



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0063597
 (43) 공개일자 2011년06월10일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C12N 15/12</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/86</i> (2006.01) <i>A61K 31/7105</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7012601(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년07월18일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2005-7001330
 원출원일자(국제출원일자) 2003년07월18일
 심사청구일자 2008년05월23일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년06월01일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2003/022444</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2004/009769
 국제공개일자 2004년01월29일</p> <p>(30) 우선권주장
 10/294,228 2002년11월14일 미국(US)
 60/398,417 2002년07월24일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
 미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트 스트리트 3160</p> <p>(72) 발명자
 틀렌티노 마이클 제이,
 미국, 플로리다 34747, 켈레브레이션, 알버 씨클 411
 레이치 사무엘 조탐
 미국, 펜실바니아 19004, 발라 썬위드, 켄트 로드 312</p> <p>(74) 대리인
 특허법인씨엔에스</p> |
|--|---|

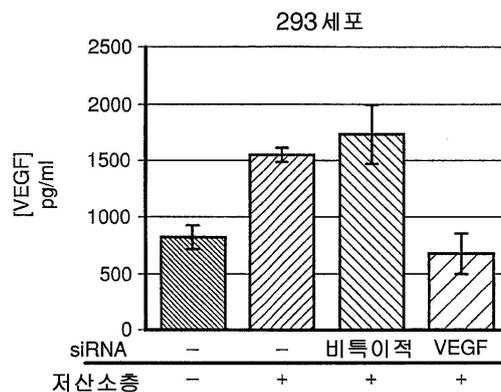
전체 청구항 수 : 총 88 항

(54) 신생혈관형성의 siRNA 저해를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 혈관내피세포 성장인자(VEGF) 유전자 및 VEGF 수용체 유전자 Flt1과 Flk-1/KDR에 특이적인 siRNA(small interfering RNA)에 관한 것이다. siRNA에 의한 RNA 간섭은 이러한 유전자의 발현을 억제한다. siRNA는 VEGF 과다발현에 의해서 촉진되는 신생혈관형성과 관련된 질병, 예를 들면, 당뇨병성 망막병증, 노인성 황반변성 및 다양한 형태의 암의 치료에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 25개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 분리된 siRNA.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인간 VEGF mRNA는 VEGF₁₂₁ mRNA(서열번호 2); VEGF₁₆₅ mRNA(서열번호 3); VEGF₁₈₉ mRNA(서열번호 4) 및 VEGF₂₀₆ mRNA(서열번호 5)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 인간 VEGF mRNA 서열의 동족체는 마우스 VEGF mRNA(서열번호 1)인 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥은 서열번호 77을 포함하고, 상기 안티센스 가닥은 서열번호 78을 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥은 한 개의 RNA 분자를 포함하고, 상기 안티센스 RNA 가닥은 한 개의 RNA 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 RNA 듀플렉스를 형성하는 상기 센스 및 안티센스 RNA 가닥은 단일쇄의(single-stranded) 머리카락(hairpin)에 의해서 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 siRNA는 뉴클레오티드가 아닌 물질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 센스 및 안티센스 RNA 가닥은 뉴클레아제(nuclease) 분해에 대해 안정화되어 있는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 9

제 1항에 있어서, 3' 오버행(overhang)을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 3' 오버행은 1개 내지 약 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 3' 오버행은 약 2개의 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 12

제 5항에 있어서, 상기 센스 RNA 가닥은 제 1의 3' 오버행을 포함하고, 상기 안티센스 RNA 가닥은 제 2의 3' 오버행을 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2의 3' 오버행은 각각 1개 내지 약 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 제 1의 3' 오버행은 디뉴클레오티드(dinucleotide)를 포함하고, 상기 제 2의 3' 오버행은 디뉴클레오티드(dinucleotide)를 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2의 3' 오버행을 구성하는 상기 디뉴클레오티드는 디티미딜릭산(dithymidylic acid(TT)) 또는 디우리딜릭산(diuridylic acid(uu))인 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 16

제 9항에 있어서, 상기 3' 오버행은 뉴클레아제(nuclease) 분해에 대해 안정화되어 있는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 17

제 1항의 siRNA를 포함하는 망막 색소 상피세포.

청구항 18

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 포함하

는 재조합 플라스미드.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 siRNA를 발현시키기 위한 상기 핵산서열은 유도성 또는 조절가능한 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 siRNA를 발현시키기 위한 상기 핵산서열은 인간 U6 RNA 프로모터의 조절 하에 polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된 센스 RNA 가닥 코딩 서열, 및 인간 U6 RNA 프로모터의 조절 하에 polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된 안티센스 RNA 가닥 코딩 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 플라스미드는 pAAVsiRNA인 것을 특징으로 하는 재조합 플라스미드.

청구항 22

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 siRNA를 발현시키기 위한 상기 핵산서열은 유도성 또는 조절가능한 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 24

제 22항에 있어서, 상기 siRNA를 발현시키기 위한 상기 핵산서열은 인간 U6 RNA 프로모터의 조절 하에 polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된 센스 RNA 가닥 코딩 서열, 및 인간 U6 RNA 프로모터의 조절 하에 polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된 안티센스 RNA 가닥 코딩 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 25

제 22항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 헤르페스바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 26

제 22항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 수포성구내염 바이러스, 광견병 바이러스, 에볼라 바이러스 또는 모콜라 바이러스의 표면 단백질로 슈도타이핑(pseudotyping)되는 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 27

제 25항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 아데노연관바이러스 벡터를 포하는 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 28

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 siRNA; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

제 28항에 있어서, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), 고분자양이온 또는 리포솜을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 30

제 18항의 플라스미드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 31

제 30항에 있어서, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), 고분자양이온 또는 리포솜을 더욱 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 32

제 22항의 바이러스 벡터 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 33

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 siRNA를 대상으로서 인간을 제외한 동물에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 인간을 제외한 동물에서 인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태, 돌연변이체 또는 동족체의 발현을 억제하는 방법.

청구항 34

제 33항에 있어서, 상기 인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태, 돌연변이체 또는 동족체의 발현이 상기 대상자의 한 쪽 또는 양쪽 눈에서 억제되는 것을 특징으로

하는 방법.

청구항 35

제 33항에 있어서, 상기 인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태, 돌연변이체 또는 동족체의 발현이 상기 대상자의 망막 색소 상피세포에서 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제 33항에 있어서, 상기 siRNA의 유효량은 약 1 nM 내지 약 100 nM의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제 33항에 있어서, 상기 siRNA는 전달시약과 조합으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 전달시약은 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), 고분자양이온 및 리포솜으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 38항에 있어서, 상기 전달시약은 리포솜인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 39항에 있어서, 상기 리포솜은 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 부위에 있는 세포에 리포솜을 표적화하는 리간드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 리간드는 종양세포 또는 혈관내피세포의 표면에 존재하는 수용체에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 41항에 있어서, 상기 리간드는 단일클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제 39항에 있어서, 상기 리포솜은 식균작용증진(opsonization)-억제 잔기로 변형되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제 43항에 있어서, 상기 식균작용증진-억제 잔기는 PEG, PPG 또는 이의 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제 33항에 있어서, 상기 siRNA는 재조합 플라스미드로부터 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 33항에 있어서, 상기 siRNA는 재조합 바이러스 벡터로부터 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제 46항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노연관바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 헤르페스바이러스 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제 47항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 수포성구내염 바이러스, 광견병 바이러스, 에볼라 바이러스 또는 모콜라 바이러스의 표면 단백질로 슈도타이핑(pseudotyping)되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제 46항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 아데노연관바이러스 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제 33항에 있어서, 상기 siRNA는 위장관(enteral) 투여경로를 통해서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제 50항에 있어서, 상기 위장관 투여경로는 경구, 직장 및 비내로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제 33항에 있어서, 상기 siRNA는 비경구적 투여경로를 통해서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제 52항에 있어서, 상기 비경구적 투여경로는 혈관내 투여, 조직주변 및 조직내 투여, 피하 주사 또는 침착, 피하 주입, 안구내 투여, 및 혈관신생 장소 또는 이와 인접된 부위에 직접 적용으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 53항에 있어서, 상기 혈관내 투여는 정맥내 볼루스 주사, 정맥내 주입, 동맥내 볼루스 주사, 동맥내 주입 및 맥관내로의 카테터 점적주입으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 53항에 있어서, 상기 조직주변 및 조직내 주사는 종양주변 주사 또는 종양내 주사를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제 53항에 있어서, 상기 안구내 투여는 초자체내, 망막내, 망막하, 건주하(subtenon), 안와 주위 및 안와후, 경각막(trans-conrneal) 또는 경공막(trans-scleral) 투여를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제 53항에 있어서, 상기 혈관신생 장소 또는 이와 인접된 부위에 직접 적용은 카테터, 각막 펠렛(corneal pellet), 안구내 점적장치(eye dropper), 좌약, 다공성 물질을 포함하는 임플란트, 비다공성 물질을 포함하는 임플란트, 또는 젤라틴 물질을 포함하는 임플란트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제 53항에 있어서, 상기 혈관신생 장소는 눈에 존재하고, 상기 혈관신생 장소 또는 이와 인접된 부위에 직접 적용은 안구 임플란트를 이용한 적용을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제 58항에 있어서, 상기 안구 임플란트는 생분해성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 siRNA를 대상으로서 인간을 제외한 동물에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 인간을 제외한 동물에서 신생혈관형성을 억제하는 방법.

청구항 61

제 60항에 있어서, 상기 신생혈관형성은 병리적인(pathogenic) 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제 60항에 있어서, 상기 신생혈관형성은 비병리적인(non-pathogenic) 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

제 62항에 있어서, 상기 비병리적 신생혈관형성은 지방조직의 생성 또는 콜레스테롤의 생성과 관련이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64

제 62항에 있어서, 상기 비병리적 신생혈관형성은 자궁내막에서의 혈관신생을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

제 60항에 있어서, 상기 신생혈관형성은 상기 대상자의 한 쪽 또는 양쪽 눈에서 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66

제 60항에 있어서, 상기 신생혈관형성은 상기 대상자의 망막 색소 상피세포에서 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 또는 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥; 및 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 상기 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥이 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성하는 siRNA를 신생혈관형성 질환의 치료를 요하는 대상자로서 인간을 제외한 동물에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 인간을 제외한 동물에서 신생혈관형성 질환을 치료하는 방법.

청구항 68

제 67항에 있어서, 상기 신생혈관형성 질환은 암과 관련된 종양을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제 68항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 뇌암, 복부암, 결장암, 결장직장암, 식도암, 위장암, 신경교종(glioma), 간암, 설암, 신경아세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막아세포종, 빌름스 종양(Wilm's tumor), 다발성 골수종, 피부암, 림프종 및 혈액암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

제 67항에 있어서, 상기 신생혈관형성 질환은 당뇨병성 망막병증, 노인성 황반변성 및 염증성 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

제 70항에 있어서, 상기 염증성 질환은 건선 또는 류마티스 관절염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제 70항에 있어서, 상기 신생혈관형성 질환은 노인성 황반변성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제 67항에 있어서, 상기 siRNA는 상기 siRNA와는 다르고 상기 신생혈관형성 질환을 치료하기 위한 억제학적 제제와 조합으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제 73항에 있어서, 상기 신생혈관형성 질환은 암이고, 상기 억제학적 제제는 화학요법제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제 73항에 있어서, 상기 화학요법제는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 아드리아미신(adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin) 및 타모시펜(tamoxifen)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

제 67항에 있어서, 상기 siRNA는 상기 신생혈관형성 질환을 치료하기 위한 다른 치료요법과 병행하면서 대상자에게 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 77

제 76항에 있어서, 상기 신생혈관형성 질환은 암이고, 상기 siRNA는 방사선 치료요법, 화학요법 또는 수술과 병행하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 78

제 1항에 있어서, 상기 siRNA는 변화된(altered) RNA를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 79

제 1항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69,

SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 90으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 80

제 1항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 및 SEQ ID NO: 44로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 siRNA.

청구항 81

제 18항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 90으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 플라스미드.

청구항 82

제 18항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 및 SEQ ID NO: 44로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 플라스미드.

청구항 83

제 22항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 90으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 바이러스 벡터.

청구항 84

제 22항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID

NO: 24 및 SEQ ID NO: 44로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.

청구항 85

제 28항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 90으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 86

제 28항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 및 SEQ ID NO: 44로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 87

제 33항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 90으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 88

제 33항에 있어서, 상기 표적 서열은 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 및 SEQ ID NO: 44로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

관련 특허출원에 대한 상호참고자료

[0001]

본 출원은 2002년 7월 24일자로 제출된 미합중국 가특허출원 제 60/398,417호 및 2002년 11월 14일자로 제출된 미합중국 정규특허출원 제 10/294,228호에 대한 우선권을 주장한다.

[0002]

[0003] 정부연구비에 대한 참고사항

[0004] 본 발명은 NIH/NEI 연구비 번호 R01-EY10820, EY-13410 및 EY12156하에서 부분적으로 연구비를 지원 받아서 수행되었다. 미국정부는 본 발명에 대해서 일부 권리를 가진다.

[0005] 본 발명은 siRNA(small interfering RNA)에 의한 유전자 발현 조절에 관한 것이고, 특히 신생혈관형성에 관련된 질병 또는 상태를 치료하기 위한 유전자 발현 조절에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 신생혈관형성(angiogenesis)은 새로운 모세혈관의 성장 또는 혈관신생(neovascularization)으로 정의되는 것으로 성장 및 발생에서 기본적인 역할을 수행한다. 성인의 모든 조직은 신생혈관형성을 개시할 수 있는 능력을 가지고 있으나 이러한 능력은 엄격하게 조절되고 있다. 신생혈관형성의 주요 조절인자는 혈관내피세포 성장인자("VEGF")이며 이는 혈관투과성 인자("VPF")라고도 불리운다. VEGF는 인간에서 적어도 4개의 다른 선택적으로 스플라이싱된 형태(alternative splice forms)로 존재하고(VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆), 이들 모두는 비슷한 생물학적 활성을 나타낸다.

[0007] 신생혈관형성은 분비된 VEGF가 혈관내피세포의 표면에 발현된 Flt-1 및 Flk-1/KDR 수용체(VEGF 수용체 1 및 VEGF 수용체 2라고도 불리워짐)에 결합함으로써 개시된다. Flt-1 및 Flk-1/KDR는 막투과성 타이로신 키나제 단백질이고, 이들 단백질에 VEGF의 결합은 세포 내에서 일련의 신호전달 경로를 활성화시켜서 최종적으로 주변조직에서 혈관신생을 유발한다.

[0008] 비정상적인 신생혈관형성 또는 신생 혈관의 병리적(pathogenic) 성장은 다수의 상태와 관련되어 있다. 이러한 상태는 당뇨병성 망막병증, 건선, 삼출성 또는 젖은형(wet) 노인성 황반변성("ARMĐ"), 류마티스 관절염 및 기타 염증성 질환, 및 대부분의 암을 포함한다. 이러한 상태와 관련된 질병에 걸린 조직 또는 종양에서 VEGF는 비정상적인 높은 수준으로 발현되고 혈관신생 또는 혈관투과성이 증가되어 있다.

[0009] 특히, ARMĐ는 임상적으로 중요한 혈관신생질환이다. 이 질환은 노인의 한 쪽 또는 양쪽 눈의 맥락막에서 신생혈관이 형성되는 것을 특징으로 하며, 산업화된 국가에서 실명의 주 요인이 되고 있다.

[0010] 비정상적인 신생혈관형성을 저해하기 위해서 많은 치료전략이 제시되어 VEGF의 생성 또는 효과를 감소시키려는 노력이 이루어졌다. 예를 들면, 항-VEGF 항체 또는 항-VEGF 수용체 항체 (Kim ES 등 (2002), *PNAS USA*99: 11399-11404), 및 VEGF와 결합하는 혈관내피세포 수용체와 경쟁적으로 결합하는 가용성 VEGF 포획체 (Holash J 등 (2002), *PNAS USA*99: 11393-11398)이 개발되었다. 또한, VEGF 유전자 발현을 초래하는 전통적인 VEGF "안티센스" 또는 압타머(aptamer) 치료요법이 제안되었다 (Uhlmann 등의 미국 특허출원 공개 제 2001/0021772호). 그러나, 이러한 치료요법에서 사용된 항-신생혈관형성 제제는 단지 VEGF 또는 VEGF 수용체의 화학량적 감소를 유도할 수 있고, 이들 제제의 효과는 질병에 걸린 조직에서 비정상적인 고농도로 생성된 VEGF에 의해서 감소된다. 그러므로, 이용 가능한 항-신생혈관형성 제제를 이용하여 얻은 결과는 만족스럽지 못하다.

[0011] RNA 간섭(RNA interference, 이하 "RNAi"로 약칭함)은 많은 진핵생물에서 보존된 전사후 유전자 조절의 한 방법이다. RNAi는 세포에 존재하는 짧은(예, <30개 뉴클레오티드) 이중나선 RNA("dsRNA") 분자에 의해서 유도된다 (Fire A 등 (1998), *Nature*391: 806-811). "소간섭 RNA(short interfering RNA)" 또는 "siRNA"라고도 불리우는 이러한 짧은 dsRNA 분자는 한 개의 뉴클레오티드 변형 내에서 siRNA와 서열상동성을 가지는 전령 RNA("mRNA")의 파괴를 유발한다 (Elbashir SM 등 (2001), *Genes Dev*, 15: 188-200). siRNA 및 이의 표적화된 mRNA가 "RNA-유도 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex)" 또는 "RISC"에 결합하면 RISC는 표적화된 mRNA를 절단한다. siRNA는 분명히 여러 번 재사용되는 효소와 유사하게 재순환된다. 하나의 siRNA 분자는 약 1000개의 mRNA 분자의 절단을 유도할 수 있다. 그러므로, mRNA의 siRNA-매개 RNAi 분해는 표적 유전자의 발현을 저해하기 위한 현재 이용 가능한 기술보다 더 효과적이다.

[0012] Elbashir SM 등 (2001, *supra*)은 짧은 3' 오버행(overhang) 말단을 가지며 21 및 22 뉴클레오티드로 이루어진 합성 siRNA는 초파리세포 용혈액에서 표적 mRNA의 RNAi을 유도할 수 있다고 보고하였다. 또한, 배양된 포유동물세포에서 합성 siRNA는 RNAi 분해를 유도하고 (Elbashir SM 등 (2001) *Nature*, 411: 494-498), 최근에 합성 siRNA에 의한 RNAi 분해의 유도는 살아있는 마우스에서 보고된 바 있다 (McCaffrey AP 등 (2002), *Nature*, 418: 38-39; Xia H 등 (2002), *Nat. Biotech.*20: 1006-1010). siRNA에 의한 RNAi 분해 유도의 치료적 목적의

적용 가능성은 최근의 몇몇 체외(*in vitro*) 실험에서 증명되고 있는데, siRNA 매개에 의한 HIV-1 감염 저해 (Novina CD 등 (2002), *Nat. Med.* 8: 681-686) 및 신경독성 특성을 나타내는 폴리글루타민 질환 단백질 발현의 감소(Xia H 등 (2002), *supra*) 등의 연구를 예로 들 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 그러므로, 촉매적 또는 아화화양론적 양으로 VEGF 또는 VEGF 수용체의 발현을 선택적으로 저해할 수 있는 제제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 발명의 요약
- [0015] 본 발명은 VEGF, FLT-1 및 FLK-1/KDR 유전자의 mRNA를 특이적으로 표적화하여 이들의 RNAi 유도에 의한 분해를 유발하는 siRNA에 관한 것이다. 본 발명의 siRNA 화합물 및 조성물은 신생혈관형성을 저해하기 위해서, 특히 암 종양, 노인성 황반변성 및 다른 신생혈관형성 질환을 치료하기 위한 목적으로 사용될 수 있다.
- [0016] 따라서, 본 발명은 인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이들의 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 돌연변이체 또는 동족체(cognate)를 표적화하는 분리된 siRNA를 제공한다. siRNA는 센스 RNA 가닥과 안티센스 RNA 가닥으로 구성되어 RNA 듀플렉스(duplex)를 형성한다. 센스 RNA 가닥은 표적 mRNA에서 약 19개 내지 약 20개의 인접한 뉴클레오티드로 구성된 표적 서열에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 본 발명의 siRNA를 발현하는 재조합 플라스미드 및 바이러스 벡터뿐만 아니라, 본 발명의 siRNA와 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 본 발명의 siRNA를 대상자에게 유효량으로 투여하여 표적 mRNA를 분해하는 것을 포함하는, 인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이들의 선택적 스플라이싱 형태, 돌연변이체 또는 동족체의 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 대상자에게 인간 VEGF mRNA, 인간 Flt-1 mRNA, 인간 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이들의 선택적 스플라이싱 형태, 돌연변이체 또는 동족체를 표적화하는 siRNA를 유효량으로 투여하여 신생혈관형성 질환과 관련된 신생혈관형성을 저해하는 것을 포함하는, 대상자에서 신생혈관형성을 저해하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1a 및 1b는 siRNA로 처리되지 않거나("-") 비특이적 siRNA("비특이적") 또는 인간 VEGF mRNA를 표적화하는 siRNA("VEGF")로 처리된 저산소 상태의 293 세포 및 HeLa 세포에서의 VEGF 농도(pg/ml)를 보여주는 막대그래프이다. 저산소 상태가 아닌 293 세포 및 HeLa 세포에서의 VEGF 농도(pg/ml) 또한 나타내고 있다. 각 막대는 4회 실험의 평균값이고, 오차는 평균의 표준편차를 나타낸다.
- 도 2는 siRNA로 처리되지 않거나("-") 비특이적 siRNA("비특이적") 또는 인간 VEGF mRNA를 표적화하는 siRNA("VEGF")로 처리된 저산소 상태의 NIH 3T3 세포에서의 VEGF 농도(pg/ml)를 보여주는 막대그래프이다. 각 막대는 6회 실험의 평균값이고, 오차는 평균의 표준편차를 나타낸다.
- 도 3은 GFP siRNA(진한 회색 막대) 또는 인간 VEGF siRNA(얇은 회색 막대)의 존재하에서 인간 VEGF를 발현하는 아데노바이러스("AdVEGF")를 주입한 마우스의 망막에서의 인간 VEGF 농도(pg/총 단백질)를 보여주는 막대그래프이다. 각 막대는 5개 눈에서의 평균값이고, 오차는 평균의 표준편차를 나타낸다.
- 도 4는 대조군으로서 GFP siRNA를 망막하 주사하여 얻은 마우스 눈(N=9; "GFP siRNA") 및 마우스 VEGF siRNA를 망막하(subretinal) 주사하여 얻은 마우스 눈(N=7; "마우스 VEGF siRNA")에서 레이저에 의해 유도된 CNV의 평균 면적(mm²)을 보여주는 막대그래프이다. 오차막대는 평균의 표준오차를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 재조합 AAV 바이러스 벡터를 제조하는 데 사용한 시스-작용성(cis-acting) 플라스미드, pAAVsiRNA를 개략적으로 보여주는 도면이다. "ITR": AAV inverted terminal repeats; "U6": U6 RNA 프로모터; "Sense": siRNA 센스 코딩 서열; "Anti": siRNA 안티센스 코딩 서열; "PolyT": polythymidine 종결신호.

도 6은 마우스 항-VEGF siRNA("mVEGF1.siRNA") 또는 대조군 siRNA("GFP1.siRNA")를 망막하(A) 또는 초자체내(B) 주사하여 얻은 마우스 눈에서 레이저에 의해 유도된 CNV의 평균면적(mm^2)을 보여주는 막대그래프이다. 오차막대는 평균의 표준오차를 나타낸다. (C)는 레이저 유도한지 1일 후 siRNA를 포함하지 않은 인산완충용액(PBS)을 초자체내 주사("PBS"; CNV 면적은 레이저 유도 후 14일에 측정); 레이저 유도 후 14일에 대조군 siRNA를 초자체내 주사("GFP1.siRNA"; CNV 면적은 레이저 유도 후 21일에 측정); 또는 레이저 유도 후 14일에 마우스 항-VEGF siRNA를 초자체내 주사("mVEGF1.siRNA"; CNV 면적은 레이저 유도 후 21일에 측정)하여 얻은 마우스 눈에서 레이저에 의해 유도된 CNV의 평균면적(mm^2)을 보여주는 막대그래프이다. 오차막대는 평균의 표준오차를 나타낸다.

도 7은 인간 항-VEGF siRNA("Cand5") 및 대조군 siRNA("GFP1.siRNA")를 망막하 주사하여 얻은 마우스 눈에서 주사 후 0일(n=2; pre-siRNA injection), 6일 (n=3), 10일 (n=3) 및 14일 (n=3)에 측정된 VEGF 단백질의 백분율("%VEGF")을 보여주는 그래프이다. %VEGF = (Cand5 마우스 눈에서의 [VEGF]/GFP1.siRNA 마우스 눈에서의 [VEGF])*100.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 특별히 언급되지 않은 한, 본 발명의 모든 핵산서열은 5' → 3' 방향성을 가진다. 또한, 핵산서열에서 모든 테옥시리보뉴클레오티드는 대문자로 표기되고(예, 테옥시티미딘은 "T"), 핵산서열에서 리보뉴클레오티드는 소문자로 표기된다(예, 우리딘은 "u").
- [0022] VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA를 표적화하는 siRNA를 포함하는 조성물 및 방법은 신생혈관형성을 저해하기 위해서, 특히 신생혈관형성 질환의 치료를 위해서 사용되는 것이 바람직하다. 본 발명의 siRNA는 이러한 mRNA의 RNAi-매개 분해를 유발하여 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자의 단백질 산물을 생성시키지 않거나 이들의 생성을 감소시키는 것으로 여겨진다. 신생혈관형성을 개시하고 유지하기 위해서는 Flt-1 또는 Flk-1/KDR 수용체에 VEGF가 결합하여야 하기 때문에, siRNA에 의해서 매개되는 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA의 분해는 신생혈관형성 과정을 저해한다.
- [0023] 그러므로, 본 발명은 표적 mRNA를 표적화하는 약 17개의 뉴클레오티드 내지 약 29개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 19개 내지 약 25개의 뉴클레오티드로 이루어진 짧은 이중쇄 RNA를 포함하는 분리된 siRNA를 제공한다. siRNA는 센스 RNA 가닥과 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 이들 두 가닥은 표준 왓슨-크릭 염기쌍 상호작용에 의해서 서로 결합(annealing)한다(이하 "염기쌍을 형성한(base-paired)"으로 표현함). 하기에서 더 상세히 설명되겠지만 센스가닥은 표적 mRNA 내의 표적서열에 동일한 핵산서열을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 siRNA의 센스 및 안티센스 가닥은 두개의 상보적이고 단일쇄(single-stranded)의 RNA 분자를 포함하거나, 두 개의 상보적 부분이 염기쌍을 형성하고 단일쇄의 "머리핀(hairpin)" 영역에 의해서 공유결합된 단일 분자를 포함할 수 있다. 특정 이론과 결부되는 것을 원치 않으나, 후자 형태의 siRNA 분자의 머리핀 영역은 세포 내에서 "다이서(Dicer)" 단백질(또는 이의 동등물)에 의해서 절단되어 두개의 개별적인 염기쌍을 형성한 RNA 분자의 siRNA를 생성한다 (참조, Tuschl, T. (2002), *supra*).
- [0025] 본 발명에서 사용된 용어 "분리된(isolated)"은 사람이 개입하여 천연 상태에서부터 변형 또는 제거되는 것을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 siRNA는 "분리된" 것이 아니지만, 합성 siRNA 또는 천연상태와 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된(separated) siRNA는 "분리된" 것이다. 분리된 siRNA는 실질적으로 정제된 형태로 존재하거나, siRNA가 전달된 세포와 같은 비천연적 환경에서 존재할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용된 용어 "표적 mRNA"는 인간 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA, 인간 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA의 돌연변이체 또는 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice form), 또는 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자의 동족체에서 유래한 mRNA를 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 인간 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR와 유사한 유전자 또는 mRNA를 표현할 때 사용된 "동족체(cognate)"는 인간 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR와 상동성을 가지는 다른 포유동물 종으로부터 유래한 유전자 또는 mRNA를 의미한다. 예를 들면, 마우스에서 유래한 VEGF mRNA 동족체는 서열번호 1로 표시된다.
- [0028] 인간 VEGF의 스플라이싱 변이체는 공지되어 있으며, VEGF₁₂₁(서열번호 2), VEGF₁₆₅(서열번호 3), VEGF₁₈₉(서열번호 4) 및 VEGF₂₀₆(서열번호 5)를 포함한다. 인간 VEGF, Flt-1(서열번호 6) 또는 Flk-1/KDR(서열번호 7) 유전자로부

터 전사된 mRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 잘 알려진 기술을 이용하여 선택적 스플라이싱 형태(alternative splice forms)에 대해서 더 분석될 수 있다. 이러한 기술의 예는 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction), 노던 블랏팅 및 *in-situ* 혼성화를 포함한다. mRNA 서열 분석기술은 예를 들면 문헌 [Busting SA (2000), *J. Mol. Endocrinol.*25: 169-193]에 기술되어 있으며, 이 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 또한, 선택적으로 스플라이싱된 mRNA를 동정하기 위한 대표적인 기술은 하기에서 기술된다.

- [0029] 예를 들면, 임의의 질환 유전자와 관련된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 데이터베이스를 이용하여 선택적으로 스플라이싱된 mRNA를 동정할 수 있다. 이러한 데이터베이스는 GenBank, Embase 및 CGAP(Cancer Genome Anatomy Project) 데이터베이스를 포함한다. CGAP 데이터베이스는 예를 들면 다양한 형태의 인간 암의 EST(expressed sequence tag)를 포함한다. VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자에서 유래한 mRNA 또는 유전자 서열을 이러한 데이터베이스를 통해서 검색하여 선택적으로 스플라이싱된 mRNA를 나타내는 EST가 이러한 유전자에 존재하는지를 결정할 수 있다.
- [0030] 또한, "RNase 보호(Protection)"라는 기술을 이용하여 선택적으로 스플라이싱된(alternatively spliced) VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA를 동정할 수 있다. RNase 보호는 유전자 서열을 합성 RNA로 번역시키는 것으로서, 이러한 합성 RNA는 다른 세포, 예를 들면, 혈관신생 장소에 있는 또는 이 장소에서 인접한 조직으로부터 유래한 RNA와 혼성화된다. 혼성화된 RNA를 RNA:RNA 혼성 미스매치(mismatch)를 인식할 수 있는 효소와 반응시킨다. 예보다 작은 단편은 선택적으로 스플라이싱된 mRNA의 존재를 암시한다. 추정되는 선택적으로 스플라이싱된 mRNA는 클로닝될 수 있고, 이의 서열은 본 발명이 속하는 분야에서 잘 알려진 방법에 의해서 결정될 수 있다.
- [0031] 또한, RT-PCR을 통해서 선택적으로 스플라이싱된 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA를 동정할 수 있다. RT-PCR에서, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 질병에 걸린 조직으로부터 분리된 mRNA는 역전사 효소(reverse transcriptase)에 의해서 cDNA로 전환된다. cDNA의 전체 코딩서열은 3' 비번역 영역(untranslated region)에 위치하는 정방향(forward) 프라이머와 5' 비번역 영역에 위치하는 역방향(reverse) 프라이머를 이용하여 PCR를 수행함으로써 증폭된다. 증폭된 산물은 선택적으로 스플라이싱된 형태에 대해 분석될 수 있는 데, 예를 들면 증폭된 산물의 크기를 정상적으로 스플라이싱된 mRNA로부터 예상되는 산물의 크기와 비교할 수 있고, 이때 예를 들면 아가로스겔 전기영동을 통해서 분석할 수 있다.
- [0032] VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자의 돌연변이체로부터 생성된 mRNA는 또한 상기에서 언급한 바와 같은 선택적으로 스플라이싱된 형태를 동정하는 기술을 이용하여 용이하게 분석될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자 또는 mRNA의 "돌연변이체(mutant)"는 상기의 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 서열과 다른 서열을 가지는 인간 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자 또는 mRNA를 포함한다. 따라서, 이러한 유전자의 대립유전자(allelic) 형태 및 이로부터 생성된 mRNA는 본 발명의 목적 측면에서 "돌연변이체"로 여겨진다.
- [0033] 인간 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA는 이들 각각의 선택적으로 스플라이싱된 형태, 동족체 또는 돌연변이체와 공통적인 표적서열을 포함한다는 것은 당업자는 이해할 것이다. 그러므로, 이러한 공통의 표적서열을 포함하는 단일 siRNA 분자는 상기의 공통의 표적서열을 포함하는 다른 RNA 형태의 RNAi-매개 분해(RNAi-mediated degradation)를 유도할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 siRNA는 부분적으로 정제된 RNA, 실질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA 또는 제조법 방법에 의해서 생성된 RNA 뿐 만 아니라, 한 개 이상의 뉴클레오티드의 첨가, 결실, 치환 및/또는 변이에 의해서 천연적으로 존재하는 RNA와 다른 변이된 RNA를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 비-뉴클레오티드 물질을 예를 들면 siRNA의 말단(들) 또는 siRNA 내의 한 개 이상의 뉴클레오티드에 첨가하는 것을 포함할 수 있고, 뉴클레아제(nuclease) 분해에 저항성을 가지는 siRNA를 제조할 수 있는 변형을 포함한다.
- [0035] 또한, 본 발명의 siRNA의 한 쪽 또는 양쪽 가닥은 3' 오버행(overhang)을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "3' 오버행(overhang)"은 이중나선의 RNA 가닥의 3' 말단으로부터 연장된 적어도 한 개의 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0036] 따라서, 일구현예에서, 본 발명의 siRNA는 1 내지 약 6개의 뉴클레오티드(리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드를 포함), 바람직하게는 1 내지 약 5개의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 1 내지 약 4개의 뉴클레오티드, 특히 바람직하게는 약 2 내지 약 4개의 뉴클레오티드로 이루어진 적어도 한 개의 3' 오버행을 포함한다.
- [0037] siRNA 분자의 두 가닥 모두 3' 오버행을 포함하는 구현예에서, 오버행의 길이는 두 가닥에서 동일하거나 다를 수 있다. 가장 바람직한 구현예에서, 3' 오버행은 siRNA의 두 가닥 모두에 존재하고 2개의 뉴클레오티드로 이루어진다. 예를 들면, 본 발명의 siRNA의 각 가닥은 디티미딜릭산(dithymidylic acid, "TT") 또는 디우리디릴릭산

(diuridylic acid, "uu")의 3' 오버행을 포함할 수 있다.

- [0038] 본 발명의 siRNA의 안정성을 향상시키기 위해서, 3' 오버행은 분해에 대해 안정화될 수 있다. 일구현예에서, 오버행은 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오티드와 같은 퓨린(purine) 뉴클레오티드를 포함함으로써 안정화된다. 다른 방법으로서, 피리미딘(pyrimidine) 뉴클레오티드를 변형된 유사체로 치환하는 경우는 분해에 저항성을 가지면서 RNAi 분해의 효과에 영향을 끼치지 않고, 이러한 치환은 우리딘 뉴클레오티드를 2' -데옥시티미딘을 가지는 3' 오버행으로 치환하는 것을 예로 들 수 있다. 특히, 2' 히드록실을 가지지 않는 2' -데옥시티미딘은 조직 배양배지에서 3' 오버행의 뉴클레아제 저항성을 유의성있게 향상시킨다.
- [0039] 본 발명의 구현예에서, 본 발명의 siRNA는 AA(N19)TT 또는 NA(N21) 서열(N은 임의의 뉴클레오티드)을 포함한다. 이러한 siRNA는 약 30-70% GC, 바람직하게는 약 50% G/C 함량을 가진다. siRNA의 센스 가닥의 서열은 (N19)TT 또는 NA(N21) (즉, 3 내지 23번 위치)에 상응한다. 후자의 경우, 센스 siRNA 가닥의 3' 말단은 TT로 전환된다. 이러한 서열 전환은 이론적으로 센스 및 안티센스 가닥의 3' 오버행의 서열조성 측면에서 대칭적인 듀플렉스(duplex)를 생성한다. 안티센스 RNA 가닥은 센스 가닥의 1 내지 21 위치에 대한 보완물로서 합성된다. 이러한 구현예에서, 23-nt 센스 가닥의 1번 위치는 안티센스 가닥에 의해서 서열-특이적인 방식으로 인식되지 않기 때문에, 안티센스 가닥의 3' 말단의 대부분의 뉴클레오티드 잔기는 신중하게 선택될 수 있다. 그러나, 안티센스 가닥의 두 번째 뉴클레오티드(임의의 구현예에서 23-nt 센스 가닥의 2번 위치)는 일반적으로 표적서열에 상보적이다.
- [0040] 다른 구현예에서, 본 발명의 siRNA는 NAR(N17)YNN 서열을 포함하고, 여기서 R은 퓨린(예, A 또는 G)이고, Y는 피리미딘(예, C 또는 U/T)이다. 따라서, 이 구현예의 21-nt 센스 및 안티센스 RNA 가닥은 일반적으로 퓨린 뉴클레오티드로 시작된다. 최초로 전사되는 뉴클레오티드가 퓨린일 경우 pol III 프로모터로부터의 RNA 발현은 효과적인 것으로 여겨지기 때문에, 이러한 siRNA는 표적부위에서 변화없이 pol III 발현벡터로부터 발현될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 siRNA는 표적 mRNA 서열("표적서열")의 임의의 부위에서 인접한 약 19개-25개의 뉴클레오티드에 표적화될 수 있다. siRNA의 표적서열을 선택할 수 있는 기술은 예를 들면 문헌 [Tuschl T 등, "The siRNA User Guide" revised Oct. 11, 2002]에 기술되어 있고, 이 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 상기 문헌 "The siRNA User Guide"는 토마스(Thomas Tuschl) 박사(Department of Cellular Biochemistry, AG 105, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, 37077 Göttingen, 독일)가 관리하는 웹사이트에서 이용가능하고, Max Planck Institute의 웹사이트에 접속하여 "siRNA" 키워드로 검색하여 찾을 수 있다. 따라서, 본 발명의 siRNA의 센스 가닥은 표적 mRNA에서 인접된 약 19개 내지 약 25개의 뉴클레오티드에 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0042] 일반적으로, 표적 mRNA 상의 표적서열은 표적 mRNA에 상응하는 cDNA 서열로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 개시코돈으로부터 50 내지 100개의 뉴클레오티드 아래(즉, 3' 방향)에서 시작하는 서열이다. 그러나, 표적서열은 5' 또는 3' 비번역 영역, 또는 시작코돈에 인접한 영역(예, VEGF₁₂₁ cDNA의 5'-말단의 100개의 뉴클레오티드 내에 위치하는 하기 표 1의 서열번호 73 및 74의 표적서열)에 위치할 수 있다.
- [0043] 예를 들면, VEGF₁₂₁ cDNA에서 적절한 표적서열은 하기와 같다.
- [0044] TCATCACGAAGTGGTGAAG (서열번호 8)
- [0045] 따라서, 이러한 서열을 표적화하고 각 가닥에 3' uu 오버행을 가지는 본 발명의 siRNA는 하기와 같다 (오버행은 고딕체로 나타냄).
- [0046] 5' - ucaucacgaaguggugaaguu-3' (서열번호 9)
- [0047] 3' -uuaguagugcuuccaccacuuc-5' (서열번호 10)
- [0048] 상기 서열을 표적화하고 각 가닥에 3' tt 오버행을 가지는 본 발명의 siRNA는 하기와 같다 (오버행은 고딕체로 나타냄).
- [0049] 5' -ucaucacgaaguggugaagTT-3' (서열번호 11)
- [0050] 3' -TTaguagugcuuccaccacuuc-5' (서열번호 12)
- [0051] 본 발명의 siRNA의 서열의 기원이 될 수 있는 다른 VEGF₁₂₁ 표적서열은 표 1에 기재되어 있다. 표 1에 기재되어 있는 모든 VEGF₁₂₁ 표적서열은 모든 인간 VEGF의 선택적으로 스프라이싱된 형태에 공통적으로 존재하는 VEGF₁₂₁의

선택적으로 스프라이싱된 형태의 일부영역 내에 존재한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 표 1의 VEGF₁₂₁ 표적서열은 또한 VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ 및 VEGF₂₀₆ mRNA를 표적화할 수 있다. 또한, 특정 VEGF 이성체를 표적화하는 표적서열은 용이하게 동정될 수 있다. 예를 들면, VEGF₁₆₅ mRNA를 표적화하지만 VEGF₁₂₁ mRNA는 표적화하지 않는 표적서열은 AACGTACTTGCGAGATGTGACA (서열번호 13)이다. 인간 Flt-1에 대한 예시적 표적서열은 서열번호 91 내지 504로 표시되고, 인간 Flk-1/KDR에 대한 예시적 표적서열은 서열번호 505 내지 864로 표시된다.

[0052] [표 1]

VEGF 표적서열

표적서열	서열번호	표적서열	서열번호
GTTTCATGGATGCTCTATCAG	14	TCCCTGTGGGCCCTTGCTCA	30
TCGAGACCCTGGTGGACAT	15	GCATTTGTTTGTACAAGAT	31
TGACGAGGGCCTGGAGTGT	16	GATCCGCAGACGTGTAAT	32
TGACGAGGGCCTGGAGTGT	17	ATGTTCCCTGCAAAAACACA	33
CATCACCATGCAGATTATG	18	TGTTCCCTGCAAAAACACAG	34
ACCTCACCAGGCCAGCAC	19	AAACACAGACTCGCGTTGC	35
GGCCAGCACATAGGAGAGA	20	AACACAGACTCGCGTTGCA	36
CAAAATGTGAATGCAGACCA	21	ACACAGACTCGCGTTGCAA	37
ATGTGAATGCAGACCAAAG	22	CACAGACTCGCGTTGCAAG	38
TGCAGACCAAGAAAAGATA	23	GGCGAGGCAGCTTGAGTA	39
AGAAAAGATAGAGCAAGACA	24	ACGAACGTAAGTGCAGATG	40
GAAAGATAGAGCAAGACAA	25	CGAACGTAAGTGCAGATGT	41
GATAGAGCAAGACAAA	26	CGTAAGTGCAGATGTGACA	42
GACAAGAAAATCCCTGTGG	27	GTGGTCCCAGGCTGCACCC	43
GAAAATCCCTGTGGGCCTT	28	GGAGGAGGGCAGAATCATC	44
AATCCCTGTGGGCCTTGCT	29	GTGGTGAAGTTCATGGATG	45

[0053]

[0054] [표 1-연속]

VEGF 표적서열

표적서열	서열번호	표적서열	서열번호
AATCATCAGGAAGTGGTGAAG	46	AAGCATTGTTTGTACAAGATCC	62
AAGTTCATGGATGCTCTATCAG	47	AAGATCCGCAGACGTGTAATGT	63
AATCGAGACCCTGGTGGACAT	48	AAATGTTCCCTGCAAAAACACAGA	64
AATGACGAGGGCCTGGAGTGT	49	AATGTTCCCTGCAAAAACACAGAC	65
AACATCACCATGCAGATTATG	50	AAAAACACAGACTCGCGTTGCAA	66
AAACCTCACCAGGCCAGCAC	51	AAAACACAGACTCGCGTTGCAAG	67
AAGGCCAGCACATAGGAGAGA	52	AAACACAGACTCGCGTTGCAAGG	68
AACAAATGTGAATGCAGACCA	53	AACACAGACTCGCGTTGCAAGGC	69
AAATGTGAATGCAGACCAAAG	54	AAGGCGAGGCAGCTTGAGTAAA	70
AATGCAGACCAAGAAAAGATA	55	AAACGAACGTAAGTGCAGATGTG	71
AAAGAAAAGATAGAGCAAGACA	56	AACGAACGTAAGTGCAGATGTGA	72
AAGAAAAGATAGAGCAAGACAA	57	AAGTGGTCCCAGGCTGCACCCAT	73
AAGATAGAGCAAGACAAGAAAAT	58	AAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC	74
AAGACAAGAAAATCCCTGTGGC	59	AAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC	75
AAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGC	60	AAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCA	76
AATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGA	61	GGCAGAATCATCACGAAGTGG	81

[0055]

[0056] [표 1-연속]

VEGF 표적서열

표적서열	서열번호	표적서열	서열번호
CCTGGTGGACATCTCCAGGA	82	CACACACTCGCGTTGCAAGGC	87
GAGATCGAGTACATCTCAAG	83	TCACCATGCAGATTATCGGA	88
TGGAGTGTGTGCCACTGAGG	84	TAGAGCAAGACAAGAAAATCC	89
GAGCTTCTACAGCACAA	85	CCGCAGACGTGTAATGTTC	90
TTGCTCAGAGCGGAGAAAGCA	86		

[0057]

[0058] 본 발명의 siRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 알려진 많은 기술을 이용하여 획득

될 수 있다. 예를 들면, siRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 알려진 방법을 이용하여 화학적으로 합성되거나 재조합 방법에 의해서 생산될 수 있다. 예를 들면, Tuschl 등의 미국특허 출원공고 제 2002/0086356호에 기술된 바와 같은 초파리 체외 시스템을 이용할 수 있다 (상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재함).

- [0059] 바람직하게는, 본 발명의 siRNA는 적절히 보호된 리보뉴클레오사이드 포스포라미데이트(ribonucleoside phosphoramidites)와 종래의 DNA/RNA 합성기를 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. siRNA는 상보적이고 분리된 두 개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 합성될 수 있다. 합성 RNA 분자 또는 합성 시약을 상업적으로 제공하는 회사는 Proligo(Hamburg, 독일), Dharmacon Research(Lafayette사, 미국), Pierce Chemical (part of Perbio Science, Rockford, IL, 미국), Glen Research(Sterling, VA, 미국), ChemGenes(Ashland, MA, 미국) 및 Cruachem(Glasgow, 영국)을 포함한다.
- [0060] 다른 방법으로서, siRNA는 또한 적절한 프로모터를 이용하여 재조합 원형 또는 선형 DNA 플라스미드로부터 발현될 수 있다. 플라스미드로부터 본 발명의 siRNA를 발현시키는 데 적절한 프로모터는 예를 들면 U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 거대세포바이러스 프로모터를 포함한다. 또한, 본 발명의 재조합 플라스미드는 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서 siRNA를 발현시키기 위해서 유도성 또는 조절가능한 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0061] 재조합 플라스미드로부터 발현되는 siRNA는 표준기술을 이용하여 배양세포 발현 시스템으로부터 분리되거나, 생체내 혈관신생 영역 또는 이와 인접한 장소에서 세포 내에서 발현될 수 있다. 본 발명의 siRNA를 생체내 세포로 전달하기 위한 재조합 플라스미드의 사용은 하기에서 상세히 설명될 것이다.
- [0062] 본 발명의 siRNA는 재조합 플라스미드로부터 상보적이고 분리된 두 개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 발현될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 siRNA를 발현시키는 데 적절한 플라스미드의 선택, siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 플라스미드 내로 삽입하는 방법, 및 재조합 플라스미드를 목적하는 세포로 전달하는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다. 예를 들면, 문헌 [Tuschl, T. (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20: 446-448]; [Brummelkamp TR 등 (2002), *Science* 296: 550- 553]; [Miyagishi M 등 (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 497-500]; [Paddison PJ 등 (2002), *Genes Dev.* 16: 948-958; Lee NS 등 (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 500-505]; 및 [Paul CP 등 (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 505-508]을 참고하면 되고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다.
- [0064] 본 발명의 siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 포함하는 플라스미드는 하기 실시예 7에 기술되어 있다. 이 플라스미드는 pAAVsiRNA로 명명되었으며, 인간 U6 RNA 프로모터의 조절 하에 polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된 센스 RNA 가닥 코딩 서열, 및 인간 U6 RNA 프로모터의 조절 하에 polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된 안티센스 RNA 가닥 코딩 서열을 포함한다. pAAVsiRNA 플라스미드는 궁극적으로 본 발명의 siRNA를 발현시키기 위한 상기 핵산서열을 포함하는 재조합 아데노연관바이러스 벡터를 생산하는 데 사용된다.
- [0065] 본 발명에서 사용된 용어 "polyT 종결 서열에 작동가능하게 연결된"은 센스 또는 안티센스 가닥을 암호화하는 핵산서열이 5' 방향에서 polyT 종결 신호에 바로 인접되어 있는 것을 의미한다. 센스 또는 안티센스 서열이 플라스미드로부터 전사되는 동안 polyT 종결 신호는 전사를 종결시키는 기능을 수행한다.
- [0066] 본 발명에서 사용된 용어 프로모터의 "조절 하에"는 센스 또는 안티센스 가닥을 암호화하는 핵산서열이 프로모터의 3' 쪽에 위치하여 프로모터가 센스 또는 안티센스 코딩 서열의 전사를 개시하도록 하는 것을 의미한다.
- [0067] 또한, 본 발명의 siRNA는 생체내 혈관신생 영역 또는 이와 인접한 장소에서 세포 내에서 재조합 바이러스 벡터로부터 발현될 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 siRNA를 암호화하는 서열 및 siRNA 서열을 발현시키는 데 적절한 프로모터를 포함한다. 적절한 프로모터의 예는 U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 거대세포 바이러스 프로모터를 포함한다. 다른 적절한 프로모터의 선택은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다. 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서 siRNA를 발현시키기 위해서 유도성 또는 조절가능한 프로모터를 포함할 수 있다. 본 발명의 siRNA를 생체내 세포로 전달하기 위한 재조합 바이러스 벡터의 사용은 하기에서 상세히 설명될 것이다.
- [0068] 본 발명의 siRNA는 재조합 바이러스 벡터로부터 상보적이고 분리된 두 개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 발현될 수 있다.
- [0069] 발현될 siRNA 분자(들)에 대한 코딩 서열을 수용할 수 있는 바이러스 벡터의 예는 다음과 같은 바이러스로부터 유래한 벡터를 포함한다: 아데노바이러스(adenovirus(AV)); 아데노연관바이러스(adeno-associated virus (AAV));

레트로바이러스(예, 렌티바이러스(lentivirus(LV)), 하브도바이러스 (rhabdovirus), 마우스 백혈병 바이러스 (murine leukemia virus)); 헤르페스 바이러스(herpes virus) 등. 바이러스 벡터의 방향성(tropism)은 다른 바이러스의 외피(envelope) 단백질 또는 다른 표면 단백질로 벡터를 슈도타이핑(pseudotyping)함으로써 변형될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 AAV 벡터는 수포성구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus(VSV))의 표면 단백질로 슈도타이핑될 수 있다.

- [0070] 본 발명에서 유용한 재조합 바이러스 벡터의 선택, siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 벡터 내로 삽입하는 방법, 및 바이러스 벡터를 목적하는 세포로 전달하는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다. 예를 들면, 문헌 [Dornburg R (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis MA (1988), *Biotechniques* 6: 608-614]; [Miller AD (1990), *Hum Gene Therap.* 1: 5-14]; 및 [Anderson WF (1998), *Nature* 392: 25-30]을 참고하면 되고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다.
- [0071] 바람직한 바이러스 벡터는 AV 및 AAV로부터 유래한 벡터이다. 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 siRNA는 예를 들면 U6 또는 H1 RNA 프로모터 또는 거대세포바이러스(cytomegalovirus(CMV)) 프로모터를 포함하는 재조합 AAV 벡터로부터 상보적이고 분리된 두 개의 RNA 분자로서 발현된다.
- [0072] 본 발명의 siRNA를 발현시키기 위한 적절한 AV 벡터, 재조합 AV 벡터의 제조방법, 및 이러한 벡터의 표적세포로의 전달방법은 문헌 [Xia H 등 (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010]에 기술되어 있다.
- [0073] 본 발명의 siRNA를 발현시키기 위한 적절한 AAV 벡터, 재조합 AAV 벡터의 제조방법, 및 이러한 벡터의 표적세포로의 전달방법은 다음과 같은 문헌에 기술되어 있고: Samulski R 등 (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher KJ 등 (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski R 등 (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; 미국특허 제 5,252,479호; 미국특허 제 5,139,941호; 국제특허 출원번호 제 W094/13788호; 및 국제특허 출원번호 제 W093/24641호, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 본 발명의 재조합 AAV 벡터를 생성하는 예시적 방법은 하기 실시예 7에 기술되어 있다.
- [0074] 임의의 표적서열을 포함하는 siRNA의 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해를 유발할 수 있는 능력은 세포내 RNA 또는 단백질 농도를 측정할 수 있는 표준 기술을 이용하여 평가할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 siRNA는 배양된 세포 내로 전달될 수 있고, 표적 mRNA의 농도는 노던 블랏 또는 도트 블랏팅(dot blotting) 기술 또는 정량적 RT-PCR를 이용하여 측정될 수 있다. 다른 방법으로서, 배양된 세포에서 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 수용체 단백질의 농도를 ELISA 또는 웨스턴 블랏을 통해서 측정할 수 있다. 본 발명의 siRNA가 표적 mRNA에 미치는 효과를 평가하기 위한 적절한 세포배양 시스템은 하기 실시예 1에 기술되어 있다.
- [0075] 또한, 임의의 표적서열을 포함하는 siRNA에 의한 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해는 ROP 또는 CNV 마우스 모델과 같은 혈관신생 동물모델을 이용하여 평가될 수 있다. 예를 들면, ROP 또는 CNV 마우스에서 혈관신생이 일어난 영역을 siRNA의 투여 전후에 측정할 수 있다. 이러한 동물모델에서 siRNA 투여시 혈관신생 영역이 감소하는 결과는 표적 mRNA의 발현이 억제되는 것을 암시한다 (하기 실시예 6 참고).
- [0076] 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 siRNA는 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR mRNA, 또는 이의 선택적으로 스플라이싱된 형태, 돌연변이체 또는 동족체를 표적화하여 이들의 RNAi-매개 분해를 유발한다. 본 발명의 siRNA에 의한 표적 mRNA의 분해는 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자로부터 기능성 유전자 산물의 생성을 감소시킨다. 따라서, 본 발명은 대상자에게 본 발명의 siRNA를 유효량으로 투여하여 표적 mRNA를 분해하는 것을 포함하는, 대상자에서 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 신생혈관형성을 개시하고 유지하기 위해서는 VEGF, Flt-1 또는 Flk-1/KDR 유전자의 산물이 요구되므로, 본 발명은 또한 본 발명의 siRNA를 이용하여 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해를 유발함으로써 대상자에서 신생혈관형성을 저해하는 방법을 제공한다.
- [0077] 본 발명에서 사용된 용어 "대상자(subject)"는 인간 또는 인간을 제외한 동물을 포함한다. 바람직하게는, 대상자는 인간이다.
- [0078] 본 발명에서 사용된 용어 siRNA의 "유효량"은 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해를 유발하기에 충분한 양, 또는 대상자에서 신생혈관형성이 진행되는 것을 저해하기에 충분한 양을 의미한다.
- [0079] 표적 mRNA의 RNAi-매개 분해는 상기에서 기술한 바와 같은 mRNA 또는 단백질을 분리하고 정량화 할 수 있는 표준 기술을 이용하여 대상자의 세포에서 표적 mRNA 또는 단백질의 농도를 측정함으로써 평가될 수 있다.
- [0080] 신생혈관형성의 저해는 대상자에서 병리적(pathogenic) 또는 비병리적(non-pathogenic) 신생혈관형성이 진행되는지를 직접 측정함으로써, 예를 들면, 본 발명의 siRNA의 처리 전후에 혈관신생 영역의 크기를 측정함으로써

평가될 수 있다. 혈관신생 영역의 크기가 변함이 없거나 감소되는 결과는 신생혈관형성이 저해되었다는 것을 암시한다. 대상자에서 혈관신생 영역의 크기를 관찰하고 측정할 수 있는 기술은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있으며, 예를 들면, 맥락막에서의 혈관신생 영역을 검안경검사(ophthalmoscopy)를 통해서 관찰할 수 있다.

[0081] 또한, 신생혈관형성과 관련된 병리적 상태의 변화 또는 반전을 관찰함으로써 신생혈관형성의 저해가 일어난 것으로 추정할 수 있다. 예를 들면, ARMD에서, 시력상실이 느린 속도로 일어나거나 멈추거나, 시력이 좋아지는 경우는 맥락막에서 신생혈관형성이 저해됨을 의미한다. 종양의 경우, 종양생장이 느린 속도로 일어나거나 멈추거나 종양크기가 감소하거나, 종양전이가 느린 속도로 일어나거나 멈추는 경우는 종양부위 또는 이와 인접한 부위에서 신생혈관형성이 저해됨을 암시한다. 또한, 비병리적 신생혈관형성의 저해는 예를 들면 본 발명의 siRNA를 투여하였을 경우 지방손실이 발생하거나 콜레스테롤 수치가 감소하는 현상으로 추정할 수 있다.

[0082] 본 발명의 siRNA는 아화학양론적 양으로 표적 mRNA를 분해(신생혈관형성의 저해를 유발)할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 특정 이론과 결부되는 것을 원치 않으나, 본 발명의 siRNA는 촉매적 방식으로 표적 mRNA의 분해를 유발하는 것으로 여겨진다. 따라서, 표준 항-신생혈관형성 제제와 비교하였을 경우, siRNA는 유의성있는 더 작은 양으로도 혈관신생 부위 또는 이와 인접한 부위에 전달되어 치료적 효과를 나타낸다.

[0083] 당업자는 임의의 대상자에게 투여될 본 발명의 siRNA의 유효량을 대상자의 크기 및 몸무게; 혈관신생 또는 질병의 진행 정도; 대상자의 나이, 건강상태 및 성별; 투여경로; 및 국부 또는 전신 투여와 같은 인자를 고려하면서 용이하게 결정할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 siRNA의 유효량은 혈관신생 부위 또는 이와 인접한 부위에서 약 1 nM 내지 약 100 nM, 바람직하게는 약 2 nM 내지 약 50 nM, 더욱 바람직하게는 약 2.5 nM 내지 약 10 nM의 세포간(intercellular) 농도를 포함한다. 심사숙고하여 siRNA는 상기 농도보다 높은 또는 낮은 양으로 투여될 수 있다.

[0084] 본 발명의 방법은 비병리적(non-pathogenic) 신생혈관형성, 즉 대상자에서 정상적인 과정에 의한 신생혈관형성을 저해하기 위한 목적으로 사용될 수 있다. 비병리적 신생혈관형성의 예는 자궁내막에서의 혈관신생 및 지방세포 또는 콜레스테롤의 생성과 관련된 과정을 포함한다. 따라서, 본 발명은 예를 들면 몸무게를 조절하거나 지방손실을 촉진시키거나, 콜레스테롤 수치를 감소시키거나, 낙태를 유발하기 위해서, 비병리적 신생혈관형성을 저해하는 방법을 제공한다.

[0085] 또한, 본 발명의 방법은 신생혈관형성 질환, 즉 적절치 않은 또는 조절되지 않은 신생혈관형성과 관련된 병리적 질환과 관련된 신생혈관형성을 저해할 수 있다. 예를 들면, 대부분의 악성 고형종양은 종양부위 또는 종양 주변에서 신생혈관형성을 유도함으로써 혈액을 원활하게 공급한다. 이러한 종양에 의해서 유도된 신생혈관형성은 종양생장에 필요한 경우가 많고, 이는 또한 전이성 세포가 혈류를 통해서 전이되도록 한다.

[0086] 다른 신생혈관형성 질환은 당뇨병성 망막병증, 노인성 황반변성("ARMD"), 건선, 류마티스 관절염 및 기타 염증성 질환을 포함한다. 이러한 질환에서 정상조직은 혈관신생 영역에서 새로 형성된 혈관에 의해서 파괴되어 있다. 예를 들면, ARMD에서, 모세혈관이 맥락막에 침범하여 맥락막이 파괴되어 있다. ARMD에서 신생혈관형성에 의한 맥락막의 파괴는 최종적으로 부분적 또는 완전한 실명을 초래한다.

[0087] 바람직하게는, 본 발명의 siRNA는 암과 관련된 고형종양의 성장 또는 전이를 억제하기 위해서 사용된다. 이러한 암의 예는 유방암, 폐암, 두경부암, 뇌암, 복부암(abdominal cancer), 결장암, 결장직장암, 식도암, 위장암, 신경교종(glioma), 간암, 설암, 신경아세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막아세포종, 빌립스 종양(Wilm's tumor), 다발성 골수종, 피부암(예, 흑색종), 림프종 및 혈액암을 포함한다.

[0088] 더욱 바람직하게는, 본 발명의 siRNA는 노인성 황반변성에서 맥락막에서의 신생혈관형성을 저해하기 위해서 사용된다.

[0089] 신생혈관형성 질환을 치료하기 위해서, 본 발명의 siRNA는 본 발명의 siRNA와는 다른 약제학적 제제와 조합으로 대상자에게 투여될 수 있다. 다른 방법으로서, 본 발명의 siRNA는 신생혈관형성 질환을 치료하기 위한 다른 치료요법과 병행하면서 대상자에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 siRNA는 암을 치료하거나 종양전이를 예방하기 위한 목적으로 현재 사용되고 있는 치료요법(예, 방사선 치료요법, 화학요법 및 수술)과 병행하여 투여될 수 있다. 종양을 치료하기 위해서, 본 발명의 siRNA는 방사선 치료요법과 병행하여, 또는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 아드리아미신(adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin) 또는 타모시펜(tamoxifen)과 같은 화학요법제와 조합으로 대상자에게 투여되는 것이 바람직하다.

- [0090] 본 발명의 방법에서, 본 발명의 siRNA는 전달시약과 조합으로 네이키드(naked) siRNA로서, 또는 siRNA를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터로서 대상자에게 투여될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 siRNA와 조합으로 투여될 수 있는 적절한 전달시약은 Mirus Transit TKO 지질친화성 시약; 리포펙틴; 리포펙타민; 셀펙틴(cellfectin); 및 고분자양이온(예, 폴리리신) 또는 리포솜을 포함한다. 바람직한 전달시약은 리포솜이다.
- [0092] 리포솜은 망막 또는 종양 조직과 같은 특정 조직으로의 siRNA의 전달을 도울 수 있고, 또한 siRNA의 혈중 반감기를 증가시킬 수 있다. 본 발명에서 유용한 리포솜은 표준 베지클(vesicle)-형성 지질을 이용하여 형성되는데, 베지클-형성 지질은 일반적으로 중성 또는 음전하를 띠는 인지질과 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함한다. 지질은 일반적으로 목적하는 리포솜 크기와 리포솜의 혈중 반감기와 같은 인자를 고려하면서 선택된다. 리포솜을 제조할 수 있는 다양한 방법이 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌 [Szoka 등 (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467]; 및 미국특허 제 4,235,871호, 제 4,501,728호, 제 4,837,028호 및 제 5,019,369호에서 기술된 바와 같이 제조할 수 있고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다.
- [0093] 바람직하게는, 본 발명의 siRNA를 캡슐화하는 리포솜은 혈관신생 부위 또는 이와 인접한 부위에 있는 특정 세포 또는 조직으로 리포솜을 표적화할 수 있는 리간드 분자를 포함한다. 종양 또는 혈관내피세포에 많이 존재하는 수용체에 결합하는 리간드가 바람직하고, 종양 항원 또는 혈관내피세포 표면항원에 결합하는 단일클론 항체를 예로 들 수 있다.
- [0094] 특히 바람직하게는, 단핵 대식세포와 망상내피계에 의해서 제거되는 것을 피하기 위해서, 본 발명의 siRNA를 캡슐화하는 리포솜은 변형되는 데, 예를 들면 리포솜의 표면에 식균작용증진(opsonization)-억제 잔기를 결합시킴으로써 이루어질 수 있다. 일구현예에서, 본 발명의 리포솜은 식균작용증진-억제 잔기 및 리간드를 모두 포함할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 리포솜의 제조에 사용될 수 있는 식균작용증진-억제 잔기는 일반적으로 친수성이 높은 중합체로서 이는 리포솜 막에 결합된다. 본 발명에서 사용된 용어, 식균작용증진-억제 잔기의 리포솜 막에의 "결합"은 상기 잔기가 리포솜 막에 화학적으로 또는 물리적으로 부착되는 것을 의미하고, 이러한 결합은 예를 들면 리포솜 막에 삽입된 지용성 앵커(anchor)를 매개로 하여, 막 지질의 활성화에 직접 결합함으로써 이루어질 수 있다. 이러한 식균작용증진을 억제하는 친수성 중합체는 표면 보호층을 형성하여 대식-단구계(macrophage-monocyte system("MMS"))와 망막내피계(reticuloendothelial system("RES"))가 리포솜을 포획하는 것을 유의성있게 감소시킨다. 이러한 작용은 예를 들면 미국특허 제 4,920,016호에 기술되어 있고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 따라서, 식균작용증진-억제 잔기를 가지는 변형된 리포솜은 변형되지 않은 리포솜보다 훨씬 더 오랫동안 혈류에 남아있게 된다. 이러한 이유로 인해서, 리포솜은 "스텔스(stealth)" 리포솜이라고 불리우기도 한다.
- [0096] 스텔스 리포솜은 다공성 또는 "누출성(leaky)" 미세혈관이 형성된 조직에 축적된다. 따라서, 고품 종양처럼 이러한 미세혈관 결합이 있는 표적 조직은 이러한 리포솜을 효과적으로 축적한다 (Gabizon 등 (1988), *P.N.A.S.*, USA, 18: 6949-53). 또한, RES에 의한 포획이 감소하여 간과 비장에서 유의성있는 축적이 방지됨으로써 스텔스 리포솜의 독성이 감소된다. 따라서, 식균작용증진-억제 잔기로 변형된 본 발명의 리포솜은 본 발명의 siRNA를 종양세포로 전달할 수 있다.
- [0097] 리포솜 변형에 적절한 식균작용증진-억제 잔기는 바람직하게는 약 500 내지 약 40,000 Da, 더욱 바람직하게는 약 2,000 내지 약 20,000 Da의 수평균분자량을 가지는 수용성 중합체이다. 이러한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 유도체(예, 메톡시 PEG 또는 PPG, PEG 또는 PPG 스테아레이트); 폴리아크릴아미드 또는 폴리 N-비닐 피롤리돈과 같은 합성 중합체; 선형, 분지형 또는 덴드리머형(dendrimeric) 폴리아미도아민; 폴리아크릴산; 폴리알콜(예, 카복실기 또는 아미노기와 화학적으로 결합된 폴리비닐알콜 및 폴리자일리톨); 및 강글리오시드(예, 강글리오시드 GM1)를 포함한다. 또한, 식균작용증진을 억제하는 중합체는 PEG의 블록 공중합체, 및 폴리아미노산, 폴리사카리드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌아민 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 식균작용증진을 억제하는 중합체는 또한 갈락투론산, 글루쿠론산, 만뉴론산, 알긴산, 가라기난과 같은 아미노산 또는 카복실산을 포함하는 중성 폴리사카리드; 아민화된 폴리사카리드 또는 올리고사카리드(선형 또는 분지형); 또는 카복실화된 폴리사카리드 또는 올리고사카리드(예를 들면 탄산 유도체와 반응을 통해서 카복실기를 가진다).
- [0098] 바람직하게는, 식균작용증진-억제 잔기는 PEG, PPG, 또는 이들의 유도체이다. PEG 또는 PPG-유도체로 변형된 리

리포솜은 "PEG화된(PEGylated) 리포솜"으로도 불리운다.

- [0099] 식균작용증진-억제 잔기는 본 발명이 속하는 분야에서 공지된 많은 기술 중 어느 하나를 이용하여 리포솜 막에 결합될 수 있다. 예를 들면, PEG의 N-히드록시석시미드 에스터는 포스파티딜-에탄올아민 지용성 앵커(anchor)에 결합된 후 리포솜 막에 결합될 수 있다. 이와 유사하게, 텍스트란 중합체는 Na(CN)BH₃와 용매 혼합물(예, 60°C에서 테트라히드로퓨란과 물을 30:12의 비율로 혼합)을 이용한 환원성 아민화 반응을 통해서 스테아릴아민 지용성 앵커로 유도체화될 수 있다.
- [0100] 본 발명의 siRNA를 발현하는 재조합 플라스미드는 상기에서 언급되었다. 이러한 재조합 플라스미드는 또한 직접 또는 적절한 전달시약과 조합으로 투여될 수 있다. 적절한 전달시약의 예는 Mirus Transit TK1 지질친화성 시약; 리포펙틴; 리포펙틴민; 셀펙틴(cellfectin); 및 고분자양이온(예, 폴리리신) 또는 리포솜을 포함한다. 또한, 본 발명의 siRNA를 발현하는 재조합 바이러스 벡터는 상기에서 언급되었고, 이러한 벡터를 환자의 혈관신생 장소에 전달하는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다.
- [0101] 본 발명의 siRNA는 siRNA를 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 장소에 있는 조직의 세포에 전달하기에 적절한 수단을 이용하여 대상자에게 투여될 수 있다. 예를 들면, siRNA는 유전자 총 또는 전기충격법에 의해서, 또는 기타 적절한 비경구적 또는 위장관(enteral) 투여경로를 통해서 투여될 수 있다.
- [0102] 적절한 위장관 투여경로는 경구, 직장, 또는 비내 전달을 포함한다.
- [0103] 적절한 비경구적 투여경로는 혈관내 투여(예, 정맥내 볼루스 주사, 정맥내 주입, 동맥내 볼루스 주사, 동맥내 주입, 맥관내로의 카테터 점적주입); 조직주변 또는 조직내 투여(예, 종양주변 및 종양내 주사, 망막내 주사 또는 망막하 주사); 피하 주입을 포함하는 피하 주사 또는 침착(deposition)(예를 들면 삼투압 펌프 이용); 혈관신생 장소 또는 이와 인접되어 있는 영역에 직접(예, 국부) 적용 (예를 들면 카테터 또는 다른 배치 장치(예, 각막 펠렛(corneal pellet) 또는 좌약, 안구내 점적장치, 다공성, 비다공성 또는 젤라틴 물질을 포함하는 임플란트)를 이용); 및 흡입을 포함한다. 적절한 배치 장치는 미국특허 제 5,902,598호 및 제 6,375,972호에 기술되어 있는 안구 임플란트, 및 미국특허 제 6,331,313호에 기술되어 있는 생분해성 안구 임플란트를 포함한다. 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 이러한 안구 임플란트는 Control Delivery Systems사(Watertown, MA) 및 Oculex Pharmaceuticals사(Sunnyvale, CA)로 부터 구매가능하다.
- [0104] 바람직한 구현예에서, siRNA의 주사 또는 주입은 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 부위에 적용된다. 더욱 바람직하게는, siRNA는 안구에 국부적으로 투여되고, 이때 액체 또는 겔 형태로 아래 눈꺼풀 또는 결막주머니로 투여될 수 있으며, 이러한 투여는 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에서 있다 (예, 문헌[Acheampong AA 등, 2002, *Drug Metabol. and Disposition* 30: 421-429] 참고, 이 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재됨).
- [0105] 일반적으로, 본 발명의 siRNA는 약 5 μ l 내지 약 75 μ l, 예를 들면 약 7 μ l 내지 약 50 μ l, 바람직하게는 약 10 μ l 내지 약 30 μ l의 양으로 안구에 국부적으로 투여된다. siRNA의 안구 내로의 국부 점적주입이 75 μ l 이상의 부피로 실시되면 일부를 흘리거나 안구 밖으로 흘러나와 안구에서 siRNA의 손실이 발생할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 따라서 siRNA를 고농도(예, 100-1000 nM)로 투여하고자 하는 경우 가능한 적은 부피로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0106] 특히 바람직한 비경구 투여경로는 안구내 투여이다. 본 발명의 siRNA의 안구내 투여는 투여경로가 siRNA가 안구내로 들어가는 것을 보장하는 경우 주사 또는 안구로의 직접(예, 국부적) 투여에 의해서 이루어 질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 적절한 안구내 투여경로는 상기에서 기술한 안구로의 국부 투여경로 뿐 만 아니라, 초차체내, 망막내, 망막하, 건주하(subtenon), 안와 주위 또는 안와후, 경각막(trans-conrneal) 및 경공막(trans-scleral) 투여를 포함한다. 이러한 안구내 투여경로는 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다 (예, 문헌 [Acheampong AA 등, 2002, *supra*]; [Bennett 등. (1996), *Hum. Gene Ther.* 7: 1763-1769]; 및 [Ambati J 등, 2002, *Progress in Retinal and Eye Res.* 21: 145-151]을 참고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재함).
- [0107] 본 발명의 siRNA는 단일 또는 다회 형태로 투여될 수 있다. 본 발명의 siRNA가 주입에 의해서 투여되는 경우, 주입은 단일 지속형 형태이거나, 다회 주입에 의해서 전달될 수 있다. 약제학적 제제의 조직 내로의 직접 주사는 선호되는 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 부위에서 실시된다. 특히 바람직하게는, 제제는 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 부위에 있는 조직내로 다회 주사된다.
- [0108] 또한, 당업자는 본 발명의 siRNA를 임의의 대상자에게 투여하기 위해서 적당한 투여계획을 선택할 수 있다. 예

를 들면, 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 부위에 단일 주사 또는 점적을 통해서 siRNA는 대상자에게 일회 투여될 수 있다. 또한, siRNA는 매일 또는 매주 다회 대상자에게 일회 투여될 수 있다. 예를 들면, siRNA는 약 3주 내지 약 28주 동안, 더욱 바람직하게는 약 7주 내지 약 10주 동안 주 일회 대상자에게 일회 투여될 수 있다. 바람직한 투여계획은 siRNA를 혈관신생 장소 또는 이와 인접한 부위에 7주 동안 주 일회 주사(예, 초자체내 주사)하는 것이다. ARMD 또는 당뇨병성 망막병증과 같은 만성 혈관신생 질환으로 고통받는 환자의 경우 본 발명의 siRNA는 특별히 기간을 정하지 않고 정기적으로 투여될 필요가 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0109] 투여계획이 다회 투여를 포함하는 경우, 대상자에게 투여된 siRNA의 유효량은 투여계획의 전체기간 동안에 투여된 siRNA의 총량을 포함할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0110] 본 발명의 siRNA는 대상자에게 투여되기 전에 본 발명이 속하는 기술분야에서 공지된 기술을 이용하여 약제학적 조성물로 제형화되는 것이 바람직하다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적어도 멸균되고 발열물질이 제외된 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 사용된 용어 "약제학적 제형"은 인간 및 수의사가 사용할 수 있는 제형을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물을 제조할 수 있는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다. 예를 들면, 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Science*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)]에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 이 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다.

[0111] 본 발명의 약제학적 제형은 본 발명의 siRNA(예, 0.1 내지 90 중량%), 또는 생리적으로 허용가능한 담체 매질과 혼합된 이의 생리적으로 허용가능한 염을 포함한다. 바람직한 생리적으로 허용가능한 담체 매질로서 물, 완충된 물, 생리식염수(예, 통상적인 식염수 또는 Hank's 또는 Earle's balanced salt solution과 같은 균형 잡힌(balanced) 식염수), 0.4% 생리식염수, 0.3% 글리신, 히아루론산 등이 있다.

[0112] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 종래의 약제학적 부형제 및/또는 첨가제를 포함할 수 있다. 적절한 약제학적 부형제는 안정화제, 항산화제, 삼투압 조절제, 완충제, pH 조절제를 포함한다. 적절한 첨가제는 생체적합성 생리적 완충제(예, 트로메타민 히드로클로리드), 킬레이트제(예, DTPA 또는 DTPA-비스아미드) 또는 칼슘 킬레이트 착물(예, 칼슘 DTPA, CaNaDTPA-비스아미드), 또는 필요하다면 칼슘 또는 나트륨 염(예, 염화칼슘, 아스코르빈산칼슘, 글루콘산칼슘 또는 젯산칼슘). 본 발명의 약제학적 조성물은 액체 형태로 사용될 수 있도록 포장되거나, 동결건조될 수 있다.

[0113] 안구로 국부투여되는 경우, 종래의 안구내 전달시약을 이용할 수 있다. 예를 들면, 국부 안구내 전달을 위해서 본 발명의 약제학적 조성물은 상기에 기술한 바와 같은 생리식염수, 각막 투과 증진제, 불용성 입자, 페트롤레이텀 또는 다른 겔-기재 연고, 안구내 점적시 점성이 증가하는 중합체, 또는 점액부착성 중합체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 안구내 전달 시약은 각막 투과를 증가시키거나, 점성효과에 의해서 또는 각막 상피를 덮는 뮤신층과 물리화학적으로 상호작용함으로써 siRNA의 안구내 체류를 연장시킨다.

[0114] 국부 안구내 전달에 적절한 불용성 입자는 Bell 등의 미국특허 제 6,355,271호에 기술되어 있는 인산칼슘 입자를 포함한다. 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 안구내 점적시 점성이 증가하는 적절한 중합체는 폴록사머(poloxamer) 407과 같은 폴리에틸렌폴리옥시프로필렌 블록 공중합체(예, 25% 농도로), 셀룰로오스 아세토프탈레이트(예, 30% 농도로), 또는 Gelrite[®]과 같은 저(low)-아세틸 겔란 검(CP Kelco(Wilmington, DE)로부터 구매가능)을 포함한다. 적절한 점액부착성 중합체는 카르복실, 히드록실, 아미드 및/또는 설페이트 그룹과 같은 다수의 친수성 기능을 가지는 히드로콜로이드를 포함한다. 히드로콜로이드의 예는 히드록시프로필셀룰로오스, 폴리아크릴산, 고분자량 폴리에틸렌 글리콜(예, 200,000 이상의 수평균분자량), 텍스트란, 히아루론산, 폴리갈락투론산, 및 자이론칸(xylocan)을 포함한다. 적절한 각막 투과 증진제는 시클로덱스트린, 염화벤잘코늄, 폴리옥시에틸렌 글리콜 라우릴 에테르(예, Brij[®] 35), 폴리옥시에틸렌 글리콜 스테아릴 에테르(예, Brij[®] 78), 폴리옥시에틸렌 글리콜 올레일 에테르(예, Brij[®] 98), 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA), 디기토닌(digitonin), 소듐 타우로콜레이트, 사포닌, 및 Cremaphor EL과 같은 폴리옥시에틸화된 피마자유를 포함한다.

[0115] 고형 조성물을 제조하기 위해서 종래의 비독성 고형 담체를 사용할 수 있다. 이러한 담체의 예는 약제학적 급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 탈쿰(talcum), 셀룰로오스, 포도당, 자당, 탄산마그네슘 등을 포함한다.

[0116] 예를 들면, 경구투여를 위한 고형 약제학적 조성물은 상기에서 언급한 담체와 부형제 및 10-95%, 바람직하게는 25-75%의 한 개 이상의 본 발명의 siRNA를 포함할 수 있다. 에어로졸(흡입) 투여를 위한 약제학적 조성물은

0.01-20 중량%, 바람직하게는 1-10 중량%의, 상기에서 기술한 바와 같은 리포솜에 캡슐화되어 있는 한 개 이상의 본 발명의 siRNA, 및 추진제를 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우 비내 전달을 위해서 레시틴과 같은 담체를 포함할 수 있다.

[0117] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다. 실시예 4-6 및 8-9의 동물실험은 펜실베이니아 대학에서 제공하는 실험동물의 사용시 주의사항과 사용방법에 대한 지침서를 참고하면서 실시되었다. 실시예 10의 동물실험은 Sierra Biomedical사(587 Dunn Circle, Sparks, NV, 89431)에서 제공하는 표준 조작 절차에 따라서 실시된다.

[0118] 실시예

[0119] **실시예 1: siRNA 형질감염 및 체외 저산소증 유도**

[0120] siRNA 제조 - 인간 VEGF mRNA의 5' 말단으로부터 329 nt 위치에 있는 19-nt 서열을 표적서열로서 선택하였다: AAACCTCACCAAGGCCAGCAC (서열번호 51). 상기 표적서열이 다른 유전자로부터 유래한 mRNA에 존재하지 않는다는 것을 조사하기 위하여, 상기 표적서열을 NCBI가 제공하는 BLAST 검색엔진을 이용하여 검색하였다. BLAST 알고리즘의 사용은 문헌 [Altschul 등 (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403- 410] 및 [Altschul 등 (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402]에 기술되어 있고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 상기 표적서열은 어떤 다른 mRNA에 존재하지 않는다는 것을 확인한 후, 이 서열을 표적화하기 위해 siRNA 듀플렉스 (duplex)를 합성하였다 (Dharmacon Research, Inc., Lafayette, CO).

[0121] siRNA 듀플렉스는 다음과 같은 센스 및 안티센스 가닥으로 구성된다.

[0122] *센스:

[0123] 5' -accucaccaaggccagcacTT-3' (서열번호 77)

[0124] 안티센스:

[0125] 5' -gugcuggccuuggugagguTT-3' (서열번호 78)

[0126] a nonspecific control: GGCTACGTCCAGCGCACC (SEQ ID NO: 79)

[0127] siRNA 센스 및 안티센스 가닥은 각 가닥에 3' TT 오버행(고덕체로 나타냄)을 가지는 19-nt 이중쇄 siRNA를 형성한다. 이러한 siRNA는 "후보(Candidate) 5 또는 Cand5"로 명명하였다. 인간 VEGF mRNA를 표적화하는 다른 siRNA를 제조하여 Cand5의 경우와 동일한 방법으로 조사하였다.

[0128] 녹색형광 단백질(GFP) mRNA에 있는 다음과 같은 서열을 표적화하는 siRNA는 비특이적 대조군으로 사용하였다: GGCTACGTCCAGCGCACC (서열번호 79). 이러한 siRNA는 Dharmacon(Lafayette, CO)로부터 구매하였다.

[0129] siRNA 형질감염 및 체외 저산소증 유도 - 인간세포주(293, HeLa 및 ARPE19)를 형질감염 하루 전에 각각 250 μ l의 DMEM 완전 배지를 포함하는 24-웰 플레이트에 분주하고, 형질감염시 50% 정도까지 증식하도록 배양하였다. 세포를 2.5 nM의 Cand5 siRNA로 형질감염시켰다. 또한, 대조군으로서 siRNA으로 형질감염되지 않거나 2.5 nM의 비특이적 siRNA(GFP 표적화함)으로 형질감염시켰다. 형질감염은 "Transit TKO Transfection" 시약을 이용하여 제조사(Mirus)의 프로토콜에 따라서 모든 세포주에서 실시하였다.

[0130] 형질감염시킨지 24시간 후, 각 웰에 데스페로사미드 메실레이트(desferoxamide mesylate)를 최종농도가 130 μ M 이 되도록 첨가하여 세포에서 저산소증을 유도하였다. 형질감염후 24시간에, 세포배양배지를 각 웰에서 제거하고, 인간 VEGF ELISA(R&D systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 제조사에서 제공하는 Quantikine 인간 VEGF ELISA 프로토콜에 기술되어 있는 바와 같이 상기의 배양배지를 이용하여 분석하였다. 상기 프로토콜은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다.

[0131] 도 1에 나타난 바와 같이, Cand5 siRNA에 의해서 유도되는 RNAi 분해는 저산소상태의 293 및 HeLa 세포에 의해

서 생성되는 VEGF의 농도를 유의성있게 감소시켰다. 대조군으로서 siRNA로 처리되지 않거나 비특이적 siRNA로 처리된 저산소상태의 세포에 의해서 생성되는 VEGF의 양과 비교하였을 경우 큰 차이가 없었다. 또한, 이와 비슷한 결과가 동일한 조건하에서 처리된 인간 ARPE19 세포에서도 관찰되었다. 따라서, VEGF를 표적화하는 siRNA를 이용한 RNA 간섭(RNA interference)은 *in vitro*(체외)에서 인간배양세포에서 VEGF의 병리적 발현증가를 저해한다는 것을 알 수 있다.

[0132] 상기에서 기술한 실험은 마우스 NIH 3T3 세포에서 마우스-특이적 VEGF siRNA를 이용하여 반복되었고 (하기 실시예 6 참고), VEGF 생성은 마우스 VEGF ELISA(R&D systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 제조사에서 제공하는 Quantikine 마우스 VEGF ELISA 프로토콜에 기술되어 있는 바와 같이 정량화하였다. 상기 프로토콜은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다. 인간세포주에 대한 실험결과인 도 1과 비슷한 결과를 얻었다.

[0133] **실시예 2: 인간배양세포에서 siRNA 농도를 증가시키는 경우 VEGF 생성에 미치는 효과**

[0134] 실시예 1에서 기술한 실험을 10 nM 내지 50 nM의 siRNA를 이용하여 인간 293, HeLa 및 ARPE19 세포에서 반복하였다. Cand5 siRNA의 VEGF 생성을 감소시키는 효과는 약 13 nM의 siRNA 농도까지 증가하였으나, 이 이상의 농도에서는 더 이상 증가하지 않았다. 이러한 정체효과(plateau effect)는 siRNA로 형질감염되지 않은 세포에서는 일어나지 않는 VEGF 생성을 반영하기 때문에, 이러한 결과를 통해서 mRNA의 siRNA-매개 RNAi 분해의 촉매적 특성을 알 수 있다. siRNA로 형질감염된 대부분의 세포에서, 저산소증에 의해서 유발된 VEGF mRNA의 생성 증가는 약 13 nM 이상의 siRNA 농도에서 표적 mRNA가 siRNA에 의해 분해됨으로써 저하되었다.

[0135] **실시예 3: siRNA 표적화의 특이성**

[0136] NIH 3T3 마우스 섬유아세포를 24-웰 플레이트에 분주하여 표준 조건하에서 형질감염 하루 전에 50% 정도까지 증식하도록 배양하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 NIH 3T3 마우스 섬유아세포를 인간 VEGF siRNA Cand5으로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포에서 저산소증을 유발한 후, VEGF 농도를 실시예 1과 동일한 방법으로 ELISA분석을 통해서 측정하였다.

[0137] 마우스 VEGF mRNA 서열과 비교시 인간 VEGF siRNA Cand5에 의해서 표적화되는 서열은 한 개의 뉴클레오티드가 다르다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 인간 VEGF siRNA는 저산소증 유도 후 마우스 세포의 마우스 VEGF의 발현을 증가시키는 능력에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과를 통해서 siRNA에 의해서 유도되는 RNAi 분해는 한 개의 뉴클레오티드까지도 구별할 정도로 탁월한 서열 특이적 특성을 가진다는 것을 알 수 있다.

[0138] **실시예 4: siRNA의 마우스 망막 색소 상피세포로의 *in vivo* 전달**

[0139] VEGF는 노인성 황반변성(ARMD) 환자의 망막 색소 상피(retinal pigment epithelial(RPE)) 세포에서 고 농도로 생성된다. 기능성 siRNA가 *in vivo*에서 RPE 세포에 전달될 수 있는지를 조사하기 위하여, GFP를 재조합 아데노바이러스를 이용하여 마우스 망막에서 발현시키고, GFP 발현을 siRNA를 이용하여 억제하였다. 실험은 다음과 같이 실시하였다.

[0140] 5마리의 성체 C57/Black6 마우스(Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 각각의 한 쪽 눈에 Bennett 등(1996, *supra*) 이 기술한 바와 같이, CMV 프로모터에 의해서 발현되는 eGFP를 포함하는 약 1×10^8 의 아데노바이러스 입자와 transit TKO reagent(Mirus)와 결합된 eGFP를 표적화하는 20 pM의 siRNA의 혼합물을 망막하 주사하였다.

[0141] 양성대조군으로서, 반대쪽 눈에 CMV 프로모터에 의해서 발현되는 eGFP를 포함하는 약 1×10^8 의 아데노바이러스 입자와 transit TKO reagent(Mirus)와 결합된 인간 GFP를 표적화하는 20 pM의 siRNA의 혼합물을 주사하였다. GFP 발현을 분석하기 위해서 주사 후 48 시간 또는 60 시간에 펀더스(fundus) 검안경검사를 실시하였다. 눈을 적출하여 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 후, 형광현미경 분석을 실시하기 위하여 플랫 마운트(flat mount)로 제조하거나 10 μ m의 크기로 동결절편하였다.

[0142] 검안경검사시 5 마리 마우스 중 4 마리에서 GFP mRNA를 표적화하는 siRNA를 주입한 눈에서 어떠한 GFP 형광도 검출되지 않았다. 반면, 대조군으로서 비특이적 siRNA를 주입한 반대쪽 눈에서 GFP 형광이 검출되었다. 형광현미경 분석시 대조군으로서 비특이적 siRNA를 주입한 눈과 비교하였을 경우, 대표적인 플랫 마운트에서 GFP

siRNA를 주사한 눈은 GFP 형광을 나타내지 않았다. 다른 망막의 동결절편의 경우, 재조합 아데노바이러스는 효과적으로 RPE 세포를 표적화하였고, 아데노바이러스가 GFP mRNA를 표적화하는 siRNA와 함께 주입되었을 경우 GFP 트랜스유전자(transgene)의 발현은 멈추었다.

[0143] 형광현미경 분석시 GFP mRNA를 표적화하는 siRNA를 주입한 눈에서 약간의 GFP 형광이 검출되었으나, 비특이적 siRNA를 주입한 대조군과 비교하였을 경우 이러한 형광은 크게 감소된 강도를 나타냈다. 이러한 결과를 통해서 기능성 siRNA는 *in vivo*(생체내)에서 RPE 세포내로 전달될 수 있음을 알 수 있다.

[0144] **실시예 5: 마우스 망막에서 인간 VEGF의 *in vivo* 발현 및 siRNA-유도 RNAi 분해소**

[0145] siRNA가 *in vivo*에서 기능하는 VEGF를 표적화할 수 있음을 증명하기 위하여, 실시예 4와 동일한 방법으로 외래(exogenous) 인간 VEGF 발현 카세트를 아데노바이러스를 이용하여 망막하 주사를 통해서 마우스 RPE 세포에 전달하였다. 한 쪽 눈에 Cand5 siRNA를 주사하고, 반대쪽 눈에 GFP mRNA를 표적화하는 siRNA를 주사하였다. 주사 후 60 시간에 마우스를 희생시킨 후, 눈을 적출하여 액체질소에서 잠깐동안 냉동시켰다. 적출한 눈을 용혈 버퍼(lysis buffer)에서 균질하게 갈고, 총단백질 농도를 standard Bradford protein assay(Roche, 독일)를 이용하여 측정하였다. 샘플의 총단백질 농도가 일정하게 한 후, 실시예 1과 동일한 방법으로 ELISA를 실시하여 인간 VEGF를 분석하였다.

[0146] VEGF의 발현정도는 동물마다 다소 다양하게 나타났다. 이러한 다양한 VEGF의 발현정도는 실시예 4의 GFP 실험 결과와 일치하였고, 이는 주사시 일어날 수 있는 실수 및 각 마우스에서 아데노바이러스의 표적 유전자를 전달하는 능력이 다르므로 인해서 나타나는 결과일 수 있다. 그러나, 대조군으로서 비특이적 siRNA를 주사한 눈과 비교하였을 경우, VEGF siRNA를 주사한 각 눈에서 VEGF 발현이 유의성있게 감소하였다(도 4). 이러한 데이터는 Cand5 siRNA가 *in vivo*에서 마우스 RPE 세포에서 인간 VEGF 발현을 강력하고 효과적으로 억제한다는 것을 암시한다.

[0147] **실시예 6: 마우스 CNV 모델에서 맥락막 혈관신생의 저해**

[0148] ARMD에서 맥락막 혈관신생은 RPE 세포에서 VEGF의 발현이 증가하기 때문에 발생하는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 인간의 병리적 상태에 대해서 망막상의 한 점(spot)을 레이저로 태워("레이저 광-응집(laser photo-coagulation)" 또는 "레이저 유도") 마우스 모델을 만들 수 있다. 상처가 치유되는 동안에, 태워진 영역의 RPE 세포에서 VEGF의 발현이 증가하여 맥락막 혈관신생을 유발하는 것으로 여겨진다. 이러한 모델은 마우스 맥락막 혈관신생("choroidal neovascularization(CNV)") 모델로 불리워진다.

[0149] 마우스 CNV 모델에 주입하기 위해서, 실시예 1의 인간 "Cand5" siRNA에서 한 개의 뉴클레오티드가 바뀐 마우스 siRNA를 제조하였다. 이러한 마우스 siRNA는 마우스 VEGF mRNA에 있는 서열 AAACCUCACCAAAGCCAGCAC (서열번호 80)을 특이적으로 표적화하였다. 마우스 VEGF를 표적화하는 다른 siRNA 또한 제조하여 분석하였다. 실시예 1에서 비특이적 대조군으로 사용된 GFP siRNA는 본 실시예에서도 비특이적 대조군으로서 사용되었다.

[0150] 레이저 유도후 24시간에, 11 마리의 성체 C57/Black6 마우스(Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 각각의 한 쪽 눈에 실시예 4와 동일한 방법으로 CMV 프로모터에 의해서 발현되는 LacZ를 포함하는 약 1×10^8 의 아데노바이러스 입자와 transit TKO reagent(Mirus)와 결합된 마우스 VEGF를 표적화하는 20 pM의 siRNA의 혼합물을 망막하 주사하였다. 대조군으로서, 반대쪽 눈에 CMV 프로모터에 의해서 발현되는 eGFP를 포함하는 약 1×10^8 의 아데노바이러스 입자와 transit TKO reagent(Mirus)와 결합된 GFP를 표적화하는 20 pM의 siRNA의 혼합물을 주사하였다.

[0151] 레이저 처리 후 14일에, 플루오레세인(fluorescein)을 마우스에 관류시킨 후 태워진 스팟 주변에서 혈관신생 면적을 측정하였다. 반대쪽 눈에서의 태워진 스팟의 면적을 대조군으로서 이용하였다. 마우스 VEGF를 표적화하는 siRNA를 주사한 마우스에서, 태워진 스팟 주변의 혈관신생 부위는 평균 대조군 면적의 1/4에 달했다. 이러한 데이터는 VEGF를 표적화하는 siRNA("항-VEGF siRNA"라고도 함)를 ARMD 치료에 적용가능함을 증명한다.

[0152] **실시예 7: siRNA 발현을 위한 아데노연관바이러스 벡터의 제조**

[0153] 본 발명의 siRNA를 전달할 수 있는 재조합 AAV 벡터를 제조하기 위해서, "시스-작용(cis-acting)" 플라스미드를

문헌 [Samulski R 등 (1987), *supra*]에 기술된 바와 같이 PCR를 이용한 서브클로닝을 통해서 제조하였다. 수득한 시스-작용 플라스미드는 "pAAVsiRNA"로 명명하였다.

[0154] psub201의 *rep* 유전자와 *cap* 유전자를 순서대로 다음과 같은 서열로 치환하였다: 인간 U6 RNA 프로모터의 조절하에 polyT 종결 서열과 작동가능하게 연결된 19-nt 센스 RNA 가닥 코딩 서열, 및 인간 U6 RNA 프로모터의 조절하에 polyT 종결 서열과 작동가능하게 연결된 19-nt 안티센스 RNA 가닥 코딩 서열. 도 5는 pAAVsiRNA의 구조를 개략적으로 보여준다.

[0155] 문헌 [Fisher KJ 등 (1996), *supra*]에 기술된 바와 같이, E1-소실 아데노바이러스로 감염시킨 인간 293 세포를 pAAVsiRNA 플라스미드로 형질감염시켜서 재조합 AAV siRNA 벡터를 수득하였다. AAV *rep* 및 *cap* 기능은 문헌 [Samulski R 등 (1989), *supra*]에 기술된 바와 같은 트랜스-작용(trans-acting) 플라스미드 pAAV/Ad에 의해서 제공되었다. 재조합 AAV siRNA 벡터의 생산역가는 문헌 [Fisher KJ 등 (1996), *supra*]에 기술된 바와 같이 ml 당 게놈 복제수에 따라서 결정하였다.

[0156] **실시예 8: VEGF를 표적화하는 siRNA에 의한 인위적으로 유도된 맥락막 혈관신생의 저해**

[0157] 마우스 VEGF를 표적화하는 siRNA가 마우스에서 인위적으로 레이저-유도된 맥락막 혈관신생(CNV)을 저해하는 지를 결정하기 위하여 하기와 같은 실험을 실시하였다.

[0158] 성체 암컷 C57BL/6 마우스의 망막에서 810 nm 디오드(diode) 레이저(75 μ m, 140 mw, 0.10 초)(OcuLight Six; IRIS Medical, Mountain View, CA)를 이용하여 레이저 광-응집을 실시하였다. 각 마우스의 양쪽 눈에 3개의 레이저 스팟을 적용하였다. 레이저 광-응집 후 36시간에, 마우스 VEGF를 표적화하는 siRNA("mVEGF1.siRNA")를 각 마우스의 한 쪽 눈에 망막하 또는 초자체내 주사하였다. 망막하 주사의 경우, siRNA는 Transit TKO 형질감염 시약(Mirus)과 결합시키고 재조합 아데노바이러스(rAdenovirus)와 혼합하였다. 초자체내 주사의 경우, siRNA는 형질감염 시약과 재조합 아데노바이러스를 사용하지 않고 전달되었다. 대조군으로서, 각 마우스의 반대쪽 눈에 마우스 VEGF와 상동성이 없는 GFP를 표적화하는 siRNA("GFP1.siRNA")를 포함하는 동일한 제형을 망막하 또는 초자체내 주사하였다.

[0159] 레이저 처리 후 14일에, 고분자량 FITC-텍스트란을 모든 마우스에 관류시키고, 맥락막 플랫폼 마운트(flat mount)를 상기에서 기술한 바와 같이 준비하고, 사진을 찍고 표면을 마스크(mask)한 후 현미경 하에서 분석하였다. 각 플랫폼 마운트에서 Openlab software(Improvision, Boston, MA)을 이용하여 CNV 면적을 측정하였다. 망막하 전달(도 6A; $P < 0.003$) 및 초자체내 전달(도 6B; $P < 0.004$) 모두의 경우, mVEGF1.siRNA로 처리된 눈의 CNV 평균면적은 GFP1.siRNA로 처리된 눈의 CNV 평균면적보다 유의성있게 적게 나타났다.

[0160] 두번째 실험으로서, 성체 암컷 C57BL/6 마우스에 대해 상기와 같이 레이저 광-응집을 실시하고, 마우스를 대조군과 실험군으로 나누었다. 레이저 광-응집 후 1일에, 대조군의 각 마우스에 인산완충된 식염수를 초자체내 전달하고, 레이저 처리 후 14일에 텍스트란-플루오레세인을 관류시켰다. 맥락막 플랫폼 마운트를 준비하고, 각 플랫폼 마운트에서 CNV 면적을 상기한 바와 같이 측정하였다.

[0161] 레이저 광-응집 후 14일에, mVEGF1.siRNA를 실험군의 각 마우스의 한 쪽 눈에 초자체내 주사를 통해서 전달하였다. 대조군으로서, 반대쪽 눈에 GFP1.siRNA를 주사하였다. 레이저 처리 후 21일에 실험군 동물을 고분자량 텍스트란-플루오레세인을 관류시켰다. 맥락막 플랫폼 마운트를 준비하고, 각 플랫폼 마운트에서 CNV 면적을 상기한 바와 같이 측정하였다.

[0162] 두 번째 실험에서, CNV 성장 이전에 투여되었것과는 반대로, 항-VEGF siRNA는 CNV 성장 동안에 투여되었기 때문에 젖은형(wet) AMD 환자의 상태에 더 가깝다. 도 6에 나타낸 바와 같이, mVEGF1.siRNA로 처리된 눈에서 CNV의 평균면적은 GFP1.siRNA로 처리된 눈의 CNV 평균면적보다 유의성있게 적게 나타났다 (도 6C; $P < 0.005$). 21일에 측정된 mVEGF1.siRNA로 처리된 눈의 CNV 평균면적과 14일에 측정된 대조군("PBS")의 CNV 평균면적은 유의성있는 차이를 나타내지 않았다 (도 6C; $P=0.469$).

[0163] 이러한 실험결과는 노인성 황반변성이 항-VEGF siRNA로 치료될 수 있음을 암시한다.

[0164] **실시예 9: 마우스 RPE 세포에서 항-VEGF siRNA에 의해서 유도되는 인간 VEGF의 *in vivo* RNA 간섭**

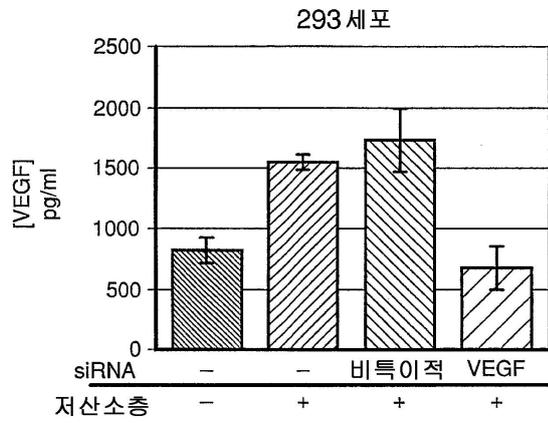
[0165] Cand5 siRNA가 *in vivo*에서 장기간 동안 VEGF의 RNAi를 유도할 수 있는 지를 조사하기 위하여 다음과 같은 실험

을 실시하였다.

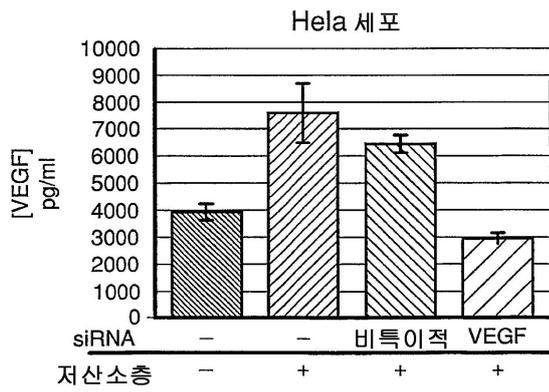
- [0166] 아데노연관바이러스 벡터로부터 인간 VEGF를 발현하는 AAV.CMV.VEGF는 A. Auricchio. 박사에게서 얻은 것이다. 5마리의 C57B1/6 마우스의 양쪽 눈에 AAV.CMV.VEGF를 망막하 주사하였다. AAV.CMV.VEGF의 주사 후 28일에, Cand5 siRNA를 마우스의 한 쪽 눈에 초자체내 주입을 통해서 전달하였고, 대조군으로서 GFP1.siRNA를 반대쪽 눈에 초자체내 주입을 통해서 전달하였다.
- [0167] 0일(siRNA 주입 전) 및 siRNA 주입 후 6, 10 및 14일에, 마우스를 희생시킨 후, 눈을 적출하여 액체질소에서 잠깐동안 냉동시켰다. 적출한 눈을 용혈 버퍼(lysis buffer; Roche, Basel, 스위스)에서 균질하게 갈고, 총단백질 농도를 Bradford 분석을 통해서 측정하였다. 2마리의 마우스는 시점 0일 동안 사용되었고(n=2), 3마리의 마우스는 시점 6, 10 및 14일 동안 사용되었다(n=3). 샘플의 총단백질 농도가 일정하게 한 후, 제조사의 프로토콜(R&D systems, Minneapolis, Minnesota)에 따라서 ELISA를 실시하여 인간 VEGF를 분석하였다. 각 마우스에서 VEGF 백분율(%VEGF)을 Cand5를 주사한 눈에서 VEGF 농도("[VEGF]")을 GFP1.siRNA를 주입한 눈에서 [VEGF]로 나누고 100을 곱하여 계산하였다.
- [0168] 도 7에 나타난 바와 같이, Cand5를 단일투여한 경우, siRNA 주입 후 6일에 VEGF 농도가 RNAi 매개에 의해서 약 70% 정도 감소하였고, siRNA 주입 후 적어도 14일째까지 VEGF 생성이 약 35% 정도 감소하였다. 이러한 결과를 통해서 인간 VEGF를 표적화하는 siRNA는 연장된 기간동안 *in vivo*에서 인간 VEGF의 RNAi를 유도할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0169] **실시예 10: 항-VEGF siRNA를 이용한 원숭이에서 VEGF의 *in vivo* RNA 간섭**
- [0170] 10마리의 순수한 시노놀구스(*cynomolgus*) 원숭이(*Macaca fascicularis*)를 양쪽 눈의 망막에서 레이저 광-응집을 실시하여 맥락막 혈관신생("CNV")을 유도하였다. Cand5 siRNA가 원숭이에서 CNV 면적을 감소시킬 수 있는지를 조사하기 위해서 하기와 같은 실험계획을 세웠다. Cand5에 의해서 표적화되는 VEGF RNA 서열은 호모사피엔스(*Homo sapiens*)와 시노놀구스 원숭이(*M. fascicularis*) 모두에서 동일하기 때문에, Cand5는 시노놀구스 원숭이의 VEGF RNA의 RNAi를 유도할 것으로 예측된다.
- [0171] 실험은 Sierra Biomedical("SBI") 587 Dunn Circle, Sparks, NV, 89431에 의해서 SBI의 표준 조작 절차에 따라서 실시된다. 모든 원숭이에 대해서 실험 전 신체검사, 혈액 및 안과검사, 혈청 화학검사, 망막전위도검사(electroretinography("ERG"))를 포함해서 건강검진을 실시한다. 또한, 실험 전 원숭이의 눈을 플루오레세인(fluorescein) 조영술을 통해서 검사하고, 안구내 압력을 실험전 및 실험기간 동안 두 번 더 측정한다.
- [0172] 0일에, 10마리 원숭이 모두의 양쪽 눈에 레이저 광-응집을 실시하여 맥락막 혈관신생을 유도한다. 실험기간동안 케이지사이드 관찰(cageside observation)을 매일 2회 실시하고 음식 섭취량을 매일 일회 정량적으로 측정한다. 레이저 유도 후 14일에, 단일 투여량의 50 μ l의 처리 제형 또는 대조 제형(하기 참고)을 무작위 맹검방식으로 원숭이의 각 눈에 초자체내 주사한다. 예를 들면, 처리 1의 투여량을 임의의 동물의 오른쪽 눈에 투여하고, 대조 투여량은 왼쪽 눈에 투여한다. 다른 동물에게 처리 1의 투여량을 오른쪽 눈에 투여하고, 처리 3의 투여량을 왼쪽 눈에 투여한다. 각 제형은 4개의 눈에 투여되고, 실험은 각 군이 4개의 눈으로 이루어지는총 1개의 대조군과 4개의 처리군에서 실시된다.
- [0173] 제형은 다음과 같다: 대조 제형 - 균형잡힌 식염수(balanced saline solution("BBS"))만; 처리 1 제형 - BBS에 용해한 1 mg/ml의 Cand5; 처리 2 제형 - BBS에 용해한 2.5 mg/ml의 Cand5; 처리 3 제형 - BBS에 용해한 5 mg/ml의 Cand5; 및 처리 4 제형 - BBS에 용해한 10 mg/ml의 Cand5. 주사 전에, 각 제형의 pH, 삼투물농도 및 260 nm에서의 흡광도를 측정한다.
- [0174] 레이저 유도 후, 각 원숭이의 양쪽 눈에 대해 레이저 유도 후 7주 동안 매주 플루오레세인 조영검사를 실시한다. 원숭이를 희생시킨 후, 완전히 해부하여 모든 조직(초자체 샘플도 포함하여 약 45개 조직)을 수집하고, 수집한 조직에 대해 조직병리학적 검사를 실시한다. 해부 전에 ERG를 실시한다.
- [0175] Cand5 siRNA 투여시 레이저에 의해 유도된 CNV 면적은 감소하고, 이때 Cand5의 투여량이 증가함에 따라서 CNV 면적을 감소할 것으로 예측된다. 그러나, 실시예 2에서 기술한 바와 같은 정체효과(plateau effect)가 관찰될 것이다. Cand5 siRNA는 눈의 맥락막을 제외한 어떠한 기관 또는 조직에 영향을 미치지 않을 것으로 예측된다.

도면

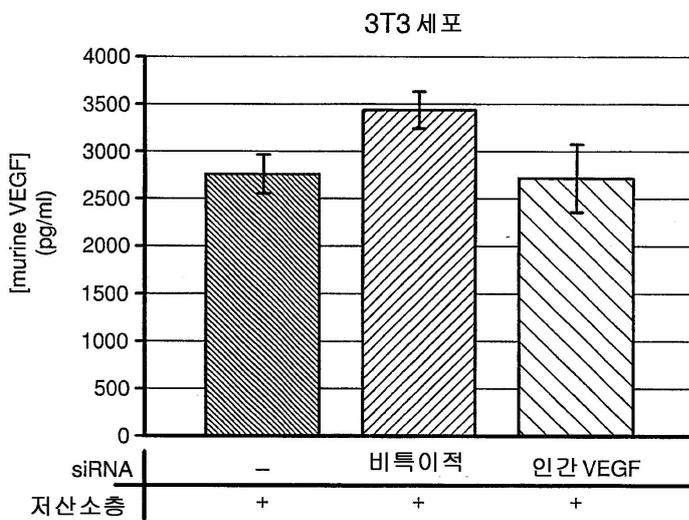
도면1a



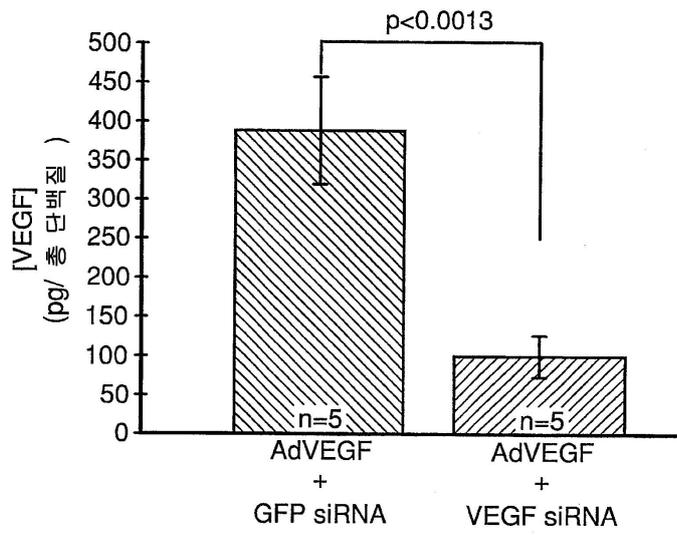
도면1b



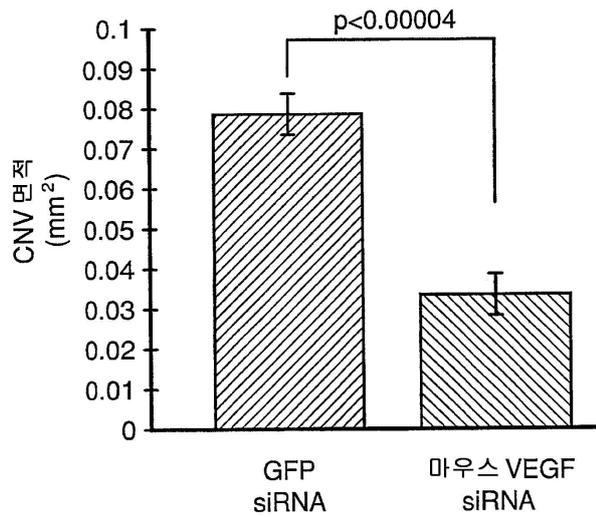
도면2



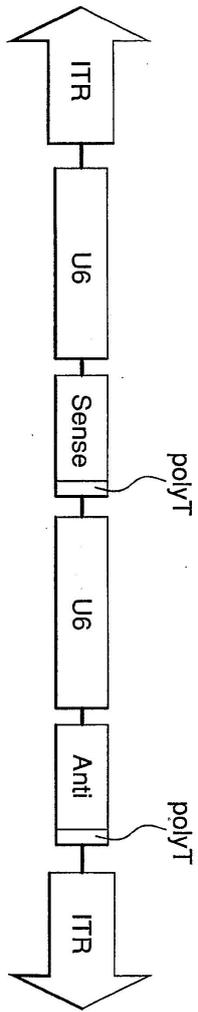
도면3



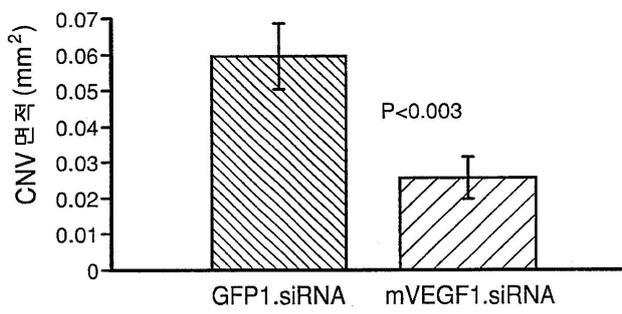
도면4



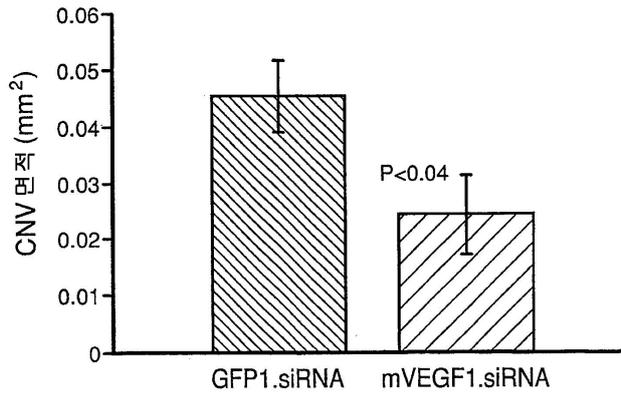
도면5



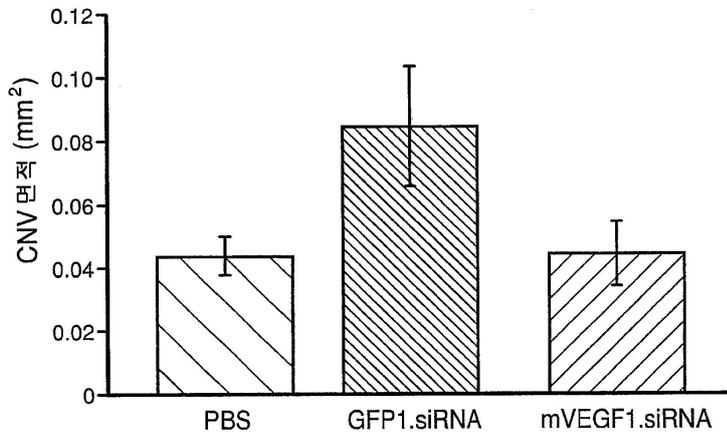
도면6a



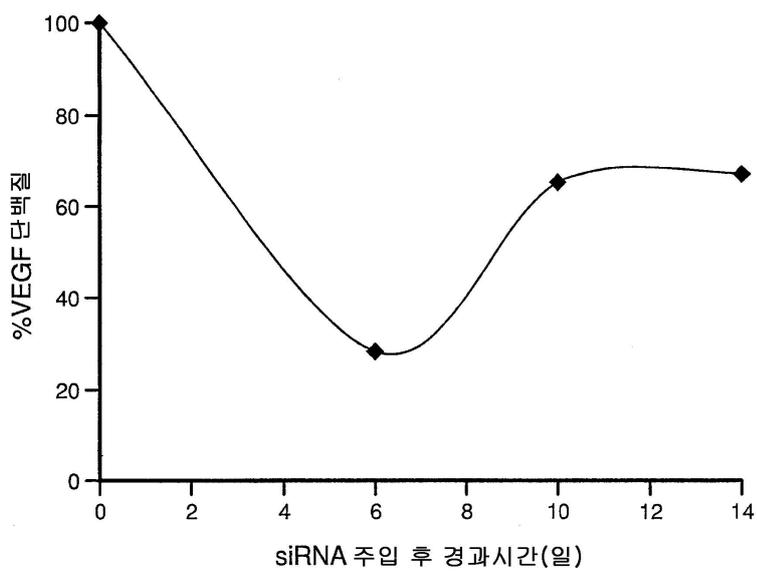
도면6b



도면6c



도면7



서열 목록

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Compositions and Methods for siRNA
 <150> US 60/398,417
 <151> 2002-07-24
 <150> US 10/294,228
 <151> 2002-11-14
 <160> 864
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 2250
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 1

tgagccaggc tggcaggaag gagcctcct cagggtttcg ggaaccagac ctctcaccgg 60
 aaagaccgat taaccatgtc accaccacgc catcatcgtc accgttgaca gaacagtctt 120
 taatccagaa agcctgacat gaaggaagag gagactcttc gaggagcact ttgggtccgg 180

agggcgagac tccggcagac gcattcccgg gcaggtgacc aagcacggtc cctcgtggga 240
 ctggattcgc cattttctta tatctgctgc taaatcgcca agcccggaag attagggttg 300
 tttctgggat tcctgtagac acaccaccc acatacacac atatataat attatatata 360
 taataaata tatatgtttt atatataaaa tatatatata ttcttttttt taaattaact 420
 ctgctaagt tattgggtgc ttcactggat atgtttgact gctgtggact tgtgttggga 480
 ggaggatgtc ctactcggga tgccgacatg ggagacaatg ggatgaaagg cttcagtgtg 540
 gtctgagaga ggccgaagtc cttttgcctg ccggggagca agcaaggcca gggcacgggg 600

gcacattggc tcaactccag aaacacgaca aaccattcc tggccctgag tcaagaggac 660
 agagagacag atgatgacac agaaagagat aaagatgccg gttccaacca gaagtttggg 720
 gagcctcagg acatggcatg ctttgtggat ccccatgata gtctacaaaa gcaccccgcc 780
 cctctgggca ctgcctggaa gaatcgggag cctggccagc cttcagctcg ctctccact 840
 tctgaggggc ctaggaggcc tcccacaggt gtcccggcaa gagaagacac ggtggtggaa 900
 gaagaggcct ggtaatggcc cctcctcctg ggacccttc gtcctctcct taccccact 960
 cctgggtaca gccaggagg accttgtgtg atcagacat tgaaccact aattctgtcc 1020

ccaggagact tggtctgtg tgtgagtggc ttacccttcc tcatttccc ttcceaagge 1080
 acagagcaat ggggcaggac ccgcaagccc ctacaggagg cagagaaaag agaaagtgtt 1140
 ttatatacgg tacttattta atagcccttt ttaattagaa attaaacag ttaatttaat 1200

taaagagtag ggTTTTTTC agtattcttg gTtaaatattt aatttcaact atttatgaga 1260
 tGtatctctc gctctctctt atttgtactt atgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 1320
 gtgtgtgtgt gTatgaaatc tgtgtttcca atctctctct cccagatcgg tgacagtcac 1380
 tagcttgtcc tgagaagata tTtaattttg cTaaactca gctctgcct cccttgtccc 1440

caccacacat tcctttgaaa taaggtttca atatacattt acatactata tatatatttg 1500
 gcaacttgtg tttgtatata aatatatata tatatatatg tttatgtata tatgtgattc 1560
 tgataaaata gacattgcta ttctgttttt tatatgtaa aacaaaaca gaaaaataga 1620
 gaattctaca tactaaatct ctctctcttt tTaatTTTaa tatttgttat catttattta 1680
 ttggtgctac tgittatccg taataattgt gggggaaaa gatattaaca tcacgtcttt 1740
 gtctctagag cagttttccg agatattccg tagtacatat tTatTTTaa acagcaaca 1800
 agaaatcacg atatatctta aaaaaaagc attttgtatt aaagaattga atctctgatc 1860

caaagctctc ccTggtctct ccttctctcc tgggccctcc tGtctcgctt tcctctctcc 1920
 tttgggtac atagTTTTg tcttaggttt gagaagcagt ccctggagta gaatatgggg 1980
 tgacccatcc attcctgggc ggaggggaga tggctcttt gccaagggtc ctcaactac 2040
 tgggtactct gTtccTtGtc agacaaggat gggggcatgt ctccaggTgc taactggaga 2100
 tcggagagag ctgttggtg cagctggcca ggatttgggc atgccgggga catgggaggc 2160
 tgtgaccca gcatgcagtt tacttctggg tgctaaatgg aagagtcag taaaaagagt 2220
 ctgcccattg ggattccatt ccgctttgtg 2250

- <210> 2
- <211> 444
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

atgaactttc tGctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tGctgtctta cctccacat 60
 gccaaTggt cccaggtGc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
 gtgaagtTca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180
 atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatctTca agccatctg tgtgccctg 240
 atgcgatGcg ggggctGctg caatgacgag ggctggagt gtgtgccac tgaggagtcc 300
 aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

 agcttctac agcacaaca atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420
 aaatgtgaca agccgaggcg gtga 444

<210> 3

<211> 576

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgaactttc tctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tgctgctcta cctccacat 60

gccaaagtgt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180

atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg 240

atgcatgctg ggggctgctg caatgacgag ggcttgaggt gtgtgccac tgaggagtcc 300

aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

agcttcttac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420

aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480

tgtaaagtgt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540

gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cggatga 576

<210> 4

<211> 648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgaactttc tctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tgctgctcta cctccacat 60

gccaaagtgt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120

gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180

atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgccctg 240

atgcatgctg ggggctgctg caatgacgag ggcttgaggt gtgtgccac tgaggagtcc 300

aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360

agcttcttac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420

aaaaaatcag ttcaggaaa gggaaagggg caaaaacgaa agcgcgaagaa atcccgttat 480

aagtcctgga gcgttcctg tggccttgc tcagagcgga gaaagcattt gtttgtacaa 540

gatccgcaga cgtgtaaatg ttctgcaaaa aacacagact cgcttgcaa ggcgaggcag 600

cttgagttaa acgaacgtac ttgcagatgt gacaagccga ggcggtga 648

<210> 5

<211> 670
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 gccttgctgc tctacctcca ccatgccaag tgggccagg ctgcacccat ggcagaagga 60
 ggagggcaga atcatcacga agtgggtgaag ttcattgatg tctatcagcg cagctactgc 120
 catccaatcg agaccctggt ggacatcttc caggagtacc ctgatgagat cgagtacatc 180
 ttcaagccat cctgtgtgcc cctgatgcga tgcgggggct gctgcaatga cgagggcctg 240
 gagtgtgtgc cactgagga gtccaacatc accatgcaga ttatgcggat caaacctcac 300
 caaggccagc acataggaga gatgagcttc ctacagcaca acaaatgtga atgcagacca 360
 aagaaggata gagcaagaca agaaaaaaaa tcagttcgag gaaagggaaa ggggcaaaaa 420
 cgaaagcgca agaaatcccg gtataagtcc tggagcgttt acgttggtgc ccgctgctgt 480
 ctaatgcctt ggagcctccc tggcccccatt cctgtgggc cttgctcaga gcggagaaag 540
 catttgtttg tacaagatcc gcagacgtgt aaatgttctt gcaaaaacac agactcgcgt 600
 tgcaaggcga ggcagcttga gttaaacgaa cgtacttga gatgtgacaa gccgaggcgg 660
 tgatgaatga 670
 <210> 6
 <211> 1137
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 atgctcattg tccagactgg ggtcagatca gcaaacaaag ggcctctgat ggtgattgtt 60
 gaatattgca aatatggaaa tctatccaac tacctcaaga gcaaatatga cttatttttt 120
 ctcgacaagg atgtggcatc acacatggag cgtaaagaag aaaaaatgga gccaggcctg 180
 gaacaaggca agaaaccaa actagatagc atcaccagca gcgagagctt tgggagctcc 240
 aagtttcagg aagataaaaa tctgagtgat gttgaggaag aggaggattc tgatggtttc 300
 taccaggagc ccatcactat ggaagatctg atttcttaca gttttcaagt ggccagaggc 360
 atgaagtttc tgicttccag aaagtgcatt cattgggacc tggcagcaag aaacattctt 420
 ttatctgaga acaatgtggt gaagatttgt gattttggcc ttgccagga tatttacaag 480
 aacgccgatt atgtgagaaa aggaggtggg tctccatacc caggagtgca aatggatgag 540
 cacttctgca gttgcctgag ggaaggcatg aggatgagag ctgctgagta ctccactcct 600

gaaatctatc agatcatgct ggactgcagg cacaaagacc caaaagaaag gccaagattt 660
 gcagaacttg tggaaaaact agaaaatagt gggtttacat actcaactcc tgccttctct 720
 gaggacttct tcaaggaagg tatttcagct cccaagtta gttcaggaag ctctgatgat 780
 gtcagatacg taaatgcttt caagttcatg agcctggaaa gaatcaaac ctttgaagaa 840
 cttttgccaa atgccacctc catgtttgat gactaccagg gggacagcag cgctctgctg 900
 gcctctccca tgetgaagcg cttcaccagg actgacagca aaccaaggc ctcgctcaag 960
 attgacttga gactaactag caaaagtaag aagtcggggc tttctgatgt cagcaggccc 1020

 agtttctgcc attccaacag tgggcacatc agcaaaggca agggcaggtt cacctacgac 1080
 aacgccgagc tggaaaggaa gacggcgtgc tgetccccgc ccctctggga gttgtag 1137
 <210> 7
 <211> 5830
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

 actgagtccc gggaccccg gagagcggtc agtgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg 60
 cgccgggcat cacttgcgcg ccgcagaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta 120
 ccggcacccg cagagcctcc tgcagccgcc ggtcggcgcc eggctccct agccctgtgc 180
 gctcaactgt cctgcgctgc ggggtgccgc gagttccacc tccgcgctc cttctctaga 240

 caggcgtgg gagaaagaac cggtcccga gttctgggca tttcggccgg ctcgagggtgc 300
 aggatgcaga gcaagggtct gctggccgct gccctgtggc tctgcgtgga gaccggggcc 360
 gcctctgtgg gtttgcctag tgtttctctt gatctgcca ggctcagcat acaaaaagac 420
 atacttaca ttaaggctaa tacaactctt caaattactt gcaggggaca gagggacttg 480
 gactggcttt ggccaataa tcagagtggc agtgagcaaa gggaggaggt gactgagtgc 540
 agcgatggcc tcttctgtaa gacactcaca attccaaaag tgatcgaaa tgacactgga 600
 gcctacaagt gcttctaccg ggaaactgac ttggcctcgg tcatttatgt ctatgttcaa 660

 gattacagat ctccatttat tgcttctgtt agtgaccaac atggagtcgt gtacattact 720
 gagaacaaaa acaaaactgt ggtgattcca tgtctcgggt ccatttcaa tctcaactg 780
 tcactttgtg caagatacc agaaaagaga tttgttctg atggtaacag aatttctgg 840
 gacagcaaga agggctttac tattcccagc tacatgatca gctatgctgg catggcttc 900
 tgtgaagcaa aaattaatga tgaagttac cagtctatta tgtacatagt tgtcgttgta 960
 gggtatagga tttatgatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttga 1020

gaaaagcttg tcttaaattg tacagcaaga actgaactaa atgtgggat tgacttcaac 1080

 tgggaatacc cttcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga cctaaaaacc 1140
 cagtctggga gtgagatgaa gaaatTTTTG agcaccttaa ctatagatgg tgtaaccggg 1200
 agtgaccaag gattgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgaccaa gaagaacagc 1260
 acatttgtca gggTccatga aaaacTTTT gTtgcTTTTg gaagtggcat ggaatctctg 1320
 gtggaagcca cggTggggga gcgtgtcaga atccctgcga agtaccttgg ttaccacccc 1380
 ccagaaataa aatggataa aaatggaata cccttgagt ccaatcacac aattaaagcg 1440
 gggcatgtac tgacattat ggaagtgagt gaaagagaca caggaaatta cactgtcatc 1500

 cttaccaatc ccatttcaaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgtc 1560
 ccaccccaga ttggtgagaa atctctaac tctctctggt attcctacca gtacggcacc 1620
 actcaaacgc tgacatgtac ggtctatgcc attctcccc cgcacacat ccactggtat 1680
 tggcagttgg aggaagagt gcCCAacgag cccagccaag ctgtctcagt gacaaacca 1740
 taccttgtg aagaatggag aagtgtggag gacttccagg gaggaataa aattgaagtt 1800
 aataaaaaatc aatttgcTct aattgaagga aaaaacaaaa ctgtaagtac cettgttTatc 1860
 caagcggcaa atgtgtcagc tttgtacaaa tgtgaagcgg tcaacaaagt cgggagagga 1920

 gagagggtga tctccttcca cgtgaccagg ggtcctgaaa ttactttgca acctgacatg 1980
 cagccccactg agcaggagag cgtgtctttg tggTgcactg cagacagatc tacgtttgag 2040
 aaactcacat ggtacaagct tggccacag cctctgcca tccatgtggg agagttgcc 2100
 acacctgttt gcaagaactt ggatactctt tggaaattga atgccacat gttctctaat 2160
 agcacaatg acattttgat catggagctt aagaatgcat cctTgcagga ccaaggagac 2220
 tatgtctgcc ttgtcaaga caggaagacc aagaaaagac attgcgtggt caggcagctc 2280
 acagtcttag agcgtgtggc acccagatc acaggaaacc tggagaatca gacgacaagt 2340

 attggggaaa gcatcgaagt ctcatgcacg gcatctggga atccccctcc acagatcatg 2400
 tggtttaaag ataatgagac cttttagaa gactcaggca ttgtattgaa ggatgggaac 2460
 cggaacctca ctatccgag agtgaggaag gaggacgaag gcctctacac ctgccaggca 2520
 tgcagtgttc ttggctgtgc aaaagtggag gcatttttca taatagaagg tgcccaggaa 2580
 aagacgaact tggaaatcat tattctagta ggcacggcgg tgattgcat gttcttctgg 2640
 ctacttcttg tcatcatcct acggaccgtt aagcgggcca atggagggga actgaagaca 2700
 ggctacttgt ccatcgtcat ggatccagat gaactcccat tggatgaaca ttgtgaacga 2760

ctgccttatg atgccagcaa atgggaattc cccagagacc ggctgaagct aggtaagcct 2820
 cttggccgtg gtgcctttgg ccaagtgatt gaagcagatg cctttggaat tgacaagaca 2880
 gcaacttgca ggacagtagc agtcaaaatg ttgaaagaag gagcaacaca cagtgagcat 2940
 cgagctctca tgictgaaat caagatcctc attcatattg gtcaccatct caatgtggtc 3000
 aaccttctag gtgcctgtac caagccagga gggccactca tgggtattgt ggaattctgc 3060
 aaatttgaa acctgtccac ttacctgagg agcaagagaa atgaatttgc cccctacaag 3120
 accaaagggg cacgattccg tcaagggaat gactacgttg gagcaatccc tgtggatctg 3180

 aaacggcgtc tggacagcat caccagtagc cagagctcag ccagctctgg atttgtggag 3240
 gagaagtccc tcagtgatgt agaagaagag gaagctcctg aagatctgta taaggacttc 3300
 ctgaccttgg agcatctcat ctgttacagc ttccaagtgg ctaagggcat ggagtctctg 3360
 gcatcgcaa agtgtatcca cagggacctg gcggcacgaa atatcctctt atcggagaag 3420
 aacgtggtta aaatctgta ctttggcttg gcccgggata tttataaaga tccagattat 3480
 gtcagaaaag gagatgctcg cctccctttg aaatggatgg ccccagaaac aattttgac 3540
 agagtgtaca caatccagag tgacgtctgg tcttttggtg ttttctgtg ggaaatattt 3600

 tccttaggtg ctctccata tcctggggta aagattgatg aagaattttg taggcgattg 3660
 aaagaaggaa ctagaatgag ggcccctgat tatactacac cagaatgta ccagaccatg 3720
 ctggactgct ggacgggga gccagtcag agaccacgt tttcagagt ggtggaacat 3780
 ttgggaaatc tcttgcaagc taatgctcag caggatggca aagactacat tgttcttccg 3840
 atatcagaga ctttgagcat ggaagaggat tctggactct ctctgctac ctcacctgtt 3900
 tcctgtatgg aggaggagga agtatgtgac cccaaattcc attatgacaa cacagcagga 3960
 atcagtcagt atctgcagaa cagtaagcga aagagccggc ctgtgagtgt aaaaacattt 4020

 gaagatatcc cgttagaaga accagaagta aaagtaatcc cagatgacaa ccagacggac 4080
 agtggatagg ttcttgctc agaagagctg aaaactttgg aagacagaac caaattatct 4140
 ccatcttttg gtggaatggt gccagcaaa agcagggagt ctgtggcatc tgaaggctca 4200
 aaccagacaa gggctacca gtccggatat cactccgatg acacagacac caccgtgtac 4260
 tccagtgagg aagcagaact tttaaagctg atagagattg gaggcaaac cggtagcaca 4320
 gccagattc tccagctga ctctggggacc aactgagct ctctctctgt ttaaaggaa 4380
 gcatccacac cccaactccc ggacatcaca tgagaggtct gctcagattt tgaagtgttg 4440

 ttctttccac cagcaggaag tagccgatt tgattttcat ttcacaaca gaaaaaggac 4500
 ctctgactgc agggagccag tcttctagc atatcctgga agaggcttgt gaccaagaa 4560
 tgtgtctgtg tcttctccca gtgttgacct gatcctcttt tttattcat ttaaaaagca 4620

ttatcatgcc cctgctgcgg gtctcacat gggtttagaa caaagagctt caagcaatgg	4680
ccccatcctc aaagaagtag cagtacctgg ggagctgaca cttctgtaa actagaagat	4740
aaaccaggca acgtaagtgt tcgagggtt gaagatggga aggatttga gggctgagtc	4800
tatccaagag gctttgttta ggacgtgggt cccaagccaa gccttaagtg tggattcgg	4860
attgatagaa aggaagacta acgttacctt gctttggaga gtactggagc ctgcaaatgc	4920
attgtgtttg ctctgggtga ggtgggcatg gggctctgtc tgaatgtaa agggttcaga	4980
cggggtttct ggtttagaa ggttcgtgt tcttcagtt gggctaaagt agagtctgtt	5040
gtgctgtttc tgactcctaa tgagagttcc ttccagaccg ttactgtct ccttgccaag	5100
ccccaggaag aaaatgatgc agctctggct ccttgtctcc caggtgatc cttattcag	5160
aataccacaa agaaaggaca ttcagctcaa ggctccctgc cgtgttgaag agttctgact	5220
gcacaaacca gcttctggtt tcttctggaa tgaatacct catatctgc ctgatgtgat	5280
atgtctgaga ctgaatgcgg gaggttcaat gtgaagctgt gtgtggtgc aaagttcag	5340
gaaggatfff accctttgt tcttccccct gtcccaacc cactctcacc ccgcaacca	5400
tcagtatfff agttattgg cctctactcc agtaaacctg attgggtttg ttcactctct	5460
gaatgattat tagccagact tcaaaattat tttatagccc aaattataac atctattgta	5520
ttatttagac ttttaacata tagagctatt tctactgatt tttgcccttg tctgtcctt	5580
tttttcaaaa aagaaaatgt gtttttgit tggtagcata gtgtgaaatg ctgggaacaa	5640
tgactataag acatgctatg gcacatatat ttatagtctg tttatgtaga aacaaatgta	5700
atatattaaa gccttatata taatgaactt tgfactattc acattttgta tcagtattat	5760
gtagcataac aaaggtcata atgctttcag caattgatgt cattttatta aagaacattg	5820
aaaaacttga	5830
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 8	
tcatcacgaa gtggtgaag	19
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220
 ><223> Targeting sequence
 <400> 9
 ucaucacgaa guggugaagu u 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 10
 cuucaccacu ucgugaugau u 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <220><223> ..
 <220><221> misc_RNA
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleotide

 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotide
 <400> 11
 tcatcagaa gtggtgaagt t 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <220><223> ..
 <220><221> misc_RNA
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleotides

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 12
 cttcaccact tcgtgatgat t 21

 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 13
 aacgtacttg cagatgtgac a 21

 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 14
 gttcatggat gtctatcag 19

 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 15
 tcgagaccct ggtggacat 19

 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 16
 tgacgagggc ctggagtgt 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 17
 tgacgagggc ctggagtgt 19
 <210> 18
 <211>
 > 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 18
 catcaccatg cagattatg 19
 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 19
 acctcaccaa ggccagcac 19
 <210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 20
 ggccagcaca taggagaga 19

 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 21
 caaatgtgaa tgcagacca 19
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 22
 atgtgaatgc agaccaaag 19
 <210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 23
 tgcagaccaa agaaagata 19
 <210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 24
 agaaagatag agcaagaca 19
 <210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 25
 gaaagataga gcaagacaa 19
 <210> 26
 <211>
 > 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 26
 gatagagcaa gacaagaaa 19
 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 27
 gacaagaaaa tcctgtgg 19
 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 28
 gaaaatccct gtggcctt 19

 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 29
 aatccctgtg ggccttgct 19
 <210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 30
 tcctgtggg ccttgctca 19
 <210> 31
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 31
 gcatttgttt gtacaagat 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 32
 gatccgcaga cgtgtaaat 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 33
 atgttctgc aaaaacaca 19
 <210> 34
 <211>
 > 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 34
 tgttctgca aaaacacag 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 35
 aaacacagac tcgcgttgc 19

<210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 36
 aacacagact cgcgttgca 19

<210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 37
 acacagactc gcgttgcaa 19

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 38
 cacagactcg cgttgcaag 19

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 39

ggcgaggcag cttgagtta 19
 <210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 40
 acgaacgtac ttgcagatg 19
 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 41
 cgaacgtact tgcagatgt 19
 <210> 42
 <211>
 > 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 42
 cgtacttgca gatgtgaca 19
 <210> 43
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 43
 gtgggccag gctgcaccc 19
 <210> 44
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 44
 ggaggaggc agaatcatc 19
 <210> 45
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 45
 gtggtgaagt tcatggatg 19
 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 46
 aatcatcacg aagtggtag g 21
 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 47
 aagttcatgg atgtctatca g 21
 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 48
 aatcgagacc ctggtggaca t 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 49
 aatgacgagg gcctggagtg t 21
 <210> 50
 <211>

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 50

aacatcacca tgcagattat g 21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 51

aaacctcacc aaggccagca c 21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 52

aaggccagca cataggagag a 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 53

aacaaatgtg aatgcagacc a 21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 54

aaatgtgaat gcagaccaaa g 21

<210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 55
 aatgcagacc aaagaaagat a 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 56
 aaagaaagat agagcaagac a 21
 <210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 57
 aagaaagata gagcaagaca a 21
 <210> 58
 <211>
 > 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 58
 aagatagagc aagacaagaa aat 23
 <210> 59
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 59
aagacaagaa aatccctgtg ggc 23

<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 60
aagaaaatcc ctgtgggcct tgc 23

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 61
aatccctgtg ggccttgctc aga 23

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 62
aagcatttgt ttgtacaaga tcc 23

<210> 63
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 63
aagatccgca gacgtgtaaa tgt 23

<210> 64
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 64
 aaatgttcct gcaaaaacac aga 23
 <210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 65
 aatgttcctg caaaaacaca gac 23
 <210> 66
 <211
 > 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 66
 aaaaacacag actcgcgttg caa 23
 <210> 67
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 67
 aaaacacaga ctgcgttgc aag 23
 <210> 68
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 68
 aaacacagac tcgcgttgca agg 23
 <210> 69

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 69
 aacacagact cgcgttgcaa ggc 23
 <210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 70
 aaggcgaggc agcttgagtt aaa 23
 <210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 71
 aaacgaacgt acttgagat gtg 23
 <210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 72
 aacgaacgta cttgagatg tga 23
 <210> 73
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 73
 aagtgtccc aggtgcacc cat 23

<210> 74
 <211>
 > 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 74
 aaggaggagg gcagaatcat cac 23
 <210> 75
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 75
 aagtgtgaa gttcatggat gtc 23
 <210> 76
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 76
 aaaatccctg tgggccttgc tca 23

 <210> 77
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <220><221> misc_RNA
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleotides
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 77

acctcaccaa ggccagcact t 21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<220><221> misc_RNA

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleotides

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> deoxyribonucleotides

<400> 78

gtgctggcct tggtaggatt t 21

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 79

ggctacgtcc agcgacc 18

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 80

aaacctcacc aaagccagca c 21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 81
ggcagaatca tcacgaagtg g 21

<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 82
cctggtggac atcttcagg a 21

<210> 83
<211>
> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 83
gagatcgagt acatcttcaa g 21

<210> 84
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 84
tggagtgtgt gccactgag g 21

<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 85
gagcttcta cagcacaaca a 21

<210> 86
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 86
 ttgctcagag cggagaaagc a 21
 <210> 87
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 87
 cacacactcg cgttgcaagg c 21
 <210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 88
 tcacatgca gattatgcgg a 21
 <210> 89
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 89
 tagagcaaga caagaaaatc c 21
 <210> 90
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 90
 ccgacagcgt gtaaattgtc c 21
 <210> 91
 <211>

> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 91
 aagcaggcca gacactgcat c 21
 <210> 92
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 92
 aatgcagggg ggaagcagcc c 21
 <210> 93
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 93
 aagcagccca taaatgtct t 21

 <210> 94
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 94
 aaatgtctt tgctgaaat g 21
 <210> 95
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 95
 aatgtcttt gcctgaaatg g 21

<210> 96
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 96
 aaatggtgag taaggaaagc g 21
 <210> 97
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 97
 aatggtgagt aaggaaagcg a 21
 <210> 98
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 98
 aaggaaagcg aaaggctgag c 21
 <210> 99
 <211>
 > 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 99
 aaagcгааag gctgagcata a 21
 <210> 100
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 100
aagcгааagg ctgagcataa c 21
<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 101

aaaggctgag cataactaaa t 21
<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 102

aaggctgagc ataactaaat c 21
<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 103

aactaaatct gcctgtggaa g 21
<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 104

aaatctgcct gtggaagaaa t 21
<210> 105
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 105
 aatctgcctg tggaagaaat g 21
 <210> 106
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 106
 aagaaatggc aaacaattct g 21

 <210> 107
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 107
 aaatggcaaa caattctgca g 21
 <210> 108
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 108
 aatggcaaac aattctgcag t 21
 <210> 109
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 109
 aaacaattct gcagtacttt a 21
 <210> 110

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 110
 aacaattctg cagtacttta a 21
 <210> 111
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 111
 aattctgcag tactttaacc t 21
 <210> 112

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 112
 aaccttgaac acagctcaag c 21
 <210> 113
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 113
 aacacagctc aagcaaacca c 21
 <210> 114
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 114

aagcaaacca cactggcttc t	21
<210> 115	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 115	
aaaccacact ggctttaca g	21
<210> 116	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 116	
aaccacactg gctttacag c	21
<210> 117	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 117	
aaatatctag ctgtacctac t	21
<210> 118	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 118	
aatatctagc tgtacctact t	21
<210> 119	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	

<400> 119
aaagaagaag gaaacagaat c 21

<210> 120
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 120
aagaagaagg aaacagaatc t 21

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 121
aagaagaaa cagaatctgc a 21

<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 122
aaggaaacag aatctgcaat c 21

<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 123
aaacagaatc tgcaatctat a 21

<210> 124
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 124
 aacagaatct gcaatctata t 21
 <210> 125

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 125
 aatctgcaat ctatatattt a 21
 <210> 126
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 126
 aatctatata tttattagtg a 21
 <210> 127
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 127

 aaatccccga aattatacac a 21
 <210> 128
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 128
 aatccccgaa attatacaca t 21
 <210> 129

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 129
 aaattataca catgactgaa g 21
 <210> 130
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 130
 aattatacac atgactgaag g 21
 <210> 131
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 131
 aaggaaggga gctcgtcatt c 21
 <210> 132
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 132
 aaggagctc gtcattccct g 21

 <210> 133
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 133

aacatcactg ttactttaaa a 21

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 134

aaaaaagttt ccacttgaca c 21

<210> 135

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 135

aaaaagtttc cacttgacac t 21

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 136

aaaagtttcc acttgacact t 21

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 137

aaagtttcca ctgacactt t 21

<210> 138

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 138
 aagtttccac ttgacacttt g 21
 <210> 139
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 139
 aaaacgcata atctgggaca g 21
 <210> 140
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 140

 aaacgcataa tctgggacag t 21
 <210> 141
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 141
 aacgcataat ctgggacagt a 21
 <210> 142
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 142
 aatctgggac agtagaaagg g 21
 <210> 143
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 143
 aaagggttc atcatatcaa a 21
 <210> 144
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 144
 aagggttca tcatatcaaa t 21
 <210> 145
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 145
 aaatgcaacg tacaagaaa t 21
 <210> 146
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 146
 aatgcaacgt acaagaaat a 21
 <210> 147
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 147
 aacgtacaaa gaaatagggc t 21
 <210> 148

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 148
 aaagaaatag ggcttctgac c 21

<210> 149
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 149
 aagaaatagg gcttctgacc t 21

<210> 150
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 150
 aaatagggct tctgacctgt g 21

<210> 151

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 151
 aataggcctt ctgacctgtg a 21

<210> 152
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 152

aagcaacagt caatgggcat t	21
<210> 153	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 153	
aacagtcaat gggcatttgt a	21
<210> 154	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 154	
aatgggcatt tgtataagac a	21
<210> 155	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 155	
aagacaaact atctcacaca t	21
<210> 156	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 156	
aaactatctc acacatcgac a	21
<210> 157	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Targeting sequence
 <400> 157
 aactatctca cacatcgaca a 21
 <210> 158
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 158
 aaaccaatac aatcatagat g 21

 <210> 159
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 159
 aaccaataca atcatagatg t 21
 <210> 160
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 160
 aatacaatca tagatgtcca a 21
 <210> 161
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 161
 aatcatagat gtccaaataa g 21
 <210> 162
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 162
 aaataagcac accacgcca g 21
 <210> 163
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 163
 aataagcaca ccacgccag t 21
 <210> 164

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 164
 aagcacacca cgcccagtca a 21
 <210> 165
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 165
 aaattactta gaggccatac t 21
 <210> 166
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 166

 aattacttag aggccatac c 21

<210> 167
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 167
 aattgtactg ctaccactcc c 21
 <210> 168
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 168
 aacacgagag ttcaaatgac c 21
 <210> 169
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 169
 aaatgacctg gagttaccct g 21
 <210> 170
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 170
 aatgacctgg agttaccctg a 21
 <210> 171
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 171

aaaaaaataa gagagcttcc g	21
<210> 172	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 172	
aaaaaataag agagcttccg t	21
<210> 173	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 173	
aaaaataaga gagcttccgt a	21
<210> 174	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 174	
aaaataagag agcttccgta a	21
<210> 175	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Targeting sequence	
<400> 175	
aaataagaga gcttccgtaa g	21
<210> 176	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Targeting sequence
 <400> 176
 aataagagag cttccgtaag g 21
 <210> 177

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 177
 aagagagctt ccgtaaggcg a 21
 <210> 178
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 178
 aaggcgacga attgaccaa g 21
 <210> 179
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 179

 aattgaccaa agcaattccc a 21
 <210> 180
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 180
 aaagcaatte ccatgccaac a 21
 <210> 181
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 181
 aagcaattcc catgccaaca t 21
 <210> 182
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 182
 aattcccatg ccaacatatt c 21
 <210> 183
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 183
 aacatattct acagtgttct t 21
 <210> 184
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 184
 aaaatgcaga acaaagacaa a 21

 <210> 185
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 185
 aatgcagaac aaagacaaag g 21

<210> 186
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 186
 aacaaagaca aaggacttta t 21
 <210> 187
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 187
 aaagacaaag gactttatac t 21
 <210> 188
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 188
 aagacaaagg actttatact t 21
 <210> 189
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 189
 aaaggacttt atactgtcg t 21
 <210> 190
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 190
aaggacttta tacttgcgt g 21

<210> 191
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 191
aaggagtgga ccatcattca a 21

<210> 192
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 192

aaatctgtta acacctcagt g 21

<210> 193
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 193

aatctgttaa cacctcagtg c 21

<210> 194
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 194

aacacctcag tgcatatata t 21

<210> 195
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 195
 aaagcattca tcaactgtgaa a 21
 <210> 196
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 196
 aagcattcat cactgtgaaa c 21
 <210> 197
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 197
 aaacatcgaa aacagcaggt g 21
 <210> 198
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 198
 aacatcgaaa acagcaggtg c 21
 <210> 199
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 199
 aaaacagcag gtgcttgaaa c 21
 <210> 200
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 200
 aaacagcagg tgcttgaaac c 21
 <210> 201
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 201
 aacagcaggt gcttgaacc g 21
 <210> 202
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 202
 aaaccgtagc tggcaagcgg t 21
 <210> 203

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 203
 aaccgtagct ggcaagcgg t c 21
 <210> 204
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 204
 aaccgtagct ggcaagcgg t c 21

<210>	205	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	205	
aaagtgaagg catttcctc g		21
<210>	206	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	206	
aagtgaaggc atttcctcg c		21
<210>	207	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	207	
aaggcatttc cctgccgga a		21
<210>	208	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	208	
aagttgtatg gttaaaagat g		21
<210>	209	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	

<400> 209
aaaagatggg ttacctgcga c 21

<210> 210
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 210
aaagatgggt tacctgcgac t 21

<210> 211
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 211
aagatgggtt acctgcgact g 21

<210> 212
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 212
aaatctgctc gctatttgac t 21

<210> 213
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 213
aatctgctcg ctatttgact c 21

<210> 214
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 214
 aattatcaag gacgtaactg a 21
 <210> 215
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 215
 aaggacgtaa ctgaagagga t 21
 <210> 216

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 216
 aactgaagag gatgcaggga a 21
 <210> 217
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 217
 aagaggatgc agggaattat a 21
 <210> 218
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 218

 aattatacaa tcttgctgag c 21
 <210> 219

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 219
 aatcttgctg agcataaaac a 21
 <210> 220
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 220
 aaaacagtca aatgtgttta a 21
 <210> 221
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 221
 aaacagtcaa atgtgtttaa a 21
 <210> 222
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 222
 aacagtcaaa tgtgtttaa a 21
 <210> 223
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 223

aaatgtgttt aaaaacctca c 21

<210> 224
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 224

aatgtgttta aaaacctcac t 21

<210> 225
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 225

aaaaacctca ctgccactct a 21

<210> 226
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 226

aaaacctcac tgccactcta a 21

<210> 227
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 227

aaacctcact gccactctaa t 21

<210> 228
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 228
 aacctcactg ccactctaata t 21
 <210> 229

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 229
 aattgtcaat gtgaaacccc a 21
 <210> 230
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 230
 aatgtgaaac cccagattta c 21
 <210> 231
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 231

 aaaccccaga ttacgaaaa g 21
 <210> 232
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 232
 aaccccagat ttacgaaaag g 21
 <210> 233
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 233
 aaaaggccgt gtcacgttt c 21
 <210> 234
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 234
 aaaggccgtg tcacgtttc c 21
 <210> 235
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 235
 aaggccgtgt cacgtttcc a 21
 <210> 236
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 236
 aaatcctgac ttgtaccga t 21

 <210> 237
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 237
 aatcctgact tgtaccgat a 21

<210> 238
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 238
 aacctacaat caagtggttc t 21
 <210> 239
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 239
 aatcaagtgg ttctggcacc c 21
 <210> 240
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 240
 aagtggttct ggcaccctg t 21
 <210> 241
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 241
 aaccataatc attccgaagc a 21
 <210> 242
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 242
aatcattccg aagcaagggtg t 21

<210> 243
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 243
aagcaagggtg tgacttttgt t 21

<210> 244
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 244

aaggtgtgac tttgttcca a 21

<210> 245
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 245

aataatgaag agtcctttat c 21

<210> 246
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 246

aatgaagagt cttttatcct g 21

<210> 247
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 247
 aagagtcctt tatcctggat g 21
 <210> 248
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 248
 aacatgggaa acagaattga g 21
 <210> 249
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 249
 aaacagaatt gagagcatca c 21
 <210> 250
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 250
 aacagaattg agagcatcac t 21
 <210> 251
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 251
 aattgagagc atcactcagc g 21
 <210> 252
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 252
 aataatagaa gaaagaata a 21
 <210> 253
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 253
 aatagaagga aagaataaga t 21
 <210> 254
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 254
 aaggaaagaa taagatggct a 21
 <210> 255

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 255
 aaagaataag atggctagca c 21
 <210> 256
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 256
 aagaataaga tgctagcac c 21

<210> 257
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 257

aataagatgg ctagcacctt g 21

<210> 258
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 258

aagatggcta gcaccttggt t 21

<210> 259
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 259

aatttctgga atctacattt g 21

<210> 260
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 260

aatctacatt tgcatagett c 21

<210> 261
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 261
 aataaagttg ggactgtggg a 21
 <210> 262
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 262
 aaagttggga ctgtgggaag a 21

 <210> 263
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 263
 aagttgggac tgtgggaaga a 21
 <210> 264
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 264
 aagaaacata agcttttata t 21
 <210> 265
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 265
 aaacataagc ttttatatca c 21
 <210> 266
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 266
 aacataagct tttatatcac a 21
 <210> 267
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 267
 aagcttttat atcacagatg t 21
 <210> 268

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 268
 aaatgggttt catgttaact t 21
 <210> 269
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 269
 aatgggtttc atgttaactt g 21
 <210> 270
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 270

 aacttgaaa aaatgccgac g 21
 <210> 271

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 271
 aaaaaatgcc gacggaagga g 21
 <210> 272
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 272
 aaaaatgccg acggaaggag a 21
 <210> 273
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 273
 aaaatgccga cggaaggaga g 21
 <210> 274
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 274
 aaatgccgac ggaaggagag g 21
 <210> 275
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 275

aatgccgacg gaaggagagg a 21

<210> 276

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 276

aaggagagga cctgaaactg t 21

<210> 277

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 277

aaactgtcct gcacagttaa c 21

<210> 278

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 278

aactgtcttg cacagttaac a 21

<210> 279

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence

<400> 279

aacaagttct tatacagaga c 21

<210> 280

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 280
 aagttcttat acagagacgt t 21
 <210> 281

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 281
 aataacagaa caatgcacta c 21
 <210> 282
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 282
 aacagaacaa tgcactacag t 21
 <210> 283
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 283
 aacaatgcac tacagtatta g 21
 <210> 284
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 284
 aatgcactac agtattagca a 21
 <210> 285
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 285
 aagcaaaaaa tggccatcac t 21
 <210> 286
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 286
 aaaaaatggc catcactaag g 21
 <210> 287
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 287
 aaaaaatggcc atcactaagg a 21
 <210> 288
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 288
 aaaatggcca tcactaagga g 21

 <210> 289
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 289
 aaatggccat cactaaggag c 21

<210> 290
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 290
 aatggccatc actaaggagc a 21
 <210> 291
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 291
 aaggagcact ccatcactct t 21
 <210> 292
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 292
 aatcttacca tcatgaatgt t 21
 <210> 293
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 293
 aatgtttccc tgcaagattc a 21
 <210> 294
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 294
 aagattcagg cacctatgcc t 21
 <210> 295
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 295
 aatgtataca caggggaaga a 21
 <210> 296
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 296

 aagaaatcct ccagaagaaa g 21
 <210> 297
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 297
 aaatcctcca gaagaaagaa a 21
 <210> 298
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 298
 aatcctccag aagaaagaaa t 21
 <210> 299
 <211> 21

 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 299
 aagaaagaaa ttacaatcag a 21
 <210> 300
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 300
 aaagaaatta caatcagaga t 21
 <210> 301
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 301
 aagaaattac aatcagagat c 21
 <210> 302
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 302
 aaattacaat cagagatcag g 21
 <210> 303
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 303
 aattacaatc agagatcagg a 21
 <210> 304
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 304
 aatcagagat caggaagcac c 21

<210> 305
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 305
 aagcaccata cctcctgcga a 21

<210> 306
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 306
 aaacctcagt gatcacacag t 21

<210> 307

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 307
 aacctcagtg atcacacagt 20

<210> 308
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 308
 aatggtgtcc ccgagcctca g 21

<210> 309
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 309

 aaaaacaacc aaaaataca a 21
 <210> 310
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 310

 aaaacaacca caaatacaa c 21
 <210> 311
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 311

 aaacaaccac aaatacaac a 21
 <210> 312
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 312

 aacaaccaca aaatacaaca a 21
 <210> 313
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 313
aaccacaaaa tacaacaaga g 21

<210> 314
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 314
aaaatacaac aagagcctgg a 21

<210> 315
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 315
aaatacaaca agagcctgga a 21

<210> 316
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 316
aatacaaca gagcctggaa t 21

<210> 317
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 317
aacaagagcc tgaattatt t 21

<210> 318
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 318
 aagagcctgg aattatttta g 21
 <210> 319
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 319
 aattatttta ggaccaggaa g 21
 <210> 320

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 320
 aagcagcacg ctgtttattg a 21
 <210> 321
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 321
 aaagagtcac agaagaggat g 21
 <210> 322
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 322

 aagagtcaca gaagaggatg a 21
 <210> 323

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 323
 aagaggatga aggtgtctat c 21
 <210> 324
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 324
 aaggtgtcta tctactgcaaa g 21
 <210> 325
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 325
 aaagccacca accagaaggg c 21
 <210> 326
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 326
 aagccaccaa ccagaaggc t 21
 <210> 327
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 327

aaccagaagg gctctgtgga a 21

<210> 328
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 328

aagggtcttg tggaaagttc a 21

<210> 329
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 329

aaagttcagc atacctcact g 21

<210> 330
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 330

aagttcagca tacctcactg t 21

<210> 331
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 331

aaggaacctc ggacaagtct a 21

<210> 332
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 332
 aacctcggac aagtctaatt t 21
 <210> 333

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 333
 aagtctaatt tggagctgat c 21
 <210> 334
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 334
 aatctggagc tgatcactct a 21
 <210> 335
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 335

 aacatgcacc tgtgtggctg c 21
 <210> 336
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 336
 aacctctttt atccgaaaaa t 21
 <210> 337
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 337
 aaaaatgaaa aggtcttctt c 21
 <210> 338
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 338
 aaaatgaaaa ggtcttcttc t 21
 <210> 339
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 339
 aaatgaaaag gtcttcttct g 21
 <210> 340
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 340
 aatgaaaagg tcttcttctg a 21

 <210> 341
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 341
 aaaaggtctt ctctgaaat a 21

<210> 342
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 342
 aaaggtcttc ttctgaaata a 21
 <210> 343
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 343
 aaggtcttct tctgaaataa a 21
 <210> 344
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 344
 aaataaagac tgactaccta t 21
 <210> 345
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 345
 aataaagact gactacctat c 21
 <210> 346
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 346
 aaagactgac tacctatcaa t 21
 <210> 347
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 347
 aagactgact acctatcaat t 21
 <210> 348
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 348

 aattataatg gaccagatg a 21
 <210> 349
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 349
 aatggaccca gatgaagttc c 21
 <210> 350
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 350
 aagttccttt ggatgagcag t 21
 <210> 351
 <211> 21

 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 351
 aagtgggagt ttgcccgga g 21
 <210> 352
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 352
 aaactgggca aatcacttgg a 21
 <210> 353
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 353
 aactgggcaa atcacttga a 21
 <210> 354
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 354
 aaatcacttg gaagaggggc t 21
 <210> 355
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 355
 aatcacttgg aagagggct t 21
 <210> 356
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 356
 aagaggggct tttgaaaag t 21

<210> 357
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 357
 aaaagtgggt caagcatcag c 21

<210> 358
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 358
 aaagtgggtc aagcatcagc a 21

<210> 359

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 359
 aagtggttca agcatcagca t 21

<210> 360
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 360
 aagcatcagc atttgcatt a 21

<210> 361
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 361

aagaaatcac ctacgtgccg g 21

<210> 362
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 362

aaatcaccta cgtgccggac t 21

<210> 363
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 363

aatcacctac gtgccggact g 21

<210> 364
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 364

aaaatgctga aagagggggc c 21

<210> 365
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 365
 aaatgctgaa agagggggcc a 21

<210> 366
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 366
 aatgctgaaa gagggggcca c 21

<210> 367
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 367
 aaagaggggg ccacggccag c 21

<210> 368
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 368
 aagagggggc cacggccagc g 21

<210> 369
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 369
 aaagctctga tgactgagct a 21

<210> 370
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 370
 aagctctgat gactgagcta a 21
 <210> 371
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 371
 aaaaatcttg acccacattg g 21
 <210> 372

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 372
 aaaatcttga cccacattgg c 21
 <210> 373
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 373
 aaatcttgac ccacattggc c 21
 <210> 374
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 374

 aatcttgacc cacattggcc a 21
 <210> 375

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 375
 aacgtggta acctgctggg a 21
 <210> 376
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 376
 aacctgctgg gagcctgcac c 21
 <210> 377
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 377
 aagcaaggag ggcctctgat g 21
 <210> 378
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 378
 aaggaggcc tctgatgtg a 21
 <210> 379
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 379

aataactgcaa atatggaaat c 21

<210> 380
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 380

aaatatggaa atctctccaa c 21

<210> 381
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 381

aatatggaaa tctctccaac t 21

<210> 382
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 382

aaatctctcc aactacctca a 21

<210> 383
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 383

aatctctcca actacctcaa g 21

<210> 384
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 384
 aactacctca agagcaaacg t 21
 <210> 385

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 385
 aagagcaaac gtgacttatt t 21
 <210> 386
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 386
 aaacgtgact tattttttct c 21
 <210> 387
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 387

 aacgtgactt attttttctc a 21
 <210> 388
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 388
 aacaaggatg cagcactaca c 21
 <210> 389
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 389
 aaggatgcag cactacacat g 21
 <210> 390
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 390
 aagaaagaaa aaatggagcc a 21
 <210> 391
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 391
 aaagaaaaaa tggagccagg c 21
 <210> 392
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 392
 aagaaaaaat ggagccaggc c 21

 <210> 393
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 393
 aaaaaatgga gccaggcctg g 21

<210> 394
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 394
 aaaaatggag ccaggcctgg a 21
 <210> 395
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 395
 aaaatggagc caggcctgga a 21
 <210> 396
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 396
 aaatggagcc aggcctggaa c 21
 <210> 397
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 397
 aatggagcca ggcctggaac a 21
 <210> 398

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 398
aacaaggcaa gaaaccaaga c 21
<210> 399
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 399
aaggcaagaa accaagacta g 21
<210> 400
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 400

aagaaaccaa gactagatag c 21
<210> 401
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 401
aaaccaagac tagatagcgt c 21
<210> 402
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 402
aaccaagact agatagcgtc a 21
<210> 403
<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 403
 aagactagat agcgtcacca g 21
 <210> 404
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 404
 aaagctttgc gagctccggc t 21
 <210> 405
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 405
 aagctttgcg agctccggct 20
 <210> 406
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 406
 aagataaaag tctgagtgat g 21
 <210> 407
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 407
 aaaagtctga gtgatgttga g 21
 <210> 408
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 408
 aaagtctgag tgatggtgag g 21
 <210> 409
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 409
 aagtctgagt gatggtgagg a 21
 <210> 410
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 410
 aagaggagga ttctgacggt t 21
 <210> 411

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 411
 aaggagccca tcactatgga a 21
 <210> 412
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 412
 aagatctgat ttcttacagt t 21

<210>	413	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	413	
aagtggccag aggcatggag t		21
<210>	414	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	414	
aaagtgcatt catcgggacc t		21
<210>	415	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	415	
aagtgcattc atcgggacct g		21
<210>	416	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	
<400>	416	
aaacattctt ttatctgaga a		21
<210>	417	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Targeting sequence	

<400> 417
 aacattcttt tatctgagaa c 21
 <210> 418
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 418
 aacaacgtgg tgaagattg t 21

 <210> 419
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 419
 aacgtggtga agatttgtga t 21
 <210> 420
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 420
 aagatttgtg atttgacct t 21
 <210> 421
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 421
 aagaaccccg attatgtgag a 21
 <210> 422
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 422
 aaccccgatt atgtgagaaa a 21
 <210> 423
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 423
 aaaaggagat actcgacttc c 21
 <210> 424

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 424
 aaaggagata ctcgacttcc t 21
 <210> 425
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 425
 aaggagatac tcgacttct c 21
 <210> 426
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 426

 aatggatgg ctctgaatc t 21
 <210> 427

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 427
 aatggatggc tctgaatct a 21
 <210> 428
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 428
 aatctatctt tgacaaaatc t 21
 <210> 429
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 429
 aaaatctaca gcaccaagag c 21
 <210> 430
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 430
 aaatctacag caccaagagc g 21
 <210> 431
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 431

aatctacagc accaagagcg a 21

<210> 432
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 432

aagagcgacg tgtggtctta c 21

<210> 433
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 433

aaatcttctc cttaggtggg t 21

<210> 434
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 434

aatcttctcc ttaggtgggt c 21

<210> 435
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 435

aaatggatga ggacttttgc a 21

<210> 436
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 436
 aatggatgag gacttttgca g 21
 <210> 437

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 437
 aaggcatgag gatgagagct c 21
 <210> 438
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 438
 aaatctatca gatcatgctg g 21
 <210> 439
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 439

 aatctatcag atcatgctgg a 21
 <210> 440
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 440
 aaaagaaagg ccaagatttg c 21
 <210> 441
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 441
 aaagaaggc caagattgc a 21
 <210> 442
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 442
 aagaaaggcc aagattgca g 21
 <210> 443
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 443
 aaagccaag attgcagaa c 21
 <210> 444
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 444
 aaggccaaga ttgcagaac t 21

 <210> 445
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 445
 aagattgca gaacttggtg a 21

<210> 446
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 446
 aacttgtagg aaaactaggt g 21
 <210> 447
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 447
 aaaaactagg tgatttgctt c 21
 <210> 448
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 448
 aaaactaggt gatttgcttc a 21
 <210> 449
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 449
 aaactaggtg atttgcttca a 21
 <210> 450

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 450
aactaggtga tttgcttcaa g 21

<210> 451
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 451
aagcaaatgt acaacaggat g 21

<210> 452
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 452

aaatgtacaa caggatggta a 21

<210> 453
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 453

aatgtacaac aggatggtaa a 21

<210> 454
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 454

aacaggatgg taaagactac a 21

<210> 455
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 455
 aaagactaca tccaatcaa t 21
 <210> 456
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 456
 aagactacat cccaatcaat g 21
 <210> 457
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 457
 aatcaatgcc atactgacag g 21
 <210> 458
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 458
 aatgccatac tgacaggaaa t 21
 <210> 459
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 459
 aaatagtggg ttacatact c 21
 <210> 460
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 460
 aatagtgggt ttacatactc a 21
 <210> 461
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 461
 aactcctgcc ttctctgagg a 21
 <210> 462
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 462
 aaggaaagta tttcagctcc g 21
 <210> 463

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 463
 aaagtatttc agctccgaag t 21
 <210> 464
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 464
 aagtatttca gctccgaagt t 21

<210> 465
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 465

 aagtttaatt caggaagctc t 21
 <210> 466
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 466

 aattcaggaa gctctgatga t 21
 <210> 467
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 467

 aagctctgat gatgcagat a 21
 <210> 468
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 468

 aaatgctttc aagttcatga g 21
 <210> 469
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 469
 aatgctttca agttcatgag c 21
 <210> 470
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 470
 aagttcatga gcctggaag a 21

 <210> 471
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 471
 aaagaatcaa aacctttgaa g 21
 <210> 472
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 472
 aagaatcaaa acctttgaag a 21
 <210> 473
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 473
 aatcaaaacc tttgaagaac t 21
 <210> 474
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 474
 aaaacctttg aagaactttt a 21
 <210> 475
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 475
 aaacctttga agaactttta c 21
 <210> 476

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 476
 aacctttgaa gaacttttac c 21
 <210> 477
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 477
 aagaactttt accgaatgcc a 21
 <210> 478
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 478

 aacttttacc gaatgccacc t 21
 <210> 479

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 479
 aatgccacct ccatgtttga t 21
 <210> 480
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 480
 aaaccaagg cctcgctcaa g 21
 <210> 481
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 481
 aaaccaagg cctcgctcaa g 21
 <210> 482
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 482
 aaccaaggc ctcgctcaag a 21
 <210> 483
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 483

aaggcctcgc tcaagattga c 21

<210> 484
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 484

aagattgact tgagagtaac c 21

<210> 485
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 485

aaccagtaaa agtaaggagt c 21

<210> 486
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 486

aaaagtaagg agtcggggct g 21

<210> 487
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 487

aaagtaagga gtcggggctg t 21

<210> 488
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 488
 aagtaaggag tcggggctgt c 21
 <210> 489

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 489
 aaggagtcgg ggctgtctga t 21
 <210> 490
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 490
 aaggcaagcg caggttcacc t 21
 <210> 491
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 491

 gcaccagca catcatgcaa g 21
 <210> 492
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 492
 ggctgagcat aactaaatct g 21
 <210> 493
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 493
 gcttctacag ctgcaaatat c 21
 <210> 494
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 494
 gagctcgtca ttcctgccg g 21
 <210> 495
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 495
 ccaaagcaat tcccatgcc a 21
 <210> 496
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 496
 tgctgagcat aaaacagtca a 21

 <210> 497
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 497
 ttgcatagct tccaataag t 21

<210> 498
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 498
 agtgatcaca cagtggccat c 21
 <210> 499
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 499
 gatgaagttc cttggatga g 21
 <210> 500
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 500
 tacacatgga gcctaagaaa g 21
 <210> 501
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 501
 gagctccggc tttcaggaag a 21
 <210> 502
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 502
tctacagcac caagagcgac g 21

<210> 503
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 503
tctgatgatg tcagatatgt a 21

<210> 504
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 504

gcctcgctca agattgactt g 21

<210> 505
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 505
aaaaagacat acttacaatt a 21

<210> 506
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 506
aaaagacata cttacaatta a 21

<210> 507
<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 507
 aaagacatac ttacaattaa g 21
 <210> 508
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 508
 aagacatact tacaattaag g 21
 <210> 509
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 509
 aattaaggct aatacaactc t 21
 <210> 510
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 510
 aaggctaata caactcttca a 21
 <210> 511
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 511
 aatacaactc ttcaaattac t 21
 <210> 512
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 512
 aactcttcaa attacttgca g 21

<210> 513
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 513
 aaattacttg caggggacag a 21

<210> 514
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 514
 aattacttgc aggggacaga g 21

<210> 515

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 515
 aataatcaga gtggcagtga g 21

<210> 516
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 516
 aatcagagtg gcagtgagca a 21

<210> 517
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 517

aaagggtgga ggtgactgag t 21

<210> 518
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 518

aagggtggag gtgactgagt g 21

<210> 519
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 519

aagacactca caattccaaa a 21

<210> 520
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 520

aattccaaaa gtgatcgaa a 21

<210> 521
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 521
aaaagtgatc gaaatgaca c 21

<210> 522
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 522
aaagtgatcg gaaatgacac t 21

<210> 523
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 523
aagtgatcgg aaatgacact g 21

<210> 524
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 524
aaatgacact ggagcctaca a 21

<210> 525
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 525
aatgacactg gagcctacaa g 21

<210> 526
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 526
 aagtgttctt accgggaaac t 21
 <210> 527
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 527
 aaactgactt ggcctcggtc a 21
 <210> 528

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 528
 aactgacttg gcctcggtca t 21
 <210> 529
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 529
 aagattacag atctccattt a 21
 <210> 530
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 530

 aacatggagt cgtgtacatt a 21
 <210> 531

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 531
 aacaaaaaca aaactgtggt g 21
 <210> 532
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 532
 aaaaacaaaa ctgtggtgat t 21
 <210> 533
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 533
 aaaacaaaac tgtggtgatt c 21
 <210> 534
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 534
 aaacaaaact gtggtgattc c 21
 <210> 535
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 535

aacaaaactg tggtgattcc a 21

<210> 536
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 536

aaaactgtgg tgattccatg t 21

<210> 537
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 537

aaactgtggt gattccatgt c 21

<210> 538
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 538

aactgtggtg attccatgtc t 21

<210> 539
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 539

aaatctcaac gtgtcacttt g 21

<210> 540
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 540
 aatctcaacg tgcactttg t 21
 <210> 541

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 541
 aacgtgtcac tttgtgcaag a 21
 <210> 542
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 542
 aagataccca gaaaagagat t 21
 <210> 543
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 543

 aaaagagatt tgttctgat g 21
 <210> 544
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 544
 aaagagattt gttctgatg g 21
 <210> 545
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 545
 aagagatttg ttctgatgg t 21
 <210> 546
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 546
 aacagaattt cctgggacag c 21
 <210> 547
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 547
 aatttcttg gacagcaaga a 21
 <210> 548
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 548
 aagaagggt ttactattcc c 21

 <210> 549
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 549
 aagggttta ctattccag c 21

<210> 550
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 550
 aagcaaaaat taatgatgaa a 21
 <210> 551
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 551
 aaaaattaat gatgaaagtt a 21
 <210> 552
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 552
 aaaattaatg atgaaagtta c 21
 <210> 553
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 553
 aaattaatga tgaagttac c 21
 <210> 554
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 554
aattaatgat gaaagttacc a 21
<210> 555
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 555
aatgatgaaa gttaccagtc t 21
<210> 556
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 556

aaagttacca gtctattatg t 21
<210> 557
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 557
aagttaccag tctattatgt a 21
<210> 558
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 558
aattgaacta tctgttgag a 21
<210> 559
<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 559
 aactatctgt tggagaaaag c 21
 <210> 560
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 560
 aaaagcttgt cttaaattgt a 21
 <210> 561
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 561
 aaagcttgtc ttaaattgta c 21

 <210> 562
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 562
 aagcttgctt taaattgtac a 21
 <210> 563
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 563
 aaattgtaca gcaagaactg a 21
 <210> 564
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 564
 aattgtacag caagaactga a 21

<210> 565
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 565
 aagaactgaa ctaaattggg g 21

<210> 566
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 566
 aactgaacta aatgtgggga t 21

<210> 567

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 567
 aactaaatgt ggggattgac t 21

<210> 568
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 568
 aaatgtgggg attgacttca a 21

<210> 569
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 569

aatgtgggga ttgacttcaa c 21

<210> 570
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 570

aactgggaat acccttcttc g 21

<210> 571
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 571

aataccttc ttcgaagcat c 21

<210> 572
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 572

aagcatcagc ataagaaact t 21

<210> 573
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 573
 aagaaacttg taaaccgaga c 21
 <210> 574
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 574
 aaacttgtaa accgagacct a 21

 <210> 575
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 575
 aacttgtaaa ccgagaccta a 21
 <210> 576
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 576
 aaaccgagac ctaaaaaccc a 21
 <210> 577
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 577
 aaccgagacc taaaaccca g 21
 <210> 578
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 578
 aaaaaccag tctgggagtg a 21
 <210> 579
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 579
 aaaaccagt ctgggagtga g 21
 <210> 580

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 580
 aaaccagtc tgggagtgag a 21
 <210> 581
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 581
 aaccagtct gggagtgaga t 21
 <210> 582
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 582

 aagaaat ttt tgacacctt a 21
 <210> 583

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 583
 aaatttttga gcaccttaac t 21
 <210> 584
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 584
 aatttttgag caccttaact a 21
 <210> 585
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 585
 aactatagat ggtgtaacc g 21
 <210> 586
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 586
 aaccggagt gaccaaggat t 21
 <210> 587
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 587

aaggattgta cacctgtgca g 21

<210> 588
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 588

aagaagaaca gcacatttgt c 21

<210> 589
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 589

aagaacagca catttgtcag g 21

<210> 590
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 590

aacagcacat ttgtcagggt c 21

<210> 591
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 591

aaaaaccttt tgttgctttt g 21

<210> 592
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 592
 aaaacctttt gttgcttttg g 21
 <210> 593

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 593
 aaaccttttg ttgcttttgg a 21
 <210> 594
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 594
 aaccttttgt tgccttttga a 21
 <210> 595
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 595

 aagtggcatg gaatctctgg t 21
 <210> 596
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 596
 aatctctggt ggaagccacg g 21
 <210> 597
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 597
 aagccacggt gggggagcgt g 21
 <210> 598
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 598
 aatccctgcg aagtaccttg g 21
 <210> 599
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 599
 aagtaccttg gttaccacc c 21
 <210> 600
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 600
 aaataaatg gtataaaaat g 21

 <210> 601
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 601
 aataaaatgg tataaaaatg g 21

<210> 602
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 602
 aaaatggtat aaaaatggaa t 21
 <210> 603
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 603
 aaatggtata aaaaatggaat a 21
 <210> 604
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 604
 aatggtataa aaatggaata c 21
 <210> 605
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 605
 aaaaatggaa tacccttga g 21
 <210> 606
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 606
 aaaatggaat accccttgag t 21
 <210> 607
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 607
 aaatggaata cccttgagt c 21
 <210> 608
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 608

 aatggaatac cccttgagtc c 21
 <210> 609
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 609
 aataccctt gagtccaatc a 21
 <210> 610
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 610
 aatcacacaa ttaaagcggg g 21
 <210> 611
 <211> 21

 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 611
 aattaaagcg gggcatgtac t 21
 <210> 612
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 612
 aaagcggggc atgtactgac g 21
 <210> 613
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 613
 aagcggggca tgtactgacg a 21

 <210> 614
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 614
 aagtgagtga aagagacaca g 21
 <210> 615
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 615
 aaagagacac aggaaattac a 21
 <210> 616
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 616
 aagagacaca gaaattaca c 21

<210> 617
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 617
 aaattacact gtcaccta c 21

<210> 618
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 618
 aattacactg tcaccttac c 21

<210> 619

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 619
 aatccattt caaaggagaa g 21

<210> 620
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 620
 aaaggagaag cagagccatg t 21

<210> 621
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 621

 aaggagaagc agagccatgt g 21
 <210> 622
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 622

 aagcagagcc atgtggtctc t 21
 <210> 623
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 623

 aaatctctaa tctctcctgt g 21
 <210> 624
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 624

 aatctetaat ctctcctgtg g 21
 <210> 625
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 625
aatctctcct gtggattcct a 21

<210> 626
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 626
aaacgctgac atgtacggtc t 21

<210> 627
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 627
aacgctgaca tgtacggtct a 21

<210> 628
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 628
aagagtgcgc caacgagccc a 21

<210> 629
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 629
aacgagccca gccaaactgt c 21

<210> 630
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 630
 aagctgtctc agtgacaaac c 21
 <210> 631
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 631
 aaaccatac cctgtgaag a 21
 <210> 632
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 632
 aaccatacc cttgtgaaga a 21
 <210> 633
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 633
 aagaatggag aagtgtggag g 21
 <210> 634
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 634
 atggagaag tgtggaggac t 21
 <210> 635

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 635
 aagtgtggag gacttccagg g 21
 <210> 636
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 636
 aaataaaatt gaagttaata a 21
 <210> 637
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 637
 aataaaattg aagttaataa a 21
 <210> 638
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 638
 aaaattgaag ttaataaaaa t 21
 <210> 639
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 639

aaattgaagt taataaaaat c 21

<210> 640
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 640

aattgaagtt aataaaaatc a 21

<210> 641
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 641

aagttaataa aaatcaattt g 21

<210> 642
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 642

aataaaaatc aatttgctct a 21

<210> 643
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 643

aaaaatcaat ttgctcta t 21

<210> 644
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 644
 aaaatcaatt tgctctaatt g 21
 <210> 645

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 645
 aaatcaattt gctctaattg a 21
 <210> 646
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 646
 aatcaatttg ctctaattga a 21
 <210> 647
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 647

 aatttgctct aattgaagga a 21
 <210> 648
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 648
 aattgaagga aaaaacaaaa c 21
 <210> 649
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 649
 aaggaaaaa caaaactgta a 21
 <210> 650
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 650
 aaaaaacaaa actgtaagta c 21
 <210> 651
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 651
 aaaaacaaaa ctgtaagtac c 21
 <210> 652
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 652
 aaaacaaaac tgtaagtacc c 21

 <210> 653
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 653
 aaacaaaact gtaagtacc t 21

<210> 654
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 654
 aacaaaactg taagtacct t 21
 <210> 655
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 655
 aaaactgtaa gtacccttgt t 21
 <210> 656
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 656
 aaactgtaag tacccttggt a 21
 <210> 657
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 657
 aactgtaagt acccttggtt t 21
 <210> 658
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 658
aagtaccctt gttatccaag c 21
<210> 659
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 659
aagcggcaaa tgtgtcagct t 21
<210> 660
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 660

aaatgtgtca gctttgtaca a 21
<210> 661
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 661
aatgtgtcag ctttgtacaa a 21
<210> 662
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 662
aaatgtgaag cggtaacaa a 21
<210> 663
<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 663
 aatgtgaagc ggtcaacaaa g 21
 <210> 664
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 664
 aagcgggtcaa caaagtcggg a 21
 <210> 665
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 665
 aacaaagtgc ggagaggaga g 21
 <210> 666
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 666
 aaagtcggga gaggagagag g 21
 <210> 667
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 667
 aagtcgggag aggagagagg g 21
 <210> 668
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 668
 aaattacttt gcaacctgac a 21
 <210> 669
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 669
 aattactttg caacctgaca t 21
 <210> 670
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 670
 aacctgacat gcagcccact g 21
 <210> 671

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 671
 aacctcacat ggtacaagct t 21
 <210> 672
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 672
 aagcttggcc cacagcctct g 21

<210> 673
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 673

aatccatgtg ggagagttgc c 21

<210> 674
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 674

aagaacttgg atactctttg g 21

<210> 675
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 675

aacttggata ctctttggaa a 21

<210> 676
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 676

aaattgaatg ccaccatgtt c 21

<210> 677
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 677
aattgaatgc caccatgttc t 21

<210> 678
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 678
aatgccacca tgttctctaa t 21

<210> 679
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 679
aatagcacia atgacatttt g 21

<210> 680
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 680
aaatgacatt ttgatcatgg a 21

<210> 681
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 681
aatgacattt tgatcatgga g 21

<210> 682
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 682
 aagaatgcat ccttcagga c 21
 <210> 683
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 683
 aatgcatcct tgcaggacca a 21
 <210> 684

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 684
 aaggagacta tgtctgcctt g 21
 <210> 685
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 685
 aagacaggaa gaccaagaaa a 21
 <210> 686
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 686

 aagaccaaga aaagacattg c 21
 <210> 687

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 687
 aagaaaagac attgcgtggt c 21
 <210> 688
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 688
 aaaagacatt gcgtggtcag g 21
 <210> 689
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 689
 aaagacattg cgtggtcagg c 21
 <210> 690
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 690
 aagacattgc gtggtcaggc a 21
 <210> 691
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 691

aaacctggag aatcagacga c 21

<210> 692
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 692

aacctggaga atcagacgac a 21

<210> 693
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 693

aatcagacga caagtattgg g 21

<210> 694
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 694

aagtattggg gaaagcatcg a 21

<210> 695
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 695

aaagcatcga agtctcatgc a 21

<210> 696
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 696
 aagcatcgaa gtctcatgca c 21
 <210> 697

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 697
 aatccccctc cacagatcat g 21
 <210> 698
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 698
 aaagataatg agacccttgt a 21
 <210> 699
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 699

 aagataatga gacccttgta g 21
 <210> 700
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 700
 aatgagacce ttgtagaaga c 21
 <210> 701
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 701
 aagactcagg cattgtattg a 21
 <210> 702
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 702
 aaggatggga accggaacct c 21
 <210> 703
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 703
 aaccggaacc tcactatccg c 21
 <210> 704
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 704
 aacctcacta tccgagagt g 21

 <210> 705
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 705
 aaggaggacg aaggcctcta c 21

<210> 706
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 706
 aaggcctcta cacctgccag g 21
 <210> 707
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 707
 aaaagtggag gcatttttca t 21
 <210> 708
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 708
 aaagtggagg catttttcat a 21
 <210> 709
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 709
 aagtggaggc atttttcata a 21
 <210> 710
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 710
aatagaaggt gccaggaaa a 21

<210> 711
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 711
aaggtgccca ggaaaagacg a 21

<210> 712
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 712

aaaagacgaa cttggaaatc a 21

<210> 713
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 713

aaagacgaac ttggaaatca t 21

<210> 714
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 714

aagacgaact tggaaatcat t 21

<210> 715
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 715
 aacttgaaa tcattattct a 21
 <210> 716
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 716
 aaatcattat tctagtaggc a 21
 <210> 717
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 717
 aatcattatt ctagtaggca c 21
 <210> 718
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 718
 aagcgggcca atggagggga a 21
 <210> 719
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 719
 aatggagggg aactgaagac a 21
 <210> 720
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 720
 aactgaagac aggctacttg t 21

<210> 721
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 721
 aagacaggct actgtccat c 21

<210> 722
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 722
 aactccatt ggatgaacat t 21

<210> 723
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 723
 aacattgtga acgactgcct t 21

<210> 724
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 724
 aacgactgcc ttatgatgcc a 21

<210> 725
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 725

 aaatgggaat tccccagaga c 21
 <210> 726
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 726

 aatgggaatt ccccagagac c 21
 <210> 727
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 727

 aattccccag agaccggctg a 21
 <210> 728
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 728

 aagctaggta agcctcttgg c 21
 <210> 729
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 729
aagcctcttg gccgtggtgc c 21

<210> 730
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 730
aagtgattga agcagatgcc t 21

<210> 731
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 731
aagcagatgc ctttgaatt g 21

<210> 732
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 732
aattgacaag acagcaactt g 21

<210> 733
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 733
aagacagcaa cttgcaggac a 21

<210> 734
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 734
 aacttgcagg acagtagcag t 21
 <210> 735
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 735
 aaaatgttga aagaaggagc a 21
 <210> 736
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 736
 aaatgttgaa agaaggagca a 21
 <210> 737
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 737
 aatgttgaaa gaaggagcaa c 21
 <210> 738
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 738
 aaagaaggag caacacacag t 21
 <210> 739

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 739
 aagaaggagc aacacacagt g 21
 <210> 740
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 740
 aaggagcaac acacagtgag c 21
 <210> 741
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 741
 aacacacagt gagcatcgag c 21
 <210> 742
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 742
 aactcaagat cctcattcat a 21
 <210> 743
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 743

aagatcctca ttcatttgg t 21

<210> 744
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 744

aatgtgtca accttctagg t 21

<210> 745
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 745

aaccttctag gtgctgtac c 21

<210> 746
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 746

aagccaggag ggccactcat g 21

<210> 747
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 747

aattctgcaa atttgaaac c 21

<210> 748
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 748
 aaatttggaacacctgtccac t 21
 <210> 749

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 749
 aatttggaacacctgtccac t 21
 <210> 750
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 750
 aaacctgtccaccttacctgag g 21
 <210> 751
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 751

 aacctgtccaccttacctgag g 21
 <210> 752
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 752
 aagagaaatgaattgtccc c 21
 <210> 753
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 753
 aaatgaattt gtcccctaca a 21
 <210> 754
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 754
 aatgaatttg tcccctacaa g 21
 <210> 755
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 755
 aatttgtccc ctacaagacc a 21
 <210> 756
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 756
 aagaccaag gggcacgatt c 21

 <210> 757
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 757
 aaagggcac gattccgtca a 21

<210> 758
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 758
 aaggggcacg attccgtcaa g 21
 <210> 759
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 759
 aagggaaaga ctacgttggg g 21
 <210> 760
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 760
 aaagactacg ttggagcaat c 21
 <210> 761
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 761
 aagactacgt tggagcaatc c 21
 <210> 762

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 762
 aatccctgtg gatctgaaac g 21
 <210> 763
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 763
 aaacggcgct tggacagcat c 21
 <210> 764
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 764

 aacggcgctt ggacagcatc a 21
 <210> 765
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 765
 aagtcctca gtgatgtaga a 21
 <210> 766
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 766
 aagaagagga agtcctgaa g 21
 <210> 767
 <211> 21

 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 767
 aagaggaagc tcctgaagat c 21
 <210> 768
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 768
 aagctcctga agatctgtat a 21
 <210> 769
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 769
 aagatctgta taaggacttc c 21

 <210> 770
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 770
 aaggacttcc tgaccttgga g 21
 <210> 771
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 771
 aagtggctaa gggcatggag t 21
 <210> 772
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 772
 aagggcatgg agttcttggc a 21

<210> 773
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 773
 aaagtgtatc cacagggacc t 21

<210> 774
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 774
 aagtgtatcc acagggacct g 21

<210> 775

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 775
 aaatcctc ttatcggaga a 21

<210> 776
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 776
 aatcctct t atcggagaa g 21

<210> 777
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 777

 aatatacctct tatcggagaa g 21
 <210> 778
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 778

 aagaacgtgg ttaaaatctg t 21
 <210> 779
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 779

 aacgtggtta aaatctgtga c 21
 <210> 780
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 780

 aaaatctgtg actttggett g 21
 <210> 781
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 781
 aaatctgtga cttggcttg g 21
 <210> 782
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 782
 aatctgtgac tttggcttgg c 21

 <210> 783
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 783
 aaagatccag attatgtcag a 21
 <210> 784
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 784
 aagatccaga ttatgtcaga a 21
 <210> 785
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 785
 aaaaggagat gctgcctcc c 21
 <210> 786
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 786
 aaaggagatg ctgcctccc t 21
 <210> 787
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 787
 aaggagatgc tcgctccct t 21
 <210> 788

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 788
 aaatggatgg cccagaaac a 21
 <210> 789
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 789
 aatggatggc cccagaaaca a 21
 <210> 790
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 790

 aaacaatttt tgacagagtg t 21
 <210> 791

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 791
 aacaattttt gacagagtgt a 21
 <210> 792
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 792
 aatttttgac agagtgtaca c 21
 <210> 793
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 793
 aatccagagt gacgtctggt c 21
 <210> 794
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 794
 aaatattttc cttaggtgct t 21
 <210> 795
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 795

aatattttcc ttaggtgctt c 21

<210> 796
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 796

aaagattgat gaagaatttt g 21

<210> 797
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 797

aagattgatg aagaattttg t 21

<210> 798
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 798

aagaattttg taggcgattg a 21

<210> 799
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 799

aattttgtag gcgattgaaa g 21

<210> 800
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 800
 aaagaaggaa ctagaatgag g 21
 <210> 801

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 801
 aagaaggaac tagaatgagg g 21
 <210> 802
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 802
 aaggaactag aatgagggcc c 21
 <210> 803
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 803
 aactagaatg agggcccctg a 21
 <210> 804
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 804
 aatgagggcc cctgattata c 21
 <210> 805
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 805
 aaatgtacca gaccatgctg g 21
 <210> 806
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 806
 aatgtaccag accatgctgg a 21
 <210> 807
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 807
 aacatttggg aaatctcttg c 21
 <210> 808
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 808
 aaatctcttg caagctaatg c 21

 <210> 809
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 809
 aatctcttg aagctaatgc t 21

<210> 810
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 810
 aagctaatgc tcagcaggat g 21
 <210> 811
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

 <400> 811
 aatgctcagc aggatggcaa a 21
 <210> 812
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 812
 aaagactaca ttgttcttcc g 21
 <210> 813
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 813
 aagactacat tgttcttccg a 21
 <210> 814

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 814
aagaggattc tggactctct c 21
<210> 815
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 815
aagtatgtga ccccaaattc c 21
<210> 816
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 816

aaattccatt atgacaacac a 21
<210> 817
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 817
aattccatta tgacaacaca g 21
<210> 818
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence
<400> 818
aacacagcag gaatcagtca g 21
<210> 819
<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 819
 aatcagtcag tatctgcaga a 21
 <210> 820
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 820
 aacagtaagc gaaagagccg g 21
 <210> 821
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 821
 aagcgaaga gccggcctgt g 21
 <210> 822
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 822
 aaagagccgg cctgtgagt g 21
 <210> 823
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 823
 aagagccggc ctgtgagt g 21
 <210> 824
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 824
 aaaaacattt gaagatatcc c 21

<210> 825
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 825
 aaaacatttg aagatatccc g 21

<210> 826
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 826
 aaacatttga agatatcccg t 21

<210> 827

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 827
 aacatttgaa gatatcccg t 21

<210> 828
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 828
 aagatatccc gttagaagaa c 21

<210> 829
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 829

 aagaaccaga agtaaaagta a 21
 <210> 830
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 830

 aaccagaagt aaaagtaatc c 21
 <210> 831
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 831

 aagtaaaagt aatcccagat g 21
 <210> 832
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 832

 aaaagtaatc ccagatgaca a 21
 <210> 833
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence

<400> 833
aaagtaatcc cagatgacaa c 21

<210> 834
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 834
aagtaatccc agatgacaac c 21

<210> 835
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 835
aatcccagat gacaaccaga c 21

<210> 836
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 836
aaccagacgg acagtggat g 21

<210> 837
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Targeting sequence

<400> 837
aagagctgaa aactttggaa g 21

<210> 838
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 838
 aaaactttgg aagacagaac c 21
 <210> 839
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 839
 aaactttgga agacagaacc a 21
 <210> 840

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 840
 aactttgga gacagaacca a 21
 <210> 841
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 841
 aagacagaac caaattatct c 21
 <210> 842
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 842

 aaccaaatta tctccatctt t 21
 <210> 843

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 843
 aaattatctc catcttttgg t 21
 <210> 844
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 844
 aattatctcc atcttttggg g 21
 <210> 845
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 845
 aatggtgccc agcaaaagca g 21
 <210> 846
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 846
 aaaagcaggg agtctgtggc a 21
 <210> 847
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 847

aaagcagga gtctgtggca t 21

<210> 848
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 848

aagcaggag tctgtggcat c 21

<210> 849
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 849

aaggctcaa ccagacaagc g 21

<210> 850
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 850

aaaccagaca agcggctacc a 21

<210> 851
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 851

aaccagaaa gcggtacca g 21

<210> 852
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Targeting sequence
 <400> 852
 aagcggctac cagtccggat a 21
 <210> 853

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 853
 aagcagaact tttaaagctg a 21
 <210> 854
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 854
 gacatactta caattaagc t 21
 <210> 855
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 855

 gatttgttcc tgatggtaac a 21
 <210> 856
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 856
 ttttgagcac cttaactata g 21
 <210> 857
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 857
 gagccatgtg gtctctctgg t 21
 <210> 858
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 858
 ggtgatctcc ttccacgtga c 21
 <210> 859
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 859
 ggggtcaggc agctcacagt c 21
 <210> 860
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 860
 cggtgattgc catgttcttc t 21

 <210> 861
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 861
 ttctaggtgc ctgtaccaag c 21

<210> 862
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 862
 tgtatccaca gggacctggc g 21
 <210> 863
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 863
 taccagacca tgctggactg c 21
 <210> 864
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Targeting sequence
 <400> 864
 ttatctccat cttttggtgg a 21