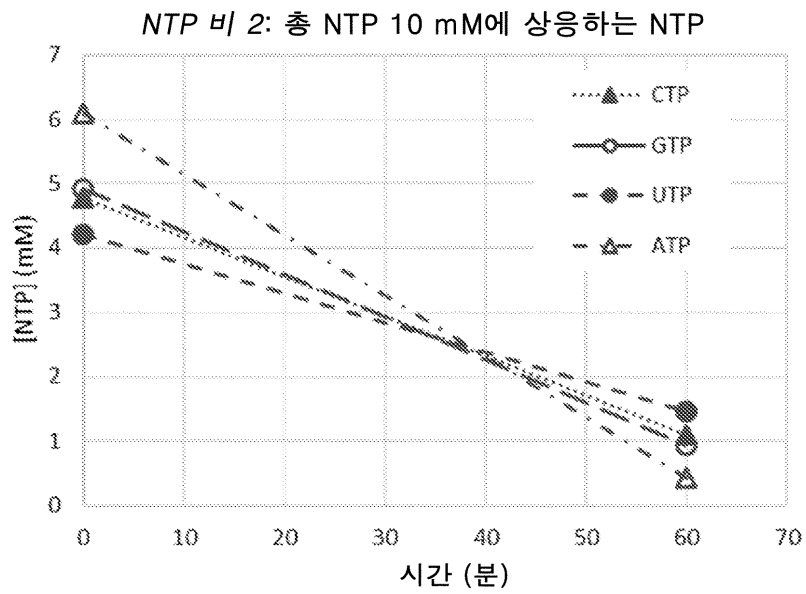
도면3b



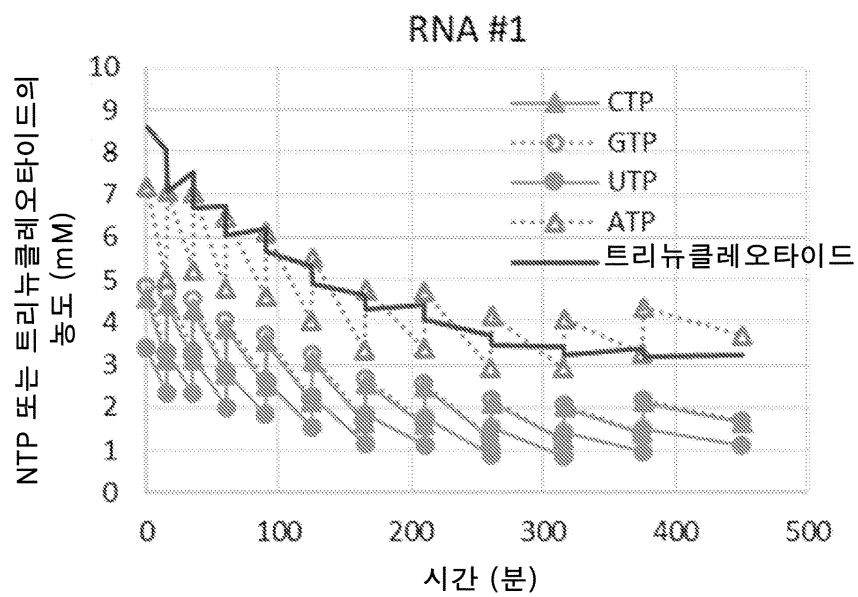
도면4a



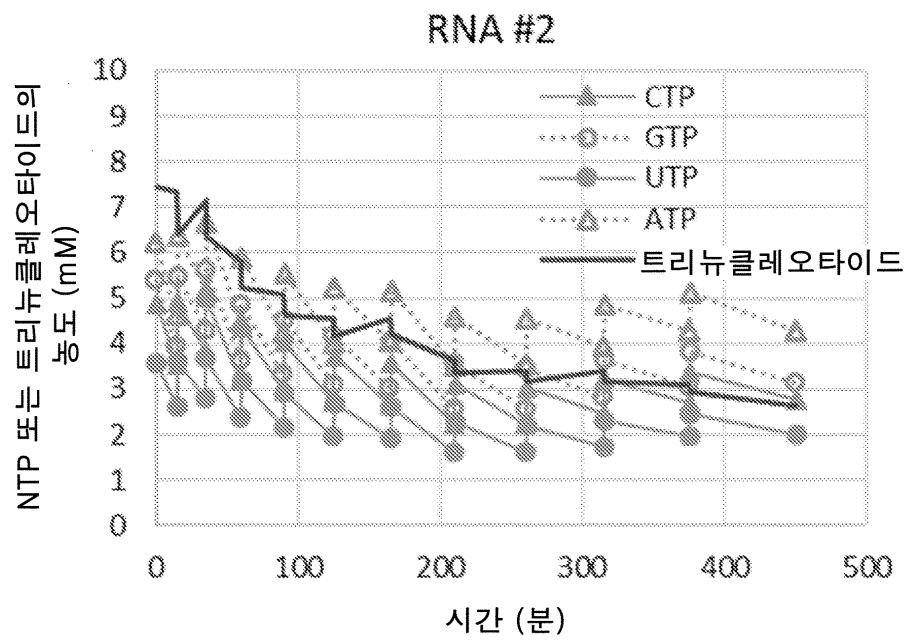
도면4b



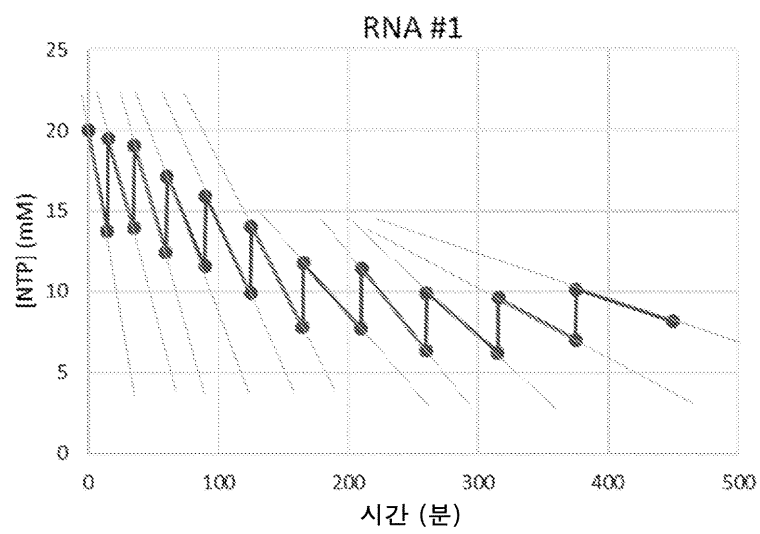
도면5a



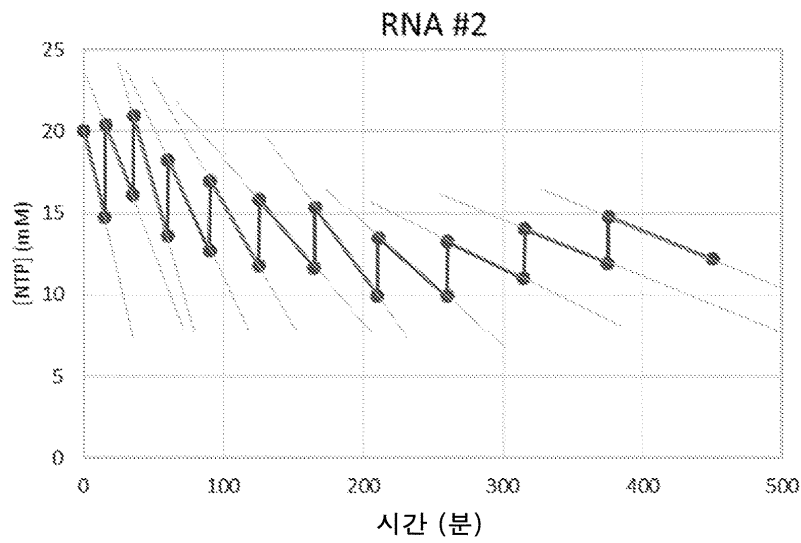
도면5b



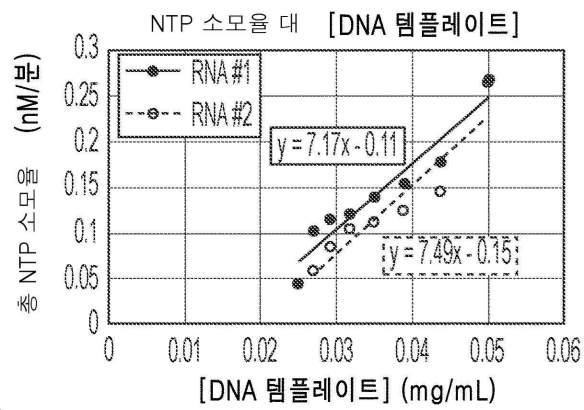
도면6a



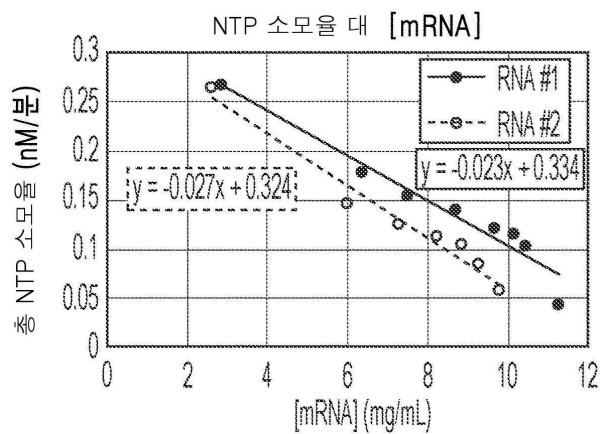
도면6b



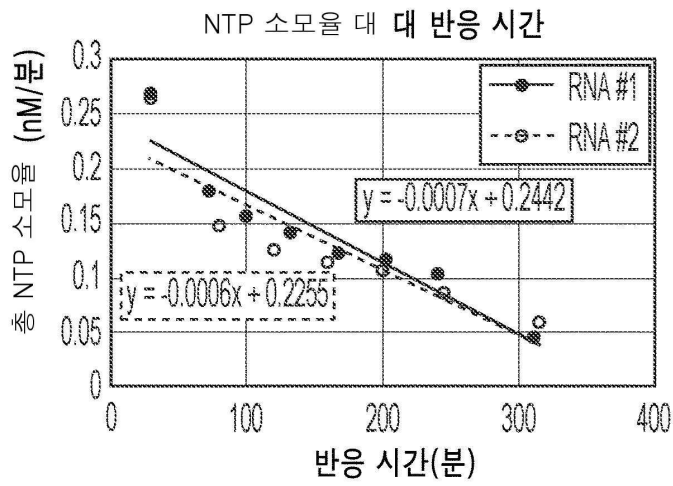
도면7a



도면7b

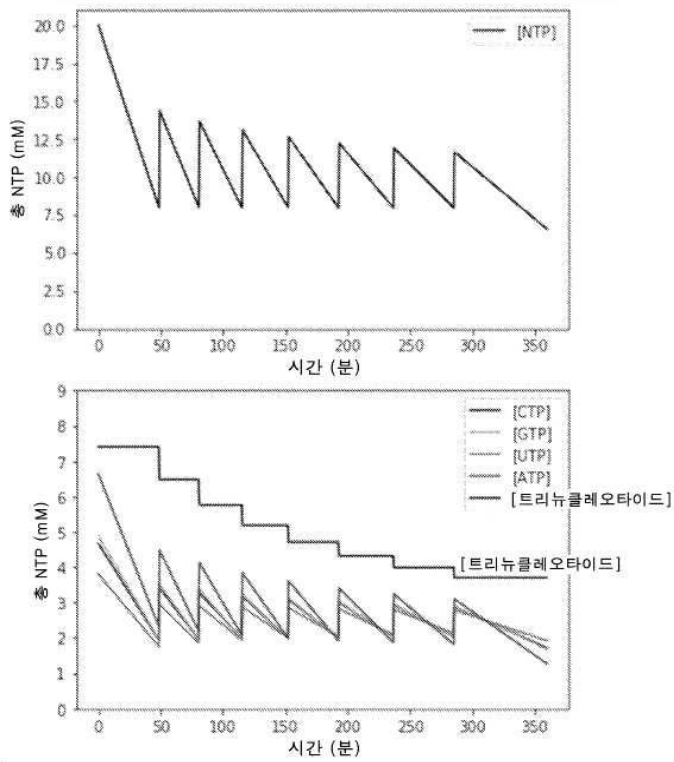


도면7c



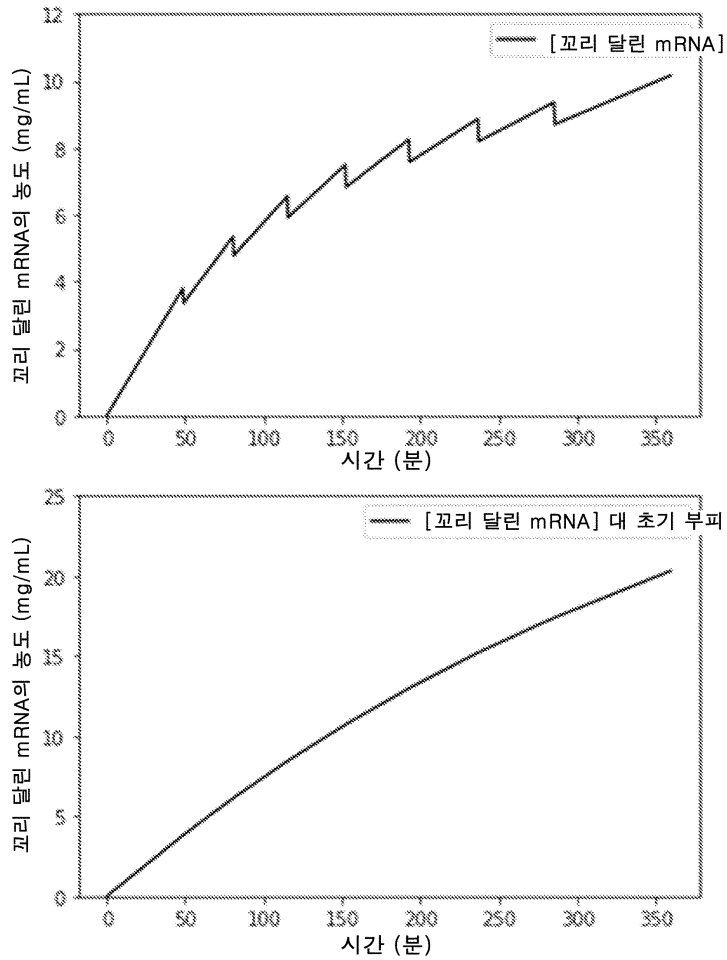
도면8

RNA #1 시뮬레이션된 반응물 소모



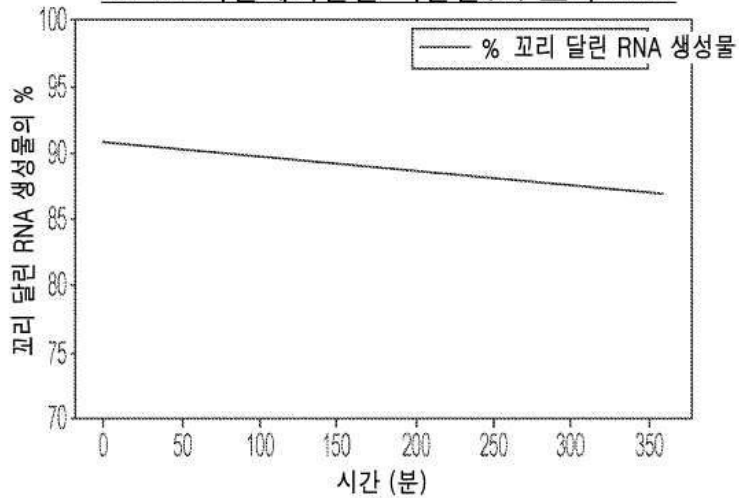
도면9

RNA #1 시뮬레이션된 생성물 형성:

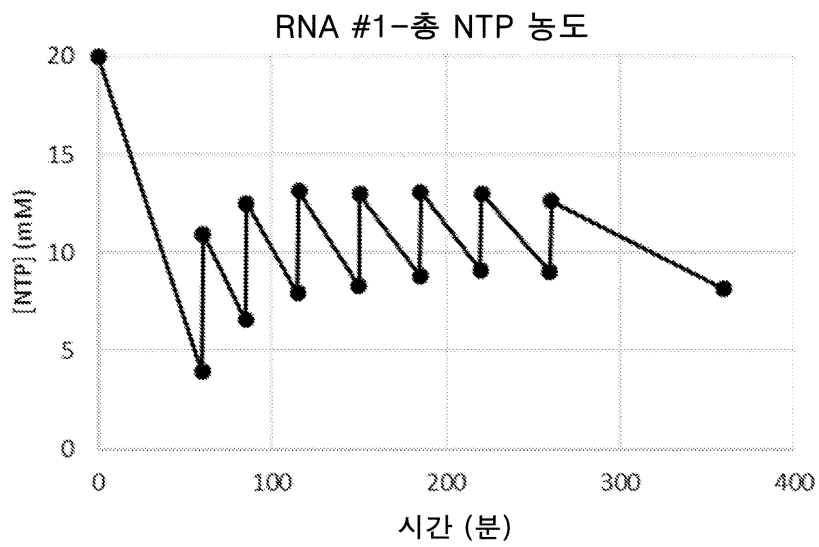


도면10

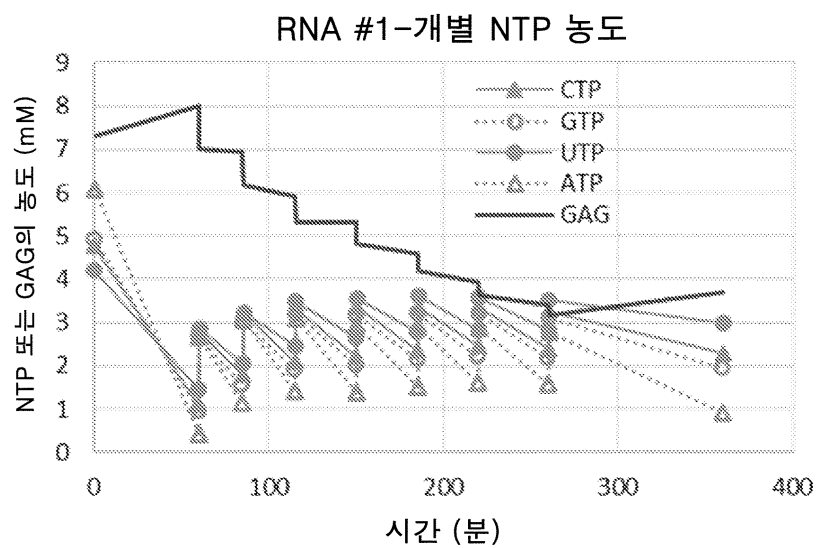
RNA#1 시뮬레이션된 백분율(%) 꼬리 RNA:



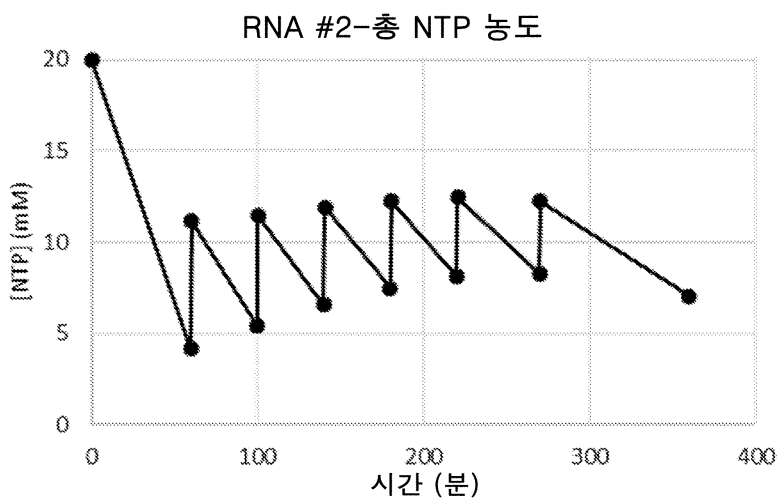
도면11a



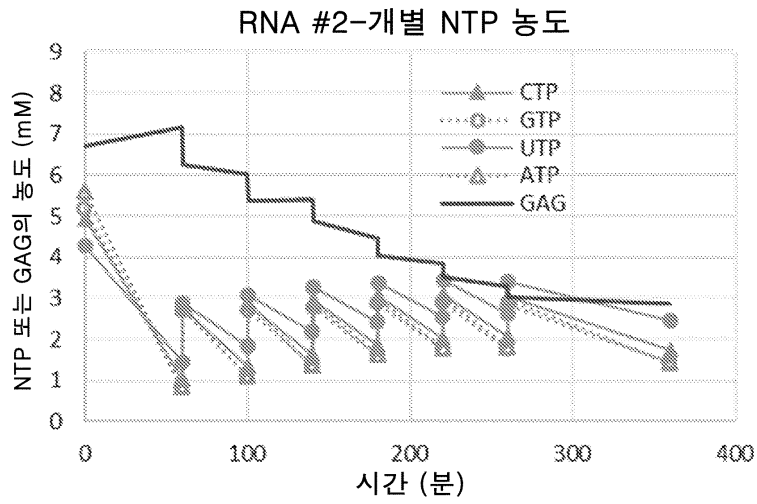
도면11b



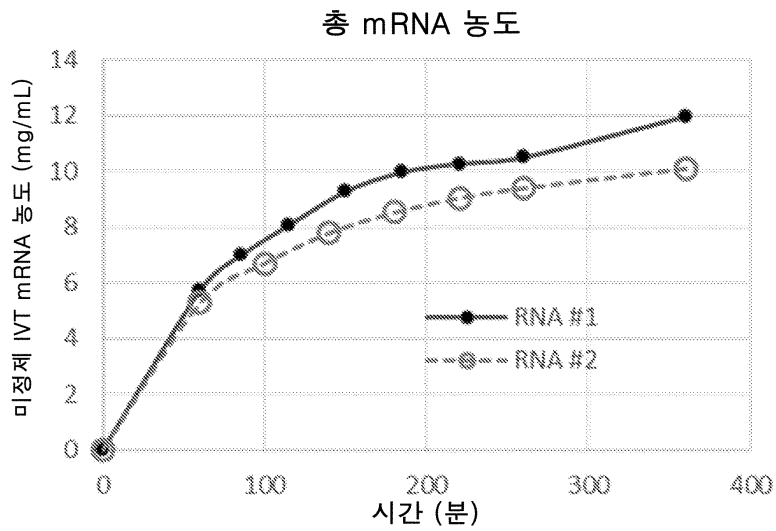
도면12a



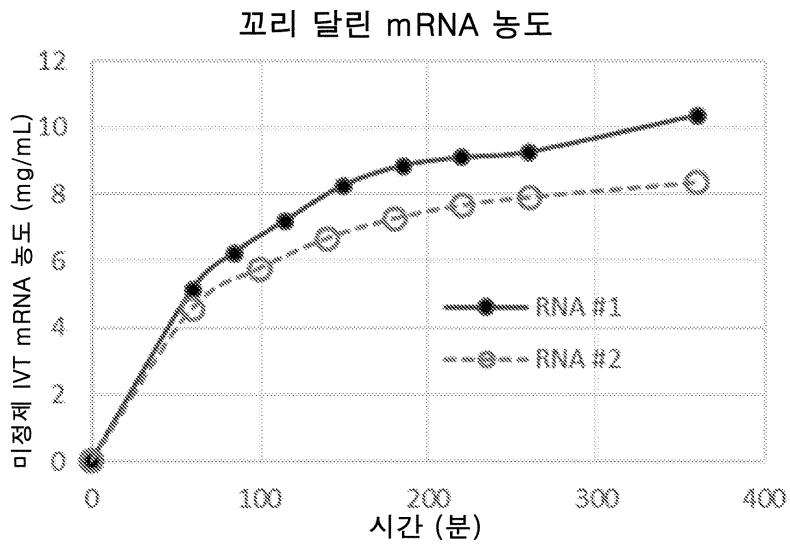
도면12b



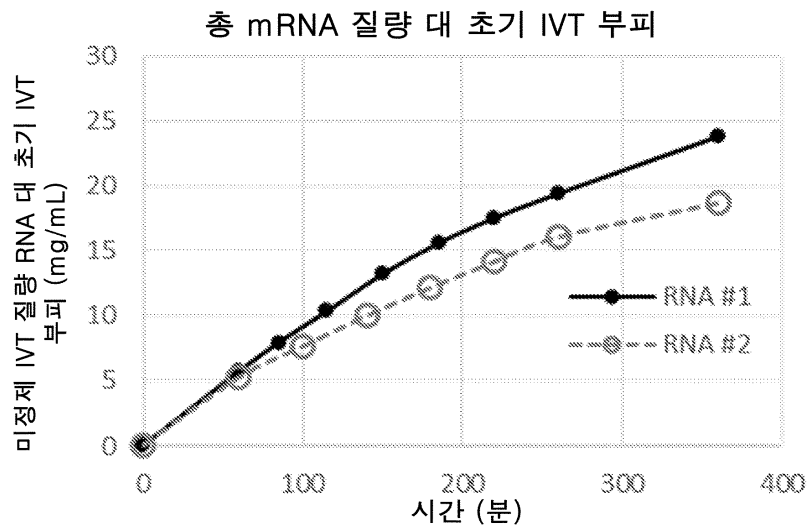
도면13a



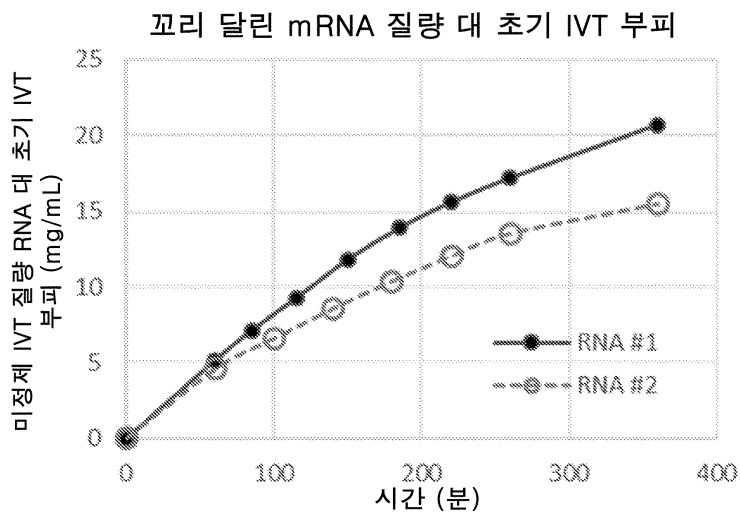
도면13b



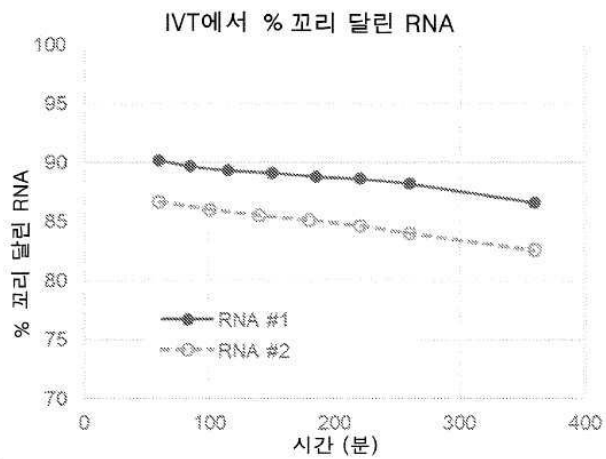
도면14a



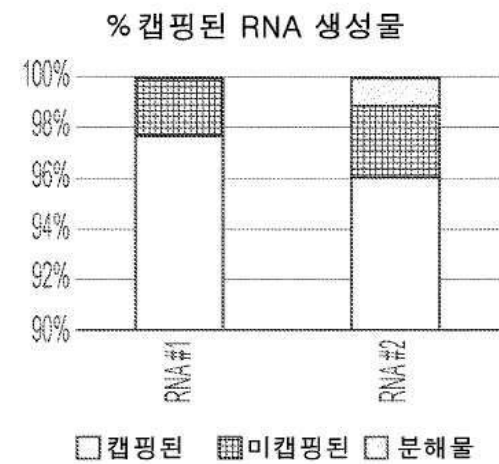
도면14b



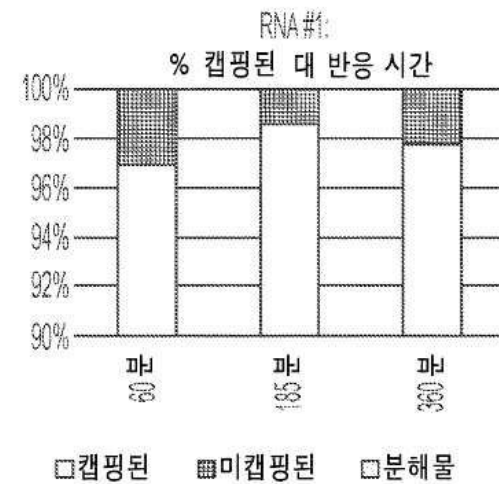
도면15



도면16a

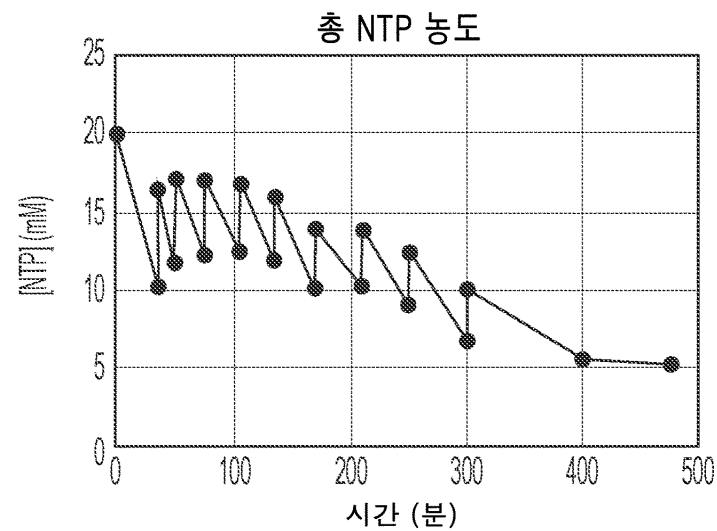


도면16b



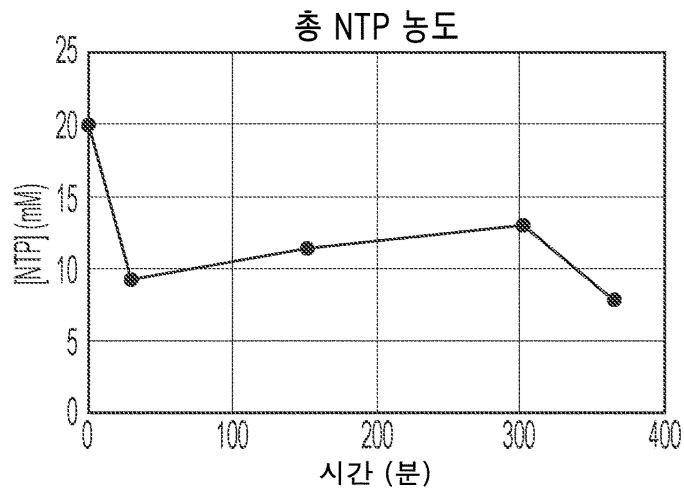
도면17a

RNA#3에 대한 볼루스 공급:



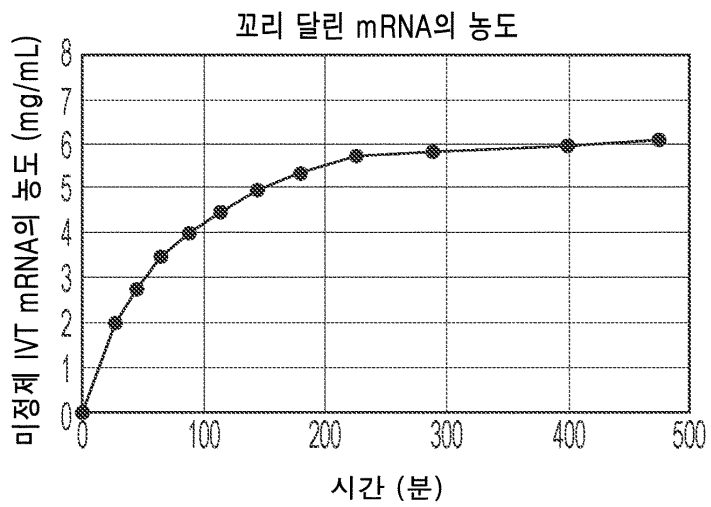
도면17b

RNA#3에 대한 지속적 공급:



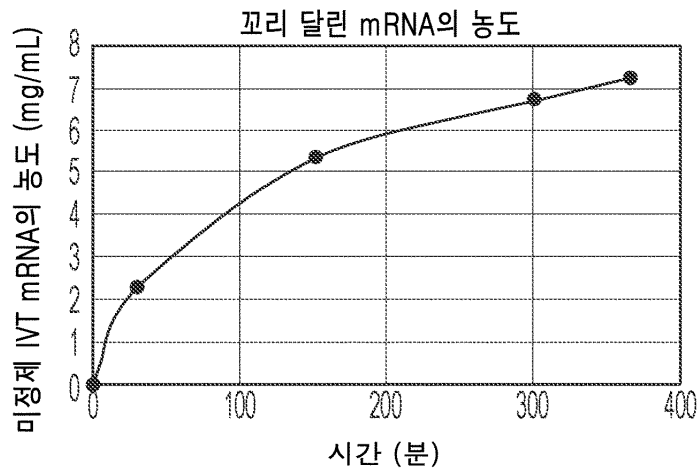
도면18a

RNA#3에 대한 볼루스 공급:



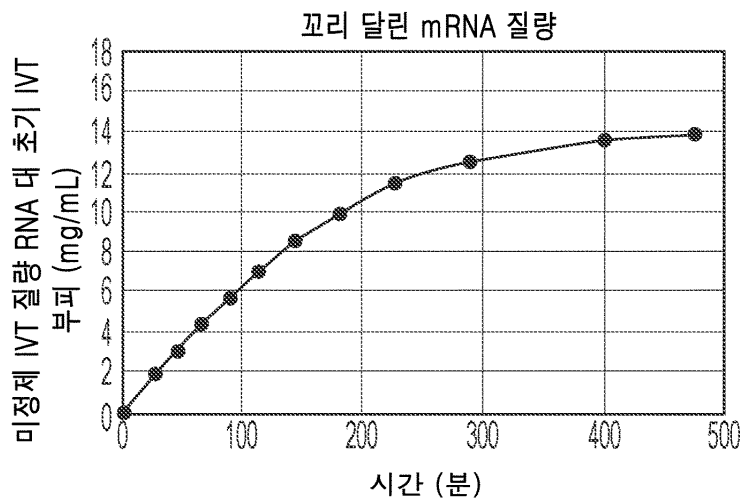
도면18b

RNA#3에 대한 지속적 공급:



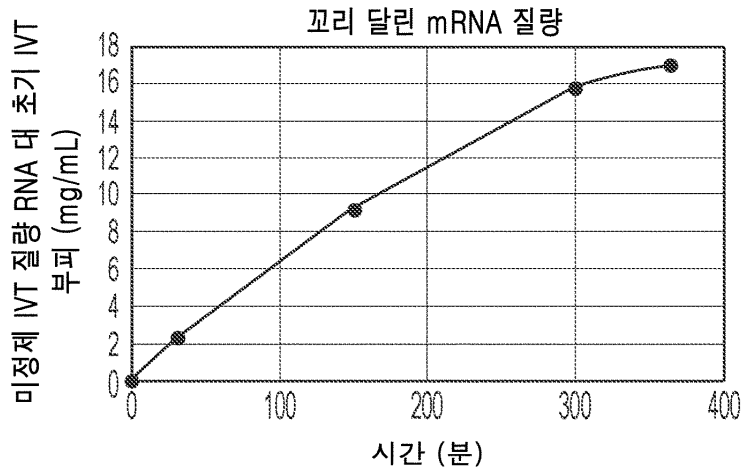
도면19a

RNA#3에 대한 볼루스 공급:



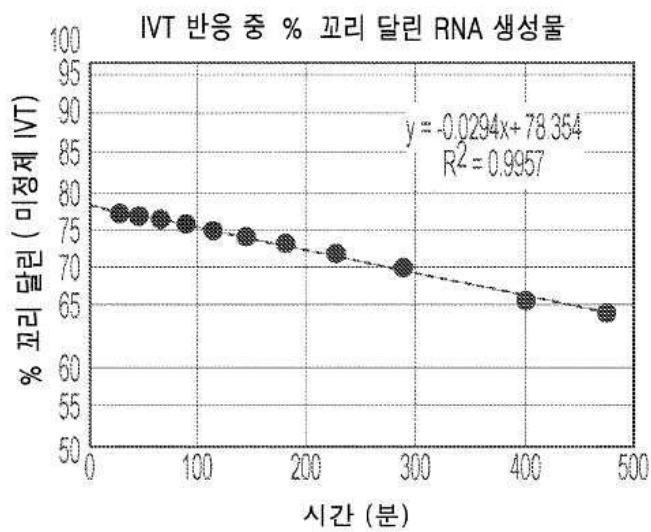
도면19b

RNA#3에 대한 지속적 공급:



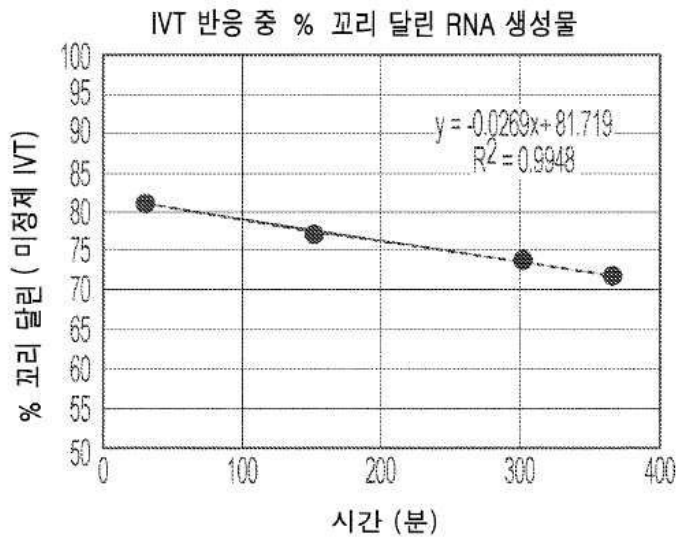
도면20a

RNA#3에 대한 볼루스 공급:



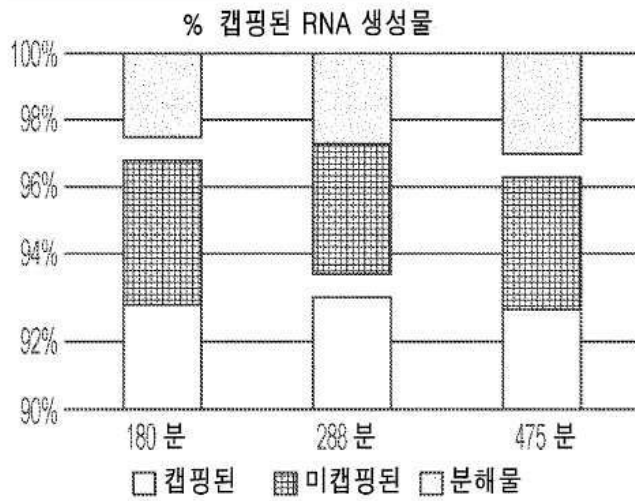
도면20b

RNA#3에 대한 지속적 공급:



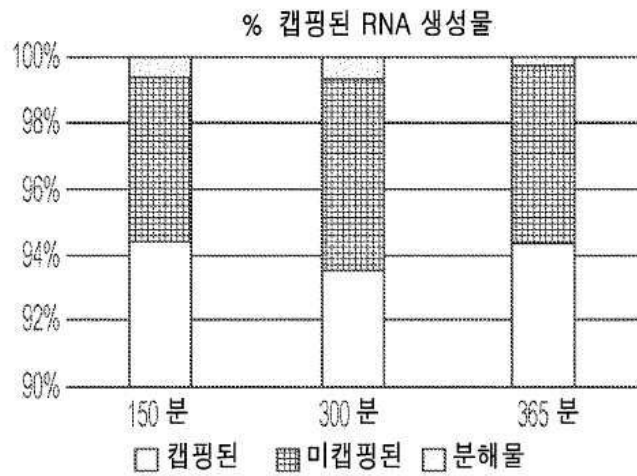
도면21a

RNA#3에 대한 볼루스 공급:

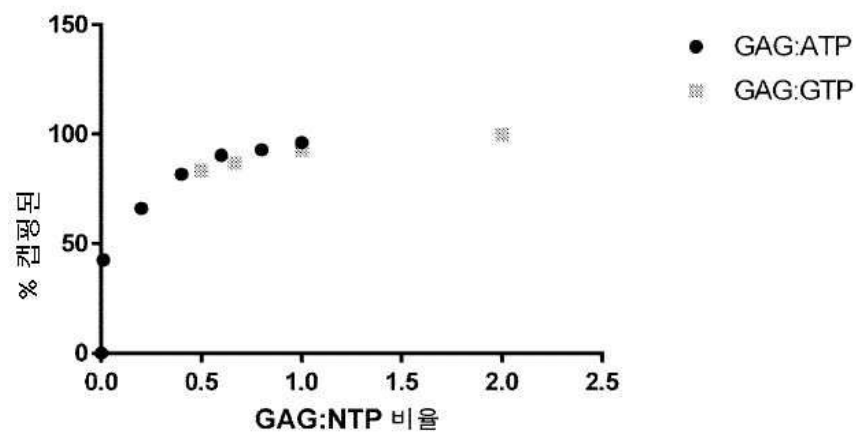


도면21b

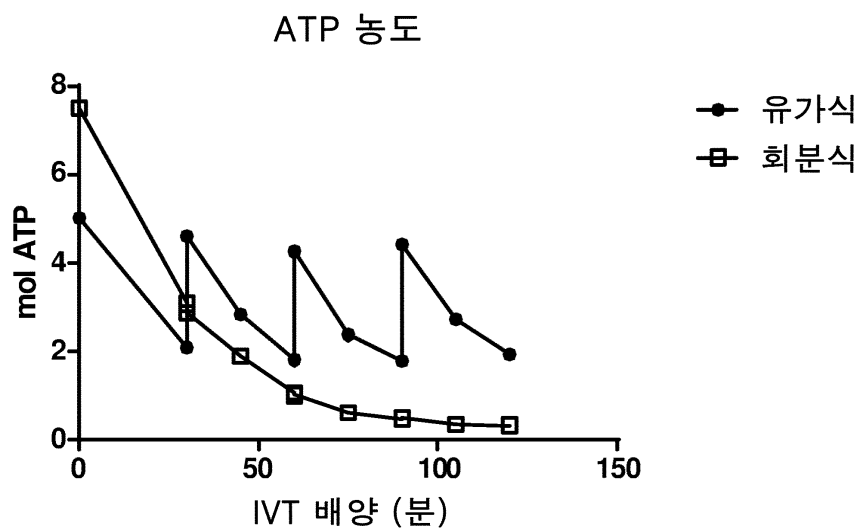
RNA#3에 대한 지속적 공급:



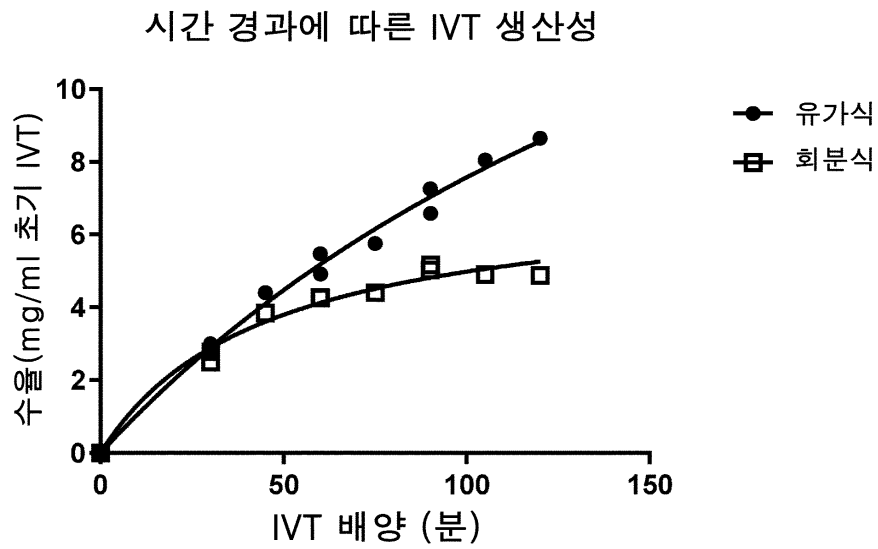
도면22



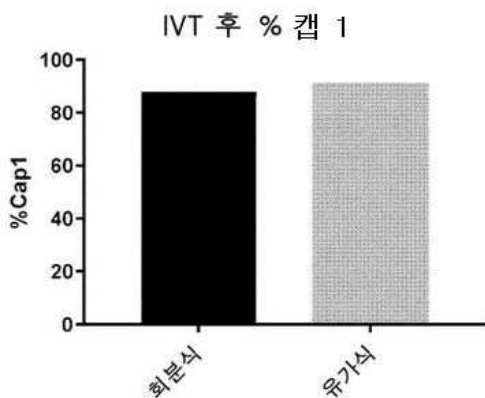
도면23



도면24



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ModernaTX, Inc.

<120> FED-BATCH IN VITRO TRANSCRIPTION PROCESS

<130> M1378.70110W000

<140> Not yet assigned

<141> Concurrently herewith

<150> US 62/816,734

<151> 2019-03-11

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 883

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu

20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu

35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val

50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys

65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg

85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu

100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser

115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala

130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys

145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His

165 170 175

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

180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp

195 200 205
 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
 210 215 220
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
 225 230 235 240
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
 260 265 270

 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
 275 280 285
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
 305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
 340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

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

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu
500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly
610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly
625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln
645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys

690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845

 Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala

<210> 2

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 2

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

1 5 10 15

 Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
 35 40 45
 Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50 55 60
 Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65 70 75 80

 Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85 90 95
 Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110
 Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
 115 120 125
 Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
 130 135 140

 Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
 145 150 155 160
 His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165 170 175
 Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
 180 185 190
 Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
 195 200 205

 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
 210 215 220
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
 225 230 235 240
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu

500 505 510
 Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
 515 520 525

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865 870 875 880

Ala Phe Ala Gly

<210> 3

<211> 883

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 3

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile

305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
 340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
 405 410 415
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
 420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

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

 Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
 530 535 540
 His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
 565 570 575
 Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
 580 585 590

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr

805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala

<210> 4

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
 35 40 45
 Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50 55 60
 Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85 90 95
 Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110
 Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser

115	120	125	
Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala			
130	135	140	
Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys			
145	150	155	160
His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His			
165	170	175	
Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser			
180	185	190	
Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp			
195	200	205	
Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr			
210	215	220	
Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp			
225	230	235	240
Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr			
245	250	255	
Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val			
260	265	270	
Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala			
275	280	285	
Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala			
290	295	300	
Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile			
305	310	315	320
Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala			
325	330	335	
Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile			
340	345	350	
Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp			
355	360	365	

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val
370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu
500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly

610	615	620	
Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly			
625	630	635	640
Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln			
645	650	655	
Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln			
660	665	670	
Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr			
675	680	685	
Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys			
690	695	700	
Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg			
705	710	715	720
Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp			
725	730	735	
Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu			
740	745	750	
Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu			
755	760	765	
Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His			
770	775	780	
Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu			
785	790	795	800
Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr			
805	810	815	
Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met			
820	825	830	
Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln			
835	840	845	
Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu			
850	855	860	

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala Gly

<210> 5

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
 35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
 115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
 145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Lys Asp Ile
340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe

420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

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

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
675 680 685
Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
690 695 700
Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
725 730 735
Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
740 745 750
Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
755 760 765
Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785 790 795 800
Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
805 810 815
Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
820 825 830
Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850 855 860
Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865 870 875 880
Ala Phe Ala Gly

<210> 6

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp

225 230 235 240
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
 260 265 270

 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
 275 280 285
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
 305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Asn Asp Ile
 340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
 405 410 415
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
 420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

 Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
 465 470 475 480

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

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp

725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala Gly

<210> 7

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu

35	40	45	
Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val			
50	55	60	
Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys			
65	70	75	80
Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg			
85	90	95	
Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu			
100	105	110	
Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser			
115	120	125	
Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala			
130	135	140	
Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys			
145	150	155	160
His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His			
165	170	175	
Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser			
180	185	190	
Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp			
195	200	205	
Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr			
210	215	220	
Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp			
225	230	235	240
Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr			
245	250	255	
Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val			
260	265	270	
Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala			
275	280	285	

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
 305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Ala Asp Ile
 340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
 405 410 415
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
 420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

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

 Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785 790 795 800
Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
805 810 815
Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
820 825 830
Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850 855 860
Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865 870 875 880
Ala Phe Ala Gly

<210> 8

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110
 Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
 115 120 125
 Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
 130 135 140

 Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
 145 150 155 160
 His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165 170 175
 Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
 180 185 190
 Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
 195 200 205

 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
 210 215 220
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
 225 230 235 240
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
 260 265 270

 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
 275 280 285
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
 305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Trp Asp Ile

340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
 405 410 415
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
 420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

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

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln

835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu

850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe

865 870 875 880

Ala Phe Ala Gly

<210> 9

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 9

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

1 5 10 15

Ala	Ala	Ile	Pro	Phe	Asn	Thr	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gly	Glu	Arg	Leu
		20						25					30		
Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu	Glu	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Met	Ala	Glu
		35					40					45			
Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Met	Phe	Glu	Arg	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Val
	50						55				60				
Ala	Asp	Asn	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Leu	Pro	Lys
65					70					75				80	

Met	Ile	Ala	Arg	Ile	Asn	Asp	Trp	Phe	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Arg
				85					90					95	
Gly	Lys	Arg	Pro	Thr	Ala	Phe	Gln	Phe	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Pro	Glu
			100					105					110		
Ala	Val	Ala	Tyr	Ile	Thr	Ile	Lys	Thr	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser
		115					120					125			
Ala	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Arg	Ala
	130					135					140				

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
145 150 155 160
His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165 170 175
Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
 180 185 190
Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
 195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
 210 215 220
Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
225 230 235 240
Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255
Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
 260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
 275 280 285
Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300
Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
305 310 315 320
Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Val Ile
 340 345 350
Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380
Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe

385	390							395							400						
Met	Leu	Glu	Gln	Ala	Asn	Lys	Phe	Ala	Asn	His	Lys	Ala	Ile	Trp	Phe						
				405				410				415									
Pro	Tyr	Asn	Met	Asp	Trp	Arg	Gly	Arg	Val	Tyr	Ala	Val	Ser	Met	Phe						
				420				425				430									
Asn	Pro	Gln	Gly	Asn	Asp	Met	Thr	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys						
				435				440				445									
Gly	Lys	Pro	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Lys	Ile	His	Gly						
				450				455				460									
Ala	Asn	Cys	Ala	Gly	Val	Asp	Lys	Val	Pro	Phe	Pro	Glu	Arg	Ile	Lys						
				470				475				480									
Phe	Ile	Glu	Glu	Asn	His	Glu	Asn	Ile	Met	Ala	Cys	Ala	Lys	Ser	Pro						
				485				490				495									
Leu	Glu	Asn	Thr	Trp	Trp	Ala	Glu	Gln	Asp	Ser	Pro	Phe	Cys	Phe	Leu						
				500				505				510									
Ala	Phe	Cys	Phe	Glu	Tyr	Ala	Gly	Val	Gln	His	His	Gly	Leu	Ser	Tyr						
				515				520				525									
Asn	Cys	Ser	Leu	Pro	Leu	Ala	Phe	Asp	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Ile	Gln						
				530				535				540									
His	Phe	Ser	Ala	Met	Leu	Arg	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Arg	Ala	Val	Asn						
				550				555				560									
Leu	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Gln	Asp	Ile	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Lys						
				565				570				575									
Lys	Val	Asn	Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Asn	Gly	Thr	Asp	Asn						
				580				585				590									
Glu	Val	Val	Thr	Val	Thr	Asp	Glu	Asn	Thr	Gly	Glu	Ile	Ser	Glu	Lys						
				595				600				605									
Val	Lys	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Trp	Leu	Ala	Tyr	Gly						
				610				615				620									
Val	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Val	Met	Thr	Leu	Ala	Tyr	Gly						
				625				630				635				640					

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln
645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
690 695 700

Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
725 730 735

Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865 870 875 880

Ala Phe Ala Gly

<210> 10

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 10

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

1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu

20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu

35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val

50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys

65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg

85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu

100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser

115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala

130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys

145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His

165 170 175

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

180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp

195 200 205
 Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
 210 215 220
 Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
 225 230 235 240
 Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
 245 250 255
 Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
 260 265 270

 Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
 275 280 285
 Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
 290 295 300
 Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
 305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
 340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Ser Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

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

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu
500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly
610 615 620

Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly
625 630 635 640

Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln
645 650 655

Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
675 680 685

Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys

690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845

 Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala Gly

<210> 11

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

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

1					5					10					15								
Ala	Ala	Ile	Pro	Phe	Asn	Thr	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gly	Glu	Arg	Leu								
20								25								30							
Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu	Glu	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Met	Ala	Glu								
35								40								45							
Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Met	Phe	Glu	Arg	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Val								
50								55								60							
Ala	Asp	Asn	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Leu	Pro	Lys								
65								70								75				80			
Met	Ile	Ala	Arg	Ile	Asn	Asp	Trp	Phe	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Arg								
85								90								95							
Gly	Lys	Arg	Pro	Thr	Ala	Phe	Gln	Phe	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Pro	Glu								
100								105								110							
Ala	Val	Ala	Tyr	Ile	Thr	Ile	Lys	Thr	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser								
115								120								125							
Ala	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Arg	Ala								
130								135								140							
Ile	Glu	Asp	Glu	Ala	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	Arg	Asp	Leu	Glu	Ala	Lys								
145								150								155				160			
His	Phe	Lys	Lys	Asn	Val	Glu	Glu	Gln	Leu	Asn	Lys	Arg	Val	Gly	His								
165								170								175							
Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Met	Gln	Val	Val	Glu	Ala	Asp	Met	Leu	Ser								
180								185								190							
Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	Ser	Trp	His	Lys	Glu	Asp								
195								200								205							
Ser	Ile	His	Val	Gly	Val	Arg	Cys	Ile	Glu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr								
210								215								220							
Gly	Met	Val	Ser	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Gln	Asp								
225								230								235				240			
Ser	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Thr								
245								250								255							

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
370 375 380

Tyr Arg His Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu

500 505 510
 Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
 515 520 525

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750

Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
755 760 765

Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785 790 795 800

Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
805 810 815

Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
820 825 830

Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865 870 875 880

Ala Phe Ala Gly

<210> 12

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
20 25 30

Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
35 40 45

Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
85 90 95

Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
100 105 110

Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
115 120 125

Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
145 150 155 160

His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile

305 310 315 320
 Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
 325 330 335

 Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Glu Asp Ile
 340 345 350
 Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
 355 360 365
 Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Ala Val
 370 375 380
 Tyr Arg Asn Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
 385 390 395 400

 Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
 405 410 415
 Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
 420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

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

 Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
 530 535 540
 His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
 545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
 565 570 575
 Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
 580 585 590

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr

805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860
 Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala Gly

<210> 13

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Ala Glu
 35 40 45
 Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50 55 60
 Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85 90 95
 Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110
 Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser

115	120	125	
Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala			
130	135	140	
Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys			
145	150	155	160
His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His			
165	170	175	
Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser			
180	185	190	
Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp			
195	200	205	
Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr			
210	215	220	
Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp			
225	230	235	240
Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr			
245	250	255	
Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val			
260	265	270	
Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala			
275	280	285	
Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala			
290	295	300	
Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile			
305	310	315	320
Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala			
325	330	335	
Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Trp Val Ile			
340	345	350	
Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp			
355	360	365	

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe
420 425 430

Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
435 440 445

Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
450 455 460

Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys
465 470 475 480

Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro
485 490 495

Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu
500 505 510

Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr
515 520 525

Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln
530 535 540

His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn
545 550 555 560

Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys
565 570 575

Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn
580 585 590

Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys
595 600 605

Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp Leu Ala Tyr Gly

610 615 620
 Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly
 625 630 635 640
 Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln
 645 650 655

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670
 Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
 675 680 685
 Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
 690 695 700
 Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
 705 710 715 720

 Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
 725 730 735
 Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
 740 745 750
 Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
 755 760 765
 Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
 770 775 780

 Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
 785 790 795 800
 Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
 805 810 815
 Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
 820 825 830
 Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
 835 840 845

 Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
 850 855 860

Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
 865 870 875 880
 Ala Phe Ala Gly

<210> 14

<211> 883

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 14

Met Asn Thr Ile Asn Ile Ala Lys Asn Asp Phe Ser Asp Ile Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp His Tyr Gly Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu Ser Tyr Glu Met Gly Glu
 35 40 45
 Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln Leu Lys Ala Gly Glu Val
 50 55 60
 Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile Thr Thr Leu Leu Pro Lys
 65 70 75 80

Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu Glu Val Lys Ala Lys Arg
 85 90 95
 Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu Gln Glu Ile Lys Pro Glu
 100 105 110
 Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr Leu Ala Cys Leu Thr Ser
 115 120 125
 Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala Ser Ala Ile Gly Arg Ala
 130 135 140

Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp Leu Glu Ala Lys
 145 150 155 160
 His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys Arg Val Gly His
 165 170 175

Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala Asp Met Leu Ser
180 185 190

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp His Lys Glu Asp
195 200 205

Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu Ile Glu Ser Thr
210 215 220

Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val Val Gly Gln Asp
225 230 235 240

Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu Ala Ile Ala Thr
245 250 255

Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gln Pro Cys Val
260 265 270

Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Trp Ala
275 280 285

Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His Ser Lys Lys Ala
290 295 300

Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val Tyr Lys Ala Ile
305 310 315 320

Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys Lys Val Leu Ala
325 330 335

Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro Val Trp Val Ile
340 345 350

Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro Glu Asp Ile Asp
355 360 365

Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala Ala Ala Val
370 375 380

Tyr Arg Lys Asp Lys Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe
385 390 395 400

Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe
405 410 415

Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe

420 425 430
 Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys
 435 440 445
 Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly
 450 455 460

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

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

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

 Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Leu Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln
 660 665 670

Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr
675 680 685
Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys
690 695 700
Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg
705 710 715 720

Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp
725 730 735
Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu
740 745 750
Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu
755 760 765
Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His
770 775 780

Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu
785 790 795 800
Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr
805 810 815
Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met
820 825 830
Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln
835 840 845

Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu
850 855 860
Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe
865 870 875 880
Ala Phe Ala