



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0006827
(43) 공개일자 2023년01월11일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>A01K 67/027</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>C12N 15/877</i> (2010.01)
 <i>C12N 15/90</i> (2006.01) <i>C12N 5/077</i> (2010.01)
 <i>C12N 9/22</i> (2006.01) <i>C12Q 1/6888</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 14/70596</i> (2013.01)
 <i>A01K 67/0276</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7038847</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년05월04일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년11월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/GB2021/051060</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/224599
 국제공개일자 2021년11월11일</p> <p>(30) 우선권주장
 63/020,128 2020년05월05일 미국(US)
 63/021,370 2020년05월07일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 제너스 피엘씨
 영국 알쥐21 4에이취쥐 햄프셔, 베이싱 뷰 베이싱
 스토크, 벨베테레 하우스</p> <p>(72) 발명자
 시건, 앤드류 마크
 미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
 제너스 피엘씨 내
 라이트너, 조나단 에드워드
 미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
 제너스 피엘씨 내
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 공병욱</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 CD163의 표적 불활화를 통한 돼지 종의 건강 개선 방법

(57) 요약

본 개시내용은 *Sus scrofa* 종의 동물을 비롯한 동물에서 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSv)의 예방에 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 교시는 CD163 유전자의 적어도 하나의 대립유전자가 불활성화된 돼지, 및 CD163 유전자를 불활성화시키기 위한 유전자 편집에 사용되는 특정 방법 및 핵산 서열에 관한 것이다. CD163 유전자의 두 대립유전자가 모두 비활성화된 돼지는 PRRSv (porcine reproductive and respiratory syndrome virus)에 저항성이 있다. 동형접합 CD163 편집 유전자로 구성된 엘리트 계통(Elite lines)은 우수한 특성을 유지한다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/1138 (2013.01)
C12N 15/8778 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 5/0656 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2320/34 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

컬버슨, 매튜 스콧

미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
제너스 피엘씨 내

크리스찬슨, 윌리엄 토마스

미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
제너스 피엘씨 내

메튼, 벤자민

미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
제너스 피엘씨 내

버거, 브라이언

미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
제너스 피엘씨 내

반스, 딜런

미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
제너스 피엘씨 내

캠벨, 매튜

미국 위스콘신 53532 드포레스트 리버 로드 1525
제너스 피엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

*Sus scrofa*에서 PRRSV 저항성을 부여하도록 편집된 CD163 유전자로서, 편집된 유전자는 엑손 7을 절단하고 편집된 유전자는 서열번호 426 내지 458 및 520 내지 555로 이루어진 군으로부터 선택되는 복구된 지놈 서열을 포함하는, 편집된 CD163 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 편집은 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 237 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 230 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 237 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 229 및 261, 서열번호 230 및 261, 서열번호 231 및 261, 서열번호 237 및 261, 서열번호 241 및 261, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 219 및 258, 서열번호 221 및 258, 서열번호 224 및 258, 서열번호 227 및 258, 서열번호 219 및 261, 서열번호 221 및 261, 서열번호 224 및 261, 서열번호 227 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 서열번호 250 및 258, 서열번호 249 및 261, 및 서열번호 250 및 261으로 이루어진 군으로부터 선택되는 엑손 7 절단 부위에 대한 한 쌍의 가이드RNA(gRNAs)를 사용하여 생성된 것인, 편집된 CD163 유전자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 편집은 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 227 및 258, 서열번호 221 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 및 서열번호 249 및 261으로 이루어진 군으로부터 선택되는 엑손 7 절단 부위에 대한 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성되는, 편집된 CD163 유전자.

청구항 4

제1항에 있어서, 복구된 지놈 서열은 서열번호 453에 기재된 것인, 편집된 CD163 유전자.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 편집은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 사용하여 생성된 것인, 편집된 CD163 유전자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 복구된 지놈 서열은 서열번호 453에 기재되고 상기 편집은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 사용하여 생성되는 것인, 편집된 CD163 유전자.

청구항 7

제1항 내지 6항 중 어느 한 항의 CD163 유전자를 포함하는 *Sus scrofa* 세포.

청구항 8

제7항에 따른 복수의 세포를 포함하는 세포주.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 세포주는 섬유아세포 세포주인 것인, 세포주.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 세포는 PIC line 2, PIC line 3, PIC line 15, PIC line 19, PIC line 27, PIC line 62, 또는 PIC line 65에서 유래된 것인, 세포.

청구항 11

*Sus scrofa*에서 PRRSV 저항성을 부여하도록 편집된 CD163 유전자로서, 상기 편집은 서열번호 506 내지 517로 이루어진 군으로부터 선택되는 예측된 엑손 7 아미노산 서열을 야기하는 정지 코돈을 생성하는 것인, CD163 유전자.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 편집은 서열번호 351 및 365, 서열번호 351 및 387, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 348 및 395, 서열번호 352 및 365, 서열번호 352 및 387, 서열번호 352 및 399, 서열번호 353 및 365, 서열번호 353 및 387, 서열번호 353 및 399, 서열번호 354 및 390, 서열번호 354 및 388, 서열번호 354 및 395, 서열번호 358 및 361, 서열번호 358 및 362, 서열번호 358 및 368, 서열번호 358 및 384, 서열번호 358 및 394, 서열번호 358 및 399, 서열번호 359 및 390, 서열번호 359 및 388, 서열번호 359 및 395, 서열번호 360 및 368, 서열번호 360 및 384, 서열번호 360 및 389, 서열번호 360 및 394, 서열번호 360 및 397, 서열번호 361 및 365, 서열번호 361 및 387, 서열번호 362 및 390, 서열번호 362 및 388, 서열번호 362 및 395, 서열번호 364 및 365, 서열번호 364 및 387, 서열번호 364 및 399, 서열번호 365 및 368, 서열번호 365 및 384, 서열번호 365 및 389, 서열번호 365 및 394, 서열번호 365 및 397, 서열번호 366 및 368, 서열번호 366 및 384, 서열번호 366 및 389, 서열번호 366 및 394, 및 서열번호 366 및 397로 이루어진 군으로부터 선택되는 gRNA를 사용하여 생성되는 것인, CD163 유전자.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 편집은 서열번호 351 및 365, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 354 및 390, 서열번호 358 및 394, 서열번호 362 및 390, 및 서열번호 366 및 394로 이루어진 군으로부터 선택된 gRNA를 사용하여 생성되는 것인, CD163 유전자.

청구항 14

제11항에 있어서, 복구된 유전자가 서열번호 459 내지 504로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것인, CD163 유전자

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 CD163 엑손 7의 예측된 아미노산 서열은 서열번호 513에 기재된 것인, CD163 유전자.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 복구된 유전자가 서열번호 489에 기재된 핵산 서열을 갖는 것인, CD163 유전자.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 편집은 서열번호 362 및 390에 기재된 서열을 사용하여 생성된 것인, CD163 유전자.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 유전자의 예측된 아미노산 서열은 서열번호 513에 기재되고, 상기 복구된 유전자는 서열번호 489에 기재된 핵산 서열을 가지며, 상기 편집은 서열번호 362 및 390에 기재된 서열을 사용하여 생성된 것인, CD163 유전자.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 CD163 유전자를 포함하는 *Sus scrofa* 세포.

청구항 20

제19항에 따른 복수의 세포를 포함하는 세포주.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 세포주가 섬유아세포 세포주인 것인, 세포주.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 세포는 PIC line 2, PIC line 3, PIC line 15, PIC line 19, PIC line 27, PIC line 62, 또는 PIC line 65에서 유래된 것인, 세포.

청구항 23

서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 237 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 230 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 237 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 229 및 261, 서열번호 230 및 261, 서열번호 231 및 261, 서열번호 237 및 261, 서열번호 241 및 261, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 219 및 258, 서열번호 221 및 258, 서열번호 224 및 258, 서열번호 227 및 258, 서열번호 219 및 261, 서열번호 221 및 261, 서열번호 224 및 261, 서열번호 227 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 서열번호 250 및 258, 서열번호 249 및 261, 서열번호 250 및 261, 서열번호 351 및 365, 서열번호 351 및 387, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 348 및 395, 서열번호 352 및 365, 서열번호 352 및 387, 서열번호 352 및 399, 서열번호 353 및 365, 서열번호 353 및 387, 서열번호 353 및 399, 서열번호 354 및 390, 서열번호 354 및 388, 서열번호 354 및 395, 서열번호 358 및 361, 서열번호

358 및 362, 서열번호 358 및 368, 서열번호 358 및 384, 서열번호 358 및 394, 서열번호 358 및 399, 서열번호 359 및 390, 서열번호 359 및 388, 서열번호 359 및 395, 서열번호 360 및 368, 서열번호 360 및 384, 서열번호 360 및 389, 서열번호 360 및 394, 서열번호 360 및 397, 서열번호 361 및 365, 서열번호 361 및 387, 서열번호 362 및 390, 서열번호 362 및 388, 서열번호 362 및 395, 서열번호 364 및 365, 서열번호 364 및 387, 서열번호 364 및 399, 서열번호 365 및 368, 서열번호 365 및 384, 서열번호 365 및 389, 서열번호 365 및 394, 서열번호 365 및 397, 서열번호 366 및 368, 서열번호 366 및 384, 서열번호 366 및 389, 서열번호 366 및 394, 및 서열번호 366 및 397로 이루어진 군으로부터 선택되는 *Sus scrofa* CD163 유전자를 편집하기 위한 한 쌍의 gRNA.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 gRNA의 쌍이 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 227 및 258, 서열번호 221 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 서열번호 249 및 261, 서열번호 351 및 365, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 354 및 390, 서열번호 358 및 394, 서열번호 362 및 390, 및 서열번호 366 및 394으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, gRNA의 쌍.

청구항 25

제23항 내지 제24항 중 어느 한 항의 gRNA 쌍을 포함하는, *Sus scrofa*의 CD163 유전자를 편집하기 위한 CRISPR 복합체.

청구항 26

제23항 내지 제24항 중 어느 한 항의 gRNA 쌍을 포함하는 CRISPR-CAS 복합체를 사용하는 것을 포함하는, *Sus scrofa*의 CD163 유전자를 편집하는 방법.

청구항 27

제23항 내지 제24항 중 어느 한 항의 gRNA 쌍을 포함하는 CRISPR-CAS 복합체를 사용하여 PRRSV 저항성 *Sus scrofa* 세포를 제조하는 방법.

청구항 28

다음 단계를 포함하는 PRRSV 저항성 *Sus scrofa* 동물을 생산하는 방법:

- 제23 내지 제24항 중 어느 한 항의 gRNA의 쌍을 포함하는 CRISPR 복합체를 사용하여 *Sus scrofa* 세포 또는 복수의 *Sus scrofa* 세포의 CD163 유전자를 편집하는 단계; 및
- 상기 세포 또는 복수의 세포로부터 동물을 생성하는 단계.

청구항 29

PRRSV 저항성 동물을 생산하기 위한 제8항에 따른 세포주의 용도.

청구항 30

PRRSv 저항성 동물을 생산하기 위한 제19항에 따른 세포주의 용도.

청구항 31

제7항 내지 제10항 또는 제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 복수의 세포를 포함하는 배아, 새끼 돼지, 또는 성숙한 성체.

청구항 32

다음과 함께 실시간 PCR을 수행하는 것을 포함하는, 서열번호 453에 기재된 서열과 90% 동일성을 갖는 편집된 서열의 존재 또는 부재를 결정하는 방법:

- a) 서열번호 564 및 서열번호 558 또는 561에 기재된 서열의 차등 표지된 프로브;
- b) 서열번호 562 및 563에 기재된 프라이머 쌍; 및
- c) 서열번호 556 및 567 또는 서열번호 559 및 560에 기재된 프라이머 쌍.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 편집된 서열이 서열번호 453에 기재된 서열과 100% 동일성을 갖는 것인, 방법.

청구항 34

서열번호 556, 서열번호 557, 서열번호 559, 서열번호 560, 서열번호 562, 및 서열번호 56으로 이루어진 군으로부터 선택되는 PCR 프라이머.

청구항 35

서열번호 558, 서열번호 561, 및 서열번호 564으로 이루어진 군으로부터 선택되는 실시간 PCR 프로브.

청구항 36

서열번호 453에 기재된 편집된 지놈 서열의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 a) 서열번호 556 및 557 및 서열번호 562 및 563 또는 b) 서열번호 559 및 560 및 서열번호 562 및 563에 기재된 PCR 프라이머의 용도.

청구항 37

서열번호 453에 기재된 편집된 지놈 서열의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 a) 서열번호 558 및 564 또는 b) 서열번호 561 및 564 에 기재된 PCR 프로브의 용도.

청구항 38

서열번호 453에 기재된 지놈 서열을 포함하는 돼지 지놈을 편집하는 단계를 포함하는 PRRSv 저항성 돼지를 생산하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 돼지의 지놈을 편집하는 단계는 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 갖는 gRNA를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 gRNA 및 CAS 단백질을 포함하는 미리-형성된 RNP 복합체를 접합체, 배아 또는 MII 난모세포에 주입하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 돼지는 PIC line 2, PIC line 3, PIC line 15, PIC line 19, PIC line 27, PIC line 62, 또는 PIC line 65 돼지인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 돼지 종의 건강을 개선하기 위한 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 CD163의 표적화된 폴리뉴클레오타이드 편집을 통해 돼지 생식 및 호흡기 증후군 바이러스(Porcine Reproductive 및 Respiratory Syndrome virus, PRRSv)에 의한 감염으로부터 감염을 예방하고 내성 동물, 무리(herd) 및 세포주를 생성함으로써 *Sus scrofa* 동물 및 엘리트 계통(elite line)을 보호하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0003] 본 출원은 2020년 5월5일에 출원된 미국 가출원 제63/020,128호 및 제2020년 5월 7일에 출원된 미국 가출원 제63/021,370호의 이익 및 우선권을 주장한다. 상기 제63/020,128호 및 제63/021,370호는 각각 그 전체가 참조로 여기에 통합된다.

[0004] 전자적으로 제출된 서열 목록 참조

[0005] 서열 목록의 공식 사본은 2021년 3월 10일에 생성된 RD-12-2020-US2-SEQLIST라는 파일과 함께 ASCII 형식의 서열 목록으로 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출되고, 137,058바이트의 크기를 갖는 것이 본 명세서와 함께 동시에 제출된다. 이 ASCII 형식 문서에 포함된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며 전체가 참조로 여기에 통합된다.

배경 기술

[0006] 바이러스 감염은 축산업에서 이환율(morbidity) 및 폐사율(mortality)의 주요 원인이다. 특히, 돼지생식호흡기 증후군(Porcine Reproductive 및 Respiratory Syndrome, PRRS)은 돼지의 범유행성 전염병으로, 전 세계 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. PRRS는 모든 연령의 돼지에서 나타나지만, 주로 암태지의 경우 후기 유산 및 사산 및 새끼 돼지의 호흡기 질환을 유발한다. 상기 질병의 원인 인자는 양성 가닥 RNA PRRS 바이러스(PRRSv)이다. PRRS는 북미, 유럽 및 아시아에서 가장 경제적으로 중요한 국내 돼지 질병으로, 북미의 생산자에게 연간 6억 달러 이상의 비용을 발생시킨다.

[0007] 현재, 급성 PRRS에 대한 효과적인 치료 프로그램은 없다. 결과적으로, 농장에서 PRRS의 발생이 감지되면, 개체 수 감소, 충분한 청소/소독 및 사체의 적절한 폐기를 사용하여 바이러스를 제거해야 한다. 더 극단적인 경우, 전체 무리(herd)의 감소-재증가는 풍토병으로 감염된 무리에서 PRRSv를 제거하는 효과적인 방법으로 문서화되었으나; 이 방법은 상당한 손실을 초래한다.

[0008] PRRSv에 대한 백신이 존재하나; 이러한 백신은 주로 바이러스의 구조 단백질 내의 유전적 다양성으로 인해 질병을 통제할 수 없다. 따라서, 현재로서는 감염 예방이 최선의 방제 조치이다. 예방 조치로, PRRSv가 존재하는 국가 또는 지역의 농장은 대체 어린 암태지(gilts) 및 수태지(boars)의 건강 상태 평가뿐 아니라, 유입되는 가축에 대한 격리 및 순응 기간 45-60일을 포함하는 엄격한 통제 조치를 사용해야 한다.

[0009] 최근 몇년 동안, PRRS의 발생에서 CD163이 수행할 수 있는 역할에 더 많은 관심이 주어졌다. PRRSv 바이러스주

의 상당한 이질성에도 불구하고, PRRSV 바이러스주는 모두 CD163-양성 세포에 대한 친화성(tropism)을 공유한다. CD163은 바이러스 수용체이지만, CD163 스캐빈저 수용체는 내피 세포에 대한 단핵구의 부착에도 관여한다. CD163의 기능 및 자세한 설명은 Onofre, Gabriela *et al.*, *ACTA MEDICA*, 2009, 52, 57-61에 제공되어 있다.

[0010] CD163은 PRRS 바이러스에 대한 융합 수용체로 간주되는 130 kDa 유형 1 막 단백질이고; 돼지의 5번 염색체에 매핑된다. 기본 전사체는 1076개 아미노산의 단백질을 암호화한다. 5개의 보고된 CD163의 동형 단백질(isoform)이 있고; 3개의 동형 단백질은 세포질 도메인의 서로 다른 스플라이싱(splicing) 형태를 나타낸다. 그러나, 일반적으로, CD163의 지놈 분자 서열은 펩타이드 신호 서열을 암호화하는 17개의 엑손, 9개의 SRCR(scavenger receptor cysteine-rich) 도메인, 2개의 PST(proline serine threonine) 링커 도메인, 세포질 도메인 및 짧은 세포질 꼬리를 포함한다. CD163은 PRRSV에 대한 수용체로 기재되었다. 단백질의 도메인 5(SRCR5)는 바이러스의 상호작용 부위이다. CD163의 엑손 7은 시험관 내(*in vitro*)에서 PRRSV의 상호작용 부위 역할을 하는 SRCR 도메인 5(SRCR5)를 암호화한다. Burkard(Burkard, C., PLoS Pathog. 2017, 23, 13, e1006206.)는 CD163 엑손 7의 제거가 돼지 대식세포에 대한 PRRSV 내성을 부여한다는 것을 입증하였다. 그러나 해당 작업에 사용된 가이드(서열번호 272 및 273에서 PAM을 포함하는 표적화 서열로 명시됨)는 상업적 육종 프로그램의 일부로 유전자 편집을 위한 충분한 활성 및 특이성이 부족할 수 있다. Whitworth와 동료들의 추가 작업에는 서열번호 354 및 서열번호 211(Whitworth, K.M., Biol. Reprod., 2014, 91, 1-13)에 명시된 가이드(PAM 포함)를 사용하여 Exon 7에서 123bp 결실 생성이 포함되었다. Whitworth 등(Whitworth, K.M., Nature Biotechnology, 2016, 34, 20-22)은 CD163의 기능을 녹아웃(knock out)시켜 PRRSV 내성 돼지를 제조하는 것을 보고하였다.

[0011] 지놈 편집은 특정 핵산 서열을 결실, 삽입 또는 치환함으로써 지놈을 변경하는 것을 포함한다. 상기 변경은 유전자- 또는 위치-특이적일 수 있다. 지놈 편집은 Cas 단백질 및 동족 폴리뉴클레오타이드(cognate polynucleotides)와 같은 부위 지정(site-directed) 뉴클레아제를 사용할 수 있다.

[0012] CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 및 CRISPR-연관 단백질(Cas)은 CRISPR-Cas 시스템을 구성한다.

[0013] Cas9는 예시적인 II형 CRISPR Cas 단백질이다. Cas9는 tracrRNA/crRNA에 의해 프로그래밍되어 2개의 별개의 엔도뉴클레아제 도메인 (HNH 및 RuvC/RNase H-유사 도메인)을 사용하여 DNA 표적 서열을 부위 특이적 방식으로 절단할 수 있는 엔도뉴클레아제이다 (2014년 3월 6일 공개된 미국특허 출원 공개 번호 제2014-0068797호 참조; 또한 Jinek, M., *et al.*, Science, 337:816-821(2012) 및 Karvelis *et al.* Genome Biology(2015) 16:253 참조).

[0014] 전술한 CD163 편집은 PRRSV에 대한 효능의 일부 표시를 나타내지만, 본 명세서에 개시된 편집만큼 정확하고 효과적으로 이루어질 수 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] PRRSV에 대한 내성을 부여하면서 개선된 편집 활성 및 의도하지 않은 편집 감소를 위한 가이드를 사용하여 CD163 유전자를 편집함으로써 돼지 무리의 건강을 개선할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 명세서는 편집된 유전자를 포함하는 돼지에 PRRSV 내성을 부여하는 편집된 CD163 유전자를 제공하고 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 본 교시는 *Sus scrofa*에서 PRRSV 내성을 부여하도록 편집된 CD163 유전자를 제공하고 포함하며, 여기에서 상기 편집은 엑손 7을 절단하고 편집된 유전자는 서열번호 426-458 및 520-555 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 복구된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구성에서, 편집된 유전자는 서열번호 426-458로 이루어진 균으로부터 선택되는 복구된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 복구된 유전자 서열은 서열번호 426, 서열번호 427, 서열번호 428, 서열번호 429, 서열번호 430, 서열번호 431, 서열번호 432, 서열번호 433, 서열번호 434, 서열번호 435, 서열번호 436, 서열번호 437, 서열번호 438, 서열번호 439, 서열번호 440, 서열번호 441, 서열번호 442, 서열번호 443, 서열번호 444, 서열번호 445, 서열번호 446, 서열번호 447, 서열번호 448, 서열번호 449, 서열번호 450, 서열번호 451, 서열번호 452, 서열번호 453, 서열번호 454, 서열번호 455, 서열번호 456, 서열번호 457, 서열번호 458, 서열번호 520, 서열번호 521, 서열번호 522, 서열번호

523, 서열번호 524, 서열번호 525, 서열번호 526, 서열번호 527, 서열번호 528, 서열번호 529, 서열번호 530, 서열번호 531, 서열번호 532, 서열번호 533, 서열번호 534, 서열번호 535, 서열번호 536, 서열번호 537, 서열번호 538, 서열번호 539, 서열번호 540, 서열번호 541, 서열번호 542, 서열번호 543, 서열번호 544, 서열번호 545, 서열번호 546, 서열번호 547, 서열번호 548, 서열번호 549, 서열번호 550, 서열번호 551, 서열번호 552, 서열번호 553, 서열번호 554, 또는 서열번호 555를 포함할 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성할 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 237 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 230 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 237 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 229 및 261, 서열번호 230 및 261, 서열번호 231 및 261, 서열번호 237 및 261, 서열번호 241 및 261, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 219 및 258, 서열번호 221 및 258, 서열번호 224 및 258, 서열번호 227 및 258, 서열번호 219 및 261, 서열번호 221 및 261, 서열번호 224 및 261, 서열번호 227 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 서열번호 250 및 258, 서열번호 249 및 261, 또는 서열번호 250 및 261일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 표적화 영역의 쌍은 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 227 및 258, 서열번호 221 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 또는 서열번호 249 및 261일 수 있다.

[illegible]

일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 227 및 261일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 249 및 256일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 250 및 256일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 249 및 258일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 250 및 258일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 249 및 261일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 한 쌍의 gRNA를 사용하여 생성될 수 있으며, 여기에서 상기 gRNA의 쌍은 서열번호 250 및 261일 수 있다. 다양한 구성에서, 복구된 지놈 서열은 서열번호 453을 포함할 수 있고 편집은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 사용하여 생성될 수 있다.

[0019] 다양한 구성에서, 본 개시내용은 본 교시의 CD163 유전자를 포함할 수 있는 *Sus scrofa* 세포를 제공하고 포함한다. 일부 구성에서, 본 교시는 복수의 *Sus scrofa* 세포를 포함할 수 있는 세포주를 추가로 제공하고 포함한다. 일부 구성에서, 상기 세포주는 섬유아세포 세포주일 수 있다. 다양한 구성에서, 세포, 복수의 세포, 또는 세포주는 PIC Line 2, PIC Line 3, PIC Line 15, PIC Line 19, PIC Line 27, PIC Line 62, 또는 PIC Line 65로부터 유래될 수 있다. 본 교시는 복수의 세포를 포함할 수 있는 배아, 새끼 돼지, 또는 성숙한 성체를 추가로 제공한다.

[0020] 본 개시내용은 또한 *Sus scrofa*에서 PRRSV 내성을 부여하도록 편집된 CD163 유전자를 제공하며, 여기에서 상기 편집은 506-517로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있는 예측된 엑손 7 아미노산 서열을 생성하는 정지 코돈을 생성한다. 다양한 구성에서, 상기 아미노산 서열은 서열번호 506, 서열번호 507, 서열번호 508, 서열번호 509, 서열번호 510, 서열번호 511, 서열번호 512, 서열번호 513, 서열번호 514, 서열번호 515, 서열번호 516, 또는 서열번호 517에 기재될 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 엑손 7의 예측된 아미노산 서열은 서열번호 513에 기재될 수 있다. 일부 구성에서, 상기 편집은 서열번호 351 및 365, 서열번호 351 및 387, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 348 및 395, 서열번호 352 및 365, 서열번호 352 및 387, 서열번호 352 및 399, 서열번호 353 및 365, 서열번호 353 및 387, 서열번호 353 및 399, 서열번호 354 및 390, 서열번호 354 및 388, 서열번호 354 및 395, 서열번호 358 및 361, 서열번호 358 및 362, 서열번호 358 및 368, 서열번호 358 및 384, 서열번호 358 및 394, 서열번호 358 및 399, 서열번호 359 및 390, 서열번호 359 및 388, 서열번호 359 및 395, 서열번호 360 및 368, 서열번호 360 및 384, 서열번호 360 및 389, 서열번호 360 및 394, 서열번호 360 및 397, 서열번호 361 및 365, 서열번호 361 및 387, 서열번호 362 및 390, 서열번호 362 및 388, 서열번호 362 및 395, 서열번호 364 및 365, 서열번호 364 및 387, 서열번호 364 및 399, 서열번호 365 및 368, 서열번호 365 및 384, 서열번호 365 및 389, 서열번호 365 및 394, 서열번호 365 및 397, 서열번호 366 및 368, 서열번호 366 및 384, 서열번호 366 및 389, 서열번호 366 및 394, 및 서열번호 366 및 397로 구성된 군으로부터 선택되는 gRNA를 사용하여 생성될 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 편집은 서열번호 351 및 365, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 354 및 390, 서열번호 358 및 394, 서열번호 362 및 390, 및 서열번호 366 및 394로 이루어진 군으로부터 선택되는 gRNA를 사용하여 생성될 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 351 및 365일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 351 및 387일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 348 및 390일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 348 및 388일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 348 및 395일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 352 및 365일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 352 및 387일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 352 및 399일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 353 및 365일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 353 및 387일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 353 및 399일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 354 및 390일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 354 및 388일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 354 및 395일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 361일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 362일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 368일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 394일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 395일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 399일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 394일 수 있다. 다양한

구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 358 및 399일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 359 및 390일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 359 및 388일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 359 및 395일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 360 및 368일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 360 및 384일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 360 및 389일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 360 및 394일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 360 및 397일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 361 및 365일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 361 및 387일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 362 및 390일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 362 및 388일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 362 및 395일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 364 및 365일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 364 및 387일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 364 및 399일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 365 및 368일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 365 및 384일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 365 및 389일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 365 및 394일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 365 및 397일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 366 및 368일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 366 및 384일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 366 및 389일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 366 및 394일 수 있다. 다양한 구성에서, 편집을 생성하는 데 사용되는 gRNA는 서열번호 366 및 397일 수 있다.

[0021] 다양한 구성에서, 편집된 CD163 유전자는 서열번호 459 내지 504로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, 복구된 유전자는 서열번호 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 또는 504에 기재된 핵산 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, 복구된 유전자는 서열번호 489에 기재된 핵산 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서 엑손 7의 예측된 아미노산 서열은 서열번호 513에 기재된 바와 같을 수 있다. 다양한 구성에서, 유전자의 예측된 아미노산 서열은 서열번호 513일 수 있고, 복구된 유전자는 서열번호 489에 기재된 핵산 서열을 가질 수 있고, 편집은 서열번호 362 및 390에 기재된 서열을 사용하여 생성될 수 있다.

[0022] 본 개시내용은 상기 기재된 바와 같은 외인성 정지 코돈을 포함하도록 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있는 *Sus scrofa* 세포를 제공하고 포함한다. 본 개시내용은 또한 외인성 정지 코돈을 포함하도록 편집된 CD163 유전자를 포함하는 복수의 세포를 포함할 수 있는 세포주를 제공한다. 일부 구성에서, 상기 세포주는 섬유아세포 세포주일 수 있다. 다양한 구성에서, 상기 세포는 PIC Line 2, PIC Line 3, PIC Line 15, PIC Line 19, PIC Line 27, PIC Line 62 또는 PIC Line 65에서 유래될 수 있다. 본 개시내용은 또한 외인성 정지 코돈을 포함하도록 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있는 복수의 세포를 포함하는 배아, 새끼 돼지 또는 성숙한 성체를 제공하고 포함한다.

[0023] 다양한 구현예에서, 본 교시는 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 237 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 230 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 237 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 229 및 261, 서열번호 230 및 261, 서열번호 231 및 261, 서열번호 237 및 261, 서열번호 241 및 261, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 219 및 258, 서열번호 221 및 258, 서열번호 224 및 258, 서열번호 227 및 258, 서열번호 219 및 261, 서열번호 221 및 261, 서열번호 224 및 261, 서열번호 227 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 서열번호 250 및 258, 서열번호 249 및 261, 서열번호 250 및 261, 서열번호 351 및 365, 서열번호 351 및 387, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 348 및 395, 서열번호 352 및 365, 서열번호 352 및 387, 서열번호 352 및 399, 서열번호 353 및 365, 서열번호 353 및 387, 서열번호 353 및 399, 서열번호 354 및 390, 서열번호 354 및 388, 서열번호 354 및 395, 서열번호 358 및 361, 서열번호 358 및 362, 서열번호 358 및 368, 서열번호 358 및 384, 서열번호 358 및 394, 서열번호 358 및 399, 서열번호 359 및 390, 서열번호 359 및 388, 서열번호 359 및 395, 서열번호 360 및 368, 서열번호 360 및 384, 서열번호 360 및 389, 서열번호 360 및 394, 서열번호 360 및 397, 서열번호 361 및 365,

서열번호 361 및 387, 서열번호 362 및 390, 서열번호 362 및 388, 서열번호 362 및 395, 서열번호 364 및 365, 서열번호 364 및 387, 서열번호 364 및 399, 서열번호 365 및 368, 서열번호 365 및 384, 서열번호 365 및 389, 서열번호 365 및 394, 서열번호 365 및 397, 서열번호 366 및 368, 서열번호 366 및 384, 서열번호 366 및 389, 서열번호 366 및 394, 또는 서열번호 366 및 397에 기재된 서열을 갖는 *Sus scrofa* CD163 유전자를 편집하기 위한 한 쌍의 gRNA를 제공하고 이를 포함한다. 일부 구성에서, gRNA의 쌍은 서열번호 229 및 256, 서열번호 230 및 256, 서열번호 231 및 256, 서열번호 241 및 256, 서열번호 229 및 258, 서열번호 231 및 258, 서열번호 241 및 258, 서열번호 219 및 256, 서열번호 221 및 256, 서열번호 224 및 256, 서열번호 227 및 256, 서열번호 227 및 258, 서열번호 221 및 261, 서열번호 249 및 256, 서열번호 250 및 256, 서열번호 249 및 258, 서열번호 249 및 261, 서열번호 351 및 365, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 354 및 390, 서열번호 358 및 394, 서열번호 362 및 390, 또는 서열번호 366 및 394에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, gRNA의 쌍은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, gRNA의 쌍은 서열번호 362 및 390에 기재된 서열을 가질 수 있다.

- [0024] 본 개시내용은 본 교시의 한 쌍의 gRNA를 포함하는 *Sus scrofa*의 CD163 유전자를 편집하기 위한 CRISPR 복합체를 제공하고 포함한다.
- [0025] 본 개시내용은 본 교시의 gRNA 쌍을 포함하는 CRISPR-CAS 복합체를 사용하는 것을 포함하는, *Sus scrofa*의 CD163 유전자를 편집하는 방법을 제공하고 포함한다.
- [0026] 본 개시내용은 본 교시의 gRNA 쌍을 포함하는 CRISPR-CAS 복합체를 사용하여 PRSSV 내성 *Sus scrofa* 세포를 제조하는 방법을 제공하고 포함한다.
- [0027] 본 개시내용은 다음 단계를 포함하는 PRRSv 내성 *Sus scrofa* 동물을 제공하고 생산하는 방법을 포함한다: a) 본 교시의 한 쌍의 gRNA를 포함하는 CRISPR 복합체를 사용하여 *Sus scrofa* 세포 또는 복수의 *Sus scrofa* 세포의 CD163 유전자를 편집하는 단계; 및 b) 세포 또는 복수의 세포로부터 동물을 생산하는 단계.
- [0028] 본 개시내용은 PRRSv 내성 동물을 생산하는데 있어서 본 교시에 따른 세포주의 용도를 제공하고 포함한다.
- [0029] 본 개시내용은 또한 본 교시에 따른 복수의 세포를 포함하는 배아, 새끼 돼지, 또는 성숙한 성체를 제공하고 이를 포함한다.
- [0030] 다양한 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호 453에 기재된 서열과 90% 또는 95% 동일성을 갖는 편집된 서열의 존재 또는 부재를 결정하는 방법을 제공하고 이를 포함하며, 이는 다음을 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것을 포함한다: a) 서열번호 564 및 서열번호 558 또는 561에 기재된 서열의 차등 표지된 프로브; b) 서열번호 562 및 563에 기재된 프라이머 쌍; 및 c) 서열번호 556 및 557 또는 서열번호 559 및 560에 기재된 프라이머 쌍. 일부 구성에서, 편집된 서열은 서열번호 453에 기재된 서열과 100% 동일성을 가질 수 있다. 일부 구성에서, 편집된 서열은 서열번호 453에 기재된 서열과 90% 동일성을 가질 수 있다. 일부 구성에서, 편집된 서열은 서열번호 453에 기재된 서열과 95% 동일성을 가질 수 있다.
- [0031] 다양한 구현예에서, 본 교시는 서열번호 556, 서열번호 557, 서열번호 559, 서열번호 560, 서열번호 560, 서열번호 562, 및 서열번호 563으로 이루어진 군으로부터 선택된 PCR 프라이머를 제공하고 이를 포함한다. 일부 구성에서, PCR 프라이머는 서열번호 556에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, PCR 프라이머는 서열번호 557에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, PCR 프라이머는 서열번호 559에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, PCR 프라이머는 서열번호 560에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, PCR 프라이머는 서열번호 562에 기재된 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, PCR 프라이머는 서열번호 563에 기재된 서열을 가질 수 있다.
- [0032] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호 558, 서열번호 561, 및 서열번호 564로 이루어진 군으로부터 선택된 실시간 PCR 프로브를 제공하고 이를 포함한다. 일부 구성에서, 프로브는 서열번호 558에 기재된 서열을 갖는다. 다양한 구성에서, 프로브는 서열번호 561에 기재된 서열을 갖는다. 다양한 구성에서, 프로브는 서열번호 564에 기재된 서열을 갖는다.
- [0033] 다양한 구현예에서, 본 교시는 서열번호 453에 기재된 편집된 지놈 서열의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 a) 서열번호 556 및 557 및 서열번호 562 및 563 또는 b) 서열번호 559 및 560 및 서열번호 562 및 563에 기재된 PCR 프라이머의 사용을 제공하고 이를 포함한다.
- [0034] 다양한 구현예에서, 본 교시는 서열번호 453에 기재된 편집된 지놈 서열의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 a)

서열번호 558 및 564 또는 b) 서열번호 561 및 564에 기재된 PCR 프라이머의 사용을 제공하고 이를 포함한다.

[0035] 다양한 구현예에서, 본 교시는 서열번호 453에 기재된 지놈 서열을 포함하도록 돼지의 지놈을 편집하는 것을 포함하는 PRRSv 저항성 돼지를 생성하는 방법을 제공하고 포함한다. 일부 구성에서, 돼지의 지놈 편집은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 갖는 gRNA를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 다양한 구성에서, 투여는 gRNA 및 CAS 단백질을 포함하는 미리-형성된 RNP 복합체를 접합체, 배아 또는 MII 난모세포(oocyte)에 주입하는 것을 포함한다. 다양한 구성에서 돼지는 PIC™ Line 2(Pig Improvement Company, Ltd, Basingstoke, UK), PIC™ Line 3, PIC™ Line 15, PIC™ Line 19, PIC™ Line 27, PIC™ Line 62, 또는 PIC™ Line 65 돼지이다.

[0036] 다양한 구현예에서, 본 개시내용은 *Sus scrofa*에 PRRSv 내성을 부여하는 편집된 유전자를 포함하는 *Sus scrofa* 동물을 제공하고 이를 포함하며, 여기에서 상기 편집은 엑손 7을 절단하고 편집된 유전자는 서열번호 453에 기재된 복구된 지놈 서열을 포함한다. 일부 구성에서, 편집은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 갖는 가이드 RNA(gRNA)로 이루어질 수 있다. 다양한 구성에서 동물은 PIC™ Line 2, PIC™ Line 3, PIC™ Line 15, PIC™ Line 19, PIC™ Line 27, PIC™ Line 62 또는 PIC™ Line 65의 편집된 동물일 수 있다. 다양한 구성에서, 본 개시내용은 본 교시의 동물로부터 제조된 세포를 제공하고 이를 포함한다. 다양한 구성에서, 본 개시내용은 본 교시에 따라 세포로부터 제조된 세포주를 제공하고 이를 포함한다. 일부 구성에서, 상기 세포주는 섬유아세포 세포주일 수 있다.

[0037] 일부 구현예에서, 본 교시는 *Sus scrofa*에서 PRRSv 내성을 부여하도록 편집된 CD163 유전자를 제공하고 이를 포함하며, 여기에서 상기 편집은 엑손 7을 절단하고 편집된 유전자는 서열번호 453에 기재된 복구된 지놈 서열을 포함한다. 일부 구성에서, 상기 편집은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 사용하여 생성된다. 다양한 구성에서, 본 개시내용은 본 교시에 따른 CD163 유전자를 포함하는 *Sus scrofa* 세포를 제공한다. 일부 구성에서, 본 개시내용은 본 교시에 따른 복수의 세포를 포함하는 세포주를 제공한다. 일부 구성에서, 상기 세포주는 섬유아세포 세포주일 수 있다. 다양한 구성에서, 세포는 PIC Line 2, PIC Line 3, PIC Line 15, PIC Line 19, PIC Line 27, PIC Line 62 또는 PIC Line 65에서 분리될 수 있다.

[0038] 다양한 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호 249 및 256에 기재된 가이드 서열을 포함하는 *Sus scrofa* CD163 유전자를 편집하기 위한 한 쌍의 gRNA를 제공하고 이를 포함한다.

[0039] 다양한 구현예에서, 본 교시는 서열번호 453에 기재된 지놈 서열을 포함하도록 돼지의 지놈을 편집하는 것을 포함하는 PRRSv 저항성 돼지를 생성하는 방법을 제공하고 이를 포함한다. 일부 구성에서, 돼지의 지놈을 편집하는 것은 서열번호 249 및 256에 기재된 서열을 갖는 gRNA를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구성에서, 투여는 gRNA 및 CAS 단백질을 포함하는 미리-형성된 RNP 복합체를 접합체, 배아 또는 MII 난모세포에 주사하는 것을 포함할 수 있다. 다양한 구성에서, 돼지는 PIC™ Line 2, PIC™ Line 3, PIC™ Line 15, PIC™ Line 19, PIC™ Line 27, PIC™ Line 62 또는 PIC™ Line 65 돼지일 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 상세한 설명

[0041] 본 교시의 측면은 CD163의 표적화된 불활성화에 의해 돼지 종의 건강을 개선하는 특정 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 이는 숙련된 기술자에 의해 다양하고 이해될 수 있다. 본 명세서에 사용된 모든 용어는 단지 특정 측면을 설명하기 위한 것이며 어떠한 방식이나 범위로 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 예를 들어, 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함할 수 있다. 또한 모든 단위, 접두사 및 기호는 SI 허용 형식으로 표시될 수 있다. 본 출원 내에서 인용된 숫자 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함하고 정의된 범위 내의 각 정수를 포함한다.

[0042] 본 출원을 보다 쉽게 이해할 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 출원의 측면이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나, 변형되거나, 동등한 많은 방법 및 재료가 과도한 실험 없이 본 출원의 측면의 실행에 사용될 수 있으며, 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 출원의 측면을 기술하고 청구함에 있어서, 하기 정의에 따라 하기 용어가 사용될 것이다.

[0043] 본 명세서에 사용된 "동물 세포"는 체세포, 배양 세포, 배우자 세포, 혈액 세포, 접합체 및 배아 세포를 포함하

나 이에 제한되지 않는 세포를 의미한다. 이러한 동물 세포는 생식 세포 또는 비 생식 세포일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 세포는 동물 또는 배아로부터 단리되고 조직 배양물에서 유지될 수 있다. 또한 본 명세서의 유전자 편집된 세포 및 비-유전자 편집된 지지 세포 또는 영양 세포를 포함할 수 있는 혼합 배양물이 포함된다.

[0044] 본 명세서에 사용된 용어 "유전자 편집된", "유전적으로 편집된" 및 "지놈 편집된"은 종종 "귀소 엔도뉴클레아제(homing endonucleases)"로 지칭되는, 자연 발생 또는 인공적으로 조작된 엔도뉴클레아제와 함께 귀소 기술의 사용을 의미하고, 또는 "엔도뉴클레아제 표적화". "지놈 편집" 및 "유전자 편집"은 특정 핵산 서열을 결실, 삽입 또는 치환하여 지놈을 변경하는 것을 의미한다. 상기 변경은 유전자 또는 위치 특이적일 수 있지만 유전자 자체의 서열을 변경할 필요는 없다. 지놈 편집은 CRISPR 시스템과 같은 엔도뉴클레아제를 사용하여 핵산을 절단하여 변경을 위한 부위를 생성할 수 있다. 다른 엔도뉴클레아제를 이용할 수 있으며 사용하기에 적합하나; 오프-사이트(off-site) 절단 및 특이성은 심각한 문제가 될 수 있다. CRISPR 및 기타와 같은 시스템에서, 뉴클레아제는 부위 특이적 DSB를 도입하기 위해 본 명세서에서 "표적 서열"이라고 하는 폴리뉴클레오타이드와 복합체를 형성함으로써 표적 부위로 지시될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, DSB는 내인성 비-상동 말단 접합(endogenous non-homologous end joining, NHEJ) 기계에 의해 복구될 수 있다.

[0045] 유전자 편집에 적합하고 이에 적응된 다수의 엔도뉴클레아제가 공지되어 있다. CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템(예: CRISPR/Cas9 시스템), TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nucleases), ZFN(Zinc Finger Nucleases)을 포함한 유전자 편집 방법은 당업계에 알려져 있다. 유전자 편집 동물은 외인성 DNA 서열, 특히 후자의 외래 종의 서열과 동일성을 갖는 서열의 통합에 의해 형질전환 동물과 구별될 수 있다. 여기에서, 용어는 10개 이상의 뉴클레오타이드를 도입하지 않는 작은 결실 및 삽입을 포함하고 이를 제공한다. 이 용어는 또한 초기 유전자 편집 동물로부터의 유성 교배 또는 무성 번식에 의해 생성된 것과 같은 자손 동물을 포함한다.

[0046] 본 명세서에 사용된 용어 "복구 주형" 또는 "복구 서열"은 복구를 안내하고 정확하고 선택적인 편집을 제공하기 위해 지놈의 뉴클레아제 표적 위치에서 DSB 복구를 겪는 세포 내로 도입된 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 복구 주형은 DSB가 있는 유전자좌에서 서열을 선택적으로 변경하거나 삭제하는 데 사용할 수 있으며 일반적으로 5' 지놈 혼성화 영역 및 3' 지놈 혼성화 영역을 포함한다. 일 측면에서, 5' 지놈 혼성화 및 3' 지놈 혼성화 영역은 적어도 80% 상동성을 공유할 수 있다. 일 측면에서, 5' 지놈 혼성화 및 3' 지놈 혼성화 영역은 동일성을 공유할 수 있다. 본 개시내용의 복구 주형에 대한 추가 설명은 아래에 제공된다. 결실 주형의 경우, 지놈의 인접 영역은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실에 의해 분리될 수 있다. 개별 염기의 표적화된 편집은 지놈의 인접 영역을 포함하고 정지 코돈의 추가를 포함하는 하나 이상의 염기 변화를 갖는 복구 주형을 사용하여 준비할 수 있다. 지놈의 인접 영역에 대한 복구 주형의 백분율 동일성은 갭(gap)이 없는 얼라인먼트(alignment)를 사용하여 80%에서 100% 사이일 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 표적화된 염색체 영역에 대해 80% 내지 100% 상동성을 공유하는 측면화(flanking) 상동성 영역이 측면화될 수 있는 복구 주형 내의 동일성의 코어 영역이 제공된다. 이론에 제한되지 않고, 상기 코어 영역 동일성은 복구 프로세스의 충실도를 증가시킬 수 있는 반면, 양쪽의 확장된 상동성 영역은 효율성을 증가시키고 편집을 대상으로 하는 세포 간의 유전형 변이를 허용한다.

[0047] 본 명세서에 사용된 용어 "야생형" 또는 "WT"는 돼지의 자연 개체군 또는 돼지 계통에서 우세한 표현형, 유전자형 또는 유전자를 의미한다. 유전자 편집 세포와 특정 계통의 동물의 표현형 및 유전자형을 비교할 때 용어 "야생형"은 유전자 편집되지 않은 세포 및 동일한 계통의 동물을 의미한다. 일 측면에서, 본 개시내용은 유사한 유전적 배경을 갖는 유사한 품종의 편집되지 않은 돼지에 대한 편집된 돼지의 비교를 제공한다. 일 측면에서, 본 개시내용은 편집된 돼지를 동일한 육종 계통의 편집되지 않은 돼지와 비교하는 것을 제공한다.

[0048] 본 명세서에 사용된 용어 "넉아웃"은 발현의 감소 또는 제거에 의한 유전자 기능의 파괴를 의미한다. 넉아웃은 염색체의 이중 가닥 절단(DSB) 생성을 통해 생성될 수 있으며, 이는 비-상동 말단 연결(non-homologous end joining, NHEJ) 또는 상동성-유도 복구(homology-directed repair, HDR)에 의한 표적 벡터 또는 DNA 복구 주형의 상동성 재조합을 사용하여 복구될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, HDR 넉아웃은 또한 지놈 서열을 삽입, 삭제 또는 편집하기 위한 복구 주형을 제공하는 미세 상동성 매개 말단 연결(microhomology-mediated end joining)에 의해 제조될 수 있다. 넉아웃은 대체 벡터, 히트-앤-런 벡터 또는 유전자 트랩 벡터의 무작위 삽입을 통해 생성되어 유전자 기능의 완전, 부분 또는 조건부 손실을 초래할 수도 있다.

[0049] 범위에 걸쳐 있는 뉴클레오타이드 서열의 결실에 대한 본 명세서의 언급은 나열된 범위의 모든 뉴클레오타이드

를 포함한다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 "a"에서 뉴클레오타이드 "e"로의 5개 염기쌍 결실은 각각의 뉴클레오타이드 "a", "b", "c", "d" 및 "e"가 결실되었음을 의미한다(여기서 "b", "c" 및 "d"는 "a"와 "e" 사이에 있음).

[0050] 본 명세서에 사용된 용어 "편집"은 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 야생형 서열과 비교하여, 유전자, 코딩 DNA 서열(CDS), 또는 비-코딩 DNA 서열을 포함한다. 상기 용어 "편집"은 삽입, 삭제, 스플라이스-공여자 사이트 편집(splice-donor site edits), 포인트 편집 등을 포함할 수 있다.

[0051] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "클러스터된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복체(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)" 또는 "CRISPR"는 유전 물질의 CRISPR 분절, 및 다른 유기체의 지놈에서 특정 DNA 서열을 식별하고 수정하기 위해 그것을 생성하는 RNA 세그먼트 및 효소를 이용하는 유전자 편집 시스템을 의미한다. CRISPR 시스템에는 유형 I, 유형 II 및 유형 III CRISPR 시스템이 포함된다. 본 명세서에 사용된 용어 "CRISPR 관련 단백질" 또는 "Cas"는 CRISPR 요소와 엄격하게 연관될 수 있고 항상 CRISPR 세그먼트의 반복 클러스터 근처에서 발생하는 단백질 패밀리를 의미한다. 예를 들어, Cas 단백질은 Cas9 패밀리 구성원 단백질, Cas6 패밀리 구성원 단백질(예를 들어, Csy4 및 Cas6), 및 Cas5 패밀리 구성원 단백질을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. Cas 단백질 패밀리의 예 및 이를 확인하는 방법은 Haft, Daniel H., *et al.*, PLoS Comput. Bio., 2005, 1, e60.에 기재되어 있다.

[0052] 임의의 특정 과학 이론에 의해 제한되지는 않지만, CRISPR 뉴클레아제는 상보적 표적 핵산 분자와 혼성화함으로써 CRISPR 뉴클레아제를 표적 핵산 분자로 안내하는 가이드 RNA(gRNA)와 복합체를 형성할 수 있다. crRNA는 침입 병원체에서 특정 프로토스페이스 서열(protospacer sequence)에 상보적일 수 있는 반복 서열 및 스페이스 서열을 포함한다. 이는 진핵생물 지놈에서 표적 서열에 상보적으로 설계될 수 있는 스페이스 서열이다. CRISPR 뉴클레아제는 활성 형태로 각각의 crRNA와 결합할 수 있다. 본 명세서는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드를 포함하는 RNA 스페이스를 포함할 수 있는 crRNA를 제공하고 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각은 티미딘을 우리딘으로, 데옥시리보스를 리보스로 치환한 상응하는 RNA 서열을 제공하고 포함한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 서열번호는 표적화된 지놈 서열에 존재하는 PAM(하기 참조)을 포함한다. 숙련된 기술자는 이 서열을 표적으로 하는 gRNA가 PAM을 포함하지 않을 것이며, 따라서 이들 서열번호에 기재된 서열을 갖는 gRNA가 처음 20개 뉴클레오타이드만을 포함하여 PAM을 제외할 것임을 인식할 것이다.

[0053] CasX 및 Cas9와 같은 일부 CRISPR 뉴클레아제는 기능적 활성을 갖기 위해 트랜스-활성화 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)로 지칭되는 또 다른 비-암호화 RNA 성분을 필요로 할 수 있다. 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이스 서열을 포함하는 crRNA는 Jinek, *et al.*, Science, 337, 2012, 816-821에 기재된 바와 같이, 본 명세서에서 "단일 가이드 RNA"(sgRNA)로 지칭하는 것의 하나의 핵산 분자에서 tracrRNA의 5' 말단에 공유적으로 연결될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, tracrRNA는 또한 "가이드 RNA 백본(backbone)" 또는 "백본" 서열을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, gRNA는 단일 가이드 RNA 또는 별도의 tracrRNA와 함께 사용하기 위한 crRNA에 스페이스 서열을 포함하는 별도의 분자를 모두 포함한다. gRNA는 활성 Cas 복합체를 crRNA의 스페이스 서열에 상보적인 표적 부위로 안내할 수 있으며, 여기서 Cas 뉴클레아제는 표적 부위를 절단할 수 있다. crRNA는 잠재적인 DNA 표적 서열에 대한 상보성 영역 및 tracrRNA와 염기쌍 수소 결합을 형성하여 이차 구조를 형성할 수 있는 제2 영역, 일반적으로 적어도 하나의 줄기 구조를 형성할 수 있는 영역을 가질 수 있다. DNA 표적 서열에 대한 상보성 영역은 스페이스 또는 스페이스 서열일 수 있다. tracrRNA와 crRNA는 다수의 염기-쌍 수소 결합을 통해 상호작용하여 2차 RNA 구조를 형성할 수 있다. tracrRNA/crRNA와 Cas9 단백질 사이의 복합체 형성은 DNA에 대한 결합, Cas9 단백질의 엔도뉴클레아제 활성, 및 엔도뉴클레아제 Cas9에 의한 crRNA-유도 부위-특이적 DNA 절단을 촉진하는 Cas9 단백질의 형태적 변화를 초래할 수 있다 (Svitashev *et al.*, Nature Communications, 2016, 7, 113274). 실제로, 20개의 뉴클레오타이드 및 가이드 RNA 백본은 RNA 가이드를 형성하기 위해 생체내(in vivo)(세포 내) 또는 시험관내(in vitro)(T7 폴리머라제를 통해) 전사될 프로모터로부터 발현될 수 있는 DNA이거나 RNA 가이드는 화학적으로 합성된 이중(crRNA 및 tracrRNA) 가이드 또는 단일 가이드 RNA일 수 있다.

[0054] 이중-가닥 DNA 표적 서열을 절단하기 위한 Cas9 단백질/tracrRNA/crRNA 복합체의 경우, DNA 표적 서열은 동족 프로토스페이스 인접 모티프(cognate protospacer adjacent motif)(PAM)에 인접할 수 있다. 적절한 스페이스 서열을 갖도록 crRNA를 설계함으로써, 복합체는 관심 유전자좌, 예를 들어 서열 변형이 요구되는 유전자좌에서

절단되도록 표적화될 수 있다.

[0055] 다양한 유형 II CRISPR-Cas 시스템 crRNA 및 tracrRNA 서열, 및 관련된 예측된 2차 구조가 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Ran, F. A., *et al.*, Nature, 2015, 520, 186-191; Fonfara *et al.*, Nucleic Acids Research, 2014, 42, 2577-2590를 참조). Ran *et al.*의 Type II CRISPR-Cas 시스템은 일 측면에서 본 명세서에 제공된다.

[0056] 유형 II CRISPR-Cas 시스템의 스페이서는 사용될 Cas 단백질에 따라 PAM의 5' 또는 3'에 위치한 핵산 표적 서열에 혼성화할 수 있다. PAM은 사용되는 Cas 폴리펩타이드에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, *S. pyogenes*로부터의 Cas9가 사용되는 경우, PAM은 서열 5'-NRR-3'을 포함하는 핵산 표적 서열의 서열일 수 있고, 여기에서 R은 A 또는 G일 수 있고, N은 임의의 뉴클레오타이드이고, N은 핵산 표적 결합 서열에 의해 표적화된 핵산 표적 서열의 바로 3'이다. 바람직하게는, *S. pyogenes*의 PAM은 5'-NGG-3'을 포함한다. 다른 예에서, *S. thermophilus CRISPR3 (Sther CR3)*의 Cas9이 사용되는 경우, PAM은 서열 5'-nGGnG-3'을 포함하는 핵산 표적 서열의 서열일 수 있다. (Sapranaukas *et al.*, Nucleic Acids Research, 2011, 39, 9275-9282 참조).

[0057] 다른 Cas 단백질은 다른 PAM을 인식하고, 당업자는 임의의 특정 Cas 단백질에 대한 PAM을 결정할 수 있다. 본 명세서의 표적화 서열과 함께 사용하기에 적합한 CAS 단백질 및 시스템이 점점 더 많이 알려져 있다. Shah *et al.*, RNA Biol., 2013, 10, 891-899. 참조. CAS 시스템 및 해당 PAM 서열의 대표적인 샘플은 아래 표 1에 나와 있다.

표 1

[0058] 예시적인 CRISPR/Cas 시스템

종(Species) /Cas9의 변이체	PAM 서열	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SP); SpCas9	3' NGG	Wu <i>et al.</i> , <i>Nat Biotechnol.</i> , 2014, 32, 670-676
SpCas9 D1135E variant	3' NGG (reduced NAG binding)	Nishimasu <i>et al.</i> , <i>Science</i> , 2018, 361, 1259-1262.
SpCas9 VRER variant	3' NGCG	Nishimasu <i>et al.</i> (2018)
SpCas9 EQR variant	3' NGAG	Nishimasu <i>et al.</i> (2018)
SpCas9 VQR variant	3' NGAN or NGNG	Nishimasu <i>et al.</i> (2018)
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA); SaCas9	3' NNGRRT or NNGRR(N)	Kleinstiver <i>et al.</i> , Nature, 2015, 523, 481-485
<i>Acidaminococcus</i> sp. (AsCpf1) and <i>Lachnospiraceae</i> bacterium (LbCpf1)	5' TTTV	Fagerlund, R., <i>et al.</i> , 2015, <i>Genome Biology</i> , 16, 251
AsCpf1 RR variant	5' TYCV	Nishimasu <i>et al.</i> , <i>Mol Cell.</i> , 2017, 67, 139-147
LbCpf1 RR variant	5' TYCV	Nishimasu <i>et al.</i> (2017)
AsCpf1 RVR variant	5' TATV	Nishimasu <i>et al.</i> (2017)
<i>Neisseria meningitidis</i> (NM)	3' NNNNGAT	Hou <i>et al.</i> , 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110, 15644-156449
<i>Treponema denticola</i> (TD)	3' NAAAAC	Sun <i>et al.</i> , <i>Biotechnol J.</i> , 2018, 13, e1700588
<i>Campylobacter jejuni</i> (Cj)	NNNRYAC	Kim, <i>et al.</i> , Nat Commun., 2017, 8, 14500.
<i>Streptococcus thermophilus CR1</i> (St)	NNAGAAW	Toth <i>et al.</i> , 2016, Biol Direct., 11, 46
<i>Streptococcus thermophilus CR3</i>	nGGnG	Muller <i>et al.</i> , <i>Mol Ther.</i> , 2016, 24,636-644

[0059] 임의의 CRISPR/CAS 시스템에 의존하는 방법은 *S. pyogenes* 서열에 대해 하기에 제공된 바와 같이 NRR(예를 들어, NGG 및 NAA)의 PAM 서열을 가질 수 있거나 *S. thermophilus* 서열에 대해 제공된 바와 같은 NGGNG의 PAM 서열을 가질 수 있다. 표 3 및 서열 목록은 표적화 서열 및 염색체 위치를 제공한다. 또한, 상이한 PAM 요건을 갖는 공지된 CAS 시스템이 본 명세서에 개시된 표적 서열을 인식하고 활용하도록 조작될 수 있다는 것이 당업자

에 의해 인식될 것이다. 변형의 예는 상기 표 1에 나와 있다.

- [0060] 용어 "CRISPR/CasN 또는 "CRISPR/CasN 시스템"은 CasN(예를 들어, Cas2, Cas5, Cas6, Cas9 등) 단백질 또는 이의 유도체를 포함하는 유전자 편집을 위한 프로그램 가능한 뉴클레아제 시스템을 의미하고, CasN에 대한 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 RNA(trans-activating RNA, tracrRNA)의 기능을 제공할 수 있는 하나 이상의 비-암호화 RNA를 의미한다. crRNA 및 tracrRNA는 개별적으로 사용하거나 조합하여 "가이드 RNA"(gRNA)를 생성할 수 있다. crRNA 또는 gRNA는 지놈 표적에 상보적인 서열을 제공할 수 있다.
- [0061] 용어 "Cpf1" 또는 "CAS12"는 유전자 편집 목적으로 기술되고 사용되는 클래스 2 CRISPR-Cas 시스템의 또 다른 프로그램 가능한 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 의미한다(Zetsche *et al.*, Cell, 163:759-771, 2015). 이 시스템은 단일 crRNA(tracrRNA 결여)에 의해 부여된 절단 특이성과 함께 Cpf1 단백질 패밀리의 비-특이적 엔도뉴클레아제 단위를 사용할 수 있다. Cas9와 유사하게, Cpf1 암호화 서열은 본 명세서에 기재된 UTR 서열에 융합되어 안정성, 및 이에 따라 생성된 유전자 편집 방법의 효율성을 개선할 수 있다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 용어 "전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제(transcription activator-like effector nucleases)" 또는 "TALEN"는 주어진 DNA 서열의 표적화된 변형을 가능하게 하도록 조작된 뉴클레아제를 의미한다. TALEN은 표적화된 유전자 편집을 허용하도록 조작될 수 있는 TALE DNA-결합 도메인에 융합된 비특이적 DNA-절단 뉴클레아제를 포함할 수 있다. "TALE DNA-결합 도메인" 또는 "TALE"은 하나 이상의 TALE 반복 도메인/단위를 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 반복 도메인은 동족 표적 DNA 서열에 대한 TALE의 결합에 관여할 수 있다. 단일 "반복 단위"("반복"이라고도 함)는 길이가 33-35개 아미노산일 수 있으며 자연 발생 TALE 단백질 내에서 다른 TALE 반복 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다. "설계된" DNA 결합 단백질은 설계/구성이 주로 합리적인 기준에 따라 발생하는 자연에서 발생하지 않는 단백질일 수 있다. TALENs는 Joung *et al.*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2013, 14, 49-55에서 논의되고 기술된다. "선택된 TALE"은 파지 디스플레이, 상호작용 트랩 또는 하이브리드 선택과 같은 경험적 과정에서 주로 생성되는 자연에서 발견되지 않는 단백질일 수 있다. 본 명세서는 본 명세서에 기재된 폐지에 대한 TALENs의 용도를 제공하고 이를 포함한다.
- [0063] "저항성" 또는 "질병 저항성"은 유기체가 병원체의 공격으로부터 자신을 방어 및/또는 견딜 수 있고 영향을 받지 않고 남아 있을 수 있는 정도를 의미한다. 유기체는 병원체의 영향을 거의 받지 않는 것을 의미하는, 완전한 저항성을 나타낼 수 있다. 대안적으로, 유기체는 부분 내성을 나타낼 수 있으며, 여기에서 병원체가 유기체에 영향을 미치는 정도는 저항이 없는 비교 가능한 유기체보다 적을 수 있다. 내성은 유기체의 특정 특성에서 비롯되어 유기체가 유기체-병원체 상호작용의 결과를 피할 수 있도록 한다. 내성은 유기체가 관련 질병 증상을 회피하거나 임상 징후의 발생/심각도를 감소시키거나 병원체와 관련된 임상 증상을 감소시킬 수 있는 정도에 의해 입증될 수 있다.
- [0064] 용어 "저항성 증가" 및 "감수성 감소"는 주어진 병원체에 의한 감염과 관련된 임상 징후 또는 임상 증상의 발병률 및/또는 중증도의 통계적으로 유의한 감소를 의미한다. 예를 들어, "증가된 내성" 또는 "감소된 감수성"은 비변형된 염색체 서열을 갖는 대조군 동물과 비교하여 CD163 유전자 단백질에서 결실되거나 비활성화된 염색체 서열을 포함하는 동물에서 PRRSV에 의한 감염과 관련된 임상 징후 또는 임상 증상의 발생률 및/또는 중증도의 통계적으로 유의한 감소를 의미한다. "임상 증상의 통계적으로 유의한 감소"라는 용어는 변형된 대상(subject) 그룹에서 적어도 하나의 임상 증상의 발생 빈도를 의미하지만 이에 제한되지 않으며, 일부 측면에서, 임상 증상은 감염원으로 공격한 후 비-변형 대조군에서보다 통계적으로 적어도 80% 더 낮을 수 있다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 용어 "임상 징후의 발생률 및/또는 중증도 감소" 또는 "임상 증상 감소"는 다른 유사한 유전적 배경의 야생형 감염과 비교하여, 그룹에서 감염된 대상(subject)의 수를 감소시키는 것, 감염의 임상 징후를 나타내는 대상의 수를 감소 또는 제거하는 것, 또는 하나 이상의 대상에 존재하는 임의의 임상 징후의 중증도를 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 이러한 용어는 감염, 폐 병리, 바이러스혈증, 항체 생산, 병원체 부하의 감소, 병원체 배출, 병원체 전파의 감소 또는 유사한 배경과 비교할 때 PRRS의 증상을 나타내는 임의의 임상 징후의 감소의 임의의 임상 징후를 포함한다. 편집되지 않은 CD163 폐지와 CD163 편집 폐지 간의 임상 징후 비교는 개별적으로 또는 무리 간에 이루어질 수 있다. 일 측면에서, 개별 폐지는 임상 징후를 나타내지 않는다. 일 측면에서, CD163 편집 폐지 무리는 감소된 임상 징후를 나타낸다. 일 측면에서, 무리의 크기는 적어도 100마리의 동물일 수 있다. 일 측면에서, 본 명세서의 CD163 편집 폐지는 생식 증후군의 임상 징후가 감소될 수 있다. 일 측면에서, CD163 편집 폐지 무리는 조기 분만 횟수 감소, 사산 또는 미라 새끼 폐지 수 감소, PRRSV-양성 새끼 폐지 수 감소, 또는 암태지 서비스 복귀 지연 감소를 가질 수 있다. 일 측면에서, 본 명세서의 CD163 편집 폐지는 감소된 식욕 부진, 감소된 발열, 감소된 혼수, 감소된 폐렴, 감소된 아갈락티카(agalactica), 및

감소된 피하 및 뒷다리 부종을 포함하지만 이에 제한되지 않는 어린 암퇘지 및 암퇘지에서 감소된 임상 징후를 가질 수 있다. 일 측면에서, 본 명세서의 CD163 편집 돼지인 어린 암퇘지 및 암퇘지는 귀 및 외음부의 적색/청색 변색을 감소시킬 수 있다. 일 측면에서, CD163으로 편집된 모돈은 젖을 땀 후 발정으로 돌아가는 지연이 감소될 수 있다. 본 명세서는 CD163 편집된 암퇘지 및 모돈 무리 사이에서 감소된 폐사를 제공하고 포함한다. 또한 본 명세서에 의해 포함되고 제공되는 것은 비육돈(finishing pigs)의 감소된 임상 징후이다. 일 측면에서, CD163 편집 비육돈 무리는 발열, 재채기, 호흡과다, 호흡곤란, 기침, 폐렴, 혼수, 안구주위 부종 및 안구-비강 분비물로 이루어진 군으로부터 선택된 감소된 호흡기 임상 징후를 가질 수 있다. 바람직하게는 이러한 임상 징후는 CD163 유전자에 변형이 없고 유사한 배경을 갖고 감염되는 대상과 비교하여 본 교시의 하나 이상의 동물에서 적어도 10%까지 감소될 수 있다. 일 측면에서, 임상 징후는 본 교시의 대상에서 적어도 80%까지 감소될 수 있다. 또 다른 측면에서, 임상 징후는 본 교시의 돼지에서 적어도 85%까지 감소될 수 있다. 추가적인 측면에서, 임상 징후는 본 교시의 돼지에서 적어도 90%까지 감소될 수 있다. 또 다른 측면에서, 임상 징후는 본 교시의 돼지에서 적어도 95%까지 감소될 수 있다. 본 개시내용에 따른 측면에서, 임상 징후는 편집되지 않은 CD163 돼지에 비해 80% 내지 100% 감소될 수 있다.

[0066] 본 명세서에 사용된 용어 "번식"은 차세대 자손의 생성을 위해 사용하는 우수한 수컷 및 우수한 암컷 동물의 선택을 포함하는 과정을 의미한다. 이 과정은 수정이 일어나도록 남성과 여성 배우자의 결합을 더 포함한다. 이러한 결합은 교배(교미) 또는 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*) 인공 방법에 의해 이루어질 수 있다. 그러한 인공 방법은 인공 수정, 외과 보조 인공 수정, 시험관 내(*in vitro*) 수정, 세포질 내 정자 주입, zona drilling, 수정된 난모세포의 시험관 내(*in vitro*) 배양, 난소 이식 및 난소 분할을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에 사용된 용어 "번식"은 또한 특정 엘리트 암컷으로부터 더 많은 자손을 허용하기 위해 수정된 난모세포(fertilized oocyte)를 암컷 동물의 생식관으로 이식하는 것을 포함할 수 있다.

[0067] 본 명세서에 사용된 "참조 서열"은 서열 비교를 위한 기초로 사용되는 정의된 서열이다. 참조 서열은 지정된 서열의 부분 집합 또는 전체일 수 있다. 예를 들어, 전장 프로모터 서열의 세그먼트, 또는 완전한 프로모터 서열일 수 있다. 일 측면에서, 참조 서열은 Sscrofa11.1 참조 지놈일 수 있다(GenBank accession: GCA_000003025.6).

[0068] 2개 이상의 뉴클레오타이드 또는 단백질 서열과 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 "퍼센트 동일성 (percent identity)" 또는 "퍼센트 동일 (percent identical)"은 (i) 비교 창에 걸쳐 2개의 최적으로 얼라인된(aligned) 서열(뉴클레오타이드 또는 단백질)을 비교하고, (ii) 동일한 핵산 염기(뉴클레오타이드 서열의 경우) 또는 아미노산 잔기(단백질의 경우)가 두 서열 모두에서 발생하여 일치하는 위치의 수를 산출하는 위치의 수를 결정하며, (iii) 일치하는 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수로 나눈 다음, (iv) 백분율 동일성을 산출하기 위해 이 몫에 100%를 곱하는 것에 의해 계산된다. 특정 비교 창을 지정하지 않고 참조 서열과 관련하여 "퍼센트 동일성"을 계산하는 경우, 상기 퍼센트 동일성은 얼라인먼트(alignment) 영역에 걸쳐 일치하는 위치의 수를 참조 서열의 총 길이로 나누어 결정할 수 있다. 따라서, 본 출원의 목적을 위해, 2개의 서열(쿼리(query) 및 대상(subject))가 최적으로 정렬될 때(그들의 얼라인먼트에서 갭(gap)을 허용함), 쿼리 서열의 "퍼센트 동일성"은 두 서열 사이의 동일한 위치 수를 해당 길이(또는 비교 창)에 대한 쿼리 서열의 총 위치 수로 나눈 다음 100% 곱한 것과 같을 수 있다.

[0069] 서열 동일성의 백분율이 단백질과 관련하여 사용될 때, 동일하지 않은 잔기 위치는 종종 보존적 아미노산 치환에 의해 상이할 수 있으며, 여기서 아미노산 잔기는 유사한 화학적 성질(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환될 수 있고 따라서 분자의 기능적 특성을 변하지 않음을 인지한다. 서열의 보존적 치환이 다른 경우, 치환의 보존적 특성을 수정하기 위해 서열 동일성 퍼센트를 상향 조정할 수 있다. 이러한 보존적 치환에 의해 상이한 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는다고 한다.

[0070] 퍼센트 동일성을 계산하기 위한 서열의 최적 얼라인먼트(alignment)를 위해, 두 개 이상의 뉴클레오타이드 또는 단백질 서열 간의 서열 동일성 또는 유사성을 비교하는 데 사용할 수 있는 ClustalW 또는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®, National Library of Medicine, Bethesda, MD)와 같은 다양한 쌍-별 또는 다중 서열 정렬 알고리즘(multiple sequence alignment algorithms) 및 프로그램이 당업계에 공지되어 있다. 다른 얼라인먼트(alignment) 및 비교 방법이 당업계에 공지되어 있지만, 2개의 서열 사이의 정렬 및 동일성 퍼센트(상기 기재된 동일성 퍼센트 범위 포함)는 ClustalW 알고리즘에 의해 결정될 수 있으며, 예를 들어, Chenna, R., *et al.*, Nucleic Acids Research, 2003, 31, 3497-3500; Thompson, J.D., *et al.*, Nucleic Acids Research, 1994, 22, 4673-4680; Larkin MA *et al.*, Bioinformatics, 2007, 23, 2947-2948; 및 Altschul,

S.F., *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410.을 참조한다.

- [0071] 본 명세서에서 사용되는 서열에 대한 동일성은 2개의 서열의 얼라인먼트(alignment)에 따라 결정되는 바와 같이 2개의 서열 사이의 동일성 퍼센트로 표현될 수 있다. 본 명세서는 지놈의 인접 영역에 대해 적어도 80% 동일성을 가질 수 있는 복구 주형 서열을 제공한다. 일 측면에서, 복구 주형은 지놈의 인접 영역에 대해 적어도 80% 동일성을 공유하는 5' 영역 및 3' 영역 및 의도된 유전자 편집 부위에 인접하는 염색체 서열에 대해 동일성을 갖는 코어 영역을 가질 수 있다.
- [0072] 본 명세서는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택된 표적 서열과 100% 동일할 수 있는 표적 서열을 제공하고 이를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이들 표적 서열은 상기 표 1에 열거된 것과 같은 PAM 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 가이드 RNA에 혼입될 때, 일 측면에서 스페이서 영역은 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드의 군으로부터 선택된 서열에 대해 100% 동일성을 공유할 수 있다. 또한, 서열번호 22 내지 271 각각의 15 내지 20개 뉴클레오타이드 또는 서열번호 347 내지 425 각각의 15 내지 20개 뉴클레오타이드를 가질 수 있는 스페이서 서열이 포함된다. (서열의 나머지 부분은 지놈에 존재할 수 있는 PAM 서열을 포함할 수 있지만 gRNA 분자는 포함하지 않는다.) 표적 서열에 대해 하나 이상의 미스매치를 가질 수 있는 가이드 RNA 스페이서 서열이 또한 포함되고 제공된다. 일 측면에서, 미스매치는 엔도뉴클레아제 절단 부위에서의 동일성이 유지되는 것을 보장하기 위해 서열 표적 서열의 먼 말단에 있을 수 있다. 일반적으로 미스매치는 3' 말단의 뉴클레아제 부위에 비해 표적 서열의 5' 말단에서 발생할 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 또는 이로부터 제조된 가이드 RNA의 스페이서 서열은 단일 미스매치를 가질 수 있다. 또 다른 측면에서, 표적 서열, 또는 이로부터 제조된 가이드 RNA의 스페이서 서열은 2개의 미스매치를 가질 수 있다. 또 다른 측면에서, 서열, 또는 이로부터 제조된 가이드 RNA의 스페이서 서열은 3개의 미스매치를 가질 수 있다. 또 다른 측면에서, 서열, 또는 이로부터 제조된 가이드 RNA의 스페이서 서열은 4개 미만의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 측면에서, 미스매치 영역은 PAM 서열 및 절단 부위에서 먼 말단 뉴클레오타이드로 제한될 수 있다.
- [0073] 일 측면에서, gRNA 가이드의 표적 서열 및 스페이서 서열은 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 가질 수 있다. 추가적인 측면에서, RNA 가이드는 서열의 3' 말단에서 15개 뉴클레오타이드에서 적어도 90% 동일성 및 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 및 RNA 가이드는 적어도 95% 동일성을 가질 수 있다. 추가적인 측면에서, RNA 가이드는 서열의 3' 말단에서 15개 뉴클레오타이드에서 적어도 95% 동일성 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 및 RNA 가이드는 적어도 96% 동일성을 가질 수 있다. 추가적인 측면에서, RNA 가이드는 서열의 3' 말단에서 15개 뉴클레오타이드에서 적어도 96% 동일성 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 및 RNA 가이드는 적어도 97% 동일성을 가질 수 있다. 추가적인 측면에서, RNA 가이드는 서열의 3' 말단에서 15개 뉴클레오타이드에서 적어도 97% 동일성 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 및 RNA 가이드는 적어도 98% 동일성을 가질 수 있다. 추가적인 측면에서, RNA 가이드는 서열의 3' 말단에서 15개 뉴클레오타이드에서 적어도 98% 동일성 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 및 RNA 가이드는 적어도 99% 동일성을 가질 수 있다. 추가적인 측면에서, RNA 가이드는 서열의 3' 말단에서 15개 뉴클레오타이드에서 적어도 99% 동일성 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 측면에서, 표적 서열 및 RNA 가이드는 적어도 100% 동일성을 가질 수 있다. 또한, 본 명세서에 의해 포함되고 제공되는 것은 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 15개 뉴클레오타이드 또는 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 15개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 스페이서 서열이다. 일 측면에서, 스페이서 서열은 서열번호 22 내지 271 각각에서 처음 16개 뉴클레오타이드 또는 서열번호 347 내지 425 각각에서 처음 16개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 스페이서 서열은 서열번호 22 내지 271 각각에서 처음 17개 뉴클레오타이드 또는 서열번호 347 내지 425 각각에서 처음 17개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 스페이서 서열은 서열번호 22 내지 271 각각에서 처음 18개 뉴클레오타이드 또는 서열번호 347 내지 425 각각에서 처음 18개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 스페이서 서열은 서열번호 22 내지 271 각각에서 처음 19개 뉴클레오타이드 또는 서열번호 347 내지 425 각각에서 처음 19개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0074] 돼지 번식(pig breeding)을 지칭하기 위해 본 명세서에 사용된 "수정"의 바람직한 의미는 생존 가능한 배아를 생산하는 임의의 기술을 포함한다. 수정에는 암컷 돼지의 수정과 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 외(*ex vivo*) 수정이 모두 포함될 수 있다. 암돼지의 수정에는 일반적으로 사용 가능한 세 가지 방법, 즉 전통적인 인공 수정(artificial insemination, AI), 자궁 내 수정(intrauterine insemination, IUI) 및 심부 자궁 내 수정(deep

intrauterine insemination, DIUI)이 있다. 이러한 기술은 모두 수정을 위해 일반적으로 신선하고 얼지 않은 정액을 제공하는 데 의존적이다. 체외 수정(*in vitro* fertilization, IVF)은 수정되지 않은 난모세포(들)를 채취한 후 표준 ET에서와 같이 생체 내(*in vivo*)(즉, 살아있는 동물, 위에서 논의한 수정) 대신 시험관(*in vitro*)(즉, 실험실)에서 정액으로 난모세포를 수정하는 것일 수 있다. 수정된 난모세포 또는 난모세포 공여자의 배아는 다른 여성(배아 수여자)에게 이식될 수 있다. 배아 이식(Embryo transfer, ET)은 한 여성(배아 공여자)에서 수정된 난모세포 또는 배아를 수확하고 생식 상태가 공여자와 동기화될 수 있는 다른 여성(배아 수여자)에게 이러한 배아를 이식할 수 있다.

[0075] Cameron *et al.* (Nat Methods, 2017, 14, 600-606)에 기술된 바와 같이, CRISPR-Cas9 시스템은 기초 연구와 생명 공학 모두에서 지놈 편집에 사용할 수 있다. 유전자 또는 지놈 편집에 대한 CRISPR 및 관련 기술의 적용은 원치 않는 표적 외(off-target) 절단 활성 및 가능한 병원성 및 기타 부정적인 표현형 결과를 동반할 수 있다. 표적 외(off-target) 절단을 최소화하기 위해 다양한 지놈-전체의 실험 방법이 최근에 개발되었지만 일부 방법은 관련 절단 부위를 복구하는 데 있어 세포 컨텍스트(cellular context) 또는 비효율성으로 인해 잠재적으로 편향되어 있다. 접근 시 Cameron *et al.*에 기재된 SITE-SEQ® assay (Caribou Biosciences, Inc., Berkeley CA)을 통해 샘플 지놈에서 Cas9 절단 부위를 포괄적으로 나열한 다음, (1) 고분자량 지놈 DNA의 추출 및 정제, (2) 시험관 내(*in vitro*) Cas9 리보핵단백질(RNP) 절단의 실행, (3) Cas9 절단 단편을 강화하기 위한 단편화, 어댑터 결합(adapter ligation) 및 친화성 정제(affinity purification), 및 (4) ILLUMINA®(ILLUMINA®, San Diego, CA) 시퀀싱을 위한 SITE-SEQ® 라이브러리의 증폭 및 인덱싱을 통한 후속 실험에서 세포 표적 외 편집을 위해 해당 부위를 조사할 수 있다. (Cameron *et al.*, Nat Methods, 2017, 14, 600-606 참조). 잠재적인 표적 외(off-target) 편집의 수를 발견하고 감소시키는 다양한 다른 방법이 지놈 편집 분야에 알려져 있다. 그러한 생물정보학 도구는 적합한 표적 서열을 식별하는 데 매우 유용할 수 있지만, 오류율은 일반적으로 원하는 것보다 높으며 시스템에 광범위한 서열 데이터가 부족한 경우 접근 방식이 제한될 수 있다. 또한, DSB 절단 복구의 정확도는 다양할 수 있으므로 원치 않는 오프 타겟 효과를 예측하고 방지하는 능력을 혼란스럽게 할 수 있다. 인실리코(*in silico*) 선택된 표적 서열에 대한 추가 테스트는 더 높은 효율과 더 적은 표적 외 절단을 갖는 선택된 서열을 식별할 수 있다. 고처리량 시퀀싱(high-throughput sequencing) 방법과 결합된 세포 배양 시스템에서의 테스트는 성능이 낮은 표적 구성을 식별하는 데 사용할 수 있다.

[0076] 예를 들어, *Streptococcus pyogenes*(*S. pyogenes*)로부터 유래된 유형 II CRISPR 시스템은 Cas9, 백본 서열(backbone sequence) 및 서열번호 22 내지 271의 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 특이성-결정 CRISPR RNA(crRNA), 및 보조 트랜스-활성화 RNA(trans-activating RNA, tracrRNA)를 사용하여 포유동물 세포에서 재구성될 수 있다. 용어 "표적 외 효과(off target effect)"는 타겟 치료 또는 절차의 결과로 의도되지 않고 의도되지 않은 모든 영향을 광범위하게 나타낸다. 표적 외(off-target) 편집의 예에는 의도하지 않은 뉴클레오타이드의 DNA 삽입 또는 복구 주형, 삭제 또는 재배열로 이어지는 의도하지 않은 위치에서의 이중 가닥 절단(double strand breaks)이 포함될 수 있다. *S. pyogenes* 및 *S. thermophilus* CRISPR 시스템과 같은 일부 시스템의 경우, crRNA 및 tracrRNA 이중가닥을 융합하여 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 생성할 수 있다. sgRNA의 처음 20개 뉴클레오타이드는 표적 DNA 서열에 상보적일 수 있고 스페이서 영역일 수 있으며, 이러한 20개 뉴클레오타이드는 지놈(가이드가 아님)의 3' 말단에서 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)가 올 수 있다. 일 측면에서, sgRNA 및 PAM 서열의 처음 20개 뉴클레오타이드는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택된 서열일 수 있다. 따라서, 하기 표 2 및 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425에 제공된 바와 같이, *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*로부터의 Cas 뉴클레아제의 특이적 표적화는 crRNA를 백본 서열과 조합하여 달성될 수 있다. sgRNA의 20개 뉴클레오타이드 가이드 서열과 PAM 서열(예: 23개 내지 25개 뉴클레오타이드)이 엄격하게 제어된 표적화 및 절단을 제공할 수 있지만, 표적 외(off-target) 절단 활성이 sgRNA-가이드 서열의 PAM-말단 부분에서 3-5개 염기쌍 미스매치를 갖는 DNA 서열에서 여전히 발생할 수 있다는 것이 발견되었다. 또한, 다양한 유형의 가이드 RNA 구조가 실제로 절단 정밀도에 영향을 미치며 표적 외(off-target) 부위의 절단을 증가 또는 감소시킨다. 다양한 기술과 표적 외 절단에 대한 추가 설명은 Zhang *et al.*, Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4, e264 에서 검토된다. 표적 외(off-target) 절단의 메커니즘과 효과는 아직 제대로 이해되지 않았으며, 이는 그 효과를 예측하고 보상하기 어려울 수 있음을 의미한다. 그러나, 그 결과는 심각할 수 있고; 표적 외 절단은 궁극적으로 지놈 불안정으로 이어질 수 있으며 그렇지 않은 경우 정상 유전자의 기능을 방해할 수 있다.

[0077] 본 명세서는 CD163 유전자의 두 대립유전자 모두에서 비활성화 편집을 가질 수 있고 PRRSv에 의한 감염에 내성일 수 있는 돼지를 제공하고 포함한다. 본 명세서에 개시된 CD163 돼지는 새로운 서열 또는 폴리펩타이드를 추가로 포함하지 않으며, 프레임시프트(frameshifts) 또는 미스센스 돌연변이(missense mutations)로 인한 비-천

연(non-native) 아미노산도 포함하지 않는다. 본 명세서에 개시된 유전자 편집은 CD163-양성 태아(예를 들어, 하나 이상의 야생형 CD163 대립유전자를 갖는 태아)의 보호를 허용한다. CD163-양성 태아는 댐(dam)이 CD163 유전자의 두 대립 유전자 모두에서 비활성화 편집을 보유하는 한 자궁에 있는 동안 PRRSv 감염으로부터 보호될 수 있다(PCT/US2018/027944). 예를 들어, CD163 유전자의 두 대립유전자 모두에서 비활성화 편집을 갖는 어미는 2 개의 야생형 CD163 대립유전자를 갖는 수컷과 교배될 수 있으며, 생성된 이형접합 태아는 자궁 내(in utero) PRRSv 감염으로부터 보호될 것이다.

[0078] 일 측면에서, CD163의 하나의 대립유전자에서 비활성화 편집을 갖는 돼지는 본 명세서의 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 이형접합 CD163 대립유전자(하나는 편집되고, 하나는 야생형)를 갖는 이러한 돼지는 이형접합 CD163 대립유전자 또는 동형 편집 CD163 대립유전자를 또한 갖는 다른 돼지와 교배될 수 있고, 동형접합 편집 CD163 대립유전자를 갖는 이 번식의 자손은 PRRSv 감염에 대한 내성을 위해 선택될 수 있다. 본 개시내용은 또한 돼지 동물 및 개체군(population), 및 돼지 동물 및 개체군을 생성 또는 개선하는 방법을 제공하고 포함하며, 여기서 동물은 하나 이상의 특정 유전자 마커 또는 대립유전자에 대해 동형접합성일 수 있다. 다양한 측면에서, 본 개시내용은 동물, 및 하나 이상의 특정 유전자 마커 또는 대립유전자에 대해 이형접합성일 수 있는 동물을 생성하고, 상기 동물을 하나 이상의 특정 유전적 마커 또는 대립 유전자에 대해 이형접합성인 다른 동물과 교배하여 하나 이상의 특정 유전자 마커 또는 대립 유전자에 대해 동형접합성일 수 있는 동물을 생산함으로써, 교차 돼지 및 개체군을 생산 또는 개선하는 방법을 제공하고, 이를 포함한다. 일부 측면에서, 특정 유전자 마커 및 대립유전자 각각에 대한 동형접합성을 얻기 위해 다중 라운드의 교차 및/또는 역교차가 필요할 수 있다. 다른 측면에서, 단일 교차는 동형접합성을 얻기에 충분할 수 있다.

[0079] 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 유전자를 비활성화시켜 녀아웃 동물을 만들고/만들거나 편집된 유전자를 동물에 도입하여 시초 동물(founder animals)을 생성하고 녀아웃 또는 핵산 컨스트럭트가 지놈에 통합될 수 있는 동물 계통을 만들 수 있다. 이러한 기술에는 전핵 미세주사(pronuclear microinjection)(미국 특허 번호 4,873,191), 생식선으로의 레트로바이러스 매개 유전자 전달(Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 6148-1652), 배아 줄기 세포로의 유전자 표적화(Thompson *et al.*, Cell, 1989, 56, 313-321), 배아의 전기천공(electroporation)(Lo, Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 1803-1814), 정자 매개 유전자 전달(Lavitrano *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99, 14230-14235; Lavitrano *et al.*, Reprod. Fert. Develop., 2006, 18, 19-23), 및 체세포(예: 적운(cumulus) 또는 유선 세포, 또는 성체, 태아 또는 배아 줄기 세포)의 시험관 내(in vitro) 형질전환 후 핵 이식(Wilmot *et al.*, Nature, 1997, 385, 810-813 및 Wakayama *et al.*, Nature, 1998, 394, 369-374)이 제한없이 포함될 수 있다. 전핵 미세주입, 정자 매개 유전자 전달 및 체세포 핵 전달은 다른 유용한 기술이 될 수 있다. 동물은 생식선 세포를 포함하여 모든 세포에 편집이 있다는 점에서 지놈 편집이 가능하다. 변형이 모자이크인 동물을 생산하는 방법이 사용되는 경우, 동물은 모자이크가 될 수 있고 표준 방법을 사용하여 추가 근친 교배 및 지놈 편집된 자손을 생산 및 선택할 수 있다. 예를 들어, 복제는 배반포 단계(blastocyst stage)에서 세포가 편집되면 모자이크 동물(mosaic animal)을 만드는 데 사용될 수 있으며 단일-세포가 편집되면 지놈 변형이 발생할 수 있다. 일 측면에서, 비활성화된 녀아웃 편집은 동형접합성일 수 있다.

[0080] 배아/접합체 미세주사 측면에서, 핵산 컨스트럭트(construct), mRNA, 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합은 수정란에 도입될 수 있다. 일 측면에서, 하나 또는 두 개의 세포 수정란이 사용될 수 있다. 하나 및 두 개의 세포 수정란은 원형질 내의 정자 머리와 난자의 유전 물질을 포함하는 가시적인 핵 구조를 제공할 수 있다. 일 측면에서, 전핵 단계 수정란은 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo)에서 수득될 수 있다(즉, 공여자 동물의 난관으로부터 외과적으로 회수됨). 또 다른 측면에서, 시험관 내(in vitro) 수정란, 예를 들어, Agung *et al.*, J Reprod Dev., 2013, 59, 103-106 및 Appeltant *et al.*, J Reprod Dev., 2016, 62, 439-449을 참조한다. 일 측면에서, 시험관 내(in vitro) 수정 방법에 사용하기 위해 성숙한 난모세포가 제공될 수 있다. 또 다른 측면에서, 성숙한 난모세포는 본 명세서의 CRISPR/Cas 유전자 편집 시스템으로 주입될 수 있다.

[0081] 본 명세서는 성숙한 난모세포의 시험관 내(in vitro) 수정을 추가로 제공한다. 일 측면에서, 난모세포는 상기 제공된 바와 같이 시험관 내(in vitro)에서 성숙될 수 있다. 또 다른 측면에서, 성숙한 난모세포는 암태지로부터 수득될 수 있다. 체외 수정은 확립된 방법에 따라 수행된다. Appeltant *et al.*, J Reprod Dev., 2011, 57, 9-16 및 Fowler *et al.*, Reprod Biol., 2018, 18, 203-211을 참조한다.

[0082] 접합체 또는 배아는 인공 수정 및 플러싱(flushing)에 의한 생식선 편집을 위해 수득될 수 있다. 수득된 접합체 또는 배아는 이후에 본 명세서에서 제공된 방법을 사용하여 편집될 수 있다. 일 측면에서, 선행화된 핵산 컨스

트럭트, mRNA, 단백질, 폴리뉴클레오타이드 또는 이들의 조합은, 예를 들어, 전기천공에 의해 전핵 중 하나 또는 수정 후 접합체 또는 배아의 세포질 내로, 또는 수정 전 배우자 세포 내로 주사되거나 달리 도입될 수 있다. 일 측면에서, Cas 뉴클레아제 단백질 및 서열번호 19의 백본(backbone)과 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 중 어느 하나로부터 선택된 표적화 서열을 포함하는 가이드 RNA를 포함하는 미리-형성된 RNP-복합체가 제조하여 배아, 접합체, 또는 난모세포에 주입할 수 있다. 또 다른 측면에서, Cas 뉴클레아제 및 서열번호 19의 백본(backbone)과 서열번호 22 내지 271의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열의 RNA 서열로부터 선택된 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA를 포함하는 미리-형성된 RNP 복합체를 제조하여 표 6에 열거된 서열번호 1 내지 13을 포함하는 복구 주형과 함께 배아, 접합체, 또는 난모세포에 주입할 수 있다. 또한, 본 명세서는 표 6에 열거된 서열번호 1 내지 13의 서열을 가질 수 있는 스페이서 서열 및 복구 주형의 조합을 포함하고 제공한다. 일 측면에서, 주입된 접합체 또는 배아는 수여자 암컷(recipient female)에게 (예를 들어, 수여자 암컷의 난관으로) 전달될 수 있고 수여자 암컷 내에서 발달하여 트랜스제닉 또는 유전자 편집 동물을 생산할 수 있다. 일 측면에서, 방법은 전핵의 가시화를 허용하는 지질을 침전시키기 위해 5분 동안 15,000 x g에서 원심분리될 수 있는 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*) 수정된 접합체 또는 배아를 추가로 제공한다. 접합자 또는 배아는 EPPENDORF® FEMTOJET® (EPPENDORF® AG, Germany) 주입기를 사용하여 주입할 수 있으며 배반포가 형성될 때까지 배양할 수 있다. 배아 분열 및 배반포 형성 및 품질의 속도를 기록될 수 있다.

[0083] 일 측면에서, CRISPR/Cas 편집 시스템 및 gRNA는 핵산 컨스트럭트로서 제공될 수 있다. 또 다른 측면에서, Cas 뉴클레아제는 백본 서열(backbone sequence) 및 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적화 서열을 포함하는 가이드 RNA와 함께 mRNA로서 제공될 수 있다. 또 다른 측면에서, Cas 뉴클레아제는 백본 서열 및 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적화 서열과 함께 표 6에 열거되고 서열번호 1 내지 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 복구 주형을 포함하는 가이드 RNA와 함께 mRNA로서 제공될 수 있다. 추가적인 측면에서, 유전자 표적화 복합체는 Cas 뉴클레아제 및 백본 서열과 서열번호 22 내지 271의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적화 서열을 포함하는 가이드 RNA를 암호화하는 전사가능한 DNA의 미세주입에 의해 제공될 수 있다. 본 명세서에 따른 측면에서, 백본 서열은 서열번호 19의 서열일 수 있다. 또한, 본 명세서에 의해 포함되고 제공되는 것은 서열번호 1 내지 13에 인용된 서열 중 하나를 가질 수 있는 표적화 서열 및 복구 주형의 조합이다. 뉴클레아제, gRNA, 및 선택적으로 복구 주형 서열의 다양한 조합이 본 발명의 목적을 달성하기 위해 난모세포, 접합체, 포배 및 배아에 도입될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 다른 백본 서열(backbone sequence)이 다른 Cas 뉴클레아제와 함께 사용하기 위해 서열번호 22 내지 271 및 서열번호 347 내지 425의 표적화 서열과 함께 사용될 수 있음이 추가로 이해될 것이다. NGG 또는 NGGNG의 PAM 서열을 갖는 임의의 Cas 뉴클레아제는 본 명세서의 표적화 서열과 조합하기 위한 백본 서열의 제조에 적합할 수 있다. 다양한 측면에서, 원하는 편집은 서열번호 426 내지 505의 최종 지놈 서열을 가질 수 있다. 일부 구성에서, 원하는 편집은 엑손 7이 없고 서열번호 426 내지 458에 기재된 최종 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, 최종 지놈 서열은 외인성 정지 코돈을 포함할 수 있고 서열번호 459 내지 504에 기재된 바와 같은 최종 지놈 서열을 가질 수 있다. 다양한 구성에서, 이들 부분적 CD163 유전자는 서열번호 506 내지 517에 기재된 엑손 7 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일 측면에서, 주입된 접합체 또는 배아는 수여자 암컷(recipient female)에게 (예를 들어, 수여자 암컷의 난관으로) 전달될 수 있고 수여자 암컷 내에서 발달하여 트랜스제닉 또는 유전자 편집 동물을 생산할 수 있다. 일 측면에서, 방법은 전핵의 가시화를 허용하는 지질을 침전시키기 위해 5분 동안 15,000 x g에서 원심분리될 수 있는 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*) 수정된 접합체 또는 배아를 추가로 제공한다. 접합자 또는 배아는 EPPENDORF® FEMTOJET® (EPPENDORF® AG, Germany) 주입기를 사용하여 주입할 수 있으며 배반포가 형성될 때까지 배양할 수 있다. 배아 분열 및 배반포 형성 및 품질의 속도를 기록될 수 있다.

[0084] 본 명세서는 본 개시내용에 따른 CRISPR/Cas/gRNA 조합이 주입될 수 있는 하나 이상의 배아를 갖는 수여자 모돈(recipient sow)을 제공하고 이를 포함한다. 일 측면에서, Cas 뉴클레아제 및 서열번호 19의 백본(backbone)과 서열번호 22 내지 271의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서 서열을 포함하는 미리-형성된 RNP 복합체가 제공될 수 있다. 다양한 측면에서, Cas 뉴클레아제 및 서열번호 19의 백본(backbone)을 포함하는 가이드 RNA 및 서열번호 22 내지 271의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 각각의 상이한 스페이서 서열을 포함하는 2개의 미리-형성된 RNP 복합체가

제공될 수 있다. 또한, Cas 뉴클레아제 및 서열번호 22 내지 271의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425의 각각의 처음 20개의 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 표적화 서열을 포함하는 가이드 RNA를 포함할 수 있는 미리-형성된 RNP가 주입된 하나 이상의 배아를 가질 수 있는 수여 모돈이 제공되고 이를 포함한다. 일 측면에서, 미리-형성된 RNP 복합체는 표 6(서열번호 1 내지 13)에 열거된 복구 주형과 함께 제조되어 배아, 접합체 또는 난모세포에 주입될 수 있다. 일 측면에서, 수여자 모돈은 공여자 배아와 상이한 계통의 모돈일 수 있다.

[0085] 배아 또는 접합체는 동시 수여자의 자궁 내로 외과적으로 이식될 수 있다. 일반적으로 100-200개(또는 150-200개)의 배아 또는 접합체가 카테터를 사용하여 난관의 팽대부-협부 접합부에 침착될 수 있다. 수술 후 실시간 임신초음파검사가 가능하다. 일 측면에서, 본 명세서는 1 내지 100개, 보다 전형적으로는 30 내지 60개의 CRISPR/Cas/gRNA 조합 처리된 배아를 갖는 수여자 모돈을 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 배아는 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 서열을 포함하는 유전자 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 이식된 배아는 편집된 세포의 모자이크를 포함할 수 있다. 또한 모자이크가 아닐 수 있는 CD163 유전자 편집 배아도 포함된다.

[0086] 가축 동물 또는 가축 무리의 건강을 개선하는 방법은 동물 세포의 지능에서 표적 서열을 변형시켜 절단된 CD163 폴리펩타이드를 형성하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 절단된 CD163 폴리펩타이드를 가질 수 있는 개선된 동물이 제공되고 포함된다. 일부 측면에서, 예측된 절단된 폴리펩타이드는 비천연(non-native) 아미노산을 포함하지 않는다. 이론에 얽매이지 않고, 절단된 유전자 생성물은 세포 프로테아제에 의해 생체 내(*in vivo*)에서 빠르게 분해될 수 있다. 본 명세서의 일 측면에서, 절단된 CD163은 단백질의 완전한 제거를 초래할 수 있다. 추가적인 측면에서, 절단된 CD163은 생체 내(*in vivo*)에서 검출 불가능할 수 있다. 일 측면에서, 절단된 CD163은 면역형광 표지화 및 FACS 분석에 의해 검출 불가능할 수 있다. 또 다른 측면에서, 절단된 CD163은 실시예 5에 제공된 것을 포함하여 본 명세서에 제공된 임의의 발현 분석 방법을 사용할 때 검출 불가능할 수 있다. 또 다른 측면에서, 절단된 CD163은 실시예 8에 제공된 것을 포함하여 본 명세서에 제공된 임의의 발현 분석 방법을 사용할 때 검출 불가능할 수 있다.

[0087] 또 다른 측면에서, 유전자 편집된 CD163 돼지는 25개 이하의 비-천연(non-native) 아미노산을 갖는 절단된 CD163 유전자를 포함할 수 있다. 이론에 의해 제한되지 않고, 절단된 CD163 단백질은 불안정화될 수 있고 세포 내에서 분해를 위해 표적화될 수 있다. 따라서, 비천연 아미노산을 포함하는 CD163 단백질 서열 및 CD163 폴리펩타이드는 검출 불가능할 수 있다. 또 다른 측면에서, 예측된 절단된 CD163 단백질은 천연(native) 단백질의 211개 이하의 아미노산을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 144개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 일 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 133개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 또 다른 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 129개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 일 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 113개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 또 다른 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 108개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 추가적인 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 93개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 또 다른 측면에서, 절단된 CD163 단백질은 천연 단백질의 74개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 절단된 CD163 단백질은 천연 CD163 폴리펩타이드 서열의 32 내지 211개 아미노산 및 25개 이하의 비-천연 아미노산을 포함할 수 있고 세포 및 세포 추출물에서 검출 불가능할 수 있다.

[0088] 다른 측면에서, 변형된 CD163 단백질은 단일 아미노산 치환을 갖는 절단을 가질 수 있다. 일부 측면에서, 변형된 CD163 단백질은 1,010개 이하의 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0089] 본 명세서는 CD163 단백질의 절단을 가질 수 있는 유전자 편집된 CD163 돼지를 제공하고 이를 포함한다(예를 들어, CD163 참조 서열 NP_999141의 아미노산 1 내지 40). 이론에 제한되지 않고, 신호 펩타이드(신호 서열로도 알려짐) 내의 절단은 단백질이 세포막으로 전위되는 실패를 초래할 수 있고 폴리펩타이드는 후속적으로 세포 내에서 분해되는 것으로 여겨진다. 따라서, 신호 펩타이드 절단을 갖는 CD163 단백질은 PRRSv에 의한 감염에 내성인 CD163 null 동물을 생성할 수 있다. 일 측면에서, 신호 서열에서 절단된 단백질을 갖는 유전자 편집된 CD163 동물은 비-천연(non-native) 아미노산 서열의 25개 이하의 아미노산을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 유전자 편집된 돼지는 천연 CD163 단백질의 처음 39개 이하의 아미노산을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 유전자 편집된 돼지는 천연 CD163 단백질의 처음 39개 이하의 아미노산 및 15개 이하의 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 또한 본 명세서에 의해 포함되고 제공되는 것은 천연 CD163 단백질의 처음 38개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있는 유전자 편집 돼지이다. 일 측면에서, 유전자 편집된 돼지는 천연 CD163 단백질의 처음 38

개 이하의 아미노산 및 15개 이하의 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 또한 본 명세서에 의해 제공되고 포함되는 것은 천연 CD163 단백질의 처음 36개 이하의 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있는 유전자 편집 돼지이다. 일 측면에서, 유전자 편집된 돼지는 천연 CD163 단백질의 처음 36개 이하의 아미노산 및 15개 이하의 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 절단된 단백질은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 검출 불가능할 수 있다.

[0090] 일 측면에서, 유전자 편집된 돼지는 천연 CD163 단백질의 처음 34개 이하의 아미노산 및 15개 이하의 비-천연 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 일 측면에서, 유전자 편집된 돼지는 천연 CD163 단백질의 처음 32개 이하의 아미노산 및 15개 이하의 비-천연 아미노산을 포함하는 것으로 예측될 수 있다. 절단된 단백질은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 검출 불가능할 수 있다.

[0091] 추가로, 본 개시내용은 엑손 7(서열번호 459-504)의 결실, 외인성 정지 코돈이 엑손 7에 도입된 서열(서열번호 459-504)을 포함할 수 있는 CD163 단백질의 절단을 제공하고 포함한다. 이러한 절단에는 1,010개 이하의 아미노산을 포함하는 CD163 단백질이 포함될 수 있다.

[0092] 번식 기술(breeding techniques)을 사용하여 초기 동형접합 또는 이형접합 시초동물 또는 다른 이형접합 동물로부터 불활성화된 유전자에 대해 동형접합인 동물을 생성할 수 있다. 동형 동물이 생성될 수 있다. 본 명세서에 개시된 유전자 편집된 돼지는 관심 있는 다른 편집된 또는 야생형 돼지와 교배되어 궁극적으로 편집된 유전자에 대해 동형 또는 이형인 돼지를 생성할 수 있다. 일 측면에서, 동형접합성 동물은 PIC™ 엘리트 돼지 계통(line) 2, 3, 15, 19, 27, 62, 65, 및 이들의 조합과의 교배에 의해 생성된 계통 중 어느 하나의 동물일 수 있다. 일 측면에서, 동형접합 동물은 2계통과 3계통의 동물 사이의 교배에 의해 제조된 하이브리드 동물일 수 있다.

[0093] 유전자 편집은 돼지에서 PRRS를 비롯한 다양한 질병을 해결하는 데 사용되었다. 지난 15년 동안 여러 유전자 편집 기술이 개발되었지만, 일반적으로 이러한 플랫폼은 지놈의 특정 영역에 이중 가닥 절단을 도입하도록 설계될 수 있다. 도입된 절단은 세포 자체 시스템으로 복구될 수 있다.

[0094] 하나의 복구 경로인 비-상동 말단 연결(non-homologous end-joining, NHEJ)은 모든 생명의 계(kingdom)에 걸쳐 진화적으로 보존되며 포유동물 세포에서 우세한 이중-가닥 절단 복구 경로이다. 이 복구 과정은 절단 부위에 걸쳐 뉴클레오타이드의 무작위 삽입 또는 삭제를 초래할 수 있다. 실용적인 문제로서, 이 불완전한 정밀도(fidelity)는 DNA 복구 주형을 트랜스(trans)로 제공함으로써 유리하게 사용될 수 있다. 일 측면에서, 표적 부위의 대안적 대립유전자(예를 들어, 단일 염기 다형성 또는 단일 또는 다중 염기 삽입 또는 결실)를 보유하는 DNA 복구 주형은 유전자 편집 시약과 함께 공동-전달될 수 있고, 세포의 상동 재조합 시스템에서 DNA 복구 주형은 복구를 지시하여 새로운 대립 유전자를 생성할 수 있다. 본 명세서에 따른 측면에서, DNA 복구 주형은 CRISPR/CAS 절단의 고효율 위치(예를 들어, 표 3의 높은 편집 빈도) 및 야생형 서열만을 포함하는 절단된 단백질을 초래할 수 있는 결실을 도입하는 능력에 기초하여 설계 및 선택될 수 있다. 복구 주형은 유전자 편집의 효율성과 정확성을 높일 수 있다. 본 출원의 방법에 적합한 DNA 복구 주형은 서열번호 1 내지 13을 포함할 수 있다. 한 측면에서, DNA 복구 주형은 하기 표 6에 기재된 바와 같이 가이드 서열과 쌍을 이룰 수 있다. 형질전환과 달리, 본 명세서에 따른 지놈 편집은 지놈에 외래 DNA 서열의 도입을 초래하지 않는다.

[0095] 그러나, 이러한 외인성으로 추가된 DNA 복구 주형은 지놈에 무작위로 통합될 가능성이 있기 때문에, 결합된 말단이 결합된 말단을 가로질러 프레임 내 번역 정지 코돈의 생성을 초래할 수 있도록 DNA 서열의 결실을 초래하는 가이드 쌍을 확인하고 사용하는 것이 또한 유리하고; 두 가이드의 절단 부위가 NHEJ에 의해 중단 간 방식으로 복구될 때, 이 새로운 DNA 서열은 mRNA로 전사되고 단백질로 번역될 때 CD163 단백질의 생산을 종료할 수 있다. 이 종결된 CD163 단백질의 기능은 항상 그런 것은 아니지만, 손실될 수 있으며, 단백질 합성의 조기 종결은 표준 방법으로 분해될 수 있고 검출할 수 없는 불안정한 폴리펩타이드를 초래할 수 있다. 연결된 말단이 외인성 정지 코돈을 형성하도록 CD163 유전자의 엑손 7을 절단하는 가이드 쌍은 서열번호 351 및 365, 서열번호 351 및 387, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 348 및 395, 서열번호 352 및 365, 서열번호 352 및 387, 서열번호 352 및 399, 서열번호 353 및 365, 서열번호 353 및 387, 서열번호 353 및 399, 서열번호 354 및 390, 서열번호 354 및 388, 서열번호 354 및 395, 서열번호 358 및 361, 서열번호 358 및 362, 서열번호 358 및 368, 서열번호 358 및 384, 서열번호 358 및 394, 서열번호 358 및 399, 서열번호 359 및 390, 서열번호 359 및 388, 서열번호 359 및 395, 서열번호 360 및 368, 서열번호 360 및 384, 서열번호 360 및 389, 서열번호 360 및 394, 서열번호 360 및 397, 서열번호 361 및 365, 서열번호 361 및 387, 서열번호 362 및 390, 서열번호 362 및 388, 서열번호 362 및 395, 서열번호 364 및 365, 서열번호 364 및 387, 서열번호 364 및 399, 서열번호 365 및 368, 서열번호 365 및 384, 서열번호 365 및 389, 서열번호 365 및 394, 서열번호 365

및 397, 서열번호 366 및 368, 서열번호 366 및 384, 서열번호 366 및 389, 서열번호 366 및 394, 및 서열번호 366 및 397을 포함할 수 있다.

[0096] 일 측면에서, 본 교시는 편집이 CD163 유전자의 초기에 발생하도록 엘리트 돼지에서 간단하고 정확하며 재현 가능한 단일 CD163 기능 상실 편집을 포함할 수 있다. 단일 가이드 RNA-Cas 단백질 조합 및 DNA 복구 주형은 다음의 몇 가지 고려 사항 및 접근 방식을 기반으로 엘리트 돼지의 특정 유전자 편집을 지시하기 위해 선택할 수 있다: 조직 배양에서 CD163 유전자의 5' 말단 부근의 효율적인 절단, 돼지 지놈에서 미스매치가 거의 없는 가이드를 식별하는 생물정보학적 검토, 생화학적 사전 선별에 의해 결정된 표적(on-target) 절단의 높은 특이성, 및 돼지 배아-유사 세포의 의도된 부위에서 특정 유전자 편집을 표적화하는 능력. CD163의 특정 유전자 편집의 예는 아래에 자세히 설명되어 있다. 일 측면에서, 본 명세서에 따른 특정 유전자 편집은 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CD163 유전자를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 편집된 CD163 유전자를 포함하는 세포는 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 적어도 하나의 대립유전자를 포함할 수 있다. 일 측면에서, CD163 유전자의 2개의 유전자 편집된 대립유전자를 포함하는 세포는 두 대립유전자 모두에서 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 2개의 유전자 편집된 CD163 유전자는 서열번호 1 내지 18 및 426-505(예를 들어, 서열번호 1의 2개의 대립유전자 또는 서열번호 2의 2개의 대립유전자 등)로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 세포의 지놈은 서열번호 1 내지 18 및 426-505(예를 들어, 서열번호 1의 대립유전자, 서열번호 2의 대립유전자 및 이들의 모든 조합)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 각각을 포함하는 유전자 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있다.

[0097] CD163 편집 세포 및 비-유전자 편집 세포를 포함할 수 있는 세포의 혼합물이 또한 제공되고 포함된다. 일 측면에서, 혼합물은 배아일 수 있다. 또 다른 측면에서, 혼합물은 세포 배양물일 수 있다. 추가적인 측면에서, 세포의 혼합물은 생식 세포를 포함하지 않는다. 일 측면에서, 본 명세서는 CD163 편집 세포의 조직 배양물 및 이러한 배양물을 제조하는 방법을 제공할 수 있고 포함할 수 있다. 본 명세서에 따른 배양물은 CD163 편집 세포의 혼합물을 포함할 수 있다(예를 들어, 서열번호 1의 대립유전자를 갖는 세포와 서열번호 2의 대립유전자를 갖는 세포, 서열번호 1의 대립유전자를 갖는 세포와 서열번호 3의 대립유전자를 갖는 세포, 및 이들의 모든 조합). 일 측면에서, 비-생식 세포의 조직 배양은 단일 CD163 편집을 포함하는 세포를 포함할 수 있다. 추가적인 측면에서, 배양물의 단일 CD163 편집의 세포는 편집된 대립유전자 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0098] 본 교시의 제품 및 방법에 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제 및 가이드 RNA 백본 서열의 특정 예는 하기 표 2에 나열되어 있다.

표 2

엔도뉴클레아제 및 가이드 백본 서열

서열 동일성	서열번호
가이드 RNA 배본(Backbone) (기재된 DNA 서열)	19
<i>Streptococcus pyogenes</i> 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질 서열	20
<i>Streptococcus thermophilus</i> CR3 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질 서열	21

[0100] 엘리트 돼지 핵 계통(Elite porcine nucleus lines)은 CD163 유전자에 대한 공개 참조에 대해 시퀀싱 및 얼라인될(be aligned) 수 있다. 이 데이터는 PRRS-내성 프로젝트를 위한 유전자 편집 시약 개발에 사용할 수 있다. 이 서열은 3개 뉴클레오타이드 또는 5개 뉴클레오타이드 모티프, nGG (AGG, CGG, TGG, GGG), nGGnG (AGGTG, CGGTG, TGGTG, GGGTG, AGGGG, CGGGG, TGGGG, GGGGG, AGGAG, CGGAG, TGGAG, GGGAG, AGGCG, CGGCG, TGGCG, GGGCG)로 각각 이루어질 수 있는 보존된 RNA 유도 CRISPR-Cas9 인식 부위의 존재를 스캔할 수 있다. PAM 서열이라고 하는 이 모티프는 RNA와 염기-쌍을 형성하는데 사용될 수 있는 20개의 뉴클레오타이드 스페이서 서열에 인접하여 3'에 위치할 수 있다. 적합한 부위가 확인될 수 있고, crRNA 가이드 또는 단일 가이드 서열이 제조될 수 있으며, 이는 하기 표 3에 제시되어 있다.

[0101] 특정 이론에 제한되지는 않지만, 복합될 때, 가이드RNA-Cas9 단백질은 절단을 위한 DNA 부위를 인식할 수 있고, 그 후 비-상동 말단 연결(무작위 복구) 또는 DNA주형 복구 경로(상동성 지시 복구(homology directed repair), HDR)에 의해 세포 성분에 의해 복구될 수 있다.

- [0102] 가이드 RNA(gRNA)는 CD163의 엑손 1 내지 엑손 7에 걸쳐 생성될 수 있다. CD163 단백질의 바이러스 결합 도메인(도메인 5)의 편집은 단백질에 결합하는 바이러스의 능력을 억제하여 바이러스가 돼지 폐 대식세포로 흡수되는 것을 방지할 수 있다. CD163의 편집이 돼지에서 동형접합인 경우, 동물은 PRRS 감염에 내성을 가질 수 있다. 본 명세서에서는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있는 표 3에 열거된 crRNA 서열을 포함하는 gRNA 서열을 제공하고 포함한다. 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425는 DNA 서열로 표시된다. 상응하는 RNA 대응물, 및 일반적으로 gRNA에 포함되지 않는 PAM 모티프의 존재는 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있는 RNA 서열이 본 명세서에 제공된다. 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425는 gRNA 백본 서열과 조합되어 gRNA 제조에 사용하기 위한 RNA로 발현될 수 있고, 그 다음 Cas 뉴클레아제와 혼합되어 활성 리보뉴클레오타이드 단백질 복합체(sgRNP)를 제조할 수 있다. 그런 다음, sgRNP 복합체는 성숙한 난모세포, 접합체 또는 초기 배아에 단독으로 또는 서열번호 1 내지 13으로 이루어진 군 으로부터 선택된 복구 주형과 함께 주입될 수 있다. 절단 및 주형 지정 복구 후, CD163 유전자는 복구 주형 서열을 포함하도록 편집될 수 있고, CD163 유전자 편집된 세포의 편집된 지놈은 서열번호 1 내지 13으로 이루어진 군 으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다.
- [0103] 일 측면에서, 본 개시내용은 편집이 CD163 유전자(엑손 1-7)의 초기에 발생하도록 엘리트 돼지에서 간단하고 정확하게 재현 가능한 단일 CD163 기능 상실 편집을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 돼지는 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505로 이루어진 군 으로부터 선택된 서열을 포함하는 CD163 유전자를 가질 수 있다. 또한, 표 8의 마커를 포함하는 지놈 영역에 서열번호 1 내지 18 및 425 내지 505를 포함할 수 있는 돼지가 포함되고 제공된다. 또한, 표 8의 마커를 포함하는 지놈 영역에 서열번호 2를 포함할 수 있는 돼지가 포함되고 제공된다. 또한, 표 8의 마커를 포함하는 지놈 영역에 서열번호 426-458을 포함할 수 있는 돼지가 포함되고 제공된다. 또한, 표 8의 마커를 포함하는 지놈 영역에 서열 459-504를 포함할 수 있는 돼지가 포함되고 제공된다. 이러한 엘리트 돼지에서 유래된 돼지 배아 섬유아세포 세포주를 사용하여, 250개의 가이드 RNA 및 Cas9 단백질 조합을 테스트하여 CD163 유전자에서 편집을 효율적으로 자르고 생성하는 유전자 편집 쌍을 확할 수 있다. 발견된 선택된 특정 가이드 및 엔도뉴클레아제 단백질 조합은 표적 위치, 엔도뉴클레아제 활성(평균 편집 빈도) 및 편집의 CD163에서의 위치와 함께 표 3에 나열되어 있다. 더 효과적인 편집 활동이 있기 때문에 더 큰 평균 편집 빈도 조합이 선호된다. 평균 편집 빈도가 1보다 큰 조합이 바람직하다. 일 측면에서, 조합은 5보다 큰 평균 편집 빈도를 가질 수 있다. 다른 측면에서, 조합은 10보다 큰 평균 편집 빈도를 가질 수 있다. 또 다른 측면에서, 조합은 15보다 큰 평균 편집 빈도를 가질 수 있다. 본 개시는 20보다 큰 평균 편집 빈도를 가질 수 있는 조합을 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 조합은 25보다 큰 평균 편집 빈도를 가질 수 있다. 또 다른 측면에서, 조합은 30보다 큰 평균 편집 빈도를 가질 수 있다.
- [0104] 표 3에 나타난 바와 같이, 평균 편집 빈도는 타겟 서열마다 큰 차이를 보였다. 더욱이, 중첩 서열을 표적으로 하는 서열은 Cas 단백질 공급원에 따라 상이한 편집 빈도를 초래하였다. 예를 들어, 서열번호 24 및 25는 중첩 부위를 대상으로 했으며 편집 빈도에서 10배 차이가 있었다. 이 부위에서 이러한 서열로 *S. pyogenes*는 거의 20 배 더 높은 편집 빈도를 제공하였다. 대조적으로, 서열번호 33 및 34를 포함하는 RNP는 Cas 단백질 사이에서 구별할 수 없는 평균 편집 빈도를 초래하였다. *S. pyogenes*의 Cas9 뉴클레아제를 포함하는 RNP가 우수한 평균 편집 빈도를 제공할 수 있지만 항상 그런 것은 아니다. 서열번호 60 및 61에 대해 나타난 바와 같이, *S. thermophilus*의 Cas9 단백질을 포함하는 RNP는 우수한 편집 빈도(예: 3.9 대 22.0)를 생성하였다. 따라서, 본 명세서에서는 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 CD163을 표적화하기 위한 효율적인 가이드 RNA 서열 또는 효율적인 표적화 서열을 제공한다. 일 측면에서, RNP는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군 으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다.
- [0105] 본 명세서에서 모든 위치 지정은 Sscrofa11.1 참조 지놈(GenBank accession: GCA_000003025.6)을 나타낸다.
- [0106] 표적 부위 서열 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425는 돼지 CD163 유전자 내의 표적 서열을 편집할 수 있다. 각 표적 부위 서열에서, 처음 20개 뉴클레오타이드는 가이드 RNA 스페이서에 해당할 수 있고 나머지 3개 또는 5개 뉴클레오타이드는 각각 *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*에 대한 PAM 서열일 수 있다. 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425의 처음 20개 염기는 DNA 염기가 가이드로 RNA 염기 대신 사용될 수 있지만, 데옥시리보뉴클레아제 염기에 대체된 적절한 리보뉴클레아제 염기와 함께 DNA 등이 가이드 RNA 서열에 상응한다. 가이드 RNA 서열은 *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus* 엔도뉴클레아제와 쌍을 이루어 CD163 유전자의 암호화 또는 비-암호화 영역에서 돼지 지놈의 DNA 절단을 지시할 수 있으며, 이는 DNA 결실 및/또는 DNA 뉴클레오타이드 삽입을 초래할 수 있다. 표 3에 개시된 표적 부위의 위치에 따라, 가이드/엔도뉴클레아제 조합의 쌍은 가이드/엔도뉴클레

아제 조합의 쌍 사이에서 CD163 유전자의 영역을 결실시키기 위해 선택될 수 있다.

[0107]

표적 부위 서열 서열번호 212 내지 271 및 347 내지 425는 CD163 유전자의 엑손 7의 결실을 위한 가이드를 설계하는데 사용될 수 있는 표적화 서열이다. *S. pyogenes*를 사용하여 인트론 6 표적화 가이드 서열번호 212 내지 253, 및 262 내지 271과 인트론 7 표적화 가이드 서열번호 254 내지 261의 쌍은 CD163 유전자에서 2개의 이중 가닥 절단을 야기하여 엑손 7의 절단을 초래할 수 있다. 표적화 가이드 서열번호 249 및 256의 쌍은 또한 엑손 7의 절단을 초래할 수 있다. 일부 가이드의 쌍은 서열번호 351 및 365, 서열번호 351 및 387, 서열번호 348 및 390, 서열번호 348 및 388, 서열번호 348 및 498, 서열번호 352 및 365, 서열번호 352 및 387, 서열번호 352 및 399, 서열번호 353 및 365, 서열번호 353 및 387, 서열번호 353 및 399, 서열번호 354 및 390, 서열번호 354 및 388, 서열번호 354 및 395, 서열번호 358 및 361, 서열번호 358 및 362, 서열번호 358 및 368, 서열번호 358 및 384, 서열번호 358 및 394, 서열번호 358 및 399, 서열번호 359 및 390, 서열번호 359 및 388, 서열번호 359 및 395, 서열번호 360 및 368, 서열번호 360 및 384, 서열번호 360 및 389, 서열번호 360 및 394, 서열번호 360 및 397, 서열번호 361 및 365, 서열번호 361 및 387, 서열번호 362 및 390, 서열번호 362 및 388, 서열번호 362 및 395, 서열번호 364 및 365, 서열번호 364 및 387, 서열번호 364 및 399, 서열번호 365 및 368, 서열번호 365 및 384, 서열번호 365 및 389, 서열번호 365 및 394, 서열번호 365 및 397, 서열번호 366 및 368, 서열번호 366 및 384, 서열번호 366 및 389, 서열번호 366 및 394, 또는 서열번호 366 및 397를 포함하여 Exon 7에 정지 코돈의 도입을 초래할 수 있다.

[0108]

각각의 표적화 서열에 대해, 표 3은 서열번호, 사용된 CAS9 뉴클레아제 호밍 암(homing arm)의 종, PAM 서열을 포함하는 *Sus scrofa* 지놈 상의 표적화 서열의 위치, 태아 섬유아세포 분석에서 특정 가이드에 대한 편집의 평균 부분으로 측정된 편집 효율성, 및 표적화된 CD163 상의 엑손을 나열한다.

표 3

[0109]

돼지 태아 섬유아세포의 표적 서열 및 편집 활동 목록

서열 번호	Cas9 Nuclease	표적의 위치	평균의 편집된 부분	CD163 상의 위치
22	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300192-63300214	12.9	Exon 1 / 15
23	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300222-63300244	1.4	Exon 1 / 15
24	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300236-63300258	5.8	Exon 1 / 15
25	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63300236-63300260	0.3	Exon 1 / 15
26	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300250-63300272	8.6	Exon 1 / 15
27	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300251-63300273	0.1	Exon 1 / 15
28	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300275-63300297	25.7	Exon 1 / 15
29	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300288-63300310	24.9	Exon 1 / 15
30	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300293-63300315	12.8	Exon 1 / 15
31	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300305-63300327	0.4	Exon 1 / 15
32	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300308-63300330	3.4	Exon 1 / 15
33	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63300308-63300332	3.7	Exon 1 / 15
34	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300327-63300349	5.3	Exon 1 / 15
35	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63300336-63300358	3.5	Exon 1 / 15
36	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63301950-63301972	14.4	Exon 2 / 15
37	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63301951-63301973	16.3	Exon 2 / 15
38	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63301962-63301984	13.6	Exon 2 / 15
39	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63301981-63302003	3.6	Exon 2 / 15
40	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63301995-63302017	21.8	Exon 2 / 15
41	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63301997-63302019	8.2	Exon 2 / 15
42	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63301997-63302021	10.1	Exon 2 / 15
43	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303121-63303143	16.4	Exon 3 / 15
44	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303121-63303145	16.1	Exon 3 / 15
45	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303129-63303151	31.4	Exon 3 / 15
46	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303136-63303158	22.8	Exon 3 / 15
47	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303137-63303159	42.9	Exon 3 / 15

48	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303137-63303161	10.7	Exon 3 / 15
49	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303140-63303162	36.7	Exon 3 / 15
50	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303140-63303164	32.6	Exon 3 / 15
51	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303158-63303180	21.1	Exon 3 / 15
52	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303166-63303188	23.6	Exon 3 / 15
53	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303166-63303190	22.1	Exon 3 / 15
54	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303169-63303191	40.0	Exon 3 / 15
55	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303169-63303193	19.5	Exon 3 / 15
56	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303181-63303203	9.9	Exon 3 / 15
57	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303181-63303205	10.4	Exon 3 / 15
58	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303184-63303206	20.6	Exon 3 / 15
59	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303184-63303208	2.8	Exon 3 / 15
60	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303189-63303211	3.9	Exon 3 / 15
61	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303189-63303213	22.0	Exon 3 / 15
62	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303190-63303212	18.1	Exon 3 / 15
63	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303191-63303213	23.5	Exon 3 / 15
64	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303209-63303231	23.6	Exon 3 / 15
65	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303213-63303235	4.1	Exon 3 / 15
66	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303214-63303236	16.2	Exon 3 / 15
67	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303220-63303242	14.6	Exon 3 / 15
68	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303226-63303248	15.4	Exon 3 / 15
69	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303243-63303265	21.6	Exon 3 / 15
70	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303250-63303272	1.5	Exon 3 / 15
71	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303251-63303273	30.3	Exon 3 / 15
72	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303278-63303300	20.1	Exon 3 / 15
73	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303278-63303300	1.5	Exon 3 / 15
74	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303282-63303304	23.9	Exon 3 / 15
75	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303283-63303305	20.8	Exon 3 / 15
76	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303294-63303316	33.8	Exon 3 / 15
77	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303299-63303321	8.2	Exon 3 / 15
78	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303305-63303327	6.1	Exon 3 / 15
79	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303315-63303337	25.2	Exon 3 / 15
80	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303319-63303341	28.7	Exon 3 / 15
81	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303338-63303360	4.5	Exon 3 / 15
82	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303339-63303361	2.8	Exon 3 / 15
83	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303357-63303379	18.3	Exon 3 / 15
84	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303358-63303380	26.6	Exon 3 / 15
85	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303374-63303396	16.1	Exon 3 / 15
86	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303378-63303400	35.4	Exon 3 / 15
87	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303378-63303402	40.0	Exon 3 / 15
88	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303379-63303401	24.4	Exon 3 / 15
89	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303380-63303402	25.6	Exon 3 / 15
90	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303406-63303428	28.1	Exon 3 / 15
91	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303413-63303435	13.7	Exon 3 / 15
92	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303413-63303437	19.0	Exon 3 / 15
93	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63303419-63303443	15.2	Exon 3 / 15
94	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303421-63303443	16.5	Exon 3 / 15
95	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303428-63303450	35.8	Exon 3 / 15
96	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63303441-63303463	3.4	Exon 3 / 15
97	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306087-63306109	19.8	Exon 4 / 15
98	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306091-63306113	4.5	Exon 4 / 15

99	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306091-63306115	3.1	Exon 4 / 15
100	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306098-63306120	29.9	Exon 4 / 15
101	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306098-63306122	31.5	Exon 4 / 15
102	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306101-63306123	29.2	Exon 4 / 15
103	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306108-63306130	6.9	Exon 4 / 15
104	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306108-63306132	14.7	Exon 4 / 15
105	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306116-63306138	21.6	Exon 4 / 15
106	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306127-63306149	26.4	Exon 4 / 15
107	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306140-63306162	6.9	Exon 4 / 15
108	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306144-63306166	35.2	Exon 4 / 15
109	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306144-63306168	3.3	Exon 4 / 15
110	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306147-63306169	8.8	Exon 4 / 15
111	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306147-63306171	3.2	Exon 4 / 15
112	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306148-63306170	5.2	Exon 4 / 15
113	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306149-63306171	28.0	Exon 4 / 15
114	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306193-63306215	9.3	Exon 4 / 15
115	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306236-63306258	14.2	Exon 4 / 15
116	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306251-63306273	26.3	Exon 4 / 15
117	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306251-63306275	4.4	Exon 4 / 15
118	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306257-63306279	1.3	Exon 4 / 15
119	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306263-63306285	7.8	Exon 4 / 15
120	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306273-63306295	35.0	Exon 4 / 15
121	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306287-63306309	13.4	Exon 4 / 15
122	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306296-63306318	2.0	Exon 4 / 15
123	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306315-63306337	31.2	Exon 4 / 15
124	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306332-63306354	10.1	Exon 4 / 15
125	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306336-63306358	31.1	Exon 4 / 15
126	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306336-63306360	52.8	Exon 4 / 15
127	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306337-63306359	30.3	Exon 4 / 15
128	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306338-63306360	43.2	Exon 4 / 15
129	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306364-63306386	2.5	Exon 4 / 15
130	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63306371-63306393	0.2	Exon 4 / 15
131	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63306371-63306395	0.3	Exon 4 / 15
132	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309028-63309050	4.5	Exon 5 / 15
133	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309034-63309056	5.1	Exon 5 / 15
134	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309035-63309057	41.8	Exon 5 / 15
135	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309035-63309059	21.9	Exon 5 / 15
136	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309053-63309075	15.1	Exon 5 / 15
137	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309061-63309083	0.2	Exon 5 / 15
138	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309077-63309099	15.7	Exon 5 / 15
139	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309077-63309101	11.2	Exon 5 / 15
140	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309084-63309106	10.1	Exon 5 / 15
141	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309084-63309108	23.8	Exon 5 / 15
142	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309085-63309107	11.3	Exon 5 / 15
143	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309086-63309108	23.4	Exon 5 / 15
144	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309094-63309116	13.8	Exon 5 / 15
145	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309104-63309126	7.8	Exon 5 / 15
146	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309108-63309130	1.4	Exon 5 / 15
147	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309109-63309131	7.0	Exon 5 / 15
148	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309130-63309152	24.8	Exon 5 / 15
149	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309144-63309166	20.8	Exon 5 / 15

150	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309145-63309167	0.1	Exon 5 / 15
151	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309146-63309168	37.4	Exon 5 / 15
152	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309173-63309195	2.5	Exon 5 / 15
153	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309173-63309195	2.3	Exon 5 / 15
154	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309189-63309211	11.5	Exon 5 / 15
155	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309193-63309215	2.7	Exon 5 / 15
156	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309194-63309216	10.4	Exon 5 / 15
157	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309200-63309222	3.8	Exon 5 / 15
158	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309205-63309229	19.0	Exon 5 / 15
159	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309207-63309229	21.0	Exon 5 / 15
160	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309210-63309232	19.0	Exon 5 / 15
161	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309233-63309255	8.3	Exon 5 / 15
162	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309250-63309272	13.6	Exon 5 / 15
163	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309252-63309274	23.0	Exon 5 / 15
164	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309273-63309295	2.3	Exon 5 / 15
165	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309273-63309297	34.4	Exon 5 / 15
166	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309274-63309296	15.1	Exon 5 / 15
167	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309275-63309297	19.4	Exon 5 / 15
168	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309284-63309308	14.4	Exon 5 / 15
169	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309286-63309308	7.0	Exon 5 / 15
170	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309308-63309330	0.5	Exon 5 / 15
171	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309308-63309332	2.4	Exon 5 / 15
172	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309323-63309345	16.0	Exon 5 / 15
173	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309841-63309863	0.1	Exon 6 / 15
174	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309857-63309879	8.4	Exon 6 / 15
175	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309857-63309881	8.0	Exon 6 / 15
176	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309860-63309882	40.3	Exon 6 / 15
177	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309860-63309884	32.3	Exon 6 / 15
178	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309863-63309885	37.2	Exon 6 / 15
179	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309886-63309908	4.7	Exon 6 / 15
180	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309886-63309910	3.5	Exon 6 / 15
181	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309889-63309911	38.1	Exon 6 / 15
182	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309889-63309911	34.1	Exon 6 / 15
183	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309889-63309913	17.5	Exon 6 / 15
184	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309892-63309914	4.9	Exon 6 / 15
185	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309907-63309929	13.5	Exon 6 / 15
186	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309911-63309933	5.5	Exon 6 / 15
187	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309933-63309955	0.7	Exon 6 / 15
188	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63309933-63309957	10.0	Exon 6 / 15
189	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309934-63309956	6.4	Exon 6 / 15
190	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309935-63309957	18.7	Exon 6 / 15
191	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309955-63309977	12.0	Exon 6 / 15
192	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309963-63309985	5.6	Exon 6 / 15
193	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309970-63309992	0.5	Exon 6 / 15
194	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309971-63309993	12.5	Exon 6 / 15
195	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63309977-63309999	5.3	Exon 6 / 15
196	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310021-63310043	2.2	Exon 6 / 15
197	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310035-63310057	10.3	Exon 6 / 15
198	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310038-63310060	0.2	Exon 6 / 15
199	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310058-63310080	8.2	Exon 6 / 15
200	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310077-63310099	6.2	Exon 6 / 15

201	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310078-63310100	8.6	Exon 6 / 15
202	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310092-63310114	2.7	Exon 6 / 15
203	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310098-63310120	11.1	Exon 6 / 15
204	<i>S. thermophi lus</i>	chr5:63310098-63310122	8.0	Exon 6 / 15
205	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310099-63310121	12.2	Exon 6 / 15
206	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310100-63310122	21.1	Exon 6 / 15
207	<i>S. thermophi lus</i>	chr5:63310100-63310124	0.1	Exon 6 / 15
208	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310103-63310125	3.3	Exon 6 / 15
209	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63310152-63310174	4.8	Exon 6 / 15
210	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323061-63323083	32.8	Exon 7 / 15
211	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323147-63323169	17.0	Exon 7 / 15
212	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322548-63322570	13.6	Intron 6
213	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322549-63322571	1.7	Intron 6
214	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322566-63322588	15.6	Intron 6
215	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322594-63322616	0.0	Intron 6
216	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322597-63322619	0.0	Intron 6
217	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322646-63322668	21.1	Intron 6
218	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322647-63322669	12.6	Intron 6
219	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322681-63322703	44.3	Intron 6
220	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322683-63322705	3.9	Intron 6
221	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322693-63322715	33.9	Intron 6
222	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322694-63322716	26.1	Intron 6
223	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322714-63322736	5.7	Intron 6
224	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322731-63322753	42.8	Intron 6
225	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322756-63322778	5.8	Intron 6
226	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322757-63322779	21.2	Intron 6
227	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322770-63322792	36.1	Intron 6
228	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322799-63322821	29.9	Intron 6
229	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322800-63322822	43.2	Intron 6
230	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322809-63322831	33.3	Intron 6
231	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322810-63322832	46.8	Intron 6
232	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322834-63322856	7.8	Intron 6
233	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322835-63322857	18.3	Intron 6
234	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322839-63322861	18.8	Intron 6
235	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322839-63322861	13.2	Intron 6
236	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322840-63322862	2.8	Intron 6
237	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322845-63322867	55.3	Intron 6
238	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322848-63322870	27.2	Intron 6
239	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322852-63322874	24.4	Intron 6
240	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322859-63322881	22.2	Intron 6
241	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322875-63322897	25.3	Intron 6
242	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322887-63322909	4.2	Intron 6
243	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322888-63322910	3.5	Intron 6
244	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322891-63322913	44.3	Intron 6
245	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322900-63322922	58.2	Intron 6
246	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322906-63322928	3.7	Intron 6
247	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322926-63322948	38.1	Intron 6
248	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322927-63322949	0.5	Intron 6
249	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322947-63322969	31.7	Intron 6
250	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322957-63322979	50.0	Intron 6
251	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322957-63322979	11.0	Intron 6

252	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322991-63323013	4.5	Intron 6
253	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63322992-63323014	0.5	Intron 6
254	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323338-63323360	19.8	Intron 7
255	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323339-63323361	8.1	Intron 7
256	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323361-63323383	21.1	Intron 7
257	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323362-63323384	30.4	Intron 7
258	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323362-63323384	5.6	Intron 7
259	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323363-63323385	2.8	Intron 7
260	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323367-63323389	23.2	Intron 7
261	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323368-63323390	26.2	Intron 7
262	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322644-63322668	Activity not tested	Intron 6
263	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322647-63322671	Activity not tested	Intron 6
264	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322678-63322702	Activity not tested	Intron 6
265	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322681-63322705	Activity not tested	Intron 6
266	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322755-63322779	Activity not tested	Intron 6
267	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322807-63322831	Activity not tested	Intron 6
268	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322845-63322869	Activity not tested	Intron 6
269	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322850-63322874	Activity not tested	Intron 6
270	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322955-63322979	Activity not tested	Intron 6
271	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63322989-63323013	Activity not tested	Intron 6
347	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323002-63323024	2.1	Exon 7
348	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323011-63323033	31.9	Exon 7
349	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323015-63323037	7.7	Exon 7
350	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323017-63323039	56.5	Exon 7
351	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323018-63323040	74.3	Exon 7
352	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323019-63323041	52.3	Exon 7
353	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323022-63323044	44.0	Exon 7
354	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323023-63323045	61.6	Exon 7
355	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323024-63323046	49.4	Exon 7
356	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323028-63323050	3.1	Exon 7
357	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323029-63323051	0.8	Exon 7
358	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323040-63323062	42.4	Exon 7
359	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323052-63323074	66.7	Exon 7
360	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323053-63323075	13.4	Exon 7
361	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323061-63323083	77.9	Exon 7
362	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323071-63323093	60.8	Exon 7
363	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323072-63323094	70.6	Exon 7
364	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323073-63323095	75.2	Exon 7
365	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323098-63323120	64.4	Exon 7
366	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323102-63323124	55.0	Exon 7
367	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323105-63323127	51.2	Exon 7
368	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323108-63323130	58.3	Exon 7
369	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323125-63323147	14.5	Exon 7
370	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323126-63323148	22.6	Exon 7
371	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323131-63323153	49.9	Exon 7

372	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323139-63323161	68.9	Exon 7
373	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323147-63323169	57.4	Exon 7
374	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323159-63323181	12.9	Exon 7
375	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323160-63323182	19.7	Exon 7
376	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323161-63323183	33.6	Exon 7
377	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323162-63323184	65.3	Exon 7
378	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323163-63323185	51.4	Exon 7
379	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323173-63323195	57.6	Exon 7
380	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323174-63323196	52.1	Exon 7
381	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323175-63323197	48.2	Exon 7
382	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323177-63323199	33.7	Exon 7
383	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323181-63323203	18.3	Exon 7
384	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323187-63323209	57.0	Exon 7
385	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323197-63323219	33.3	Exon 7
386	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323198-63323220	58.3	Exon 7
387	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323219-63323241	20.7	Exon 7
388	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323220-63323242	42.2	Exon 7
389	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323221-63323243	43.4	Exon 7
390	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323231-63323253	21.8	Exon 7
391	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323251-63323273	46.8	Exon 7
392	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323252-63323274	42.6	Exon 7
393	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323255-63323277	22.8	Exon 7
394	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323267-63323289	85.4	Exon 7
395	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323268-63323290	41.1	Exon 7
396	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323268-63323290	53.6	Exon 7
397	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323269-63323291	32.1	Exon 7
398	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323277-63323299	16.6	Exon 7
399	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323278-63323300	39.0	Exon 7
400	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323279-63323301	11.7	Exon 7
401	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323282-63323304	48.9	Exon 7
402	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323283-63323305	n/a	Exon 7
403	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323287-63323309	11.6	Exon 7
404	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323288-63323310	69.3	Exon 7
405	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323295-63323317	46.0	Exon 7
406	<i>S. pyogenes</i>	chr5:63323300-63323322	54.2	Exon 7
407	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323019-63323043	25.5	Exon 7
408	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323022-63323046	24.7	Exon 7
409	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323061-63323085	37.8	Exon 7
410	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323071-63323095	30.4	Exon 7
411	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323096-63323120	33.4	Exon 7
412	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323102-63323126	19.8	Exon 7
413	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323105-63323129	0.6	Exon 7
414	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323159-63323183	14.8	Exon 7
415	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323160-63323184	7.8	Exon 7
416	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323161-63323185	3.6	Exon 7
417	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323163-63323187	7.9	Exon 7
418	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323175-63323199	33.8	Exon 7
419	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323175-63323199	11.5	Exon 7
420	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323219-63323243	8.1	Exon 7
421	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323253-63323277	32.6	Exon 7
422	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323275-63323299	0.2	Exon 7

423	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323277-63323301	12.3	Exon 7
424	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323280-63323304	26.0	Exon 7
425	<i>S. thermophilus</i>	chr5:63323295-63323319	30.5	Exon 7

[0110] CD163 유전자(엑손 1-4)의 초기 부위를 절단하는 효율적인 가이드RNA-Cas9 쌍을 선택하고 돼지 지놈 내의 잠재적인 표적 외(off-target) 결합에 대해 추가로 스크리닝하였다. 일부 경우에, 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제의 사용은 지놈의 의도하지 않은 위치에서 DNA의 절단을 초래하는 것으로 관찰되었다. dsDNA 절단에 대한 복구 과정은 무작위일 수 있기 때문에 표적 외(off-target) 절단 사건은 지놈의 암호화 또는 조절 영역에 바람직하지 않은 변화를 초래할 수 있다. 따라서, 다수의 단일 가이드 또는 쌍 가이드가 유사한 편집 빈도로 의도한 편집을 수행할 수 있는 경우, 편집 실험을 위한 가이드 또는 가이드 쌍을 선택할 때 표적 외(off-target) 절단을 고려하는 것이 유리하다.

[0111] 표적을 벗어나는 것(off-target)을 밝히기 위한 다수의 계산 및 생화학적 접근이 개발되어 왔다. 전산적인 접근법(computational approaches)은 Cas-OFFinder (Bae, S., *et al.*, Bioinformatics, 2014, 30, 1473-1475.), CRISPR-offinder (Zhao, C., *et al.*, Int. J. Biol. Sci., 2017, 13, 1470-1478), 및 CRISPR-OFF (Alkan, F., *et al.*, Genome Biol., 2018, 19, 177)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 전산적인 접근법이 당업자에게 용이하게 이용가능하다. 생화학적 접근법은 GUIDE-Seq (Tsai, S.Q., *et al.*, Nat Biotechnol. 2015, 33, 187-197), SITE-SEQ® (Cameron, P., *et al.*, Nat Methods 2017, 14, 600-606), 및 CIRCLE-seq (Tsai, S.Q., *et al.*, Nat. Methods, 2017, 14, 607-614)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 생화학적 접근법이 당업자에게 용이하게 이용가능하다. 전산적인 방법은 생화학적 방법에 비해 상대적으로 빠르고 저렴하지만 검증된 표적 외(off-target) 편집을 식별하는 데 생화학적 방법이 더 우수한 것으로 나타났다.

[0112] 상술한 바와 같이, 돼지 태아 섬유아세포에서 의도된 편집의 빈도가 높은 것으로 입증된 가이드RNA의 서브세트(subset)를 SITE-SEQ®를 사용하여 특이성에 대해 분석하였다. 시험관 내(*in vitro*)에서 네이키드(naked) gDNA 및 RNP 편집 시약을 사용하여 SITE-SEQ®는 잠재적인 절단 부위 목록을 제공할 수 있다. 세포 환경에서 표적 외(off-target) 절단은 시험관 내(*in vitro*)에서 생화학적으로 시뮬레이션된 것보다 더 복잡할 수 있다. 효과적인 RNP 농도 및 염색질 상태로 인한 표적 가용성과 같은 요인은 돼지 세포 또는 편집된 돼지에서 실현되는 표적 외 편집의 수에 기여할 수 있다. 다행히도 SITE-SEQ®와 같은 생화학적 방법은 연구자에게 조사할 사이트 목록을 제공할 수 있다. 이러한 부위는 TOPO 클로닝 및 TOPO 클론의 시퀀싱, ILLUMINA® 앰플리콘 시퀀싱, Nanopore 시퀀싱, 기타 NGS 시퀀싱 방법 및 서열 캡처를 포함하지만 이에 제한되지 않는 방법으로 조사할 수 있다(Gnirke, A., *et al.*, Nat. Biotechnol., 2009, 27, 182-189).

[0113] 편집된 돼지 섬유아세포 및 후속적으로 주입된 배아에서 생화학적으로 확인된 표적 외(off-target) 부위에 대해 스크리닝을 수행하였다. 검증된 표적 외(off-target) 편집이 있는 가이드는 편집된 돼지를 생성하는 데 사용하기 위해 우선 순위가 낮아졌다. 알려진 표적 외(off-target) 가이드를 사용하여 생성된 동물은 위에 설명된 전략을 사용하여 표적 외 편집의 존재에 대해 조사할 수 있다. 표적 외(off-target) 편집이 포함된 동물은 번식 프로그램에서 제거하거나 표적 외 편집을 번식을 통해 제거할 수 있다. 이 스크리닝에는 BLAST® 검색과 같은 생물정보학 방법이 포함될 수 있으며, 따라서 가이드 RNA와 1-5개의 미스매치가 포함된 *Sus scrofa* 지놈의 서열을 식별하여 표적 외 결합을 허용할 수 있다. 컴퓨터 알고리즘에서 이러한 미스매치를 허용할 때 지놈에서 잠재적인 표적 외(off-target) 결합 부위의 수는 하기 표 4에 자세히 설명되어 있다.

표 4

[0114] 미스매치(mismatch) 감지

위치	LOCATION- Spy coordinates	서열번호		MISMATCHES ≤ 5	
		서열번호 Spy	서열번호 Stherm	Spy	Stherm C3
1	chr5:63300236-63300258	19	20	920	142
2	chr5:63300308-63300330	32	33	625	51
3	chr5:63301997-63302019	41	42	506	37
4	chr5:63303121-63303143	43	44	1625	201
5	chr5:63303137-63303159	47	48	474	32
6	chr5:63303140-63303162	49	50	548	49
7	chr5:63303166-63303188	52	53	692	92

8	chr5:63303169-63303191	54	55	782	94
9	chr5:63303181-63303203	56	57	1346	200
10	chr5:63303184-63303206	58	59	1873	382
11	chr5:63303189-63303211	60	61	1642	240
12	chr5:63303378-63303400	86	87	588	53
13	chr5:63303413-63303435	91	92	545	50
14	chr5:63306108-63306130	103	104	480	49
15	chr5:63306144-63306166	108	109	344	21
16	chr5:63306147-63306169	110	111	451	44
17	chr5:63306251-63306273	116	117	1343	65
18	chr5:63306336-63306358	125	126	718	66
19	chr5:63306371-63306393	130	131	1310	131
20	chr5:63309035-63309057	134	135	690	83
21	chr5:63309077-63309099	138	139	949	95
22	chr5:63309084-63309106	140	141	1234	99
23	chr5:63309273-63309295	164	165	418	47
24	chr5:63309308-63309330	170	171	747	95
25	chr5:63309857-63309879	174	175	795	47
26	chr5:63309860-63309882	176	177	736	94
27	chr5:63309886-63309908	179	180	1829	124
28	chr5:63309889-63309911	182	183	1575	94
29	chr5:63309933-63309955	187	188	871	95
30	chr5:63310098-63310120	203	204	533	73
31	chr5:63310100-63310122	206	207	537	53

[0115] 이러한 표적 외(off-target) 부위에서 절단에 기여하는 요인 중 하나는 유전자 편집 성분이 DNA 벡터로 전달되는지 또는 RNA-단백질 복합체로 전달되는지 여부일 수 있고; Cas9 및 가이드 RNA가 DNA 벡터에 전달되지 않고 단일 가이드 리보뉴클레오타이드 단백질 복합체(sgRNP)로 전달될 수 있는 경우, 1 또는 2개의 염기 미스매치가 있을 수 있는 부위를 의도한 표적 부위와 믿을 수 있게 구별할 수 있다. Cas9 가이드-RNA 시약의 특이성을 최대화하기 위한 두 번째 고려사항은 시험관 내(*in vitro*) 생화학적 방법을 사용하여 가이드 RNA-단백질 쌍을 사전 스크리닝하는 것일 수 있다. 여러 실험실에서 표적 외(off-target) 편집 사이트를 선별하는 방법을 발표하였다. 이러한 생화학적 접근은 정제된 지놈 DNA에서 잠재적인 표적 외(off-target) Cas9 절단 부위를 식별할 수 있다. 이러한 분석을 사용하여 지놈 DNA를 제한에서 포화에 이르기까지 다양한 sgRNP 농도로 분해 할 수 있으므로 높은 절단 민감도와 낮은 절단 민감도의 표적 외(off-target) 부위를 모두 복구할 수 있다. 예를 들어, Cameron *et al.*, "SITE-SEQ®: A Genome-wide Method to Measure Cas9 Cleavage," Protocol Exchange (2017)을 참조한다.

[0116] 표적 외(off-target) 스크리닝에 의해 확인된 표적 외 부위는 편집 빈도 및 기능적 세포 결과 둘 다를 측정하여 세포에서 가능한 표적 외 부위의 신중하고 포괄적인 검사를 안내하기 위해 사용될 수 있다. 몇 가지 선택된 가이드 RNA-Cas 단백질 쌍을 스크리닝할 수 있으며 스크리닝은 1) CD163 유전자의 5' 말단에 더 가까운 효율적인 절단 및 2) 생물정보학 방법에 의해 결정된 몇 가지 미스매치 서열을 입증할 수 있다.

[0117] 이 가이드 선택 기준을 사용하여, 돼지 단위생식개체(parthenote)에서 절단 활성을 위해 여러 가이드 RNA-Cas 단백질 쌍을 선택할 수 있다. 돼지 난모세포는 전류를 사용하여 두 배로 만들고 가이드 RNA-Cas 단백질을 주입하고 7일 동안 발달되도록 한 다음 수확하고 의도한 표적 부위에 걸쳐 DNA 시퀀싱을 할 수 있다. 여러 가이드 RNA-Cas 단백질 쌍을 식별하여 단위생식개체(parthenote)에서 높은 빈도로 편집할 수 있으며 추가 개발을 위해 선택된다.

[0118] 본 명세서에서는 CRISPR/Cas 매개 절단 및 유전자 편집을 위한 최적의 표적 부위를 확인하고 선택하는 방법을 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 방법은 편집을 위한 지놈의 표적 영역을 식별하는 단계; 표적 영역에서 모든 20개의 뉴클레오타이드 서열을 확인하는 단계; 1 내지 4개의 미스매치를 포함하고 Cas 단백질을 기반으로 하는 적합한 PAM 서열을 갖는 돼지 지놈의 비-표적 부위와 일치하는 서열을 확인하고 제거하기 위해 생물정보학적 스크리닝을 수행하는 단계; 가이드 RNA 백본 및 표적 서열을 포함하는 CRISPR/Cas RNP 복합체를 제조하고, CRISPR/Cas RNP 복합체를 배양된 돼지 세포에 도입하며, 가이드 RNA/Cas 조합의 평균 편집 빈도를 결정하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 가이드 RNA/Cas 조합의 평균 편집 빈도를 결정하는 것은 PCR에 의해 표적 부위를 둘러싼 영역

을 증폭하고, 앰플리콘 덩어리 시퀀싱을 수행하고, 및 이를 미처리 세포와 비교하는 것을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 방법은 적어도 15의 평균 편집 빈도를 가질 수 있는 선호되는 표적 서열을 선택하는 것을 제공한다. 또한 가이드 RNA 및 Cas 단백질이 발현 벡터 또는 벡터들의 일부로서 제공될 수 있는 CRISPR/Cas 매개 절단 및 유전자 편집을 위한 최적의 표적 부위를 확인 및 선택하는 방법이 제공된다. 적합한 세포는 당업자에게 공지되어 있고 의도된 돼지 번식 계통의 1차 태아 섬유아세포를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0119] 프레임내 정지 코돈을 생성하기 위해 다중 복구 주형이 설계될 수 있다. 나열된 복구 주형은 엔도뉴클레아제 시스템에서 적절한 가이드 RNA와 함께 사용하면 복구 후 프레임 내 종결 코돈(TAA, TGA, TAG)을 생성할 수 있다. 편집 부위의 양쪽에 서열 동일성이 있는 다양한 길이의 복구 주형을 사용할 수 있다. 일 측면에서, 복구 주형은 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제 절단 부위의 양쪽에서 적어도 15개의 뉴클레오타이드(예를 들어, 15~15개의 뉴클레오타이드)를 공유할 수 있다. 다른 측면에서, 복구 주형은 편집 사이트의 양쪽에서 100개 이상의 뉴클레오타이드를 공유할 수 있다(예: >100~>100). 복구 주형은 말단의 돌출부(overhangs)를 사용하여 상보적 DNA의 단일, 이중 또는 엇갈린 가닥이 될 수 있다. 또한 이러한 주형은 DNA에 국한되지 않고 RNA 또는 변형된 뉴클레오타이드(예: 이노신) 또는 이러한 염기의 혼합물일 수 있으며 5' 및/또는 3' 말단이 분해로부터 보호된다. 말단에서 뉴클레오타이드를 절단하는 엑소뉴클레아제가 있기 때문에 변형된 염기로 말단을 보호하면 DNA와 RNA 모두의 세포에서 엑소뉴클레아제 분해(exonuclease digestion)를 방지할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 편집 부위의 양쪽에서 동일성 영역의 길이를 늘리면 복구 프로세스(예: 상동성 암(arm))의 효율성과 특이성이 증가할 수 있다. 본 명세서에 의해 편집 부위의 양쪽에 있는 적어도 25개의 뉴클레오타이드에 걸쳐 100% 동일성을 가질 수 있는 복구 주형이 포함되고 제공된다. 이러한 핵심 동일성 영역은 원하는 편집(예: 서열번호 1 내지 13에 대한 결실)이 정확하고 효율적임을 보장한다. 일 측면에서, 코어 동일성 영역은 편집 부위의 측면의 적어도 40개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 또 다른 측면에서, 코어 동일성 영역은 편집 부위의 양쪽에 적어도 50개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일 측면에서, 측면(flanking) 코어 영역은 100% 동일성의 60개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한 일 측면에서는 편집 부위의 측면의 염색체 영역에 대해 70개의 동일한 뉴클레오타이드를 가질 수 있는 복구 주형이 포함된다. 일 측면에서, 코어 동일성 영역은 편집 부위의 측면에는 염색체 영역에 대해 동일성의 75개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 코어 동일성 영역은 25 내지 40개의 측면(flanking) 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 추가적인 측면에서, 코어 동일성 영역은 40 내지 75개의 측면(flanking) 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0120] 일부 측면에서, 코어 동일성 영역은 표적 부위에 대한 추가적인 상동성 영역("측면(flanking) 상동성 영역")에 의해 추가로 측면화될 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 일 측면에서, 측면 상동성 영역은 표적 부위에 대한 100% 동일성을 포함할 수 있다. 예시로서, 서열번호 1 내지 13은 라인 2, 3, 15, 19, 27, 62, 또는 65(예를 들어, 코어 영역 및 측면 상동성 영역에서 100% 상동성)에서 발견되는 바와 같이 표적화된 편집 부위의 양쪽에 있는 CD163 영역에 대해 100% 상동성을 공유하였다. 또한, 서열번호 1 내지 13을 포함할 수 있는 복구 주형이 포함되며, 여기서 코어 동일성 영역은 원하는 편집(예를 들어, 염기 50 내지 100)의 양쪽에 있는 지놈의 25개 뉴클레오타이드에 대한 100% 동일성을 포함할 수 있고 코어 영역(예를 들어, 서열번호 1 내지 18의 1 내지 49 및 101 내지 150의 뉴클레오타이드)의 양쪽 상의 지놈에 대해 적어도 80% 동일성에 의해 측면화될 수 있다. 또 다른 측면에서, 코어 영역은 100% 상동성을 가질 수 있고 측면 상동성 영역은 85% 상동성을 공유할 수 있다. 추가적인 측면에서, 코어 영역은 100% 상동성을 가질 수 있고 측면 상동성 영역은 90% 상동성을 공유할 수 있다. 또 다른 측면에서, 코어 영역은 100% 상동성을 가질 수 있고 측면 상동성 영역은 95% 상동성을 공유할 수 있다. 또한, 100% 상동성을 갖는 코어 영역을 가질 수 있고 측면 상동성 영역이 97% 상동성을 공유할 수 있는 복구 주형이 일 측면에 포함된다. 일부 측면에서, 측면 상동성 영역은 99% 상동성을 공유할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 측면 상동성 영역의 길이를 증가시키면 지놈을 추가로 변형하지 않고 관련 동물에 원하는 CD163 편집을 도입할 수 있다고 생각된다. 즉, 다형성 또는 다른 돼지의 CD163 지놈의 변화를 포함하는 특이적 복구 서열이 구체적으로 포함되고 제공된다.

[0121] 본 명세서는 편집 부위의 각 측면에 50개 초과 뉴클레오타이드를 가질 수 있는 측면 상동성 영역을 포함하고 제공한다. 일 측면에서, 측면 상동성 영역은 편집 부위의 각 측면에 75개 초과 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 일 측면에서, 측면 상동성 영역은 편집 부위의 각 측면에 100개 초과 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 또한 편집 부위의 각 측면에 200개 초과 뉴클레오타이드를 가질 수 있는 측면 상동성 영역이 포함된다. 측면에서, 측면 상동성 영역은 편집 부위의 각 측면에 30 내지 1000개의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.

[0122] 본 명세서는 복구 주형의 5' 및 3' 말단에서의 추가 변형을 포함하고 제공한다. 복구 주형은 DNA에 국한되지 않고 RNA 또는 변형된 뉴클레오타이드(예: 이노신) 또는 이러한 염기의 혼합물일 수 있으며 분해로부터 보호되는

5' 및/또는 3' 말단을 가질 수 있다. 말단에서 뉴클레오타이드를 절단하는 엑소뉴클레아제가 있기 때문에 변형된 염기로 말단을 보호하면 DNA와 RNA 모두의 세포에서 엑소뉴클레아제 분해(exonuclease digestion)를 방지할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 제공된 바와 같이, 측면 상동성 영역을 포함하는 복구 주형의 5' 및 3' 말단은 분해를 방지하기 위해 변형될 수 있다.

[0123] 본 명세서는 가이드 폴리뉴클레오타이드 및 Cas 단백질을 포함할 수 있는 리보핵단백질(RNP) 복합체를 제공하고 포함한다. 일 측면에서, Cas 단백질은 *S. thermophilus* Cas9일 수 있다. 또 다른 측면에서, Cas 단백질은 *S. pyogenes*부터의 Cas9일 수 있다. 다른 적합한 Cas 단백질은 당업계에 공지되어 있으며 예시적인 Cas 시스템은 상기 표 1에 기재되어 있다. 적합한 Cas 단백질의 선택은 필요한 PAM 서열 조합에 따라 달라지며, Cas 단백질을 식별하고 Pam 서열을 변형하는 방법이 알려져 있다. 유사하게, Cas 시스템은 가이드 RNA 백본 서열(예: tracrRNA 서열)에 대한 요구 사항이 상이하다. 일 측면에서, RNP 복합체는 Cas 단백질 및 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 RNA 서열에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 가이드 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, RNP 복합체는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 가이드 RNA를 포함할 수 있다. 일 측면에서, RNP 복합체는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 99% 동일성을 갖는 가이드 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일 측면에서, RNP 복합체의 가이드 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, RNP 복합체는 sgRNA의 일부로서 RNA 백본과 조합된 서열번호 22 내지 271 및 347 내지 425 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, RNP 복합체는 표적 세포 내로 주사하기 전에 미리 형성될 수 있거나 별도로 주사되거나 도입될 수 있다.

[0124] 또한, 본 명세서에는 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 및 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서를 포함할 수 있는 단리된 가이드 RNA가 제공되고 포함된다. 일 측면에서, Cas 단백질은 서열번호 20 또는 21을 포함하는 단백질일 수 있다.

[0125] 본 명세서는 또한 CRISPR/Cas RNP의 제조를 위한 가이드 RNA를 암호화할 수 있는 DNA 벡터를 포함하고 제공한다. 일반적으로, 가이드 RNA를 암호화하는 벡터는 서열번호 22 내지 271 또는 서열번호 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열 및 단일 전사 단위의 일부로서 시스(cis)로 배열된 가이드 RNA 백본을 포함할 수 있다. 적합한 세포에서 발현되면, DNA 벡터는 본 명세서의 sgRNA를 생성할 수 있다. 프로모터, 선택가능한 마커 및 복제 기원을 포함하는 적합한 발현 벡터 백본은 당업자에게 잘 알려져 있다. 실제로, 20개의 뉴클레오타이드 및 가이드 RNA 백본은 RNA 가이드를 형성하기 위해 생체 내(in vivo)(세포 내) 또는 시험관 내(in vitro)(T7 폴리머라제를 통해) 전사될 프로모터로부터 발현될 때 DNA일 수 있거나 백본은 화학적으로 합성된 이중(crRNA 및 trRNA) 가이드 또는 단일 가이드 RNA일 수 있다.

[0126] 특정 가이드 RNA는 짝을 이룬 가이드 RNA를 사용하여 해당 가이드 사이에 위치한 유전자의 섹션을 삭제함으로써 CD163 유전자의 일부를 절단하도록 짝을 이룰 수 있다. 가이드 RNA의 예시적인 쌍(DNA 서열로 나열됨)은 하기 표 5에 제공된다. 나열된 엑손 7 아미노산 서열이 없는 가이드 쌍은 전체 엑손을 제거한다. 이들 결실에 대한 완전한 아미노산 서열은 서열번호 553에 기재되어 있다. 표 5의 모든 가이드는 두 가이드 사이의 DNA를 절단하고 DNA 복구 주형을 사용하지 않고 절단 부위 사이의 NHEJ 복구를 통해 원하는 서열을 생성할 수 있다. 서열번호 506-517에 기재된 아미노산 서열을 생성하는 가이드 쌍은 가이드에 의해 입된 DNA의 절단 말단을 가로질러 위인성 정지 코돈을 도입할 수 있다.

표 5

[0127] 예시적인 가이드 RNA 쌍

서열번호 (5')	절단 부위 (5')	서열번호 (3')	절단 부위 (3')	결실 크기 (bp)	복구된 서열 서열번호	Exon 7AA 서열번호
229	63322816	256	63323377	561	426	N/A
230	63322814	256	63323377	562	427	N/A
231	63322826	256	63323377	551	428	N/A
237	63322861	256	63323377	516	429	N/A
241	63322891	256	63323377	486	430	N/A
229	63322816	258	63323378	562	431	N/A
230	63322814	258	63323378	563	432	N/A

231	63322826	258	63323378	552	433	N/A
237	63322861	258	63323378	517	434	N/A
241	63322891	258	63323378	487	435	N/A
229	63322816	261	63323373	558	436	N/A
230	63322814	261	63323373	559	437	N/A
231	63322826	261	63323373	548	438	N/A
237	63322861	261	63323373	513	439	N/A
241	63322891	261	63323373	483	440	N/A
219	63322697	256	63323377	680	441	N/A
221	63322709	256	63323377	668	442	N/A
224	63322747	256	63323377	630	443	N/A
227	63322786	256	63323377	591	444	N/A
219	63322697	258	63323378	681	445	N/A
221	63322709	258	63323378	669	446	N/A
224	63322747	258	63323378	631	447	N/A
227	63322786	258	63323378	592	448	N/A
219	63322697	261	63323373	677	449	N/A
221	63322709	261	63323373	665	450	N/A
224	63322747	261	63323373	627	451	N/A
227	63322786	261	63323373	588	452	N/A
249	63322963	256	63323377	414	453	N/A
250	63322973	256	63323377	404	454	N/A
249	63322963	258	63323378	415	455	N/A
250	63322973	258	63323378	405	456	N/A
249	63322963	261	63323373	411	457	N/A
250	63322973	261	63323373	401	458	N/A
351	63323023	365	63323103	80	459	506
351	63323023	387	63323235	212	460	506
348	63323027	390	63323236	209	461	507
348	63323027	388	63323236	209	462	507
348	63323027	395	63323284	257	463	507
352	63323035	365	63323103	68	464	508
352	63323035	387	63323235	200	465	508
352	63323035	399	63323283	248	466	508
353	63323038	365	63323103	65	467	509
353	63323038	387	63323235	197	468	509
353	63323038	399	63323283	245	469	509
354	63323039	390	63323236	197	470	509
354	63323039	388	63323236	197	471	509
354	63323039	395	63323284	245	472	509
358	63323056	361	63323077	21	473	510
358	63323056	362	63323087	31	474	510
358	63323056	368	63323124	68	475	510
358	63323056	384	63323203	147	476	510
358	63323056	394	63323272	216	477	510
358	63323056	399	63323283	227	478	511
359	63323057	390	63323236	179	479	511
359	63323057	388	63323236	179	480	511
359	63323057	395	63323284	227	481	511
360	63323058	368	63323124	66	482	511
360	63323058	384	63323203	145	483	511
360	63323058	389	63323237	179	484	511
360	63323058	394	63323272	214	485	511
360	63323058	397	63323285	227	486	511
361	63323077	365	63323103	26	487	512
361	63323077	387	63323235	158	488	512
362	63323087	390	63323236	149	489	513
362	63323087	388	63323236	149	490	512

362	63323087	395	63323284	197	491	513
364	63323089	365	63323103	14	492	514
364	63323089	387	63323235	146	493	514
364	63323089	399	63323283	194	494	514
365	63323103	368	63323124	21	495	515
365	63323103	384	63323203	100	496	516
365	63323103	389	63323237	134	497	516
365	63323103	394	63323272	169	498	516
365	63323103	397	63323285	182	499	516
366	63323118	368	63323124	6	500	517
366	63323118	384	63323203	85	501	517
366	63323118	389	63323237	119	502	517
366	63323118	394	63323272	154	503	517
366	63323118	397	63323285	167	504	517
354	63323039	211	63323163	123	505	518

[0128] 측면에서, 가이드 RNA-Cas 단백질 쌍은 DNA 복구 주형을 추가로 포함할 수 있다. 정지 코돈을 생성하는 예시적인 가이드 및 복구 주형은 하기 표 6에 나열되어 있다. 이들 및 기타 가이드는 CD163 mRNA 번역 또는 프로세싱을 방해하는 예로서, 프레임 내 정지 코돈을 생성하거나 엑손의 스플라이싱을 교란, 방해 또는 제거하기 위해 다른 복구 주형과 쌍을 이룰 수 있다. 다른 예에는 개시 ATG 코돈의 제거, 또는 복구 주형이 쌍을 이루는 뉴클레아제가 CD163에서 엑손(예: 도메인 5에 해당하는 엑손 7의 결실)을 제거할 경우 복구 주형이 무작위 비-상동 말단 결합(NHEJ)보다 단일 복구 결과를 촉진할 수 있는 쌍을 이루는 가이드 RNA를 사용할 때 복구 결과 프로그래밍을 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이론에 제한되지 않고, 분석은 PAM(nGGnG)에 추가 nG를 포함하고 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*)에서 표적 외(off-target) 절단을 감소시켜 생물정보학적 미스매치의 일관된 감소를 나타낸다. 미스매치 감소는 얼라인먼트(alignment) 관점(DNA 서열이 RNA 가이드 서열과 불일치가 있는지 여부)에서의 불일치를 포함할 수 있다. 상기 표 4를 참조한다. 미스매치는 표적 외 편집(각각 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*) indel의 존재 또는 절단)이 아닐 수 있지만 표적 외(off-target) 편집은 미스매치로 인한 것일 수 있다. 가장 바람직한 측면에서, 본 명세서에 개시된 방법은 돼지에서 표적 외(off-target) 편집을 생성하지 않으며, 본 명세서에 개시된 돼지는 지놈에 표적 외(off-target) 편집을 갖지 않는다.

[0129] [표 6]

[0130] CD163의 엑손 2 편집을 위한 가이드 RNA 및 복구 주형

Table 6: Guide RNAs and repair templates for editing CD163

Region Chr5 Location of guideRNAs binding site	Repair tem- plate SEQ ID NO	Guide RNA spacer (DNA) SEQ ID NO	Guide RNA spacer (RNA) SEQ ID NO	WT Region SEQ ID NO	Trans-lation of WT region	Translation of Deletion	Base deletion coordinates	Deleted bases (#)
63301998 - 02017	1	274	287	300	313	326	chr5: 6330 1999- 2005	CTT GGT C (7)
63301997- 02016	2	275	288	301	314	327	chr5: 6330 1999- 2005	CTT GGT C (7)
63303213- 03332	3	276	289	302	315	328	chr5: 6330 3234- 6330	GG (2)
63303283 - 03302	4	277	290	303	316	329	chr5: 6330 3304- 6330	GGC T (4)
63303315- 03334	5	278	291	304	317	330	chr5: 6330 3336- 6330	G (1)
63303315- 03334	6	279	292	305	318	331	chr5: 6330 3337- 6330	G (1)
63303338- 03357	7	280	293	306	319	332	chr5: 6330 3351- 6330	CTT GTC (6)
63303379- 03398	8	281	294	307	320	333	chr5: 6330 3399- 6330	GGG (3)
63303379- 03398	9	282	295	308	321	334	chr5: 6330 3400- 6330	GGG (3)
63306148 - 06167	10	283	296	309	322	335	chr5:6 33061 56- 63306	TTC (3)
63306263- 06282	11	284	297	310	323	336	chr5: 6330 6282- 6330	CTC (3)
63306364- 06383	12	285	298	311	324	337	chr5: 6330 6373- 6330	CGA TC (5)
63323147- 23166	13	286	299	312	325	338	chr5: 6332 3159- 6332	CGG C (4)

[0131]

[0132] 비-상동 말단 연결(NHEJ) 복구의 확률론적 자연 세포 복구 과정은 때때로 이중 가닥 절단에서 단일 또는 다중 뉴클레오타이드를 삽입 또는 결실시키는 것을 포함한다. 이 복구 과정의 결과로, 유전자의 암호화 영역에서 이중 가닥 절단이 발생하면 암호화된 mRNA의 번역 해독 프레임의 이동이 프레임 내 정지 코돈까지 발생하여 단백질 번역을 종료할 수 있다. 이 자연적으로 우연히 돌연변이된 유전자의 번역이 변형되지 않은 버전의 단백질 생성물에 비해 단축된 단백질을 생성할 수 있지만, 이러한 새로 암호화된 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 독특하여 표적 유기체 내 세포의 적합성을 감소시키거나 개선할 가능성이 있다. 일 측면에서, 프레임 이동 돌연변이의 생성 및 이러한 바람직하지 않은 폴리펩타이드 세트의 번역을 배제하기 위해, 편집된 돼지는 별도의 자연 발생 NHEJ 복구의 결과인 엔도뉴클레아제 절단 부위 또는 근처에서 프레임-내 번역 정지 코돈 형성에 대해 스크리닝할 수 있다.

[0133] 엔도뉴클레아제와 함께 2개의 인트론 가이드RNA를 사용하는 지놈 DNA 서열의 절단은 뉴클레아제 절단 부위의 중단간 연결을 포함하나 이에 제한되지 않는 NHEJ 복구에 의해 달성될 수 있다. 인트론은 비-암호화이기 때문에 뉴클레아제 절단 부위 주변의 인텔을 포함하는 NHEJ 복구 결과는 인트론 및/또는 엑손 서열을 포함할 수 있는 DNA의 의도된 영역의 절단을 달성할 수 있다. 일부 NHEJ 복구 결과는 다른 것보다 더 빈번하게 발생하기 때문에 유전자 편집 실험에 사용할 가이드 RNA 쌍을 선택할 때 복구 결과 빈도를 고려하는 것이 유리하다. 서열번호 520-555는 하기 표 7에 기재된 가이드 쌍으로부터의 배반포에서 관찰된 엑손 7 절단의 복구 결과를 예시한다. 이 가이드 쌍에 대해 설계된 복구 결과는 표 5에 나열되어 있다.

표 7

[0134]

배반포에서 관찰된 복구 결과

서열번호 (5')	서열번호 (3')	복구 결과 서열번호
249	261	520
249	261	521
249	261	522
249	261	523
249	261	524
249	261	525
249	261	526
249	261	527
249	256	528
249	256	529
249	256	530
249	256	531
249	256	532
249	256	533
249	256	534
249	256	535
241	258	536
241	258	537
241	258	538
241	258	539
241	258	540
241	258	541
241	258	542
241	258	543
241	258	544
221	261	545
221	261	546
221	261	547
221	261	548
221	261	549
229	256	550
229	256	551
229	256	552
229	256	553
229	256	554
229	256	555

[0135]

다른 측면에서, 유전자 편집 동안, 가이드 RNA-Cas 단백질 쌍과 함께 DNA 복구 주형을 포함함으로써 새로운 아미노산의 추가를 초래하지 않는 인프레임 정지 코돈이 생성될 수 있다. 일 측면에서, DNA 복구 주형은 dsDNA일 수 있다. 또 다른 측면에서, DNA 복구 주형은 ssDNA일 수 있다. 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA 복구 주형의 공동-도입(Co-introduction)은 DNA 뉴클레오타이드를 삭제하거나 삽입하여 엔도뉴클레아제에 의해 개시된 이중 가닥 절단 부위에서 또는 그 근처에서 프레임 내 번역 정지 코돈(TAA, TGA, TAG)을 형성하는 데 사용할 수 있다. DNA 복구 주형은 천연 서열과 비교하여 여러 뉴클레오타이드 변화를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 변형 주형을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 표적 DNA 서열을 직접 편집할 수 있고 엔도뉴클레아제 편집 시약으로 공동 형질 감염되어 프레임 내 정지 코돈이 있는 편집된 CD163 유전자를 생성할 수 있다. 한 측면에서, 이러한 유전자 편집된 CD163 유전자로부터의 암호화된 단백질은 mRNA로 전사된 다음 단백질로 번역될 때 CD163 폴리펩타이드의 단축되고 비-기능적인 형태만 합성할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 서열 상동성의 더 긴 영역을 갖는 DNA 복구 주형이 더 효율적일 수 있다. 특정 구현예에서, DNA 복구 주형은 서열 변화를 측면화(flanking)할 수 있고 50개 미만의 뉴클레오타이드에서 1000개 초과 뉴클레오타이드 범위일 수 있는 DNA 복구 주형 내의 서열 동일성 영역(상동성 암(arm))을 포함할 수 있다.

[0136]

DNA 복구 주형과 함께 Cas9-단백질/가이드 RNA 조합의 여러 측면이 표 6에 기재되어 있다. 표 6에 제공된 바와 같이, 여러 Cas9-단백질/가이드 RNA 조합은 표적화된 결실의 각 측면에 서열 상동성의 75개 염기(50개의 코어

상동성 염기 및 양쪽 사이트에 50개의 측면 상동성 영역)를 갖지만 이에 제한되지 않는 DNA 복구 주형과 쌍을 이룰 수 있다. 일 측면에서, 단백질-가이드 RNA 복합체 및 주형 조합은 세포 내로 형질감염될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, DNA 복구 주형을 사용한 이중 가닥 절단의 복구는 절단 부위에서 또는 그에 인접한 단일 또는 다중 뉴클레오타이드의 결실의 결과로서 프레임 내(in-frame) 번역 정지 코돈의 형성을 지시할 수 있다. 이 방법에서 얻은 동물 및 세포는 돼지 CD163 유전자의 엔도뉴클레아제-유도 이중 가닥 절단이 동시 도입된 DNA 복구 주형을 사용하여 복구될 수 있음을 보여준다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 서열번호 1 내지 13의 서열을 갖는 복구 주형은 엑손 2에 프레임 내(in-frame) 번역 정지 코돈을 도입함으로써 단축되고 비-기능적인 CD163 단백질을 생성할 수 있다.

[0137] 본 명세서에 따른 DNA 복구 주형의 사용은 CD163의 기능을 없애는 것으로 제한되지 않는다. 본 명세서는 유전자에 대한 뉴클레오타이드의 제거 또는 추가를 지시할 수 있는 복구 주형을 추가로 포함하고 제공한다. 일 측면에서, 암호화된 CD163 mRNA의 안정성 또는 반감기 조절은 본 방법에 따른 편집에 의해 조절될 수 있다. 또 다른 측면에서, PRRS 바이러스 결합을 담당하는 성숙 단백질의 아미노산을 코딩하는 DNA 서열은 제거되거나 대체될 수 있다. 한 측면에서, CD163 발현 및/또는 활성은 적어도 90%까지 감소될 수 있지만 사라지지는 않는다. 본 교시의 측면에서, 다른 복구 주형으로 기재된 스페이스 서열을 사용하는 것은 염기의 제거 및 염기의 도입 또는 이들의 조합에 의해 프레임내 정지 코돈의 형성을 허용하기 위해 당업자에 의해 고려될 것이다.

[0138] 편집된 CD163 유전자를 포함하는 엘리트 돼지 계통(elite porcine lines, PIC)으로부터 유래된 돼지가 본 명세서에 포함되고 제공된다. 측면에서, 엘리트 돼지 계통은 PIC™ Line 15, , PIC™ Line 17, PIC™ Line 27, PIC™ Line 65, PIC™ Line 14, PIC™ Line 62, PIC337, PIC800, PIC280, PIC327, PIC408, PIC™ 399, PIC410, PIC415, PIC359, PIC380, PIC837, PIC260, PIC265, PIC210, PIC™ Line 2, PIC™ Line 3, PIC™ Line 4, PIC™ Line 5, PIC™ Line 18, PIC™ Line 19, PIC™ Line 92, PIC95, PIC™ CAMBOROUGH® (Pig Improvement Company, Limited, Basingstoke, UK), PIC1070, PIC™ CAMBOROUGH® 40, PIC™ CAMBOROUGH® 22, PIC1050, PIC™ CAMBOROUGH® 29, PIC™ CAMBOROUGH® 48, 또는 PIC™ CAMBOROUGH® x54일 수 있다. 다양한 측면에서, 엘리트 돼지 계통(lilne)은 PIC™ 엘리트 돼지 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 또는 65일 수 있다. 또 다른 측면에서, 돼지는 엘리트 돼지 계통으로부터 유래된 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있다. 측면에서, 돼지는 표 8 내지 표 14에 기재된 유전자형을 갖는 CD163 지놈 영역에 편집된 CD163을 포함할 수 있다. 표 8 내지 표 14는 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism)이 존재하는 CD163 유전자 부근의 5번 염색체 상의 각 위치를 나타낸다.

[0139] 각 표는 해당 계통에서 동형접합인 대립유전자를 제시하고 계통의 구별되는 유전적 특징 뿐만 아니라 고유한 지놈 편집 영역을 제공한다. 모든 유전자 특징은 Sscrofa11.1 참조 지놈(GenBank accession: GCA_000003025.6)을 기반으로 한다. 따라서, 편집된 CD163 계통의 전과를 추적할 수 있고, 계통에서 얻은 편집된 CD163 유전자를 포함하는 동물을 식별할 수 있다. 다른 계통의 돼지는 표 8 내지 표 14의 계통과 비교할 때 다중 대립유전자에서 이형접합성 또는 반대 유전자형이다. 이러한 방식으로, 각 계통의 유전자 특징 조합을 사용하여 특정 계통에 속하는 돼지와 특정 계통에 속하지 않는 돼지를 구별할 수 있다. 일 측면에서, 유전자 특징은 CD163 편집된 지놈을 세대에서 세대로 번식 및 추적하는 방법을 제공한다. 일 측면에서, 표 8 내지 표 14에 따른 유전적 특징을 갖는 CD163 편집된 지놈을 포함하는 자손 세대가 제조될 수 있다.

표 8

[0140] Line 2 유전적 특징(Line 2 Genetic Signatures)

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60306428	C/C	60354925	C/C	63553656	G/G	65411831	C/C
60306527	C/C	60355415	G/G	63558087	G/G	65411848	G/G
60308030	C/C	60355420	T/T	63640722	G/G	65411854	T/T
60320580	C/C	60355448	G/G	63792071	T/T	65411966	C/C
60322529	A/A	60355529	A/A	64009226	C/C	65412729	G/G
60324162	T/T	60355530	A/A	64459105	T/T	65413215	G/G
60327987	C/C	60355774	C/C	64460101	A/A	65413759	C/C
60328009	T/T	60356277	C/C	64527707	A/A	65417199	A/A
60335421	T/T	60356351	C/C	64577968	C/C	65417256	G/G
60338654	G/G	60356575	C/C	64943306	T/T	65417261	A/A
60344946	A/A	60356578	T/T	65242696	T/T	65417273	C/C
60345163	C/C	60356861	G/G	65242725	A/A	65417287	G/G

60345689	G/G	60356885	T/T	65242729	A/A	65417716	G/G
60345715	G/G	60356898	T/T	65242736	G/G	65417797	C/C
60345722	A/A	60356914	C/C	65249484	T/T	65417800	C/C
60345749	G/G	60357001	T/T	65260283	T/T	65419169	G/G
60345775	A/A	60357014	T/T	65269510	C/C	65419410	G/G
60345825	A/A	60358409	C/C	65273886	T/T	65420017	T/T
60346409	G/G	60358449	G/G	65276133	C/C	65420184	G/G
60346607	A/A	60358469	T/T	65277053	T/T	65420415	A/A
60346641	G/G	60358475	T/T	65277156	C/C	65420591	G/G
60346691	T/T	60358551	A/A	65277320	G/G	65420680	C/C
60346734	A/A	60358568	G/G	65280282	A/A	65420681	A/A
60347297	G/G	60358641	T/T	65282683	C/C	65420693	G/G
60350295	C/C	60358704	T/T	65283434	C/C	65420947	G/G
60350343	G/G	60358774	T/T	65283970	C/C	65420949	T/T
60350448	C/C	60368913	C/C	65284829	C/C	65421133	G/G
60350470	T/T	60368916	A/A	65285100	C/C	65421195	G/G
60350475	C/C	60368921	T/T	65285902	G/G	65421255	G/G
60350564	A/A	60368940	G/G	65285914	T/T	65421365	G/G
60350571	A/A	60368963	C/C	65286400	C/C	65421421	C/C
60350572	A/A	60416097	G/G	65294497	T/T	65422005	G/G
60350911	C/C	60543479	C/C	65383805	C/C	65422008	G/G
60351055	G/G	60614797	G/G	65405986	C/C	65422057	T/T
60351604	C/C	60614964	G/G	65410118	C/C	65422141	C/C
60351855	T/T	60920926	G/G	65410147	G/G	65422701	C/C
60351857	C/C	61479206	C/C	65410198	C/C	65422725	C/C
60351972	G/G	61479353	T/T	65410435	C/C	65425730	G/G
60352165	C/C	61653091	C/C	65410440	T/T	65601310	C/C
60352923	C/C	61783688	A/A	65410441	C/C	65602328	C/C
60353408	A/A	62091204	A/A	65410443	C/C	65711602	C/C
60353562	T/T	62416522	A/A	65410447	C/C	65761990	C/C
60353576	C/C	62476273	C/C	65411265	C/C	66293766	G/G
60353659	T/T	62687883	C/C	65411431	G/G	66296268	A/A
60353721	G/G	63044336	A/A	65411524	C/C		
60354428	G/G	63546615	C/C	65411698	G/G		

표 9

Line 3 유전적 특징

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60414864	T/T	64555715	G/G	64774093	G/G	66035868	A/A
60415813	C/C	64561148	G/G	64775512	G/G	66042409	C/C
60415854	G/G	64561209	G/G	64775565	C/C	66042542	C/C
60572371	A/A	64561659	G/G	64780089	C/C	66042551	C/C
60663464	C/C	64561828	T/T	64780152	C/C	66042557	A/A
60663499	A/A	64561873	G/G	64780196	C/C	66042563	G/G
61016527	G/G	64561935	C/C	64783169	G/G	66155827	A/A
61442674	T/T	64562021	C/C	64783774	C/C	66155859	A/A
61870484	C/C	64562771	C/C	64783896	G/G	66155863	T/T
61989476	G/G	64563462	G/G	64784000	T/T	66156160	A/A
62510031	G/G	64682243	C/C	64784139	C/C	66156183	G/G
62602514	T/T	64682929	G/G	64784235	T/T	66156533	G/G
63044336	A/A	64685072	T/T	64784410	A/A	66167582	C/C
63345577	G/G	64692673	G/G	64784653	A/A	66167809	C/C
63452493	A/A	64692905	T/T	64784725	C/C	66167823	T/T
63669675	G/G	64693058	T/T	64784844	A/A	66167877	A/A
63754659	T/T	64705228	G/G	64784875	T/T	66167888	C/C
63810627	C/C	64720067	A/A	64785001	A/A	66167905	A/A

63810632	G/G	64722426	T/T	64785078	C/C	66168135	C/C
63810707	T/T	64722539	C/C	64813032	G/G	66168261	C/C
63810733	G/G	64726936	G/G	64819974	C/C	66168311	G/G
63810819	C/C	64729340	C/C	64893099	G/G	66168615	G/G
63810857	C/C	64730596	G/G	64899922	A/A	66168688	G/G
63810861	G/G	64736752	G/G	64934758	C/C	66168742	G/G
64010555	T/T	64761650	G/G	65348500	G/G	66168880	G/G
64010599	A/A	64767369	G/G	65546268	A/A	66168947	T/T
64452338	T/T	64768411	G/G	65546327	G/G	66168952	A/A
64455982	C/C	64769978	T/T	65841270	T/T	66168993	A/A
64457532	T/T	64769989	C/C	65858531	G/G		
64458163	T/T	64770307	G/G	65979134	G/G		
64458711	G/G	64773053	A/A	65985520	C/C		

표 10

[0142] Line 15 유전적 특징

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60391943	G/G	61515967	T/T	63367266	G/G	64537982	T/T
60392234	T/T	61759785	C/C	63424311	T/T	64893205	A/A
60394009	A/A	61759821	C/C	63535058	T/T	64916422	G/G
60414796	T/T	61865586	A/A	63653754	G/G	65039734	C/C
60601475	A/A	61867498	C/C	63655538	T/T	65175496	C/C
60630898	A/A	62192420	G/G	63669242	A/A	65177506	G/G
60630910	A/A	62195570	A/A	63669944	C/C	65294016	C/C
60786421	G/G	62196101	C/C	63669946	G/G	65571397	A/A
60787517	G/G	62442547	G/G	63900332	A/A	65573608	T/T
60792231	G/G	62509196	T/T	64138082	C/C	65576707	C/C
60795724	C/C	62675268	G/G	64171653	C/C	65984917	G/G
60915104	C/C	62843969	G/G	64471845	G/G	65984984	T/T
61016227	A/A	62852334	A/A	64472363	A/A	65985058	T/T
61086145	T/T	63025151	A/A	64472504	T/T	65985392	C/C
61275101	C/C	63025152	C/C	64472616	T/T	66042472	C/C
61396087	A/A	63168616	A/A	64523343	A/A	66099282	A/A
61434042	G/G	63266682	T/T	64536599	G/G	66119075	T/T

표 11

[0143] Line 19 유전적 특징

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60320100	A/A	61390748	C/C	63174233	T/T	65031621	C/C
60320144	G/G	61465215	T/T	63174257	A/A	65031630	C/C
60320580	C/C	61567329	C/C	63393845	G/G	65031684	T/T
60507836	C/C	61567357	A/A	63393849	T/T	65222383	T/T
60512716	G/G	61567365	A/A	63393851	T/T	65222385	A/A
60564418	A/A	61567410	C/C	63860532	A/A	65242693	C/C
60666662	T/T	61567494	C/C	63861247	A/A	65497229	G/G
60683738	T/T	61567594	G/G	63862368	T/T	65499233	C/C
60782197	T/T	61975156	G/G	64138082	C/C	65502398	G/G
60782278	T/T	61975367	G/G	64171653	C/C	65562917	C/C
60782642	A/A	61975382	A/A	64181448	G/G	65566225	T/T
60782683	G/G	61975388	C/C	64402245	T/T	65567066	T/T
60782756	G/G	62363513	T/T	64455172	G/G	65894449	C/C
60782997	G/G	62367647	G/G	64514012	C/C	65904537	T/T
60783031	C/C	62378299	G/G	64514013	A/A	65959573	A/A

60783198	G/G	62610431	T/T	64522169	G/G	65998062	C/C
61131519	G/G	62952267	T/T	64522173	T/T	66158553	A/A
61131736	C/C	62965473	T/T	64522177	T/T	66158950	C/C
61189029	C/C	63108711	G/G	64522178	C/C	66159103	A/A
61359517	A/A	63109224	T/T	64794635	G/G	66159212	G/G

표 12

[0144] Line 27 유전적 특징

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60347934	A/A	62159353	T/T	62918655	T/T	64582272	A/A
60356984	C/C	62313847	C/C	63042154	C/C	64600735	G/G
60692943	C/C	62315464	A/A	63043261	G/G	65056396	A/A
60693260	G/G	62570257	C/C	63046692	G/G	65056671	T/T
60693769	G/G	62570793	A/A	63433705	G/G	65332987	A/A
60938885	T/T	62571313	T/T	63490990	A/A	65335837	C/C
60960728	A/A	62917536	G/G	63626018	A/A	65390844	A/A
61436306	G/G	62917597	T/T	63626423	T/T	65404042	A/A
61464114	C/C	62917618	C/C	63626826	C/C	65404045	A/A
61468375	G/G	62917629	T/T	63630149	A/A	65404063	C/C
61736415	A/A	62917780	G/G	63631098	C/C	65705261	G/G
61736429	G/G	62917866	T/T	63977777	A/A	65740018	T/T
61757961	G/G	62917889	T/T	63977821	G/G	65740030	A/A
61820110	A/A	62918448	G/G	64460204	C/C	66235840	G/G
61822513	T/T	62918456	A/A	64582243	C/C		
61858837	G/G	62918465	A/A	64582246	G/G		

표 13

[0145] Line 62 유전적 특징

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60336383	A/A	61760230	C/C	62483897	T/T	64484177	T/T
60343172	A/A	61927492	T/T	62847072	G/G	64689271	A/A
60345254	G/G	61927506	A/A	62874766	G/G	64758235	C/C
60447765	G/G	62006220	T/T	62897778	A/A	64790188	C/C
60452143	C/C	62115641	T/T	63100290	C/C	64895383	C/C
60452167	T/T	62169134	T/T	63219344	G/G	64991645	A/A
60462769	T/T	62368918	C/C	63361759	G/G	65045805	T/T
60653700	T/T	62471593	C/C	63388357	C/C	65146186	C/C
60654939	A/A	62474001	A/A	63442314	G/G	65368620	C/C
60654943	A/A	62474006	C/C	63590333	T/T	65432698	C/C
61085770	A/A	62474365	A/A	63670724	G/G	65542716	A/A
61108831	G/G	62480042	A/A	63714834	A/A	65637507	G/G
61117357	A/A	62480261	G/G	63792005	T/T	65771614	C/C
61234908	C/C	62480699	A/A	63985848	A/A	65771615	G/G
61331270	A/A	62480892	A/A	63985923	G/G	65772162	T/T
61388824	G/G	62481902	G/G	64131088	C/C	66033248	T/T
61755575	C/C	62482914	T/T	64471400	C/C	66033476	C/C
61759095	C/C	62483893	C/C	64483848	G/G	66033484	C/C

표 14

[0146]

Line 65 유전적 특징

위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype	위치	Genotype
60322300	C/C	60783031	C/C	63383925	A/A	64759492	T/T
60411747	A/A	60783198	G/G	63392495	T/T	64795760	T/T
60412758	G/G	60791719	T/T	63549670	C/C	64797970	A/A
60412775	A/A	60900261	G/G	63593491	G/G	64798690	G/G
60412826	C/C	60911551	A/A	63609938	A/A	64860395	G/G
60413294	G/G	60912669	A/A	63641998	C/C	64860396	C/C
60459719	A/A	61223574	A/A	63678793	G/G	64862131	C/C
60462179	C/C	61486607	C/C	63784770	G/G	65371202	T/T
60492928	A/A	61756324	G/G	63810897	C/C	65371472	G/G
60492938	T/T	61832527	C/C	63810903	C/C	65371901	G/G
60666662	T/T	61895566	C/C	63810920	G/G	65371970	C/C
60722708	C/C	61895833	A/A	63810922	T/T	65372072	A/A
60770183	G/G	62354225	C/C	63810928	G/G	65409493	A/A
60770197	C/C	62364072	G/G	63872757	C/C	65437347	G/G
60777431	C/C	62383525	G/G	63944636	G/G	65573362	T/T
60781592	T/T	62399452	T/T	63944765	C/C	65601655	G/G
60782197	T/T	62404734	A/A	64138639	C/C	65747069	T/T
60782278	T/T	62432982	C/C	64194054	G/G	65843843	A/A
60782642	A/A	62841388	G/G	64242768	T/T	65849424	T/T
60782683	G/G	62931496	T/T	64270989	G/G	66248756	A/A
60782756	G/G	63156406	C/C	64753488	G/G		
60782997	G/G	63156417	T/T	64758888	A/A		
60783006	G/G	63266198	A/A	64758900	C/C		

[0147]

엘리트(elite) PIC™ 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65는 우수한 상업적 표현형을 위해 선택된 계통이다. 일 측면에서, CD163 유전자 편집된 세포 및 동물은 야생 집단 및 많은 상업적 무리에 존재하는 유해한 대립유전자가 없을 수 있다. 측면에서, CD163 유전자 편집된 세포 및 동물은 상피형성부전증(epitheliogenesis imperfecta), 흑색종성 피부종양(melanotic skin tumors), dermatosis vegetans, abnormal mammae, 단축된 척추(shortened vertebral column), 꼬인 꼬리(kinky tail), 꼬리발달 부전(rudimentary tail), 탈모(Hairlessness), 탈모(2)(Hairlessness (2)), 양털 같은 털(Woolly hair), 수두증(Hydrocephalus), Tassels, 다리가 없는(Legless), 3개의 다리(Three-legged), 합지증(Syndactyly), 다지증(Polydactyly), Pulawska factor, 홍채 이색증(Heterochromia iridis), 선청성 떨림 A III(Congenital tremor A III), 선청성 떨림 A IV(Congenital tremor A IV), 선청성 운동 실조(Congenital ataxia), 뒷다리 마비(Hind leg paralysis), 굽은 다리(Bentleg), 두꺼운 다리(Thickleg), 악성 고열(Malignant hyperthermia), 혈우병(Hemophilia) 폰 빌레브란트병(von Willebrand's disease)), 백혈병(Leukemia), 용혈성 질환(Hemolytic disease), 부종(edema), 급성 호흡성 질환(Acute respiratory distress) ("barker"), 구루병(Rickets), 25 신장 기능 저하증(25 Renal hypoplasia), 신장 낭종(Renal cysts), 자궁 무형성증(Uterus aplasia), 돼지 스트레스 증후군(Porcine Stress Syndrome, PSS), 할로세인(halothane, HAL), 침적된 어깨(Dipped Shoulder) (Humpy Back, Kinky Back, Kyphosis), 골비대증(Hyperostosis), 유방 저형성증(Mammary Hypoplasia), 및 미발달된 유방(Undeveloped Udder)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유해한 대립유전자가 없을 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, CD163 유전자 편집 동물을 제조하는 개선된 방법은 유해한 유전자좌에 새로운 돌연변이를 도입하거나 비-표적 부위에서 새로운 무정형(amorphic), 저형(hypomorphic), 과형(hypermorphic), 신형(neomorphic), 반형(antimorphic) 돌연변이를 생성하는 것을 피할 수 있다. 이러한 후자의 변화는 집단에서 연속적이고 정량적인 방식으로 다중 유전자좌에 의해 제어될 수 있는 바람직한 형질에 관여하는 유전자를 방해할 수 있기 때문에 엘리트 계통에서 특히 바람직하지 않을 수 있다. 그러한 많은 QTL(Quantitative Trait Loci)이 알려져 있으며 일반적으로 종 모양의 곡선으로 특징지어질 수 있고, 특성 값은 관찰된 동물의 수에 대해 표시될 수 있다. 이러한 형질의 다유전자 유전은 등지방(backfat), 일일 평균 사료 섭취량(average daily feed intake), 일생 1일 증가량(lifetime daily gain) 및 허리 깊이(loin depth)에 국한되지는 않지만, 이와 같이 상업적으로 중요한 것으로 인식되는 형질 중에서 공통적일 수 있다.

[0148]

유사하게, 생산성과 관련된 형질은 다중 유전자일 수 있고 다중 QTL에 의해 제어될 수 있다. 이러한 특성은 일

반적으로 육안 검사로 측정되었지만 이제는 초음파를 사용하여 등지방 두께(bfp), 허리 깊이(ldp) 및 근육내 지방(uip)을 측정할 수 있다. 하기 표 15에 제공된 바와 같이, 엘리트 계통은 높은 일생 일일 증가량을 가지면서 높은 등지방 및 허리 깊이를 포함하는 바람직한 표현형 특성을 가질 수 있습니다. 유사하게, 엘리트 계통의 암 돼지는 번식력이 있고, 새끼가 많고, 사산아가 거의 없으며, 젖을 떼고 젖을 먹이기에 충분한 젖꼭지를 가질 수 있다.

표 15

바람직한 표현형 특성

LINE	TRT	average	standard deviation
2	Backfat, mm	7.8	1.81
3	Backfat, mm	9.44	2.77
15	Backfat, mm	8.16	2.03
65	Backfat, mm	7.45	1.88
2	Average Daily Feed Intake, kg	1.99	0.24
3	Average Daily Feed Intake, kg	2.13	0.25
15	Average Daily Feed Intake, kg	2.22	0.24
65	Average Daily Feed Intake, kg	2.2	0.27
2	Lifetime Daily Gain, grams/day	683.83	73.53
3	Lifetime Daily Gain, grams/day	704.23	80.15
15	Lifetime Daily Gain, grams/day	755.61	69.32
65	Lifetime Daily Gain, grams/day	800.6	84.48
2	Loin depth, mm	65.31	7.09
3	Loin depth, mm	62.61	7.14
15	Loin depth, mm	67.17	7.15
65	Loin depth, mm	81.2	8
2	Total Born per litter	13.71	3.19
3	Total Born per litter	15.06	3.41
15	Total Born per litter	10.39	2.71
65	Total Born per litter	10.31	2.52
2	Still born per litter	1.19	1.43
3	Still born per litter	1.25	1.50
15	Still born per litter	1.22	1.37
65	Still born per litter	0.77	1.16
2	Teat number	15.43	1.27
3	Teat number	15.44	1.29

본 명세서는 CD163 녹아웃 편집(CD163-/-)에 대해 동형접합성일 수 있는 선택된 엘리트 계통의 유전자 편집 돼지를 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 계통(line)은 PIC™ line 2, line 3, line 15, line 19, line 27, line 62, line 65, 및 본 명세서에 기재된 편집된 CD163 유전자를 포함하는 그의 자손으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 유전자 편집된 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65는 표 8 내지 표 14에 제공된 바와 같은 CD163 지놈 영역을 포함할 수 있으며, 서로, 미개선 계통 및 기타 엘리트 계통과 쉽게 구별될 수 있다. 본 명세서에 따른 측면에서, 본 명세서의 이형접합 및 동형접합 돼지는 오프-사이트(off-site) 돌연변이가 없을 수 있다. 본 명세서는 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505를 포함하는 편집된 CD163 유전자를 가질 수 있고 표 8 내지 표 14의 유전형 마커의 적어도 90%를 포함하는 유전적 특징을 공유할 수 있는 돼지 및 세포를 제공하고 포함한다. 본 명세서는 서열번호 2를 포함하고 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 적어도 90%를 포함하는 유전자 특징을 공유할 수 있는 편집된 CD163 유전자를 가질 수 있는 돼지 및 세포를 제공하고 포함한다. 일 측면에서, CD163 편집 돼지 또는 세포의 유전적 특징은 표 8 내지 표 14의 유전형 마커의 적어도 95%를 포함하는 유전적 특징을 공유할 수 있다. 또한 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 적어도 97%를 포함하는 유전적 특징을 공유할 수 있는 CD163 편집 돼지 또는 세포가 포함된다. 일 측면에서, CD163 편집된 돼지 또는 세포는 표 8 내지 표 14의 유전형 마커의 적어도 98%를 포함하는 유전적 특징을 공유할 수 있다. 또 다른 측면은 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 적어도 99%를 포함하는 유전적 특징을 공유할 수 있는 CD163 편집 돼지 또는 세포를 제공한다.

본 명세서에 제공된 바와 같이, 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는

바람직한 상업적 특성을 유지할 수 있고 유해한 표적외 돌연변이가 없을 수 있으며 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505 중 어느 하나를 포함하는 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 측면에서, 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 돼지의 허리 깊이의 적어도 90%를 포함하고 서열번호 1 내지 18 및 426-505 중 어느 하나를 포함하는 편집된 CD163 유전자를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 측면에서, 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 비-편집된 돼지 계통의 일생 1일 증가량(lifetime daily gain)의 적어도 90%를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 측면에서, 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 비-편집된 돼지 계통의 일일 평균 사료 섭취량(average daily feed intake)의 적어도 90%를 포함할 수 있다. 본 명세서는 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505를 포함하는 편집된 CD163 유전자를 가질 수 있고 표 8 내지 표14의 유전자형 마커의 적어도 90%를 포함하는 유전자 특징을 공유할 수 있는 돼지 및 세포를 제공하고 포함한다.

[0152] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 바람직한 생식 특성을 유지할 수 있다. 본 개시내용의 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-를 포함하는 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 비-편집된 돼지 계통의 한배당 총 출생아(total born per litter)의 적어도 90%를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-를 포함하는 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 비-편집된 돼지 계통과 비교하여 사산자돈의 수(the number of still born piglets)의 110% 이하를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-를 포함하는 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 비-편집된 돼지 계통과 비교하여 평균 유두의 수가 적어도 90%를 포함할 수 있다.

[0153] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 2의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 2의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.

[0154] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 3의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 3 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 3의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 3 동물의 적어도 95%인 등지방을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 3의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.

[0155] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 15의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 15 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 15의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 15 동물의 적어도 95%인 등지방을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 15의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.

[0156] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 19의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 19 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 19의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 19 동물의 적어도 95%인 등지방을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 19의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.

[0157] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 27의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 27 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 27의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 27 동물의 적어도 95%인 등지방을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 27의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.

[0158] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 62의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 62 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 62의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 62 동물의 적어도 95%인 등지방을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 62의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집된

지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.

- [0159] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 65 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 등지방(backfat)을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 65의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 65 동물의 적어도 95%인 등지방을 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 65의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%인 등지방을 가질 수 있다.
- [0160] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 2의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 2의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 2의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 2 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0161] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 3의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 3 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 3의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 3 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 3의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 3 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0162] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 15의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 15 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 15의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 15 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 15의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 15 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0163] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 19의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 19 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 19의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 19 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 19의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 19 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0164] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 27의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 27 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 27의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 27 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 27의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 27 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0165] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 62의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 62 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 62의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 62 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 62의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 62 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0166] 일 측면에서, 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 유전자-편집된 CD163-/-을 갖는 계통 65의 유전자-편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 65 동물에서 발견되는 양의 적어도 90%인 한배당 총 출생아(total born per litter)를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 65의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 65 동물의 적어도 95%인 한배당 총 출생아를 가질 수 있다. 일 측면에서, 계통 65의 유전자 편집된 CD163-/- 동물 및 세포는 편집되지 않은 계통 65 동물의 적어도 97%의 한배당 총 출생아를 가질 수 있다.
- [0167] 본 명세서는 PICTM Line 15, PICTM Line 17, PICTM Line 27, PICTM Line 65, PICTM Line 14, PICTM Line 62,

PIC337, PIC800, PIC280, PIC327, PIC408, PICTM 399, PIC410, PIC415, PIC359, PIC380, PIC837, PIC260, PIC265, PIC210, PICTM Line 2, PICTM Line 3, PICTM Line 4, PICTM Line 5, PICTM Line 18, PICTM Line 19, PICTM Line 92, PIC95, PICTM CAMBOROUGH®, PIC1070, PICTM CAMBOROUGH® 40, PICTM CAMBOROUGH® 22, PIC1050, PICTM CAMBOROUGH® 29, PICTM CAMBOROUGH® 48, 또는 PICTM CAMBOROUGH® x54의 생식질(germplasm)을 포함하는 CD163 편집 동물을 제공하고 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 생식질(germplasm)은 세포 또는 핵에 존재하고 염색체를 포함하는 온전한 지놈을 포함한다. 생식질이라는 용어는 모든 배우자, 생식 세포 또는 동물이 복제될 수 있는 모든 체세포를 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 갖는 편집을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504 또는 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 갖는 편집을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 15와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 17과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 27과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 65와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 14와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 62와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC337과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC800과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC280과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC327과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC408과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM 399와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC410과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC415와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC359와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC380과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC837과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC260과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC265와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC210과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 2와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 3과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 4와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 5와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 18과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 19와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM Line 92와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC95와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM CAMBOROUGH®와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC1070과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM CAMBOROUGH® 40과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM CAMBOROUGH® 22와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PIC1050과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM CAMBOROUGH® 29와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM CAMBOROUGH® 48과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 PICTM CAMBOROUGH® x54와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다.

[0168] 본 명세서는 PICTM Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65의 생식질을 포함하는 CD163 편집 동물을 제공하고 포함한다. 편집된 생식질은 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 갖는 편집물을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493,

494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 또는 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 갖는 편집물을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453에 기재된 편집된 지놈 서열을 갖는 편집을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 2와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 3과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 15와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 19와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 27과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 62와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 453을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 65와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다.

[0169] 편집된 생식질은 서열번호489에 기재된 편집된 지놈 서열을 갖는 편집을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489를 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 2와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 3과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 15와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 19와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 27과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 62와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 489을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 65와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 506-517 중 어느 하나로부터 예측된 엑손 7 아미노산 서열을 가질 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 513에 기재된 예측된 엑손 7 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0170] 편집된 생식질은 서열번호 505에 기재된 편집된 지놈 서열을 갖는 편집을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505를 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 2와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 3과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 15와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 19와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 27과 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 62와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 505을 포함하는 CD163 편집된 서열을 갖는 PICTM Line 65와 80%, 85%, 90%, 95% 유사하거나 동일한 지놈을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 518에 기재된 예측된 엑손 7 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0171] 본 명세서는 또한 PIC™ Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65의 세포를 제공하고 포함한다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 2의 세포는 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PIC™ Line 2의 세포는 서열번호 453에 기재된 편집 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 3의 세포는 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PIC™ Line 3의 세포는 서열번호 453에 기재된 편집 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 15의 세포는 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PIC™ Line 15의 세포는 서열번호 453에 기재된 바와 같이 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 19의 세포는 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PIC™ Line 19의 세포는 서열번호 453에 기재된 바와 같이 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 27의 세포는 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PIC™ Line 27의 세포는 서열번호 453에 기재된 바와 같이 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 62의 세포는 서열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PIC™ Line 62의 세포는 서열번호 453에 기재된 바와 같이 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PIC™ Line 65의 세포는 서

열번호 426 내지 505 중 어느 하나의 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. PICTTM Line 65의 세포는 서열번호 453에 기재된 바와 같이 편집된 지놈 서열을 포함할 수 있다. 편집된 생식질은 서열번호 513에 기재된 예측된 엑손 7 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0172] 본 명세서는 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505를 특징으로 하는 CD163 유전자 편집을 포함할 수 있는 하이브리드 동물을 제공하고 포함한다. 일부 구성에서 유전자 편집은 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 상기 하이브리드 동물은 CAMBOROUGH®(PICTTM UK Limited, Basingstoke, UK) 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. CAMBOROUGH® 돼지는 Line 2와 Line 3을 교배하여 제조할 수 있는 하이브리드이다. 일 측면에서, 하이브리드 동물은 서열번호 2의 편집된 CD163 유전자를 갖는 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 동물은 서열번호 426-458의 편집된 CD163 유전자를 갖는 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. 다양한 측면에서, 하이브리드 동물은 서열번호 453의 편집된 CD163 유전자를 갖는 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 동물은 서열번호 459-504의 편집된 CD163 유전자를 갖는 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. 다양한 측면에서, 하이브리드 동물은 서열번호 489의 편집된 CD163 유전자 서열을 갖는 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. CAMBOROUGH® 하이브리드 돼지는 균일하고 활발한 새끼 돼지와 함께 큰 한배새끼(litters)를 낳는 돼지이다. CAMBOROUGH® 하이브리드 돼지는 생산 수명이 길고 폐사율이 낮다. CAMBOROUGH® CD163-/- 하이브리드 돼지는 이러한 바람직한 상업적 특성을 유지한다. 일 측면에서, CAMBOROUGH® CD163-/- 하이브리드 돼지는 유전자가 편집되지 않은 CAMBOROUGH® 하이브리드 돼지와 구별할 수 없는 한배새끼(litter) 크기를 갖는다. 본 명세서에 따른 측면에서, 본 명세서의 이형접합 및 동형접합 돼지는 오프사이트(off-site) 돌연변이가 없다.

[0173] 본 명세서는 CD163 유전자 편집된 하이브리드 동물을 제조하는 방법을 추가로 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 첫 번째 부모는 CD163 유전자 편집된 수퇘지, 어린 암퇘지(gilt), 또는 두 번째 부모와의 교배를 위한 PICTTM Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65 중 하나의 암퇘지(sow)를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 유전자 편집된 첫 번째 부모의 지놈은 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 지놈은 서열번호 453을 포함할 수 있다. 다양한 측면에서, 지놈은 서열번호 489를 포함할 수 있다. 다양한 측면에서, 지놈은 서열번호 505를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 상기 방법은 PICTTM Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65 중 하나의 CD163 유전자 편집된 수퇘지, 어린 암퇘지, 또는 암퇘지로 이루어진 군으로부터 선택된 두 번째 부모를 포함할 수 있다. 또한 본 명세서에 의해 제공되고 포함되는 것은 PICTTM Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65 중 어느 하나의 자손을 교배하는 것을 포함할 수 있는 CD163 편집 동물을 제조하는 방법이다.

[0174] 일 측면에서, 본 명세서는 CD163의 적어도 하나의 카피를 가질 수 있는 2, 3, 15 및 65 계통(line)(각각 표 8, 표 9, 표 10, 및 표 14)으로부터의 이형접합 돼지를 제공한다. 유전자가 닉아웃 편집에서 성공적으로 편집되었다. 이 편집된 돼지는 편집으로 인한 눈에 띄는 해로운 영향 없이 건강한 표현형을 나타낼 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 명세서는 건강한 표현형을 갖는 편집된 돼지를 생성하기 위해 본 명세서에 개시된 방법을 사용하여 편집될 수 있는 19, 27 및 62 계통의 돼지(각각 표 11, 표 12 및 표 13)를 제공한다. 이형접합 돼지는 F1 이형접합 돼지를 생산하기 위해 해당 계통의 편집되지 않은 동물과 교배될 수 있다. 한 구현예에서, 2, 3, 15, 및 65 계통의 이형접합 돼지는 2, 3, 15 및 65 계통의 두 번째 이형접합 돼지와 교배될 수 있고, 동형접합 CD163 편집 돼지는 멘델 비율로 생산될 수 있다. 특히, 유전자 편집은 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505를 사용하여 독특하고 식별가능할 수 있고, 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 적어도 90%를 포함하는 유전자 특징(signature)을 공유함으로써, 모든 자손 세대에서 CD163 유전자 편집 지놈의 검출 및 변식을 가능케 한다. 일 측면에서, 유전자 특징은 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 95% 이상을 공유할 수 있다. 또 다른 측면에서, 유전자 특징은 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 97% 이상을 공유한다. 또한 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커의 98% 이상을 공유할 수 있는 유전자 특징이 포함된다. 중요하게는, 표 8 내지 표 14의 유전자형 마커를 사용하여 식별할 수 있는 지놈 영역에 대한 CD163 편집의 연결은 원하는 편집을 갖는 임의의 자손 동물의 제조 및 임의의 수의 자손 세대에서 편집된 영역의 추적을 가능하게 할 수 있다. 본 명세서에 따른 측면에서, 본 명세서의 이형접합 및 동형접합 돼지는 오프-사이트(off-site) 돌연변이가 없을 수 있다.

[0175] 본 명세서는 엘리트 돼지 계통으로부터 얻을 수 있는 배 또는 접합체를 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 배아 또는 접합체는 PICTTM Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65로 이루어진 군으로부터 선택된 엘리트 돼지 계통으로부터 획득될 수 있다. 일 측면에서, 배아 또는 접합체는 냉동 배아 또는 접합

체일 수 있다. 또 다른 측면에서, 배아 또는 접합체는 동결된 배반포(blastocyst)일 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 배아는 발정 동기화된 어린 암태지(gilts)로부터 수집된 시험관 내(*in vitro*) 성숙 난모세포로부터 제조될 수 있다. 시험관 내(*in vitro*)에서 성숙된 난모세포에서 주변 적운 세포(cumulus cells)를 제거하고 세척된 수태지 정자와 함께 배양하고 배양할 수 있다. 인큐베이션 후, 추정 접합체는 CRISPR-Cas 엔도뉴클레아제 및 표 3에 나열된 서열번호 22 내지 271 또는 347 내지 425의 처음 20개 뉴클레오타이드를 포함하는 가이드 RNA 조합을 포함하는 RNP 혼합물로 미세주입될 수 있다. 주입된 배아는 1-4 세포 단계에서 대리 암컷에게 이식될 수 있다. 일 측면에서, RNP 혼합물은 표 6(서열번호 1 내지 13)에 열거된 복구 주형을 추가로 포함할 수 있다. 일 측면에서, 주입된 접합자는 전신 마취 하에 중간 라인 개복술에 의해 발정 동기화된 짝짓지 않은 대리 암컷의 난관에 외과적으로 이식될 수 있다(각 대리자는 40-60개의 주입된 배아를 받는다).

[0176] 본 명세서는 CD163-/-일 수 있는 선택된 엘리트 계통의 유전자 편집 돼지를 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 계통(line)은 PIC™ Line 15, PIC™ Line 17, PIC™ Line 27, PIC™ Line 65, PIC™ Line 14, PIC™ Line 62, PIC337, PIC800, PIC280, PIC327, PIC408, PIC™ 399, PIC410, PIC415, PIC359, PIC380, PIC837, PIC260, PIC265, PIC210, PIC™ Line 2, PIC™ Line 3, PIC™ Line 4, PIC™ Line 5, PIC™ Line 18, PIC™ Line 19, PIC™ Line 92, PIC95, PIC™ CAMBOROUGH®, PIC1070, PIC™ CAMBOROUGH® 40, PIC™ CAMBOROUGH® 22, PIC1050, PIC™ CAMBOROUGH® 29, PIC™ CAMBOROUGH® 48, 또는 PIC™ CAMBOROUGH® x54일 수 있다. 일 측면에서, 계통은 PIC™ Line 2, Line 3, Line 15, Line 19, Line 27, Line 62, 또는 Line 65 및 본 명세서에 기재된 편집된 CD163 유전자를 포함하는 그의 자손으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 유전자 편집된 계통(line) 2, 3, 15, 19, 27, 62, 및 65는 상기 표 8 내지 표 14에 제공된 바와 같은 CD163 지놈 영역을 포함하며, 서로, 미개선 라인 및 기타 엘리트 라인과 쉽게 구별될 수 있다. 유사하게, 표 8 내지 표 14에 제공된 바와 같은 CD163-/- 지놈 영역을 포함하는 2, 3, 15, 19, 27, 62 및 65계통의 자손이 확인될 수 있다. 따라서, 본 명세서는 CD163-/- 지놈 영역을 가질 수 있는 자손 돼지를 제공한다.

[0177] 본 명세서는 본 교시의 편집된 CD163 유전자를 포함하는 하이브리드 돼지 계통을 제공하고 포함한다. 일부 측면에서, 하이브리드 돼지 계통은 편집된 PIC™ 계통을 적어도 하나의 다른 편집된 PIC™ 계통과 교배함으로써 생산될 수 있다. 일부 측면에서, 돼지 계통은 3개 이상의 돼지 계통으로부터 생식질을 도입하기 위해 연속 교배에 의해 생산될 수 있다. 일 측면에서, 계통(line)은 PIC™ Line 15, PIC™ Line 17, PIC™ Line 27, PIC™ Line 65, PIC™ Line 14, PIC™ Line 62, PIC337, PIC800, PIC280, PIC327, PIC408, PIC™ 399, PIC410, PIC415, PIC359, PIC380, PIC837, PIC260, PIC265, PIC210, PIC™ Line 2, PIC™ Line 3, PIC™ Line 4, PIC™ Line 5, PIC™ Line 18, PIC™ Line 19, PIC™ Line 92, PIC95, PIC™ CAMBOROUGH®, PIC1070, PIC™ CAMBOROUGH® 40, PIC™ CAMBOROUGH® 22, PIC1050, PIC™ CAMBOROUGH® 29, PIC™ CAMBOROUGH® 48, 또는 PIC™ CAMBOROUGH® x54일 수 있다.

[0178] 다양한 측면에서, PIC™ Line 65는 상품명 PIC337로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 62는 PIC408이라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서, PIC™ Line 15 및 17을 교배하여 만든 하이브리드 돼지는 상품명 PIC800 또는 PIC280으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 27은 PIC327이라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 65와 PIC™ Line 62를 교배하여 생성된 하이브리드는 PIC399, PIC410 또는 PIC415라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 65와 Pic Line 27을 교배하여 생성된 하이브리드는 PIC359라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서, PIC™ Line 800 돼지(PIC™ Line 15 및 PIC™ Line 17의 하이브리드)에서 PIC™ Line 65 돼지와 교배하여 제조된 하이브리드는 상품명 PIC380 또는 PIC837로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 14는 PIC260이라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 14와 PIC™ Line 65를 교배하여 생성된 하이브리드는 PIC265라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 2와 PIC™ Line 3을 교배하여 만든 하이브리드는 PIC210, PIC™ CAMBOROUGH® 및 PIC1050이라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서, PIC™ Line 3과 PIC™ Line 92의 접종은 PIC95라는 상품명으로 판매된다. 다양한 구성에서 PIC™ Line 19와 PIC™ Line 3을 교배하여 만든 접종은 PIC1070이라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 18과 PIC™ Line 3을 교배하여 만든 하이브리드는 PIC™ CAMBOROUGH® 40이라는 상품명으로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 19와 PIC1050(이 자체가 PIC™ Line 2 및 3의 하이브리드임)을 교배하여 생성된 하이브리드는 상품명 PIC™ CAMBOROUGH® 22로 판매된다. 다양한 측면에서, PIC™ Line 2와 PIC1070(이 자체가 PIC™ Line 19 및 3의 하이브리드임)을 교배하여 생성된 하이브리드는 상품명 PIC™ CAMBOROUGH® 29로 판매된다. 다양한 측면에서 PIC™ Line 18과 PIC1050(이 자체가 PIC™ Line 2 및 3의 하이브리드임)을 교배하여 생성된 하이브리드는 상품명 PIC™ CAMBOROUGH® 48로 판매된다. 다양한 측면에서, PIC™ Line 4와 PIC™ Line 5를 교배하여 생성된 하이브리드는 PIC™ CAMBOROUGH® x54라는 상품명으로 판매된다. 본 교시는 본 교시의 CD163

편집을 포함하는 임의의 상기 계통 또는 하이브리드의 돼지를 제공하고 포함한다.

- [0179] 다양한 측면에서, 본 교시는 서열번호 453, 489, 또는 505에 기재된 편집된 서열을 포함하는 편집된 CD163 유전자를 포함하는 돼지를 포함하고, 여기서 돼지는 PICTM Line 15, PICTM Line 17, PICTM Line 27, PICTM Line 65, PICTM Line 14, PICTM Line 62, PICTM Line 2, PICTM Line 3, PICTM Line 4, PICTM Line 5, PICTM Line 18, PICTM Line 19, PICTM Line 92 또는 이들 계통 중 둘 이상의 하이브리드(hybrid)의 돼지일 수 있다. 다양한 측면에서, 하이브리드 돼지는 PICTM Line 15 및 PICTM Line 17, PICTM Line 65 및 PICTM Line 62, PICTM Line 65 및 PICTM Line 27, PICTM Line 15 및 PICTM Line 17의 직렬 하이브리드(serial hybrid)일 수 있고, 여기서 하이브리드 자손은 PICTM Line 65, PICTM Line 14 및 PICTM Line 65, PICTM Line 2 및 PICTM Line 3, PICTM Line 3 및 PICTM Line 92, PICTM Line 19 및 PICTM Line 3, PICTM Line 18 및 PICTM Line 3, PICTM Line 2 및 PICTM Line 3의 하이브리드 돼지와 PICTM Line 19 돼지간의 직렬 하이브리드, PICTM Line 19 및 PICTM Line 3의 하이브리드 돼지와 PICTM Line 2 돼지간의 직렬 하이브리드, PICTM Line 2 및 PICTM Line 3의 하이브리드 돼지를 PICTM Line 18돼지와 교배한 직렬 하이브리드, 또는 PICTM Line 4 및 PICTM Line 5의 하이브리드에 교배된다.
- [0180] 다양한 측면에서, 편집된 CD163 유전자를 포함하는 하이브리드 계통은 계통 2, 3, 15, 19, 27, 62, 또는 65 중 2개 이상을 교배함으로써 생성될 수 있다. 일부 측면에서, 편집된 CD163 유전자를 포함하는 하이브리드 계통은 CAMBOROUGH® 계통일 수 있다. CAMBOROUGH® 돼지는 Line 2와 Line 3을 교배하여 제조할 수 있는 하이브리드이다. 다양한 측면에서, 하이브리드 계통은 편집된 CD163 유전자를 포함하는 PICTM 837 하이브리드 계통을 포함할 수 있다. PICTM 837 돼지는 PICTM Line 800 돼지와 PICTM Line 65 돼지를 교배하여 제조할 수 있는 하이브리드이다.
- [0181] 본 명세서는 계통(line) 2, 3, 15, 19, 27, 62, 또는 65로부터 수득될 수 있는 하나의 CD163-/- 지놈 영역, 및 계통(line) 2, 3, 15, 19, 27, 62, 또는 65로부터 선택된 상이한 계통으로부터 수득될 수 있는 제2 CD163-/- 지놈 영역을 포함하는 하이브리드 자손 계통을 제공하고 포함한다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자 및 표 10에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자 및 표 14에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 상기 표 9에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자 및 상기 표 10에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 상기 표 9에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자 및 상기 표 14에 따른 지놈 영역에 CD163-/- 대립유전자를 포함할 수 있다.
- [0182] 본 명세서는 서열번호 1 내지 18 및 426 내지 505를 특징으로 하는 CD163 유전자 편집을 포함할 수 있는 하이브리드 동물을 제공하고 포함한다. 일 측면에서, CD163 유전자 편집을 포함하는 하이브리드 동물은 서열번호 2를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, CD163 유전자 편집을 포함하는 하이브리드 동물은 서열번호 426-458에 의해 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, CD163 유전자 편집을 포함하는 하이브리드 동물은 서열번호 453을 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, CD163 유전자 편집을 포함하는 하이브리드 동물은 서열번호 459-504를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, CD163 유전자 편집을 포함하는 하이브리드 동물은 서열번호 489에 의해 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 동물은 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. CAMBOROUGH® 돼지는 Line 2와 Line 3을 교배하여 제조할 수 있는 하이브리드이다.
- [0183] 다양한 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 2를 포함하고 표 10에 따른 지놈 영역에 서열번호 2를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 453을 포함하고 표 10에 따른 지놈 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 489를 포함하고 표 10에 따른 지놈 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 2 및 표 14에 따른 지놈 영역에 서열번호 2를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 453 및 표 14에 따른 지놈 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 489를 포함하고 표 14에 따른 지놈 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지놈 영역에 서열번호 2 및 표 10에 따른 지놈 영역에 서열번호 2를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지놈 영역에 서열번호 453 및 표 10에 따른 지놈 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지놈 영역에 서열번호 489 및 표 10에 따른 지놈 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지놈 영역에 서열번호 2 및 표 10에 따른 지놈 영

역에 서열번호 2를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함하고 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함하고 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 2 및 표 14에 따른 지능 영역에 서열번호 2를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 453 및 표 14에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함하고 표 14에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지능 영역에 서열번호 2 및 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 2를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지능 영역에 서열번호 453 및 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지능 영역에 서열번호 489 및 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 본 명세서에 따른 측면에서, 본 명세서의 이형접합 및 동형접합 돼지는 오프-사이트(off-site) 돌연변이가 없을 수 있다.

[0184] 일 측면에서, 하이브리드 동물은 CAMBOROUGH® 계통의 CD163-/- 하이브리드 동물일 수 있다. CAMBOROUGH® 돼지는 Line 2와 Line 3 사이의 교배에 의해 제조될 수 있는 하이브리드이다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 426 내지 505 및 표 10에 따른 지능 영역에서 서열번호 426-505를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함하고 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 돼지는 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함하고 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 426 내지 505를 포함하고 표 14에 따른 지능 영역에 서열번호 426 내지 505를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함하고 표 14에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 8에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함하고 표 14에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지능 영역에 서열번호 426 내지 505를 포함하고, 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 426 내지 505를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지능 영역에 서열번호 453 및 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 453을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하이브리드 CD163-/- 자손 계통은 표 9에 따른 지능 영역에 서열번호 489 및 표 10에 따른 지능 영역에 서열번호 489를 포함할 수 있다.

[0185] 다양한 측면에서, PIC™ 계통 2, PIC™ 계통 3, PIC™ 계통 15, PIC™ 계통 19, PIC™ 계통 27, PIC™ 계통 62 또는 PIC™ 계통 65의 편집된 돼지는 서열번호 518에 기재된 예측된 아미노산 서열을 포함하는 CD163 유전자를 가질 수 있다. 다양한 측면에서, 편집된 CD163 유전자는 서열번호 505에 기재된 바와 같이 123 bp 결실을 가질 수 있다. 다양한 구성에서 이 결실은 AHRKPRLV의 엑손 7 아미노산 서열을 가질 수 있다-----
-----TVVSLGGAHFGEGSGQIWAEEFQCEGHESLSLCPVAPRPDGTCSHSRVDGVVCS(서열번호 518). 다양한 측면에서, 서열번호 518에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 편집된 CD163 유전자를 갖는 돼지는 2개의 PIC™ 계통 사이의 하이브리드 자손일 수 있다. 다양한 측면에서, 돼지는 서열번호 505에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집된 CD163 엑손 7 서열을 가질 수 있다. 다양한 측면에서, 돼지는 PIC™ Line 2와 PIC™ Line 3 사이의 교배 자손일 수 있다. 본 명세서에 따른 측면에서, 본 명세서의 이형접합 및 동형접합 돼지는 오프-사이트(off-site) 돌연변이가 없을 수 있다.

[0186] 중요하게는, 본 명세서의 CD163 편집 돼지 및 세포는 바람직한 상업적 표현형을 유지한다. 편집된 돼지는 편집으로 인한 눈에 띄는 급성 유해 효과 없이 건강한 표현형을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 2, 3, 15, 19, 27, 62, 및 65 계통의 돼지는 표 15에 제공된 바와 같이 상업적으로 바람직한 표현형을 유지할 수 있다.

[0187] 기존 가축 무리의 건강을 개선하기 위한 방법은 전술한 방법을 사용하여 CD163 유전자 좌를 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 방법은 엔도뉴클레아제 또는 상기 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 22 내지 271 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드 또는 347 내지 425 각각의 처음 20개 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 가이드 폴리뉴클레오타이드를 돼지 세포에 도입하는 단계, 엔도뉴클레아제가 표적 서열 또는 그 근처에서 DNA에 작용하여 표적 부위 또는 그 근처에서 재조합, 상동성 지정 복구(homology-directed repair) 또는 비-상동 말단 연결(non-homologous end joining)을 유도하는 조건 하에 세포를 인큐베이션하는 단계, 상기 표적 서열에서 변형을 갖는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계, 및 동물 세포로부터 동물을 생산하는 단계를 포함한다. 본 명세서의 일 측면에서, 상기 엔도뉴클레아제는 S.

thermophilus 유래의 Cas 단백질과 가이드 RNA의 RNP 복합체일 수 있다. 또 다른 측면에서, 엔도뉴클레아제는 *S. pyogenes* 부터의 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RNP 복합체일 수 있다.

[0188] 일 측면에서, 방법은 서열번호 1 내지 13의 뉴클레오타이드 50 내지 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 복구 가이드를 세포에 제공하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 복구 가이드는 서열번호 1 내지 13의 뉴클레오타이드 50 내지 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 1에서 13의 뉴클레오타이드 1 내지 49 및 101 내지 150과 85% 상동성을 추가로 포함할 수 있다. 일 측면에서, 복구 가이드는 서열번호 1 내지 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 기존 무리의 건강을 개선하기 위한 방법은 상기 논의된 바와 같이 바람직한 상업적 표현형의 유지를 제공한다. 일 측면에서, 바람직한 상업적 표현형은 유사한 유전적 배경을 갖는 비편집 돼지 무리에서 관찰된 표현형의 90% 이상일 수 있다.

[0189] CD163 유전자 편집된 유전자좌는 통상적인 번식 또는 인공 수정을 포함하는 방법에 의해 무리에 도입될 수 있다. 동형접합 동물을 제조하기 위해 서열번호 1 내지 18 또는 426 내지 505의 서열을 포함하는 적어도 하나의 유전자 편집된 CD163 유전자좌를 갖는 부모 사이의 교배가 수행될 수 있고 동형접합 자손(1:4 멘델 비율로 존재)이 선택될 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 부모 및 하나의 유전자 편집된 CD163 유전자좌의 조합은 무리를 개선하는 데 적합할 수 있다. CD163 유전자 편집된 유전자좌를 갖는 동물의 추가 번식은 무리의 모든 동물이 설명된 바와 같이 CD163 유전자 편집된 유전자좌를 포함할 때까지 무리의 건강을 개선할 수 있다. 특히, CD163 유전자 편집 무리로 완전히 교배되기 훨씬 전에 무리의 건강이 상당히 개선될 수 있다. 구체적으로, 상기 논의한 바와 같이, PRRSV 내성 유전자 편집 CD163 암퇘지의 돼지 태아는 PRRSV로부터 스스로 보호된다. 또한, 당업자는 동형접합 CD163 편집 동물의 수가 증가함에 따라 PRRSV 전파에 적합한 돼지 벡터가 감소함(예를 들어, 무리 면역이 발생함)을 알 것이다. 따라서, 본 방법은 무리 면역을 도입함으로써 무리를 개선하는 것을 제공할 수 있다.

[0190] 원하는 편집을 검출하는 한 가지 유용한 방법은 실시간 PCR을 사용하는 것이다. 관심 영역의 측면에 있는 PCR 프라이머 및 관심 영역에 특이적으로 어닐링하는 프로브. 프로브는 형광단(fluorophore)과 소광제(quencher)로 표시된다. PCR 반응에서 프라이머와 프로브는 관심 영역의 상보적 DNA 가닥에 서열 의존적으로 혼성화된다. 프로브가 손상되지 않았기 때문에 형광단과 소광제는 가까이 있고 소광제는 형광단에서 방출되는 형광을 흡수한다. 중합효소는 프라이머에서 확장되어 DNA 합성을 시작한다. 중합효소가 프로브에 도달하면 중합효소의 엑소뉴클레아제 활성이 혼성화된 프로브를 절단한다. 절단의 결과로 형광단은 소광제에서 분리되고 형광을 발한다. 이 형광은 실시간 기기에 의해 감지된다. 이러한 단계는 각 PCR 주기에 대해 반복되며 특정 제품의 검출을 허용한다.

[0191] 본 출원에서, 프라이머 및 프로브의 3가지 개별 세트가 설계되었다. 첫 번째 세트의 프라이머(서열번호 556 및 557)는 서열번호 249 및 프라이머 사이의 편집되지 않은 지놈 DNA에 결합하는 프로브(서열번호 558)를 포함하는 편집되지 않은 지놈 서열의 측면에 위치한다. 두 번째 세트의 프라이머(서열번호 559 및 560)는 서열번호 256을 포함하는 편집되지 않은 지놈 서열의 측면에 위치하며 프로브(서열번호 561)는 프라이머 사이에서 편집되지 않은 지놈에 결합한다. 프라이머의 최종 세트(서열번호 562 및 563)는 서열번호 249와 서열번호 256의 절단 부위 사이의 서열의 절단에 의해 생성된 원하는 Exon 7 결실 편집의 측면에 위치하였다. 프로브(서열번호 564)는 이들 프라이머 사이에서 원하는 편집에 결합하도록 설계되었다. 그런 다음 상업용 실시간 PCR 키트를 사용하여 원하는 편집을 위해 다양한 동물을 조사하였다. IDT의 PRIMETIME®, Applied Biosystems의 TAQMAN®(Roche Molecular Systems, Inc, Pleasanton, CA) 및 Qiagen 및 Bio-Rad의 다양한 키트를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 상용 실시간 PCR 키트가 존재한다. 당업자는 그러한 키트가 동일한 결과를 달성하기 위해 본 교시의 프라이머 및 방법과 함께 사용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0192] 실시예

[0193] 실시예 1

[0194] 이 실시예는 돼지 세포에서 돼지 CD163 유전자 녹아웃의 표적 부위 선택을 예시한다.

[0195] *Streptococcus* Cas9/gRNA RNA-지향 DNA 엔도뉴클레아제를 사용하여 돼지 CD163 유전자(SsCrofa11.1, GenBank accession: GCA_000003025.6)에서 DNA 서열 삽입, 결실 및 이들의 조합을 생성하고, 이에 의해 가이드 RNA 및 단백질 조합이 단일 또는 쌍으로 전달되어 CD163 유전자의 서열 변화가 CD163 메신저 RNA 또는 단백질의 기능, 안정성 또는 발현을 감소시키거나 없애도록 한다. 번역 시작 부위의 120개 뉴클레오타이드 업스트림

(chr5:63300192)부터 CD163 엑손 7(chr5:63323390)의 59개 뉴클레오타이드 다운스트림까지의 CD163 유전자의 서열은 인접한 nGG 또는 nGGnG PAM을 갖는 가이드 RNA 결합 부위에 대해 스크리닝되었고, 이는 각각 *Streptococcus pyogenes* 또는 *Streptococcus thermophilus* CRISPR3(*S. thermophilus* CR3)에서 유래한 Cas9 단백질에 의한 절단에 필요한 서열이며, 이들의 서열은 표 2에 나열된 바와 같이 본 명세서에 제출된 서열 목록에 있다. 편집을 위한 표적 부위에 대한 DNA 서열, CD163 유전자 상의 표적 부위의 위치, 및 편집 활성(실시예 3에 기재된 바와 같이 측정됨)은 표 3에 제공된다. 가이드 RNA 분자는 PAM 서열(*S. pyogenes*의 경우 nGG 및 *S. thermophilus*의 경우 nGGnG) 없이 해당 RNA 뉴클레오타이드가 있는 표적과 동일한 서열을 가졌다. 가이드 폴리뉴클레오타이드 분자는 또한 DNA 염기 또는 DNA와 RNA 염기의 혼합물로 구성될 수 있다. 표적 부위 서열은 서열 번호 22 내지 271 및 347 내지 425로 본 명세서에 제출된 서열 목록에 나열된다. 표시된 표적 부위 서열은 돼지 생식질 전체에 걸쳐 보존되며 DNA 시퀀싱으로 스크리닝된다.

[0196] 실시예 2

[0197] 이 실시예는 돼지 태아 섬유아세포로의 가이드 RNA/Cas9 엔도뉴클레아제의 전달을 위한 뉴클레오펙션(nucleofection)을 예시한다.

[0198] 살아있는 세포에서 DNA 절단 활성을 테스트하여 편집된 돼지 CD163 대립유전자를 생성하기 위해, 표 3에 나열된 서열을 표적화하는 CRISPR-Cas 엔도뉴클레아제 및 가이드 RNA를 돼지 태아 섬유아세포로 뉴클레오펙션시켰다. 돼지 태아 섬유아세포(Porcine fetal fibroblast, PFF) 세포주는 28-35일령의 태아와 3.2 μ g의 Cas9 단백질(*S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*)과 2.2 μ g의 시험관 내(*in vitro*) 전사된 단일 가이드 RNA를 물에서 합하여 총 2.23 μ l의 부피로, Lonza 전기천공기를 사용하여 PFF 세포로 뉴클레오펙션시켰다. 뉴클레오펙션을 준비하기 위해 TrypLE 발현(재조합 트립신)을 사용하여 PFF 세포를 수확하고, 그 위에서 배양 배지를 세포에서 제거하고, 1 X HBSS 또는 DPBS로 세척하고, TrypLE의 존재 하에 38.5°C에서 3-5분 동안 배양하였다. 그런 다음 세포를 완전 배지로 수확하였다. 세포를 원심분리(실온 300 x g에서 5분 동안)를 통해 펠렛화하고, 상청액을 버린 다음, 세포를 10 mL PBS에 재현탁하여 트리판 블루 염색을 사용하여 세포를 계수하는 단일 세포 현탁액을 얻었다.

[0199] 적절한 양의 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고(실온 300 x g에서 5분 동안), 상청액을 버리고, 세포를 7.5 x 10⁶ 세포/mL의 최종 농도로 뉴클레오펙션 완충액 P3에 재현탁시켰다. 20 μ l의 세포 현탁액을 다중 채널 피펫을 사용하여 RNP 혼합물을 포함하는 뉴클레오펙션 플레이트의 각 웰에 첨가한 다음 부드럽게 혼합하여 세포를 재현탁시켰다. RNP/세포 혼합물을 뉴클레오펙션 플레이트로 옮기고, 프로그램 CM138(제조업체에서 제공)로 뉴클레오펙션하였다. 80 μ l의 따뜻한 배아 섬유아세포 배지(Embryonic Fibroblast Medium), EFM(2.77 mM 포도당, 1.99 mM L-글루타민(L-glutamine) 및 0.5 mM 피루브산나트륨(sodium pyruvate)을 함유하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 100 μ M 2-메르캅토에탄올(2-Mercaptoethanol) 보충, 1X Eagle의 최소 필수 배지 비필수 아미노산(Eagle's minimum essential medium non-essential amino acids, MEM NEAA), 100 μ g/mL 페니실린-스트렙토마이신 및 12% Fetal Bovine Serum을 뉴클레오펙션 후 각 웰에 첨가하였다. 현탁액을 피펫팅으로 부드럽게 혼합한 다음, 100 μ l를 38.5°C에서 사전 인큐베이션된 900 μ l의 EFM을 포함하는 12웰 플레이트로 옮겼다. 그런 다음 플레이트를 38.5°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션했다. 뉴클레오펙션 후 48시간에, 지놈 DNA를 형질감염된 대조군 PFF 세포로부터 제조하고, 15 μ l의 QUICKEXTRACT™ DNA 추출 용액(Lucigen, Madison, WI)을 펠렛화된 세포에 첨가한 다음, 37°C에서 10분 동안, 65°C에서 8분 동안, 95°C에서 5분 동안 인큐베이션하여 용해시켰으며, 그 다음에 DNA 시퀀싱에 사용될 때까지 용해물을 4°C에서 유지하였다.

[0200] 실시예 3

[0201] 이 실시예는 돼지 CD163에 대한 가이드 RNA/Cas9 조합의 편집 빈도를 설명한다.

[0202] 뉴클레오타이드 서열 변화는 실시예 2에 기재된 바와 같이 태아 섬유아세포에 가이드 RNA와 복합체화된 Cas9 단백질을 전달함으로써 돼지 CD163 유전자에 도입되었다.

[0203] 가이드 RNA/Cas 엔도뉴클레아제 시스템에 의해 매개되는 돼지 CD163 지놈 표적 부위에서 DNA 이중 가닥 절단을 평가하기 위해, 표적 부위를 둘러싸는 대략 250 bp 지놈 DNA의 영역을 PCR에 의해 증폭시키고, PCR 생성물을 다음으로 편집의 존재에 대한 앰플리콘 딥 시퀀싱(amplicon deep sequencing)에 의해 검사하였다. 3중으로 형질감염시킨 후, 실시예 2에 기재된 바와 같이 PFF 지놈 DNA를 추출하였다. 의도된 표적 부위를 둘러싼 영역은 앰플리콘 특이적 바코드 및 ILLUMINA®(ILLUMINA®, San Diego, CA) 시퀀싱에 필요한 서열을 추가하고 2회의 PCR을 통해 테일드 프라이머를 사용하여 NEB Q5 중합효소로 PCR 증폭하였다. 생성된 PCR 증폭은 ILLUMINA® MISEQ

® Personal Sequencer(ILLUMINA®, San Diego, CA)에서 덤 시퀀싱되었다. 결과 판독은 Cas9 단백질 및 가이드 RNA가 형질감염에서 생략된 대조군 실험과 비교하거나 참조 지놈과 비교하여 예상되는 절단 부위에서 편집의 존재에 대해 조사되었다. 표적 부위, Cas9 단백질, 가이드 RNA 조합에 대한 NHEJ 편집 빈도를 계산하기 위해 편집된 판독의 총 수(대조군 처리 또는 참조 지놈의 DNA 서열과 비교할 때 삽입 또는 결실을 포함하는 앰플리콘 서열)를 바코드 및 정방향 프라이머와 완벽하게 일치하는 적절한 총 판독 수(야생형 + 편집된 판독값)으로 나누었다. 총 판독 수는 샘플당 평균 약 7000이고 NHEJ 활동은 표 3에서 평균(n=3) 편집된 부분으로 표시된다. 표 3에서 나타난 바와 같이, 판독의 0~58.2%에 편집이 포함되었으며 모든 조합의 평균 편집 빈도는 약 16%였다. 이 예는 태아 섬유아세포에서 돼지 CD163 유전자 뉴클레오타이드 서열이 다양한 가이드 RNA와 복합된 *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*의 Cas9 단백질을 형질감염시켜 매개된 이중 가닥 절단의 자극을 통해 편집되었음을 보여준다.

[0204] 실시예 4

[0205] 이 실시예는 DNA 복구 주형을 사용한 프레임내(in-frame) 정지 코돈의 생성을 예시한다.

[0206] Cas9 단백질 및 가이드 RNA와 함께 전달될 때 DNA 복구 주형을 사용하여 돼지 CD163 유전자에 정지 코돈을 도입하였다. 표 6에 개시된 엔도뉴클레아제-가이드 복합체 및 복구 주형을 생성하여 배반포에서 CD163 유전자를 편집하는 데 사용하였다. 염기 결실은 실시예 5의 방법으로 확인하였다.

[0207] 실시예 5

[0208] 이 실시예는 편집된 동물 지놈의 분자적 특성화를 예시한다.

[0209] 본 명세서의 실시예에 따라 지놈이 편집된 동물로부터 조직 샘플을 채취하였다. 꼬리, 귀 노치 또는 혈액 샘플이 적합한 조직 유형이었다. 조직 샘플의 DNA 무결성을 보존하기 위해 조직 샘플을 샘플링 1시간 이내에 -20℃에서 동결하였다.

[0210] 용해 완충액에서 프로테아제 K 분해 후 조직 샘플로부터 DNA를 추출하였다. 특성화는 ILLUMINA® 플랫폼을 사용한 짧은 서열 판독과 Oxford NANOPORE™ 플랫폼(Oxford NANOPORE™ Technologies, Oxford, UK)에서 긴 서열 판독의 두 가지 다른 서열 플랫폼에서 수행되었다.

[0211] 짧은 서열 판독의 경우, 2-단계 PCR을 사용하여 관심 영역을 증폭하고 서열화하였다. 제1 단계는 공급업체-특이적(vendor-specific) 프라이머와 결합된 유전자좌-특이적 프라이머를 사용하여 DNA 샘플에서 관심 유전자좌를 증폭하는 유전자좌-특이적 PCR이었다. 제2 단계는 시퀀싱이 발생할 수 있도록 첫 번째 단계의 앰플리콘에 시퀀싱 인덱스 및 어댑터 서열을 첨부하였다.

[0212] 제1단계 PCR을 위한 유전자좌-특이적 프라이머는 ILLUMINA® 페어드-엔드 시퀀싱 (ILLUMINA® paired-end sequencing) 판독이 증폭된 단편에 걸쳐 있을 수 있도록 <300 bp 영역을 증폭하도록 선택되었다. 결실 또는 자연적으로 발생하는 점 돌연변이가 프라이머가 올바르게 결합하는 것을 방해하는 경우 중복성을 제공하기 위해 다중 앰플리콘이 선호되었다. 앰플리콘에 대한 서열 데이터는 ILLUMINA® 시퀀싱 플랫폼(MISEQ®, ILLUMINA®, San Diego, CA)을 사용하여 생성되었다. 서열 판독은 편집 프로세스의 결과를 특성화하기 위해 분석된다.

[0213] 긴 서열 판독의 경우, 2-단계 PCR을 사용하여 관심 영역을 증폭하고 서열화하였다. 제1단계는 공급업체-특이적(vendor-specific) 어댑터와 결합된 유전자좌-특이적 프라이머를 사용하여 DNA 샘플에서 관심 유전자좌를 증폭하는 유전자좌 특이적 PCR이다. 제2단계 PCR은 1단계 PCR의 앰플리콘에 시퀀싱 인덱스를 부착하여 DNA가 시퀀싱 라이브러리를 준비할 준비가 되도록 하였다. 제2단계 PCR 제품은 공급업체 키트에서 일련의 화학 반응을 거쳐 DNA 말단을 연마하고 모터 단백질이 포함된 어댑터를 결합하여 DNA 가닥-기반 시퀀싱을 위한 기공에 액세스할 수 있다.

[0214] 제1 단계 PCR 범위에 대한 유전자좌-특이적 프라이머는 CD163 유전자의 다른 영역과 길이가 다른 증폭 영역을 증폭하도록 설계되었다. 그런 다음 정규화된 DNA를 공급업체에서 제공한 로딩 버퍼와 혼합하고 NANOPORE™ 플로우 셀에 로딩한다.

[0215] 긴 서열 판독은 짧은 판독보다 염기당 정확도가 낮지만 표적 부위 주변의 서열의 장거리 컨텍스트(context)를 관찰하는 데 매우 유용하다.

[0216] 실시예 6

[0217] 이 실시예는 PRRSv 내성을 부여하는 편집된 CD163 유전자를 갖는 돼지를 제조하는 방법을 예시한다.

- [0218] 돼지 난모세포를 분리하고 수정한 후, 생성된 접합체를 편집하여 유전자 편집된 돼지를 생성하였다.
- [0219] CD163 RNP 복합체를 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*) 수정된 돼지 난세포 접합체의 세포질 내로 미세주사하였다. 그런 다음 이 접합체를 배양하여 편집된 다세포 배아를 생성하고 표준 방법을 통해 유전자 편집된 돼지를 출산하는 대리 어린 암태지(gilts)로 옮겼다. 배아 공여자와 대리모(surrogates)를 준비하기 위해 PIC™ Line 2, Line 3, Line 15, 및 Line 65의 사춘기 어린 암태지(gilts)를 14일 동안 0.22% 알트레노게스트 용액(altrenogest solution)(20-36 mg/동물)으로 처리하여 발정 동기화를 수행하였다. Matrix의 마지막 투여 36시간 후 PMSG 투여에 의해 난포 성장이 유도되었고, PMSG 투여 82시간 후에 hCG 투여에 의해 배란이 유도되었다. 생체 내 수정된 접합체를 생성하기 위해 기립 상태의 암컷을 해당 PIC™ 계통의 수돼지 정액으로 인공 수정(AI)하였다. 생체 내(*in vivo*) 유래 접합체는 0.3% BSA(w/v)가 보충된 멸균 TL-HEPES 배지로 난관을 역행 플러싱하여(by retrograde flushing) AI 후 12-24시간에 외과적으로 회복되었다. 수정된 접합체는 CD163을 표적으로 하는 Cas9 단백질 및 가이드 RNA 복합체(25 - 50 ng/ μ l 및 12.5 - 35 ng/ μ l)의 단일 2 - 50피코리터(pl) 세포질 주입을 받고 PZM5 배지에서 배양되었다 (Yoshioka, K., *et al.*, Biol. Reprod., 2002, 60: 112-119; Suzuki, C., *et al.*, Reprod. Fertil. Dev., 2006 18, 789-795; Yoshioka, K., J. Reprod. Dev. 2008, 54, 208-213). 주입된 접합체는 전신 마취 하에 중간 라인 개복술에 의해 발정 동기화, 찢기지 않은 대리 암컷의 난관에 외과적으로 이식되었다(각 대리모는 20-60개의 주입된 배아를 받았음).
- [0220] 유전자 편집을 위한 시험관 내(*in vitro*) 수정된 배아는 수정되지 않은 PIC™ 난모세포로부터 유래되었다. 발정 동기화 PIC™ 어린 암태지의 미성숙 난모세포를 중간 크기(3-6 mm) 난포에서 수집하였다. 고르게 어두운 세포질과 온전한 주변 적운 세포(cumulus cells)를 가진 난모세포는 성숙을 위해 선택되었다. 난모세포를 둘러싼 적운 복합체는 3.05 mM 포도당, 0.91 mM 피루브산나트륨(sodium pyruvate), 0.57 mM 시스테인, 10 ng/ml EGF, 0.5 μ g/ml 황체형성 호르몬(LH), 0.5 μ g/ml FSH, 10 ng/ml 겐타마이신(Sigma) 및 10% 여포액(follicular fluid)과 함께 500 μ l의 성숙 배지, TCM-199(Invitrogen)을 함유한 웰에서 습한 조건의 38.5℃ 및 5% CO₂에서 42-44시간 동안 놓아두었다. 성숙이 끝나면 0.1% hyaluronidase가 있는 상태에서 3분 동안 불태싱하여 난모세포를 둘러싸고 있는 적운세포(cumulus cell)를 제거하였다. 그 다음, 시험관 내(*in vitro*) 성숙 난모세포를 25-30개의 난모세포 그룹으로 100 μ l 방울의 IVF 배지(113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂, 11 mM 포도당, 20 mM 트리스, 2 mM 카페인, 5 mM 피루브산나트륨 및 2 mg/ml BSA(bovine serum albumin)을 포함하는 변형된 Tris 완충 배지)에 넣고 신선한 확장된 수돼지 정액을 사용하여 확립된 프로토콜에 따라 수정하였다(Abeydeera, Biol. Reprod., 57:729-734, 1997). 확장된 정액 1 ml를 BSA 1 mg/ml를 함유한 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 혼합하여 최종 부피가 10 ml가 되도록 하고 1000 Xg, 25℃에서 4분간 원심분리하고 정자를 DPBS로 3회 세척하였다. 최종 세척 후 정자를 mTBM 배지에 재현탁하고 1 x 10⁵ 정자/ml의 최종 농도로 난모세포에 첨가하고 38.5℃ 및 5% CO₂에서 4-5시간 동안 공동 배양하였다. 수정 접합체를 IVF 후 5시간에 미세주입하고 18-42시간 후에 대리 암컷으로 옮겼다(1-4 세포 단계). 각 대리인은 20-60개의 주입된 배아를 받았다. 임신은 배아 이식 후 28일에 발정으로의 복귀 부족(21일) 및 초음파에 의해 확인되었다.
- [0221] 돼지 배아에서 Cas9-가이드 RNA 표적화된 유전자 편집의 빈도를 확립하기 위해, 주입되지 않은 대조군 접합체 및 시험관 내(*in vitro*) 수정에 의해 생성된 주입된 잉여 접합체를 38.5℃에서 5-7일 동안 PZM3 또는 PZM5 배지에서 배양하였다. 배반포는 배양 후 7일째에 수확되었고 지놈 DNA는 차세대 시퀀싱을 위해 분리되었다.
- [0222] **실시예 7**
- [0223] 이 실시예는 유전자 편집 돼지의 생성 및 특성화를 예시한다.
- [0224] PIC™ 계통 2, 3, 15 및 65의 동물을 실시예 6에 기재된 방법으로 편집하였다. 성공적인 편집은 실시예 5의 방법을 사용하여 확인되었다. 섬유모세포 세포주는 편집된 동물에서 추출한 콜라게나제 처리된 귀 노치 샘플에서 성장되었고 American Type Culture Collection(ATCC®)에 기탁되었다. ATCC®의 주소는 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209이다. CD163 편집 PIC™ Line 2의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125814로 지정되었다. CD163 편집 PIC™ Line 3의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125815로 지정되었다. CD163 편집 PIC™ Line 15의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125816로 지정되었다. CD163 편집 PIC™ Line 65의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC®에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125813로 지정되었다. 각 기탁은 부다페스트 조약에 따라 이루어졌다. 각 계통(line)의 대표적인 동물은 표 16에 명시된 바와 같이 이형 접합체 편집을 갖는 것으로 확인되었다.

표 16

검증된 유전자 편집 동물

계통(Line) 번호	CD163 대립유전자 1	CD163 대립유전자 2	ATCC 기탁번호
2	야생형 서열	결실된 뉴클레오타이드 chr5: 63301999-63302005	PTA-125814
3	야생형 서열	결실된 뉴클레오타이드 chr5: 63301999-63302005	PTA-125815
15	야생형 서열	결실된 뉴클레오타이드 chr5: 63301999-63302005	PTA-125816
65	야생형 서열	결실된 뉴클레오타이드chr5: 63301999-63302005	PTA-125813

표 16의 각 동물은 5번 염색체에서 뉴클레오타이드 63301999-63302005(엑손 2)가 결실된 건강한 표현형을 나타냈다.

ATCC에 기탁된 PICTM 계통 19, 27 및 62의 편집되지 않은 동물의 콜라게나제 처리된 귀 노치 샘플로부터 추가의 세포주를 성장시켰다. PICTM Line 19의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC®에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125811로 지정되었다. PICTM Line 27의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125907로 지정되었다. PICTM Line 62의 대표적인 샘플은 2019년 4월 3일 ATCC에 기탁되었으며 ATCC® 특허 기탁 번호 PTA-125812로 지정되었다. 각 기탁은 부다페스트 조약에 따라 이루어졌다. 통상적인 클로닝 방법을 사용하여, PTA-125811, PTA-125812 및 PTA-125907로 기탁된 세포주로부터 동물을 생성하고 편집된 라인을 생성하기 위해 실시예 6의 방법을 사용하여 편집하였다.

기탁된 PICTM 계통(2, 3, 15, 19, 27, 62, 및 65) 각각에 대해 CD163 유전자 부근의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphisms, SNP) 및 각 계통(line)을 구분할 수 있는 각 계통의 SNP 프로파일이 선택되었다. 계통 특징(line signatures)을 정의하기 위한 시작 데이터세트는 7개의 기탁된 PICTM 계통에서 330마리의 전체 지놈 시퀀싱된 동물의 모음이었다. CD163 유전자를 중심으로 하는 5번 염색체의 6Mb 영역을 특징으로 추출하고, 계통(line)에 대해 함께 특징을 형성하는 비교적 적은 수의 SNP를 식별하기 위해 이 영역의 각 뉴클레오타이드에 대해 계통 내 및 계통 간의 변이를 조사하였다.

주어진 계통의 특징에 포함하기 위한 후보가 되기 위해 다음 기준이 각 염색체 위치에 부과되었다. 서열 적용범위는 계통에 있는 동물의 90%에 대해 존재해야 했고; 상기 내용은 7줄 중 적어도 5줄에 대해 참(true)이어야 한다. 그리고 표적 라인에 데이터가 있는 모든 동물은 동일한 동형 접합 유전자형을 가져야 한다. 각각의 다른 계통에 대해, 이 유전자형에 대한 유전자형 빈도는 해당 계통에 대해 시퀀싱된 모든 동물에 걸쳐 계산되었다. 다른 6개 계통의 최고 및 최저 유전자형 빈도 사이의 차이의 적어도 30%에 대한 차단이 부과되었다(즉, 6개 계통 내에서 유전형 빈도의 확산이 있어야 함).

각 계통을 정의할 수 있는 유전자형의 하위 집합을 선택하기 위해 식별력 및 균일 분포를 위한 메트릭의 조합이 사용되었다. 표 8 내지 표 14는 각 돼지 계통에서 동형접합 대립유전자가 고정된 SNP에 대한 5번의 염색체 상의 위치를 제공한다. 이러한 동형접합 대립 유전자 세트는 각 돼지 계통을 다른 계통과 구별한다. 나열된 유전자형 표 8 내지 표 14에 나타난 바와 같이 각 위치에서 어느 대립유전자가 동형접합인지를 나타낸다.

실시예 8

이 실시예는 야생형 및 유전자 편집된 돼지로부터 분리된 면역 세포의 상이한 수준의 PRRSv 내성을 비교한다.

CD163 표면 발현 분석은 이전 실시예에 기재된 방법에 따라 각각 CD163 유전자에 대한 편집이 있거나 없는 편집 및 야생형 동물로부터 회수된 단핵구 유래 대식세포(Monocyte Derived Macrophage)(MoMØ)에 대해 수행하였다. 테스트된 편집 내용은 표 17에 나와 있다. 4개의 편집은 표시된 대로 다양한 크기의 결실을 포함하고 다섯 번째 편집은 2개의 염기쌍 삽입을 포함하며; 표 15의 모든 편집은 엑손 2에 있다. 모든 결실 또는 삽입은 절단된 CD163 폴리펩타이드를 초래한다. CD163 발현은 마우스 항-돼지 CD163 단일클론 항체인 클론 2A10/11을 사용한 면역형광 표지 및 FACS 분석에 의해 평가되었다. CD163 편집 세포인 MoMØ는 세포 표면 발현 분석에서 명백한 바와 같이 세포 표면에 기능적 에피토프가 부족하였다.

표 17

[0234]

단백질 발현에 대해 테스트된 CD163 유전자 편집

가이드 RNAs 결합 부위의 Chr5 영역 위치	63301997-02016	63301997-02016	63301997-02016	63301997-02016	63301997-02016
서열번호	14	15	16	17	18
가이드 RNA spacer (DNA) SEQ ID NO	42	42	42	42	42
Guide RNA spacer (RNA) 서열번호	288	288	288	288	288
결실의 번역	339	340	341	342	343
염기 결실 또는 삽입의 좌표	chr5:63302012-63302013	chr5:63302009-63302041	chr5:63302012-63302013	chr5:63302005-63302020	chr5:63302011-63302020
결실된 또는 삽입된 염기 (#)	TC (2 bp 결실)	서열번호 344; (33 bp 결실)	TC (2 bp 삽입)	서열번호 345; (16 bp 결실)	서열번호 346; (10 bp 결실)

[0235]

PRRSv 바이러스 감염에 대해 동형접합 편집된 세포에서 CD163에 대한 2개의 염기쌍 결실 편집을 테스트하기 위해, MoMØ를 PRRSv 유형 1 및 유형 2로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 현미경 시야에서 세포를 계수하여 복제하는 PRRSv를 함유하는 세포의 수를 결정하였다. CD163 동형접합 편집된 MoMØ 세포는 PRRSv 유형 1 및 2 모두에 대해 허용되지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0236]

실시예 9

[0237]

이 실시예는 돼지 섬유아세포에서 *S. scrofa* CD163으로부터 엑손 7을 제거하기 위한 2개의 가이드의 사용을 입증한다.

[0238]

성숙한 CD163 폴리펩타이드의 SRCR5를 암호화하는 CD163 엑손 7 DNA 서열을 제거하기 위해, CD163 엑손 7의 450 bp 업스트림 및 59 bp 다운스트림 인트론 영역에 위치한 DNA 서열을 *Streptococcus pyogenes*(NGG) 및 *Streptococcus thermophilus*(NGNG) Cas9 단백질 및 guideRNA 인식 부위에 대해 조사하였다. 48개 부위는 인트론 6의 450 bp 내에서 확인되었고 10개 부위는 인트론 7의 59 bp 영역 내에서 확인되었다. 이 58개 부위가 Cas9 및 가이드RNA에 결합하여 유전자 편집을 지시하는 능력은 돼지 태아 섬유아세포에서 단일 가이드를 사용하여 먼저 테스트되었다. 스페이서 인식 부위에서 높은 빈도의 편집을 생성한 가이드RNA인 이러한 단일 가이드RNA-Cas9 단백질의 하위 집합은 CD163 엑손 7을 제거하는 능력에 대한 가이드 쌍으로 추가 테스트되었다. 가이드는 실시예 2에 기술된 바와 같이 뉴클레오펙션에 의해 돼지 태아 섬유아세포에 도입되었다: 각 가이드를 RNP로 준비한 다음 두 세트의 복합체를 형질감염 전에 총 부피 2.23 μ l로 결합하였다. 가이드 쌍에 대한 편집 빈도는 실시예 3에 기재된 대로 결정되었다. 엔도뉴클레아제 절단 부위가 합쳐져 CD163 엑손 7이 결실되는 NHEJ 매개 복구의 빈도는 하기 표 18에 기재되어 있다.

표 18

[0239]

돼지 태아 섬유아세포에서 CD163 엑손 7 결실에 대해 한 쌍의 가이드 RNA를 사용한 종단 간 복구 빈도

서열번호 (5')	절단 부위 (5')	서열번호 (3')	절단 부위 (3')	결실 크기(bp)	원하는 복구 결과(%)
229	63322816	256	63323377	561	23.3
230	63322814	256	63323377	562	24.7
231	63322826	256	63323377	551	15.3
237	63322861	256	63323377	516	20.7
241	63322891	256	63323377	486	20.0
229	63322816	258	63323378	562	5.3
230	63322814	258	63323378	563	7.0
231	63322826	258	63323378	552	4.3
237	63322861	258	63323378	517	15.7
241	63322891	258	63323378	487	5.7

229	63322816	261	63323373	558	15.0
230	63322814	261	63323373	559	18.0
231	63322826	261	63323373	548	0.0
237	63322861	261	63323373	513	12.0
241	63322891	261	63323373	483	14.0
219	63322697	256	63323377	680	28.0
221	63322709	256	63323377	668	33.7
224	63322747	256	63323377	630	27.0
227	63322786	256	63323377	591	22.7
219	63322697	258	63323378	681	7.7
221	63322709	258	63323378	669	13.0
224	63322747	258	63323378	631	7.3
227	63322786	258	63323378	592	6.3
219	63322697	261	63323373	677	14.5
221	63322709	261	63323373	665	20.7
224	63322747	261	63323373	627	14.7
227	63322786	261	63323373	588	11.3
249	63322963	256	63323377	414	38.0
250	63322973	256	63323377	404	36.7
249	63322963	258	63323378	415	20.3
250	63322973	258	63323378	405	14.7
249	63322963	261	63323373	411	17.7
250	63322973	261	63323373	401	11.7

[0240] 절단 가이드는 원하는 편집에 대해 광범위한 편집 빈도를 가졌다.

[0241] 실시예 10

[0242] 이 실시예는 이중 가이드 RNA를 사용하여 돼지 배반포에서 엑손 7의 절단을 예시한다.

[0243] 돼지 태아 섬유아세포에서 스크리닝된 가이드의 하위 집합을 돼지 배반포에서 CD163 엑손 7을 제거하는 능력에 대해 추가로 시험하였다. 돼지 배아에서 테스트할 가이드의 하위 집합은 돼지 섬유아세포에서 엑손 7 결실을 생성하는 효능과 쌍의 각 가이드에 대한 적은 수의 표적 외(off-target) 편집의 조합을 기반으로 선택되었다(상세 설명 참조). 편집된 돼지 배아는 상기 설명한 대로 생성되었다. 간단히 말해서, 도축장 난소에서 회수된 난모세포를 실시예 6에 기재된 바와 같이 시험관 내(*in vitro*) 수정하였다. sgRNP 용액은 FEMTOJET® 4i 마이크로인젝터(Eppendorf; Hamburg, Germany)의 $\pi=200$ hPa, $t_i=0.25$ 초, $p_c=15$ hPa 설정에서 단일 펄스를 사용하여 수정 후 4-5시간에 추정 접합체의 세포질에 주입되었다. 외경이 1.2 mm이고 내경이 0.94 mm인 유리 모세관 피펫(Sutter Instrument, Navato, CA, USA)을 0.5 μ m 미만의 매우 미세한 지점으로 당겼다. Narishige(Narishige International USA, Amityville, NY) 미세 조작기가 장착된 도립 현미경 (inverted microscope)의 가열 단계에서 3 mg/ml BSA(Proliant)가 보충된 TL-Hepes(ABT360, LLC)에서 미세 주입을 수행하였다. 주입 후, 추정 접합체를 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂의 인큐베이터 환경에서 PZM5(Cosmo Bio, Co LTD, Tokyo, Japan)에서 7일 동안 배양하였다. 배반포의 편집 빈도는 실시예 3에 기재된 바와 같이 결정하였다. CD163 엑손 7의 결실을 초래하는 종단 간 NHEJ 복구의 빈도는 표 19에 기재되어 있다.

표 19

[0244] 돼지 배아에서 CD163 엑손 7 결실에 대한 쌍된 가이드 RNA를 사용한 종단 간 복구 빈도

서열번호 (5')	절단 부위 (5')	서열번호 (3')	절단 부위 (3')	결실 크기 (bp)	원하는 복구 결과 (%)
229	63322816	256	63323377	561	38.0
230	63322814	256	63323377	562	21.0
231	63322826	256	63323377	551	24.0
241	63322891	256	63323377	486	29.0
229	63322816	258	63323378	562	7.0
231	63322826	258	63323378	552	12.0
241	63322891	258	63323378	487	20.0

219	63322697	256	63323377	680	35.0
221	63322709	256	63323377	668	36.0
224	63322747	256	63323377	630	24.0
227	63322786	256	63323377	591	0.0
227	63322786	258	63323378	592	0.0
221	63322709	261	63323373	665	15.0
249	63322963	256	63323377	414	44.0
250	63322973	256	63323377	404	14.0
249	63322963	258	63323378	415	7.0
249	63322963	261	63323373	411	53.0

[0245] 이 실시예는 CD163 엑손 7을 삭제하기 위해 다수의 가이드 쌍을 사용할 수 있지만 효율성은 가이드 쌍과 세포 유형 간에 크게 다를 수 있음을 입증한다.

[0246] 실시예 11

[0247] 이 실시예는 *S. scrofa* CD163의 엑손 7 내로 미성숙 정지 코돈을 도입하기 위한 2개의 가이드의 사용을 입증한다.

[0248] CD163의 엑손 7 내의 가이드는 NHEJ 동안 가이드에 의해 생성된 절단이 함께 결합될 때 프레임내(in-frame) 정지 코돈을 생성하는 능력에 대해 생물정보학 방법에 의해 스크리닝되었다. 생물정보학적 예측을 실시예 2에 기재된 바와 같이 돼지 태아 섬유아세포에서 시험하였다: 가이드는 트랜스펙션 전에 총 2.23 μ l의 부피로 결합되기 전에 별도로 복합화되었다. 편집 빈도는 실시예 3에 기재된 대로 결정되었다. CD163의 엑손 7에 미성숙 정지 코돈의 도입을 초래하는 엔드-투-엔드 NHEJ(end-to-end NHEJ) 복구의 빈도는 표 20에 나와 있다.

표 20

[0249] 돼지 태아 섬유아세포에서 CD163 엑손 7 결실의 정지 코돈 도입을 위한 종단 간 복구 빈도

서열번호 (5')	절단 부위 (5')	서열번호 (3')	절단 부위 (3')	결실 크기 (bp)	원하는 복구 결과 (%)
351	63323023	365	63323103	80	50.5
351	63323023	387	63323235	212	1.0
348	63323027	390	63323236	209	53.5
348	63323027	388	63323236	209	50.0
348	63323027	395	63323284	257	31.0
352	63323035	365	63323103	68	29.0
352	63323035	387	63323235	200	12.5
352	63323035	399	63323283	248	21.0
353	63323038	365	63323103	65	21.0
353	63323038	387	63323235	197	6.0
353	63323038	399	63323283	245	11.0
354	63323039	390	63323236	197	55.5
354	63323039	388	63323236	197	18.0
354	63323039	395	63323284	245	17.0
358	63323056	361	63323077	21	0.0
358	63323056	362	63323087	31	4.0
358	63323056	368	63323124	68	37.0
358	63323056	384	63323203	147	34.0
358	63323056	394	63323272	216	56.0
358	63323056	399	63323283	227	34.0
359	63323057	390	63323236	179	13.0
359	63323057	388	63323236	179	3.0
359	63323057	395	63323284	227	4.0
360	63323058	368	63323124	66	7.5
360	63323058	384	63323203	145	6.0
360	63323058	389	63323237	179	0.0
360	63323058	394	63323272	214	16.5

360	63323058	397	63323285	227	0.0
361	63323077	365	63323103	26	42.0
361	63323077	387	63323235	158	0.0
362	63323087	390	63323236	149	45.0
362	63323087	388	63323236	149	17.5
362	63323087	395	63323284	197	22.5
364	63323089	365	63323103	14	0.0
364	63323089	387	63323235	146	14.5
364	63323089	399	63323283	194	35.5
365	63323103	368	63323124	21	0.0
365	63323103	384	63323203	100	17.0
365	63323103	389	63323237	134	0.0
365	63323103	394	63323272	169	32.5
365	63323103	397	63323285	182	1.0
366	63323118	368	63323124	6	0.0
366	63323118	384	63323203	85	29.0
366	63323118	389	63323237	119	14.0
366	63323118	394	63323272	154	48.5
366	63323118	397	63323285	167	10.0
354	63323039	211	63323163	123	29.0

[0250] 이 실시예는 정지 코돈을 도입하도록 설계된 가이드 쌍이 돼지 섬유아세포에서 매우 다양한 편집 효율을 갖는다는 것을 예시한다.

[0251] **실시예 12**

[0252] 이 예는 돼지 배반포에서 정지 코돈을 도입하는 가이드의 편집 효율성을 예시한다.

[0253] 돼지 태아 섬유아세포에서 스크리닝된 가이드의 하이 집합을 돼지 배아에서 CD163의 엑손 7에 미성숙 정지 코돈을 도입하는 능력에 대해 추가로 시험하였다. 돼지 배아에서 테스트할 가이드의 하위 집합은 돼지 섬유아세포에서 CD163의 엑손 7에 미성숙 정지 코돈을 도입하는 효율과 앞서 설명한 한 쌍의 각 가이드에 대해 관찰된 표적 외(off-target) 부족의 조합을 기반으로 선택되었다. 편집 빈도는 실시예 3에 기재된 대로 결정되었다. CD163의 엑손 7에서 미성숙 정지 코돈의 도입을 초래하는 엔드-투-엔드 NHEJ 복구의 빈도는 하기 표 21에 나와 있다.

표 21

[0254] 돼지 배반포에서 CD163 엑손 7 결실의 종결 코돈 도입을 위한 종단 간 복구 빈도

서열번호 (5')	절단 부위 (5')	서열번호 (3')	절단 부위 (3')	결실 크기 (bp)	원하는 복구 결과 (%)
351	63323023	365	63323103	80	39.6
348	63323027	390	63323236	209	31
348	63323027	388	63323236	209	35.4
354	63323039	390	63323236	197	30.4
358	63323056	394	63323272	216	29.2
362	63323087	390	63323236	149	31
366	63323118	394	63323272	154	33
354	63323039	211	63323163	123	27.4

[0255] 이 실시예는 CD163의 엑손 7에 미성숙 정지 코돈을 도입하는 데 사용될 수 있는 가이드 쌍이 매우 다양한 편집 효율을 갖는다는 것을 입증한다.

[0256] **실시예 13**

[0257] 이 예는 NHEJ 복구에 대한 다양한 복구 결과를 설명한다.

[0258] CD163 엑손 7을 결실시키도록 설계된 가이드RNA의 하위집합을 실시예 9에 기재된 바와 같이 돼지 배반포에서 엑손 7 암호화 및 측면 영역을 결실시키는 능력에 대해 시험하였다. 배반포의 편집 빈도는 실시예 3에 기재된 대

로 결정되었다. 이 예에서, NHEJ-매개 복구의 결과로 생체 내(*in vivo*) 돼지 배반포에서 관찰된 DNA 서열의 하위 집합이 표 7에 5개의 가이드RNA 쌍에 대해 개시된다. 단순한 뉴클레오타이드 결실뿐만 아니라 결실, 삽입, 재배열, 역위 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 보다 복잡한 NHEJ-매개 복구 DNA 서열도 발생하는 것으로 알려져 있다. 이론에 제한되지 않고, 이러한 다양한 복구 결과는 또한 돼지 배반포에서 단일 및 쌍 가이드를 사용하여 DNA의 엔도뉴클레아제 절단의 결과로 발생한다. 표 7은 또한 각 복구 결과와 관련된 관찰된 DNA 서열의 빈도가 가이드RNA 쌍 간에 다양함을 나타낸다. 전부는 아니지만 일부에서는 한 쌍의 가이드 RNA 절단 부위의 종단간 연결(end-to-end joining)과 관련된 DNA 서열의 빈도가 가장 높게 대표되는 복구 결과였다. 일부 가이드RNA 쌍의 경우 단일 우세한 DNA 복구 결과가 있는 반면, 다른 가이드RNA 쌍의 경우 동일한 빈도로 발생하는 DNA 복구 결과가 있었다. 이 5개의 가이드 RNA 쌍에 대해 개시된 대부분의 DNA 복구 결과는 SRCR 5 도메인에 해당하는 CD163 엑손 7 DNA 서열의 결실을 초래했다. 따라서 편집된 돼지의 생성에 사용할 가이드RNA 쌍에 대한 결정은 집단의 여러 대립유전자에 대한 내성에 크게 의존한다.

[0259] 이 실시예는 지놈 DNA를 삭제하기 위해 2개의 인트론 가이드RNA가 사용될 때 발생하는 NHEJ-매개 복구 결과로 DNA 절단이 해결되는 방식뿐만 아니라 이러한 절단 빈도에서도 가이드RNA 쌍 간에 다양함을 입증한다. 편집된 동물의 생성을 위한 단일 또는 이중 가이드RNA의 DNA 복구 결과를 관찰하기 위해 섬유아세포 또는 배아에서 가이드RNA 쌍을 스크리닝하는 것이 유리하다.

[0260] 실시예 14

[0261] 이 실시예는 서열번호 249에 기재된 스페이서 서열의 존재 및/또는 세포에서 원하는 엑손 7 절단 편집의 존재를 확인하기 위한 실시간 PCR 분석을 예시한다.

[0262] 두 세트의 프라이머 및 두 개의 프로브가 이 분석을 위해 설계되었다. 한 세트의 프라이머는 편집되지 않은 지놈에서 서열번호 249에 기재된 스페이서 서열의 측면에 위치하도록 설계되었다. 이들 프라이머의 서열은 서열번호 556 및 557에 기재되어 있다. 서열번호 558이고 HEX 형광 모이어티로 표시된 프로브는 PCR 프라이머 사이의 편집되지 않은 지놈에 어닐링하도록 설계되었다. 서열번호 562 및 563에 기재된 서열을 갖는 다른 프라이머 세트는 원하는 편집 서열의 측면에 있도록 설계되었다. 서열번호 564에 기재된 서열을 갖고 FAM 형광 모이어티로 표시된 프로브는 편집의 연결 영역에 걸쳐 있는 뉴클레오타이드에 어닐링하도록 설계되었다. 대립유전자 상태(야생형, 동형접합 또는 이형접합)가 알려진 돼지의 꼬리 및/또는 귀 샘플에서 추출한 지놈 DNA와 프라이머 세트를 모두 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 5 μ l의 2x PRIMETIME® Master Mix(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)를 0.5 μ l의 각 프라이머(10 μ M), 0.5 μ l의 각 프로브(2.5 μ M) 및 2 μ l의 지놈 DNA와 혼합하였다. PCR은 95°C에서 3분간 초기 변성 후 95°C 15초, 64°C 30초, 72°C 30초의 35주기로 수행되었다. 최종 신장은 72°C에서 2분 동안 수행한 다음 반응을 4°C의 사이클러에서 유지하였다. 형광을 측정하고 도표화한 결과 예상대로 동형접합체는 y축에 가까웠고(FAM 모이어티(moiety) 파장을 나타냄), 이형접합체는 도표 중앙 근처에 그룹화되었으며 야생형 돼지는 X축에 가깝게 그룹화되었다(HEX 모이어티 파장을 나타냄). 따라서, 분석은 서열번호 249에 기재된 스페이서 서열을 기반으로 한 편집을 성공적으로 검출하였다.

[0263] 실시예 15

[0264] 이 실시예는 서열번호 256에 기재된 스페이서 서열의 존재 및/또는 세포에서 원하는 엑손 7 절단 편집의 존재를 확인하기 위한 실시간 PCR 분석을 예시한다.

[0265] 두 세트의 프라이머 및 두 개의 프로브가 이 분석을 위해 설계되었다. 한 세트의 프라이머가 서열번호 256에 기재된 스페이서 서열의 측면에 위치하였다. 이들 프라이머의 서열은 서열번호 559 및 560에 기재되어 있다. 서열번호 561에 기재된 서열을 갖고 HEX 형광 모이어티(moiety)로 표시된 프로브는 스페이서 서열의 편집되지 않은 버전에 어닐링하도록 설계되었다. 프라이머 및 프로브의 다른 세트는 원하는 편집을 표적으로 하도록 설계되었으며 실시예 14(서열번호 562-564)에 개시되어 있다. 실시예 14에 기재된 바와 같이 실시간 PCR을 수행하되, 인스턴트 프라이머 및 프로브를 사용하였다. 형광도를 도표화했고 예상대로 동형접합체는 y축에 가까웠고(FAM 부분을 나타냄), 이형접합체는 도표 중앙 근처에 그룹화되었으며 야생형 돼지는 X축에 가깝게 그룹화되었다(HEX 부분을 나타냄). 따라서, 분석은 서열번호 256에 기재된 스페이서 서열을 기반으로 한 편집을 성공적으로 검출하였다.

[0266] 실시예 16

[0267] 이 실시예는 본 교시의 이전에 공개된 가이드 쌍과 가이드 쌍 사이의 세포에서 CD163 CRISPR-CAS gRNA 활성의 비교를 예시한다.

[0268] 각각의 가이드 쌍을 실시예 2에 기재된 바와 같이 돼지 섬유아세포에서 시험하였다. 각 쌍을 실시예 10에 기재된 바와 같이 돼지 배반포에서 추가로 시험하였다. 결과를 하기 표 22에 나타내었다.

표 22

[0269] 돼지 세포에서의 비교 활성

가이드 쌍 서열번호	출처	% 원하는 복구 섬유아세포	% 원하는 복구 배반포
272 및 273	Burkard 2017	6	20
249 및 256	Present Disclosure	38	44
354 및 211	Whitworth 2014	17	n.d.
362 및 390	Present Disclosure	45	31

[0270] 이들 데이터는 본 개시내용의 가이드가 문헌에 이전에 개시된 가이드에 비해 원하는 편집을 갖는 세포의 백분율에서 적어도 2배의 개선을 제공한다는 것을 예시한다. 따라서, 본 발명의 가이드는 이전에 문헌에 개시된 가이드보다 더 효율적이다.

[0271] 실시예 17

[0272] 이 실시예는 PRRSv 유형 I로 챌린지된 CD163 편집 돼지를 예시한다.

[0273] PIC™ Line 2의 돼지를 실시예 6에 기재된 바와 같이 서열번호 249 및 256에 기재된 가이드로 편집하였다. 실시예 5에 기재된 바와 같이 편집이 확인되었다. 그런 다음 편집된 돼지를 교배하여 편집용 동형접합성 돼지를 생성하였다. 이들 동형접합 편집 돼지에 104 내지 105 비리온(4-5 log TCID₅₀)을 갖는 3 ml의 PRSSv 유형 I(SD13-15)을 접종하였다. 1.5 ml를 21 게이지 바늘로 근육내 투여하였다. 나머지 1.5 ml는 비강내 투여하였다. 혈청 샘플을 0일(그 날 접종 전), 3일, 5일, 10일, 14일 및 21일에 수득하였다. 제조업체 지침에 따라 TETRACORE® EZ-PRRSV MPX 4.0 Master Mix 및 Enzyme with ROX(TETRACORE®, Rockville, MD)를 사용하여 혈청 샘플에서 바이러스의 존재를 결정하기 위한 실시간 PCR. 실시간 PCR EU 조정 카운트는 표 23에 나와 있다. 데이터를 보다 직관적으로 만들기 위해 당업계에 알려진 표준 방법을 사용하여 카운트를 역전시켰고-숫자가 높을수록 더 많은 바이러스가 감지되었음을 나타낸다.

표 23

[0274] 유형 I PRRSv 챌린지에 대한 Realtime PCR EU 조정 카운트

Animal	CD163	Day 0	Day 3	Day 5	Day 10	Day 14	Day 21
2	WT	0	19.8	22.6	20	19.6	18.3
4	WT	0	17	17.7	18.6	16.8	17.5
5	WT	0	18.9	21.5	17.3	14.2	13.6
6	WT	0	15.8	19.7	15.6	14.5	13.4
17	WT	0	17.1	17.8	18.5	18	15.8
18	WT	0	15.8	17.9	17	16.8	15
20	WT	0	17.2	20.3	18.8	17	12.8
3	Edit	0	0	0	0	0	0
7	Edit	0	0	0	0	0	0
14	Edit	0	0	0	0	0	0
19	Edit	0	0	0	0	0	0

[0275] 실험 내내 편집된 동물의 혈청에서 PRRSv가 검출되지 않았다.

[0276] 혈청 샘플은 또한 IDEXX PRRS X3 항체 테스트 키트를 사용하여 ELISA에 적용되었고; 테스트는 공인 수의 진단 연구소에서 수행되었다. 결과는 샘플:양의 비율로 표시된다. 0.40보다 크거나 같은 비율은 양수로 간주된다. 각 샘플에 대한 비율은 표 24에 나와 있다.

표 24

[0277]

유형 I PRRSv 켈린지에 대한 ELISA S/P 결과

Animal	CD163	Day 0	Day 3	Day 5	Day 10	Day 14	Day 21
2	WT	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	1.4
4	WT	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.8
5	WT	0.0	0.0	0.0	0.9	1.3	1.8
6	WT	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.9
17	WT	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	1.1
18	WT	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	1.4
20	WT	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	1.2
3	Edit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	Edit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14	Edit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19	Edit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0278]

편집된 돼지는 어떠한 양의 비율도 갖지 않는다. 대조적으로, 21일까지 모든 야생형 돼지는 양성 비율을 나타낸다. 이것은 편집된 돼지의 혈청에 PRRSv가 순환하지 않는다는 것을 추가로 보여준다.

[0279]

이 실시예는 서열번호 249 및 256의 가이드로 편집된 돼지가 PRRSv 유형 I 바이러스 감염에 내성이 있음을 예시한다.

[0280]

실시예 18

[0281]

이 실시예는 PRRSv 유형 II로 켈린지된 CD163 편집 돼지를 예시한다.

[0282]

PICTM Lines 2 및 3의 돼지를 실시예 6에 기재된 바와 같이 서열 249 및 256에 기재된 가이드로 편집하였다. 실시예 5에 기재된 바와 같이 편집을 확인하였다. 편집된 돼지를 교배하여 편집물에 대해 동형접합성인 돼지를 생성하였다. 그 다음, 이들 동형접합 편집 돼지에 104 내지 105 비리온(4-5 log TCID₅₀)을 갖는 3 ml의 PRRSv 유형 II(NVSL 97-7895)를 접종하였다. 1.5 ml를 21 게이지 바늘로 근육내 투여하였다. 나머지 1.5 ml는 비강내 투여하였다. 혈청 샘플을 0일(그 날 접종 전), 3일, 5일, 10일, 14일 및 21일에 얻었다. 제조업체 지침에 따라 TETRACORE® EZ-PRRSV MPX 4.0 Master Mix 및 Enzyme with ROX를 사용하여 혈청 샘플에서 바이러스의 존재를 확인하기 위한 실시간 PCR. Real Time PCR에 대한 NA 조정 카운트는 표 25에 나와 있다. 숫자는 더 직관적이라도 반전되었고-카운트가 높을수록 더 많은 바이러스가 존재한다.

표 25

[0283]

유형 II PRRSv 켈린지에 대한 Realtime PCR NA 조정된 카운트

Animal	CD163	Day 0	Day 3	Day 5	Day 10	Day 14	Day 21
21	WT	0.0	18.4	22.0	21.9	18.0	16.1
23	WT	0.0	16.4	22.0	21.8	20.0	19.7
25	WT	N/A	17.2	21.2	21.9	19.2	19.8
30	WT	0.0	16.2	17.8	21.4	21.1	17.6
33	WT	0.0	18.5	N/A	21.8	18.5	15.3
35	WT	N/A	17.0	22.9	21.8	20.5	20.9
36	WT	0.0	16.7	21.4	21.9	19.9	17.4
38	WT	0.0	16.0	18.1	20.2	20.9	9.4
24	Edit	N/A	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0
37	Edit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0284]

편집된 돼지는 야생형 돼지에 비해 바이러스 수가 매우 적거나 전혀 없다. 혈청 샘플은 또한 IDEXX PRRS X3 항체 테스트 키트를 사용하여 ELISA에 적용되었다. 테스트는 공인 수의 진단 연구소에서 수행되었다. 결과는 샘플:양의 비율로 표시된다. 0.40보다 크거나 같은 비율은 양수로 간주된다. 각 샘플에 대한 비율은 표 26에 나와 있다.

표 26

[0285] 유형 II PRRSV 켈린지에 대한 ELISA S/P 비율

Animal	Edit	Day 0	Day 3	Day 5	Day 10	Day 14	Day 21
21	WT	0.0	0.0	0.0	1.7	2.0	1.9
23	WT	0.0	0.0	0.0	1.2	1.7	1.9
25	WT	N/A	0.0	0.0	1.2	1.6	1.7
30	WT	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.6
33	WT	0.0	0.0	N/A	0.7	0.6	0.7
35	WT	N/A	0.0	0.0	1.3	1.3	1.4
36	WT	0.0	0.0	0.0	1.2	1.5	1.8
38	WT	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9	1.0
24	Edit	N/A	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
37	Edit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0286] 편집된 돼지는 양성 비율이 없고; 대조적으로, 10일까지 모든 야생형 돼지는 양성 비율을 갖는다. 종합하면, 이 데이터는 편집된 돼지의 혈액에 바이러스가 순환하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0287] 이 실시예는 서열번호 249 및 256으로 편집된 CD163 유전자를 가진 돼지가 PRRSV 유형 II 감염에 내성이 있음을 설명한다.

[0288] 상기 참고문헌 및 출원 각각의 내용은 그 전체가 참고문헌으로 본 명세서에 포함된다. 본 개시내용을 상세히 설명하였지만, 첨부된 특허청구범위에 정의된 교시의 범위를 벗어나지 않고 수정 및 변형이 가능함은 명백할 것이다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENUS PLC

<120> METHODS FOR IMPROVING THE HEALTH OF PORCINE SPECIES BY TARGETED
INACTIVATION OF CD163

<130> PI220027EP

<150> US63/020,128

<151> 2020-05-05

<150> US63/021,370

<151> 2020-05-07

<160> 564

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 1

tttcgcagac tttagaagat gttctgccca ttttaagttcc ttcacttttg ctgtagtcgc 60

tggttctcagt gctgactag ttctcttggt gactactttg acaaatttac ttgtaaccta 120

gcccactgtg acaagaaaca ctgaaaagca 150

<210> 2

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 2

tttcgcagac ttiagaagat gttctgccca ttttaagttcc ttcacttttg ctgtagtcgc 60

tgtttctcagt gcctgactag ttctcttggg gagtactttg acaaatttac ttgtaaccta 120

gcccactgtg acaagaaaca ctgaaaagca 150

<210> 3

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 3

gtggtgaaaa caagtgcctt ggaagagtgg aggtgaaagt gcaggaggag tggggaactg 60

tgtgtaataa tggtgacat ggatgtggc tctgttggtt gtaggcagct gggatgtcca 120

actgctatca aagccactgg atgggctaata 150

<210> 4

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 4

tggtctggac atggatgtgg tctctgttgt ttgtaggcag ctgggatgtc caactgctat 60

caaagccact ggatgaattt tagtgcaggt tctggacgca tttggatgga tcatgtttct 120

tgtcgaggga atgagtcagc tctctgggac 150

<210> 5

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400>

> 5

gtaggcagct gggatgtcca actgctatca aagccactgg atgggctaata tttagtgcag 60

gttctggacg catttgatgg atcatgtttc ttgtcgaggg aatgagtcag ctctctggga 120

ctgcaaacat gatggatggg gaaagcataa 150

<210> 6

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 6

taggcagctg ggatgtccaa ctgctatcaa agccactgga tgggctaatt ttagtgcagg	60
ttctggacgc atttgatgga tcatgtttct tctcgaggga atgagtcagc tctctgggac	120
tgcaaacatg atggatgggg aaagcataac	150

<210> 7

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 7

gtccaactgc tatcaaagcc actggatggg ctaatttttag tgcaggttct ggacgcattt	60
ggatggatca tgtttgaggg aatgagtcag ctctctggga ctgcaaacat gatggatggg	120
gaaagcataa ctgtactcac caacaggatg	150

<210> 8

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 8

ctggacgcat ttgatggat catgtttctt gtcgaggga tgagtcagct ctctgggact	60
gcaaacatga tggatgaaag cataactgtc ctaccaaca ggatgctgga gtaacctgct	120
caggtgaagac atacacaaat aagtcaagcc	150

<210> 9

<211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 9

tggacgcatt tggatggatc atgtttcttg tcgagggaat gagtcagctc tctgggactg	60
caaacatgat ggatgaaagc ataactgtac tcaccaacag gatgctggag taacctgctc	120
aggtaagaca tacacaaata agtcaagcct	150

<210> 10

<211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 10
 ctctagatgg atctgattta gagatgaggc tggatgaatgg aggaaaccgg tgcttaggaa 60

 gaatagaagt caaataagga cggtaggggaa cagtgtgtga tgataacttc aacataaatc 120
 atgcttctgt ggtttgtaaa caacttgaat 150
 <210> 11
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 11
 cttctgtggt ttgtaaacaa cttgaatgtg gaagtgtgtg cagtttctct ggttcagcta 60
 attttgaga aggttgacca atctggtttg atgatcttgt atgcaatgga aatgagtcag 120
 ctctctggaa ctgcaaacat gaaggatggg 150
 <210> 12
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

 <400> 12
 tgatgatctt gtatgcaatg gaaatgagtc agctctctgg aactgcaaac atgaaggatg 60
 gggaaagcac aattgatgct gaggatgctg gagtgatattg cttaagtaag gactgacctg 120
 ggtttgttct gtctccatg agagggcaaa 150
 <210> 13
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 13
 agacacgtgg ggcaccgtct gtgattctga cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg 60
 cagggaacta cagtgactgt ggtttccctc ctggggggag ctacttttg agaaggaagt 120
 ggacagatct gggctgaaga attccagtgt 150

 <210> 14

<211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 14
 agaagatgtt ctgcccattt aagttccttc acttttgctg tagtcgctgt tctcagtgcc 60
 tgcttggtea ctagttcttg gtgagtactt tgacaaattt acttgtaacc tagccactg 120
 tgacaagaaa cactgaaaag caaataattc 150
 <210> 15
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 15
 gactttagaa gatgttctgc ccatttaagi tccttcactt ttgctgtagt cgctgttctc 60
 agtgcctgct tggctacttg taacctagcc cactgtgaca agaaacactg aaaagcaaat 120
 aattctcctg aagtctagat agcatctaaa 150
 <210> 16
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 16
 gaagatgttc tgcccattta agttccttca cttttgctgt agtcgctgtt ctcagtgcct 60
 gcttggtcac tagttctctc ttggtagta ctttgacaaa ttactttgta acctagccca 120
 ctgtgacaag aaacactgaa aagcaaataa 150
 <210> 17
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 17
 ttctgcagac ttiagaagat gttctgcccc ttaagtcc ttacttttg ctgtagtcgc 60
 tgttctcagt gctgcttgg tgagtacttt gacaaattta cttgtaacct agcccactgt 120
 gacaagaaac actgaaaagc aaataattct 150
 <210> 18
 <211> 150

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 18

tagaagatgt tcigccatt taagtccctt cacttttgct gtagtcgctg ttctcagtc	60
ctgcttggtc actaggagta ctttgacaaa ttacttgta acctagcca ctgtgacaag	120
aaacactgaa aagcaaataa ttctcctgaa	150

<210> 19

<211> 82

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<

<400> 19

gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt	60
ggcaccgagt cggctgtttt tt	82

<210> 20

<211> 1380

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 20

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala
 115 120 125
 Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val
 130 135 140
 Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala
 145 150 155 160

 His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn
 165 170 175
 Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp
 195 200 205
 Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu
 210 215 220

 Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly
 225 230 235 240
 Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn
 245 250 255
 Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr
 260 265 270
 Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 275 280 285

 Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser
 290 295 300
 Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala
 305 310 315 320
 Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu
 325 330 335
 Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe
 340 345 350

 Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala

355 360 365
 Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met
 370 375 380
 Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His
 405 410 415

 Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro
 420 425 430
 Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg
 435 440 445
 Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala
 450 455 460
 Trp Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu
 465 470 475 480

 Glu Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met
 485 490 495
 Thr Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His
 500 505 510
 Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val
 515 520 525
 Lys Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu
 530 535 540

 Gln Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val
 545 550 555 560
 Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe
 565 570 575
 Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu
 580 585 590
 Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu
 595 600 605

Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu
 610 615 620
 Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr
 625 630 635 640
 Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg
 645 650 655
 Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg
 660 665 670

 Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly
 675 680 685
 Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr
 690 695 700
 Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser
 705 710 715 720
 Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys
 725 730 735

 Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met
 740 745 750
 Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn
 755 760 765
 Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg
 770 775 780
 Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His
 785 790 795 800

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

850 855 860
 Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met
 865 870 875 880
 Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg
 885 890 895
 Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu
 900 905 910
 Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile
 915 920 925

 Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr
 930 935 940
 Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys
 945 950 955 960
 Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val
 965 970 975
 Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala
 980 985 990

 Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu
 995 1000 1005
 Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile
 1010 1015 1020
 Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe
 1025 1030 1035
 Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu
 1040 1045 1050

 Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly
 1055 1060 1065
 Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr
 1070 1075 1080
 Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys
 1085 1090 1095

Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro		
1100	1105	1110
Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp		
1115	1120	1125
Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser		
1130	1135	1140
Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu		
1145	1150	1155
Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser		
1160	1165	1170
Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr		
1175	1180	1185
Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser		
1190	1195	1200
Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala		
1205	1210	1215
Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr		
1220	1225	1230
Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly		
1235	1240	1245
Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His		
1250	1255	1260
Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser		
1265	1270	1275
Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser		
1280	1285	1290
Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu		
1295	1300	1305
Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala		
1310	1315	1320
Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr		

1325 1330 1335
 Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile
 1340 1345 1350

 Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly
 1355 1360 1365
 Asp Gly Ser Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1370 1375 1380
 <210> 21
 <211> 1400
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophilus
 <400> 21
 Ser Asn Ala Met Thr Lys Pro Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr
 1 5 10 15
 Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Asn Tyr Lys Val Pro Ser

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro Tyr Gln

405 410 415

Ile His Leu Gln Glu Met Arg Ala Ile Leu Asp Lys Gln Ala Lys Phe

420 425 430

Tyr Pro Phe Leu Ala Lys Asn Lys Glu Arg Ile Glu Lys Ile Leu Thr

435 440 445

Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Asp

450 455 460

Phe Ala Trp Ser Ile Arg Lys Arg Asn Glu Lys Ile Thr Pro Trp Asn

465 470 475 480

Phe Glu Asp Val Ile Asp Lys Glu Ser Ser Ala Glu Ala Phe Ile Asn

485 490 495

Arg Met Thr Ser Phe Asp Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Lys Val Leu Pro

500 505 510

Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Thr Phe Asn Val Tyr Asn Glu Leu Thr

515 520 525

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

530 535 540

Ser Lys Gln Lys Lys Asp Ile Val Arg Leu Tyr Phe Lys Asp Lys Arg

545 550 555 560

Lys Val Thr Asp Lys Asp Ile Ile Glu Tyr Leu His Ala Ile Tyr Gly

565 570 575

Tyr Asp Gly Ile Glu Leu Lys Gly Ile Glu Lys Gln Phe Asn Ser Ser

580 585 590

Leu Ser Thr Tyr His Asp Leu Leu Asn Ile Ile Asn Asp Lys Glu Phe

595 600 605

Leu Asp Asp Ser Ser Asn Glu Ala Ile Ile Glu Glu Ile Ile His Thr

610 615 620

Leu Thr Ile Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Lys Gln Arg Leu Ser Lys

625 630 635 640

Phe Glu Asn Ile Phe Asp Lys Ser Val Leu Lys Lys Leu Ser Arg Arg

645 650 655
His Tyr Thr Gly Trp Gly Lys Leu Ser Ala Lys Leu Ile Asn Gly Ile

660 665 670
Arg Asp Glu Lys Ser Gly Asn Thr Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Asp Asp

675 680 685
Gly Ile Ser Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ala Leu

690 695 700
Ser Phe Lys Lys Lys Ile Gln Lys Ala Gln Ile Ile Gly Asp Glu Asp

705 710 715 720
Lys Gly Asn Ile Lys Glu Val Val Lys Ser Leu Pro Gly Ser Pro Ala

725 730 735
Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Ser Ile Lys Ile Val Asp Glu Leu Val

740 745 750
Lys Val Met Gly Gly Arg Lys Pro Glu Ser Ile Val Val Glu Met Ala

755 760 765
Arg Glu Asn Gln Tyr Thr Asn Gln Gly Lys Ser Asn Ser Gln Gln Arg

770 775 780
Leu Lys Arg Leu Glu Lys Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ser Lys Ile Leu

785 790 795 800
Lys Glu Asn Ile Pro Ala Lys Leu Ser Lys Ile Asp Asn Asn Ala Leu

805 810 815
Gln Asn Asp Arg Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Asp Met

820 825 830
Tyr Thr Gly Asp Asp Leu Asp Ile Asp Arg Leu Ser Asn Tyr Asp Ile

835 840 845
Asp His Ile Ile Pro Gln Ala Phe Leu Lys Asp Asn Ser Ile Asp Asn

850 855 860
Lys Val Leu Val Ser Ser Ala Ser Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asp Phe

865 870 875 880
Pro Ser Leu Glu Val Val Lys Lys Arg Lys Thr Phe Trp Tyr Gln Leu

885 890 895

Leu Lys Ser Lys Leu Ile Ser Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys
 900 905 910
 Ala Glu Arg Gly Gly Leu Leu Pro Glu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Gln
 915 920 925
 Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Arg Leu
 930 935 940
 Leu Asp Glu Lys Phe Asn Asn Lys Lys Asp Glu Asn Asn Arg Ala Val
 945 950 955 960
 Arg Thr Val Lys Ile Ile Thr Leu Lys Ser Thr Leu Val Ser Gln Phe
 965 970 975
 Arg Lys Asp Phe Glu Leu Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asp Phe His
 980 985 990
 His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Ile Ala Ser Ala Leu Leu
 995 1000 1005
 Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Pro Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr
 1010 1015 1020
 Pro Lys Tyr Asn Ser Phe Arg Glu Arg Lys Ser Ala Thr Glu Lys
 1025 1030 1035
 Val Tyr Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Ile Phe Lys Lys Ser Ile
 1040 1045 1050
 Ser Leu Ala Asp Gly Arg Val Ile Glu Arg Pro Leu Ile Glu Val
 1055 1060 1065
 Asn Glu Glu Thr Gly Glu Ser Val Trp Asn Lys Glu Ser Asp Leu
 1070 1075 1080
 Ala Thr Val Arg Arg Val Leu Ser Tyr Pro Gln Val Asn Val Val
 1085 1090 1095
 Lys Lys Val Glu Glu Gln Asn His Gly Leu Asp Arg Gly Lys Pro
 1100 1105 1110
 Lys Gly Leu Phe Asn Ala Asn Leu Ser Ser Lys Pro Lys Pro Asn
 1115 1120 1125
 Ser Asn Glu Asn Leu Val Gly Ala Lys Glu Tyr Leu Asp Pro Lys

1130	1135	1140
Lys Tyr Gly Gly Tyr Ala Gly Ile Ser Asn Ser Phe Ala Val Leu		
1145	1150	1155
Val Lys Gly Thr Ile Glu Lys Gly Ala Lys Lys Lys Ile Thr Asn		
1160	1165	1170
Val Leu Glu Phe Gln Gly Ile Ser Ile Leu Asp Arg Ile Asn Tyr		
1175	1180	1185
Arg Lys Asp Lys Leu Asn Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr Lys Asp		
1190	1195	1200
Ile Glu Leu Ile Ile Glu Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu		
1205	1210	1215
Ser Asp Gly Ser Arg Arg Met Leu Ala Ser Ile Leu Ser Thr Asn		
1220	1225	1230
Asn Lys Arg Gly Glu Ile His Lys Gly Asn Gln Ile Phe Leu Ser		
1235	1240	1245
Gln Lys Phe Val Lys Leu Leu Tyr His Ala Lys Arg Ile Ser Asn		
1250	1255	1260
Thr Ile Asn Glu Asn His Arg Lys Tyr Val Glu Asn His Lys Lys		
1265	1270	1275
Glu Phe Glu Glu Leu Phe Tyr Tyr Ile Leu Glu Phe Asn Glu Asn		
1280	1285	1290
Tyr Val Gly Ala Lys Lys Asn Gly Lys Leu Leu Asn Ser Ala Phe		
1295	1300	1305
Gln Ser Trp Gln Asn His Ser Ile Asp Glu Leu Cys Ser Ser Phe		
1310	1315	1320
Ile Gly Pro Thr Gly Ser Glu Arg Lys Gly Leu Phe Glu Leu Thr		
1325	1330	1335
Ser Arg Gly Ser Ala Ala Asp Phe Glu Phe Leu Gly Val Lys Ile		
1340	1345	1350
Pro Arg Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Ser Ser Leu Leu Lys Asp Ala		
1355	1360	1365

Thr Leu Ile His Gln Ser Val Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile
1370 1375 1380

Asp Leu Ala Lys Leu Gly Glu Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg
1385 1390 1395

Lys Val
1400

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 22

gaagcctttc tgtatttttg tgg 23

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 23

atgattttta gaattcttag tgg 23

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 24

tcttagtggt tctcttcttc agg 23

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 25

tcttagtggt tctcttcttc aggag 25

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 26
 ttcttcagga gaacatttct agg 23
 <210> 27
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 27
 tcttcaggag aacatttcta ggg 23
 <210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 28
 ataatacaag aagattttaa tgg 23
 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 29
 atttaaatgg cataaaacct tgg 23

 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 30
 aatggcataa aaccttggaa tgg 23
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 31
 ttctgagttt gtccattcca agg 23
 <210> 32

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 32
 tggaatggac aaactcagaa tgg 23
 <210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 33
 tggaatggac aaactcagaa tgggtg 25

 <210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 34
 atggtgctac atgaaaactc tgg 23
 <210> 35
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 35
 catgaaaact ctggatctgc agg 23
 <210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 36
 aaaagtgaag gaacttaaat ggg 23
 <210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 37

caaaagtga ggaacttaa tgg	23
<210> 38	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 38	
agcgactaca gcaaaagtga agg	23
<210> 39	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 39	
cgctgttctc agtgcctgct tgg	23
<210> 40	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 40	
aagagaacta gtgaccaagc agg	23
<210> 41	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 41	
tgcttggtea ctagttctct tgg	23
<210> 42	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 42	
tgcttggtea ctagttctct tgg	25
<210> 43	
<211> 23	

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 43
 tgttacagga ggaaaagaca agg 23
 <210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 44
 tgttacagga ggaaaagaca aggag 25
 <210> 45
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 45
 gaggaaaaga caaggagctg agg 23

 <210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 46
 agacaaggag ctgaggctaa cgg 23
 <210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 47
 gacaaggagc tgaggctaac ggg 23
 <210> 48
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 48
 gacaaggagc tgaggctaac gggtg 25

<210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 49
 aaggagctga ggctaacggg tgg 23

 <210> 50
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 50
 aaggagctga ggctaacggg tgg 25

 <210> 51
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 51
 ggtggtgaaa acaagtgctc tgg 23

 <210> 52
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 52
 aaacaagtgc tctggaagag tgg 23

 <210> 53
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 53
 aaacaagtgc tctggaagag tgg 25

 <210> 54
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 54
 caagtgtctt ggaagagtgagg 23
 <210> 55
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 55
 caagtgtctt ggaagagtgagg aggtg 25
 <210> 56
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 56
 aagagtgagg gtgaaagtgc agg 23
 <210> 57
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 57
 aagagtgagg gtgaaagtgc aggag 25

 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 58
 agtggaggtg aaagtgcagg agg 23
 <210> 59
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 59
 agtggaggtg aaagtgcagg aggag 25
 <210> 60

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 60
 aggtgaaagt gcaggaggag tgg 23
 <210> 61
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 61
 aggtgaaagt gcaggaggag tgggg 25
 <210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 62
 ggtgaaagtg caggaggagt ggg 23
 <210> 63
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 63
 gtgaaagtgc aggaggagtg ggg 23
 <210> 64
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 64
 tggggaactg tgtgtaataa tgg 23
 <210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 65

gaactgtgtg taataatggc tgg	23
<210> 66	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 66	
aactgtgtgt aataatggct ggg	23
<210> 67	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 67	
gtgtaataat ggctgggaca tgg	23
<210> 68	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 68	
taatggctgg gacatggatg tgg	23
<210> 69	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 69	
atgtggtctc tgttgtttgt agg	23
<210> 70	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 70	
ctctgttgtt tgtaggcagc tgg	23
<210> 71	
<211> 23	

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 71
 tctgttggtt gtaggcagct ggg 23
 <210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 72
 ccagtggctt tgatagcagt tgg 23
 <210> 73
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 73
 ccaactgcta tcaaagccac tgg 23

 <210> 74
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 74
 ctgctatcaa agccactgga tgg 23
 <210> 75
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 75
 tgctatcaaa gccactggat ggg 23
 <210> 76
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 76
 actaaaatta gcccatccag tgg 23

<210> 77
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 77
 ggatgggcta attttagtgc agg 23

<210> 78
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 78
 gctaatttta gtgcaggttc tgg 23

<210> 79
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 79
 gtgcaggttc tggacgcatt tgg 23

<210> 80
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 80
 aggttctgga cgcatttgga tgg 23

<210> 81
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 81
 atggatcatg tttcttgctcg agg 23

<210> 82
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 82
 tggatcatgt ttcttgtcga ggg 23
 <210> 83
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 83
 gagggaatga gtcagctctc tgg 23
 <210> 84
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 84
 aggggaatgag tcagctctct ggg 23
 <210> 85
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 85
 ctctgggact gcaaacaatga tgg 23

 <210> 86
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 86
 gggaactgcaa acatgatgga tgg 23
 <210> 87
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 87
 gggaactgcaa acatgatgga tgggg 25
 <210> 88

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 88
 ggactgcaaa catgatggat ggg 23
 <210> 89
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 89
 gactgcaaac atgatggatg ggg 23

 <210> 90
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 90
 gcataactgt actcaccaac agg 23
 <210> 91
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 91
 tgtactcacc aacaggatgc tgg 23
 <210> 92
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 92
 tgtactcacc aacaggatgc tggag 25
 <210> 93
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 93

aggttactcc agcatcctgt tgg	25
<210> 94	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 94	
aggttactcc agcatcctgt tgg	23
<210> 95	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 95	
gatgctggag taacctgctc agg	23
<210> 96	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 96	
tgtgtatgtc ttacctgagc agg	23
<210> 97	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 97	
atggatctga tttagagatg agg	23
<210> 98	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 98	
atctgattta gagatgaggc tgg	23
<210> 99	
<211> 25	

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 99
 atctgattta gagatgaggc tgggtg 25
 <210> 100
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 100
 ttagagatga ggctgggtgaa tgg 23
 <210> 101
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 101
 ttagagatga ggctgggtgaa tggag 25

 <210> 102
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 102
 gagatgaggc tgggtgaatgg agg 23
 <210> 103
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 103
 ggctgggtgaa tggaggaaac cgg 23
 <210> 104
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 104
 ggctgggtgaa tggaggaaac cgggtg 25

<210> 105

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 105

aatggaggaa accggtgctt agg

23

<210> 106

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 106

cttctattct tcctaagcac cgg

23

<210> 107

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 107

agaatagaag tcaaatttca agg

23

<210> 108

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 108

tagaagtcaa atttcaagga cgg

23

<210> 109

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 109

tagaagtcaa atttcaagga cgggtg

25

<210> 110

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 110
 aagtcaaatt tcaaggacgg tgg 23
 <210> 111
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 111
 aagtcaaatt tcaaggacgg tgggg 25
 <210> 112
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 112

 agtcaaattt caaggacggt ggg 23
 <210> 113
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 113
 gtcaaatttc aaggacggtg ggg 23
 <210> 114
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 114
 caacataaat catgcttctg tgg 23
 <210> 115
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 115
 ggaagtgctg tcagtttctc tgg 23

<210> 116
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 116
 ttctctggtt cagctaattt tgg 23
 <210> 117
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 117
 ttctctggtt cagctaattt tggag 25
 <210> 118
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 118
 ggttcagcta attttggaga agg 23
 <210> 119
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 119
 gctaattttg gagaagggtc tgg 23
 <210> 120
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 120
 gagaagggtc tggaccaatc tgg 23
 <210> 121
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 121	
acaagatcat caaaccagat tgg	23
<210> 122	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 122	
tttgatgac ttgtatgcaa tgg	23
<210> 123	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 123	
atggaaatga gtcagctctc tgg	23
<210> 124	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 124	
ctctggaact gcaaactga agg	23
<210> 125	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 125	
ggaactgcaa acatgaagga tgg	23
<210> 126	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 126	
ggaactgcaa acatgaagga tgggg	25
<210> 127	

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 127
 gaactgcaaa catgaaggat ggg 23
 <210> 128
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 128
 aactgcaaac atgaaggatg ggg 23
 <210> 129
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 129
 gcacaattgt gatcatgctg agg 23
 <210> 130
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 130
 tgtgatcatg ctgaggatgc tgg 23
 <210> 131
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 131
 tgtgatcatg ctgaggatgc tggag 25
 <210> 132
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 132

agcagacctg aaactgagag tgg	23
<210> 133	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 133	
catctaccac tctcagtttc agg	23
<210> 134	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 134	
ctgaaactga gagtggtaga tgg	23
<210> 135	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 135	
ctgaaactga gagtggtaga tggag	25
<210> 136	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 136	
gatggagtca ctgaatgttc agg	23
<210> 137	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 137	
cactgaatgt tcaggaagat tgg	23
<210> 138	
<211> 23	

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 138
 agattggaag tgaaattcca agg 23
 <210> 139
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 139
 agattggaag tgaaattcca aggag 25
 <210> 140
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 140

 aagtgaatt ccaaggagaa tgg 23
 <210> 141
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 141
 aagtgaatt ccaaggagaa tgggg 25
 <210> 142
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 142
 agtgaattc caaggagaat ggg 23
 <210> 143
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 143

gtgaaattcc aaggagaatg ggg	23
<210> 144	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 144	
agattgttcc ccattctcct tgg	23
<210> 145	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 145	
tggggaacaa tctgtgatga tgg	23
<210> 146	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 146	
gaacaatctg tgatgatggc tgg	23
<210> 147	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 147	
aacaatctgt gatgatggct ggg	23
<210> 148	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 148	
ggatagtgat gatgccgctg tgg	23
<210> 149	
<211> 23	

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 149
 cagttgctta catgccacag cgg 23
 <210> 150
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 150
 cgctgtggca tgtaagcaac tgg 23

 <210> 151
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 151
 gctgtggcat gtaagcaact ggg 23
 <210> 152
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 152
 ccaatggcag tgacagcagt tgg 23
 <210> 153
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 153
 ccaactgtg tcaactgcat tgg 23
 <210> 154
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 154

actggcggtta actcgaccaa tgg	23
<210> 155	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 155	
tggtcgagtt aacgccagtg agg	23
<210> 156	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 156	
ggtcgagtt aacgccagtga ggg	23
<210> 157	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 157	
gttaacgcca gtgaggaac tgg	23
<210> 158	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 158	
aatgtgtcca gttccctcac tggcg	25
<210> 159	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 159	
aatgtgtcca gttccctcac tgg	23
<210> 160	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa
 <400> 160
 gtgaggaac tggacacatt tgg 23
 <210> 161
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 161

 ctgacagtg ttcttgcca tgg 23
 <210> 162
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 162
 agagagcaga ctctgtcca tgg 23
 <210> 163
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 163
 atggacacga gtctgtctc tgg 23
 <210> 164
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 164
 ggcagtgtag acaccatgaa tgg 23

 <210> 165
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 165
 ggcagtgtag acaccatgaa tgggg 25

<210> 166
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 166
 gcagtgtaga caccatgaat ggg 23
 <210> 167
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 167
 cagtgtagac accatgaatg ggg 23
 <210> 168
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 168

 aataatgctt tccccattca tgggtg 25
 <210> 169
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 169
 aataatgctt tccccattca tgg 23
 <210> 170
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 170
 tgcaatcata atgaagatgc tgg 23
 <210> 171
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 171	
tgcaatcata atgaagatgc tgggtg	25
<210> 172	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 172	
gatgctggtg tgacatgttc tgg	23
<210> 173	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 173	
ttttgcagat ggatcagatc tgg	23
<210> 174	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 174	
gatctggaac tgagacttaa agg	23
<210> 175	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 175	
gatctggaac tgagacttaa aggtg	25
<210> 176	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 176	
ctggaactga gacttaaagg tgg	23
<210> 177	

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 177
 ctggaactga gacttaaagg tggag 25
 <210> 178
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 178
 gaactgagac ttaaaggtgg agg 23

 <210> 179
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 179
 cagccactgt gctgggacag tgg 23
 <210> 180
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 180
 cagccactgt gctgggacag tggag 25
 <210> 181
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 181
 cctccactgt cccagcacag tgg 23
 <210> 182
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 182

ccactgtgct gggacagtgg agg

23

<210> 183

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 183

ccactgtgct gggacagtgg aggtg

25

<210> 184

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 184

ctgtgctggg acagtggagg tgg

23

<210> 185

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 185

ggaggtggaa attcagaaac tgg

23

<210> 186

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 186

gtggaaattc agaaactggt agg

23

<210> 187

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 187

gaaaagtgtg tgatagaagc tgg

23

<210> 188

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 188
 gaaaagtgtg tgatagaagc tgggg 25
 <210> 189
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 189

 aaaagtgtgt gatagaagct ggg 23
 <210> 190
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 190
 aaagtgtgtg atagaagctg ggg 23
 <210> 191
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 191
 gggactgaaa gaagctgatg tgg 23
 <210> 192
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 192
 aagaagctga tgtggtttgc agg 23

 <210> 193
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 193
 tgatgtggtt tgcaggcagc tgg 23
 <210> 194
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 194
 gatgtggttt gcaggcagct ggg 23
 <210> 195
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 195
 gtttgcaggc agctgggatg tgg 23
 <210> 196
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 196

 tcaagtttat tcctaaacac agg 23
 <210> 197
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 197
 aaaccaaggc aacaaacaca tgg 23
 <210> 198
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 198
 cagccatgtg ttgtttgcct tgg 23
 <210> 199
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 199
 ctgtttgtaa gcagctgtaa tgg 23

<210> 200
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 200
 atggaaatga aacttctctt tgg 23

<210> 201
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 201
 tggaaatgaa acttctcttt ggg 23

<210> 202
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 202
 ctctttggga ctgcaagaat tgg 23

<210> 203
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 203

gggactgcaa gaattggcag tgg 23

<210> 204
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 204

gggactgcaa gaattggcag tgggg	25
<210> 205	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 205	
ggactgcaag aattggcagt ggg	23
<210> 206	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 206	
gactgcaaga attggcagtg ggg	23
<210> 207	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 207	
gactgcaaga attggcagtg gggtg	25
<210> 208	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 208	
tgcaagaatt ggcagtgggg tgg	23
<210> 209	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 209	
cttacctgag caggtaattt tgg	23
<210> 210	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa

<400> 210

ggtcgtgttg aagtacaaca tgg

23

<210> 211

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 211

ggaactacag tgcggcactg tgg

23

<210> 212

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 212

agaggcaatt caatttactt ggg

23

<210> 213

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 213

gagaggcaat tcaatttact tgg

23

<210> 214

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 214

gtttctttta acagactgag agg

23

<210> 215

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 215

ggttaagagt acaatcatca agg

23

<210> 216
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 216
 tgatgattgt actcttaacc tgg 23
 <210> 217
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 217

 cagaaataaa gcagaagaca tgg 23
 <210> 218
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 218
 catgtcttct gctttatttc tgg 23
 <210> 219
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 219
 ctccagatta cagttaaagg agg 23
 <210> 220
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 220
 gtcctccatt tactgtaac tgg 23

 <210> 221
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 221
 gtaaatggag gactgagtat agg 23
 <210> 222
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 222
 taaatggagg actgagtata ggg 23
 <210> 223
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 223
 gggtctaaaaa gtagagagaa tgg 23
 <210> 224
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 224

 gaatggatgc atattatctg tgg 23
 <210> 225
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 225
 tccaatgtga tgaatgaagt agg 23
 <210> 226
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 226
 gcctacttca ttcacacat tgg 23
 <210> 227

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 227
 tgaagtaggc aaataactcaa agg 23

<210> 228
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 228
 aaagcatgct ccaagaatta tgg 23

<210> 229
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 229
 aagcatgctc caagaattat ggg 23

<210> 230
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 230
 cttctggaac ccataattct tgg 23

<210> 231
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 231
 caagaattat gggttccaga agg 23

<210> 232
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 232	
aaagtcccag aattgtctcc agg	23
<210> 233	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 233	
aagtcccaga attgtctcca ggg	23
<210> 234	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 234	
ccttccttg agacaattct ggg	23
<210> 235	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 235	
cccagaattg tctccaggga agg	23
<210> 236	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 236	
tccttcctg gagacaattc tgg	23
<210> 237	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 237	
attgtctcca gggaaggaca ggg	23
<210> 238	
<211> 23	

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 238

gtctccaggg aaggacaggg agg

23

<210> 239

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 239

tagacctccc tgccttccc tgg

23

<210> 240

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 240

aggacaggga ggtctagaat cgg

23

<210> 241

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 241

gaatcggcta agcccactgt agg

23

<210> 242

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 242

ttggtttttc tgcctacagt ggg

23

<210> 243

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 243

cttgggttttt ctgcctacag tgg	23
<210> 244	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 244	
ctgtaggcag aaaaaccaag agg	23
<210> 245	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 245	
gaaaaaccaa gaggcataaa tgg	23
<210> 246	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 246	
gggaagccat tcatgcctct tgg	23
<210> 247	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 247	
agagagtga aagtgagaaa ggg	23
<210> 248	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 248	
cagagagtga aaagtgagaa agg	23
<210> 249	
<211> 23	

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 249
 ctggcttact cctatcatga agg 23
 <210> 250
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 250
 cctatcatga aggaaaatat tgg 23
 <210> 251
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 251
 ccaatatattt ccttcatgat agg 23
 <210> 252
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 252

 aaaaaaatagc atttcggtga ggg 23
 <210> 253
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 253
 gaaaaaatag catttcggtg agg 23
 <210> 254
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 254
 acaaagtga cacattccct ggg 23

<210> 255
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 255
 aacaaagtga acacattccc tgg 23

<210> 256
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 256
 tcccatgccca tgaagagggt agg 23

<210> 257
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 257
 ccctaccctc ttcatggcat ggg 23

<210> 258
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 258
 cccatgcat gaagagggtgta ggg 23

<210> 259
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 259

accctaccct cttcatggca tgg 23
 <210> 260
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 260
 gccatgaaga ggtaggggtt agg 23
 <210> 261
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 261
 acctaaccct accctcttca tgg 23
 <210> 262
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 262
 cagaaataaa gcagaagaca tggag 25
 <210> 263
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 263
 catgtcttct gctttatttc tgggtg 25
 <210> 264
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 264
 tgactccaga ttacagtaaa tggag 25
 <210> 265
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 265
 gtctccatt tactgtaatc tggag 25
 <210> 266

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 266

gcctacttca ttcacacat tggag

25

<210> 267

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 267

cttctggaac ccataattct tggag

25

<210> 268

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 268

attgtctcca gggaaggaca gggag

25

<210> 269

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 269

tagacctccc tgccttccc tggag

25

<210> 270

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 270

ccaatatttt ccttcatgat aggag

25

<210> 271

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 271
 aaaaaatagc atttcggtga gggag 25
 <210> 272
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 272
 gaatcggcta agcccactgt agg 23
 <210> 273
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 273

 cccatgccat gaagagggtg ggg 23
 <210> 274
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 274
 aagagaacta gtgaccaagc 20
 <210> 275
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 275
 tgcttggtea ctagttctct 20
 <210> 276
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 276
 gaactgtgtg taataatggc 20

 <210> 277

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 277
 tgctatcaaa gccactggat 20
 <210> 278
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 278
 gtgcaggttc tggacgcatt 20
 <210> 279
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 279
 gtgcaggttc tggacgcatt 20
 <210> 280
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 280

 atggatcatg tttcttgcg 20
 <210> 281
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 281
 ggactgcaaa catgatggat 20
 <210> 282
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 282

ggactgcaaa catgatggat	20
<210> 283	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 283	
agtcaaattt caaggacggt	20
<210> 284	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 284	
gctaattttg gagaaggttc	20
<210> 285	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 285	
gcacaattgt gatcatgctg	20
<210> 286	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 286	
ggaactacag tgcggcactg	20
<210> 287	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 287	
aagagaacua gugaccaagc	20
<210> 288	
<211> 20	

<212> RNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 288
 ugcugguca cuaguucucu 20
 <210> 289
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 289
 gaacugugug uaauauggc 20
 <210> 290
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 290
 ugcuaucaaa gccacuggau 20

 <210> 291
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 291
 gugcagguuc uggacgcauu 20
 <210> 292
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 292
 gugcagguuc uggacgcauu 20
 <210> 293
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 293
 auggaucaug uuucuugucg 20

<210> 294

<211> 20

<212> RNA

<213> Sus scrofa

<400> 294

ggacugcaaa caugauggau

20

<210> 295

<211> 20

<212> RNA

<213> Sus scrofa

<400> 295

ggacugcaaa caugauggau

20

<210> 296

<211> 20

<212> RNA

<213> Sus scrofa

<400> 296

agucaaaauu caaggacggu

20

<210> 297

<211> 20

<212> RNA

<213> Sus scrofa

<400> 297

gcuaauuuug gagaagguuc

20

<210> 298

<211> 20

<212> RNA

<213> Sus scrofa

<400> 298

gcacaaugu gaucaugcug

20

<210> 299

<211> 20

<212> RNA

<213> Sus scrofa
 <400> 299
 ggaacuacag ugcggcacug 20
 <210> 300
 <211> 157
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 300
 tticgcagac tttagaagat gttctgccca ttttaagtcc ttcacttttg ctgtagtcgc 60
 tgttctcagt gcctgcttgg tcactagttc tcttggtgag tactttgaca aatttacttg 120
 taacctagcc cactgtgaca agaaacactg aaaagca 157
 <210> 301
 <211> 157
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 301
 tticgcagac tttagaagat gttctgccca ttttaagtcc ttcacttttg ctgtagtcgc 60
 tgttctcagt gcctgcttgg tcactagttc tcttggtgag tactttgaca aatttacttg 120
 taacctagcc cactgtgaca agaaacactg aaaagca 157
 <210> 302
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 302
 gtggtgaaaa caagtgtctt ggaagagtgg aggtgaaagt gcaggaggag tggggaactg 60
 tgtgtaataa tggctgggac atggatgtgg tctctgttgt ttgtaggcag ctgggatgtc 120
 caactgctat caaagccact ggatgggcta at 152
 <210> 303
 <211> 154
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 303
 tggctgggac atggatgtgg tctctgttgt ttgtaggcag ctgggatgtc caactgctat 60

caaagccact ggatgggcta attttagtgc aggttctgga cgcatTTGga tggatcatgt 120
 ttcttgcga gggaatgagt cagctctctg ggac 154
 <210> 304
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 304
 gtaggcagct gggatgtcca actgctatca aagccactgg atgggctaata ttagtgcag 60
 gtcttgacg catttgatg gatcatgttt ctgtcgagg gaatgagtca gctctctggg 120
 actgcaaaca tgatggatgg ggaaagcata a 151
 <210> 305
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 305
 gtaggcagct gggatgtcca actgctatca aagccactgg atgggctaata ttagtgcag 60
 gtcttgacg catttgatg gatcatgttt ctgtcgagg gaatgagtca gctctctggg 120
 actgcaaaca tgatggatgg ggaaagcata a 151

<210> 306
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 306
 gtccaactgc tatcaaagcc actggatggg ctaatttttag tgcaggttct ggacgcattt 60
 ggatggatca tgtttcttgt cgagggaatg agtcagctct ctgggactgc aaacatgatg 120
 gatggggaaa gcataactgt actcaccaac aggatg 156
 <210> 307
 <211> 153
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 307
 ctggacgcat ttgatggat catgtttctt gtcagggaat tgagtcagct ctctgggact 60

gcaaacatga tggatgggga aagcataact gtactcacca acaggatgct ggagtaacct 120

gctcaggtaa gacatacaca aataagtcaa gcc 153

<210> 308

<211> 153

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 308

ctggacgcat ttggatggat catgtttctt gtcgaggga tgagtcagct ctctgggact 60

gcaaacatga tggatgggga aagcataact gtactcacca acaggatgct ggagtaacct 120

gctcaggtaa gacatacaca aataagtcaa gcc 153

<210> 309

<211> 153

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 309

ctctagatgg atctgattta gagatgaggc tggatgaatgg aggaaaccgg tgcttaggaa 60

gaatagaagt caaatattcaa ggacgggtggg gaacagtggt tgatgataac ttcaacataa 120

atcatgcttc tgtggtttgt aaacaacttg aat 153

<210> 310

<211> 153

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 310

cttctgtggt ttgtaaaca cttgaatgtg gaagtgtgt cagtttctct ggttcagcta 60

atatttgaga aggttctgga ccaatctggt ttgatgatct tgtatgcaat ggaaatgagt 120

cagctctctg gaactgcaaa catgaaggat ggg 153

<210> 311

<211> 155

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 311

tgatgatctt gtatgcaatg gaaatgagtc agctctctgg aactgcaaac atgaaggatg 60

gggaaagcac aattgcgac atgctgagga tgctggagt atttgcttaa gtaaggactg 120
acctgggttt gttctgttct ccatgagagg gcaaa 155
<210> 312
<211> 154
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 312
agacacgtgg ggcaccgtct gtgattctga cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg 60
cagggaacta cagtgcggca ctgtggtttc cctctgggg ggagctcact ttggagaagg 120
aagtggacag atctgggctg aagaattcca gtgt 154

<210> 313
<211> 28
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 313
Phe Arg Arg Cys Ser Ala His Leu Ser Ser Phe Thr Phe Ala Val Val
1 5 10 15
Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Ser Ser Leu
20 25
<210> 314
<211> 28
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 314
Phe Arg Arg Cys Ser Ala His Leu Ser Ser Phe Thr Phe Ala Val Val
1 5 10 15
Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Ser Ser Leu
20 25
<210> 315
<211> 50
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 315

Gly Glu Asn Lys Cys Ser Gly Arg Val Glu Val Lys Val Gln Glu Glu
 1 5 10 15
 Trp Gly Thr Val Cys Asn Asn Gly Trp Asp Met Asp Val Val Ser Val
 20 25 30
 Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp
 35 40 45

Ala Asn

50

<210> 316

<211> 51

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 316

Gly Trp Asp Met Asp Val Val Ser Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys
 1 5 10 15
 Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser
 20 25 30
 Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala
 35 40 45

Leu Trp Asp

50

<210> 317

<211> 44

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 317

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala
 20 25 30
 Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His
 35 40

<210> 318

<211> 44

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 318

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser

1 5 10 15
Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His

35 40

<210> 319

<211> 51

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 319

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Thr His

35 40 45

Gln Gln Asp

50

<210> 320

<211> 35

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 320

Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala

1 5 10 15

Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Thr His

20 25 30

Gln Gln Asp

35

<210> 321

<211> 35

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 321

Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala

1 5 10 15

Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Thr His

20 25 30

Gln Gln Asp

35

<210> 322

<211> 48

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 322

Gly Ser Asp Leu Glu Met Arg Leu Val Asn Gly Gly Asn Arg Cys Leu

1 5 10 15

Gly Arg Ile Glu Val Lys Phe Gln Gly Arg Trp Gly Thr Val Cys Asp

20 25 30

Asp Asn Phe Asn Ile Asn His Ala Ser Val Val Cys Lys Gln Leu Glu

35 40 45

<210> 323

<211> 50

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 323

Ser Val Val Cys Lys Gln Leu Glu Cys Gly Ser Ala Val Ser Phe Ser

1 5 10 15

Gly Ser Ala Asn Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro Ile Trp Phe Asp Asp

20 25 30

Leu Val Cys Asn Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asn Cys Lys His Glu

35

40

45

Gly Trp

50

<210> 324

<211> 36

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 324

Asp Asp Leu Val Cys Asn Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asn Cys Lys

1

5

10

15

His Glu Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp His Ala Glu Asp Ala Gly

20

25

30

Val Ile Cys Leu

35

<210> 325

<211> 51

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 325

Asp Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Ser Asp Phe Ser Leu Glu Ala Ala

1

5

10

15

Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln Cys Gly Thr Val Val Ser Leu Leu

20

25

30

Gly Gly Ala His Phe Gly Glu Gly Ser Gly Gln Ile Trp Ala Glu Glu

35

40

45

Phe Gln Cys

50

<210> 326

<211> 21

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 326

Phe Arg Arg Cys Ser Ala His Leu Ser Ser Phe Thr Phe Ala Val Val

1 5 10 15

Ala Val Leu Ser Ala

20

<210> 327

<211> 21

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 327

Phe Arg Arg Cys Ser Ala His Leu Ser Ser Phe Thr Phe Ala Val Val

1 5 10 15

Ala Val Leu Ser Ala

20

<210> 328

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 328

Gly Glu Asn Lys Cys Ser Gly Arg Val Glu Val Lys Val Gln Glu Glu

1 5 10 15

Trp Gly Thr Val Cys Asn Asn Gly

20

<210> 329

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 329

Gly Trp Asp Met Asp Val Val Ser Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys

1 5 10 15

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly

20

<210> 330

<211> 19

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 330

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 331

<211> 19

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 331

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 332

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 332

Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val

20

<210> 333

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 333

Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala

1 5 10 15

Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly

20

<210> 334

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 334

Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala

1 5 10 15

Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly

20

<210> 335

<211> 22

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 335

Gly Ser Asp Leu Glu Met Arg Leu Val Asn Gly Gly Asn Arg Cys Leu

1 5 10 15

Gly Arg Ile Glu Val Lys

20

<210> 336

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 336

Ser Val Val Cys Lys Gln Leu Glu Cys Gly Ser Ala Val Ser Phe Ser

1 5 10 15

Gly Ser Ala Asn Phe Gly Glu Gly

20

<210> 337

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 337

Asp Asp Leu Val Cys Asn Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asn Cys Lys

1 5 10 15

His Glu Gly Trp Gly Lys His Asn

20

<210> 338

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 338

Asp Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Ser Asp Phe Ser Leu Glu Ala Ala

1 5 10 15

Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln

20

<210> 339

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 339

Val Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Ser Ser Trp Arg Lys Arg

1 5 10 15

Gln Gly Ala Glu Ala Asn Gly Trp

20

<210> 340

<211> 20

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 340

Val Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Cys Asn Leu Ala His Cys

1 5 10 15

Asp Lys Lys His

20

<210> 341

<211> 20

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 341

Val Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Ser Ser Leu Leu Glu Glu

1 5 10 15

Lys Thr Arg Ser

20

<210> 342

<211> 14

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 342

Val Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Glu Glu Lys Thr Arg Ser

1 5 10

<210> 343

<211> 20

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 343

Val Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Arg Ser Thr Leu Thr Asn

1 5 10 15

Leu Leu Val Thr

20

<210> 344

<211> 33

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 344

agttctcttg gtgagtactt tgacaaattt act

33

<210> 345

<211> 16

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 345

cactagtcttct cttggt	16
<210> 346	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 346	
ttctcttgggt	10
<210> 347	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 347	
atgctatattt ttcagcccac agg	23
<210> 348	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 348	
tttcagccca caggaaaccc agg	23
<210> 349	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 349	
agcccacagg aaaccaggc tgg	23
<210> 350	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 350	
aaccagcctg ggtttcctgt ggg	23
<210> 351	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa
 <400> 351
 caaccagcct gggtttcctg tgg 23

 <210> 352
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 352
 cacaggaaac ccaggctggt tgg 23
 <210> 353
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 353
 aggaaaccca ggctggttgg agg 23
 <210> 354
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 354
 ggaaaccag gctggttga ggg 23
 <210> 355
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 355

 gaaaccagg ctggttgag ggg 23
 <210> 356
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 356
 atgtccctc caaccagcct ggg 23

<210> 357
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 357
 aatgtcccct ccaaccagcc tgg 23
 <210> 358
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 358
 ggaggggaca ttccctgctc tgg 23
 <210> 359
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 359
 acttcaacac gaccagagca ggg 23
 <210> 360
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 360
 tacttcaaca cgaccagagc agg 23
 <210> 361
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 361
 ggtcgtgttg aagtacaaca tgg 23
 <210> 362
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 362

aagtacaaca tggagacacg tgg 23

<210> 363

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 363

agtacaacat ggagacacgt ggg 23

<210> 364

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 364

gtacaacatg gagacacgtg ggg 23

<210> 365

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 365

agagaagtca gaatcacaga cgg 23

<210> 366

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 366

ctgtgattct gacttctctc tgg 23

<210> 367

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 367

tgattctgac ttctctctgg agg 23

<210> 368

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 368
 ttctgacttc tctctggagg cgg 23
 <210> 369
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 369

 aggcggccag cgtgctgtgc agg 23
 <210> 370
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 370
 ggcgccagc gtgctgtgca ggg 23
 <210> 371
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 371
 tagttcctg cacagcagc tgg 23
 <210> 372
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 372
 ctgtgcaggg aactacagtg cgg 23

 <210> 373
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 373
ggaactacag tgcggcactg tgg 23
<210> 374
<211> 23
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 374
cggcactgtg gttccctcc tgg 23
<210> 375
<211> 23
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 375
ggcactgtgg tttccctcct ggg 23
<210> 376
<211> 23
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 376
gcactgtggt ttccctcctg ggg 23
<210> 377
<211> 23
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 377
cactgtggtt tcctcctgg ggg 23
<210> 378
<211> 23
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 378
actgtggttt ccctcctggg ggg 23
<210> 379
<211> 23

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 379
 aaagtgagct ccccccagga ggg 23

<210> 380
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 380
 caaagtgagc tccccccagg agg 23

<210> 381
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 381
 ctctctggggg gagctcactt tgg 23

<210> 382
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 382
 ctccaaagtg agctcccccc agg 23

<210> 383
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 383

ggggggagctc actttggaga agg 23

<210> 384
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 384

gctcactttg gagaaggaag tgg	23
<210> 385	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 385	
gagaaggaag tggacagatc tgg	23
<210> 386	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 386	
agaaggaagt ggacagatct ggg	23
<210> 387	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 387	
ggctgaagaa ttccagtgtg agg	23
<210> 388	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 388	
gctgaagaat tccagtgtga ggg	23
<210> 389	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 389	
ctgaagaatt ccagtgtgag ggg	23
<210> 390	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa

<400> 390

gggactcgtg ccctcacac tgg

23

<210> 391

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 391

tactgggcag agtgaaagg ggg

23

<210> 392

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 392

ctactgggca gaggtaaagg tgg

23

<210> 393

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 393

gtgctactgg gcagagtga agg

23

<210> 394

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 394

cgtcaggcgg ggggtgctact ggg

23

<210> 395

<211> 23

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 395

ccagtagcac cccgccctga cgg

23

<210> 396
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 396
 ccgtcagggc ggggtgctac tgg 23
 <210> 397
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 397

 cagtagcacc ccgccctgac ggg 23
 <210> 398
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 398
 ctacatgtcc cgtcagggcg ggg 23
 <210> 399
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 399
 gctacatgtc ccgtcagggc ggg 23
 <210> 400
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 400
 ggctacatgt cccgtcaggg cgg 23

 <210> 401
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 401
 tgttggtaca tgtcccgta ggg 23
 <210> 402
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 402
 ctgtggctac atgtccgta agg 23
 <210> 403
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 403
 acgggacatg tagccacagc agg 23
 <210> 404
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 404

 cgggacatgt agccacagca ggg 23
 <210> 405
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 405
 tgtagccaca gcaggacgt cgg 23
 <210> 406
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 406
 ctacgccgac gtcctgctg tgg 23
 <210> 407

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 407
 cacaggaaac ccaggctggt tggag 25

<210> 408
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 408
 aggaaaccca ggctggttgg agggg 25

<210> 409
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 409
 ggtcgtgttg aagtacaaca tggag 25

<210> 410
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 410
 aagtacaaca tggagacacg tgggg 25

<210> 411
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 411
 agagaagtca gaatcacaga cggtg 25

<210> 412
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 412
ctgtgattct gacttctctc tggag 25

<210> 413
<211> 25
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 413
tgattctgac ttctctctgg aggcg 25

<210> 414
<211> 25
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 414
cggcactgtg gttccctcc tgggg 25

<210> 415
<211> 25
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 415
ggcactgtgg ttccctcct ggggg 25

<210> 416
<211> 25
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 416
gcactgtggt ttccctcctg ggggg 25

<210> 417
<211> 25
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 417
actgtggttt ccctcctggg gggag 25

<210> 418
<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 418

ctcctggggg gagctcactt tggag

25

<210> 419

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 419

ctccaaagtg agctcccccc aggag

25

<210> 420

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 420

ggctgaagaa ttccagtgtg agggg

25

<210> 421

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 421

gtgctactgg gcagagtgaag aggtg

25

<210> 422

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 422

ctacatgtcc cgtcaggcg gggtg

25

<210> 423

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 423

ggctacatgt cccgtcaggg cgggg 25

<210> 424

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 424

tgtggctaca tgtcccgtca gggcg 25

<210> 425

<211> 25

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 425

tgtagccaca gcagggacgt cggcg 25

<210> 426

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 426

gaatgaagta ggcaaatact caaaggaaag agaaagcatg ctccaagaat ggtagggtta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 427

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 427

atgaatgaag taggcaaata ctcaaaggaa agagaaagca tgctccaaga ggtagggtta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 428

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 428

ggcaaatact caaaggaaag agaaagcatg ctccaagaat tatgggttcc ggtagggtta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 429

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 429

agaattatgg gticcagaag gcaaagtcac agaattgtct ccagggaagg gtaggggta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 430

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400>

> 430

agaattgtct ccagggaagg acaggagggt ctagaatcgg ctaagccac gtaggggta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 431

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 431

gaatgaagta ggcaaatact caaaggaaag agaaagcatg ctccaagaat gtaggggtag 60

gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttccag 100

<210> 432

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 432

atgaatgaag taggcaaata ctcaaaggaa agagaaagca tgctccaaga gtaggggtag 60

gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttccag 100

<210> 433

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 433
 ggcaaatact caaaggaaag agaaagcatg ctccaagaat tatgggttcc gtagggtag 60
 gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcag 100

<210> 434
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 434
 agaattatgg gttccagaag gcaaagtcct agaattgtct ccagggaagg gtagggtag 60
 gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcag 100

<210> 435
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 435
 agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagccac gtagggtag 60
 gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcag 100

<210> 436
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 436
 gaatgaagta ggcaaatact caaaggaaag agaaagcatg ctccaagaat agaggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100

<210> 437
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400>
 > 437
 atgaatgaag taggcaaata ctcaaaggaa agagaaagca tgctccaaga agaggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100

<210> 438
 <211> 100

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 438
 ggcaaatact caaaggaaag agaaagcatg ctccaagaat tatgggttcc agagggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100
 <210> 439
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 439
 agaattatgg gttccagaag gcaaagtcct agaattgtct ccagggaagg agagggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100
 <210> 440
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 440
 agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagccac agagggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100
 <210> 441
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 441
 atgtctctg ctttatttct ggtgtgcctt tgactccaga ttacagtaa gtaggggtta 60
 ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100
 <210> 442
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 442
 ttatttctgg tgtgcctttg actccagatt acagtaaag gaggactgag gtaggggtta 60
 ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 443

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 443

tggaggactg agtatagggc taaaaagtag agagaatgga tgcatattat ggtagggtta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 444

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400>

> 444

atgcatatta tctgtggctc ccaatgtgat gaatgaagta ggcaaatact ggtagggtta 60

ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100

<210> 445

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 445

atgtcttctg ctttatttct ggtgtgcctt tgactccaga ttacagtaaa gtagggttag 60

gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttccag 100

<210> 446

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 446

ttatttctgg tgtgcctttg actccagatt acagtaaag gaggactgag gtagggttag 60

gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttccag 100

<210> 447

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 447

tggaggactg agtatagggc taaaaagtag agagaatgga tgcatattat gtagggtag	60
gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcag	100
<210> 448	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 448	
atgcatatta tctgtggctt ccaatgtgat gaatgaagta ggcaataact gtagggtag	60
gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcag	100
<210> 449	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 449	
atgtctctg ctttatttct ggtgtgcctt tgactccaga ttacagtaa agaggtagg	60
gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctct	100
<210> 450	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 450	
ttatttctgg tgtgcctttg actccagatt acagtaaatg gaggactgag agaggtagg	60
gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctct	100
<210> 451	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400>	
> 451	
tggaggactg agtatagggc taaaaagtag agagaatgga tgcatattat agaggtagg	60
gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctct	100
<210> 452	
<211> 100	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa
 <400> 452
 atgcatatta tctgtggtct ccaatgtgat gaatgaagta ggcaataact agagggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100
 <210> 453
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 453
 catgaatggc ttccctttct cacttttcac tctctggctt actcctatca gtagggtta 60
 gtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100
 <210> 454
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 454
 ttccctttct cacttttcac tctctggctt actcctatca tgaaggaaaa gtagggtta 60
 gtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca 100
 <210> 455
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 455
 catgaatggc ttccctttct cacttttcac tctctggctt actcctatca gtagggttag 60
 gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctcttccag 100
 <210> 456
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 456
 ttccctttct cacttttcac tctctggctt actcctatca tgaaggaaaa gtagggttag 60
 gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctcttccag 100
 <210> 457

<211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 457
 catgaatggc ttccctttct cacttttcac tctctggcctt actcctatca agagggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100
 <210> 458
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 > 458
 ttccctttct cacttttcac tctctggcctt actcctatca tgaaggaaaa agagggtagg 60
 gttaggtagt cacagacatc tttttaagc cctgtctcct 100
 <210> 459
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 459
 tattggaatc atattctccc tcaccgaaat gctatTTTTT cagccacag gtgattctga 60
 cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg cagggaacta 100
 <210> 460
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 460
 tattggaatc atattctccc tcaccgaaat gctatTTTTT cagccacag gtgaggggca 60
 cgagtccac ctttactct gccagtagc accccgcct 100
 <210> 461
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 461
 ggaatcatat tctccctcac cgaaatgcta tttttcagc ccacaggaaa tgaggggcac 60

gagtcccacc tticactctg cccagtagca cccgcacctg 100

<210> 462

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 462

ggaatcatat tctccctcac cgaaatgcta ttttttcagc ccacaggaaa tgaggggcac 60

gagtcccacc tticactctg cccagtagca cccgcacctg 100

<210> 463

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 463

ggaatcatat tctccctcac cgaaatgcta ttttttcagc ccacaggaaa tgacgggaca 60

tgtagccaca gcagggacgt cggcgtagtc tgc tcaagtg 100

<210> 464

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 464

attctccctc accgaaatgc tattttttca gcccacagga aaccaggct gtgattctga 60

cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg cagggaacta 100

<210> 465

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400>

> 465

attctccctc accgaaatgc tattttttca gcccacagga aaccaggct gtgaggggca 60

cgagtccac ctttactct gcccagtagc acccgcctt 100

<210> 466

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 466
attctccctc accgaaatgc tattttttca gccacagga aaccaggct ctgacgggac 60
atgtagccac agcagggacg tcggcgtagt ctgctcaagt 100
<210> 467
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 467
ctccctcacc gaaatgctat tttttcagcc cacaggaac ccaggctggt gtgattctga 60
cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg cagggaacta 100
<210> 468
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 468
ctccctcacc gaaatgctat tttttcagcc cacaggaac ccaggctggt gtgaggggca 60
cgagtccac ctttcaactct gccagtagc acccgcctt 100
<210> 469
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 469
ctccctcacc gaaatgctat tttttcagcc cacaggaac ccaggctggt ctgacgggac 60
atgtagccac agcagggacg tcggcgtagt ctgctcaagt 100
<210> 470
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 470
tcctcaccg aaatgctatt ttttcagccc acaggaacc caggctggtt tgaggggcac 60
gagtcaccac tttcaactctg cccagtagca cccgccttg 100
<210> 471
<211> 100

<212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 471
 tccttcaccg aaatgctatt ttttcagccc acaggaaacc caggctggtt tgaggggcac 60
 gagtccacc tttcactctg ccagtagca cccgcctg 100
 <210> 472
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 > 472
 tccttcaccg aaatgctatt ttttcagccc acaggaaacc caggctggtt tgacgggaca 60
 ttagccaca gcagggacgt cggcgtagtc tgcacaagt 100
 <210> 473
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 473
 attttttcag cccacaggaa acccaggctg gttggagggg acattccctg acatggagac 60
 acgtggggca cgtctgtga ttctgacttc tctctggagg 100
 <210> 474
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 474
 attttttcag cccacaggaa acccaggctg gttggagggg acattccctg acgtggggca 60
 cgtctgtga ttctgacttc tctctggagg cggccagcgt 100
 <210> 475
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 475
 attttttcag cccacaggaa acccaggctg gttggagggg acattccctg aggcggccag 60
 cgtgctgtgc agggaactac agtgcggcac tgtgtttcc 100

<210> 476
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 476
 attttttcag cccacaggaa acccaggctg gttggagggg acattccctg aagtggacag 60
 atctgggctg aagaattcca gtgtgagggg cacgagtcce 100

 <210> 477
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 477
 attttttcag cccacaggaa acccaggctg gttggagggg acattccctg agcaccgccg 60
 cctgacggga catgtagcca cagcaggac gtcggcgtag 100

 <210> 478
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 478
 attttttcag cccacaggaa acccaggctg gttggagggg acattccctg ctgacgggac 60
 atgtagccac agcaggacg tcggcgtagt ctgctcaagt 100

 <210> 479
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 > 479
 ttttttcagc ccacaggaaa cccaggctgg ttggagggga cattccctgc tgaggggcac 60
 gagtcccacc ttctactctg cccagtagca cccgcacctg 100

 <210> 480
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 480

ttttttcagc ccacaggaaa ccaggtctgg ttggagggga cattccctgc tgaggggcac	60
gagtcaccacc ttctactctg ccagtagca cccgccttg	100
<210> 481	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 481	
ttttttcagc ccacaggaaa ccaggtctgg ttggagggga cattccctgc tgacgggaca	60
tgtagccaca gcaggacgt cggcgtatgc tgctcaagtg	100
<210> 482	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 482	
tttttcagcc cacaggaaac ccaggtctgt ttgaggggac attccctgct aggcggccag	60
cgtgctgtgc aggaactac agtcgggcac tgtggtttcc	100
<210> 483	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 483	
tttttcagcc cacaggaaac ccaggtctgt ttgaggggac attccctgct aagtggacag	60
atctgggctg aagaattcca gtgtgagggg cacgagtcce	100
<210> 484	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 484	
tttttcagcc cacaggaaac ccaggtctgt ttgaggggac attccctgct gaggggcacg	60
agtccacct ttactctgc ccagtagcac cccgcctga	100
<210> 485	
<211> 100	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa
 <400> 485
 tttttcagcc cacaggaaac ccaggctggt tggaggggac attccctgct agcaccgccg 60
 cctgacggga catgtagcca cagcaggggac gtcggcgtag 100
 <210> 486
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 > 486
 tttttcagcc cacaggaaac ccaggctggt tggaggggac attccctgct gacgggacat 60
 gtagccacag caggggacgtc ggcgtagtct gctcaagtga 100
 <210> 487
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 487
 cccaggctgg ttggagggga cattccctgc tctggtcgtg ttgaagtaca gtgattctga 60
 cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg cagggaacta 100
 <210> 488
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 488
 cccaggctgg ttggagggga cattccctgc tctggtcgtg ttgaagtaca gtgaggggca 60
 cgagtccac ctttcaactct gccagtagc accccgccct 100
 <210> 489
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 489
 ttggagggga cattccctgc tctggtcgtg ttgaagtaca acatggagac tgagggggcac 60
 gagtccacc tttcactctg cccagtagca ccccgccctg 100
 <210> 490

<211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 490
 ttggagggga cattccctgc tctggctgtg ttgaagtaca acatggagac tgaggggcac 60
 gagtccacc ttctactctg cccagtagca ccccgccctg 100

<210> 491
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 491
 ttggagggga cattccctgc tctggctgtg ttgaagtaca acatggagac tgacgggaca 60
 tgtagccaca gcaggacgt cggcgtagtc tgctcaagtg 100

<210> 492
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 492
 ggaggggaca ttccctgctc tggctgtgtt gaagtacaac atggagacac gtgattctga 60
 cttctctctg gaggcggcca gcgtgctgtg cagggaacta 100

<210> 493
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 > 493
 ggaggggaca ttccctgctc tggctgtgtt gaagtacaac atggagacac gtgaggggca 60
 cgagtccac ctttactct gcccagtagc accccgccct 100

<210> 494
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 494
 ggaggggaca ttccctgctc tggctgtgtt gaagtacaac atggagacac ctgacgggac 60

atgtagccac agcagggacg tcggcgtagt ctgctcaagt 100

<210> 495

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 495

ctgctctggt cgtgttgaag tacaacatgg agacacgtgg ggcaccgtct aggcgccag 60

ctgtgctgtgc agggaaactac agtgcggcac tgtggtttcc 100

<210> 496

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 496

ctgctctggt cgtgttgaag tacaacatgg agacacgtgg ggcaccgtct aagtggacag 60

atctgggctg aagaattcca gtgtgagggg cagagtccc 100

<210> 497

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 497

ctgctctggt cgtgttgaag tacaacatgg agacacgtgg ggcaccgtct gaggggcacg 60

agtccacct ttactctgc ccagtagcac cccgccctga 100

<210> 498

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 498

ctgctctggt cgtgttgaag tacaacatgg agacacgtgg ggcaccgtct agcaccgccg 60

cctgacggga catgtagcca cagcaggac gtcggcgtag 100

<210> 499

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 499
ctgctctggt cgtgttgaag tacaacatgg agacacgtgg ggcaccgtct gacgggacat 60
gtagccacag cagggacgtc ggcgtagtct gctcaagtga 100
<210> 500
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400>
> 500
tgaagtacaa catggagaca cgtggggcac cgtctgtgat tctgacttct aggcggccag 60
cgtgctgtgc agggaactac agtgcggcac tgtggtttcc 100
<210> 501
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 501
tgaagtacaa catggagaca cgtggggcac cgtctgtgat tctgacttct aagtggacag 60
atctgggctg aagaattcca gtgtgagggg cagagtcctc 100
<210> 502
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 502
tgaagtacaa catggagaca cgtggggcac cgtctgtgat tctgacttct gaggggcacg 60
agtcaccact ttcactctgc ccagtagcac cccgcctga 100
<210> 503
<211> 100
<212> DNA
<213> Sus scrofa
<400> 503
tgaagtacaa catggagaca cgtggggcac cgtctgtgat tctgacttct agcaccgccg 60
cctgacggga catgtagcca cagcaggac gtcggcgtag 100
<210> 504
<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 504

tgaagtacaa catggagaca cgtggggcac cgtctgtgat tctgacttct gacgggacat 60

gtagccacag cagggacgtc ggcgtagtct gctcaagtga 100

<210> 505

<211> 100

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 505

tcctcaccg aaatgctatt ttttcagccc acaggaaacc caggctggtt ctgtggtttc 60

cctcctgggg ggagctcact ttggagaagg aagtggacag 100

<210> 506

<211> 3

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 506

Ala His Arg

1

<210> 507

<211> 4

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 507

Ala His Arg Lys

1

<210> 508

<211> 7

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 508

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu

1

5

<210> 509

<211> 8

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 509

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val

1 5

<210> 510

<211> 13

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 510

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro

1 5 10

<210> 511

<211> 14

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 511

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys

1 5 10

<210> 512

<211> 21

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 512

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

1 5 10 15

Arg Val Glu Val Gln

20

<210> 513

<211> 24

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 513

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

1 5 10 15

Arg Val Glu Val Gln His Gly Asp

20

<210> 514

<211> 25

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 514

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

1 5 10 15

Arg Val Glu Val Gln His Gly Asp Thr

20 25

<210> 515

<211> 29

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 515

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

1 5 10 15

Arg Val Glu Val Gln His Gly Asp Thr Trp Gly Thr Val

20 25

<210> 516

<211> 29

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 516

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

1 5 10 15

Arg Val Glu Val Gln His Gly Asp Thr Trp Gly Thr Val

20 25

<210> 517

<211> 34

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 517

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

1 5 10 15

Arg Val Glu Val Gln His Gly Asp Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Ser

20 25 30

Asp Phe

<210> 518

<211> 64

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 518

Ala His Arg Lys Pro Arg Leu Val Thr Val Val Ser Leu Leu Gly Gly

1 5 10 15

Ala His Phe Gly Glu Gly Ser Gly Gln Ile Trp Ala Glu Glu Phe Gln

20 25 30

Cys Glu Gly His Glu Ser His Leu Ser Leu Cys Pro Val Ala Pro Arg

35 40 45

Pro Asp Gly Thr Cys Ser His Ser Arg Asp Val Gly Val Val Cys Ser

50 55 60

<210> 519

<211> 1010

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 519

Met Asp Lys Leu Arg Met Val Leu His Glu Asn Ser Gly Ser Ala Asp

1 5 10 15

Phe Arg Arg Cys Ser Ala His Leu Ser Ser Phe Thr Phe Ala Val Val

20 25 30

Ala Val Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr Ser Ser Leu Gly Gly Lys Asp
35 40 45

Lys Glu Leu Arg Leu Thr Gly Gly Glu Asn Lys Cys Ser Gly Arg Val
50 55 60

Glu Val Lys Val Gln Glu Glu Trp Gly Thr Val Cys Asn Asn Gly Trp
65 70 75 80

Asp Met Asp Val Val Ser Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Pro Thr
85 90 95

Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn Phe Ser Ala Gly Ser Gly Arg
100 105 110

Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp
115 120 125

Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Thr His Gln Gln
130 135 140

Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly Ser Asp Leu Glu Met Arg Leu
145 150 155 160

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

Gly Arg Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asn Phe Asn Ile Asn His Ala
180 185 190

Ser Val Val Cys Lys Gln Leu Glu Cys Gly Ser Ala Val Ser Phe Ser
195 200 205

Gly Ser Ala Asn Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro Ile Trp Phe Asp Asp
210 215 220

Leu Val Cys Asn Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asn Cys Lys His Glu
225 230 235 240

Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp His Ala Glu Asp Ala Gly Val Ile
245 250 255

Cys Leu Asn Gly Ala Asp Leu Lys Leu Arg Val Val Asp Gly Val Thr
260 265 270

Glu Cys Ser Gly Arg Leu Glu Val Lys Phe Gln Gly Glu Trp Gly Thr

275 Ile Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ser Asp Asp Ala Ala Val Ala Cys Lys
 290 295 300
 Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Val Thr Ala Ile Gly Arg Val Asn Ala
 305 310 315 320
 Ser Glu Gly Thr Gly His Ile Trp Leu Asp Ser Val Ser Cys His Gly
 325 330 335
 His Glu Ser Ala Leu Trp Gln Cys Arg His His Glu Trp Gly Lys His
 340 345 350

 Tyr Cys Asn His Asn Glu Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly Ser
 355 360 365
 Asp Leu Glu Leu Arg Leu Lys Gly Gly Gly Ser His Cys Ala Gly Thr
 370 375 380
 Val Glu Val Glu Ile Gln Lys Leu Val Gly Lys Val Cys Asp Arg Ser
 385 390 395 400
 Trp Gly Leu Lys Glu Ala Asp Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly
 405 410 415

 Ser Ala Leu Lys Thr Ser Tyr Gln Val Tyr Ser Lys Thr Lys Ala Thr
 420 425 430
 Asn Thr Trp Leu Phe Val Ser Ser Cys Asn Gly Asn Glu Thr Ser Leu
 435 440 445
 Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp Gly Gly Leu Ser Cys Asp His Tyr
 450 455 460
 Asp Glu Ala Lys Ile Thr Cys Ser Gly Tyr Thr Gln Ile Arg Leu Val
 465 470 475 480

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

Gly Ala Pro Phe Gly Lys Gly Ser Glu Gln Val Trp Arg His Met Phe
530 535 540

His Cys Thr Gly Thr Glu Lys His Met Gly Asp Cys Ser Val Thr Ala
545 550 555 560

Leu Gly Ala Ser Leu Cys Ser Ser Gly Gln Val Ala Ser Val Ile Cys
565 570 575

Ser Gly Asn Gln Ser Gln Thr Leu Ser Pro Cys Asn Ser Ser Ser Ser
580 585 590

Asp Pro Ser Ser Ser Ile Ile Ser Glu Glu Asn Gly Val Ala Cys Ile
595 600 605

Gly Ser Gly Gln Leu Arg Leu Val Asp Gly Gly Gly Arg Cys Ala Gly
610 615 620

Arg Val Glu Val Tyr His Glu Gly Ser Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp
625 630 635 640

Ser Trp Asp Leu Asn Asp Ala His Val Val Cys Lys Gln Leu Ser Cys
645 650 655

Gly Trp Ala Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly Thr
660 665 670

Gly Pro Ile Trp Leu Asp Glu Ile Asn Cys Asn Gly Lys Glu Ser His
675 680 685

Ile Trp Gln Cys His Ser His Gly Trp Gly Arg His Asn Cys Arg His
690 695 700

Lys Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg Leu
705 710 715 720

Ile Ser Glu Asn Ser Arg Glu Thr Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val Phe
725 730 735

Tyr Asn Gly Ala Trp Gly Ser Val Gly Arg Asn Ser Met Ser Pro Ala
740 745 750

Thr Val Gly Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Arg Gly Asp
755 760 765

Ile Ser Pro Ala Ser Ser Asp Lys Thr Val Ser Arg His Met Trp Val

770 775 780
 Asp Asn Val Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys Pro
 785 790 795 800

Ser Ser Pro Trp Lys Lys Arg Leu Ala Ser Pro Ser Glu Glu Thr Trp
 805 810 815
 Ile Thr Cys Ala Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Asn Thr Asn Cys
 820 825 830
 Ser Gly Arg Val Glu Ile Trp Tyr Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val Cys
 835 840 845
 Asp Asp Ser Trp Asp Leu Glu Asp Ala Gln Val Val Cys Arg Gln Leu
 850 855 860

Gly Cys Gly Ser Ala Leu Glu Ala Gly Lys Glu Ala Ala Phe Gly Gln
 865 870 875 880
 Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn Glu
 885 890 895
 Thr Ser Leu Trp Asp Cys Pro Ala Arg Ser Trp Gly His Ser Asp Cys
 900 905 910
 Gly His Lys Glu Asp Ala Ala Val Thr Cys Ser Glu Ile Ala Lys Ser
 915 920 925

Arg Glu Ser Leu His Ala Thr Gly Arg Ser Ser Phe Val Ala Leu Ala
 930 935 940
 Ile Phe Gly Val Ile Leu Leu Ala Cys Leu Ile Ala Phe Leu Ile Trp
 945 950 955 960
 Thr Gln Lys Arg Arg Gln Arg Gln Arg Leu Ser Val Phe Ser Gly Gly
 965 970 975
 Glu Asn Ser Val His Gln Ile Gln Tyr Arg Glu Met Asn Ser Cys Leu
 980 985 990

Lys Ala Asp Glu Thr Asp Met Leu Asn Pro Ser Gly Asp His Ser Glu
 995 1000 1005
 Val Gln
 1010

<210> 520
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 520
 ctcacttttc actctctggc ttactcctat caagagggtg gggtaggtg gtcacagaca 60
 tctttttaaa gccctgtctc ctccaggat acacacaaat c 101
 <210> 521
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 521
 ctcacttttc actctctggc ttactcctat cagagggtag ggtaggtag tcacagacat 60
 ctttttaaag cctgtctcc ttccaggata cacacaaatc 100
 <210> 522
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 522
 ctcacttttc actctctggc ttactcctat cagggtaggg ttaggtagtc acagacatct 60
 ttttaaagcc ctgtctcctt ccaggataca cacaaatc 98
 <210> 523
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 523
 ctcacttttc actctctggc ttactcctat catggcatgg gaggtaggg ttaggtagtc 60
 acagacatct ttttaaagcc ctgtctcctt ccaggataca cacaaatc 108
 <210> 524
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 524

ctcacttttc agggtttaggt agtcacagac atctttttaa agccctgtct ccttccagga	60
tacacacaaa tc	72
<210> 525	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 525	
ctcacttttc actctctggc ttactcctag ggtaggttag tcacagacat ctttttaaag	60
ccctgtctcc ttccaggata cacacaaatc	90
<210> 526	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400>	
526	
ctcacttttc actctctggc ttactcccca gacatctttt taaagccctg tctccttcca	60
ggatacacac aaatc	75
<210> 527	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 527	
ctcacttttc actctctggc ttactccaga ggtaggggtt aggtagtcac agacatcttt	60
ttaaagccct gtctccttcc aggatacaca caaatc	96
<210> 528	
<211> 97	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 528	
ctcacttttc actctctggc ttactcctat caggtaggggt taggtagtca cagacatctt	60
tttaaagccc tgtctccttc caggatacac acaaatc	97
<210> 529	
<211> 90	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa
 <400> 529
 ctcaacttttc actctctggc ttactcctag ggtaggttag tcacagacat ctttttaaag 60
 ccctgtctcc ttccaggata cacacaaatc 90
 <210> 530
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 530
 ctcaacttttc actctctggc ttactcctat caagggtagg gtaggttagt cacagacatc 60
 tttttaaagc cctgtctcct tccaggatac acacaaatc 99
 <210> 531
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 531
 ctcaacttttc actctctggc ttactcctat cagggttagg tagtcacaga catcttttta 60
 aagccctgtc tccttcagg atacacacaa atc 93
 <210> 532
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 532
 ctcaacttttc actctctggc ttactccggt agggtaggt agtcacagac atcttttta 60
 agccctgtct ccttcagga tacacacaaa tc 92
 <210> 533
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 533
 ctcaacttttc actctctggc ttactcctat caaggtaggg ttaggttagtc acagacatct 60
 ttttaaagcc ctgtctcctt ccaggataca cacaaatc 98
 <210> 534

<211> 99
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 534
 ctcaacttttc actctctggc ttactcctat cacaggtagg gttaggtagt cacagacatc 60
 tttttaaaagc cctgtctcct tccaggatac acacaaatc 99
 <210> 535
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 535
 ctcaacttttc actctctggc ttactcctat ggtagggtta ggtagtcaca gacatctttt 60
 taaagccctg tctccttcca ggatacacac aaatc 95
 <210> 536
 <211> 125
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 536
 gcaaagtcctc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagcccac 60
 ggtagggtta ggtagtcaca gacatctttt taaagccctg tctccttcca ggatacacac 120
 aaatc 125
 <210> 537
 <211> 124
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 537
 gcaaagtcctc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagcccac 60
 gtagggttag gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctctctccag gatacacaca 120
 aaatc 124
 <210> 538
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 538
gcaaagtc cc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagcccat 60
tagggtagg tagtcacaga catcttttta aagccctgtc tccttcagg atacacacaa 120
atc 123

<210> 539
<211> 114
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 539
gcaaagtc cc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctagggttag 60
gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcagg gatacacaca aatc 114

<210> 540
<211> 123
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 540
gcaaagtc cc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagccac 60
tagggtagg tagtcacaga catcttttta aagccctgtc tccttcagg atacacacaa 120
atc 123

<210> 541
<211> 116
<212> DNA
<213>
> Sus scrofa

<400> 541
gcaaagtc cc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagccac 60
aggtagtcac agacatcttt ttaaagccct gtctccttc aggatacaca caaatc 116

<210> 542
<211> 124
<212> DNA
<213> Sus scrofa

<400> 542
gcaaagtc cc agaattgtct ccagggaagg acagggaggt ctagaatcgg ctaagcccag 60
tagggtagg gtagtcacag acatcttttt aaagccctgt ctccttcagg gatacacaca 120

aatc 124

<210> 543

<211> 122

<

212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 543

gcaaagtccc agaattgtct ccaggaagg acaggaggt ctagaatcgg ctaagcccat 60

ggggttaggt agtcacagac atctttttaa agccctgtct cttccagga tacacacaaa 120

tc 122

<210> 544

<211> 113

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 544

gcaaagtccc agaattgtct ccaggaagg acaggaggt ctagaatcgg tagggtagg 60

tagtcacaga catcttttta aagccctgtc tccttcagg atacacacaa atc 113

<210> 545

<211> 113

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 545

atttctggtg tgcctttgac tccagattac agtaaatgga ggactgaggg tagggtagg 60

tagtcacaga catcttttta aagccctgtc tccttcagg atacacacaa atc 113

<210> 546

<211> 117

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 546

atttctggtg tgcctttgac tccagattac agtaaatgga ggactgagag agggtagggt 60

taggtagtca cagacatctt tttaaagccc tgtctccttc caggatacac acaaatc 117

<210> 547

<211> 106

<212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 547
 atttctggtg tgcctttgac tccagattac agtaaagga gggtagggtt aggtagtcac 60

 agacatcttt ttaaagccct gtctccttcc aggatacaca caaatc 106
 <210> 548
 <211> 112
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 548
 atttctggtg tgcctttgac tccagattac agtaaagga ggactgaggg tgggttaggt 60
 agtcacagac atctttttaa agccctgtct ccttcaggga tacacacaaa tc 112
 <210> 549
 <211> 117
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 549
 atttctggtg tgcctttgac tccagattac agtaaagga ggactgagag aggtagggt 60
 taggtagtca cagacatctt tttaaagccc tgtctccttc caggatacac acaaatc 117

 <210> 550
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 550
 gaaagagaaa gcatgctcca agaaggttag ggttaggttag tcacagacat ctttttaaag 60
 ccctgtctec ttccaggata cacacaaatc 90
 <210> 551
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 551
 gaaagagaaa gcatgctcca agaaggtagg gttaggtagt cacagacatc tttttaaagc 60
 cctgtctcct tccaggatac acacaaatc 89
 <210> 552

<211> 91
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 552
 gaaagagaaa gcatgctcca agaatgggta gggtaggta gtcacagaca tctttttaa 60
 gccctgtctc cttccaggat acacacaaat c 91
 <210> 553
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 553
 gaaagagaaa gcatgctcca agagtagggt taggtagtca cagacatctt tttaaagccc 60
 tgtctccttc caggatacac acaaatc 87
 <210> 554
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 554
 gaaagagaaa gcatgctcca agaatccaag agggtagggt taggtagtca cagacatctt 60
 tttaaagccc tgtctccttc caggatacac acaaatc 97
 <210> 555
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 555
 gaaagagaaa gcatgctcca agaatagggt agggtaggt agtcacagac atctttttaa 60
 agccctgtct cttccagga tacacacaaa tc 92
 <210> 556
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 556
 ctaagccac tgtaggcaga a 21

<210> 557
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400>
 557
 ctgggtttcc tgtgggctga a 21
 <210> 558
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 558
 tggcttactc ctatcatgaa ggaa 24
 <210> 559
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 559
 atgtagccac agcagggacg t 21
 <210> 560
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 560
 ccaagcggat ttgtgtgtat cc 22

 <210> 561
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 561
 ttcccatgcc atgaagagg tagggtta 28
 <210> 562
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Sus scrofa
 <400> 562
 gctaagccca ctgtaggcag a 21
 <210> 563
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 563
 gcggatttgt gtgtatcctg g 21
 <210> 564
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa
 <400> 564

 tggcttactc ctatcaggta ggg 24