(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116113696 A
(43)申请公布日 2023.05.12

(21)申请号 202180054064.8
(22)申请日 2021.07.16
(30)优先权数据
63/052,881 2020.07.16 US
63/055,808 2020.07.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/042100 2021.07.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/016121 EN 2022.01.20
(71)申请人 奥泽生物疗法公司
地址 美国科罗拉多州
(72)发明人 彼得·J·米利特
伊恩·阿拉斯代尔·拉塞尔
马修·J·艾伦 乔治·根茨
(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所 11330
专利代理师 杨剑
(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)

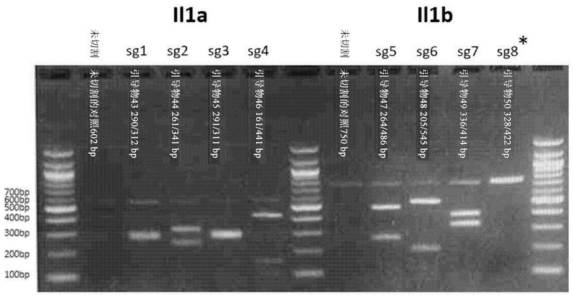
权利要求书10页 说明书110页 附图48页

(54)发明名称

基因编辑以改善关节功能

(57)摘要

本公开提供了用于治疗以炎性组分为特征的关节病症的组合物和方法。在一些方面,所述组合物和方法用于预防哺乳动物关节中骨关节炎和其他关节炎的进展,以及治疗骨关节炎和其他关节炎。



CN 116113696 A

1.一种用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物,其包括:

治疗有效量的一个或多个核酸,所述核酸编码成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)基因编辑系统,所述系统包括:

(i)CRISPR相关蛋白9(Cas9)蛋白;和

(ii)靶向IL-1α或IL-1β基因的至少一个引导RNA,其中所述靶序列邻近所述Cas9蛋白的前间区序列邻近基序(PAM)序列。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

3.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

4.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

5.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的crRNA序列。

6.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

7.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

8.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

9.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的crRNA序列。

10.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少

85%同一性的crRNA序列。

11.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

12.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

13.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的crRNA序列。

14.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

15.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

16.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

17.根据权利要求1所述的药物组合物,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的crRNA序列。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物包括共同包括所述一个或多个核酸的一个或多个病毒载体。

19.根据权利要求18所述的药物组合物,其中所述一个或多个病毒载体包括选自逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1的重组病毒。

20.根据权利要求18所述的药物组合物,其中所述一个或多个病毒载体包括重组腺相关病毒(AAV)。

21.根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述重组AAV是血清型5(AAV5)的。

22.根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述重组AAV是血清型6(AAV6)的。

23.根据权利要求18至22中任一项所述的药物组合物,其中所述一个或多个病毒载体包括:

第一病毒载体,所述第一病毒载体包括编码所述Cas9蛋白的所述一个或多个核酸中的第一核酸;和

第二病毒载体,所述第二病毒载体包括编码所述至少一个引导RNA的所述一个或多个核酸中的第二核酸。

24.根据权利要求18至22中任一项所述的药物组合物,其中所述一个或多个病毒载体包括有包括单一核酸的病毒载体,其中所述单一核酸编码所述Cas9蛋白和至少一个引导RNA。

25.根据权利要求1至17中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物包括共同包括所述一个或多个核酸的一个或多个脂质体。

26.根据权利要求1至17中任一项所述的药物组合物,其中所述一个或多个核酸以裸状态存在。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的药物组合物,其中所述Cas9蛋白是化脓性链球菌Cas9多肽。

28.根据权利要求1至26中任一项所述的药物组合物,其中所述Cas9蛋白是金黄色葡萄球菌Cas9多肽。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制成用于肠胃外施用。

30.根据权利要求1至28中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制成用于在受试者的关节内的关节内注射。

31.一种用于治疗或预防有此需要的受试者的关节疾病或病状的方法,所述方法包括:

向所述受试者的关节施用药物组合物,所述药物组合物包括药学有效量的组合物,所述组合物包括一个或多个核酸,所述核酸编码成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)基因编辑系统,所述系统包括:

(i)CRISPR相关蛋白9(Cas9)蛋白;和

(ii)靶向IL-1α或IL-1β基因的至少一个引导RNA,其中所述靶序列邻近所述Cas9蛋白的前间区序列邻近基序(PAM)序列。

32.根据权利要求31所述的方法,其中所述关节疾病或病状是关节炎。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述关节炎是骨关节炎。

34.根据权利要求31至33中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

35.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

36.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

37.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

38.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的crRNA序列。

39.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

40.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

41.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

42.根据权利要求34所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的crRNA序列。

43.根据权利要求31至33中任一项所述的方法,其中所述受试者是犬科动物。

44.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

45.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

46.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

47.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的crRNA序列。

48.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少85%同一性的crRNA序列。

49.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少90%同一性的crRNA序列。

50.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少95%同一性的crRNA序列。

51.根据权利要求43所述的方法,其中:

所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且

所述至少一个引导RNA包括选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的crRNA序列。

52.根据权利要求31至51中任一项所述的方法,其中所述施用包括将所述药物组合物关节内注射到所述受试者的关节中。

53.根据权利要求31至52中任一项所述的方法,其中所述药物组合物在手术期间施用。

54.根据权利要求31至52中任一项所述的方法,其中所述药物组合物在手术后施用。

55.根据权利要求31至54中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是控释药物组合物。

56.根据权利要求31至55中任一项所述的方法,其中所述药物组合物包括共同包括所述一个或多个核酸的一个或多个病毒载体。

57.根据权利要求56所述的方法,其中所述一个或多个病毒载体包括选自逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1的重组病毒。

58.根据权利要求57所述的方法,其中所述一个或多个病毒载体包括重组腺相关病毒(AAV)。

59.根据权利要求58所述的方法,其中所述重组AAV是血清型5(AAV5)的。

60.根据权利要求58所述的方法,其中所述重组AAV是血清型6(AAV6)的。

61.根据权利要求56至60中任一项所述的方法,其中所述一个或多个病毒载体包括:

第一病毒载体,所述第一病毒载体包括编码所述Cas9蛋白的所述一个或多个核酸中的第一核酸;和

第二病毒载体,所述第二病毒载体包括编码所述至少一个引导RNA的所述一个或多个核酸中的第二核酸。

62.根据权利要求56至60中任一项所述的方法,其中所述一个或多个病毒载体包括有包括单一核酸的病毒载体,其中所述单一核酸编码所述Cas9蛋白和至少一个引导RNA。

63.根据权利要求31至55中任一项所述的方法,其中所述药物组合物包括共同包括所述一个或多个核酸的一个或多个脂质体。

64.根据权利要求31至55中任一项所述的方法,其中所述一个或多个核酸以裸状态存在。

65.根据权利要求31至64中任一项所述的方法,其中所述Cas9蛋白是化脓性链球菌Cas9多肽。

66.根据权利要求31至64中任一项所述的方法,其中所述Cas9蛋白是金黄色葡萄球菌Cas9多肽。

67.一种用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物,所述药物组合物包括基因编辑系统,其中所述基因编辑系统靶向与关节功能相关的至少一个基因座。

68.根据权利要求67所述的药物组合物,其中所述基因编辑系统靶向IL-1α和/或IL-1β中的一种或多种。

69.根据权利要求67或68所述的药物组合物,其中所述基因编辑系统使与关节功能有关的所述至少一个基因座的表达在包括所述关节的所述细胞的至少一部分中被沉默或减少。

70.根据权利要求67所述的药物组合物,其中与关节功能相关的所述至少一个基因座是细胞因子和/或生长因子基因座。

71.根据权利要求70所述的药物组合物,其中所述细胞因子和/或生长因子基因座选自由IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)、NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1及其组合组成的群组。

72.根据权利要求67所述的药物组合物,其中所述基因编辑包括使用在与关节功能相关的所述至少一个基因座处介导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。

73.根据权利要求67至72中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑使与关节有关的所述至少一个基因座的表达在包括所述关节的所述细胞的至少一部分中被沉默或减少。

74.根据权利要求73所述的药物组合物,其中所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因选自由IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)、NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1及其组合组成的群组。

75.根据权利要求67至74中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑使一个或多个细胞因子和/或生长因子基因的表达在包括所述关节的所述细胞的至少一部分中被增强,所述细胞因子和/或生长因子基因选自由IL-1Ra、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4及其组合组成的群组。

76.根据权利要求67至75中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑包括使用在所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因处介导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。

77.根据权利要求67至76中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑包括选自CRISPR方法、TALE方法、锌指方法及其组合的一种或多种方法。

78.根据权利要求67至76中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑包括CRISPR方法。

79.根据权利要求78所述的药物组合物,其中所述CRISPR方法是CRISPR-Cas9方法。

80.根据权利要求67至76中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑包括TALE方法。

81.根据权利要求67至76中任一项所述的药物组合物,其中所述基因编辑包括锌指方法。

82.一种用于治疗或预防关节疾病或病状的方法,所述方法包括引入基因编辑系统,其中所述基因编辑系统靶向与关节功能相关的至少一个基因座。

83.根据权利要求82所述的方法,其中所述基因编辑系统靶向IL-1α和/或IL-1β中的一

种或多种。

84.根据权利要求82或83所述的方法，其中所述基因编辑系统使与关节功能有关的所述至少一个基因座的表达在包括所述关节的所述细胞的至少一部分中被沉默或减少。

85.根据权利要求82所述的方法，其中与关节功能有关的所述至少一个基因座是细胞因子和/或生长因子基因座。

86.根据权利要求85所述的方法，其中所述细胞因子和/或生长因子基因座选自由IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)、NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1及其组合组成的群组。

87.根据权利要求82至86中任一项所述的方法，其中所述基因编辑包括使用在与关节功能相关的所述至少一个基因座处介导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。

88.根据权利要求82至87中任一项所述的方法，其中所述基因编辑使与关节有关的所述至少一个基因座的表达在包括所述关节的所述细胞的至少一部分中被沉默或减少。

89.根据权利要求88所述的方法，其中所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因选自由IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)、NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1及其组合组成的群组。

90.根据权利要求82或83中任一项所述的方法，其中所述基因编辑使一个或多个细胞因子和/或生长因子基因的表达在包括所述关节的所述细胞的至少一部分中被增强，所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因选自由IL-1Ra、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4及其组合组成的群组。

91.根据权利要求82至86中任一项所述的方法，其中所述基因编辑包括使用在所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因处介导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。

92.根据权利要求82至91中任一项所述的方法，其中所述基因编辑包括选自CRISPR方法、TALE方法、锌指方法及其组合的一种或多种方法。

93.根据权利要求82至92中任一项所述的方法，其中所述基因编辑包括CRISPR方法。

94.根据权利要求93所述的方法，其中所述CRISPR方法是CRISPR-Cas9方法。

95.根据权利要求82至91中任一项所述的方法，其中所述基因编辑包括TALE方法。

96.根据权利要求82至91中任一项所述的方法，其中所述基因编辑包括锌指方法。

97.一种用于治疗由于关节疾病引起的犬科动物跛行的方法，所述方法包括将根据权利要求67至81中任一项所述的组合物施用于有此需要的犬科动物。

98.根据权利要求97所述的方法，其中所述组合物被注射到关节中。

99.一种用于治疗由于关节疾病引起的马科动物跛行的方法，所述方法包括将根据权利要求67至81中任一项所述的组合物施用于有此需要的马科动物。

100.根据权利要求99所述的方法，其中所述组合物被注射到关节中。

101.根据权利要求97至100中任一项所述的方法，其中所述关节疾病是炎性关节疾病。

102.一种治疗患有关节炎的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)基因编辑复合物，所述基因编辑复合物包括CRISPR相关蛋白9(Cas9)和靶向所述基因的至少一个引导RNA，

其中所述基因选自由IL-1α、IL-1β及其组合组成的群组，并且其中靶向所述基因的所述至少一个引导RNA是与选自由SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:20组成的群组的DNA序列互补的

RNA序列。

103.根据权利要求102所述的方法,其中所述关节炎是骨关节炎。

104.根据权利要求102所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物包括Cas9蛋白和单链引导RNA。

105.根据权利要求104所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物包括与所述单链引导RNA的复合物中的Cas9蛋白。

106.根据权利要求102所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物包括Cas9蛋白和编码靶向IL-1α和IL-1β中的一种或两者的至少一个引导RNA的核酸。

107.根据权利要求102所述的方法,其中所述Cas9作为包括编码Cas9蛋白的序列的核酸施用。

108.根据权利要求107所述的方法,其中包括编码所述Cas9蛋白的序列的所述核酸在病毒中施用。

109.根据权利要求108所述的方法,其中所述病毒选自由重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和慢病毒组成的群组。

110.根据权利要求109所述的方法,其中所述病毒是腺相关病毒(AAV)。

111.根据权利要求108所述的方法,所述方法包括施用包括编码靶向IL-1α和IL-1β中的一种或两者的至少一个引导RNA的序列的核酸。

112.根据权利要求111所述的方法,其中包括编码所述引导RNA的序列的所述核酸在病毒中施用。

113.根据权利要求112所述的方法,其中所述病毒选自由重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和慢病毒组成的群组。

114.根据权利要求113所述的方法,其中所述病毒是腺相关病毒(AAV)。

115.根据权利要求102所述的方法,其中所述复合物作为包括编码所述Cas9蛋白的序列和编码所述至少一个引导RNA的序列的单个核酸、优选地病毒载体被施用,并且所述Cas9蛋白和所述至少一个引导RNA由相同的核酸表达。

116.根据权利要求102所述的方法,其中所述复合物在多于一个核酸中施用,优选在多于一个病毒载体中施用,其中第一核酸包括编码所述至少一个引导RNA的序列,并且第二核酸包括编码所述Cas9蛋白的序列,并且所述至少一个引导RNA和所述Cas9蛋白由单独的核酸表达。

117.根据权利要求115或116所述的方法,其中所述核酸是选自由重组逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体和慢病毒载体组成的群组的病毒载体。

118.根据权利要求117所述的方法,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

119.根据权利要求102所述的方法,其包括施用靶向IL-1α的引导RNA。

120.根据权利要求102所述的方法,其包括施用靶向IL-1β的引导RNA。

121.根据权利要求102所述的方法,其中所述Cas9是嗜热链球菌(ST)Cas9(StCas9);齿密螺旋体(TD)(TdCas9);化脓性链球菌(SP)(SpCas9);金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9);或脑膜炎奈瑟球菌(NM)Cas9(NmCas9)或其变体。

122.根据权利要求121所述的方法,其中所述Cas9是SpCas9或其变体。

123.根据权利要求122所述的方法,其中所述SpCas9是SpyCas9或其变体。

124.根据权利要求102所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物被全身或局部施用于关节炎部位。

125.根据权利要求102所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物被局部施用于选自由手术、局部软膏的施用及其组合组成的群组的治疗部位。

126.根据权利要求102所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物被配制成在包括可生物降解的和/或生物相容性的聚合物的组合物中施用。

127.根据权利要求126所述的方法,其中所述生物可降解的和/或生物相容性的聚合物选自由胶原、乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乙二醇包被的脂质体和聚乳酸组成的群组。

128.根据权利要求102所述的方法,其中所述受试者是人。

129.根据权利要求102所述的方法,其中所述受试者是选自由猿、狒狒、牛、犬、山羊、大猩猩、豚鼠、仓鼠、狐猴、小鼠、猩猩、猪、大鼠、马和绵羊组成的群组的非人类受试者。

130.根据权利要求102所述的方法,其中所述CRISPR基因编辑复合物的编辑效率是至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。

131.一种药物组合物,其包括:

治疗有效量的成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)基因编辑复合物,所述基因编辑复合物包括CRISPR相关蛋白9(Cas9)和靶向所述基因的至少一个引导RNA,

其中所述基因选自由IL-1α、IL-1β及其组合组成的群组,并且其中靶向所述基因的所述至少一个引导RNA是与选自由SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:20组成的群组的DNA序列互补的RNA序列。

132.一种通过多细胞真核生物的基因修饰来治疗关节疾病的CRISPR/Cas9介导的方法,其包括局部施用与前间区序列邻近基序(PAM)相邻的核酸靶序列和非天然存在的Cas9蛋白,包括:

a)第一调控元件,所述第一调控元件与编码一种或多种与靶序列杂交的CRISPR/Cas9复合物gRNA的一个或多个核苷酸序列可操作地连接;

b)第二调控元件,所述第二调控元件与编码II型Cas蛋白的核苷酸序列可操作地连接,以及

c)病毒载体,所述病毒载体能够将组分(a)和(b)递送至靶关节细胞,由此核酸组分的共表达使所述关节的至少一些细胞中的炎症减轻。

133.一种治疗关节疾病的方法,其包括局部施用:

a)包括编码gRNA分子的核苷酸序列的病毒载体,其中所述gRNA分子包括靶向IL-1α基因或IL-1β的结构域;和

b)包括编码Cas9分子的核苷酸序列的病毒载体,

其中包括编码gRNA分子的核苷酸序列的所述病毒载体和包括Cas9分子的所述病毒载体能够递送至细胞,使得所述关节的至少一些细胞中的IL-1α或IL-1β的水平被降低。

134.一种CRISPR-Cas核酸酶,其包括具有选自由SEQ ID NO.21至34组成的群组的结合至IL-1α或IL-1β基因的靶位点的序列的单链引导RNA,其中所述核酸酶切割并灭活所述基因。

135.一种灭活受试者的关节中的内源性IL-1α或IL-1β的方法,所述方法包括以下步

骤:向所述关节施用根据权利要求134所述的CRISPR/Cas核酸酶,其中所述核酸酶切割并灭活所述IL-1α基因或IL-1β基因。

136.一种成簇的规律间隔的回文重复序列(CRISPR)/Cas引导RNA(gRNA),其包括与基因组白细胞介素-1α(IL-1a)互补的靶向结构域,其中所述靶向结构域被配置为破坏野生型序列。

137.一种载体系统,其包括一个或多个包装的载体,所述一个或多个包装的载体包括:

a)第一调控元件,所述第一调控元件与根据权利要求136所述的编码gRNA的序列可操作地连接,和

b)第二调控元件,所述第二调控元件与编码Cas蛋白的核酸可操作地连接。

138.一种改变细胞中编码IL-1A的核酸序列的方法,其包括使所述细胞与以下接触:

a)包括编码gRNA分子的核苷酸序列的病毒载体,其中所述gRNA分子包括靶向IL-1α基因或IL-1β的结构域;和

b)包括编码Cas9分子的核苷酸序列的病毒载体,

其中包括编码gRNA分子的核苷酸序列的所述病毒载体和包括Cas9分子的所述病毒载体能够递送至细胞,使得所述关节的至少一些细胞中的IL-1α或IL-1β的水平被降低。

139.一种在受试者中治疗骨关节炎的方法,其包括向所述受试者局部施用根据权利要求137所述的IL-1α基因或IL-1β载体系统。

140.一种用于减少所述关节的至少一些细胞中的IL-1α基因或IL-1β表达的方法,其包括在所述细胞中引入或表达根据权利要求137所述的载体系统。

141.根据任一前述权利要求所述的组合物、方法或系统,其中所述引导RNA与SEQ ID NOs.:21-34和168-297中所示的序列至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同。

142.根据任一前述权利要求所述的组合物、方法或系统,其中所述AAV选自由AAV-5和AAV-6组成的群组。

基因编辑以改善关节功能

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月16日提交的美国临时专利申请第63/052,881号和2020年7月23日提交的美国临时专利申请第63/055,808号的优先权,所述美国临时专利申请的内容出于所有目的据此通过引用以其整体并入。

技术领域

[0003] 本文描述了用于治疗滑膜关节功能障碍的组合物和方法。此外,本文公开了用于基因编辑滑膜细胞(synovial cell)和/或滑膜细胞(synoviocyte)、软骨细胞、滑膜巨噬细胞和滑膜成纤维细胞的方法,以及基因编辑的滑膜细胞、软骨细胞、滑膜巨噬细胞和滑膜成纤维细胞在治疗如骨关节炎的疾病中的用途。

背景技术

[0004] 骨关节炎、退行性关节疾病和其他关节功能障碍的治疗是复杂的,并且对于症状缓解或恢复关节功能几乎没有长期选项。骨关节炎(OA)是由疼痛导致的残疾的主要原因。Neogi,《骨关节炎软骨病(Osteoarthritis Cartilage)》,2013;21:1145-53。所有哺乳动物物种都受到影响:役用动物、家畜及其所有者都经历与OA相关的不适、疼痛和残疾,这取决于疾病进展的程度。

[0005] OA是以进行性残疾过程为特征的复杂疾病。全身性炎症与OA和OA疾病进展相关联。炎症是由促炎性细胞因子水平增加驱动的。迫切需要用于治疗这种疾病的新的方法和组合物。本文公开了可用于治疗OA以及其他炎性关节病症的组合物和方法。

发明内容

[0006] 本公开提供了用于治疗以炎性组分为特征的关节病症的组合物和方法。在一些方面,所述组合物和方法用于预防哺乳动物关节中骨关节炎和其他关节炎的进展,以及治疗骨关节炎和其他关节炎。根据示例性的实施例,至少一部分关节滑膜细胞和/或滑膜细胞、软骨细胞、滑膜巨噬细胞或滑膜成纤维细胞被基因编辑以减少炎性细胞因子的表达。在一些方面,对至少一部分关节滑膜细胞和/或滑膜细胞、软骨细胞、滑膜巨噬细胞或滑膜成纤维细胞进行基因编辑,以降低IL-1α、IL-1β或IL-1α、IL-1β两者的表达。

[0007] 在一些实施例中,基因编辑使一个或多个细胞因子和/或生长因子基因的表达在包括哺乳动物关节的细胞的至少一部分中被沉默或减少。在一些方面,细胞是滑膜细胞(synovial cell)。在一些方面,细胞是滑膜成纤维细胞。在一些方面,细胞是滑膜细胞(synoviocyte)。在一些方面,细胞是软骨细胞。在一些方面,细胞是滑膜巨噬细胞。

[0008] 在一些实施例中,一个或多个细胞因子和/或生长因子基因选自包括IL-1a和IL-1Bb的组。

[0009] 在一些实施例中,基因编辑包括使用在所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因处介导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。

[0010] 在一些实施例中,基因编辑包括选自CRISPR方法、TALE方法、锌指方法及其组合的一种或多种方法。

[0011] 在一些实施例中,基因编辑包括CRISPR方法。

[0012] 在一些实施例中,CRISPR方法是CRISPR-Cas9方法。

[0013] 在一些实施例中,基因编辑包括TALE方法。

[0014] 在一些实施例中,基因编辑包括锌指方法。

[0015] 在一些实施例中,基因编辑使一个或多个细胞因子和/或生长因子基因的表达在包括关节的细胞的至少一部分中被沉默或降低。在一些实施例中,编辑的细胞部分是滑膜细胞。一方面,编辑的细胞部分是滑膜成纤维细胞。在一些实施例中,编辑的细胞部分是滑膜细胞。在一些实施例中,编辑的细胞部分是软骨细胞。在一些实施例中,编辑的细胞部分是滑膜巨噬细胞。

[0016] 在一些实施例中,腺相关病毒(AAV)递送系统用于递送基因编辑系统。在一些实施例中,将AAV递送系统注射到关节中。

[0017] 本公开的一些方面提供了用于治疗或预防关节疾病或病症的药物组合物,其包括基因编辑系统和药学上可接受的载剂。在一方面,基因编辑系统包括靶向选自由IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8和IL-18组成的群组的一个或多个基因基因座的一个或多个核酸。

[0018] 一个实施例提供了一种治疗犬科动物跛行的方法,所述方法包括施用基因编辑组合物,其中所述组合物使在跛行关节的滑膜细胞、软骨细胞、滑膜巨噬细胞或滑膜成纤维细胞的一部分中IL-1α和IL-1β的表达被沉默或降低。

[0019] 在一些实施例中,上述方法进一步包括在本文所述的方法和组合物中的任何一种列举的一个或多个特征。

附图说明

[0020] 将参考附图进一步解释本发明公开的实施例。所示的附图不一定按比例绘制,而是重点通常放在说明本发明公开的实施例的原理上。

[0021] 图1A示出了针对小家鼠Il1a和Il1b基因设计的100ng小鼠DNA(gBlocks,Integrated DNATechnologies)的琼脂糖凝胶电泳分析,该小鼠DNA在体外被0.5μg SpyCas9(TrueCut™ Cas9蛋白v2,ThermoFisher Scientific)和200ng经硫代磷酸酯修饰的针对Il1a基因(#43-46)和Il1b基因(#47-50)靶向的单链引导(sg)RNA切割。

[0022] 图1B示出了针对小家Il1a和Il1b基因设计的100ng小鼠DNA(gBlocks,Integrated DNATechnologies)的琼脂糖凝胶电泳分析,该小鼠DNA被0.5μgSauCas9(GeneSnipper™ Cas9、BioVision)和200ng经硫代磷酸酯修饰的针对Il1a(#51-53)和IL1b(#54-56)基因的引导sgRNAs切割。

[0023] 图2A、2B、2C和2D共同示出了显示在J774.2(“J”)和NIH3T3(“N”)细胞中与一系列引导RNA一起使用的SpyCas9和SauCas9的编辑效率的图;图2A:在两种细胞系NIH 3T3(“N”)和J774.2(“J”)之间,在两个单独的池(池1和池2)中用4 x sgRNAs(Spy Cas9)编辑的Il1a的体内切割;图2B:在两种细胞系NIH 3T3(“N”)和J774.2(“J”)之间,在两个单独的池(池1和2)中用4 x sgRNAs(Spy Cas9)编辑的Il1b的体内切割;图2C:在两种细胞系NIH 3T3(“N”)和J774.2(“J”)之间,在两个单独的池(池1和2)中用3 x sgRNAs(Sau Cas9)编辑的

Il1a的体内切割;图2D:在两种细胞系NIH 3T3("N")和J774.2("J")之间,在两个单独的池(池1和池2)中用3 x sgRNAs(saCas9)编辑的Il1b的体内切割;使用每个池的桑格测序轨迹(ICE工具,Synthego)去卷积确定的编辑效率。

[0024] 图3示出了使用IVIS系统测量的GFP表达。通量值基于以动物注射的膝关节为中心的感兴趣的区域。数据呈现为每组四个样本的平均值(SD)。

[0025] 图4示出了如在本公开的实例5中所述的研究的设计。

[0026] 图5示出了在如本公开的实例5中所述的研究中获得的寿命内结果测量。

[0027] 图6示出了在如本公开的实施例5所述的研究中,用关节内(IA)注射PBS、具有乱序载体的AAV-6、具有CRISPR-Cas引导1和2的AAV-6、具有乱序载体的AAV-5或具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-5处理的小鼠的体重变化。

[0028] 图7A和7B共同示出了(A)膝盖卡尺测量值相对于小鼠关节的基线随时间的变化,和(B)在如本公开的实例5中所述的研究中,用关节内(IA)注射PBS、具有乱序载体的AAV-6、具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-6、具有乱序载体的AAV-5或具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-5处理的小鼠中,踝卡尺测量值与AUC的平均差异。

[0029] 图8A和8B共同示出了(A)vonFrey测量值的变化,和(B)von Frey测量值的平均绝对阈值,所述vonFrey测量值是在如本公开的实例5所述的研究中,从用关节内(IA)注射PBS、具有乱序载体的AAV-6、具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-6、具有乱序载体的AAV-5或具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-5处理的小鼠获得的。

[0030] 图9示出了在如在本公开的实例5所述的研究中,从关节内(IA)注射PBS、具有乱序载体的AAV-6、具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-6、具有乱序载体的AAV-5或具有CRISPR-Cas引导物1和2的AAV-5处理的小鼠获得的滑液中IL-1β表达的qPCR测定的结果。

[0031] 图10A、10B、10C和10D共同示出了用PBS预处理的MSU注射的动物(A、B)和用CRISPR处理的(C、D)的滑膜组织中鼠IL-1β的免疫组织化学。图10B和10D分别示出了图10A和10C中的每一个的同种型对照。

[0032] 图11A、11B和11C共同示出了小鼠、人、马科动物、猫科动物和犬科动物IL-1α基因之间的比对。

[0033] 图12A、12B、12C和12D共同示出了小鼠、人、马科动物、猫科动物和犬科动物IL-1β基因之间的比对。

[0034] 图13A、13B、13C和13D共同示出了被设计成用于编辑人IL-1α基因的示例性CRISPR/Cas9 crRNA序列。

[0035] 图14A、14B、14C、14D和14E共同示出了被设计成用于编辑人IL-1β基因的示例性CRISPR/Cas9 crRNA序列。

[0036] 图15A、15B和15C共同示出了被设计成用于编辑犬科动物IL-1α基因的示例性CRISPR/Cas9 crRNA序列。

[0037] 图16A和16B共同示出了被设计成用于编辑犬科动物IL-1β基因的示例性CRISPR/Cas9 crRNA序列。

[0038] 图17A、17B、17C和17D共同示出了靶向人IL-1α基因(图7A)、人IL-1β基因(图7B)、犬科动物IL-1α基因(图7C)和犬科动物IL-1β基因(图7D)的crRNA序列的基于细胞和计算机基因编辑分析的结果,如实例8中所述。o氨基酸(AA)翻译框架内的CRISPR切割位置。*来自

Doench,Fusi等人(2016)的优化评分。该评分针对具有NGG的20bp引导物优化。评分范围为0到100。更高是更好的。**特异性评分来自Hsu等人(2013)。评分范围为0到100。更高是更好的。***该评分基于U2OS中的实验。高精度评分(>0.4)意味着DNA修复结果是一致的,并且只富集了少数独特的基因型。****该评分基于U2OS中的实验。较高(>80%)的移码频率将倾向于将蛋白编码基因敲至框外。典型的基因组移码频率高于66%,因为1-bp插入和1-2bp缺失是特别常见的修复结果。^综合评分=(脱靶评分+精度评分*100+移码)/3。†管道符号‘|’表示CRISPR切割位点。花括号‘{}’表示插入。连字符‘-’表示缺失。$潜在脱靶位点。根据Hsu等人(2013)评分。中靶(on-target)位点具有100的评分。

[0039] 图18A、18B、18C和18D共同示出了在暴露于PBS或LPS后6小时(图18A和18C)和24小时(图18B和18D)犬科动物IL-1α(图18A和18B)和犬科动物IL-1β从未编辑的(对照)和双IL-1α/IL-1βKO(编辑的)犬科动物软骨细胞中的释放(图18C和18D),如实例9所述。

[0040] 图19A、19B、19C和19D共同示出了在暴露于PBS或LPS后6小时(图19A和19C)和24小时(图19B和19D)人IL-1α(图19A和19B)和犬科动物IL-1β(图19C和19D)从未编辑的(对照)和双IL-1α/IL-1βKO(编辑的)犬科动物软骨细胞中的释放,如实例9所述。

[0041] 虽然上述附图阐述了本发明公开的实施例,但是如在讨论中所提到的,也可以设想其他实施例。本公开通过代表性而非限制性的方式呈现说明性实施例。本领域的技术人员可以设计出许多其他的修改和实施例,这些修改和实施例落入本发明公开的实施例的原理的范围和精神内。

具体实施方式

[0042] 如本文所述,本公开的实施例提供了用于改善关节功能和治疗关节疾病的组合物和方法。在特定的实施例中,提供了基因编辑滑膜成纤维细胞、滑膜细胞、软骨细胞或滑膜巨噬细胞以减少炎性细胞因子的表达的组合物和方法,所述炎性细胞因子例如IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、一种或多种基质金属蛋白酶(MMP)、或NLRP3炎性小体的一种或多种组分。实施例用于治疗骨关节炎和其他炎性关节疾病。实施例进一步可用于治疗由骨关节炎引起的犬科动物跛行。实施例进一步可用于治疗由关节疾病引起的马科动物跛行。实施例进一步可用于治疗创伤后关节炎、痛风、假性痛风和其他炎症介导或免疫介导的关节疾病。

[0043] 定义

[0044] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。本文提及的所有专利和出版物均通过引用以其整体并入。

[0045] 术语“体内”是指在受试者的身体内发生的事件。

[0046] 术语“体外”是指在受试者的身体外部发生的事件。体外测定涵盖其中使用活细胞或死细胞的基于细胞的测定,并且也可以涵盖其中不使用完整细胞的无细胞测定。

[0047] 术语“离体”是指涉及治疗已从受试者的身体移除的细胞、组织和/或器官或在该细胞、组织和/或器官上执行程序的事件。合适地,细胞、组织和/或器官可以通过外科手术或治疗的方法返回到受试者的身体。

[0048] 术语“IL-1”(本文中也被称为“IL1”)是指被称为白细胞介素-1的促炎细胞因子,

并且包含所有形式的IL-1,包含IL1-α和IL-1β,人和哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-1α和IL-1β与同一受体分子结合,该受体分子被称为I型IL-1受体(IL-1RI)。存在该受体的第三配体:白细胞介素1受体拮抗剂(IL-1Ra),其不激活下游信号传导;因此,通过与IL-1α和IL-1β竞争受体的结合位点而充当IL-1α和IL-1β信号传导的抑制剂。参见,例如,Dinarello,《血液(Blood)》117:3720-32(2011)和Weber等人,《科学信号传导(Science Signaling)》,3(105):cm1,doi:10.1126/scisignal.3105cm1。IL-1描述于例如Dinarello、《细胞因子和生长因子评论(Cytokine Growth FactorRev.)》,8:253-65(1997)中,其公开通过引用并入本文。例如,术语IL-1涵盖IL-1的人重组形式。

[0049] 表1.白细胞介素的氨基酸序列。

[0050]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:1 重组人 IL-1α （rhIL-1α）	10 20 30 40 50 MAKVPDMFED LKNCYSENEE DSSSIDHLSL NQKSFYHVSY GPLHEGCMDQ 60 70 80 90 100 SVSLSISETS KTSKLTFKES MVVVATNGKV LKKRRLSLSQ SITDDDLEAI 110 120 130 140 150 ANDSEEEIIK PRSAPFSFLS NVKYNFMRII KYEFILNDAL NQSIIRANDQ 160 170 180 190 200 YLTAAALHNL DEAVKFDMGA YKSSKDDAKI TVILRISKTQ LYVTAQDEDQ 210 220 230 240 250 PVLLKEMPEI PKTITGSETN LLFFWETHGT KNYFTSVAHP NLFIATKQDY 260 270 WVCLAGGPPS ITDFQILENQ A
SEQ ID NO:2 重组人 IL-1β （rhIL-1β）	10 20 30 40 50 MAEVPELASE MMAYYSGNED DLFFEADGPK QMKCSFQDLD LCPLDGGIQL 60 70 80 90 100 RISDHHYSKG FRQAASVVVA MDKLRKMLVP CPQTFQENDL STFFPFIFEE 110 120 130 140 150 EPIFFDTWDN EAYVHDAPVR SLNCTLRDSQ QKSLVMSGPY ELKALHLQGQ 160 170 180 190 200 DMEQQVVFSM SFVQGEESND KIPVALGLKE KNLYLSCVLK DDKPTLQLES 210 220 230 240 250 VDPKNYPKKK MEKRFVFNKI EINNKLEFES AQFPNWYIST SQAENMPVFL 260 GGTKGGQDIT DFTMQFVSS
SEQ ID NO:3 重组小鼠 IL-1α （rmIL-1α）	10 20 30 40 50 MAKVPDLFED LKNCYSENED YSSAIDHLSL NQKSFYDASY GSLHETCTDQ 60 70 80 90 100 FVSLRTSETS KMSNFTFKES RVTVSATSSN GKILKKRRLS FSETFTEDDL 110 120 130 140 150 QSITHDLEET IQPRSAPYTY QSDLRYKLMK LVRQKFVMND SLNQTIYQDV 160 170 180 190 200 DKHYLSTTWL NDLQQEVKFD MYAYSSGGDD SKYPVTLKIS DSQLFVSAQG 210 220 230 240 250 EDQPVLLKEL PETPKLITGS ETDLIFFWKS INSKNYFTSA AYPELFIATK 260 270 EQSRVHLARG LPSMTDFQIS
SEQ ID NO:4 重组小鼠 IL-1β （rmIL-1β）	10 20 30 40 50 MATVPELNCE MPPFDSDEND LFFEVDGPQK MKGCFQTFDL GCPDESIQLQ 60 70 80 90 100 ISQQHINKSF RQAVSLIVAV EKLWQLPVSF PWTFQDEDMS TFFSFIFEEE 110 120 130 140 150 PILCDSWDDD DNLLVCDVPI RQLHYRLRDE QQKSLVLSDP YELKALHLNG 160 170 180 190 200 QNINQQVIFS MSFVQGEPSN DKIPVALGLK GKNLYLSCVM KDGTPTLQLE 210 220 230 240 250 SVDPKQYPKK KMEKRFVFNK IEVKSKVEFE SAEFPNWYIS TSQAEHKPVF 260 LGNNSGQDII DFTMESVSS

[0051]

SEQ ID NO:5 重组人 IL-1 受体拮抗剂 （rhIL-1Ra）	10 20 30 40 50 MEICRGLRSH LITLLLFLFH SETICRPSGR KSSKMQAFRI WDVNQKTFYL 60 70 80 90 100 RNNQLVAGYL QGPNVNLEEK IDVVPIEPHA LFLGIHGGKM CLSCVKSGDE 110 120 130 140 150 TRLQLEAVNI TDLSENRKQD KRFAFIRSDS GPTTSFESAA CPGWFLCTAM 160 170 EADQPVSLTN MPDEGVMVTK FYFQEDE
SEQ ID NO:6 重组小鼠 IL-1 受体拮抗剂 （rmIL-1Ra）	10 20 30 40 50 MEICWGPYSH LISLLLILLF HSEAACRPSG KRPCKMQAFR IWDTNQKTFY 60 70 80 90 100 LRNNQLIAGY LQGPNIKLEE KIDMVPIDLH SVFLGIHGGK LCLSCAKSGD 110 120 130 140 150 DIKLQLEEVN ITDLSKNKEE DKRFTFIRSE KGPTTSFESA ACPGWFLCTT 160 170 LEADRPVSLT NTPEEPLIVT KFYFQEDQ

[0052] 术语“NLRP3炎性小体”是指负责某些炎症反应激活的多蛋白复合体。NMRP3炎性小体促进功能性促炎细胞因子的产生，如IL-1β、IL-18等。NLRP3炎性小体的核心组分是NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和半胱天冬酶-1，如Lee等人，《健康和疾病中的脂质(LipidsHealth Dis.)》16:271(2017)以及Groslambet和Py，《炎症研究杂志(J.Inflamm.Res.)》，11:359-374(2018)。

[0053] 术语“基质金属蛋白酶”和“MMP”被定义为例如锌内肽酶的基质金属蛋白酶家族的成员中的任何一个，如由Fanjul-Fernandez等人，Biochem.Biophys.Acta1803:3-19(2010)表征的。在本领域中，家族成员经常被称为原型MMP、明胶酶、基质溶解素和/或弗林蛋白酶活化的MMP。如本文所用，“基质金属蛋白酶”和“MMP”涵盖整个MMP家族，包含但不限于MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-18、MMP-19、MMP-20、MMP-21、MMP-23、MMP-25、MMP-26、MMP-27和MMP-28。

[0054] 如本文所用的，术语“共同施用(co-administration)”、“共同施用(co-administering)”、“联合施用(administered in combination with)”、“联合施用(administering in combination with)”、“同时(simultaneous)”和“同时(concurrent)”涵盖向受试者施用两种或更多种活性药物成分(在本公开的优选实施例中，例如，至少一种抗炎化合物与功能性工程改造以递送如本文所述的基因编辑核酸的病毒载体组合)，使得活性药物成分和/或其代谢物同时存在于受试者体内。共同施用包含以单独的组合物同时施用、在不同时间以单独的组合物施用、或以其中存在两种或更多种活性药物成分的组合物施用。以单独的组合物同时施用和以其中同时存在两种药剂的组合物施用是优选的。

[0055] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指如本文所述的组合物或组合物的组合足以实现预期的应用的量，所述预期的应用包含但不限于疾病治疗。治疗有效量可以根据预期的应用(体外或体内)、或被治疗的受试者和疾病状况(例如，受试者的体重、年龄和性别)、疾病状况的严重程度或施用方式而变化。该术语也适用于将在靶细胞中诱导特定应答例如，减少血小板粘附和/或细胞迁移)的剂量。具体剂量将根据所选择的特定组合物、所遵循的给药方案、该组合物是否与其他组合物或化合物联合施用、施用时机、待施用的组织以及其中携带该组合物的物理递送系统而变化。

[0056] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等是指获得期望的

药理学和/或生理学作用。就完全或部分预防疾病或其症状而言，该作用可以是预防性的，和/或和就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的不良作用而言，该作用可以是治疗性的。例如，本公开的组合物、方法或系统可以作为预防性治疗施用于对给定病症(例如，关节炎)具有易感性的受试者。如本文所用的，“治疗”涵盖在哺乳动物中(特别是在人、犬科动物、猫科动物或马科动物中)疾病的任何治疗，并且包含:(a)防止可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者发生该疾病;(b)抑制疾病，即阻止疾病的发展或进展;和(c)缓解疾病，即引起疾病的消退和/或缓解一种或多种疾病症状。“治疗”还意指涵盖药剂的递送，以便即使在不存在疾病或病状的情况下也提供药理作用。例如，“治疗”涵盖在不存在疾病状况的情况下，例如在疫苗的情况下，可以引发免疫应答或赋予免疫性的组合物的递送。应当理解，本公开的组合物和方法适用于治疗所有哺乳动物，包含但不限于人、犬科动物、猫科动物、马科动物和牛科动物受试者。

[0057] 当参考核酸或蛋白质的部分使用时，术语“异源”指示核酸或蛋白质包括在天然中未发现彼此处于相同关系的两个或更多个子序列。例如，核酸通常重组产生，具有来自被布置成制备新的功能性核酸的不相关基因的两个或更多个序列，例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区，或来自不同来源的编码区。类似地，异源蛋白质指示蛋白质包括在自然界中未发现彼此处于相同关系的两个或更多个子序列(例如，融合蛋白)。

[0058] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用，是指所有形式的核酸、寡核苷酸，包含脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。多核苷酸包含基因组DNA、cDNA和反义DNA，以及剪接的或未剪接的mRNA、rRNA、tRNA、lncRNA、RNA antagomirs和抑制性DNA或RNA(RNAi，例如，小或短发夹(sh)RNA、微小RNA(miRNA)、适体、小或短干扰(si)RNA、反式剪接RNA或反义RNA)。多核苷酸还包含非编码RNA，所述非编码RNA包含但不限于RNAi、miRNA、lncRNA、RNA antagomirs、适体以及本领域技术人员已知的任何其他非编码RNA。多核苷酸包含天然存在的、合成的和有意改变或修饰的多核苷酸以及类似物和衍生物。术语“多核苷酸”还指任何长度的核苷酸的聚合形式，包含脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物，并且与核酸序列同义。多核苷酸可以包括经修饰的核苷酸，如甲基化核苷酸和核苷酸类似物，并且可以由非核苷酸组分中断。如果存在，则可以在聚合物的组装之前或之后赋予核苷酸结构的修饰。如本文所用的，术语多核苷酸可互换地是指双链分子和单链分子。除非另外说明或需要，否则如本文所述的涵盖多核苷酸的任何实施例涵盖双链形式和已知或预测构成双链形式的两种互补单链形式中的每一种两者。多核苷酸可以是单链、双链或三链、线性或环状的，并且可以是任何长度。在讨论多核苷酸时，可以根据在5’至3’方向上提供序列的惯例在本文中描述特定多核苷酸的序列或结构。

[0059] 术语“基因”或“编码多肽的核苷酸序列”是指涉及产生多肽链的DNA的区段。DNA区段可以包含在基因产物的转录/翻译和转录/翻译的调节在涉及的编码区(前导子和尾随子(trailer))之前和之后的区域，以及各个编码区段(外显子)之间的插入序列(内含子)。例如，基因包含含有至少一个开放阅读框的多核苷酸，所述开放阅读框能够在被转录和翻译后编码特定的蛋白质或多肽。

[0060] 就核苷酸序列而言，术语“同源”包含与已知参考序列相同或基本上相似的核苷酸(核酸)序列。在一个实施例中，术语“同源核苷酸序列”用于表征具有与已知参考序列至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、

至少99％或100％相同的核酸序列的序列。

[0061] “异源”意指源自与其进行比较的实体的其余部分的基因型不同的实体。例如，通过基因工程改造技术引入到衍生自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸是异源多核苷酸。从其天然编码序列去除并且可操作地连接至编码序列的启动子未被天然发现连接至异源启动子。尽管术语“异源”在本文中并不总是用于提及多核苷酸，但是即使在不存在修饰词“异源”的情况下，提及多核苷酸也旨在包含异源多核苷酸，尽管有所省略。

[0062] 在两种或更多种核酸或多肽的上下文中，术语“序列同一性”、“同一性百分比”和“序列同一性百分比”(或其同义词，例如，“99％同一性”)是指两种或更多种相同的序列或亚序列，或具有相同的指定百分比的核苷酸或氨基酸残基，当为了最大对应性而进行比较和比对(如果必要，引入间隙)时，不将任何保守氨基酸取代视为序列同一性的一部分。可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量同一性百分比。各种算法和软件是本领域已知的，其可以用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对。用于确定序列同一性百分比的合适的程序包含例如可从美国政府国家生物技术信息中心BLAST网站获得的BLAST程序套件。可以使用BLASTN或BLASTP算法来获得两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列，而BLASTP用于比较氨基酸序列。可从DNASTAR获得的ALIGN、ALIGN-2(Genentech，加利福尼亚州南旧金山(South San Francisco、California))或MegAlign是可以用于比对序列的额外公开可用的软件程序。ClustalW和ClustalX可以用于产生比对，Larkin等人，《生物信息学(Bioinformatics)》，23:2947-2948(2007)；Goujon等人，《核酸研究(NucleicAcids Research)》，38补刊(Suppl)：W 695-9(2010)；以及McWilliam等人，《核酸研究》，41(Web Serverissue)：W 597-600(2013)。本领域技术人员可以通过特定的比对软件确定用于最大比对的适当参数。在某些实施例中，使用比对软件的默认参数。

[0063] 如本文所用的，术语“变体”涵盖但不限于包括氨基酸序列的抗体或融合蛋白，所述氨基酸序列通过在参考抗体的氨基酸序列内或附近的某些位置处的一个或多个取代、缺失和/或添加而与参考抗体的氨基酸序列不同。与参考抗体的氨基酸序列相比，变体可以在氨基酸序列中包括一个或多个保守性取代。保守性取代可以涉及例如类似地带电荷的或未带电荷的氨基酸的取代。变体保留特异性地结合至参考抗体的抗原的能力。术语变体还包含聚乙二醇化抗体或蛋白质。

[0064] “关节疾病”被定义为关节的细胞或组织中的可测量异常，其可能导致疾病，例如，触发关节的解剖和/或生理变化的代谢和分子紊乱。包含但不限于关节空间狭窄、软骨下硬化、软骨下囊肿和骨赘形成的射线照相检测。

[0065] “关节疾病”在人类受试者中被定义为驱使受试者寻求医疗干预的症状，例如，受试者报告的疼痛、僵硬、肿胀或不动。对于非人类哺乳动物，“关节疾病”被定义为，例如，跛行、步态中可观察到的变化、负重、异常性疼痛或探索性行为。

[0066] 如本文所用的，sgRNA(单链引导RNA)是由靶向序列和支架组成的RNA，优选地合成RNA。它用于在基因组工程改造实验中将Cas9引导至特定基因组基因座。sgRNA可以施用或配制，例如作为合成RNA，或作为包括编码gRNA的序列的核酸，所述gRNA随后在靶细胞中表达。如本领域的普通技术人员将显而易见的，各种工具可以用于设计和/或优化sgRNA的序列，例如以增加基因组编辑的特异性和/或精度。一般而言，可以基于任何可用的基于网络的工具，通过鉴定在靶区域内具有高预测的中靶效率和低脱靶效率的序列来设计候选

sgRNA。可以通过人工检查和/或实验筛选进一步评估候选sgRNA。基于网络的工具的实例包含但不限于CRISPR寻求、CRISPR设计工具、Cas-OFFinder、E-CRISP、ChopChop、CasOT、CRISPR direct、CRISPOR、BREAKING-CAS、CrispRGold和CCTop。参见例如Safari等人,《当代制药生物技术(CurrentPharma.Biotechol.(2017)18(13),其出于所有目的通过引用以其整体并入本文。这样的工具也在例如PCT公开号WO2014093701A1和Liu等人,"有效的CRISPR引导RNA设计和评估的计算方法(Computational approached for effective CRISPR guide RNAdesign and evaluation)",《计算和结构生物技术杂志(Comput Struct Biotechnol J.)》,2020;18:35-44中描述,其中的每一个出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0067] 如本文所用的,"Cas9"是指CRISPR相关蛋白;Cas9核酸酶是II型CRISPR系统的活性酶。"nCas9"是指具有两个失活的核酸酶结构域中的一个(即RuvC或HNH结构域)的Cas9。nCas9只能切割靶DNA的一条链(一种"切口酶")。术语"Cas9"是指RNA引导的双链DNA结合核酸酶蛋白或切口酶蛋白或其变体。在本文中,"Cas9"是指天然存在的和重组Cas9两者。野生型Cas9核酸酶具有切割不同DNA链的两个功能结构域例如RuvC和HNH。本文所述的Cas9酶可以包括HNH或HNH样核酸酶结构域和/或RuvC或RuvC样核酸酶结构域。当两个功能结构域都是活性的时,Cas9可以在基因组DNA(靶基因座)中诱导双链断裂。Cas9酶可以包括Cas9蛋白的一个或多个催化结构域,所述Cas9蛋白衍生自属于由以下组成的群组的细菌:棒状杆菌属(Corynebacter)、萨特氏菌属(Sutterella)、军团菌属(Legionella)、密螺旋体菌属(Treponema)、丝状菌属(Filifactor)、真细菌属(Eubacterium)、链球菌属(Streptococcus)、乳杆菌属(Lactobacillus)、支原体属(Mycoplasma)、拟杆菌属(Bacteroides)、Flaviivola、黄杆菌属(Flavobacterium)、鳞球菌属(Sphaerochaeta)、固氮螺菌属(Azospirillum)、葡糖酸醋杆菌属(Gluconacetobacter)、奈瑟氏球菌属(Neisseria)、蔷薇属(Roseburia)、细小棒菌属(Parvibaculum)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、硝化细菌属(Nitratifractor)和弯曲杆菌属(Campylobacte)。在一些实施例中,两个催化结构域源自不同的细菌物种。

[0068] 如本文所用,"PAM"是指前间区序列邻近基序(ProtospacerAdjacent Motif),并且是Cas9结合靶DNA所必需的,并且紧接在靶序列之后。Cas9可以例如作为蛋白质(例如重组蛋白)施用或配制,或作为包括编码Cas9蛋白的序列的核酸,所述序列接着在靶细胞中表达。天然存在的Cas9分子识别特定的PAM序列(例如,化脓性链球菌、嗜热链球菌、变异链球菌、金黄色葡萄球菌和脑膜炎奈瑟氏菌的PAM识别序列)。在一个实施例中,Cas9分子具有与天然存在的Cas9分子相同的PAM特异性。在其他实施例中,Cas9分子具有与天然存在的Cas9分子不相关的PAM特异性。在其他实施例中,Cas9分子的PAM特异性与其具有最接近的序列同源性的天然存在的Cas9分子无关。例如,可以改变天然存在的Cas9分子,使得PAM序列识别被改变以减少脱靶位点、改善特异性或消除PAM识别要求。在一个实施例中,可以改变Cas9分子(例如,以延长PAM识别序列、改善Cas9特异性至高水平同一性、减少脱靶位点和/或增加特异性)。在一个实施例中,PAM识别序列的长度为长度至少4、5、6、7、8、9、10或15个氨基酸。在一些实施例中,可以改变Cas9分子以消融PAM识别。

[0069] "表达盒"是重组或合成产生的核酸构建体,其具有允许在宿主细胞中转录特定多核苷酸序列的一系列指定的核酸元件。表达盒或载体可以是质粒、病毒基因组或核酸片段

的一部分。通常，表达盒或载体包含待转录的多核苷酸，其可操作地连接至启动子。

[0070] 术语“启动子”在本文中用于指指导核酸的转录的核酸控制序列的阵列。如本文所用的，启动子包含在转录的起始位点附近的必要核酸序列，如，在聚合酶II型启动子的情况下，TATA元件。启动子还任选地包含远端增强子或阻遏子元件，它们可以位于距离转录的起始位点多达几千个碱基对的位置。在表达载体中可能存在的其他元件包含增强转录(例如增强子)和终止转录(例如终止子)的元件，以及赋予由表达载体产生的重组蛋白一定结合亲和力或抗原性的元件。

[0071] 术语“可操作地连接”是指基因元件的并置，其中元件处于允许它们以预期方式操作的关系中。例如，如果启动子有助于启动编码序列的转录，则启动子可操作地连接到编码区。只要维持这种功能关系，在启动子和编码区之间就可以存在介入残基。

[0072] “分离的”质粒、核酸、载体、病毒、病毒粒子、宿主细胞或其他物质是指物质的制剂，其不含所述物质或类似物质天然存在或最初由其制备时存在的至少一些其他组分。因此，例如，可以通过使用纯化技术以从源混合物富集分离的物质来制备分离的物质。可以在绝对基础上来测量富集，如每体积溶液的重量，或者可以相对于源混合物中存在的第二种潜在干扰物质进行测量。增加本公开的实施例的富集被越来越隔离。在一些实施例中，纯化分离的质粒、核酸、载体、病毒、宿主细胞或其他物质，例如约80％至约90％纯的、至少约90％纯的、至少约95％纯的、至少约98％纯的或至少约99％或更多纯的。

[0073] 如本文所用的，“AAV载体”是指编码各种核酸序列的AAV载体核酸序列，在一些实施例中包含变体或嵌合衣壳多肽(即，AAV载体包括编码变体或嵌合衣壳多肽的核酸序列)。AAV载体还可以包括非AAV来源的异源核酸序列作为核酸插入物的一部分。这种异源核酸序列通常包括用于细胞的基因转化的感兴趣的序列。通常，异源核酸序列的侧翼有至少一个AAV反向末端重复序列(ITR)，并且通常有两个AAV反向末端重复序列(ITR)。在某些实施例中，当施用于受试者时，Cas序列、引导RNA序列和任何其他基因元件(例如，启动子序列、PAM序列等)可以在相同的AAV载体上，或者在两个或更多个不同的AAV载体上。在某些实施例中，当施用于受试者时，Cas序列、引导RNA序列和任何其他基因元件(例如，启动子序列、PAM序列等)可以在两种或更多种不同的AAV载体上，并且AAV可以是相同的血清型，或者AAV可以是两种或更多种不同的血清型(例如，AAV5和AAV6)。

[0074] “AAV病毒粒子”或“AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“AAV载体颗粒”是指由至少一种AAV衣壳多肽和包封的多核苷酸AAV转移载体组成的病毒颗粒。如果颗粒包括异源核酸(即不同于野生型AAV基因组的多核苷酸，如待递送至细胞的转基因)，则该颗粒可以被称为“AAV载体颗粒”或简称为“AAV载体”。因此，AAV病毒粒子或AAV颗粒的产生必然包含AAV载体的产生，因为这样的载体被包含在AAV病毒粒子或AAV颗粒内。

[0075] 如本文所用的，“载剂”或“媒介物”是指适合于药物施用的载剂材料。可用于本文的载剂和媒介物包含本领域已知的任何此类材料，例如任何液体、凝胶、溶剂、液体稀释剂、增溶剂、表面活性剂等，它们是无毒的，并且不以有害的方式与组合物的其他组分相互作用。

[0076] 短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适合于与人和动物的组织接触使用而没有过度毒性、刺激、过敏响应或与合理的益处/风险比相称的其他问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0077] 术语“药学上可接受的载剂”或“药学上可接受的赋形剂”旨在包含任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂以及惰性成分。此类药学上可接受的载剂或药学上可接受的赋形剂用于活性药物成分的用途是本领域熟知的。除了任何常规的药学上可接受的载剂或药学上可接受的赋形剂与活性药物成分不相容之外，考虑了其在本公开的治疗组合物中的用途。还可以将额外的活性药物成分，如其他药剂并入到所描述的组合物和方法中。

[0078] 术语“药学上可接受的赋形剂”旨在包含能够与化合物共同施用以促进其预期功能的发挥的媒介物和载剂。此类介质用于药学活性物质的用途是本领域熟知的。此类媒介物和载剂的实例包含溶液、溶剂、分散介质、延迟剂、乳液等。适合与多结合化合物一起使用的任何其他常规载剂也落入本公开的范围内。

[0079] 如本文所用的，术语“一个(a)”、“一种(an)”或“所述(the)”通常被解释为涵盖单数形式和复数形式两者。

[0080] 术语“约(about)”和“大约(approximately)”意指在值的统计上有意义的范围内。此范围可以在给定值或范围的量级内，优选地在50％内，更优选地在20％内，更优选地仍在10％内，并且甚至更优选地在5％内。由术语“约”或“大约”涵盖的可允许的变化取决于所研究的特定系统，并且可以由本领域的普通技术人员容易地理解。此外，如本文所用，术语“约”和“大约”意指组合物、量、配方、参数、形状和其他数量和特征不是精确的并且不需要精确的，但是根据需要可以是近似的和/或更大的或更小的，反映了公差、转换因子、舍入、测量误差等以及本领域技术人员已知的其他因素。一般来说，尺寸、大小、配方、参数、形状或其他数量或特征是“约”或“近似”的，无论其是否明确陈述如此。应当注意，非常不同的大小、形状和尺寸的实施例可以采用所描述的布置。

[0081] 如本文所用的，术语“基本上”可以指大多数或大部分，如至少约50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％、99.99％或至少约99.999％或更多。

[0082] 当在所附的权利要求中以原始的形式和修改的形式使用时，过渡术语“包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”定义了关于哪些未叙述的附加权利要求要素或步骤(如果有的话)被排除在权利要求范围之外的权利要求范围。术语“包括”旨在是包含性的或开放式的，并且不排除任何额外的、未叙述的元件、方法、步骤或材料。术语“由……组成”排除除了在权利要求中指定的那些之外的任何元件、步骤或材料，并且在后一种情况下，排除与指定的材料通常相关的杂质。术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制为指定的元件、步骤或材料，以及那些实质上不影响所要求保护的方法和组合物的基本和新颖特征的元件、步骤或材料。在替代的实施例中，本文描述的体现本公开的所有组合物、方法和试剂盒可以更具体地由任何过渡术语“包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”来定义。

[0083] 通过本文所述的方法或组合物中的任何一种治疗的受试者可以是任何年龄，并且可以是成人、婴儿或儿童。在某些情况下，受试者是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99岁或在其中的范围内(例如，但不限于，在2和20岁之

间,在20和40岁之间,或在40和90岁之间)。受试者可以是人或非人受试者。可受益于本公开的组合物和方法的特定类别的受试者包含年龄超过40、50或60岁的受试者。可受益于本公开的组合物和方法的另一类别的受试者是患有关节炎(例如,骨关节炎)的受试者。

[0084] 本文公开的组合物中的任何一种可以施用于非人受试者,如实验室或农场动物。非人受试者的非限制性实例包含实验室或研究动物、宠物、野生或家养动物、农场动物等,例如,犬、山羊、豚鼠、仓鼠、小鼠、猪、非人灵长类动物(例如,大猩猩、猿、猩猩、狐猴、狒狒等))、大鼠、绵羊、马、牛等。

[0085] 本公开提供了可用于用炎性组分治疗关节病症的组合物。在一些方面,组合物可用于预防哺乳动物关节中骨关节炎的进展和治疗骨关节炎。

[0086] 在一些方面,药物组合物包含基因编辑系统,其中所述基因编辑系统使与关节功能相关的至少一个基因基因座的表达在包括关节的细胞的至少一部分中被沉默或减少。

[0087] 在一方面,药物组合物包括基因编辑系统,其中所述基因编辑系统靶向IL-1α和IL-1β中的一种或多种。在一些方面,药物组合物包括基因编辑系统,其中所述基因编辑系统靶向TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)或NLRP3炎性小体的组分中的一种或多种。

[0088] 在一些方面,药物组合物包括基因编辑系统,其中所述基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在与关节功能相关的至少一个基因座处的双链或单链断裂的产生。在一些实施例中,基因编辑系统减少一个或多个靶向的基因座的基因表达。在一些实施例中,与关节组织有关的至少一个基因座在包括关节的细胞的至少一部分中被沉默或减少。

[0089] 在一些方面,包括关节的细胞是滑膜细胞。在一些方面,细胞是滑膜巨噬细胞。在一些方面,细胞是滑膜成纤维细胞。在一些方面,至少一部分滑膜细胞被编辑。在一些方面,包括关节的细胞是软骨细胞。

[0090] 在一方面,药物组合物靶向一个或多个细胞因子和/或生长因子基因选自包括IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)或NLRP3炎性小体的组分的组。在一些实施例中,NLRP3炎性小体的组分包括NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1及其组合。

[0091] 还提供了药物组合物,其中所述基因编辑使一个或多个细胞因子和/或生长因子基因的表达在包括关节的细胞的至少一部分中增强,所述细胞因子和/或生长因子基因选自包括IL-1Ra、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4及其组合的群组。

[0092] 在一些实施例中,药物组合物提供基因编辑,其中所述基因编辑包括使用在所述一个或多个细胞因子和/或生长因子基因处介导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。在一些实施例中,基因编辑包括选自CRISPR方法、TALE方法、锌指方法及其组合的一种或多种方法。

[0093] 在一方面,基因编辑包括CRISPR方法。在又其他方面,CRISPR方法是CRISPR-Cas9方法。在一些方面,Cas9被突变以增强功能。

[0094] 骨关节炎的动物模型

[0095] 用于骨关节炎的几种动物模型是本领域已知的。总结了示例性的非限制性动物模型;然而,应当理解,可以使用各种模型。许多不同物种的动物用于模拟OA,例如,已经对小

鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬、猪、马，以及甚至其他动物进行了研究。参见例如，Kuyinu等人，《整形外科和研究杂志(JOrthop SurgRes.)》11:19(2016)(在下文中被称为“Kuyinu,2016”)。

[0096] 应当理解，用于诱导OA的各种方法可以用于任何哺乳动物中。在小鼠中，通常使用自发性的、化学诱导的、手术诱导和非侵入性的诱导。例如，Kuyinu,2016;Bapat等人，《临床转移医学(Clin TranslMed)》,7:36(2018)(在下文中被称为“Bapat,2018”);以及Poulet，《当前风湿病学报告(Curr RheumatolRep)》,18:40(2016)。在马中，通常使用骨软骨碎片-运动模型、化学诱导、创伤诱导和通过过度使用的诱导。在绵羊中，手术诱导是最常见的;在豚鼠中，经常使用手术诱导、化学诱导和自发性(Durkin Hartley)方法。例如Bapat,2018。

[0097] 不稳定的内侧半月板(DMM)经常用于小鼠中以建模创伤后骨关节炎，例如Culley等人，《分子生物学方法(Methods Mol Biol.)》,1226:143-73(2015)。DMM模型模仿临床半月板损伤，这是人OA的发展的已知易感因素，并且允许研究在疾病过程中的结构和生物学变化。小鼠是有吸引力的模型生物体，因为可以使用具有限定的基因背景的小鼠品系。另外，敲除或其他基因操纵的小鼠品系可以用于评价各种分子途径在响应各种OA治疗模式和方案中的重要性。例如，STR/ort小鼠具有使品系特别易受发育中的OA影响的特征，包含炎性细胞因子IL1β的增加的水平，Bat等人，《临床转移方法》,7:36(2018)。这些小鼠通常在膝、踝、肘和颞下颌关节中发展OA，Jaeger等人，《软骨骨关节炎(OsteoarthritisCartilage)》16:607-614(2008)。小鼠的其他有用的突变品系是技术人员已知的，例如Col9a1(-/-)小鼠，Allen等人，《风湿性关节炎(ArthritisRheum)》,60:2684-2693(2009)。

[0098] 用于OA的另一个常用的手术模型是前交叉韧带横断(ACLT)模型Little和Hunter，《自然评论风湿病学(NatRevRheumatol.)》,9(8):485-497(2013)。受试者的ACL是手术横切的，导致关节不稳定。关节弯曲时的前抽屉测试用于确认韧带的横断已经发生。在某些情况下，其他韧带，如后交叉韧带、内侧副韧带、外侧副韧带和/或任一半月板可能被横切。与DMM模型一样，多种小鼠品系可以用于研究各种分子途径。

[0099] 取决于技术目的，可以选择不同大小的动物以供使用。啮齿动物是有用的，因为骨骼成熟所需的时间较短，并且因此在诱导OA的手术或其他技术之后发展OA的时间较短。较大的动物特别可用于评价治疗干预。较大动物中的解剖结构与人类非常相似;例如，在犬中，软骨厚度小于人类厚度的约一半;这种惊人的相似性是为什么此类软骨退化和骨软骨缺损研究在大动物模型中更有用的例证。例如McCoy,《兽医病理学(Vet.Pathol.)》,,52:803-18(2015);以及Pelletier等人，《疗法(Therapy)》,7:621-34(2010)。

[0100] 基因编辑过程

[0101] 概述:基因编辑滑膜细胞的组合物

[0102] 本公开的实施例涉及用于基因编辑滑膜细胞(滑膜细胞)的方法，所述方法包括基因编辑关节中至少一部分滑膜细胞以治疗骨关节炎或其他关节病症的一个或多个步骤。如本文所用的，“基因编辑”、“基因编辑”和“基因组编辑”是指其中DNA在细胞的基因组中被永久修饰的基因修饰的类型，例如DNA在细胞的基因组内被插入、缺失、修饰或替换。在一些实施例中，基因编辑使DNA序列的表达沉默(有时被称为基因敲除)或抑制/减少(有时被称为基因敲除)。在其他实施例中，基因编辑导致DNA序列的表达增强(例如，通过引起过表达)。根据本公开的实施例，基因编辑技术用于减少促炎基因的表达或使促炎基因沉默和/或增

强再生基因的表达。

[0103] 白细胞介素

[0104] 根据另外的实施例，本公开的基因编辑方法可以用于增加某些白细胞介素的表达，所述白细胞介素如IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-18和TNF-α中的一种或多种。某些白细胞介素已经被证实增强关节组织中的炎性应答，并且与疾病进展相关。

[0105] 表达构建体

[0106] 编码引导RNA和/或Cas9编辑酶中的一者或两者的表达构建体可以在任何有效载剂中施用，例如能够将组分基因在体内有效地递送至细胞中的任何配方或组合物。方法包含例如基因在病毒载体中的电穿孔和/或插入，所述病毒载体包含重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1或重组细菌或真核质粒。病毒载体直接转染细胞；质粒DNA可以被裸递送或借助于例如阳离子脂质体(lipofectamine)或衍生的(例如，抗体缀合的)、聚赖氨酸缀合物、革兰氏阳性菌素S(gramacidin S)、人工病毒包膜或其他此类细胞内载剂，以及基因构建体的直接注射或体内进行的CaPO4沉淀来递送。

[0107] 将核酸体内引入到细胞中的优选的方法是使用含有核酸的病毒载体，例如cDNA。用病毒载体感染细胞具有的优点是大部分靶向的细胞可以接受核酸。此外，在病毒载体内编码的分子，例如由病毒载体中含有的cDNA编码的分子，在已经摄取病毒载体核酸的细胞中被有效表达。

[0108] 逆转录病毒载体和腺相关病毒载体可以用作重组基因递送系统，用于在体内转移外源基因，特别是转移到人类中。这些载体提供基因向细胞中的有效递送。在一些情况下，转移的核酸被稳定地整合到宿主的染色体DNA中。在其他情况下，特别是对于腺相关病毒载体，稳定整合到宿主DNA内可以是罕见的事件，导致转基因的游离体表达和转基因的瞬时表达。

[0109] 仅产生复制缺陷型逆转录病毒的专门细胞系(被称为“包装细胞”)的开发增加了逆转录病毒用于基因疗法的效用，并且缺陷型逆转录病毒的特征在于用于基因疗法目的的基因转移(关于综述，参见Miller，《血液(Blood)》，76:271(1990))。复制缺陷型逆转录病毒可以被包装成病毒粒子，所述病毒粒子可以通过标准技术通过使用辅助病毒用于感染靶细胞。用于生产重组逆转录病毒和用此类病毒体外或体内感染细胞的方案可以在Ausubel等人编辑，《分子生物学中的当前方案(Current Protocols in Molecular Biology)》，格林出版协会(Greene PublishingAssociates)，(1989)，第9.10-9.14节，以及其他标准实验室手册中找到。合适的逆转录病毒的实例包含本领域技术人员已知的pLJ、pZIP、pWE和pEM。用于制备亲嗜性和双嗜性逆转录病毒系统的合适的包装病毒系的实例包含ΨCrip、ΨCre、Ψ2和ΨAm。逆转录病毒已经被用于在体外和/或体内将多种基因引入到许多不同的细胞类型中，包含上皮细胞(参见例如Eglitis等人(1985)《科学(Science)》，230:1395-1398；Danos and Mulligan(1988)，《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》，85:6460-6464；Wilson等人(1988)，《美国国家科学院院刊》，85:3014-3018；Armentano等人(1990)，《美国国家科学院院刊》，87:6141-6145；Huber等人(1991)，《美国国家科学院院刊》，88:8039-8043；Ferry等人(1991)，《美国国家科学院院刊》，88:8377-8381；Chowdhury等人(1991)，《科学》，254:1802-1805；van Beusechem等人(1992)，《美国国家科学院院刊》，89:7640-

7644;Kay等人(1992),《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》,3:641-647;Dai等人(1992),《美国国家科学院院刊》,89:10892-10895;Hwu等人(1993),《免疫学杂志(J.Immunol.)》,150:4104-4115;美国专利第4,868,116号;美国专利第4,980,286号;PCT申请WO 89/07136;PCT申请WO 89/02468;PCT申请WO 89/05345;和PCT申请WO 92/07573,这些文献中的每一个出于所有目的通过引用以其整体并入本文)。

[0110] 可用于本发明的方法的另一病毒基因递送系统利用腺病毒衍生的载体。可以操纵腺病毒的基因组,使得其编码并表达感兴趣的基因产物,但就其在正常裂解性病毒生命周期中复制的能力而言是失活的。参见例如Berkner等人,《生物技术(BioTechniques)》,6:616(1988);Rosenfeld等人,《科学》,252:431-434(1991);以及Rosenfeld等人,《细胞(Cell)》,68:143-155(1992)。合适的腺病毒载体可以来源于腺病毒的任何菌株(例如,Ad2、Ad3、Ad5或Ad7等),包含本领域技术人员已知的来自其他物种(例如,小鼠、犬、人等)的腺病毒血清型。病毒颗粒是相对稳定的并且适合于纯化和浓缩,并且如上所述,可以被修饰以便影响感染性的谱。此外,引入的腺病毒DNA(和其中含有的外来DNA)未被整合到宿主细胞的基因组中,而是保持游离状态,从而避免了由于原位插入突变而可能发生的潜在问题,其中引入的DNA变得被整合到宿主基因组(例如逆转录病毒DNA)中。此外,相对于其他基因递送载体,腺病毒基因组对于外来DNA的携带能力较大(高达8千碱基)(Berkner等人,同上;Haj-Ahmand和Graham,《病毒学杂志(J.Virol.)》,57:267(1986)。

[0111] 也可以产生辅助依赖型(HDAd)载体,其中除了在病毒DNA的每个末端处的DNA复制起点以及左侧包装信号下游的基因组的5-引发端的包装信号之外,所有腺病毒序列都被删除。HDAd载体在具有复制能力的辅助腺病毒的存在下构建和繁殖,该辅助腺病毒提供复制所需的所要求的早期和晚期蛋白。

[0112] 可用于核酸递送的又一病毒载体系统是腺相关病毒(AAV)。腺相关病毒是天然存在的缺陷型病毒,它需要另一种病毒(如腺病毒或疱疹病毒)作为辅助病毒,以用于实现有效复制和生产性生命周期。(关于综述,参见Muzyczka等人,《微生物学和免疫学的当前主题(Curr.Topics in Micro.and Immunol.)》,158:97-129(1992)。它也是可以将其DNA整合到非分裂细胞中的少数病毒中的一种,并且表现出高频率的稳定整合(参见例如Flotte等人,《美国呼吸系统细胞和分子生物学杂志(Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.)7:349-356(1992);Samulski等人,《病毒学杂志》,63:3822-3828(1989);和McLaughlin等人,《病毒学杂志》,62:1963-1973(1989)。含有少至300个碱基对的AAV的载体可以被包装并且可以整合。外源性DNA的空间被限制在约4.5kb。AAV载体,如在Tratschin等人的《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》,5:3251-3260(1985)中所述的AAV载体,可以用于将DNA引入到细胞中。已经使用AAV载体将多种核酸引入到不同的细胞类型中(参见例如Hermonat等人,《美国国家科学院院刊》,81:6466-6470(1984);Tratschin等人,《分子细胞生物学》,4:2072-2081(1985);Wondisford等人,《分子内分泌学(Mol.Endocrinol.)》,2:32-39(1988);Tratschin等人,《病毒学杂志》,51:611-619(1984);和Flotte等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》268:3781-3790(1993)。金黄色葡萄球菌(SaCas9)和其他较小的Cas9酶的鉴定为治疗性基因编辑铺平了新的道路,这些酶可以被包装到在体内高度稳定和有效的腺相关病毒(AAV)载体中,易于生产,经FDA批准,并在多个临床试验中测试。

[0113] 在一些实施例中,编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物(例如,Cas9或gRNA)

的核酸被包埋到在其表面上带有正电荷的脂质体(例如,lipofectins)中,所述脂质体可以用针对靶细胞的细胞表面抗原的抗体进行标记。这些递送媒介物也可以用于递送Cas9蛋白/gRNA复合物。

[0114] 在临床环境中,编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸的基因递送系统可以通过多种方法中的任何一种被引入到受试者中,每种方法都是本领域熟知的。例如,基因递送系统的药物制剂可以通过例如静脉注射被系统地引入,并且靶细胞中蛋白质的特异性转导将主要从由基因递送媒介物提供的转染的特异性、由于控制受体基因的表达的转录调节序列导致的细胞型或组织型表达或其组合发生。在其他实施例中,编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸的初始递送更加有限,其中引入到受试者中相当局限。例如,可以通过关节内注射将编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸引入到表现出关节疾病(例如,骨关节炎)的关节中。在一些实施例中,在手术期间或之后施用编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸;在一些实施例中,包括编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸的控释的水凝胶在手术结束时在闭合前施用,以通过随时间提供稳定剂量的编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸来防止减少或消除骨关节炎。

[0115] 编码CRISPR IL-1α或IL-1β基因编辑复合物的核酸的药物制剂可以基本上由在可接受的稀释剂中的基因递送系统(例如,病毒载体)组成,或者可以包括其中包埋了基因递送媒介物的缓释基质。可替代地,在完整的基因递送系统可以从重组细胞(例如腺相关病毒载体)完整产生时,药物制剂可以包括一种或多种产生基因递送系统的细胞。

[0116] 优选地,CRISPR IL-1α或IL-1β编辑复合物是特异性的,即,优先在靶位点(IL-1α或IL-1β)诱导基因组改变,并且不在其他位点诱导改变,或者仅很少在其他位点诱导改变。在某些实施例中,CRISPR IL-1α或IL-1β编辑复合物具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的编辑效率。

[0117] 用于HR的CRISPR/Cas系统中的sgRNA通常包含与靶核酸序列(靶基因座)互补的引导序列(例如crRNA)和与Cas核酸酶(例如Cas9多肽)或其变体或片段相互作用的支架序列(例如tracrRNA)。单链引导RNA(sgRNA)可以包含crRNA和tracrRNA。

[0118] 在表2和12中提供了通过CRISPR-Cas编辑复合物诱导IL-1α或IL-1β基因中的基因组改变的示例性靶序列。在表3和13中提供了用于本公开的组合物、方法和系统的示例性引导RNA。

[0119] 表12.示例性的靶IL-1α和IL-1β基因序列

[0120]

标识符	基因组	基因	外显子	靶序列 5'-3'	PAM
SEQ ID NO: 37	智人	*IL-1α*	4	GCCATAGCTTACATGATAGA	AGG
SEQ ID NO: 38	智人	*IL-1α*	4	TCCTTCTATCATGTAAGCTA	TGG
SEQ ID NO: 39	智人	*IL-1α*	4	CCATGCAGCCTTCATGGAGT	GGG
SEQ ID NO: 40	智人	*IL-1α*	4	TCCATGCAGCCTTCATGGAG	TGG
SEQ ID NO: 41	智人	*IL-1α*	4	AGCTATGGCCCACTCCATGA	AGG
SEQ ID NO: 42	智人	*IL-1α*	4	ATTGATCCATGCAGCCTTCA	TGG
SEQ ID NO: 43	智人	*IL-1α*	4	CCCACTCCATGAAGGCTGCA	TGG
SEQ ID NO: 44	智人	*IL-1α*	4	GCTCTCCTTGAAGGTAAGCT	TGG
SEQ ID NO: 45	智人	*IL-1α*	4	TACCACCATGCTCTCCTTGA	AGG
SEQ ID NO: 46	智人	*IL-1α*	4	GCTTACCTTCAAGGAGAGCA	TGG
SEQ ID NO: 47	智人	*IL-1α*	4	TACCTTCAAGGAGAGCATGG	TGG
SEQ ID NO: 48	智人	*IL-1α*	4	ATGGTGGTAGTAGCAACCAA	CGG
SEQ ID NO: 49	智人	*IL-1α*	4	TGGTGGTAGTAGCAACCAAC	GGG
SEQ ID NO: 50	智人	*IL-1α*	4	CTTCTTCAGAACCTTCCCGT	TGG
SEQ ID NO: 51	智人	*IL-1α*	4	GGTAGTAGCAACCAACGGGA	AGG
SEQ ID NO: 52	智人	*IL-1α*	4	GGAAGGTTCTGAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 53	智人	*IL-1α*	4	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	TGG
SEQ ID NO: 54	智人	*IL-1α*	4	CATCACTGATGATGACCTGG	AGG
SEQ ID NO: 55	智人	*IL-1α*	4	AGTCATTGGCGATGGCCTCC	AGG
SEQ ID NO: 56	智人	*IL-1α*	4	TTCCTCTGAGTCATTGGCGA	TGG
SEQ ID NO: 57	智人	*IL-1β*	4	TCCCATGTGTCGAAGAAGAT	AGG

[0121]

SEQ ID NO: 58	智人	*IL-1β*	4	AACCTATCTTCTTCGACACA	TGG
SEQ ID NO: 59	智人	*IL-1β*	4	ACCTATCTTCTTCGACACAT	GGG
SEQ ID NO: 60	智人	*IL-1β*	4	CTTCGACACATGGGATAACG	AGG
SEQ ID NO: 61	智人	*IL-1β*	4	GTGCAGTTCAGTGATCGTAC	AGG
SEQ ID NO: 62	智人	*IL-1β*	4	GATCACTGAACTGCACGCTC	CGG
SEQ ID NO: 63	智人	*IL-1β*	4	ATCACTGAACTGCACGCTCC	GGG
SEQ ID NO: 64	智人	*IL-1β*	4	CAAAAAAGCTTGGTGATGTC	TGG
SEQ ID NO: 65	智人	*IL-1β*	4	CCATATCCTGTCCCTGGAGG	TGG
SEQ ID NO: 66	智人	*IL-1β*	4	CTGAAAGCTCTCCACCTCCA	GGG
SEQ ID NO: 67	智人	*IL-1β*	4	GCTCCATATCCTGTCCCTGG	AGG
SEQ ID NO: 68	智人	*IL-1β*	4	AGCTCTCCACCTCCAGGGAC	AGG
SEQ ID NO: 69	智人	*IL-1β*	4	GTTGCTCCATATCCTGTCCC	TGG
SEQ ID NO: 70	智人	*IL-1β*	4	GGACAGGATATGGAGCAACA	AGG
SEQ ID NO: 71	家犬	*IL-1α*	3	GTCACAGCTCATATCATAGA	AGG
SEQ ID NO: 72	家犬	*IL-1α*	3	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	GGG
SEQ ID NO: 73	家犬	*IL-1α*	3	GACATGCAGTCCTCATGAAG	TGG
SEQ ID NO: 74	家犬	*IL-1α*	3	GAGCTGTGACCCACTTCATG	AGG
SEQ ID NO: 75	家犬	*IL-1α*	3	GGATGTCTTTGAGATTTCAG	AGG
SEQ ID NO: 76	家犬	*IL-1α*	3	ATTTTCCTTGAAGGTAAGCT	GGG
SEQ ID NO: 77	家犬	*IL-1α*	3	GACATCCCAGCTTACCTTCA	AGG
SEQ ID NO: 78	家犬	*IL-1α*	3	CTTCAAGGAAAATGTGGTAG	TGG
SEQ ID NO: 79	家犬	*IL-1α*	3	GTGGTAGTGGTGGCAGCCAA	TGG
SEQ ID NO: 80	家犬	*IL-1α*	3	TGGTAGTGGTGGCAGCCAAT	GGG
SEQ ID NO: 81	家犬	*IL-1α*	3	CTTCTTTAGAATCTTCCCAT	TGG
SEQ ID NO: 82	家犬	*IL-1α*	3	GGAAGATTCTAAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 83	家犬	*IL-1α*	3	AATGTCTTCCAGGTCATCAT	CGG
SEQ ID NO: 84	家犬	*IL-1α*	3	ATTCATCACCGATGATGACC	TGG
SEQ ID NO: 85	家犬	*IL-1α*	3	ATTGCCAATGACACAGAAGA	AGG
SEQ ID NO: 86	家犬	*IL-1β*	4	CCTCATCTACCAGAGAACTG	TGG
SEQ ID NO: 87	家犬	*IL-1β*	4	CCACAGTTCTCTGGTAGATG	AGG
SEQ ID NO: 88	家犬	*IL-1β*	4	CACAGTTCTCTGGTAGATGA	GGG
SEQ ID NO: 89	家犬	*IL-1β*	4	GCTGGTGGGAGACTTGCAAC	TGG
SEQ ID NO: 90	家犬	*IL-1β*	4	ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG
SEQ ID NO: 91	家犬	*IL-1β*	4	GACTCTTGTTACAGAGCTGG	TGG
SEQ ID NO: 92	家犬	*IL-1β*	4	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	TGG
SEQ ID NO: 93	家犬	*IL-1β*	4	AGCTCTGTAACAAGAGTCTG	AGG
SEQ ID NO: 94	家犬	*IL-1β*	4	CGTGTCAGTCATTGTAGCTT	TGG
SEQ ID NO: 95	家犬	*IL-1β*	4	TCCTGGAGGACCTGTGGGCA	GGG
SEQ ID NO: 96	家犬	*IL-1β*	4	GCTGAAGAAGCCCTGCCCAC	AGG
SEQ ID NO: 97	家犬	*IL-1β*	4	CATCCTCCTGGAGGACCTGT	GGG
SEQ ID NO: 98	家犬	*IL-1β*	4	TCATCCTCCTGGAGGACCTG	TGG
SEQ ID NO: 99	家犬	*IL-1β*	4	GCCCTGCCCACAGGTCCTCC	AGG
SEQ ID NO: 100	家犬	*IL-1β*	4	CTGCCCACAGGTCCTCCAGG	AGG
SEQ ID NO: 101	家犬	*IL-1β*	4	TCTTCAGGTCATCCTCCTGG	AGG

[0122]

SEQ ID NO: 102	家犬	*IL-1β*	4	TGCTCTTCAGGTCATCCTCC	TGG
SEQ ID NO: 103	家犬	*IL-1β*	4	TGTAGCAAAAGATGCTCTTC	AGG
SEQ ID NO: 104	家犬	*IL-1β*	4	TTTTGCTACATCTTTGAAGA	AGG
SEQ ID NO: 105	家马	*IL-1α*	4	GTCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
SEQ ID NO: 106	家马	*IL-1α*	4	CCATGCAGTCCTCAGGAAGT	GGG
SEQ ID NO: 107	家马	*IL-1α*	4	TCCATGCAGTCCTCAGGAAG	TGG
SEQ ID NO: 108	家马	*IL-1α*	4	AAGCTATGACCCACTTCCTG	AGG
SEQ ID NO: 109	家马	*IL-1α*	4	AATGTATCCATGCAGTCCTC	AGG
SEQ ID NO: 110	家马	*IL-1α*	4	CCCACTTCCTGAGGACTGCA	TGG
SEQ ID NO: 111	家马	*IL-1α*	4	GGATGTCTTAGAGGTTTCAG	AGG
SEQ ID NO: 112	家马	*IL-1α*	4	GTTCAGCTTGGATGTCTTAG	AGG
SEQ ID NO: 113	家马	*IL-1α*	4	GCTCTCCTTGAAGTTCAGCT	TGG
SEQ ID NO: 114	家马	*IL-1α*	4	GACATCCAAGCTGAACTTCA	AGG
SEQ ID NO: 115	家马	*IL-1α*	4	GCTGAACTTCAAGGAGAGCG	TGG
SEQ ID NO: 116	家马	*IL-1α*	4	CTTCAAGGAGAGCGTGGTGC	TGG
SEQ ID NO: 117	家马	*IL-1α*	4	CAAGGAGAGCGTGGTGCTGG	TGG
SEQ ID NO: 118	家马	*IL-1α*	4	GTGGTGCTGGTGGCAGCCAA	CGG
SEQ ID NO: 119	家马	*IL-1α*	4	TGGTGCTGGTGGCAGCCAAC	GGG
SEQ ID NO: 120	家马	*IL-1α*	4	CTTCTTCAGAGTCTTCCCGT	TGG
SEQ ID NO: 121	家马	*IL-1α*	4	GGAAGACTCTGAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 122	家马	*IL-1α*	4	AATGGCTTCCAGGTCATCAT	TGG
SEQ ID NO: 123	家马	*IL-1α*	4	GTTCATCACCAATGATGACC	TGG
SEQ ID NO: 124	家马	*IL-1α*	4	TTCTTCTGGATCATTGGCAA	TGG
SEQ ID NO: 125	家马	*IL-1β*	4	GGTGGTGGGAGATTTGCAAC	TGG
SEQ ID NO: 126	家马	*IL-1β*	4	AGTCTTGTTGTAGAGGTGGT	GGG
SEQ ID NO: 127	家马	*IL-1β*	4	AAGTCTTGTTGTAGAGGTGG	TGG
SEQ ID NO: 128	家马	*IL-1β*	4	TGAAAGTCTTGTTGTAGAGG	TGG
SEQ ID NO: 129	家马	*IL-1β*	4	GTTTGAAAGTCTTGTTGTAG	AGG
SEQ ID NO: 130	家马	*IL-1β*	4	ACATGCCATGTCAATCATTG	TGG
SEQ ID NO: 131	家马	*IL-1β*	4	CATGTCAATCATTGTGGCTG	TGG
SEQ ID NO: 132	小家鼠	*IL-1α*	4	GCCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
SEQ ID NO: 133	小家鼠	*IL-1α*	4	TCCTTCTATGATGCAAGCTA	TGG
SEQ ID NO: 134	小家鼠	*IL-1α*	4	GGACATCTTTGACGTTTCAG	AGG
SEQ ID NO: 135	小家鼠	*IL-1α*	4	GATGTCCAACTTCACCTTCA	AGG
SEQ ID NO: 136	小家鼠	*IL-1α*	4	TGTCACCCGGCTCTCCTTGA	AGG
SEQ ID NO: 137	小家鼠	*IL-1α*	4	CTTCACCTTCAAGGAGAGCC	GGG
SEQ ID NO: 138	小家鼠	*IL-1α*	4	ACGTTGCTGATACTGTCACC	CGG
SEQ ID NO: 139	小家鼠	*IL-1α*	4	GTATCAGCAACGTCAAGCAA	CGG
SEQ ID NO: 140	小家鼠	*IL-1α*	4	TATCAGCAACGTCAAGCAAC	GGG
SEQ ID NO: 141	小家鼠	*IL-1α*	4	GGAAGATTCTGAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 142	小家鼠	*IL-1α*	4	CTGCAGGTCATCTTCAGTGA	AGG
SEQ ID NO: 143	小家鼠	*IL-1α*	4	ACCTTCCAGATCATGGGTTA	TGG
SEQ ID NO: 144	小家鼠	*IL-1α*	4	CTCCTTACCTTCCAGATCAT	GGG
SEQ ID NO: 145	小家鼠	*IL-1α*	4	TCCATAACCCATGATCTGGA	AGG

[0123]

SEQ ID NO: 146	小家鼠	*IL-1α*	4	AACCCATGATCTGGAAGGTA	AGG
SEQ ID NO: 147	小家鼠	*IL-1β*	4	GACAGCCCAGGTCAAAGGTT	TGG
SEQ ID NO: 148	小家鼠	*IL-1β*	4	ATCAGGACAGCCCAGGTCAA	AGG
SEQ ID NO: 149	小家鼠	*IL-1β*	4	TGCTTCCAAACCTTTGACCT	GGG
SEQ ID NO: 150	小家鼠	*IL-1β*	4	TGCTCTCATCAGGACAGCCC	AGG
SEQ ID NO: 151	小家鼠	*IL-1β*	4	TGAAGCTGGATGCTCTCATC	AGG
SEQ ID NO: 152	小家鼠	*IL-1β*	4	GCTGCTGCGAGATTTGAAGC	TGG
SEQ ID NO: 153	小家鼠	*IL-1β*	4	CATCAACAAGAGCTTCAGGC	AGG
SEQ ID NO: 154	小家鼠	*IL-1β*	4	GCAGGCAGTATCACTCATTG	TGG
SEQ ID NO: 155	小家鼠	*IL-1β*	4	AGTATCACTCATTGTGGCTG	TGG
SEQ ID NO: 156	小家鼠	*IL-1β*	4	TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG	TGG
SEQ ID NO: 157	小家鼠	*IL-1β*	4	AAGGTCCACGGGAAAGACAC	AGG
SEQ ID NO: 158	小家鼠	*IL-1β*	4	AGCTACCTGTGTCTTTCCCG	TGG
SEQ ID NO: 159	小家鼠	*IL-1β*	4	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC	GGG
SEQ ID NO: 160	小家鼠	*IL-1β*	4	TCCTCATCCTGGAAGGTCCA	CGG
SEQ ID NO: 161	小家鼠	*IL-1β*	4	GCTCATGTCCTCATCCTGGA	AGG
SEQ ID NO: 162	小家鼠	*IL-1β*	4	CCCGTGGACCTTCCAGGATG	AGG
SEQ ID NO: 163	小家鼠	*IL-1β*	4	AGGTGCTCATGTCCTCATCC	TGG
SEQ ID NO: 164	小家鼠	*IL-1β*	4	TTCAAAGATGAAGGAAAAGA	AGG
SEQ ID NO: 165	小家鼠	*IL-1β*	4	AGTACCTTCTTCAAAGATGA	AGG
SEQ ID NO: 167	小家鼠	*IL-1β*	4	TTTTCCTTCATCTTTGAAGA	AGG

[0124] 表13.示例性的CRISPR引导RNA

[0125]

标识符	基因组	基因	外显子	靶序列 5'-3'	PAM
SEQ ID NO: 168	智人	*IL-1α*	4	GCCAUAGCUUACAUGAUAGA	AGG
SEQ ID NO: 169	智人	*IL-1α*	4	UCCUUCUAUCAUGUAAGCUA	UGG
SEQ ID NO: 170	智人	*IL-1α*	4	CCAUGCAGCCUUCAUGGAGU	GGG
SEQ ID NO: 171	智人	*IL-1α*	4	UCCAUGCAGCCUUCAUGGAG	UGG
SEQ ID NO: 172	智人	*IL-1α*	4	AGCUAUGGCCCACUCCAUGA	AGG
SEQ ID NO: 173	智人	*IL-1α*	4	AUUGAUCCAUGCAGCCUUCA	UGG
SEQ ID NO: 174	智人	*IL-1α*	4	CCCACUCCAUGAAGGCUGCA	UGG
SEQ ID NO: 175	智人	*IL-1α*	4	GCUCUCCUUGAAGGUAAGCU	UGG
SEQ ID NO: 176	智人	*IL-1α*	4	UACCACCAUGCUCUCCUUGA	AGG
SEQ ID NO: 177	智人	*IL-1α*	4	GCUUACCUUCAAGGAGAGCA	UGG
SEQ ID NO: 178	智人	*IL-1α*	4	UACCUUCAAGGAGAGCAUGG	UGG
SEQ ID NO: 179	智人	*IL-1α*	4	AUGGUGGUAGUAGCAACCAA	CGG
SEQ ID NO: 180	智人	*IL-1α*	4	UGGUGGUAGUAGCAACCAAC	GGG
SEQ ID NO: 181	智人	*IL-1α*	4	CUUCUUCAGAACCUUCCCGU	UGG
SEQ ID NO: 182	智人	*IL-1α*	4	GGUAGUAGCAACCAACGGGA	AGG
SEQ ID NO: 183	智人	*IL-1α*	4	GGAAGGUUCUGAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 184	智人	*IL-1α*	4	CUCCAGGUCAUCAUCAGUGA	UGG
SEQ ID NO: 185	智人	*IL-1α*	4	CAUCACUGAUGAUGACCUGG	AGG
SEQ ID NO: 186	智人	*IL-1α*	4	AGUCAUUGGCGAUGGCCUCC	AGG

[0126]

SEQ ID NO: 187	智人	*IL-1α*	4	UUCCUCUGAGUCAUUGGCGA	UGG
SEQ ID NO: 188	智人	*IL-1β*	4	UCCCAUGUGUCGAAGAAGAU	AGG
SEQ ID NO: 189	智人	*IL-1β*	4	AACCUAUCUUCUUCGACACA	UGG
SEQ ID NO: 190	智人	*IL-1β*	4	ACCUAUCUUCUUCGACACAU	GGG
SEQ ID NO: 191	智人	*IL-1β*	4	CUUCGACACAUGGGAUAACG	AGG
SEQ ID NO: 192	智人	*IL-1β*	4	GUGCAGUUCAGUGAUCGUAC	AGG
SEQ ID NO: 193	智人	*IL-1β*	4	GAUCACUGAACUGCACGCUC	CGG
SEQ ID NO: 194	智人	*IL-1β*	4	AUCACUGAACUGCACGCUCC	GGG
SEQ ID NO: 195	智人	*IL-1β*	4	CAAAAAAGCUUGGUGAUGUC	UGG
SEQ ID NO: 196	智人	*IL-1β*	4	CCAUAUCCUGUCCCUGGAGG	UGG
SEQ ID NO: 197	智人	*IL-1β*	4	CUGAAAGCUCUCCACCUCCA	GGG
SEQ ID NO: 198	智人	*IL-1β*	4	GCUCCAUAUCCUGUCCCUGG	AGG
SEQ ID NO: 199	智人	*IL-1β*	4	AGCUCUCCACCUCCAGGGAC	AGG
SEQ ID NO: 200	智人	*IL-1β*	4	GUUGCUCCAUAUCCUGUCCC	UGG
SEQ ID NO: 201	智人	*IL-1β*	4	GGACAGGAUAUGGAGCAACA	AGG
SEQ ID NO: 202	家犬	*IL-1α*	3	GUCACAGCUCAUAUCAUAGA	AGG
SEQ ID NO: 203	家犬	*IL-1α*	3	ACAUGCAGUCCUCAUGAAGU	GGG
SEQ ID NO: 204	家犬	*IL-1α*	3	GACAUGCAGUCCUCAUGAAG	UGG
SEQ ID NO: 205	家犬	*IL-1α*	3	GAGCUGUGACCCACUUCAUG	AGG
SEQ ID NO: 206	家犬	*IL-1α*	3	GGAUGUCUUUGAGAUUUCAG	AGG
SEQ ID NO: 207	家犬	*IL-1α*	3	AUUUUCCUUGAAGGUAAGCU	GGG
SEQ ID NO: 208	家犬	*IL-1α*	3	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	AGG
SEQ ID NO: 209	家犬	*IL-1α*	3	CUUCAAGGAAAAUGUGGUAG	UGG
SEQ ID NO: 210	家犬	*IL-1α*	3	GUGGUAGUGGUGGCAGCCAA	UGG
SEQ ID NO: 211	家犬	*IL-1α*	3	UGGUAGUGGUGGCAGCCAAU	GGG
SEQ ID NO: 212	家犬	*IL-1α*	3	CUUCUUUAGAAUCUUCCCAU	UGG
SEQ ID NO: 213	家犬	*IL-1α*	3	GGAAGAUUCUAAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 214	家犬	*IL-1α*	3	AAUGUCUUCCAGGUCAUCAU	CGG
SEQ ID NO: 215	家犬	*IL-1α*	3	AUUCAUCACCGAUGAUGACC	UGG
SEQ ID NO: 216	家犬	*IL-1α*	3	AUUGCCAAUGACACAGAAGA	AGG
SEQ ID NO: 217	家犬	*IL-1β*	4	CCUCAUCUACCAGAGAACUG	UGG
SEQ ID NO: 218	家犬	*IL-1β*	4	CCACAGUUCUCUGGUAGAUG	AGG
SEQ ID NO: 219	家犬	*IL-1β*	4	CACAGUUCUCUGGUAGAUGA	GGG
SEQ ID NO: 220	家犬	*IL-1β*	4	GCUGGUGGGAGACUUGCAAC	UGG
SEQ ID NO: 221	家犬	*IL-1β*	4	ACUCUUGUUACAGAGCUGGU	GGG
SEQ ID NO: 222	家犬	*IL-1β*	4	GACUCUUGUUACAGAGCUGG	UGG
SEQ ID NO: 223	家犬	*IL-1β*	4	UCAGACUCUUGUUACAGAGC	UGG
SEQ ID NO: 224	家犬	*IL-1β*	4	AGCUCUGUAACAAGAGUCUG	AGG
SEQ ID NO: 225	家犬	*IL-1β*	4	CGUGUCAGUCAUUGUAGCUU	UGG
SEQ ID NO: 226	家犬	*IL-1β*	4	UCCUGGAGGACCUGUGGGCA	GGG
SEQ ID NO: 227	家犬	*IL-1β*	4	GCUGAAGAAGCCCUGCCCAC	AGG
SEQ ID NO: 228	家犬	*IL-1β*	4	CAUCCUCCUGGAGGACCUGU	GGG
SEQ ID NO: 229	家犬	*IL-1β*	4	UCAUCCUCCUGGAGGACCUG	UGG
SEQ ID NO: 230	家犬	*IL-1β*	4	GCCCUGCCCACAGGUCCUCC	AGG

[0127]

SEQ ID NO: 231	家犬	*IL-1β*	4	CUGCCCACAGGUCCUCCAGG	AGG
SEQ ID NO: 232	家犬	*IL-1β*	4	UCUUCAGGUCAUCCUCCUGG	AGG
SEQ ID NO: 233	家犬	*IL-1β*	4	UGCUCUUCAGGUCAUCCUCC	UGG
SEQ ID NO: 234	家犬	*IL-1β*	4	UGUAGCAAAAGAUGCUCUUC	AGG
SEQ ID NO: 235	家犬	*IL-1β*	4	UUUUGCUACAUCUUUGAAGA	AGG
SEQ ID NO: 236	家马	*IL-1α*	4	GUCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
SEQ ID NO: 237	家马	*IL-1α*	4	CCAUGCAGUCCUCAGGAAGU	GGG
SEQ ID NO: 238	家马	*IL-1α*	4	UCCAUGCAGUCCUCAGGAAG	UGG
SEQ ID NO: 239	家马	*IL-1α*	4	AAGCUAUGACCCACUUCCUG	AGG
SEQ ID NO: 240	家马	*IL-1α*	4	AAUGUAUCCAUGCAGUCCUC	AGG
SEQ ID NO: 241	家马	*IL-1α*	4	CCCACUUCCUGAGGACUGCA	UGG
SEQ ID NO: 242	家马	*IL-1α*	4	GGAUGUCUUAGAGGUUUCAG	AGG
SEQ ID NO: 243	家马	*IL-1α*	4	GUUCAGCUUGGAUGUCUUAG	AGG
SEQ ID NO: 244	家马	*IL-1α*	4	GCUCUCCUUGAAGUUCAGCU	UGG
SEQ ID NO: 245	家马	*IL-1α*	4	GACAUCCAAGCUGAACUUCA	AGG
SEQ ID NO: 246	家马	*IL-1α*	4	GCUGAACUUCAAGGAGAGCG	UGG
SEQ ID NO: 247	家马	*IL-1α*	4	CUUCAAGGAGAGCGUGGUGC	UGG
SEQ ID NO: 248	家马	*IL-1α*	4	CAAGGAGAGCGUGGUGCUGG	UGG
SEQ ID NO: 249	家马	*IL-1α*	4	GUGGUGCUGGUGGCAGCCAA	CGG
SEQ ID NO: 250	家马	*IL-1α*	4	UGGUGCUGGUGGCAGCCAAC	GGG
SEQ ID NO: 251	家马	*IL-1α*	4	CUUCUUCAGAGUCUUCCCGU	UGG
SEQ ID NO: 252	家马	*IL-1α*	4	GGAAGACUCUGAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 253	家马	*IL-1α*	4	AAUGGCUUCCAGGUCAUCAU	UGG
SEQ ID NO: 254	家马	*IL-1α*	4	GUUCAUCACCAAUGAUGACC	UGG
SEQ ID NO: 255	家马	*IL-1α*	4	UUCUUCUGGAUCAUUGGCAA	UGG
SEQ ID NO: 256	家马	*IL-1β*	4	GGUGGUGGGAGAUUUGCAAC	UGG
SEQ ID NO: 257	家马	*IL-1β*	4	AGUCUUGUUGUAGAGGUGGU	GGG
SEQ ID NO: 258	家马	*IL-1β*	4	AAGUCUUGUUGUAGAGGUGG	UGG
SEQ ID NO: 259	家马	*IL-1β*	4	UGAAAGUCUUGUUGUAGAGG	UGG
SEQ ID NO: 260	家马	*IL-1β*	4	GUUUGAAAGUCUUGUUGUAG	AGG
SEQ ID NO: 261	家马	*IL-1β*	4	ACAUGCCAUGUCAAUCAUUG	UGG
SEQ ID NO: 262	家马	*IL-1β*	4	CAUGUCAAUCAUUGUGGCUG	UGG
SEQ ID NO: 263	小家鼠	*IL-1α*	4	GCCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
SEQ ID NO: 264	小家鼠	*IL-1α*	4	UCCUUCUAUGAUGCAAGCUA	UGG
SEQ ID NO: 265	小家鼠	*IL-1α*	4	GGACAUCUUUGACGUUUCAG	AGG
SEQ ID NO: 266	小家鼠	*IL-1α*	4	GAUGUCCAACUUCACCUUCA	AGG
SEQ ID NO: 267	小家鼠	*IL-1α*	4	UGUCACCCGGCUCUCCUUGA	AGG
SEQ ID NO: 268	小家鼠	*IL-1α*	4	CUUCACCUUCAAGGAGAGCC	GGG
SEQ ID NO: 269	小家鼠	*IL-1α*	4	ACGUUGCUGAUACUGUCACC	CGG
SEQ ID NO: 270	小家鼠	*IL-1α*	4	GUAUCAGCAACGUCAAGCAA	CGG
SEQ ID NO: 271	小家鼠	*IL-1α*	4	UAUCAGCAACGUCAAGCAAC	GGG
SEQ ID NO: 272	小家鼠	*IL-1α*	4	GGAAGAUUCUGAAGAAGAGA	CGG
SEQ ID NO: 273	小家鼠	*IL-1α*	4	CUGCAGGUCAUCUUCAGUGA	AGG
SEQ ID NO: 274	小家鼠	*IL-1α*	4	ACCUUCCAGAUCAUGGGUUA	UGG

[0128]

SEQ ID NO: 275	小家鼠	*IL-1α*	4	CUCCUUACCUUCCAGAUCAU	GGG
SEQ ID NO: 276	小家鼠	*IL-1α*	4	UCCAUAACCCAUGAUCUGGA	AGG
SEQ ID NO: 277	小家鼠	*IL-1α*	4	AACCCAUGAUCUGGAAGGUA	AGG
SEQ ID NO: 278	小家鼠	*IL-1β*	4	GACAGCCCAGGUCAAAGGUU	UGG
SEQ ID NO: 279	小家鼠	*IL-1β*	4	AUCAGGACAGCCCAGGUCAA	AGG
SEQ ID NO: 280	小家鼠	*IL-1β*	4	UGCUUCCAAACCUUUGACCU	GGG
SEQ ID NO: 281	小家鼠	*IL-1β*	4	UGCUCUCAUCAGGACAGCCC	AGG
SEQ ID NO: 282	小家鼠	*IL-1β*	4	UGAAGCUGGAUGCUCUCAUC	AGG
SEQ ID NO: 283	小家鼠	*IL-1β*	4	GCUGCUGCGAGAUUUGAAGC	UGG
SEQ ID NO: 284	小家鼠	*IL-1β*	4	CAUCAACAAGAGCUUCAGGC	AGG
SEQ ID NO: 285	小家鼠	*IL-1β*	4	GCAGGCAGUAUCACUCAUUG	UGG
SEQ ID NO: 286	小家鼠	*IL-1β*	4	AGUAUCACUCAUUGUGGCUG	UGG
SEQ ID NO: 287	小家鼠	*IL-1β*	4	UUGUGGCUGUGGAGAAGCUG	UGG
SEQ ID NO: 288	小家鼠	*IL-1β*	4	AAGGUCCACGGGAAAGACAC	AGG
SEQ ID NO: 289	小家鼠	*IL-1β*	4	AGCUACCUGUGUCUUUCCCG	UGG
SEQ ID NO: 290	小家鼠	*IL-1β*	4	CCUCAUCCUGGAAGGUCCAC	GGG
SEQ ID NO: 291	小家鼠	*IL-1β*	4	UCCUCAUCCUGGAAGGUCCA	CGG
SEQ ID NO: 292	小家鼠	*IL-1β*	4	GCUCAUGUCCUCAUCCUGGA	AGG
SEQ ID NO: 293	小家鼠	*IL-1β*	4	CCCGUGGACCUUCCAGGAUG	AGG
SEQ ID NO: 294	小家鼠	*IL-1β*	4	AGGUGCUCAUGUCCUCAUCC	UGG
SEQ ID NO: 295	小家鼠	*IL-1β*	4	UUCAAAGAUGAAGGAAAAGA	AGG
SEQ ID NO: 296	小家鼠	*IL-1β*	4	AGUACCUUCUUCAAAGAUGA	AGG
SEQ ID NO: 297	小家鼠	*IL-1β*	4	UUUUCCUUCAUCUUUGAAGA	AGG

[0129] 在某些实施例中，引导RNA(例如，单链引导RNA或sgRNA)的序列可以被修饰以增加编辑效率和/或减少脱靶效应。在某些实施例中，引导RNA的序列可以与靶序列相差约1个碱基、约2个碱基、约3个碱基、约4个碱基、约5个碱基、约5个碱基、约6个碱基、约7个碱基、约8个碱基、约9个碱基、约10个碱基、约15个碱基或大于约15个碱基。在某些实施例中，引导RNA的序列可以与靶序列相差约1％、约2％、约3％、约4％、约5％、约6％、约7％、约8％、约9％、约10％、约11％、约12％、约13％、约14％、约15％、约16％、约17％、约18％、约19％、约20％或大于约20％。如本文所用的，与靶序列的差异可以指互补性的程度。

[0130] 在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约95％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约90％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约85％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约80％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约75％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ IDNO.:168-297中的任一个所示的序列至少约70％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:

21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约65％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ IDNO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约60％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约55％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约50％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约45％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约40％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列至少约35％相同。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA与SEQ ID NO.:21-34和SEQ IDNO.:168-297中的任一个所示的序列至少约35％相同。

[0131] 在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有1个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有2个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有3个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有4个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ IDNO.:168-297中的任一个所示的序列具有4个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有6个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ IDNO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有7个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有8个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有9个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有10个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有11个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ IDNO.:168-297中的任一个所示的序列具有12个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有13个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ IDNO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一个所示的序列具有14个碱基取代。在某些实施例中，与本公开的组合物、方法或系统一起使用的引导RNA在SEQ ID NO.:21-34和SEQ ID NO.:168-297中的任一

个所示的序列具有15个碱基取代。

[0132] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成和/或能够敲低SEQ IDNO.:7-20和SEQ ID NO.:37-167中的任一个所示的靶基因的表达。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子1的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子2的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子3的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子4的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子5的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子6的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子7的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1α基因的外显子8的至少一部分结合来敲低人IL-1α基因。

[0133] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子1的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子2的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子3的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子4的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子5的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子6的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与人IL-1β基因的外显子7的至少一部分结合来敲低人IL-1β基因。

[0134] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成和/或能够敲低SEQ IDNO.:7-20和SEQ ID NO.:37-167中的任一个所示的靶基因的表达。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子1的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子2的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子3的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子4的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子5的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子6的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1α基因的外显子7的至少一部分结合来敲低家犬IL-1α基因。

[0135] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子1的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子2的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些

实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子3的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子4的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子5的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子6的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子7的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家犬IL-1β基因的外显子8的至少一部分结合来敲低家犬IL-1β基因。

[0136] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成和/或能够敲低SEQ IDNO.:7-20和SEQ ID NO.:37-167中的任一个所示的靶基因的表达。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子1的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子2的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子3的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子4的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子5的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子6的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1α基因的外显子7的至少一部分结合来敲低家马IL-1α基因。

[0137] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子1的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子2的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子3的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子4的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子5的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子6的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与家马IL-1β基因的外显子7的至少一部分结合来敲低家马IL-1β基因。

[0138] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成和/或能够敲低SEQ IDNO.:7-20和SEQ ID NO.:37-167中的任一个所示的靶基因的表达。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子1的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子2的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子3的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子4的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或

能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子5的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子6的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子7的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1α基因的外显子8的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1α基因。

[0139] 在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子1的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子2的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子3的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子4的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子5的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子6的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。在某些实施例中，本公开的引导RNA被设计成或能够通过与小家鼠IL-1β基因的外显子7的至少一部分结合来敲低小家鼠IL-1β基因。

[0140] 在一些情况下，用重组表达载体将sgRNA引入到细胞(例如，体外细胞，如用于离体疗法的原代细胞，或体内细胞，如患者体内的细胞)，所述重组表达载体包括编码Cas核酸酶(例如，Cas9多肽)或其变体或片段的核苷酸序列。在一些实施例中，sgRNA与Cas核酸酶(例如，Cas9多肽)或其变体或片段复合，以形成基于核糖核蛋白(RNP)的递送系统，用于引入到细胞(例如，体外细胞，如用于离体疗法的原代细胞，或体内细胞，如患者体内的细胞)中。在其他情况下，将sgRNA引入到具有编码Cas核酸酶(例如，Cas9多肽)或其变体或片段的mRNA的细胞(例如，体外细胞，如用于离体疗法的原代细胞，或体内细胞，如患者体内的细胞)中。

[0141] 可以使用本领域技术人员已知的任何方法将任何异源或外源核酸(例如，靶标基因座特异性sgRNA和/或编码Cas9多核苷酸的多核苷酸)引入到细胞中。此类方法包含但不限于电穿孔、核转染、转染、脂转染、转导、显微注射、电注射、电融合、纳米粒子轰击、转化、缀合等。

[0142] sgRNA的核酸序列可以是与靶多核苷酸序列(例如，靶DNA序列)具有足够互补性的任何多核苷酸序列，以与靶序列杂交并指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合。在一些实施例中，当使用合适的比对算法进行最佳比对时，sgRNA的引导序列与其相应的靶序列之间的互补性程度为约或者超过约50％、60％、75％、80％、85％、90％、95％、97.5％、99％或更高。最佳比对可以通过使用用于比对序列的任何合适的算法来确定，其非限制性实例包含Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler变换的算法(例如，Burrows WheelerAligner)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(NovocraftTechnologies，ELAND(Illumina，加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego，Calif))、SOAP(可从soap.genomics.org.cn获得)和Maq(可从maq.sourceforge.net获得)。在一些实施例中，引导序列的长度为约1个核苷酸、2个核苷酸、3个核苷酸、4个核苷酸、5个核苷酸、6个核苷酸、7个核苷酸、8个核苷酸、9个核苷酸、10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个

核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸、35个核苷酸、40个核苷酸、45个核苷酸、50个核苷酸、75个核苷酸或多个核苷酸。在一些情况下，引导序列的长度为约20个核苷酸。在其他情况下，引导序列的长度为约15个核苷酸。在其他情况下，引导序列的长度为约25个核苷酸。可以通过任何合适的测定来评估引导序列指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的能力。例如，可以将足以形成CRISPR复合物的CRISPR系统的组分(包含待测试的引导序列)提供给具有相应靶序列的宿主细胞，如通过用编码CRISPR序列的组分的载体转染，然后评估靶序列内的优先切割。类似地，通过提供靶序列、CRISPR复合物的组分，包含待测试的引导序列和不同于测试引导序列的对照引导序列，并比较测试引导序列和对照引导序列的反应之间靶序列处的结合或切割速率，可以在试管中评估靶多核苷酸序列的切割。

[0143] sgRNA的核酸序列可以使用上述基于web的软件中的任一种来选择。用于选择DNA靶向RNA的考虑因素包含用于待使用的Cas核酸酶(例如Cas9多肽)的PAM序列，以及用于最小化脱靶修饰的策略。诸如CRISPR设计工具的工具可以提供用于制备sgRNA、用于评估靶修饰效率和/或评估脱靶位点处的切割的序列。用于选择sgRNA的序列的另一考虑因素包含降低引导序列内的二级结构的程度。二级结构可以通过任何合适的多核苷酸折叠算法来确定。一些程序基于计算最小吉布斯自由能。合适的算法的实例包含mFold(Zuker和Stiegler,《核酸研究(Nucleic Acids Res)》,9(1981),133-148),UNAFold包装(Markham等人,《分子生物学方法(MethodsMol Biol)》,2008,453:3-31)和来自ViennaRNa包装的RNAfold。

[0144] sgRNA可以是约10至约500个核苷酸，例如，约10个核苷酸、15个核苷酸、20个核苷酸、25个核苷酸、30个核苷酸、35个核苷酸、40个核苷酸、45个核苷酸、50个核苷酸、55个核苷酸、60个核苷酸、65个核苷酸、70个核苷酸、75个核苷酸、80个核苷酸、85个核苷酸、90个核苷酸、95个核苷酸、100个核苷酸、105个核苷酸、110个核苷酸、120个核苷酸、130个核苷酸、140个核苷酸、150个核苷酸、160个核苷酸、170个核苷酸、180个核苷酸、190个核苷酸、200个核苷酸、210个核苷酸、220个核苷酸、230个核苷酸、240个核苷酸、250个核苷酸、260个核苷酸、270个核苷酸、280个核苷酸、290个核苷酸、300个核苷酸、310个核苷酸、320个核苷酸、330个核苷酸、340个核苷酸、350个核苷酸、360个核苷酸、370个核苷酸、380个核苷酸、390个核苷酸、400个核苷酸、410个核苷酸、420个核苷酸、430个核苷酸、440个核苷酸、450个核苷酸、460个核苷酸、470个核苷酸、480个核苷酸、490个核苷酸或约500个核苷酸。在一些实施例中，sgRNA是约20至约500个核苷酸，例如，20个核苷酸、25个核苷酸、30个核苷酸、35个核苷酸、40个核苷酸、45个核苷酸、50个核苷酸、55个核苷酸、60个核苷酸、65个核苷酸、70个核苷酸、75个核苷酸、80个核苷酸、85个核苷酸、90个核苷酸、95个核苷酸、100个核苷酸、105个核苷酸、110个核苷酸、115个核苷酸、120个核苷酸、125个核苷酸、130个核苷酸、135个核苷酸、140个核苷酸、145个核苷酸、150个核苷酸、155个核苷酸、160个核苷酸、165个核苷酸、170个核苷酸、175个核苷酸、180个核苷酸、185个核苷酸、190个核苷酸、195个核苷酸、200个核苷酸、205个核苷酸、210个核苷酸、215个核苷酸、220个核苷酸、225个核苷酸、230个核苷酸、235个核苷酸、240个核苷酸、245个核苷酸、250个核苷酸、255个核苷酸、260个核苷酸、265个核苷酸、270个核苷酸、275个核苷酸、280个核苷酸、285个核苷酸、290个核苷酸、295个核苷

酸、300个核苷酸、305个核苷酸、310个核苷酸、315个核苷酸、320个核苷酸、325个核苷酸、330个核苷酸、335个核苷酸、340个核苷酸、345个核苷酸、350个核苷酸、355个核苷酸、360个核苷酸、365个核苷酸、370个核苷酸、375个核苷酸、380个核苷酸、385个核苷酸、390个核苷酸、395个核苷酸、400个核苷酸、405个核苷酸、410个核苷酸、415个核苷酸、420个核苷酸、425个核苷酸、430个核苷酸、435个核苷酸、440个核苷酸、445个核苷酸、450个核苷酸、455个核苷酸、460个核苷酸、465个核苷酸、470个核苷酸、475个核苷酸、480个核苷酸、485个核苷酸、490个核苷酸、495个核苷酸或约500个核苷酸。在一些实施例中，sgRNA是约20至约100个核苷酸，例如，约20个核苷酸，例如，20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸、31个核苷酸、32个核苷酸、33个核苷酸、34个核苷酸、35个核苷酸、36个核苷酸、37个核苷酸、38个核苷酸、39个核苷酸、40个核苷酸、41个核苷酸、42个核苷酸、43个核苷酸、44个核苷酸、45个核苷酸、46个核苷酸、47个核苷酸、48个核苷酸、49个核苷酸、50个核苷酸、51个核苷酸、52个核苷酸、53个核苷酸、54个核苷酸、55个核苷酸、56个核苷酸、57个核苷酸、58个核苷酸、59个核苷酸、60个核苷酸、61个核苷酸、62个核苷酸、63个核苷酸、64个核苷酸、65个核苷酸、66个核苷酸、67个核苷酸、68个核苷酸、69个核苷酸、70个核苷酸、71个核苷酸、72个核苷酸、73个核苷酸、74个核苷酸、75个核苷酸、76个核苷酸、77个核苷酸、78个核苷酸、79个核苷酸、80个核苷酸、81个核苷酸、82个核苷酸、83个核苷酸、84个核苷酸、85个核苷酸、86个核苷酸、87个核苷酸、88个核苷酸、89个核苷酸、90个核苷酸、91个核苷酸、92个核苷酸、93个核苷酸、94个核苷酸、95个核苷酸、96个核苷酸、97个核苷酸、98个核苷酸、99个核苷酸或约100个核苷酸。

[0145] 支架序列可以是约10至约500个核苷酸，例如，约10个核苷酸、15个核苷酸、20个核苷酸、25个核苷酸、30个核苷酸、35个核苷酸、40个核苷酸、45个核苷酸、50个核苷酸、55个核苷酸、60个核苷酸、65个核苷酸、70个核苷酸、75个核苷酸、80个核苷酸、85个核苷酸、90个核苷酸、95个核苷酸、100个核苷酸、105个核苷酸、110个核苷酸、120个核苷酸、130个核苷酸、140个核苷酸、150个核苷酸、160个核苷酸、170个核苷酸、180个核苷酸、190个核苷酸、200个核苷酸、210个核苷酸、220个核苷酸、230个核苷酸、240个核苷酸、250个核苷酸、260个核苷酸、270个核苷酸、280个核苷酸、290个核苷酸、300个核苷酸、310个核苷酸、320个核苷酸、330个核苷酸、340个核苷酸、350个核苷酸、360个核苷酸、370个核苷酸、380个核苷酸、390个核苷酸、400个核苷酸、410个核苷酸、420个核苷酸、430个核苷酸、440个核苷酸、450个核苷酸、460个核苷酸、470个核苷酸、480个核苷酸、490个核苷酸或约500个核苷酸。在一些实施例中，支架序列是约20至约500个核苷酸，例如，20个核苷酸、25个核苷酸、30个核苷酸、35个核苷酸、40个核苷酸、45个核苷酸、50个核苷酸、55个核苷酸、60个核苷酸、65个核苷酸、70个核苷酸、75个核苷酸、80个核苷酸、85个核苷酸、90个核苷酸、95个核苷酸、100个核苷酸、105个核苷酸、110个核苷酸、115个核苷酸、120个核苷酸、125个核苷酸、130个核苷酸、135个核苷酸、140个核苷酸、145个核苷酸、150个核苷酸、155个核苷酸、160个核苷酸、165个核苷酸、170个核苷酸、175个核苷酸、180个核苷酸、185个核苷酸、190个核苷酸、195个核苷酸、200个核苷酸、205个核苷酸、210个核苷酸、215个核苷酸、220个核苷酸、225个核苷酸、230个核苷酸、235个核苷酸、240个核苷酸、245个核苷酸、250个核苷酸、255个核苷酸、260个核苷酸、265个核苷酸、270个核苷酸、275个核苷酸、280个核苷酸、285个核苷酸、290个核苷酸、295个

核苷酸、300个核苷酸、305个核苷酸、310个核苷酸、315个核苷酸、320个核苷酸、325个核苷酸、330个核苷酸、335个核苷酸、340个核苷酸、345个核苷酸、350个核苷酸、355个核苷酸、360个核苷酸、365个核苷酸、370个核苷酸、375个核苷酸、380个核苷酸、385个核苷酸、390个核苷酸、395个核苷酸、400个核苷酸、405个核苷酸、410个核苷酸、415个核苷酸、420个核苷酸、425个核苷酸、430个核苷酸、435个核苷酸、440个核苷酸、445个核苷酸、450个核苷酸、455个核苷酸、460个核苷酸、465个核苷酸、470个核苷酸、475个核苷酸、480个核苷酸、485个核苷酸、490个核苷酸、495个核苷酸或500个核苷酸。在一些实施例中，支架序列是约20至约100个核苷酸，例如，约20个核苷酸，例如，20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸、31个核苷酸、32个核苷酸、33个核苷酸、34个核苷酸、35个核苷酸、36个核苷酸、37个核苷酸、38个核苷酸、39个核苷酸、40个核苷酸、41个核苷酸、42个核苷酸、43个核苷酸、44个核苷酸、45个核苷酸、46个核苷酸、47个核苷酸、48个核苷酸、49个核苷酸、50个核苷酸、51个核苷酸、52个核苷酸、53个核苷酸、54个核苷酸、55个核苷酸、56个核苷酸、57个核苷酸、58个核苷酸、59个核苷酸、60个核苷酸、61个核苷酸、62个核苷酸、63个核苷酸、64个核苷酸、65个核苷酸、66个核苷酸、67个核苷酸、68个核苷酸、69个核苷酸、70个核苷酸、71个核苷酸、72个核苷酸、73个核苷酸、74个核苷酸、75个核苷酸、76个核苷酸、77个核苷酸、78个核苷酸、79个核苷酸、80个核苷酸、81个核苷酸、82个核苷酸、83个核苷酸、84个核苷酸、85个核苷酸、86个核苷酸、87个核苷酸、88个核苷酸、89个核苷酸、90个核苷酸、91个核苷酸、92个核苷酸、93个核苷酸、94个核苷酸、95个核苷酸、96个核苷酸、97个核苷酸、98个核苷酸、99个核苷酸或约100个核苷酸。

[0146] sgRNA的核苷酸可以包含核糖(例如糖)基团、磷酸基团、核碱基或其任何组合中的修饰。在一些实施例中，核糖基团中的修饰包括在核糖的2'位置处的修饰。

[0147] 在一些实施例中，核苷酸包含2'氟-阿拉伯糖核酸、三环-DNA(tc-DNA)、肽核酸、环己烯核酸(CeNA)、锁定核酸(LNA)、乙烯桥连核酸(eNA)、磷酸二酰胺基吗啉代或其组合。

[0148] 经修饰的核苷酸或核苷酸类似物可以包含糖-和/或主链-核糖核苷酸(即，包含对磷酸-糖主链的修饰)。例如，自然或天然RNA的磷酸二酯键可以包含氮或硫杂原子中的至少一种。在一些主链-核糖核苷酸中，与邻近核糖核苷酸连接的磷酸酯基团可以被例如硫代磷酸酯基团替换。在一些糖-核糖核苷酸中，2'部分是选自H、OR、R、卤代、SH、SR、H2、HR、R_2或ON的基团，其中R为C_1-C6烷基、烯基或炔基，并且卤代为F、CI、Br或I。

[0149] 在一些实施例中，核苷酸含有糖修饰。糖修饰的非限制性实例包含2'-脱氧-2'-氟-寡核糖核苷酸(2'-氟-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、2'-氟-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸)、2'-脱氧-2'-脱胺寡核糖核苷酸(2'-氨基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸)、2'-O-烷基寡核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-C-烷基寡核糖核苷酸(2'-O-甲基胞苷-5'-三磷酸、2'-甲基尿苷-5'-三磷酸)、2'-C-烷基寡核糖核苷酸及其异构体(2'-阿拉伯胞苷-5'-三磷酸、2'-阿拉伯尿苷-5'-三磷酸)、叠氮三磷酸盐(2'-叠氮基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、2'-叠氮基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸)及其组合。

[0150] 在一些实施例中，sgRNA含有一个或多个2'-氟修饰、2'-氨基修饰和/或2'-硫基修饰。在一些情况下，修饰是2'-氟胞苷、2'-氟尿苷、2'-氟腺苷、2'-氟鸟苷、2'-氨基胞苷、2'-氨基尿苷、2'-氨基腺苷、2'-氨基鸟苷、2,6-二氨基嘌呤、4-硫代尿苷、5-氨基-烯丙基尿苷、

5-溴尿苷、5-碘尿苷、5-甲基胞苷、核糖-胸苷、2-氨基嘌呤、2'-氨基-丁酰基-苊尿苷、5-氟胞苷和/或5-氟尿苷。

[0151] 在哺乳动物RNA上发现多于96种天然存在的核苷修饰。参见例如,Limbach等人,《核酸研究(Nucleic Acids Research)》,22(12):2183-2196(1994)。核苷酸和核苷酸和核苷的制备是本领域熟知的,并且描述于例如美国专利号4,373,071、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679、5,047,524、5、132,418、5、153,319、5,262,530和5,700,642中。适合于如本文所述的用途的许多核苷和核苷酸是可商购获得的。核苷可以是天然存在的核苷的类似物。在一些情况下,类似物是二氢尿苷、甲基腺苷、甲基胞苷、甲基尿苷、甲基假尿苷、硫尿苷、脱氧胞苷和脱氧尿苷。

[0152] 在一些情况下,本文所述的sgRNA包含核碱基-核糖核苷酸,即含有至少一个非天然存在的核碱基而不是天然存在的核碱基的核糖核苷酸。可以并入到核苷和核苷酸中的核碱基的非限制性实例包含m5C(5-甲基胞苷)、m5U(5-甲基尿苷)、m6A(N6-甲基腺苷)、s2U(2-硫代尿苷)、Um(2'-O-甲基尿苷)、m1A(1-甲基腺苷)、m2A(2-甲基腺苷)、Am(2-1-O-甲基腺苷)、ms2m6A(2-甲硫基-N6-甲基腺苷)、i6A(N6-异戊烯基腺苷)、ms2i6A(2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷)、io 6A(N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)、ms2io6A(2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)、g6A(N6-甘氨酰氨基甲酰腺苷)、t6A(N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷)、ms2t6A(2-甲硫基-N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷)、m6t6A(N6-甲基-N6-苏氨酰氨基甲酰腺苷)、hn6A(N6.-羟基正缬氨酰氨基甲酰腺苷)、ms2hn6A(2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰氨基甲酰腺苷)、Ar(p)(2'-O-核糖腺苷(磷酸))、I(肌苷)、m1l(1-甲基肌苷)、m'1m(1,2'-O-二甲基肌苷)、m3C(3-甲基胞苷)、Cm(2T-o-甲基胞苷)、s2C(2-硫代胞苷)、ac4C(N4-乙酰胞苷)、f5C(5-甲酰胞苷)、m5Cm(5,2-O-二甲基胞苷)、ac4Cm(N4乙酰基2TO-甲基胞苷)、k2C(赖胞苷)、m1G(1-甲基鸟苷)、m2G(N2-甲基鸟苷)、m7G(7-甲基鸟苷)、Gm(2'-O-甲基鸟苷)、m22G(N2,N2-二甲基鸟苷)、m2Gm(N2,2'-O-二甲基鸟苷)、m22Gm(N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷)、Gr(p)(2'-O-核糖鸟苷(磷酸))、yW(怀丁苷(wybutosine))、o2yW(过氧怀丁苷)、OHyW(羟基怀丁苷)、OHyW*(修饰不足的羟基怀丁苷)、imG(怀俄苷(wyosine))、mimG(甲基怀俄苷)、Q(辫苷(queuosine))、oQ(环氧辫苷)、galQ(半乳糖基-辫苷)、manQ(甘露糖基-辫苷)、preQo(7-氰基-7-脱氮鸟苷)、preQi(7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷)、G(古嘌苷(archaeosine))、D(二氢尿苷)、m5Um(5,2'-O-二甲基尿苷)、s4U(4-硫代尿苷)、m5s2U(5-甲基-2-硫代尿苷)、s2Um(2-硫代-2'-O-甲基尿苷)、acp3U(3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷)、ho5U(5-羟基尿苷)、mo5U(5-甲氧基尿苷)、cmo5U(尿苷5-氧基乙酸)、mcmo5U(尿苷5-氧基乙酸甲酯)、chm5U(5-(羧基羟基甲基)尿苷))、mchm5U(5-(羧基羟基甲基)尿苷甲酯)、mcm5U(5-甲氧基羰基甲基尿苷)、mcm5Um(S-甲氧基羰基甲基-2-O-甲基尿苷)、mcm5s2U(5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷)、nm5s2U(5-氨基甲基-2-硫代尿苷)、mnm5U(5-甲基氨基甲基尿苷)、mnm5s2U(5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷)、mnm5se2U(5-甲基氨基甲基-2-硒尿苷)、ncm5U(5-氨基甲酰甲基尿苷)、ncm5Um(5-氨基甲酰甲基-2'-O-甲基尿苷)、cmnm5U(5-羧基甲基氨基甲基尿苷)、cmnm5Um(5-羧基甲基氨基甲基-2-L-O-甲基尿苷)、cmnm5s2U(5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷)、m62A(N6,N6-二甲基腺苷)、Tm(2'-O-甲基肌苷)、m4C(N4-甲基胞苷)、m4Cm(N4,2-O-二甲基胞苷)、hm5C(5-羟基甲基胞苷)、m3U(3-甲基尿苷)、cm5U(5-羧基甲基尿苷)、m6Am(N6,T-O-二甲基腺苷)、rn62Am(N6,N6,0-2-三甲基腺苷)、m2'7G(N2,7-二甲基鸟苷)、m2'2'7G(N2,N2,7-三甲基鸟

苷)、m3Um(3,2T-O-二甲基尿苷)、m5D(5-甲基二氢尿苷)、f5Cm(5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷)、m1Gm(1,2'-O-二甲基鸟苷)、m'Am(1,2-O-二甲基腺苷)、益立诺甲基尿苷(irinomethyluridine))、tm5s2U(S-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷)、imG-14(4-脱甲基鸟苷)、imG2(异鸟苷)、或ac6A(N6-乙酰腺苷)、次黄嘌呤、肌苷、8-氧代-腺嘌呤、其7-取代的衍生物、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5-(C_1-C_6)-烷基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(C_2-C_6)-烯基尿嘧啶、5-(C_2-C_6)-炔基尿嘧啶、5-(羟甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-(C_1-C_6)-烷基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-(C_2-C_6)-烯基胞嘧啶、5-(C_2-C_6)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N^2-二甲基鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮-7-取代的鸟嘌呤、7-脱氮-7-(C2-C6)炔基鸟嘌呤、7-脱氮-8-取代的鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、8-氧代鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,4-二氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、8-氮杂嘌呤、取代的7-脱氮嘌呤、7-脱氮-7-取代的嘌呤、7-脱氮-8-取代的嘌呤及其组合。

[0153] sgRNA可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法合成。在一些实施例中,sgRNA是化学合成的。修饰的sgRNA可以使用2'-O-硫代氨基甲酸酯保护的核苷亚磷酰胺合成。方法描述于例如Dellinger等人,《美国化学学会杂志(J.American ChemicalSociety)》,133,11540-11556(2011);Threlfall等人,《有机和生物分子化学(Organic&Biomolecular Chemistry)》,10,746-754(2012);和Dellinger等人,《美国化学学会杂志》,125,940-950(2003)。经修饰的sgRNA可从例如TriLinkBioTechnology(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA))商购获得。

[0154] 有用的sgRNA的额外详细描述可见于例如Hendel等人,《自然生物技术(NatBiotechnol)》,2015,33(9):985-989和Dever等人,《自然(Nature)》,2016,539:384-389中,本公开出于所有目的通过引用以其整体并入本文中。

[0155] 本领域技术人员将理解,如本公开中所公开的引导RNA可以与本领域已知的任何Cas蛋白(例如,来自任何合适的生物体或细菌物种的任何Cas类型)组合使用。

[0156] Cas蛋白可以是I型、II型、III型、IV型、V型或VI型Cas蛋白。Cas蛋白可以包括一个或多个结构域。结构域的非限制性实例包含引导核酸识别和/或结合结构域、核酸酶结构域(例如,DNA酶或RNA酶结构域、RuvC、HNH)、DNA结合结构域、RNA结合结构域、解旋酶结构域、蛋白质-蛋白质相互作用结构域和二聚化结构域。引导核酸识别和/或结合结构域可以与引导核酸相互作用。核酸酶结构域可以包括用于核酸切割的催化活性。核酸酶结构域可能缺乏阻止核酸切割的催化活性。Cas蛋白可以是与其他蛋白质或多肽融合的嵌合Cas蛋白。Cas蛋白可以是各种Cas蛋白的嵌合体,例如包括来自不同Cas蛋白的结构域。

[0157] Cas蛋白的非限制性实例包含c2c1、C2c2、c2c3、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(CasD)、Cash、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9(Csn1 or Csx12)、Cas10、Cas10d、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Cpf1、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(CasA)、Cse2(CasB)、Cse3(CasE)、Cse4(CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cul966,和其同系物或修饰形式。

[0158] Cas蛋白可以来自任何合适的生物体。非限制性的实例包含化脓性链球菌,嗜热链球菌,链球菌属的种、金黄色葡萄球菌、达氏拟诺卡氏菌(Nocardiopsis dassonvillei)、始

旋链霉菌(Streptomyces pristinae spiralis)、绿色产色链霉菌(Streptomyces viridochromo genes)、绿色产色链霉菌、玫瑰色链孢囊菌、玫瑰色链孢囊菌、酸热脂环酸杆菌(AlicyclobacHlus acidocaldarius)、假蕈状芽孢杆菌(Bacillus pseudomycoides)、亚硒酸芽孢杆菌(Bacillus selenitireducens)、西伯利亚微小杆菌(Exiguobacterium sibiricum)、德氏乳杆菌(Lactobacillus delbrueckii)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)、海洋微颤菌(Microscilla marina)、伯克霍尔德氏菌(Burkholderiales bacterium)、食萘极地单胞菌(Polaromonas naphthalenivorans)、极单胞菌属的种、瓦氏鳄球藻(Crocosphaera watsonii)、蓝丝菌属的种、铜绿微囊藻(Microcystis aeruginosa)、铜绿假单胞菌、聚球藻属的种、阿拉伯醋杆菌、丹氏制氨菌(Ammonifex degensii)、贝氏热解纤维素(Caldicelulosiruptorbecscii)、脱硫白假丝酵母(Candidatus Desulforudis)、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、大芬戈尔德菌(Finegoldia magna)、嗜热盐碱厌氧菌(Natranaerobius thermophilus)、Pelotomaculum thermopropionicum、嗜热丙酸厌氧肠状菌(Pelotomaculum thermopropionicum)、喜温嗜酸硫杆菌(Acidithiobacillus caldus)、氧化亚铁硫杆菌(Acidithiobacillus ferrooxidans)、Allochromatium vinosum、海杆菌属的种、嗜盐亚硝化球菌(Nitrosococcus halophilus)、瓦氏亚硝化球菌(Nitrosococcus watsoni)、游海假交替单胞菌(Pseudoalteromonas haloplanktis)、消旋纤线杆菌(Ktedonobacter racemifer)、调查甲烷盐菌(Methanohalobiumevestigatum)、多变鱼腥藻(Anabaena variabilis)、泡沫节球藻(Nodularia spumigena)、念珠藻属的种(Nostoc sp.)、极大节旋藻(Arthrospira maxima)、钝顶节旋藻(Arthrospira platensis)、节旋藻属的种(Arthrospira sp.)、林氏藻属的种(Lyngbya sp.)、原型微鞘藻(Microcoleus chthonoplastes)、颤藻属的种(Oscillatoria sp.)、运动石袍菌(Petrotoga mobilis)、非洲栖热腔菌(Thermosipho africanus)、海洋无核氯菌(Acaryochloris marina)、沙氏纤毛菌(Leptotrichia shahii)和凶手弗朗西斯菌(Francisellanovicida)。在一些方面,生物体是化脓性链球菌(化脓性链球菌(S.pyogenes))。在一些方面,生物体是金黄色葡萄球菌(金黄色葡萄球菌(S.aureus))。在一些方面,生物体是嗜热链球菌(嗜热链球菌(S.thermophilus))。

[0159] Cas蛋白可以衍生自多种细菌物种,包含但不限于,韦永氏球菌(Veillonella atypical)、具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum)、龈沟产线菌(Filifactor alocis)、莫雷梭菌(Solobacterium moorei)、灵巧粪球菌(Coprococcus catus)、齿垢密螺旋体(Treponema denticola)、杜氏裂孔菌(Peptoniphilus duerdenii)、Catenibacterium mitsuokai、变形链球菌(Streptococcus mutans)、无害李斯特菌(Listeria innocua)、假中间葡萄球菌(Staphylococcus pseudintermedius)、肠氨基酸球菌(Acidaminococcus intestine)、龈乳杆菌(Olsenellauli)、北原酒球菌(Oenococcus kitaharae)、两歧双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)、鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)、加氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)、大芬戈尔德菌(Finegoldia magna)、运动支原体(Mycoplasma mobile)、鸡败血支原体(Mycoplasma gallisepticum)、绵羊肺炎支原体(Mycoplasma ovipneumoniae)、犬支原体(Mycoplasma canis)、滑膜囊支原体(Mycoplasma synoviae)、直肠真杆菌(Eubacterium rectale)、嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)、细长真

杆菌(Eubacterium dolichum)、棒状乳杆菌棒状曲亚种(Lactobacillus coryniformis subsp.Torquens)、营养泥杆菌(Ilyobacterpolytropus)、白色瘤胃球菌(Ruminococcus albus)、嗜黏蛋白阿克曼菌(Akkermansiamuciniphila)、解纤维素热酸菌(Acidothermus cellulolyticus)、长双歧杆菌(Bifidobacterium longum)、齿双歧杆菌(Bifidobacterium dentium)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheria)、微小拟杆菌(Elusimicrobium minutum)、卤水硝酸盐裂解菌(Nitratifractor salsuginis)、Sphaerochaeta globus、产琥珀酸丝状杆菌产琥珀酸亚种(Fibrobacter succinogenes subsp.Succinogenes)、脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(Capnocytophaga ochracea)、沼泽红假单胞菌(Rhodopseudomonas palustris)、Prevotella micans、反刍瘤胃亚菌(Prevotella ruminicola)、柱状黄杆菌(Flavobacteriumcolumnare)、贫食氨基单胞菌(Aminomonas paucivorans)、深红红螺菌(Rhodospirillum rubrum)、Candidatus Puniceispirillum marinum、艾森氏蠕形杆菌(Verminephrobacter eiseniae)、蒲桃雷尔氏菌(Ralstonia syzygii)、芝氏沟鞭藻玫瑰杆菌(Dinoroseobacter shibae)、偶氮螺菌(Azospirillum)、汉氏硝化细菌(Nitrobacterhamburgensis)、慢生根瘤菌(Bradyrhizobium)、产琥珀酸沃廉菌(Wolinella succinogenes)、空肠弯曲杆菌空肠亚种(Campylobacter jejuni subsp.Jejuni)、雪貂螺杆菌(Helicobacter mustelae)、蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)、Acidovorax ebreus、产气荚膜梭菌(Clostridium perjringens)、食清洁剂细小棒菌(Parvibaculum lavamentivorans)、肠道罗斯拜瑞氏菌(Roseburia intestinalis)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseriameningitidis)、多杀性巴氏杆菌多杀性亚种(Pasteurella multocida subsp.Multocida)、华德萨特菌(Sutterella wadsworthensis)、变形杆菌(proteobacterium)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、排泄物副腺杆菌(Parasutterella excrementihominis)、产琥珀酸沃廉菌(Wolinella succinogenes)和新凶手弗朗西丝氏菌(Francisella novicida)。在这种情况下,术语“衍生的”被定义为从天然存在的各种细菌物种修饰而来,以保持与天然存在的各种细菌物种的显著部分或显著同源性。显著部分可以是至少10个连续核苷酸、至少20个连续核苷酸、至少30个连续核苷酸、至少40个连续核苷酸、至少50个连续核苷酸、至少60个连续核苷酸、至少70个连续核苷酸、至少80个连续核苷酸、至少90个连续核苷酸或至少100个连续核苷酸。显著同源性可以是至少50%同源性、至少60%同源性、至少70%同源性、至少80%同源性、至少90%同源性或至少95%同源性。可以修饰衍生的物种,同时保留天然存在的种类的活性。

[0160] 基因编辑方法

[0161] 如上文所讨论的,本公开的实施例提供了用于治疗关节病症的组合物和方法,其中关节细胞的一部分经由基因编辑被基因修饰以治疗关节病症。本公开的实施例包括通过向滑膜细胞的群体中的核苷酸插入(RNA或DNA)或重组蛋白插入进行基因编辑,用于促进一种或多种蛋白质的表达和抑制一种或多种蛋白质的表达两者以及其组合。本公开的实施例还提供了用于将基因编辑组合物递送到关节细胞,并且特别是将基因编辑组合物递送到滑膜细胞的方法。存在几种可以用于基因修饰关节细胞的基因编辑技术,这些技术适合根据本发明使用。

[0162] 在一些实施例中,基因修饰关节细胞的方法包含稳定地并入用于产生一种或多种

蛋白质的基因的步骤。在一个实施例中，基因修饰关节滑膜细胞的一部分的方法包含逆转录病毒转导的步骤。在一个实施例中，基因修饰关节滑膜细胞的一部分的方法包含慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统是本领域已知的，并且描述于例如Levine等人，《美国国家科学院院刊》，2006,103,17372-77；Zufferey等人，《自然生物技术》，1997,15,871-75；Dull等人，《病毒学杂志》，1998,72,8463-71和美国专利第6,627,442号，这些文献中的每一个的公开通过引用并入本文。在一个实施例中，基因修饰关节滑膜细胞的一部分的方法包含γ-逆转录病毒转导的步骤。γ-逆转录病毒转导系统是本领域已知的，并且描述于例如Cepko和Pear，《分子生物学中的当前方案》，1996,9.9.1-9.9.16，其公开通过引用并入本文。在一个实施例中，基因修饰关节的滑膜细胞的一部分的方法包含转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统在本领域中是已知的，并且包含其中转座酶作为DNA表达载体被提供或作为可表达的RNA或蛋白质被提供以使得在转基因细胞中不发生转座酶的长期表达的系统，例如转座酶作为mRNA(例如包括帽和poly-A尾的mRNA)被提供。适合的转座子介导的基因转移系统，包含鲑鱼型Tel样转座酶(SB或睡美人转座酶)，如SB10、SB11和SB100x，以及具有增加的酶促活性的工程改造的酶，被描述在例如Hackett等人，《分子疗法(Mol.Therapy)》，2010,18,674-83和美国专利第6,489,458号中，这些文献中的每一个的公开通过引用并入本文。

[0163] 在一些方面，病毒载体或系统用于将基因编辑系统引入到包括关节的细胞中。在一些方面，细胞是滑膜成纤维细胞。在一些方面，病毒载体是AAV载体。在一些方面，AAV载体包括选自由以下组成的群组的血清型：AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10和AAV-DJ/8。在一些方面，AAV载体包括选自由以下组成的群组的血清型：AAV1、AAV5、AAV6、AAV6(Y705F/Y731F/T492V)、AAV8、AAV9和AAV9(Y731F)。

[0164] 在一些方面，病毒载体是慢病毒。在一方面，慢病毒选自由以下组成的群组：人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)、人类免疫缺陷病毒-2(HIV-2)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫科动物免疫缺陷病毒(FIV)、牛科动物免疫缺陷病毒(BIV)、杰姆布拉纳病毒(Jembrana Disease Virus)(JDV)、马科动物传染性贫血病毒(EIAV)和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

[0165] 在一个实施例中，基因修饰关节的滑膜细胞的一部分的方法包含稳定地并入基因以用于产生或抑制(例如，沉默)一种或多种蛋白质的步骤。在一个实施例中，基因修饰关节的滑膜细胞的一部分的方法包含脂质体转染的步骤。脂质体转染方法，如使用在经过滤的水中的阳离子脂质N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)的1:1(w/w)脂质体配方的方法，在本领域中是已知的，并描述在Rose等人，《生物技术(Biotechniques)》，1991,10,520-525和Felgner等人，《美国国家科学院院刊》，1987,84,7413-7417；以及美国专利号5,279,833；5,908,635；6,056,938；6,110,490；6,534,484；和7,687,070中，这些文献中的每一个的公开通过引用并入本文。在一个实施例中，基因修饰关节滑膜细胞的一部分的方法包含使用在美国专利号5,766,902；6,025,337；6,410,517；6,475,994；和7,189,705中描述的方法进行转染的步骤；这些专利中的每一个的公开通过引用并入本文。

[0166] 根据一个实施例，基因编辑过程可以包括使用在一个或多个免疫检查点基因处介

导双链或单链断裂的产生的可编程核酸酶。此类可编程核酸酶能够通过在特定基因组基因座处引入断裂进行精确的基因组编辑，即它们依靠基因组内特定DNA序列的识别以将核酸酶结构域靶向该位置，并在所述靶序列处介导双链断裂的产生。DNA中的双链断裂随后将内源性修复机制募集到断裂位点，以通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)介导基因组编辑。因此，断裂的修复可以导致破坏(例如沉默、抑制或增强)靶基因产物的插入/缺失突变的引入。

[0167] 已经开发的能够进行位点特异性基因组编辑的核酸酶的主要类别包含锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样核酸酶(TALEN)和CRISPR相关核酸酶(例如CRISPR-Cas9)。这些核酸酶系统可以基于其DNA识别模式被大致分为两类：ZFN和TALEN经由蛋白质-DNA相互作用实现特异性DNA结合，而CRISPR系统如Cas9通过直接与靶DNA碱基配对的短RNA引导分子并通过蛋白质-DNA相互作用靶向特定DNA序列。参见例如，Cox等人，《自然医学(NatureMedicine)》,2015,第21卷,第2期。

[0168] 可以根据本公开的方法使用的基因编辑方法的非限制性实例包含CRISPR方法、TALE方法和ZFN方法，它们在下文更详细地描述。

[0169] CRISPR方法

[0170] 用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物包括基因编辑系统，其中所述基因编辑系统靶向至少一个与关节功能相关的基因座，其中通过CRISPR方法(例如CRISPR-Cas9、CRISPR-Cas13a或CRISPR/Cpf1(也被称为CRISPR-Cas12a))对关节的滑膜细胞的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例，使用CRISPR方法对关节滑膜细胞进行基因编辑使在关节的滑膜细胞的至少一部分中一个或多个免疫检查点基因的表达被沉默或降低。

[0171] CRISPR代表“成簇的规律间隔的短回文重复序列”。使用CRISPR系统进行基因编辑的方法在本文中也被称为CRISPR方法。存在三种类型的CRISPR系统，它们并入RNA和Cas蛋白并且可以根据本公开使用：II型、V型和VI型。II型CRISPR(由Cas9例示)是表征最充分的系统之一。

[0172] CRISPR技术改编自细菌和古细菌(单细胞微生物域)的自然防御机制这些生物体使用CRISPR来源的RNA和各种Cas蛋白(包含Cas9)，通过切断并破坏外来入侵者的DNA或RNA，抵御病毒和其他外来体的激发。CRISPR是具有两个明显特征的DNA的特殊化区：核苷酸重复序列和间隔子的存在。核苷酸的重复序列分布在整个CRISPR区中，其中外来DNA(间隔子)的短区段散布在重复的序列之间。在II型CRISPR-Cas系统中，将间隔子整合在CRISPR基因组基因座内，并转录和加工成短CRISPR RNA(crRNA)。这些crRNA与反式活化的crRNA(tracrRNA)退火，并且指导通过Cas蛋白对致病性DNA的序列特异性切割和沉默。通过Cas9蛋白的靶向识别需要crRNA内的“种子”序列和crRNA结合区上游的保守的含二核苷酸的前间区序列邻近基序(PAM)序列。因此，可以通过重新设计crRNA来使CRISPR-Cas系统重新靶向以切割几乎任何DNA序列。天然系统中的crRNA和tracrRNA可以被简化成大约100个核苷酸的单链引导RNA(sgRNA)，用于基因工程改造。CRISPR-Cas系统可通过共递送表达Cas9核酸内切酶的质粒以及必要的crRNA和tracrRNA(或sgRNA)组分被直接移植到人细胞中。Cas蛋白的不同变体可以用于减少靶向限制(例如CasCas9的直系同源物，如Cpf1)。

[0173] CRSIPR-Cas介导的同源重组

[0174] 用于同源重组(HR)的CRISPR-Cas系统包含Cas核酸酶(e例如Cas9核酸酶)或其变

体或片段、含有将Cas核酸酶靶向靶基因组DNA的引导序列和与Cas核酸酶相互作用的支架序列的DNA靶向RNA(例如单链引导RNA(sgRNA))以及供体模板。CRISPR-Cas系统可以用于在细胞的基因组中的期望的靶基因基因座处产生双链断裂,并且利用细胞的内源机制通过同源定向修复(HDR)来修复诱导的断裂。

[0175] CRISPR-Cas9核酸酶可以促进由AAV载体递送的外源DNA的基因座特异性染色体整合。通常,可以被整合的外源DNA(例如,转基因、表达盒等)的大小受到AAV载体的DNA包装容量的限制,其为约4.0kb。通过包括同源重组所必需的两个同源臂,单个AAV载体仅可以递送小于约3.7kb的外源DNA。本文所述的方法允许通过在两种不同的AAV载体之间拆分核苷酸序列来递送为4kb或更长的外源DNA。供体模板被设计成用于可以整合和融合核苷酸序列的两个部分的连续同源重组事件。

[0176] 本公开的同源重组可以使用用于基因组编辑的经工程改造的核酸酶系统进行,如但不限于CRISPR-Cas核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应物核酸酶(TALEN)、工程改造的巨核酸酶。在一个方面,使用基于CRISPR-Cas的核酸酶系统。有用的核酸酶系统的详细描述可以在例如Gaj等人,《生物技术趋势(Trends Biotechnol)》,2013年7月,31(7):397-405中找到。

[0177] 任何合适的CRISPR/Cas系统可以用于本文公开的方法和组合物。CRISPR/Cas系统可以使用各种命名系统来指代。示例性的命名系统在Makarova,K.S.等人,“CRISPR-Cas系统的更新进化分类(An updated evolutionary classification ofCRISPR-Cas systems)”,《自然生物技术综述(Nat Rev Microbiol)》,(2015)13:722-736和Shmakov,S.等人,“不同2类CRISPR-Cas系统的发现和功能表征(Discovery and Functional Characterization ofDiverse Class 2CRISPR-Cas Systems)”,《分子细胞(Mol Cell)》,(2015)60:1-13中提供。CRISPR/Cas系统可以是I型、II型、III型、IV型、V型、VI型系统或任何其他合适的CRISPR/Cas系统。如本文所用的,CRISPR/Cas系统可以是类别1、类别2或任何其他适当分类的CRISPR/Cas系统。1类CRISPR/Cas系统可以使用多种Cas蛋白的复合物来实现调节。1类CRISPR/Cas系统可以包括例如I型(例如I、IA、IB、IC、ID、IE、IF、IU)、III型(例如III、IIIA、IIIB、IIIC、IIID)和IV型(例如IV、IVA、IVB)CRISPR/Cas型。2类CRISPR/Cas系统可以使用单个大Cas蛋白来实现调节。2类CRISPR/Cas系统可以包括例如II型(例如II、IIA、IIB)和V型CRISPR/Cas型。CRISPR系统可以彼此互补,和/或可以以反式形式提供功能单元,以促进CRISPR基因座靶向。

[0178] 在一些实施例中,编码Cas核酸酶的核苷酸序列存在于重组表达载体中。在某些情况下,重组表达载体是病毒构建体,例如重组腺相关病毒构建体、重组腺病毒构建体、重组慢病毒构建体等。例如,病毒载体可以基于牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、腺相关病毒、SV40、单纯疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒等。逆转录病毒载体可以基于鼠白血病病毒、脾坏死病毒和衍生自逆转录病毒的载体,如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒(Harvey Sarcoma Virus)、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒、乳腺肿瘤病毒等。有用的表达载体是本领域技术人员已知的,并且许多是可商购获得的。以下载体通过例如真核宿主细胞提供:pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVLSV40。然而,可以使用任何其他载体,如果其与宿主细胞相容的话。例如,含有编码Cas9酶的核苷酸序列的有用表达载体可从例如Addgene、Life Technologies、Sigma-Aldrich和Origene商购获得。

[0179] 宿主细胞对于产生感染性AAV载体以及基于所公开的AAV载体产生AAV病毒粒子是必需的。各种宿主细胞是本领域已知的，并且可用于本公开的方法中。本文所述的或本领域已知的任何宿主细胞可以与本文所述的组合物和方法一起使用。

[0180] 在一些实施例中，用于产生感染性病毒粒子的宿主细胞可以选自任何生物生物体，包含原核(例如，细菌)细胞和真核细胞，包含昆虫细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞。可以使用多种细胞，例如哺乳动物细胞，包含例如鼠科动物细胞和灵长类动物细胞(例如人类细胞)。特别期望的宿主细胞选自任何哺乳动物物种，包含但不限于，细胞如A549、WEHI、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、WI38、HeLa、CHO、293、Vero、NIH 3T3、PC12、Huh-7 Saos、C2C12、RAT1、Sf9、L细胞、HT1080、人胚胎肾(HEK)、人胚胎肾(HEK)、人胚胎干细胞、人成体组织干细胞、多能干细胞、诱导多能干细胞、重编程干细胞、器官样干细胞、骨髓干细胞、HLHepG2、HepG2和来源于哺乳动物(包含人、猴、小鼠、大鼠、兔和仓鼠)的原代成纤维细胞、肝细胞和成肌细胞。对所用细胞的要求是它能够通过AAV载体进行感染或转染。在一些实施例中，宿主细胞是具有在细胞中稳定转染的rep和cap的宿主细胞。

[0181] 在一些实施例中，根据本公开的宿主细胞的制备涉及诸如所选DNA序列的组装的技术。此组装可以利用常规技术来实现。此类技术包含熟知并在上文引用的Sambrook等人中描述的cDNA和基因组克隆、腺病毒和AAV基因组的重叠寡核苷酸序列的使用、与聚合酶链反应组合的使用、合成方法和用于提供期望的核苷酸序列的任何其他合适的方法。

[0182] 除了AAV载体之外，宿主细胞还可以含有驱动AAV衣壳多肽(在宿主细胞中)表达的序列，以及与在AAV载体中发现的AAV反向末端重复序列(ITR)的血清型或交叉互补血清型相同血清型的rep(复制)序列。AAV衣壳和rep(复制)序列可以独立地从AAV源获得，并且可以以本领域技术人员已知的或如本文所述的任何方式引入到宿主细胞中。另外，当在AAV8衣壳中对AAV载体进行假分型时，例如编码必需rep(复制)蛋白中的每一个的序列可以由AAV8提供，或编码rep(复制)蛋白的序列可以由不同的AAV血清型(例如，AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7和/或AAV9)提供。

[0183] 在一些实施例中，宿主细胞稳定地含有在合适的启动子的控制下的衣壳蛋白。在一些实施例中，衣壳蛋白以反式被供应至宿主细胞。当以反式中递送至宿主细胞时，衣壳蛋白可以经由含有指导宿主细胞中所选择的衣壳蛋白的表达所必需的序列的质粒被递送。在一些实施例中，当以反式被递送至宿主细胞时，编码衣壳蛋白的载体还携带包装AAV所需的其他序列，例如rep(复制)序列。

[0184] 在一些实施例中，宿主细胞稳定地含有在合适的启动子的控制下的rep(复制)序列。在另一个实施例中，rep(复制)蛋白以反式被供应至宿主细胞。当以反式被递送至宿主细胞时，rep(复制)蛋白可以经由含有指导宿主细胞中所选的rep(复制)蛋白的表达所必需的序列的质粒被递送。在一些实施例中，当以反式被递送至宿主细胞时，编码衣壳蛋白的载体还携带包装AAV载体所需的其他序列，例如rep(复制)序列。

[0185] 在一些实施例中，rep(复制)和衣壳序列可以以单个核酸分子被转染到宿主细胞中，并且作为未整合的表位稳定存在于细胞中。在另一实施例中，rep(复制)和衣壳序列被稳定地整合到细胞的染色体中。另一个实施例具有在宿主细胞中瞬时表达的rep(复制)和衣壳序列。例如，用于此类转染的有用核酸分子从5'至3'包括启动子、存在于启动子与rep

(复制)基因序列的起始位点之间的任选的间隔子、AAV rep(复制)基因序列以及AAV衣壳基因序列。

[0186] 尽管提供rep(复制)和衣壳的分子可以瞬时存在于宿主细胞中(即,通过转染),但在一些实施例中,rep(复制)和衣壳蛋白中的一个或两个以及控制其表达的启动子稳定地在宿主细胞中表达,例如作为表位或通过整合到宿主细胞的染色体中。用于构建本公开的实施例的方法是常规的基因工程或重组工程技术,如上文参考文献中描述的那些。

[0187] 产生AAV病毒粒子的各种方法是本领域已知的,并且可以用于产生包括本文所述的AAV载体的AAV病毒粒子。通常,所述方法涉及将本公开的AAV载体插入或转导到能够将AAV载体包装到AAV病毒粒子中的宿主细胞中。下文描述并参考了示例性的方法;然而,本领域技术人员已知的任何方法都可以用于生成本公开的AAV病毒粒子。

[0188] 可以使用本领域熟知的方法来构建包括异源核酸(例如,供体模板)并且用于生成AAV病毒粒子的AAV载体。参见,例如,Koerber等人,(2009)《分子疗法(Mol.Ther.)》,17:2088;Koerber等人,(2008)《分子疗法》,16:1703-1709;以及美国专利号7,439,065、6,951,758和6,491,907。例如,可以将异源序列直接插入到AAV基因组中,其中主要AAV开放阅读框("ORF")从其切除。AAV基因组的其他部分也可以缺失,只要保留足够的ITR部分以允许用于复制和包装功能。此类构建体可以使用本领域熟知的技术来设计。参见,例如,美国专利号5,173,414和5,139,941;国际公开号WO 92/01070(1992年1月23日公布)和WO 93/03769(1993年3月4日公布);Lebkowski等人,(1988),《分子细胞生物学(Molec.Cell.Biol.)》,8:3988-3996;Vincent等人,(1990)《疫苗(Vaccines)》,90(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press));Carter,B.J.(1992)《生物技术的当前观点(Current Opinion in Biotechnology)》3:533-539;Muzyczka、N.(1992),《微生物学和免疫学的当前主题(Curr.TopicsMicrobiol.Immunol.)》,158:97-129;Kotin,R.M.(1994)《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》,5:793-801;Shelling和Smith(1994)《基因疗法(Gene Therapy)》1:165-169;和Zhou等人,(1994),《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》,179:1867-1875。

[0189] 为了产生AAV病毒粒子,使用已知技术,如通过转染将AAV载体引入到合适的宿主细胞中。多种转染技术通常是本领域已知的。参见,例如,Graham等人(1973)《病毒学(Virology)》,52:456,Sambrook等人,(1989)《分子克隆,实验室手册(Molecular Cloning,A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室《Cold Spring Harbor Laboratories》,纽约(NewYork),Davis等人,(1986),《分子生物学的基本方法(Basic Methods in Molecular Biology)》,Elsevier和Chu等人(1981),《基因(Gene)》,13:197。特别合适的转染方法包含磷酸钙共沉淀(Graham等人(1973)《病毒学(Virol.)》,52:456-467)、直接微量注射到培养的细胞中(Capecchi、M.R.(1980)Cell 22:479-488)、电穿孔(Shigekawa等人(1988),《生物技术(BioTechniques)》,6:742-751),脂质体介导的基因转移(Mannino等人(1988)《生物技术)》,6:682-690)、脂质介导的转导(Felgner等人(1987)《美国国家科学院院刊》,84:7413-7417)和使用高速微弹轰击的核酸递送(Klein等人,(1987)《自然》327:70-73)。

[0190] 取决于所使用的表达系统,许多转录和翻译控制元件中的任一种,包含启动子、转录增强子、转录终止子等,可以用于表达载体中。有用的启动子可以来源于病毒或任何生物体,例如原核生物体或真核生物体。合适的启动子包含但不限于SV40早期启动子、小鼠哺乳动物肿瘤病毒长末端重复序列(LTR)启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)、单纯疱疹病

毒(HSV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(如CMV即时早期启动子区;CMVIE)、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、人U6小核启动子(U6)、增强U6启动子和人HI启动子(HI)等。

[0191] 在一些实施例中,编码Cas核酸酶的多核苷酸可以用于本公开中。此类多核苷酸(例如,mRNA)可以从例如TriLink BioTechnologies、GE Dharmacon、ThermoFisher等商业获得。

[0192] 在某些实施例中,Cas核酸酶(例如Cas9多肽)可以用于本公开中。有用的Cas9多肽的详细描述可见于例如Hendel等人、《自然生物学》,2015,33(9):985-989和Dever等人,《自然》,2016,539:384-389中,公开出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0193] 在一些实施例中,Cas核酸酶(例如Cas9多肽)与sgRNA复合以形成Cas核糖核蛋白(例如Cas9核糖核蛋白)。Cas核酸酶与sgRNA的摩尔比可以是促进靶向AAV载体和靶基因基因座的连续同源重组的任何范围。在一些实施例中,Cas9多肽与sgRNA的摩尔比为约1:5;1:4;1:3;1:2.5;1:2;或1:1。在其他实施例中,Cas9多肽与sgRNA的摩尔比为约1:2至约1:3。在某些实施例中,Cas9多肽与sgRNA的摩尔比为约1:2.5。

[0194] Cas核酸酶及其变体或片段可以作为Cas多肽或其变体或片段、编码Cas多肽或其变体或片段的mRNA、包括编码Cas多肽或其变体或片段的核苷酸序列的重组表达载体、或Cas核糖核蛋白被引入到细胞(例如,从受试者分离的细胞或体内细胞,如在受试者中)。本领域技术人员将认识到,可以使用递送外源多核苷酸、多肽或核糖核蛋白的任何方法。此类方法的非限制性实例包含电穿孔、核转染、转染、脂转染、转导、显微注射、电注射、电融合、纳米粒子轰击、转化、缀合等。

[0195] 可以经由CRISPR方法通过永久基因编辑滑膜细胞沉默或抑制的基因的非限制性实例包含IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13和TNF-α。

[0196] 可以经由CRISPR方法通过永久基因编辑滑膜细胞增强的基因的非限制性实例包含IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13和TNF-α。

[0197] 用于通过CRISPR方法改变靶基因序列的表达并且可以根据本公开的实施例使用的系统、方法和组合物的实例在美国专利号8,697,359;8,993,233;8,795,965;8,771,945;8,889,356;8,865,406;8,999,641;8,945,839;8,932,814;8,871,445;8,906,616;和8,895,308中描述,其通过引用并入本文。用于执行CRISPR方法的资源,如用于表达CRISPR-Cas9和CRISPR-Cpf1的质粒,可从诸如GenScript等公司商购获得。

[0198] 在一个实施例中,如本文所述的关节滑膜细胞的至少一部分的基因修饰可以使用如在美国专利号US 9,790,490中所述的CRISPR-Cpf1系统进行,该美国专利的公开通过引用并入本文。

[0199] 在一个实施例中,如本文所述的关节滑膜细胞的至少一部分的基因修饰可以使用包含如在美国专利号9,907,863中所述的单个载体系统的CRISPR-Cas系统进行,该美国专利的公开通过引用并入本文。TALE方法

[0200] 用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物包括基因编辑系统,其中所述基因编辑系统靶向与关节功能相关的至少一个基因座,其中所述方法进一步包括通过TALE方法对关节滑膜细胞的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,使用TALE方法靶向与关节功能相关的至少一个基因座,其中对关节的滑膜细胞的至少一部分进行基因编辑。可替代地,在靶向与关节功能相关的至少一个基因座期间使用TALE方法,其中对关节的滑膜细胞

的至少一部分进行基因编辑以使与关节功能基因相关的至少一个基因座的表达在关节滑膜细胞的至少一部分中被增强。

[0201] TALE代表“转录活化剂样效应物”蛋白,其包含TALEN(“转录活化剂样效应物核酸酶”)。使用TALE系统进行基因编辑的方法在本文中也可以被称为TALE方法。TALE是来自植物致病细菌属黄单胞菌属(Xanthomonas)的天然存在的蛋白质,并且含有由各自识别单个碱基对的一系列33-35个氨基酸重复结构域组成的DNA结合结构域。TALE特异性由被称为重复可变双残基(RVD)的两种超可变氨基酸确定。模块化TALE重复序列被连接在一起以识别邻接的DNA序列。DNA结合结构域中的特异性RVD识别靶基因座中的碱基,提供用于组装可预测的DNA结合结构域的结构特征。TALE的DNA结合结构域与IIS型FokI核酸内切酶的催化结构域融合,以形成可靶向的TALE核酸酶。为了诱导位点特异性突变,由14-20个碱基对间隔子分开的两个单独的TALEN臂使FokI单体非常接近以二聚化并产生靶向双链断裂。

[0202] 利用各种组装方法的几项大型系统性研究已经表明,TALE重复序列可以被组合以识别几乎任何用户定义的序列。定制设计的TALE阵列也可以通过Cellectis Bioresearch(Paris、France)、Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington、KY、USA)和Life Technologies(Grand Island、NY、USA)商购获得。适用于本公开中的TALE和TALEN方法描述于美国专利申请公开号US 2011/0201118 A1;US 2013/0117869 A1;US 2013/0315884 A1;US2015/0203871A1和US 2016/0120906A1中,其公开通过引用并入本文。

[0203] 可以通过经由TALE方法对滑膜细胞进行永久基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包含IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13和TNF-α。

[0204] 可以经由TALE方法对滑膜细胞进行永久基因编辑而增强的基因的非限制性实例包含IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13和TNF-α。

[0205] 用于通过TALE方法改变靶基因序列的表达并且可以根据本公开的实施例使用的系统、方法和组合物的实例在美国专利第8,586,526中描述,该美国专利通过引用并入本文。

[0206] 锌指方法

[0207] 用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物包括基因编辑系统,其中所述基因编辑系统靶向与关节功能相关的至少一个基因座,其中所述方法进一步包括通过锌指或锌指核酸酶方法对关节滑膜细胞的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,使用锌指方法靶向与关节功能相关的至少一个基因座,其中对关节的滑膜细胞的至少一部分进行基因编辑。或者,在靶向与关节功能相关的至少一个基因座期间使用锌指方法,其中对关节的滑膜细胞的至少一部分进行基因编辑以使与关节功能基因相关的至少一个基因座的表达在关节滑膜细胞的至少一部分中被增强。

[0208] 单独的锌指在保守的ββα构型中含有大约30个氨基酸。α-螺旋的表面上的几个氨基酸通常与DNA大沟中的3bp接触,具有不同的选择性水平。锌指具有两个蛋白质结构域。第一结构域是DNA结合结构域,其包含真核转录因子并且含有锌指。第二结构域是核酸酶结构域,其包含FokI限制性酶并且负责DNA的催化裂解。

[0209] 单独的ZFN的DNA结合结构域通常含有三至六个单独的锌指重复序列,并且每个锌指重复序列可以识别9至18个碱基对。如果锌指结构域对于其预期靶位点是特异性的,那么理论上,甚至识别总共18个碱基对的一对3指ZFN也可以靶向哺乳动物基因组中的单个基因

座。产生新的锌指阵列的一种方法是组合已知特异性的较小锌指“模块”。最常见的模块化组装过程涉及组合三个单独的锌指，这些锌指各自可以识别3个碱基对DNA序列，以生成可以识别9个碱基对靶位点的3-指阵列。可替代地，基于选择的方法如寡聚体池工程(OPEN)可以用于从随机文库中选择新的锌指阵列，该随机文库考虑了相邻指之间的上下文相关的相互作用。经工程改造的锌指是可商购获得的；Sangamo Biosciences(Richmond，美国加利福尼亚州(CA，USA))已经与Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯(St.Louis，MO，USA))合作开发用于锌指构造的专有平台(CompoZr®)。

[0210] 可以通过经由锌指方法对滑膜细胞进行永久基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包含IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)或NLRP3炎性小体的组分。在一些实施例中，NLRP3炎性小体的组分包括NLRP3、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1及其组合。

[0211] 可以通过经由锌指方法对滑膜细胞进行永久基因编辑而增强的基因的非限制性实例包含包括IL-1Ra、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4及其组合的群组。在一方面，本公开提供了用于上调抗炎细胞因子的组合物。

[0212] 可以根据本公开的实施例使用的用于通过锌指方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例在美国专利号6,534,261、6,607,882、6,746,838、6,794,136、6,824,978、6,866,997、6,933,113、6,979,539、7,013,219、7,030,215、7,220,719、7,241,573、7,241,574、7,585,849、7,595,376、6,903,185和6,479,626中描述，这些专利通过引用并入本文。

[0213] 在一些方面，细胞可以是离体基因编辑的，其中基因编辑靶向一个或多个抗炎细胞因子基因座。在一些方面，细胞是非滑膜细胞。在一些方面，细胞是间充质干细胞。在一些方面，细胞是巨噬细胞。在一些方面，本公开提供了一种用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物，其包括基因编辑的细胞的群体，其中所述基因编辑的细胞由靶向与关节功能相关的至少一个基因座的基因编辑系统编辑。在一方面，将基因编辑的细胞的群体注射到滑膜关节中。

[0214] 可以根据本公开的实施例使用的通过锌指方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的其他实例描述在Beane等人，《分子疗法》，2015，231380-1390，其公开通过引用并入本文。

[0215] 示例性的实施例

[0216] 在一些实施例中，本公开提供了一种用于治疗或预防关节疾病或病状的药物组合物，所述组合物包含治疗有效量的一个或多个核酸，所述核酸编码成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)基因编辑系统。所述系统包含CRISPR相关蛋白质9(Cas9)蛋白和靶向IL-1α或IL-1β基因的至少一个引导RNA，其中所述靶序列邻近Cas9蛋白的前间区序列邻近基序(PAM)序列。

[0217] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子2中

的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子2中的靶序列没有形成错配。

[0218] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子3中的靶序列没有形成错配。

[0219] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子4中的靶序列没有形成错配。

[0220] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子5中的靶序列没有形成错配。

[0221] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子6中的靶序列没有形成错配。

[0222] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子7中的

靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1基因的外显子7中的靶序列没有形成错配。

[0223] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0224] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0225] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0226] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并包含与IL-1α基因的外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0227] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导

RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0228] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0229] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0230] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0231] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α

基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0232] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子5、外显子6或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0233] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少80％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少85％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少90％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少95％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组。

[0234] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与SEQ ID NO:301具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:301。

[0235] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与SEQ ID NO:309具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:309。

[0236] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA

序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少95％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组。

[0237] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子2中的靶序列没有形成错配。

[0238] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子3中的靶序列没有形成错配。

[0239] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子4中的靶序列没有形成错配。

[0240] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子5中的靶序列没有形成错配。

[0241] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因

的外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子6中的靶序列没有形成错配。

[0242] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与人IL-1β基因的外显子7中的靶序列没有形成错配。

[0243] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0244] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0245] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0246] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的

外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0247] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0248] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0249] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0250] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补

的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0251] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0252] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子5、外显子6或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0253] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:462具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:462。

[0254] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:391具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序

列与SEQ ID NO:391具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:391。

[0255] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且包含与SEQ ID NO:393具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:393。

[0256] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且包含与SEQ ID NO:388具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:388。

[0257] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因,并且包含与SEQ ID NO:389具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:389。

[0258] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少90%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少95%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组。

[0259] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:552具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:552。

[0260] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:554具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少90%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:554。

[0261] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:578具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:578。

[0262] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:579具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:579。

[0263] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少90%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少95%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组。

[0264] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与SEQ ID NO:498具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少90%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:498。

[0265] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与SEQ ID NO:506具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少90%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:506。

[0266] 在一些实施例中,药物组合物包含如本文所述的共同包括一个或多个核酸的一个或多个病毒载体。在一些实施例中,一个或多个病毒载体包含选自逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1的重组病毒。在一些实施例中,一个或多个病毒载体包含重组腺相关病毒(AAV)。在一些实施例中,重组AAV是血清型5(AAV5)的。在一些实施例中,重组AAV是血清型6(AAV6)的。

[0267] 在一些实施例中,一个或多个病毒载体包含:第一病毒载体,所述第一病毒载体包括编码所述Cas9蛋白的一个或多个核酸中的第一核酸;以及第二病毒载体,所述第二病毒

载体包括编码所述至少一个引导RNA的一个或多个核酸中的第二核酸。在一些实施例中，一个或多个病毒载体包括有包括单个核酸的病毒载体，其中所述单个核酸编码Cas9蛋白和至少一个引导RNA。

[0268] 在一些实施例中，组合物包含共同包括一个或多个核酸的一个或多个脂质体。在一些实施例中，一个或多个核酸以裸状态存在。

[0269] 在一些实施例中，Cas9蛋白是化脓性链球菌Cas9多肽。在一些实施例中，Cas9蛋白是金黄色葡萄球菌Cas9多肽。

[0270] 在一些实施例中，组合物被配制成用于肠胃外施用。在一些实施例中，组合物被配制成用于受试者的关节内的关节内注射。

[0271] 在另一方面，本公开提供了一种用于治疗或预防有此需要的受试者的关节疾病或病状的方法。所述方法包含向受试者的关节施用药物组合物，所述药物组合物包括药学有效量的组合物，所述组合物包括编码成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)基因编辑系统的一个或多个核酸。所述系统包含CRISPR相关蛋白质9(Cas9)蛋白和靶向IL-1α或IL-1β基因的至少一个引导RNA，其中所述靶序列邻近Cas9蛋白的前间区序列邻近基序(PAM)序列。

[0272] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组的序列具有至少95％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列选自由SEQ ID NOs:298-387组成的群组。

[0273] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与SEQ ID NO:301具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:301具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:301。

[0274] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1α基因，并且包含与SEQ ID NO:309具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:309具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:309。

[0275] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少

90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组的序列具有至少95％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列选自由SEQ ID NOs:388-496组成的群组。

[0276] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:462具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:462具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:462。

[0277] 在一些实施例中，至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:391具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:391具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:391。

[0278] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:393具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:393具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:393。

[0279] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:388具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:388具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:388。

[0280] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向人IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:389具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少90％同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:389具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:389。

[0281] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:522-590组成的群组的序列具有至少95％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列选自由SEQ ID NOs:

522-590组成的群组。

[0282] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:552具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:552具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:552。

[0283] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:554具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少90%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:554具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:554。

[0284] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:578具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:578具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:578。

[0285] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与SEQ ID NO:579具有至少75%同一性的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少80%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少85%的同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少90%同一性。在一些实施例中,crRNA序列与SEQ ID NO:579具有至少95%同一性。在一些实施例中,crRNA序列是SEQ ID NO:579。

[0286] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子2中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子2中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子2中的靶序列没有形成错配。

[0287] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中,

crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子3中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子3中的靶序列没有形成错配。

[0288] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子4中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子4中的靶序列没有形成错配。

[0289] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子5中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子5中的靶序列没有形成错配。

[0290] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子6中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子6中的靶序列没有形成错配。

[0291] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子7中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中,crRNA序列与犬科动物IL-1α基因的外显子7中的靶序列没有形成错配。

[0292] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因,并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所

述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0293] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0294] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0295] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0296] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0297] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述

至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0298] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0299] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0300] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0301] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-

1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子5、外显子6或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1α基因，并且包含与IL-1α基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0302] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组的序列具有至少95％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列选自由SEQ ID NOs:497-551组成的群组。

[0303] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:498具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:498具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:498。

[0304] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与SEQ ID NO:506具有至少75％同一性的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少80％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少85％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少90％的同一性。在一些实施例中，crRNA序列与SEQ ID NO:506具有至少95％同一性。在一些实施例中，crRNA序列是SEQ ID NO:506。

[0305] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，

crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子2中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子2中的靶序列没有形成错配。

[0306] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子3中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子3中的靶序列没有形成错配。

[0307] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子4中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子4中的靶序列没有形成错配。

[0308] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子5中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子5中的靶序列没有形成错配。

[0309] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子6中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子6中的靶序列没有形成错配。

[0310] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过5个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过4个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过3个错配。在一些实施例中，crRNA序

列与犬科动物IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过2个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子7中的靶序列形成不超过1个错配。在一些实施例中，crRNA序列与犬科动物IL-1β基因的外显子7中的靶序列没有形成错配。

[0311] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子3中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0312] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0313] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0314] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0315] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子4中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β

基因的外显子2、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0316] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0317] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0318] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子5中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0319] 在一些实施例中，所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因，并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施

例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0320] 在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子5、外显子6或外显子6中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。在一些实施例中,所述至少一个引导RNA靶向犬科动物IL-1β基因,并且包含与IL-1β基因的外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6或外显子7中的靶序列互补的crRNA序列。

[0321] 通常,本文所述的crRNA序列可以包括一个或多个核苷酸取代,例如相对于靶序列的反向补体。用于制备核苷酸取代的指南可见于例如Jiang等人和Doudna(Jiang and Doudna,《生物物理学年度评论(Annu.Rev.Biophy.)》,46:505-29(2017)),其内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。具体地,Jiang和Doudna考虑为CRISPR/Cas9系统的许多不同确认而生成的分子结构,范围从apo Cas9蛋白(图3)到与入侵的双链DNA分子的靶链结合的Cas9-sgRNA复合物(图5和7),以得出图6中的CRISPR/Cas9结合和切割的详细分子模型。根据这些分子模型,本领域的普通技术人员将知道crRNA序列中的哪些核苷酸位置将更耐受与靶序列的错配。

[0322] 例如,Jiang教导了,PAM-邻近10-12个核苷酸,也被称为crRNA靶向序列的“种子区”,对于稳健的CRISPR/Cas9结合最为关键。具体地,Jiang公开了种子区中的错配“严重损害或完全消除靶DNA结合和切割,而种子区中的紧密同源性通常导致脱靶结合事件,即使在其他地方具有许多错配”,即在PAM-远端8-10核苷酸中。Jiang在512。类似地,Jiang教导“sgRNA的种子区与靶DNA之间的完美互补性对于Cas9介导的DNA靶向和切割是必需的,而非种子区处的不完美的碱基配对对于靶结合特异性的耐受性高得多。同上,省略引用。

[0323] 因此,在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在PAM-远端8-10个核苷酸内包含一个或多个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA序列在PAM-远端8-10个核苷酸内包含一个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA序列在PAM-远端8-10个核

苷酸内包含两个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在PAM-远端8-10个核苷酸内包含三个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在PAM-远端8-10个核苷酸内包含四个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在PAM-远端8-10个核苷酸内包含五个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。

[0324] 因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前8个位置内包含一个或多个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前8个位置内包含一个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前8个位置内包含两个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前8个位置内包含三个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前8个位置内包含四个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前8个位置内包含五个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。

[0325] 类似地，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的前10个位置内包含一个或多个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的前10个位置内包含一个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的前10个位置内包含两个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的前10个位置内包含三个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的前10个位置内包含四个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的前10个位置内包含五个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。

[0326] 此外，Jiang和Doudna假定，在crRNA靶向序列的位置14-17处的PAM-远端核苷酸的碱基配对对于在结合至靶序列之后的切割活性是重要的。

[0327] 因此，在一些实施例中，在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8-10内包含一个或多个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8-10内包含一个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8-10内包含两个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8-10内包含三个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8-10内包含四个核苷酸取代，例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中，crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和

8-10内包含五个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。

[0328] 类似地,在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8内包含一个或多个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8内包含一个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA。在一些实施例中,crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8内包含两个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA。在一些实施例中,crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8内包含三个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA。在一些实施例中,crRNA序列在crRNA序列的核苷酸位置1-3和8内包含四个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个。在一些实施例中,crRNA。

[0329] 在其他实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA的整个序列中包含一个或多个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个,例如如通过实验确定的。在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA的整个序列中包含一个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个,例如如通过实验确定的。在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA的整个序列中包含两个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个,例如如通过实验确定的。在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA的整个序列中包含三个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个,例如如通过实验确定的。在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA的整个序列中包含四个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个,例如如通过实验确定的。在一些实施例中,在本公开的组合物和/或方法中使用的crRNA序列在crRNA的整个序列中包含五个核苷酸取代,例如相对于SEQ ID NOs:298-590中的任一个,例如如通过实验确定的。

[0330] 在一些实施例中,关节疾病或病状是关节炎。在一些实施例中,关节炎是骨关节炎。

[0331] 在一些实施例中,施用包含将药物组合物关节内注射到受试者的关节中。在一些实施例中,药物组合物在手术期间施用。在一些实施例中,药物组合物在手术后施用。在一些实施例中,药物组合物是控释药物组合物。

[0332] 在一些实施例中,药物组合物包含如本文所述的共同包括一个或多个核酸的一个或多个病毒载体。在一些实施例中,一个或多个病毒载体包含选自逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1的重组病毒。在一些实施例中,一个或多个病毒载体包含重组腺相关病毒(AAV)。在一些实施例中,重组AAV是血清型5(AAV5)的。在一些实施例中,重组AAV是血清型6(AAV6)的。

[0333] 在一些实施例中,一个或多个病毒载体包含:第一病毒载体,所述第一病毒载体包括编码所述Cas9蛋白的一个或多个核酸中的第一核酸;以及第二病毒载体,所述第二病毒载体包括编码所述至少一个引导RNA的一个或多个核酸中的第二核酸。在一些实施例中,一个或多个病毒载体包括有包括单个核酸的病毒载体,其中所述单个核酸编码Cas9蛋白和至少一个引导RNA。

[0334] 在一些实施例中，组合物包含共同包括一个或多个核酸的一个或多个脂质体。在一些实施例中，一个或多个核酸以裸状态存在。

[0335] 在一些实施例中，Cas9蛋白是化脓性链球菌Cas9多肽。在一些实施例中，Cas9蛋白是金黄色葡萄球菌Cas9多肽。

[0336] 治疗骨关节炎和其他疾病的方法

[0337] 本文所述的组合物和方法可以用于治疗疾病的方法中。在一个实施例中，它们用于治疗炎性关节病症。它们还可以用于治疗本文所述的其他障碍和在以下段落中。在一方面，所述组合物和方法用于治疗骨关节炎(OA)。

[0338] 在一些实施例中，本公开提供了一种用于治疗或预防关节疾病或病状的方法，所述方法包括引入基因编辑系统，其中所述基因编辑系统靶向与关节功能相关的至少一个基因座。在一些实施例中，关节疾病是骨关节炎。在一方面，所述方法用于治疗患有骨关节炎的犬科动物。在另一方面，所述方法用于治疗患有退行性关节疾病的哺乳动物。在一些方面，所述方法用于治疗患有关节疾病的犬科动物或马科动物。在一些方面，所述方法用于治疗骨关节炎、创伤后关节炎、感染后关节炎、类风湿性关节炎、痛风、假性痛风、自身免疫介导的关节炎、炎性关节炎、炎症介导的关节疾病和免疫介导的关节疾病。

[0339] 在一些实施例中，所述方法进一步包括基因编辑关节滑膜细胞的一部分以减少或沉默IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13和TNF-α中的一种或多种的表达。在一方面，所述方法进一步包括基因编辑关节滑膜细胞的一部分，以减少或沉默IL-1α、IL-1β中的一种或多种的表达。

[0340] 在一方面，所述方法进一步包括基因编辑，其中所述基因编辑包括选自CRISPR方法、TALE方法、锌指方法及其组合的一种或多种方法。

[0341] 在一些方面，所述方法进一步包括使用AAV载体、慢病毒载体或逆转录病毒载体递送基因编辑。在优选的实施例中，所述方法进一步包括使用AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3(Y705+731F)、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10(Y733F)和AAV-ShH10递送基因编辑。在一些方面，AAV载体包括选自由以下组成的群组的血清型：AAV1、AAV5、AAV6、AAV6(Y705F/Y731F/T492V)、AAV8、AAV9和AAV9(Y731F)。

[0342] 药物组合物和施用方法

[0343] 本文所述的方法包含使用包括CRISPR基因(例如、IL-1α和/或IL-1β)编辑复合物作为活性成分的药物组合物。

[0344] 取决于施用的方法/途径，药物剂型有几种类型。这些包含多种类型的液体、固体和半固体剂型。常见的药物剂型包含丸剂、片剂或胶囊、饮剂或糖浆，以及天然或草药形式，如各种各样的植物或食品以及很多其他形式。值得注意的是，用于药物递送的施用途径(ROA)取决于所讨论物质的剂型。液体药物剂型是旨在用于施用或消费的一定剂量的用作药物或医药的化合物的液体形式。

[0345] 在一个实施例中，本公开的组合物可以皮下(例如关节内注射)、真皮(例如，经由补片透皮)和/或经由植入物递送至受试者。示例性的药物剂型包含例如丸剂、渗透递送系统、酏剂、乳液、水凝胶、悬浮液、糖浆、胶囊、片剂、口服溶解片剂(ODT)、凝胶胶囊、薄膜、粘附性局部贴剂、棒棒糖、锭剂、口香糖、干粉吸入器(DPI)、汽化器、雾化器、定量吸入器

(MDI)、软膏、透皮贴片、皮内植入物、皮下植入物和经皮植入物。

[0346] 如本文所用,“真皮递送”或“真皮施用”可以指这样的施用途径,其中药物剂型被带到或通过真皮(即,表皮(其构成皮肤)和皮下组织之间的皮肤层)。“皮下递送”可以指其中药物剂型接近或位于皮下组织层下方的施用途径。

[0347] 配制合适的药物组合物的方法是本领域已知的,参见例如《雷明顿:药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice ofPharmacy)》,第21版,2005;以及《药物与制药科学:教科书和专著丛书(Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a SeriesofTextbooks and Monographs)》(纽约德克尔(Dekker,N.Y.))系列中的书籍。例如,用于肠胃外、真皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可以包含以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张度的药剂,如氯化钠或葡萄糖。pH可以用酸或碱(如盐酸或氢氧化钠)来调节。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0348] 适合可注射使用的药物组合物可以包含无菌水溶液(如果是水溶性的)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载剂包含生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(巴斯夫(BASF),新泽西州帕西帕尼(Parsippany,N.J.))或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的,并且应该具有流体性,以至于存在容易的可注射性。它在制造和储存的条件下应当是稳定的,并且必须被防腐以对抗诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。适当的流动性可以例如通过使用诸如卵磷脂的涂层、通过在分散体的情况下维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持。微生物的作用的预防可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,将优选的是在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延长的吸收。

[0349] 无菌可注射溶液可以通过以下来制备:将所需量的活性化合物并入到适当的溶剂中,所述溶剂根据需要含有上文列举的成分中的一种或其组合,随后进行过滤灭菌。通常,分散体通过将活性化合物并入到无菌媒介物中来制备,所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分的粉剂。

[0350] 作为核酸或包含核酸的治疗性化合物可以通过适合于核酸药剂如DNA疫苗的施用的任何方法来施用。这些方法包含基因枪、生物注射器和皮肤贴片以及无针方法,例如在美国专利号6,194,389中公开的微粒DNA疫苗技术和如在美国专利号6,168,587中描述的使用粉剂形式的疫苗的哺乳动物经皮无针疫苗接种。此外,鼻内递送是可能的,如在尤其是Hamajima等人,《临床免疫学和免疫病理学(Clin.Immunol.Immunopathol.)》,88(2),205-10(1998)中描述的。也可以使用脂质体(例如,如在美国专利号6,472,375中所述)和微囊化。也可以使用生物可降解的可靶向微粒递送系统(例如,如在美国专利号6,471,996中所

描述的)。

[0351] 治疗性化合物可以用将保护所述治疗性化合物以免于从体内快速消除的载剂来制备,如控释配方,包含植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物,如胶原、乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐(例如聚[1,3-双(羧基苯氧基)丙烷-共-癸二酸](PCPP-SA)基质、脂肪酸二聚体-癸二酸(FAD-SA)共聚物、聚(丙交酯-共-乙交酯))、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乙二醇包被的脂质体和聚乳酸。此类配方可以使用标准技术来制备,或者商业获得,例如从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc商业获得。脂质体悬浮液(包含靶向具有针对细胞抗原的单克隆抗体的选定细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载剂。它们可以按照本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如在美国专利号4,522,811中所述。可以使用半固体、凝胶、软凝胶或其他配方(包含控释配方),例如当需要向手术部位施用时。制备此类配方的方法是本领域已知的,并且可以包含使用生物可降解的生物相容性聚合物。参见例如Sawyer等人,《耶鲁生物学和医学杂志(Yale J Biol Med.)》,2006年12月;79(3-4):141-152。

[0352] 药物组合物可以与施用说明书一起被包含在容器、试剂盒、包装或分配器中。

[0353] 实施例

[0354] 现在参考以下实例描述本文中涵盖的实施例。仅出于说明的目的提供这些实例,并且本文中涵盖的公开决不应被解释为限于这些实例,而是应被解释为涵盖由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变化。

[0355] 实例1.在骨关节炎小鼠模型中通过CRISPR基因工程减少IL-1表达。

[0356] 选择六十只C57B小鼠并分为四组,每组十五只小鼠。DMM手术方法用于诱导每只小鼠中的OA。一旦小鼠已发展出OA,小鼠就如下进行处理:

[0357] 第1组:在OA关节中直接注射被工程改造以靶向IL-1α和IL-1β并沉默或降低IL-1蛋白的表达的CRISPRAAV载体。

[0358] 第2组:在OA关节中直接注射用不影响IL-1产生的“无意”负载物工程改造的CRISPRAAV载体;阴性对照。

[0359] 第3组:在OA关节中直接注射被工程改造以靶向IL-1Ra并沉默或降低IL-1Ra蛋白的表达的CRISPRAAV载体。

[0360] 第4组:在OA关节中直接注射无菌缓冲盐水;用于注射过程的对照。

[0361] 在处理之前和之后监测小鼠,以评估对它们的运动和探索活动的影响。还监测机械灵敏度和步态变化。还可以监测异常性疼痛和后肢握力。

[0362] 在约八周后,处死动物,并且通过IHC评估OA关节组织的大体组织病理学和IL-1表达。还评估了炎症的生物标志物,例如OA关节中的MMP-3表达。

[0363] 用被工程改造以靶向IL-1α和IL-1β并沉默或降低IL-1蛋白的表达的CRISPRAAV载体处理的第1组小鼠与其他三组中的任一组相比,通过IHC显示出IL-1的水平降低,通过组织病理学显示出组织再生,并显示出更低水平的炎症生物标志物。第3组小鼠与其他三组中的任一组相比显示出相对较高水平的炎症生物标志物。

[0364] 实例2.评估针对小鼠IL1A和IL1B的引导切割效率

[0365] 体外切割测定

[0366] 针对Il1a的外显子4和Il1b的外显子4(Il1a-201ENSMUST00000028882.1和Il1b-

201ENSMUST00000028881.13;对于Il1a的外显子4和Il1b的外显子4上的靶序列来说,参见表2)设计了CRISPR引导RNA(硫代磷酸酯修饰的sgRNA,表3)。C57BL/6小鼠基因组DNA用于通过PCR(Phusion高保真度DNA聚合酶,NEB目录号M0530S)扩增Il1a和Il1b的外显子4。Il1a正向引物:CATTGGGAGGATGCTTAGGA(SEQ ID NO:620)、Il1a反向引物:GGCTGCTTTCTCTCCAACAG(SEQ IDNO:621)、Il1b正向引物:AGGAAGCCTGTGTCTGGTTG(SEQ ID NO:622)、Il1b反向引物:TGGCATCGTGAGATAAGCTG(SEQ ID NO:623)。将扩增子PCR纯化(QiaQuickPCR纯化试剂盒目录号28106)。使用100ng纯化的PCR产物、200ng修饰的引导RNA(SigmaAldrich)和0.5μg的TrueCut Spy Cas9蛋白V2(InvitrogenA36498)或0.5μg的Gene Snipper NLS Sau Cas9(BioVision目录号M1281-50-1),使用体外切割测定来确定引导切割效率。比较了两种类型的Cas9,即化脓性链球菌Cas9和金黄色葡萄球菌Cas9的编辑能力。2%琼脂糖凝胶用于切割测定的定性读出。

[0367] 编辑细胞系

[0368] 针对Il1a的外显子4和Il1b的外显子4(Il1a-201ENSMUST00000028882.1和Il1b-201ENSMUST00000028881.13)设计了CRISPR引导RNA(硫代磷酸酯修饰的sgRNA,表2)。引导RNA切割效率在J774.2和NIH3T3细胞的池中使用桑格测序和Synthego ICE(参见例如“从Sanger迹线数据推断CRISPR编辑”(Inference of CRISPR Edits from SangerTrace Data),Hsiau T,Maures T,Waite K,Yang J等人,biorxiv.2018,其出于所有目的通过引用并入本文)或TIDE(参见例如“通过序列迹线分解对基因组编辑进行轻松定量评估”(Easy quantitative assessment ofgenome editing by sequence trace decomposition),Brinkman E、Chen T、Amendola MandVan Steensel B.,《核酸研究》,2014,其出于所有目的通过引用并入本文)网络工具以计算编辑百分率来确定。实验还比较了化脓性链球菌Cas9和金黄色葡萄球菌Cas9的效率。使用5μg TrueCutSpy Cas9蛋白V2(Invitrogen A36498)或5μg EnGen Sau Cas9蛋白(NEB M0654T)和100pmol修饰的引导RNA(SigmaAldrich)对所述细胞进行电穿孔(Amaxa 4D Nucleofector装置,Lonza)。将SF nucleofector溶液和程序CM139用于J774.2细胞,并将SG nucleofector溶液和程序EN158用于NIH3T3细胞。在电穿孔后3天获取细胞沉淀,并从每个池中提取gDNA(Qiagen,DNeasy血液和组织试剂盒,69506)。通过PCR(Phusion高保真度DNA聚合酶,NEB,目录号M0530S)在适合的池中扩增Il1a或Il1b的外显子4。Il1a正向引物:TGGTTTCAGGAAAACCCAAG(SEQ ID NO:624)、Il1a反向引物:GCAGTATGGCCAAGAAAGGA(SEQ ID NO:625)、Il1b正向引物:AGGAAGCCTGTGTCTGGTTG(SEQ ID NO:622)、Il1b反向引物:CTGGGCAAGAACATTGGATT(SEQ ID NO:626)。对扩增子进行三个测序,并使用Synthego ICE或TIDE网络工具进行分析,以确定在每个克隆中不存在野生型序列并存在导致cDNA序列中的移码的插入缺失。

[0369] 表2.靶标Il1a和Il1b序列

[0370]

标识符	引导 ID	基因	外显子	Cas9	靶序列 5'-3'	PAM
SEQ ID NO: 7	sg43	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	GTATCAGCAACGTCAAGCAA	CGG
SEQ ID NO: 8	sg44	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	CTGCAGGTCATCTTCAGTGA	AGG
SEQ ID NO: 9	sg45	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	TATCAGCAACGTCAAGCAAC	GGG
SEQ ID NO: 10	sg46	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	GCCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
SEQ ID NO: 11	sg47	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	CATCAACAAGAGCTTCAGGC	AGG
SEQ ID NO: 12	sg48	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	TGCTCTCATCAGGACAGCCC	AGG
SEQ ID NO: 13	sg49	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	GCTCATGTCCTCATCCTGGA	AGG
SEQ ID NO: 14	sg50	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC	GGG

[0371]

SEQ ID NO: 15	sg51	*Il1a*	4	*金黄色葡萄球菌*	TTACTCCTTACCTTCCAGATC	ATGGGT
SEQ ID NO: 16	sg52	*Il1a*	4	*金黄色葡萄球菌*	GAAACTCAGCCGTCTCTTCTT	CAGAAT
SEQ ID NO: 17	sg53	*Il1a*	4	*金黄色葡萄球菌*	CAACTTCACCTTCAAGGAGAG	CCGGGT
SEQ ID NO: 18	sg54	*Il1b*	4	*金黄色葡萄球菌*	GTGTCTTTCCCGTGGACCTTC	CAGGAT
SEQ ID NO: 19	sg55	*Il1b*	4	*金黄色葡萄球菌*	CACAGCTTCTCCACAGCCACA	AGTAGT
SEQ ID NO: 20	sg56	*Il1b*	4	*金黄色葡萄球菌*	GTGCTGCTGCGAGATTTGAAG	CTGGAT

[0372] 表3.CRISPR引导RNA。

[0373]

标识符	引导 ID	基因	外显子	Cas9	cRNA 序列 5'-3'	PAM
SEQ ID NO: 21	sg43	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	GUAUCAGCAACGUCAAGCAA	CGG
SEQ ID NO: 22	sg44	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	CUGCAGGUCAUCUUCAGUGA	AGG
SEQ ID NO: 23	sg45	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	UAUCAGCAACGUCAAGCAAC	GGG
SEQ ID NO: 24	sg46	*Il1a*	4	*化脓性链球菌*	GCCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
SEQ ID NO: 25	sg47	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	CAUCAACAAGAGCUUCAGGC	AGG
SEQ ID NO: 26	sg48	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	UGCUCUCAUCAGGACAGCCC	AGG
SEQ ID NO: 27	sg49	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	GCUCAUGUCCUCAUCCUGGA	AGG
SEQ ID NO: 28	sg50	*Il1b*	4	*化脓性链球菌*	CCUCAUCCUGGAAGGUCCAC	GGG
SEQ ID NO: 29	sg51	*Il1a*	4	*金黄色葡萄球菌*	UUACUCCUUACCUUCCAGAUC	ATGGGT
SEQ ID NO: 30	sg52	*Il1a*	4	*金黄色葡萄球菌*	GAAACUCAGCCGUCUCUUCUU	CAGAAT
SEQ ID NO: 31	sg53	*Il1a*	4	*金黄色葡萄球菌*	CAACUUCACCUUCAAGGAGAG	CCGGGT
SEQ ID NO: 32	sg54	*Il1b*	4	*金黄色葡萄球菌*	GUGUCUUUCCCGUGGACCUUC	CAGGAT
SEQ ID NO: 33	sg55	*Il1b*	4	*金黄色葡萄球菌*	CACAGCUUCUCCACAGCCACA	AGTAGT
SEQ ID NO: 34	sg56	*Il1b*	4	*金黄色葡萄球菌*	GUGCUGCUGCGAGAUUUGAAG	CTGGAT

[0374]

[0375] 每个cRNA(参见例如表3)被合成为由上述与以下tracrRNA序列融合的cRNA序列组成的单链引导RNA(参见例如SEQ ID Nos:35-36)。在某些实施例中,A<>U翻转用于增加引导RNA活性。

[0376] Sau Cas9:

[0377] GUUAUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUUU(SEQ ID NO:35)

[0378] Spy Cas9:

[0379] GUUAUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU(SEQ ID NO:36)

[0380] 体外切割测定

[0381] 图1A示出了用0.5μg Spy Cas9和200ng修饰的引导RNA(对于I11a基因来说43-46,并且对于IL1B来说47-50)切割的100ng小鼠DNA的琼脂糖凝胶电泳分析。使用该引导RNA将DNA在特定位点处用cas9切开,以与未切开的对照相比在琼脂糖凝胶上产生可预测的条带图案(不希望受到任何特定理论的束缚,sg8*的所述琼脂糖凝胶电泳似乎显示出失败的合

成)。

[0382] 图1B示出了用0.5μg Sau Cas9和200ng修饰的引导RNA(对于Il1a基因来说51-53,并且对于Il1b来说54-56)切割的100ng小鼠DNA的琼脂糖凝胶电泳分析。使用该引导RNA将DNA在特定位点处用cas9切开,以与未切开的对照相比在琼脂糖凝胶上产生可预测的条带图案。

[0383] 编辑细胞系

[0384] 从编辑的池中提取基因组DNA,并在适合的池中PCR扩增Il1a或Il1b的外显子4。将PCR产物送去用于桑格测序,然后使用TIDE或Synthego ICE软件去卷积。Synthego ICE被用于去卷积Spy Cas9池。该软件可以基于引导RNA序列和PAM位点来确定每个池中的编辑模式。它可以区分引起可以导致截短的功能性蛋白的框内缺失的编辑和引起将导致真正敲除的移码突变的编辑。SauCas9池使用TIDE进行分析,因为Synthego ICE软件不能去卷积SauCas9编辑。TIDE分析以与ICE相似的方式,通过基于引导RNA和PAM位点确定池中的编辑模式而起作用。然而,它不是给出真正的敲除评分,而是给出编辑效率评分,其不能区分框内和移码编辑模式。因此,编辑效率评分可能过度代表了引导RNA敲除蛋白质的能力。SpyCas9是CRISPR基因编辑中使用的标准蛋白质。然而,与3156bp的SauCas9相比,它是4101bp。由于包装一些病毒例如AAV的大小限制,因此决定比较SauCas9和SpyCas9的编辑能力,以观察较小的SauCas9是否可以用于为此项目设计的载体中。

[0385] 图2A-2D示出了展示了在J774.2(“J”)和NIH3T3(“N”)细胞中与多种引导RNA一起使用的SpyCas9(图2A和2B)和SauCas9(图2C和2D)的编辑效率的图。编辑效率使用Synthego ICE或TIDE sanger去卷积软件来确定。图2A:在J774.2和NIH3T3中使用引导RNA43-46和SpyCas9时Il1a的敲除效率。Synthego ICE用于去卷积桑格序列迹线并确定敲除效率。图2B:在J774.2和NIH3T3中使用引导RNA47-50和SpyCas9时Il1b的敲除效率;不希望受到任何特定理论的束缚,sgRNA8的数据似乎显示出失败的合成。Synthego ICE用于去卷积桑格序列迹线并确定敲除效率。图2C:在J774.2和NIH3T3中使用引导RNA 51-53和saCas9时Il1a的敲除效率。TIDE用于去卷积桑格序列迹线并确定编辑效率。图2D:在J774.2和NIH3T3中使用引导RNA 54-56和Sau Cas9时Il1b的敲除效率。TIDE用于去卷积桑格序列迹线并确定编辑效率。

[0386] 实例3.在小鼠尿酸模型中通过CRISPR基因工程降低IL-1β表达

[0387] 确定最佳预处理时间的时间过程实验

[0388] 在用尿酸激发小鼠之前进行了预实验,以确定小鼠用病毒的最佳预处理时间。将GFP标记的AAV5载体注射到小鼠的膝关节中。然后通过PCR定量病毒载量,并在感染后3、5和7天通过组织学定量病毒感染的位置。选择在关节内产生鲁棒的病毒表达的处理时间作为用于将病毒载体注射到小鼠中的最佳提前时间,用于在小鼠尿酸模型中确定由被工程改造以靶向IL-1b并沉默或降低IL-1b的表达的CRISPRAAV载体引起的IL-1b的降低的实验。

[0389] 在尿酸模型中确认CRISPRAAV(AAV-spCas9)对1L-1b表达的敲低和治疗效果的实验

[0390] 选择小鼠并将其分成三组:

[0391] 第1组:用被工程改造以靶向IL-1b并沉默或降低IL-1蛋白表达的CRISPRAAV载体(AAV-spCas9)注射的小鼠,

[0392] 第2组:用“乱序的(scrambled)”引导RNA/Cas9(AAV-spCas9)注射的小鼠,所述“乱序的”引导RNA/Cas9(AAV-spCas9)是一种被工程改造成具有不会影响IL-1生产的有效载荷的CRISPRAAV载体,以及

[0393] 第3组:用盐水注射的小鼠。

[0394] 然后在最佳预处理时间后,将所述小鼠用尿酸激发。在注射尿酸的24小时内,将动物处死,并分析关节组织的细胞因子表达(例如通过IHC评估IL-1表达)。还可以评估关节组织的总体组织病理学和炎症的生物标志物的表达。

[0395] 用被工程改造以靶向IL-1b并沉默或降低IL-1蛋白表达的CRISPRAAV载体处理的第1组小鼠与其他两组中的任一组相比,通过IHC显示出IL-1水平的降低并显示出炎症生物标志物的较低水平。

[0396] 实例4.小鼠中AAV的关节内注射的时间过程研究。

[0397] 进行一项研究以评估将AAV注射到雄性C57BL/6小鼠的关节中的时间进程。

[0398] 材料和方法

[0399] 测试制品鉴定和制备-eGFPAAVPrime ™纯化的腺相关病毒颗粒:GFP标记的AAV5 GeneCopoeia™,目录号AB201,批号GC08222K1902,1.18×10^{13}个基因组拷贝/mL)和AAV6(GeneCopoeia™,目录号AB401,批号GC09242K1905,5.47×10^{12}个基因组拷贝/mL)由我们提供。AAV颗粒在干冰上运输并在接收后立即储存在-80℃。在即将给药前,将AAV颗粒在磷酸盐缓冲盐水(不含钙和镁的PBS:Corning,批号11419005)中重构,用于以每个膝盖10μL的剂量IA给药。对于测试制品的制备、储存和操作的额外细节,参见研究方案(附录A)。

[0400] 测试系统鉴定-8至10周龄的雄性C57BL/6小鼠(N=30)获自杰克逊实验室(Jackson Laboratory)(缅因州巴尔港(Bar Harbor,ME))。在研究的第0天登记时,小鼠重约24至29克(平均值为26g)。动物通过在尾根处描绘组和动物编号的明显标牌来识别。在随机分组后,所有笼子都用方案编号、组编号和具有适合的颜色编码的动物编号标记(附录A)。

[0401] 环境和饲养-在抵达后,将动物按每笼3至5只饲养在带有木屑垫料和悬挂食物瓶和水瓶的聚碳酸酯笼中。将小鼠饲养在带有过滤顶的鞋盒笼(静态气流,大约70in2地板空间)或单独通风的饼笼(被动气流,大约70-75in2地板空间)中。动物护理(包含房间、笼子和设备卫生)符合《实验室动物护理和使用指南(Guide for the Care and Use ofLaboratoryAnimals)》(第8版),美国国家研究委员会,美国国家科学院(National Research Council,NationalAcademy ofSciences),华盛顿哥伦比亚特区(Washington,DC),2011中引用的指南,该文献出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0402] 在进入研究之前,使动物适应4天。在研究的活期期间,主治兽医在现场或随叫随到。没有提供同期药物。

[0403] 在适应和研究时间段期间,将动物饲养在温度在19℃至25℃的范围内并且相对湿度为30%至70%的实验室环境中。自动计时器提供12小时的光照和12小时的黑暗。允许动物随意取用Envigo Teklad 8640饮食和新鲜的市政自来水。

[0404] 实验设计-在研究第0天,将小鼠按体重随机分入治疗组中。在随机分组后,如表4中所示将动物通过关节内(IA)注射给药。如第8.5.1节所述测量动物体重。如下文标题为“尸检样本”的部分中所述,在3个时间点(第3天、第5天和第7天)将小鼠安乐死,用于尸检和

组织收集。

[0405] 表4.组和治疗信息

[0406]

组	N	治疗	剂量水平（颗粒）	剂量体积	剂量浓度（颗粒/ml）	剂量途径	方案
1	30	GFP 标记的 AAV5	5×10^{9}	10 μL	5×1011/mL	IA（右膝盖）	1×（第 0 天）
		GFP 标记的 AAV6	5×10^{9}	10 μL	5×10^{11}/mL	IA（左膝盖）	1×（第 0 天）

[0407] 观察、测量和样本

[0408] 体重测量-在研究第0天将小鼠称重用于随机分组，并在第1天、第3天、第5天和第7天再次称重。体重测量值可以在表6中发现。

[0409] 尸检样本-如表5中所示，在研究第3天、第5天和第7天将小鼠尸检。

[0410] 表5.尸检时间表

[0411]

组	动物编号	时间点
1	1-10	第3天
1	11-20	第5天
1	21-30	第7天

[0412] 在尸检时，经由心脏穿刺将小鼠放血，然后颈椎脱位。从所有动物收获右膝和左膝从关节中去除皮肤和肌肉，同时保持关节囊完整。将关节分别快速冷冻在仅标有小鼠编号、收集日期和右腿或左腿的15mL锥形管中。将膝关节在-80℃下冷冻储存以用于运输。

[0413] 动物处置-根据BBP SOP处置动物尸体。

[0414] 样本和原始数据储存-在研究期间或完成时提交样本(右膝和左膝关节)、研究数据和报告。

[0415] 偏差对研究质量和完整性的影响的声明-与研究方案没有偏差。

[0416] 结果/结论

[0417] 在研究第0天，雄性C57BL/6小鼠在右膝中接受GFP标记的AAV5(5×10^{9}个颗粒，10μL)的IA注射并在左膝中接受GFP标记的AAV6(5×10^{9}个颗粒，10μL)的IA注射。在研究第0、1、3、5和7天对动物称重。在研究第3天(动物1-10)、第5天(动物11-20)和第7天(动物21-30)进行尸检，并且收集右膝和左膝关节以用于运输。这项研究的活体部分已成功完成，包含动物称重、给药和生物样本采集。所有动物存活至研究终止。

[0418] 参考文献

[0419] 《实验动物护理和使用指南》(Guide for the Care and Use of LaboratoryAnimals)(第8版)，美国国家研究委员会，美国国家科学院，华盛顿哥伦比亚特区，2011中引用的指南，该文献通过引用以其整体并入本文。

[0420]

表 6. 体重和剂量计算数据（MTC-UCM-1）

治疗组							
第 1 组	第 0 天	第 0 天	第 1 天			第 3 天	
C57B1/6 IA，1x（D0）	体重重量（g）	剂量体积 10 μl（ml）	体重重量（g）	Δ体重重量%，相对于基线		体重重量（g）	Δ体重重量%，相对于基线
1	26.68	0.01	26.53	-0.6%		26.22	-1.7%
2	27.65	0.01	27.55	-0.4%		26.54	-4.0%
3	28.64	0.01	27.97	-2.3%		28.57	-0.2%
4	28.13	0.01	27.60	-1.9%		27.63	-1.8%
5	26.18	0.01	26.07	-0.4%		25.87	-1.2%
6	26.38	0.01	26.02	-1.4%		26.30	-0.3%
7	29.13	0.01	29.11	-0.1%		28.83	-1.0%
8	24.22	0.01	23.90	-1.3%		23.51	-2.9%
9	25.40	0.01	24.97	-1.7%		24.49	-3.6%
10	24.85	0.01	24.21	-2.6%		23.86	-4.0%
11	27.76	0.01	27.26	-1.8%		28.02	0.9%
12	25.23	0.01	24.77	-1.8%		24.90	-1.3%
13	24.92	0.01	24.45	-1.9%		24.59	-1.3%
14	24.33	0.01	24.19	-0.6%		23.86	-1.9%
15	23.82	0.01	23.81	0.0%		23.26	-2.4%
16	24.83	0.01	24.39	-1.8%		24.15	-2.7%
17	25.94	0.01	25.93	0.0%		26.28	1.3%
18	27.21	0.01	27.44	0.8%		27.60	1.4%
19	25.61	0.01	25.17	-1.7%		25.22	-1.5%
20	27.81	0.01	27.26	-2.0%		26.99	-2.9%
21	26.63	0.01	26.63	0.0%		26.71	0.3%
22	26.96	0.01	27.40	1.6%		25.75	-4.5%
23	27.69	0.01	27.21	-1.7%		27.22	-1.7%
24	25.90	0.01	25.71	-0.7%		25.45	-1.7%
25	24.03	0.01	24.11	0.3%		23.40	-2.6%
26	27.60	0.01	26.67	-3.4%		27.00	-2.2%
27	27.87	0.01	27.59	-1.0%		27.22	-2.3%
28	24.43	0.01	24.25	-0.7%		24.14	-1.2%
29	26.75	0.01	26.02	-2.7%		26.46	-1.1%
30	25.93	0.01	25.99	0.2%		25.80	-0.5%
平均值	**26.28**		**26.01**	**-1.0%**		**25.86**	**-1.6%**
SE	**0.27**		**0.27**	**0.2%**		**0.29**	**0.3%**

[0421]

表 6（续）. 体重和剂量计算数据（MTC-UCM-1）

治疗组						
第 1 组	第 5 天			第 7 天		体重相对于基
C57B1/6 IA，1x（D0）	体重重量（g）	Δ体重重量%，相对于基线	体重重量（g）	Δ体重重量%，相对于基线	线的变化（g）
1					-0.46
2					-1.11
3					-0.07
4					-0.50
5					-0.31
6					-0.08
7					-0.30
8					-0.71
9					-0.91
10					-0.99
11	28.62	3.1%			0.86
12	25.04	-0.8%			-0.19
13	24.94	0.1%			0.02
14	23.68	-2.7%			-0.65
15	23.71	-0.5%			-0.11
16	24.26	-2.3%			-0.57
17	26.15	0.8%			0.21
18	27.88	2.5%			0.67
19	25.64	0.1%			0.03
20	27.71	-0.4%			-0.10
21	26.44	-0.7%	26.70	0.3%	0.07
22	25.76	-4.5%	25.75	-4.5%	-1.21
23	27.53	-0.6%	27.33	-1.3%	-0.36
24	25.61	-1.1%	26.00	0.4%	0.10
25	23.76	-1.1%	24.10	0.3%	0.07
26	27.44	-0.6%	27.18	-1.5%	-0.42
27	27.09	-2.8%	27.30	-2.0%	-0.57
28	24.50	0.3%	24.76	1.4%	0.33
29	26.48	-1.0%	26.48	-1.0%	-0.27
30	25.73	-0.8%	25.89	-0.2%	-0.04
平均值	**25.90**	**-0.6%**	**26.15**	**-0.8%**	**-0.25**
SE	**0.33**	**0.4%**	**0.34**	**0.5%**	**0.09**

[0422] 方案

[0423] 测试系统

[0424]

动物数量：	33（30 + 3 额外）
物种/品系或品种：	C57BL/6
供应商：	Jackson
到达时的年龄/重量：	8-10 周龄（约 20 克）
性别：	雄性
研究开始时的年龄/重量范围：	到研究开始时至少 9 周
适应：	在到达 BBP 后，将适应至少 3 天
饲养：	3-5 只动物/笼

[0425] 研究日历

[0426]

星期一	星期二	星期三	星期四	星期五	星期六	星期日
第 1 周第-4 天	第 1 周第-3 天	第 1 周第-2 天	第 1 周第-1 天	第 1 周第 0 天	第 1 周第 1 天	第 1 周第 2 天
在到达时将动物分配到组中以用于适应				*称重和随机分组* IA 注射	称重	
第 2 周第 3 天	第 2 周第 4 天	第 2 周第 5 天	第 2 周第 6 天	第 2 周第 7 天	第 2 周第 8 天	第 2 周第 9 天
称重，尸检动物 1-10		称重，尸检动物 11-20		称重，尸检动物 21-30		

[0427] 材料

[0428]

名称	供应商	目录号
异氟烷	VetOne	502017
注射器和针头	BD	根据需要
血清分离器管(如果需要)	GreinerBio-One	#450472(经由Fisher)
LiHepMini-Collect(如果需要)	GreinerBio-One	#450480(经由Fisher)
EDTAMini-Collect(如果需要)	GreinerBio-One	#450477(经由Fisher)
K3EDTA(如果需要)	Covidien	#8881311149(经由Fisher)
K2EDTAVacutainer(如果需要)	BD	#367856(经由Fisher)
NaHepVacutainer(如果需要)	BD	#367871(经由Fisher)
LiHepVacutainer(如果需要)	BD	#367960(经由Fisher)

[0429] 测试制品和媒介物信息

[0430] 未配制的测试制品储存条件-GFP标记的AAV5(第1组)：-80C;GFP标记的AAV6(第1组)：-80℃。

[0431] 媒介物信息-GFP标记的AAV5(第1组)：PBS(不含Ca和Mg)；GFP标记的AAV6(第1组)：PBS(不含Ca和Mg)。

[0432] 测试制品配制说明和计算-GFP标记的AAV5(第1组)：使用PBS将储备液稀释至适当的浓度;GFP标记的AAV6(第1组)：使用PBS将储备液稀释至适当的浓度。

[0433] 给药配方和媒介物储存和稳定性-GFP标记的AAV5(第1组):在即将注射前稀释;GFP标记的AAV6(第1组):在即将注射前稀释。

[0434] 给药后测试制品的处置-GFP标记的AAV5(第1组)丢弃配方,保留储备溶液用于将来的研究;GFP标记的AAV6(第1组):丢弃配方,保留储备溶液用于将来的研究。

[0435] 活体阶段可递送的

[0436]

活期数据采集			
类型	**研究天数**	**Grp（An）**	**详情**
体重	第 0 天、第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天	全部（剩余）	

[0437] 尸检信息

[0438] 处死时间表:第1组An 1-10:第3天

[0439] 第1组An 11-20:第5天

[0440] 第1组An 21-30:第7天

[0441] 安乐死方法:通过心脏穿刺出血以放血,随后颈椎脱位。

[0442] 时间点:未定时

[0443]

尸检组织样本采集:				
类型	**Gr/An**	**详情**	**储存条件**	**处置**
右膝注射	全部	去除皮肤和肌肉，保持关节囊完整	快速冷冻（15 mL 锥形瓶*）	运输
左膝注射	全部	去除皮肤和肌肉，保持关节囊完整	快速冷冻（15 mL 锥形瓶*）	运输

[0444] *管只标记有小鼠编号、收集日期和左腿或右腿。样本在不提及它们是用AAV-2还是用AAV-5注射的情况下进行测试。仅在PCR完成后提供答案。

[0445] 样本分析

[0446] 组织样本-来自AAV注射的小鼠的后肢被快速冷冻并运输。在到达后,将样本转移至-80℃的冰箱中储存。

[0447] 靶组织中的GFP表达-将后肢(成对)在室温下解冻并在IVIS生物发光成像系统(Lumina III;Perkin Elmer)中成像。使用在488nm处激发和在510nm处测量发射对GFP荧光进行定量。在每个时间点(第3天、第5天和第7天)评估总共4只小鼠。保留来自每个时间点的剩余6只动物的组织,用于随后使用实时PCR确认病毒负荷。

[0448] 结果-如可以在图3中看到的,在注射后3天时在注射的膝关节内存在GFP的高水平表达。在第5天病毒载量略微下降,然后再次上升至第7天。由于在本试验性研究中样本量有限,因此在AAV-5和AAV-6的行为之间没有显著差异。

[0449] 讨论-来自本研究的数据支持了将AAV-5或AAV-6用于CRISPR-Cas9在小鼠膝关节中的关节内递送。从第5天到第7天两种病毒血清型的水平提高,保留了如果随访延长至2周或可能3周,它们可能进一步提高的可能性。为了证实这一点需要额外的工作,但迄今为止的数据表明在注射载体并用关节内单碘代乙酸盐(MIA)晶体激发之前,应该存在至少一周的时间间隔。

[0450] 背景和原理-在本工作中出于两个原因使用单碘代乙酸盐(MIA)诱导的OA模型。首先,自然的(自发的)OA在小鼠中极为罕见,而MIA的注射导致OA的诱导模型发作相对快,可

预测,并提供与在人类OA患者中看到的疾病表型(包含关节内炎症、疼痛和软骨退化)的良好临床相关性。其次,与手术模型如内侧半月板失稳(DMM)和前交叉韧带横切(ACLT)相比,MIA模型不涉及关节囊的手术切口,使其更加贴近于患有OA的人类患者的关节囊。

[0451] 在啮齿动物中注射MIA晶体重现OA样病变和功能缺损,其可以通过诸如行为测试和客观跛行评估的技术来分析和定量。MIA是甘油醛-3-磷酸酶的抑制剂,并且引起的细胞糖酵解变化最终使包含软骨细胞在内的关节内细胞的死亡。软骨细胞死亡表现为软骨退化和蛋白聚糖染色的改变。用MIA注射的小通常在72小时内表现出疼痛样行为,并且在注射后4周左右表现出软骨丧失。在大鼠和小鼠中已证实在注射后2-3天内IL-1表达提高。

[0452] 研究设计-将小鼠用MIA或盐水媒介物对照单侧注射(每只动物一个关节)。在每个组中,将一半的动物用靶向小鼠IL-1β基因的AAV-CRISPR-Cas9载体预处理,并将另一半用AAV-CRISPR-Cas9乱序的对照注射。来自两个组的动物将在两个时间点中的一个时间点退出研究:48小时的早期时间点,以允许评估疗法对滑膜液中IL-1水平的影响;以及4周的晚期时间点,以允许评估疗法对软骨破坏和骨关节炎的组织学证据的影响。

[0453] 方法

[0454] 实验动物-在本研究中使用总共80只小鼠。实验程序由当地IACUC审查和批准。小鼠被饲养在小型隔离笼中,喂食标准实验动物饮食,并允许随意饮水。

[0455] MIA模型和抗IL1疗法-在研究前使小鼠适应环境持续7天的时间段。在研究的第一天,通过吸入在氧气中的异氟烷的混合物将小鼠麻醉。一旦确认手术麻醉平面后,将右后肢夹住并用手术消毒剂擦洗皮肤。40只小鼠(处理的)接受靶向IL-1的AAV-CRISPR-Cas9载体的关节内注射,并且其余40只小鼠(对照)被关节内注射AAV-CRISPR-Cas9乱序对照。七天后,将每组中一半的动物在同一关节中注射MIA,并且另一半注射盐水媒介物。这导致四个研究组的建立:

[0456] 第1组:经处理的MIA(20只小鼠)

[0457] 第2组:对照-MIA(20只小鼠)

[0458] 第3组:经处理的媒介物(20只小鼠)

[0459] 第4组:对照-媒介物(20只小鼠)

[0460] 在MIA激发后48小时将每组十只小鼠安乐死,以便记录膝关节中的IL-1水平。将剩余的动物饲养4周,以便评估疗法对疼痛行为(行为测试,包含vonFrey测试)、跛行(肢体使用)、关节肿胀(卡尺测量)和关节病理学(组织病理学)的影响。

[0461] 安乐死和组织收集-通过放血,然后颈椎脱位杀死小鼠。将关节打开,并冲洗以用于IL-1测量(48小时组),或在10%福尔马林中浸泡固定用于脱钙组织病理学检查(4周组)。

[0462] 实例5.AAV-6和AAV-5介导的CRISPR治疗对MSU晶体诱导的小鼠关节关节炎的疗效

[0463] 简介和目的

[0464] 这些研究的目的是鉴定抑制由单钠尿酸盐(MSU)晶体诱导的白细胞介素1J3(IL-1J3)的释放诱导的炎症的化合物/蛋白质。这是简单的预筛选,其鉴定各种类型的抗炎剂的抗炎活性,所述抗炎剂尤其是IL-1途径阻断剂,如白细胞介素受体拮抗剂或阻断IL-1或IL1R1的抗体(Torres R等人,在新的痛风性关节炎动物模型中,痛觉过敏、滑膜炎和多种炎症的生物标志物受白细胞介素1抑制的抑制(Hyperalgesia,synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1inhibition in a

novel animal model ofgouty arthritis),《风湿病年鉴(Ann Rheym Dis.)》,2009;68(10):1602-1608,其出于所有目的通过引入以其整体并入本文)。痛风是炎症性关节炎的最常见形式,并且在全球范围内的发病率正在增加(Roddy E和Doherty M.“痛风的流行病学(Epidemiology of Gout)”,《关节炎研究与疗法(Arthritis Research&Therapy)》,2010;12(6):223,其出于所有目的通过引用以其整体并入本文)。痛风性关节炎的特征是血清尿酸盐浓度增加和单钠尿酸盐晶体(MSU)在关节内和关节周围沉积,导致关节肿胀和严重疼痛(Sabina EP,Chandel S和Rasool MK,“用withaferinA抑制单钠尿酸盐晶体诱导的炎症(Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by withaferin A)”,《药学科学杂志(J Pharm Pharmaceut Sci.)》,2008;11(4):46-55,其出于所有目的通过引用以其整体并入本文)。目前的治疗包含非类固醇抗炎药(NSAID)、类固醇或秋水仙碱。对于一些患者,这些治疗可能不能有效治疗痛风或具有不良副作用(Sabina,2008;Getting SJ等人,“作为痛风性关节炎中的促肾上腺皮质激素疗效的分子机制的黑皮质素3型受体的激活(Activation of melanocortin type 3receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotropic hormone efficacy in gouty arthritis)”,《关节炎和风湿病(Arthritis&Rheumatism)》,2002;46(10):2765-2775,其出于所有目的通过引用以其整体并入本文)。MSU诱导的炎症模型提供了用于鉴定可能在更复杂的疾病过程中具有活性的化合物的良好的、简单的筛选工具,所述疾病过程如全身性关节炎和更复杂的IL-1驱动的疾病。

[0465] 进行一项研究以评估腺相关病毒(AAV)介导的CRISPR疗法在小鼠的单钠尿酸盐(MSU)晶体诱导的炎症中的功效。在研究的第0天,雄性C57BL/6小鼠在右膝内单次(1x)关节内(IA)注射安慰剂对照(稀释剂,磷酸盐缓冲盐水[PBS])、AAV-6的两种变体的混合物(一种携带引导RNA 1,并且另一种携带引导RNA2,5x109个病毒基因组[vg]拷贝/mL)、AAV-5的两种变体的混合物(引导物1+引导物2,5x109vg/mL)、乱序的AAV-6对照(携带非靶向的引导RNA,1x1010vg/mL),或乱序的AAV-5对照(1x1010vg/mL)。在研究的第7天,向小鼠的右膝(与处理相同的关节)中注射MSU晶体(25mg/mL:在10μL的PBS中的250μg)。在研究第7天MSU注射后大约6小时对小鼠实施安乐死以用于尸检。疗效评估基于动物体重、von Frey测试和膝盖卡尺测量值。

[0466] 与IA注射AAV-5乱序载体的小鼠(p＝0.025)相比,在第7天MSU注射后6小时,用AAV-6(引导物1+2:5x109vg/引导物每膝盖)IA(第0天1次)处理的小显示出牵涉性疼痛的统计学意义的降低,如通过von Frey测试测量的,结果是与AAV-6乱序载体和PBS对照组相比几乎具有统计学意义(分别为p＝0.051和p＝0.075)。对于vonFrey评估,曲线下面积(AUC)计算在统计学上在组间没有差异。动物体重增量和膝盖肿胀在组间没有统计学显著差异(表7)。所有动物存活至研究终止。

[0467] 表7.数据的总结

[0468]

	组处理	von Frey 绝对阈值 AUC（第-1 至 7 天）– 右足	相对于基线 AUC（第 -1 天至第 7 天）的膝盖卡尺变化 – 右膝
1	AAV-6 乱序载体（1x10^{10} 颗粒/膝盖），IA，1x（d0）	5.92（0.39）	0.02（0.01）
2	AAV-6 引导物 1+2（每个引导物 5×10^{9}/膝盖），IA，1x（d0）	6.01（0.36）	0.01（0.01）
3	PBS、IA（d0）	6.12（0.33）	0.02（0.01）
4	AAV-5 乱序载体（1x10^{10} 颗粒/膝盖），IA，1x（d0）	5.09（0.31）	0.02（0.01）
5	AAV-5 引导物 1+2（每个引导物 5 x 10^{9}/膝盖），IA，1x（d0）	5.73（0.39）	0.02（0.01）

[0469] 值代表组平均值和标准误差(SE)

[0470] PBS＝磷酸盐缓冲盐水对照,AAV＝腺相关病毒,AUC＝曲线下面积

[0471] *p<0.05ANOVA(Tukey事后)相对于AAV-6引导物1

[0472] †p<0.05ANOVA(Tukey事后)相对于PBS

[0473] ‡p<0.05ANOVA(Tukey事后)相对于AAV-5乱序载体

[0474] §p<0.05ANOVA(Tukey事后)相对于AAV-5引导物1

[0475] 临床结果的总结-随时间推移,未观察到组之间的显著差异。没有临床证据表明病毒注射引起比在媒介物组中看到的更大的应答。没有临床证据表明病毒注射改变了MSU对关节肿胀的作用。IL-1在MSU诱导的炎症中的特定作用不清楚,因此缺乏临床效果可能不是非预期的。

[0476] qPCR的总结-qPCR数据证实,用AAV-6或AAV-5进行的CRISPR编辑有效地将IL-1β mRNA表达恢复到正常水平。鉴于样本量,统计学显著性难以证明。可以通过对滑膜组织的IHC分析获得这种效应的确认。

[0477] 监管合规

[0478] 本研究是根据测试机构标准操作程序(SOP)、世界卫生组织基础生物医学研究质量规范指南,并遵循所有州和联邦法规(包含USDA动物福利法案9CFR第1-3部分,联邦登记册39129,1993年7月22日)进行的。

[0479] 机构动物护理和使用

[0480] 本研究根据《实验室动物护理和使用指南》(第8^{版})进行。对于在本研究中使用的动物,未鉴定可接受的替代测试系统。

[0481] 材料和方法

[0482] 测试制品鉴定和制备

[0483] 将AAV载体预先配制为在冷冻的等分试样中的病毒颗粒悬浮液(>5x10^{12}个病毒基因组[vg]拷贝/mL)。将等分试样储存在-80℃下,并在使用前立即在稀释剂(无菌过滤的PBS[Corning,批号01420007])中重构。注射前由处理AAV载体的人员使用标准生物安全水平2(BSL-2)处理。在无菌PBS中制备AAV乱序对照以形成含有1x10^{12}vg/mL的工作储备液,用于以10μL/膝进行IA注射,以将1x10^{10}vg的乱序对照递送至膝关节中。通过将两个活性AAV-5或AAV-6构建体中的每一个的相等部分与无菌PBS混合来制备活性AAV载体,以对于两个引导物中的每一个形成含有5x10^{11}vg/mL的工作储备液。将活性AAV配方以10μL/膝注IA射,以将

$5x10^9$vg的两个引导物中的每一个递送到膝关节中。关于测试制品制备、储存和处理的另外的细节，参见研究方案(附录B)。

[0484] AAV载体鉴定如下：

[0485]

用于 sgRNA 的 AAVPrimeTM 腺相关病毒血清型 6（AAV-6）颗粒（GeneCopoeia™，目录号 AA06-MCP001682-AD01-2-200-a，批号 GC03182K2001）
用于 sgRNA 的 AAVPrimeTM 腺相关病毒血清型 6（AAV-6）颗粒（GeneCopoeia™，目录号 AA06-MCP001682-AD01-2-200-b，批号 GC03202K2001）
用于 sgRNA 的 AAVPrimeTM 腺相关病毒血清型 6（AAV-6）颗粒（GeneCopoeia™，目录号 AA06-CCPCTR01-AD01-200，批号 GC03112K2002）
用于 sgRNA 的 AAVPrimeTM 腺相关病毒血清型 5（AAV-5）颗粒（GeneCopoeia™，目录号 AA05-MCP001682-AD01-2-200A，批号 GC-03182K2002）
用于 sgRNA 的 AAVPrimeTM 腺相关病毒血清型 5（AAV-5）颗粒（GeneCopoeia™，目录号 AA05-MCP001682-AD01-2-200B，批号 GC03182K2003）
用于 sgRNA 的 AAVPrimeTM 腺相关病毒血清型 5（AAV-5）颗粒（GeneCopoeiaTM，目录号 AA05-CCPCTR01-AD01-200，批号 GC03032K2003）

[0486] 从Invivogen(目录号Tlrl-25-MSU,批号MSU-42-01)获得单钠尿酸盐(MSU)晶体。在塑料管中的PBS(不含Ca或Mg:Corning,目录号21-031-CV,批号31719003)中制备25mg/mL的MSU晶体,涡旋大约1分钟,超声大约15至20分钟,并在移液和使用前涡旋。

[0487] 测试系统

[0488]

动物数量：	75(70+5额外)
物种/品系或品种：	C57BL/6
供应商：	Jackson
到达时的年龄/重量：	8-10周龄(约20克)
性别：	雄性
研究开始时的年龄/重量范围：	到研究开始时至少9周
适应：	在到达BBP后,将适应至少3天
饲养：	3-5只动物/笼

[0489] 从杰克逊实验室(缅因州巴尔港)获得8至10周龄的雄性C57BL/6小鼠(N＝70+额外4只)。在研究的第-1天登记时,小鼠重大约20至29克(平均约25g)。

[0490] 动物通过在尾巴底部描绘动物编号的彩色编码点来识别。在登记后,用方案编号、组编号和动物编号标记所有笼子。

[0491] 环境和饲养

[0492] 在到达后,将动物按每笼3至5只饲养在具有玉米棒垫料和悬挂食物和水瓶的聚碳酸酯笼中。将小鼠饲养在单独通风的饼笼(被动气流,大约0.045-0.048m2地面空间)中。动物护理(包含房间、笼子和设备卫生)符合在《实验动物护理和使用指南》(指南,2011)和适用的BBP SOP中引用的指南。

[0493] 动物在进入研究之前适应9天。在研究的活期期间,主治兽医在现场或随叫随到。没有提供同期药物。

[0494] 在适应期和研究期期间,将动物饲养在温度在19℃至25℃的范围内且相对湿度为30％至70％的实验室环境中。自动计时器提供12小时的光照和12小时的黑暗。允许动物随意取用Envigo Teklad 8640饮食和新鲜的市政自来水。

[0495] 研究设计

[0496] 在研究第-1天，将动物按体重随机分入治疗组，剃除膝盖，并获取基线膝盖卡尺测量值。在研究第0天，向动物给药如表8所示的治疗(IA到右膝盖内)。在研究第7天，向动物右膝盖(与治疗相同的膝盖)中IA注射MSU晶体(总共10μL，250μg的MSU)。按所述获取体重测量值。在如所述的5个时间点，通过VonFrey测试测量牵涉性疼痛。在5个时间点获取右膝盖的卡尺测量值，如所描述的。如所描述，在第7天的最终行为测试后将动物安乐死以用于尸检。

[0497] 表8.组和治疗信息

[0498]

Grp	N	MSU	治疗	剂量水平（颗粒/膝盖）	剂量体积	剂量浓度（颗粒/mL）	剂量途径	方案
1	14	是	AAV-6 乱序载体	$1x10^{10}$	10 μL	$1x10^{12}$	IA（右膝盖）	1x（第 0 天）
2	14	是	AAV-6 引导物 1+2	$5x10^{9}$（每个引导物）	10 μL	$1x10^{12}$	IA（右膝盖）	1x（第 0 天）
3	14	是	PBS	--	10 μL	--	IA（右膝盖）	1x（第 0 天）
4	14	是	AV-5 乱序载体	$1x10^{10}$	10 μL	$1x10^{12}$	IA（右膝盖）	1x（第 0 天）
5	14	是	AAV-5 引导物 1+2	$5x10^{9}$（每个引导物）	10 μL	$1x10^{12}$	IA（右膝盖）	1x（第 0 天）

[0499] 疾病诱导

[0500] 在无菌PBS中以25mg/mL的浓度制备MSU晶体。晶体确实溶解，并且在使用前小心地混合注射制剂。将10uL的MSU晶体溶液注射到右膝关节中。

[0501]

未配制的MSU储存条件:室温，避光
媒介物:PBS
剂量途径:IA到右膝盖中
剂量体积:每膝盖10uL
MSU配方说明和计算:0.01ml/膝*75只动物＝0.72ml的所需的25mg/mlMSU，最小
MSU储存和稳定性:储存在玻璃中。临给药前制备。在注射之前涡旋
在给药后的MSU处置:在给药后丢弃的配方。未配制的储备液保留。

[0502] 体重测量值和活期采样

[0503] 在研究第-1天(注射前)对小鼠进行称重以用于随机分组，并且在研究第2天和第6天再次测量体重。动物体重测量值可以在表9找到。

[0504] 表9.体重和剂量计算数据(MGA-UCM-2)

[0505]

治疗组	第-1 天	第 0 天	第 2 天		第 6 天		第-1 天至 6 天体重变化
第 1 组							
AAV-6 乱序载体（1x10^10 颗粒/膝盖）	体重重量（g）	剂量体积 10 μl（ml）	体重重量（g）	Δ 体重重量%，相对于基线	体重重量（g）	Δ 体重重量%，相对于基线	
1A，1x（D0）							
1	25.99	0.01	24.19	-6.9%	24.67	-5.1%	-1
2	25.00	0.01	24.64	-1.4%	25.32	1.3%	0
3	23.50	0.01	24.61	4.7%	24.95	6.2%	1
4	23.92	0.01	23.14	-3.3%	23.81	-0.5%	0
5	23.30	0.01	23.14	-0.7%	23.78	2.1%	0
6	23.04	0.01	23.97	4.0%	24.51	6.4%	1
7	27.44	0.01	28.10	2.4%	27.90	1.7%	0
8	22.79	0.01	22.83	0.2%	23.59	3.5%	1
9	24.80	0.01	24.74	-0.2%	25.71	3.7%	1
10	27.46	0.01	27.97	1.9%	28.66	4.4%	1
11	26.50	0.01	26.57	0.3%	26.88	1.4%	0
12	26.51	0.01	26.48	-0.1%	27.78	4.8%	1
13	22.80	0.01	23.38	2.5%	23.77	4.3%	1
14	24.77	0.01	24.60	-0.7%	24.90	0.5%	0
额外	21.95	0.01	22.56	2.8%	23.34	6.3%	1
平均值	**24.84**		**24.88**	**0.19%**	**25.4**	**2.47%**	**0.6**
SE	**0.45**		**0.5**	**0.80%**	**0.5**	**0.80%**	**0.2**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 2 组							**0.684**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 3 组							**0.243**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 4 组							**0.212**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组							**0.543**
第 2 组	第-1 天	第-1 天	第 2 天		第 6 天		第-1 天至 6 天体重变化
AAV-6 引导物 1+2（每个引导物 5x10^9/膝盖）	体重重量（g）	剂量体积 10 μl（ml）	体重重量（g）	Δ 体重重量%，相对于基线	体重重量（g）	Δ 体重重量%，相对于基线	
1A，1x（D0）							
1	22.56	0.01	22.47	-0.4%	22.92	1.6%	0
2	28.49	0.01	29.00	1.8%	29.08	2.1%	1
3	24.65	0.01	24.65	0.0%	25.06	1.7%	0
4	23.63	0.01	23.29	-1.4%	24.05	1.8%	0
5	22.78	0.01	23.19	1.8%	24.14	6.0%	1
6	27.32	0.01	27.60	1.0%	28.54	4.5%	1
7	26.83	0.01	27.49	2.5%	28.00	4.4%	1
8	26.96	0.01	26.84	-0.4%	28.70	6.5%	2
9	22.80	0.01	22.88	0.4%	23.66	3.8%	1
10	22.45	0.01	23.12	3.0%	23.86	6.3%	1
11	24.83	0.01	24.53	-1.2%	25.42	2.4%	1
12	25.80	0.01	26.11	1.2%	26.56	2.9%	1
13	25.30	0.01	25.59	1.1%	26.14	3.3%	1
14	23.45	0.01	23.88	1.8%	24.14	2.9%	1
额外	25.84	0.01	26.43	2.3%	26.29	1.7%	0
平均值	**24.85**		**25.05**	**0.79%**	**25.7**	**3.57%**	**0.9**
SE	**0.53**		**0.56**	**0.36%**	**0.6**	**0.46%**	**0.1**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 3 组							**0.940**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 4 组							**0.919**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组							**0.999**

[0506] 表9(续).体重和剂量计算数据(MGA-UCM-2

[0507]

治疗组							
第 3 组 PBS IA,1x（D0）	第-1 天 体重重量（g）	第-1 天 剂量体积 10 µl（ml）	第 2 天 体重重量（g）	第 2 天 Δ体重重量%，相对于基线	第 6 天 体重重量（g）	第 6 天 Δ体重重量%，相对于基线	第-1 天至 6 天体重变化
1	27.14	0.01	28.19	3.9%	29.19	7.6%	2
2	25.35	0.01	25.11	-0.9%	26.38	4.1%	1
3	24.72	0.01	25.03	1.3%	25.41	2.8%	1
4	28.53	0.01	29.04	1.8%	29.62	3.8%	1
5	25.50	0.01	25.99	1.9%	26.16	2.6%	1
6	25.23	0.01	25.30	0.3%	26.00	3.1%	1
7	25.45	0.01	25.81	1.4%	26.42	3.8%	1
8	25.80	0.01	26.48	2.6%	26.83	4.0%	1
9	24.77	0.01	25.33	2.3%	26.24	5.9%	1
10	19.83	0.01	20.15	1.6%	21.23	7.1%.	1
11	25.66	0.01	26.30	2.5%	27.14	5.8%	1
12	24.27	0.01	24.58	1.3%	25.02	3.1%	1
13	20.05	0.01	20.91	4.3%	21.23	5.9%	1
14	24.74	0.01	24.88	0.6%	24.92	0.7%	0
平均值	**24.79**		**25.22**	**1.77%**	**25.8**	**4.30%**	**1.1**
SE	**0.62**		**0.63**	**0.36%**	**0.6**	**0.51%**	**0.1**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 4 组							**>0.9999**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组							**0.983**
第 4 组 AAV-5 乱序载体（1x10^10 颗粒/膝盖）IA，1x（D0）	**第-1 天 体重重量（g）**	**第-1 天 剂量体积 10 µl（ml）**	**第 2 天 体重重量（g）**	**第 2 天 Δ体重重量%，相对于基线**	**第 6 天 体重重量（g）**	**第 6 天 Δ体重重量%，相对于基线**	**第-1 天至 6 天体重变化**
1	25.00	0.01	25.68	2.7%	26.51	6.0%	2
2	28.90	0.01	29.66	2.6%	30.89	6.9%	2
3	25.37	0.01	25.41	0.2%	25.52	0.6%	0
4	23.46	0.01	23.93	2.0%	24.73	5.4%	1
5	24.96	0.01	25.37	1.6%	26.16	4.8%	1
6	26.95	0.01	27.27	1.2%	27.89	3.5%	1
7	24.99	0.01	25.07	0.3%	25.63	2.6%	1
8	24.52	0.01	24.60	0.3%	25.38	3.5%	1
9	24.66	0.01	27.09	9.9%	27.21	10.3%	3
10	24.62	0.01	26.06	5.8%	26.11	6.1%	1
11	23.73	0.01	24.06	1.4%	23.88	0.6%	0
12	23.43	0.01	24.04	2.6%	24.88	6.2%	1
13	22.63	0.01	22.60	-0.1%	23.08	2.0%	0
14	25.50	0.01	25.66	0.6%	25.82	1.3%	0
额外	26.25	0.01	26.58	1.3%	26.28	0.1%	0

[0508]

平均值	**24.91**		**25.46**	**2.23%**	**26.0**	**4.27%**	**1.1**
SE	**0.42**		**0.47**	**0.72%**	**0.5**	**0.74%**	**0.2**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组							**0.973**
第 5 组	**第-1 天**	**第-1 天**	**第 2 天**		**第 6 天**		**第-1 天至 6 天体重变化**
AAV-5 引导物 1+2(每个引导物 5x10^9/膝盖) IA，1x（D0）	**体重重量（g）**	**剂量体积 10 μl(ml)**	**体重重量（g）**	**Δ体重重量%，相对于基线**	**体重重量（g）**	**Δ体重重量%，相对于基线**	
1	25.57	0.01	26.47	3.5%	26.21	2.5%	1
2	23.68	0.01	23.37	-1.3%	24.18	2.1%	1
3	24.28	0.01	24.42	0.6%	24.71	1.8%	0
4	23.09	0.01	23.31	1.0%	24.18	4.7%	1
5	24.52	0.01	25.34	3.3%	24.97	1.8%	0
6	25.90	0.01	26.60	2.7%	27.25	5.2%	1
7	25.92	0.01	26.08	0.6%	26.28	1.4%	0
8	25.32	0.01	25.48	0.6%	26.49	4.6%	1
9	25.99	0.01	27.51	5.8%	27.39	5.4%	1
10	27.50	0.01	27.63	0.5%	28.82	4.8%	1
11	24.69	0.01	25.54	3.4%	25.86	4.7%	1
12	24.15	0.01	24.97	3.4%	26.01	7.7%	2
13	22.60	0.01	22.99	1.7%	22.99	1.7%	0
14	23.96	0.01	24.32	1.5%	24.93	4.0%	1
额外	24.78	0.01	25.36	2.3%.	26.21	5.8%	1
平均值	**24.80**		**25.29**	**1.96%**	**25.7**	**3.75%**	**0.9**
SE	**0.35**		**0.40**	**0.49%**	**0.4**	**0.50%**	**0.1**

[0509] Von Frey方法

[0510] 在5个时间点对右后爪进行Von Frey分析:基线(第-1天)、给药后6小时(第0天)、给药后24小时(第1天)、注射MSU前(0小时,第7天)和注射MSU后6小时(第7天)。在von Frey测试期间,组对研究员是盲的。

[0511] von Frey方法基于动物对将校准的细丝(Bioseb,法国维特罗勒(Vitrolles,France))施加于足部的响应来评估机械性异常性疼痛(由于通常不引发疼痛的刺激引起的疼痛)。通过表示以毫克×10计的力的log10的数字来识别细丝。在基线评估之前,使动物适应测试架三次(45至60分钟)在测试时,将Von Frey毛发放在后爪的表面上并且平稳地推入,直到毛发明显弯曲;毛发被压靠在爪上持续六秒。响应被重新编码为0(无响应)或1(响应)。响应被定义为将后爪抬离毛发、将腿推离、离开毛发等。起始毛发为3.22,如果动物响应,则测试者移动到2.83,如果对3.22毛发没有响应,则测试者将移动到3.61;测试者将基于响应继续测试毛发,并且视情况向上或向下移动。毛发增量如下:1.65、2.36、2.44、2.83、3.22、3.61、3.84、4.08、4.17。每个爪测试5次,在毛发之间上下移动,直到达到最终丝。将数据输入到电子表格中,并且用于将响应率转换成爪撤回阈值。使用式10(x+yz)/10000将测试的结果转换为以克计的绝对阈值(50%响应率),其中x等于最终测试的丝的对数单位值,y等于来自小样本(Dixon,1965)的Dixon的上下方法的响应模式的表格值,并且z等于丝的值之间的平均间隔。当足跟倾向于给出更可靠和敏感的响应时,对后爪的后部分进行测试。测试者监测动物的高响应或冷冻,在这种情况下,将动物单独留下直到平静。Von Frey数据可以表10中找到。

[0512] 表10.vonFrey数据(MGA-UCM-2)

[0513]

治疗组											
组1 AAV-6 乱序载体（1x10^10 颗粒/膝盖） IA，1x（D0）	第-1 天		第 0.25 天		第 1 天		第 7 天		第 7.25 天		第-1 天-第 7 天
	绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		
	日志单位	（g）	日志单位	（g）	日志单位	（g）	日志单位	（g）	日志单位	（g）	AUC
1	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	6.05
2	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.41500	0.26	7.09
3	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.68
4	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.42
5	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.41500	0.26	2.91
6	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	7.04
7	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.93
8	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.44
9	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	5.63
10	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.42
11	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	6.14
12	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	6.04
13	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	2.63500	0.04	5.75
14	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	6.29
额外	4.12500	1.33	3.41500	0.26	3.41500	0.26	4.12500	1.33	3.02500	0.11	6.15
平均值		**0.86**		**0.66**		**0.64**		**0.81**		**0.23**	**5.92**
SE		**0.07**		**0.07**		**0.08**		**0.06**		**0.04**	**0.39**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 2 组		**0.979**		**0.917**		**1.000**		**0.974**		**0.051**	**1.000**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 3 组		**0.998**		**>0.9999**		**>0.9999**		**0.907**		**>0.9999**	**0.994**

[0514]

ANOVA（Tukey 事后）相对于第 4 组		**0.999**		**0.943**		**0.493**		**0.956**		**0.987**	**0.478**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组		**0.984**		**0.873**		**0.995**		**0.998**		**0.599**	**0.996**

[0515] 表10(续).vonFrey数据(MGA-UCM-2)

[0516]

治疗组											
第2组 AAV-6引导物1+2(每个引导物 5x10^9/膝盖) IA，1x（D0）	第-1天		第0.25天		第1天		第7天		第7.25天		第-1天-第7天
	绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		
	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	AUC
1	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.41500	0.26	6.82
2	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	5.45
3	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	4.66
4	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.20
5	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	6.29
6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	4.12500	1.33	3.72500	0.53	8.79
7	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	6.12
8	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.91
9	4.12500	1.33	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	5.90
10	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.41500	0.26	4.72
11	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.62
12	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.41500	0.26	5.24
13	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	7.04
14	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	7.36
额外	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.73
平均值		0.92		0.58		0.62		0.86		0.46	6.01
SE		0.07		0.08		0.09		0.07		0.06	0.36
ANOVA（Tukey事后）相对于第3组		0.886		0.941		>0.9999		0.998		0.075	1.000
ANOVA（Tukey事后）相对于第4组		0.924		>0.9999		0.639		0.690		0.025	0.369
ANOVA（Tukey事后）相对于第5组		0.828		1.000		0.999		0.999		0.855	0.981

[0517] 表10(续).vonFrey数据(MGA-UCM-2)

[0518]

治疗组											
第 3 组 PBS IA，1x（D0）	第-1 天		第 0.25 天		第 1 天		第 7 天		第 7.25 天		第-1 天-第 7 天
	绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		
	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	AUC
1	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	4.12500	1.33	3.72500	0.53	8.14
2	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.42
3	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.06
4	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	2.63500	0.04	5.99
5	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	2.63500	0.04	5.89
6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	6.25
7	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	5.81
8	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.93
9	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	5.27
10	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	6.19
11	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	2.63500	0.04	4.32
12	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.02500	0.11	7.45
13	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.02500	0.11	7.07
14	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.41500	0.26	4.86
平均值		0.83		0.66		0.63		0.89		0.23	6.12
SE		0.06		0.07		0.06		0.08		0.05	0.33
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 4 组		>0.9999		0.962		0.400		0.548		0.985	0.259
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组		0.999		0.901		0.998		0.983		0.660	0.937

[0519] 表10(续).vonFrey数据(MGA-UCM-2)

[0520]

治疗组											
第 4 组 AAV-5 乱序载体（1x10^10 颗粒/膝盖）IA，1x（D0）	第-1 天		第 0.25 天		第 1 天		第 7 天		第 7.25 天		第-1 天-第 7 天
	绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		
	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	AUC
1	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	5.92
2	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	2.63500	0.04	3.64
3	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	5.11
4	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	2.63500	0.04	4.32
5	4.12500	1.33	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	6.42
6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.97
7	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	2.63500	0.04	6.13
8	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.51
9	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.03
10	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.15
11	4.12500	1.33	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	5.65
12	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	5.25
13	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.38
14	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	2.63500	0.04	5.75
额外	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.97
平均值		0.84		0.59		0.48		0.75		0.20	5.09
SE		0.07		0.08		0.05		0.05		0.05	0.31
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组		0.999		0.999		0.776		0.869		0.411	0.713

[0521]

[0522] 表10(续).vonFrey数据(MGA-UCM-2)

[0523]

治疗组											
第5组 AAV-5引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA，1x（D0）	第-1天		第0.25天		第1天		第7天		第7.25天		第-1天-第7天
	绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		绝对阈值		
	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	日志单位	(g)	AUC
1	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.20
2	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	6.59
3	4.12500	1.33	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	6.50
4	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	5.21
5	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	4.12500	1.33	3.96000	0.91	8.60
6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	2.63500	0.04	3.50
7	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.02500	0.11	6.83
8	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	4.62
9	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.06
10	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.16
11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.41500	0.26	4.48
12	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	2.63500	0.04	5.57
13	4.12500	1.33	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	5.54
14	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.02500	0.11	4.29
额外	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	5.33
平均值		**0.81**		**0.56**		**0.59**		**0.84**		**0.36**	**5.73**
SE		**0.08**		**0.09**		**0.09**		**0.07**		**0.08**	**0.39**

[0524] 卡尺方法

[0525] 在5个时间点进行右膝盖的卡尺测量:基线(第-1天)、施用后6小时(第0天)、施用后24小时(第1天)、MSU注射前(0小时,第7天)和后6小时(第7天)。使用弹簧加载的微米卡尺(Mitutuyo)进行膝盖卡尺测量。膝盖卡尺测量可参见表11。

[0526] 表11.膝盖卡尺数据(MGA-UCM-2)

[0527]

治疗组											
第 1 组 AAV-6 乱序载体（1x10^10 颗粒/膝盖） IA，1x（D0）	第-1 天		第 0.25 天		第 1 天		第 7 天		第 7.25 天		第-1 天-第 7 天
	卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		Δ，相对于基线 AUC
	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	
1	3.63	0.00	3.65	0.02	3.63	0.00	3.63	0.00	3.68	0.05	0.03
2	3.88	0.00	3.92	0.04	3.88	0.00	3.85	-0.03	3.90	0.02	-0.05
3	3.67	0.00	3.72	0.05	3.67	0.00	3.67	0.00	3.70	0.03	0.05
4	3.65	0.00	3.70	0.05	3.65	0.00	3.64	-0.01	3.68	0.03	0.02
5	3.58	0.00	3.62	0.04	3.58	0.00	3.58	0.00	3.62	0.04	0.05
6	3.60	0.00	3.61	0.01	3.60	0.00	3.60	0.00	3.62	0.02	0.01
7	3.89	0.00	3.94	0.05	3.89	0.00	3.87	-0.02	3.91	0.02	-0.01
8	3.73	0.00	3.74	0.01	3.73	0.00	3.73	0.00	3.78	0.05	0.02
9	3.70	0.00	3.73	0.03	3.70	0.00	3.69	-0.01	3.74	0.04	0.00
10	3.66	0.00	3.69	0.03	3.66	0.00	3.67	0.01	3.75	0.09	0.07
11	3.65	0.00	3.69	0.04	3.65	0.00	3.65	0.00	3.70	0.05	0.05
12	3.63	0.00	3.68	0.05	3.63	0.00	3.63	0.00	3.67	0.04	0.06
13	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.75	0.03	0.00
14	3.78	0.00	3.80	0.02	3.78	0.00	3.76	-0.02	3.81	0.03	-0.04
额外	3.54	0.00	3.57	0.03	3.54	0.00	3.54	0.00	3.56	0.02	0.03
平均值	**3.70**	**0.00**	**3.73**	**0.03**	**3.70**	**0.00**	**3.69**	**-0.01**	**3.74**	**0.04**	**0.02**
SE	**0.03**	**0.00**	**0.03**	**0.00**	**0.03**	**0.00**	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.00**	**0.01**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 2 组				**0.129**				**0.719**		**0.927**	**0.998**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 3 组				**0.832**				**0.959**		**0.543**	**1.000**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 4 组				**0.854**				**0.836**		**0.971**	**0.999**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组				**0.370**				**0.618**		**0.832**	**1.000**

[0528] 表11(续).膝盖卡尺数据(MGA-UCM-2)

[0529]

治疗组											
第 2 组 AAV-6 引导物 1+2(每个引导物 5x10^9/膝盖) IA，1x（D0）	第-1 天		第 0.25 天		第 1 天		第 7 天		第 7.25 天		第-1 天-第 7 天
	卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		Δ，相对于基线 AUC
	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	
1	3.48	0.00	3.48	0.00	3.48	0.00	3.48	0.00	3.51	0.03	0.00
2	4.04	0.00	4.04	0.00	4.04	0.00	4.02	-0.02	4.04	0.00	-0.06
3	3.67	0.00	3.67	0.00	3.67	0.00	3.67	0.00	3.71	0.04	0.01
4	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.67	0.05	0.01
5	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.62	0.04	0.01

	6	3.80	0.00	3.85	0.05	3.80	0.00	3.81	0.01	3.84	0.04	0.09
	7	3.88	0.00	3.89	0.01	3.88	0.00	3.88	0.00	3.90	0.02	0.01
	8	3.75	0.00	3.75	0.00	3.75	0.00	3.75	0.00	3.79	0.04	0.01
	9	3.56	0.00	3.60	0.04	3.56	0.00	3.56	0.00	3.65	0.09	0.05
	10	3.64	0.00	3.64	0.00	3.64	0.00	3.64	0.00	3.67	0.03	0.00
	11	3.65	0.00	3.70	0.05	3.65	0.00	3.65	0.00	3.69	0.04	0.06
	12	3.75	0.00	3.75	0.00	3.75	0.00	3.74	-0.01	3.78	0.03	-0.03
	13	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	0.00
	14	3.65	0.00	3.69	0.04	3.65	0.00	3.65	0.00	3.65	0.00	0.04
[0530]	**额外**	3.62	0.00	3.64	0.02	3.62	0.00	3.62	0.00	3.65	0.03	0.02
	平均值	**3.70**	**0.00**	**3.71**	**0.01**	**3.70**	**0.00**	**3.70**	**0.00**	**3.73**	**0.03**	**0.01**
	SE	**0.04**	**0.00**	**0.04**	**0.01**	**0.04**	**0.00**	**0.04**	**0.00**	**0.04**	**0.01**	**0.01**
	ANOVA(Tukey 事后)相对于第 3 组				**0.741**				**0.994**		**0.252**	**0.989**
	ANOVA(Tukey 事后)相对于第 4 组				**0.906**				**>0.9999**		**0.994**	**0.982**
	ANOVA(Tukey 事后)相对于第 5 组				**0.935**				**0.999**		**1.000**	**0.989**

[0531] 表11(续).膝盖卡尺数据(MGA-UCM-2)

治疗组											
第 5 组 AAV-5 引导物 1+2(每个引导物 5x10^9/膝盖) IA，1x（D0）	**第-1 天**		**第 0.25 天**		**第 1 天**		**第 7 天**		**第 7.25 天**		**第-1 天-第 7 天**
	卡尺测量（mm）		**卡尺测量（mm）**		**卡尺测量（mm）**		**卡尺测量（mm）**		**卡尺测量（mm）**		**Δ，相对于基线 AUC**
	右	**Δ，相对于基线（D-1）**	**右**	**Δ，相对于基线（D-1）**	**右**	**Δ，相对于基线（D-1）**	**右**	**Δ，相对于基线（D-1）**	**右**	**Δ，相对于基线（D-1）**	
1	3.68	0.00	3.72	0.04	3.68	0.00	3.68	0.00	3.70	0.02	0.04
2	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.67	-0.01	3.70	0.02	-0.03
3	3.71	0.00	3.71	0.00	3.71	0.00	3.70	-0.01	3.72	0.01	-0.03
4	3.66	0.00	3.69	0.03	3.66	0.00	3.65	-0.01	3.73	0.07	0.01
5	3.65	0.00	3.66	0.01	3.65	0.00	3.65	0.00	3.68	0.03	0.01
6	3.68	0.00	3.70	0.02	3.68	0.00	3.69	0.01	3.70	0.02	0.05
7	3.74	0.00	3.77	0.03	3.74	0.00	3.74	0.00	3.75	0.01	0.03
8	3.69	0.00	3.69	0.00	3.69	0.00	3.69	0.00	3.71	0.02	0.00
9	3.72	0.00	3.75	0.03	3.72	0.00	3.73	0.01	3.75	0.03	0.06
10	3.74	0.00	3.74	0.00	3.74	0.00	3.73	-0.01	3.76	0.02	-0.03
11	3.62	0.00	3.67	0.05	3.62	0.00	3.62	0.00	3.67	0.05	0.06
12	3.79	0.00	3.79	0.00	3.79	0.00	3.79	0.00	3.87	0.08	0.01
13	3.67	0.00	3.71	0.04	3.67	0.00	3.67	0.00	3.70	0.03	0.04
14	3.68	0.00	3.70	0.02	3.68	0.00	3.69	0.01	3.70	0.02	0.05
额外	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	0.00
平均值	**3.69**	**0.00**	**3.71**	**0.02**	**3.69**	**0.00**	**3.69**	**0.00**	**3.72**	**0.03**	**0.02**
SE	**0.01**	**0.00**	**0.01**	**0.00**	**0.01**	**0.00**	**0.01**	**0.00**	**0.01**	**0.01**	**0.01**

[0532]

[0533] 表11(续).膝盖卡尺数据(MGA-UCM-2)

[0534]

治疗组											
第3组 PBS IA，1x（D0）	第-1天		第0.25天		第1天		第7天		第7.25天		第-1天-第7天
	卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		Δ，相对于基线AUC
	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	
1	3.85	0.00	3.89	0.04	3.85	0.00	3.85	0.00	3.90	0.05	0.05
2	3.78	0.00	3.78	0.00	3.78	0.00	3.76	-0.02	3.79	0.01	-0.06
3	3.68	0.00	3.72	0.04	3.68	0.00	3.68	0.00	3.75	0.07	0.05
4	3.72	0.00	3.77	0.05	3.72	0.00	3.74	0.02	3.79	0.07	0.12
5	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.70	0.08	0.01
6	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.66	-0.02	3.74	0.06	-0.06
7	3.78	0.00	3.78	0.00	3.78	0.00	3.78	0.00	3.86	0.08	0.01
8	3.72	0.00	3.76	0.04	3.72	0.00	3.73	0.01	3.80	0.08	0.08
9	3.65	0.00	3.69	0.04	3.65	0.00	3.65	0.00	3.71	0.06	0.05
10	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.59	0.01	0.00
11	3.63	0.00	3.68	0.05	3.63	0.00	3.63	0.00	3.68	0.05	0.06
12	3.79	0.00	3.79	0.00	3.79	0.00	3.77	-0.02	3.82	0.03	-0.06
13	3.56	0.00	3.58	0.02	3.56	0.00	3.56	0.00	3.61	0.05	0.03
14	3.73	0.00	3.78	0.05	3.73	0.00	3.72	-0.01	3.75	0.02	0.02
平均值	**3.70**	**0.00**	**3.72**	**0.02**	**3.70**	**0.00**	**3.70**	**0.00**	**3.75**	**0.05**	**0.02**
SE	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.01**	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.01**	**0.01**
ANOVA（Tukey事后）相对于第4组				**>0.9999**				**0.997**		**0.214**	**>0.9999**
ANOVA（Tukey事后）相对于第5组				**0.980**				**0.975**		**0.160**	**>0.9999**

[0535] 表11(续).膝盖卡尺数据(MGA-UCM-2)

[0536]

治疗组											
第4组 AAV-5乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖） IA，1x（D0）	第-1天		第0.25天		第1天		第7天		第7.25天		第-1天-第7天
	卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		卡尺测量（mm）		Δ，相对于基线AUC
	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	右	Δ，相对于基线（D-1）	
1	3.67	0.00	3.70	0.03	3.67	0.00	3.68	0.01	3.70	0.03	0.07
2	3.77	0.00	3.80	0.03	3.77	0.00	3.75	-0.02	3.81	0.04	-0.03
3	3.72	0.00	3.74	0.02	3.72	0.00	3.73	0.01	3.75	0.03	0.05
4	3.61	0.00	3.63	0.02	3.61	0.00	3.61	0.00	3.66	0.05	0.03
5	3.68	0.00	3.71	0.03	3.68	0.00	3.68	0.00	3.71	0.03	0.03
6	3.84	0.00	3.84	0.00	3.84	0.00	3.82	-0.02	3.87	0.03	-0.06
7	3.72	0.00	3.74	0.02	3.72	0.00	3.72	0.00	3.77	0.05	0.03
8	3.70	0.00	3.82	0.12	3.70	0.00	3.71	0.01	3.72	0.02	0.15
9	3.80	0.00	3.81	0.01	3.80	0.00	3.81	0.01	3.83	0.03	0.05
10	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.76	0.04	0.00
11	3.60	0.00	3.60	0.00	3.60	0.00	3.60	0.00	3.62	0.02	0.00

[0537]

12	3.63	0.00	3.64	0.01	3.63	0.00	3.63	0.00	3.69	0.06	0.02
13	3.59	0.00	3.59	0.00	3.59	0.00	3.57	-0.02	3.62	0.03	-0.06
14	3.68	0.00	3.70	0.02	3.68	0.00	3.68	0.00	3.71	0.03	0.02
额外	3.74	0.00	3.75	0.01	3.74	0.00	3.72	-0.02	3.73	-0.01	-0.05
平均值	**3.70**	**0.00**	**3.72**	**0.02**	**3.70**	**0.00**	**3.69**	**0.00**	**3.73**	**0.04**	**0.02**
SE	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.01**	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.00**	**0.02**	**0.00**	**0.01**
ANOVA（Tukey 事后）相对于第 5 组				**0.998**				**1.000**		**0.962**	**>0.9999**

[0538] 濒死或发现的死亡动物

[0539] 如果发现动物死亡，则不采集样本。对于需要实施安乐死的动物，无论原因如何，均按照尸检时的方式采集样本（参见尸检信息部分）。健康评估中的动物可以在笼子的底部上给予SC流体以及水凝胶和食物。

[0540] 研究组名称

[0541]

Grp	N	MSU	治疗	剂量水平（颗粒/膝盖）	剂量体积	剂量浓度（颗粒/ml）	剂量途径	方案
1	14	是	AAV-6 乱序载体	$1x10^{10}$	10µl	$1x10^{12}$	IA（**右**膝盖）	1x（第 0 天）
2	14	是	AAV-6 引导物 1+2	$5x10^{9}$（每个引导物）	10µl	$1x10^{12}$	IA（**右**膝盖）	1x（第 0 天）
3	14	是	PBS	--	10µl	--	IA（**右**膝盖）	1x（第 0 天）
4	14	是	AAV-5 乱序载体	$1x10^{10}$	10µl	$1x10^{12}$	IA（**右**膝盖）	1x（第 0 天）
5	14	是	AAV-5 引导物 1+2	$5x10^{9}$（每个引导物）	10µl	$1x10^{12}$	IA（**右**膝盖）	1x（第 0 天）

[0542] 研究日历

[0543]

星期一	星期二	星期三	星期四	星期五	星期六	星期日
5/4/2020 *第-10 天*	5/5/2020 *第-9 天*	5/6/2020 *第-8 天*	5/7/2020 *第-7 天*	5/8/2020 *第-6 天*	5/9/2020 *第-5 天*	5/10/2020 *第-4 天*
在到达时将动物分配到各组中用于适应				*适应 VF*		
5/11/2020 *第-3 天*	5/12/2020 *第-2 天*	5/13/2020 *第-1 天*	5/14/2020 *第 0 天*	5/15/2020 *第 1 天*	5/16/2020 *第 2 天*	5/17/2020 *第 3 天*
适应 VF	*适应 VF*	称重和随机分组、基线卡尺、基线行为。剃掉	定时剂量、定时卡尺、定时行为	定时卡尺、定时行为	称重	

[0544]

		膝盖				
5/18/2020 *第4天*	5/19/2020 *第5天*	5/20/2020 *第6天*	5/21/2020 *第7天*	5/22/2020 *第8天*	5/23/2020 *第9天*	5/24/2020 *第10天*
		称重，剃掉膝盖？	定时 MSU、定时卡尺、定时行为、定时尸检			

[0545] 材料

[0546]

名称	供应商	目录号
MSU晶体	Invivogen	Tlrl-msu-25
媒介物(PBS)	康宁	21-031-CV
基因	SgRNA	AA06-CCPCTR01—AD01-200
基因	SgRNA	AA06-MCP001682-AD01-2-200A
基因	SgRNA	AA06-MCP001682-AD01-2-200B
基因	SgRNA	AA05-CCPCTR0I-AD01-200
基因	SgRNA	AA05-MCP001682-AD01-2-200-9
基因	SgRNA	AA05-MCP001682-AD01-2-200-6
异氟烷	VetOne	502017
注射器和针头	BD	根据需要
血清分离器管(如果需要)	GreinerBio-One	#450472(经由Fisher)
LiHepMini-Collect(如果需要)	GreinerBio-One	#450480(经由Fisher)
EDTAMini-Collect(如果需要)	GreinerBio-One	#450477(经由Fisher)
K3EDTA(如果需要)	Covidien	#8881311149(经由Fisher)

[0547] 测试制品和媒介物信息

[0548]

Grp	Cpmd	N	ml/动物	给药天数	剂量/天	所需的化合物（ml）	25%超额	所需的总量（ml）
1	**AAV-6 乱序载体**	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
2	**AAV-6 引导物 1+2**	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
3	**PBS**	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
4	**AAV-5 乱序载体**	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
5	**AAV-5 引导物 1+2**	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18

[0549] 未配制的测试制品储存条件：

[0550]

AAV-6乱序载体(第1组)：-80C
AAV-6引导物1+2(第2组)：-80C
PBS(第3组)：4C
AAV-5乱序载体(第4组)：-80C
AAV-5引导物1+2(第5组)：-80C

[0551] 媒介物信息：

[0552]

AAV-6乱序载体(第1组)：无菌PBS(不含Ca和Mg)
AAV-6引导物1+2(第2组)：无菌PBS(不含Ca和Mg)
PBS(第3组)：无菌PBS(不含Ca和Mg)

AAV-5乱序载体(第4组):无菌PBS(不含Ca和Mg)
AAV-5引导物1+2(第5组):无菌PBS(不含Ca和Mg)

[0553] 测试制品配方说明和计算:

AAV-6 乱序载体（第 1 组）：使用无菌 PBS 将储备液稀释至适当的浓度（参见 AAV 制备部分）
AAV-6 引导物 1+2（第 2 组）：使用无菌 PBS 将储备液稀释至适当的浓度（参见 AAV 制备部分）
PBS（第 3 组）：使用无菌 PBS（参见 AAV 制备部分）
AAV-5 乱序载体（第 4 组）：使用无菌 PBS 将储备液稀释至适当的浓度（参见 AAV 制备部分）
AAV-5 引导物 1+2（第 5 组）：使用无菌 PBS 将储备液稀释至适当的浓度（参见 AAV 制备部分）

[0554]

[0555] 剂量制剂和媒介物储存和稳定性:

[0556]

AAV-6乱序载体(第1组):即将注射前稀释
AAV-6引导物1+2(第2组):即将注射前稀释
AAV-5乱序载体(第4组):即将注射前稀释
AAV-5引导物1+2(第5组):即将注射前稀释

[0557] 给药后测试制品的处置:

[0558]

AAV-6乱序载体(第1组):丢弃配方,将储备溶液保存在-80C下,用于未来的研究
AAV-6引导物1+2(第2组):丢弃配方,将储备溶液保存在-80C下,用于未来的研究
AAV-5乱序载体(第4组):丢弃配方,将储备溶液保存在-80C下,用于未来的研究
AAV-5引导物1+2(第5组):丢弃配方,将储备溶液保存在-80C下,用于未来的研究

[0559] 活期

[0560]

活期数据采集			
类型	**研究天数**	**Grp（An）**	**详情**
体重	第-1 天、第 2 天、第 6 天	全部	
膝盖卡尺	第-1 天（基线）第 0 天（6 小时） 第 1 天（24 小时） 第 7 天（0 小时，6 小时）	全部	右膝盖 相对于基线的变化
Von Frey	第-1 天（基线）第 0 天（6 小时） 第 1 天（24 小时） 第 7 天（0 小时，6 小时）	全部	仅右脚

[0561] 尸检信息

[0562] 在研究第7天的最终行为测试后(MSU后约6小时)对动物进行尸检。在尸检时,通过心脏穿刺使动物出血以放血,并且通过颈部脱位实施安乐死以用于组织收集。对全血进行血清加工(≥200μL/小鼠),其在-80℃下冷冻储存以用于运输至研究资助方。收集来自所有动物的右(注射的)和左(正常)膝盖(皮肤、肌肉和足部被去除,同时保持膝关节完整)。将关节在15mL锥形管中直接快速冷冻,以用于运输至资助方。

[0563]

处死时间表:	研究第7天(MSU后6小时):所有动物
安乐死方法:	通过心脏穿刺出血以放血,随后颈椎脱位。
时间点:	在最终行为时间点后(MSU后6小时)

[0564]

尸检样本采集：						
类型	加工	抗凝血	Gr/An	最终体积	储存条件	处置
心脏穿刺全血	血清	N/A	全部	≥200μl	-80C,Epps	运输至资助方

[0565]

尸检组织样本采集：				
类型	Gr/An	详情	储存条件	处置
右（注射的）膝盖	全部	去除皮肤和肌肉，保持膝关节完整，去除足部	直接快速冷冻，放入15 ml 锥形瓶中	运输至资助方
左（正常）膝盖	全部	去除皮肤和肌肉，保持膝关节完整，去除足部	直接快速冷冻，放入15 ml 锥形瓶中	运输至资助方

[0566] 统计分析

[0567] 将数据输入到微软Excel中，并且确定每组的平均值和标准误差(SE)。使用单因素方差分析(ANOVA)或带Tukey事后分析的重复测量(RM)ANOVA对组进行比较。使用Prism v8.0.2软件(GraphPad)进行ANOVA。除非指明，否则BBP仅对原始(未转化的)数据进行统计分析。统计测试对数据的正态性和方差均匀性进行某些假设，并且如果测试导致违反这些假设，则可能需要进一步分析。所有测试的显著性均设定为$p<0.050$，其中p值被四舍五入至小数点后第三位。

[0568] AAV制备

[0569] 用于制备用于注射的病毒的标准操作程序

[0570] 对于每种构建体，创建含有5x10^11vg/ml的工作储备液(引导物1，引导物2)。应当注意，对于等同物，乱序对照组需要注射总共1x10^10拷贝的乱序载体。稀释剂(PBS)将用于媒介物对照组。

[0571] 材料

[0572]

AA06-CCPCTR01-AD01-200：乱序对照 AAV-6 颗粒，含有 5 x 10^12 vg/ml 的 100 微升溶液。
AA06-MCP001682-AD01-2-200-引导物 1：AAVPrime™颗粒，含有引导物 1 的 AAV-6，含有 5 x 10^12 vg/ml 的 100 微升溶液。
AA06-MCP001682-AD01-2-200-引导物 2：AAVPrime™颗粒，含有引导物 2 的 AAV-6，含有 5 x 10^12 vg/ml 的 100 微升溶液。
AA05-CCPCTR01-AD01-200：乱序对照 AAV-5 颗粒，含有>5 x 10^12 vg/ml 的 100 微升溶液。
AA05-MCP001682-AD01-2-200-引导物 1：AAVPrime™颗粒，含有引导物 1 的 AAV-5，含有>5 x 10^12 vg/ml 的 100 微升溶液。
AA05-MCP001682-AD01-2-200-引导物 2：AAVPrime™颗粒，含有引导物 2 的 AAV-5，含有>5 x 10^12 vg/ml 的 100 微升溶液。

[0573] 程序

[0574] 第1组：AAV-6乱序对照-将400微升的无菌过滤的无Ca和无Mg的PBS的等分试样装入到无菌Eppendorf管中。添加100微升(相当于5x10^11vg)的储备液AA06-CCPCTR01-AD01-200。这导致0.5ml体积的工作储备液含有1x10^12vg/ml的AAV-5乱序对照。将10微升的该溶液注射到膝关节内递送1x10^10vg的AAV-6乱序对照。

[0575] 第2组：活性AAV-6引导物1+2-将800微升的无菌过滤的无Ca和无Mg的PBS的等分试样放入到无菌Eppendorf管中。添加100微升(相当于5x10^11vg)的两种活性AAV-6构建体中的每一种—这意味着100微升(相当于5x10^11vg)的AA06-MCP001682-AD01-2-200-a和100

微升(相当于5x10^11vg)的储备液AA06-MCP001682-AD01-2-200-b。这产生1ml体积的工作储备液,对于两个引导物中的每一个含有5x10^11vg/ml。将10微升的该溶液注射到膝关节内,对于两个AAV-6引导物中的每一个递送5x10^9vg。

[0576] 第3组:PBS-用于稀释病毒储备液的无菌过滤的无Ca和Mg的PBS作为用于本研究的媒介物对照。它以10微升/膝关节给药。

[0577] 第4组:AAV-5乱序对照-将400微升的无菌过滤的无Ca和无Mg的PBS等分试样装入无菌Eppendorf管中。添加100微升(相当于5x10^11vg)的储备液AA05-CCPCTR01-AD01-200。这导致0.5ml体积的工作储备液含有1x10^12vg/ml的AAV-5乱序对照。将10微升的该溶液注射到膝关节中递送1x10^10vg的AAV-5乱序对照。

[0578] 第5组:活性AAV-6引导物1+2-将800微升的无菌过滤的无Ca和无Mg的PBS的等分试样放入无菌Eppendorf管中。添加100微升(相当于5x10^11vg)的两种活性AAV-6构建体中的每一种—这意味着100微升(相当于5x10^11vg)的AA05-MCP001682-AD01-2-200-a和100微升(相当于5x10^11vg)的储备液AA05-MCP001682-AD01-2-200-b。这产生1ml体积的工作储备液,对于两个引导物中的每一个含有5x10^11vg/ml。将10微升的该溶液注射到膝关节中,对于两个AAV-6引导物中的每一个递送5x10^9vg。

[0579] qPCR

[0580] 整块切除速冻滑膜组织(包含股骨远端和胫骨近端),并置于RLT缓冲液中。使用Cyrolys Evolution组织匀浆器进行匀浆(“硬”程序循环)。使用RNeasy或RNeasy Plus试剂盒,随后使用QIAshredder(来自QIAGEN)提取RNA。使用Nanonstring定量RNA。使用IL-1β、β-肌动蛋白和RPL13的小鼠特异性引物进行cDNA逆转录和qPCR。

[0581] 结果

[0582] 如图6所示,PBS对照小鼠在研究过程中具有4.3%(1.1g)的平均体重增量。体重增量在组之间没有统计学显著的差异(表7、表9)。

[0583] 如图7A所示,所有组中的膝盖卡尺测量在研究第0天给药后6小时达到峰值,在给药后24小时恢复到基线,然后在研究第7天MSU后6小时再次达到峰值。随着时间的推移,在各组之间自基线的膝盖卡尺变化没有统计学差异(表11)。如图7B所示,在各组之间第-1天至第7天的膝盖卡尺变化AUC没有统计学显著的差异(表7、表11)。

[0584] 如图8A所示,在研究第0天IA给药后,所有组中的von Frey绝对阈值略微降低,然后在MSU的IA注射后急剧降低之前,在研究第7天趋向于基线。随着时间的推移,在AAV乱序载体对照组与PBS对照组之间没有统计学差异。与对照组相比,用AAV-6(引导物1+2)处理的小鼠在第7天时具有在MSU后6小时增加的vonFrey绝对阈值;与AAV-6乱序载体和PBS对照组相比,此时间点的von Frey绝对阈值增加几乎达到统计显著性(分别为p=0.051和p=0.075),并且与AAV-5乱序载体对照组相比是统计学显著的(p=0.025)。用AAV-5(引导物1+2)处理的小鼠具有von Frey绝对阈值,其随时间而与对照组没有统计学显著的差异(表10)。如图8B所示,第-1天至第7天的von Frey绝对阈值AUC在各组之间没有统计学差异(表7、表10)。

[0585] 如图10所示,滑膜组织中小鼠IL-1β的免疫组织化学数据显示在CRISPR治疗的动物中IL-1β表达减少。(A)在用PBS预处理的MSU注射的动物中,存在IL-1β(棕色染色)的稳健表达。在CRISPR处理的动物中未观察到这种效应(图C)。在CRISPR处理的动物中不存在IL-1

β(棕色染色)类似于阴性抗体对照(图B和D)。所有图像均为原始放大率的10倍。

[0586] 讨论和结论

[0587] 与IA注射AAV-5乱序载体的小鼠(p＝0.025)相比,在第7天MSU注射后6小时,用AAV-6(引导物1+2:5x10^9vg/引导物/每膝盖)IA(第0天1x)处理的小鼠显示出如通过von Frey测试测量的牵涉性疼痛的统计学意义的减轻,结果与AAV-6乱序载体和PBS对照组相比几乎具有统计学意义(分别为p＝0.051和p＝0.075)。von Frey评估的AUC计算在各组之间在统计学上没有差异。动物体重增量和膝盖肿胀在各组之间在统计学上没有差异。所有动物存活至研究终止。

[0588] 实例6.引导物RNA设计

[0589] 根据以下程序设计靶向人IL-1α和IL-1β的引导物RNA(表14):

[0590] 1.识别适当的基因组组装和基因模型(工具:Ensemble,UCSC基因组浏览器);

[0591] 2.识别关键功能性结构域,以绘制靶向窗口(工具:Ensemble;文献);

[0592] 3.生成关键外显子上所有可能的引导RNA的列表(工具:Ensemble、UCSC、InDelphi);

[0593] 4.基于ML预测的移码评分对引导物进行排名,并排除较差的表现者;

[0594] 5.从内含子:外显子边界排除<5bp的引导物,并且具有6 x T's或更大的同源多核苷酸片段;

[0595] 6.确定每个引导物的中靶(Donech 2016)和脱靶(Hsu 2013)指标(工具:UCSC、Deskgen);

[0596] 7.过滤掉具有较差的中靶和脱靶评分的引导物,以生成最终列表;及

[0597] 8.基于移码指数进行排名。

[0598] 根据以下程序设计靶向猫、犬或马IL-1α和IL-1β的引导RNA(表15):

[0599] 1.鉴定适当的基因组组装和基因模型(工具:Ensemble、UCSC基因组浏览器)

[0600] 2.鉴定关键功能性结构域以绘制靶向窗口(工具:Ensemble;文献)

[0601] 3.从适当的外显子和相关侧翼内含子序列中检索编码序列(工具:Ensemble.APE)

[0602] 4.生成关键外显子上所有可能的引导RNA的列表(工具:Ensemble,InDelphi)

[0603] 5.基于ML预测的移码评分对引导物进行排名,并排除较差的表现者

[0604] 6.从内含子:外显子边界排除<5bp的引导物,并且具有6 x T's或更大的同源多核苷酸片段

[0605] 7.确定每个引导物的脱靶的度量(工具:Cas Off-Finder、Excel)

[0606] 8.过滤掉具有较差的脱靶评分的引导物,以生成最终列表

[0607] 9.基于移码指数进行排名。

[0608] 在表16中包含所考虑的所有物种的基因转录物信息。

[0609] 表14

[0610]

基因符号	SEQ ID NO:	物种	染色体	基因组	移码(%)	Doench 2016	Hsu 2013	gRNA	PAM
IL1B	627	人	chr2	hg38	80.1	55	76	AGCTGGATGCCGCCATCCAG	AGG
IL1B	628	人	chr2	hg38	78.5	44	71	ACCACTACAGCAAGGGCTTC	AGG
IL1B	629	人	chr2	hg38	75.4	63	92	CATGGCCACAACAACTGACG	CGG
IL1B	630	人	chr2	hg38	74	60	97	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	TGG
IL1B	631	人	chr2	hg38	87.6	55	61	CTACAGCAAGGGCTTCAGGC	AGG
IL1B	632	人	chr2	hg38	85.6	61	58	GACCTCTGCCCTCTGGATGG	CGG
IL1B	633	人	chr2	hg38	85.2	35	62	CTCTCCGCAGTGCTCCTTCC	AGG
IL1B	634	人	chr2	hg38	78.5	50	62	CATTCTCCTGGAAGGTCTGT	GGG
IL1A	635	人	chr2	hg38	92.1	70	87	ATGGTGGTAGTAGCAACCAA	CGG
IL1A	636	人	chr2	hg38	88.3	51	88	GCCATAGCTTACATGATAGA	AGG
IL1A	637	人	chr2	hg38	87	68	88	CAGAGACAGATGATCAATGG	AGG
IL1A	638	人	chr2	hg38	87	50	74	ATTCAGAGACAGATGATCAA	TGG
IL1A	639	人	chr2	hg38	83.1	53	91	TGGTGGTAGTAGCAACCAAC	GGG
IL1A	640	人	chr2	hg38	85.7	60	67	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	TGG

[0611] 表15

[0612]

基因符号	SEQ ID NO:	物种	染色体	外显子	基因组	移码（%）	CasOffFinder 总计	gRNA	PAM
IL1A	641	马	chr15	4	EquCab3.0	80.9	21	TGGTGCTGGTGGCAGCCAAC	GGG
IL1A	642	马	chr15	4	EquCab3.0	79.2	14	CTTCTTCAGAGTCTTCCCGT	TGG
IL1A	643	马	chr15	3	EquCab3.0	74.9	37	TTACCTGAGTCAGAGAGAGA	TGG
IL1A	644	马	chr15	4	EquCab3.0	74.6	11	AAGCTATGACCCACTTCCTG	AGG

[0613]

基因符号	SEQ ID NO:	物种	染色体	外显子	基因组	移码（%）	CasOffFinder总计	gRNA	PAM
IL1A	645	马	chr15	4	EquCab3.0	71.5	14	CCATGCAGTCCTCAGGAAGT	GGG
IL1A	646	犬	chr17	3	canFam4	75.7	7	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	GGG
IL1A	647	犬	chr17	3	canFam4	73.8	10	GACATCCCAGCTTACCTTCA	AGG
IL1A	648	犬	chr17	3	canFam4	72.6	10	GAGCTGTGACCCACTTCATG	AGG
IL1A	649	犬	chr17	3	canFam4	79.2	14	CATTTTCCTTGAAGGTAAGC	TGG
IL1A	650	犬	chr17	3	canFam4	87	16	TGGTAGTGGTGGCAGCCAAT	GGG
IL1A	651	犬	chr17	3	canFam4	76.8	18	ATTTTCCTTGAAGGTAAGCT	GGG
IL1A	652	犬	chr17	3	canFam4	79.1	23	CTTCTTTAGAATCTTCCCAT	TGG
IL1A	653	犬	chr17	3	canFam4	71.4	23	GGATGTCTTTGAGATTTCAG	AGG
IL1A	654	犬	chr17	3	canFam4	88.5	28	GTGGTAGTGGTGGCAGCCAA	TGG
IL1A	655	犬	chr17	3	canFam4	78.7	31	CACTACCACATTTTCCTTGA	AGG
IL1A	656	猫	chrA3	3	Fc9.0	73.3	12	GGTAAGCTGGGGTGTCTTAG	AGG
IL1A	657	猫	chrA3	3	Fc9.0	74.3	13	ATTCCTCACTGCTGATGACC	TGG
IL1A	658	猫	chrA3	3	Fc9.0	86.7	15	TGGTGATGGTGGCAGCCAAT	GGG
IL1A	659	猫	chrA3	3	Fc9.0	79.3	20	CTTCCAGGTCATCAGCAGTG	AGG
IL1B	660	马	chr15	4	EquCab3.0	87.6	27	TGAAAGTCTTGTTGTAAAGT	TGG
IL1B	661	马	chr15	4	EquCab3.0	79.6	15	GACCTCAGCTCCATGGGCGA	TGG
IL1B	662	马	chr15	4	EquCab3.0	78.5	13	CTGGATGCCCCCATCGCCCA	TGG
IL1B	663	马	chr15	4	EquCab3.0	75.4	17	CCCCATCGCCCATGGAGCTG	AGG
IL1B	664	马	chr15	4	EquCab3.0	75.2	12	AAGTCTTGTTGTAAAGTTGG	TGG
IL1B	665	犬	chr17	3	canFam4	82.1	2	CGTGTCAGTCATTGTAGCTT	TGG
IL1B	666	犬	chr17	3	canFam4	74.2	11	CCACAGTTCTCTGGTAGATG	AGG
IL1B	667	犬	chr17	3	canFam4	80	13	AGACCTGAACCACAGTTCTC	TGG
IL1B	668	犬	chr17	3	canFam4	80	14	CCTCATCTACCAGAGAACTG	TGG
IL1B	669	犬	chr17	3	canFam4	80	15	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	TGG
IL1B	670	猫	chrA3	2	Fc9.0	82.4	8	GTAGTAAGCCATCATTTCAC	TGG
IL1B	671	猫	chrA3	4	Fc9.0	82	4	GAGTCTTAGGCATGCCGTGT	CGG

[0614]

基因符号	SEQ ID NO:	物种	染色体	外显子	基因组	移码（%）	CasOffFinder总计	gRNA	PAM
IL1B	672	猫	chrA3	4	Fc9.0	81.8	14	AAACCTGAGCCACAGTTTTC	TGG
IL1B	673	猫	chrA3	2	Fc9.0	80.7	17	ATCATTTCACTGGTGAGTTC	AGG
IL1B	674	猫	chrA3	4	Fc9.0	80.4	18	ACTCTTGTTGTCGGGCTGGT	GGG
IL1B	675	猫	chrA3	4	Fc9.0	80.1	14	GACTCTTGTTGTCGGGCTGG	TGG
IL1B	676	猫	chrA3	4	Fc9.0	76.7	24	CCTCATCTCCCAGAAAACTG	TGG
IL1B	677	猫	chrA3	3	Fc9.0	76	23	TGAGAATGACCTGTTCTTTG	AGG
IL1B	678	猫	chrA3	4	Fc9.0	75.7	5	TAAGACTCTTGTTGTCGGGC	TGG
IL1B	679	猫	chrA3	4	Fc9.0	74.3	18	AACCTGAGCCACAGTTTTCT	GGG

[0615] 表16

[0616]

基因	物种	Ensemble	转录物	转录物_ID	位置
IL1A	人	ENSG00000115008	IL1A-201	ENST00000263339.4	染色体 2：112,773,925-112,784,493
IL1A	小鼠	ENSMUSG00000027399	Il1a-201	ENSMUST00000028882.1	染色体 2：129,299,610-129,309,972
IL1A	猫	ENSFCAG00000008095	IL1A-201	ENSFCAT00000008097.5	染色体 A3：105,113,193-105,121,209
IL1A	犬	ENSCAFG00000007245	IL1A-201	ENSCAFT00000045928.3	染色体 17：36,970,573-36,978,736
IL1A	马	ENSECAG00000023727	IL1A-202	ENSECAT00000025409.2	主组件 15：16,360,700-16,369,812
IL1B	人	ENSG00000125538	IL1B-201	ENST00000263341.7	染色体 2：112,829,751-112,836,779
IL1B	小鼠	ENSMUSG00000027398	Il1b-201	ENSMUST00000028881.13	染色体 2：129,364,570-129,371,139
IL1B	猫	ENSFCAG00000005899	IL1B-201	ENSFCAT00000005904.5	染色体 A3：105,049,334-105,056,407
IL1B	犬	ENSCAFG00000007249	IL1B-201	ENSCAFT00000011613.4	染色体 17：37,019,329-37,024,176
IL1B	马	ENSECAG00000000051	IL1B-202	ENSECAT00000061518.2	主组件 15：16,418,738-16,444,697

[0617] 实例7.用于鼠IL-1β的免疫组织化学

[0618] 根据以下方案对鼠滑膜组织进行免疫组织化学以检测IL-1β：

[0619] 试剂和制备

[0620] 1.含0.5％(v/v)吐温-20的10X PBS

[0621] 2.无菌的PBS

[0622] 3.IHC缓冲液

[0623] 4.初级抗体(山羊抗小鼠IL-1;AF-401-NA,R&D Systems,Inc.)在无菌PBS中重构至0.2mg/ml的最终浓度。

[0624] a.在+4C下短期储存

[0625] b.在-20至-70C下长期储存

[0626] 5.在无菌PBS中以1mg/ml的最终浓度重构对照抗体(正常山羊IgG;AB-108-C,R&D Systems Inc.)。

[0627] a.在+4C下短期储存

[0628] b.在-20至-70C下长期储存

[0629] 6.二级抗体(HRP缀合的驴抗山羊IgG;ab6885;Abcam)作为重构的产物出现

[0630] a.在+4C下短期储存

[0631] b.在-20至-70C下长期储存

[0632] 7.过氧化物酶阻断(BLOXALL试剂,载体实验室(Vector Laboratories))

[0633] 8.正常马血清,稀释至2.5%(v/v)(Impress聚合物试剂盒(Impress PolymerKit);载体实验室)

[0634] 9.DAB色原体

[0635] 方法

[0636] 进行抗原检索1小时(手动或自动,用户偏好),然后将样本转移到PBS中用于短期储存。在室温下执行过氧化物酶阻断10分钟,并且随后在IHC缓冲液中洗涤样本5分钟。在室温下用对照马血清封闭样本60分钟,并且在室温下暴露于初级抗体(1:100或1:200,在1 x PBS-吐温中稀释)2小时。将样本在IHC缓冲液中洗涤两次持续5分钟(每次洗涤)。然后将样本暴露于二级抗体(1:500,在1 x PBS-吐温中稀释)1小时,并且在IHC缓冲液中洗涤两次持续5分钟(每次洗涤)。用DAB色原体进行检测持续30秒。使用Mayer的苏木精进行复染(6分钟),并通过分级酒精系列将样本返回至二甲苯。施加DPX固定剂,并附接盖玻片。

[0637] 如图10所示,滑膜组织中小鼠IL-1β的免疫组织化学数据显示在CRISPR治疗的动物中IL-1β表达减少。(A)在用PBS预处理的MSU注射的动物中,存在IL-1β(棕色染色)的稳健表达。在CRISPR处理的动物中未观察到这种效应(图C)。在CRISPR处理的动物中不存在IL-1β(棕色染色)类似于阴性抗体对照(图B和D)。所有图像均为原始放大率的10倍。(A)和(B)是取自相同动物中的相同关节的邻近切片,其中(A)显示针对IL-1β进行了特异性标记的组织,并且(B)显示用阴性(同位素)对照抗体标记的组织。染色的差异反映了在该动物(例如,经PBS预处理,然后用MSU晶体激发的阳性对照动物)中,在经PBS预处理的MSU注射的动物中可证明的IL-1β表达。(C)和(D)类似地是邻近切片,但来自在MSU注射之前用CRISPR编辑病毒预处理的动物。(C)在用IL-1抗体处理的切片中没有明显的IL-1β染色,和(D)在用阴性(同位素)对照抗体处理的切片中看到相同的阴性模式。不希望受任何特定理论的束缚,这证实了在CRISPR治疗的动物的滑膜中没有可检测的IL-1β表达。

[0638] 实例8.针对犬科动物和人类白细胞介素-1α(IL-1α)和白细胞介素-1β(IL-1β)的CRISPR/Cas9 RNA引导物的设计和验证。

[0639] 鉴定了人和犬科动物白细胞介素-1α(IL-1α)和白细胞介素-1β(IL-1β)基因的不同外显子的潜在crRNA序列。图13A-13D示出了从人IL-1α基因的外显子2-7中鉴定的crRNA序列的排序列表。图14A-14E示出了从人IL-1β基因的外显子2-7中鉴定的crRNA序列的排序列表。图15A-15C示出了从犬科动物IL-1β基因的外显子3-5中鉴定的crRNA序列。图16A-16B示出了从犬科动物IL-1α基因的外显子3-5中鉴定的crRNA序列。

[0640] 可公开获取的基因组(人类,hg38;犬,CanFam3.1)、折叠的基因模型(merged Ensembl/Havana)、组织特异性外显子表达(gtexportal.org)和各种gRNA模型然后用于选择每个基因两个至两个单独的crRNA序列,靶向犬科动物和人白细胞介素-1α(IL-1α)和白细胞介素-1β(IL-1β)。应用以下gRNA设计规则:

[0641] 1.gRNA靶区域限于编码序列(CDS)的前5-50%。

[0642] 2.根据使用Azimuth 2.0模型的最大中靶编辑(10.1038/nbt.3437)和使用切割频率确定(CFD)的最小脱靶编辑(10.1038/nbt.3437)以及来自Hsu等人的特异性评分(10.1038/nbt.2647),对单个gRNA进行排序。

[0643] 3.选择如由inDelphi(10.1038/s41586-018-0686-x)预测的具有高移码频率(>75%)和一致DNA修复结果(>0.48)的高排序sgRNA进行体外合成。

[0644] 使用该选择标准,选择靶向相应靶基因的不同外显子的crRNA引导序列用于进一步研究。具体地说,如图17A所示,选择了人IL-1α基因的sg235(SEQ ID NO:301)和sg236(SEQ ID NO:309)靶外显子3和4。同样,如图17B所示,选择了靶向人IL-1β基因的外显子3、4和5的sg237(SEQ IDNO:462)、sg238(SEQ ID NO:391)、sg248(SEQ ID NO:393)、sg249(SEQ ID NO:388)和sg250(SEQ ID NO:389)。如图17C所示,选择了靶向犬科动物IL-1α基因的外显子3、4、5的sg239(SEQ ID NO:552)、sg240(SEQ IDNO:554)、sg251(SEQ ID NO:578)和sg252(SEQ ID NO:579)。同样,如图17D所示,选择了靶向犬科动物IL-1β基因的外显子3和4的sg241(SEQ ID NO:498)和sg242(SEQ ID NO:506)。

[0645] 然后用设计成用于增加其稳定性和降低其细胞免疫原性的支架修饰来合成(Synthego)将所选的crRNA引导序列融合到支架序列上的单链引导RNA(sgRNA)。用于基因分型的引物被设计为从靶位点起至少200bp,并且生成PCR扩增子<1.5kb并合成(Merck)。

[0646] 以下量用于使用4D-核转染仪(Lonza,目录号AAF-1002B and AAF-1002X)和核比色皿条的基于单次电穿孔的转染。80pmol合成的sgRNA与4μg的Cas9核酸酶在室温下预复合至少10分钟。用PBS洗涤300-400K解离的细胞,然后将它们重新悬浮在20μl补充的P3核转染溶液中,并加入Cas9 RNP复合物。然后将这些细胞转移到核比色皿孔中,并使用脉冲代码ER-100进行电穿孔。在电穿孔后,立即将核比色皿放入37℃/5%CO2培养箱中持续10分钟,用于使细胞从电压中恢复。之后,将80μl生长培养基添加到核比色皿孔中,并将细胞转移到具有预热的生长培养基的6孔培养皿中。

[0647] 在电穿孔后的第二天和第十一天之间,使用DNeasy血液和组织试剂盒(DNeasy Blood&Tissue kit)(Qiagen,目录号69506)从50-200K细胞中提取基因组DNA。通过PCR扩增单个gRNA靶(和脱靶)区域。

[0648] PCR产物通过凝胶电泳验证大小,使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen,目录号28106)纯化,并提交至Source BioScience进行桑格测序。使用ICE版本1.2(在URL github.com/synthego-open/ice在线找到)对桑格轨迹(ab1)进行解卷积,以推断CRISPR编辑。另外,使用inDelphi生成使用所选探针的基因编辑的机器学习预测。另外,通过直接测序分析预测的脱靶位点,以验证gRNA是否促进脱靶编辑。

[0649] 在图17中示出了使用所选的引导序列进行基因编辑的经验实验和机器学习预测的结果。

[0650] 实例9.-选定的CRISPR/Cas9 RNA引导物对犬科动物和人白细胞介素-1α(IL-1α)

和白细胞介素-1β(IL-1β)释放的影响。

[0651] 来自实例8的具有最高敲除(KO)评分(即最高移码频率)的gRNA用于产生双重IL-1α/IL-1β敲除(KO)细胞。具体而言,使用crRNA序列CAGAGACAGAUGAUCAAUGG(SEQ ID NO:301)对人软骨细胞进行编辑以获得>99%的IL-1αKO,并且使用crRNA序列GUGCAGUUCAGUGAUCGUAC(SEQ ID NO:389)获得67%的IL-1βKO。使用crRNA序列GACAUCCCAGCUUACCUUCA(SEQ ID NO:554)对犬科动物软骨细胞进行编辑以获得97%的IL-1αKO,并且使用crRNA序列ACUCUUGUUACAGAGCUGGU(SEQ ID NO:506)获得99%的IL-1βKO。

[0652] 犬科动物软骨细胞(目录号Cn402K-05)、人软骨细胞(目录号402-05a)和人成纤维细胞样滑膜细胞(目录号408-05a)作为冷冻储备液(5x10^5个细胞)购自CellApplications、Inc.、加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego、CA)。在由补充有20%(v/v)未处理的FBS(Gibco,目录号10270-106)和1x GlutaMAX(Gibco,目录号35050-038)的DMEM/Ham's F12(Gibco,目录号21331-020)组成的生长培养基中培养软骨细胞。在由DMEM(Gibco,目录号11960-044)、10%未处理的FBS(Gibco,目录号10270-106)和1xGlutaMAX(Gibco,目录号35050-038)组成的生长培养基中培养滑膜细胞。证实细胞对于支原菌属的种呈阴性,并且在使用前进行STR分析。对于电穿孔和继代培养,使用0.25%胰蛋白酶(Gibco,目录号25200056)解离细胞。用9体积的生长培养基淬灭胰蛋白酶,并且将细胞以1,000g旋转以去除上清液。

[0653] 通过LPS诱导IL-1。白细胞介素-1的释放是通过用脂多糖(LPS)激发亚汇合单层细胞(编辑的或野生型非编辑的)来诱导的。简言之,将未编辑的(对照)和双重IL-1α/IL-1βKO(编辑的)人或犬科动物软骨细胞以每孔大约$5x10^4$个细胞的密度接种于24孔板中。在24-48小时后,用含有LPS(50μg/ml)或PBS媒介物的新鲜无血清的培养基替换培养基,并将板返回至培养箱。在6小时和24小时后收获板,用于确定IL-1释放。将培养基在液氮中速冻,并在-20℃下储存,直到测定培养基。

[0654] IL-1α和IL-1β释放的测量。培养基中IL-1α和IL-1β的浓度按照制造商的说明用物种特异性商业测定法进行测量。在测量之前,解冻冷冻的培养基,然后离心(1500g持续2分钟),以去除细胞碎片。适当时,以一式两份测量培养基的等分试样,并且从重组人或犬科动物IL-1α或β的标准曲线确定IL-1的浓度。犬科动物细胞中IL-1α释放的结果在图18A(6小时)和18B(24小时)中示出。犬科动物细胞中IL-1β释放的结果在图18C(6小时)和18D(24小时)中示出。在人类细胞中IL-1α释放的结果在图19A(6小时)和19B(24小时)中示出。在人类细胞中IL-1β释放的结果在图19C(6小时)和19D(24小时)中示出。

[0655] P3原代细胞核苷酸转染试剂和核苷酸条带(目录号V4XP-3032)购自Lonza(英国斯劳(Slough,UK))。Cas9核酸酶(目录号A36499)购自赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)。来自大肠杆菌055:B5(目录号L6529)的脂多糖(LPS)购自默克(Merck)。用于人IL-1α(目录号ab214025)和人IL-1β(目录号ab100560)、犬科动物IL-1α(目录号A4270)和犬科动物IL-1β(目录号ab273170)的ELISA试剂盒购自Abcam(英国剑桥(Cambridge,UK))。

[0656] 实例10.-CRISPR/Cas9介导的基因编辑的增加的特异性。

[0657] 使用增强的特异性CRISPR相关蛋白9重复实例8中报告的基因编辑特异性的分析。eSpCas9包含三个特异性增强突变:K848A、K1003A和R1060A,如Slaymaker等人,《科学》,351:84-88(2016)中所述。eSpCas9在大肠杆菌中表达并纯化至均匀。构建体具有161kDa的

分子量,并且含有N末端Flag-标签和C末端hexa-His-标签。eSpCas9的序列是:

[0658] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPS
KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF
LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD
LAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT
LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGS
IPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKG
ASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK
TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV
SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIK
ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLADDSIDNKVLTRSDKNRG
KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNT
KYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPALESEFVYGDYKVYD
VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKAPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVN
IVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL
KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP
AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKAAALEHHHHHH
(SEQ ID NO:680)。

[0659] 简言之,实例8中使用以及图17中所示的相同sgRNA与eSpCas9复合。如图17A所示,使用人IL-1α基因的sg235(SEQ ID NO:301)和sg236(SEQ ID NO:309)靶外显子3和4。同样地,如图17B所示,使用靶向人IL-1β基因的外显子3、4和5的sg237(SEQ ID NO:462)、sg238(SEQ ID NO:391)、sg248(SEQ ID NO:393)、sg249(SEQ ID NO:388)和sg250(SEQ ID NO:389)。如图17C所示,使用靶向犬科动物IL-1α基因的外显子3、4和5的sg239(SEQ ID NO:552)、sg240(SEQ ID NO:554)、sg251(SEQ ID NO:578)和sg252(SEQ ID NO:579)。同样,如图17D所示,使用靶向犬科动物IL-1β基因的外显子3和4的sg241(SEQ ID NO:498)和sg242(SEQ ID NO:506)。

[0660] 然后用设计成用于增加其稳定性和降低其细胞免疫原性的支架修饰来合成(Synthego)将所选的crRNA引导序列融合到支架序列上的单链引导RNA(sgRNA)。用于基因分型的引物被设计为从靶位点起至少200bp,并且生成PCR扩增子<1.5kb并合成(Merck)。

[0661] 以下量用于使用4D-核转染仪(Lonza,目录号AAF-1002B和AAF-1002X)和核比色皿条的基于单次电穿孔的转染。80pmol合成的sgRNA与eSpCas9核酸酶在室温下预复合至少10分钟。用PBS洗涤300-400K解离的细胞,然后将它们重新悬浮在20μl补充的P3核转染溶液中,并加入Cas9 RNP复合物。然后将这些细胞转移到核比色皿孔中,并使用脉冲代码ER-100进行电穿孔。在电穿孔后,立即将核比色皿放入37℃/5%CO2培养箱中持续10分钟,用于使细胞从电压中恢复。之后,将80μl生长培养基添加到核比色皿孔中,并将细胞转移到具有预热的生长培养基的6孔培养皿中。

[0662] 在电穿孔后的第二天和第十一天之间，使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen，目录号69506)从50-200K细胞中提取基因组DNA。通过PCR扩增单个gRNA靶(和脱靶)区域。

[0663] PCR产物通过凝胶电泳验证大小，使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen，目录号28106)纯化，并提交至Source BioScience进行桑格测序。使用ICE版本1.2(在URL github.com/synthego-open/ice在线找到)对桑格轨迹(ab1)进行解卷积，以推断CRISPR编辑。另外，使用inDelphi生成使用所选探针的基因编辑的机器学习预测。另外，通过直接测序分析预测的脱靶位点，以验证gRNA是否促进脱靶编辑。

[0664] 与实例8中报告的Cas9编辑相比，eSpCas9的使用减少了脱靶编辑，而不丧失中靶活性。例如，通过扩增表18中所报道的基因座，然后对该基因座进行测序，评估了sgRNA#242(靶向犬科动物IL-1B)对分别具有2、3和3个错配的三个基因座的脱靶编辑。如表18中所示，第一个脱靶基因座在实例8所述的实验中没有经历编辑，并且在此未进行测试。第二个脱靶基因座在实例8所述的实验中经历了几乎完全的脱靶编辑(98-99%)，但在使用eSpCas9时没有经历编辑。在实例8所述的实验中，第三个脱靶基因座经历了一些编辑经历了(0-25%)，但是当使用eSpCas9时，再次经历了编辑。此外，如表17中所示，对于所测试的每个sgRNA，对应于使用如本实例所述的eSpCas9进行的编辑的“增强的中靶评分”与对应于实例8中所述的编辑的“中靶评分”一样高(如果不是更高的话)。

[0665] 表17

[0666]

	靶标		中靶指标				脱靶指标
#	外显子#	链	中靶评分*	精度评分**	移码%***	增强的中靶评分****	脱靶评分^
sg235	3	-	69.5	0.57	93.7	72.4	67
sg236	4	-	53.9	0.65	93.9	66.7	76.9
人 IL1B（IL1B-201；GRCh38）							
	靶标		中靶指标				脱靶指标
#	外显子#	链	中靶评分*	精度评分**	移码%***	增强的中靶评分****	脱靶评分^
sg237	3	+	60.9	0.57	80	64.7	66.7
sg238	4	-	58.3	0.6	86.3	65.7	49.3
sg248	5	+	61.7	0.65	89.9	69.6	86.5
sg249	5	+	68.2	0.52	75.3	65.9	93.8
sg250	5	-	64.4	0.48	83.9	65.2	91
犬科动物 IL1A（IL1A-201；CanFam3.1）							
	靶标		中靶指标				脱靶指标
#	外显子#	链	中靶评分*	精度评分**	移码%***	增强的中靶评分****	脱靶评分^
sg239	3	+	49.5	0.55	78.3	58.1	57.7
sg240	4	+	43.8	0.61	87.2	59.0	41.8
sg251	5	+	72.1	0.49	77.6	67.7	85.1
sg252	5	-	68.4	0.48	90.4	68.8	66.6

[0667]

[0668]

犬科动物 IL1B（IL1B-201；CanFam3.1）							
	靶标		中靶指标				脱靶指标
#	外显子#	链	中靶评分*	精度评分**	移码%***	增强的中靶评分****	脱靶评分^
sg241	3	+	66.1	0.53	91.2	69.1	51.5
sg242	4	-	68.9	0.64	84	71.5	62

[0669] 表18

[0670]

序列	PAM	评分	基因	染色体	链	位置	不匹配	具有Cas9的CRISPR编辑	具有增强的特异性的Cas9的CRISPR编辑
ACTCTTGTTAC AGAGCTGGT	GGG	100	ENSCAFG00000007249	chr17	1	37022194	0		
ACT**T**TTGTT**T**C AGAGCTGGT	CAG	6.16161972		chr33	-1	20234937	2	0%	
CCTCA**T**G**C**TAC AGAGCTGGT	GGG	2.76564774		chr1	-1	47541563	3	98-99%	0%
GTGCTTGTTAC AGAGCTGGT	GGG	2.32143742		chr26	-1	32323843	3	0-25%	0%

[0671] 提供上文阐述的实例是为了向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本公开的组合物、系统和方法的实施例的完整公开和描述，而不是旨在限制发明人认为是他们的发明的范围。对本领域技术人员来说显而易见的用于执行本公开的实施例的上述模式的修改旨在落入所附权利要求的范围内。说明书中提到的所有专利和出版物都表明了本公开所涉及领域的技术人员的技能水平。

[0672] 所有标题和章节名称仅用于清晰和参考的目的，并且不应被视为以任何方式进行限制。例如，本领域技术人员将意识到根据本文描述的公开的精神和范围适当地组合来自不同标题和章节的各个方面的有用性。

[0673] 应当理解，本文所述的方法不限于本文所述的特定方法、方案、受试者和测序技术，因此可以变化。还应当理解，本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的，并不旨在限制本文所述的方法和组合物的范围，该范围仅由所附的权利要求限定。虽然在本文中已经示出和描述了本公开的一些实施例，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，此类实施例仅作为实例提供。在不脱离本公开的情况下，本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应当理解，在实践本公开时，可以采用本文描述的本公开的实施例的各种替代方案。所附权利要求旨在限定本公开的范围，并且由此覆盖这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

[0674] 为了说明，参考示例性应用描述了几个方面。除非另有说明，任何实施例都可以与任何其他实施例相结合。应当理解，阐述了许多具体细节、关系和方法，以提供对本文所述特征的全面理解。然而，本领域技术人员将容易认识到，本文描述的特征可以在没有一个或多个特定细节的情况下或者通过其他方法来实现。本文描述的特征不受动作或事件的图示顺序的限制，因为一些动作可以以不同的顺序发生和/或与其他动作或事件同时发生。此外，并非所有示出的动作或事件都是实现根据本文描述的特征的方法所必需的。

[0675] 虽然本文已经示出和描述了一些实施例，但是对于本领域技术人员来说，显然此类实施例仅仅是作为实例提供的。这并不意味着本公开受到说明书中提供的具体实例的限制。虽然已经参考前述说明书描述了本公开，但是本文的实施例的描述和图示并不意味着在限制的意义上进行解释。在不脱离本公开的情况下，本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。

[0676] 此外，应当理解，本公开的所有方面不限于本文阐述的取决于各种条件和变量的具体描述、配置或相对比例。应当理解，在实践本公开时，可以采用本文描述的本公开的实

施例的各种替代方案。因此，预期本公开还将覆盖任何此类替换、修改、变化或等同物。所附权利要求旨在限定本公开的范围，并且由此覆盖这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

[0677] 本文的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文，其并入程度如同每一单独的出版物、专利或专利申请均明确且单独地指示通过引用并入本文一样。如果本文中的术语与所并入的参考文献中的术语之间存在冲突，则以本文中的术语为准。

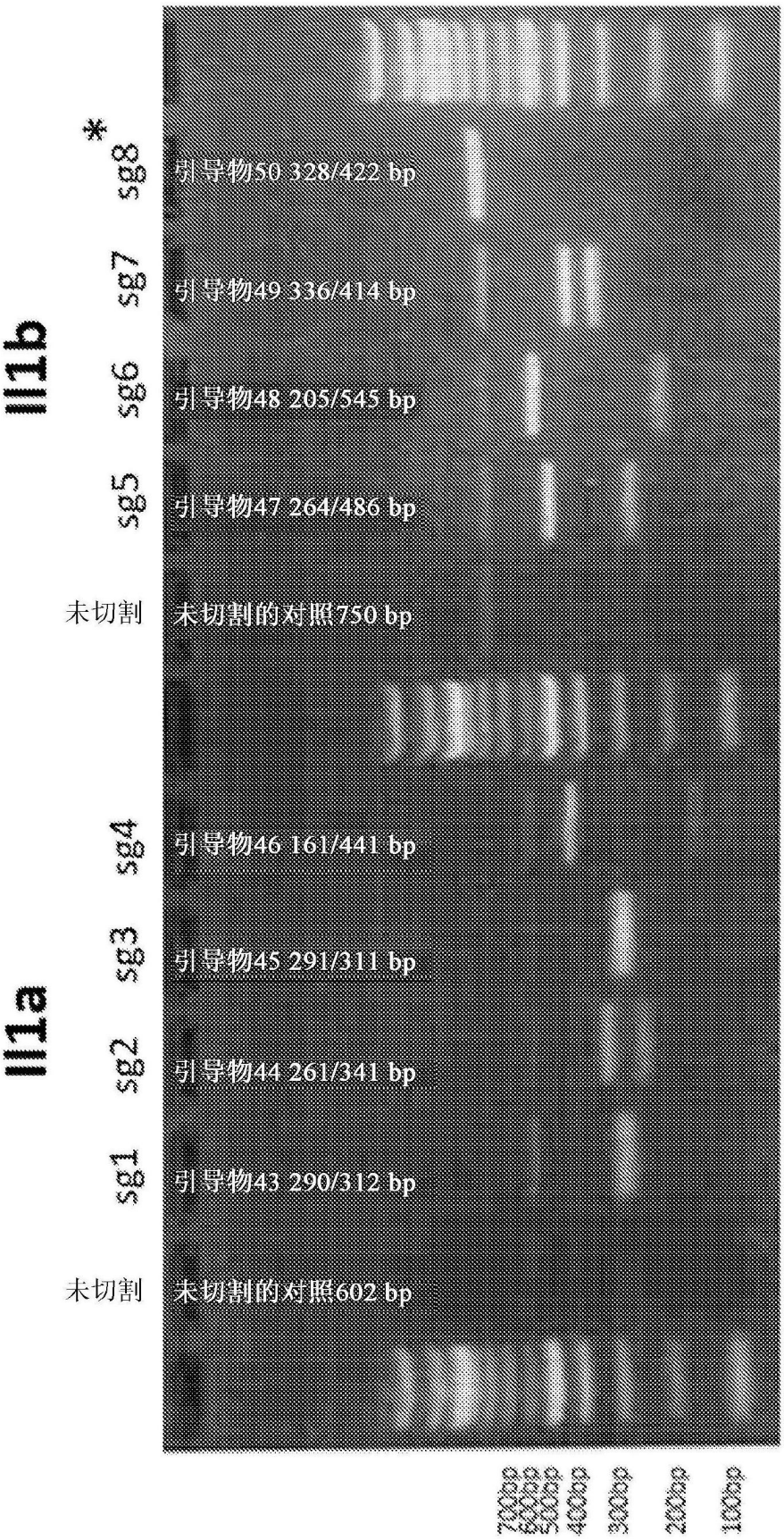

Il1b
sg8*
sg7
sg6
sg5
未切割
Il1a
sg4
sg3
sg2
sg1
未切割
引导物50 328/422 bp
引导物49 336/414 bp
引导物48 205/545 bp
引导物47 264/486 bp
未切割的对照750 bp
引导物46 161/441 bp
引导物45 291/311 bp
引导物44 261/341 bp
引导物43 290/312 bp
未切割的对照602 bp
700bp
600bp
500bp
400bp
300bp
200bp
100bp

图1A

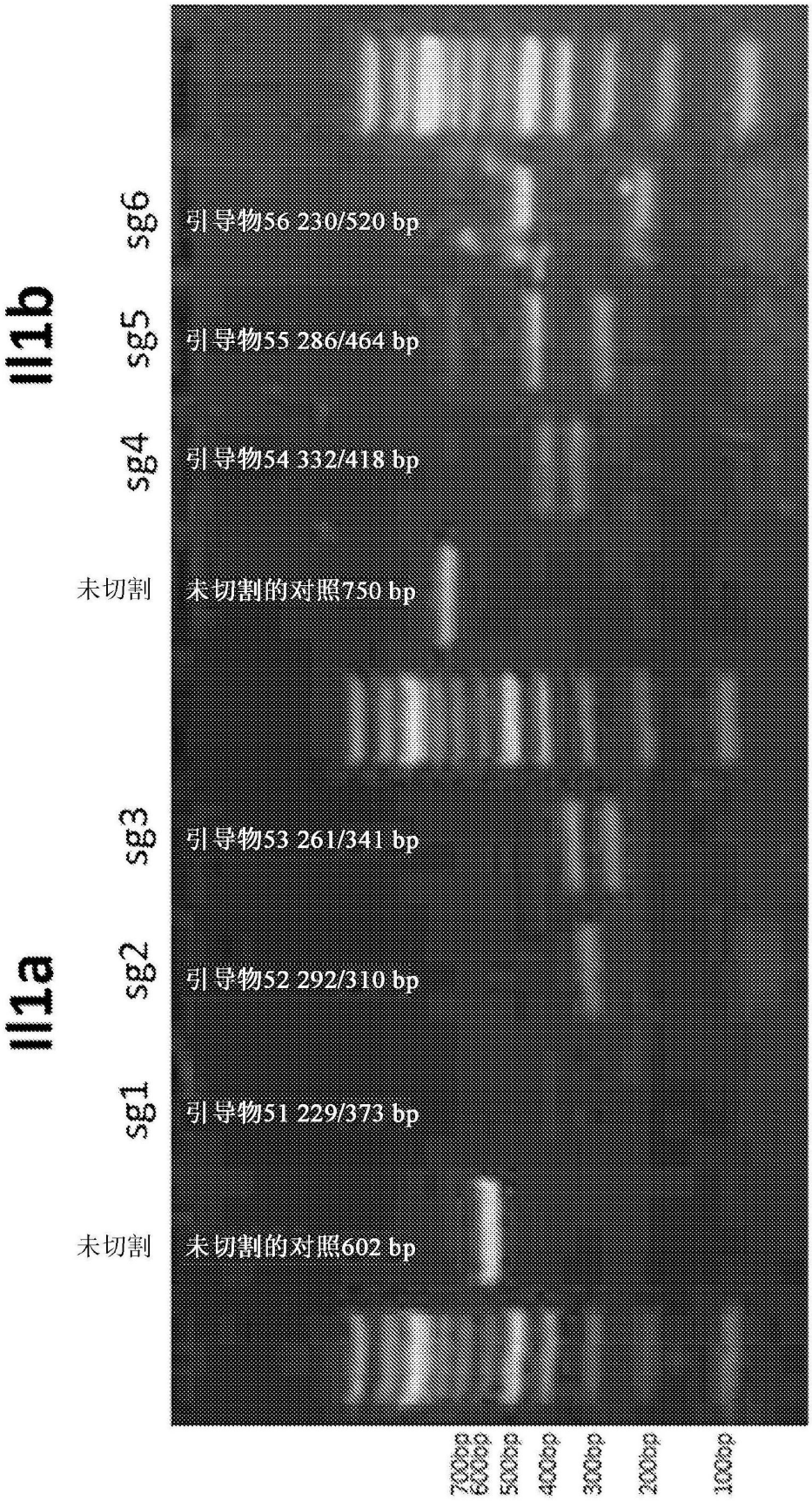

Il1b
sg6
引导物56 230/520 bp
sg5
引导物55 286/464 bp
sg4
引导物54 332/418 bp
未切割
未切割的对照750 bp
Il1a
sg3
引导物53 261/341 bp
sg2
引导物52 292/310 bp
sg1
引导物51 229/373 bp
未切割
未切割的对照602 bp
700bp
600bp
500bp
400bp
300bp
200bp
100bp

图1B

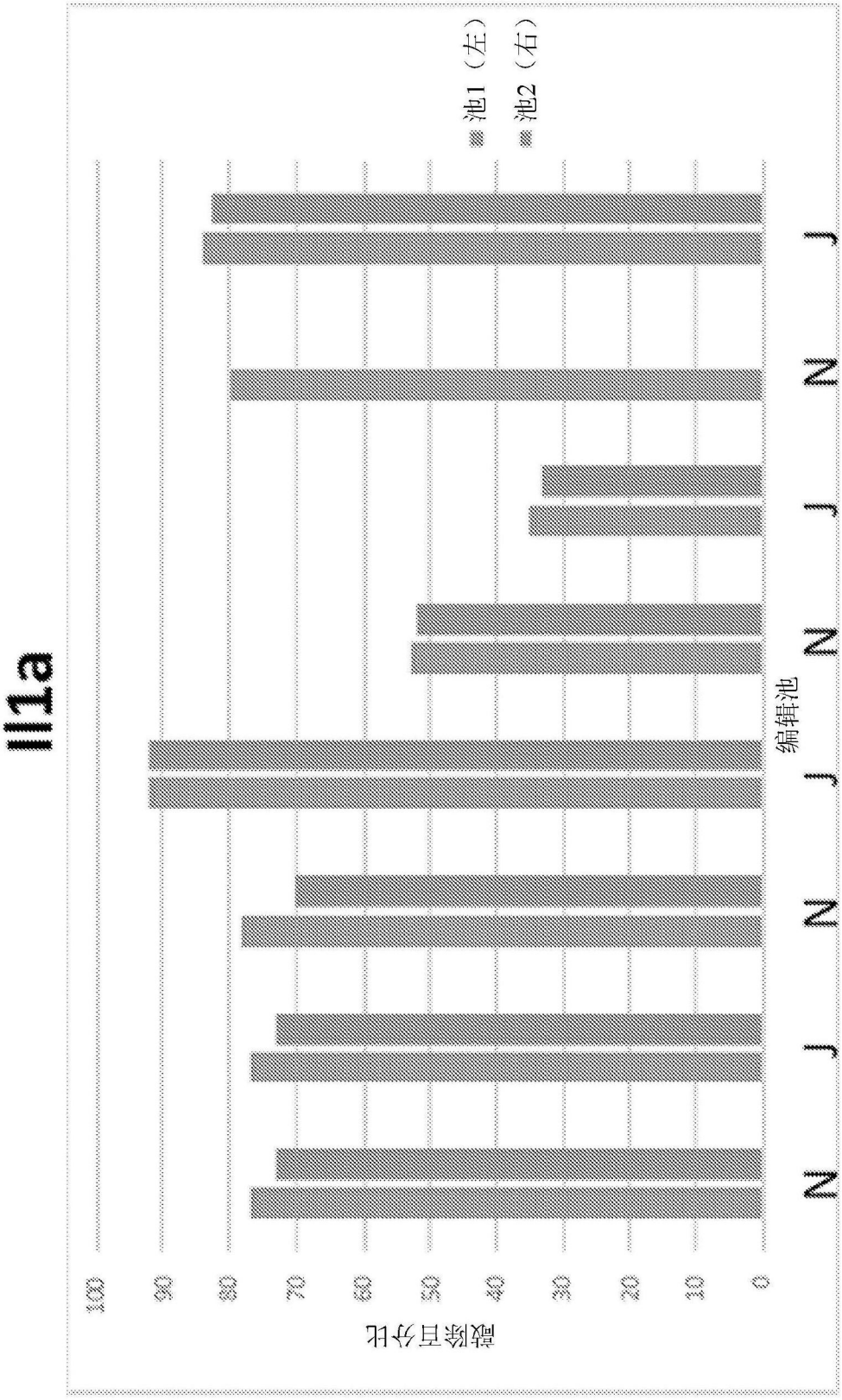

Il1a
池1（左）
池2（右）
敲除百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
编辑池
N J
sgRNA1
N J
sgRNA2
N J
sgRNA3
N J
sgRNA4

图2A

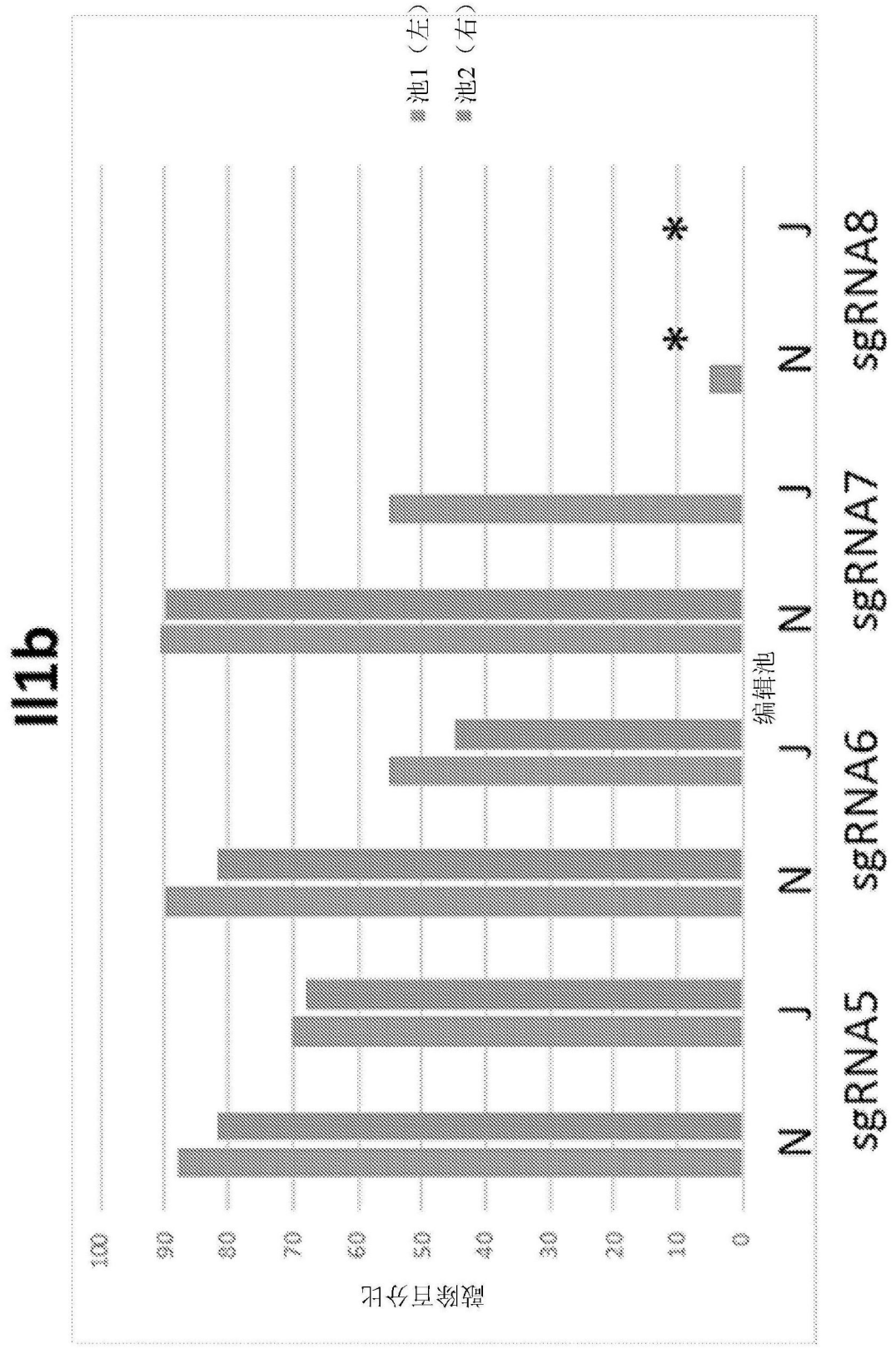

Il1b
池1（左）
池2（右）
敲除百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
N
J
sgRNA5
sgRNA6
sgRNA7
sgRNA8
编辑池

图2B

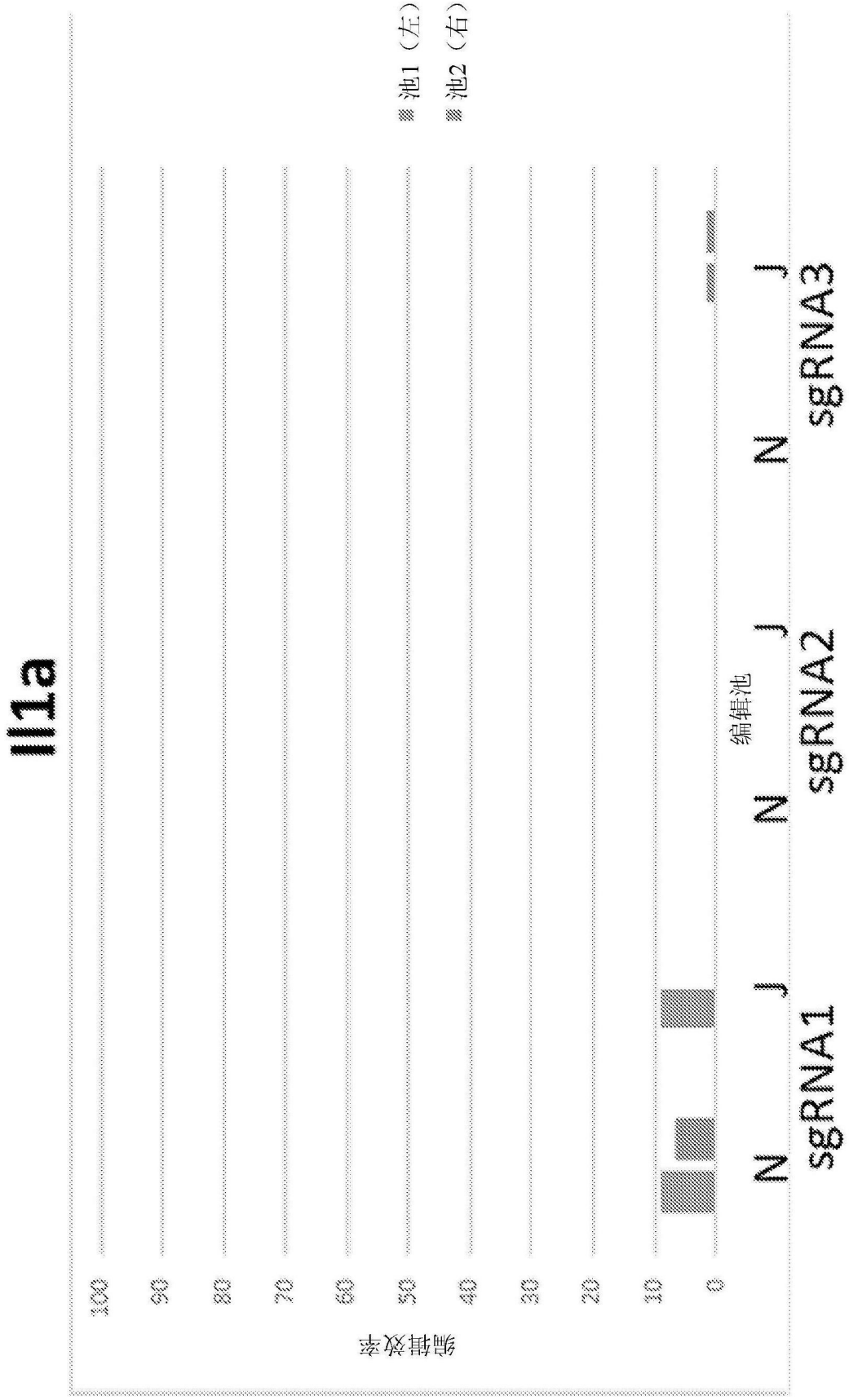

Il1a
池1（左）
池2（右）
编辑效率
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
编辑池
N
J
sgRNA1
sgRNA2
sgRNA3

图2C

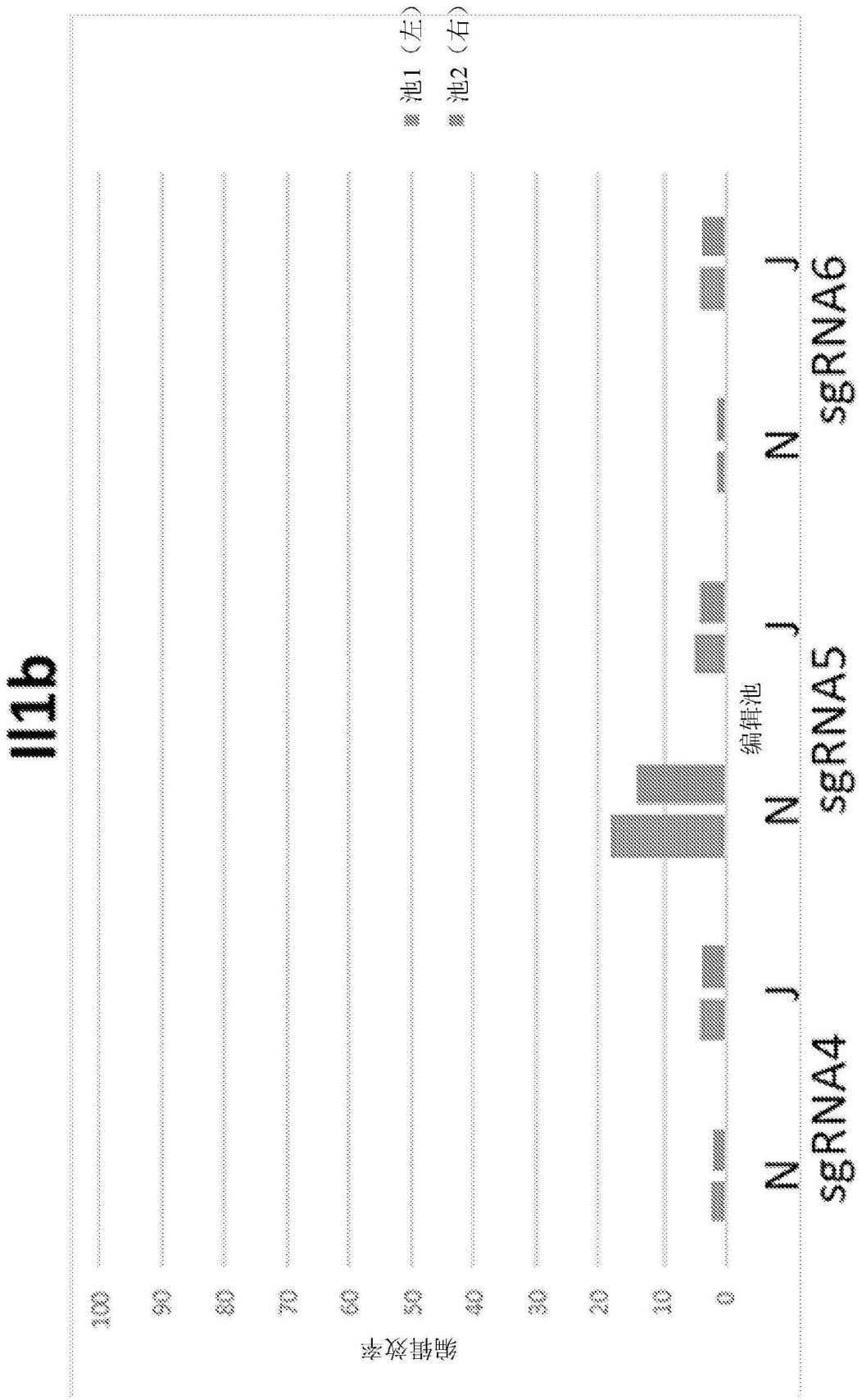

Il1b
池1（左）
池2（右）
编辑效率
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
编辑池
N
J
sgRNA4
sgRNA5
sgRNA6

图2D

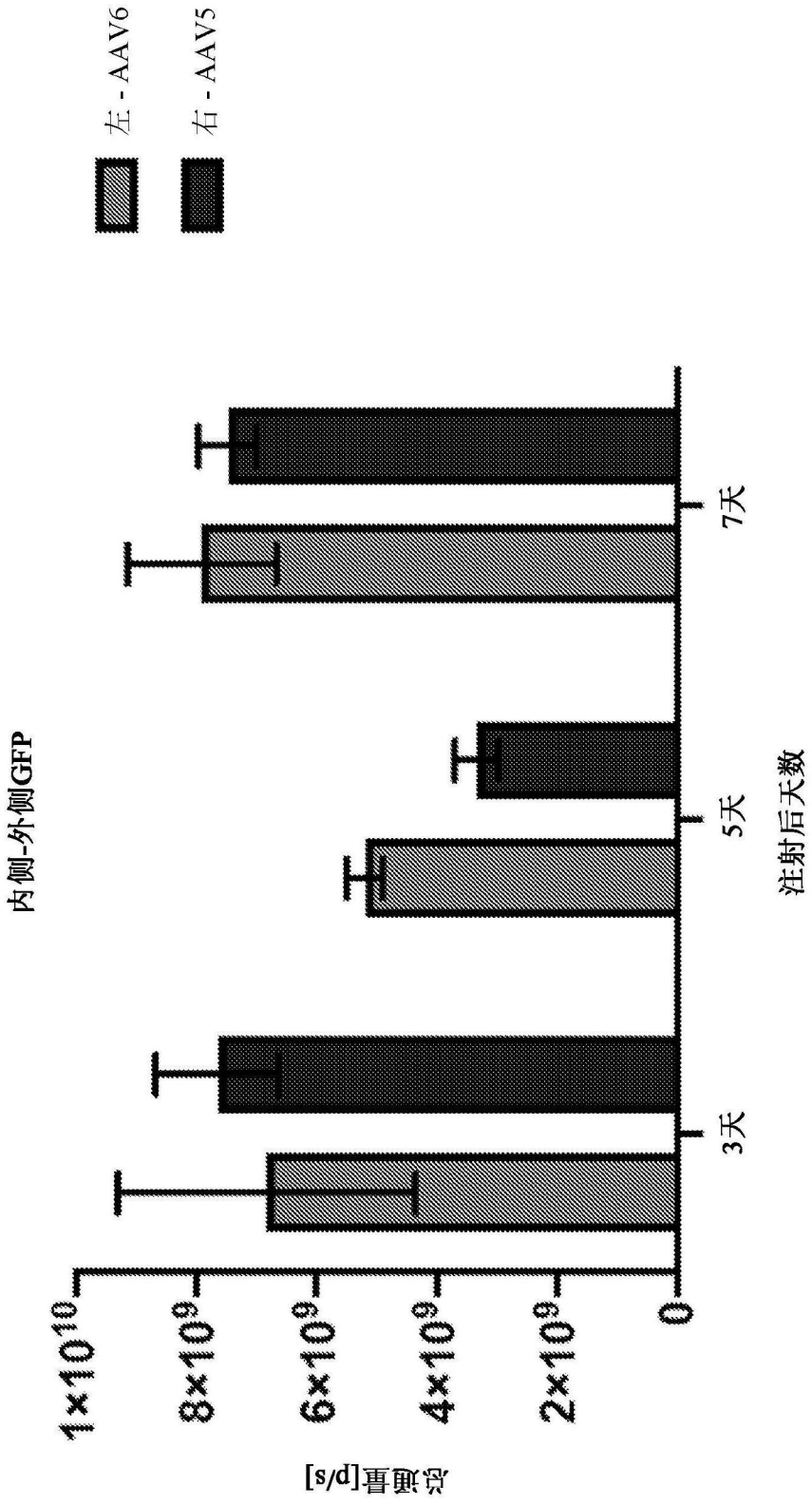

左 - AAV6
右 - AAV5
内侧-外侧GFP
总通量[p/s]
1×10^10
8×10^9
6×10^9
4×10^9
2×10^9
0
3天
5天
7天
注射后天数

图3

组	治疗	激发
AAV-6活性的	具有两个引导物的AAV-6	MSU
AAV-6乱序的	具有乱序引导物的AAV-6	MSU
未处理的	盐水	MSU
AAV-5活性的	具有两个引导物的AAV-5	MSU
AAV-5乱序的	具有乱序引导物的AAV-5	MSU
正常*	无	无

*表示来自未处理组的左膝盖

图4

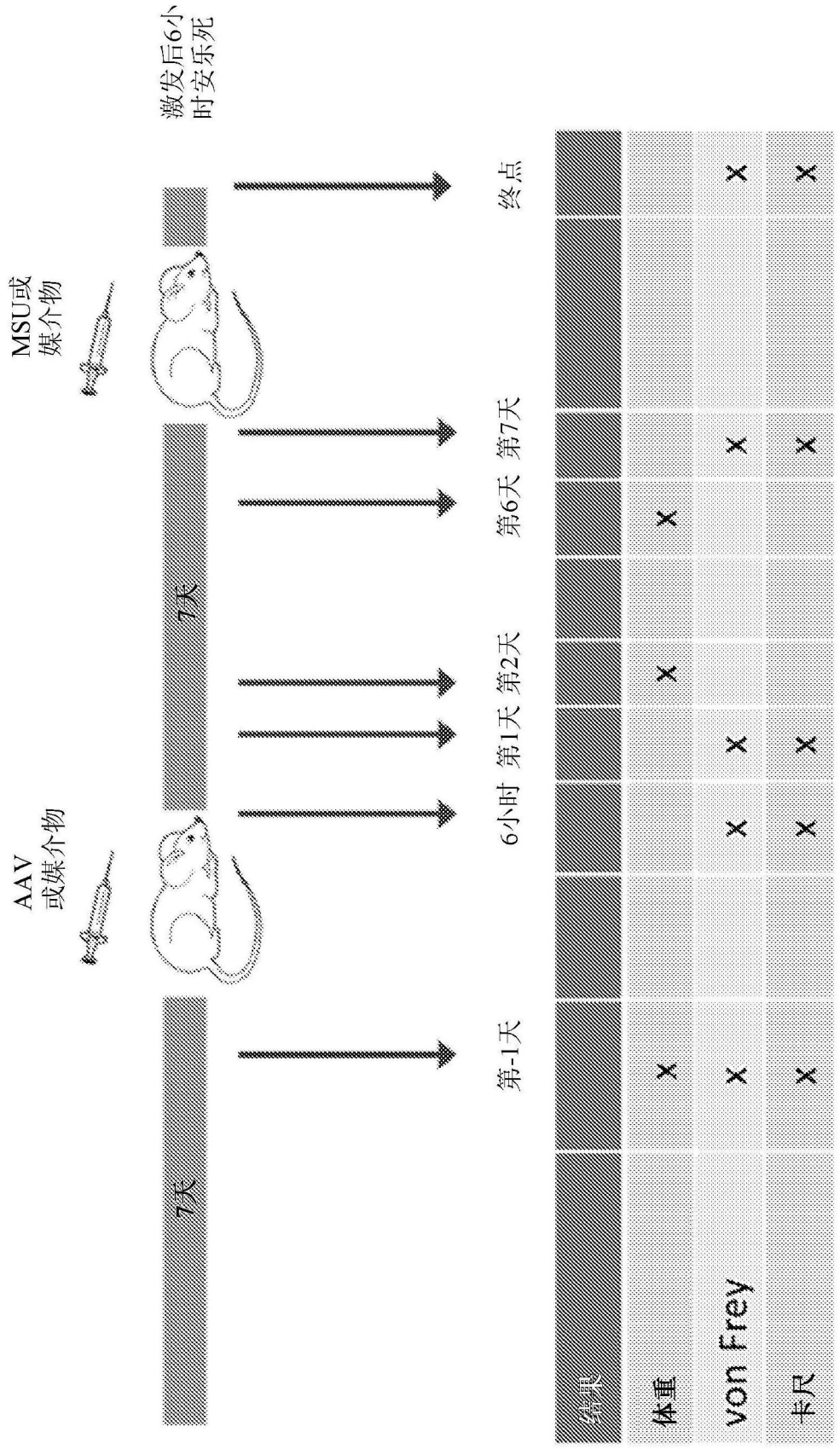

AAV
或媒介物
MSU或
媒介物
7天
7天
激发后6小
时安乐死
第-1天
6小时
第1天
第2天
第6天
第7天
终点
结果
体重
von Frey
卡尺
x

图5

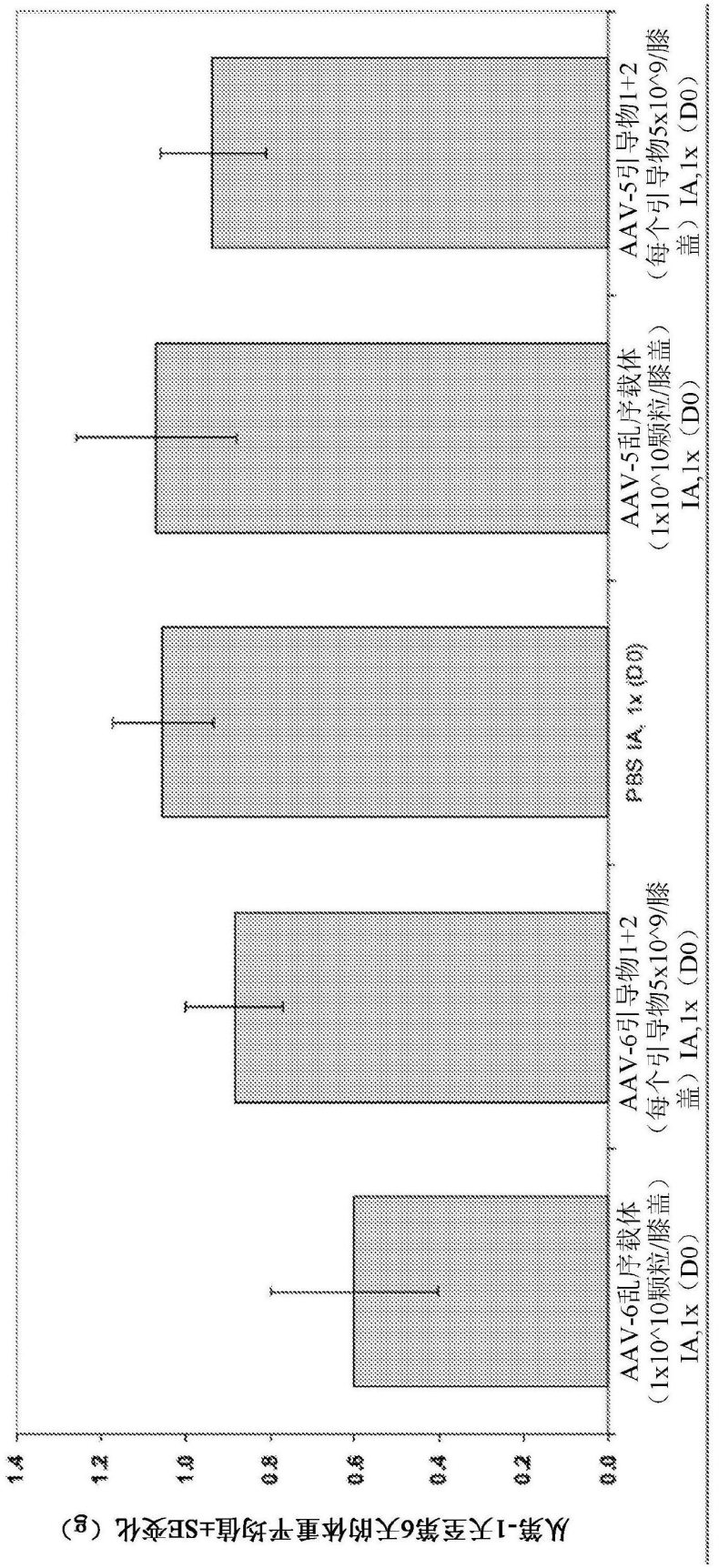

从第-1天至第6天的体重平均值±SE变化（g）
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AAV-6乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-6引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-5引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）
体重变化（第-1至第6天）
n=14/组
*p≤0.05 ANOVA（Tukey事后）相对于AAV-6引导物1
†p≤0.05 ANOVA（Tukey事后）相对于PBS
‡p≤0.05 ANOVA（Tukey事后）相对于AAV-5乱序载体
§p≤0.05 ANOVA（Tukey事后）相对于AAV-5引导物1

图6

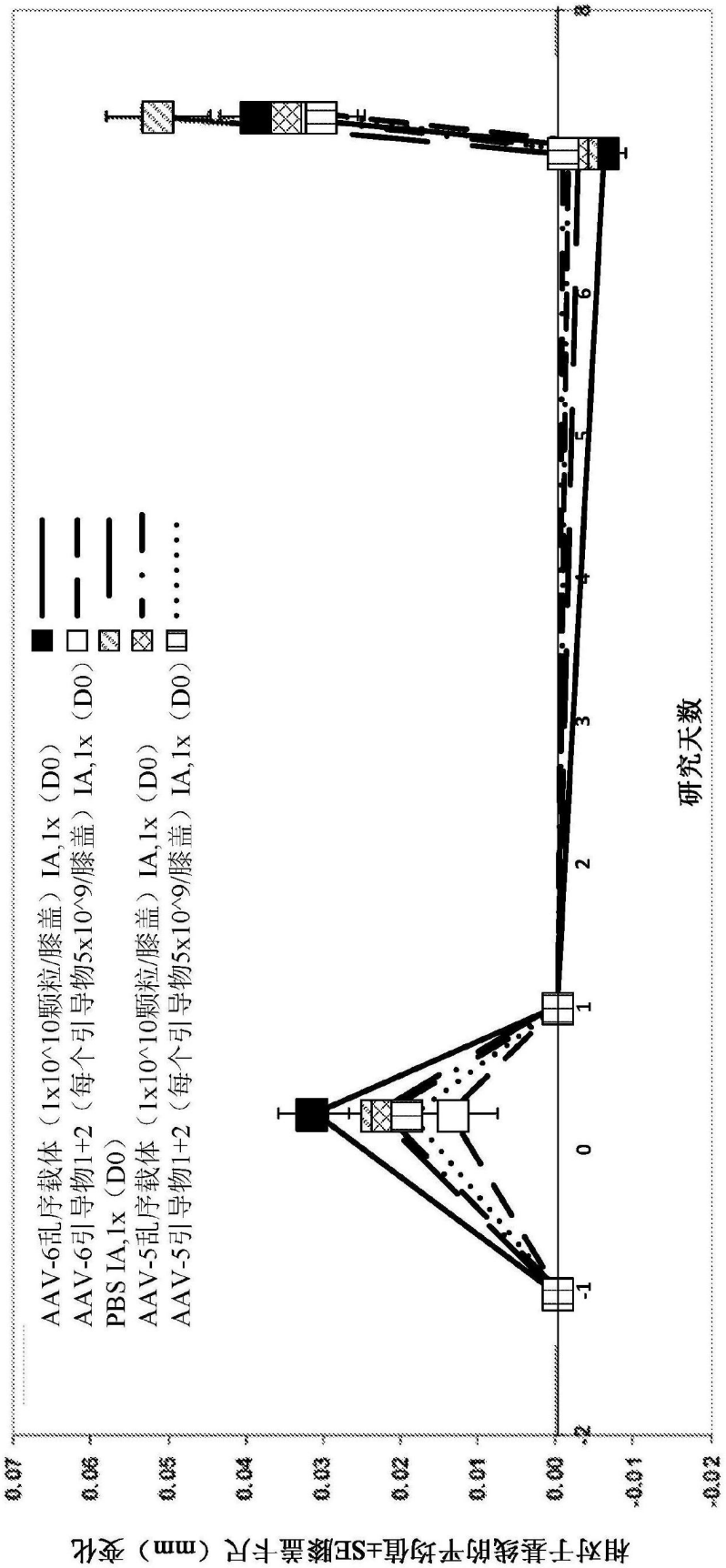

AAV-6乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-6引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）
PBS IA,1x（D0）
AAV-5乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-5引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）
研究天数
相对于基线的平均值±SE膝盖卡尺（mm）变化

图7A

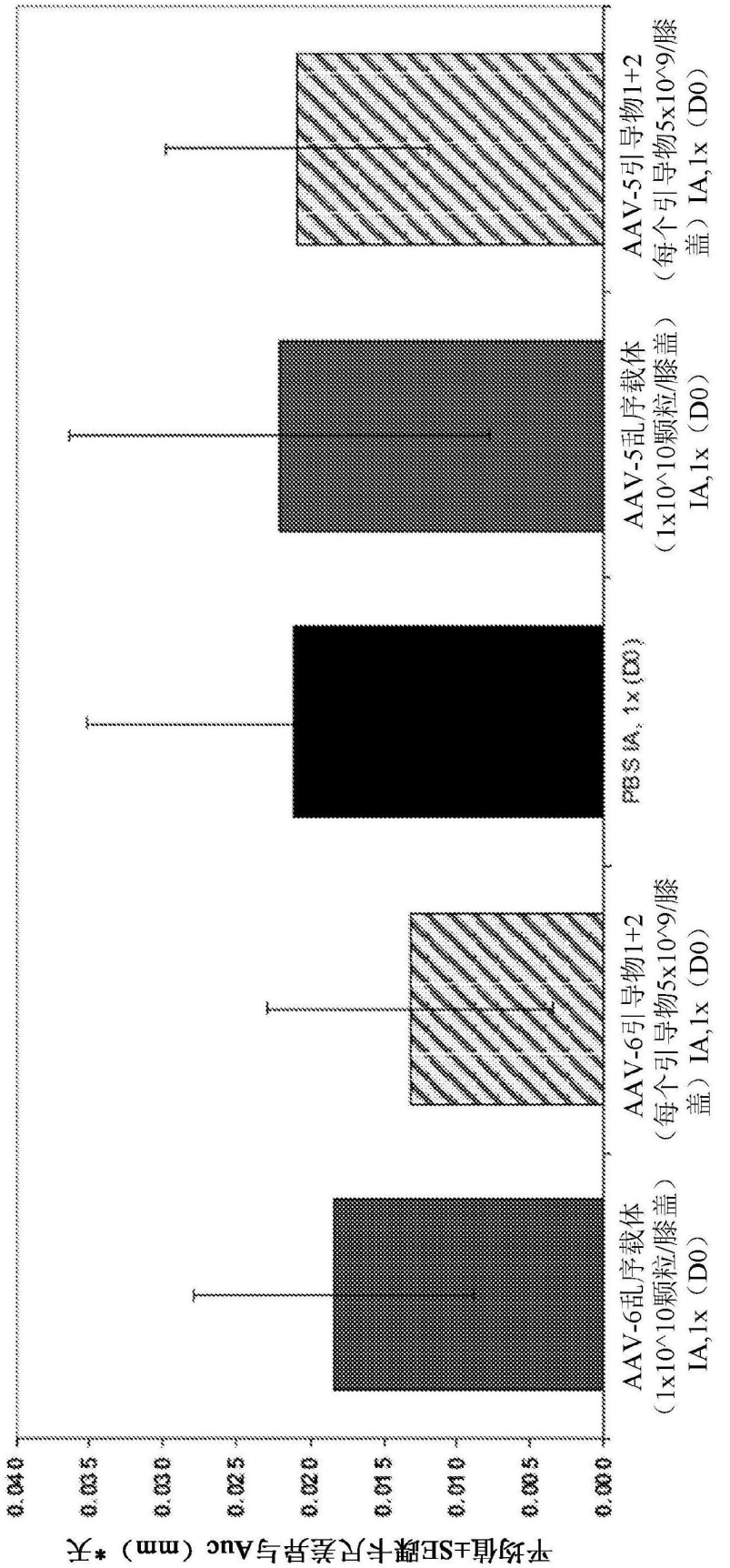

平均值±SE踝卡尺差异与Auc（mm）*天
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
AAV-6乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-6引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-5引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）

图7B

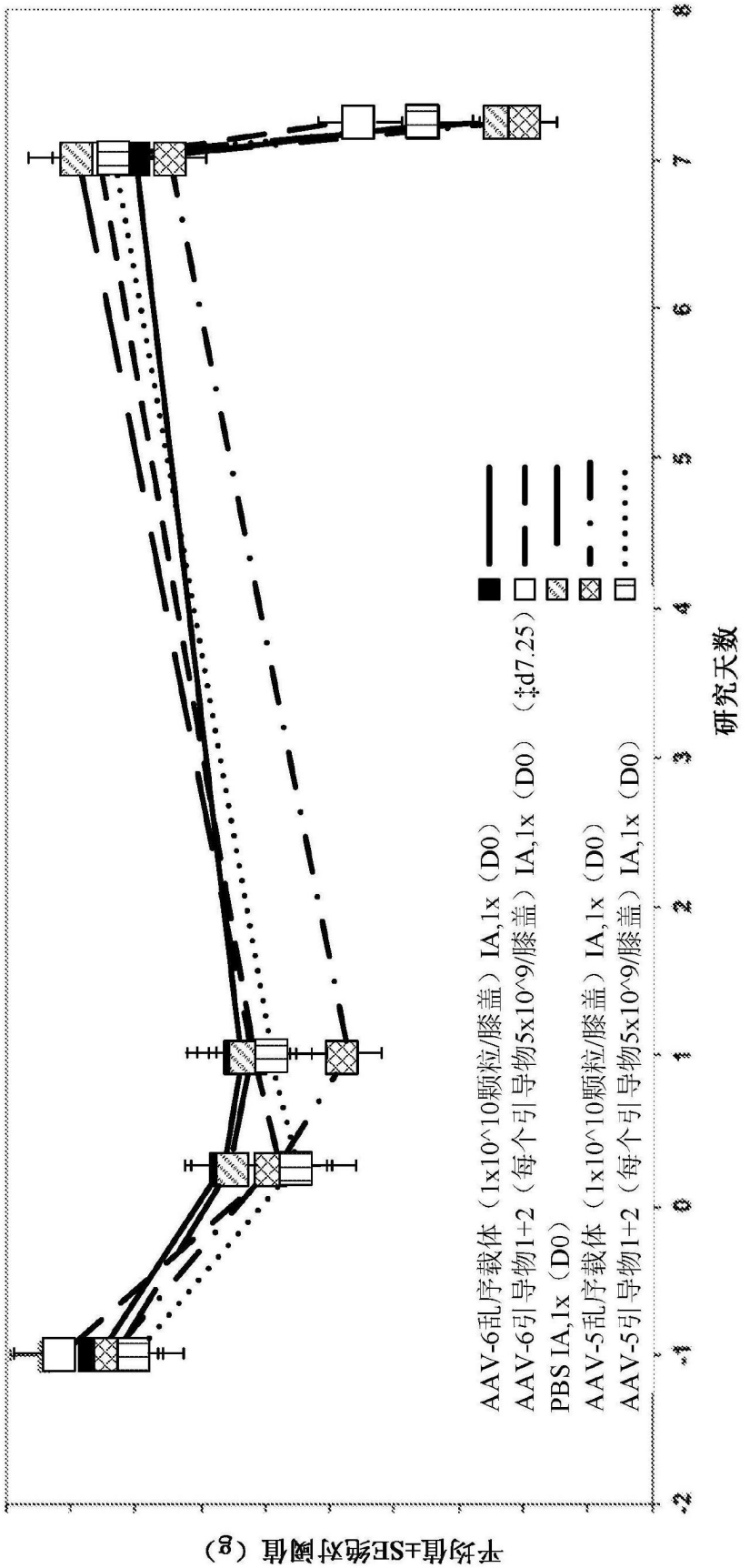

平均值±SE绝对阈值（g）
研究天数
AAV-6乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-6引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）（‡d7.25）
PBS IA,1x（D0）
AAV-5乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-5引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）

图8A

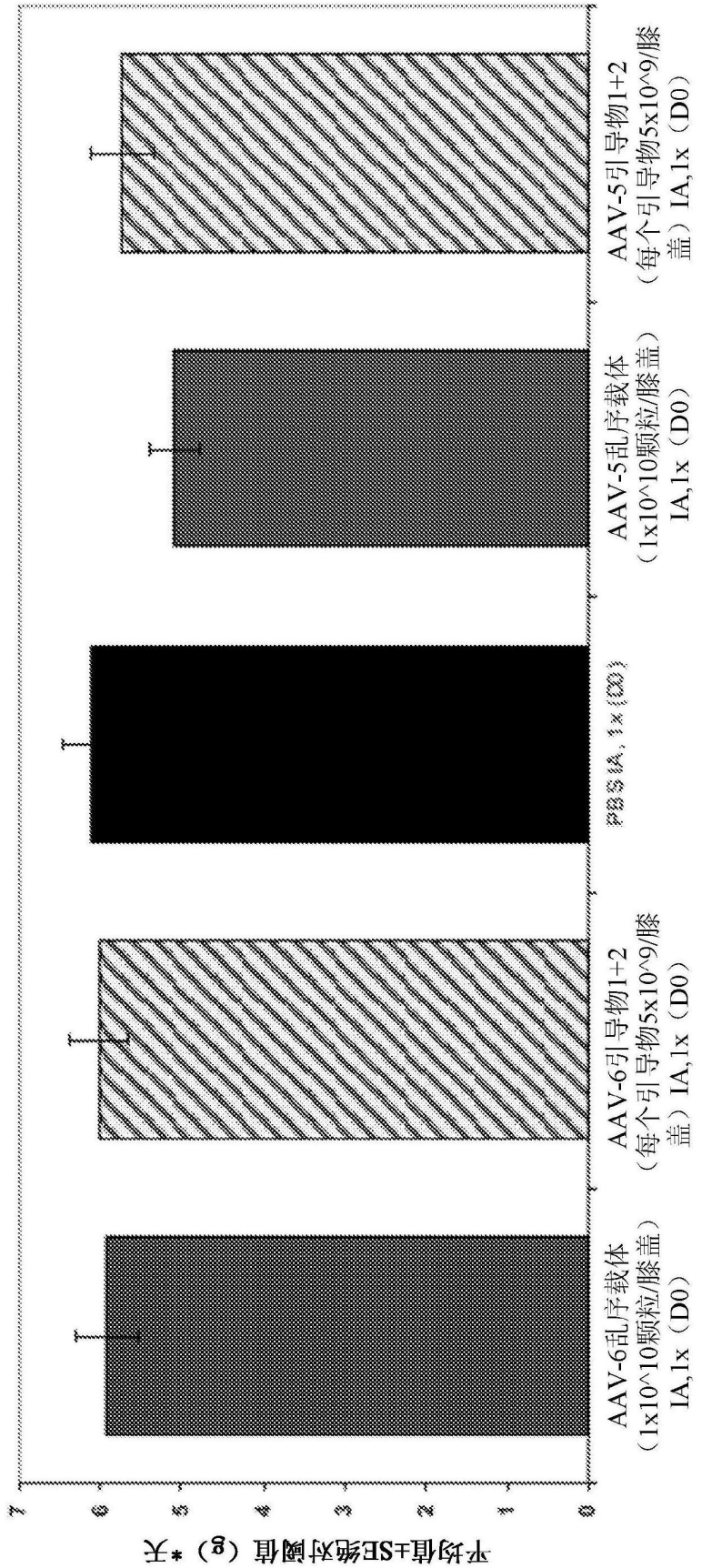

平均值±SE绝对阈值（g）*天
0
1
2
3
4
5
6
7
AAV-6乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-6引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5乱序载体（1x10^10颗粒/膝盖）IA,1x（D0）
AAV-5引导物1+2（每个引导物5x10^9/膝盖）IA,1x（D0）

图8B

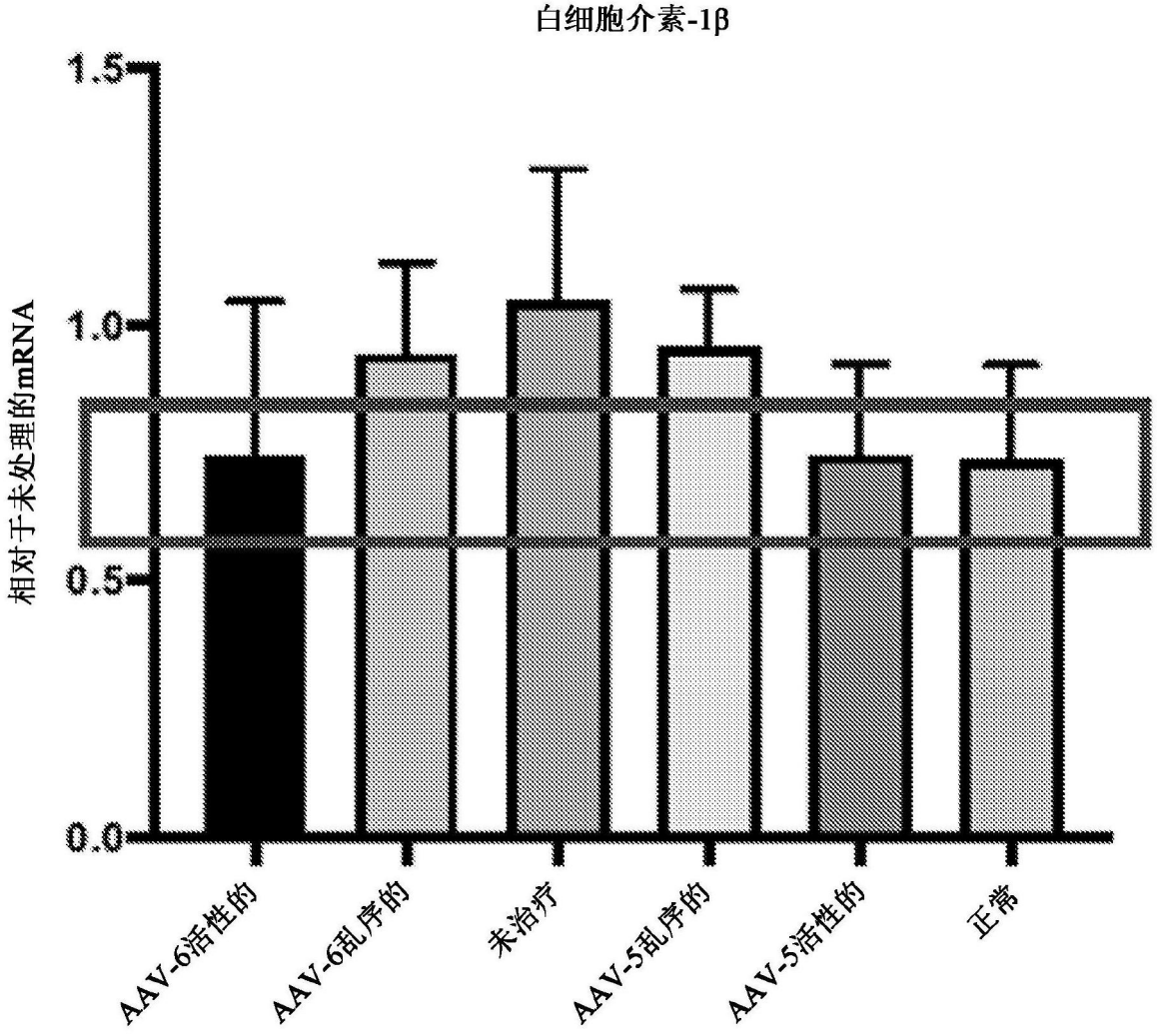

白细胞介素-1β
相对于未处理的mRNA
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV-6活性的
AAV-6乱序的
未治疗
AAV-5乱序的
AAV-5活性的
正常

图9

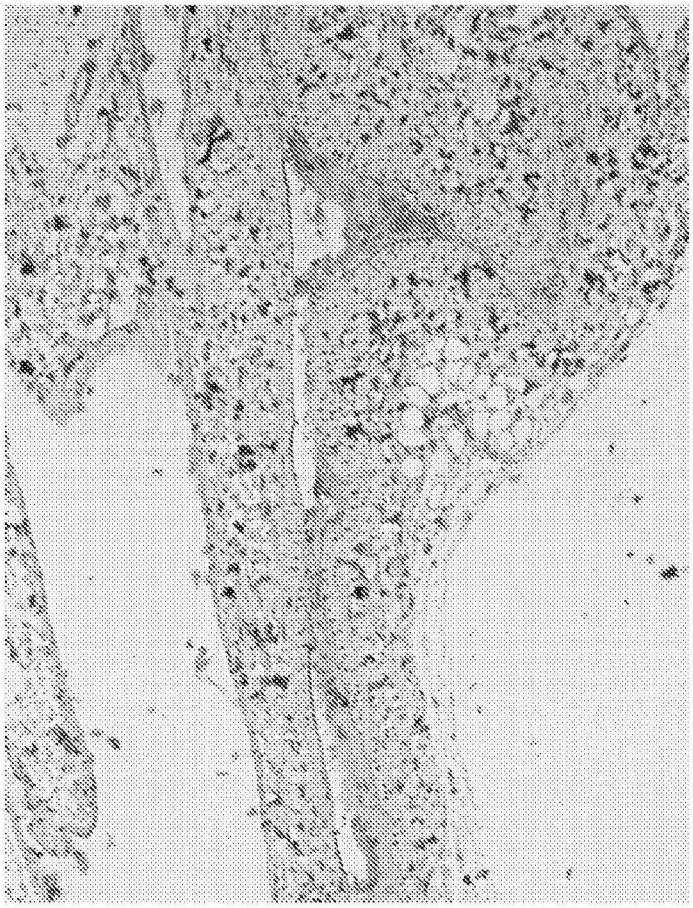


图10A

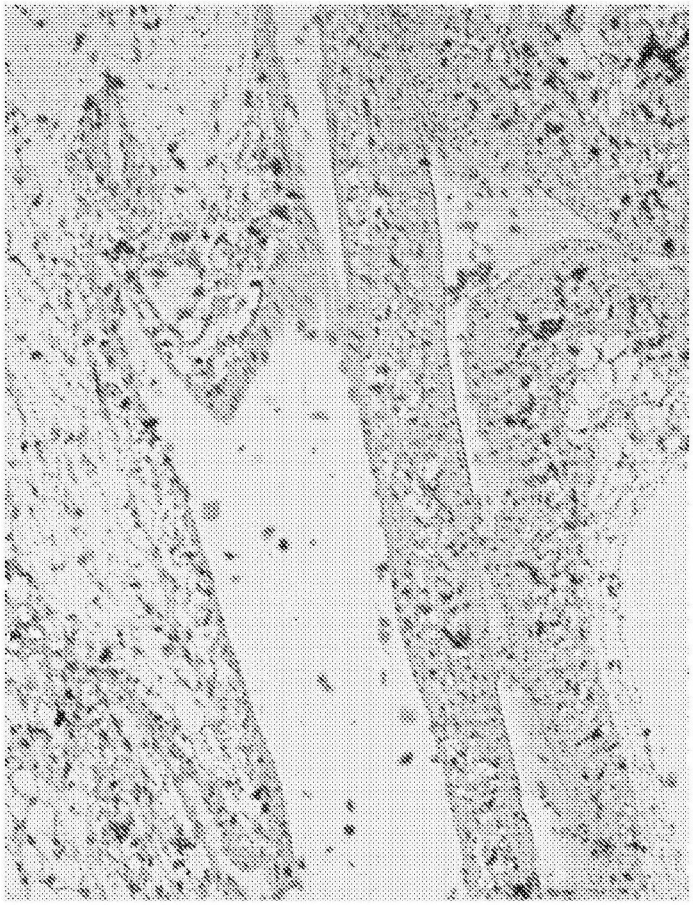


图10A

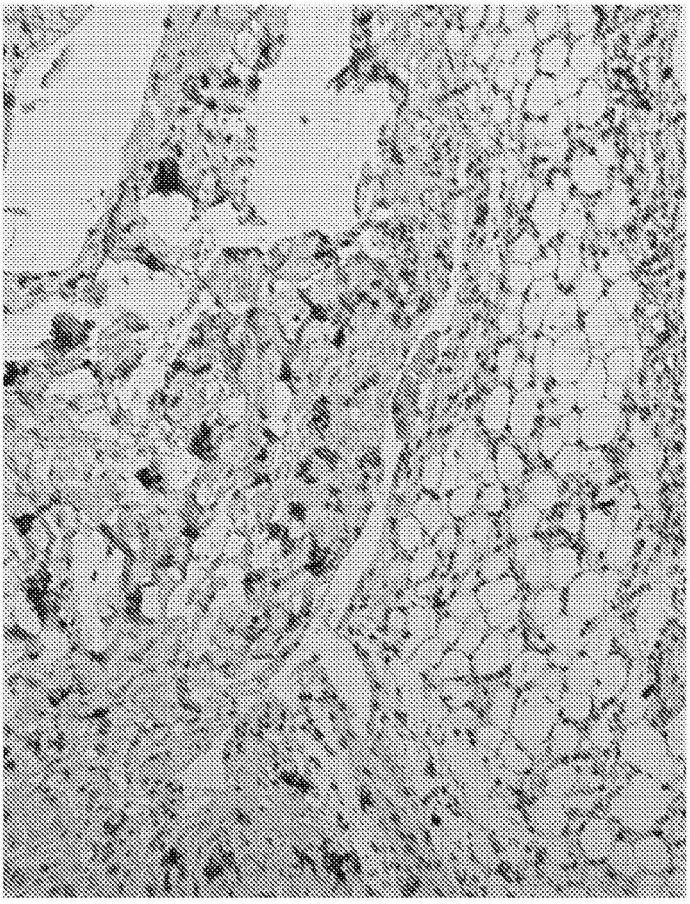


图10C

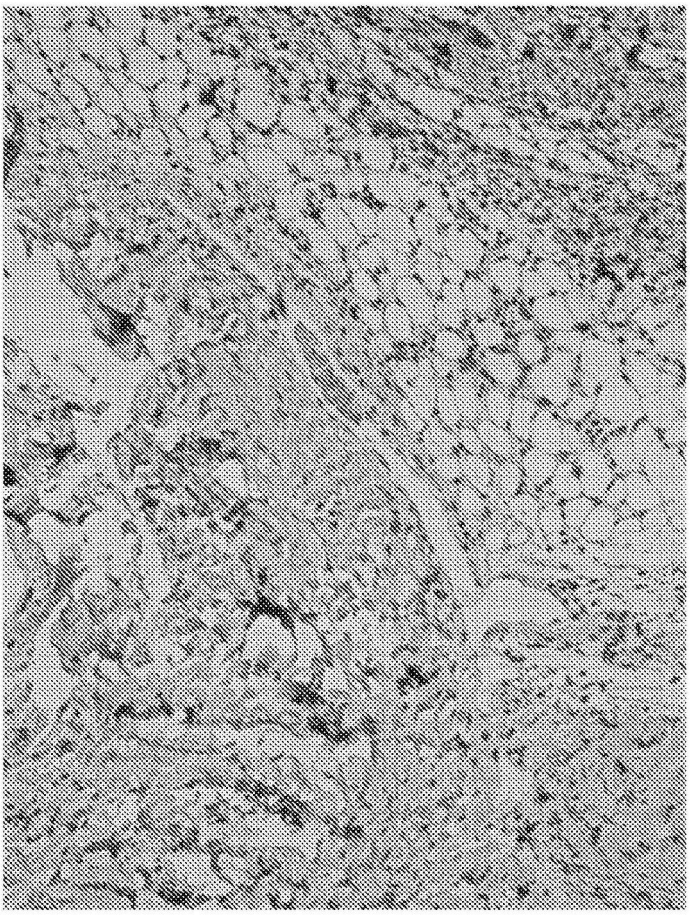


图10D

```
CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠      ATGGCCAAAGTTCCTGACTTGTTTGAAGACCTAAAGAACTGTTACAGTGAAAACGAAGAC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类      ATGGCCAAAGTTCCAGACATGTTTGAAGACCTGAAGAACTGTTACAGTGAAAATGAAGAA
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马        ATGGCGAAAGTCCCTGACCTCTTTGAAGACCTGAAGAACTGTTACAGTGAAAATGAAGAC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫        ATGGCCAAAGTTCCTGACCTCTTTGAAGACCTGAAGAACTGTTACAGTGAAAATGAAGAA
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬        ATGGCCAAAGTTCCTGACCTCTTTGAAGACCTGAAGAACTGTTACAGTGAAAATGAAGAA
                                     ***** ****** ** *** * ********** ********************** *****

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠      TACAGTTCTGCCATTGACCATCTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATGATGCAAGCTAT
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类      GACAGTTCCTCCATTGATCATCTGTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATCATGTAAGCTAT
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马        TACAGTTCTGAAATTGACCATCTCTCTGACTCAGAAATCCTTCTATGATGCAAGCTAT
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫        TACAGTTCTGAAATTGACCATCTCACTCTGAATCAGAAATCCTTCTATGATGCAAGCTAT
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬        TACAGTTCTGAAATTGACCATCTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATGATATGAGCTGT
                                      ******** *****  *****  ******  ********************** **   **** *

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠      GGCTCACTTCATGAGACTTGCACAGATCAGTTTGTATCTCTGAGAACCTCTGAAACGTCA
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类      GGCCCACTCCATGAAGGCTGCATGGATCAATCTGTGTCTCTGAGTATCTCTGAAACCTCT
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马        GACCCACTTCCTGAGGACTGCATGGATACATTTATGTCTCTGAGCACCTCTGAAACCTCT
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫        GACCCACTTCATGAGGACTGTACAGATAAATTCATGTCTCCGAGTACTTCTGAAACCTCT
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬        GACCCACTTCATGAGGACTG----------CATGTCTCTGAGTACCTCTGAAATCTCA
                                     * * ***** * ***     **                * ****  *** * *  *******  **

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠      AAGATGTCCAACTTCACCTTCAAGGAGAGCCGGGTGACAGTATCAGCAACGTCAAGCAAC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类      AAAACATCCAAGCTTACCTTCAAGGAGAGCATGGTGGTAGTAG----------CAACCAAC
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马        AAGACATCCAAGCTGAACTTCAAGGAGAGCGTGGTGCTGGTGG----------CAGCCAAC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫        AAGACACCCCAGCTTACCCTCAAGAAGAGTGTGGTGATGGTGG----------CAGCCAAT
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬        AAGACATCCCAGCTTACCTTCAAGGAAAATGTGGTAGTGGTGG----------CAGCCAAT
                                     ** *   ** *  * * * * ***** * *     ***     **          **   ***

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠      GGGAAGATTCTGAAGAAGAGACGGCTGAGTTTCAGTGAGACCTTCACTGAAGATGACCTG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类      GGGAAGGTTCTGAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAGCCAATCCATCACTGATGATGACCTG
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马        GGGAAGACTCTGAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAATCAGTTCATCACCAATGATGACCTG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫        GGGAAGATTCTGAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAATCAATTCCTCACTGCTGATGACCTG
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬        GGGAAGATTCTAAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAGTCAATTCATCACCGATGATGACCTG
                                     ******  ***  ********************* ******* *   *  * ****    *********

（续...）
```

图11A

```
Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠  CAGTCCATAACCCATGATCTGGAA---GAGACCATCCAACCCAGATCAGCACCTTACACC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类  GAGGCCATCGCCAATGACTCAGAGGAAGAAATCATCAAGCCTAGGTCAGCACCTTTTAGC
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马    GAAGCCATTGCCAATGATCCAGAAGAAGGAATCATCAAGCCCCGATCAGTACATTACAAC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫    GAAGCCATTGCCAACGAAGTAGAAGAAGAAATCATGAAGCCCAGATCAGTAGCACCCAAC
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬    GAAGACATTGCCAATGACACAGAAGAAGTAATCATGAAGCCCAGATCAGTAGCATACAAC
                                  *   ***  ** * * **    **   *  * ***  * **  * **** *      * *

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠  TACCAGAGTGATTTGAGATACAAACTGATGAAGCTCGTCAGGCAGAAGTTTGTCATGAAT
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类  TTCCTGAGCAATGTGAAAATACAACTTTATGAGGATCATCAAATACGAATTCATCCTGAAT
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马    TTCCAGAGCAATACAAAATACAACTTTATGAGGATCGTCAACCACCAGTGTACTCTGAAT
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫    TTCTATAGCAGTGAAAAATACAACTATCAGAAGATCATCAAATCCCAATTCATCCTGAAT
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬    TTCCATAACAATGAAAAATACAACTATATAAGGATCATCAAATCCCAATTCATCCTGAAT
                * *   *    *    * *******          * *  * *  ** ***      * *      *****

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠  GATTCCCTCAACCAAACTATATATCAGGATGTGGACAAACACTATCTCAGCACCACTTGG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类  GACGCCCTCAATCAAAGTATAATTCGAGCCAA---TGATCAGTACCTCACGGCTGCTGCA
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马    GATGCCCTCAATCAAAGTGTAATTCGAGACACATCAGGTCAATATCTTGCGACTGCTGCA
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫    GACAACCTCAGTCAAAGTGTAATTCGAAAAGCAGGGGGAAAATACCTCGCAGCCGCTGCA
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬    GACAACCTCAATCAAAGTATAGTTCGACAAACAGGAGGAAATTACCTCATGACTGCTGCA
                **   *****  **** * * **  **                 * ** **     *   **

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠  TTAAATGACCTGCAACAGGAAGTAAAATTTGACATGTATGCCTACTCGTCGGGAGGAGAC
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类  TTACATAATCTGGATGAAGCAGTGAAATTTGACATGGGTGCTTATAAGTCATCAAGGAT
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马    TTAAATAATCTGGACGACGCAGTGAAATTTGACATGGGTGCTTATACATCAG---AAGAG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫    TTACAGAATCTGGATGATGCAGTGAAATTTGACATGGGGGCTTATACATCAA---AAGAA
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬    TTACAGAATTTGGATGATGCAGTGAAGTTTGACATGGGAGCTTACACATCA------GAA
                *** *  *  **  *  * * *** ** **********    ** **      **

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠  GACTCTAAATATCCTGTTACTCTAAAAATCTCAGATTCACAACTGTTCGTGAGCGCTCAA
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类  GATGCTAAAATTACCGTGATTCTAAGAATCTCAAAAACTCAATTGTATGTGACTGCCCAA
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马    GATTCTCAACTTCCTGTGACTCTAAGAATCTCAAAAACTCGACTGTTTGTGAGTGCCCAA
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫    GATTCTAAACTTCCTGTGACTCTCAGAATCTCAAAAACTCGACTGTTTGTGAGTGCCCAA
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬    GATTCTAAACTTCCTGTGACTCTAAGAATATCAAAAACTCGACTCTTTGTGAGTGCCCAA
                **  ** **  * * ** * * *** * *** *** *  * * * * *  ****  ** ***
```

（续...）

图11B

```
Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠    GGAGAAGACCAGCCCGTGTTGCTGAAGGAGTTGCCAGAAACACCAAAACTCATCACAGGT
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类    GATGAAGACCAACCAGTGCTGCTGAAGGAGATGCCTGAGATACCCAAAACCATCACAGGT
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马      AATGAAGATGAACCCGTACTGCTAAAGGAGATGCCTGACACACCCAAAACTATCAAAG--
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫      AATGAAGATGAGCCTGTATTGCTAAAGGAGATGCCTGAGACACCCAAAACCATCAGAG--
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬      AATGAAGATGAACCTGTATTGCTAAAGGAGATGCCTGAGACACCCAAAACTATCAGAG--
                                     ******  * ** **  **** ****** **** ** * *** ***   **** **

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠    AGTGAGACCGACCTCATTTTCTTCTGGAAAAGTATCAACTCTAAGAACTACTTCACATCA
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类    AGTGAGACCAACCTCCTCTTCTTCTGGGAAACTCACGGCACTAAGAACTATTTCACATCA
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马      -ATGAGACCAACCTCCTCTTCTTCTGGGAACGTCACGGCTCTAAGAACTACTTCAAATCG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫      -ATGAGACCAACCTTCTCTTCTTCTGGGAACGTCATGGCAGTAAGAACTACTTCAAATCA
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬      -ATGAGACAAACCTTCTTTTCTTTTGGGAGCGTCATGGCAGTAAGCACTACTTCAAATCA
                                     ******  ****  * ***** *** *   *     *  **** **** **** ***

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠    GCTGCTTATCCAGAGCTGTTTATTGCCACCAAAGAACAAAGTCGGGTGCACCTGGCACGG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类    GTTGCCCATCCAAACTTGTTTATTGCCACAAAGCAAGACTACTGGGTGTGCTTGGCAGGG
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马      GTTGCCCATCCAAAGTTGTTTATTGCCACAAAGCAGGGAAAACTGGTGCACATGGCAAGG
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫      GTTGCCCATCCAAAGTTGTTCATTGCCACACAGGAAGAACAACTGGTGCACATGGCAAGA
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬      GTTGCCCAGCCCAAGTTGTTCATTGCCACACAGGAACGAAAACTGGTGCACATGGCAAGA
                                   * ***  * **  *  **** *********  *  *          ****  * ***** *

Il1a-201_cds:  蛋白质_编码_小鼠    GGACTGCCCTCTATGACAGACTTCCAGATATCATAA----------  (SEQ ID NO:591)
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_人类    GGGCCACCCTCTATCACTGACTTTCAGATACTGGAAAACCAGGCGTAG  (SEQ ID NO:592)
IL1A-202_cds:  蛋白质_编码_马      GGGCAACCCTCTATCACTGACTTTCAGATATTGGACAACCAGTTTTGA  (SEQ ID NO:593)
IL1A-201_cds:  蛋白质_编码_猫      GGACTACCCTCTGTCACTGACTTTCAGATACTGGAAACCCAGTCTTGA  (SEQ ID NO:594)
IL1A-203_cds:  蛋白质_编码_犬      GGGCAACCCTCTATCACTGACTTTCGGTTACTGGAAACCCAGCCTTGA  (SEQ ID NO:595)
                                   ** *  ******* * ** ***** * * **     *
```

图11C

```
CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马

（续...）
```

图12A

```
Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  CTTTGACCTGGGCTGTCCT---GATGAGAGCATCCAGCTTCAAATCTCGCAGCAGCACAT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  CCTGGACCTCTGCCCTCTG---GATGGCGGCATCCAGCTACGAATCTCCGACCACCACTA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬   CCTGAACCACAGTTCTCTGGTAGATGAGGGCATCCAGTTGCAAGTCTCCCACCAGCTCTG
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫   CCTGAGCCACAGTTTTCTGGGAGATGAGGGCATCCAGTTGCAAATCTCCCACCAGCCCGA
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马   CCTGGACCTCAGCTCCATGGGCGATGGGGGCATCCAGCTTCAATTCTCCCACCAACTTTA
                              * *   **    *          ****     ********** * * * **** * ** *

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  CAACAAGAGCTTCAGGCAGGCAGTATCACTCATTGTGGCTGTGGAGAAGCTGTGGCAGCT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  CAGCAAGGGCTTCAGGCAGGCCGCGTCAGTTGTTGTGGCCATGGACAAGCTGAGGAAGAT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬   TAACAAGAGTCTGAGGCATTTCGTGTCAGTCATTGTAGCTTTGGAGAAGCTGAAGAAG--
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫   CAACAAGAGTCTTAGGCATGCCGTGTCGGTCATTGTGGCCATGGAGAAACTGAAGAAGAT
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马   CAACAAGACTTTCAAGCATGTCGTGTCAATCATTGTGGCTATGGAGAAGCTGAAGAAGAT
                               * ****     * *  ***     *   **   *  ****  ** ****  ** ***  * **

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  ACCTGTGTCTTTCCCGTGGACCTTCCAGGATGAGGACATGAGCACCTTCTTTCCTTCAT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  GCTGGTTCCCTGCCCACAGACCTTCCAGGAGAATGACCTGAGCACCTTCTTTCCCTTCAT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬   -------CCCTGCCCACAGGTCCTCCAGGAGGATGACCTGAAGAGCATCTTTTGCTACAT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫   ATCTTTTCCCTGCTCACAACCCCTCCAGGATGAGGACCTGAAGAGCCTCTTTTGCTGCAT
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马   ACCCGTTCCCTGCTCACAGGCCTTCCAGGATGATGACTTGAGGAGCCTCTTTTCTGTCAT
                                  * * * *       * ******** * *** *** * * *****      ***

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  CTTTGAAGAAGAGCCCATCCTCTGTGACTCATGGGATGATGATAACCTGCTGGTGTG
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  CTTTGAAGAAGAACCTATCTTCTTCGACACATGGGATAACGAGGCTTATGTG------CA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬   CTTTGAAGAAGAACCTATCATCTGCAAAACAGATGCGG---ATAATTTTATG------AG
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫   CTTTGAAGAAGAACCCATCATCTGTGACACGTGGGATG---ACGGTTTTGTG------TG
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马   CTTTGAAGAAGAACCCATCATCTGTGACAACTGGGATG---ATGATTATGTG------TG
                              **********  **  ***  ***   *          *    *     **

Il1b-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  TGACGTTCCCATTAGACAACTGCACTACAGGCTCCGAGATGAACAACAAAAAAGCCTCGT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  CGATGCACCTGTACGATCACTGAACTGCACGCTCCGGGACTCACAGCAAAAAAGCTTGGT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬   TGATGCAGCCATGCAATCGGTGGACTGCAAGTTACAGGACATAAGCCACAAATACCTGGT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫   TGATGCGGCCATACAATCACAGGACTACACGTTCCGAGACATAAGCCAAAAGAGCCTGGT
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马   TGATGCAGCTGTGCATTCAGTGAACTGCAGACTCCGGGACATATACCATAAATCCCTGGT
                               ** *  *  *          * *** **  * *  **  *   **  **  * * **
```

（续...）

图12B

```
Ⅲb-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  GCTGTCGGACCCATATGAGCTGAAAGCTCTCCACCTCAATGGACAGAATATCAACCAACA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  GATGTCTGGTCCATATGAACTGAAAGCTCTCCACCTCCAGGGACAGGATATGGAGCAACA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬  GCTGTCTAACTCATATGAGCTTCGGGCTCTCCACCTCAATGGGGAAAATGTGAACAAACA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫  GCTGTCTGGCTCATACGAGCTTCGGGCTCTCCACCTCAATGGACAGAATATGAACCAACA
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马  GCTGTCCGGTGCATGTGAGCTGCAGGCTGTCCACCTCAATGGAGAGAATACAAACCAACA
                              * ****     ***  **  **     *** ********* * **  *   *  ****

Ⅲb-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  AGTGATATTCTCCATGAGCTTTGTACAAGGAGAACCAAGCAACGACAAAATACCTGTGGC
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  AGTGGTGTTCTCCATGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAAATACCTGTGGC
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬  AGTGGTGTTCCACATGAGCTTTGTGCACGGGGATGAAAGTAATAACAAGATACCTGTGGT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫  AGTGGTGTTCCGCATGAGCTTTGTGCACGGGGAGGAAAAATAGTAAGAAGATACCAGTAGT
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马  AGTGGTGTTCTGCATGAGCTTTGTGCAAGGAGAAGAAGACTGACAAGATACCTGTGGC
                              ***** * ***  ****  ****** ** **  **    *    *  * ** ***** ** *

Ⅲb-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAATCTATACCTGTCCTGTGTAATGAAAGACGGCACACCCAC
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  CTTGGGCCTCAAGGAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTTTGAAAGATGATAAGCCCAC
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬  CTTGGGCATCAAACAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGTGTGATGAAGGATGGAAAGCCCAC
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫  GTTGTGCATCAAGAAAAATAACCTGTACCTGTCCTGTGTGATGAAAGATGGGAAACCCAC
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马  CTTGGGCCTCAAGGAAAAGAACCTGTACCTGTCTTGTGGGATGAAAGATGGGAAGCCCAC
                               *** ** *****   *** ** **  ********* ** *    **** ** *  *  *****

Ⅲb-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  CCTGCAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGCAATACCCAAAGAAGAAGATGGAAAAACGGTT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  TCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAAATTACCCAAAGAAGAAGATGGAAAAGCGATT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬  CCTACAGCTAGAGAAGGTAGACCCCAAAGTCTACCCAAAGAGGAAGATGGAAAAGCGATT
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫  CCTACAGCTGGAGATGTTAGACCCCAAAGTTTACCCAAAGAAGAAGATGGAAAAGAGATT
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马  CCTACAGCTGGAGACAGTAGACCCCAATACTTACCCAAAGAGGAAAATGGAAAAGCGATT
                               ** ***** ****   * **  *****     ********** *** *********  * **

Ⅲb-201_cds：蛋白质_编码_小鼠  TGTCTTCAACAAGATAGAAGTCAAGAGCAAAGTGGAGTTTGAGTCTGCAGAGTTCCCCAA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_人类  TGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAAGCTGGAATTTGAGTCTGCCCAGTTCCCCAA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_犬  TGTCTTCAACAAGATAGAAATCAAGAACACAGTGGAATTTGAGTCTTCTCAGTACCCTAA
IL1B-201_cds：蛋白质_编码_猫  TGTCTTCAACAAGACAGAAATCAAGGGCAATGTGGAATTTGAGTCTTCCCAGTTCCCCAA
IL1B-203_cds：蛋白质_编码_马  TGTCTTCAACAAGATGGAAATCAAGGGCAACGTGGAATTTGAGTCTGCAATGTACCCCAA
                              ***************  ***  ****    **    *****  ********** *   ** *** **

（续...）
```

图12C

```
Il1b-201_cds: 蛋白质_编码_小鼠  CTGGTACATCAGCACCTCACAAGCAGAGCACAAGCCTGTCTTCCTGGGAAACAACAGTGG
IL1B-201_cds: 蛋白质_编码_人类  CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGCAGAAAACATGCCCGTCTTCCTGGGAGGGACCAAAGG
IL1B-201_cds: 蛋白质_编码_犬   CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGTCGAAGGAATGCCTGTCTTCCTAGGAAATACCAGAGG
IL1B-201_cds: 蛋白质_编码_猫   CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGCAGAAGAAATGCCTGTCTTCCTAGGAAATACCAAAGG
IL1B-203_cds: 蛋白质_编码_马   CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGCAGAAAAAAGCCTGTCTTCCTAGGAAATACCAGAGG
                              ********************* *****  **     * ***  ******** ***   * **  **

Il1b-201_cds: 蛋白质_编码_小鼠  T---CAGGACATAATTGACTTCACCATGGAATCCGTGTCTTCCTAA  (SEQ ID NO:596)
IL1B-201_cds: 蛋白质_编码_人类  CGGCCAGGATATAACTGACTTCACCATGCAATTTGTGTCTTCCTAA  (SEQ ID NO:597)
IL1B-201_cds: 蛋白质_编码_犬   TGGCCAGGATATAACTGACTTCACCATGGAATTCTCTTCCTAG---  (SEQ ID NO:598)
IL1B-201_cds: 蛋白质_编码_猫   TGGTCAGGATATAACTGACTTCATCATGGAAAGCGCTTCCTAA---  (SEQ ID NO:599)
IL1B-203_cds: 蛋白质_编码_马   CGGCCGGGACATAACTGACTTCATCATGGAAATCACCTCTGCCTAA  (SEQ ID NO:600)
                                 * *** **** ********* **** **          **
```

图12D

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1A	UCACCAGUGAAAUUUGACAU	298	GGG	-	4	6	1	6
IL1A	AUGGUGGUAGUAGCAACCAA	299	CGG	-	3	14	2	4
IL1A	AGCCAAUGAUCAGUACCUCA	300	CGG	-	8	15	3	5
IL1A	CAGAGACAGAUGAUCAAUGG	301	AGG	+	6	18	4	3
IL1A	UGAGACUCCAGACCUACGCC	302	TGG	+	24	2	5	7
IL1A	UUCACCAGUGAAAUUUGACA	303	TGG	-	16	19	6	6
IL1A	UUUUAGAAAUCAUCAAGCCU	304	AGG	-	21	16	7	5
IL1A	UAUGUAAUGCAGCAGCCGUG	305	AGG	+	5	35	8	5
IL1A	UGGUGGUAGUAGCAACCAAC	306	GGG	-	38	3	9	4
IL1A	GGCCAUCGCCAAUGACUCAG	307	AGG	-	11	34	10	4
IL1A	AUGUGAAAUACAACUUUAUG	308	AGG	-	37	10	11	5
IL1A	GCCAUAGCUUACAUGAUAGA	309	AGG	+	42	5	12	4
IL1A	AGCUAUGGCCCACUCCAUGA	310	AGG	-	23	26	13	4
IL1A	AUCCUGAAAGUCAGUGAUAGA	311	GGG	+	41	9	14	7
IL1A	AGCCGUGAGGUACUGAUCAU	312	TGG	+	39	13	15	5
IL1A	AUUCAGAGACAGAUGAUCAA	313	TGG	+	47	7	16	3
IL1A	UGAAAGUCAGUGAUAGAGGG	314	TGG	+	7	48	17	7
IL1A	UGGCAAUAAACAAGUUUGGA	315	TGG	+	45	12	18	7
IL1A	GCACCCAUGUCAAAUUUCAC	316	TGG	+	27	31	19	6
IL1A	UUCCUCUGAGUCAUUGGCGA	317	TGG	+	30	29	20	4
IL1A	AUCGCCAAUGACUCAGAGGA	318	AGG	-	13	54	21	4
IL1A	CUCUUCUUCUGGGAAACUCA	319	CGG	-	20	49	22	7
IL1A	AAGCUAAAAAGGUGCUGACCU	320	AGG	+	10	59	23	5
IL1A	CUCGAAUUAUACUUUGAUUG	321	AGG	+	50	20	24	5
IL1A	UGGAAAACCAGGCGUAGGUC	322	TGG	-	70	1	25	7

图13A

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1A	CTTCTTCAGAACCTTCCCGT	323	TGG	+	34	37	26	4
IL1A	GTTGGTCTCACTACCTGTGA	324	TGG	+	44	28	27	7
IL1A	TCCTTCTATCATGTAAGCTA	325	TGG	-	55	17	28	4
IL1A	GATACTGGAAAACCAGGCGT	326	AGG	-	12	63	29	7
IL1A	TACCTTCAAGGAGAGCATGG	327	TGG	-	1	74	30	4
IL1A	AGACCAACCAGTGCTGCTGA	328	AGG	-	9	68	31	6
IL1A	TATCTGAAAGTCAGTGATAG	329	AGG	+	35	43	32	7
IL1A	GGCAATAAACAAGTTTGGAT	330	GGG	+	67	11	33	7
IL1A	CATCACTGATGATGACCTGG	331	AGG	-	2	78	34	4
IL1A	GAGATACCCAAAACCATCAC	332	AGG	-	31	50	35	7
IL1A	TTTTGAGATTCTTAGAATCA	333	CGG	+	61	22	36	6
IL1A	TTGCCACAAAGCAAGACTAC	334	TGG	-	51	33	37	7
IL1A	TGACCTTCAGCAGCACTGGT	335	TGG	+	25	60	38	6
IL1A	CTTTCAGATACTGGAAAACC	336	AGG	-	22	64	39	7
IL1A	CCATGCAGCCTTCATGGAGT	337	GGG	+	17	69	40	4
IL1A	GGTAAGCTTGGATGTTTTAG	338	AGG	+	81	8	41	4
IL1A	TTACATAATCTGGATGAAGC	339	AGG	-	29	61	42	5
IL1A	GGCTGCTGCATTACATAATC	340	TGG	-	86	4	43	5
IL1A	ACATTGCTCAGGAAGCTAAA	341	AGG	+	68	23	44	5
IL1A	GCTTACCTTCAAGGAGAGCA	342	TGG	-	26	65	45	4
IL1A	TTTGTGGCAATAAACAAGTT	343	TGG	+	60	32	46	7
IL1A	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	344	TGG	+	19	73	47	4
IL1A	CACCCAGTAGTCTTGCTTTG	345	TGG	+	49	44	48	7
IL1A	GAGTTTCCCAGAAGAAGAGG	346	AGG	+	18	76	49	7
IL1A	AGTTGTATTTCACATTGCTC	347	AGG	+	56	38	50	5

图13B

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1A	GGTCATCATCAGTGATGGAT	348	TGG	+	54	41	51	4
IL1A	TTCAAACATGTCTGGAACTT	349	TGG	+	75	21	52	2
IL1A	GGTAGTAGCAACCAACGGGA	350	AGG	-	14	85	53	4
IL1A	TCCATGCAGCCTTCATGGAG	351	TGG	+	33	66	54	4
IL1A	TCGAATTATACTTTGATTGA	352	GGG	+	79	24	55	5
IL1A	GGAAGGTTCTGAAGAAGAGA	353	CGG	-	15	88	56	4
IL1A	TTCAGGTCTTCAAACATGTC	354	TGG	+	77	27	57	2
IL1A	ACTACTGGGTGTGCTTGGCA	355	GGG	-	63	42	58	7
IL1A	AACATCCAAGCTTACCTTCA	356	AGG	-	76	30	59	4
IL1A	CGTGAGTTTCCCAGAAGAAG	357	AGG	+	36	71	60	7
IL1A	TTTGATTGAGGGCGTCATTC	358	AGG	+	82	25	61	5
IL1A	ATCCATCACTGATGATGACC	359	TGG	-	52	55	62	4
IL1A	TTCCCAGAAGAAGAGGAGGT	360	TGG	+	28	80	63	7
IL1A	GCTCTCCTTGAAGGTAAGCT	361	TGG	+	57	51	64	4
IL1A	ACTGGGTGTGCTTGGCAGGG	362	GGG	-	40	72	65	7
IL1A	GGGTGCTTATAAGTCATCAA	363	AGG	-	32	83	66	6
IL1A	TGATCATCTGTCTCTGAATC	364	AGG	-	69	46	67	3
IL1A	CTGAAGAACTGTTACAGGTA	365	AGG	-	62	58	68	2
IL1A	AAGACCTGAAGAACTGTTAC	366	AGG	-	84	36	69	2
IL1A	TACCACCATGCTCTCCTTGA	367	AGG	+	65	57	70	4
IL1A	GCAAGACTACTGGGTGTGCT	368	TGG	-	43	81	71	7
IL1A	ATTGATCCATGCAGCCTTCA	369	TGG	+	73	52	72	4
IL1A	CAATGACTCAGAGGAAGGTA	370	AGG	-	64	62	73	4
IL1A	CTTACCTTCCTCTGAGTCAT	371	TGG	+	59	67	74	4
IL1A	TATCACTGACTTTCAGATAC	372	TGG	-	74	53	75	7

图13C

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1A	CCCACTCCATGAAGGCTGCA	373	TGG	-	46	82	76	4
IL1A	CTCACTACCTGTGATGGTTT	374	TGG	+	90	39	77	7
IL1A	TCACTACCTGTGATGGTTTT	375	GGG	+	89	40	78	7
IL1A	CACTGGTTGGTCTTCATCTT	376	GGG	+	83	47	79	6
IL1A	CTTACCTGTAACAGTTCTTC	377	AGG	+	87	45	80	2
IL1A	AGTCATTGGCGATGGCCTCC	378	AGG	+	48	90	81	4
IL1A	TGCCACAAAGCAAGACTACT	379	GGG	-	53	86	82	7
IL1A	GACTACTGGGTGTGCTTGGC	380	AGG	-	85	56	83	7
IL1A	CAACTGACCTTCAGCAGCAC	381	TGG	+	58	87	84	6
IL1A	CTACTGGGTGTGCTTGGCAG	382	GGG	-	72	75	85	7
IL1A	TACTGGGTGTGCTTGGCAGG	383	GGG	-	66	84	86	7
IL1A	GCACTGGTTGGTCTTCATCT	384	TGG	+	80	70	87	6
IL1A	GACCAACCTCCTCTTCTTCT	385	GGG	-	78	77	88	7
IL1A	GTGATGGTTTTGGGTATCTC	386	AGG	+	71	89	89	7
IL1A	AGACCAACCTCCTCTTCTTC	387	TGG	-	88	79	90	7

图13D

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1B	CUUCGACACAUGGGAUAACG	388	AGG	-	8	7	1	5
IL1B	GUGCAGUUCAGUGAUCGUAC	389	AGG	+	11	8	2	5
IL1B	CAUGGCCACAACAACUGACG	390	CGG	+	4	18	3	4
IL1B	GGUGGUCGGAGAUUCGUAGC	391	TGG	+	32	1	4	4
IL1B	GGACUCACAGCAAAAAAGCU	392	TGG	-	21	16	5	5
IL1B	ACCUAUCUUCUUCGACACAU	393	GGG	-	15	25	6	5
IL1B	AGGUGCUGAUGUACCAGUUG	394	GGG	+	9	32	7	7
IL1B	CUUAUCAUCUUUCAACACGC	395	AGG	+	12	31	8	6
IL1B	UCCGACCACCACUACAGCAA	396	GGG	-	13	30	9	4
IL1B	GUAAUAAGCCAUCAUUUCAC	397	TGG	+	42	5	10	2
IL1B	GAGGUGCUGAUGUACCAGUU	398	GGG	+	31	19	11	7
IL1B	CUGAAAGCUCUCCACCUCCA	399	GGG	-	14	37	12	5
IL1B	AACCUAUCUUCUUCGACACA	400	TGG	-	28	24	13	5
IL1B	UUUUUAUUACAGUGGCAAUG	401	AGG	-	6	46	14	3
IL1B	UUCUCCAUGUCCUUUGUACA	402	AGG	-	30	23	15	6
IL1B	AAGUAAUGACAAAAUACCUG	403	TGG	-	3	57	16	6
IL1B	AACAUGCCCGUCUUCCUGGG	404	AGG	-	10	51	17	7
IL1B	GGACAGGAUAUGGAGCAACA	405	AGG	-	2	61	18	5
IL1B	UUAGGAAGACACAAAUUGCA	406	TGG	+	26	38	19	7
IL1B	GAGCUCAGGUACUUCUGCCA	407	TGG	+	29	36	20	2
IL1B	UUCUCCUUGUACAAAGGACA	408	TGG	+	53	13	21	6
IL1B	AUCACUGAACUGCACGCUCC	409	GGG	-	56	10	22	5
IL1B	UGAAGGGAAAGAAGGUGCUC	410	AGG	+	50	17	23	4
IL1B	CAUCUUUCAACACGCAGGAC	411	AGG	+	66	2	24	6
IL1B	CUCCGACCACCACUACAGCA	412	AGG	-	20	49	25	4

图14A

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1B	UGAUAAGCCCACUCUACAGC	413	TGG	-	67	3	26	6
IL1B	GCAGGCCGCGUCAGUUGUUG	414	TGG	-	60	11	27	4
IL1B	UAAGCCCACUCUACAGCUGG	415	AGG	-	18	54	28	6
IL1B	CUUACCUCCAGCUGUAGAGU	416	GGG	+	61	12	29	6
IL1B	GCUCCAUAUCCUGUCCCUGG	417	AGG	+	7	73	30	5
IL1B	UUUCCCUUCAUCUUUGAAGA	418	AGG	-	54	28	31	4
IL1B	GCCCUUGCUGUAGUGGUGGU	419	CGG	+	23	60	32	4
IL1B	GCUGGAUGCCGCCAUCCAGA	420	GGG	+	19	64	33	4
IL1B	UUCCUGGGAGGGACCAAAGG	421	CGG	-	25	59	34	7
IL1B	ACUUACCUCCAGCUGUAGAG	422	TGG	+	43	41	35	6
IL1B	UUGUGGCCAUGGACAAGCUG	423	AGG	-	5	79	36	4
IL1B	GAAACAUGCCCGUCUUCCU	424	GGG	-	64	22	37	7
IL1B	GGGCAUGUUUUCUGCUUGAG	425	AGG	+	38	48	38	7
IL1B	UGGUGAAGUCAGUUAUAUCC	426	TGG	+	68	20	39	7
IL1B	UCCCAUGUGUCGAAGAAGAU	427	AGG	+	51	39	40	5
IL1B	UGAAGCCCUUGCUGUAGUGG	428	TGG	+	22	68	41	4
IL1B	UGAGCUCGCCAGUGAAAUGA	429	TGG	-	58	33	42	2
IL1B	GAUCACUGAACUGCACGCUC	430	CGG	-	52	40	43	5
IL1B	AUCAUUUCACUGGCGAGCUC	431	AGG	+	84	9	44	2
IL1B	UUGGUCCCUCCCAGGAAGAC	432	GGG	+	49	45	45	7
IL1B	GACCUCUGCCCUCUGGAUGG	433	CGG	-	17	77	46	4
IL1B	ACUACCUUCUUCAAAGAUGA	434	AGG	+	69	29	47	4
IL1B	GUGAAAUGAUGGCUUAUUAC	435	AGG	-	94	4	48	2
IL1B	AGCUUUUUUGCUGUGAGUCC	436	CGG	+	73	26	49	5
IL1B	ACAUGCCCGUCUUCCUGGGA	437	GGG	-	24	76	50	7

图14B

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1B	GGUACAGAUUCUUUUCCUUG	438	AGG	+	37	63	51	6
IL1B	AGCUGGAUGCCGCCAUCCAG	439	AGG	+	39	62	52	4
IL1B	AGGUCCUGGAAGGAGCACUG	440	CGG	+	1	101	53	4
IL1B	AGAGGUGCUGAUGUACCAGU	441	TGG	+	36	67	54	7
IL1B	CUACAGCAAGGGCUUCAGGC	442	AGG	-	34	69	55	4
IL1B	UGACAAAAUACCUGUGGCCU	443	TGG	-	100	6	56	6
IL1B	ACUGAAAGCUCUCCACCUCC	444	AGG	-	59	47	57	5
IL1B	ACUUUCUUCUCCUUGUACAA	445	AGG	+	82	27	58	6
IL1B	CUACCUUCUUCAAAGAUGAA	446	GGG	+	57	52	59	4
IL1B	GGACAAGCUGAGGAAGAUGC	447	TGG	-	27	82	60	4
IL1B	UGCCGCCAUCCAGAGGGCAG	448	AGG	+	41	70	61	4
IL1B	UGGAGAGCUUUCAGUUCAUA	449	TGG	+	98	15	62	5
IL1B	GAUGUACCAGUUGGGGAACU	450	GGG	+	16	100	63	7
IL1B	UCCUUGAGGCCCAAGGCCAC	451	AGG	+	76	42	64	6
IL1B	GCUCAGGUCAUUCUCCUGGA	452	AGG	+	33	85	65	4
IL1B	AGUCUUACCUUCAUCUGUUU	453	AGG	+	105	14	66	3
IL1B	CAAAAAAGCUUGGUGAUGUC	454	TGG	-	86	34	67	5
IL1B	AGAAAACAUGCCCGUCUUCC	455	TGG	-	102	21	68	7
IL1B	AUUCUUUUCCUUGAGGCCCA	456	AGG	+	35	92	69	6
IL1B	CAUCUUCCUCAGCUUGUCCA	457	TGG	+	46	83	70	4
IL1B	GUUGCUCCAUAUCCUGUCCC	458	TGG	+	87	43	71	5
IL1B	UCAUUCUCCUGGAAGGUCUG	459	TGG	+	62	71	72	4
IL1B	CAUUCUCCUGGAAGGUCUGU	460	GGG	+	63	75	73	4
IL1B	CUCUCCGCAGUGCUCCUUCC	461	AGG	-	103	35	74	4
IL1B	UGAUGGCCCUAAACAGAUGA	462	AGG	-	40	98	75	3

图14C

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1B	AGGUGCUCAGGUCAUUCUCC	463	TGG	+	74	65	76	4
IL1B	AAAUUACCCAAAGAAGAAGA	464	TGG	-	44	96	77	7
IL1B	UUCAAAGAUGAAGGAAAGA	465	AGG	+	48	95	78	4
IL1B	CUGGACCUCUGCCCUCUGGA	466	TGG	-	72	72	79	4
IL1B	GAUAGAAAUCAAUAACAAGC	467	TGG	-	55	90	80	7
IL1B	ACCACUACAGCAAGGGCUUC	468	AGG	-	95	50	81	4
IL1B	AGUCUGCCCAGUUCCCCAAC	469	TGG	-	91	55	82	7
IL1B	UCCUGGAAGGUCUGUGGGCA	470	GGG	+	65	81	83	4
IL1B	GUCUUCCUGGGAGGGACCAA	471	AGG	-	45	102	84	7
IL1B	UGAUGUACCAGUUGGGGAAC	472	TGG	+	96	53	85	7
IL1B	GUCUUACCUUCAUCUGUUUA	473	GGG	+	106	44	86	3
IL1B	ACCUGUGGCCUUGGGCCUCA	474	AGG	-	85	66	87	6
IL1B	UUUGGUCCCUCCCAGGAAGA	475	CGG	+	77	78	88	7
IL1B	GCCUGAAGCCCUUGCUGUAG	476	TGG	+	99	56	89	4
IL1B	GCAGAGGUCCAGGUCCUGGA	477	AGG	+	47	109	90	4
IL1B	CCACCUCCAGGGACAGGAUA	478	TGG	-	101	58	91	5
IL1B	AGCUCUCCACCUCCAGGGAC	479	AGG	-	75	87	92	5
IL1B	UCCCUGCCCACAGACCUUCC	480	AGG	-	90	74	93	4
IL1B	GCAGUGCUCCUUCCAGGACC	481	TGG	-	83	84	94	4
IL1B	CCAUAUCCUGUCCCUGGAGG	482	TGG	+	89	80	95	5
IL1B	GACAAAAUACCUGUGGCCUU	483	GGG	-	71	99	96	6
IL1B	CUCCUGGAAGGUCUGUGGGC	484	AGG	+	81	94	97	4
IL1B	CGCGUCAGUUGUUGUGGCCA	485	TGG	-	70	105	98	4
IL1B	AGUUAUAUCCUGGCCGCCUU	486	TGG	+	92	89	99	7
IL1B	GGCCGCCUUUGGUCCCUCCC	487	AGG	+	78	103	100	7

图14D

基因	crRNA序列	SEQ ID NO:	PAM	链	中靶排名	脱靶排名	综合排名	外显子
IL1B	CAUCCAGAGGGCAGAGGUCC	488	AGG	+	88	93	101	4
IL1B	GAGGGCAGAGGUCCAGGUCC	489	TGG	+	97	86	102	4
IL1B	GGGAGGGACCAAAGGCGGCC	490	AGG	-	79	106	103	7
IL1B	GACUUGUUCUUUGAAGCUGA	491	TGG	-	80	107	104	3
IL1B	CGCUUUUCCAUCUUCUUCUU	492	TGG	+	107	88	105	7
IL1B	GGACCUGGACCUCUGCCCUC	493	TGG	-	93	104	106	4
IL1B	CUUCUUCUUUGGGUAAUUUU	494	TGG	+	108	91	107	7
IL1B	GCUUUUCCAUCUUCUUCUUU	495	GGG	+	104	97	108	7
IL1B	UUCUUCUUUGGGUAAUUUUU	496	GGG	+	109	108	109	7

图14E

基因	crRNA	SEQ ID NO:	PAM	外显子	链	中靶 (Azimuth2)	脱靶	精度 (Delphi)	移码 (Delphi)	综合（脱靶+精度+移码）
IL1b	GAAAUGUGAAGGUGAGACCA	497	TGG	3	+	70.6	54.6	0.56	88.3	66.3
IL1b	UGAUGGCCCUGGAAAUGUGA	498	AGG	3	+	66.1	51.5	0.53	91.2	65.2
IL1b	GGUCUCACCUUCACAUUUCC	499	AGG	3	-	36.6	44.3	0.59	87.6	63.6
IL1b	GUCUCACCUUCACAUUUCCA	500	GGG	3	-	62.4	48.6	0.57	83.2	62.9
IL1b	AAAUGUGAAGGUGAGACCAU	501	GGG	3	+	68.4	61.9	0.41	78.2	60.4
IL1b	GACCUAUUCUUUGAAGCUGA	502	TGG	3	+	55.9	58.4	0.48	60.4	55.6
IL1b	UUCUUUGAAGCUGAUGGCCC	503	TGG	3	+	47.6	67	0.51	47.8	55.3
IL1b	GGCCAUCAGCUUCAAAGAAU	504	AGG	3	-	46.5	45.6	0.46	69.5	53.7
IL1b	CGUGUCAGUCAUUGUAGCUU	505	TGG	4	+	42.6	86.8	0.43	84.4	71.4
IL1b	ACUCUUGUUACAGAGCUGGU	506	GGG	4	-	68.9	62	0.64	84	70
IL1b	CCUCAUCUACCAGAGAACUG	507	TGG	4	-	76.7	60.6	0.58	90	69.5
IL1b	AGACCUGAACCACAGUUCUC	508	TGG	4	+	54.5	62.1	0.55	89.3	68.8
IL1b	GCUGGUGGGAGACUUGCAAC	509	TGG	4	-	48.7	74.9	0.53	78.2	68.7
IL1b	CACAGUUCUCUGGUAGAUGA	510	GGG	4	+	61.8	66.6	0.56	81	67.9
IL1b	AGGUCUUGGCAGCAGCACUG	511	TGG	4	-	69.3	49.5	0.57	91.5	66
IL1b	UCAGACUCUUGUUACAGAGC	512	TGG	4	-	56.6	65.4	0.49	82.7	65.7
IL1b	AGCUCUGUAACAAGAGUCUG	513	AGG	4	+	64.1	58.3	0.62	76.8	65.7
IL1b	GAGAACUGUGGGUUCAGGUCU	514	TGG	4	-	49.3	63.7	0.49	80.7	64.5
IL1b	GCAGCACUGUGGGAGAGACCA	515	AGG	4	-	62.5	50.7	0.55	84	63.2
IL1b	CCACAGUUCUCUGGUAGAUG	516	AGG	4	+	56.7	66.1	0.43	78.1	62.4
IL1b	CUACCAGAGAACUGUGGUUC	517	AGG	4	-	35.7	68	0.47	69.9	61.6
IL1b	CAUCCUCCUGGAGGACCUGU	518	GGG	4	-	57.1	59.3	0.45	78.1	60.8
IL1b	GACUCUUGUUACAGAGCUGG	519	TGG	4	-	54.4	60.4	0.44	75.4	59.9
IL1b	UUUUGCUACACUCUUUGAAGA	520	AGG	4	+	48.9	49.2	0.55	73.5	59.2
IL1b	UGUAGCAAAAGAUGCUCUUC	521	AGG	4	-	34.5	59.5	0.46	70.6	58.7

图15A

基因	crRNA	SEQ ID NO:	PAM	外显子	链	中靶 (Azimuth2)	脱靶	精度 (Delphi)	移码 (Delphi)	综合（脱靶+精度+移码）
IL1b	UCCUGGAGGACCUGUGGGCA	522	GGG	4	-	47.8	43.8	0.45	78.7	55.8
IL1b	GCUGAAGAAGCCCUGCCCAC	523	AGG	4	+	54.5	52.3	0.41	71.3	54.9
IL1b	UGCUCUUCAGGUCAUCCUCC	524	TGG	4	-	48.6	60.4	0.59	43.9	54.4
IL1b	CUCCUGGAGGACCUGUGGGC	525	AGG	4	-	43	46.1	0.41	74.4	53.8
IL1b	CUGCCCACAGGUCCUCCAGG	526	AGG	4	+	68.4	42.1	0.55	62.4	53.2
IL1b	UCAUCCUCCUGGAGGACCUG	527	TGG	4	-	55.5	44.9	0.45	66.6	52.2
IL1b	UCUUCAGGUCAUCCUCCUGG	528	AGG	4	-	70.1	54	0.45	55.5	51.5
IL1b	GCCCUGCCCACAGGUCCUCC	529	AGG	4	+	48.7	40.8	0.6	42.7	47.8
IL1b	UGAUGCAGCCAUGCAAUCGG	530	TGG	5	+	67.5	89.8	0.6	87.7	79.2
IL1b	CUUGCAGUCCACCGAUUGCA	531	TGG	5	-	57.9	87.4	0.61	89.3	79.2
IL1b	AUCGGUGGACUGCAAGUUAC	532	AGG	5	+	47.1	85.8	0.57	83	75.3
IL1b	GUGAACAAACAAGGUAACGG	533	GGG	5	+	74.7	81.2	0.59	82.9	74.4
IL1b	CUUCGGGCUCUCCACCUCAA	534	TGG	5	+	50.3	74.1	0.62	87.1	74.4
IL1b	UCGGGCUCUCCACCUCAAUG	535	GGG	5	+	74.9	80.8	0.56	84.6	73.8
IL1b	GGACAUAAGCCACAAAUACC	536	TGG	5	+	58.7	66.4	0.64	82.1	70.8
IL1b	UAGACAGCACCAGGUAUUUG	537	TGG	5	-	43.7	66.6	0.61	83.6	70.4
IL1b	GAGUGAUGCAGCCAUGCAAU	538	CGG	5	+	57	77.1	0.49	85	70.4
IL1b	UUCGGGCUCUCCACCUCAAU	539	GGG	5	+	33.9	79.3	0.49	82.3	70.2
IL1b	UGUGAACAAACAAGGUAACG	540	GGG	5	+	73.2	76.5	0.53	78.7	69.4
IL1b	AUGUGAACAAACAAGGUAAC	541	GGG	5	+	42.5	58.5	0.62	85.1	68.5
IL1b	GGGGAAAAUGUGAACAAACA	542	AGG	5	+	62.3	49.2	0.63	91.2	67.8
IL1b	GUCUAACUCAUAUGAGCUUC	543	GGG	5	+	36.8	79.3	0.43	80.4	67.6
IL1b	CAUAUGAGUUAGACAGCACC	544	AGG	5	-	57.8	76.9	0.56	68.9	67.3
IL1b	UGUUCACAUUUUCCCCAUUG	545	AGG	5	-	58.9	55.1	0.57	87	66.4
IL1b	UGUCUAACUCAUAUGAGCUU	546	CGG	5	+	49.5	73.7	0.4	82.3	65.3

图15B

基因	crRNA	SEQ ID NO:	PAM	外显子	链	中靶 (Azimuth2)	脱靶	精度 (Delphi)	移码 (Delphi)	综合（脱靶+精度+移码）
IL1b	AGAUGAUAGGUUCUGAAAUG	547	TGG	5	-	66.3	48.3	0.53	90.3	63.9
IL1b	GCAUCUGUUUUGCAGAUGAU	548	AGG	5	-	48.6	56.4	0.66	67.9	63.4
IL1b	UCACAUUUCCCCAUUGAGG	549	TGG	5	-	60.6	57.1	0.46	77.6	60.2
IL1b	AAUGUGAACAAACAAGGUAA	550	CGG	5	+	58.8	48.2	0.48	78.3	58.2
IL1b	UAUCAUCUGCAAAACAGAUG	551	CGG	5	+	68.8	44.5	0.42	80.1	55.5

图15C

基因	crRNA	SEQ ID NO:	PAM	外显子	链	中靶 (Azimuth2)	脱靶	精度 (Delphi)	移码 (Delphi)	综合（脱靶+精度+移码）
IL1a	UGACCAUCUCUCUCUGAAUC	552	AGG	3	+	49.5	57.7	0.55	78.3	63.7
IL1a	UUACCUGAUUCAGAGAGAGA	553	TGG	3	-	58.3	40.9	0.56	74.7	57.2
IL1a	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	554	AGG	4	+	43.8	41.8	0.61	87.2	63.3
IL1a	GUCACAGCUCCAUAUCAUAGA	555	AGG	4	-	54.2	35.6	0.62	91.9	63.2
IL1a	AUGACACAGAAGAAGGUAAG	556	AGG	4	+	66.2	30.5	0.63	96	63.2
IL1a	CACUACCACAUUUUCCUUGA	557	AGG	4	-	37.5	34.3	0.63	89.6	62.3
IL1a	AAUGUCUUCCAGGUCAUCAU	558	CGG	4	-	54.4	39.3	0.7	73.5	60.9
IL1a	UGGUAGUGGUGGCAGCCAAU	559	GGG	4	+	55.8	39.3	0.52	90.4	60.6
IL1a	AUCAUAGAAGGAUUUCUAUG	560	AGG	4	-	60.9	32.4	0.65	83.7	60.4
IL1a	GGAUGUCUUUGAGAUUUCAG	561	AGG	4	-	70.3	33.6	0.61	83.9	59.5
IL1a	CAUUUUCCUUGAAGGUAAGC	562	TGG	4	-	48.3	39.5	0.53	85.7	59.4
IL1a	AUUUUCCUUGAAGGUAAGCU	563	GGG	4	-	61.3	38.6	0.55	84.5	59.4
IL1a	ACAUGCAGUCCUCAUGAAGU	564	GGG	4	-	64.4	39.6	0.54	83.2	58.9
IL1a	UGUCAUUGGCAAUGUCUUCC	565	AGG	4	-	30.2	37.1	0.64	74.8	58.6
IL1a	GUGGUAGUGGUGGCAGCCAA	566	TGG	4	+	56.3	34.9	0.48	88.9	57.3
IL1a	GAGCUGUGACCCACUUCAUG	567	AGG	4	+	71.5	42.7	0.47	79.7	56.5
IL1a	CUUACCUUCUUCUGUGUCAU	568	TGG	4	-	41.3	34.8	0.57	77.8	56.5
IL1a	UAGAAGGAUUUCUAUGAGGA	569	AGG	4	-	55.8	35.5	0.54	76.9	55.5
IL1a	GCUUACCUUCAAGGAAAAUG	570	TGG	4	+	67.3	33.4	0.54	78.5	55.3
IL1a	GGAAGAUUCUAAAGAAGAGA	571	CGG	4	+	61	26.1	0.52	85.5	54.5
IL1a	AUUCAUCACCGAUGAUGACC	572	TGG	4	+	57.1	44	0.45	71.9	53.6
IL1a	CUUCUUUAGAAUCUUCCCAU	573	TGG	4	-	50.7	34	0.44	79.9	52.6
IL1a	GACAUGCAGUCCUCAUGAAG	574	TGG	4	-	58.5	40.5	0.44	72.8	52.4
IL1a	AUUGCCAAUGACACAGAAGA	575	AGG	4	+	61.9	32.1	0.6	64.6	52.2
IL1a	CUUCAAGGAAAAUGUGGUAG	576	TGG	4	+	58.6	35.1	0.59	37.5	43.9

图16A

基因	crRNA	SEQ ID NO:	PAM	外显子	链	中靶 (Azimuth2)	脱靶	精度 (Delphi)	移码 (Delphi)	综合（脱靶+精度+移码）
IL1a	CAAGGAAAAUGUGGUAGUGG	577	TGG	4	+	66.8	25.7	0.57	39.6	40.8
IL1a	AGUAUAGUUCGACAAACAGG	578	AGG	5	+	72.1	85.1	0.49	77.6	70.6
IL1a	UCUGUAAUGCAGCAGUCAUG	579	AGG	5	-	68.4	66.6	0.48	90.4	68.3
IL1a	UUACAGAAUUUUGGAUGAUGC	580	AGG	5	+	57	57.6	0.56	80.8	64.8
IL1a	GUCGAACUAUACUUUGAUUG	581	AGG	5	-	54.7	85.7	0.62	93.5	80.4
IL1a	AAGUUGUAUGCUACUGAUCU	582	GGG	5	-	51.5	73.5	0.6	92.6	75.4
IL1a	CAAAGUAUAGUUCGACAAAC	583	AGG	5	+	44.3	91.5	0.6	87	79.5
IL1a	GUUGUCAUUCAGGAUGAAUU	584	GGG	5	-	42	59	0.56	84.4	66.5
IL1a	AUGAAAAAUACAACUAUAUA	585	AGG	5	+	38	41.8	0.65	94.3	67
IL1a	GAAGUUGUAUGCUACUGAUC	586	TGG	5	-	37.5	81.1	0.52	85.4	72.8
IL1a	GGUUGUCAUUCAGGAUGAAU	587	TGG	5	-	34.6	64.7	0.47	77.9	63.2
IL1a	UUUGAUUGAGGUUGUCAUUC	588	AGG	5	-	29.9	69.4	0.6	85.6	71.7
IL1a	AGUUGUAUUUUUUCAUUGUUA	589	TGG	5	-	29.3	38.8	0.49	72.5	53.4
IL1a	GACUGCUGCAUUACAGAAUU	590	TGG	5	+	27.7	63.5	0.54	86.1	67.9

图16B

人IL1A（IL1A-001；GRCh38）

#	crRNA序列	靶标		中靶评分*	脱靶评分**	精度评分***	移码%****	综合评分^
		外显子#	链					
sg235	CAGAGACAGATGATCAATGG	3	-	69.5	67	0.57	93.7	72.6
sg236	GCCATAGCTTACATGATAGA	4	-	53.9	76.9	0.65	93.9	78.6

机器学习（inDelphi）预测	
顶级基因型（Top genotype）	修复结果†
insA (35.3%)	TACCTGATTCAGAGACAGATGATCAA|{A}TGGAGGAACTGTCTTCTTCATTTTCA SEQ ID NO:601
insT (56%)	ATGGAGTGGGCCATAGCTTACATGAT|{T}AGAAGGATTTCTGTGAGGAAGGAAAA SEQ ID NO:602

经验数据：ICE，核转染后第10天			
KO评分	顶级基因型	inDelphi排名	修复结果
99%	insA (99%)	第1	TACCTGATTCAGAGACAGATGATCAA|{A}TGGAGGAACTGTCTTCTTCATTTTCA SEQ ID NO:603
48%	insT (32%)	第1	ATGGAGTGGGCCATAGCTTACATGAT|{T}AGAAGGATTTCTGTGAGGAAGGAAAA SEQ ID NO:604

图17A

人IL1B（IL1B-201；GRCh38）

#	crRNA序列	靶标		中靶评分*	脱靶评分**	精度评分***	移码%****	综合评分^
		外显子#	链					
sg237	TGATGGCCCTAAACAGATGA	3	+	60.9	66.7	0.57	80	67.9
sg238	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	4	-	58.3	49.3	0.6	86.3	65.2
sg248	ACCTATCTTCTTCGACACAT	5	+	61.7	86.5	0.65	89.9	80.5
sg249	CTTCGACACATGGGATAACG	5	+	68.2	93.8	0.52	75.3	73.7
sg250	GTGCAGTTCAGTGATCGTAC	5	-	64.4	91	0.48	83.9	74.3

机器学习（inDelphi）预测		
顶级基因型	修复结果†	
insA (33.3%)	CTTTGAAGCTGATGGCCCTAAACAGA{A}TGAAGGTAAGACTATGGGTTTAACTC	SEQ ID NO:605
insT (51.5%)	TGCTGTAGTGGTGGTCGGAGATTCGT{T}AGCTGGATGCCGGCCATCCAGAGGGCA	SEQ ID NO:606
insA (51.9%)	CATTTCAGAACCTATCTTCTTCGACA{A}CATGGGATAACGAGGCTTATGTGCAC	SEQ ID NO:607
insA (33.4%)	ACCTATCTTCTTCGACACATGGGATA{A}ACGAGGCTTATGTGCACGATGCACCT	SEQ ID NO:608
insT (18.3%)	TCCCGGAGCGTGCAGTTCAGTGATCG{T}TACAGGTGCATCGTGCACATAAGCCT	SEQ ID NO:609

经验数据：ICE，核转染后第10天（*第3天）				
KO评分	顶级基因型	inDelphi排名	修复结果	
66%	insA (40%)	第1	CTTTGAAGCTGATGGCCCTAAACAGA{A}TGAAGGTAAGACTATGGGTTTAACTC	SEQ ID NO:605
0%	野生型	NA	TGCTGTAGTGGTGGTCGGAGATTCGT{AGCTGGATGCCGGCCATCCAGAGGGCA	SEQ ID NO:606
3%*	CAdel (3%)*	第2	CATTTCAGAACCTATCTTCTTCGACA{--TGGGATAACGAGGCTTATGTGCAC	SEQ ID NO:607
33%*	insA (22%)*	第1	ACCTATCTTCTTCGACACATGGGATA{A}ACGAGGCTTATGTGCACGATGCACCT	SEQ ID NO:608
81%*	Gdel (55%)*	第8	TCCCGGAGCGTGCAGTTCAGTGATC-{TACAGGTGCATCGTGCACATAAGCCT	SEQ ID NO:609

图17B

犬科动物IL1A（IL1A-201；CanFam3.1）

		靶标						
#	crRNA序列	外显子#	链	中靶评分*	脱靶评分**	精度评分***	移码%****	综合评分^
sg239	TGACCATCTCTCTCTGAATC	3	+	49.5	57.7	0.55	78.3	63.7
sg240	GACATCCCAGCTTACCTTCA	4	+	43.8	41.8	0.61	87.2	63.3
sg251	AGTATAGTTCGACAAACAGG	5	+	72.1	85.1	0.49	77.6	70.6
sg252	TCTGTAATGCAGCAGTCATG	5	-	68.4	66.6	0.48	90.4	68.3

机器学习（inDelphi）预测		
顶级基因型	修复结果†	
insA (35.2%)	TTCTGAAATTGACCATCTCTCTCTGA|{A}ATCAGGTAAGTAAATGACTGCAATTC	SEQ ID NO:610
insT (52.7%)	AATCTCAAAGACATCCCAGCTTACCT|{T}TCAAGGAAAAATGTGGTAGTGGTGGCA	SEQ ID NO:611
insC (30.6%)	CTCAATCAAAGTATAGTTCGACAAAC|{C}AGGAGGAAAATTACCTCATGACTGCTG	SEQ ID NO:612
insC (20.4%)	CATCCAAATTCTGTAATGCAGCAGTC|{C}ATGAGGTAATTTCCTCCTGTTTGTCG	SEQ ID NO:613

经验数据：ICE，核转染后第10天				
KO评分	顶级基因型	inDelphi排名	修复结果	
90%	insA (56%)	第1	TTCTGAAATTGACCATCTCTCTCTGA|{A}ATCAGGTAAGTAAATGACTGCAATTC	SEQ ID NO:614
97%	insT (57%)	第1	AATCTCAAAGACATCCCAGCTTACCT|{T}TCAAGGAAAAATGTGGTAGTGGTGGCA	SEQ ID NO:615

图17C

犬科动物IL1B（IL1B-201；CanFam3.1）

#	crRNA序列	靶标		中靶评分*	脱靶评分**	精度评分***	移码%****	综合评分^
		外显子#	链					
sg241	TGATGGCCCTGGAAATGTGA	3	+	66.1	51.5	0.53	91.2	65.2
sg242	ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	4	-	68.9	62	0.64	84	70

机器学习（inDelphi）预测		
顶级基因型	修复结果†	
insT (22.9%)	CTTTGAAGCTGATGGCCCTGGAAATG{T}TGAAGGTGAGACCATGGGCTTAGCTC	SEQ ID NO:616
insT (56.4%)	ATGCCTCAGACTCTTGTTACAGAGCT{T}GGTGGGAGACTTGCAACTGGATGCCC	SEQ ID NO:617

经验数据：ICE，核转染后第10天				
KO评分	顶级基因型	inDelphi排名	修复结果	
99%	delTG (95%)	第2	CTTTGAAGCTGATGGCCCTGGAAATG--AAGGTGAGACCATGGGCTTAGCTC	SEQ ID NO:618
99%	insT (99%)	第1	ATGCCTCAGACTCTTGTTACAGAGCT{T}GGTGGGAGACTTGCAACTGGATGCCC	SEQ ID NO:619

图17D

6小时的犬科动物IL-1α

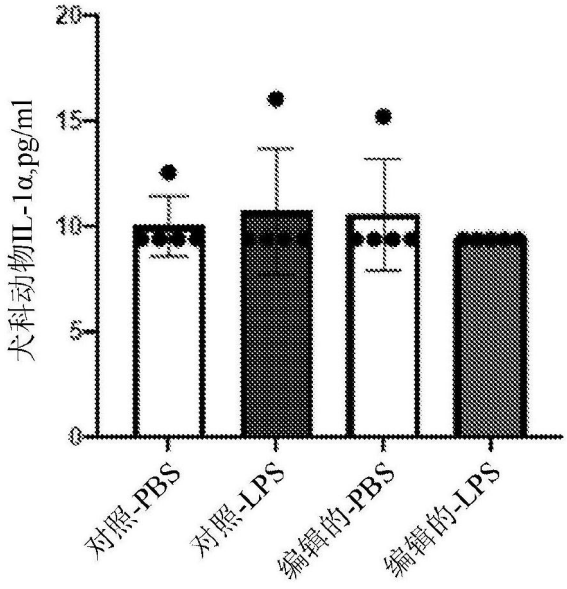


图18A

24小时时的犬科动物IL-1α

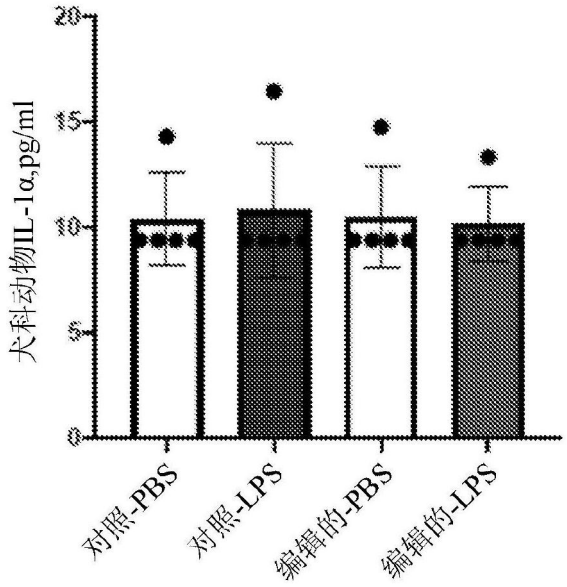


图18B

6小时时的犬科动物IL-1β

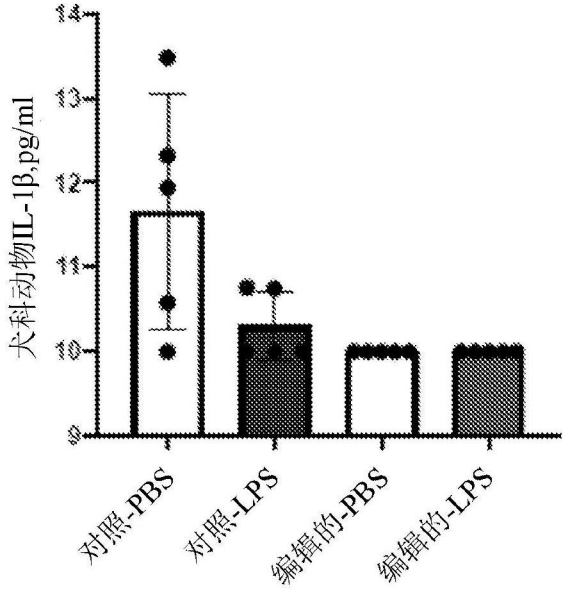


图18C

24小时时的犬科动物IL-1β

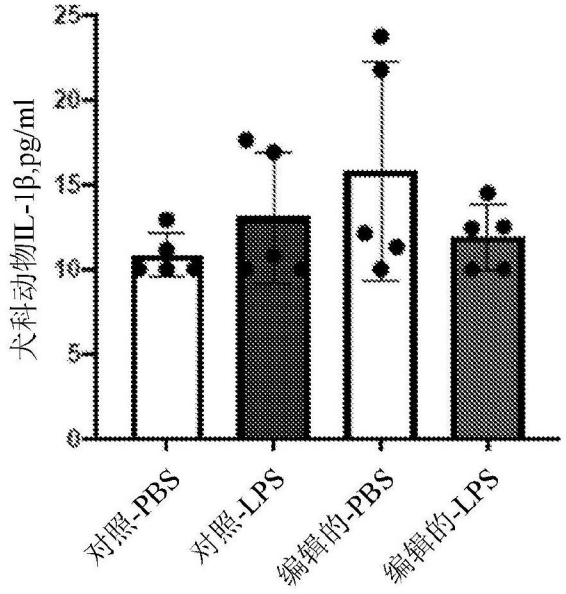


图18D

6小时时的人IL-1α

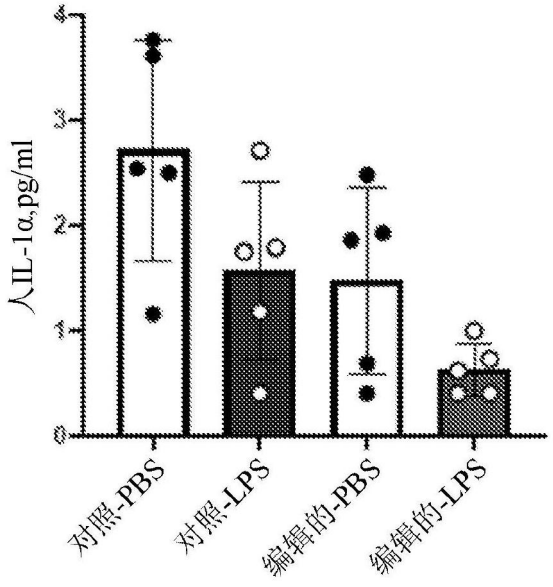


图19A

24小时时的人IL-1α

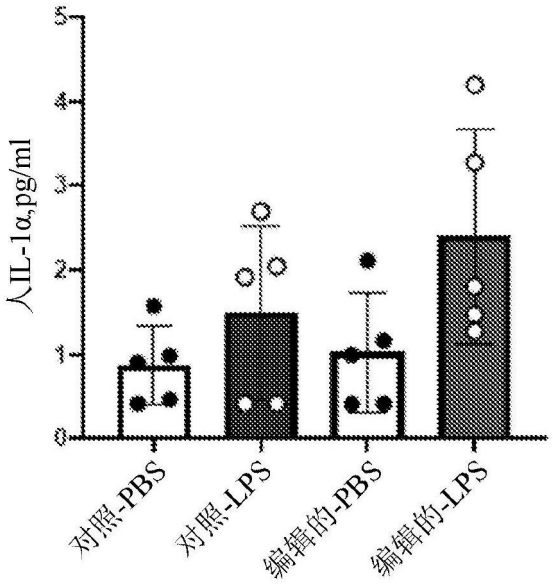


图19B

6小时时的人IL-1β

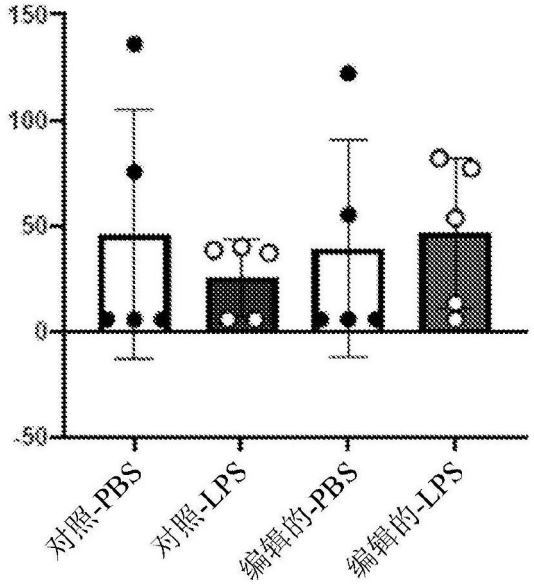


图19C

24小时时的人IL-1β

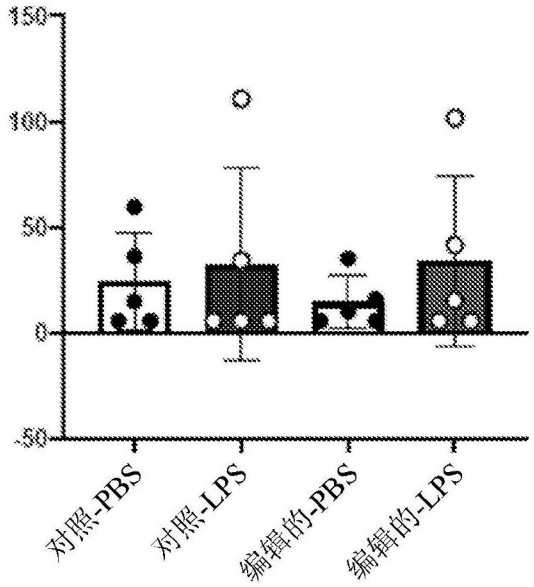


图19D