(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0041729
(43) 공개일자 2023년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7004715
(22) 출원일자(국제) 2021년07월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/042100
(87) 국제공개번호 WO 2022/016121
국제공개일자 2022년01월20일
(30) 우선권주장
63/052,881 2020년07월16일 미국(US)
63/055,808 2020년07월23일 미국(US)

(71) 출원인
오르토바이오 테라퓨틱스, 인크.
미국, 콜로라도 81657, 베일, 노스 프론티지 로드 웨스트 1300, 박스 5937
(72) 발명자
밀레 피터 제이.
미국, 콜로라도 81632, 에드워드 필그림 드라이브 975
러셀 아이에인 앨러스데이어
영국 캠브리지 씨비1 9에이치이 헤딩턴 드라이브 11
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구

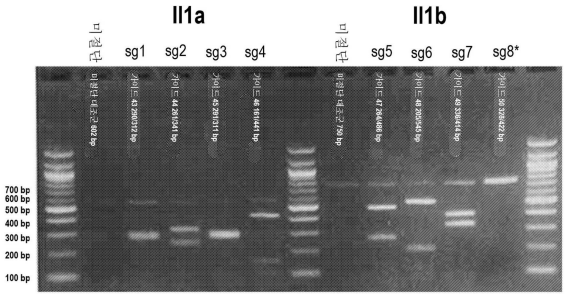
전체 청구항 수 : 총 142 항

(54) 발명의 명칭 **관절 기능을 개선하기 위한 유전자 편집**

(57) 요 약

본 개시는 염증성 성분을 특징으로 하는 관절 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 조성물 및 방법은 포유류 관절을 대상으로 골관절염 및 다른 관절염의 진행을 예방하고, 골관절염 및 다른 관절염을 치료하기 위한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 19/02 (2018.01)
C12N 15/1136 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
(72) 발명자
알렌 매튜 제이.
영국 캠스 씨비25 0에이치피, 스워프햄 불벡, 하이 스트리트 33

젠트쉬 조지
영국 캠브리지 씨비4 1유에이 캠브리지샤이어 렌트 웨이 12

명 세 서

청구범위

청구항 1

관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서,

일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR) 유전자 편집 시스템을 암호화하는 하나 이상의 핵산의 치료적 유효량을 포함하되, 상기 시스템은

(i) CRISPR 연관 단백질 9(Cas9) 단백질; 및

(ii) IL-1α 또는 IL-1β 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 포함하고, 표적 서열은 Cas9 단백질에 대한 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열에 인접하는, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1로부터 선택된 재조합 바이러스를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 재조합 AAV는 혈청형 5의 AAV(AAV5)인, 약학적 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 재조합 AAV는 혈청형 6의 AAV(AAV6)인, 약학적 조성물.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는:

하나 이상의 핵산 중에서 Cas9 단백질을 암호화하는 제1 핵산을 포함하는 제1 바이러스 벡터; 및

하나 이상의 핵산 중에서 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 제2 바이러스 벡터를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 24

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 단일 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 포함하고, 단일 핵산은 Cas9 단백질 및 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는, 약학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 리포좀을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 핵산은 네이키드 상태로 존재하는, 약학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질은 화농성연쇄상구균(*S. pyogenes*) Cas9 폴리펩티드인, 약학적 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질은 황색포도상구균(*S. aureus*) Cas9 폴리펩티드인, 약학적 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여용으로 제형화되는, 약학적 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 대상체의 관절 내에 관절내 주사용으로 제형화되는, 약학적 조성물.

청구항 31

관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 이를 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 상기 방법은:

대상체의 관절에, 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR) 유전자 편집 시스템을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 조성물의 약학적 유효량을 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 시스템은:

(i) CRISPR 연관 단백질 9(Cas9) 단백질; 및

(ii) IL-1α 또는 IL-1β 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 포함하고, 표적 서열은 Cas9 단백질에 대한 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열에 인접하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 관절 질환 또는 병태는 관절염인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 관절염은 골관절염인, 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 36

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 37

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 38

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 39

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 40

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 41

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 42

제34항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 43

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 개과인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 45

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 46

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 47

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 48

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 49

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 50

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 51

제43항에 있어서,

적어도 하나의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자를 표적화하고,

적어도 하나의 가이드 RNA는 서열 번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 crRNA 서열을 포함하는, 방법.

청구항 52

제31항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 투여하는 단계는 대상체의 관절 내로 약학적 조성물을 관절내 주사하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 53

제31항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 수술 중에 투여되는, 방법.

청구항 54

제31항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 수술 후에 투여되는, 방법.

청구항 55

제31항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 조절 방출식 약학적 조성물인, 방법.

청구항 56

제31항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1로부터 선택된 재조합 바이러스를 포함하는, 방법

청구항 58

제57항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함하는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 재조합 AAV는 혈청형 5의 AAV(AAV5)인, 방법.

청구항 60

제58항에 있어서, 재조합 AAV는 혈청형 6의 AAV(AAV6)인, 방법.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는:

하나 이상의 핵산 중에서 Cas9 단백질을 암호화하는 제1 핵산을 포함하는 제1 바이러스 벡터; 및

하나 이상의 핵산 중에서 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 제2 바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 62

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 단일 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 포함하고, 단일 핵산은 Cas9 단백질 및 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는, 방법.

청구항 63

제31항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 64

제31항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 핵산은 네이키드 상태로 존재하는, 방법.

청구항 65

제31항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질은 화농성연쇄상구균 Cas9 폴리펩티드인, 방법.

청구항 66

제31항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질은 황색포도상구균 Cas9 폴리펩티드인, 방법.

청구항 67

관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 유전자 편집 시스템을 포함하되, 상기 유전자 편집 시스템은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 68

제67항에 있어서, 유전자 편집 시스템은 IL-1α 및/또는 IL-1β 중 하나 이상을 표적으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 유전자 편집 시스템은 관절을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 침묵시키거나 감소시키는, 약학적 조성물.

청구항 70

제67항에 있어서, 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌는 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자좌인, 약학적 조성물.

청구항 71

제70항에 있어서, 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자좌는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-관련 반점-유사 단백질), 카스파제-1, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 72

제67항에 있어서, 유전자 편집은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 73

제67항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 관절을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 관절과 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 침묵시키거나 감소시키는, 약학적 조성물.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-관련 반점-유사 단백질), 카스파제-1, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 75

제67항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 무릎을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서, IL-1Ra, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자의 발현을 강화시키는, 약학적 조성물.

청구항 76

제67항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 상기 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 77

제67항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 CRISPR 방법, TALE 방법, 징크 핑거 방법, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 78

제67항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 CRISPR 방법을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 79

제78항에 있어서, CRISPR 방법은 CRISPR-Cas9 방법인, 약학적 조성물.

청구항 80

제67항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 TALE 방법을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 81

제67항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 징크 핑커 방법을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 82

관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 유전자 편집 시스템을 도입하는 단계를 포함하되, 유전자 편집 시스템은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적으로 하는, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 유전자 편집 시스템은 IL-1α 및/또는 IL-1β 중 하나 이상을 표적으로 하는, 방법.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 유전자 편집 시스템은 관절을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 침묵시키거나 감소시키는, 방법.

청구항 85

제82항에 있어서, 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌는 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자좌인, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자좌는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-관련 반점-유사 단백질), 카스파제-1, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 87

제82항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 88

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 관절을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 관절과 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 침묵시키거나 감소시키는, 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-관련 반점-유사 단백질), 카스파제-1, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 90

제82항 또는 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 무릎을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서, IL-1Ra, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자의 발현을 강화시키는, 방법.

청구항 91

제82항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 상기 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 92

제82항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 CRISPR 방법, TALE 방법, 징크 핑거 방법, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 포함하는, 방법.

청구항 93

제82항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 CRISPR 방법을 포함하는, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, CRISPR 방법은 CRISPR-Cas9 방법인, 방법.

청구항 95

제82항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 TALE 방법을 포함하는, 방법.

청구항 96

제82항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집은 징크 핑커 방법을 포함하는, 방법.

청구항 97

관절 질환으로 인한 개 절뚝거림을 치료하기 위한 방법으로서, 제67항 내지 제81항 중 어느 한 항의 조성물을 이를 필요로 하는 개에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 조성물은 관절 내에 주입되는, 방법.

청구항 99

관절 질환으로 인한 말 절뚝거림을 치료하기 위한 방법으로서, 제67항 내지 제81항 중 어느 한 항의 조성물을 이를 필요로 하는 말에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 조성물은 관절 내에 주입되는, 방법.

청구항 101

제97항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 관절 질환은 염증성 관절 질환인, 방법.

청구항 102

관절염을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은

회문 반복서열(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9); 및 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 유전자 편집 복합체의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되,

상기 유전자는 IL-1α, IL-1β, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA는 서열번호 7~20으로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열에 상보적인 RNA 서열인, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 관절염은 골관절염인, 방법.

청구항 104

제102항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체는 Cas9 단백질 및 단일 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체는 Cas9 단백질을 및 단일 가이드 RNA와의 복합체로서 포함하는, 방법.

청구항 106

제102항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체는 Cas9 단백질; 및 IL-1α 및 IL-1β 중 적어도 하나 또는 둘 다를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 107

제102항에 있어서, Cas9는 Cas9 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산으로서 투여되는, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, Cas9 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산은 바이러스로서 투여되는, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 바이러스는 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 및 렌티바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 바이러스는 아데노-연관 바이러스(AAV)인, 방법.

청구항 111

제108항에 있어서, IL-1α 및 IL-1β 중 하나 또는 둘 다를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 가이드 RNA를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산은 바이러스로서 투여되는, 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 바이러스는 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 및 렌티바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 바이러스는 아데노-연관 바이러스(AAV)인, 방법.

청구항 115

제102항에 있어서, 복합체는 Cas9 단백질을 암호화하는 서열 및 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 서열을

포함하는 단일 핵산으로서, 바람직하게는 바이러스 벡터로서 투여되고, Cas9 단백질 및 적어도 하나의 가이드 RNA는 동일한 핵산으로부터 발현되는, 방법.

청구항 116

제102항에 있어서, 복합체는 둘 이상의 핵산으로서, 바람직하게는 둘 이상의 바이러스 벡터로서 투여되고, 제1 핵산은 적어도 하나의 가이드 RNA를 암화하는 서열을 포함하고, 제2 핵산은 Cas9 단백질을 암호화하는 서열을 포함하고, 적어도 하나의 가이드 RNA 및 Cas9 단백질은 별도의 핵산으로부터 발현되는, 방법.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 핵산은 재조합 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터, 및 렌티바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 벡터인, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터인, 방법.

청구항 119

제102항에 있어서, IL-1α를 표적으로 하는 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 120

제102항에 있어서, IL-1β를 표적으로 하는 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 121

제102항에 있어서, Cas9는 스트렙토코커스 써모필러스(ST) Cas9(StCas9); 트레포네마 덴티콜라(TD)(TdCas9); 화농성연쇄상구균(SP)(SpCas9); 황색포도상구균(SA) Cas9(SaCas9); 또는 수막염균(NM) Cas9(NmCas9), 또는 이들의 변이체인, 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, Cas9는 SpCas9, 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, Cas9는 SpyCas9, 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 124

제102항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체는 전신 투여되거나 관절염 부위에 국소 투여되는, 방법.

청구항 125

제102항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체는 수술, 국소 연고의 도포, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료 부위에 국소 투여되는, 방법.

청구항 126

제102항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체는 생분해성 및/또는 생체적합성 중합체를 포함하는 조성물로서 투여되도록 제형화되는, 방법.

청구항 127

제126항에 있어서, 생분해성 및/또는 생체적합성 중합체는 콜라겐, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리에틸렌글리콜-코팅된 리포좀, 및 폴리락트산으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 128

제102항에 있어서, 대상체는 인간인, 방법.

청구항 129

제102항에 있어서, 대상체는 유인원, 개코원숭이, 소, 개, 염소, 고릴라, 기니피그, 햄스터, 여우원숭이, 마우스, 오랑우탄, 돼지, 랫트, 말, 및 양으로 이루어진 군으로부터 선택된 비인간 대상체인, 방법.

청구항 130

제102항에 있어서, CRISPR 유전자 편집 복합체의 편집 효율은 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%인, 방법.

청구항 131

약학적 조성물로서,

일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9); 및 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 유전자 편집 복합체의 치료적 유효량을 포함하되,

상기 유전자는 IL-1α, IL-1β, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 유전자를 표적화하는 적어도 하나의 가이드 RNA는 서열번호 7~20으로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열에 상보적인 RNA 서열인, 약학적 조성물.

청구항 132

다세포 진핵생물의 유전적 변형을 통해 관절 질환을 치료하기 위한 CRISPR/Cas9-매개 방법으로서, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접한 핵산 표적 서열 및 다음을 포함하는 비-자연 발생 Cas9 단백질을 국소 투여하는 단계를 포함하되, 이에 의한 핵산 성분의 공동 발현이 관절의 적어도 일부 세포에서 염증을 감소시키는, 방법:

a) 표적 서열(들)과 혼성화되는 하나 이상의 CRISPR/Cas9 복합체 gRNA를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 제1 조절 요소;

b) II형 Cas 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 제2 조절 요소, 및

c) 성분 (a) 및 (b)를 표적 관절 세포에 전달할 수 있는 바이러스 벡터.

청구항 133

관절 질환을 치료하는 방법으로서,

a) IL-1α 유전자 또는 IL-1β를 표적으로 하는 도메인을 포함하는 gRNA 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 바이러스 벡터; 및

b) Cas9 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 국소 투여하는 단계를 포함하되,

gRNA 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상기 바이러스 벡터 및 Cas9 분자를 포함하는 상기 바이러스 벡터는, 관절의 적어도 일부 세포에서 IL-1α 또는 IL-1β의 수준이 감소되도록 세포로 전달될 수 있는, 방법.

청구항 134

서열번호 21 내지 34로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖고 IL-1α 또는 IL-1β 유전자의 표적 부위에 결합하는 단일 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR-Cas 뉴클레아제로서, 유전자를 절단하고 불활성화하는 CRISPR-Cas 뉴클레아제.

청구항 135

대상체의 관절에서 내인성 IL-1α 또는 IL-1β를 불활성화하는 방법으로서, 제134항에 따른 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 관절에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 뉴클레아제는 IL-1α 유전자 또는 IL-1β 유전자를 절단하고 불활성화하는, 방법.

청구항 136

게놈 인터류킨-1 알파(IL-1a)에 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)/Cas 가이드 RNA(gRNA)로서, 표적화 도메인은 야생형 서열을 파괴하도록 구성되는, CRISPR/Cas gRNA.

청구항 137

다음을 포함하는 하나 이상의 패키징된 벡터(들)를 포함하는 벡터 시스템:

a) 제136항에 따른 gRNA를 암호화하는 서열에 작동가능하게 연결된 제1 조절 요소, 및

b) Cas 단백질을 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된 제2 조절 요소.

청구항 138

세포에서 IL-1A를 암호화하는 핵산 서열을 변경하는 방법으로서, 상기 세포를: a) gRNA 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 바이러스 벡터(gRNA 분자는 IL-1α 유전자 또는 IL-1β를 표적화하는 도메인을 포함함); 및

b) Cas9 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하되,

gRNA 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상기 바이러스 벡터 및 Cas9 분자를 포함하는 상기 바이러스 벡터는, 관절의 적어도 일부 세포에서 IL-1α 또는 IL-1β의 수준이 감소되도록 세포로 전달될 수 있는, 방법.

청구항 139

대상체에서 골관절염을 치료하는 방법으로서, 제137항의 IL-1α 유전자 또는 IL-1β 벡터 시스템을 대상체에게 국소 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 140

관절의 적어도 일부 세포에서 IL-1α 유전자 또는 IL-1β 발현을 감소시키는 방법으로서, 제137항의 벡터 시스템을 세포에 도입하거나 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 141

제1항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 168~297에 도시된 서열과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한, 조성물, 방법, 또는 시스템.

청구항 142

제1항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 AAV-5 및 AAV-6으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물, 방법, 또는 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 활막 관절 기능장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법이 본원에 기술된다. 또한, 활막세포 및/또는 윤활막세포, 연골세포, 활막 대식세포, 및 활막 섬유아세포를 유전자 편집하는 방법, 및 골관절염과 같은 질환의 치료에 있어서 유전자 편집된 활막세포 및/또는 윤활막세포, 연골세포, 활막 대식세포, 및 활막 섬유아세포의 용도가 본원에 개시된다.

배 경 기 술

[0002] 골관절염, 퇴행성 관절 질환, 및 기타 관절 기능장애의 치료는 복잡하며, 증상을 완화시키거나 관절 기능을 회복하기 위한 장기적인 옵션은 거의 없다. 골관절염(OA)은 통증으로 인한 장애의 주요 원인이다. Neogi의 문헌

[*Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21:1145-53]. 모든 포유동물 종(사역 동물, 가축, 및 그 소유주)은 질환 진행의 정도에 따라 모두 OA 관련 불편함, 통증, 및 장애를 겪는다.

[0003] OA는 장애의 진행 과정을 특징으로 하는 복합 질환이다. 전신 염증은 OA 및 OA 질환 진행과 관련이 있다. 염증은 전염증성 사이토카인 수준의 증가에 의해 유도된다. 이러한 질환을 치료하기 위한 새로운 방법 및 조성물이 시급하다. OA를 비롯하여 다른 염증성 관절 장애를 치료하는 데 유용한 조성물 및 방법이 본원에 개시된다.

발명의 내용

[0004] 본 개시는 염증성 성분을 특징으로 하는 관절 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 조성물 및 방법은 포유류 관절을 대상으로 골관절염 및 다른 관절염의 진행을 예방하고, 골관절염 및 다른 관절염을 치료하기 위한 것이다. 예시적인 구현예에 따르면, 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키기 위해, 관절 활막세포 및/또는 윤활막세포, 연골세포, 활막 대식세포, 또는 활막 섬유아세포의 적어도 일부분이 유전자 편집된다. 일부 양태에서, IL-1α, IL-β, 또는 IL-1α와 IL-1β 둘 다의 발현을 감소시키기 위해, 관절 활막세포 및/또는 윤활막세포, 연골세포, 활막 대식세포, 또는 활막 섬유아세포의 적어도 일부분이 유전자 편집된다.

[0005] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 포유류 관절 세포를 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자의 발현을 침묵화시키거나 감소시킨다. 일부 양태에서, 세포는 활막세포이다. 일부 양태에서, 세포는 활막 섬유아세포이다. 일부 양태에서, 세포는 윤활막세포이다. 일부 양태에서, 세포는 연골세포이다. 일부 양태에서, 세포는 활막 대식세포이다.

[0006] 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자는 IL-1α 및 IL-1β를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0007] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 상기 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 CRISPR 방법, TALE 방법, 징크 핑거 방법, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 CRISPR 방법을 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, CRISPR 방법은 CRISPR-Cas9 방법이다.

[0011] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 TALE 방법을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 징크 핑거 방법을 포함한다.

[0013] 일부 구현예에서, 유전자 편집은 관절 세포를 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자의 발현을 침묵화시키거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, 편집된 세포의 일부분은 윤활막세포이다. 일 양태에서, 편집된 세포의 부분은 활막 섬유아세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포의 일부분은 윤활막세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포의 일부분은 연골세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포의 일부분은 활막 대식세포이다.

[0014] 일부 구현예에서, 아데노-연관 바이러스(AAV) 전달 시스템이 유전자-편집 시스템을 전달하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, AAV 전달 시스템은 관절 내에 주입된다.

[0015] 본 개시의 일부 양태는 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 유전자 편집 시스템 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 일 양태에서, 유전자 편집 시스템은 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, 및 IL-18로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자좌를 표적으로 하는 하나 이상의 핵산을 포함한다.

[0016] 일 구현예는 개의 절뚝거림(canine lameness)을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유전자-편집 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 절뚝거리는 관절의 윤활막세포, 연골세포, 활막 대식세포, 또는 활맥 섬유아세포의 일부분에서 IL-1α 및 IL-1β의 발현을 침묵화시키거나 감소시킨다.

[0017] 일부 구현예에서, 상기 방법은 본원에 기술된 방법 및 조성물 중 어느 하나에서 인용된 하나 이상의 특징을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 현재 개시된 구현예는 첨부된 도면을 참조하여 추가로 설명될 것이다. 도시된 도면은 반드시 축척에 비례하지는 않으며, 그 대신에 현재 개시된 구현예의 원리를 예시할 때 강조해야 할 부분 위주로 표시된다.

도 1a는 0.5 μg *Spy*Cas9(TrueCut쩨 Cas9 protein v2, ThermoFisher Scientific)에 의해 절단된 생쥐(*Mus musculus*) *Il1a* 및 *Il1b* 유전자에 대해 설계된 100 ng 마우스 DNA(gBlocks, Integrated DNA Technologies); 및 시험관내에서 *Il1a* 유전자(#43-46) 및 *Il1b* 유전자(#47-50)에 대해 표적화된 200 ng의 포스포로티오에이트-변형된 단일 가이드 (sg)RNA에 대한 아가로스 겔 전기영동 분석을 도시한다.

도 1b는 0.5 μg *Sau*Cas9(GeneSnipper쩨 Cas9, BioVision)에 의해 절단된 생쥐 *Il1a* 및 *Il1b* 유전자에 대해 설계된 100 ng 마우스 DNA(gBlocks, Integrated DNA Technologies); 및 시험관내에서 *Il1a* 유전자(#51-53) 및 *IL1b* 유전자(#54-56)에 대한 200 ng의 포스포로티오에이트-변형된 가이드 sgRNA에 대한 아가로스 겔 전기영동 분석을 도시한다.

도 2a, 2b, 2c, 및 2d는 J774.2("J") 및 NIH3T3("N") 세포에서 다양한 가이드 RNA와 함께 사용된 *Spy*Cas9 및 *Sau*Cas9의 편집 효율을 나타내는 그래프를 집합적으로 도시한 것으로서; 도 2a: 2개의 세포주 NIH 3T3("N") 및 J774.2("J")를 대상으로 2개의 상이한 풀(풀 1 및 2)에서 4 x sgRNA(*Spy* Cas9)로 편집한 *Il1a*의 생체내 절단; 도 2b: 2개의 세포주 NIH 3T3("N") 및 J774.2("J")를 대상으로 2개의 별도 풀(풀 1 및 2)에서 4 x sgRNA(*Spy* Cas9)로 편집한 *Il1b*의 생체내 절단; 도 2c: 2개의 세포주 NIH 3T3("N") 및 J774.2("J")를 대상으로 2개의 별도 풀(풀 1 및 2)에서 3 x sgRNA(*Sau* Cas9)로 편집한 *Il1a*의 생체내 절단; 도 2d: 2개의 세포주 NIH 3T3("N") 및 J774.2("J")를 대상으로 2개의 별도 풀(풀 1 및 2)에서 3 x sgRNA(*Sa*Cas9)로 편집한 *Il1b*의 생체내 절단을 도시하며; 편집 효율은 각 풀의 생거 시퀀싱 흔적(ICE 도구, Synthego)의 디컨볼루션을 사용해 결정하였다.

도 3은 IVIS 시스템을 사용하여 측정된 GFP 발현을 도시한다. 플럭스 값은 동물의 주입된 무릎 관절을 중심으로 한 관심 영역을 기준으로 하였다. 데이터는 군 당 4개의 시편에 대한 평균(SD)으로서 제시된다.

도 4는 본 개시의 실시예 5에 기술된 바와 같은 임상시험의 설계를 도시한다.

도 5는 본 개시의 실시예 5에 기술된 바와 같은 임상시험에서 얻은 생체내 결과 측정을 도시한다.

도 6은 본 개시의 실시예 5에 기술된 바와 같은 임상시험에서 PBS의 관절내(IA) 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-6의 IA 주사, CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-6의 IA 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-5의 IA 주사, 또는 CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-5의 IA 주사로 치료한 마우스의 체중 변화를 도시한다.

도 7a 및 7b는 집합적으로 (A) 마우스 관절의 베이스라인 대비 시간 경과에 무릎 캘리퍼 측정치의 변화; 및 (B) 본 개시의 실시예 5에 기술된 바와 같은 임상시험에서 PBS의 관절 내(IA) 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-6의 IA 주사, CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-6의 IA 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-5의 IA 주사, 또는 CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-5의 IA 주사로 치료한 마우스에서 발목 캘리퍼 측정치의 평균 차이를 AUC로 도시한 것이다.

도 8a 및 8b는 집합적으로 (A) 본 프레이 측정의 변화; 및 (B) 본 개시의 실시예 5에 기술된 바와 같은 임상시험에서 PBS의 관절 내(IA) 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-6의 IA 주사, CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-6의 IA 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-5의 IA 주사, 또는 CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-5의 IA 주사로 치료한 마우스에서 얻은 본 프레이 측정의 평균 절대 임계치를 도시한 것이다.

도 9는 본 개시의 실시예 5에 기술된 바와 같은 임상시험에서 PBS의 관절내(IA) 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-6의 IA 주사, CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-6의 IA 주사, 스크램블 벡터를 이용한 AAV-5의 IA 주사, 또는 CRISPR-Cas 가이드 1 및 2를 이용한 AAV-5의 IA 주사로 치료한 마우스로부터 수득한 관절낭액에서 IL-1β 발현에 대한 qPCR 검정 결과를 도시한다.

도 10a, 10b, 10c, 및 10d는 MSU 주입한 후, PBS로 전치료하고(a, b) CRISPR로 치료한(c, d)의 동물의 활막 조직에서 쥣과 IL-1β에 대한 면역조직화학을 집합적으로 도시한다. 도 10b 및 10d는 도 10a 및 10c 각각에 대한 이소형 대조군을 각각 보여준다.

도 11a, 11b, 및 11c는 마우스, 인간, 말, 고양이, 및 개 IL-1 알파 유전자 간의 정렬을 집합적으로 도시한다.

도 12a, 12b, 12c, 및 12d는 마우스, 인간, 말, 고양이, 및 개 IL-1 베타 유전자 간의 정렬을 집합적으로 도시

한다.

도 13a, 13b, 13c, 및 13d는 인간 IL-1 알파 유전자를 편집하도록 설계된 예시적인 CRISPR/Cas9 crRNA 서열을 집합적으로 도시한다.

도 14a, 14b, 14c, 14d, 및 14e는 인간 IL-1 베타 유전자를 편집하도록 설계된 예시적인 CRISPR/Cas9 crRNA 서열을 집합적으로 도시한다.

도 15a, 15b, 및 15c는 개 IL-1 알파 유전자를 편집하도록 설계된 예시적인 CRISPR/Cas9 crRNA 서열을 집합적으로 도시한다.

도 16a 및 16b는 개 IL-1 베타 유전자를 편집하도록 설계된 예시적인 CRISPR/Cas9 crRNA 서열을 집합적으로 도시한다.

도 17a, 17b, 17c, 및 도 17d는 실시예 8에 기술된 바와 같이, 인간 IL-1 알파 유전자(도 7a), 인간 IL-1 베타 유전자(도 7b), 개 IL-1 알파 유전자(도 7c), 및 개 IL-1 베타 유전자(도 77d)를 표적으로 하는 crRNA의 세포 기반 유전자 편집 분석 및 가상 유전자 편집 분석 결과를 집합적으로 도시한다. º 아미노산(AA)의 번역 프레임 내에 있는 CRISPR 절단 위치. * Doench, Fusi 등의 (2016)에서의 최적화된 점수. 이 점수는 NGG를 이용해 20 bp 가이드에 최적화되어 있다. 점수는 0에서 100의 범위이다. 높을수록 더 양호하다. ** Hsu 등의 (2013)에서의 특이성 점수. 점수는 0에서 100의 범위이다. 높을수록 더 양호하다. *** 이 점수는 U2OS에서의 실험을 기반으로 한다. 높은 정밀도 점수(>0.4)는 DNA 복구 결과가 균일하고 소량의 고유한 유전자형만으로도 충분함을 시사한다. **** 이 점수는 U2OS에서의 실험을 기반으로 한다. 높은(>80%) 프레임시프트 빈도는 단백질 코딩 유전자를 프레임 밖으로 녹아웃하는 경향을 보이게 된다. 일반적인 게놈 프레임시프트 빈도는 66%를 초과하는데, 이는 1 bp 삽입 및 1~2 bp 결실이 특히 흔한 복구 결과이기 때문이다. ^ 종합 점수 = (오프 타겟 점수 + 정밀도 점수*100 + 프레임시프트)/3. 쪌 파이프 기호 '|'는 CRISPR 절단 부위를 나타낸다. 대괄호 '{}'는 삽입을 나타낸다. 하이픈 '-'은 결실을 나타낸다. $ 잠재적인 오프 타겟 부위. 채점은 Hsu 등의 (2013)에 따름. 온 타겟 부위는 100의 점수를 갖는다.

도 18a, 18b, 18c, 및 18d는 실시예 9에 기술된 바와 같이, PBS 또는 LPS에 노출시키고 6시간 후(도 18a 및 18c) 및 24시간 후(도 18b 및 18d)에 편집되지 않은(대조군) 개 연골세포 및 (편집된)이중 IL-1α/IL-1β KO의 개 연골세포로부터 개 IL-1 알파(도 18a 및 18b) 및 개 IL-1 베타(도 18b 및 18d)의 방출을 집합적으로 도시한다.

도 19a, 19b, 19c, 및 19d는 실시예 9에 기술된 바와 같이, PBS 또는 LPS에 노출시키고 6시간 후(도 19a 및 19c) 및 24시간 후(도 19b 및 19d)에 편집되지 않은(대조군) 개 연골세포 및 (편집된)이중 IL-1α/IL-1β KO 개 연골세포로부터 인간 IL-1 알파(도 19a 및 19b) 및 인간 IL-1 베타(도 19c 및 19d)의 방출을 집합적으로 도시한다.

상기 도면은 현재 개시된 구현예를 제시하지만, 논의에서 언급된 바와 같이 다른 구현예도 고려된다. 본 개시는 제한이 아닌 표현을 통해 예시적인 구현예를 제공한다. 다수의 다른 변형 및 구현예가 당업자에 의해 고안될 수 있으며, 이러한 변형 및 다른 구현예는 현재 개시된 구현예의 원리의 범주와 사상 내에 포함된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본원에 기술된 바와 같이, 본 개시의 구현예는 관절 기능을 개선하고 관절 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 하나 이상의 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), 또는 NLRP3 염증조절복합체(inflammasome)의 하나 이상의 성분과 같은 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키기 위해 활막 섬유아세포, 윤활막세포, 연골세포, 또는 활막 대식세포를 유전자 편집하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 구현예는 골관절염 및 기타 염증성 관절 질환을 치료하는 데 사용된다. 구현예는 골관절염으로 인한 개 절뚝거림을 치료하는 데 추가로 유용하다. 구현예는 관절 질환으로 인한 말 절뚝거림을 치료하는 데 추가로 유용하다. 구현예는 외상후 관절염, 통풍, 가성통풍, 및 기타 염증 매개성 또는 면역 매개성 관절 질환을 치료하는 데에도 유용하다.

[0020] 정의

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시가 속하는 당업계의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허 및 간행물은 그 전체가 참조로서

통합된다.

[0022] 용어 "생체내"는 대상체의 신체에서 발생하는 이벤트를 지칭한다.

[0023] 용어 "시험관내"는 대상체의 신체 외부에서 발생하는 이벤트를 지칭한다. 시험관내 검정은 생존 세포 또는 죽은 세포가 사용되는 세포 기반 검정을 포함하며, 온전한 세포가 사용되지 않는 무세포 검정도 포함할 수 있다.

[0024] 용어 "생체외"는 대상체의 신체로부터 제거된 세포, 조직, 및/또는 기관을 치료하거나 이를 대상으로 수행하는 것을 포함하는 이벤트를 지칭한다. 적절하게는, 세포, 조직, 및/또는 기관은 수술 또는 치료의 방법을 통해 대상체의 신체로 반환될 수 있다.

[0025] 용어 "IL-1"(본원에서는 "IL1"로도 지칭됨)은 인터류킨-1로서 알려진 전염증성 사이토카인을 지칭하며, IL1-α 및 IL-1-1β, 인간 및 포유류 형태, 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러, 및 이들의 변이체를 포함하여 IL-1의 모든 형태을 포함한다. IL-1α 및 IL-1β는 I형 IL-1 수용체(IL-1RI)로 불리는 동일한 수용체 분자에 결합한다. 이러한 수용체의 제3 리간드가 있다: 하류 신호전달을 활성화하지 않고; 따라서 수용체의 결합 부위에 대해 IL-1α 및 IL-1β와 경쟁함으로써 이들의 억제제로서 작용하는 인터류킨 1 수용체 작용제(IL-1Ra). 예를 들어 Dinarello의 문헌[*Blood* **117**: 3720-32 (2011)] 및 Weber 등의 문헌[*Science Signaling* **3**(105): cm1, doi:10.1126/scisignal.3105cm1] 참조. IL-1은 예를 들어 Dinarello의 문헌[*Cytokine Growth Factor Rev.* **8**:253-65 (1997)]에 기술되어 있으며, 그 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다. 예를 들어, IL-1이라는 용어는 IL-1의 인간 형태, 및 재조합 형태를 포함한다.

표 1

[0026]

인터류킨의 아미노산 서열.	
식별자	**서열 (한 글자 아미노산 기호)**
서열번호 1 재조합 인간 IL-1알파 (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
서열번호 2 재조합 인간 IL-1베타 (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

서열번호 3 재조합 마우스 IL-1알파 (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
서열번호 4 재조합 마우스 IL-1베타 (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
서열번호 5 재조합 인간 IL-1 수용체 길항제 (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
서열번호 6 재조합 마우스 IL-1 수용체 길항제 (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

[0027] 용어 "NLRP3 염증조절복합체"는 일부 염증 반응의 활성화를 담당하는 다중단백질 복합체를 지칭한다. NMRP3 염증조절복합체는 기능적 전염증성 사이토카인, 예를 들어 IL-1β 및 IL-18의 생성을 촉진한다. NLRP3 염증조절복합체의 핵심 성분은 Lee 등의 문헌[*Lipids Health Dis.* **16**:271 (2017)] 및 Groslambert 및 Py의 문헌[*J. Inflamm. Res.* **11**:359-374 (2018)]에 기술된 것과 같은 NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-연관된 반점-유사 단백질), 및 카스파제-1이다.

[0028] 용어 "매트릭스 금속단백분해효소" 및 "MMP"는, 예를 들어 Fanjul-Fernandez 등의 문헌[*Biochem. Biophys. Acta* **1803**:3-19 (2010)]에 기술된 내용을 특징으로 하는 아연-엔도펩티다아제의 매트릭스 금속단백질분해효소 계열의 구성원 중 어느 하나로서 정의된다. 당업계에서, 계열 구성원은 흔히 전형적인 MMP, 젤라틴분해효소, 매트릴리신, 및/또는 퓨린에 의해 활성화될 수 있는 MMP로서 지칭된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "매트릭스 금속단백분해효소" 및 "MMP"는 전체 MMP 계열을 포함하며, 여기에는 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, 및 MMP-28이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.

[0029] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "병용 투여 및 동시 투여(co-administration, co-administering, administered in combination with, administering in combination with, simultaneous, 및 concurrent)"는 둘 이상의 활성 약학적 성분을 (본 개시의 바람직한 구현예에서는, 예를 들어 적어도 하나의 항염증 화합물을 본원에 기술된 것과 같은 유전자 조작 핵산을 전달하도록 기능적으로 조작된 바이러스 벡터와 병용으로) 대상체에게 투여함으로써, 활성 약학적 성분 모두가 및/또는 이들의 대사산물이 동일한 시간에 대상체에게 존재하는 것을 포함한다. 공동 투여는 별도의 조성물로 동시 투여하는 것, 별도의 조성물로 상이한 시간에 투여하는 것, 또는 둘 이상의 활성 약학적 성분이 존재하는 조성물로 투여하는 것을 포함한다. 별도의 조성물로 동시 투여하는 것 및 2가지 제제 모두가 존재하는 조성물로 투여하는 것이 바람직하다.

[0030] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 질환 치료를 포함하되 이에 한정되지 않는 의도된 적용을 수행하기에 충분한, 본원에 기술된 것과 같은 조성물 또는 조성물의 조합의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 (시험관내 또는 생체내에서의) 의도된 적용, 또는 대상체 또는 치료 중인 병태(예를 들어 대상체의 체중, 연령, 및 성별), 병태의 중증도, 또는 투여 방식에 따라 달라질 수 있다. 이 용어는 표적 세포에서 특정 반응(예를 들어 혈소판 부착 및/또는 세포 이동의 감소)을 유도하게 될 투여량에도 적용된다. 특정 투여량은 선택된 특정 조성물, 따를 투여 요법, 조성물이 다른 조성물 또는 화합물과 병용 투여되는지 여부, 투여 시기, 조성물이 투여되는 조직, 및 조성물이 운반되는 물리적 전달 시스템에 따라 달라질 것이다.

[0031] 용어 "치료(treatment, treating, treat 등)"는 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 측면에서 예방적일 수 있고/있거나, 질환 및/또는 질환에 기인하는 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 측면에서 치료적일 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템은 주어진 병태(예: 관절염)에 걸리기 쉬운 대상체에게 예방적 치료로서 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료"는 포유동물, 특히 인간, 개, 고양이, 또는 말에서 질환의 모든 치료를 포괄하며, 다음을 포함한다: (a) 질환에 걸리기 쉽지만 아직 질환에 걸린 것으로 진단되지 않은 대상체에서 질환의 발생을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 단계, 즉 질환의 발생 또는 진행을 중단시키는 것; 및 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환을 퇴행시키는 것 및/또는 하나 이상의 질환 증상을 완화시키는 것. "치료"는 또한 질환 또는 병태가 없는 경우에도, 약리학적 효과를 제공하기 위해 제제를 전달하는 것을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, "치료"는, 예를 들어 백신의경우에, 질환 병태가 없는 가운데 면역 반응을 유도하거나 면역을 부여할 수 있는 조성물의 전달을 포함한다. 본 개시의 조성물 및 방법은 인간, 개, 고양이, 말, 및 소 대상체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 모든 포유동물을 치료하는 데 적용할 수 있는 것으로 이해된다.

[0032] 핵산 또는 단백질의 일부분을 참조하여 사용될 때, 용어 "이종"은 핵산 또는 단백질이 자연계에서 서로에 대해 동일한 관계일 때는 발견되지 않는 둘 이상의 하위 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 핵산은 일반적으로 재조합적으로 생산되며, 새로운 기능적 핵산을 만들도록 배열된 무관한 유전자 유래의 2개 이상의 서열, 예를 들어 하나의 공급원으로부터의 프로모터 및 또 다른 공급원으로부터의 코딩 영역, 또는 상이한 공급원으로부터의 코딩 영역을 갖는다. 유사하게, 이종 단백질은 단백질이, 자연계에서 서로에 대해 동일한 관계(예: 융합 단백질)일 때 발견되지 않은 둘 이상의 하위 서열을 포함하는 것을 나타낸다.

[0033] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", 및 "핵산"은 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)을 포함하는 핵산, 올리고뉴클레오티드의 모든 형태를 지칭하도록 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 게놈 DNA, cDNA 및 안티센스 DNA, 및 스플라이싱되었거나 스플라이싱되지 않은 mRNA, rRNA, tRNA, lncRNA, RNA 안타고미르(antagomir), 및 억제 DNA 또는 RNA(RNAi, 예를 들어 작거나 또는 짧은 헤어핀 (sh)RNA, 마이크로 RNA (miRNA), 앱타머, 작거나 짧은 간섭 (si)RNA, 트랜스스플라이싱 RNA, 또는 안티센스 RNA)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 또한 비-코딩 RNA를 포함하며, 이는 예를 들어 RNAi, miRNA, lncRNA, RNA 안타고머, 앱타머, 및 당업자에게 공지된 임의의 다른 비-코딩 RNA를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드는 자연 발생, 합성, 및 의도적으로 변경되거나 변형된 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 유사체 및 유도체도 포함한다. 용어 "폴리뉴클레오티드"는 또한 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체를 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭하며, 핵산 서열과 동의어이다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있고, 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형이 존재하는 경우, 이는 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 및 단일 가닥 분자를 상호교환적으로 지칭한다. 달리 명시되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본원에 기술된 것과 같은 임의의 구현예는 이중 가닥 형태; 및 이중 가닥 형태를 구성하는 것으로 알려졌거나 이중 가닥 형태를 구성

할 것으로 예측되는 2개의 상보적 단일 가닥 형태 각각을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일, 이중, 또는 삼중 체일 수 있고, 선형 또는 원형일 수 있고, 임의의 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 논의함에 있어서, 특정 폴리뉴클레오티드의 서열 또는 구조는 서열을 제공하는 규칙에 따라 본원에서는 5'에서 3' 방향으로 기술될 수 있다.

[0034] 용어 "유전자" 또는 "폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열"은 폴리펩티드 사슬을 생산하는 데 관여하는 DNA의 분절을 지칭한다. DNA 분절은 유전자 산물의 전사/번역에 관여하고 전사/번역의 조절에 관여하는 코딩 영역의 선행 또는 후속 영역(리더 및 트레일러)뿐만 아니라, 개별 코딩 분절(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)도 포함할 수 있다. 예를 들어, 유전자는 특정 단백질 또는 폴리펩티드가 전사되고 번역된 후, 이러한 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화할 수 있는 적어도 하나의 개방 해독 프레임을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0035] 뉴클레오티드 서열의 측면에서 용어 "상동성"은 알려진 기준 서열과 동일하거나 실질적으로 유사한 뉴클레오티드(핵산) 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 용어 "상동성 뉴클레오티드 서열"은 알려진 기준 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 갖는 서열을 특성화하는 데 사용된다.

[0036] "이종"은 비교되는 나머지 엔티티와 유전자형이 구별되는 엔티티로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 상이한 종으로부터 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 유전자 조작 기술에 의해 도입된 폴리뉴클레오티드는 이종 폴리뉴클레오티드이다. 프로모터는 이의 고유 코딩 서열로부터 제거되고, 이종 프로모터에 연결된 상태로 자연적으로 발견되지 않는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 비록 용어 "이종"이 폴리뉴클레오티드를 언급할 때 본원에서 항상 사용되지는 않지만, 수식어인 "이종" 없이 폴리뉴클레오티드를 지칭하는 것은, 이러한 수식어가 생략되었음에도 불구하고, 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로 의도된다.

[0037] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 맥락에서의 용어 "서열 동일성", "동일성 백분율", 및 "서열 동일성 백분율"(또는 이의 유사어, 예를 들어 "99% 동일한")은, 보존적 아미노산 치환을 서열 동일성의 일부분으로서 고려하지 않고 최대 일치도를 위해 비교하고 (필요에 따라 갭을 도입하여) 정렬했을 때, 2개 이상의 서열 또는 하위 서열이 동일하거나, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 명시된 백분율을 갖는 것을 지칭한다. 동일성 백분율은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하거나 육안 검사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 수득하는 데 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어가 당업계에 알려져 있다. 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 적절한 프로그램은, 예를 들어, 미국 정부의 국립 생명공학 정보 센터 BLAST 웹사이트에서 이용 가능한 BLAST 프로그램 세트를 포함한다. 2개의 서열 간의 비교는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하는 데 사용되는 반면, BLASTP는 아미노산 서열을 비교하는 데 사용된다. ALIGN, ALIGN-2(Genentech, South San Francisco, California) 또는 DNASTAR로부터 구입할 수 있는 MegAlign은 서열을 정렬하는 데 사용될 수 있고, 공개적으로 이용 가능한 추가적인 소프트웨어 프로그램이다. ClustalW 및 ClustalX가 정렬을 생성하는 데 사용될 수 있다(Larkin 등의 문헌[*Bioinformatics* 23:2947-2948 (2007)]; Goujon 등의 문헌[*Nucleic Acids Research*, 38 Suppl:W 695-9 (2010)]; 및 McWilliam 등의 문헌[*Nucleic Acids Research* 41(웹 서버판):W 597-600 (2013)]. 당업자는 특정 정렬 소프트웨어에 의해 최대 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 소정의 구현예에서, 정렬 소프트웨어의 디폴트 파라미터가 사용된다.

[0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변이체"는, 기준 항체의 아미노산 서열 내 또는 이와 인접한 특정 위치에서 하나 이상의 치환, 결실, 및/또는 첨가에 의해 기준 항체의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 융합 단백질을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 변이체는 기준 항체의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 서열에서 하나 이상의 보존적 치환을 포함할 수 있다. 보존적 치환은, 예를 들어 유사하게 하전되거나 하전되지 않은 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 변이체는 기준 항체의 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한다. 용어 변이체는 PEG화된 항체 또는 단백질도 포함한다.

[0039] "관절 질환"은 관절의 세포 또는 조직에서 측정 가능한 이상으로서 정의되는데, 이는 질환, 예를 들어 관절에서 해부학적 및/또는 생리학적 변화를 유발하는 대사 및 분자 교란으로 이어질 수 있다. 관절 공간 협착, 연골하 경화증, 연골하 낭종, 및 골극 형성의 방사선 검출을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0040] 인간 대상체에서의 "관절 질환"은 대상체가 의료적 개입을 구하도록 유도하는 증상, 예를 들어 대상체 보고형 통증, 경직, 부종, 또는 부동성으로서 정의된다. 비인간 포유동물의 경우, "관절 질환"은, 예를 들어 절뚝거림, 관찰 가능한 보행 변화, 체중 부하, 이질통, 또는 탐색적 거동으로서 정의된다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, sgRNA(단일 가이드 RNA)는 표적화 서열 및 스캐폴드로 구성된 RNA, 바람직하게는 합성 RNA이다. 이는 게놈 조작 실험에서 Cas9를 특정 게놈 유전자좌로 안내하는 데 사용된다. sgRNA는 예를 들어 합성 RNA로서 또는 gRNA를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산으로서 투여되거나 제형화될 수 있으며, 이는 투여된 후 표적 세포에서 발현된다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 다양한 도구를 사용해 sgRNA의 서열을 설계 및/또는 최적화하여, 예를 들어 게놈 편집의 특이성 및/또는 정밀도를 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 후보 sgRNA는 이용 가능한 웹 기반 도구 중 어느 하나에 기초하여, 표적 영역 내에서 높은 예측 온 타겟 효율 및 낮은 오프 타겟 효율을 갖는 서열을 식별함으로써 설계될 수 있다. 후보 sgRNA는 수동 검사 및/또는 실험 스크리닝에 의해 추가로 평가될 수 있다. 웹 기반 도구의 예는 CRISPR 탐색, CRISPR 설계 도구, Cas-OFFinder, E-CRISP, ChopChop, CasOT, CRISPR direct, CRISPOR, BREAKING-CAS, CrispRGold, 및 CCTop을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어 Safari 등의 문헌[*Current Pharma. Biotechol.* (2017) 18(13)]을 참조하고, 동 문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 이러한 도구는, 예를 들어 PCT 공개 제WO2014093701A1호 및 Liu 등의 문헌["Computational approached for effective CRISPR guide RNA design and evaluation", Comput Struct Biotechnol J., 2020; 18: 35-44]에도 기술되어 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, "Cas9"는 CRISPR 연관 단백질을 지칭하며; Cas9 뉴클레아제는 II형 CRISPR 시스템에 대한 활성 효소이다. "nCas9"는 불활성화된 2개의 뉴클레아제 도메인 중 하나, 즉 RuvC 또는 HNH 도메인 중 하나를 갖는 Cas9를 지칭한다. nCas9는 표적 DNA의 하나의 가닥만을 절단할 수 있다("니카아제(nickase)"). 용어 "Cas9"는 RNA-가이드된 이중 가닥 DNA-결합 뉴클레아제 단백질 또는 니카아제 단백질, 또는 이들의 변이체를 지칭한다. 본원에서, "Cas9"는 자연 발생 Cas9와 재조합 Cas9 둘 다를 지칭한다. 야생형 Cas9 뉴클레아제는 상이한 DNA 가닥을 절단하는 2개의 기능성 도메인, 예를 들어 RuvC 및 HNH를 갖는다. 본원에 기술된 Cas9 효소는 HNH 또는 HNH-유사 뉴클레아제 도메인 및/또는 RuvC 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 포함할 수 있다. Cas9는 두 개의 기능적 도메인이 모두 활성일 때 게놈 DNA(표적 유전자좌)에서 이중 가닥 절단을 유도할 수 있다. Cas9 효소는 다음으로 이루어진 군에 속하는 박테리아로부터 유래된 Cas9 단백질의 하나 이상의 촉매 도메인을 포함할 수 있다: 코리네박터(*Corynebacter*), 수테렐라(*Sutterella*), 레지오넬라(*Legionella*), 트레포네마(*Treponema*), 필리팍터(*Filifactor*), 유박테리움(*Eubacterium*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 미코플라스마(*Mycoplasma*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 플라비이볼라(*Flaviivola*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 스파에로카에타(*Sphaerochaeta*), 아조스피릴룸(*Azospirillum*), 글루코나세토박터(*Gluconacetobacter*), 나이세리아(*Neisseria*), 로세부리아(*Roseburia*), 파르비바큘룸(*Parvibaculum*), 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 니트라티프락터(*Nitratifractor*), 및 캄필로박터(*Campylobacter*). 일부 구현예에서, 2개의 촉매 도메인은 상이한 박테리아 종으로부터 유래된다.

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, "PAM"은 프로토스페이서 인접 모티프를 지칭하는데, 이는 Cas9가 표적 DNA에 결합하는데 필수적이며, 표적 서열을 바로 뒤에 이어진다. Cas9는 예를 들어 단백질(예: 재조합 단백질)로서 또는 Cas9 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산으로서 투여되거나 제형화될 수 있으며, 이는 투여된 후 표적 세포에서 발현된다. 자연 발생 Cas9 분자는 특이적 PAM 서열(예: 화농성연쇄상구균, 스트렙토코커스 써모필루스, 스트렙토코커스 뮤탄스, 황색포도상구균, 및 수막염균에 대한 PAM 인식 서열)을 인식한다. 일 구현예에서, Cas9 분자는 자연 발생 Cas9 분자와 동일한 PAM 특이성을 갖는다. 다른 구현예에서, Cas9 분자는 자연 발생 Cas9 분자와 연관이 없는 PAM 특이성을 갖는다. 다른 구현예에서, Cas9 분자의 PAM 특이성은 가장 가까운 서열 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자와 연관이 없다. 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자는, PAM 서열 인식이 변경되어 오프 타겟 부위를 감소시키거나, 특이성을 개선하거나, PAM 인식 요건을 제거하도록 변경될 수 있다. 일 구현예에서, Cas9 분자는 (예를 들어 PAM 인식 서열을 연장시키고, Cas9 특이성을 높은 동일성 수준으로 개선하고, 오프 타겟 부위를 감소시키고/시키거나, 특이성을 증가시키도록) 변경될 수 있다. 일 구현예에서, PAM 인식 서열의 길이는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 PAM 인식을 제거하도록 변경될 수 있다.

[0044] "발현 카세트"는 숙주 세포에서 특정 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 허용하는 일련의 명시된 핵산 요소로 재조합적으로 또는 합성적으로 생성된 핵산 작제물이다. 발현 카세트 또는 벡터는 플라스미드, 바이러스 게놈, 또는 핵산 단편의 일부분일 수 있다. 일반적으로, 발현 카세트 또는 벡터는 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 전사 대상 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0045] 용어 "프로모터"는 핵산의 전사를 유도하는 핵산 조절 서열의 어레이를 지칭하도록 본원에서 사용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 프로모터는 전사 개시 부위 근처에 필요한 핵산 서열, 예컨대 (중합효소 II형 프로모터

의 경우) TATA 요소를 포함한다. 프로모터는 또한 원위 인핸서 또는 억제자 요소를 임의로 포함하는데, 이는 전사 개시 부위로부터 많게는 수천 염기쌍 떨어져 위치할 수 있다. 발현 벡터에 존재할 수 있는 다른 요소는 전사를 강화하고(예: 인핸서) 전사를 종결시키는 것들(예: 종결자) 뿐만 아니라 발현 벡터로부터 생산된 재조합 단백질에 소정의 결합 친화도 또는 항원성을 부여하는 것들도 포함한다.

[0046] 용어 "작동가능하게 연결된"은 유전적 요소들의 병치를 지칭하며, 여기서 요소들은 이들이 예상된 방식으로 작동할 수 있게 하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 개시에 도움을 주는 경우, 프로모터는 코딩 영역에 작동가능하게 연결된다. 이러한 기능적 관계가 유지되는 한 프로모터와 코딩 영역 사이에 중재 잔기가 있을 수 있다.

[0047] "단리된" 플라스미드, 핵산, 벡터, 바이러스, 비리온, 숙주 세포, 또는 다른 물질은, 물질 또는 유사한 물질이 자연적으로 발생하는 곳 또는 물질 또는 유사한 물질이 처음 제조되는 곳에 존재하는 다른 성분의 적어도 일부가 없는 물질의 제제를 지칭한다. 따라서, 예를 들어 단리된 물질은 정제 기술을 사용해 소스 혼합물로부터 이 물질을 농축시켜 제조될 수 있다. 농축은 "중량/용액의 부피"와 같은 절대 기준으로 측정되거나, 소스 혼합물에 존재하는 제2 잠재적 간섭 물질과 관련하여 측정될 수 있다. 본 개시의 구현예의 농축이 증가할수록 점점 더 많이 단리된다. 일부 구현예에서, 단리된 플라스미드, 핵산, 벡터, 바이러스, 숙주 세포, 또는 다른 물질은, 예를 들어 약 80% 내지 약 90% 순수하게, 적어도 약 90% 순수하게, 적어도 약 95% 순수하게, 적어도 약 98% 순수하게, 또는 적어도 약 99% 또는 그 이상 순수하게 정제된다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, "AAV 벡터"는, 일부 구현예에서 변이체 또는 키메라 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 다양한 핵산 서열에 대해 암호화하는 AAV 벡터 핵산 서열을 지칭한다(즉, AAV 벡터는 변이체 또는 키메라 캡시드 폴리펩티드에 대해 암호화하는 핵산 서열을 포함함). AAV 벡터는 AAV 기원의 핵산 서열이 아닌 이종 핵산 서열을 핵산 삽입체의 일부로서 포함할 수도 있다. 이러한 이종 핵산 서열은 세포의 유전적 형질전환을 위한 관심 서열을 일반적으로 포함한다. 일반적으로, 이종 핵산 서열은 적어도 하나의, 일반적으로는 2개의 AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)이 측면에 위치한다. 소정의 구현예에서, Cas 서열, 가이드 RNA 서열, 및 임의의 다른 유전적 요소(예: 프로모터 서열, PAM 서열 등)는 대상체에게 투여될 때 동일한 AAV 벡터 상에 있거나 둘 이상의 상이한 AAV 벡터 상에 있을 수 있다. 소정의 구현예에서, Cas 서열, 가이드 RNA 서열, 및 임의의 다른 유전적 요소(예: 프로모터 서열, PAM 서열 등)는 대상체에게 투여될 때 둘 이상의 상이한 AAV 벡터 상에 있을 수 있고, AAV는 동일한 혈청형이거나, AAV는 둘 이상의 상이한 혈청형(예: AAV5 및 AAV6)일 수 있다.

[0049] "AAV 비리온" 또는 "AAV 바이러스" 또는 "AAV 바이러스 입자" 또는 "AAV 벡터 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 폴리펩티드 및 캡슐화된 폴리뉴클레오티드 AAV 전달 벡터로 이루어진 바이러스 입자를 지칭한다. 입자가 이종 핵산(즉 야생형 AAV 게놈 이외의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 세포에 전달될 이식 유전자)을 포함하는 경우, 이는 "AAV 벡터 입자" 또는 단순히 "AAV 벡터"로서 지칭될 수 있다. 따라서, AAV 비리온 또는 AAV 입자의 생산은 본질적으로 AAV 벡터의 생산을 포함하는데, 이는 이러한 벡터가 AAV 비리온 또는 AAV 입자 내에 포함되기 때문이다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같은 "담체" 또는 "비히클"은 약물 투여에 적합한 담체 물질을 지칭한다. 본원에서 유용한 담체 및 비히클은 당업계에 알려진 임의의 이러한 물질, 예를 들어 비독성이고 유해한 방식으로 조성물의 다른 성분과 상호작용하지 않는 임의의 액체, 겔, 용매, 액체 희석제, 가용화제, 계면활성제 등을 포함한다.

[0051] "약학적으로 허용 가능한"이라는 문구는, 건전한 의학적 판단의 범주 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0052] 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체" 또는 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 임의의 그리고 모든 용매, 분산매, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 및 불활성 성분을 포함하도록 의도된다. 활성 약학적 성분에 대한 이러한 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 약학적으로 허용 가능한 부형제의 용도는 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 종래의 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 약학적으로 허용 가능한 부형제가 활성 약학적 성분과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 본 개시의 치료 조성물에서의 이의 용도가 고려된다. 다른 약물과 같은 추가적인 활성 약학적 성분이 기술된 조성물 및 방법에 혼입될 수도 있다.

[0053] 용어 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 화합물과 공동 투여되어 화합물의 의도된 기능의 수행을 용이하게 할 수 있는 비히클 및 담체를 포함하도록 의도된다. 약학적 활성 물질에 대한 이러한 매질의 용도는 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 비히클 및 담체의 예는 용액, 용매, 분산매, 지연제, 유화제 등을 포함한다. 다중 결합 화

합물과 함께 사용하기에 적합한 임의의 다른 종래의 담체도 본 개시의 범주 내에 포함된다.

[0054] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단수 표현("a", "an" 또는 "the")은 일반적으로 단수 형태와 복수 형태 둘 다를 포함하는 것으로 간주된다.

[0055] 용어 "약" 및 "대략"은 통계적으로 의미 있는 값의 범위 내에 있음을 의미한다. 이러한 범위는 주어진 값 또는 범위의 자릿수 이내, 바람직하게는 50% 이내, 더 바람직하게는 20% 이내, 더 바람직하게는 10% 이내, 보다 더 바람직하게는 5% 이내일 수 있다. 용어 "약" 또는 "대략"에 의해 포괄되는 허용 가능한 변동은 임상시험 중인 특정 시스템에 따라 달라지며, 당업자에 의해 쉽게 이해될 수 있다. 또한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약" 및 "대략"은 조성물, 양, 제형, 파라미터, 형상, 및 기타 수량과 특징이 정확하지 않고 정확할 필요는 없지만, 원하는 경우, 공차, 변환 인자, 반올림, 측정 오차 등, 및 당업자에게 알려진 다른 인자들을 반영하는 근사치 및/또는 더 크거나 작은 값일 수 있음을 의미한다. 일반적으로, 치수, 크기, 제형, 파라미터, 형상, 또는 기타 수량 또는 특성은 명시적으로 그렇게 언급되었는지 여부와 상관없이 "약" 또는 "대략"이다. 매우 상이한 크기, 형상, 및 치수의 구현예는 기술된 배열을 사용할 수 있음을 참고한다.

[0056] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%, 99.99%, 또는 적어도 약 99.999% 또는 그 이상에서와 같이, 대부분(majority of) 또는 대개(mostly)를 지칭할 수 있다.

[0057] 첨부된 청구범위에서 원래 형태 또는 개정된 형태로 사용될 때의 전환 용어 "포함하는(comprising)", "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)", 및 "구성되는(consisting of)"은, 언급되지 않은 어떤 추가의 청구 요소 또는 단계가 (있는 경우) 청구항(들)의 범주에서 제외되는지에 관해 청구범위를 정의한다. 용어 "포함하는"은 포괄형 또는 개방 단부형인 것으로 의도되며, 임의의 추가의 언급되지 않은 요소, 방법, 단계, 또는 물질을 제외시키지는 않는다. 용어 "구성되는"은 청구범위에 명시된 것 이외의 임의의 요소, 단계, 또는 물질을 제외하며, 물질의 경우, 명시된 물질(들)과 연관된 일반적인 불순물을 제외한다. 용어 "본질적으로 구성되는"은 청구범위를 특정 요소, 단계, 또는 재료(들); 및 청구된 방법 및 조성물의 기본적이고 신규한 특성(들)에 중대하게 영향을 미치지 않는 것들로 한정한다. 본 개시를 구현하는 본원에 기술된 모든 조성물, 방법, 및 키트는, 대안적인 구현예에서, 전환 용어인 "포함하는", "본질적으로 구성되는", 및 "구성되는" 중 어느 하나에 의해 더 구체적으로 정의될 수 있다.

[0058] 본원에 기술된 방법 또는 조성물 중 어느 하나에 의해 치료되는 대상체는 임의의 연령일 수 있고 성인, 영아, 또는 소아일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 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, 또는 99세이거나 그 안의 범위(예를 들어 2 내지 20세, 20 내지 40세, 또는 40 내지 90세, 이에 한정되지 않음) 내에 있을 수 있다. 대상체는 인간 또는 비인간 대상체일 수 있다. 본 개시의 조성물 및 방법으로부터 이익을 얻을 수 있는 특정 부류의 대상체는 40세, 50세, 또는 60세가 넘은 대상체를 포함한다. 본 개시의 조성물 및 방법으로부터 이익을 얻을 수 있는 또 다른 부류의 대상체는 관절염(예: 골관절염)을 가진 대상체이다.

[0059] 본원에 개시된 조성물 중 어느 하나는 실험실 또는 농장 동물과 같은 비인간 대상체에게 투여될 수 있다. 비인간 대상체의 비제한적인 예는 실험실 또는 임상시험 동물, 애완동물, 야생 동물 또는 가축, 농장 동물 등, 예를 들어 개, 염소, 기니피그, 햄스터, 마우스, 돼지, 비인간 영장류(예: 고릴라, 유인원, 오랑우탄, 여우원숭이, 개코원숭이 등), 랫트, 양, 말, 소 등을 포함한다.

[0060] 본 개시는 염증성 성분으로 인한 관절 장애를 치료하는 데 유용한 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 조성물은 포유류 관절을 대상으로 골관절염의 진행을 예방하고 골관절염를 치료하는 데 유용하다.

[0061] 일부 양태에서, 약학적 조성물은 관절을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 침묵화시키거나 감소시키는 유전자 편집 시스템을 포함한다.

[0062] 일 양태에서, 약학적 조성물은 IL-1α, 및 IL-1β 중 하나 이상을 표적화하는 유전자 편집 시스템을 포함한다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), 또는 NLRP3 염증조절복합체 성분 중 하나 이상을 표적화하는 유전자 편집 시스템을 포함한다.

[0063] 일부 양태에서, 약학적 조성물은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절

단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함하는 유전자 편집 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 표적화된 유전자좌(들)좌의 유전자 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 관절을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 관절 조직과 관련된 적어도 하나의 유전자좌가 침묵화되거나 감소된다.

[0064] 일부 양태에서, 관절을 포함하는 세포는 윤활막세포이다. 일부 양태에서, 세포는 활막 대식세포이다. 일부 양태에서, 세포는 활막 섬유아세포이다. 일부 양태에서, 윤활막세포의 적어도 일부분이 편집된다. 일부 양태에서, 관절을 포함하는 세포는 연골세포이다.

[0065] 일 양태에서, 약학적 조성물은 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백질분해효소(MMP), 또는 NLRP3 염증조절복합체 성분을 포함하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자를 표적으로 한다. 일부 구현예에서, NLRP3 염증조절복합체 성분은 NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-연관 반점-유사 단백질), 카스파제-1, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0066] 유전자 편집이, 무릎을 포함하는 세포의 적어도 일부분에서 IL-1Ra, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, 및 이들의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자(들)의 발현을 강화시키는, 약학적 조성물이 제공된다.

[0067] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 유전자 편집을 가능하게 하며, 여기서 유전자 편집은 상기 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자 유전자에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집은 CRISPR 방법, TALE 방법, 징크 핑거 방법, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 포함한다.

[0068] 일 양태에서, 유전자 편집은 CRISPR 방법을 포함한다. 또 다른 양태에서, CRISPR 방법은 CRISPR-Cas9 방법이다. 일부 양태에서, Cas9는 기능을 강화시키도록 돌연변이된다.

[0069] **골관절염의 동물 모델**

[0070] 여러 골관절염용 동물 모델이 당업계에 알려져 있다. 예시적인 비제한적인 동물 모델이 요약되어 있지만, 다양한 모델이 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 많은 상이한 동물 종이 OA를 모방하는 데 사용되며, 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼, 기니피그, 개, 돼지, 말, 및 심지어 다른 동물들을 이용한 임상시험이 수행된 적이 있다. 예를 들어 Kuyinu 등의 문헌[*J Orthop Surg Res.* 11:19 (2016)(이하 "Kuyinu, 2016")] 참조.

[0071] OA를 유도하기 위한 다양한 방법이 임의의 포유동물에서 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 마우스의 경우, 자발적 유도, 화학적 유도, 수술적 유도, 및 비침습적 유도가 흔히 사용된다. 예를 들어 Kuyinu, 2016; Bapat 등의 문헌[*Clin Transl Med.* 7:36 (2018)(이하 "Bapat, 2018")]; 및 Poulet의 문헌[*Curr Rheumatol Rep* 18:40 (2016)] 참조. 말의 경우, 골연골 단편-운동 모델, 화학적 유도, 외상성 유도, 및 과다사용을 통한 유도가 흔히 사용된다. 양의 경우, 수술적 유도가 가장 흔하며; 기니피그의 경우, 수술적 유도, 화학적 유도, 및 자발적(Durkin Hartley) 방법이 빈번하게 사용된다. 예를 들어 Bapat, 2018 참조.

[0072] 마우스의 경우, 탈안정화된 안쪽 반월상 연골(DMM)이 외상후 골관절염을 모델링하는 데 자주 사용된다(예를 들어 Culley 등의 문헌[*Methods Mol Biol.*1226:143-73 (2015)]). DMM 모델은 인간 OA의 발생에 대해 알려진 소인 요인인 임상적 반월상 연골 손상을 모방하며, 질환의 경과에 따른 구조적 및 생물학적 변화에 대한 임상시험을 가능하게 한다. 마우스는 매력적인 모델 유기체인데, 이는 정의된 유전적 배경을 갖는 마우스 계통을 사용할 수 있기 때문이다. 또한, 녹아웃 또는 다른 유전적으로 조작된 마우스 계통을 사용하여 다양한 OA 치료 기법 및 요법에 대한 반응에 있어서 다양한 분자 경로의 중요성을 평가할 수 있다. 예를 들어, STR/ort 마우스는 이 계통을, 염증성 사이토카인 IL1β 수준의 증가를 포함하여, OA 발병에 취약하게 만드는 특징을 가지고 있다(Bapat 등의 문헌[*Clin Transl Med.* 7:36 (2018)]. 이들 마우스의 경우, 일반적으로 무릎, 발목, 팔꿈치, 및 측두하악관절에서 OA가 발생한다(Jaeger 등의 문헌[*Osteoarthritis Cartilage* 16:607-614 (2008)]). 마우스의 다른 유용한 돌연변이체 계통, 예를 들어 Col9a1(-/-) 마우스는 당업자에게 알려져 있다(Allen 등의 문헌[*Arthritis Rheum*, 60:2684-2693 (2009)]).

[0073] 흔히 사용되는 OA의 또 다른 수술 모델은 전방 십자인대 가로 절단(ACLT) 모델이다. Little 및 Hunter의 문헌[*Nat Rev Rheumatol.*, 9(8):485-497 (2013)]. 대상체의 ACL를 외과적으로 횡절단하여 관절을 불안정화시킨다. 관절을 굽힌 상태에서 앞당김 검사(anterior drawer test)을 사용하여 인대의 횡절단이 발생했는지 확인한다. 일부 경우에, 후방 십자인대, 내측 측부 인대, 외측 측부 인대, 및/또는 반월상 연골과 같은 다른 인대를 횡절단할 수 있다. DMM 모델과 마찬가지로, 다양한 마우스 계통을 사용하여 다양한 분자 경로를 조사할 수 있다.

[0074] 기술적 목적에 따라, 다양한 크기의 동물을 선택해 사용할 수 있다. 설치류가 유용한데, 이는 골격 성숙에 필요한 시간이 짧고, 결과적으로 OA를 유도하기 위한 수술 또는 다른 기술을 구현한 후에 OA가 발병하는 짧아지기 때문이다. 더 큰 동물은 치료 개입을 평가하는 데 특히 유용하다. 큰 동물의 해부구조는 인간과 매우 유사하다; 예를 들어, 개의 연골 두께는 인간 두께의 약 절반에 못미친다; 이러한 현저한 유사성은 이러한 연골 퇴행 및 골연골 손상 임상시험이 큰 동물 모델에서 훨씬 더 유용한 이유를 예시한다. 예를 들어 McCoy의 문헌[*Vet. Pathol.*, **52**:803-18 (2015)]; 및 Pelletier 등의 문헌[*Therapy*, **7**:621-34(2010)].

[0075] 유전자 편집 프로세스

[0076] 개요: 활막 세포를 유전자 편집하기 위한 조성물

[0077] 본 개시의 구현예는, 활막 세포(윤활막 세포)를 유전자 편집하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 관절에서 윤활막 세포의 적어도 일부를 유전자 편집하여 골관절염 또는 다른 관절 장애를 치료하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "유전자 편집(gene-editing, gene editing, 및 genome editing)"은 세포의 게놈에서 DNA가 영구적으로 변형되는, 예를 들어 세포의 게놈 내에서 DNA가 삽입, 결실, 변형, 또는 치환되는 일종의 유전적 변형의 지칭한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집은 DNA 서열의 발현을 침묵화시키거나(때때로 유전자 녹아웃으로서 지칭됨) 억제/감소시킨다(때때로 유전자 녹다운으로서 지칭됨). 다른 구현예에서, 유전자 편집은 (예를 들어 과발현을 야기함으로써) DNA 서열의 발현을 강화시킨다. 본 개시의 구현예에 따르면, 유전자 편집 기술은 전염증성 유전자의 발현을 감소시키거나 전염증성 유전자를 침묵시키고/시키거나 재생 유전자의 발현을 강화시키는 데 사용된다.

[0078] 인터류킨

[0079] 추가의 구현예에 따르면, 본 개시의 유전자 편집 방법을 사용하여 소정의 인터류킨, 예컨대 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-18, 및 TNF-α 중 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있다. 특정 인터류킨은 관절 조직에서 염증 반응을 증가시키는 것으로 입증되었으며, 질환 진행과 관련이 있다.

[0080] 발현 작제물

[0081] 가이드 RNA 및/또는 Cas9 편집 효소 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 발현 작제물은 임의의 효과적인 담체로, 예를 들어 생체 내에서 성분 유전자를 세포에 효과적으로 전달할 수 있는 임의의 제형 또는 조성물로 투여될 수 있다. 접근법은, 예를 들어 유전자의 전기천공; 및/또는 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1, 또는 재조합 박테리아 또는 진핵생물 플라스미드를 포함하는, 바이러스 벡터에 유전자를 삽입하는 것을 포함한다. 바이러스 벡터는 세포를 직접 형질감염시키며; 플라스미드 DNA는 네이키드로 전달되거나, 유도체화되어(예를 들어 항체 접합되어) 전달되거나, 예를 들어 양이온 리포좀(리포펙타민), 폴리리신 접합체, 그램아시딘 S, 인공 바이러스 외피, 또는 다른 이러한 세포내 담체의 도움을 받아 전달될 수 있을 뿐 아니라 유전자 작제물로서 직접 주입되거나, 생체 내에서 CaPO4 침전이 수행될 수도 있다.

[0082] 생체 내에서 핵산을 세포 내로 도입하기 위한 바람직한 접근법은 핵산을 함유하는 바이러스 벡터, 예를 들어 cDNA를 사용하는 것이다. 바이러스 벡터로 세포를 감염시키는 것은 표적화된 세포의 많은 부분이 핵산을 수용할 수 있다는 이점을 갖는다. 또한, 바이러스 벡터에 함유된 cDNA에 의해 바이러스 벡터 내에서 암호화된 분자는 바이러스 벡터 핵산을 흡수한 세포에서 효율적으로 발현된다.

[0083] 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터는 생체 내에서 외인성 유전자를 특히 인간 내로 전달하기 위한 재조합 유전자 전달 시스템으로서 사용될 수 있다. 이들 벡터는 유전자를 세포 내로 효율적으로 전달한다. 일부 경우에, 전달된 핵산은 숙주의 염색체 DNA에 안정적으로 혼입된다. 다른 경우에, 특히 아데노-연관 바이러스 벡터의 경우, 숙주 DNA 내로의 안정한 혼입은 이식유전자의 에피솜을 발현시키고 이식유전자를 일시적으로 발현시키는 흔하지 않은 이벤트이다.

[0084] 복제-결함 레트로바이러스만을 생산하는 특화된 세포주("패키징 세포"로 지칭됨)의 개발은 유전자 요법을 위한 레트로바이러스의 유용성을 증가시켰고, 결함 레트로바이러스는 유전자 요법을 목적으로 하는 유전자 전달에 사용되는 것을 특징으로 한다(검토를 위해, Miller의 문헌[Blood 76:271 (1990)] 참조). 복제 결함 레트로바이러스는 비리온으로 패키징될 수 있으며, 비리온은 표준 기술에 의한 헬퍼 바이러스의 사용을 통해 표적 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있다. 재조합 레트로바이러스를 생산하고 시험관 내 또는 생체 내에서 이러한 바이러스로 세포를 감염시키기 위한 프로토콜은 Ausubel(eds.) 등의 문헌[Current Protocols in Molecular Biology,

Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14] 및 기타 표준 실험실 매뉴얼에서 확인할 수 있다. 적절한 레트로바이러스의 예는 당업자에게 알려져 있는 pLJ, pZIP, pWE, 및 pEM을 포함한다. 동종지향성(ecotropic) 및 양친화성(amphotropic) 레트로바이러스 시스템 둘 다를 제조하기에 적합한 패키징 바이러스 주의 예는, ΨCrip, ΨCre, Ψ2, 및 ΨAm을 포함한다. 레트로바이러스는 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 상피 세포를 비롯한 다수의 상이한 세포 유형 내로 다양한 유전자를 도입하는 데 사용되어 왔다(예를 들어 Eglitis 등의 문헌[(1985) Science 230:1395-1398]; Danos 및 Mulligan의 문헌[(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464]; Wilson 등의 문헌[(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018]; Armentano 등의 문헌[(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145]; Huber 등의 문헌[(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043]; Ferry 등의 문헌[(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381]; Chowdhury 등의 문헌[(1991) Science 254:1802-1805]; van Beusechem 등의 문헌[(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644]; Kay 등의 문헌[(1992) Human Gene Therapy 3:641-647]; Dai 등의 문헌[(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895]; Hwu 등의 문헌[(1993) J. Immunol. 150:4104-4115]; 미국 특허 제4,868,116호; 미국 특허 제4,980,286호; PCT 출원 WO 89/07136; PCT 출원 WO 89/02468; PCT 출원 WO 89/05345; 및 PCT 출원 WO 92/07573을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0085] 본 방법에서 유용한 또 다른 바이러스 유전자 전달 시스템은 아데노바이러스-유래 벡터를 사용한다. 아데노바이러스의 게놈은, 관심 유전자 산물을 암호화하고 발현하지만 정상적인 용해성 바이러스 수명 주기에서 이의 복제 능력의 측면에서 불활성화되도록 조작될 수 있다. 예를 들어 Berkner 등의 문헌[BioTechniques 6:616 (1988)]; Rosenfeld 등의 문헌[Science 252:431-434 (1991)]; 및 Rosenfeld 등의 문헌[Cell 68:143-155 (1992)] 참조. 적절한 아데노바이러스 벡터는, 당업자에게 공지된 다른 종(예를 들어 마우스, 개, 인간 등) 유래의 아데노바이러스 혈청형을 포함하여, 임의 계통의 아데노바이러스(예를 들어 Ad2, Ad3, Ad5, 또는 Ad7 등)로부터 유래될 수 있다. 바이러스 입자는 비교적 안정적이고 정제하여 농축하기 쉬우며, 위에서와 같이 광범위한 감염성을 발휘하도록 변형될 수 있다. 또한, 도입된 아데노바이러스 DNA(및 그 안에 함유된 외래 DNA)는 숙주 세포의 게놈 내로 통합되지 않지만, 에피솜으로 남아서, 도입된 DNA가 숙주 게놈(예를 들어 레트로바이러스 DNA)에 통합되는 제자리 삽입 돌연변이유발에 의해 발생할 수 있는 잠재적 문제를 피하게 된다. 또한, 외래 DNA에 대한 아데노바이러스 게놈의 보유 용량은 다른 유전자 전달 벡터에 비해 크다(최대 8 킬로 염기)(Berkner 등의 전술한 문헌; Haj-Ahmand 및 Graham의 문헌[J. Virol. 57:267 (1986)].

[0086] 좌측 패키징 신호의 하류에 있는 게놈의 5-프라임 단부에서, 패키징 신호와 함께 바이러스 DNA의 각 단부에 있는 DNA 복제 기원을 제외한 모든 아데노바이러스 서열이 삭제된, 헬퍼 의존성(HDAd) 벡터를 생산할 수도 있다. HDAd 벡터는 복제에 필요한 초기 및 후기 단백질을 제공하는 복제-적격 헬퍼 아데노바이러스가 존재하는 가운데 작제되고 전파된다.

[0087] 핵산 전달에 유용한 또 다른 바이러스 벡터 시스템은 아데노-연관 바이러스(AAV)이다. 아데노-연관 바이러스는 자연 발생 결함 바이러스이며, 효율적인 복제 및 생산 수명 주기를 위한 헬퍼 바이러스로서, 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스와 같은 또 다른 바이러스를 필요로 한다. (검토는 Muzyczka 등의 문헌[Curr. Topics in Micro. and Immunol. 158:97-129 (1992)] 참조). 이는 DNA를 비분열 세포에 통합시킬 수 있는 몇 안 되는 바이러스 중 하나이며, 높은 빈도의 안정적인 통합을 나타낸다(예를 들어 Flotte 등의 문헌[Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356 (1992)]; Samulski 등의 문헌[J. Virol. 63:3822-3828 (1989)]; 및 McLaughlin 등의 문헌[J. Virol. 62:1963-1973 (1989) 참조]. 300개 정도로 적은 AAV 염기쌍을 함유하는 벡터가 패키징되어 혼입될 수 있다. 외인성 DNA를 위한 공간은 약 4.5 kb로 제한된다. Tratschin 등의 문헌[Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)]에 기술된 것과 같은 AAV 벡터가 DNA를 세포 내로 도입하는 데 사용될 수 있다. AAV 벡터를 사용하여 다양한 핵산을 상이한 세포 유형 내로 도입하였다(예를 들어, Hermonat 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 (1984)]; Tratschin 등의 문헌[Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1985)]; Wondisford 등의 문헌[Mol. Endocrinol. 2:32-39 (1988)]; Tratschin 등의 문헌[J. Virol. 51:611-619 (1984)]; 및 Flotte 등의 문헌[J. Biol. Chem. 268:3781-3790 (1993)] 참조). 생체 내에서 매우 안정적이고 효과적이며, 쉽게 생산되고, FDA에 의해 승인되고, 다수의 임상시험에서 시험된 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터에 패키징될 수 있는 황색포도상구균(SaCas9) 및 다른 작은 Cas9 효소의 동정은 치료적 유전자 편집을 위한 새로운 길을 개척한다.

[0088] 일부 구현예에서, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체(예: Cas9 또는 gRNA)를 암호화하는 핵산은, 표적 세포의 세포 표면 항원에 대한 항체로 태그될 수 있고 표면에 양전하를 갖는 리포좀(예: 리포펙틴)에 포획된다. 이들 전달 비히클은 Cas9 단백질/gRNA 복합체를 전달하는 데에도 사용될 수 있다.

[0089] 임상 환경에서, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체를 암호화하는 핵산에 대한 유전자 전달 시스템

은 다수의 방법(방법 각각이 당업계에서 익숙함) 중 어느 하나에 의해 대상체에게 도입될 수 있다. 예를 들어, 유전자 전달 시스템의 약학적 제제는, 예를 들어 정맥내 주사에 의해 전신 도입될 수 있으며, 표적 세포에서 단백질의 특이적 형질도입은 주로 유전자 전달 비히클, 수용자 유전자의 발현을 조절하는 전사 조절 서열로 인한 세포형 발현 또는 조직형 발현, 또는 이들의 조합에 의해 제공되는 형질감염의 특이성으로부터 발생하게 된다. 다른 구현예에서, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체를 암호화하는 핵산의 초기 전달은 대상체로의 도입을 상당히 국소함으로써 더 제한된다. 예를 들어, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체를 암호화하는 핵산은 관절 질환(예: 골관절염)을 나타내는 관절 내로의 관절내 주사에 의해 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체를 암호화하는 핵산은 수술 동안 또는 수술 후에 투여되고; 일부 구현예에서, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체를 암호화하는 핵산을 포함하는 조절 방출형 하이드로겔은 CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 유전자 유전자를 암호화하는 핵산의 투여량을 시간 경과에 따라 일정하게 제공함으로써 골관절염을 감소시키거나 제거하도록 수술 후 봉합 전에 투여된다.

[0090] CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 유전자 편집 복합체를 암호화하는 핵산의 약학적 제제는 허용 가능한 희석제 중의 유전자 전달 시스템(예: 바이러스 벡터(들))으로 본질적으로 구성될 수 있거나, 유전자 전달 비히클이 포매된 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달 시스템이 재조합 세포로부터 온전하게 생산될 수 있는 경우(예: 아데노-연관 바이러스 벡터), 약학적 제제는 유전자 전달 시스템을 생산하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

[0091] 바람직하게는, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 편집 복합체는 특이적이고, 표적 부위(IL-1α 또는 IL-1β)에서 우선적으로 게놈 변경을 유도하고 다른 부위에서는 변경을 유도하지 않거나, 다른 부위에서는 변경을 드물게만 유도한다. 소정의 구현예에서, CRISPR IL-1α 또는 IL-1β 편집 복합체는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%의 편집 효율을 갖는다.

[0092] HR을 위한 CRISPR/Cas 시스템에 사용하기 위한 sgRNA는 일반적으로 표적 핵산 서열(표적 유전자좌)에 상보적인 가이드 서열(예: crRNA) 및 Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드) 또는 이의 변이체 또는 단편과 상호작용하는 스캐폴드 서열(예: tracrRNA)을 포함한다. 단일 가이드 RNA(sgRNA)는 crRNA 및 tracrRNA를 포함할 수 있다.

[0093] CRISPR-Cas 편집 복합체에 의해 IL-1α 또는 IL-1β 유전자에서 게놈 변경을 유도하기 위한 예시적인 표적 서열은 표 2 및 12에 제공되어 있다. 본 개시의 조성물, 방법, 및 시스템과 함께 사용하기 위한 예시적인 가이드 RNA는 표 3 및 표 13에 제공되어 있다.

표 12

[0094]

예시적인 표적 *IL-1α* 및 *IL-1β* 유전자 서열

식별자	게놈	유전자	엑손	표적 서열 5’-3’	PAM
서열번호 37	Homo sapiens	*IL-1α*	4	GCCATAGCTTACATGATAGA	AGG
서열번호 38	Homo sapiens	*IL-1α*	4	TCCTTCTATCATGTAAGCTA	TGG
서열번호 39	Homo sapiens	*IL-1α*	4	CCATGCAGCCTTCATGGAGT	GGG
서열번호 40	Homo sapiens	*IL-1α*	4	TCCATGCAGCCTTCATGGAG	TGG
서열번호 41	Homo sapiens	*IL-1α*	4	AGCTATGGCCCACTCCATGA	AGG
서열번호 42	Homo sapiens	*IL-1α*	4	ATTGATCCATGCAGCCTTCA	TGG
서열번호 43	Homo sapiens	*IL-1α*	4	CCCACTCCATGAAGGCTGCA	TGG
서열번호 44	Homo sapiens	*IL-1α*	4	GCTCTCCTTGAAGGTAAGCT	TGG
서열번호 45	Homo sapiens	*IL-1α*	4	TACCACCATGCTCTCCTTGA	AGG
서열번호 46	Homo sapiens	*IL-1α*	4	GCTTACCTTCAAGGAGAGCA	TGG
서열번호 47	Homo sapiens	*IL-1α*	4	TACCTTCAAGGAGAGCATGG	TGG
서열번호 48	Homo sapiens	*IL-1α*	4	ATGGTGGTAGTAGCAACCAA	CGG

서열번호 49	Homo sapiens	*IL-1α*	4	TGGTGGTAGTAGCAACCAAC	GGG
서열번호 50	Homo sapiens	*IL-1α*	4	CTTCTTCAGAACCTTCCCGT	TGG
서열번호 51	Homo sapiens	*IL-1α*	4	GGTAGTAGCAACCAACGGGA	AGG
서열번호 52	Homo sapiens	*IL-1α*	4	GGAAGGTTCTGAAGAAGAGA	CGG
서열번호 53	Homo sapiens	*IL-1α*	4	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	TGG
서열번호 54	Homo sapiens	*IL-1α*	4	CATCACTGATGATGACCTGG	AGG
서열번호 55	Homo sapiens	*IL-1α*	4	AGTCATTGGCGATGGCCTCC	AGG
서열번호 56	Homo sapiens	*IL-1α*	4	TTCCTCTGAGTCATTGGCGA	TGG
서열번호 57	Homo sapiens	*IL-1β*	4	TCCCATGTGTCGAAGAAGAT	AGG
서열번호 58	Homo sapiens	*IL-1β*	4	AACCTATCTTCTTCGACACA	TGG
서열번호 59	Homo sapiens	*IL-1β*	4	ACCTATCTTCTTCGACACAT	GGG
서열번호 60	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CTTCGACACATGGGATAACG	AGG
서열번호 61	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GTGCAGTTCAGTGATCGTAC	AGG
서열번호 62	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GATCACTGAACTGCACGCTC	CGG
서열번호 63	Homo sapiens	*IL-1β*	4	ATCACTGAACTGCACGCTCC	GGG
서열번호 64	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CAAAAAAGCTTGGTGATGTC	TGG
서열번호 65	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CCATATCCTGTCCCTGGAGG	TGG
서열번호 66	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CTGAAAGCTCTCCACCTCCA	GGG
서열번호 67	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GCTCCATATCCTGTCCCTGG	AGG
서열번호 68	Homo sapiens	*IL-1β*	4	AGCTCTCCACCTCCAGGGAC	AGG
서열번호 69	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GTTGCTCCATATCCTGTCCC	TGG
서열번호 70	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GGACAGGATATGGAGCAACA	AGG
서열번호 71	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GTCACAGCTCATATCATAGA	AGG
서열번호 72	Canis familiaris	*IL-1α*	3	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	GGG
서열번호 73	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GACATGCAGTCCTCATGAAG	TGG
서열번호 74	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GAGCTGTGACCCACTTCATG	AGG
서열번호 75	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GGATGTCTTTGAGATTTCAG	AGG
서열번호 76	Canis familiaris	*IL-1α*	3	ATTTTCCTTGAAGGTAAGCT	GGG
서열번호 77	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GACATCCCAGCTTACCTTCA	AGG
서열번호 78	Canis familiaris	*IL-1α*	3	CTTCAAGGAAAATGTGGTAG	TGG
서열번호 79	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GTGGTAGTGGTGGCAGCCAA	TGG
서열번호 80	Canis familiaris	*IL-1α*	3	TGGTAGTGGTGGCAGCCAAT	GGG

서열번호 81	Canis familiaris	*IL-1α*	3	CTTCTTTAGAATCTTCCCAT	TGG
서열번호 82	Canis familiaris	*IL-1α*	3	GGAAGATTCTAAAGAAGAGA	CGG
서열번호 83	Canis familiaris	*IL-1α*	3	AATGTCTTCCAGGTCATCAT	CGG
서열번호 84	Canis familiaris	*IL-1α*	3	ATTCATCACCGATGATGACC	TGG
서열번호 85	Canis familiaris	*IL-1α*	3	ATTGCCAATGACACAGAAGA	AGG
서열번호 86	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CCTCATCTACCAGAGAACTG	TGG
서열번호 87	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CCACAGTTCTCTGGTAGATG	AGG
서열번호 88	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CACAGTTCTCTGGTAGATGA	GGG
서열번호 89	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GCTGGTGGGAGACTTGCAAC	TGG
서열번호 90	Canis familiaris	*IL-1β*	4	ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG
서열번호 91	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GACTCTTGTTACAGAGCTGG	TGG
서열번호 92	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	TGG
서열번호 93	Canis familiaris	*IL-1β*	4	AGCTCTGTAACAAGAGTCTG	AGG
서열번호 94	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CGTGTCAGTCATTGTAGCTT	TGG
서열번호 95	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TCCTGGAGGACCTGTGGGCA	GGG
서열번호 96	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GCTGAAGAAGCCCTGCCCAC	AGG
서열번호 97	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CATCCTCCTGGAGGACCTGT	GGG
서열번호 98	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TCATCCTCCTGGAGGACCTG	TGG
서열번호 99	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GCCCTGCCCACAGGTCCTCC	AGG
서열번호 100	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CTGCCCACAGGTCCTCCAGG	AGG
서열번호 101	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TCTTCAGGTCATCCTCCTGG	AGG
서열번호 102	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TGCTCTTCAGGTCATCCTCC	TGG
서열번호 103	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TGTAGCAAAAGATGCTCTTC	AGG
서열번호 104	Canis familiaris	*IL-1β*	4	TTTTGCTACATCTTTGAAGA	AGG
서열번호 105	Equus caballus	*IL-1α*	4	GTCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
서열번호 106	Equus caballus	*IL-1α*	4	CCATGCAGTCCTCAGGAAGT	GGG
서열번호 107	Equus caballus	*IL-1α*	4	TCCATGCAGTCCTCAGGAAG	TGG
서열번호 108	Equus caballus	*IL-1α*	4	AAGCTATGACCCACTTCCTG	AGG
서열번호 109	Equus caballus	*IL-1α*	4	AATGTATCCATGCAGTCCTC	AGG
서열번호 110	Equus caballus	*IL-1α*	4	CCCACTTCCTGAGGACTGCA	TGG
서열번호 111	Equus caballus	*IL-1α*	4	GGATGTCTTAGAGGTTTCAG	AGG
서열번호 112	Equus caballus	*IL-1α*	4	GTTCAGCTTGGATGTCTTAG	AGG

서열번호 113	Equus caballus	*IL-1α*	4	GCTCTCCTTGAAGTTCAGCT	TGG
서열번호 114	Equus caballus	*IL-1α*	4	GACATCCAAGCTGAACTTCA	AGG
서열번호 115	Equus caballus	*IL-1α*	4	GCTGAACTTCAAGGAGAGCG	TGG
서열번호 116	Equus caballus	*IL-1α*	4	CTTCAAGGAGAGCGTGGTGC	TGG
서열번호 117	Equus caballus	*IL-1α*	4	CAAGGAGAGCGTGGTGCTGG	TGG
서열번호 118	Equus caballus	*IL-1α*	4	GTGGTGCTGGTGGCAGCCAA	CGG
서열번호 119	Equus caballus	*IL-1α*	4	TGGTGCTGGTGGCAGCCAAC	GGG
서열번호 120	Equus caballus	*IL-1α*	4	CTTCTTCAGAGTCTTCCCGT	TGG
서열번호 121	Equus caballus	*IL-1α*	4	GGAAGACTCTGAAGAAGAGA	CGG
서열번호 122	Equus caballus	*IL-1α*	4	AATGGCTTCCAGGTCATCAT	TGG
서열번호 123	Equus caballus	*IL-1α*	4	GTTCATCACCAATGATGACC	TGG
서열번호 124	Equus caballus	*IL-1α*	4	TTCTTCTGGATCATTGGCAA	TGG
서열번호 125	Equus caballus	*IL-1β*	4	GGTGGTGGGAGATTTGCAAC	TGG
서열번호 126	Equus caballus	*IL-1β*	4	AGTCTTGTTGTAGAGGTGGT	GGG
서열번호 127	Equus caballus	*IL-1β*	4	AAGTCTTGTTGTAGAGGTGG	TGG
서열번호 128	Equus caballus	*IL-1β*	4	TGAAAGTCTTGTTGTAGAGG	TGG
서열번호 129	Equus caballus	*IL-1β*	4	GTTTGAAAGTCTTGTTGTAG	AGG
서열번호 130	Equus caballus	*IL-1β*	4	ACATGCCATGTCAATCATTG	TGG
서열번호 131	Equus caballus	*IL-1β*	4	CATGTCAATCATTGTGGCTG	TGG
서열번호 132	Mus musculus	*IL-1α*	4	GCCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
서열번호 133	Mus musculus	*IL-1α*	4	TCCTTCTATGATGCAAGCTA	TGG
서열번호 134	Mus musculus	*IL-1α*	4	GGACATCTTTGACGTTTCAG	AGG
서열번호 135	Mus musculus	*IL-1α*	4	GATGTCCAACTTCACCTTCA	AGG
서열번호 136	Mus musculus	*IL-1α*	4	TGTCACCCGGCTCTCCTTGA	AGG
서열번호 137	Mus musculus	*IL-1α*	4	CTTCACCTTCAAGGAGAGCC	GGG
서열번호 138	Mus musculus	*IL-1α*	4	ACGTTGCTGATACTGTCACC	CGG
서열번호 139	Mus musculus	*IL-1α*	4	GTATCAGCAACGTCAAGCAA	CGG
서열번호 140	Mus musculus	*IL-1α*	4	TATCAGCAACGTCAAGCAAC	GGG
서열번호 141	Mus musculus	*IL-1α*	4	GGAAGATTCTGAAGAAGAGA	CGG
서열번호 142	Mus musculus	*IL-1α*	4	CTGCAGGTCATCTTCAGTGA	AGG
서열번호 143	Mus musculus	*IL-1α*	4	ACCTTCCAGATCATGGGTTA	TGG
서열번호 144	Mus musculus	*IL-1α*	4	CTCCTTACCTTCCAGATCAT	GGG

서열번호 145	Mus musculus	*IL-1α*	4	TCCATAACCCATGATCTGGA	AGG
서열번호 146	Mus musculus	*IL-1α*	4	AACCCATGATCTGGAAGGTA	AGG
서열번호 147	Mus musculus	*IL-1β*	4	GACAGCCCAGGTCAAAGGTT	TGG
서열번호 148	Mus musculus	*IL-1β*	4	ATCAGGACAGCCCAGGTCAA	AGG
서열번호 149	Mus musculus	*IL-1β*	4	TGCTTCCAAACCTTTGACCT	GGG
서열번호 150	Mus musculus	*IL-1β*	4	TGCTCTCATCAGGACAGCCC	AGG
서열번호 151	Mus musculus	*IL-1β*	4	TGAAGCTGGATGCTCTCATC	AGG
서열번호 152	Mus musculus	*IL-1β*	4	GCTGCTGCGAGATTTGAAGC	TGG
서열번호 153	Mus musculus	*IL-1β*	4	CATCAACAAGAGCTTCAGGC	AGG
서열번호 154	Mus musculus	*IL-1β*	4	GCAGGCAGTATCACTCATTG	TGG
서열번호 155	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGTATCACTCATTGTGGCTG	TGG
서열번호 156	Mus musculus	*IL-1β*	4	TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG	TGG
서열번호 157	Mus musculus	*IL-1β*	4	AAGGTCCACGGGAAAGACAC	AGG
서열번호 158	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGCTACCTGTGTCTTTCCCG	TGG
서열번호 159	Mus musculus	*IL-1β*	4	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC	GGG
서열번호 160	Mus musculus	*IL-1β*	4	TCCTCATCCTGGAAGGTCCA	CGG
서열번호 161	Mus musculus	*IL-1β*	4	GCTCATGTCCTCATCCTGGA	AGG
서열번호 162	Mus musculus	*IL-1β*	4	CCCGTGGACCTTCCAGGATG	AGG
서열번호 163	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGGTGCTCATGTCCTCATCC	TGG
서열번호 164	Mus musculus	*IL-1β*	4	TTCAAAGATGAAGGAAAAGA	AGG
서열번호 165	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGTACCTTCTTCAAAGATGA	AGG
서열번호 167	Mus musculus	*IL-1β*	4	TTTTCCTTCATCTTTGAAGA	AGG

표 13

[0095]

예시적인 CRISPR 가이드 RNA					
식별자	**게놈**	**유전자**	**엑손**	**표적 서열 5'-3'**	**PAM**
서열번호 168	Homo sapiens	*IL-1α*	4	GCCAUAGCUUACAUGAUAGA	AGG
서열번호 169	Homo sapiens	*IL-1α*	4	UCCUUCUAUCAUGUAAGCUA	UGG
서열번호 170	Homo sapiens	*IL-1α*	4	CCAUGCAGCCUUCAUGGAGU	GGG
서열번호 171	Homo sapiens	*IL-1α*	4	UCCAUGCAGCCUUCAUGGAG	UGG
서열번호 172	Homo sapiens	*IL-1α*	4	AGCUAUGGCCCACUCCAUGA	AGG
서열번호 173	Homo sapiens	*IL-1α*	4	AUUGAUCCAUGCAGCCUUCA	UGG

서열번호 174	Homo sapiens	*IL-1a*	4	CCCACUCCAUGAAGGCUGCA	UGG
서열번호 175	Homo sapiens	*IL-1a*	4	GCUCUCCUUGAAGGUAAGCU	UGG
서열번호 176	Homo sapiens	*IL-1a*	4	UACCACCAUGCUCUCCUUGA	AGG
서열번호 177	Homo sapiens	*IL-1a*	4	GCUUACCUUCAAGGAGAGCA	UGG
서열번호 178	Homo sapiens	*IL-1a*	4	UACCUUCAAGGAGAGCAUGG	UGG
서열번호 179	Homo sapiens	*IL-1a*	4	AUGGUGGUAGUAGCAACCAA	CGG
서열번호 180	Homo sapiens	*IL-1a*	4	UGGUGGUAGUAGCAACCAAC	GGG
서열번호 181	Homo sapiens	*IL-1a*	4	CUUCUUCAGAACCUUCCCGU	UGG
서열번호 182	Homo sapiens	*IL-1a*	4	GGUAGUAGCAACCAACGGGA	AGG
서열번호 183	Homo sapiens	*IL-1a*	4	GGAAGGUUCUGAAGAAGAGA	CGG
서열번호 184	Homo sapiens	*IL-1a*	4	CUCCAGGUCAUCAUCAGUGA	UGG
서열번호 185	Homo sapiens	*IL-1a*	4	CAUCACUGAUGAUGACCUGG	AGG
서열번호 186	Homo sapiens	*IL-1a*	4	AGUCAUUGGCGAUGGCCUCC	AGG
서열번호 187	Homo sapiens	*IL-1a*	4	UUCCUCUGAGUCAUUGGCGA	UGG
서열번호 188	Homo sapiens	*IL-1β*	4	UCCCAUGUGUCGAAGAAGAU	AGG
서열번호 189	Homo sapiens	*IL-1β*	4	AACCUAUCUUCUUCGACACA	UGG
서열번호 190	Homo sapiens	*IL-1β*	4	ACCUAUCUUCUUCGACACAU	GGG
서열번호 191	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CUUCGACACAUGGGAUAACG	AGG
서열번호 192	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GUGCAGUUCAGUGAUCGUAC	AGG
서열번호 193	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GAUCACUGAACUGCACGCUC	CGG
서열번호 194	Homo sapiens	*IL-1β*	4	AUCACUGAACUGCACGCUCC	GGG
서열번호 195	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CAAAAAAGCUUGGUGAUGUC	UGG
서열번호 196	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CCAUAUCCUGUCCCUGGAGG	UGG
서열번호 197	Homo sapiens	*IL-1β*	4	CUGAAAGCUCUCCACCUCCA	GGG
서열번호 198	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GCUCCAUAUCCUGUCCCUGG	AGG
서열번호 199	Homo sapiens	*IL-1β*	4	AGCUCUCCACCUCCAGGGAC	AGG
서열번호 200	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GUUGCUCCAUAUCCUGUCCC	UGG
서열번호 201	Homo sapiens	*IL-1β*	4	GGACAGGAUAUGGAGCAACA	AGG
서열번호 202	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GUCACAGCUCAUAUCAUAGA	AGG
서열번호 203	Canis familiaris	*IL-1a*	3	ACAUGCAGUCCUCAUGAAGU	GGG
서열번호 204	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GACAUGCAGUCCUCAUGAAG	UGG
서열번호 205	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GAGCUGUGACCCACUUCAUG	AGG

서열번호 206	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GGAUGUCUUUGAGAUUUCAG	AGG
서열번호 207	Canis familiaris	*IL-1a*	3	AUUUUCCUUGAAGGUAAGCU	GGG
서열번호 208	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	AGG
서열번호 209	Canis familiaris	*IL-1a*	3	CUUCAAGGAAAAUGUGGUAG	UGG
서열번호 210	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GUGGUAGUGGUGGCAGCCAA	UGG
서열번호 211	Canis familiaris	*IL-1a*	3	UGGUAGUGGUGGCAGCCAAU	GGG
서열번호 212	Canis familiaris	*IL-1a*	3	CUUCUUUAGAAUCUUCCCAU	UGG
서열번호 213	Canis familiaris	*IL-1a*	3	GGAAGAUUCUAAAGAAGAGA	CGG
서열번호 214	Canis familiaris	*IL-1a*	3	AAUGUCUUCCAGGUCAUCAU	CGG
서열번호 215	Canis familiaris	*IL-1a*	3	AUUCAUCACCGAUGAUGACC	UGG
서열번호 216	Canis familiaris	*IL-1a*	3	AUUGCCAAUGACACAGAAGA	AGG
서열번호 217	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CCUCAUCUACCAGAGAACUG	UGG
서열번호 218	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CCACAGUUCUCUGGUAGAUG	AGG
서열번호 219	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CACAGUUCUCUGGUAGAUGA	GGG
서열번호 220	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GCUGGUGGGAGACUUGCAAC	UGG
서열번호 221	Canis familiaris	*IL-1β*	4	ACUCUUGUUACAGAGCUGGU	GGG
서열번호 222	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GACUCUUGUUACAGAGCUGG	UGG
서열번호 223	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UCAGACUCUUGUUACAGAGC	UGG
서열번호 224	Canis familiaris	*IL-1β*	4	AGCUCUGUAACAAGAGUCUG	AGG
서열번호 225	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CGUGUCAGUCAUUGUAGCUU	UGG
서열번호 226	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UCCUGGAGGACCUGUGGGCA	GGG
서열번호 227	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GCUGAAGAAGCCCUGCCCAC	AGG
서열번호 228	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CAUCCUCCUGGAGGACCUGU	GGG
서열번호 229	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UCAUCCUCCUGGAGGACCUG	UGG
서열번호 230	Canis familiaris	*IL-1β*	4	GCCCUGCCCACAGGUCCUCC	AGG
서열번호 231	Canis familiaris	*IL-1β*	4	CUGCCCACAGGUCCUCCAGG	AGG
서열번호 232	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UCUUCAGGUCAUCCUCCUGG	AGG
서열번호 233	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UGCUCUUCAGGUCAUCCUCC	UGG
서열번호 234	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UGUAGCAAAAGAUGCUCUUC	AGG
서열번호 235	Canis familiaris	*IL-1β*	4	UUUUGCUACAUCUUUGAAGA	AGG
서열번호 236	Equus caballus	*IL-1a*	4	GUCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
서열번호 237	Equus caballus	*IL-1a*	4	CCAUGCAGUCCUCAGGAAGU	GGG

서열번호 238	Equus caballus	*IL-1α*	4	UCCAUGCAGUCCUCAGGAAG	UGG
서열번호 239	Equus caballus	*IL-1α*	4	AAGCUAUGACCCACUUCCUG	AGG
서열번호 240	Equus caballus	*IL-1α*	4	AAUGUAUCCAUGCAGUCCUC	AGG
서열번호 241	Equus caballus	*IL-1α*	4	CCCACUUCCUGAGGACUGCA	UGG
서열번호 242	Equus caballus	*IL-1α*	4	GGAUGUCUUAGAGGUUUCAG	AGG
서열번호 243	Equus caballus	*IL-1α*	4	GUUCAGCUUGGAUGUCUUAG	AGG
서열번호 244	Equus caballus	*IL-1α*	4	GCUCUCCUUGAAGUUCAGCU	UGG
서열번호 245	Equus caballus	*IL-1α*	4	GACAUCCAAGCUGAACUUCA	AGG
서열번호 246	Equus caballus	*IL-1α*	4	GCUGAACUUCAAGGAGAGCG	UGG
서열번호 247	Equus caballus	*IL-1α*	4	CUUCAAGGAGAGCGUGGUGC	UGG
서열번호 248	Equus caballus	*IL-1α*	4	CAAGGAGAGCGUGGUGCUGG	UGG
서열번호 249	Equus caballus	*IL-1α*	4	GUGGUGCUGGUGGCAGCCAA	CGG
서열번호 250	Equus caballus	*IL-1α*	4	UGGUGCUGGUGGCAGCCAAC	GGG
서열번호 251	Equus caballus	*IL-1α*	4	CUUCUUCAGAGUCUUCCCGU	UGG
서열번호 252	Equus caballus	*IL-1α*	4	GGAAGACUCUGAAGAAGAGA	CGG
서열번호 253	Equus caballus	*IL-1α*	4	AAUGGCUUCCAGGUCAUCAU	UGG
서열번호 254	Equus caballus	*IL-1α*	4	GUUCAUCACCAAUGAUGACC	UGG
서열번호 255	Equus caballus	*IL-1α*	4	UUCUUCUGGAUCAUUGGCAA	UGG
서열번호 256	Equus caballus	*IL-1β*	4	GGUGGUGGGAGAUUUGCAAC	UGG
서열번호 257	Equus caballus	*IL-1β*	4	AGUCUUGUUGUAGAGGUGGU	GGG
서열번호 258	Equus caballus	*IL-1β*	4	AAGUCUUGUUGUAGAGGUGG	UGG
서열번호 259	Equus caballus	*IL-1β*	4	UGAAAGUCUUGUUGUAGAGG	UGG
서열번호 260	Equus caballus	*IL-1β*	4	GUUUGAAAGUCUUGUUGUAG	AGG
서열번호 261	Equus caballus	*IL-1β*	4	ACAUGCCAUGUCAAUCAUUG	UGG
서열번호 262	Equus caballus	*IL-1β*	4	CAUGUCAAUCAUUGUGGCUG	UGG
서열번호 263	Mus musculus	*IL-1α*	4	GCCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
서열번호 264	Mus musculus	*IL-1α*	4	UCCUUCUAUGAUGCAAGCUA	UGG
서열번호 265	Mus musculus	*IL-1α*	4	GGACAUCUUUGACGUUUCAG	AGG
서열번호 266	Mus musculus	*IL-1α*	4	GAUGUCCAACUUCACCUUCA	AGG
서열번호 267	Mus musculus	*IL-1α*	4	UGUCACCCGGCUCUCCUUGA	AGG
서열번호 268	Mus musculus	*IL-1α*	4	CUUCACCUUCAAGGAGAGCC	GGG
서열번호 269	Mus musculus	*IL-1α*	4	ACGUUGCUGAUACUGUCACC	CGG

서열번호 270	Mus musculus	*IL-1a*	4	GUAUCAGCAACGUCAAGCAA	CGG
서열번호 271	Mus musculus	*IL-1a*	4	UAUCAGCAACGUCAAGCAAC	GGG
서열번호 272	Mus musculus	*IL-1a*	4	GGAAGAUUCUGAAGAAGAGA	CGG
서열번호 273	Mus musculus	*IL-1a*	4	CUGCAGGUCAUCUUCAGUGA	AGG
서열번호 274	Mus musculus	*IL-1a*	4	ACCUUCCAGAUCAUGGGUUA	UGG
서열번호 275	Mus musculus	*IL-1a*	4	CUCCUUACCUUCCAGAUCAU	GGG
서열번호 276	Mus musculus	*IL-1a*	4	UCCAUAACCCAUGAUCUGGA	AGG
서열번호 277	Mus musculus	*IL-1a*	4	AACCCAUGAUCUGGAAGGUA	AGG
서열번호 278	Mus musculus	*IL-1β*	4	GACAGCCCAGGUCAAAGGUU	UGG
서열번호 279	Mus musculus	*IL-1β*	4	AUCAGGACAGCCCAGGUCAA	AGG
서열번호 280	Mus musculus	*IL-1β*	4	UGCUUCCAAACCUUUGACCU	GGG
서열번호 281	Mus musculus	*IL-1β*	4	UGCUCUCAUCAGGACAGCCC	AGG
서열번호 282	Mus musculus	*IL-1β*	4	UGAAGCUGGAUGCUCUCAUC	AGG
서열번호 283	Mus musculus	*IL-1β*	4	GCUGCUGCGAGAUUUGAAGC	UGG
서열번호 284	Mus musculus	*IL-1β*	4	CAUCAACAAGAGCUUCAGGC	AGG
서열번호 285	Mus musculus	*IL-1β*	4	GCAGGCAGUAUCACUCAUUG	UGG
서열번호 286	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGUAUCACUCAUUGUGGCUG	UGG
서열번호 287	Mus musculus	*IL-1β*	4	UUGUGGCUGUGGAGAAGCUG	UGG
서열번호 288	Mus musculus	*IL-1β*	4	AAGGUCCACGGGAAAGACAC	AGG
서열번호 289	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGCUACCUGUGUCUUUCCCG	UGG
서열번호 290	Mus musculus	*IL-1β*	4	CCUCAUCCUGGAAGGUCCAC	GGG
서열번호 291	Mus musculus	*IL-1β*	4	UCCUCAUCCUGGAAGGUCCA	CGG
서열번호 292	Mus musculus	*IL-1β*	4	GCUCAUGUCCUCAUCCUGGA	AGG
서열번호 293	Mus musculus	*IL-1β*	4	CCCGUGGACCUUCCAGGAUG	AGG
서열번호 294	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGGUGCUCAUGUCCUCAUCC	UGG
서열번호 295	Mus musculus	*IL-1β*	4	UUCAAAGAUGAAGGAAAAGA	AGG
서열번호 296	Mus musculus	*IL-1β*	4	AGUACCUUCUUCAAAGAUGA	AGG
서열번호 297	Mus musculus	*IL-1β*	4	UUUUCCUUCAUCUUUGAAGA	AGG

[0096] 소정의 구현예에서, 가이드 RNA(예: 단일 가이드 RNA 또는 sgRNA)의 서열은 편집 효율을 증가시키고/시키거나 오프 타겟 효과를 감소시키도록 변형될 수 있다. 소정의 구현예에서, 가이드 RNA의 서열은 약 1 염기, 약 2 염기, 약 3 염기, 약 4 염기, 약 5 염기, 약 5 염기, 약 6 염기, 약 7 염기, 약 8 염기, 약 9 염기, 약 10 염기, 약 15 염기, 또는 약 15 염기 초과만큼 표적 서열과 다를 수 있다. 소정의 구현예에서, 가이드 RNA의 서열은 약

1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 또는 약 20% 초과만큼 표적 서열과 다를 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 표적 서열 형태의 변이는 상보성의 정도를 지칭할 수 있다.

[0097] 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 95% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 90% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 85% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 80% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 75% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 70% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 65% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 60% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 55% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 50% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 45% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 40% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 35% 동일하다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열과 적어도 35% 동일하다.

[0098] 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 1개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 2개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 3개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 4개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 4개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 6개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 7개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 8개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 9개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 10개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 11개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 12개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 13

개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 14개의 염기 치환을 갖는다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 조성물, 방법, 또는 시스템과 함께 사용되는 가이드 RNA는 서열번호 21~34 및 서열번호 168~297 중 어느 하나에 도시된 서열에서 15개의 염기 치환을 갖는다.

[0099] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 서열번호 7~20 및 서열번호 37~167 중 어느 하나에 도시된 표적 서열의 발현을 녹다운하도록 설계되고/되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 8의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0100] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 인간 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0101] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 서열번호 7~20 및 서열번호 37~167 중 어느 하나에 도시된 표적 서열의 발현을 녹다운하도록 설계되고/되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1α 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0102] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계

되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 개과 IL-1β 유전자의 엑손 8의 적어도 일부에 결합함으로써 개과 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0103] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 서열번호 7~20 및 서열번호 37~167 중 어느 하나에 도시된 표적 서열의 발현을 녹다운하도록 설계되고/되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말(equus caballus) IL-1α 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1α 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1α 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1α 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1α 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1α 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1α 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0104] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 말 IL-1β 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 말 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0105] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 서열번호 7~20 및 서열번호 37~167 중 어느 하나에 도시된 표적 서열의 발현을 녹다운하도록 설계되고/되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1α 유전자의 엑손 8의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1α 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0106] 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 1의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 2의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운

할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 3의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 4의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 5의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 6의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 가이드 RNA는 생쥐 IL-1β 유전자의 엑손 7의 적어도 일부에 결합함으로써 생쥐 IL-1β 유전자를 녹다운하도록 설계되거나 녹다운할 수 있다.

[0107] 일부 경우에, sgRNA는 Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드) 또는 이의 변이체 또는 단편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터와 함께 세포(예: 생체외 요법을 위한 일차 세포와 같은 시험관내 세포, 또는 환자 세포와 같은 생체내 세포) 내로 도입된다. 일부 구현예에서, sgRNA는 Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드) 또는 이의 변이체 또는 단편과 복합체화되어 세포(예: 생체외 요법을 위한 일차 세포와 같은 시험관내 세포, 또는 환자 세포와 같은 생체내 세포) 내 도입을 위한 리보핵산단백질(RNP)-기반 전달 시스템을 형성한다. 다른 경우에, sgRNA는 Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드) 또는 이의 변이체 또는 단편을 암호화하는 mRNA와 함께 세포(예: 생체외 요법을 위한 일차 세포와 같은 시험관내 세포, 또는 환자 세포와 같은 생체내 세포) 내로 도입된다.

[0108] 임의의 이종 또는 외래 핵산(예: 표적 유전자좌-특이적 sgRNA 및/또는 Cas9 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드)이 당업자에게 알려진 임의의 방법을 사용하여 세포내에 도입될 수 있다. 이러한 방법은 전기천공, 핵감염, 형질감염, 리포펙션, 형질도입, 미세주입, 전기주입, 전기융합, 나노입자 충돌, 형질전환, 접합 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0109] sgRNA의 핵산 서열은, 표적 뉴클레오티드 서열(예: 표적 DNA 서열)과 충분한 상보성을 가짐으로써 표적 서열과 혼성화되고 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열 특이적 결합을 유도하는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 적절한 정렬 알고리즘을 사용해 sgRNA의 가이드 서열과 이의 상응하는 표적 서열을 최적으로 정렬했을 때, 이들 간의 상보성의 정도는 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 또는 그 이상이다. 최적 정렬은 서열을 정렬하기 위한 임의의 적절한 알고리즘을 사용해 결정될 수 있으며, 이의 비제한적인 예는 스미스-워터맨 알고리즘(Smith-Waterman algorithm), 니들만-분쉬 알고리즘(Needleman-Wunsch algorithm), Burrows-Wheeler 변환에 기초한 알고리즘(예: Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign(Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif)), SOAP(soap.genomics.org.cn을 통해 이용 가능함), 및 Maq(maq.sourceforge.net을 통해 이용 가능함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 1 뉴클레오티드, 2 뉴클레오티드, 3 뉴클레오티드, 4 뉴클레오티드, 5 뉴클레오티드, 6 뉴클레오티드, 7 뉴클레오티드, 8 뉴클레오티드, 9 뉴클레오티드, 10 뉴클레오티드, 11 뉴클레오티드, 12 뉴클레오티드, 13 뉴클레오티드, 14 뉴클레오티드, 15 뉴클레오티드, 16 뉴클레오티드, 17 뉴클레오티드, 18 뉴클레오티드, 19 뉴클레오티드, 20 뉴클레오티드, 21 뉴클레오티드, 22 뉴클레오티드, 23 뉴클레오티드, 24 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 26 뉴클레오티드, 27 뉴클레오티드, 28 뉴클레오티드, 29 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드 또는 그 이상의 길이이다. 일부 경우에, 가이드 서열은 약 20 뉴클레오티드의 길이이다. 다른 경우에, 가이드 서열은 약 15 뉴클레오티드의 길이이다. 다른 경우에, 가이드 서열은 약 25 뉴클레오티드의 길이이다. 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열 특이적 결합을 유도하는 가이드 서열의 능력은 임의의 적절한 검정에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 시험 대상 가이드 서열을 포함하여, CRISPR 복합체를 형성하기에 충분한 CRISPR 시스템의 성분을 (예컨대 CRISPR 서열의 성분을 암호화하는 벡터에 의한 형질감염에 의해) 상응하는 표적 서열을 갖는 숙주 세포에게 제공한 다음, 표적 서열 내의 우선적 절단을 평가할 수 있다. 유사하게, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 절단은, 시험 대상 가이드 서열 및 시험 가이드 서열과 상이한 대조군 가이드 서열을 포함하여, CRISPR 복합체의 성분인 표적 서열을 제공하고, 표적 서열에서 시험 가이드 서열 반응과 대조군 가이드 서열 반응의 결합 또는 절단 속도를 비교함으로써, 시험관 내에서 평가할 수 있다.

[0110] sgRNA의 핵산 서열은 전술한 웹 기반 소프트웨어 중 어느 하나를 사용하여 선택될 수 있다. DNA-표적화 RNA를 선택하기 위한 고려사항은 사용할 Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드)에 대한 PAM 서열, 및 오프 타겟 변형을 최소화하기 위한 전략을 포함한다. CRISPR 설계 도구와 같은 도구는 sgRNA를 제조하고, 표적 변형 효율을 평가하고/하거나, 오프 타겟 부위에서 절단을 평가하기 위한 서열을 제공할 수 있다. sgRNA의 서열을 선택하기 위한 또 다른 고려 사항은 가이드 서열 내에서 이차 구조의 정도를 감소시키는 것을 포함한다. 이차 구조는 임의의

적절한 폴리뉴클레오티드 접힘 알고리즘에 의해 결정될 수 있다. 일부 프로그램은 최소 깁스 자유 에너지(Gibbs free energy) 계산을 기반으로 한다. 적절한 알고리즘의 예는 mFold(Zuker 및 Stiegler의 문헌[*Nucleic Acids Res*, 9 (1981), 133-148]), UNAFold 패키지(Markham 등의 문헌[*Methods Mol Biol*, 2008, 453:3-31]), 및 RNAfold form the ViennaRNa 패키지를 포함한다.

[0111] sgRNA는 약 10 내지 약 500 뉴클레오티드, 예를 들어 약 10 뉴클레오티드, 15 뉴클레오티드, 20 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 55 뉴클레오티드, 60 뉴클레오티드, 65 뉴클레오티드, 70 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드, 80 뉴클레오티드, 85 뉴클레오티드, 90 뉴클레오티드, 95 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드, 105 뉴클레오티드, 110 뉴클레오티드, 120 뉴클레오티드, 130 뉴클레오티드, 140 뉴클레오티드, 150 뉴클레오티드, 160 뉴클레오티드, 170 뉴클레오티드, 180 뉴클레오티드, 190 뉴클레오티드, 200 뉴클레오티드, 210 뉴클레오티드, 220 뉴클레오티드, 230 뉴클레오티드, 240 뉴클레오티드, 250 뉴클레오티드, 260 뉴클레오티드, 270 뉴클레오티드, 280 뉴클레오티드, 290 뉴클레오티드, 300 뉴클레오티드, 310 뉴클레오티드, 320 뉴클레오티드, 330 뉴클레오티드, 340 뉴클레오티드, 350 뉴클레오티드, 360 뉴클레오티드, 370 뉴클레오티드, 380 뉴클레오티드, 390 뉴클레오티드, 400 뉴클레오티드, 410 뉴클레오티드, 420 뉴클레오티드, 430 뉴클레오티드, 440 뉴클레오티드, 450 뉴클레오티드, 460 뉴클레오티드, 470 뉴클레오티드, 480 뉴클레오티드, 490 뉴클레오티드, 또는 약 500 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, sgRNA는 약 20 내지 약 500 뉴클레오티드, 예를 들어 20 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 55 뉴클레오티드, 60 뉴클레오티드, 65 뉴클레오티드, 70 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드, 80 뉴클레오티드, 85 뉴클레오티드, 90 뉴클레오티드, 95 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드, 105 뉴클레오티드 110 뉴클레오티드, 115 뉴클레오티드, 120 뉴클레오티드, 125 뉴클레오티드, 130 뉴클레오티드, 135 뉴클레오티드, 140 뉴클레오티드, 145 뉴클레오티드, 150 뉴클레오티드, 155 뉴클레오티드, 160 뉴클레오티드, 165 뉴클레오티드, 170 뉴클레오티드, 175 뉴클레오티드, 180 뉴클레오티드, 185 뉴클레오티드, 190 뉴클레오티드, 195 뉴클레오티드, 200 뉴클레오티드, 205 뉴클레오티드, 210 뉴클레오티드, 215 뉴클레오티드, 220 뉴클레오티드, 225 뉴클레오티드, 230 뉴클레오티드, 235 뉴클레오티드, 240 뉴클레오티드, 245 뉴클레오티드, 250 뉴클레오티드, 255 뉴클레오티드, 260 뉴클레오티드, 265 뉴클레오티드, 270 뉴클레오티드, 275 뉴클레오티드, 280 뉴클레오티드, 285 뉴클레오티드, 290 뉴클레오티드, 295 뉴클레오티드, 300 뉴클레오티드, 305 뉴클레오티드, 310 뉴클레오티드, 315 뉴클레오티드, 320 뉴클레오티드, 325 뉴클레오티드, 330 뉴클레오티드, 335 뉴클레오티드, 340 뉴클레오티드, 345 뉴클레오티드, 350 뉴클레오티드, 355 뉴클레오티드, 360 뉴클레오티드, 365 뉴클레오티드, 370 뉴클레오티드, 375 뉴클레오티드, 380 뉴클레오티드, 385 뉴클레오티드, 390 뉴클레오티드, 395 뉴클레오티드, 400 뉴클레오티드, 405 뉴클레오티드, 410 뉴클레오티드, 415 뉴클레오티드, 420 뉴클레오티드, 425 뉴클레오티드, 430 뉴클레오티드, 435 뉴클레오티드, 440 뉴클레오티드, 445 뉴클레오티드, 450 뉴클레오티드, 455 뉴클레오티드, 460 뉴클레오티드, 465 뉴클레오티드, 470 뉴클레오티드, 475 뉴클레오티드, 480 뉴클레오티드, 485 뉴클레오티드, 490 뉴클레오티드, 495 뉴클레오티드, 또는 500 뉴클레오티드이다. 소정의 구현예에서, sgRNA는 약 20 내지 약 100 뉴클레오티드, 예를 들어 약 20 뉴클레오티드, 예를 들어 20 뉴클레오티드, 21 뉴클레오티드, 22 뉴클레오티드, 23 뉴클레오티드, 24 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 26 뉴클레오티드, 27 뉴클레오티드, 28 뉴클레오티드, 29 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 31 뉴클레오티드, 32 뉴클레오티드, 33 뉴클레오티드, 34 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 36 뉴클레오티드, 37 뉴클레오티드, 38 뉴클레오티드, 39 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 41 뉴클레오티드, 42 뉴클레오티드, 43 뉴클레오티드, 44 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 46 뉴클레오티드, 47 뉴클레오티드, 48 뉴클레오티드, 49 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 51 뉴클레오티드, 52 뉴클레오티드, 53 뉴클레오티드, 54 뉴클레오티드, 55 뉴클레오티드, 56 뉴클레오티드, 57 뉴클레오티드, 58 뉴클레오티드, 59 뉴클레오티드, 60 뉴클레오티드, 61 뉴클레오티드, 62 뉴클레오티드, 63 뉴클레오티드, 64 뉴클레오티드, 65 뉴클레오티드, 66 뉴클레오티드, 67 뉴클레오티드, 68 뉴클레오티드, 69 뉴클레오티드, 70 뉴클레오티드, 71 뉴클레오티드, 72 뉴클레오티드, 73 뉴클레오티드, 74 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드, 76 뉴클레오티드, 77 뉴클레오티드, 78 뉴클레오티드, 79 뉴클레오티드, 80 뉴클레오티드, 81 뉴클레오티드, 82 뉴클레오티드, 83 뉴클레오티드, 84 뉴클레오티드, 85 뉴클레오티드, 86 뉴클레오티드, 87 뉴클레오티드, 88 뉴클레오티드, 89 뉴클레오티드, 90 뉴클레오티드, 91 뉴클레오티드, 92 뉴클레오티드, 93 뉴클레오티드, 94 뉴클레오티드, 95 뉴클레오티드, 96 뉴클레오티드, 97 뉴클레오티드, 98 뉴클레오티드, 99 뉴클레오티드, 또는 약 100 뉴클레오티드이다.

[0112] 스캐폴드 서열은 약 10 내지 약 500 뉴클레오티드, 예를 들어 약 10 뉴클레오티드, 15 뉴클레오티드, 20 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 50 뉴클레오

티드, 55 뉴클레오티드, 60 뉴클레오티드, 65 뉴클레오티드, 70 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드, 80 뉴클레오티드, 85 뉴클레오티드, 90 뉴클레오티드, 95 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드, 105 뉴클레오티드, 110 뉴클레오티드, 120 뉴클레오티드, 130 뉴클레오티드, 140 뉴클레오티드, 150 뉴클레오티드, 160 뉴클레오티드, 170 뉴클레오티드, 180 뉴클레오티드, 190 뉴클레오티드, 200 뉴클레오티드, 210 뉴클레오티드, 220 뉴클레오티드, 230 뉴클레오티드, 240 뉴클레오티드, 250 뉴클레오티드, 260 뉴클레오티드, 270 뉴클레오티드, 280 뉴클레오티드, 290 뉴클레오티드, 300 뉴클레오티드, 310 뉴클레오티드, 320 뉴클레오티드, 330 뉴클레오티드, 340 뉴클레오티드, 350 뉴클레오티드, 360 뉴클레오티드, 370 뉴클레오티드, 380 뉴클레오티드, 390 뉴클레오티드, 400 뉴클레오티드, 410 뉴클레오티드, 420 뉴클레오티드, 430 뉴클레오티드, 440 뉴클레오티드, 450 뉴클레오티드, 460 뉴클레오티드, 470 뉴클레오티드, 480 뉴클레오티드, 490 뉴클레오티드, 또는 약 500 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 서열은 약 20 내지 약 500 뉴클레오티드, 예를 들어 20 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 55 뉴클레오티드, 60 뉴클레오티드, 65 뉴클레오티드, 70 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드, 80 뉴클레오티드, 85 뉴클레오티드, 90 뉴클레오티드, 95 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드, 105 뉴클레오티드 110 뉴클레오티드, 115 뉴클레오티드, 120 뉴클레오티드, 125 뉴클레오티드, 130 뉴클레오티드, 135 뉴클레오티드, 140 뉴클레오티드, 145 뉴클레오티드, 150 뉴클레오티드, 155 뉴클레오티드, 160 뉴클레오티드, 165 뉴클레오티드, 170 뉴클레오티드, 175 뉴클레오티드, 180 뉴클레오티드, 185 뉴클레오티드, 190 뉴클레오티드, 195 뉴클레오티드, 200 뉴클레오티드, 205 뉴클레오티드, 210 뉴클레오티드, 215 뉴클레오티드, 220 뉴클레오티드, 225 뉴클레오티드, 230 뉴클레오티드, 235 뉴클레오티드, 240 뉴클레오티드, 245 뉴클레오티드, 250 뉴클레오티드, 255 뉴클레오티드, 260 뉴클레오티드, 265 뉴클레오티드, 270 뉴클레오티드, 275 뉴클레오티드, 280 뉴클레오티드, 285 뉴클레오티드, 290 뉴클레오티드, 295 뉴클레오티드, 300 뉴클레오티드, 305 뉴클레오티드, 310 뉴클레오티드, 315 뉴클레오티드, 320 뉴클레오티드, 325 뉴클레오티드, 330 뉴클레오티드, 335 뉴클레오티드, 340 뉴클레오티드, 345 뉴클레오티드, 350 뉴클레오티드, 355 뉴클레오티드, 360 뉴클레오티드, 365 뉴클레오티드, 370 뉴클레오티드, 375 뉴클레오티드, 380 뉴클레오티드, 385 뉴클레오티드, 390 뉴클레오티드, 395 뉴클레오티드, 400 뉴클레오티드, 405 뉴클레오티드, 410 뉴클레오티드, 415 뉴클레오티드, 420 뉴클레오티드, 425 뉴클레오티드, 430 뉴클레오티드, 435 뉴클레오티드, 440 뉴클레오티드, 445 뉴클레오티드, 450 뉴클레오티드, 455 뉴클레오티드, 460 뉴클레오티드, 465 뉴클레오티드, 470 뉴클레오티드, 475 뉴클레오티드, 480 뉴클레오티드, 485 뉴클레오티드, 490 뉴클레오티드, 495 뉴클레오티드, 또는 500 뉴클레오티드이다. 소정의 구현예에서, 스캐폴드 서열은 약 20 내지 약 100 뉴클레오티드, 예를 들어 약 20 뉴클레오티드, 예를 들어 20 뉴클레오티드, 21 뉴클레오티드, 22 뉴클레오티드, 23 뉴클레오티드, 24 뉴클레오티드, 25 뉴클레오티드, 26 뉴클레오티드, 27 뉴클레오티드, 28 뉴클레오티드, 29 뉴클레오티드, 30 뉴클레오티드, 31 뉴클레오티드, 32 뉴클레오티드, 33 뉴클레오티드, 34 뉴클레오티드, 35 뉴클레오티드, 36 뉴클레오티드, 37 뉴클레오티드, 38 뉴클레오티드, 39 뉴클레오티드, 40 뉴클레오티드, 41 뉴클레오티드, 42 뉴클레오티드, 43 뉴클레오티드, 44 뉴클레오티드, 45 뉴클레오티드, 46 뉴클레오티드, 47 뉴클레오티드, 48 뉴클레오티드, 49 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 51 뉴클레오티드, 52 뉴클레오티드, 53 뉴클레오티드, 54 뉴클레오티드, 55 뉴클레오티드, 56 뉴클레오티드, 57 뉴클레오티드, 58 뉴클레오티드, 59 뉴클레오티드, 60 뉴클레오티드, 61 뉴클레오티드, 62 뉴클레오티드, 63 뉴클레오티드, 64 뉴클레오티드, 65 뉴클레오티드, 66 뉴클레오티드, 67 뉴클레오티드, 68 뉴클레오티드, 69 뉴클레오티드, 70 뉴클레오티드, 71 뉴클레오티드, 72 뉴클레오티드, 73 뉴클레오티드, 74 뉴클레오티드, 75 뉴클레오티드, 76 뉴클레오티드, 77 뉴클레오티드, 78 뉴클레오티드, 79 뉴클레오티드, 80 뉴클레오티드, 81 뉴클레오티드, 82 뉴클레오티드, 83 뉴클레오티드, 84 뉴클레오티드, 85 뉴클레오티드, 86 뉴클레오티드, 87 뉴클레오티드, 88 뉴클레오티드, 89 뉴클레오티드, 90 뉴클레오티드, 91 뉴클레오티드, 92 뉴클레오티드, 93 뉴클레오티드, 94 뉴클레오티드, 95 뉴클레오티드, 96 뉴클레오티드, 97 뉴클레오티드, 98 뉴클레오티드, 99 뉴클레오티드, 또는 약 100 뉴클레오티드이다.

[0113] sgRNA의 뉴클레오티드는 리보오스(예: 당)기, 인산염기, 핵염기, 또는 이들의 임의의 조합에서의 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 리보오스기에서의 변형은 리보오스의 2' 위치에서의 변형을 포함한다.

[0114] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드는 2'플루오로-아라비노 핵산, 트리사이클-DNA(tc-DNA), 펩티드 핵산, 시클로헥센 핵산(CeNA), 잠긴 핵산(LNA), 에틸렌-가교된 핵산(ENA), 포스포디아미데이트 모르폴리노, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0115] 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체는 당- 및/또는 백본-리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다(즉, 인산염-당 백본에 대한 변형을 포함할 수 있음). 예를 들어, 고유 또는 천연 RNA의 인산디에스테르 연결은 질소 또는 황 헤테로원자 중 적어도 하나를 포함시키기 위한 것일 수 있다. 일부 백본-리보뉴클레오티드에서, 인접한

리보뉴클레오티드에 연결하기 위한 인산에스테르기는 예를 들어 포스포티오에이트기의 기에 의해 치환될 수 있다. 일부 당-리보뉴클레오티드에서, 2' 모이어티는 H, OR, R, 할로, SH, SR, H2, HR, R_2 또는 ON으로부터 선택된 기이고, 여기서 R은 C_1-C_6 알킬, 알케닐, 또는 알키닐이고, 할로는 F, CI, Br, 또는 I이다.

[0116] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드는 당 변형을 함유한다. 당 변형의 비제한적인 예는 2'-데옥시-2'-플루오로-올리고리보뉴클레오티드(2'-플루오로-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트), 2'-데옥시-2'-데아민 올리고리보뉴클레오티드(2'-아미노-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 2'-아미노-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트), 2'-O-알킬 올리고리보뉴클레오티드, 2'-데옥시-2'-C-알킬 올리고리보뉴클레오티드(2'-O-메틸시티딘-5'-트리포스페이트, 2'-메틸우리딘-5'-트리포스페이트), 2'-C-알킬 올리고리보뉴클레오티드, 및 이들의 이성질체(2'-아라시티딘-5'-트리포스페이트, 2'-아라우리딘-5'-트리포스페이트), 아지도트리포스페이트(2'-아지도-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트, 2'-아지도-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트), 및 이들의 조합을 포함한다.

[0117] 일부 구현예에서, sgRNA는 하나 이상의 2'-플루로, 2'-아미노, 및/또는 2'-티오 변형을 함유한다. 일부 경우에, 변형은 2'-플루오로-시티딘, 2'-플루오로-우리딘, 2'-플루오로-아데노신, 2'-플루오로-구아노신, 2'-아미노-시티딘, 2'-아미노-우리딘, 2'-아미노-아데노신, 2'-아미노-구아노신, 2,6-디아미노푸린, 4-티오-우리딘, 5-아미노-알릴-우리딘, 5-브로모-우리딘, 5-요오드-우리딘, 5-메틸-시티딘, 리보-티미딘, 2-아미노푸린, 2'-아미노-부티릴-피렌-우리딘, 5-플루오로-시티딘, 및/또는 5-플루오로-우리딘이다.

[0118] 96개가 넘는 자연 발생 뉴클레오시드 변형이 포유류 RNA에서 발견된다. 예를 들어 Limbach 등의 문헌[*Nucleic Acids Research*, 22(12):2183-2196 (1994)] 참조. 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드의 제조는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 미국 특허 제4,373,071호, 제4,458,066호, 제4,500,707호, 제4,668,777호, 제4,973,679호, 제5,047,524호, 제5,132,418호, 제5,153,319호, 제5,262,530호, 및 제5,700,642호에 기술되어 있다. 본원에 기술된 바와 같이 사용하기에 적합한 다수의 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드는 상업적으로 이용 가능하다. 뉴클레오시드는 자연 발생 뉴클레오시드의 유사체일 수 있다. 일부 경우에, 유사체는 디하이드로우리딘, 메틸아데노신, 메틸시티딘, 메틸우리딘, 메틸유사우리딘, 티오우리딘, 데옥시시토딘, 및 데옥시우리딘이다.

[0119] 일부 경우에, 본원에 기술된 sgRNA는 핵염기-리보뉴클레오티드, 즉 자연 발생 핵염기 대신에 적어도 하나의 비-자연 발생 핵염기를 함유하는 리보뉴클레오티드를 포함한다. 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드에 혼입될 수 있는 핵염기의 비제한적인 예는 m5C (5-메틸시티딘), m5U (5-메틸우리딘), m6A (N6-메틸아데노신), s2U (2-티오우리딘), Um(2'-O-메틸우리딘), m1A (1-메틸 아데노신), m2A (2-메틸아데노신), Am (2-1-O-메틸아데노신), ms2m6A (2-메틸티오-N6- 메틸아데노신), i6A (N6-이소펜틸 아데노신), ms2i6A (2-메틸티오- N6이소펜틸아데노신), io6A (N6-(시스-하이드록시이소펜틸) 아데노신), ms2io6A (2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜틸)아데노신), g6A (N6-글리시닐카르바모일아데노신), t6A (N6-트레오닐 카르바모일아데노신), ms2t6A (2-메틸티오-N6-트레오닐 카르바모일아데노신), m6t6A (N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데노신), hn6A (N6.-하이드록시노르발릴카르바모일아데노신), ms2hn6A (2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴 카르바모일아데노신), Ar(p) (2'-O-리보실아데노신(포스페이트)), I (이노신), mi 1 (1-메틸이노신), m'1m (1,2'-O-디메틸이노신), m3C (3-메틸시티딘), Cm (2T-o-메틸시티딘), s2C (2-티오시티딘), ac4C (N4-아세틸시티딘), f5C (5-포닐시티딘), m5Cm (5,2-O-디메틸시티딘), ac4Cm (N4아세틸2TO메틸시티딘), k2C (리시딘), m1G (1-메틸구아노신), m2G (N2-메틸구아노신), m7G (7-메틸구아노신), Gm (2'-O- 메틸구아노신), m22G (N2,N2-디메틸구아노신), m2Gm (N2,2'-O-디메틸구아노신), m22Gm (N2,N2,2'-O-트리메틸구아노신), Gr(p) (2'-O-리보실구아노신(포스페이트)), yW (위부토신), o2yW (페록시위부토신), OHyW (하이드록시위부토신), OHyW* (변형 중인 하이드록시위부토신), imG (와이오신), mimG (메틸구아노신), Q (큐오신), oQ (에폭시큐오신), galQ (갈탁노실-큐오신), manQ (만노실- 큐오신), preQo (7-시아노-7-데아자구아노신), preQi (7-아미노메틸-7-데아자구아노신), G (아케오신), D (디하이드로우리딘), m5Um (5,2'-O-디메틸우리딘), s4U (4-티오우리딘), m5s2U (5-메틸-2-티오우리딘), s2Um (2-티오-2'-O-메틸우리딘), acp3U (3-(3-아미노-3- 카르복시프로필)우리딘), ho5U (5-하이드록시우리딘), mo5U (5-메톡시우리딘), cmo5U (우리딘 5-옥시아세트산), mcmo5U (우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르), chm5U (5- (카르복시하이드록시메틸)우리딘)), mchm5U (5-(카르복시하이드록시메틸)우리딘 메틸 에스테르), mcm5U (5-메톡시카르보닐 메틸우리딘), mcm5Um (S-메톡시카르보닐메틸-2- O-메틸우리딘), mcm5s2U (5-메톡시카르보닐메틸-2-티오우리딘), nm5s2U (5- 아미노메틸-2-티오우리딘), mnm5U (5-메틸아미노메틸우리딘), mnm5s2U (5- 메틸아미노메틸-2-티오우리딘), mnm5se2U (5-메틸아미노메틸-2-셀레노우리딘), ncm5U (5-카르바모일메틸 우리딘), ncm5Um (5-카르바모일메틸-2'-O-메틸우리딘), cmnm5U (5-카르복시메틸아미노메틸우리딘), cnmm5Um (5-카르복시메틸아미노메틸- 2-L-O메틸우리딘), cmnm5s2U (5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘), m62A (N6,N6-디메틸아데노신),

Tm (2'-O-메틸이노신), m4C (N4-메틸시티딘), m4Cm (N4,2-O-디메틸시티딘), hm5C (5-하이드록시메틸시티딘), m3U (3 -메틸우리딘), cm5U (5-카르복시메틸우리딘), m6Am (N6,T-O-디메틸아데노신), rn62Am (N6,N6,O-2- 트리메틸아데노신), m2'7G (N2,7-디메틸구아노신), m2'2'7G (N2,N2,7- 트리메틸구아노신), m3Um (3,2T-O-디메틸우리딘), m5D (5-메틸디하이드로우리딘), f5Cm (5-포르밀-2'-O-메틸시티딘), m1Gm (1,2'-O-디메틸구아노신), m'Am (1,2-O- 디메틸 아데노신)이리노메틸우리딘), tm5s2U (S-타우리노메틸-2-티오우리딘)), imG-14 (4-데메틸구아노신), imG2 (이소구아노신), 또는 ac6A (N6-아세틸아데노신), 하이포크산틴, 이노신, 8-옥소-아데닌, 이들의 7-치환된 유도체, 디하이드로우라실, 슈도우라실, 2- 티오우라실, 4-티오우라실, 5-아미노우라실, 5-(C_1-C_6)-알킬우라실, 5-메틸우라실, 5-(C_2-C_6)- 알케닐우라실, 5-(C_2-C_6)-알키닐우라실, 5-(하이드록시메틸)우라실, 5-클로로우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5 -하이드록시 시토신, 5-(C_1-C_6)-알킬시토신, 5-메틸시토신, 5-(C_2-C_6)-알케닐시토신, 5-(C_2-C_6)-알키닐시토신, 5-클로로시토신, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, N^2-디메틸구아닌, 7-데아자구아닌, 8-아자구아닌, 7-데아자-7-치환된 구아닌, 7-데아자-7-(C2-C6)알키닐구아닌, 7-데아자-8-치환된 구아닌, 8-하이드록시구아닌, 6-티오구아닌, 8-옥소구아닌, 2-아미노푸린, 2-아미노-6-클로로푸린, 2,4- 디아미노푸린, 2,6-디아미노푸린, 8-아자푸린, 치환된 7-데아자푸린, 7-데아자-7-치환된 푸린, 7-데아자-8-치환된 푸린, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0120] sgRNA는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 합성될 수 있다. 일부 구현예에서, sgRNA는 화학적으로 합성된다. 변형된 sgRNA는 2'-O-티오노카르바메이트-보호된 뉴클레오시드 포스포아미다이트를 사용해 합성될 수 있다. 방법들은, 예를 들어 Dellinger 등의 문헌[*J.American Chemical Society*, 133, 11540-11556 (2011)]; Threlfall 등의 문헌[*Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 746-754 (2012)]; 및 Dellinger 등의 문헌[*J. American Chemical Society*, 125, 940-950 (2003)]에 기술되어 있다. 변형된 sgRNA는, 예를 들어 TriLink BioTechnologies (San Diego, CA)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0121] 유용한 sgRNA에 대한 추가적인 상세한 설명은, 예를 들어 등의 문헌[*Nat Biotechnol*, 2015, 33(9): 985-989] 및 Dever 등의 문헌[*Nature*, 2016, 539: 384-389]에서 확인할 수 있으며, 그 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0122] 당업자는 본 개시에 개시된 바와 같은 가이드 RNA가 당업계에 공지된 임의의 Cas 단백질(예를 들어 임의의 적절한 유기체 또는 박테리아 종 유래의 임의의 Cas 유형)과 조합하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0123] Cas 단백질은 I형, II형, III형, IV형, V형, 또는 VI형 Cas 단백질일 수 있다. Cas 단백질은 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다. 도메인의 비제한적인 예는 가이드 핵산 인식 및/또는 결합 도메인, 뉴클레아제 도메인(예: DNase 또는 RNase 도메인, RuvC, HNH), DNA 결합 도메인, RNA 결합 도메인, 헬리카제 도메인, 단백질-단백질 상호작용 도메인, 및 이량체화 도메인을 포함한다. 가이드 핵산 인식 및/또는 결합 도메인은 가이드 핵산과 상호작용할 수 있다. 뉴클레아제 도메인은 핵산 절단을 위한 촉매 활성을 포함할 수 있다. 뉴클레아제 도메인은 핵산 절단을 위한 촉매 활성이 결여되어 있을 수 있다. Cas 단백질은 다른 단백질 또는 폴리펩티드에 융합된 키메라 Cas 단백질일 수 있다. Cas 단백질은, 예를 들어 상이한 Cas 단백질 유래의 도메인을 포함하는, 다양한 Cas 단백질의 키메라일 수 있다.

[0124] Cas 단백질의 비제한적인 예는 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, Cas1O, Cas1Od, 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, 및 Cul966, 및 이들의 동족체 또는 변형된 버전을 포함한다.

[0125] Cas 단백질은 임의의 적절한 유기체로부터 유래될 수 있다. 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 화농성연쇄상구균(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 연쇄상구균 종(Streptococcus sp.), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 노카르디옵시스 다손빌레이(Nocardiopsis dassonvillei), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모진(Streptomyces viridochromo genes), 스트렙토마이세스 비리도크로모진(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로제움(Streptosporangium roseum), 알리시클로바실러스 아시도칼다리우스(AlicyclobacHlus acidocaldarius), 바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides), 바실러스 셀레니티리듀센스(Bacillus selenitireducens), 엑

시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum), 락토바실러스 델브루에키(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 미크로스킬라 마리나(Microscilla marina), 버크홀데리아레스 박테리움(Burkholderiales bacterium), 폴라로모나스 나프탈레니보란(Polaromonas naphthalenivorans), 폴라로모나스 종, 크로코스파에라 왓소니(Crocosphaera watsonii), 시아노테스 종(Cyanothece sp.), 마이크로시스티스 애루기노사(Microcystis aeruginosa), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 시네코코커스 종(Synechococcus sp.), 아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum), 암모니펙스 데겐시이(Ammonifex degensii), 칼디셀룰로시럽터 베시(Caldicelulosiruptor becscii), 칸디다투스 데설포루디스(Candidatus Desulforudis), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 디피실리균(Clostridium difficile), 피네골디아 마그나(Finegoldia magna), 나트라나에로비우스 써모필러스(Natranaerobius thermophilus), 펠로토마쿨룸 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum), 애시디티오바실러스 칼두스(Acidithiobacillus caldus), 애시디티오바실러스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans), 알로크로마티움 비노섬(Allochromatium vinosum), 마리노박터 종(Marinobacter sp.), 니트로소코커스 할로필러스(Nitrosococcus halophilus), 니트로소코커스 왓소니(Nitrosococcus watsoni), 슈도알테로모나스 할로플랑크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis), 크테도노박터 라세미페르(Ktedonobacter racemifer), 메타노할로비움 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum), 아나바에나 바리아빌리스(Anabaena variabilis), 노둘라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena), 노스톡 종(Nostoc sp.), 아르트로스피라 맥시마(Arthrospira maxima), 아르트로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis), 아르트로스피라 종, 링비아 종(Lyngbya sp.), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes), 오실라토리아 종(Oscillatoria sp.), 페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis), 써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus), 아카리오클로리스 마리나(Acaryochloris marina), 렙토트리키아 샤히(Leptotrichia shahii), 및 프란시셀라 노비시다(Francisella novicida). 일부 양태에서, 유기체는 화농성연쇄상구균(S. pyogenes)이다. 일부 양태에서, 유기체는 황색포도구균(S. aureus)이다. 일부 양태에서, 유기체는 스트렙토코쿠스 써모필루스(S. thermophilus)이다.

[0126] Cas 단백질은 다음을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다양한 박테리아 종으로부터 유래될 수 있다: 비정형 베일로넬라(Veillonella atypical), 푸소박테륨 뉴클레아툼(Fusobacterium nucleatum), 필리팩터 알로시스(Filifactor alocis), 솔로박테리움 무레이(Solobacterium moorei), 코프로코쿠스 카투스(Coprococcus catus), 트레포네마 덴티콜라(Treponema denticola), 펩토니필루스 듀에르데니이(Peptoniphilus duerdenii), 카테니박테리움 미츠오카이(Catenibacterium mitsuokai), 스트렙토코커스 뮤탄스(Streptococcus mutans), 리스테리아 이노쿠아(Listeria innocua), 스타필로코커스 슈드인터메디우스(Staphylococcus pseudintermedius), 애시드아미노코커스 인테스틴(Acidaminococcus intestine), 올세넬라 울리(Olsenella uli), 외노코커스 키타하라에(Oenococcus kitaharae), 비피도박테리움 바피덤(Bifidobacterium bifidum), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri), 피네골디아 마그나(Finegoldia magna), 마이코플라스마 모바일(Mycoplasma mobile), 마이코플라스마 갈리셉티쿰(Mycoplasma gallisepticum), 마이코플라스마 오비뉴모니아이(Mycoplasma ovipneumoniae), 마이코플라스마 카니스(Mycoplasma canis), 마이코플라스마 시노비아이(Mycoplasma synoviae), 유박테리움 렉탈(Eubacterium rectale), 스트렙토코커스 써모필루스(Streptococcus thermophilus), 유박테리움 돌리쿰(Eubacterium dolichum), 락토바실러스 코리니포르미스 아종 토르쿠엔스(Lactobacillus coryniformis subsp. Torquens), 일리오박터 폴리트로푸스(Ilyobacter polytropus), 루미니코커스 알부스(Ruminococcus albus), 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila), 애시도써무스 셀룰로리티쿠스(Acidothermus cellulolyticus), 비피토박테리움 롱섬(Bifidobacterium longum), 비피도박테리움 덴티움(Bifidobacterium dentium), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diphtheria), 엘루시마이크로비움균(Elusimicrobium minutum), 니트라프락토르 살수기니스(Nitratifractor salsuginis), 스파에로카에타 글루버스(Sphaerochaeta globus), 피브로박터 숙시노게네스 아종 숙시노게네스(Fibrobacter succinogenes subsp. Succinogenes), 박테로이드 프라길리스(Bacteroides fragilis), 카프노사이토파가 오크라체아(Capnocytophaga ochracea), 로도슈도모나스 팔루스트리스(Rhodopseudomonas palustris), 프레보텔라 미칸스(Prevotella micans), 프레보텔라 루미니콜라(Prevotella ruminicola), 플라보박테리움 컬럼아레(Flavobacterium columnare), 아미노모나스 파우시보란스(Aminomonas paucivorans), 로도스피리룸 루브룸(Rhodospirillum rubrum), 칸디다투스 푸니세이스피릴룸 마리눔(Candidatus Puniceispirillum marinum), 버미네프로박터 에이세니에(Verminephrobacter eiseniae), 랄스토니아 시지기이(Ralstonia syzygii), 디노로세오박터 시바에(Dinoroseobacter shibae), 아조시피릴룸 니트로박터 함부르겐시스(Azospirillum, Nitrobacter hamburgensis), 브래디리조비움(Bradyrhizobium), 월리넬라 숙시노게네스(Wolinella succinogenes), 캄필로박터 제주니 아종 제주니(Campylobacter jejuni subsp. Jejuni), 헬리코박터 무스텔라에(Helicobacter

mustelae), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 애시도보락스 에브레우스(Acidovorax ebreus), 웰치간균(Clostridium perfringens), 파비바큘룸 라바멘티보란스(Parvibaculum lavamentivorans), 로세부리아 인테스티날리스(Roseburia intestinalis), 수막구균(Neisseria meningitidis), 파스튜렐라 멀토시다 아종 멀토시다(Pasteurella multocida subsp. Multocida), 수테렐라 바드워르텐시스(Sutterella wadsworthensis), 프로테오박테리움(proteobacterium), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 파라수테렐라 엑스크레멘티호미니스(Parasutterella excrementihominis), 윌리넬라 숙시노게네스(Wolinella succinogenes), 및 프란시셀라 노비시다(Francisella novicida). 이 경우에, 용어 "유래된"은 박테리아 종의 자연 발생 품종으로부터 변형되어 박테리아 종의 자연 발생 품종의 유의한 부분 또는 이와 유의한 상동성을 유지하는 것으로서 정의된다. 유의한 부분(significant portion)은 적어도 10개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 30개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 40개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 50개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 60개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 70개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 80개의 연속 뉴클레오티드, 적어도 90개의 연속 뉴클레오티드, 또는 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드일 수 있다. 유의한 상동성은 적어도 50% 상동성, 적어도 60% 상동성, 적어도 70% 상동성, 적어도 80% 상동성, 적어도 90% 상동성, 또는 적어도 95% 상동성일 수 있다. 유래된 종은 자연 발생 품종의 활성을 유지하면서 변형될 수 있다.

[0127] 유전자 편집 방법

[0128] 전술한 바와 같이, 본 개시의 구현예는 관절 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공하며, 여기서 관절 세포의 일부를 유전자 편집을 통해 유전적으로 변형시켜 관절 장애를 치료한다. 본 개시의 구현예는, 하나 이상의 단백질의 발현을 촉진하는 것 및 하나 이상의 단백질의 발현을 억제하는 것 둘 다를 비롯하여 이들의 조합을 위해, 윤활막세포의 모집단 내로의 뉴클레오티드 삽입(RNA 또는 DNA) 또는 재조합 단백질 삽입을 통한 유전자 편집을 포함한다. 본 개시의 구현예는 또한 유전자-편집 조성물을 관절 세포에 전달하고, 특히 유전자-편집 조성물을 윤활막세포에 전달하는 방법을 제공한다. 관절 세포를 유전적으로 변형시키는 데 사용될 수 있고, 본 개시에 따라 사용하기에 적합한 여러 유전자 편집 기술이 있다.

[0129] 일부 구현예에서, 관절 세포를 유전적으로 변형시키는 방법은 하나 이상의 단백질을 생산하기 위한 유전자를 안정적으로 혼입하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 관절의 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 레트로바이러스 형질도입 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 관절의 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 렌티바이러스 형질도입 단계를 포함한다. 렌티바이러스 형질도입 시스템은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 Levine 등의 문헌[Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77]; Zufferey 등의 문헌[Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75]; Dull 등의 문헌[J. Virology 1998, 72, 8463-71], 및 미국 특허 제6,627,442호에 기술되어 있으며, 상기 문헌 각각의 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다. 일 구현예에서, 관절의 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 감마-레트로바이러스 형질도입 단계를 포함한다. 감마-레트로바이러스 형질도입 시스템은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 Cepko 및 Pear의 문헌[Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16]에 기술되어 있으며, 동 문헌의 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다. 일 구현예에서, 관절의 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 트랜스포존-매개 유전자 전달 단계를 포함한다. 트랜스포존-매개 유전자 전달 시스템은 당업계에 알려져 있고, 유전자이식 세포에서 유전자전위효소(transposase)의 장기 발현이 발생하지 않도록 유전자전위효소가 DNA 발현 벡터로서 제공되거나 발현 가능한 RNA 또는 단백질로서 제공되는, 예를 들어 유전자전위효소가 mRNA(예: 캡 및 폴리-A 꼬리를 포함하는 mRNA)로서 제공되는 시스템을 포함한다. SBSB10, SB11, 및 SB100x와 같은 연어형 Tel-유사 유전자전위효소(SB 또는 슬리핑 뷰티 유전자전위효소); 및 효소 활성이 증가된 조작된 효소를 포함하는 적절한 트랜스포존-매개 유전자 전달 시스템이 예를 들어 Hackett 등의 문헌[*Mol.* Therapy **2010,** *18,* 674-83] 및 미국 특허 제6,489,458호에 기술되어 있으며, 상기 문헌 각각의 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0130] 일부 양태에서, 바이러스 벡터 또는 시스템은 관절을 포함하는 세포에 유전자-편집 시스템을 도입하는 데 사용된다. 일부 양태에서, 세포는 활막 섬유아세포이다. 일부 양태에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다. 일부 양태에서, AAV 벡터는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈청형을 포함한다: AAV1, AAV1(Y705+731F+T492V), AAV2(Y444+500+730F+T491V), AAV3(Y705+731F), AAV4, AAV5, AAV5(Y436+693+719F), AAV6, AAV6 (VP3 변이체 Y705F/Y731F/T492V), AAV-7m8, AAV8, AAV8(Y733F), AAV9, AAV9 (VP3 변이체 Y731F), AAV10(Y733F), AAV-ShH10, 및 AAV-DJ/8. 일부 양태에서, AAV 벡터는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈청형을 포함한다: AAV1, AAV5, AAV6, AAV6 (Y705F/Y731F/T492V), AAV8, AAV9, 및 AAV9 (Y731F).

[0131] 일부 양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스이다. 일 양태에서, 렌티바이러스는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 인간 면역결핍 바이러스-1(HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스-2(HIV-2), 유인원 면역결핍 바이러스

(SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 소 면역결핍 바이러스(BIV), 젬브라나병(Jembrana Disease) 바이러스(JDV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV), 및 산양 관절염 뇌염 바이러스(CAVEV).

[0132] 일 구현예에서, 관절 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 하나 이상의 단백질을 생산 또는 억제(예: 침묵화)하기 위한 유전자를 안정적으로 혼입하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 관절의 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 리포좀 형질감염 단계를 포함한다. 리포좀 형질감염 방법, 예컨대 여과된 물 중에서 양이온성 지질 *N*-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-*n*,*n*,*n*-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA) 및 디올레오일 포스포티딜에탄올아민(DOPE)의 1:1(w/w) 리포좀 제형을 사용하는 방법은 당업계에 알려져 있고, Rose 등의 문헌[*Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525] 및 Felgner 등의 문헌[*Proc.* Natl. Acad. Sci. USA, **1987,** *84,* 7413-7417] 및 미국 특허 제5,279,833호; 제5,908,635호; 제6,056,938호; 제6,110,490호; 제6,534,484호; 믹 제7,687,070호에 기술되어 있으며, 이들 각각의 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다. 일 구현예에서, 관절의 윤활막세포의 일부를 유전적으로 변형시키는 방법은 미국 특허 제5,766,902호; 제6,025,337호; 제6,410,517호; 제6,475,994호; 및 제7,189,705호에 기술된 방법을 사용하여 형질감염하는 단계를 포함하며; 상기 특허 문헌 각각의 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0133] 일 구현예에 따르면, 유전자 편집 프로세스는 하나 이상의 면역 관문 유전자에서 이중 가닥 또는 단일 가닥 절단의 생성을 매개하는 프로그램 가능한 뉴클레아제의 사용을 포함한다. 이러한 프로그램 가능한 뉴클레아제는 특이적 게놈 유전자좌에 절단을 도입함으로써 정밀한 게놈 편집을 가능하게 한다. 즉, 이들은 게놈 내의 특이적 DNA 서열의 인식에 의존하여 이 위치에 대한 뉴클레아제 도메인을 표적화하고, 표적 서열에서 이중-가닥 절단의 생성을 매개한다. DNA에서의 이중 가닥 절단은 후속하여 내인성 복구 기계를 절단 부위에 동원하여 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 또는 상동성-유도 복구(HDR)에 의해 게놈 편집을 매개한다. 따라서, 절단의 복구는 표적 유전자 산물을 파괴(예를 들어 침묵화, 억제, 또는 강화)하는 삽입/결실 돌연변이의 도입을 초래할 수 있다.

[0134] 부위 특이적 게놈 편집을 가능하게 하도록 개발된 뉴클레아제의 주요 부류는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 뉴클레아제(TALEN), 및 CRISPR-연관 뉴클레아제(예: CRISPR-Cas9)를 포함한다. 이들 뉴클레아제 시스템은 이들의 DNA 인식 모드에 기초하여 2개의 카테고리로 광범위하게 분류될 수 있는데: ZFN 및 TALEN은 단백질-DNA 상호작용을 통해 특이적 DNA 결합을 달성하는 반면, Cas9와 같은 CRISPR 시스템은 표적 DNA와 직접 염기쌍을 형성하는 짧은 RNA 가이드 분자 및 단백질-DNA 상호작용에 의해 특이적 DNA 서열에 대해 표적화된다. 예를 들어 Cox 등의 문헌[*Nature Medicine,* 2015, Vol. 21, No. 2] 참조.

[0135] 본 개시의 방법에 따라 사용될 수 있는 유전자 편집 방법의 비제한적인 예는 CRISPR 방법, TALE 방법, 및 ZFN 방법을 포함하며, 이는 이하에서 더욱 상세히 기술된다.

[0136] CRISPR 방법

[0137] 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물은 유전자 편집 시스템을 포함하며, 여기서 상기 유전자 편집 시스템은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화하고, 유전자 편집은 CRISPR 방법(예: CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas13a, 또는 CRISPR/Cf1a(CRISPR-Cas12a로도 알려짐))에 의해 관절의 윤활막세포의 적어도 일부의 유전자 편집이다. 특정 구현예에 따르면, 관절 윤활막세포를 유전자 편집하기 위한 CRISPR 방법의 사용은 관절의 윤활막세포의 적어도 일부분에서 하나 이상의 면역 관문 유전자의 발현을 침묵화시키거나 감소시킨다.

[0138] CRISPR은 "일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열"을 의미한다. 유전자 편집을 위해 CRISPR 시스템을 사용하는 방법은 본원에서 CRISPR 방법으로서 지칭된다. RNA 및 Cas 단백질을 혼입하고, 본 개시에 따라 사용될 수 있는 3가지 유형의 CRISPR 시스템이 있다: II, V, 및 VI형. II형 CRISPR(Cas9로 예시됨)은 가장 잘 특성화된 시스템 중 하나이다.

[0139] CRISPR 기술은 박테리아 및 고세균(단세포 미생물의 도메인)의 자연 방어 메커니즘으로부터 채택되었다. 이들 유기체는 CRISPR-유래 RNA 및 Cas9를 포함하는 다양한 Cas 단백질을 사용하여, 외래 침입자의 DNA 또는 RNA를 절단하고 파괴함으로써 바이러스 및 다른 이물질에 의한 공격을 저지한다. CRISPR은 2개의 구별되는 특성을 갖는 DNA의 특수한 영역이다: 뉴클레오티드 반복 서열 및 스페이서의 존재. 뉴클레오티드의 반복 서열은 CRISPR 영역 전체에 분포하고, 외래 DNA의 짧은 분절(스페이서)이 반복 서열 사이에 산재한다. II형 CRISPR-Cas 시스템에서, 스페이서는 CRISPR 게놈 유전자좌 내에 통합되고 전사되어 짧은 CRISPR RNA(crRNA)로 가공된다. 이들 crRNA는 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)로 어닐링되어, Cas 단백질에 의해 병원성 DNA의 서열 특이적 절단 및 침묵화를 유도한다. Cas9 단백질에 의한 표적 인식은 crRNA 내에 "시드" 서열을 필요로 하고 crRNA-결합 영역의

상류에 보존된 디뉴클레오티드-함유 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열을 필요로 한다. 이에 의해 CRISPR-Cas 시스템은 crRNA를 재설계함으로써 사실상 모든 DNA 서열을 절단하도록 재표적화될 수 있다. 고유 시스템 내의 crRNA 및 tracrRNA는 유전자 조작에 사용하기 위해 약 100개의 뉴클레오티드로 이루어진 단일 가이드 RNA(sgRNA)로 단순화될 수 있다. CRISPR-Cas 시스템은 Cas9 엔도-뉴클레아제를 발현하는 플라스미드 및 필요한 crRNA 및 tracrRNA (또는 sgRNA) 성분을 공동 전달함으로써 인간 세포에 직접 전달할 수 있다. 표적화 제한을 감소시키기 위해 Cas 단백질의 상이한 변이체(예를 들어 Cpf1과 같은 Cas9의 오르소로그)가 사용될 수 있다.

[0140] *CRSIPR-Cas 매개 상동성 재조합*

[0141] 상동성 재조합(HR)을 위한 CRISPR-Cas 시스템은 Cas 뉴클레아제(예: Cas9 뉴클레아제) 또는 이의 변이체 또는 단편; 표적 게놈 DNA에 대해 Cas 뉴클레아제를 표적화하는 가이드 서열 및 Cas 뉴클레아제와 상호 작용하는 스캐폴드 서열을 함유하는 DNA-표적화 RNA(예: 단일 가이드 RNA(sgRNA)); 및 공여자 템플릿을 포함한다. CRISPR-Cas 시스템은, 세포의 게놈 내 원하는 표적 유전자좌에서 이중 가닥 절단을 생성하고, 상동성-유도 복구(HDR)에 의해 유도된 절단을 복구하기 위해 세포의 내인성 메커니즘을 이용하도록 사용될 수 있다.

[0142] CRISPR-Cas9 뉴클레아제는 AAV 벡터에 의해 전달된 외인성 DNA의 유전자좌-특이적 염색체 통합을 용이하게 할 수 있다. 일반적으로, 통합될 수 있는 외인성 DNA(예를 들어 이식 유전자, 발현 카세트 등)의 크기는 약 4.0 kb인 AAV 벡터의 DNA 패키징 용량에 의해 제한된다. 상동성 재조합에 필요한 2개의 상동 아암을 포함함으로써, 단일 AAV 벡터는 약 3.7 kb 미만의 외인성 DNA만을 전달할 수 있다. 본원에 기술된 방법은 2개의 상이한 AAV 벡터 사이에서 뉴클레오티드 서열을 분할함으로써 4 kb 이상인 외인성 DNA를 전달할 수 있게 한다. 공여자 템플릿은 뉴클레오티드 서열의 2개의 부분을 통합하고 융합할 수 있는 순차적 상동성 재조합 이벤트를 위해 설계된다.

[0143] 본 개시의 상동성 재조합은 CRISPR-Cas 뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 조작된 메가 뉴클레아제와 같은 그러나 이에 한정되지 않는, 게놈 편집을 위한 조작된 뉴클레아제 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 일 양태에서, CRISPR-Cas-기반 뉴클레아제 시스템이 사용된다. 유용한 뉴클레아제 시스템에 대한 상세한 설명은, 예를 들어 Gaj 등의 문헌[*Trends Biotechnol*, 2013, Jul: 31(7):397-405]을 참조한다.

[0144] 임의의 적절한 CRISPR/Cas 시스템이 본원에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은 다양한 명명 시스템을 사용하여 지칭될 수 있다. 예시적인 명명 시스템은 Makarova, K. S. 등의 문헌["An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems," Nat Rev Microbiol (2015) 13:722-736] 및 Shmakov, S. 등의 문헌["Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems," Mol Cell (2015) 60:1-13]에 제공되어 있다. CRISPR/Cas 시스템은 I형, II형, III형, IV형, V형, VI형 시스템, 또는 임의의 다른 적절한 CRISPR/Cas 시스템일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템은 클래스 1, 클래스 2, 또는 임의의 다른 적절하게 분류된 CRISPR/Cas 시스템일 수 있다. 클래스 1 CRISPR/Cas 시스템은 조절을 수행하기 위한 다수의 Cas 단백질의 복합체를 사용할 수 있다. 클래스 1 CRISPR/Cas 시스템은, 예를 들어 I형(예: I, IA, IB, IC, ID, IE, IF, IU), III형(예: III, IIIA, IIIB, IIIC, IIID), 및 IV형(예: IV, IVA, IVB) CRISPR/Cas 유형을 포함할 수 있다. 클래스 2 CRISPR/Cas 시스템은 조절을 수행하기 위한 하나의 큰 Cas 단백질을 사용할 수 있다. 클래스 2 CRISPR/Cas 시스템은, 예를 들어 II형(예: II, IIA, IIB) 및 V형 CRISPR/Cas 유형을 포함할 수 있다. CRISPR 시스템은 서로 상보적일 수 있고/있거나, CRISPR 유전자좌 표적화를 용이하게 하기 위해 기능적 단위를 트랜스에 부여할 수 있다.

[0145] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 재조합 발현 벡터에 존재한다. 소정의 경우에, 재조합 발현 벡터는 바이러스 작제물, 예를 들어 재조합 아데노-연관 바이러스 작제물, 재조합 아데노바이러스 작제물, 재조합 렌티바이러스 작제물 등이다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 우두 바이러스, 폴리오바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, SV40, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 등에 기초할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 쥣과 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 및 다음과 같은 레트로바이러스 유래 벡터에 기초할 수 있다: 라우스 육종 바이러스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 렌티바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 골수증식성 육종 바이러스, 유방 종양 바이러스 등. 유용한 발현 벡터는 당업자에게 공지되어 있고, 많은 수가 상업적으로 이용 가능하다. 다음 벡터는 예로서 제공되는 진핵 숙주 세포에 대한 것이다: pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG, 및 pSVLSV40. 그러나, 임의의 다른 벡터가 숙주 세포와 양립할 수 있는 경우 이를 사용할 수 있다. 예를 들어, Cas9 효소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 유용한 발현 벡터는, 예를 들어 Addgene, Life Technologies, Sigma-Aldrich, 및 Origene으로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0146] 숙주 세포는 감염성 AAV 벡터를 생성하는 데 필요할 뿐만 아니라 개시된 AAV 벡터에 기초하여 AAV 비리온을 생성하는 데에도 필요하다. 다양한 숙주 세포가 당업계에 공지되어 있고 본 개시의 방법에서 사용될 수 있다. 본원에 기술되거나 당업계에 공지된 임의의 숙주 세포가 본원에 기술된 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있다.

[0147] 일부 구현예에서, 감염성 비리온을 생성하는 데 사용하기 위한 숙주 세포는 원핵 세포(예: 박테리아)를 포함하는 임의의 생물학적 유기체, 및 곤충 세포, 효모 세포, 및 포유류 세포를 포함하는 진핵 세포로부터 선택될 수 있다. 예를 들어 쥣과 세포 및 영장류 세포(예: 인간 세포)를 포함하는 포유류 세포와 같은 다양한 세포가 사용될 수 있다. 특히 바람직한 숙주 세포는 임의의 포유류 종 중에서 선택되며, 여기에는 인간, 원숭이, 마우스, 랫트, 및 햄스터를 포함하는 포유동물에서 유래된 세포들, 예컨대 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 cells, HT1080, 인간 배아 신장(HEK), 인간 배아 줄기 세포, 성인 조직 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 재프로그램된 줄기 세포, 오르가노이드 줄기 세포, 골수 줄기 세포, HLHepG2, HepG2 및 일차 섬유아세포, 간세포, 및 근육아세포 세포 등이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 사용된 세포에 대한 요건은 AAV 벡터에 의한 감염 또는 형질감염이 가능해야 한다는 것이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 세포에서 안정적으로 형질감염되는 rep 및 cap을 갖는 세포이다.

[0148] 일부 구현예에서, 본 개시에 따른 숙주 세포의 제조는 선택된 DNA 서열의 조립과 같은 기술을 포함한다. 이러한 조립은 종래의 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 이러한 기술은 다음을 포함한다: 잘 알려져 있고 전술한 Sambrook 등의 문헌에 기술된 cDNA 및 게놈 클로닝; 중합효소 연쇄 반응과 조합된 아데노바이러스 및 AAV 게놈의 중첩 올리고뉴클레오티드 서열의 사용; 합성 방법; 및 원하는 뉴클레오티드 서열을 제공하기 위한 임의의 다른 적절한 방법.

[0149] AAV 벡터에 추가하여, 숙주 세포는 (숙주 세포에서) AAV 캡시드 폴리펩티드의 발현을 유도하기 위한 서열 및 AAV 벡터에서 발견되는 AAV 역위 말단 반복(ITR)의 혈청형과 동일한 혈청형 또는 교차 상보성 혈청형의 rep(복제) 서열을 함유할 수 있다. AAV 캡시드 및 rep(복제) 서열은 AAV 공급원으로부터 독립적으로 수득될 수 있고, 당업자에게 알려진 또는 본원에 기술된 것과 같은 임의의 방식으로 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 또한, 예를 들어 AAV8 캡시드에서 AAV 벡터를 위형화(pseudotyping)하는 경우, 필수 rep(복제) 단백질 각각을 암호화하는 서열이 AAV8에 의해 공급될 수 있거나, rep(복제) 단백질을 암호화하는 서열이 상이한 AAV 혈청형(예: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, 및/또는 AAV9)에 의해 공급될 수 있다.

[0150] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 적절한 프로모터의 조절 하에 캡시드 단백질을 안정적으로 함유한다. 일부 구현예에서, 캡시드 단백질은 트랜스에서 숙주 세포에 공급된다. 트랜스에서 숙주 세포에 전달될 때, 캡시드 단백질은 숙주 세포에서 선택된 캡시드 단백질의 발현을 유도하는 데 필요한 서열을 함유하는 플라스미드를 통해 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 트랜스에서 숙주 세포에 전달될 때, 캡시드 단백질을 암호화하는 벡터는 AAV를 패키징하는 데 필요한 다른 서열, 예를 들어 rep(복제) 서열도 전달한다.

[0151] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 적절한 프로모터의 조절 하에 rep(복제) 서열을 안정적으로 함유한다. 또 다른 구현예에서, rep(복제) 단백질이 트랜스에서 숙주 세포에 공급된다. 트랜스에서 숙주 세포에 전달될 때, rep(복제) 단백질은 숙주 세포에서 선택된 rep(복제) 단백질의 발현을 유도하는 데 필요한 서열을 함유하는 플라스미드를 통해 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 트랜스에서 숙주 세포에 전달될 때, 캡시드 단백질을 암호화하는 벡터는 AAV 벡터를 패키징하는 데 필요한 다른 서열, 예를 들어 rep(복제) 서열도 전달한다.

[0152] 일부 구현예에서, rep(복제) 및 캡시드 서열은 단일 핵산 분자 상의 숙주 세포 내로 형질감염되어, 통합되지 않은 에피솜으로서 세포 내에 안정적으로 존재할 수 있다. 또 다른 구현예에서, rep(복제) 및 캡시드 서열은 세포의 염색체 내에 안정적으로 통합된다. 또 다른 구현예는 숙주 세포에서 일시적으로 발현된 rep(복제) 및 캡시드 서열을 갖는다. 예를 들어, 이러한 형질감염에 유용한 핵산 분자는, 5'에서 3' 방향으로, 프로모터, 프로모터와 rep(복제) 유전자 서열의 시작 부위 사이에 개재된 임의 스페이서, AAV rep(복제) 유전자 서열, 및 AAV 캡시드 유전자 서열을 포함한다.

[0153] rep(복제) 및 캡시드를 제공하는 분자(들)가 숙주 세포에 (형질감염을 통해) 일시적으로 존재할 수 있어도, 일부 구현예에서, rep(복제) 및 캡시드 단백질 중 하나 또는 둘 모두 및 이들의 발현을 조절하는 프로모터(들)가, 예를 들어 에피솜으로서 또는 숙주 세포의 염색체 내에 혼입됨으로써, 숙주 세포에서 안정적으로 발현될 수 있다. 본 개시의 구현예를 구성하기 위해 사용되는 방법은 전술한 참조 문헌에 기술된 것과 같은 종래의 유전자 조작 또는 재조합 조작 기술이다.

[0154] AAV 비리온을 생성하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 본원에 기술된 AAV 벡터를 포함하는 AAV 비리온을 생성하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 상기 방법들은 AAV 벡터를 AAV 비리온으로 패키징할 수 있는 숙주 세포 내로 본 개시의 AAV 벡터를 삽입하거나 형질도입하는 단계를 포함하였다. 예시적인 방법이 아래에 기술되고 언급되지만; 당업자에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 본 개시의 AAV 비리온을 생성할 수 있다.

[0155] 이종 핵산(예를 들어 공여자 템플릿)을 포함하고 AAV 비리온을 생성하는 데 사용되는 AAV 벡터는 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 작제될 수 있다. 예를 들어, Koerber 등의 문헌[(2009) *Mol. Ther.,* 17:2088]; Koerber 등의 문헌[(2008) *Mol Ther.*, 16: 1703-1709]; 뿐만 아니라 미국 특허 제7,439,065호, 제6,951,758호, 및 제6,491,907호 참조. 예를 들어, 이종 서열(들)은 AAV 게놈으로부터 절제된 주요 AAV 개방 해독 프레임("ORF")과 함께 AAV 게놈 내에 직접 삽입될 수 있다. ITR의 일부가 복제 및 패키징 기능을 허용하기에 충분할 정도로 남아 있는 한, AAV 게놈의 다른 부분도 결실될 수 있다. 이러한 작제물은 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 설계될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,173,414호 및 제5,139,941호; 국제 공개 제WO 92/01070호(1992년 1월 23일 공개) 및 제WO 93/03769호(1993년 3월 4일 공개); Lebkowski 등의 문헌[(1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996]; Vincent 등의 문헌[(1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press)]; Carter, B. J.의 문헌[(1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539]; Muzyczka, N.의 문헌[(1992) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 158:97-129]; Kotin, R. M.의 문헌[(1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801]; Shelling 및 Smith의 문헌[(1994) *Gene Therapy* 1:165-169]; 및 Zhou 등의 문헌[(1994*) J. Exp. Med.* 179:1867-1875] 참조.

[0156] AAV 비리온을 생산하기 위해, AAV 벡터를 형질감염과 같은 공지된 기술을 사용하여 적절한 숙주 세포 내로 도입한다. 다수의 형질감염 기술이 당업계에 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, Graham 등의 문헌[(1973) *Virology*, 52:456], Sambrook 등의 문헌[(1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York], Davis 등의 문헌[(1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier], 및 Chu 등의 문헌[(1981) *Gene* 13:197] 참조. 특히 적합한 형질감염 방법은 인산칼슘 공침전을 포함한다(Graham 등의 문헌[(1973) *Virol.* 52:456-467]), 배양된 세포 내로의 직접 미세 주입(Capecchi, M. R.의 문헌[(1980) *Cell* 22:479-488]), 전기천공(Shigekawa 등의 문헌[(1988) *BioTechniques* 6:742-751]), 리포좀 매개 유전자 전달(Mannino 등의 문헌[(1988) *BioTechniques* 6:682-690]), 지질 매개 형질도입(Felgner 등의 문헌[(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417]), 및 고속 미세발사체를 사용한 핵산 전달(Klein 등의 문헌[(1987) *Nature* 327:70-73])을 포함한다.

[0157] 사용된 발현 체계에 따라, 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함하는 다수의 전사 및 번역 조절 요소 중 어느 하나가 발현 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 프로모터는 바이러스, 또는 임의의 유기체, 예를 들어 원핵 또는 진핵 유기체로부터 유래될 수 있다. 적합한 프로모터는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 장말단 반복(LTR) 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(Ad MLP), 단순 포진 바이러스(HSV) 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터(CMV 즉시 초기 프로모터 영역; CMVIE), 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 인간 U6 핵 프로모터(U6), 강화된 U6 프로모터, 및 인간 HI 프로모터(HI) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0158] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 본 개시에 사용될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드(예: mRNA)는, 예를 들어 TriLink BioTechnologies, GE Dharmacon, ThermoFisher 등으로부터 상업적으로 구입할 수 있다.

[0159] 소정의 구현예에서, Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드)가 본 개시에 사용될 수 있다. 유용한 Cas9 폴리펩티드에 대한 상세한 설명은, 예를 들어 등의 문헌[*Nat Biotechnol*, 2015, 33(9): 985-989] 및 Dever 등의 문헌[*Nature*, 2016, 539: 384-389]에서 확인할 수 있으며, 그 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0160] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제(예: Cas9 폴리펩티드)는 sgRNA와 복합체화되어 Cas 리보뉴클레오단백질(예: Cas9 리보뉴클레오단백질)을 형성한다. Cas 뉴클레아제 대 sgRNA의 몰비는 표적화 AAV 벡터와 표적 유전자좌의 순차적 상동성 재조합을 용이하게 하는 임의의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 폴리펩티드 대 sgRNA의 몰비는 약 1:5; 1:4; 1:3; 1:2.5; 1:2; 또는 1:1이다. 다른 구현예에서, Cas9 폴리펩티드 대 sgRNA의 몰비는 약 1:2 내지 약 1:3이다. 소정의 구현예에서, Cas9 폴리펩티드 대 sgRNA의 몰비는 약 1:2.5이다.

[0161] Cas 뉴클레아제 및 이의 변이체 또는 단편은 Cas 폴리펩티드 또는 이의 변이체 또는 단편, Cas 폴리펩티드 또는 이의 변이체 또는 단편을 암호화하는 mRNA, Cas 폴리펩티드 또는 이의 변이체 또는 단편을 암호화하는 뉴클레오

티드 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 또는 Cas 리보뉴클레오단백질로서 세포(예를 들어 대상체로부터 단리된 세포, 또는 대상체 내에 있는 것과 같은 생체 내 세포) 내로 도입될 수 있다. 당업자는 외인성 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 또는 리보뉴클레오단백질을 전달하는 임의의 방법이 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 방법의 비제한적인 예는 전기천공, 핵감염, 형질감염, 리포펙션, 형질도입, 미세주입, 전기주입, 전기융합, 나노입자 충돌, 형질전환, 접합 등을 포함한다.

[0162] CRISPR 방법을 통해 윤활막세포를 영구적으로 유전자 편집함으로써 침묵화되거나 억제될 수 있는 유전자의 비제한적인 예는 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, 및 TNF-α를 포함한다.

[0163] CRISPR 방법을 통해 윤활막세포를 영구적으로 유전자 편집함으로써 강화될 수 있는 유전자의 비제한적인 예는 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, 및 TNF-α를 포함한다.

[0164] CRISPR 방법에 의해 표적 유전자 서열의 발현을 변경시키기 위한 시스템, 방법, 및 조성물의 실시예로서, 본 개시의 구현예에 따라 사용될 수 있는 실시예는 미국 특허 제8,697,359호; 제8,993,233호; 제8,795,965호; 제8,771,945호; 제8,889,356호; 제8,865,406호; 제8,999,641호; 제8,945,839호; 제8,932,814호; 제8,871,445호; 제8,906,616호; 및 제8,895,308호에 기술되어 있다. CRISPR-Cas9 방법을 수행하기 위한 자원, 예컨대 CRISPR-Cas9 및 CRISPR-Cpf1을 발현시키기 위한 플라스미드는 GenScript와 같은 회사로부터 상업적으로 구입할 수 있다.

[0165] 일 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은, 관절 윤활막세포의 적어도 일부의 유전적 변형은 미국 특허 제9,790,490호에 기술된 것과 같은 CRISPR-Cpf1 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 상기 특허의 개시 내용은 본원에 참조로서 통합된다.

[0166] 일 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은, 관절 윤활막세포의 적어도 일부의 유전적 변형은 미국 특허 제9,907,863호에 기술된 것과 같은 단일 벡터 시스템을 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 상기 특허의 개시 내용은 본원에 참조로서 통합된다.

[0167] TALE 방법

[0168] 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 유전자 편집 시스템을 포함하는 약학적 조성물이 제공되며, 상기 유전자 편집 시스템은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적으로 하고, 상기 방법은 TALE 방법에 의해 관절 윤활막세포의 적어도 일부를 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에 따르면, 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화하기 위한 TALE 방법의 용도가 제공되며, 여기서 유전자 편집은 관절의 윤활막세포의 적어도 일부의 유전자 편집이다. 대안적으로, 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화하기 위한 동안에 TALE 방법의 용도가 제공되며, 여기서 관절의 윤활막세포의 적어도 일부를 유전자 편집하는 것은 관절 윤활막세포의 적어도 일부에서 관절 기능 유전자와 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 강화시킨다.

[0169] TALE은 "전사 활성화제-유사 효과기(Transcription Activator-Like Effector)" 단백질을 의미하며, TALEN("전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(Transcription Activator-Like Effector Nucleases)"을 포함한다. 유전자 편집을 위해 TALE 시스템을 사용하는 방법은 본원에서 TALE 방법으로서 지칭될 수도 있다. TALE은 식물 병원성 박테리아 속 크산토모나스(*Xanthomonas*)로부터 자연적으로 발생하는 단백질이며, 단일 염기쌍을 각각 인식하는 일련의 33~35개의 아미노산 반복 도메인으로 이루어진 DNA-결합 도메인을 함유한다. TALE 특이성은 반복-가변 이중 잔기(RVD)로서 알려진 2개의 초가변 아미노산에 의해 결정된다. 모듈형 TALE 반복은 함께 연결되어 연속 DNA 서열을 인식한다. DNA 결합 도메인 내의 특이적 RVD는 표적 유전자좌 내의 염기를 인식하여, 예측 가능한 DNA 결합 도메인을 조립하기 위한 구조적 특징을 제공한다. TALE의 DNA 결합 도메인은 IIS형 FokI 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 융합되어 표적화 가능한 TALE 뉴클레아제를 만든다. 부위 특이적 돌연변이를 유도하기 위해, 14~20 염기쌍의 스페이서 영역에 의해 분리된 2개의 개별 TALEN 아암을 FokI 단량체와 밀접한 근위에 위치시켜 이량체화하여, 표적화된 이중 가닥 절단을 생성한다.

[0170] 다양한 조립 방법을 이용하는 몇몇 대규모의 체계적인 연구는 TALE 반복이 사실상 임의의 사용자 정의 서열을 인식하도록 조합될 수 있음을 나타냈다. 맞춤형으로 설계된 TALE 어레이 또한 Cellectis Bioresearch(Paris, France), Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington, KY, USA), 및 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)를 통해 상업적으로 이용할 수 있다. 본 개시에 사용하기에 적합한 TALE 및 TALEN 방법은 미국 특허 출원 제US 2011/0201118 A1호; 제US 2013/0117869 A1호; 제US 2013/0315884 A1호; 제US 2015/0203871 A1호; 및 제US 2016/0120906 A1호에 기술되어 있으며, 상기 특허 문헌의 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0171] TALE 방법을 통해 윤활막세포를 영구적으로 유전자 편집함으로써 침묵화되거나 억제될 수 있는 유전자의 비제한적인 예는 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, 및 TNF-α를 포함한다.

[0172] TALE 방법을 통해 윤활막세포를 영구적으로 유전자 편집함으로써 강화될 수 있는 유전자의 비제한적인 예는 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, 및 TNF-α를 포함한다.

[0173] TALE 방법에 의해 표적 유전자 서열의 발현을 변경하기 위한 시스템, 방법, 및 조성물로서 본 개시의 구현예에 따라 사용될 수 있는 시스템, 방법, 및 조성물의 예는 미국 특허 제8,586,526호에 기술되어 있으며, 동 문헌은 참조로서 본원에 통합된다.

[0174] 징크 핑거 방법(Zinc Finger Methods)

[0175] 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 유전자 편집 시스템을 포함하는 약학적 조성물이 제공되며, 상기 유전자 편집 시스템은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적으로 하고, 상기 방법은 징크 핑거 방법 또는 징크 핑거 뉴클레아제 방법에 의해 관절 윤활막세포의 적어도 일부를 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에 따르면, 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화하기 위한 징크 핑거 방법의 용도가 제공되며, 여기서 유전자 편집은 관절의 윤활막세포의 적어도 일부의 유전자 편집이다. 대안적으로, 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화하기 위한 동안에 징크 핑거 방법의 용도가 제공되며, 여기서 관절의 윤활막세포의 적어도 일부를 유전자 편집하는 것은 관절 윤활막세포의 적어도 일부에서 관절 기능 유전자와 관련된 적어도 하나의 유전자좌의 발현을 강화시킨다.

[0176] 개별 징크 핑거는 약 30개 아미노산을 보존된 ββα 구성으로 함유한다. α-나선의 표면 상의 여러 아미노산은 일반적으로 DNA의 주요 홈에서 3 bp와 접촉하며, 선택도 수준은 다양하다. 아연 핑거는 2개의 단백질 도메인을 갖는다. 제1 도메인은, 진핵 전사 인자를 포함하고 징크 핑거를 함유하는 DNA 결합 도메인이다. 제2 도메인은, FokI 제한 효소를 포함하고 DNA의 촉매 절단을 담당하는 뉴클레아제 도메인이다.

[0177] 개별 ZFN의 DNA-결합 도메인은 일반적으로 3개 내지 6개의 개별 징크 핑거 반복을 함유하며, 9개 내지 18개의 염기쌍을 각각 인식할 수 있다. 징크 핑거 도메인이 이들의 의도된 표적 부위에 특이적인 경우, 이론상으로는, 총 18개의 염기쌍을 인식하는 한 쌍의 3-핑거 ZFN만 있어도 포유류 게놈에서 단일 유전자좌를 표적화할 수 있다. 새로운 징크-핑거 어레이를 생성하는 하나의 방법은 알려진 특이성의 더 작은 징크-핑거 "모듈"을 조합하는 것이다. 가장 일반적인 모듈 조립 프로세스는 3개의 염기쌍 DNA 서열을 각각 인식할 수 있는 3개의 별도 징크 핑거를 조합하여 9개의 염기쌍 표적 부위를 인식할 수 있는 3-핑거 어레이를 생성하는 것을 포함한다. 대안적으로, 올리고머화된 풀 조작(OPEN)과 같은 선택 기반 접근법을 사용해, 이웃하는 핑거들 간의 문맥-의존적 상호작용을 고려하는 새로운 징크-핑거 어레이를 랜덤화된 라이브러리로부터 선택할 수 있다. 조작된 징크 핑거는 상업적으로 이용할 수 있고; Sangamo Biosciences(Richmond, CA, USA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)와 협력하여 징크 핑거 작제를 위한 독점 플랫폼(CompoZr®)을 개발하였다.

[0178] 징크 핑거 방법을 통해 윤활막세포를 영구적으로 유전자 편집함으로써 침묵화되거나 억제될 수 있는 유전자의 비제한적인 예는 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18, 매트릭스 금속단백분해효소(MMP), 또는 NLRP3 염증조절복합체 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, NLRP3 염증조절복합체 성분은 NLRP3, ASC(CARD를 함유하는 세포자멸사-연관 반점-유사 단백질), 카스파제-1, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0179] 징크 핑거 방법을 통해 윤활막세포를 영구적으로 유전자 편집함으로써 강화될 수 있는 유전자의 비제한적인 예는 IL-1Ra, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, 및 이들의 조합을 포함하는 군을 포함한다. 일 양태에서, 본 개시는 항염증성 사이토카인의 상향 조절을 위한 조성물을 제공한다.

[0180] 징크 핑거 방법에 의해 표적 유전자 서열의 발현을 변경시키기 위한 시스템, 방법, 및 조성물의 실시예로서, 본 개시의 구현예에 따라 사용될 수 있는 실시예는 미국 특허 제6,534,261호, 제6,607,882호, 제6,746,838호, 제6,794,136호, 제6,824,978호, 제6,866,997호, 제6,933,113호, 제6,979,539호, 제7,013,219호, 제7,030,215호, 제7,220,719호, 제7,241,573호, 제7,241,574호, 제7,585,849호, 제7,595,376호, 제6,903,185호, 및 제6,479,626호에 기술되어 있다.

[0181] 일부 양태에서, 세포는 생체 외에서 유전자 편집될 수 있으며, 여기서 유전자 편집은 하나 이상의 항염증성 사이토카인 유전자좌를 표적으로 한다. 일부 양태에서, 세포는 비활막 세포이다. 일부 양태에서, 세포는 간엽 줄기 세포이다. 일부 양태에서, 세포는 대식세포이다. 일부 양태에서, 본 개시는 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서 유전자 편집된 세포의 모집단을 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서

상기 유전자 편집된 세포는 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화하는 유전자 편집 시스템에 의해 편집된다. 일 양태에서, 유전자 편집된 세포의 모집단은 활막 관절 내에 주입된다.

[0182] 징크 핑거 방법에 의해 표적 유전자 서열의 발현을 변경하기 위한 시스템, 방법, 및 조성물로서 본 개시의 구현예에 따라 사용될 수 있는 시스템, 방법, 및 조성물의 다른 예는 Beane 등의 문헌[*Mol. Therapy*, **2015**, 23 1380-1390]에 기술되어 있으며, 그 개시 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0183] 예시적인 구현예

[0184] 일부 구현예에서, 본 개시는 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR) 유전자 편집 시스템을 암호화하는 하나 이상의 핵산의 치료적 유효량을 포함한다. 상기 시스템은 CRISPR 연관 단백질 9(Cas9 단백질), 및 IL-1α 또는 IL-1β 유전자를 표적으로 하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 포함하며, 여기서 표적 서열은 Cas9 단백질에 대한 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열에 인접한다.

[0185] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2의 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0186] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3의 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0187] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0188] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0189] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6에

서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0190] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0191] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0192] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0193] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0194] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 6 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0195] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 7에서

표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0196] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0197] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0198] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0199] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0200] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서

열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0201] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0202] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 301과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301이다.

[0203] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 309와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309이다.

[0204] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0205] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0206] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0207] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0208] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0209] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0210] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 인간 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0211] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0212] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0213] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4 또는

엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0214] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 6 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0215] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0216] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0217] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의

엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0219] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0220] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0221] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 462와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462이다.

[0222] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 391과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391이다.

[0223] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 393과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393이다.

[0224] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 388과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388이다.

[0225] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 389와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389이다.

[0226] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0227] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 552와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552이다.

[0228] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 554와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554이다.

[0229] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 578과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578이다.

[0230] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 579와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579이다.

[0231] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0232] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 498과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498이다.

[0233] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 506과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열

은 서열번호 506과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506이다.

[0234] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는, 본원에 기술된 것과 은 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1로부터 선택된 재조합 바이러스를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 AAV는 혈청형 5의 AAV(AAV5)이다. 일부 구현예에서, 재조합 AAV는 혈청형 6의 AAV(AAV6)이다.

[0235] 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는, 하나 이상의 핵산 중 Cas9 단백질을 암호화하는 제1 핵산을 포함하는 제1 바이러스 벡터; 및 하나 이상의 핵산 중 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 제2 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 단일 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 포함하며, 여기서 단일 핵산은 Cas9 단백질 및 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화한다.

[0236] 일부 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 리포좀을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 핵산은 네이키드 상태로 존재한다.

[0237] 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 화농성연쇄상구균 Cas9 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 황색포도상구균 Cas9 폴리펩티드이다.

[0238] 일부 구현예에서, 조성물은 비경구 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 대상체의 관절 내에 관절내 주사용으로 제형화된다.

[0239] 또 다른 양태에서, 본 개시는 관절 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 CRISPR 유전자 편집 시스템을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 조성물의 약학적 유효량을 포함하는 약학적 조성물을 대상체의 관절에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 시스템은 CRISPR 연관 단백질 9(Cas9 단백질), 및 IL-1α 또는 IL-1β 유전자를 표적으로 하는 적어도 하나의 가이드 RNA를 포함하며, 여기서 표적 서열은 Cas9 단백질에 대한 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열에 인접한다.

[0240] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 298~387로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0241] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 301과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 301이다.

[0242] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 309와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 309이다.

[0243] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는

다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388~496으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0244] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 462와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 462이다.

[0245] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 391과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 391이다.

[0246] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 393과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 393이다.

[0247] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 388과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 388이다.

[0248] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 인간 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 389와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 389이다.

[0249] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 522~590으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0250] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 552와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 552이다.

[0251] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 554와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 554이다.

[0252] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 578과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578과 적어도 95% 동

일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 578이다.

[0253] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, 서열번호 579와 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579와 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 579이다.

[0254] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0255] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0256] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0257] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0258] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0259] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표

적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1α 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0260] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0261] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0262] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0263] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 6 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0264] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0265] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0266] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0267] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0268] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0269] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA

는 개 IL-1α 유전자를 표적화하고, IL-1α 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0270] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 497~551로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0271] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 498과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 498이다.

[0272] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, 서열번호 506과 적어도 75% 동일성을 갖는 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 서열번호 506이다.

[0273] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 2에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0274] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 3에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0275] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 4에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0276] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열

과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 5에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0277] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 6에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0278] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 5개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 4개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 3개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 2개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 1개 이하의 불일치를 형성한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 개 IL-1β 유전자의 엑손 7에서 표적 서열과 불일치를 형성하지 않는다.

[0279] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0280] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0281] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0282] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 6 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0283] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 4에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β

유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0284] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0285] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0286] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 5에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0287] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나

의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 6에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1β 유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 가이드 RNA는 개 IL-1β 유전자를 표적화하고, IL-1ββ유전자의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 엑손 6, 또는 엑손 7에서 표적 서열에 상보적인 crRNA 서열을 포함한다.

[0289] 일반적으로, 본원에 기술된 crRNA 서열은, 예를 들어 표적 서열의 역 상보체에 대해 상대적으로, 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 치환을 만들기 위한 지침은, 예를 들어 Jiang 등과 Doudna의 문헌(Jiang 및 Doudna의 문헌[Annu. Rev. Biophys., 46:505-29 (2017)])에서 확인할 수 있으며, 그 전체 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 구체적으로, Jiang과 Doudna는, apo Cas9 단백질(도 3)에서 침입한 이중 가닥 DNA 분자의 표적 가닥에 결합된 Cas9-sgRNA 복합체(도 5 및 7)에 이르기까지, CRISPR/Cas9 시스템의 많은 상이한 확인을 위해 생성한 분자 구조를 고려함으로써, 도 6에서 CRISPR/Cas9 결합 및 절단의 상세한 분자 모델에 도달한다. 이들 분자 모델로부터, 당업자는 crRNA 서열에서 어떤 뉴클레오티드 위치가 표적 서열과의 불일치에 더 내성이 있는지를 알 것이다.

[0290] 예를 들어, Jiang은 crRNA 표적화 서열의 '시드 영역'으로도 알려진 PAM-근위 10~12 뉴클레오티드가 강력한 CRISPR/Cas9 결합에 가장 중요하다는 것을 교시한다. 구체적으로, Jiang은 시드 영역에서의 불일치가 "표적 DNA 결합 및 절단을 심각하게 손상시키거나 완전히 방해하는 반면, 시드 영역에서의 밀접한 상동성은 그 외에 곳에 많은 불일치가 있는 경우에도 (PAM-원위 8~10 뉴클레오티드에서) 오프 타겟 결합 이벤트를 초래한다"는 것을 개시하고 있다. Jiang의 512. 유사하게, Jiang은 "Cas9-매개 DNA 표적화 및 절단을 위해서는 sgRNA의 시드 영역과 표적 DNA 사이의 완벽한 상보성이 필요한 반면, 비-시드 영역에서의 불완전한 염기쌍 형성은 표적 결합 특이성을 위해 훨씬 더 내성이 있음"을 교시한다. 상동, 인용 생략.

[0291] 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, PAM-원위 8~10 뉴클레오티드 내에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, PAM-원위 8~10 뉴클레오티드 내에 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, PAM-원위 8~10 뉴클레오티드 내에 2개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, PAM-원위 8~10 뉴클레오티드 내에 3개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, PAM-원위 8~10 뉴클레오티드 내에 4개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, PAM-원위 8~10 뉴클레오티드 내에 5개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다.

[0292] 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 8개 위치 내에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 8개 위치 내에 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 8개 위치 내에 2개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 8개 위치 내에 3개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 8개 위치 내에 4개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 8개 위치 내에 5개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다.

[0293] 유사하게, 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 10개 위치 내에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 10개 위치 내에 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 10개 위치 내에 2개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 10개 위치 내에 3개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 10개 위치 내에 4개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 첫 10개 위치 내에 5개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다.

[0294] 또한, Jiang과 Doudna는 crRNA 표적화 서열의 위치 14~17에서 PAM-원위 뉴클레오티드의 염기쌍 형성이, 표적 서열에 대한 결합 후 절단 활성에 중요한 것으로 추정한다.

[0295] 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8~10 내에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8~10 내에 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8~10 내에 2개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8~10 내에 3개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8~10 내에 4개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8~10 내에 5개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다.

[0296] 유사하게, 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8 내에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8 내에 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA이다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8 내에 2개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA이다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8 내에 3개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA이다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA 서열의 뉴클레오티드 위치 1~3 및 8 내에 4개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA이다.

[0297] 또 다른 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 실험을 통해 결정했을 때, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA의 전체 서열에 걸쳐 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 실험을 통해 결정했을 때, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA의 전체 서열에 걸쳐 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 실험을 통해 결정했을 때, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA의 전체 서열에 걸쳐 2개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 실험을 통해 결정했을 때, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA의 전체 서열에 걸쳐 3개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 실험을 통해 결정했을 때, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA의 전체 서열에 걸쳐 4개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물 및/또는 방법에 사용된 crRNA 서열은, 예를 들어 실험을 통해 결정했을 때, 예를 들어 서열번호 298~590 중 어느 하나에 비해, crRNA의 전체 서열에 걸쳐 5개의 뉴클레오티드 치환을 포함한다.

[0298] 일부 구현예에서, 관절 질환 또는 병태는 관절염이다. 일부 구현예에서, 관절염은 골관절염이다.

[0299] 일부 구현예에서, 투여는 대상체의 관절 내로 약학적 조성물을 관절내 주사하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 수술 도중에 투여된다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 수술 후에 투여된다. 일부 구현

예에서, 약학적 조성물은 조절 방출형 약학적 조성물이다.

[0300] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는, 본원에 기술된 것과 은 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1로부터 선택된 재조합 바이러스를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)를 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 AAV는 혈청형 5의 AAV(AAV5)이다. 일부 구현예에서, 재조합 AAV는 혈청형 6의 AAV(AAV6)이다.

[0301] 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는, 하나 이상의 핵산 중 Cas9 단백질을 암호화하는 제1 핵산을 포함하는 제1 바이러스 벡터; 및 하나 이상의 핵산 중 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 제2 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 단일 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 포함하며, 여기서 단일 핵산은 Cas9 단백질 및 적어도 하나의 가이드 RNA를 암호화한다.

[0302] 일부 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 핵산을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 리포좀을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 핵산은 네이키드 상태로 존재한다.

[0303] 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 화농성연쇄상구균 Cas9 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 황색포도상구균 Cas9 폴리펩티드이다.

[0304] 골관절염 및 기타 질환을 치료하는 방법

[0305] 본원에 기술된 조성물 및 방법은 질환을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 이들 조성물 및 방법은 염증성 관절 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 이들 조성물 및 방법은 본원에서 및 다음 단락에서 기술된 것과 같은 다른 장애를 치료하는 데에도 사용될 수 있다. 일 양태에서, 조성물 및 방법은 골관절염(OA)을 치료하는 데 사용된다.

[0306] 일부 구현예에서, 본 개시는 관절 질환 또는 병태의 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 유전자 편집 시스템을 도입하는 단계를 포함하되, 유전자 편집 시스템은 관절 기능과 관련된 적어도 하나의 유전자좌를 표적화한다. 일부 구현예에서, 관절 질환은 골관절염이다. 일 양태에서, 상기 방법은 골관절염이 있는 개를 치료하는 데 사용된다. 또 다른 양태에서, 상기 방법은 퇴행성 관절 질환을 가진 포유동물을 치료하는 데 사용된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 관절 질환을 가진 개 또는 말을 치료하는 데 사용된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 골관절염, 외상후 관절염, 감염후 관절염, 류마티스 관절염, 통풍, 가성통풍, 자가면역 매개 관절염, 염증성 관절염, 염증 매개 및 면역 매개 관절 질환을 치료하는 데 사용된다.

[0307] 일부 구현예에서, 상기 방법은 관절 윤활막세포의 일부분을 유전자 편집하여 IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, 및 TNF-α 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 침묵시키는 단계를 추가로 포함한다. 일 양태에서, 상기 방법은 관절 윤활막세포의 일부분을 유전자 편집하여 IL-1α, IL-1β 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 침묵시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0308] 일 양태에서, 상기 방법은 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 유전자 편집은 CRISPR 방법, TALE 방법, 징크 핑거 방법, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 포함한다.

[0309] 일부 양태에서, 상기 방법은 AAV 벡터, 렌티바이러스 벡터, 또는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 유전자 편집을 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 AAV1, AAV1(Y705+731F+T492V), AAV2(Y444+500+730F+T491V), AAV3(Y705+731F), AAV5, AAV5(Y436+693+719F), AAV6, AAV6 (VP3 변이체 Y705F/Y731F/T492V), AAV-7m8, AAV8, AAV8(Y733F), AAV9, AAV9 (VP3 변이체 Y731F), AAV10(Y733F), 및 AAV-ShH10을 사용해 유전자 편집을 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, AAV 벡터는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈청형을 포함한다: AAV1, AAV5, AAV6, AAV6 (Y705F/Y731F/T492V), AAV8, AAV9, 및 AAV9 (Y731F).

[0310] 약학적 조성물 및 투여 방법

[0311] 본원에 기술된 방법은 활성 성분으로서 CRISPR 유전자(예: IL-1α 및/또는 IL-1β) 편집 복합체를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 포함한다.

[0312] 투여 방법/경로에 따라, 약학적 투여 형태에는 여러 유형이 있다. 여기에는 많은 종류의 액체, 고형분, 및 반고형분 투여 형태가 포함된다. 일반적인 약학적 투여 형태는 알약, 정제, 또는 캡슐, 음료 또는 시럽, 및 특히 식

물이나 음식 종류와 같은 천연 형태 또는 약초 형태를 포함한다. 특히, 약물 전달을 위한 투여 경로(ROA)는 해당 물질의 투여 형태에 따라 달라진다. 액체 약학적 투여 형태는 투여 또는 복용하도록 의도된 약물 또는 의약으로서 사용되는 화학 화합물의 투여량의 액체 형태이다.

[0313] 일 구현예에서, 본 개시의 조성물은 피하(예: 관절내 주사), 피부(예: 패치를 통한 경피), 및/또는 임플란트를 통해 대상체에게 전달될 수 있다. 예시적인 약학적 투여 형태는, 예를 들어 알약, 삼투 전달 시스템, 엘릭서, 유화액, 하이드로겔, 현탁액, 시럽, 캡슐, 정제, 경구용해정(ODT), 젤라틴 캡슐, 박막, 점착식 국소 패치, 막대 사탕, 캔디, 츄잉 검, 건조 분말 흡입기(DPI), 증발기, 네블라이저, 정량 흡입기(MDI), 연고, 경피 패치, 피내 임플란트, 피하 임플란트, 및 경피 임플란트를 포함한다.

[0314] 본원에서 사용되는 바와 같이, "피부 전달" 또는 "피부 투여"는, 약학적 투여 형태가 진피(즉, (피부를 구성하는) 표피와 피하 조직 사이의 피부 층)에 또는 진피를 통해 흡수되는 투여 경로를 지칭할 수 있다. "피하 전달"은 약학적 투여 형태가 피하 조직 층에 또는 그 아래에 전달되는 투여 경로를 지칭할 수 있다.

[0315] 적절한 약학적 조성물을 제형화하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005; 및 시리즈 책자인 Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs(Dekker, N.Y.)를 참조한다. 예를 들어, 비경구, 피내, 또는 피하 투여에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음 성분을 포함할 수 있다: 주사용수, 식염수 용액, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 이황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세트산염, 구연산염, 또는 인산염과 같은 완충제; 및 염화나트륨 또는 덱스트로스와 같은 등장화제. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조정될 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 일회용 주사기, 또는 다회 투여 바이알에 봉입될 수 있다.

[0316] 주사식으로 사용하기에 적합한 약학적 조성물은 멸균 주사식 용액 또는 분산액을 즉석에서 제조하기 위한 멸균 수용액(가용성인 경우) 또는 분산액과 멸균 분말을 포함할 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 적절한 담체는 생리식염수, 정균수, Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, N.J.), 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균 상태여야 하며, 쉽게 주입할 수 있는 정도로 유동적이어야 한다. 조성물은 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하며, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대항해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅을 사용함으로써, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 작용은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 방지할 수 있다. 많은 경우에, 당, 만니톨과 같은 다가알코올, 소르비톨, 염화나트륨과 같은 등장성 제제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사식 조성물의 장시간 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0317] 멸균 주사식 용액은 필요량의 활성 화합물을 위에 열거된 성분 중 하나 또는 이들의 조합과 함께 적절한 용매에 혼입한 다음, 멸균 여과하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산매와 위에 열거된 것들 중 필요한 다른 성분이 포함된 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입하여 제조한다. 멸균 주사식 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조이며, 이를 통해 활성 성분 + 이전에 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 바람직한 추가 성분으로 이루어진 분말을 수득한다.

[0318] 핵산이거나 이를 포함하는 치료 화합물은 DNA 백신과 같은 핵산 제제의 투여에 적합한 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 이들 방법은 유전자 총, 바이오 인젝터, 및 피부 패치뿐만 아니라 미국 특허 제6,194,389호에 개시된 마이크로-입자 DNA 백신 기술과 같은 무침(needle-free) 방법 및 미국 특허 제6,168,587호에 개시된 것과 같은 분말형 백신을 이용한 포유류 경피 무침 백신접종을 포함한다. Hamajima 등의 문헌[Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10 (1998)]에 특히 기술된 것과 같은 비강내 전달도 가능하다. (예를 들어 미국 특허 제6,472,375호에 기술된 것과 같은) 리포좀, 및 마이크로캡슐화도 사용될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 제6,471,996호에 기술된 것과 같은) 생분해성 표적화가능한 마이크로입자 전달 시스템을 사용할 수도 있다.

[0319] 치료 화합물은, 치료 화합물이 신체로부터 신속하게 제거되지 않도록 보호하는 담체와 함께, 예컨대 조절 방출식 제형(임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템 포함)으로 제조될 수 있다. 콜라겐, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물(예: 폴리[1,3-비스(카르복시페녹시)프로판-코-세박산] (PCPP-SA) 매트릭스, 지방산 이량체-세박

산 (FAD-SA) 공중합체, 폴리(락티드-코-글리콜리드) 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리에틸렌글리콜-코팅된 리포좀, 및 폴리락트산과 같은 생분해성 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형은 표준 기술을 사용하여 제조하거나, 예를 들어, Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 상업적으로 구입할 수 있다. 리포좀 현탁액(세포 항원에 대한 단클론 항체와 함께, 선택된 세포에 대해 표적화된 리포좀을 포함함)도 약학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 알려진 방법, 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호에 기술된 것과 같은 방법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어 수술 부위에 대한 투여가 필요할 때, 반고형분 제형, 겔화 제형, 연질 젤라틴 제형, 또는 다른 제형(조절 방출형 제형 포함)이 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 생분해성, 생체적합성 중합체의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어 Sawyer 등의 문헌[Yale J Biol Med. 2006 December; 79(3-4): 141-152] 참조.

[0320] 약학적 조성물은 투여 지침과 함께 용기, 키트, 팩, 또는 분배기에 포함될 수 있다.

[0321] 실시예

[0322] 본원에 포함된 구현예는 이제 다음의 실시예들을 참조하여 기술된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본원에 포함된 개시는 결코 이들 실시예에 한정되는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 그리고 모든 변화를 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0323] 실시예 1. 골관절염의 마우스 모델에서 CRISPR 유전자-조작에 의해 IL-1 발현의 감소.

[0324] 60마리의 C57B 마우스를 선별하여 각각 15마리씩 4개의 군으로 분배한다. DMM 수술 방법을 사용해 마우스 각각을 대상으로 OA를 유도한다. 마우스에게서 OA가 발생하면, 마우스를 다음과 같이 치료한다:

[0325] 군 1: IL-1α 및 IL-1IL-β를 표적화하여 IL-1 단백질의 발현을 침묵시키거나 감소시키도록 조작된 CRISPR AAV 벡터를 OA 관절 내로 직접 주입함.

[0326] 군 2: IL-1 생산에 영향을 미치지 않을 "넌센스" 페이로드로 조작된 CRISPR AAV 벡터를 OA 관절 내로 직접 주입함 (음성 대조군).

[0327] 군 3: IL-1Ra를 표적화하여 IL-1Ra 단백질의 발현을 침묵시키거나 감소시키도록 조작된 CRISPR AAV 벡터를 OA 관절 내로 직접 주입함.

[0328] 군 4: 멸균 완충 식염수를 OA 관절 내로 직접 주입함 (주사 프로세스를 위한 대조군).

[0329] 치료 전과 후에 마우스를 모니터링하여 치료가 마우스의 운동 및 탐색적 활성에 미치는 효과를 평가한다. 기계적 민감도 및 걸음걸이의 변화도 모니터링한다. 이질통 및 뒷다리 파지력을 모니터링할 수도 있다.

[0330] 약 8주 후, 동물을 희생시키고, 총 조직병리학에 대해 OA 관절 조직을 평가하고, IHC에 의해 IL-1 발현을 평가한다. 염증의 바이오마커, 예를 들어 OA 관절에서의 MMP-3 발현도 평가한다.

[0331] IL-1α 및 IL-1β를 표적화하여 IL-1 단백질의 발현을 침묵시키거나 감소시키도록 조작된 CRISPR AAV 벡터로 치료한 군 1 마우스는 IL-1의 수준 감소(IHC), 조직 재생(조직병리학), 및 다른 3개의 군 모두에 비해 낮은 염증 바이오마커 수준을 나타낼 것이다. 군 3의 마우스는 다른 3개의 군 모두에 비해 상대적으로 더 높은 염증 바이오마커 수준을 나타낼 것이다.

[0332] 실시예 2. 마우스 IL1A 및 IL1B에 대한 가이드 절단 효율 평가

[0333] *시험관 내 절단 검정*

[0334] *Il1a*의 엑손 4 및 *Il1b*의 엑손 4(Il1a-201 ENSMUST00000028882.1 및 Il1b-201 ENSMUST00000028881.13; *Il1a*의 엑손 4 및 *Il1b*의 엑손 4에 대한 표적 서열에 대해서는 표 2 참조)에 대해 CRISPR 가이드 RNA(포스포로티오네이트-변형된 sgRNA, 표 3)를 설계하였다. C57BL/6 마우스 게놈 DNA를 사용해 *Il1a* 및 *Il1b*의 엑손 4를 PCR(Phusion High-Fidelity DNA 중합효소, NEB cat#M0530S)로 증폭시켰다 Il1a 정방향 프라이머: CATTGGGAGGATGCTTAGGA (서열번호 620), Il1a 역방향 프라이머: GGCTGCTTTCTCTCCAACAG (서열번호 621), Il1b 정방향 프라이머: AGGAAGCCTGTGTCTGGTTG (서열번호 622), Il1b 역방향 프라이머: TGGCATCGTGAGATAAGCTG (서열번호 623). 앰플리콘을 PCR 정제하였다(QiaQuick PCR 정제 키트 cat#28106). 100 ng의 정제된 PCR 산물, 200 ng의 변형된 가이드 RNA(Sigma Aldrich), 및 0.5 μg의 TrueCut *Spy* Cas9 단백질 V2(Invitrogen A36498) 또는 0.5 μg의 Gene Snipper NLS *Sau* Cas9(BioVision Cat#M1281-50-1)를 사용하여 시험관 내 절단 검정을 사용하여 가이드 절단 효율을 결정하였다. 두 가지 유형의 Cas9인 화농성연쇄상구균 Cas9 및 황색포도상구균 Cas9를 이들

의 편집 능력에 대해 비교하였다. 2% 아가로오스 겔을 절단 검정의 정성적 판독에 사용하였다.

[0335] *세포주 편집*

[0336] *Il1a*의 엑손 4 및 *Il1b*의 엑손 4(Il1a-201 ENSMUST00000028882.1 및 Il1b-201 ENSMUST00000028881.13)에 대해 CRISPR 가이드 RNA(포스포로티오네이트-변형된 sgRNA, 표 2)를 설계하였다. 생거 시퀀싱 및 Synthego ICE(예: Hsiau T, Maures T, Waite K, Yang J 등의 문헌[Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data, biorxiv. 2018]을 참조하고, 동 문헌은 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 통합됨), 또는 TIDE(예: Brinkman E, Chen T, Amendola M, 및 Van Steensel B.의문헌[Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition, Nucleic Acids res 2014]을 참조하고, 동 문헌은 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 통합됨) 웹 도구를 사용하여 J774.2 및 NIH3T3 세포의 풀에서 가이드 RNA 절단 효율을 결정하여 편집 백분률을 계산하였다. 실험을 통해 화농성연쇄상구균 Cas9의 효율과 황색포도상구균 Cas9의 효율도 비교하였다. 5 μg의 TrueCut *Spy* Cas9 단백질 V2(Invitrogen A36498) 또는 5 μg의 EnGen *Sau* Cas9 단백질(NEB M0654T)과 100 pmol의 변형된 가이드 RNA(Sigma Aldrich)로 세포를 전기천공하였다(Amaxa 4D Nucleofector 유닛, Lonza). SF nucleofector 용액과 프로그램 CM139를 J7744.2 세포에 사용하였고, SG nucleofector 용액과 프로그램 EN158을 NIH3T3 세포에 사용하였다. 전기천공 후 3일차에 세포 펠릿을 취하고, gDNA를 각 풀로부터 추출하였다(Qiagen, DNeasy 혈액 및 조직 키트, 69506). *Il1a* 또는 *Il1b*의 엑손 4를 적절한 풀에서 PCR(Phusion High-Fidelity DNA 중합효소, NEB, cat#M0530S)로 증폭시켰다. Il1a 정방향 프라이머: TGGTTTCAGGAAAACCCAAG (서열번호 624), Il1a 역방향 프라이머: GCAGTATGGCCAAGAAAGGA (서열번호 625), Il1b 정방향 프라이머: AGGAAGCCTGTGTCTGGTTG (서열번호 622), Il1b 역방향 프라이머: CTGGGCAAGAACATTGGATT (서열번호 626). 앰플리콘을 생거 시퀀싱하고, Synthego ICE 또는 TIDE 웹 도구를 사용해 분석하여 각 클론에서 야생형 서열의 부재 및 인델의 존재가 cDNA 서열에서 프레임시프트를 야기한다는 것을 결정하였다.

표 2

[0337]

표적 *Il1a* 및 *Il1b* 서열

식별자	가이드 ID	유전자	엑손	Cas9	표적 서열 5’-3’	PAM
서열번호 7	sg43	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	GTATCAGCAACGTCAAGCAA	CGG
서열번호 8	sg44	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	CTGCAGGTCATCTTCAGTGA	AGG
서열번호 9	sg45	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	TATCAGCAACGTCAAGCAAC	GGG
서열번호 10	sg46	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	GCCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
서열번호 11	sg47	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	CATCAACAAGAGCTTCAGGC	AGG
서열번호 12	sg48	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	TGCTCTCATCAGGACAGCCC	AGG
서열번호 13	sg49	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	GCTCATGTCCTCATCCTGGA	AGG
서열번호 14	sg50	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC	GGG
서열번호 15	sg51	*Il1a*	4	*황색포도상구균*	TTACTCCTTACCTTCCAGATC	ATGGGT
서열번호 16	sg52	*Il1a*	4	*황색포도상구균*	GAAACTCAGCCGTCTCTTCTT	CAGAAT
서열번호 17	sg53	*Il1a*	4	*황색포도상구균*	CAACTTCACCTTCAAGGAGAG	CCGGGT
서열번호 18	sg54	*Il1b*	4	*황색포도상구균*	GTGTCTTTCCCGTGGACCTTC	CAGGAT
서열번호 19	sg55	*Il1b*	4	*황색포도상구균*	CACAGCTTCTCCACAGCCACA	AGTAGT
서열번호 20	sg56	*Il1b*	4	*황색포도상구균*	GTGCTGCTGCGAGATTTGAAG	CTGGAT

표 3

[0338]

CRISPR 가이드 RNA.

식별자	가이드 ID	유전자	엑손	Cas9	cRNA 서열 5’-3’	PAM
서열번호 21	sg43	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	GUAUCAGCAACGUCAAGCAA	CGG
서열번호 22	sg44	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	CUGCAGGUCAUCUUCAGUGA	AGG
서열번호 23	sg45	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	UAUCAGCAACGUCAAGCAAC	GGG
서열번호 24	sg46	*Il1a*	4	*화농성연쇄상구균*	GCCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
서열번호 25	sg47	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	CAUCAACAAGAGCUUCAGGC	AGG

서열번호 26	sg48	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	UGCUCUCAUCAGGACAGCCC	AGG
서열번호 27	sg49	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	GCUCAUGUCCUCAUCCUGGA	AGG
서열번호 28	sg50	*Il1b*	4	*화농성연쇄상구균*	CCUCAUCCUGGAAGGUCCAC	GGG
서열번호 29	sg51	*Il1a*	4	*황색포도상구균*	UUACUCCUUACCUUCCAGAUC	ATGGGT
서열번호 30	sg52	*Il1a*	4	*황색포도상구균*	GAAACUCAGCCGUCUCUUCUU	CAGAAT
서열번호 31	sg53	*Il1a*	4	*황색포도상구균*	CAACUUCACCUUCAAGGAGAG	CCGGGT
서열번호 32	sg54	*Il1b*	4	*황색포도상구균*	GUGUCUUUCCCGUGGACCUUC	CAGGAT
서열번호 33	sg55	*Il1b*	4	*황색포도상구균*	CACAGCUUCUCCACAGCCACA	AGTAGT
서열번호 34	sg56	*Il1b*	4	*황색포도상구균*	GUGCUGCUGCGAGAUUUGAAG	CTGGAT

[0339] 각각의 cRNA(예: 표 3 참조)를 아래의 tracrRNA 서열(예: 서열번호 35~36 참조)에 융합된 상기 cRNA 서열로 이루어진 단일 가이드 RNA로서 합성하였다. 소정의 구현예에서, A<>U 플립을 사용해 가이드 RNA 활성을 증가시킨다.

[0340] Sau Cas9:

[0341] GUUAUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUUU (서열번호 35)

[0342] Spy Cas9:

[0343] GUUAUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU (서열번호 36)

[0344] *시험관 내 절단 검정*

[0345] 도 1a는 0.5 μg *Spy* Cas9에 의해 절단된 100 ng 마우스 DNA; 및 200 ng 변형된 가이드 RNA(*Il1a* 유전자의 경우 43~46 및 IL1B의 경우 47~50)의 아가로스 겔 전기영동 분석을 도시한다. DNA는 가이드 RNA를 사용하여 cas9에 의해 특정 부위에서 절단되어 아가로스 겔 상에서 미절단 대조군 대비 예측 가능한 밴드 패턴을 생성한다(임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, sg8*에 대한 아가로오스 겔 전기영동은 실패한 합성을 나타내는 것으로 보임).

[0346] 도 1b는 0.5 μg *Sau* Cas9에 의해 절단된 100 ng 마우스 DNA; 및 200 ng 변형된 가이드 RNA(*Il1a* 유전자의 경우 51~53 및 *Il1b*의 경우 54~56)의 아가로스 겔 전기영동 분석을 도시한다. DNA는 가이드 RNA를 사용하여 Cas9에 의해 특정 부위에서 절단되어 아가로오스 겔 상에서 미절단 대조군 대비 예측 가능한 밴드 패턴을 생성한다.

[0347] *세포주 편집*

[0348] 게놈 DNA를 편집된 풀로부터 추출하고, *Il1a* 또는 *Il1b* 엑손 4를 적절한 풀에서 PCR 증폭시켰다. PCR 산물을 생거 시퀀싱한 다음, TIDE 또는 Synthego ICE 소프트웨어를 사용하여 디컨볼루션하였다. Synthego ICE는 *Spy* Cas9 풀을 디콘볼루션하는 데 사용하였다. 소프트웨어는 가이드 RNA 서열 및 PAM 부위에 기초하여 각 풀에서 편집 패턴을 결정할 수 있다. 소프트웨어는 기능성 단백질의 절단으로 이어질 수 있는 프레임 내 결실을 야기한 편집과 진정한 녹아웃으로 이어질 프레임시프트 돌연변이를 야기한 편집을 구별할 수 있다. Synthego ICE 소프트웨어가 *Sau*Cas9 편집을 디콘볼루션할 수 없기 때문에, *Sau*Cas9 풀은 TIDE로 분석하였다. TIDE 분석은 가이드 RNA 및 PAM 부위를 기반으로 풀에서 편집 패턴을 결정함으로써 ICE와 유사한 방식으로 동작한다. 그러나, TIDE 분석은 진정한 녹아웃 점수를 매기기 보다는 편집 효율 점수를 매기는데, 이를 통해서는 프레임 내 편집 패턴과 프레임 시프트 편집 패턴을 구별할 수 없다. 따라서, 편집 효율 점수는 단백질을 녹아웃하는 가이드 RNA의 능력을 과도하게 나타낼 수 있다. *Spy*Cas9는 CRISPR 유전자 편집에 사용되는 표준 단백질이다. 그러나, *Sau* Cas9가 3156 bp인 것에 비해 *Spy*Cas9는 4101 bp이다. AAV와 같은 일부 바이러스를 포장하는 것의 크기 제한 때문에, *Sau*Cas9와 *Spy*Cas9의 편집 능력을 비교하여 더 작은 *Sau* Cas9가 이 프로젝트를 위해 설계된 벡터에 사용될 수 있는지 여부를 알아보기로 결정하였다.

[0349] 도 2a~2d는 J774.2 ("J") 및 NIH3T3 ("N") 세포에서 다양한 가이드 RNA와 함께 사용된 *Spy* Cas9(도 2a 및 2b) 및 *Sau*Cas9(도 2c 및 2d)의 편집 효율을 나타내는 그래프를 도시한다. 편집 효율은 Synthego ICE 또는 TIDE 생거 디콘볼루션 소프트웨어를 사용하여 결정하였다. 도 2a: J774.2 및 NIH3T3에서 *Spy*Cas9와 함께 가이드 RNA 43~46을 사용했을 때 *Il1a*의 녹아웃 효율. Synthego ICE를 사용해 생거 서열 흔적을 디콘볼루션하고 녹아웃 효율을 결정하였다. 도 2b: J774.2 및 NIH3T3에서 *Spy*Cas9와 함께 가이드 RNA 47~50을 사용했을 때 *Il1b*의 녹아웃 효율; 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, sgRNA8에 대한 데이터는 실패한 합성을 나타내는

것으로 보임. Synthego ICE를 사용해 생거 서열 흔적을 디콘볼루션하고 녹아웃 효율을 결정하였다. 도 2c: J774.2 및 NIH3T3에서 saCas9와 함께 가이드 RNA 51~53을 사용했을 때 *Il1a*의 녹아웃 효율. TIDE를 사용해 생거 서열 흔적을 디콘볼루션하고 편집 효율을 결정하였다. 도 2d: J774.2 및 NIH3T3에서 *Sau* Cas9와 함께 가이드 RNA 54~56을 사용했을 때 *Il1b*의 녹아웃 효율. TIDE를 사용해 생거 서열 흔적을 디콘볼루션하고 편집 효율을 결정하였다.

[0350] 실시예 3. 마우스 요산 모델에서 CRISPR 유전자 조작에 의한 IL-1 발현의 감소.

[0351] *최적의 전치료 시간을 결정하기 위한 시간 경과 실험*

[0352] 요산을 마우스에게 접종하기 전에, 바이러스를 이용한 마우스의 최적 전치료 시간을 결정하기 위한 예비 실험을 수행한다. GFP-표지된 AAV5 벡터를 마우스의 무릎 관절 내로 주입한다. 그런 다음, PCR에 의해 바이러스 부하를 정량화하고, 감염 후 3, 5, 및 7일차에 조직학에 의해 바이러스 감염 위치를 정량화한다. 관절 내에서 바이러스의 강력한 발현을 생성하는 치료 시간은, 마우스 요산 모델에서 IL-1b를 표적화하고 IL-1b의 발현을 침묵시키거나 감소시키도록 조작된 CRISPR AAV 벡터에 의한 IL-1b의 감소를 결정하는 실험을 위해, 바이러스 벡터를 마우스에게 주입하기 위한 최적의 소요 시간으로서 선택된다.

[0353] *요산 모델에서 CRISPR AAV(AAV-spCas9)에 의한 IL-1b 발현의 녹다운 및 치료 효과를* 확인하기 위한 실험

[0354] 마우스를 선별하여 3개의 군으로 배분한다:

[0355] 군 1: IL-1b를 표적화하고 IL-1 단백질의 발현을 침묵시키거나 감소시키도록 조작된 CRISPR AAV 벡터(AAV-spCas9)를 주입한 마우스,

[0356] 군 2: IL-1 생산에 영향을 미치지 않는 페이로드로 조작된 CRISPR AAV 벡터인 "스크램블" 가이드 RNA/Cas9(AAV-spCas9)를 주입한 마우스, 및

[0357] 군 3: 식염수를 주입한 마우스.

[0358] 그런 다음, 최적의 전치료 시간 후 마우스에게 요산을 접종한다. 요산을 주입한 후 24시간 이내에, 동물을 희생시키고, 사이토카인 발현에 대해 관절 조직을 분석한다(예를 들어 IHC로 IL-1 발현을 평가함). 관절 조직은 총 조직병리학 및 염증 바이오마커의 발현에 대해서도 평가될 수 있다.

[0359] IL-1b를 표적화하여 IL-1 단백질의 발현을 침묵시키거나 감소시키도록 조작된 CRISPR AAV 벡터로 치료한 군 1 마우스는 IL-1의 수준 감소(IHC) 및 다른 2개의 군 모두에 비해 낮은 염증 바이오마커 수준을 나타낼 것이다.

[0360] 실시예 4. 마우스에서 AAV의 관절내 주사에 대한 시간 과정 연구.

[0361] 수컷 C57BL/6 마우스의 관절 내에 AAV를 주사하기 위한 시간 과정을 평가하기 위한 연구를 수행하였다.

[0362] 물질 및 방법

[0363] *시험 물질 식별 및 제조* - eGFP AAVPrime쎄 정제된 아데노-연관 바이러스 입자: GFP 태그가 부착된 AAV5(GeneCopoeia쎄, 카탈로그 번호 AB201, 로트 번호 GC08222K1902, $1.18 X 10^{13}$ 게놈 사본/mL) 및 AAV6(GeneCopoeia쎄, 카탈로그 번호 AB401, 로트 번호 GC09242K1905, $5.47 X 10^{12}$ 게놈 사본/mL)을 공급하였다. AAV-입자를 드라이아이스에 담아 배송하고, 수령 즉시 -80℃에서 보관하였다. 투여 직전에, AAV-입자를 10 μL/무릎으로 IA 투여하도록 인산염 완충 식염수(칼슘 및 마그네슘이 없는 PBS: Corning, 로트 번호 11419005)에서 재구성하였다. 시험 물질 제조, 보관, 및 취급에 대한 추가의 상세 정보는 임상시험 계획서(부록 A)를 참조한다.

[0364] *시험 시스템 식별* - 8 내지 10주령의 수컷 C57BL/6 마우스(N = 30)를 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)로부터 입수하였다. 임상시험 0일차에 등록 시, 마우스는 약 24 내지 29 그램(평균 26 g)으로 칭량되었다. 꼬리 아래에 군과 동물 번호를 나타내는 구별되는 마크로 동물을 식별하였다. 무작위 배정 후, 적절한 색상 코드를 이용해 모든 케이지에 프로토콜 번호, 군 번호, 및 동물 번호를 표지하였다(부록 A).

[0365] *환경 및 관리* - 도착 후, 목재 칩으로 만든 침상과 먹이와 물병이 매달린 폴리카보네이트 케이지에 동물을 케이지당 3~5마리씩 수용하였다. 마우스를 상단에 필터가 달린 신발박스 케이지(정적인 공기 흐름, 2층으로 된 공간에 약 70 마리씩)에 수용하거나 개별적으로 환기되는 파이 케이지(수동 공기 흐름, 2층으로 된 공간에 약 70~75 마리씩)에 수용하였다. 수용실, 케이지, 및 장비 위생을 비롯한 동물 관리는 실험동물 사용과 관리에 대한 지침

(8판) (National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, DC, 2011)에 인용된 지침을 준수하였으며, 상기 지침은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0366] 임상시험에 투입하기에 앞서, 4일 동안 동물을 적응시켰다. 임상시험의 생 단계(live phase) 동안에는 수의사를 현장에 배석시키거나 대기시켰다. 병용 약물은 투여하지 않았다.

[0367] 적응 기간 및 임상시험 기간 동안, 동물을 19℃ 내지 25℃의 온도와 30% 내지 70%의 상대 습도 범위의 실험실 환경에 수용하였다. 자동 타이머를 이용해 12시간의 주간 및 12시간의 야간 환경을 제공하였다. 동물들이 Envigo Teklad 8640 먹이와 신선한 수돗물을 자유롭게 취식할 수 있게 하였다.

[0368] *실험 설계* - 연구 0일차에, 마우스를 체중에 따라 치료군에 무작위배정하였다. 무작위배정 후, 표 4에 표시된 바와 같이 동물에게 관절내(IA) 주사를 투여하였다. 동물의 체중은 섹션 8.5.1에 기술된 것과 같이 측정하였다. 아래 '부검 시편'이라는 제목의 섹션에 기술된 바와 같이 동물을 안락사시키고, 3개 시점(3, 5, 및 7일차)에 부검하여 조직을 채취하였다.

표 4

[0369]

군 및 치료 정보							
군	**N**	**치료**	**투여량 수준 (입자)**	**투여량**	**투여 농도 (입자/ml)**	**투여 경로**	**요법**
1	30	GFP-태그됨 AAV5	5×10^{9}	10 μL	5×1011/mL	IA (**우측** 무릎)	1× (0일차)
		GFP-태그됨 AAV6	5×10^{9}	10 μL	5×10^{11}/mL	IA (**좌측** 무릎)	1× (0일차)

[0370] *관찰, 측정, 및 시편*

[0371] **체중 측정** - 연구 0일차에 무작위배정을 위해 마우스를 칭량하고, 1, 3, 5, 및 7일차에 다시 칭량하였다. 체중 측정은 표 6에서 확인할 수 있다.

[0372] **부검 시편** - 표 5에 나타낸 바와 같이, 임상시험 3, 5, 및 7일차에 마우스를 부검하였다.

표 5

부검 일정

[0373]

군	동물 번호	시점(들)
1	1~10	3일차
1	11~20	5일차
1	21~30	7일차

[0374] 부검 시, 심장 천자를 통해 마우스를 방혈한 후 경추를 탈골시켰다. 모든 동물로부터 우측 무릎과 좌측 무릎을 채취하였다. 관절낭을 온전하게 유지하면서 관절로부터 피부와 근육을 제거하였다. 마우스 번호, 채취일, 및 우측 다리인지 좌측 다리인지만 표지된 15-mL 원뿔형 튜브에서 관절을 급속 냉동시켰다. 배송을 위해 무릎 관절을 -80℃에서 냉동 보관하였다.

[0375] *동물 폐기* - 동물 사체는 BBP SOP에 따라 폐기하였다.

[0376] *시편 및 원시 데이터의 보관* - 시편(우측 및 좌측 무릎 관절), 연구 데이터, 및 보고서는 임상시험 도중 및 임상시험 완료 후에 전달하였다.

[0377] *편차가 임상시험의 품질 및 무결성에 미치는 영향에 대한 진술* - 임상시험 프로토콜로부터의 편차는 없었다.

[0378] 결과/결론

[0379] 시험 0일차에, 수컷 C57BL/6 마우스에게 GFP 태그된 AAV5(5×10^9 입자, 10 μL)를 우측 무릎에 IA 주사하고, GFP 태그된 AAV6(5×10^9 입자, 10 μL)을 좌측 무릎에 IA 주사하였다. 연구 0, 1, 3, 5, 및 7일차에 동물을 칭량하였다. 연구 3일차(동물 1~10), 5일차(동물 11~20), 및 7일차(동물 21~30)에 부검을 수행하고, 배송을 위한 우측 및 좌측 무릎 관절을 채취하였다. 동물 칭량, 투여, 및 생물학적 샘플 채취를 포함하여, 본 임상시험의 생단계 부분(live portion)을 성공적으로 완료하였다. 모든 동물은 연구 종료 시까지 생존하였다.

[0380] 참고문헌

[0381] 실험동물 사용과 관리에 대한 지침(8판). National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, DC, 2011(모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

표 6

체중 및 투여량 계산 데이터 (MTC-UCM-1)

처료군		0일차	0일차	1일차		3일차	
		체중 (g)	투여량 10 μl (ml)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)
군 1 C57Bl/6 IA, 1x (D0)	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%
	평균	**26.28**		**26.01**	**-1.0%**	**25.86**	**-1.6%**
	SE	**0.27**		**0.27**	**0.2%**	**0.29**	**0.3%**

[0382]

처료군		5일차		7일차		베이스라인 대비 체중 변화 (g)
		체중 (g)	베이 스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이 스라인 대비 체중 변화율(%)	
군 1 C57B1/6 IA, 1x (D0)	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
	평균	**25.90**	**-0.6%**	**26.15**	**-0.8%**	**-0.25**
	SE	**0.33**	**0.4%**	**0.34**	**0.5%**	**0.09**

[0383]

[0384] **프로토콜**

[0385] 시험 시스템

[0386] 동물 수: 33(30 + 3 추가)

[0387] 종/계통 또는 품종: C57BL/6

[0388] 공급자: Jackson

[0389] 도착 시 연령/체중: 8~10주령(약 20그램)

[0390] 성별: 수컷

[0391] 임상시험 개시 시점의 연령/체중 범위: 임상시험 개시 전 적어도 9주령

[0392] 적응: BBP에 도착한 후 최소 3일 동안 적응하게 됨

[0393] 수용: 3~5마리/케이지

[0394] 임상시험 달력

월	화	수	목	금	토	일
1주차 *-4일차*	1주차 *-3일차*	1주차 *-2일차*	1주차 *-1일차*	1주차 *0일차*	1주차 *1일차*	1주차 *2일차*
적응을 위해 동물을 도착 즉시 군별로 배분함.				*칭량 및 무작위 배정.* IA 주사	칭량	
2주차 *3일차*	2주차 *4일차*	2주차 *5일차*	2주차 *6일차*	2주차 *7일차*	2주차 *8일차*	2주차 *9일차*
칭량, 부검 동물 1~10		칭량, 부검 동물 11~20		칭량, 부검 동물 21~30		

[0395]

[0396] 물질

명칭	공급업체	카탈로그 #*
이소플루란	VetOne	502017
주사기 및 바늘	BD	필요에 따라
혈청 분리관(필요한 경우)	Greiner Bio-One	#450472 (Fisher 경유)
Li Hep Mini-Collect (필요한 경우)	Greiner Bio-One	#450480 (Fisher 경유)

[0397]

EDTA Mini-Collect (필요한 경우)	Greiner Bio-One	#450477 (Fisher 경유)
K3EDTA (필요한 경우)	Covidien	#8881311149 (Fisher 경유)
K2EDTA 진공 채혈기 (필요한 경우)	BD	#367856 (Fisher 경유)
Na Hep 진공 채혈기 (필요한 경우)	BD	#367871 (Fisher 경유)
Li Hep 진공 채혈기 (필요한 경우)	BD	#367960 (Fisher 경유)

[0398]

[0399] 시험 물질 및 비히클 정보

[0400] *제형화되지 않은 시험 물질 보관 조건* - GFP-태그된 AAV5(군 1): -80℃; GFP-태그 AAV6(군 1): -80℃.

[0401] *비히클 정보* - GFP 태그된 AAV5(군 1): PBS(Ca 및 Mg 미포함); GFP 태그된 AAV6(군 1): PBS(Ca 및 Mg 미포함).

[0402] *시험 물질 제형화 지침 및 계산* - GFP 태그된 AAV5(군 1): PBS를 사용하여 모액을 적절한 농도로 희석할 것; GFP 태그된 AAV6(군 1): PBS를 사용하여 모액을 적절한 농도로 희석할 것.

[0403] *투여 제형 및 비히클의 보관 및 안정성* - GFP 태그된 AAV5(군 1): 주사 직전에 희석할 것; GFP 태그된 AAV6(군 1): 주사 직전에 희석할 것.

[0404] *투여 후 시험물질의 처분* - GFP 태그된 AAV5(군 1): 제형을 폐기하고, 모액은 향후 연구를 위해 유지할 것; GFP 태그된 AAV6(군 1): 제형을 폐기하고, 모액은 향후 연구를 위해 유지할 것.

[0405] 생 단계 전달물

생 단계 데이터 수집			
유형	임상시험일	군 (An)	세부사항
체중	0, 1, 3, 5, 7일차	전체 (모두 남음)	

[0406]

[0407] 부검 정보

[0408] *희생 일정:*군 1 **An 1~10**: 3일차

[0409] 군 1 **An 11~20**: 5일차

[0410] 군 1 **An 21~30**: 7일차

[0411] *안락사 방법:* 심장 천자에 의한 출혈로 방혈에 이어서 경추 탈골.

[0412] *시점: 시간 미측정*

부검 조직 샘플 채취:				
유형	군/An	세부사항	보관 조건	처분
주입한 우측 무릎	전체	관절낭을 온전하게 유지하면서 피부와 근육을 제거함	급속 냉동 (15 ml 원뿔형 바이알*)	배송
주입한 좌측 무릎	전체	관절낭을 온전하게 유지하면서 피부와 근육을 제거함	급속 냉동 (15 ml 원뿔형 바이알*)	배송

* 마우스 번호, 채취 일자, 및 왼쪽 다리인지 오른쪽 다리인지만 튜브에 표지함. 샘플은 이들 샘플에 AAV-2 또는 AAV-5가 주입되었는지 언급되지 않은 상태로 시험될 것이다. 주된 사항은 PCR 완료 후에만 제공된다.

[0413]

[0414] 샘플 분석

[0415] *조직 시편* - *AAV*-주입된 마우스의 뒷다리를 급속 냉동하여 배송하였다. 도착 후, 시편을 -80℃ 냉동고로 옮겨 보관하였다.

[0416] *표적 조직에서의 GFP 발현* - 뒷다리(한 쌍)를 실온에서 해동하고, IVIS 생물발광 이미징 시스템(Lumina III; Perkin Elmer)에서 촬영하였다. GFP 형광은 488 nm에서의 여기를 사용하고 510 nm에서의 방출을 측정하여 정량화하였다. 각 시점(3일차, 5일차, 및 7일차)에 총 4마리의 마우스를 평가하였다. 각 시점의 나머지 6마리의 동물 유래의 조직은, 후속하는 실시간 PCR을 사용한 바이러스 부담의 확인을 위해 유지시켰다.

[0417] *결과* - 도 3에서 알 수 있듯이, 주입 후 3일차에 주입된 무릎 관절 내에서 높은 수준의 GFP 발현이 있었다. 바이러스 부하는 5일차에 약간 감소한 다음, 7일차까지 다시 상승하였다. 본 예비 임상시험에서는 샘플 크기가 제한적이므로 AAV-5와 AAV-6의 거동 간에 유의한 차이가 없었다.

[0418] *논의* - 본 임상시험의 데이터는 마우스 무릎 관절 내로 CRISPR-Cas9의 관절내 전달을 위한 AAV-5 또는 AAV-6의 사용을 뒷받침한다. 두 바이러스 혈청형의 수준은 5일부터 7일까지 증가하여, 추적 관찰이 2주 또는 3주로 연장되었다면 혈청형이 더 증가했을 수 있었다는 가능성을 열어두었다. 이를 확인하기 위해 추가 작업이 필요하지만, 현재까지의 데이터는 벡터의 주입 전과 모노요오드아세테이트(MIA) 결정의 관절내 접종 사이에는 적어도 1주의 간격이 있어야 함을 시사한다.

[0419] *배경 및 이론적 근거* - 모노요오드아세테이트(MIA) 유도성 OA 모델이 두 가지 이유로 본 작업에 사용된다. 첫째, 자연(자발적) OA는 마우스에서 극히 드문 반면, MIA의 주사는 OA 모델을 유도하는데, 이는 비교적 빠르게 발생하고, 예측 가능하며, 관절 내 염증, 통증, 및 연골 변성을 비롯하여 인간 OA 환자에서 보이는 질환 표현형에 대한 양호한 임상적 상관관계를 제공한다. 둘째, 안쪽 반월상 연골의 불안정화(DMM) 및 전방 십자 인대의 횡절단(ACLT)과 같은 수술 모델과 대조적으로, MIA 모델은 관절낭의 수술적 절개를 수반하지 않으므로, 인간 OA 환자의 관절낭과 훨씬 더 관련이 있다.

[0420] 설치류에 대한 MIA 결정의 주입은 OA-유사 병변 및 기능적 손상을 재현하며, 이는 거동 시험 및 객관적 절뚝거림 평가와 같은 기술에 의해 분석되고 정량화될 수 있다. MIA는 글리세르알데히드-3-포스파타아제의 억제제이며, 이로 인한 세포 당분해의 변화는 궁극적으로 연골 세포를 비롯한 관절 내 세포를 사멸시킨다. 연골 세포 사멸은 연골 변성 및 프로테오글리칸 염색의 변화로 나타난다. MIA를 주입한 마우스는 일반적으로 72시간 이내에 통증-유사 거동을 나타내고, 주사 후 약 4주 무렵에는 연골 손실을 나타낸다. 랫트 및 마우스를 대상으로 주입 후 2~3일 이내에 IL-1 발현 증가가 문서화되었다.

[0421] *임상시험 설계* - 마우스에게 MIA 또는 식염수 비히클 대조군(하나의 관절/동물)을 일측으로 주입한다. 각 군 내에서, 동물의 절반은 마우스 IL-1 베타 유전자를 표적화하는 AAV-CRISPR-Cas9 벡터로 전치료하고, 나머지 절반에게는 AAV-CRISPR-Cas9 스크램블 대조군을 주입한다. 다음 두 시점 중 하나에 동물들을 두 군 모두에서 꺼내게 된다: 48시간차의 초기 시점, 윤활액 내에서 IL-1의 수준에 요법이 미치는 영향을 평가하기 위함; 및 4주차의 후기 시점, 연골 파괴에 요법이 미치는 영향 및 골관절염의 조직학적 증거를 평가하기 위함.

[0422] *방법*

[0423] **실험 동물** - 본 임상시험에는 총 80 마리의 마우스가 사용된다. 실험 절차는 현지 IACUC에 의해 검토되고 승인된다. 마우스를 마이크로-아이솔레이터 케이지에 수용하고, 표준 실험 동물 먹이를 급식하고, 물을 자유롭게 마실 수 있게 한다.

[0424] **MIA 모델 및 항-IL1 요법** - 임상시험에 앞서 7일의 기간 동안 마우스를 적응시킨다. 임상시험 첫 날에, 산소와 이소플루란의 혼합물을 흡입시켜 마우스를 마취시킨다. 수술면의 마취가 확인된 후, 오른쪽 뒷다리를 묶고 수술 소독제로 피부를 문질러 닦는다. 40마리의 마우스(**치료군**)에게 IL-1을 표적화하는AAV-CRISPR-Cas9벡터의 관절내 주사하고, 나머지 40마리(**대조군**)에게는 AAV-CRISPR-Cas9 스크램블 대조군을 관절내 주사한다. 7일 후, 각 군의 동물 중 절반에게 MIA를 동일한 관절에 주사하고, 나머지 절반에게은 식염수 비히클에 주사한다. 이를 통해 다음 4개의 임상연구 군이 확립된다:

[0425] 군 1: **치료군-MIA** (20마리 마우스)

[0426] 군 2: **대조군-MIA** (20마리 마우스)

[0427] 군 3: **치료군-비히클** (20마리 마우스)

[0428] 군 4: **대조군-비히클** (20마리 마우스)

[0429] 무릎 관절 내 IL-1 수준을 문서화하기 위해 MIA 접종 후 48시간차에 군 당 10마리의 마우스를 안락사시킨다. 나머지 동물은, 통증 거동(본 프레이 검사를 포함하는 거동 검사), 절뚝거림(다리 사용), 관절 부종(캘리퍼 측정), 및 관절 병리(조직병리학)에 요법이 미치는 효과를 평가하기 위해 4주 동안 수용될 것이다.

[0430] **안락사 및 조직 채취** - 마우스를 방혈 후 경추 탈구에 의해 희생시킨다. 관절을 개방하고 IL-1 측정의 경우(48시간 군) 플러싱하거나 탈석회 조직병리학의 경우(4주 군) 10% 포르말린에 침지시킨다.

[0431] 실시예 5. 마우스에서 MSU-결정 유도 관절 관절염에서 AAV-6 및 AAV-5 매개 CRISPR 치료의 효능

[0432] *소개 및 목적*

[0433] 이들 임상시험의 목적은 모노나트륨 요산염(MSU) 결정 유도성 인터류킨 1J3(IL-1J3)의 방출에 의해 유도된 염증을 억제하는 화합물/단백질을 식별하는 것이다. 이는 다양한 유형의 항염증제, 특히 인터류킨 수용체 길항제 또는 IL-1 또는 IL1R1을 차단하는 항체와 같은 IL-1 경로 차단제의 항염증 활성을 식별하는 간단한 사전 스크리닝이다(Torres R 등의 문헌[Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. Ann Rheym Dis. 2009; 68(10):1602-1608], 그 전체가 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 통합됨). 통풍은 염증성 관절염의 가장 흔한 형태이며 전 세계적으로 유병률이 증가하고 있다(Roddy E 및 Doherty M.의 문헌[Epidemiology of Gout. Arthritis Research & Therapy. 2010; 12(6):223], 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 통풍성 관절염은 혈청 요산염 농도의 증가 및 관절 내 및 관절 주변에서의 일나트륨 요산염 결정(MSU) 침착을 특징으로 하며, 이는 관절 부종 및 중증 통증으로 이어진다(Sabina EP, Chandel S, 및 Rasool MK의 문헌[Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by withaferin A. J Pharm Pharmaceut Sci. 2008; 11(4):46-55], 그 전체가 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 통합됨). 현재의 치료제에는 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 스테로이드, 또는 콜히친이 포함된다. 일부 환자의 경우, 이들 치료제는 통풍 치료에 효과적이지 않거나 유해한 부작용이 있을 수 있다(Sabina의 2008 문헌; Getting SJ 등의 문헌[Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotropic hormone efficacy in gouty arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2002; 46(10):2765-2775], 그 전체가 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 통합됨). MSU-유도 염증 모델은 전신 관절염 및 보다 복잡한 IL-1 유도 질환과 같은 보다 복잡한 질환 과정에서 활성을 가질 수 있는 화합물을 식별하기 위한 양호하고 간단한 스크리닝 도구를 제공한다.

[0434] 마우스를 대상으로 일나트륨 요산염(MSU) 결정 유도형 염증에서 아데노-연관 바이러스(AAV)-매개 CRISPR 요법의 효능을 평가하기 위한 임상시험을 수행하였다. 임상시험 0일차에, 위약 대조군(희석제, 인산염 완충 식염수 [PBS]), AAV-6의 2개의 변이체의 혼합물(하나는 가이드 RNA 1을 보유하고 다른 하나는 가이드 RNA 2를 보유함, 5×10^9 바이러스 게놈 [vg] 카피/mL), AAV-5의 2개의 변이체의 혼합물(가이드 1 + 가이드 2, 5×10^9 vg/mL), 스크램블 AAV-6 대조군(비표적화 가이드 RNA를 보유함, 1×10^{10} vg/mL), 또는 스크램블 AAV-5 대조군(1×10^{10} vg/mL)을 수컷 C57BL/6 마우스를 우측 무릎에 1회(1x) 관절내(IA) 주입하였다. 임상시험 7일차에, MSU 결정(25

mg/mL: 10 μL PBS 중 250 μg)을 마우스의 오른쪽 무릎(치료와 동일한 관절)에 주사하였다. 임상시험 7일차에, MSU 주사 후 약 6시간차에 부검을 위해 마우스를 안락사시켰다. 효능 평가는 동물 체중, 본 프레이 시험, 및 무릎 캘리퍼 측정에 기초하였다.

[0435] AAV-6(가이드 1 + 2: 5 x 10^9 vg/가이드/무릎)으로 IA(0일차에 1x) 주사하여 치료한 마우스는, 7일차에 MSU 주사 후 6시간차에 본 프레이 시험에 의해 측정했을 때 언급된 통증에 있어서 AAV-5 스크램블 벡터를 IA 주사하여 치료한 마우스($p = 0.025$)와 비교하여 통계적으로 유의한 감소를 나타냈으며, 그 결과는 AAV-6 스크램블 벡터 및 PBS 대조군(각각 $p = 0.051$ 및 $p = 0.075$)과 비교했을 때 거의 유의하였다. 본 프레이 평가에 대한 곡선 아래 면적(AUC) 계산은 모든 군에 걸쳐 통계적으로 다르지 않았다. 동물 체중 증가와 무릎 부종은 모든 군에 걸쳐 통계적으로 다르지 않았다(표 7). 모든 동물은 연구 종료 시까지 생존하였다.

표 7

[0436]

데이터 요약			
군	치료	본 프레이 절대 임계값 AUC (-1 내지 7일차) - 오른발	베이스라인 AUC 대비 무릎 캘리퍼 변화(-1 내지 7일차) - 우측 무릎
1	AAV-6 스크램블 벡터 ($1x10^{10}$ 입자/무릎), IA, 1x (d0)	5.92 (0.39)	0.02 (0.01)
2	AAV-6 가이드 1 + 2 ($5x10^9$ 가이드/무릎), 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 스크램블 벡터 ($1x10^{10}$ 입자/무릎), IA, 1x (d0)	5.09 (0.31)	0.02 (0.01)
5	AAV-5 가이드 1 + 2 ($5x10^9$ 가이드/무릎), IA, 1x (d0)	5.73 (0.39)	0.02 (0.01)

값은 군 평균 및 표준 오차(SE)를 나타낸다.
PBS = 인산염 완충 식염수 대조군, AAV = 아데노-연관 바이러스, AUC = 곡선 아래 면적
*$p < 0.05$ AAV-6 가이드 1에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)
†$p < 0.05$ PBS에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)
‡$p < 0.05$ AAV-5 스크램블 벡터에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)
§$p < 0.05$ AAV-5 가이드 1에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)

[0437] 임상 결과 요약 - 시간 경과에 따른 그룹 간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 바이러스 주사가 비히클군에서 관찰된 것보다 더 큰 반응을 유발했다는 임상적 증거는 없었다. 바이러스 주사가 관절 부종에 미치는 MSU의 효과를 변경시켰다는 임상적 증거는 없었다. MSU-유도 염증에서 IL-1의 특이적 역할은 명확하지 않으므로, 임상적 효과의 결여는 예상치 못한 것이 아닐 수 있다.

[0438] qPCR 요약 - qPCR 데이터는 AAV-6 또는 AAV-5를 이용한 CRISPR 편집이 IL-1 베타 mRNA 발현을 정상 수준으로 복구하는 데 효과적임을 확인시켜 준다. 통계적 유의성은 샘플 크기를 고려하면 입증하기 어렵다. 이러한 효과의 확인은 활막 조직의 IHC 분석을 통해 얻을 수 있다.

[0439] *규정 준수*

[0440] 본 임상시험은 시험 시설 표준 운영 절차(SOP), 기본 생명의학 연구 지침의 세계 보건 기구 품질 관행에 따라 수행하였고, USDA 동물 복지법 9 CFR 파트 1~3을 비롯한 모든 주 및 연방 규정을 준수하여 수행하였다. 연방정부 공보 39129, 1993년 7월 22일.

[0441] *동물실험 윤리(Institutional Animal Care and Use)*

[0442] 본 임상시험은 실험동물 사용과 관리에 대한 지침(8판)에 따라 수행하였다. 본 임상시험에 사용된 동물에 대해 허용 가능한 대안적인 시험 시스템은 식별되지 않았다.

[0443] *물질 및 방법*

[0444] 시험 물질의 식별 및 제조

[0445] AAV 벡터를 동결된 분취물 중 바이러스 입자 현탁액(>5 x 10^{12} vg 카피/mL)으로서 사전 제형화하였다. 분취물을 -80℃에서 보관하고, 사용 직전에 희석제(멸균 여과된 PBS[Corning, 로트 번호 01420007]) 중에서

재구성하였다. 주입 전에 AAV 벡터를 연구원이 취급할 때는 표준 생물안전 등급 2(BSL-2) 취급을 사용하였다. AAV 스크램블 대조군을 멸균 PBS에서 제조하여, 10 μL/무릎으로 IA 주입하기 위한 1 x 10^{12} vg/mL를 함유하는 작업 모액을 형성하여 1 x 10^{10} vg의 스크램블 대조군을 무릎 관절 내로 전달하였다. 2개의 활성 AAVAAV-5 또는 AAV-6 작제물 각각의 동일한 양을 멸균 PBS와 혼합하여 2개의 가이드 각각에 대해 5 x 10^{11} vg/mL를 함유하는 작업 모액을 형성함으로써 활성 AAV 벡터를 제조하였다. 활성 AAV 제형을 10 μL/무릎으로 IA 주입하여 2개의 가이드 각각을 5 x 10^{9} vg를 무릎 관절 내로 전달하였다. 시험 물질 제조, 보관, 및 취급에 대한 보다 자세한 내용은 임상시험 계획서(부록 B)를 참조한다.

[0446] AAV 벡터를 다음과 같이 식별하였다:

AAVPrimeTM 아데노 연관 바이러스 - 혈청형6 (AAV-6) sgRNA 용 입자(GeneCopoeia™, 카탈로그 번호 AA06-MCP001682-AD01-2-200-a, 로트 번호 GC03182K2001)
AAVPrimeTM 아데노 연관 바이러스 - 혈청형6 (AAV-6) sgRNA 용 입자 (GeneCopoeia™, 카탈로그 번호 AA06-MCP001682-AD01-2-200-b, 로트 번호 GC03202K2001)
AAVPrimeTM 아데노 연관 바이러스 - 혈청형6 (AAV-6) sgRNA 용 입자(GeneCopoeia™, 카탈로그 번호 AA06-CCPCTR01-AD01-200, 로트 번호 GC03112K2002)
AAVPrimeTM 아데노 연관 바이러스 – 혈청형5 (AAV-5) sgRNA 용 입자 (GeneCopoeia™, 카탈로그 번호 AA05-MCP001682-AD01-2-200A, 로트 번호 GC-03182K2002)
AAVPrimeTM 아데노 연관 바이러스 – 혈청형5 (AAV-5) sgRNA 용 입자 (GeneCopoeia™, 카탈로그 번호 AA05-MCP001682-AD01-2-200B, 로트 번호 GC03182K2003)
AAVPrimeTM 아데노 연관 바이러스 – 혈청형5 (AAV-5) sgRNA 용 입자 (GeneCopoeia™, 카탈로그 번호 AA05-CCPCTR01-AD01-200, 로트 번호 GC03032K2003)

[0447]

[0448] 일나트륨 요산염(MSU) 결정을 Invivogen(카탈로그 번호 Tlrl-25-MSU, 로트 번호 MSU-42-01)으로부터 입수하였다. MSU 결정을 플라스틱 튜브에서 PBS(Ca 또는 Mg 미포함: Corning, 카탈로그 번호 21-031-CV, 로트 번호 31719003) 중 25 mg/mL로 제조하고, 대략 1분 동안 와동시키고, 대략 15 내지 20분 동안 초음파처리하고, 와동시킨 후 피펫팅하여 사용하였다.

[0449] *시험 시스템*

동물 수:	75 (70 + 5 추가)
종/계통 또는 품종:	C57BL/6
공급자:	Jackson
도착 시 연령/체중:	8~10주령 (약 20그램)
성별:	수컷
임상시험 개시 시점의 연령/체중 범위:	임상시험 개시 전 적어도 9주령
적응:	BBP에 도착한 후 최소 3일 동안 적응하게 됨
수용:	3~5마리/케이지

[0450]

[0451] 8 내지 10주령의 수컷 C57BL/6 마우스(N = 70 + 4 추가)를 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)로부터 입수하였다. 마우스는 임상시험 -1일차에 등록 시 약 20 내지 29 그램(평균 약 25 g)으로 칭량되었다.

[0452] 동물 번호가 표시된 꼬리 아래 쪽의 색상으로 코드화된 점으로 동물을 식별하였다. 등록 후, 모든 케이지에 프로토콜 번호, 군 번호, 및 동물 번호를 표지하였다.

[0453] *환경 및 관리*

[0454] 도착 후, 동물은 옥수숫대로 만든 침상과 먹이와 물병이 매달린 폴리카보네이트 케이지에 동물을 케이지당 3~5마리씩 수용하였다. 마우스를 개별적으로 환기되는 파이 케이지(수동 공기 흐름, 약 0.045~0.048 m2의 바닥 면적)에 수용하였다. 수용실, 케이지, 및 장비 위생을 비롯한 동물 관리는 실험동물 사용과 관리에 대한 지침(Guide, 2011) 및 해당 BBP SOP에 명시된 지침을 준수하였다.

[0455] 임상시험에 투입하기에 앞서, 9일 동안 동물을 적응시켰다. 임상시험의 생 단계(live phase) 동안에는 수의사를 현장에 배석시키거나 대기시켰다. 병용 약물은 투여하지 않았다.

[0456] 적응 기간 및 임상시험 기간 동안, 동물을 19℃ 내지 25℃의 온도와 30% 내지 70%의 상대 습도 범위의 실험실 환경에 수용하였다. 자동 타이머를 이용해 12시간의 주간 및 12시간의 야간 환경을 제공하였다. 동물들이 Envigo Teklad 8640 먹이와 신선한 수돗물을 자유롭게 취식할 수 있게 하였다.

[0457] *임상시험의 설계*

[0458] 임상시험 -1일차에, 동물을 체중에 따라 치료군에 무작위배정하고, 무릎을 면도하고, 베이스라인 무릎 캘리퍼스 측정을 수행하였다. 임상시험 0일차에, 표 8에 나타낸 것과 같이 치료제를 동물에게 (오른쪽 무릎에 IA) 투여하였다. 임상시험 7일차에, 동물에게 MSU 결정(총 10 μL, 250 μg의 MSU)을 오른쪽 무릎(치료제와 동일한 무릎)에 IA 주사하였다. 체중 측정을 기술된 바와 같이 수행하였다. 언급된 통증은 기술된 것과 같이 5개 시점에 본 프레이 시험에 의해 측정하였다. 우측 무릎의 캘리퍼 측정은 기술된 것과 같이 5개 시점에 측정하였다. 기술된 것과 같이, 7일차에 최종 거동 검사 후 부검을 위해 동물을 안락사시켰다.

표 8

[0459]

군 및 치료 정보								
군	N	MSU	치료	투여량 수준 (입자/무릎)	투여량	투여 농도(입자/ml)	투여 경로	요법
1	14	예	AAV-6 스크램블 벡터	$1x10^{10}$	10 μL	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
2	14	예	AAV-6 가이드 1 + 2	$5x10^{9}$ (각 가이드)	10 μL	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
3	14	예	PBS	--	10 μL	--	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
4	14	예	AAV-5 스크램블 벡터	$1x10^{10}$	10 μL	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
5	14	예	AAV-5 가이드 1 + 2	$5x10^{9}$ (각 가이드)	10 μL	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)

[0460] 질환 유도

[0461] MSU 결정을 멸균 PBS 중에서 25 mg/mL의 농도로 제조하였다. 결정을 가용화하고, 주사제를 사용 전에 조심스럽게 혼합하였다. 10uL의 MSU 결정 용액을 우측 무릎 관절 내에 주사하였다.

[0462]

제형화되지 않은 MSU 보관 조건: 실온, 차광
비히클: PBS
투여 경로: 오른쪽 무릎에 IA
투여량: 10uL/무릎
MSU 제형화 지침 및 계산: 0.01 ml/무릎 * 75마리 = 0.72 ml의 25 mg/ml MSU 필요, 최소
MSU 보관 및 안정성: 유리에 보관함. 투여 직전에 제조함. 주사 전에 와동시킴
투여 후 MSU 처리: 투여 후 제형 폐기함. 제형화하지 않은 모액을 유지함.

[0463] 체중 측정 및 생 단계 샘플링

[0464] 무작위배정을 위해 임상시험 -1일차(주입 전)에 마우스를 칭량하고, 임상시험 2일차 및 6일차에 체중을 다시 측

정하였다. 동물 체중 측정은 표 9에서 확인할 수 있다.

표 9

체중 및 투여량 계산 데이터 (MGA-UCM-2)

처료군	-1일차	0일차	2일차		6일차		-1 대지 6일차 체중 변화
군 1 AAV-6 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/투물) IA, 1x (D0)	체중 (g)	투여량 10 μl (ml)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	
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
총갯	21.95	0.01	22.56	2.8%	23.34	6.3%	1
평균	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
군 2에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.684
군 3에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.243
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.212
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.543
군 2 AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/투물) IA, 1x (D0)	-1일차	-1일차	2일차		6일차		-1 대지 6일차 체중 변화
	체중 (g)	투여량 10 μl (ml)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	
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
추가	25.84	0.01	26.43	2.3%	26.29	1.7%	0
평균	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
군 3에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.940
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.919
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.999

[0465]

치료군							
군 3 PBS IA, 1x (D0)	-1일차	-1일차	2일차		6일차		-1 내지 6일차
	체중 (g)	투여량 10 μl (ml)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 변화
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
평균	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
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							>0.9999
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.983
군 4 AAV-5 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)	-1일차	-1일차	2일차		6일차		-1 내지 6일차
	체중 (g)	투여량 10 μl (ml)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 변화
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
추가	26.25	0.01	26.58	1.3%	26.28	0.1%	0
평균	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
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)							0.973
군 5 AAV-5 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x(D0)	-1일차	-1일차	2일차		6일차		-1 내지 6일차
	체중 (g)	투여량 10 μl (ml)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 (g)	베이스라인 대비 체중 변화율(%)	체중 변화
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
추가	24.78	0.01	25.36	2.3%.	26.21	5.8%	1
평균	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

[0466]

[0467] 본 프레이 방법

[0468] 본 프레이 분석은 5개 시점에 우측 뒷발에 대해 수행하였다: 베이스라인(-1일차), 투여 6시간 후(0일차), 투여 24시간 후(1일차), MSU 주사 전(0시간, 7일차), 및 MSU 주사 6시간 후(7일차). 본 프레이 시험 도중에 군을 연구원에게 눈가림하였다.

[0469] 본 프레이 방법은 발에 교정된 필라멘트(Bioseb, Vitrolles, France)를 적용한 것에 대한 동물의 반응에 기초하여 기계적 이질통(보통 통증을 유발하지 않는 자극으로 인한 통증)을 평가한다. 필라멘트는 log10[힘(mg) X 10]으로 표시되는 숫자에 의해 식별된다. 베이스라인 평가 전에, 3회(45 내지 60분)에 걸쳐 시험 랙에 익숙하게 만든다. 시험할 때, 본 프레이 헤어(hair)를 뒷발의 표면에 위치시키고, 헤어가 상당히 구부러질 때까지 부드럽게 밀고; 헤어를 발에 대고 6초 동안 민다. 반응은 0(반응 없음) 또는 1(반응)로 다시 코딩된다. 반응은 뒷발을 헤어와 먼쪽으로 들어 올리는 것, 다리를 갑자기 치우는 것, 헤어로부터 도망가는 것 등으로서 정의된다. 시작 헤어는 3.22이고, 동물이 반응하면 시험자는 2.83으로 사이즈를 낮추고, 3.22 헤어까지 반응이 없으면 시험자는 3.61로 올리고; 시험자는 반응을 기준으로 사이즈를 적절히 높이거나 낮추면서 헤어 테스트를 계속한다. 헤어 증분은 다음과 같다: 1.65, 2.36, 2.44, 2.83, 3.22, 3.61, 3.84, 4.08, 4.17. 최종 필라멘트에 도달할 때까지 헤어를 높이거나 낮추면서 각각의 발을 5회 시험한다. 데이터를 스프레드시트에 입력하고, 반응률을 발 이질통 임계값으로 번역하는 데 사용한다. 식 10(x + yz)/10000을 사용하여 시험 결과를 그램 단위의 절대 임계값(50% 반응률)으로 변환하며, 식 중 x는 최종 시험된 필라멘트의 로그 단위 값과 같고, y는 작은 샘플에 대한 Dixon의 고저법(Dixon's up-and-down method, Dixon, 1965)의 반응 패턴에 대한 표 값과 같으며, z는 필라멘트 값들 사이의 평균 간격과 같다. 시험을 뒷발의 뒷 부분에 대해 시험을 수행하는데, 이는 발뒤꿈치가 보다 신뢰할 수 있고 민감한 반응을 제공하는 경향이 있기 때문이다. 시험자는 과도한 반응 또는 얼어붙음에 대해 동물을 모니터링하는데, 이 경우 동물을 진정될 때까지 혼자 둔다. 본 프레이 데이터는 표 10에서 확인할 수 있다.

표 10

본 프레이 데이터(MGA-UCM-2)

처료군														
군 1 AAV-6 스크윈를 백터 (1x10^10 입자/무물) IA, Ix (D0)	-1일차		0.25일차		1일차		7일차		7.25일차		-1-7일차
	결 대 임계값		결 대 임계값		결 대 임계값		결 대 임계값		결 대 임계값		
	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(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
추가	4.12500	1.33	3.41500	0.26	3.41500	0.26	4.12500	1.33	3.02500	0.11	6.15
평균		**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**
군 2에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.979**		**0.917**		**1.000**		**0.974**		**0.051**	**1.000**
군 3에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.998**		**>0.9999**		**>0.9999**		**0.907**		**>0.9999**	**0.994**
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.999**		**0.943**		**0.493**		**0.956**		**0.987**	**0.478**
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.984**		**0.873**		**0.995**		**0.998**		**0.599**	**0.996**

[0470]

[0471]

치료군														
군 2 AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 벌로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)	-1일차		0.25일차		1일차		7일차		7.25일차		-1-7일차
	절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		
	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(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
추가	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.73
평균		**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**
군 3에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.886**		**0.941**		**>0.9999**		**0.998**		**0.075**	**1.000**
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.924**		**>0.9999**		**0.639**		**0.690**		**0.025**	**0.369**
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.828**		**1.000**		**0.999**		**0.999**		**0.855**	**0.981**

[0472]

처료군	-1일차		0.25일차		1일차		7일차		7.25일차		-1-7일차
	절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		
군3 PBS IALix (D0)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(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
평균		**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**
군4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**>0.9999**		**0.962**		**0.400**		**0.548**		**0.985**	**0.259**
군5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)		**0.999**		**0.901**		**0.998**		**0.983**		**0.660**	**0.937**

[0473]

치료군											
군 4 AAV-5 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)	-1일차		0.25일차		1일차		7일차		7.25일차		-1~7일차
	절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		
	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(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
추가	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.97
평균		**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**
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후검정)		**0.999**		**0.999**		**0.776**		**0.869**		**0.411**	**0.713**

[0474]

처료군		-1일차		0.25일차		1일차		7일차		7.25일차		-1-7일차
군 5 AAV-5 가이드 1+2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		절대 임계값		
		로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(g)	로그 단위	(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
	추가	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	5.33
	평균		**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**

표 11

무료 갤리퍼 데이터 (MGA-UCM-2)

치료군																	
군1 AAV-6 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)	-1일차			0.25일차			1일차			7일차			7.25일차			-1-7일차
	갤리퍼 측정 (mm)			갤리퍼 측정 (mm)			갤리퍼 측정 (mm)			갤리퍼 측정 (mm)			갤리퍼 측정 (mm)			베이스라인 AUC 대비 △
	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		
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
추가	3.54	0.00		3.57	0.03		3.54	0.00		3.54	0.00		3.56	0.02		0.03
평균	**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**
군 2에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.129**						**0.719**			**0.927**		**0.998**
군 3에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.832**						**0.959**			**0.543**		**1.000**
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.854**						**0.836**			**0.971**		**0.999**
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.370**						**0.618**			**0.832**		**1.000**

[0475]

[0476]

처료군															
군 2 AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)	-1일차			0.25일차			1일차			7일차			7.25일차			-1-7일차
	캘리퍼 측정 (mm)			캘리퍼 측정 (mm)			캘리퍼 측정 (mm)			캘리퍼 측정 (mm)			캘리퍼 측정 (mm)			베이스라인 AUC 대비 △
	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		
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
추가	3.62	0.00		3.64	0.02		3.62	0.00		3.62	0.00		3.65	0.03		0.02
평균	**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**
군 3에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.741**						**0.994**			**0.252**		**0.989**
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.996**						**>0.9999**			**0.994**		**0.982**
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					**0.935**						**0.999**			**1.000**		**0.989**

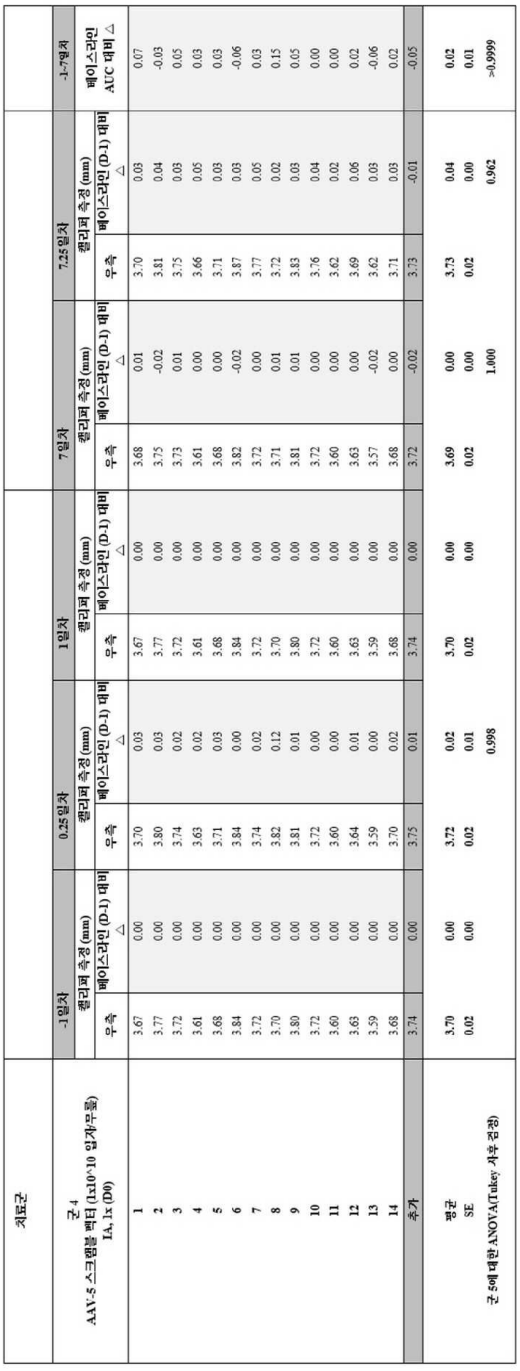
[0477]

처료군	-1일차			0.25일차			1일차			7일차			7.25일차			-1-7일차
군 5 AAV-5 가이드 1 + 2 가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)	왼리퍼 측정 (mm)			왼리퍼 측정 (mm)			왼리퍼 측정 (mm)			왼리퍼 측정 (mm)			왼리퍼 측정 (mm)			베이스라인 AUC 대비 △
	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		
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
추가	3.72	0.00		3.72	0.00		3.72	0.00		3.72	0.00		3.72	0.00		0.00
평균	**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**

[0478]

치료군											
군 3 PBS IA,1x (D0)	-1일차		0.25일차		1일차		7일차		7.25일차		-1~7일차
	캘리퍼 측정 (mm)		캘리퍼 측정 (mm)		캘리퍼 측정 (mm)		캘리퍼 측정 (mm)		캘리퍼 측정 (mm)		베이스라인 AUC 대비 △
	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △	
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
평균	**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**
군 4에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)				**>0.9999**				**0.997**		**0.214**	**>0.9999**
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)				**0.980**				**0.975**		**0.160**	**>0.9999**

공개특허 10-2023-0041729



처료군	-1일차			0.25일차			1일차			7일차			7.25일차			-1-7일차
	퀄리퍼 측정 (mm)			퀄리퍼 측정 (mm)			퀄리퍼 측정 (mm)			퀄리퍼 측정 (mm)			퀄리퍼 측정 (mm)			베이스라인 AUC 대비 △
군 4 AAV-5 스크램블 펩타 (1x10^10 입자무물) IA, 1x (D0)	우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		우측	베이스라인 (D-1) 대비 △		
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
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
추가	3.74	0.00		3.75	0.01		3.74	0.00		3.72	-0.02		3.73	-0.01		-0.05
평균	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
군 5에 대한 ANOVA(Tukey 사후 검정)					0.998						1.000			0.962		>0.9999

[0479]

[0480] 빈사 상태의 동물 또는 죽은 채로 발견된 동물

[0481] 동물이 죽은 채로 발견된 경우, 샘플을 채취하지 않았다. 이유와 상관없이, 안락사가 필요한 동물의 경우, 부검에서와 마찬가지로 샘플을 채취하였다(부검 정보 섹션 참조). 건강 평가 중인 동물에게는 케이지 하단에 하이드로겔과 먹이뿐만 아니라 체액을 SC 주입할 수 있다.

[0482] *임상시험 군의 지정*

군	N	MSU	치료	투여량 수준 (입자/무릎)	투여량	투여 농도 (입자/ml)	투여 경로	요법
1	14	예	AAV-6 스크램블 벡터	$1x10^{10}$	10μl	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
2	14	예	AAV-6 가이드 1 + 2	$5x10^{9}$ (각 가이드)	10μl	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
3	14	예	PBS	--	10μl	--	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
4	14	예	AAV-5 스크램블 벡터	$1x10^{10}$	10μl	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)
5	14	예	AAV-5 가이드 1 + 2	$5x10^{9}$ (각 가이드)	10μl	$1x10^{12}$	IA (우측 무릎)	1x (0일차)

[0483]

[0484] *임상시험 달력*

월	화	수	목	금	토	일
5/4/2020 *-10 일차*	5/5/2020 *-9 일차*	5/6/2020 *-8 일차*	5/7/2020 *-7 일차*	5/8/2020 *-6 일차*	5/9/2020 *-5 일차*	5/10/2020 *-4 일차*
적응을 위해 동물을 도착 즉시 군별로 배분함.				*VF에 적응시킴*		
5/11/2020 *-3 일차*	5/12/2020 *-2 일차*	5/13/2020 *-1 일차*	5/14/2020 *0 일차*	5/15/2020 *1 일차*	5/16/2020 *2 일차*	5/17/2020 *3 일차*
VF에 적응시킴	*VF에 적응시킴*	칭량 및 무작위 배정, 베이스라인 캘리퍼, 베이스라인 거동. 무릎을 면도함	지정 시간 투여, 지정 시간 캘리퍼, 지정 시간 거동	지정 시간 캘리퍼, 지정 시간 거동	칭량	
5/18/2020 *4 일차*	5/19/2020 *5 일차*	5/20/2020 *6 일차*	5/21/2020 *7 일차*	5/22/2020 *8 일차*	5/23/2020 *9 일차*	5/24/2020 *10 일차*
		칭량, 무릎 면도?	지정 시간 MSU, 지정 시간 캘리퍼, 지정 시간 거동, 지정 시간 부검			

[0485]

[0486] *물질*

명칭	공급업체	카탈로그 #*
MSU 결정	Invivogen	Tlrl-msu-25
비히클(PBS)	Corning	21-031-CV
유전자	SgRNA	AA06-CCPCTRO1—AD01-200
유전자	SgRNA	AA06-MCP001682-AD01-2-200A
유전자	SgRNA	AA06-MCP001682-AD01-2-200B
유전자	SgRNA	AA05-CCPCTROI-AD01-200
유전자	SgRNA	AA05-MCP001682-AD01-2-200-9
유전자	SgRNA	AA05-MCP001682-AD01-2-200-6
이소플루란	VetOne	502017
주사기 및 바늘	BD	필요에 따라
혈청 분리관(필요한 경우)	Greiner Bio-One	#450472 (Fisher 경유)
Li Hep Mini-Collect (필요한 경우)	Greiner Bio-One	#450480 (Fisher 경유)
EDTA Mini-Collect (필요한 경우)	Greiner Bio-One	#450477 (Fisher 경유)
K3EDTA (필요한 경우)	Covidien	#8881311149 (Fisher 경유)

[0487]

[0488] *시험 물질 및 비히클 정보*

군	화합물	N	ml/동물	투여일수	투여량/일	필요한 화합물 (ml)	25% 평균	총 필요량 (ml)
1	AAV-6 스크램블 벡터	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
2	AAV-6 가이드 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 스크램블 벡터	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
5	AAV-5 가이드 1+2	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18

[0489]

[0490] 제형화되지 않은 시험 물질 보관 조건:

AAV-6 스크램블 벡터 (군 1): -80℃
AAV-6 가이드 1+2 (군 2): -80℃
PBS (군 3): 4℃
AAV-5 스크램블 벡터 (군 4): -80℃
AAV-5 가이드 1+2 (군 5): -80℃

[0491]

[0492] 비히클 정보:

AAV-6 스크램블 벡터 (군 1): 멸균 PBS (Ca 및 Mg 미포함)
AAV-6 가이드 1+2 (군 2): 멸균 PBS (Ca 및 Mg 미포함)
PBS (군 3): 멸균 PBS (Ca 및 Mg 미포함)
AAV-5 스크램블 벡터 (군 4): 멸균 PBS (Ca 및 Mg 미포함)
AAV-5 가이드 1+2 (군 5): 멸균 PBS (Ca 및 Mg 미포함)

[0493]

[0494] 시험 물질 제형화 지침 및 계산:

AAV-6 스크램블 벡터 (군 1): 멸균 PBS를 사용하여 모액을 적절한 농도로 희석한다 (AAV 제조 섹션 참조)
AAV-6 가이드 1+2 (군 2): 멸균 PBS를 사용하여 모액을 적절한 농도로 희석한다(AAV 제조 섹션 참조)
PBS (군 3): 멸균 PBS를 사용한다(AAV 제조 섹션 참조)
AAV-5 스크램블 벡터 (군 4): 멸균 PBS를 사용하여 모액을 적절한 농도로 희석한다 (AAV 제조 섹션 참조)
AAV-5 가이드 1+2 (군 5): 멸균 PBS를 사용하여 모액을 적절한 농도로 희석한다(AAV 제조 섹션 참조)

[0495]

[0496] 투여 제형 및 비히클의 보관 및 안정성:

AAV-6 스크램블 벡터 (군 1): 주사 직전에 희석할 것
AAV-6 가이드 1+2 (군 2): 주사 직전에 희석할 것
AAV-5 스크램블 벡터 (군 4): 주사 직전에 희석할 것
AAV-5 가이드 1+2 (군 5): 주사 직전에 희석할 것

[0497]

[0498] 투여 후 시험 물질의 처리:

AAV-6 스크램블 벡터 (군 1): 제형을 폐기하고, 모액은 향후 연구를 위해 -80℃로 유지할 것.
AAV-6 가이드 1+2 (군 2): 제형을 폐기하고, 모액은 향후 연구를 위해 -80℃로 유지할 것.
AAV-5 스크램블 벡터 (군 4): 제형을 폐기하고, 모액은 향후 연구를 위해 -80℃로 유지할 것.
AAV-5 가이드 1+2 (군 5): 제형을 폐기하고, 모액은 향후 연구를 위해 -80℃로 유지할 것.

[0499]

[0500] *생 단계*

생 단계 데이터 수집			
유형	임상시험일	군 (An)	세부사항
체중	-1, 2, 6일차	전체	
무릎 캘리퍼	-1일차(베이스라인) 0일차(6시간) 1일차(24시간) 7일차(0시간, 6시간)	전체	우측 무릎 베이스라인 대비 변화
본 프레이	-1일차(베이스라인) 0일차(6시간) 1일차(24시간) 7일차(0시간, 6시간)	전체	오른발만

[0501]

[0502] *부검 정보*

[0503] 연구 7일차에 최종 거동 검사 후 동물을 부검하였다(MSU 약 6시간 후). 부검 시, 심장 천자를 통해 마우스를 방혈한 후 경추를 탈골시켜 안락사시킨 후 조직을 채취하였다. 전혈을 가공하여 혈청(≥200 μL/마우스)을 채취하고, 이를 임상시험 의뢰자에게 배송하기 위해 -80℃에서 냉동 보관하였다. 모든 동물로부터 우측 무릎(주입) 및 좌측 무릎(정상)을 채취하였다(무릎 관절을 온전하게 유지하면서 피부, 근육, 및 발을 제거함). 관절을 임상시험 의뢰자에게 배송하기 위해 15-mL 원뿔형 튜브에 넣어 급속 냉동시켰다.

희생 일정:	임상시험 7일차(MSU 6시간 후): 모든 동물
안락사 방법:	심장 천자에 의한 출혈로 방혈에 이어서 경추 탈골.
시점:	최종 거동 시점 후(MSU 6시간 후)

[0504]

부검 샘플 채취:						
유형	가공 목적	항-응고	군/An	최종 부피	보관 조건	처분
심장 천자 전혈	혈청	N/A	전체	≥200μl	-80°C, Epps	임상시험 의뢰자에게 배송

[0505]

부검 조직 샘플 채취:				
유형	군/An	세부사항	보관 조건	처분
우측 무릎(주입)	전체	무릎 관절을 온전하게 유지하면서 피부와 근육을 제거하고, 발을 제거함	15ml 원뿔형 튜브에서, 즉시 급냉	임상시험 의뢰자에게 배송
좌측 무릎(정상)	전체	무릎 관절을 온전하게 유지하면서 피부와 근육을 제거하고, 발을 제거함	15ml 원뿔형 튜브에서, 즉시 급냉	임상시험 의뢰자에게 배송

[0506]

[0507] *통계 분석*

[0508] 데이터를 Microsoft Excel에 입력하고, 각 그룹에 대한 평균 및 표준 오차(SE)를 결정하였다. 일원 분산분석(ANOVA)을 사용해 군을 비교하거나, Tukey 사후 검정을 이용한 반복 측정(RM) ANOVA를 사용해 군을 비교하였다. ANOVA는 Prism v8.0.2 소프트웨어(GraphPad)를 사용하여 수행하였다. 명시되지 않는 한, BBP는 원시(비변환) 데

이터만을 대상으로 통계적 분석을 수행한다. 통계적 검정은 데이터의 정규성 및 분산 균질성에 관한 소정의 가정을 하며, 검정이 이러한 가정을 위반하는 경우 추가 분석이 필요할 수 있다. 모든 시험에 대한 유의성은 $p < 0.050$으로 설정하였으며, p 값은 소수점 셋째 자리까지 반올림하였다.

[0509] *AAV 제조*

[0510] 주사용 바이러스 제조를 위한 표준 작업 절차

[0511] 각 작제물 별로(가이드 1, 가이드 2) 5 x 10^11 vg/ml를 함유하는 작업 모액을 생성한다. 참고로, 동등성을 위해, 스크램블 대조군은 총 1 x 10^10 카피의 스크램블 벡터로 주입되어야 한다. 비히클 대조군에는 희석제(PBS)가 사용된다.

[0512] 물질

[0513]

AA06-CCPCTR01-AD01-200: 스크램블 대조군 AAV-6 입자, 5 x 10^12 vg/ml를 함유하는 100 µL 용액.
AA06-MCP001682-AD01-2-200-가이드 1: AAVPrime™ 입자, AAV-6 함유 가이드 1, 5 x 10^12 vg/ml를 함유하는 100 µL 용액.
AA06-MCP001682-AD01-2-200-가이드 2: AAVPrime™ 입자, AAV-6 함유 가이드 2, 5 x 10^12 vg/ml를 함유하는 100 µL 용액.

[0514]

AA05-CCPCTR01-AD01-200: 스크램블 대조군 AAV-5 입자, >5 x 10^12 vg/ml를 함유하는 100 µL 용액.
AA05-MCP001682-AD01-2-200-가이드 1: AAVPrime™ 입자, AAV-5 함유 가이드 1, >5 x 10^12 vg/ml를 함유하는 100 µL 용액.
AA05-MCP001682-AD01-2-200-가이드 2: AAVPrime™ 입자, AAV-5 함유 가이드 2, >5 x 10^12 vg/ml를 함유하는 100 µL 용액.

[0515] 절차

[0516] **군 1: AAV-6 스크램블 대조군 -** Ca 및 Mg가 없는 멸균 여과된 400 µL의 PBS를 멸균 Eppendorf 튜브 내로 분취한다. 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)의 모액 AA06-CCPCTR01-AD01-200을 첨가한다. 1 x 10^12 vg/ml의 AAV-5 스크램블 대조군을 함유하는 0.5 ml 부피의 작업 모액이 생성된다. 10 µL의 이 용액을 무릎 관절 내로 주사하여 1 x 10^10 vg의 AAV-6 스크램블 대조군을 전달한다.

[0517] **군 2: 활성 AAV-6 가이드 1+2 -** Ca 및 Mg가 없는 멸균 여과된 800 µL의 PBS를 멸균 Eppendorf 튜브 내로 분취한다. 2개의 활성 AAV-6 작제물 각각의 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)를 첨가한다 - 이는 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)의 AA06-MCP001682-AD01-2-200-a 및 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)의 모액 AA06-MCP001682-AD01-2-200-b를 첨가함을 의미함. 2개의 가이드 각각에 대해 5 x 10^11 vg/ml를 함유하는 1 ml 부피의 작업 모액이 생성된다. 10 µL의 이 용액을 무릎 관절 내로 주사하여 2개의 AAV-6 가이드 각각에 대해 5 x 10^9 vg을 전달한다.

[0518] **군 3: PBS** - 본 임상시험에 비히클 대조군의 역할을 하는 바이러스 모액을 희석하는 데 사용한 Ca 및 Mg가 없는 멸균 여과된 PBS. 10 µL/무릎 관절로 투여하였다.

[0519] **군 4: AAV-5 스크램블 대조군 -** Ca 및 Mg가 없는 멸균 여과된 400 µL의 PBS를 멸균 Eppendorf 튜브 내로 분취한다. 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)의 모액 AA05-CCPCTR01-AD01-200을 첨가한다. 1 x 10^12 vg/ml의 AAV-5 스크램블 대조군을 함유하는 0.5 ml 부피의 작업 모액이 생성된다. 10 µL의 이 용액을 무릎 관절 내로 주사하여 1 x 10^10 vg의 AAV-5 스크램블 대조군을 전달하였다.

[0520] **군 5: 활성 AAV-6 가이드 1+2 -** Ca 및 Mg가 없는 멸균 여과된 800 µL의 PBS를 멸균 Eppendorf 튜브 내로 분취한다. 2개의 활성 AAV-6 작제물 각각의 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)를 첨가한다 - 이는 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)의 AA05-MCP001682-AD01-2-200-a 및 100 µL(5 x 10^11 vg와 등량)의 모액 AA05-MCP001682-AD01-2-

200-b를 첨가함을 의미함. 2개의 가이드 각각에 대해 5 x 10^11 vg/ml를 함유하는 1 ml 부피의 작업 모액이 생성된다. 10 μL의 이 용액을 무릎 관절 내로 주사하여 2개의 AAV-6 가이드 각각에 대해 5 x 10^9 vg을 전달하였다.

[0521] *qPCR*

[0522] 급냉시킨 활막 조직을 일괄 절단하고(원위 대퇴골 및 근위 경골 포함) RLT 완충액에 넣었다. Cyrolys Evolution 조직 균질화기("HARD" 프로그램 사이클)를 사용하여 균질화하였다. RNeasy 또는 RNeasy Plus 키트에 이어서 QIAshredder(QIAGEN)를 사용해 RNA를 추출하였다. Nanonstring을 사용해 RNA를 정량화하였다. cDNA를 역전사하고, IL-1 베타, 베타-액틴, 및 RPL13에 대한 마우스-특이적 프라이머를 사용해 qPCR을 수행하였다.

[0523] *결과*

[0524] 도 6에 도시된 바와 같이, PBS 대조군 마우스는 임상시험 과정에 걸쳐 평균 체중이 4.3%(1.1 g) 증가하였다. 체중 증가는 군 전체에 걸쳐 통계적으로 다르지 않았다(표 7, 표 9).

[0525] 도 7a에 도시된 바와 같이, 모든 군에서 무릎 캘리퍼 측정치는 임상시험 0일차 투여 6시간 후에 피크를 형성하였고, 투여 24시간 후에 베이스라인으로 돌아간 다음, 임상시험 7일차 MSU 6시간 후에 다시 피크를 형성하였다. 베이스라인 대비 무릎 캘리퍼 변화는 시간 경과에 따라 모든 군에서 통계적으로 다르지 않았다(표 11). 도 7b에 도시된 바와 같이, -1일차 내지 7일차의 무릎 캘리퍼 변화 AUC는 모든 군에서 통계적으로 다르지 않았다(표 7, 표 11).

[0526] 도 8a에 도시된 바와 같이, 본 프레이 절대 임계치는 임상시험 0일차 IA 투여 후 모든 군에서 약간 감소한 다음, 임상시험 7일차 베이스라인을 향하는 경향을 보인 다음, MSU의 IA 주사 후 급격히 감소하였다. AAV 스크램블 벡터 대조군과 PBS 대조군 간에 시간 경과에 따른 통계적 차이는 없었다. AAV-6(가이드 1 + 2)으로 치료한 마우스의 본 프레이 절대 임계치는 7일차 MSU 6시간 후에 대조군에 비해 증가하였고; 이 시점에 본 프레이 절대 임계치의 증가는 AAV-6 스크램블 벡터 및 PBS 대조군에 비해 거의 통계적 유의성에 도달하였고(각각 p = 0.051 및 p = 0.075), AAV-5 스크램블 벡터 대조군에 비해 통계적으로 유의하였다(p = 0.025). AAV-5(가이드 1 + 2)로 치료한 마우스의 본 프레이 절대 임계치는 시간 경과에 따라 대조군과 통계적으로 다르지 않았다(표 10). 도 8b에 도시된 바와 같이, -1일차 내지 7일차의 본 프레이 절대 임계치는 모든 군에서 통계적으로 다르지 않았다(표 7, 표 10).

[0527] 도 10에 도시된 바와 같이, 활막 조직에서 쥣과 IL-1

[0528] 에 대한 면역조직화학 데이터는 CRISPR로 치료한 동물에서 IL-1β 발현의 감소를 보여주었다. (A) PBS로 사전 치료한 후 MSU를 주입한 동물에서, IL-1β의 강력한 발현이 나타난다(갈색 염색). 이러한 효과는 CRISPR로 치료한 동물(패널 C)에서는 보이지 않는다. CRISPR로 치료한 동물에서 IL-1β(갈색 염색)의 부재는 음성 항체 대조군(패널 B 및 D)과 유사하다. 모든 이미지는 10x 배율이다.

[0529] *논의 및 결론*

[0530] AAV-6(가이드 1 + 2: 5 x 10^9 vg/가이드/무릎)으로 IA(0일차에 1x) 주사하여 치료한 마우스는, 7일차에 MSU 주사 후 6시간차에 본 프레이 시험에 의해 측정했을 때, 언급된 통증에 있어서 AAV-5 스크램블 벡터를 IA 주사하여 치료한 마우스(p = 0.025)와 비교하여 통계적으로 유의한 감소를 나타냈는데, 그 결과는 AAV-6 스크램블 벡터 및 PBS 대조군(각각 p = 0.051 및 p = 0.075)과 비했을 때 거의 유의하였다. 본 프레이 평가에 대한 AUC 계산은 모든 군에서 통계적으로 다르지 않았다. 동물 체중 증가 및 무릎 부종은 모든 군에서 통계적으로 다르지 않았다. 모든 동물은 연구 종료 시까지 생존하였다.

[0531] 실시예 6. 가이드 RNA 설계

[0532] 인간 IL-1α 및 IL-1β를 표적으로 하는 가이드 RNA(표 14)를 다음 절차에 따라 설계하였다:

[0533] 1. 적절한 게놈 조립체 및 유전자 모델을 식별하고(도구: Ensemble, UCSC Genome Browser);

[0534] 2. 표적화 윈도우를 맵핑하기 위한 주요 기능적 도메인을 식별하고(도구: Ensemble; 문헌);

[0535] 3. 주요 엑손에 걸쳐 모든 가능한 가이드 RNA의 목록을 생성하고(도구: Ensemble, UCSC, InDelphi);

[0536] 4. ML 예측 프레임시프트 점수에 기반하여 가이드 순위를 매기고, 순위가 좋지 않은 가이드는 제외시키고;

[0537] 5. 인트론:엑손 경계로부터 5 bp 이내에 있고, 호모폴리뉴클레오티드 영역이 6 x T 이상인 가이드를 제외시키고;

[0538] 6. 각 가이드별로 온 타겟(Doench 2016) 및 오프 타겟(Hsu 2013) 메트릭을 결정하고(도구: UCSC, Deskgen);

[0539] 7. 온 타겟 및 오프 타겟 점수가 낮은 가이드를 걸러내고 최종 목록을 생성하고;

[0540] 8. 프레임시프트 지수를 기준으로 순위를 매긴다.

[0541] 고양이, 개, 또는 말 IL-1α 및 IL-1β를 표적으로 하는 가이드 RNA(표 15)를 다음 절차에 따라 설계하였다:

[0542] 1. 적절한 게놈 조립체 및 유전자 모델을 식별하고(도구: Ensemble, UCSC Genome Browser)

[0543] 2. 표적화 윈도우를 맵핑하기 위한 주요 기능적 도메인을 식별하고(도구: Ensemble; 문헌)

[0544] 3. 적절한 엑손 및 관련 측면 인트론 서열로부터 코딩 서열을 검색하고(도구: Ensemble. APE)

[0545] 4. 주요 엑손에 걸쳐 모든 가능한 가이드 RNA의 목록을 생성하고(도구: Ensemble, InDelphi)

[0546] 5. ML 예측 프레임시프트 점수에 기반하여 가이드 순위를 매기고, 순위가 좋지 않은 가이드는 제외시키고

[0547] 6. 인트론:엑손 경계로부터 5 bp 이내에 있고, 호모폴리뉴클레오티드 영역이 6 x T 이상인 가이드를 제외시키고

[0548] 7. 각 가이드 별로 오프 타겟 메트릭을 결정하고(도구: Cas Off-Finder, 엑셀)

[0549] 8. 오프 타겟 점수가 낮은 가이드를 걸러내고 최종 목록을 생성하고

[0550] 9. 프레임시프트 지수를 기준으로 순위를 매긴다.

[0551] 고려된 모든 종에 대한 유전자 전사물 정보는 표 16에 포함되어 있다.

표 14

유전자 기호	서열번호	종	염색체	게놈	프레임시프트 (%)	Doench 2016	Hsu 2013	gRNA	PAM
IL1B	627	인간	chr2	hg38	80.1	55	76	AGCTGGATGCCGCCATCCAG	AGG
IL1B	628	인간	chr2	hg38	78.5	44	71	ACCACTACAGCAAGGGCTTC	AGG
IL1B	629	인간	chr2	hg38	75.4	63	92	CATGGCCACAACAACTGACG	CGG
IL1B	630	인간	chr2	hg38	74	60	97	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	TGG
IL1B	631	인간	chr2	hg38	87.6	55	61	CTACAGCAAGGGCTTCAGGC	AGG
IL1B	632	인간	chr2	hg38	85.6	61	58	GACCTCTGCCCTCTGGATGG	CGG
IL1B	633	인간	chr2	hg38	85.2	35	62	CTCTCCGCAGTGCTCCTTCC	AGG
IL1B	634	인간	chr2	hg38	78.5	50	62	CATTCTCCTGGAAGGTCTGT	GGG
IL1A	635	인간	chr2	hg38	92.1	70	87	ATGGTGGTAGTAGCAACCAA	CGG
IL1A	636	인간	chr2	hg38	88.3	51	88	GCCATAGCTTACATGATAGA	AGG
IL1A	637	인간	chr2	hg38	87	68	88	CAGAGACAGATGATCAATGG	AGG
IL1A	638	인간	chr2	hg38	87	50	74	ATTCAGAGACAGATGATCAA	TGG
IL1A	639	인간	chr2	hg38	83.1	53	91	TGGTGGTAGTAGCAACCAAC	GGG
IL1A	640	인간	chr2	hg38	85.7	60	67	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	TGG

[0552]

표 15

[0553]

유전자 기호	서열 번호	종	염색체	엑손	게놈	프레임시프트 (%)	CasOffFinder 합계	gRNA	PAM
IL1A	641	말	chr15	4	EquCab3.0	80.9	21	TGGTGCTGGTGGCAGCCAAC	GGG
IL1A	642	말	chr15	4	EquCab3.0	79.2	14	CTTCTTCAGAGTCTTCCCGT	TGG
IL1A	643	말	chr15	3	EquCab3.0	74.9	37	TTACCTGAGTCAGAGAGAGA	TGG
IL1A	644	말	chr15	4	EquCab3.0	74.6	11	AAGCTATGACCCACTTCCTG	AGG
IL1A	645	말	chr15	4	EquCab3.0	71.5	14	CCATGCAGTCCTCAGGAAGT	GGG
IL1A	646	개	chr17	3	canFam4	75.7	7	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	GGG
IL1A	647	개	chr17	3	canFam4	73.8	10	GACATCCCAGCTTACCTTCA	AGG
IL1A	648	개	chr17	3	canFam4	72.6	10	GAGCTGTGACCCACTTCATG	AGG
IL1A	649	개	chr17	3	canFam4	79.2	14	CATTTTCCTTGAAGGTAAGC	TGG
IL1A	650	개	chr17	3	canFam4	87	16	TGGTAGTGGTGGCAGCCAAT	GGG
IL1A	651	개	chr17	3	canFam4	76.8	18	ATTTTCCTTGAAGGTAAGCT	GGG
IL1A	652	개	chr17	3	canFam4	79.1	23	CTTCTTTAGAATCTTCCCAT	TGG
IL1A	653	개	chr17	3	canFam4	71.4	23	GGATGTCTTTGAGATTTCAG	AGG
IL1A	654	개	chr17	3	canFam4	88.5	28	GTGGTAGTGGTGGCAGCCAA	TGG
IL1A	655	개	chr17	3	canFam4	78.7	31	CACTACCACATTTTCCTTGA	AGG
IL1A	656	고양이	chrA3	3	Fc9.0	73.3	12	GGTAAGCTGGGGTGTCTTAG	AGG
IL1A	657	고양이	chrA3	3	Fc9.0	74.3	13	ATTCCTCACTGCTGATGACC	TGG
IL1A	658	고양이	chrA3	3	Fc9.0	86.7	15	TGGTGATGGTGGCAGCCAAT	GGG
IL1A	659	고양이	chrA3	3	Fc9.0	79.3	20	CTTCCAGGTCATCAGCAGTG	AGG
IL1B	660	말	chr15	4	EquCab3.0	87.6	27	TGAAAGTCTTGTTGTAAAGT	TGG
IL1B	661	말	chr15	4	EquCab3.0	79.6	15	GACCTCAGCTCCATGGGCGA	TGG
IL1B	662	말	chr15	4	EquCab3.0	78.5	13	CTGGATGCCCCCATCGCCCA	TGG
IL1B	663	말	chr15	4	EquCab3.0	75.4	17	CCCCATCGCCCATGGAGCTG	AGG
IL1B	664	말	chr15	4	EquCab3.0	75.2	12	AAGTCTTGTTGTAAAGTTGG	TGG

[0554]

유전자 기호	서열 번호	종	염색체	엑손	게놈	프레임시프트 (%)	CasOffFinder 합계	gRNA	PAM
IL1B	665	개	chr17	3	canFam4	82.1	2	CGTGTCAGTCATTGTAGCTT	TGG
IL1B	666	개	chr17	3	canFam4	74.2	11	CCACAGTTCTCTGGTAGATG	AGG
IL1B	667	개	chr17	3	canFam4	80	13	AGACCTGAACCACAGTTCTC	TGG
IL1B	668	개	chr17	3	canFam4	80	14	CCTCATCTACCAGAGAACTG	TGG
IL1B	669	개	chr17	3	canFam4	80	15	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	TGG
IL1B	670	고양이	chrA3	2	Fc9.0	82.4	8	GTAGTAAGCCATCATTTCAC	TGG
IL1B	671	고양이	chrA3	4	Fc9.0	82	4	GAGTCTTAGGCATGCCGTGT	CGG
IL1B	672	고양이	chrA3	4	Fc9.0	81.8	14	AAACCTGAGCCACAGTTTTC	TGG
IL1B	673	고양이	chrA3	2	Fc9.0	80.7	17	ATCATTTCACTGGTGAGTTC	AGG
IL1B	674	고양이	chrA3	4	Fc9.0	80.4	18	ACTCTTGTTGTCGGGCTGGT	GGG
IL1B	675	고양이	chrA3	4	Fc9.0	80.1	14	GACTCTTGTTGTCGGGCTGG	TGG
IL1B	676	고양이	chrA3	4	Fc9.0	76.7	24	CCTCATCTCCCAGAAAACTG	TGG
IL1B	677	고양이	chrA3	3	Fc9.0	76	23	TGAGAATGACCTGTTCTTTG	AGG
IL1B	678	고양이	chrA3	4	Fc9.0	75.7	5	TAAGACTCTTGTTGTCGGGC	TGG
IL1B	679	고양이	chrA3	4	Fc9.0	74.3	18	AACCTGAGCCACAGTTTTCT	GGG

표 16

유전자	종	앙상블	전사체	전사체_ID	위치
IL1A	인간	ENSG00000115008	IL1A-201	ENST00000263339.4	염색체 2: 112,773,925~112,784,493
IL1A	마우스	ENSMUSG00000027399	Il1a-201	ENSMUST00000028882.1	염색체 2: 129,299,610~129,309,972
IL1A	고양이	ENSFCAG00000008095	IL1A-201	ENSFCAT00000008097.5	염색체 A3: 105,113,193~105,121,209
IL1A	개	ENSCAFG00000007245	IL1A-201	ENSCAFT00000045928.3	염색체 17: 36,970,573~36,978,736
IL1A	말	ENSECAG00000023727	IL1A-202	ENSECAT00000025409.2	일차 조립체 15: 16,360,700~16,369,812
IL1B	인간	ENSG00000125538	IL1B-201	ENST00000263341.7	염색체 2: 112,829,751~112,836,779
IL1B	마우스	ENSMUSG00000027398	Il1b-201	ENSMUST00000028881.13	염색체 2: 129,364,570~129,371,139
IL1B	고양이	ENSFCAG00000005899	IL1B-201	ENSFCAT00000005904.5	염색체 A3: 105,049,334~105,056,407
IL1B	개	ENSCAFG00000007249	IL1B-201	ENSCAFT00000011613.4	염색체 17: 37,019,329~37,024,176
IL1B	말	ENSECAG00000000051	IL1B-202	ENSECAT00000061518.2	일차 조립체 15: 16,418,738~16,444,697

[0555]

[0556] 실시예 7. 쥣과 IL-1β에 대한 면역조직화학

[0557] 다음 프로토콜에 따라 IL-1β를 검출하기 위해, 쥣과 활막 조직에 대해 면역조직화학을 수행하였다:

[0558] *시약 및 제제*

[0559] 1. 0.5%(v/v) Tween-20이 포함된 10X PBS

[0560] 2. 멸균 PBS

[0561] 3. IHC 완충액

[0562] 4. 1차 항체(염소 항마우스 IL-1; AF-401-NA, R&D Systems, Inc.)를 멸균 PBS에서 0.2 mg/ml의 최종 농도로 재구성하였다.

[0563] a. +4℃에서 단기 보관

[0564] b. -20 내지 -70℃에서 장기 보관

[0565] 5. 대조군 항체(정상 염소 IgG; AB-108-C, R&D Systems Inc.)를 멸균 PBS에서 1 mg/ml의 최종 농도로 재구성한다.

[0566] a. +4℃에서 단기 보관

[0567] b. -20 내지 -70℃에서 장기 보관

[0568] 6. 이차 항체(HRP 접합된 당나귀 항염소 IgG; ab6885; Abcam)가 재구성된 생성물로서 제공된다.

[0569] a. +4℃에서 단기 보관

[0570] b. -20 내지 -70℃에서 장기 보관

[0571] 7. 과산화효소 블록(BLOXALL 시약, Vector Laboratories)

[0572] 8. 2.5%(v/v)로 희석된 정상 말 혈청(Impress Polymer Kit; Vector Laboratories)

[0573] 9. DAB 크로모젠

[0574] *방법*

[0575] 1시간 동안 항원을 회수하고(수동 또는 자동, 사용자 선호에 따라), 단기간 보관을 위해 샘플을 PBS로 옮겼다. 실온에서 10분 동안 과산화효소를 차단하고, 이어서 샘플을 IHC 완충액에서 5분 동안 세척하였다. 샘플을 대조군 말 혈청으로 실온에서 60분 동안 차단하고, 실온에서 2시간 동안 1차 항체(1 x PBS-Tween에서 1:100 또는 1:200로 희석함)에 노출시켰다. 샘플을 IHC 완충액에서 각각 5분씩 2회 세척하였다. 그런 다음, 샘플을 1시간 동안 2차 항체(1 x PBS-Tween에서 1:500으로 희석함)에 노출시키고, IHC 완충액에서 각각 5분씩 2회 세척하였다. DAB 색소원으로 30초 동안 검출을 수행하였다. Mayer의 헤마톡실린으로 반대 염색을 수행하고(6분), 일련의 등급 알코올을 통해 샘플을 크실렌으로 다시 옮겼다. DPX 장착제를 도포하고, 커버슬립을 부착하였다.

[0576] 도 10에 도시된 바와 같이, 활막 조직에서 쥣과 IL-1β에 대한 면역조직화학 데이터는 CRISPR로 치료한 동물에서 IL-1β 발현의 감소를 보여주었다. (A) PBS로 사전 치료한 후 MSU를 주입한 동물에서, IL-1β의 강력한 발현이 나타난다(갈색 염색). 이러한 효과는 CRISPR로 치료한 동물(패널 C)에서는 보이지 않는다. CRISPR로 치료한 동물에서 IL-1β(갈색 염색)의 부재는 음성 항체 대조군(패널 B 및 D)과 유사하다. 모든 이미지는 10x 배율이다. (A) 및 (B)는 동일한 동물의 동일한 관절에서 취한 인접 절편이며, (A)는 IL-1 베타에 대해 특이적으로 표지된 조직을 나타내고, (B)는 음성(동위원소) 대조군 항체로 표지된 조직을 나타낸다. 염색에서의 차이는, PBS로 전치료한 MSU 주입 동물(예를 들어 PBS로 전치료한 다음 MSU 결정을 접종한 양성 대조군 동물)에서 입증 가능한 IL-1 베타 발현을 이러한 동물에서 반영한다. (C) 및 (D)는 유사하게 인접한 절편이지만, MSU 주사 전에 CRISPR 편집 바이러스로 전치료한 동물의 절편이다. (C) IL-1 항체로 치료한 절편에서는 IL-1 베타에 대한 뚜렷한 염색은 없으며, (D) 음성(동위원소) 대조군 항체로 치료한 절편에서 동일한 음성 패턴이 보인다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 이를 통해서 CRISPR로 치료한 동물의 윤활막에서 검출 가능한 IL-1 베타 발현이 없음을 확인할 수 있다.

[0577] 실시예 8. 개 및 인간 인터류킨-1 알파(IL-1α) 및 인터류킨-1 베타(IL-1β)에 대한 CRISPR/Cas9 RNA 가이드의 설계 및 검증.

[0578] 인간 및 개 인터류킨-1 알파(IL-1α) 및 인터류킨-1 베타(IL-1β) 유전자의 다양한 엑손에 대해 잠재적 crRNA 서열을 식별하였다. 도 13a~13d는 인간 IL-1α 유전자의 엑손 2~7로부터 식별된 crRNA 서열의 순위 목록을 보여준다. 도 14a~14d는 인간 IL-1β 유전자의 엑손 2~7로부터 식별된 crRNA 서열의 순위 목록을 보여준다. 도 15a~15c는 개 IL-1β 유전자의 엑손 3~5로부터 식별된 crRNA 서열을 보여준다. 도 16a~16b는 개 IL-1α 유전자의 엑손 3~5로부터 식별된 crRNA 서열을 보여준다.

[0579] 그런 다음, 공개적으로 접근 가능한 게놈(인간, hg38; 개, CanFam3.1), 접힌 유전자 모델(병합된 Ensembl/Havana), 조직 특이적 엑손 발현(gtexportal.org), 및 다양한 gRNA 모델을 사용해, 개 및 인간 인터류킨-1 알파(IL-1α) 및 인터류킨-1 베타(IL-1β)를 표적화하는 2개 내지 5개의 개별 crRNA 서열/유전자를 선택하였다. 다음의 gRNA 설계 규칙을 적용하였다:

[0580] 1. gRNA 표적 영역은 코딩 서열(CDS)의 첫 5~50%로 제한하였다.

[0581] 2. 단일 gRNA를 Azimuth 2.0 모델(10.1038/nbt.3437)을 사용하는 최대 온 타겟 편집 및 절단 빈도 결정(CFD)(10.1038/nbt.3437)을 사용한 최소 오프 타겟 편집 및 Hsu 등의 특이성 점수(10.1038/nbt.2647)에 따라 순위를 매겼다.

[0582] 3. 시험관내 합성을 위해, inDelphi(10.1038/s41586-018-0686-x)에 의해 예측했을 때 프레임시프트 빈도가 높고(>75%) DNA 복구 결과가 균일한(>0.48) 고순위 sgRNA를 선택하였다.

[0583] 이 선택 기준을 사용하여, 각각의 표적 유전자의 상이한 엑손을 표적으로 하는 crRNA 가이드 서열을 선택하여 추가로 조사하였다. 구체적으로, 도 17a에 도시된 바와 같이, 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3 및 4를 표적으로 하는 sg235(서열번호 301) 및 sg236(서열번호 309)을 선택하였다. 마찬가지로, 도 17b에 도시된 바와 같이, 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3, 4, 및 5를 표적으로 하는 sg237(서열번호 462), sg238(서열번호 391), sg248(서열번호 393), sg249(서열번호 388), 및 sg250(서열번호 389)을 선택하였다. 도 17c에 도시된 바와 같이, 개 IL-1α 유전자의 엑손 3, 4, 및 5를 표적으로 하는 sg239(서열번호 552), sg240(서열번호 554), sg251(서열번호 578), 및 sg252(서열번호 579)를 선택하였다. 마찬가지로, 도 17d에 도시된 바와 같이, 개 IL-1β 유전자의 엑손 3 및 4를 표적으로 하는 sg241(서열번호 498) 및 sg242(서열번호 506)를 선택하였다.

[0584] 그런 다음, 선택된 crRNA 가이드 서열을 스캐폴드 서열에 융합시키는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를, 이들의 안정성을 증가시키고 이들의 세포 면역원성을 감소시키도록 설계된 스캐폴드 변형으로 합성(Synthego)하였다. 유전자형 분석을 위한 프라이머를 표적 부위로부터 적어도 200 bp에 있도록 설계하고, <1.5 kb의 PCR 앰플리콘를 생성하고 합성하였다(Merck).

[0585] 4D-nucleofector(Lonza, 카탈로그 AAF-1002B 및 AAF-1002X) 및 뉴클레오큐베트 스트립을 사용하는 단일 전기천공-기반 형질감염에 다음 양을 사용하였다. 80 pmol의 합성된 sgRNA를 4 μg의 Cas9 뉴클레아제와 실온에서 10분 동안 미리 복합체를 형성하였다. 300~400K의 해리된 세포를 PBS로 세척한 후, 20 μl의 보충된 P3 뉴클레오펙션 용액에 현탁하고, Cas9 RNP 복합체를 첨가하였다. 그런 다음, 이들 세포를 뉴클레오큐베트 웰 내로 옮기고 펄스 코드 ER-100을 사용하여 전기천공하였다. 전기천공 직후, 세포가 전압으로부터 회복하도록 뉴클레오큐베트를 37℃/5% CO2 인큐베이터에 10분 동안 두었다. 그 후, 80 μl의 성장 배지를 뉴클레오큐베트 웰에 첨가하고, 미리 가온된 성장 배지가 담긴 6-웰 접시에 세포를 옮겼다.

[0586] 전기천공 후 2일 내지 11일 사이에, DNeasy Blood & Tissue 키트(Qiagen, 카탈로그 69506)를 사용하여 50~200K 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 단일 gRNA 타겟 (및 오프 타겟) 영역을 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0587] PCR 산물을 겔 전기영동에 의해 크기를 검증하고, QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen, 카탈로그 28106)를 사용해 정제하고, 생거 시퀀싱을 위해 Source BioScience에 제출하였다. ICE 버전 1.2(온라인으로 URL github.com/synthego-open/ice에서 확인)를 사용하여 생거 흔적(ab1)을 디컨볼루션하고, .CRISPR 편집을 추론하였다. 또한, inDelphi를 사용하여 선택된 프로브를 사용하는 유전자 편집의 머신 러닝 예측을 생성하였다. 또한, 예측된 오프 타겟 부위를 직접 시퀀싱을 통해 분석하여 gRNA가 오프 타겟 편집을 용이하게 하는지 여부를 확인하였다.

[0588] 경험적 실험의 결과와 선택된 가이드 서열을 사용하는 유전자 편집의 머신 러닝 예측의 결과는 도 17에 도시되어 있다.

[0589] ***실시예 9.*** - 개 및 인간 인터류킨-1 알파(IL-1α) 및 인터류킨-1 베타(IL-1β) 방출에 선택된 CRISPR/Cas9 RNA 가이드가 미치는 효과.

[0590] 실시예 8에서 녹아웃(KO) 점수가 가장 높은(즉, 프레임시프트 빈도가 가장 높은) gRNA를 사용해 이중 IL-1α/IL-1β 녹아웃(KO) 세포를 생성하였다. 구체적으로, 인간 연골세포를 편집하여, crRNA 서열 CAGAGACAGAUGAUCAAUGG(서열번호 301)를 사용해 >99% IL-1α KO를 달성하고, crRNA 서열 GUGCAGUUCAGUGAUCGUAC(서열번호 389)를 사용해 67% IL-1β KO를 달성하였다. 개 연골세포를 편집하여, crRNA 서열 GAACAUCCCAGCUUACCUUCA(서열번호 554)를 사용해 97% IL-1α KO를 달성하고, crRNA 서열 ACUUGUUACAGAGCUGGU(서열번호 506)를 사용해 99% IL-1β KO를 달성하였다.

[0591] 개 연골세포(카달로그 Cn402K-05), 인간 연골세포(카달로그 402-05a), 및 인간 섬유아세포 유사 활막 세포(카달로그 408-05a)는 Cell Applications, Inc.,(San Diego, CA)로부터 냉동 모액(5 x 10^5 세포)으로서 구입하였다. 20%(v/v) 미치료 FBS(Gibco, 카탈로그 10270-106)로 보충된 DMEM/Ham's F12(Gibco, 카달로그

21331-020) 및 1x GlutaMAX(Gibco, 카달로그 35050-038)로 이루어진 성장 배지에서 연골세포를 배양하였다. DMEM(Gibco, 카탈로그 11960-044), 10% 미치료 FBS(Gibco, 카탈로그 10270-106), 및 1x GlutaMAX(Gibco, 카탈로그 35050-038)로 이루어진 성장 배지에서 활막 세포를 배양하였다. 세포는 미코플라스마 종에 대해 음성인 것으로 확인되었고, 사용 전에 세포에 대한 STR 프로파일링을 수행하였다. 전기천공 및 계대 배양을 위해, 0.25% 트립신(Gibco, 카탈로그 25200056)을 사용해 세포를 해리시켰다. 트립신을 9부피의 성장 배지로 퀀칭시키고, 세포를 1,000g로 회전시켜 상청액을 제거하였다.

[0592] LPS에 의한 IL-1의 유도. (편집된 또는 편집되지 않은 야생형) 세포의 준-컨플루언트 단층을 리포다당류(LPS)와 함께 접종하여 인터류킨-1 방출을 유도하였다. 요약하자면, 편집되지 않은(대조군) 인간 또는 개 연골세포와 (편집된)이중 IL-1α/IL-1β KO 인간 또는 개 연골 세포를 24-웰 플레이트에 약 5 x 10^4 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 24~48시간 후, LPS(50 μg/ml) 또는 PBS 비히클을 함유하는 신선한 무혈청 배지로 배치를 교체하고, 플레이트를 인큐베이터에 다시 넣었다. 6시간 및 24시간 후에 플레이트를 수확하여 IL-1 방출을 결정하였다. 배지를 액체 질소에서 급속 냉동시키고, 검정이 완료될 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0593] IL-1 알파 및 IL-1 베타 방출의 측정. 배양 배지에서 IL-1 알파 및 IL-1 베타의 농도를, 종-특이적 상업적 검정을 제조사의 지침에 따라 사용하여 측정하였다. 측정에 앞서, 동결 배지를 해동한 다음, 세포 잔해를 제거하기 위해 원심분리(2분 동안 1,500 g)하였다. 배지의 분취물을 2회 측정하고, 재조합 인간 또는 개 IL-1 알파 또는 베타의 표준 곡선으로부터 IL-1의 농도를 적절하게 측정하였다. 개 세포에서 IL-1 알파 방출의 결과는 도 18a(6시간) 및 18b(24시간)에 도시되어 있다. 개 세포에서 IL-1 베타 방출의 결과는 도 18c(6시간) 및 18d(24시간)에 도시되어 있다. 인간 세포에서 IL-1 알파 방출의 결과는 도 19a(6시간) 및 19b(24시간)에 도시되어 있다. 인간 세포에서 IL-1 베타 방출의 결과는 도 19c(6시간) 및 19d(24시간)에 도시되어 있다.

[0594] P3 일차 세포 뉴클레오펙션 시약 및 뉴클레오큐베트 스트립(카달로그 V4XP-3032)은 Lonza(Slough, UK)로부터 구입하였다. Cas9 뉴클레아제(카탈로그 A36499)는 Thermo Fisher Scientific으로부터 구입하였다. 대장균 055:B5 유래 지질다당류(LPS, 카탈로그 L6529)는 Merck로부터 구입하였다. 인간 IL-1 알파(카탈로그 ab214025) 및 인간 IL-1 베타(카탈로그 ab100560), 개 IL-1 알파(카탈로그 A4270), 및 개 IL-1 베타(카탈로그 ab273170)용 ELISA 키트는 Abcam(Cambridge, UK)으로부터 구입하였다.

[0595] ***실시예 10.*** - CRISPR/Cas9 매개 유전자 편집의 특이성 증가.

[0596] 실시예 8에서 보고된 유전자 편집 특이성의 분석을 강화된 특이성 CRISPR 관련 단백질 9를 사용해 반복하였다. eSpCas9는 3개의 특이성 강화 돌연변이를 포함한다: K848A, K1003A, 및 R1060A (Slaymaker 등의 문헌[Science, 351:84-88 (2016)] 기술 내용 참조). eSpCas9를 대장균에서 발현시키고 균질하게 정제하였다. 작제물의 분자량은 161 kDa이고, N-말단 Flag-태그 및 C-말단 hexa-His-태그를 함유한다. eSpCas9의 서열은 다음과 같다:

[0597] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATR
LKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFR
GHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS
KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ
EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE
TITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQS
GKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS
RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLADDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKM
KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPALESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKAPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV
RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAK
GYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANL
DKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKAAALE
HHHHHH (서열번호 680).

[0598] 요약하자면, 실시예 8에 사용되고 도 17에 도시된 동일한 sgRNA와 eSpCas9로 복합체를 형성하였다. 도 17a에 도시된 바와 같이, 인간 IL-1α 유전자의 엑손 3 및 4를 표적으로 하는 sg235(서열번호 301) 및 sg236(서열번호 309)을 사용하였다. 마찬가지로, 도 17b에 도시된 바와 같이, 인간 IL-1β 유전자의 엑손 3, 4, 및 5를 표적으로 하는 sg237(서열번호 462), sg238(서열번호 391), sg248(서열번호 393), sg249(서열번호 388), 및 sg250(서

열번호 389)을 사용하였다. 도 17c에 도시된 바와 같이, 개 IL-1α 유전자의 엑손 3, 4, 및 5를 표적으로 하는 sg239(서열번호 552), sg240(서열번호 554), sg251(서열번호 578), 및 sg252(서열번호 579)를 사용하였다. 마찬가지로, 도 17d에 도시된 바와 같이, 개 IL-1β 유전자의 엑손 3 및 4를 표적으로 하는 sg241(서열번호 498) 및 sg242(서열번호 506)를 사용하였다.

[0599] 그런 다음, 선택된 crRNA 가이드 서열을 스캐폴드 서열에 융합시키는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를, 이들의 안정성을 증가시키고 이들의 세포 면역원성을 감소시키도록 설계된 스캐폴드 변형으로 합성(Synthego)하였다. 유전자형 분석을 위한 프라이머를 표적 부위로부터 적어도 200 bp에 있도록 설계하고, <1.5 kb의 PCR 앰플리콘를 생성하고 합성하였다(Merck).

[0600] 4D-nucleofector(Lonza, 카탈로그 AAF-1002B 및 AAF-1002X) 및 뉴클레오큐베트 스트립을 사용하는 단일 전기천공-기반 형질감염에 다음 양을 사용하였다. 80 pmol의 합성된 sgRNA를 eSpCas9 뉴클레아제와 실온에서 10분 동안 미리 복합체를 형성하였다. 300~400K의 해리된 세포를 PBS로 세척한 후, 20 μl의 보충된 P3 뉴클레오펙션 용액에 현탁하고, Cas9 RNP 복합체를 첨가하였다. 그런 다음, 이들 세포를 뉴클레오큐베트 웰 내로 옮기고 펄스 코드 ER-100을 사용하여 전기천공하였다. 전기천공 직후, 세포가 전압으로부터 회복하도록 뉴클레오큐베트를 37℃/5% CO2 인큐베이터에 10분 동안 두었다. 그 후, 80 μl의 성장 배지를 뉴클레오큐베트 웰에 첨가하고, 미리 가온된 성장 배지가 담긴 6-웰 접시에 세포를 옮겼다.

[0601] 전기천공 후 2일 내지 11일 사이에, DNeasy Blood & Tissue 키트(Qiagen, 카탈로그 69506)를 사용하여 50~200K 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 단일 gRNA 타겟 (및 오프 타겟) 영역을 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0602] PCR 산물을 겔 전기영동에 의해 크기를 검증하고, QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen, 카달로그 28106)를 사용해 정제하고, 생거 시퀀싱을 위해 Source BioScience에 제출하였다. ICE 버전 1.2(온라인으로 URL github.com/synthego-open/ice에서 확인)를 사용하여 생거 흔적(ab1)을 디컨볼루션하고, .CRISPR 편집을 추론하였다. 또한, inDelphi를 사용하여 선택된 프로브를 사용하는 유전자 편집의 머신 러닝 예측을 생성하였다. 또한, 예측된 오프 타겟 부위를 직접 시퀀싱을 통해 분석하여 gRNA가 오프 타겟 편집을 용이하게 하는지 여부를 확인하였다.

[0603] 실시예 8에서 보고된 Cas9 편집과 비교했을 때, eSpCas9의 사용은 온 타겟 활성을 잃지 않으면서 오프 타겟 편집을 감소시킨다. 예를 들어, 각각 2, 3, 및 3개의 불일치를 갖는, 표 18에 보고된 3개의 유전자좌의 sgRNA #242(개 IL-1B를 표적화함)에 의한 오프 타겟 편집은, 이들 유전자좌를 증폭시킨 다음 시퀀싱하여 평가하였다. 표 18에 나타낸 바와 같이, 제1 오프 타겟 유전자좌는 실시예 8에 기술된 실험에서 편집을 경험하지 않았으며, 본원에서 시험되지 않았다. 제2 오프 타겟 유전자좌는 실시예 8에 기술된 실험에서 거의 완전한 오프 타겟 편집(98~99%)을 경험하였지만, eSpCas9를 사용했을 때는 편집을 경험하지 않았다. 제3 오프 타겟 유전자좌는 실시예 8에 기술된 실험에서 약간의 오프 타겟 편집(0~25%)을 경험하였지만, 다시 eSpCas9를 사용했을 때는 편집을 경험하지 않았다. 또한, 표 17에 나타낸 바와 같이, 시험된 각각의 sgRNA의 경우, 본 실시예에 기술된 것과 같은 eSpCas9를 사용한 편집에 상응하는 "강화된 온 타겟 점수"는, 실시예 8에 기술된 편집에 상응하는 "온 타겟 점수"만큼 높거나 더 높았다.

표 17

[0604]

	타겟		온 타겟 메트릭				오프 타겟 메트릭
#	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	정밀도 점수**	프레임시프트 %***	향상된 온 타겟 점수 ****	오프 타겟 점수^
sg235	3	-	69.5	0.57	93.7	72.4	67
sg236	4	-	53.9	0.65	93.9	66.7	76.9
인간 **IL1B (IL1B-201; GRCh38)**							
	타겟		온 타겟 메트릭				오프 타겟 메트릭
#	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	정밀도 점수**	프레임시프트 %***	향상된 온 타겟 점수 ****	오프 타겟 점수^
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
개 **IL1A (IL1A-201; CanFam3.1)**							
	타겟		온 타겟 메트릭				오프 타겟 메트릭
#	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	정밀도 점수**	프레임시프트 %***	향상된 온 타겟 점수 ****	오프 타겟 점수^
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

[0605]

개 IL1B (IL1B-201; CanFam3.1)

	타겟		온 타겟 메트릭			오프 타겟 메트릭	
#	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	정밀도 점수**	프레임시프트 %***	향상된 온 타겟 점수****	오프 타겟 점수^
sg241	3	+	66.1	0.53	91.2	69.1	51.5
sg242	4	-	68.9	0.64	84	71.5	62

표 18

서열	PAM	점수	유전자	염색체	가닥	위치	불일치	Cas9를 이용한 CRISPR 편집	특이성이 강화된 Cas9를 이용한 CRISPR 편집
ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG	100	ENSCAFG00000007249	chr17	1	37022194	0		
ACTTTTGTTTCAGAGCTGGT	CAG	6.16161972		chr33	-1	20234937	2	0%	
CCTCATGCTACAGAGCTGGT	GGG	2.76564774		chr1	-1	47541563	3	98~99%	0%
GTGCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG	2.32143742		chr26	-1	32323843	3	0~25%	0%

[0606]

[0607] 위에 제시된 구현예들은 당업자들에게 본 개시의 조성물, 시스템, 및 방법의 구현예를 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제공되며, 발명자가 그의 발명으로 간주하는 것의 범주를 한정하도록 의도되지 않는다. 당업자에게 명백한 본 개시의 구현예를 수행하기 위한 전술한 모드의 변형은 다음의 청구범위의 범주에 포함되도록 의도된다. 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은 본 개시가 속하는 당업계의 당업자의 기술 수준을 나타낸다.

[0608] 모든 표제 및 섹션 명칭은 명확성과 참조를 위해서만 사용되며 어떤 방식으로도 한정하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 예를 들어, 당업자는 본원에 기술된 개시의 사상 및 범주에 따라 상이한 표제와 섹션으로부터 다양한 양태를 적절하게 조합하는 것이 유용함을 이해할 것이다.

[0609] 본원에 기술된 방법이 본원에 기술된 특정 방법론, 프로토콜, 대상체, 및 시퀀싱 기술에 한정되지 않는 것으로 이해해야 하는데, 이는 이와 같은 방법론, 프로토콜, 대상체, 및 시퀀싱 기술이 다양할 수 있기 때문이다. 본원에서 사용되는 용어는 특정 구현예를 단지 기술하기 위한 것이며, 첨부된 청구범위에 의해서만 한정되는, 본원

에 기술된 방법 및 조성물의 범주를 한정하도록 의도되지 않는다는 것도 이해해야 한다. 본 개시의 일부 구현예가 본원에 도시되고 설명되었지만, 이러한 구현예는 단지 예시로서 제공된다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 이제 본 개시를 벗어나지 않고도 당업자에게 수많은 변이, 변화, 및 치환이 발생할 것이다. 본원에 기술된 본 개시의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 개시를 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 다음의 청구범위는 본 개시의 범위를 정의하고, 이들 청구범위의 범주에 속하는 방법과 구조 및 이들의 등가물이 이에 포괄되는 것으로 의도된다.

[0610] 몇몇 양태는 예시를 위해 예시적인 응용예를 참조하여 기술된다. 달리 명시되지 않는 한, 임의의 구현예는 임의의 다른 구현예와 조합될 수 있다. 다수의 특정 세부 사항, 관계, 및 방법이 본원에 기술된 특징에 대한 완전한 이해를 제공하기 위해 제시된다는 것을 이해해야 한다. 그러나, 당업자는 본원에 기술된 특징이 특정 세부 사항 중 하나 이상이 없이도 실시되거나 다른 방법을 사용해 실시될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 본원에 기술된 특징은 동작 또는 이벤트의 예시된 순서에 의해 한정되지 않는데, 이는 일부 동작이 상이한 순서로 발생할 수 있고/있거나 다른 동작 또는 이벤트와 동시에 발생할 수 있기 때문이다. 또한, 도시된 모든 동작 또는 이벤트가 본원에 기술된 특징에 따라 방법론을 구현하는 데 필요한 것은 아니다.

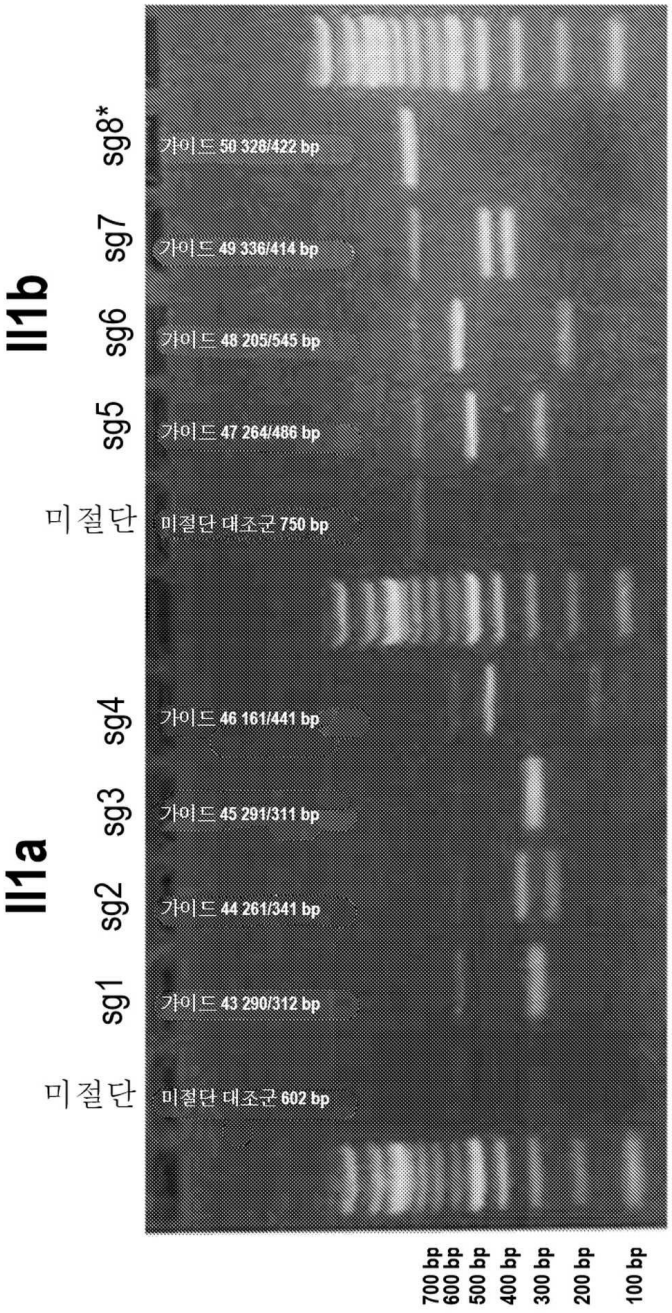
[0611] 일부 구현예가 본원에 도시되고 설명되었지만, 이러한 구현예는 단지 예시로서 제공된다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 본 개시는 명세서 내에 제공된 특정 실시예에 의해 한정되도록 의도되지 않는다. 본 개시는 전술한 명세서를 참조하여 기술되었지만, 본원의 구현예에 대하 설명 및 예시는 한정적인 의미로 해석되는 것을 의미하지 않는다. 이제 본 개시를 벗어나지 않고도 당업자에게 수많은 변이, 변화, 및 치환이 발생할 것이다.

[0612] 또한, 본 개시의 모든 양태는 본원에 제시된 특정 묘사, 구성, 또는 상대 비율로 한정되지 않으며, 다양한 조건 및 변수에 따라 달라진다는 것을 이해해야 한다. 본원에 기술된 본 개시의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 개시를 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 개시는 임의의 이러한 대안, 변형, 변화, 또는 등가물도 포괄하는 것으로 고려된다. 다음의 청구범위는 본 개시의 범위를 정의하고, 이들 청구범위의 범주에 속하는 방법과 구조 및 이들의 등가물이 이에 포괄되는 것으로 의도된다.

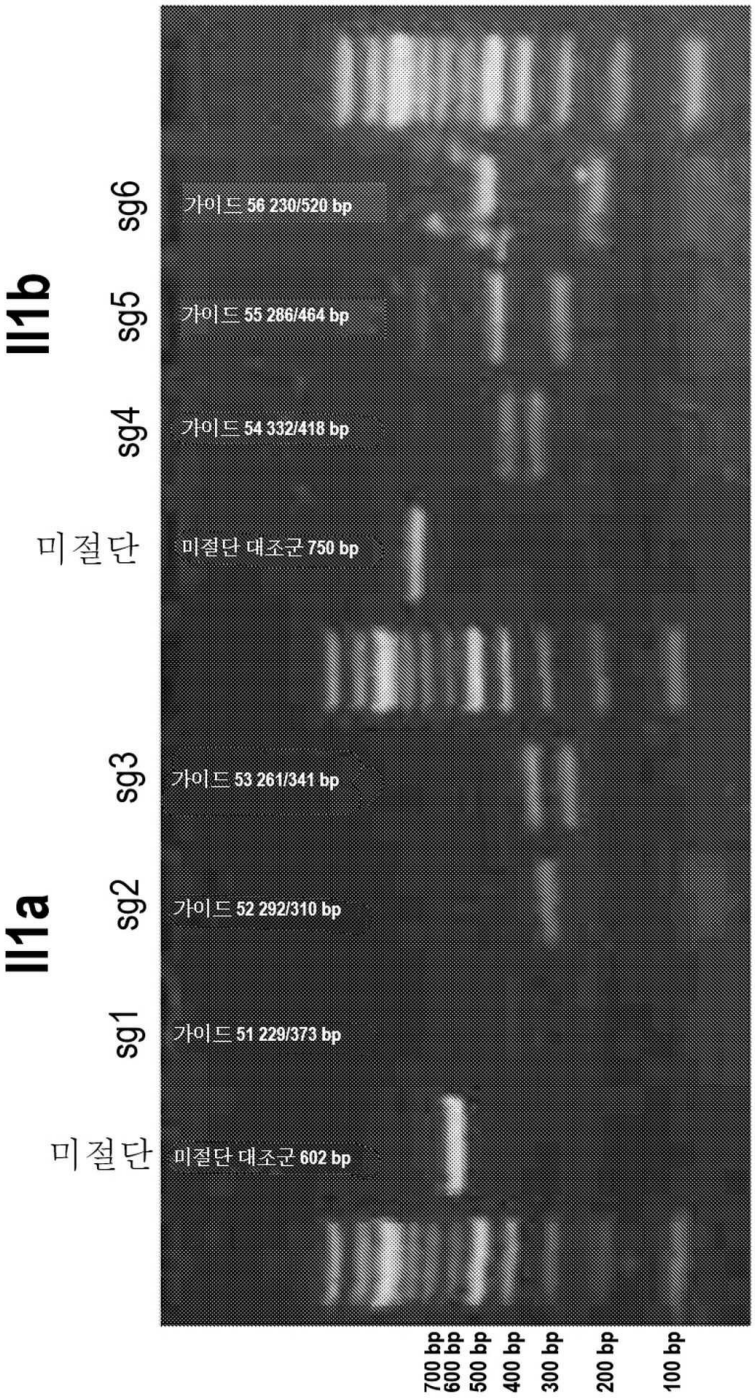
[0613] 본원의 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은, 마치 각각의 개별 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조에 의해 통합되도록 표시된 것과 같은 정도로 참조에 의해 통합된다. 본원의 용어와 통합된 참조 문헌의 용어가 상충하는 경우, 본원의 용어가 우선한다.

도면

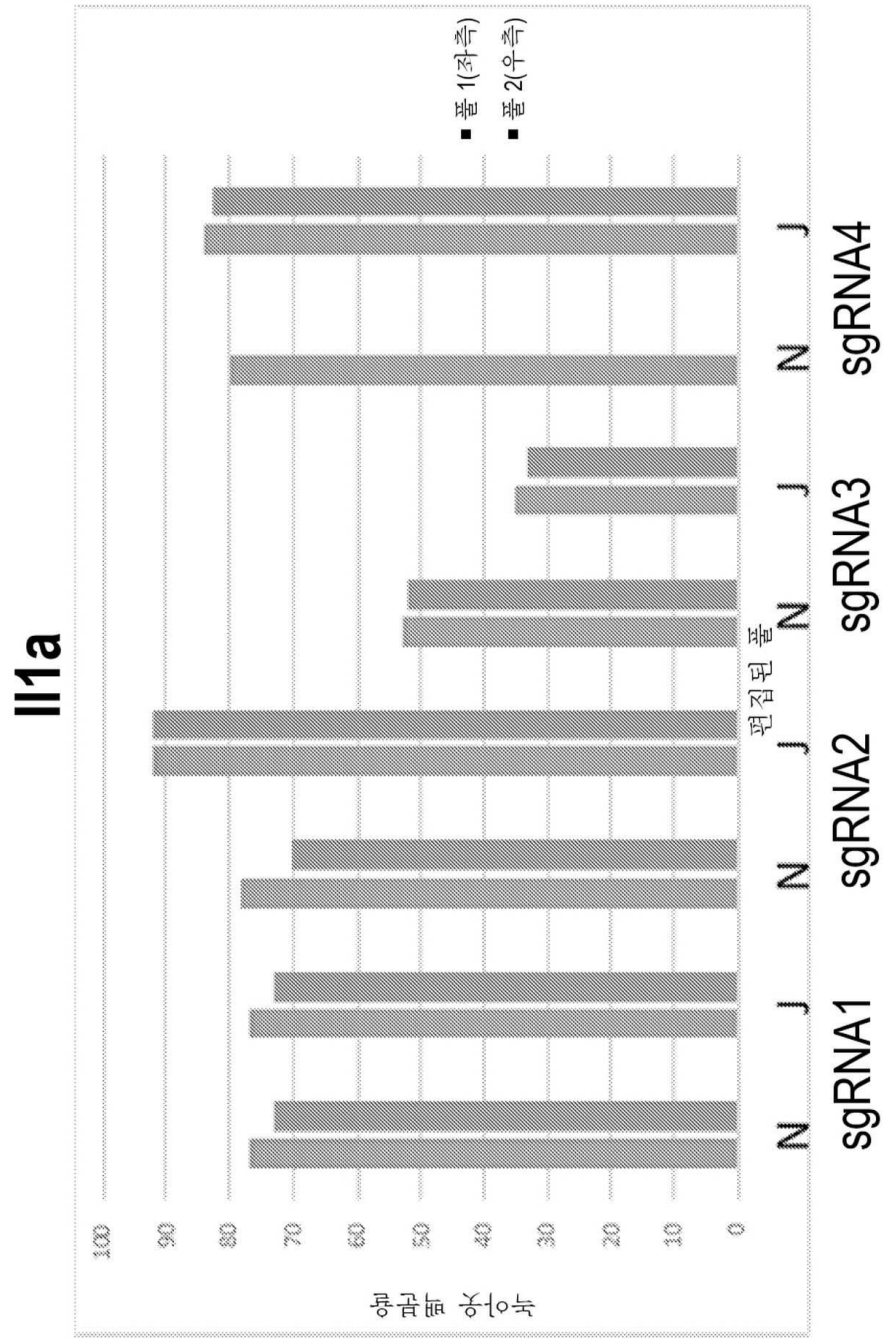
도면1


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

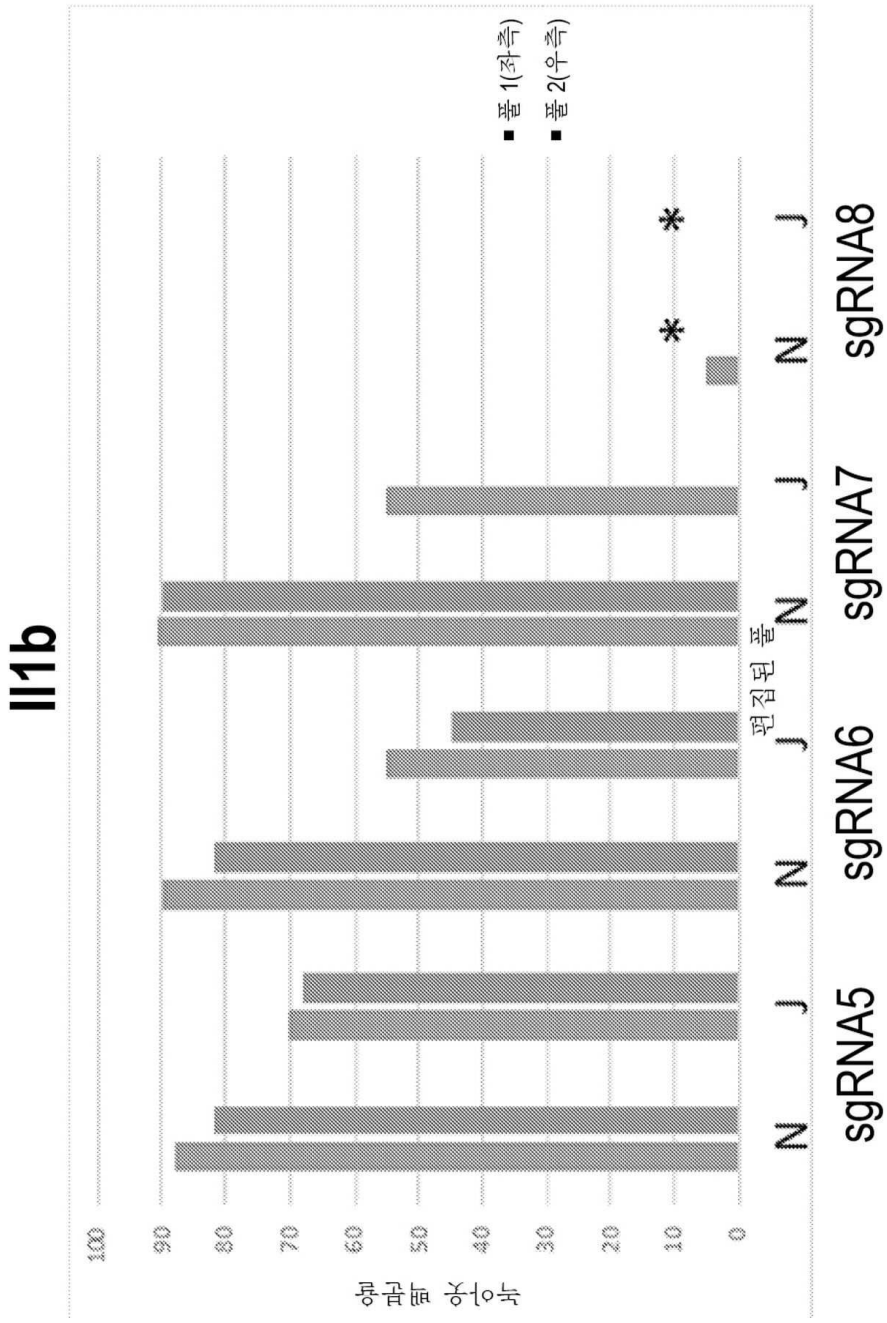
도면1a


Il1b
sg6
가이드 56 230/520 bp
sg5
가이드 55 286/464 bp
sg4
가이드 54 332/418 bp
미절단
미절단 대조군 750 bp
Il1a
sg3
가이드 53 261/341 bp
sg2
가이드 52 292/310 bp
sg1
가이드 51 229/373 bp
미절단
미절단 대조군 602 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

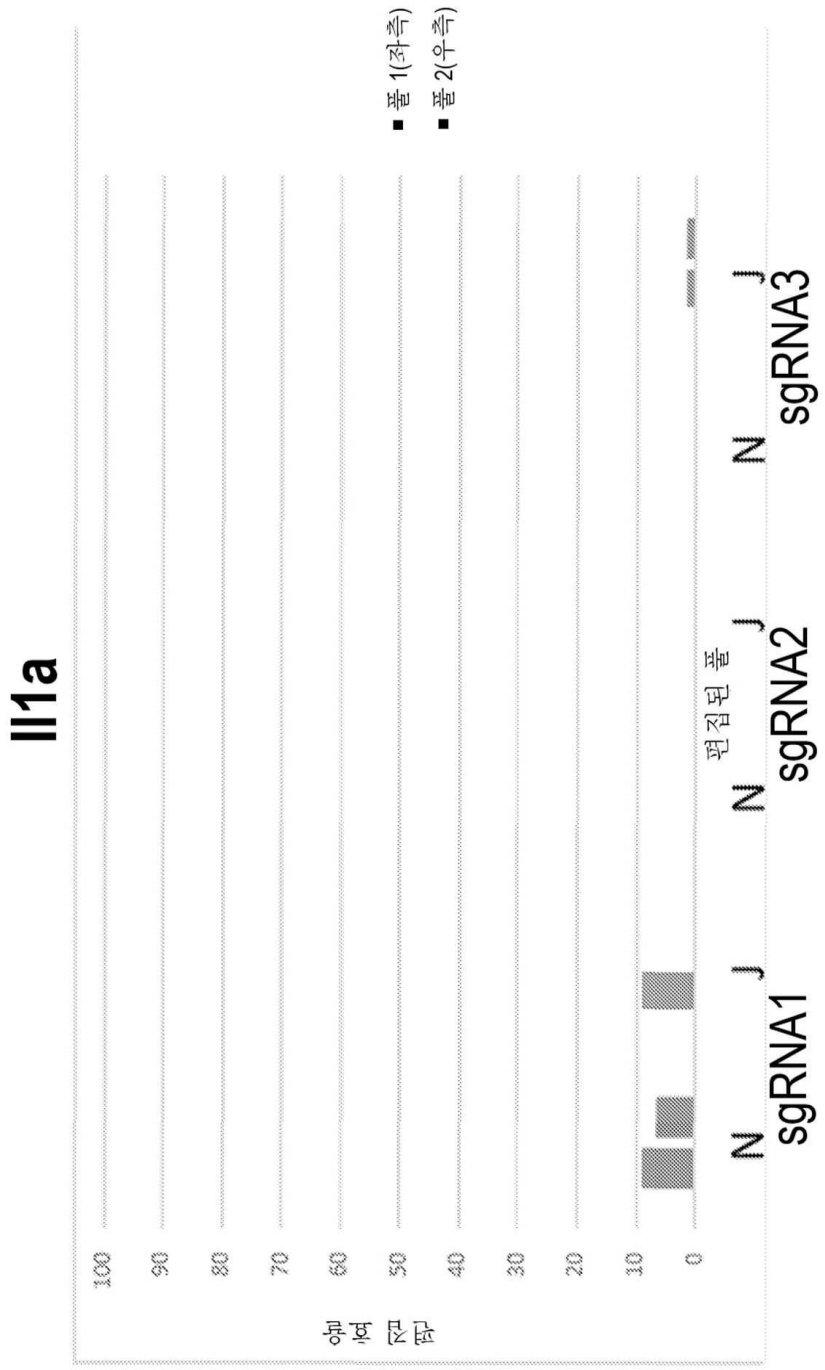
도면2a


Il1a
■ 풀 1(좌측)
■ 풀 2(우측)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
누아웃 백분율
편집된 풀
N
J
sgRNA1
sgRNA2
sgRNA3
sgRNA4

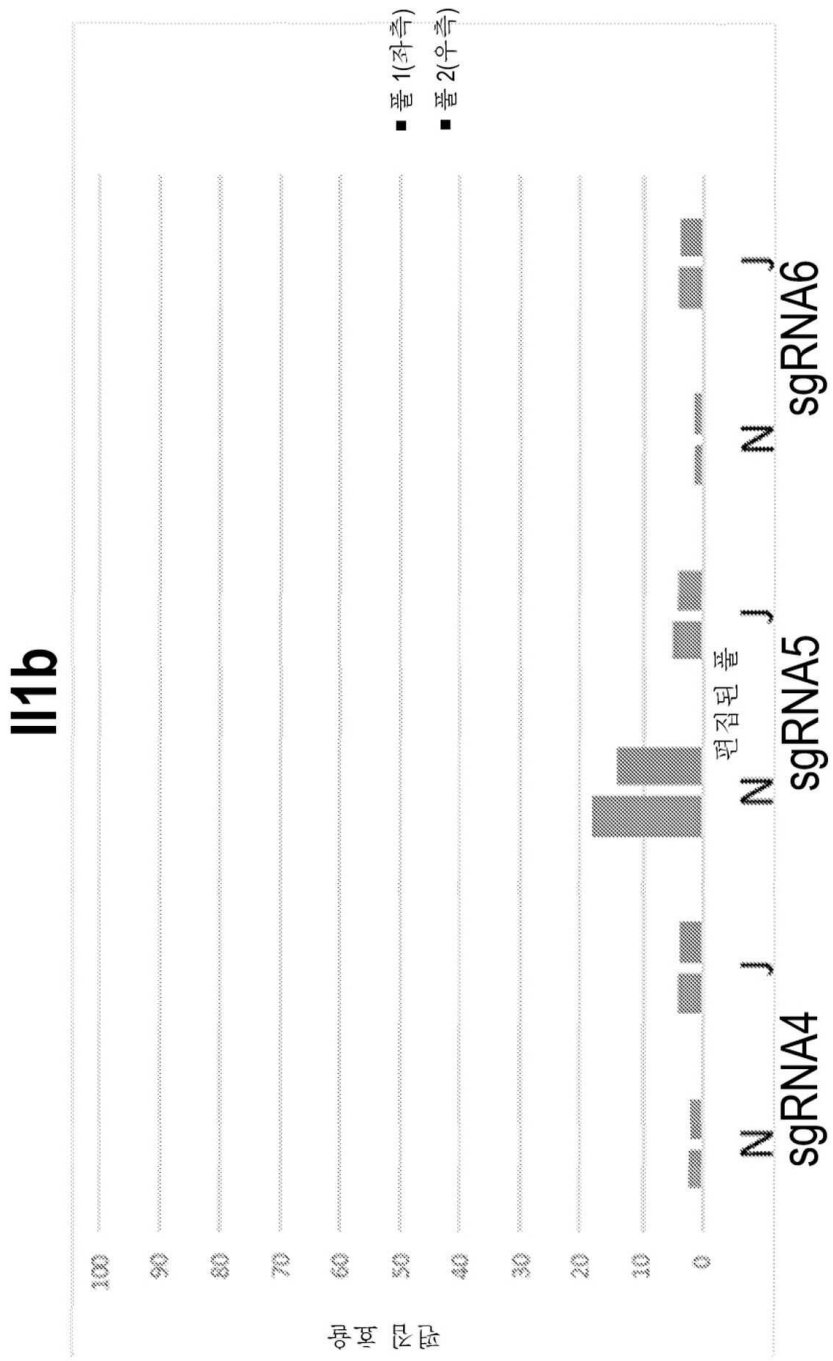
도면2b


Il1b
■ 풀 1(좌측)
■ 풀 2(우측)
누아웃 백분율
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
편집된 풀
N
J
N
J
N
J
N
J
sgRNA5
sgRNA6
sgRNA7
sgRNA8
*
*

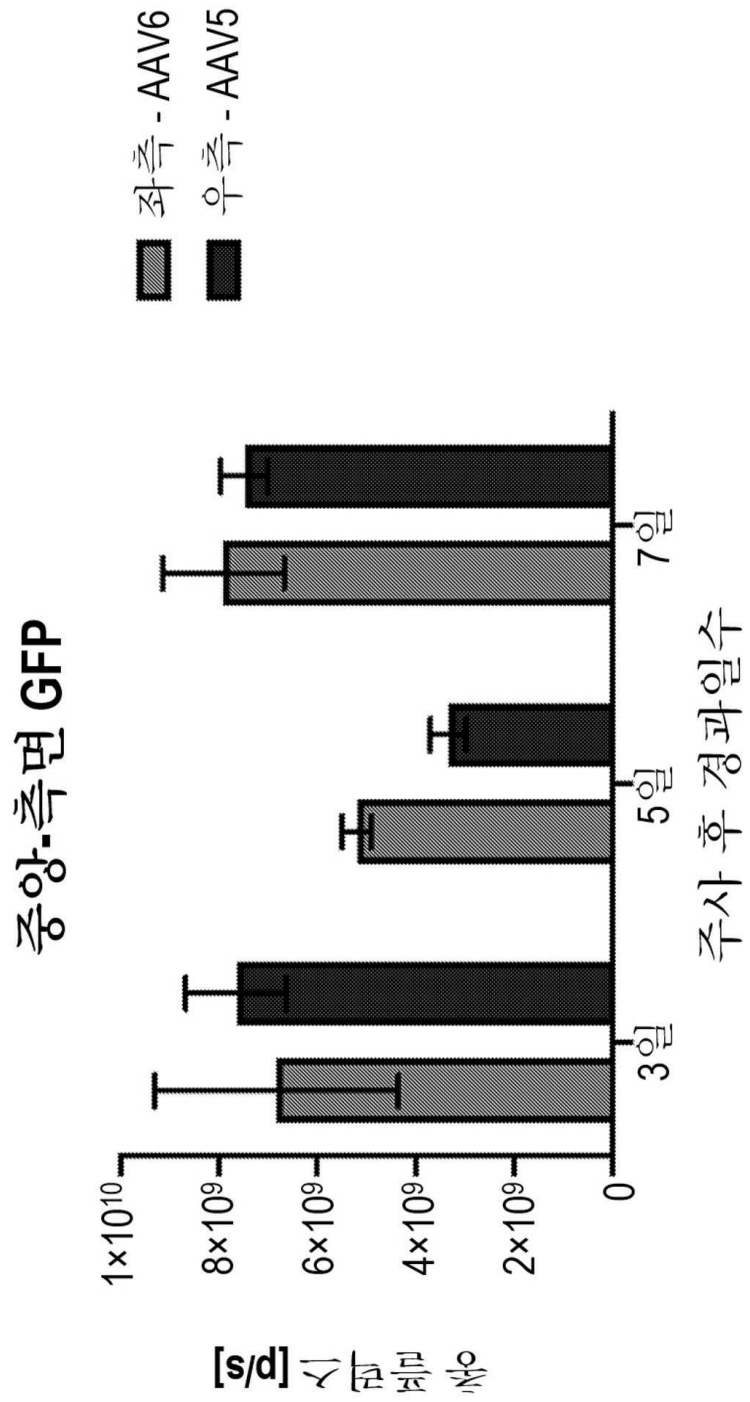
도면2c


Il1a
풀 1(좌측)
풀 2(우측)
편집 효율
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
N
J
sgRNA1
N
J
sgRNA2
편집된 풀
N
J
sgRNA3

도면2d


Il1b
풀 1(좌측)
풀 2(우측)
편집 효율
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
편집된 풀
N
J
sgRNA4
sgRNA5
sgRNA6

도면3

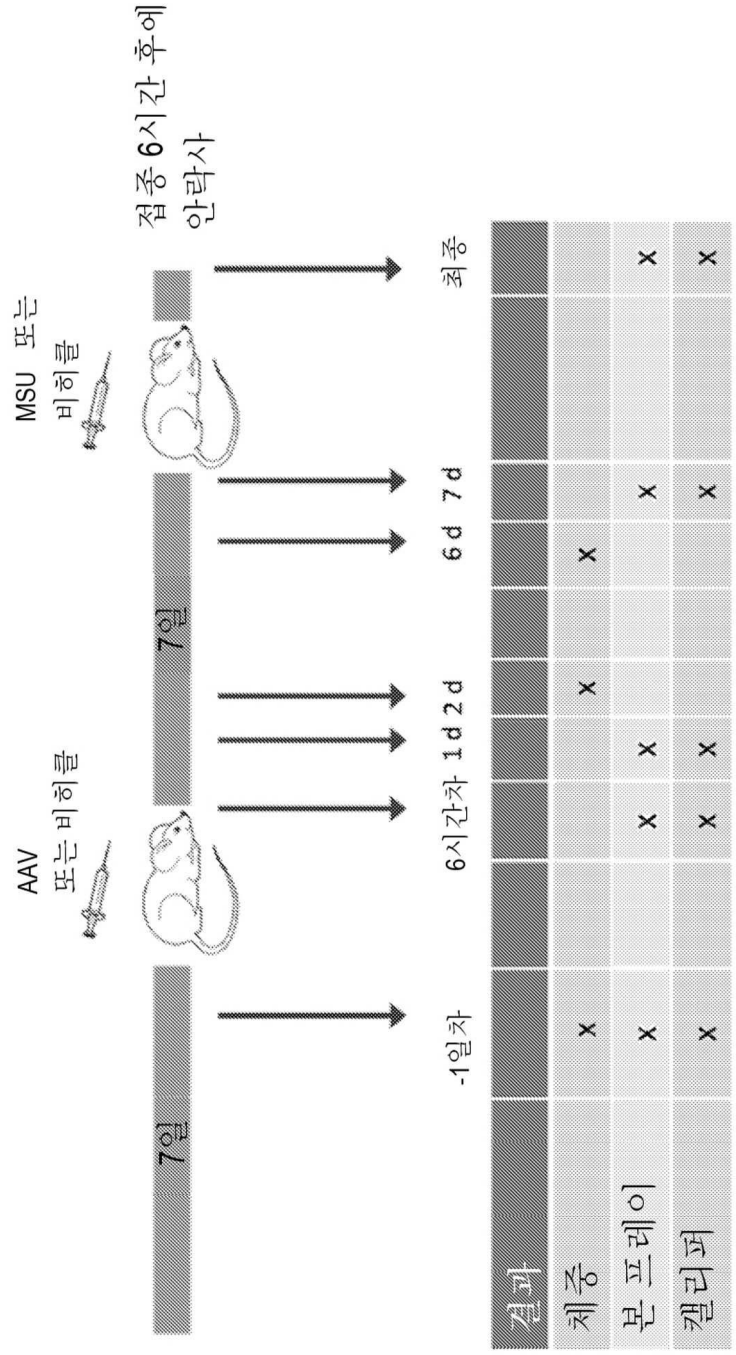

좌측 - AAV6
우측 - AAV5
중앙-측면 GFP
1×10^10
8×10^9
6×10^9
4×10^9
2×10^9
0
3일
5일
7일
주사 후 경과일수
[p/s]

도면4

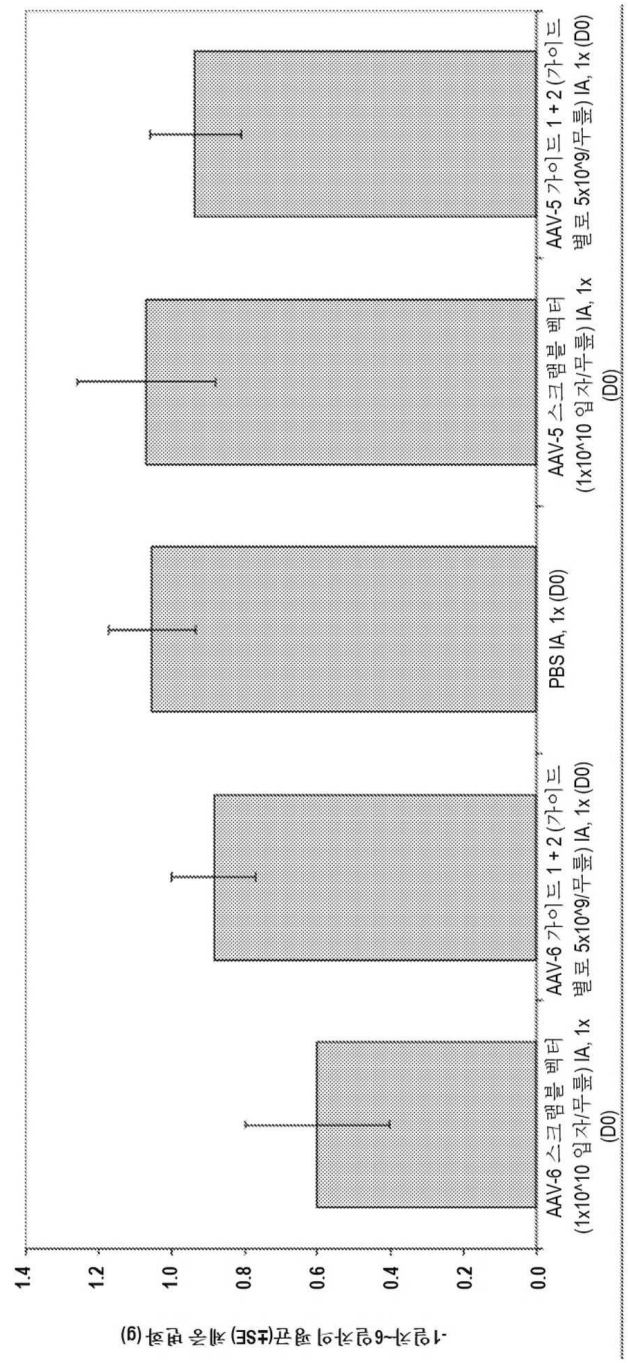
군	치료	접종
AAV-6 활성	두 가이드를 이용한 AAV-6	MSU
AAV-6 스크램블	스크램블 가이드를 이용한 AAV-6	MSU
미치료	식염수	MSU
AAV-5 활성	두 가이드를 이용한 AAV-5	MSU
AAV-5 스크램블	스크램블 가이드를 이용한 AAV-5	MSU
정상*	없음	없음

*는 미치료군의 좌측 무릎을 나타낸다.

도면5


AAV
또는 비히클
7일
MSU 또는
비히클
7일
접종 6시간 후에
안락사
-1일차
6시간차 1d 2d
6d 7d
최종
결과
체중
본 프레이
캘리퍼

도면6



체중 변화 (-1일차~6일차)

n = 14/군

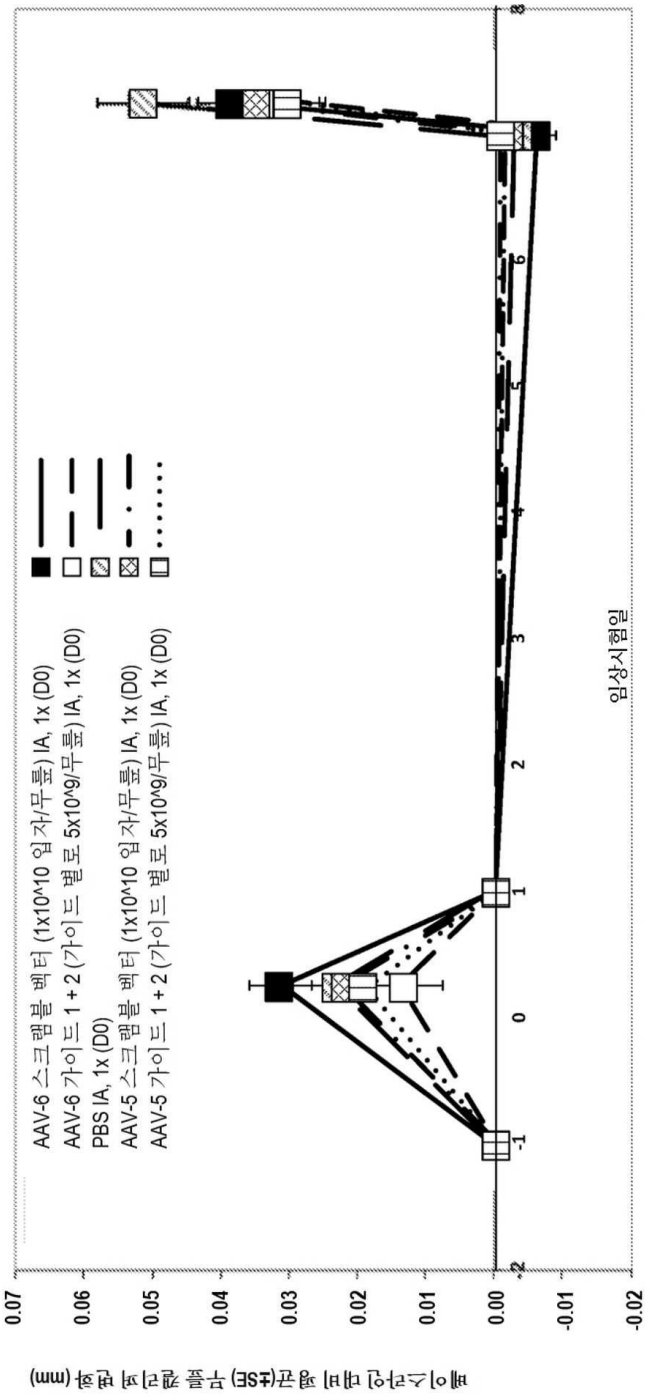
*$p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey 사후 검정) 대 AAV-6 가이드 1

† $p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey 사후 검정) 대 PBS

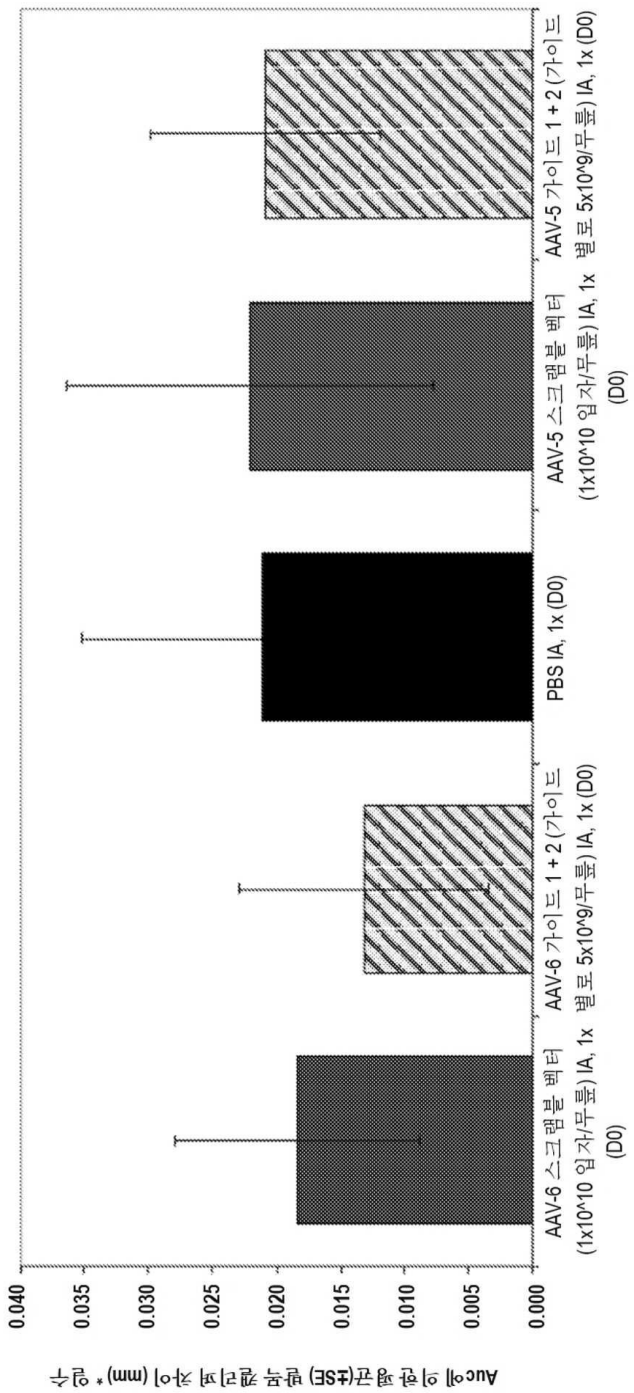
‡ $p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey 사후 검정) 대 AAV-5 스크램블 벡터

§ $p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey 사후 검정) 대 AAV-5 가이드 1

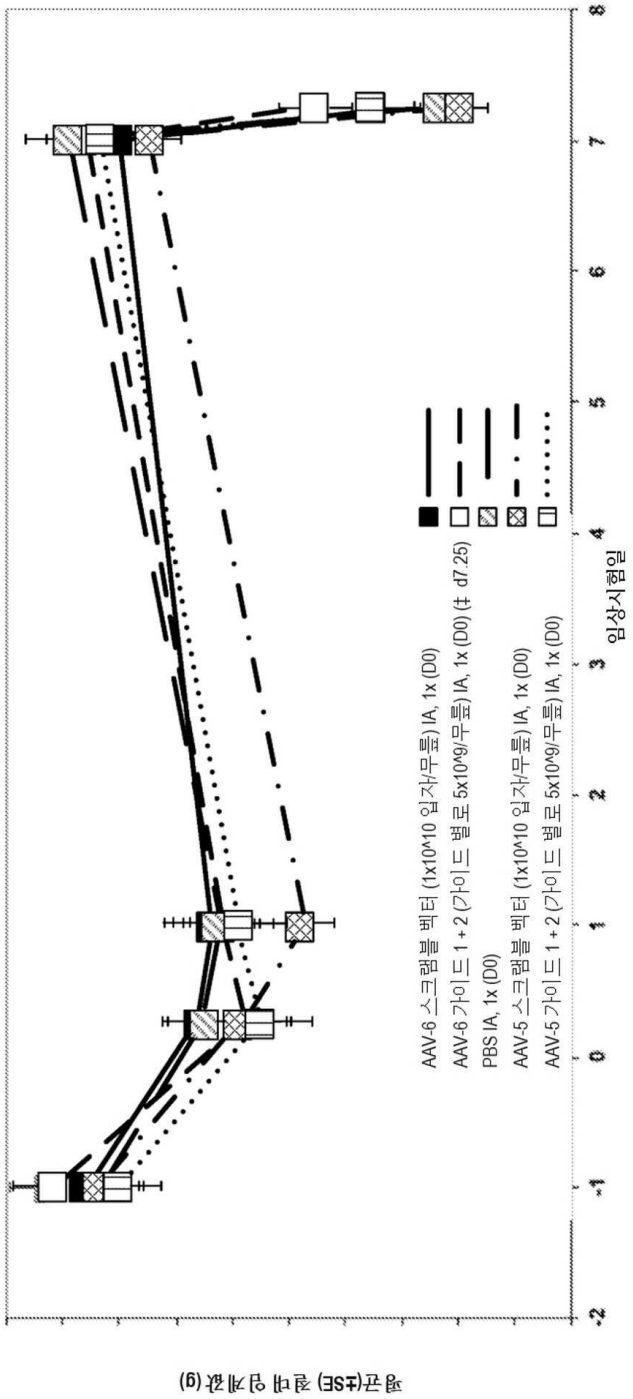
도면7a


AAV-6 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-5 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
-0.02
-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
임상시험일
베이스라인 대비 평균(±SE) 무릎 관리 변화 (mm)

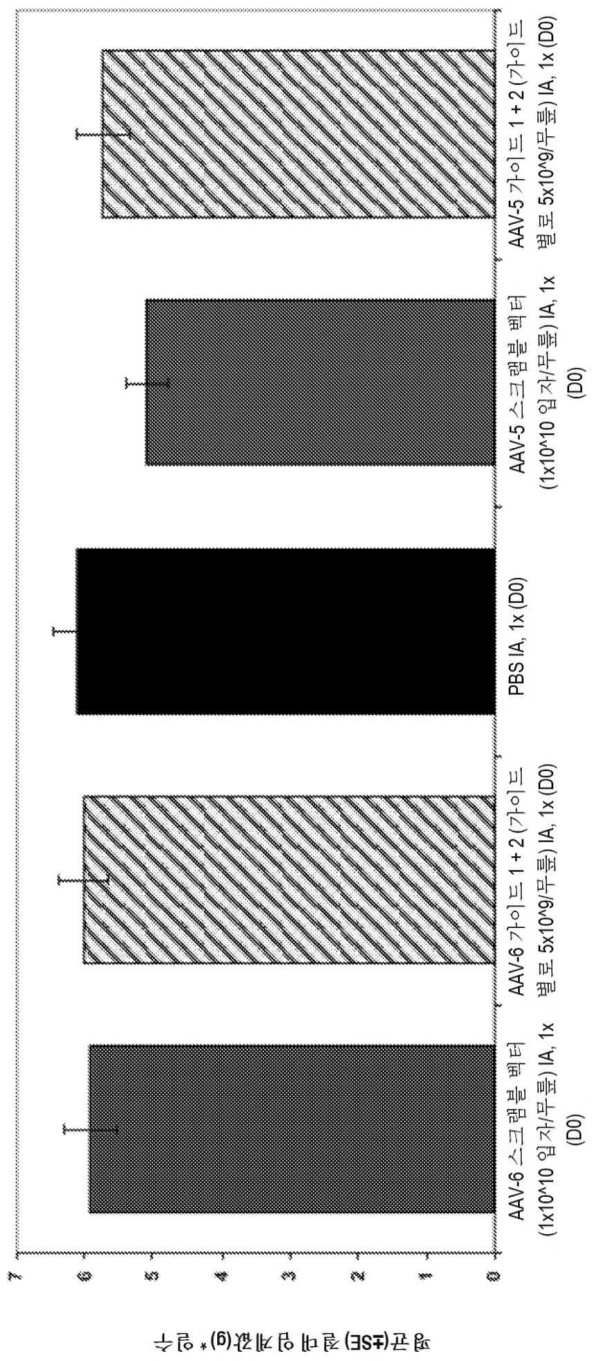
도면7b


Auc에 의한 평균(±SE) 발목 관리 차이 (mm)* 일수
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
AAV-6 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-5 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)

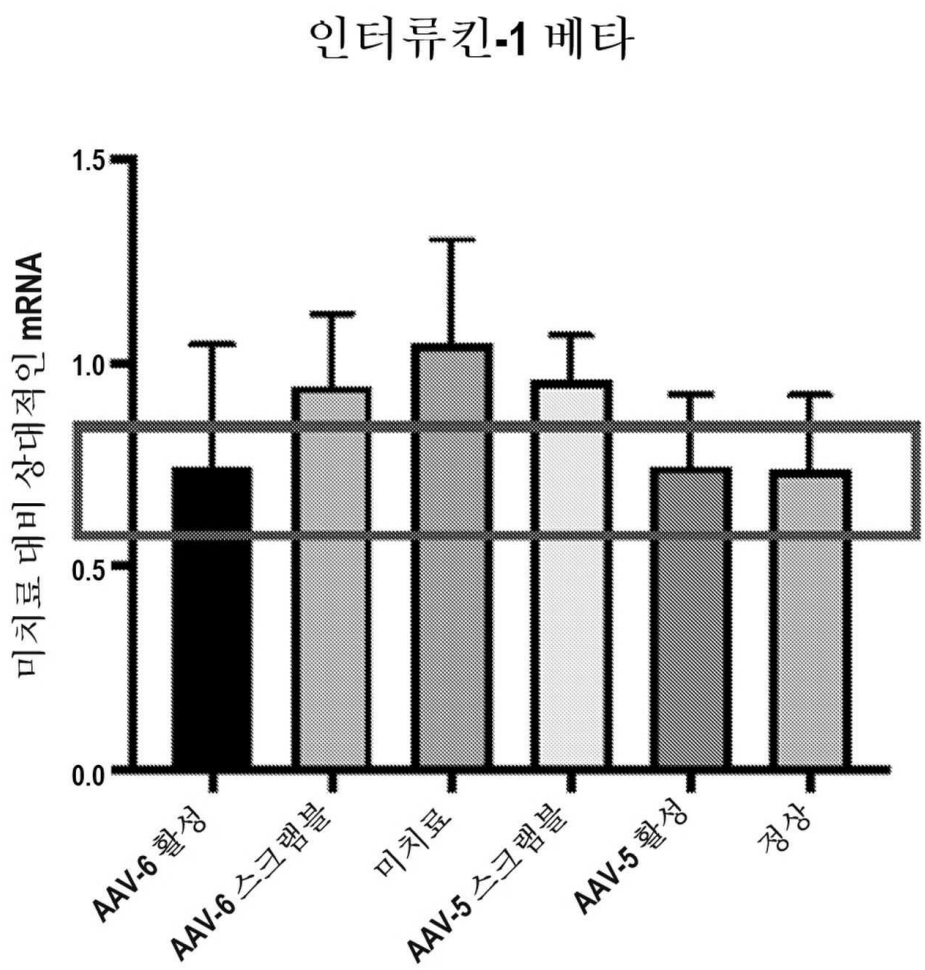
도면8a


AAV-6 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0) (± d7.25)
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-5 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)
임상시험일
평균(±SE) 절대 입 개 값 (g)

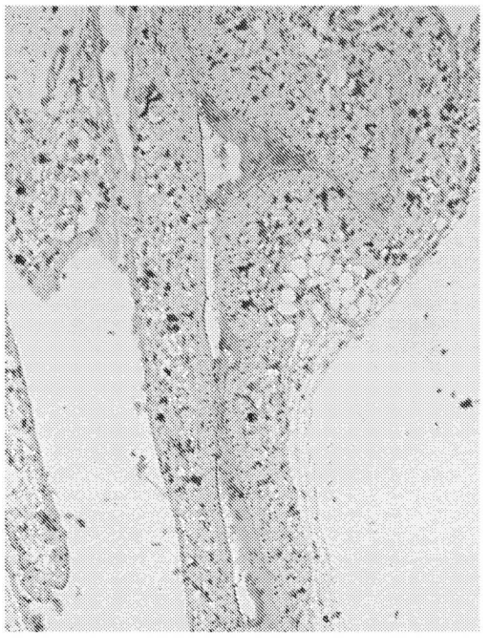
도면8b


평균(±SE) 절대 입 계강(g)* 일수
0
1
2
3
4
5
6
7
AAV-6 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-6 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)
PBS IA, 1x (D0)
AAV-5 스크램블 벡터 (1x10^10 입자/무릎) IA, 1x (D0)
AAV-5 가이드 1 + 2 (가이드 별로 5x10^9/무릎) IA, 1x (D0)

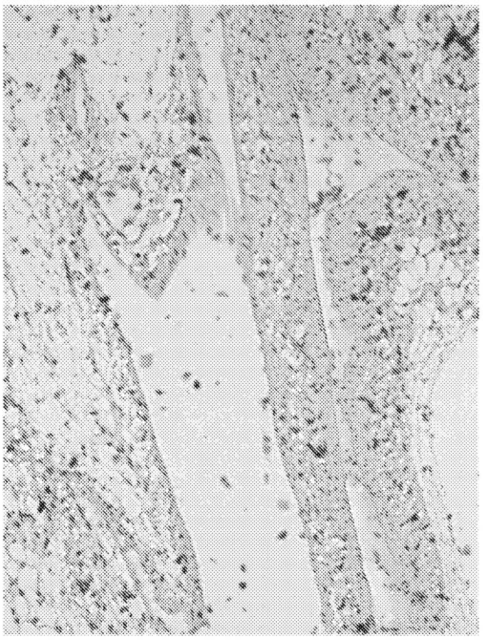
도면9


인터류킨-1 베타
미치료 대비 상대적인 mRNA
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV-6 활성
AAV-6 스크램블
미치료
AAV-5 스크램블
AAV-5 활성
정상

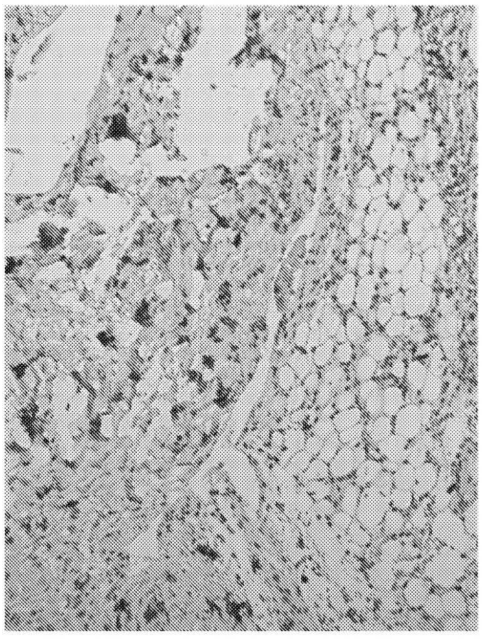
도면10a



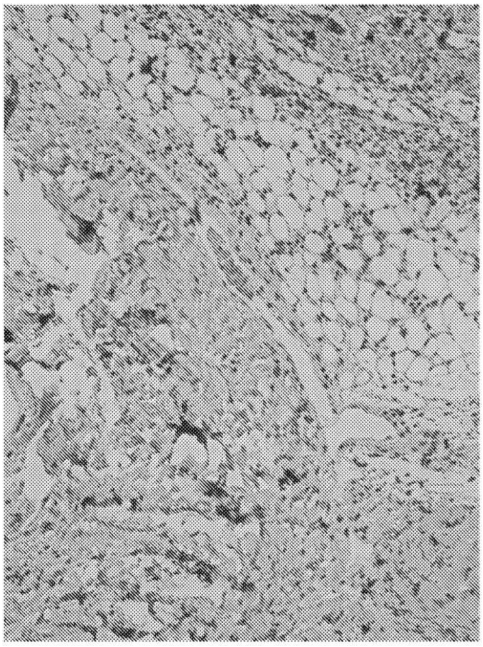
도면10b



도면10c



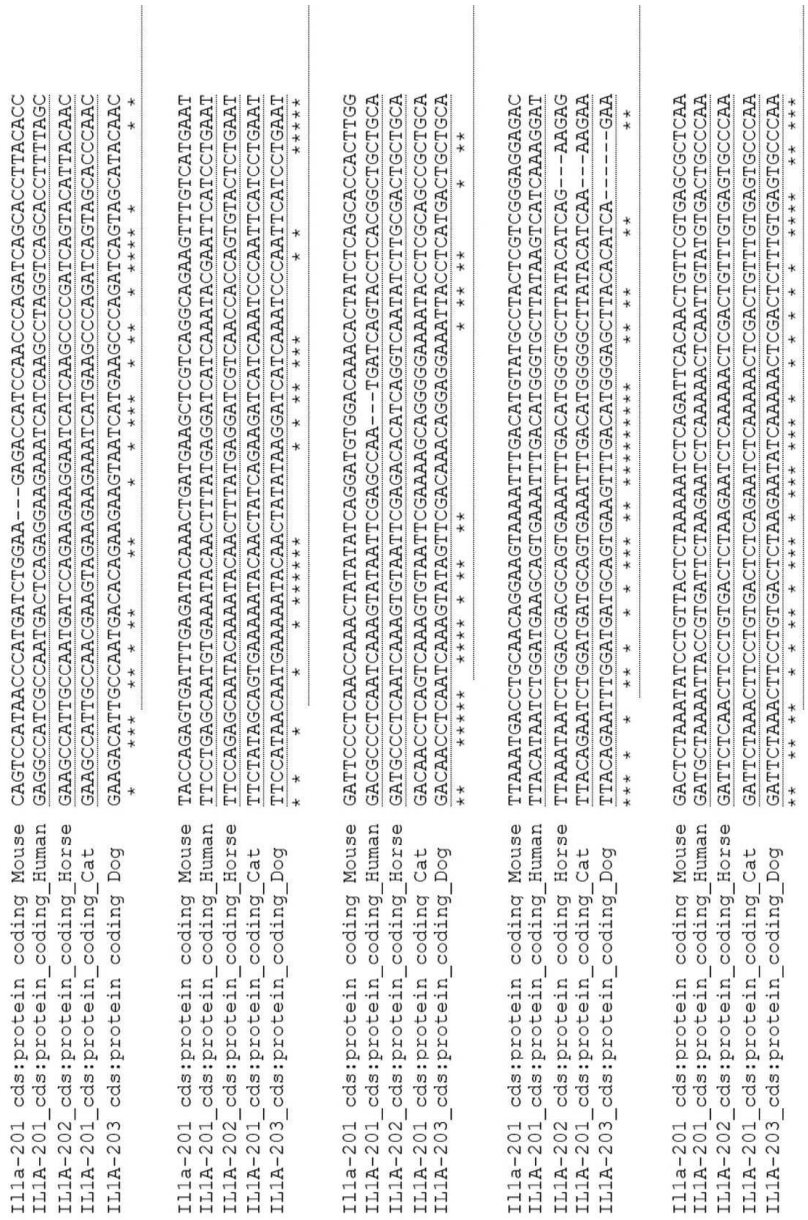
도면10d



도면11a

CLUSTAL O(1.2.4) 다중 서열 정렬
Il1a-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1A-201_cds:protein_coding_Human
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1A-201_cds:protein_coding_Human
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1A-201_cds:protein_coding_Human
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1A-201_cds:protein_coding_Human
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1A-201_cds:protein_coding_Human
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog

도면11b


Il1a-201 cds:protein coding Mouse
IL1A-201_cds:protein_coding_Human
IL1A-202_cds:protein_coding_Horse
IL1A-201_cds:protein_coding_Cat
IL1A-203 cds:protein coding Dog
Il1a-201 cds:protein coding Mouse
IL1A-201_cds:protein_coding_Human
IL1A-202_cds:protein_coding_Horse
IL1A-201_cds:protein_coding_Cat
IL1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201 cds:protein coding Mouse
IL1A-201_cds:protein_coding_Human
IL1A-202_cds:protein_coding_Horse
IL1A-201_cds:protein_coding_Cat
IL1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201 cds:protein coding Mouse
IL1A-201_cds:protein_coding_Human
IL1A-202_cds:protein_coding_Horse
IL1A-201_cds:protein_coding_Cat
IL1A-203_cds:protein_coding_Dog
Il1a-201 cds:protein coding Mouse
IL1A-201_cds:protein_coding_Human
IL1A-202_cds:protein_coding_Horse
IL1A-201_cds:protein_coding_Cat
IL1A-203_cds:protein_coding_Dog

도면11c

```
Il1a-201 cds:protein coding Mouse GGAGAAGACCAGCCCGTGTTGCTGAAGGAGTTGCCAGAAACACCAAAACTCATCACAGGT
Il1A-201_cds:protein_coding_Human GATGAAGACCAACCAGTGCTGCTGAAGGAGATGCCTGAGATACCCAAAACCATCACAGGT
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse AATGAAGATGAACCCGTACTGCTAAAGGAGATGCCTGACACACCCAAAACTATCAAAG--
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat   AATGAAGATGAGCCTGTATTGCTAAAGGAGATGCCTGAGACACCCAAAACCATCAGAG--
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog   AATGAAGATGAACCTGTATTGCTAAAGGAGATGCCTGAGACACCCAAAACTATCAGAG--
                                    ****** * ** **  **** ****** **** ** * *** ***    **** **

Il1a-201 cds:protein coding Mouse AGTGAGACCGACCTCATTTCTTCTGGAAAAGTATCAACTCTAAGAACTACTTCACATCA
Il1A-201_cds:protein_coding_Human AGTGAGACCAACCTCCTCTTCTTCTGGGAAACTCACGGCACTAAGAACTATTTCACATCA
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse -ATGAGACCAACCTCCTCTTCTTCTGGGAACGTCACGGCTCTAAGAACTACTTCAAATCG
Il1A-201 cds:protein coding Cat   -ATGAGACCAACCTTCTCTTCTTCTGGGAACGTCATGGCAGTAAGAACTACTTCAAATCA
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog   -ATGAGACAAACCTTCTTTCTTTCTTTGGGAGCGTCATGGCAGTAAGCACTACTTCAAATCA
                                    ******* ****  * ***** *** *   *    *  **** **** **** ***

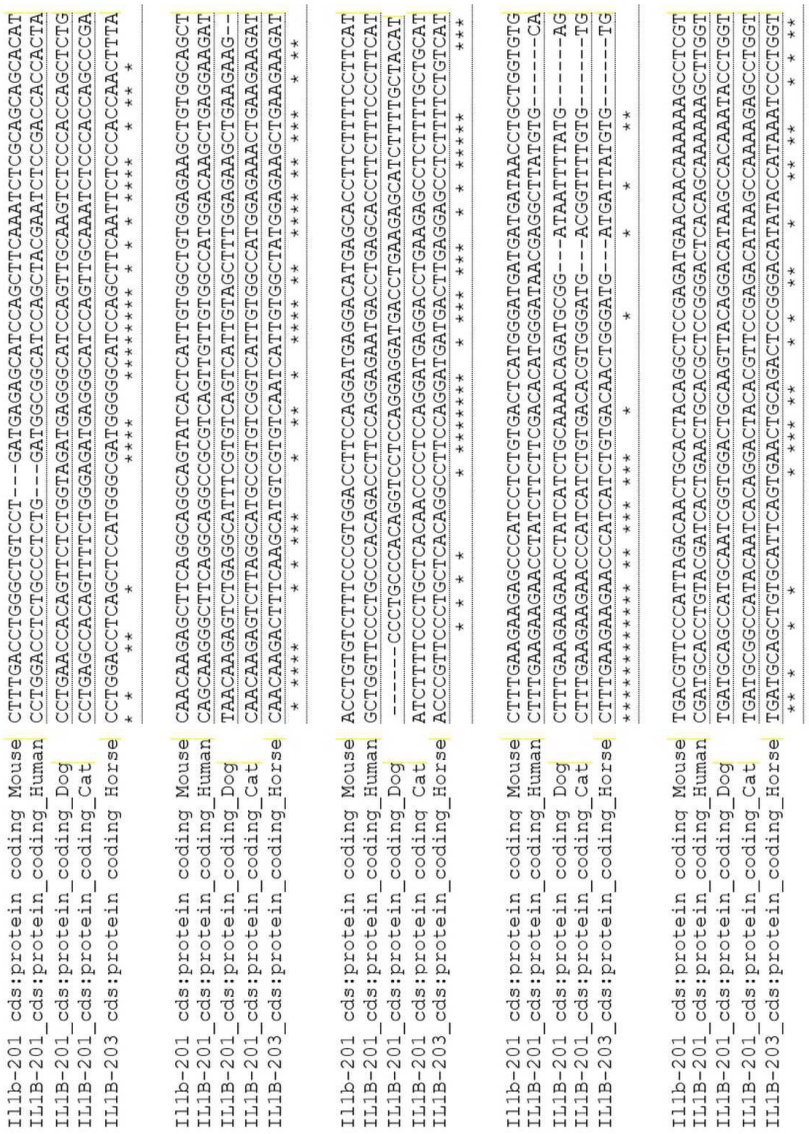
Il1a-201 cds:protein coding Mouse GCTGCTTATCCAGAGCTGTTTATTGCCACCAAAGAACAAAGTCGGGTGCACCTGGCACGG
Il1A-201_cds:protein_coding_Human GTTGCCATCCAAACTTGTTTATTGCCACAAAGCAAGACTACTGGGTGTGCTTGGCAGGG
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse GTTGCCCATCCAAAGTTGTTTATTGCCACAAAGCAGGGAAAACTGGTGCACATGGCAAGG
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat   GTTGCCCATCCAAAGTTGTTCATTGCCACACAGGAAGAACAACTGGTGCACATGGCAAGA
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog   GTTGCCCAGCCCAAGTTGTTCATTGCCACACAGGAACGAAAACTGGTGCACATGGCAAGA
                                  * ***  * **  *  **** ********  *  *          ****  * ***** *

Il1a-201 cds:protein coding Mouse GGACTGCCCTCTATGACAGACTTCCAGATATCATAA---------- (SEQ ID NO:591)
Il1A-201_cds:protein_coding_Human GGGCCACCCTCTATCACTGACTTTCAGATACTGGAAAACCAGGCGTAG (SEQ ID NO:592)
Il1A-202_cds:protein_coding_Horse GGGCAACCCTCTATCACTGACTTTCAGATATTGGACAACCAGTTTTGA (SEQ ID NO:593)
Il1A-201_cds:protein_coding_Cat   GGACTACCCTCTGTCACTGACTTTCAGATACTGGAAACCCAGTCTTGA (SEQ ID NO:594)
Il1A-203_cds:protein_coding_Dog   GGGCAACCCTCTATCACTGACTTTCGGTTACTGGAAACCCAGCCTTGA (SEQ ID NO:595)
                                  ** *  ****** * ** ***** * * **    *
```

도면12a

CLUSTAL O(1.2.4) 다중 서열 정렬
Il1b-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201 cds:protein coding Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1B-201 cds:protein coding Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201 cds:protein coding Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201 cds:protein coding Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201_cds:protein_coding_Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201 cds:protein coding Cat
Il1B-203 cds:protein coding Horse

도면12b


Il1b-201 cds:protein coding Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203 cds:protein coding Horse
Il1b-201 cds:protein coding Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201 cds:protein coding Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201_cds:protein coding Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201 cds:protein coding Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein coding Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse
Il1b-201 cds:protein coding Mouse
Il1B-201_cds:protein_coding_Human
Il1B-201_cds:protein_coding_Dog
Il1B-201_cds:protein_coding_Cat
Il1B-203_cds:protein_coding_Horse

도면12c

Il1b-201 cds:protein coding Mouse GCTGTCGGACCCATATGAGCTGAAAGCTCTCCACCTCAATGGACAGAATATCAACCAACA
IL1B-201_cds:protein_coding_Human GATGTCTGGTCCATATGAACTGAAAGCTCTCCACCTCCAGGGACAGGATATGGAGCAACA
IL1B-201_cds:protein_coding_Dog GCTGTCTAACTCATATGAGCTTCGGGCTCTCCACCTCAATGGGGAAAATGTGAACAAACA
IL1B-201_cds:protein_coding_Cat GCTGTCTGGCTCATACGAGCTTCGGGCTCTCCACCTCAATGGACAGAATATGAACCAACA
IL1B-203 cds:protein coding Horse GCTGTCCGGTGCATGTGAGCTGCAGGCTGTCCACCTCAATGGAGAGAATACAAACCAACA
Il1b-201 cds:protein coding Mouse AGTGATATTCTCCATGAGCTTTGTACAAGGAGAACCAAGCAACGACAAAATACCTGTGGC
IL1B-201_cds:protein_coding_Human AGTGGTGTTCTCCATGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAAATACCTGTGGC
IL1B-201_cds:protein_coding_Dog AGTGGTGTTCCACATGAGCTTTGTGCACGGGGATGAAAGTAATAACAAGATACCTGTGGT
IL1B-201_cds:protein_coding_Cat AGTGGTGTTCCGCATGAGCTTTGTGCACGGGAGGAAAAATAGTAAGAAGATACCAGTAGT
IL1B-203_cds:protein_coding_Horse AGTGGTGTTCTGCATGAGCTTTGTGCAAGGAGAAGAAGACTGACAACGATACCTGTGGC
Il1b-201 cds:protein coding Mouse CTTGGGCCTCAAAGGAAAGAATCTATACCTGTCCTGTGTAATGAAAGACGGCACACCCAC
IL1B-201_cds:protein_coding_Human CTTGGGCCTCAAGGAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTTGAAAGATGATAAGCCCAC
IL1B-201_cds:protein_coding_Dog CTTGGGCATCAAACAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGTGATGAAGGATGGAAAGCCCAC
IL1B-201 cds:protein coding Cat GTTGTGCATCAAGAAAAATAACCTGTACCTGTCCTGTGATGAAAGATGGGAAACCCAC
IL1B-203_cds:protein_coding_Horse CTTGGGCCTCAAGGAAAAGAACCTGTACCTGTCTTGTGGGATGAAAGATGGGAAGCCCAC
Il1b-201 cds:protein coding Mouse CCTGCAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGCAATACCCAAAGAAGAAGATGGAAAAACGGTT
IL1B-201_cds:protein_coding_Human TCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAAATTACCCAAAGAAGAAGATGGAAAAGCGATT
IL1B-201_cds:protein_coding_Dog CCTACAGCTAGAGAAGGTAGACCCCAAAGTCTACCCAAAGAGGAAGATGGAAAAGGATT
IL1B-201_cds:protein_coding_Cat CCTACAGCTGGAGATGTTAGACCCCAAAGTTTACCCAAAGAAGAAGATGGAAAAGAGATT
IL1B-203_cds:protein_coding_Horse CCTACAGCTGGAGACAGTAGACCCCAATACTTACCCAAAGAGGAAAATGGAAAAGGCGATT
Il1b-201 cds:protein coding Mouse TGTCTTCAACAAGATAGAAGTCAAGAGCAAAGTGGAGTTTGAGTCTGCAGAGTTCCCAA
IL1B-201_cds:protein_coding_Human TGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAAGCTGGAATTTGAGTCTGCCCAGTTCCCAA
IL1B-201_cds:protein_coding_Dog TGTCTTCAACAAGATAGAAATCAAGAACACAGTGGAATTTGAGTCTTCTCAGTACCTAA
IL1B-201_cds:protein_coding_Cat TGTCTTCAACAAGACAGAAATCAAGGGCAATGTGGAATTTGAGTCTTCCCAGTTCCCAA
IL1B-203_cds:protein_coding_Horse TGTCTTCAACAAGATGGAAATCAAGGGCAACGTGGAATTTGAGTCTGCAATGTACCCCAA

도면12d

```
Il1b-201_cds:protein_coding_Mouse  CTGGTACATCAGCACCTCACAAGCAGAGCACAAGCCTGTCTTCCTGGGAAACAACAGTGG
IL1B-201_cds:protein_coding_Human  CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGCAGAAAACATGCCCGTCTTCCTGGGAGGGACCAAAGG
IL1B-201_cds:protein_coding_Dog    CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGTCGAAGGAATGCCTGTCTTCCTAGGAAATACCAGAGG
IL1B-201_cds:protein_coding_Cat    CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGCAGAAGAAATGCCTGTCTTCCTAGGAAATACCAAAGG
IL1B-203 cds:protein coding Horse  CTGGTACATCAGCACCTCTCAAGCAGAAAAAAAGCCTGTCTTCCTAGGAAATACCAGAGG
                                   ********************  ****  **     *  ***  ********* ***    *  **   **

Il1b-201_cds:protein_coding_Mouse  T---CAGGACATAATTGACTTCACCATGGAATCCGTGTCTTCCTAA (SEQ ID NO:596)
IL1B-201_cds:protein_coding_Human  CGGCCAGGATATAACTGACTTCACCATGCAATTTGTGTCTTCCTAA (SEQ ID NO:597)
IL1B-201_cds:protein coding Dog    TGGCCAGGATATAACTGACTTCACCATGGAATTCTCTTCCTAG--- (SEQ ID NO:598)
IL1B-201_cds:protein_coding_Cat    TGGTCAGGATATAACTGACTTCATCATGGAAAGCGCTTCCTAA--- (SEQ ID NO:599)
IL1B-203 cds:protein coding Horse  CGGCCGGGACATAACTGACTTCATCATGGAAATCACCTCTGCCTAA (SEQ ID NO:600)
                                     * ***  ****  *********  ****  **       **
```

도면13a

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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	AUCUGAAAGUCAGUGAUAGA	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	AAGCUAAAAGGUGCUGACCU	320	AGG	+	10	59	23	5
IL1A	CUCGAAUUAUACUUUGAUUG	321	AGG	+	50	20	24	5
IL1A	UGGAAAACCAGGCGUAGGUC	322	TGG	-	70	1	25	7

도면13b

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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

도면13c

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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

도면13d

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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

도면14a

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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

도면14b

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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	GAAAACAUGCCCGUCUUCCU	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

도면14c

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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	UGCCGCCAUCCAGAGGCAG	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

도면14d

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
IL1B	AGGUGCUCAGGUCAUUCUCC	463	TGG	+	74	65	76	4
IL1B	AAAUUACCCAAAGAAGAAGA	464	TGG	-	44	96	77	7
IL1B	UUCAAAGAUGAAGGGAAAGA	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

도면14e

유전자	crRNA 서열	서열번호	PAM	가닥	온 타겟 순위	오프 타겟 순위	종합 순위	엑손
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

도면15a

유전자	crRNA	서열번호	PAM	엑손	가닥	온 타겟 (Azimuth2)	오프 타겟	정밀도 (Delphi)	프레임시프트 (Delphi)	종합 (오프 + 정밀 + 프레임)
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	GAGAACUGUGGUUCAGGUCU	514	TGG	4	-	49.3	63.7	0.49	80.7	64.5
IL1b	GCAGCACUGUGGAGAGACCA	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	UUUUGCUACAUCUUUGAAGA	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

도면15b

유전자	crRNA	서열번호	PAM	엑손	가닥	온 타겟 (Azimuth2)	오프 타겟	정밀도 (Delphi)	프레임시프트 (Delphi)	종합 (오프 + 정밀 + 프레임)
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

도면15c

유전자	crRNA	서열번호	PAM	엑손	가닥	온 타겟 (Azimuth2)	오프 타겟	정밀도 (Delphi)	프레임시프트 (Delphi)	종합 (오프 + 정밀 + 프레임)
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	UCACAUUUUCCCCAUUGAGG	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

도면16a

유전자	crRNA	서열번호	PAM	엑손	가닥	온 타겟 (Azimuth2)	오프 타겟	정밀도 (Delphi)	프레임시프트 (Delphi)	종합 (오프 + 정밀 + 프레임)
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	GUCACAGCUCAUAUCAUAGA	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

도면16b

유전자	crRNA	서열번호	PAM	엑손	가닥	온 타겟 (Azimuth2)	오프 타겟	정밀도 (Delphi)	프레임시프트 (Delphi)	종합 (오프 + 정밀 + 프레임)
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	UUACAGAAUUUGGAUGAUGC	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	AGUUGUAUUUUUCAUUGUUA	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

인간 IL1A (IL1A-001; GRCh38)								
		타겟						
#	crRNA 서열	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	오프 타겟 점수**	정밀도 점수***	프레임시프트 %****	종합 점수^
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

(inDelphi) 머신 러닝 예측		
상위 유전자형	복구 결과†	
insA (35.3%)	TACCTGATTCAGAGACAGATGATCAA|{A}TGGAGGAACTGTCTTCTTCATTTTCA	서열번호 601
insT (56%)	ATGGAGTGGGCCATAGCTTACATGAT|{T}AGAAGGATTTCTGTGAGGAAGGAAAA	서열번호 602

경험적 데이터: ICE, 뉴클레오펙션 후 10일차				
KO 점수	상위 유전자형	inDelphi 순위	복구 결과	
99%	insA (99%)	1위	TACCTGATTCAGAGACAGATGATCAA|{A}TGGAGGAACTGTCTTCTTCATTTTCA	서열번호 603
48%	insT (32%)	1위	ATGGAGTGGGCCATAGCTTACATGAT|{T}AGAAGGATTTCTGTGAGGAAGGAAAA	서열번호 604

공개특허 10-2023-0041729

인간 IL1B (IL1B-201; GRCh38)

		타겟						
#	crRNA 서열	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	오프 타겟 점수**	정밀도 점수***	프레임시프트 %****	종합 점수^
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

(inDelphi) 머신 러닝 예측		
상위 유전자형	복구 결과†	
insA (33.3%)	CTTTGAAGCTGATGGCCCTAAACAGA|{A}TGAAGGTAAGACTATGGGTTTAACTC	서열번호 605
insT (51.5%)	TGCTGTAGTGGTGGTCGGAGATTCGT|{T}AGCTGGATGCCGCCATCCAGAGGGCA	서열번호 606
insA (51.9%)	CATTTCAGAACCTATCTTCTTCGACA|{A}CATGGGATAACGAGGCTTATGTGCAC	서열번호 607
insA (33.4%)	ACCTATCTTCTTCGACACATGGGATA|{A}ACGAGGCTTATGTGCACGATGCACCT	서열번호 608
insT (18.3%)	TCCCGGAGCGTGCAGTTCAGTGATCG|{T}TACAGGTGCATCGTGCACATAAGCCT	서열번호 609

경험적 데이터: ICE, 뉴클레오펙션 후 10일차(*3일차)				
KO 점수	상위 유전자형	inDelphi 순위	복구 결과	
66%	insA (40%)	1위	CTTTGAAGCTGATGGCCCTAAACAGA|{A}TGAAGGTAAGACTATGGGTTTAACTC	서열번호 605
0%	야생형	NA	TGCTGTAGTGGTGGTCGGAGATTCGT|AGCTGGATGCCGCCATCCAGAGGGCA	서열번호 606
3%*	CAdel (3%)*	2위	CATTTCAGAACCTATCTTCTTCGACA|--TGGGATAACGAGGCTTATGTGCAC	서열번호 607
33%*	insA (22%)*	1위	ACCTATCTTCTTCGACACATGGGATA|{A}ACGAGGCTTATGTGCACGATGCACCT	서열번호 608
81%*	Gdel (55%)*	8위	TCCCGGAGCGTGCAGTTCAGTGATC-|TACAGGTGCATCGTGCACATAAGCCT	서열번호 609

공개특허 10-2023-0041729

개 IL1A (IL1A-201; CanFam3.1)

		타겟						
#	crRNA 서열	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	오프 타겟 점수**	정밀도 점수***	프레임시프트 %****	종합 점수^
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

(inDelphi) 머신 러닝 예측		
상위 유전자형	복구 결과†	
insA (35.2%)	TTCTGAAATTGACCATCTCTCTCTGA|{A}ATCAGGTAAGTAAATGACTGCAATTC	서열번호 610
insT (52.7%)	AATCTCAAAGACATCCCAGCTTACCT|{T}TCAAGGAAAATGTGGTAGTGGTGGCA	서열번호 611
insC (30.6%)	CTCAATCAAAGTATAGTTCGACAAAC|{C}AGGAGGAAATTACCTCATGACTGCTG	서열번호 612
insC (20.4%)	CATCCAAATTCTGTAATGCAGCAGTC|{C}ATGAGGTAATTTCCTCCTGTTTGTCG	서열번호 613

경험적 데이터: ICE, 뉴클레오펙션 후 10일차				
KO 점수	상위 유전자형	inDelphi 순위	복구 결과	
90%	insA (56%)	1위	TTCTGAAATTGACCATCTCTCTCTGA|{A}ATCAGGTAAGTAAATGACTGCAATTC	서열번호 614
97%	insT (57%)	1위	AATCTCAAAGACATCCCAGCTTACCT|{T}TCAAGGAAAATGTGGTAGTGGTGGCA	서열번호 615

공개특허 10-2023-0041729

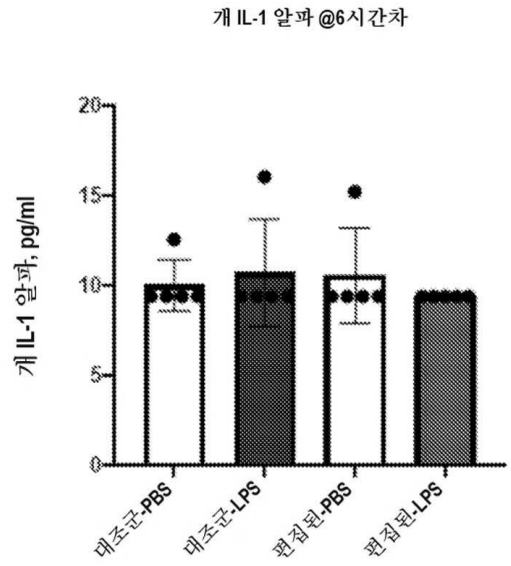
개 IL1B (IL1B-201; CanFam3.1)

		타겟						
#	crRNA 서열	엑손 #	가닥	온 타겟 점수*	오프 타겟 점수**	정밀도 점수***	프레임시프트 %****	종합 점수^
sg241	TGATGGCCCTGGAAATGTGA	3	+	66.1	51.5	0.53	91.2	65.2
sg242	ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	4	-	68.9	62	0.64	84	70

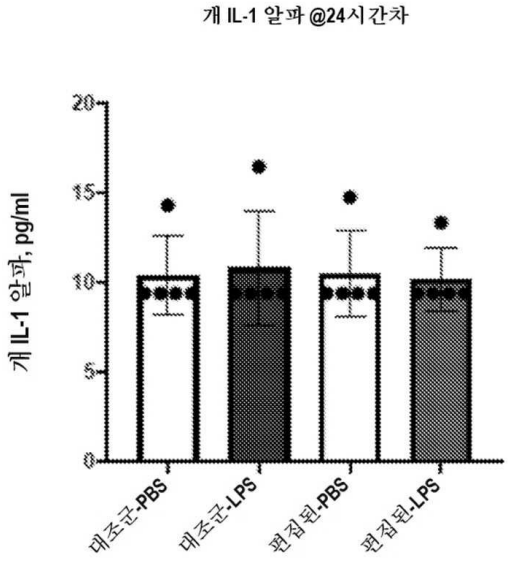
(inDelphi) 머신 러닝 예측		
상위 유전자형	복구 결과	
insT (22.9%)	TTTGAAGCTGATGGCCCTGGAAATG|{T}TGAAGGTGAGACCATGGGCTTAGCTC	서열번호 616
insT (56.4%)	TGCCTCAGACTCTTGTTACAGAGCT|{T}GGTGGGAGACTTGCAACTGGATGCCC	서열번호 617

경험적 데이터: ICE, 뉴클레오펙션 후 10일차				
KO 점수	상위 유전자형	inDelphi 순위	복구 결과	
99%	delTG (95%)	2위	CTTTGAAGCTGATGGCCCTGGAAATG|--AAGGTGAGACCATGGGCTTAGCTC	서열번호 618
99%	insT (99%)	1위	ATGCCTCAGACTCTTGTTACAGAGCT|{T}GGTGGGAGACTTGCAACTGGATGCCC	서열번호 619

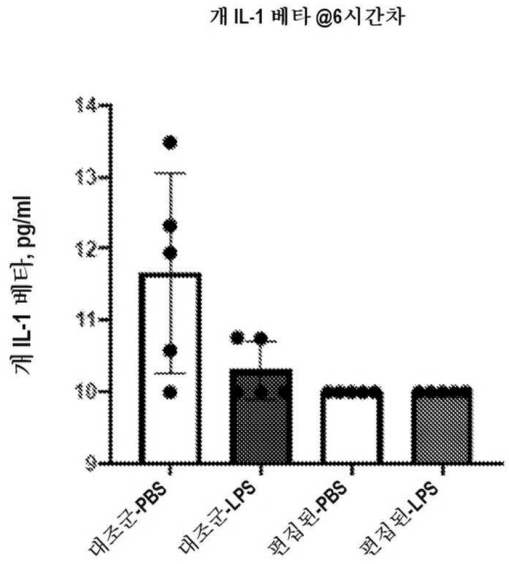
도면18a


개 IL-1 알파 @6시간차
개 IL-1 알파, pg/ml
20
15
10
5
0
대조군-PBS
대조군-LPS
편집된-PBS
편집된-LPS

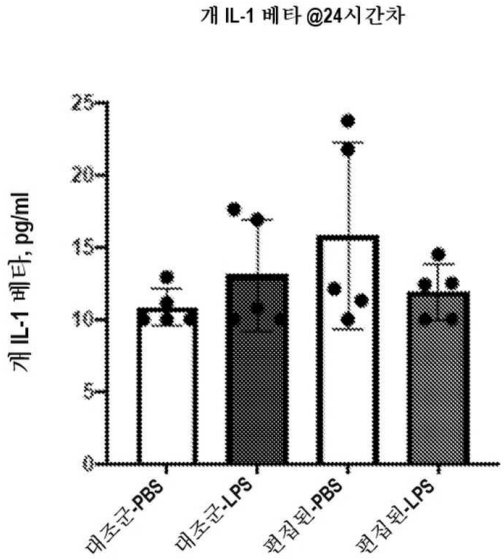
도면18b


개 IL-1 알파 @24시간차
개 IL-1 알파, pg/ml
20
15
10
5
0
대조군-PBS
대조군-LPS
편집된-PBS
편집된-LPS

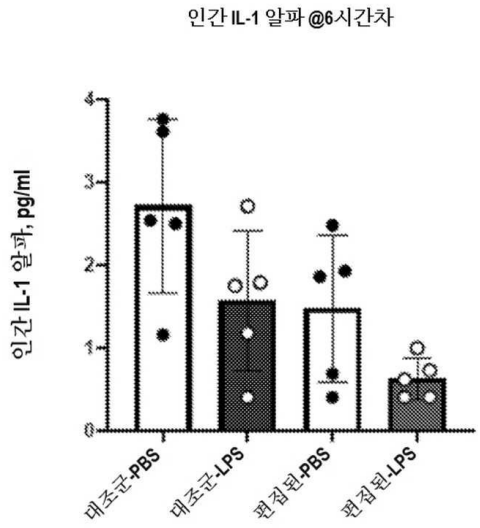
도면18c


개 IL-1 베타 @6시간차
개 IL-1 베타, pg/ml
14
13
12
11
10
9
대조군-PBS
대조군-LPS
편집된-PBS
편집된-LPS

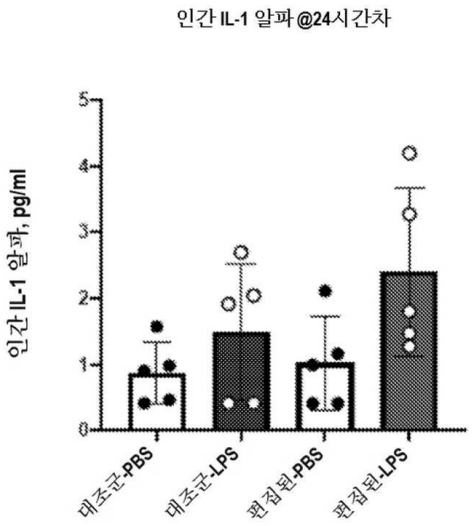
도면18d


개 IL-1 베타 @24시간차
개 IL-1 베타, pg/ml
25
20
15
10
5
0
대조군-PBS
대조군-LPS
편집된-PBS
편집된-LPS

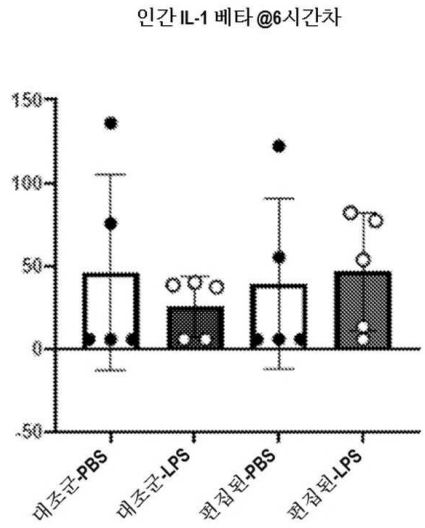
도면19a


인간 IL-1 알파 @6시간차
인간 IL-1 알파, pg/ml
0
1
2
3
4
대조군-PBS
대조군-LPS
편집된-PBS
편집된-LPS

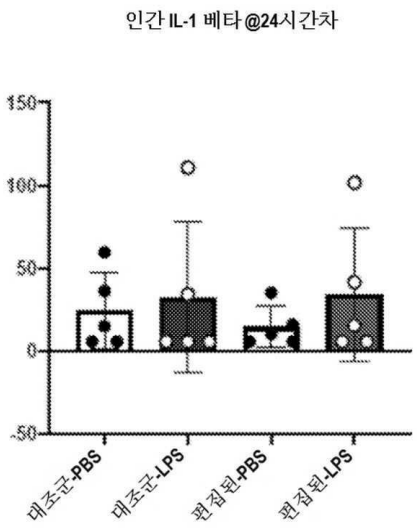
도면19b


인간 IL-1 알파 @24시간차
인간 IL-1 알파, pg/ml
0
1
2
3
4
5
대조군-PBS
대조군-LPS
편집된-PBS
편집된-LPS

도면19c



도면19d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ORTHOBIO THERAPEUTICS, INC.

Millett, Peter J.

Russell, Iain Alasdair

Allen, Matthew J.

<120> GENE EDITING TO IMPROVE JOINT FUNCTION

<130> 1239945001WO51

<140> PCT/US2021/042100

<141> 2021-07-16

<150> US 63/052,881

<151> 2020-07-16

<150> US 63/055,808

<151> 2020-07-23

<160> 666

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln

20 25 30

Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met

35 40 45

Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys

50 55 60

Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val

65 70 75 80

Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg

115 120 125

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

130 135 140

Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu

145 150 155 160

Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp
165 170 175
Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr
180 185 190
Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro

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

260 265 270
<210> 2
<211> 269
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ala Glu Val Pro Glu Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser
1 5 10 15
Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Gln Met
20 25 30
Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Asp Gly Gly Ile
35 40 45

Gln Leu Arg Ile Ser Asp His His Tyr Ser Lys Gly Phe Arg Gln Ala
50 55 60
Ala Ser Val Val Val Ala Met Asp Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro
65 70 75 80
Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe
85 90 95

Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu Ala
100 105 110

Tyr Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp
115 120 125
Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala
130 135 140
Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met
145 150 155 160
Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu
165 170 175

Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp
180 185 190
Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys
195 200 205
Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn
210 215 220
Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr
225 230 235 240

Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly
245 250 255
Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
260 265

<210> 3
<211> 270
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3
Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser
1 5 10 15
Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Ala Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln

20 25 30

Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Gly Ser Leu His Glu Thr Cys Thr

35 40 45

Asp Gln Phe Val Ser Leu Arg Thr Ser Glu Thr Ser Lys Met Ser Asn

50 55 60

Phe Thr Phe Lys Glu Ser Arg Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Ser Asn

65 70 75 80

Gly Lys Ile Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Phe Ser Glu Thr Phe Thr

85 90 95

Glu Asp Asp Leu Gln Ser Ile Thr His Asp Leu Glu Glu Thr Ile Gln

100 105 110

Pro Arg Ser Ala Pro Tyr Thr Tyr Gln Ser Asp Leu Arg Tyr Lys Leu

115 120 125

Met Lys Leu Val Arg Gln Lys Phe Val Met Asn Asp Ser Leu Asn Gln

130 135 140

Thr Ile Tyr Gln Asp Val Asp Lys His Tyr Leu Ser Thr Thr Trp Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Gly Asp Asp Ser Lys Tyr Pro Val Thr Leu Lys Ile Ser Asp Ser

180 185 190

Gln Leu Phe Val Ser Ala Gln Gly Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys

195 200 205

Glu Leu Pro Glu Thr Pro Lys Leu Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asp Leu

210 215 220

Ile Phe Phe Trp Lys Ser Ile Asn Ser Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Ala

225 230 235 240

Ala Tyr Pro Glu Leu Phe Ile Ala Thr Lys Glu Gln Ser Arg Val His

245 250 255

Leu Ala Arg Gly Leu Pro Ser Met Thr Asp Phe Gln Ile Ser

260 265 270

<210> 4

<211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 4

Met Ala Thr Val Pro Glu Leu Asn Cys Glu Met Pro Pro Phe Asp Ser
1 5 10 15

Asp Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Val Asp Gly Pro Gln Lys Met Lys
20 25 30

Gly Cys Phe Gln Thr Phe Asp Leu Gly Cys Pro Asp Glu Ser Ile Gln
35 40 45

Leu Gln Ile Ser Gln Gln His Ile Asn Lys Ser Phe Arg Gln Ala Val
50 55 60

Ser Leu Ile Val Ala Val Glu Lys Leu Trp Gln Leu Pro Val Ser Phe
65 70 75 80

Pro Trp Thr Phe Gln Asp Glu Asp Met Ser Thr Phe Phe Ser Phe Ile
85 90 95

Phe Glu Glu Glu Pro Ile Leu Cys Asp Ser Trp Asp Asp Asp Asp Asn
100 105 110

Leu Leu Val Cys Asp Val Pro Ile Arg Gln Leu His Tyr Arg Leu Arg
115 120 125

Asp Glu Gln Gln Lys Ser Leu Val Leu Ser Asp Pro Tyr Glu Leu Lys
130 135 140

Ala Leu His Leu Asn Gly Gln Asn Ile Asn Gln Gln Val Ile Phe Ser
145 150 155 160

Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Pro Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala
165 170 175

Leu Gly Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp
180 185 190

Gly Thr Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Gln Tyr Pro
195 200 205

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

Gln Asp Ile Ile Asp Phe Thr Met Glu Ser Val Ser Ser
260 265

<210> 5
<211> 177
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu
1 5 10 15
Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
20 25 30
Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe

35 40 45
Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn
50 55 60
Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala
65 70 75 80
Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys
85 90 95
Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp

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

Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn
145 150 155 160
Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp

165 170 175
Glu

<210> 6
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Glu Ile Cys Trp Gly Pro Tyr Ser His Leu Ile Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ile Leu Leu Phe His Ser Glu Ala Ala Cys Arg Pro Ser Gly Lys Arg
20 25 30
Pro Cys Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Thr Asn Gln Lys Thr
35 40 45

Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Ile Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro
50 55 60
Asn Ile Lys Leu Glu Glu Lys Ile Asp Met Val Pro Ile Asp Leu His
65 70 75 80
Ser Val Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Leu Cys Leu Ser Cys Ala
85 90 95
Lys Ser Gly Asp Asp Ile Lys Leu Gln Leu Glu Glu Val Asn Ile Thr
100 105 110

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

Asn Thr Pro Glu Glu Pro Leu Ile Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu
165 170 175

Asp Gln

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

gtatcagcaa cgtcaagcaa 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

ctgcaggtca tcttcagtga 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

tatcagcaac gtcaagcaac 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213>

Mus musculus

<400> 10

gccatagctt gcatcataga 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

catcaacaag agcttcaggc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

tgctctcatc aggacagccc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

gctcatgtcc tcatcctgga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

cctcatcctg gaaggtccac 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

ttactcctta ccttccagat c 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

gaaactcagc cgtctcttct t 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

caacttcacc ttcaaggaga g 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

gtgtctttcc cgtggacctt c 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 19

cacagcttct ccacagccac a 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

gtgctgctgc gagatttgaa g 21

<210> 21

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 21

guaucagcaa cgucaagcaa 20

<210> 22

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 22

cugcagguca ucuucaguga 20

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 23

uaucagcaac gucaagcaac 20

<210> 24

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 24

gccauagcuu gcaucauaga 20

<210> 25

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 25

caucaacaag agcuucaggc 20

<210> 26

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 26

ugcucucauc aggacagccc 20

<210> 27

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 27

gcucaugucc ucauccugga 20

<210> 28

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 28

ccucauccug gaagguccac 20

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 29

uuacuccuua ccuuccagau c 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 30

gaaacucagc cgucucuucu u 21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 31

caacuucacc uucaaggaga g 21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 32

gugucuuucc cguggaccuu c 21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 33

cacagcuucu ccacagccac a 21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 34

gugcugcugc gagauuugaa g 21

<210> 35

<211> 81

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 35

guuauaguac ucuggaaaca gaaucuacua aaacaaggca aaaugccgug uuuaucucgu 60

caacuuguug gcgagauuuu u 81

<210> 36

<211> 82

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 36

guuauagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu uu 82

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gccatagctt acatgataga 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

tccttctatc atgtaagcta 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

ccatgcagcc ttcatggagt 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

tccatgcagc cttcatggag 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

agctatggcc cactccatga 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

attgatccat gcagccttca 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

cccactccat gaaggctgca 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

gctctccttg aaggtaagct 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

taccaccatg ctctccttga 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gcttaccttc aaggagagca 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

taccttcaag gagagcatgg 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

atggtggtag tagcaaccaa 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

tggtggtagt agcaaccaac 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

cttcttcaga accttcccgt 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

ggtagtagca accaacggga 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

ggaaggttct gaagaagaga 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

ctccaggtca tcatcagtga 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

catcactgat gatgacctgg 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

agtcattggc gatggcctcc 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

ttcctctgag tcattggcga 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

tcccatgtgt cgaagaagat 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

aacctatctt cttcgacaca 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

acctatcttc ttcgacacat 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

cttcgacaca tgggataacg 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

gtgcagttca gtgatcgtac 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

gatcactgaa ctgcacgctc 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

atcactgaac tgcacgctcc 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

caaaaaagct tggtgatgtc 20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

ccatatcctg tccctggagg 20

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

ctgaaagctc tccacctcca 20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

gctccatatc ctgtccctgg 20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 68

agctctccac ctccagggac 20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

gttgctccat atcctgtccc 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

ggacaggata tggagcaaca 20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 71

gtcacagctc atatcataga 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 72

acatgcagtc ctcatgaagt 20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 73

gacatgcagt cctcatgaag 20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 74

gagctgtgac ccacttcatg 20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 75

ggatgtcttt gagatttcag 20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 76

attttccttg aaggtaagct 20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 77

gacatcccag cttaccttca 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 78

cttcaaggaa aatgtggtag 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 79

gtggtagtgg tggcagccaa 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 80

tggtagtggt ggcagccaat 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 81

cttctttaga atcttcccat 20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 82

ggaagattct aaagaagaga 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 83

aatgtcttcc aggtcatcat 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 84

attcatcacc gatgatgacc 20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 85

attgccaatg acacagaaga 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 86

cctcatctac cagagaactg 20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 87

ccacagttct ctggtagatg 20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 88

cacagttctc tggtagatga 20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 89

gctggtggga gacttgcaac 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 90

actcttgtta cagagctggt 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 91

gactcttgtt acagagctgg 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 92

tcagactctt gttacagagc 20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 93

agctctgtaa caagagtctg 20

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 94

cgtgtcagtc attgtagctt 20

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 95

tcctggagga cctgtgggca 20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 96

gctgaagaag ccctgcccac 20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 97

catcctcctg gaggacctgt 20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 98

tcatcctcct ggaggacctg 20

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 99

gccctgccca caggtcctcc 20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 100

ctgcccacag gtcctccagg 20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 101

tcttcaggtc atcctcctgg 20

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 102

tgctcttcag gtcatcctcc 20

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 103

tgtagcaaaa gatgctcttc 20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 104

ttttgctaca tctttgaaga 20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 105

gtcatagctt gcatcataga 20

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 106

ccatgcagtc ctcaggaagt 20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213>

Equus caballus

<400> 107

tccatgcagt cctcaggaag 20

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 108

aagctatgac ccacttcctg 20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 109

aatgtatcca tgcagtcctc 20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 110

cccacttcct gaggactgca 20

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 111

ggatgtctta gaggtttcag 20

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 112

gttcagcttg gatgtcttag 20

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 113

gctctccttg aagttcagct 20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 114

gacatccaag ctgaacttca 20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 115

gctgaacttc aaggagagcg 20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 116

cttcaaggag agcgtggtgc 20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 117

caaggagagc gtggtgctgg 20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 118

gtggtgctgg tggcagccaa 20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 119

tggtgctggt ggcagccaac 20

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 120

cttcttcaga gtcttcccgt 20

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 121

ggaagactct gaagaagaga 20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 122

aatggcttcc aggtcatcat 20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 123

gttcatcacc aatgatgacc 20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 124

ttcttctgga tcattggcaa 20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 125

ggtggtggga gatttgcaac 20

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 126

agtcttgttg tagaggtggt 20

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 127

aagtcttgtt gtagaggtgg 20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 128

tgaaagtctt gttgtagagg 20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 129

gtttgaaagt cttgttgtag 20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 130

acatgccatg tcaatcattg 20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 131

catgtcaatc attgtggctg 20

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 132

gccatagctt gcatcataga 20

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 133

tccttctatg atgcaagcta 20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 134

ggacatcttt gacgtttcag 20

<210> 135

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 135

gatgtccaac ttcaccttca 20

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 136

tgtcacccgg ctctccttga 20

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 137

cttcaccttc aaggagagcc 20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 138

acgttgctga tactgtcacc 20

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 139

gtatcagcaa cgtcaagcaa 20

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 140

tatcagcaac gtcaagcaac 20

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 141

ggaagattct gaagaagaga 20

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 142

ctgcaggtca tcttcagtga 20

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 143

accttccaga tcatgggtta 20

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 144

ctccttacct tccagatcat 20

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 145

tccataaccc atgatctgga 20

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 146

aacccatgat ctggaaggta 20

<210> 147

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 147

gacagcccag gtcaaaggtt 20

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 148

atcaggacag cccaggtcaa 20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 149

tgcttccaaa cctttgacct 20

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 150

tgctctcatc aggacagccc 20

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 151

tgaagctgga tgctctcatc 20

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 152

gctgctgcga gatttgaagc 20

<210> 153

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 153

catcaacaag agcttcaggc 20

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 154

gcaggcagta tcactcattg 20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 155

agtatcactc attgtggctg 20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 156

ttgtggctgt ggagaagctg 20

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 157

aaggtccacg ggaaagacac 20

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 158

agctacctgt gtctttcccg 20

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 159

cctcatcctg gaaggtccac 20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 160

tcctcatcct ggaaggtcca 20

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 161

gctcatgtcc tcatcctgga 20

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 162

cccgtggacc ttccaggatg 20

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 163

aggtgctcat gtcctcatcc 20

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 164

ttcaaagatg aaggaaaaga 20

<210> 165

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 165

agtaccttct tcaaagatga 20

<210> 166

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400

> 166

tgctgtagtg gtggtcggag attcgtagct ggatgccgcc atccagaggg ca 52

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 167

ttttccttca tctttgaaga 20

<210> 168

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 168

gccauagcuu acaugauaga 20

<210> 169

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 169

uccuucuauc auguaagcua 20

<210> 170

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 170

ccaugcagcc uucauggagu 20

<210> 171

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 171

uccaugcagc cuucauggag 20

<210> 172

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 172

agcuauggcc cacuccauga 20

<210> 173

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 173

auugauccau gcagccuuca 20

<210> 174

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 174

cccacuccau gaaggcugca 20

<210> 175

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 175

gcucuccuug aagguaagcu 20

<210> 176

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 176

uaccaccaug cucuccuuga 20

<210> 177

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 177

gcuuaccuuc aaggagagca 20

<210> 178

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 178

uaccuucaag gagagcaugg 20

<210> 179

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 179

augugguag uagcaaccaa 20

<210> 180

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 180

uggugguagu agcaaccaac 20

<210> 181

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 181

cuucuucaga accuucccgu 20

<210> 182

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 182

gguaguagca accaacggga 20

<210> 183

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 183

ggaagguucu gaagaagaga 20

<210> 184

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 184

cuccagguca ucaucaguga 20

<210> 185

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 185

caucacugau gaugaccugg 20

<210> 186

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 186

agucauuggc gauggccucc 20

<210> 187

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 187

uuccucugag ucauuggcga 20

<210> 188

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 188

ucccaugugu cgaagaagau 20

<210> 189

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 189

aaccuaucuu cuucgacaca 20

<210> 190

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 190

accuaucuuc uucgacacau 20

<210> 191

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 191

cuucgacaca ugggauaacg 20

<210> 192

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 192

gugcaguuca gugaucguac 20

<210> 193

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 193

gaucacugaa cugcacgcuc 20

<210> 194

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 194

aucacugaac ugcacgcucc 20

<210> 195

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 195

caaaaaagcu uggugauguc 20

<210> 196

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 196

ccauauccug ucccuggagg 20

<210> 197

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 197

cugaaagcuc uccaccucca 20

<210> 198

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 198

gcuccauauc cugucccugg 20

<210> 199

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 199

agcucuccac cuccagggac 20

<210> 200

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 200

guugcuccau auccuguccc 20

<210> 201

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 201

ggacaggaua uggagcaaca 20

<210> 202

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 202

gucacagcuc auaucauaga 20

<210> 203

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 203

acaugcaguc cucaugaagu 20

<210> 204

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 204

gacaugcagu ccucaugaag 20

<210> 205

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 205

gagcugugac ccacuucaug 20

<210> 206

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 206

ggaugucuuu gagauuucag 20

<210> 207

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 207

auuuuccuug aagguaagcu 20

<210> 208

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 208

gacaucccag cuuaccuuca 20

<210> 209

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 209

cuucaaggaa aaugugguag 20

<210> 210

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 210

gugguagugg uggcagccaa 20

<210> 211

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 211

ugguaguggu ggcagccaau 20

<210> 212

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 212

cuucuuuaga aucuucccau 20

<210> 213

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 213

ggaagauucu aaagaagaga 20

<210> 214

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 214

aaugucuucc aggucaucau 20

<210> 215

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 215

auucaucacc gaugaugacc 20

<210> 216

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 216

auugccaaug acacagaaga 20

<210> 217

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 217

ccucaucuac cagagaacug 20

<210> 218

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 218

ccacaguucu cugguagaug 20

<210> 219

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 219

cacaguucuc ugguagauga 20

<210> 220

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 220

gcuggugga gacuugcaac 20

<210> 221

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 221

acucuuguua cagagcuggu 20

<210> 222

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 222

gacucuuguu acagagcugg 20

<210> 223

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 223

ucagacucuu guuacagagc 20

<210> 224

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 224

agcucuguaa caagagucug 20

<210> 225

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 225

cgugucaguc auuguagcuu 20

<210> 226

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 226

uccuggagga ccugugggca 20

<210> 227

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 227

gcugaagaag cccugcccac 20

<210> 228

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 228

cauccuccug gaggaccugu 20

<210> 229

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 229

ucauccuccu ggaggaccug 20

<210> 230

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 230

gcccugccca cagguccucc 20

<210> 231

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 231

cugcccacag guccuccagg 20

<210> 232

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 232

ucuucagguc auccuccugg 20

<210> 233

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 233

ugcucuucag gucauccucc 20

<210> 234

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 234

uguagcaaaa gaugcucuuc 20

<210> 235

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 235

uuuugcuaca ucuuugaaga 20

<210> 236

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 236

gucauagcuu gcaucauaga 20

<210> 237

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 237

ccaugcaguc cucaggaagu 20

<210> 238

<211> 20

<212> RNA

<213>

Equus caballus

<400> 238

uccaugcagu ccucaggaag 20

<210> 239

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 239

aagcuaugac ccacuuccug 20

<210> 240

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 240

aauguaucca ugcaguccuc 20

<210> 241

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 241

cccacuuccu gaggacugca 20

<210> 242

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 242

ggaugucuua gagguuucag 20

<210> 243

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 243

guucagcuug gaugucuuag 20

<210> 244

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 244

gcucuccuug aaguucagcu 20

<210> 245

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 245

gacauccaag cugaacuuca 20

<210> 246

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 246

gcugaacuuc aaggagagcg 20

<210> 247

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 247

cuucaaggag agcguggugc 20

<210> 248

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 248

caaggagagc guggugcugg 20

<210> 249

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 249

guggugcugg uggcagccaa 20

<210> 250

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 250

uggugcuggu ggcagccaac 20

<210> 251

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 251

cuucuucaga gucuucccgu 20

<210> 252

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 252

ggaagacucu gaagaagaga 20

<210> 253

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 253

aauggcuucc aggucaucau 20

<210> 254

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 254

guucaucacc aaugaugacc 20

<210> 255

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 255

uucuucugga ucauuggcaa 20

<210> 256

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 256

gguggуggga gauuugcaac 20

<210> 257

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 257

agucuuguug uagagguggu 20

<210> 258

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 258

aagucuuguu guagaggugg 20

<210> 259

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 259

ugaaagucuu guuguagagg 20

<210> 260

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 260

guuugaaagu cuuguuguag 20

<210> 261

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 261

acaugccaug ucaaucauug 20

<210> 262

<211> 20

<212> RNA

<213> Equus caballus

<400> 262

caugucaauc auuguggcug 20

<210> 263

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 263

gccauagcuu gcaucauaga 20

<210> 264

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 264

uccuucuaug augcaagcua 20

<210> 265

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 265

ggacaucuuu gacguuucag 20

<210> 266

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 266

gauguccaac uucaccuuca 20

<210> 267

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 267

ugucacccgg cucuccuuga 20

<210> 268

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 268

cuucaccuuc aaggagagcc 20

<210> 269

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 269

acguugcuga uacugucacc 20

<210> 270

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 270

guaucagcaa cgucaagcaa 20

<210> 271

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 271

uaucagcaac gucaagcaac 20

<210> 272

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 272

ggaagauucu gaagaagaga 20

<210> 273

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 273

cugcagguca ucuucaguga 20

<210> 274

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 274

accuuccaga ucauggguua 20

<210> 275

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 275

cuccuuaccu uccagaucau 20

<210> 276

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 276

uccauaaccc augaucugga 20

<210> 277

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 277

aacccaugau cuggaaggua 20

<210> 278

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 278

gacagcccag gucaaagguu 20

<210> 279

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 279

aucaggacag cccaggucaa 20

<210> 280

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 280

ugcuuccaaa ccuuugaccu 20

<210> 281

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 281

ugcucucauc aggacagccc 20

<210> 282

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 282

ugaagcugga ugcucucauc 20

<210> 283

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 283

gcugcugcga gauuugaagc 20

<210> 284

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 284

caucaacaag agcuucaggc 20

<210> 285

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 285

gcaggcagua ucacucauug 20

<210> 286

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 286

aguaucacuc auuguggcug 20

<210> 287

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 287

uuguggcugu ggagaagcug 20

<210> 288

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 288

aagguccacg ggaaagacac 20

<210> 289

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 289

agcuaccugu gucuuucccg 20

<210> 290

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 290

ccucauccug gaagguccac 20

<210> 291

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 291

uccucauccu ggaaggucca 20

<210> 292

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 292

gcucaugucc ucauccugga 20

<210> 293

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 293

cccguggacc uuccaggaug 20

<210> 294

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 294

aggugcucau guccucaucc 20

<210> 295

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 295

uucaaagaug aaggaaaaga 20

<210> 296

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 296

aguaccuucu ucaaagauga 20

<210> 297

<211> 20

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 297

uuuuccuuca ucuuugaaga 20

<210> 298

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 298

ucaccaguga aauuugacau 20

<210> 299

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 299

auggugguag uagcaaccaa 20

<210> 300

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 300

agccaaugau caguaccuca 20

<210> 301

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 301

cagagacaga ugaucaaugg 20

<210> 302

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 302

ugagacucca gaccuacgcc 20

<210> 303

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 303

uucaccagug aaauuugaca 20

<210> 304

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 304

uuuuagaaau caucaagccu 20

<210> 305

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 305

uauguaaugc agcagccgug 20

<210> 306

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 306

uggugguagu agcaaccaac 20

<210> 307

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 307

ggccaucgcc aaugacucag 20

<210> 308

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 308

augugaaaua caacuuuaug 20

<210> 309

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 309

gccauagcuu acaugauaga 20

<210> 310

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 310

agcuauggcc cacuccauga 20

<210> 311

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 311

aucugaaagu cagugauaga 20

<210> 312

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 312

agccgugagg uacugaucau 20

<210> 313

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 313

auucagagac agaugaucaa 20

<210> 314

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 314

ugaaagucag ugauagaggg 20

<210> 315

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 315

uggcaauaaa caaguuugga 20

<210> 316

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 316

gcacccaugu caaauuucac 20

<210> 317

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 317

uuccucugag ucauuggcga 20

<210> 318

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 318

aucgccaaug acucagagga 20

<210> 319

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 319

cucuucuucu gggaaacuca 20

<210> 320

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 320

aagcuaaaag gugcugaccu 20

<210> 321

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 321

cucgaauuau acuuugauug 20

<210> 322

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 322

uggaaaacca ggcguagguc 20

<210> 323

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 323

cttcttcaga accttcccgt 20

<210> 324

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 324

gttggtctca ctacctgtga 20

<210> 325

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 325

tccttctatc atgtaagcta 20

<210> 326

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 326

gatactggaa aaccaggcgt 20

<210> 327

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 327

taccttcaag gagagcatgg 20

<210> 328

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 328

agaccaacca gtgctgctga 20

<210> 329

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 329

tatctgaaag tcagtgatag 20

<210> 330

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 330

ggcaataaac aagtttggat 20

<210> 331

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 331

catcactgat gatgacctgg 20

<210> 332

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 332

gagataccca aaaccatcac 20

<210> 333

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 333

ttttgagatt cttagaatca 20

<210> 334

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 334

ttgccacaaa gcaagactac 20

<210> 335

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 335

tgaccttcag cagcactggt 20

<210> 336

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 336

ctttcagata ctggaaaacc 20

<210> 337

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 337

ccatgcagcc ttcatggagt 20

<210> 338

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 338

ggtaagcttg gatgttttag 20

<210> 339

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 339

ttacataatc tggatgaagc 20

<210> 340

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 340

ggctgctgca ttacataatc 20

<210> 341

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 341

acattgctca ggaagctaaa 20

<210> 342

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 342

gcttaccttc aaggagagca 20

<210> 343

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 343

tttgtggcaa taaacaagtt 20

<210> 344

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 344

ctccaggtca tcatcagtga 20

<210> 345

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 345

cacccagtag tcttgctttg 20

<210> 346

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 346

gagtttccca gaagaagagg 20

<210> 347

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 347

agttgtattt cacattgctc 20

<210> 348

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 348

ggtcatcatc agtgatggat 20

<210> 349

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 349

ttcaaacatg tctggaactt 20

<210> 350

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 350

ggtagtagca accaacggga 20

<210> 351

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 351

tccatgcagc cttcatggag 20

<210> 352

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 352

tcgaattata ctttgattga 20

<210> 353

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 353

ggaaggttct gaagaagaga 20

<210> 354

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 354

ttcaggtctt caaacatgtc 20

<210> 355

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 355

actactgggt gtgcttggca 20

<210> 356

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 356

aacatccaag cttaccttca 20

<210> 357

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 357

cgtgagtttc ccagaagaag 20

<210> 358

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 358

tttgattgag ggcgtcattc 20

<210> 359

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 359

atccatcact gatgatgacc 20

<210> 360

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 360

ttcccagaag aagaggaggt 20

<210> 361

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 361

gctctccttg aaggtaagct 20

<210> 362

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 362

actgggtgtg cttggcaggg 20

<210> 363

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 363

gggtgcttat aagtcatcaa 20

<210> 364

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 364

tgatcatctg tctctgaatc 20

<210> 365

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 365

ctgaagaact gttacaggta 20

<210> 366

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 366

aagacctgaa gaactgttac 20

<210> 367

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 367

taccaccatg ctctccttga 20

<210> 368

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 368

gcaagactac tgggtgtgct 20

<210> 369

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 369

attgatccat gcagccttca 20

<210> 370

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 370

caatgactca gaggaaggta 20

<210> 371

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 371

cttaccttcc tctgagtcat 20

<210> 372

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 372

tatcactgac tttcagatac 20

<210> 373

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 373

cccactccat gaaggctgca 20

<210> 374

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 374

ctcactacct gtgatggttt 20

<210> 375

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 375

tcactacctg tgatggtttt 20

<210> 376

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 376

cactggttgg tcttcatctt 20

<210> 377

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 377

cttacctgta acagttcttc 20

<210> 378

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 378

agtcattggc gatggcctcc 20

<210> 379

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 379

tgccacaaag caagactact 20

<210> 380

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 380

gactactggg tgtgcttggc 20

<210> 381

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 381

caactgacct tcagcagcac 20

<210> 382

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 382

ctactgggtg tgcttggcag 20

<210> 383

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 383

tactgggtgt gcttggcagg 20

<210> 384

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 384

gcactggttg gtcttcatct 20

<210> 385

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 385

gaccaacctc ctcttcttct 20

<210> 386

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 386

gtgatggttt tgggtatctc 20

<210> 387

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 387

agaccaacct cctcttcttc 20

<210> 388

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 388

cuucgacaca ugggauaacg 20

<210> 389

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 389

gugcaguuca gugaucguac 20

<210> 390

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 390

cauggccaca acaacugacg 20

<210> 391

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 391

gguggucgga gauucguagc 20

<210> 392

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 392

ggacucacag caaaaaagcu 20

<210> 393

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 393

accuaucuuc uucgacacau 20

<210> 394

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 394

aggugcugau guaccaguug 20

<210> 395

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 395

cuuaucaucu uucaacacgc 20

<210> 396

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 396

uccgaccacc acuacagcaa 20

<210> 397

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 397

guaauaagcc aucauuucac 20

<210> 398

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 398

gaggugcuga uguaccaguu 20

<210> 399

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 399

cugaaagcuc uccaccucca 20

<210> 400

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 400

aaccuaucuu cuucgacaca 20

<210> 401

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 401

uuuuuauuac aguggcaaug 20

<210> 402

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 402

uucuccaugu ccuuuguaca 20

<210> 403

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 403

aaguaaugac aaaauaccug 20

<210> 404

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 404

aacaugcccg ucuuccuggg 20

<210> 405

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 405

ggacaggaua uggagcaaca 20

<210> 406

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 406

uuaggaagac acaaauugca 20

<210> 407

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 407

gagcucaggu acuucugcca 20

<210> 408

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 408

uucuccuugu acaaaggaca 20

<210> 409

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 409

aucacugaac ugcacgcucc 20

<210> 410

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 410

ugaagggaaa gaaggugcuc 20

<210> 411

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 411

caucuuucaa cacgcaggac 20

<210> 412

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 412

cuccgaccac cacuacagca 20

<210> 413

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 413

ugauaagccc acucuacagc 20

<210> 414

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 414

gcaggccgcg ucaguuguug 20

<210> 415

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 415

uaagcccacu cuacagcugg 20

<210> 416

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 416

cuuaccucca gcuguagagu 20

<210> 417

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 417

gcuccauauc cugucccugg 20

<210> 418

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 418

uuucccuuca ucuuugaaga 20

<210> 419

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 419

gcccuugcug uagugguggu 20

<210> 420

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 420

gcuggaugcc gccauccaga 20

<210> 421

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 421

uuccugggag ggaccaaagg 20

<210> 422

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 422

acuuaccucc agcuguagag 20

<210> 423

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 423

uuguggccau ggacaagcug 20

<210> 424

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 424

gaaaacaugc ccgucuuccu 20

<210> 425

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 425

gggcauguuu ucugcuugag 20

<210> 426

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 426

uggugaaguc aguuauaucc 20

<210> 427

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 427

ucccaugugu cgaagaagau 20

<210> 428

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 428

ugaagcccuu gcuguagugg 20

<210> 429

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 429

ugagcucgcc agugaaauga 20

<210> 430

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 430

gaucacugaa cugcacgcuc 20

<210> 431

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 431

aucauuucac uggcgagcuc 20

<210> 432

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 432

uuggucccuc ccaggaagac 20

<210> 433

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 433

gaccucugcc cucuggaugg 20

<210> 434

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 434

acuaccuucu ucaaagauga 20

<210> 435

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 435

gugaaaugau ggcuuauuac 20

<210> 436

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 436

agcuuuuuug cugugagucc 20

<210> 437

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 437

acaugcccgu cuuccuggga 20

<210> 438

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 438

gguacagauu cuuuuccuug 20

<210> 439

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 439

agcuggaugc cgccauccag 20

<210> 440

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 440

agguccugga aggagcacug 20

<210> 441

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 441

agaggugcug auguaccagu 20

<210> 442

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 442

cuacagcaag ggcuucaggc 20

<210> 443

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 443

ugacaaaaua ccuguggccu 20

<210> 444

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 444

acugaaagcu cuccaccucc 20

<210> 445

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 445

acuuucuucu ccuuguacaa 20

<210> 446

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 446

cuaccuucuu caaagaugaa 20

<210> 447

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 447

ggacaagcug aggaagaugc 20

<210> 448

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 448

ugccgccauc cagagggcag 20

<210> 449

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 449

uggagagcuu ucaguucaua 20

<210> 450

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 450

gauguaccag uuggggaacu 20

<210> 451

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 451

uccuugaggc ccaaggccac 20

<210> 452

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 452

gcucagguca uucuccugga 20

<210> 453

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 453

agucuuaccu ucaucuguuu 20

<210> 454

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 454

caaaaaagcu uggugauguc 20

<210> 455

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 455

agaaaacaug cccgucuucc 20

<210> 456

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 456

auucuuuucc uugaggccca 20

<210> 457

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 457

caucuuccuc agcuugucca 20

<210> 458

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 458

guugcuccau auccuguccc 20

<210> 459

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 459

ucauucuccu ggaaggucug 20

<210> 460

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 460

cauucuccug gaaggucugu 20

<210> 461

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 461

cucuccgcag ugcuccuucc 20

<210> 462

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 462

ugauggcccu aaacagauga 20

<210> 463

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 463

aggugcucag gucauucucc 20

<210> 464

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 464

aaauuaccca aagaagaaga 20

<210> 465

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 465

uucaaagaug aagggaaaga 20

<210> 466

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 466

cuggaccucu gcccucugga 20

<210> 467

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 467

gauagaaauc aauaacaagc 20

<210> 468

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 468

accacuacag caagggcuuc 20

<210> 469

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 469

agucugccca guuccccaac 20

<210> 470

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 470

uccuggaagg ucugugggca 20

<210> 471

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 471

gucuuccugg gagggaccaa 20

<210> 472

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 472

ugauguacca guuggggaac 20

<210> 473

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 473

gucuuaccuu caucuguuua 20

<210> 474

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 474

accuguggcc uuggccuca 20

<210> 475

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 475

uuugguccu cccaggaaga 20

<210> 476

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 476

gccugaagcc cuugcuguag 20

<210> 477

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 477

gcagaggucc agguccugga 20

<210> 478

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 478

ccaccuccag ggacaggaua 20

<210> 479

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 479

agcucuccac cuccagggac 20

<210> 480

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 480

ucccugccca cagaccuucc 20

<210> 481

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 481

gcagugcucc uuccaggacc 20

<210> 482

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 482

ccauauccug ucccuggagg 20

<210> 483

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 483

gacaaaauac cuguggccuu 20

<210> 484

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 484

cuccuggaag gucugugggc 20

<210> 485

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 485

cgcgucaguu guuguggcca 20

<210> 486

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 486

aguuauaucc uggccgccuu 20

<210> 487

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 487

ggccgccuuu ggucccuccc 20

<210> 488

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 488

cauccagagg gcagaggucc 20

<210> 489

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 489

gagggcagag guccaggucc 20

<210> 490

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 490

gggagggacc aaaggcggcc 20

<210> 491

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 491

gacuuguucu uugaagcuga 20

<210> 492

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 492

cgcuuuucca ucuucuucuu 20

<210> 493

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 493

ggaccuggac cucugcccuc 20

<210> 494

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 494

cuucuucuuu ggguaauuuu 20

<210> 495

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 495

gcuuuuccau cuucuucuuu 20

<210> 496

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 496

uucuucuuug gguaauuuuu 20

<210> 497

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 497

gaaaugugaa ggugagacca 20

<210> 498

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 498

ugauggcccu ggaaauguga 20

<210> 499

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 499

ggucucaccu ucacauuucc 20

<210> 500

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 500

gucucaccuu cacauuucca 20

<210> 501

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 501

aaaugugaag gugagaccau 20

<210> 502

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 502

gaccuauucu uugaagcuga 20

<210> 503

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 503

uucuuugaag cugauggccc 20

<210> 504

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 504

ggccaucagc uucaaagaau 20

<210> 505

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 505

cgugucaguc auuguagcuu 20

<210> 506

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 506

acucuuguua cagagcuggu 20

<210> 507

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 507

ccucaucuac cagagaacug 20

<210> 508

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 508

agaccugaac cacaguucuc 20

<210> 509

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 509

gcuggugga gacuugcaac 20

<210> 510

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 510

cacaguucuc ugguagauga 20

<210> 511

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 511

aggucuuggc agcagcacug 20

<210> 512

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 512

ucagacucuu guuacagagc 20

<210> 513

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 513

agcucuguaa caagagucug 20

<210> 514

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 514

gagaacugug guucaggucu 20

<210> 515

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 515

gcagcacugu ggagagacca 20

<210> 516

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 516

ccacaguucu cugguagaug 20

<210> 517

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 517

cuaccagaga acugugguuc 20

<210> 518

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 518

cauccuccug gaggaccugu 20

<210> 519

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 519

gacucuuguu acagagcugg 20

<210> 520

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 520

uuuugcuaca ucuuugaaga 20

<210> 521

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 521

uguagcaaaa gaugcucuuc 20

<210> 522

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 522

uccuggagga ccugugggca 20

<210> 523

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 523

gcugaagaag cccugcccac 20

<210> 524

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 524

ugcucuucag gucauccucc 20

<210> 525

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 525

cuccuggagg accugugggc 20

<210> 526

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 526

cugcccacag guccuccagg 20

<210> 527

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 527

ucauccuccu ggaggaccug 20

<210> 528

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 528

ucuucagguc auccuccugg 20

<210> 529

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 529

gcccugccca cagguccucc 20

<210> 530

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 530

ugaugcagcc augcaaucgg 20

<210> 531

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 531

cuugcagucc accgauugca 20

<210> 532

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 532

aucgguggac ugcaaguuac 20

<210> 533

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 533

gugaacaaac aagguaacgg 20

<210> 534

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 534

cuucgggcuc uccaccucaa 20

<210> 535

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 535

ucgggcucuc caccucaaug 20

<210> 536

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 536

ggacauaagc cacaaauacc 20

<210> 537

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 537

uagacagcac cagguauuug 20

<210> 538

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 538

gagugaugca gccaugcaau 20

<210> 539

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 539

uucgggcucu ccaccucaau 20

<210> 540

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 540

ugugaacaaa caagguaacg 20

<210> 541

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 541

augugaacaa acaagguaac 20

<210> 542

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 542

ggggaaaaug ugaacaaaca 20

<210> 543

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 543

gucuaacuca uaugagcuuc 20

<210> 544

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 544

cauaugaguu agacagcacc 20

<210> 545

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 545

uguucacauu uuccccauug 20

<210> 546

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 546

ugucuaacuc auaugagcuu 20

<210> 547

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 547

agaugauagg uucugaaaug 20

<210> 548

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 548

gcaucuguuu ugcagaugau 20

<210> 549

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 549

ucacauuuuc cccauugagg 20

<210> 550

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 550

aaugugaaca aacaagguaa 20

<210> 551

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 551

uaucaucugc aaaacagaug 20

<210> 552

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 552

ugaccaucuc ucucugaauc 20

<210> 553

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 553

uuaccugauu cagagagaga 20

<210> 554

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 554

gacaucccag cuuaccuuca 20

<210> 555

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 555

gucacagcuc auaucauaga 20

<210> 556

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 556

augacacaga agaagguaag 20

<210> 557

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 557

cacuaccaca uuuuccuuga 20

<210> 558

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 558

aaugucuucc aggucaucau 20

<210> 559

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 559

ugguaguggu ggcagccaau 20

<210> 560

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 560

aucauagaag gauuucuaug 20

<210> 561

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 561

ggaugucuuu gagauuucag 20

<210> 562

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 562

cauuuuccuu gaagguaagc 20

<210> 563

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 563

auuuuccuug aagguaagcu 20

<210> 564

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 564

acaugcaguc cucaugaagu 20

<210> 565

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 565

ugucauuggc aaugucuucc 20

<210> 566

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 566

gugguagugg uggcagccaa 20

<210> 567

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 567

gagcugugac ccacuucaug 20

<210> 568

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 568

cuuaccuucu ucugugucau 20

<210> 569

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 569

uagaaggauu ucuaugagga 20

<210> 570

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 570

gcuuaccuuc aaggaaaaug 20

<210> 571

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 571

ggaagauucu aaagaagaga 20

<210> 572

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 572

auucaucacc gaugaugacc 20

<210> 573

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 573

cuucuuuaga aucuucccau 20

<210> 574

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 574

gacaugcagu ccucaugaag 20

<210> 575

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 575

auugccaaug acacagaaga 20

<210> 576

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 576

cuucaaggaa aaugugguag 20

<210> 577

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 577

caaggaaaau gugguagugg 20

<210> 578

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 578

aguauaguuc gacaaacagg 20

<210> 579

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 579

ucuguaaugc agcagucaug 20

<210> 580

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 580

uuacagaauu uggaugaugc 20

<210> 581

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 581

gucgaacuau acuuugauug 20

<210> 582

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 582

aaguuguaug cuacugaucu 20

<210> 583

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 583

caaaguauag uucgacaaac 20

<210> 584

<211> 20

<212> RNA

<

213> Canis familiaris

<400> 584

guugucauuc aggaugaauu 20

<210> 585

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 585

augaaaaaua caacuauaua 20

<210> 586

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 586

gaaguuguau gcuacugauc 20

<210> 587

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 587

gguugucauu caggaugaau 20

<210> 588

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 588

uuugauugag guugucauuc 20

<210> 589

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 589

aguuguauuu uucauuguua 20

<210> 590

<211> 20

<212> RNA

<213> Canis familiaris

<400> 590

gacugcugca uuacagaauu 20

<210> 591

<211> 813

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 591

atggccaaag ttcctgactt gtttgaagac ctaaagaact gttacagtga aaacgaagac 60

tacagttctg ccattgacca tctctctctg aatcagaaat ccttctatga tgcaagctat 120

ggctcacttc atgagacttg cacagatcag tttgtatctc tgagaacctc tgaaacgtca 180

aagatgtcca acttcacctt caaggagagc cgggtgacag tatcagcaac gtcaagcaac 240

gggaagattc tgaagaagag acggctgagt ttcagtgaga ccttcactga agatgacctg 300

cagtccataa cccatgatct ggaagagacc atccaaccca gatcagcacc ttacacctac 360

cagagtgatt tgagatacaa actgatgaag ctcgtcaggc agaagtttgt catgaatgat 420

tccctcaacc aaactatata tcaggatgtg gacaaacact atctcagcac cacttggtta 480

aatgacctgc aacaggaagt aaaatttgac atgtatgcct actcgtcggg aggagacgac 540

tctaaatatc ctgttactct aaaaatctca gattcacaac tgttcgtgag cgctcaagga 600

gaagaccagc ccgtgttgct gaaggagttg ccagaaacac caaaactcat cacaggtagt 660

gagaccgacc tcattttctt ctggaaaagt atcaactcta agaactactt cacatcagct 720

gcttatccag agctgtttat tgccaccaaa gaacaaagtc gggtgcacct ggcacgggga 780

ctgccctcta tgacagactt ccagatatca taa 813

<210> 592

<211> 816

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 592

atggccaaag ttccagacat gtttgaagac ctgaagaact gttacagtga aaatgaagaa 60

gacagttcct ccattgatca tctgtctctg aatcagaaat ccttctatca tgtaagctat 120

ggcccactcc atgaaggctg catggatcaa tctgtgtctc tgagtatctc tgaaacctct 180

aaaacatcca agcttacctt caaggagagc atggtggtag tagcaaccaa cgggaaggtt 240

ctgaagaaga gacggttgag tttaagccaa tccatcactg atgatgacct ggaggccatc 300

gccaatgact cagaggaaga aatcatcaag cctaggtcag cacctttag cttcctgagc 360

aatgtgaaat acaactttat gaggatcatc aaatacgaat tcatcctgaa tgacgccctc 420

aatcaaagta taattcgagc caatgatcag tacctcacgg ctgctgcatt acataatctg 480

gatgaagcag tgaaatttga catgggtgct tataagtcat caaaggatga tgctaaaatt 540

accgtgattc taagaatctc aaaaactcaa ttgtatgtga ctgcccaaga tgaagaccaa 600

ccagtgctgc tgaaggagat gcctgagata cccaaaacca tcacaggtag tgagaccaac 660

ctcctcttct tctgggaaac tcacggcact aagaactatt tcacatcagt tgcccatcca 720

aacttgttta ttgccacaaa gcaagactac tgggtgtgct tggcaggggg gccaccctct 780

atcactgact ttcagatact ggaaaaccag gcgtag 816

<210> 593

<211> 813

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 593

atggcgaaag tccctgacct ctttgaagac ctgaagaact gttacagtga aaatgaagac 60

tacagttctg aaattgacca tctctctctg actcagaaat ccttctatga tgcaagctat 120

gacccacttc ctgaggactg catggataca tttatgtctc tgagcacctc tgaaacctct 180

aagacatcca agctgaactt caaggagagc gtggtgctgg tggcagccaa cgggaagact 240

ctgaagaaga gacggttgag tttaaatcag ttcatcacca atgatgacct ggaagccatt 300

gccaatgatc cagaagaagg aatcatcaag ccccgatcag tacattacaa cttccagagc 360

aatacaaaat acaactttat gaggatcgtc aaccaccagt gtactctgaa tgatgccctc 420

aatcaaagtg taattcgaga cacatcaggt caatatcttg cgactgctgc attaaataat 480

ctggacgacg cagtgaaatt tgacatgggt gcttatacat cagaagagga ttctcaactt 540

cctgtgactc taagaatctc aaaaactcga ctgtttgtga gtgcccaaaa tgaagatgaa 600

cccgtactgc taaaggagat gcctgacaca cccaaaacta tcaaagatga gaccaacctc 660

ctcttcttct gggaacgtca cggctctaag aactacttca aatcggttgc ccatccaaag 720

ttgtttattg ccacaaagca gggaaaactg gtgcacatgg caaggggggca accctctatc 780

actgactttc agatattgga caaccagttt tga 813

<210> 594

<211> 813

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 594

atggccaaag ttcctgacct ctttgaagac ctgaagaact gttacagtga aaatgaagaa 60

tacagttctg aaattgacca tctcactctg aatcagaaat ccttctatga tgcaagctat 120

gacccacttc atgaggactg tacagataaa ttcatgtctc cgagtacttc tgaaacctct 180

aagacacccc agcttaccct caagaagagt gtggtgatgg tggcagccaa tgggaagatt 240

ctgaagaaga gacggttgag tttaaatcaa ttcctcactg ctgatgacct ggaagccatt 300

gccaacgaag tagaagaaga aatcatgaag cccagatcag tagcacccaa cttctatagc 360

agtgaaaaat acaactatca gaagatcatc aaatcccaat tcatcctgaa tgacaacctc 420

agtcaaagtg taattcgaaa agcaggggga aaatacctcg cagccgctgc attacagaat 480

ctggatgatg cagtgaaatt tgacatgggg gcttatacat caaaagaaga ttctaaactt 540

cctgtgactc tcagaatctc aaaaactcga ctgtttgtga gtgcccaaaa tgaagatgag 600

cctgtattgc taaaggagat gcctgagaca cccaaaacca tcagagatga gaccaacctt 660

ctcttcttct gggaacgtca tggcagtaag aactacttca aatcagttgc ccatccaaag 720

ttgttcattg ccacacagga agaacaactg gtgcacatgg caagaggact accctctgtc 780

actgactttc agatactgga aacccagtct tga 813

<210> 595

<211> 798

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 595

atggccaaag ttcctgacct ctttgaagac ctgaagaact gttacagtga aaatgaagaa 60

tacagttctg aaattgacca tctctctctg aatcagaaat ccttctatga tatgagctgt 120

gacccacttc atgaggactg catgtctctg agtacctctg aaatctcaaa gacatcccag 180

cttaccttca aggaaaatgt ggtagtggtg gcagccaatg ggaagattct aaagaagaga 240

cggttgagtt taagtcaatt catcaccgat gatgacctgg aagacattgc caatgacaca 300

gaagaagtaa tcatgaagcc cagatcagta gcatacaact tccataacaa tgaaaaatac 360

aactatataa ggatcatcaa atcccaattc atcctgaatg acaacctcaa tcaaagtata 420

gttcgacaaa caggaggaaa ttacctcatg actgctgcat tacagaattt ggatgatgca 480

gtgaagtttg acatgggagc ttacacatca gaagattcta aacttcctgt gactctaaga 540

atatcaaaaa ctcgactctt tgtgagtgcc caaaatgaag atgaacctgt attgctaaag 600

gagatgcctg agacacccaa aactatcaga gatgagacaa accttctttt cttttgggag 660

cgtcatggca gtaagcacta cttcaaatca gttgcccagc ccaagttgtt cattgccaca 720

caggaacgaa aactggtgca catggcaaga gggcaaccct ctatcactga ctttcggtta 780

ctggaaaccc agccttga 798

<210> 596

<211> 810

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 596

atggcaactg ttcctgaact caactgtgaa atgccacctt ttgacagtga tgagaatgac 60

ctgttctttg aagttgacgg accccaaaag atgaagggct gcttccaaac ctttgacctg 120

ggctgtcctg atgagagcat ccagcttcaa atctcgcagc agcacatcaa caagagcttc 180

aggcaggcag tatcactcat tgtggctgtg gagaagctgt ggcagctacc tgtgtctttc 240

ccgtggacct tccaggatga ggacatgagc accttctttt ccttcatctt tgaagaagag 300

cccatcctct gtgactcatg ggatgatgat gataacctgc tggtgtgtga cgttcccatt 360

agacaactgc actacaggct ccgagatgaa caacaaaaaa gcctcgtgct gtcggaccca 420

tatgagctga aagctctcca cctcaatgga cagaatatca accaacaagt gatattctcc 480

atgagctttg tacaaggaga accaagcaac gacaaaatac ctgtggcctt gggcctcaaa 540

ggaaagaatc tatacctgtc ctgtgtaatg aaagacggca cacccaccct gcagctggag 600

agtgtggatc ccaagcaata cccaaagaag aagatggaaa aacggtttgt cttcaacaag 660

atagaagtca agagcaaagt ggagtttgag tctgcagagt tccccaactg gtacatcagc 720

acctcacaag cagagcacaa gcctgtcttc ctgggaaaca acagtggtca ggacataatt 780

gacttcacca tggaatccgt gtcttcctaa 810

<210> 597

<211> 810

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 597

atggcagaag tacctgagct cgccagtgaa atgatggctt attacagtgg caatgaggat 60

gacttgttct ttgaagctga tggccctaaa cagatgaagt gctccttcca ggacctggac 120

ctctgccctc tggatggcgg catccagcta cgaatctccg accaccacta cagcaagggc 180

ttcaggcagg ccgcgtcagt tgttgtggcc atggacaagc tgaggaagat gctggttccc 240

tgcccacaga ccttccagga gaatgacctg agcaccttct ttcccttcat ctttgaagaa 300

gaacctatct tcttcgacac atgggataac gaggcttatg tgcacgatgc acctgtacga 360

tcactgaact gcacgctccg ggactcacag caaaaaagct tggtgatgtc tggtccatat 420

gaactgaaag ctctccacct ccagggacag gatatggagc aacaagtggt gttctccatg 480

tcctttgtac aaggagaaga aagtaatgac aaaatacctg tggccttggg cctcaaggaa 540

aagaatctgt acctgtcctg cgtgttgaaa gatgataagc ccactctaca gctggagagt 600

gtagatccca aaaattaccc aaagaagaag atggaaaagc gatttgtctt caacaagata 660

gaaatcaata acaagctgga atttgagtct gcccagttcc ccaactggta catcagcacc 720

tctcaagcag aaaacatgcc cgtcttcctg ggagggacca aaggcggcca ggatataact 780

gacttcacca tgcaatttgt gtcttcctaa 810

<210> 598

<211> 984

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 598

atgtttcctc tgcacccaaa ggaaggttct ttcatgcatt cactcattca tttaaagatt 60

gtttctttac atgcctgcca tgtaccaggt gctaagggaa actcacatat gaaggcagcc 120

ctgggggaga ctggcctggc aggaatcatt tattttctcc tctttacgca ggtttctaaa 180

gcagccatgg cagcagtacc cgaactcacc agtgaaatga tggcttactc cagtaacaat 240

gagaatgacc tattctttga agctgatggc cctggaaatg tgaagtgctg ctgccaagac 300

ctgaaccaca gttctctggt agatgagggc atccagttgc aagtctccca ccagctctgt 360

aacaagagtc tgaggcattt cgtgtcagtc attgtagctt tggagaagct gaagaagccc 420

tgcccacagg tcctccagga ggatgacctg aagagcatct tttgctacat ctttgaagaa 480

gaacctatca tctgcaaaac agatgcggat aattttatga gtgatgcagc catgcaatcg 540

gtggactgca agttacagga cataagccac aaatacctgg tgctgtctaa ctcatatgag 600

cttcgggctc tccacctcaa tggggaaaat gtgaacaaac aagtggtgtt ccacatgagc 660

tttgtgcacg gggatgaaag taataacaag atacctgtgg tcttgggcat caaacaaaag 720

aatctgtacc tgtcctgtgt gatgaaggat ggaaagccca ccctacagct agagaaggta 780

gaccccaaag tctacccaaa gaggaagatg gaaaagcgat ttgtcttcaa caagatagaa 840

atcaagaaca cagtggaatt tgagtcttct cagtacccta actggtacat cagcacctct 900

caagtcgaag gaatgcctgt cttcctagga aataccagag gtggccagga tataactgac 960

ttcaccatgg aattctcttc ctag 984

<210> 599

<211> 909

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 599

atgagattga aattggcaga gagcagatct ctcgaggcac agcagcccac tccgggattc 60

tattctctcc agtcagtctt cattactcag gtttctgaag tggccatggc agcagtacct 120

gaactcacca gtgaaatgat ggcttactac agtgatgaga atgacctgtt ctttgaggct 180

gatggccccg aaaagatgaa gggcagcctc caaaacctga gccacagttt tctgggagat 240

gagggcatcc agttgcaaat ctcccaccag cccgacaaca agagtcttag gcatgccgtg 300

tcggtcattg tggccatgga gaaactgaag aagatatctt ttccctgctc acaacccctc 360

caggatgagg acctgaagag cctcttttgc tgcatctttg aagaagaacc catcatctgt 420

gacacgtggg atgacggttt tgtgtgtgat gcggccatac aatcacagga ctacacgttc 480

cgagacataa gccaaaagag cctggtgctg tctggctcat acgagcttcg ggctctccac 540

ctcaatggac agaatatgaa ccaacaagtg gtgttccgca tgagctttgt gcacggggag 600

gaaaatagta agaagatacc agtagtgttg tgcatcaaga aaaataacct gtacctgtcc 660

tgtgtgatga aagatgggaa acccacccta cagctggaga tgttagaccc caaagtttac 720

ccaaagaaga agatggaaaa gagatttgtc ttcaacaaga cagaaatcaa gggcaatgtg 780

gaatttgagt cttcccagtt ccccaactgg tacatcagca cctctcaagc agaagaaatg 840

cctgtcttcc taggaaatac caaaggtggt caggatataa ctgacttcat catggaaagc 900

gcttcctaa 909

<210> 600

<211> 807

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 600

atggcagcag tacccgacac cagtgacatg atgacttact gcagcggcaa tgagaatgac 60

ctgttctttg aggaggatgg cccaaaacag atgaagggca gcttccaaga cctggacctc 120

agctccatgg gcgatggggg catccagctt caattctccc accaacttta caacaagact 180

ttcaagcatg tcgtgtcaat cattgtggct atggagaagc tgaagaagat acccgttccc 240

tgctcacagg ccttccagga tgatgacttg aggagcctct tttctgtcat ctttgaagaa 300

gaacccatca tctgtgacaa ctgggatgat gattatgtgt gtgatgcagc tgtgcattca 360

gtgaactgca gactccggga catataccat aaatccctgg tgctgtccgg tgcatgtgag 420

ctgcaggctg tccacctcaa tggagagaat acaaaccaac aagtggtgtt ctgcatgagc 480

tttgtgcaag gagaagaaga gactgacaag atacctgtgg ccttgggcct caaggaaaag 540

aacctgtacc tgtcttgtgg gatgaaagat gggaagccca ccctacagct ggagacagta 600

gaccccaata cttacccaaa gaggaaaatg gaaaagcgat ttgtcttcaa caagatggaa 660

atcaagggca acgtggaatt tgagtctgca atgtacccca actggtacat cagcacctct 720

caagcagaaa aaaagcctgt cttcctagga aataccagag gcggccggga cataactgac 780

ttcatcatgg aaatcacctc tgcctaa 807

<210> 601

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 601

tacctgattc agagacagat gatcaaatgg aggaactgtc ttcttcattt tca 53

<210> 602

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 602

atggagtggg ccatagctta catgattaga aggatttctg tgaggaagga aaa 53

<210> 603

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 603

catttcagaa cctatcttct tcgacatggg ataacgaggc ttatgtgcac 50

<210> 604

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 604

tcccggagcg tgcagttcag tgatctacag gtgcatcgtg cacataagcc t 51

<210> 605

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 605

ctttgaagct gatggcccta aacagaatga aggtaagact atgggtttaa ctc 53

<210> 606

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 606

tgctgtagtg gtggtcggag attcgttagc tggatgccgc catccagagg gca 53

<210> 607

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 607

catttcagaa cctatcttct tcgacaacat gggataacga ggcttatgtg cac 53

<210> 608

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 608

acctatcttc ttcgacacat gggataaacg aggcttatgt gcacgatgca cct 53

<210> 609

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 609

tcccggagcg tgcagttcag tgatcgttac aggtgcatcg tgcacataag cct 53

<210> 610

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 610

ttctgaaatt gaccatctct ctctgaaatc aggtaagtaa atgactgcaa ttc 53

<210> 611

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 611

aatctcaaag acatcccagc ttacctttca aggaaaatgt ggtagtggtg gca 53

<210> 612

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 612

ctcaatcaaa gtatagttcg acaaaccagg aggaaattac ctcatgactg ctg 53

<210> 613

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 613

catccaaatt ctgtaatgca gcagtccatg aggtaatttc ctcctgtttg tcg 53

<210> 614

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 614

cagagacaga tgatcaatgg 20

<210> 615

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 615

tgatggccct aaacagatga 20

<210> 616

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 616

ctttgaagct gatggccctg gaaatgttga aggtgagacc atgggcttag ctc 53

<210> 617

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 617

atgcctcaga ctcttgttac agagcttggt gggagacttg caactggatg ccc 53

<210> 618

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 618

ctttgaagct gatggccctg gaaatgaagg tgagaccatg ggcttagctc 50

<210> 619

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 619

ggtggtcgga gattcgtagc 20

<210> 620

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 620

cattgggagg atgcttagga 20

<210> 621

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 621

ggctgctttc tctccaacag 20

<210> 622

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 622

aggaagcctg tgtctggttg 20

<210> 623

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 623

tggcatcgtg agataagctg 20

<210> 624

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 624

tggtttcagg aaaacccaag 20

<210> 625

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 625

gcagtatggc caagaaagga 20

<210> 626

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 626

ctgggcaaga acattggatt 20

<210> 627

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 627

tgaccatctc tctctgaatc 20

<210> 628

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 628

agtatagttc gacaaacagg 20

<210> 629

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 629

tctgtaatgc agcagtcatg 20

<210> 630

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 630

tgatggccct ggaaatgtga 20

<210> 631

<211> 20

<212> DNA

<

213> Canis familiaris

<400> 631

actcttgtta cagagctggt 20

<210> 632

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 632

gacctctgcc ctctggatgg 20

<210> 633

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 633

ctctccgcag tgctccttcc 20

<210> 634

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 634

cattctcctg gaaggtctgt 20

<210> 635

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 635

agctggatgc cgccatccag 20

<210> 636

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 636

accactacag caagggcttc 20

<210> 637

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 637

catggccaca acaactgacg 20

<210> 638

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 638

attcagagac agatgatcaa 20

<210> 639

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 639

ctacagcaag ggcttcaggc 20

<210> 640

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 640

acttttgttt cagagctggt 20

<210> 641

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 641

cctcatgcta cagagctggt 20

<210> 642

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 642

gtgcttgtta cagagctggt 20

<210> 643

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 643

ttacctgagt cagagagaga 20

<210> 644

<211> 20

<

212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 644

agacctgaac cacagttctc 20

<210> 645

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 645

gtagtaagcc atcatttcac 20

<210> 646

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 646

gagtcttagg catgccgtgt 20

<210> 647

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 647

aaacctgagc cacagttttc 20

<210> 648

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 648

atcatttcac tggtgagttc 20

<210> 649

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 649

cattttcctt gaaggtaagc 20

<210> 650

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 650

actcttgttg tcgggctggt 20

<210> 651

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 651

gactcttgtt gtcgggctgg 20

<210> 652

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 652

cctcatctcc cagaaaactg 20

<210> 653

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 653

tgagaatgac ctgttctttg 20

<210> 654

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 654

taagactctt gttgtcgggc 20

<210> 655

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 655

cactaccaca ttttccttga 20

<210> 656

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 656

ggtaagctgg ggtgtcttag 20

<210> 657

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 657

attcctcact gctgatgacc 20

<210> 658

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 658

tggtgatggt ggcagccaat 20

<210> 659

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 659

cttccaggtc atcagcagtg 20

<210> 660

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 660

tgaaagtctt gttgtaaagt 20

<210> 661

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 661

gacctcagct ccatgggcga 20

<210> 662

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 662

ctggatgccc ccatcgccca 20

<210> 663

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 663

ccccatcgcc catggagctg 20

<210> 664

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 664

aagtcttgtt gtaaagttgg 20

<210> 665

<211> 20

<212> DNA

<213> Felis catus

<400> 665

aacctgagcc acagttttct 20

<210> 666

<211> 1434

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 666

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25 30

Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu
35 40 45

Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr
50 55 60

Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His
65 70 75 80

Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu
85 90 95

Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr
100 105 110

Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu
115 120 125

Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe
130 135 140

Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn
145 150 155 160

Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His
165 170 175

Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu
180 185 190

Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu
195 200 205

Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe
210 215 220

Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile

225 230 235 240

Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser

245 250 255

Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys

260 265 270

Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr

275 280 285

Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln

290 295 300

Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln

305 310 315 320

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

325 330 335

Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr

340 345 350

Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His

355 360 365

Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu

420 425 430

Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser

435 440 445

Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg

450 455 460

Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu

465 470 475 480

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

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

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

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

725 730 735

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

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

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

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

Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val
980 985 990

Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp
995 1000 1005
Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His
1010 1015 1020
Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr
1025 1030 1035 1040
Pro Ala Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp
1045 1050 1055

Val Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr
1060 1065 1070
Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu
1075 1080 1085
Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Ala Pro Leu Ile Glu Thr
1090 1095 1100
Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala
1105 1110 1115 1120

Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys
1125 1130 1135
Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1140 1145 1150
Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys
1155 1160 1165
Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val
1170 1175 1180

Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys
1185 1190 1195 1200
Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn
1205 1210 1215
Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp

1220 1225 1230

Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly

1235 1240 1245

Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu

1250 1255 1260

Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His

1265 1270 1275 1280

Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu

1285 1290 1295

Phe Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile

1300 1305 1310

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

1315 1320 1325

Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln

1330 1335 1340

Ala Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro

1345 1350 1355 1360

Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr

1365 1370 1375

Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr

1380 1385 1390

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Lys

1395 1400 1405

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

1410 1415 1420

Ala Ala Leu Glu His His His His His His

1425 1430