



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0062225
(43) 공개일자 2023년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0147255
(22) 출원일자 2021년10월29일
심사청구일자 2021년10월29일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
차홍원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 310동 312호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
성영훈
서울특별시 강북구 도봉로 157(미아동, 두원프라자) 808호
백인정
서울특별시 은평구 은평터널로 65, 108동 103호(수색동, 대림한숲타운아파트)
(74) 대리인
이명진

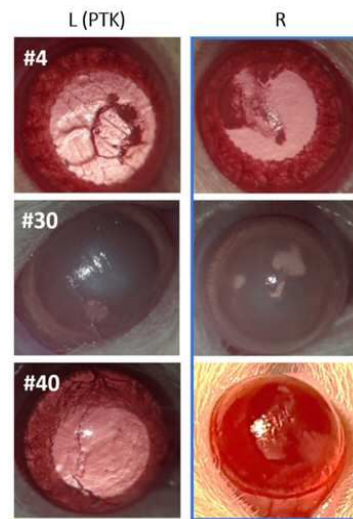
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 아벨리노 각막이상증 동물 모델 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 CRISPR-Cas9 시스템을 이용해 제조한 아벨리노 각막이상증 동물 모델 및 이의 제조 방법 등에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 아벨리노 각막이상증 동물 모델은 유전자 가위를 사용해 특이적으로 표적하는 서열을 제거하고 돌연변이 서열을 삽입할 수 있으므로 돌연변이 생성이 안정적으로 나타날 수 있다. 또한, 후천적인 요인이 아닌 배아 단계에서 유전자 조작을 통해 선천적인 동물 모델을 제조할 수 있어, 다른 요인에 영향을 받지 않고 균일하게 아벨리노 각막이상증 증상을 나타내는 동물 모델을 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0306 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711116582
과제번호	2015K1A4A3046807
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수기관유치(R&D)
연구과제명	아산-미네소타 이식 이노베이션 센터
기 여 율	100/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2015.09.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)을 히스티딘(histidine)으로 치환하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 아벨리노 각막이상증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 돌연변이를 유도하는 단계는 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 돌연변이를 유도하는 단계는 하기 단계 i) 내지 iii)의 단계를 통해 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법:

- i) TGFBI 유전자를 인식하는 sgRNA (single guide RNA) 및 ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotide)를 생성하는 단계;
- ii) 동물 모델 배아 내로 상기 sgRNA, ssODN, 및 Cas9 mRNA를 주입하는 단계; 및
- iii) 배아를 대리모에 이식하는 단계.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 동물은 인간을 제외한 포유 동물인 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 포유 동물은 랫드(rat)인 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 6

서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)이 히스티딘(histidine)으로 치환된 아벨리노 각막이상증 동물 모델.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)이 히스티딘(histidine)으로 치환되는 것은 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는, 동물 모델.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 동물은 인간을 제외한 포유 동물인 것을 특징으로 하는, 동물 모델.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 포유 동물은 랫드(rat)인 것을 특징으로 하는, 동물 모델.

청구항 10

i) 제6항 내지 제9항 중 어느 한 항의 아벨리노 각막이상증 동물 모델에 피검 물질을 처리하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 처리된 동물 모델을 무처리 대조군과 비교하여 아벨리노 각막이상증 증상의 개선 여부를 확인하는 단계를 포함하는 아벨리노 각막이상증의 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CRISPR-Cas9 시스템을 이용해 제조한 아벨리노 각막이상증 동물 모델 및 이의 제조 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 각막이상증(corneal dystrophy)은 각막 중심에 혼탁이 발생하여 노화에 따라 혼탁이 심해져 시력이 감소하는 상염색체 우성 유전질환의 하나이다. 이러한 각막이상증에서 가장 관심받고 있는 TGFBI 유전자 (Human transforming growth factor b-induced gene)는 1997년 Munier 등에 의해 사람의 5번 염색체의 장완 31번 밴드에 자리잡고 있는 것으로 확인된 바 있으며 비정상적인 단백질(keratoepithelin)을 코딩하는 17개의 엑손을 포함하고 있다. 이들 TGFBI 유전자는 최근 여러 가지 변형들이 보고되고 있지만 일반적으로 아벨리노 각막이상증, 라이스-뷔클러 각막이상증, 격자각막이상증, 과립각막이상증, Thiel-Behnke 각막이상증의 5가지 각막이상증과 연관된 것으로 알려져 있다.

[0004] 아벨리노 각막이상증(Avellino corneal dystrophy, granular corneal dystrophy type II, 과립형 각막이상증 제 2형)은 각막 기질층에 주로 발병하며, TGFBI-R124H 돌연변이로 각막에 불투명한 층이 형성되어 각막을 손상시킴으로써 시력을 저하시키거나 실명하게 만드는 질환이다. 아벨리노 각막이상증 환자는 연령이 증가함에 따라 이형접합체 (heterozygote)의 경우 시력의 상당한 손실을 보이고, 동형접합체(homozygote)의 경우에는 어릴 때부터 각막이상증이 발병해 성인이 되기 전 실명하는 것으로 알려져 있다. 대한민국의 경우 870명 중 1명 꼴로 유병율을 보이며 약 57,000명의 환자가 있을 것으로 추정된다.

[0005] 한편, 아벨리노 각막이상증에 대한 증상 개선을 위해 다양한 치료 방법이 연구되고 있어, 이러한 연구의 임상적 증상 개선 효과의 확인 등을 위해, 동물 모델의 제작이 필수적으로 요구되고 있다.

[0006] 동물 모델의 제조 과정에 있어서, 실험 동물을 목표로 하는 질병의 원인이 되는 환경에 노출시키거나 화합물을 투여함을 통해 질병이 유발된 동물 모델을 제조할 수 있는 방법이 다양한 질병 모델에 있어서 사용되고 있다. 그러나, 이러한 경우 동물 모델에서는 후천적으로 질병이 유발됨에 따른 합병증 및 개체별 차이가 크게 영향을

미칠 수 있으므로, 유전정보를 조절함을 통해 선천적으로 목표로 하는 질병이 유발되도록 유도된 동물 모델을 제조하는 방법이 주목받고 있다.

[0007] 이와 관련하여, 유전자의 결손, 삽입 또는 과발현을 유도하여 생명체의 유전정보를 자유롭게 교정할 수 있는 유전체 교정 기술은 그 활용범위가 획기적으로 확장되고 있으며, 이 중 유전자 가위는 원하는 유전정보만을 특이적으로 자를 수 있도록 설계되어 만들어진 분자 도구로, 유전체 교정 기술에서 핵심 역할을 하고 있다.

[0008] 최근 3세대 유전자 가위인 CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 유전체 편집(genome editing)이 생명공학 분야에서 새로운 혁신을 가져오고 있다. CRISPR-Cas9 시스템은 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질과 guide RNA의 결합을 통해 표적 유전자를 효과적으로 절단하여 DNA 이중가닥 절단(double strand breaks, DSBs)을 일으킨다. 이중가닥 절단이 형성되면, 잘린 DNA는 크게 비상동성 말단 접합(non-homologous end joining, NHEJ) 또는 상동재조합수선(homology-directed repair, HDR)의 두 가지 경로에 의해 수선되는데, 이 때 표적 특이적인 돌연변이 및 유전자 변형이 일어나게 된다. 이와 같은 CRISPR-Cas9 시스템에 기반하여 표적화된 유전자 조절이 가능하다

[0009] 이에, 본 발명자들은 이러한 유전자 가위 기술을 통해 돌연변이 유전자가 삽입된 동물 모델을 제조하기 위해 노력한 결과, CRISPR-Cas9 시스템을 이용해 TGFBI 단백질의 124번째 아르기닌을 히스티딘으로 치환한 TGFBI-R124H 돌연변이 랫드를 제조하였다. 상기 랫드는 아벨리노 각막이상증의 병변인 각막 혼탁을 유의적으로 나타내는바, 아벨리노 각막이상증의 동물 모델로서 사용할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0093841호.

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Sung et al. Genome Res. 2014 Jan;24(1):125-31.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)을 히스티딘(histidine)으로 치환하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 아벨리노 각막이상증 동물 모델의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 또한, 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)이 히스티딘(histidine)으로 치환된 아벨리노 각막이상증 동물 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 동물 모델을 이용한 아벨리노 각막이상증의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단

(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)을 히스티딘(histidine)으로 치환하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 아벨리노 각막이상증 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 돌연변이를 유도하는 단계는 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 유도될 수 있으며, 구체적으로, i) TGFBI 유전자를 인식하는 sgRNA(single guide RNA) 및 ssODN(single-stranded oligodeoxynucleotide)를 생성하는 단계; ii) 동물 모델 배아 내로 상기 sgRNA, ssODN, 및 Cas9 mRNA를 주입하는 단계; 및 iii) 배아를 대리모에 이식하는 단계를 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 동물은 인간을 제외한 포유 동물일 수 있으며, 상기 포유 동물은 바람직하게는 랫드일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)이 히스티딘(histidine)으로 치환된 아벨리노 각막이상증 동물 모델을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열의 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)이 히스티딘(histidine)으로 치환되는 것은 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 유도될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 동물은 인간을 제외한 포유 동물일 수 있으며, 상기 포유 동물은 바람직하게는 랫드일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 하기 단계 i) 및 ii)를 포함하는, 아벨리노 각막이상증의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다: i) 본 발명에 따른 아벨리노 각막이상증 동물 모델에 피검 물질을 처리하는 단계; 및 ii) 상기 단계 i)에서 처리된 동물 모델을 대조군과 비교하여 아벨리노 각막이상증 증상의 개선 여부를 확인하는 단계.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 아벨리노 각막이상증 동물 모델은 유전자 가위를 사용해 특이적으로 표적하는 서열을 제거하고 돌연변이 서열을 삽입할 수 있으므로 돌연변이 생성이 안정적으로 나타날 수 있다. 또한, 후천적인 요인이 아닌 배아 단계에서 유전자 조작을 통해 선천적인 동물 모델을 제조할 수 있어, 다른 요인에 영향을 받지 않고 균일하게 아벨리노 각막이상증 증상을 나타내는 동물 모델을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 인간(Human)과 랫드(Rat)의 TGFBI 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 유전체 편집이 가능한 4개의 타겟 DNA 서열을 선별하여 Snapgene software를 통해 나타낸 도면이다 (점선 박스: 타겟 DNA 서열, 빨간색 화살표: homology arm).

도 3은 야생형 랫드(WT)의 TGFBI 단백질 및 TGFBI-R124H 돌연변이 단백질의 아미노산 서열 및 이의 염기 서열을 나타낸 도면이다.

도 4는 야생형 랫드 및 TGFBI-R124H 돌연변이 랫드의 염기 서열과 TGFBI-R124H 돌연변이를 통해 새롭게 포함된 restriction enzyme site를 나타낸 도면이다.

도 5은 F1 개체의 유전형 분석을 위하여 genotyping PCR을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 genotyping PCR 수행 결과, 돌연변이 밴드가 확인된 F1 랫드 #1, 2, 9, 10, 13, 15 개체에 대해 서열 분석을 실시한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 N2F1 개체에 대한 유전형 분석을 실시한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 43주령의 F1 개체의 각막을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 아벨리노 각막이상증의 발현이 확인된 생후 9주차의 이형접합체 N2개체 중 #4, #30, 및 #40의 각막을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 N2 #40 개체의 좌안에 치료레이저각막절제술(PTK, Phototherapeutic keratectomy)을 실시한 뒤 각막을

관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 N2 #40 개체의 좌안에 PTK를 실시한 뒤 3주 후(생후 12주차) 각막을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 N2 #30 개체의 좌안에 PTK를 실시한 뒤 각막 조직을 조직화학분석으로 관찰한 결과를 나타낸 도면이다 (H&E 염색: 빨간색-세포질/Masson Trichrome 염색: 파란색-콜라겐/Congo Red 염색: 갈색-핵, 이하 동일).

도 13은 N2 #40 개체의 좌안에 PTK를 실시한 뒤 3주 후 각막 조직을 조직화학분석으로 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 생후 8주차의 N2F1 개체 중 이형접합체인 #93 및 #139 개체의 각막을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 15는 생후 40주차의 N2F1 개체 중 이형접합체인 #93 및 #139 개체와 동형접합체인 #146, #170, #178, 및 #190 개체의 각막을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명은 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)을 히스티딘(histidine)으로 치환하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 아벨리노 각막이상증 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된, 아벨리노 각막이상증 동물 모델을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어 “동물 모델”이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 의미한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환 모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환 모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환 모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내며, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 “TGFBI(Transforming Growth Factor Beta Induced)”는 분비 신호 및 인테그린의 리간드 인식 부위로서 작용하는 Arg-Gly-Asp(RGD) 모티브를 포함하는 683개의 아미노산으로 구성된 단백질을 인코딩하는 유전자로, 이 유전자에 변이가 생겨 변이 TGFBI 단백질이 생성되는 경우 변이의 종류에 따라 다양한 유형의 각막이상증을 유발한다. 본 발명에 있어서, TGFBI 단백질은 서열번호 1로 나타내는 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열은 서열번호 2의 염기 서열에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명에서 “TGFBI-R124H”는 서열번호 1로 나타내는 TGFBI 단백질의 아미노산 서열에서 N-말단(terminus)으로부터 124번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)이 히스티딘(histidine)으로 치환된 돌연변이를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 TGFBI-R124H 돌연변이를 얻기 위하여 TGFBI 유전자에서 아르기닌을 암호화하는 코돈인 CGC를 히스티딘을 암호화하는 코돈인 CAC로 치환할 수 있으나, 히스티딘을 암호화하는 코돈이라면 제한되지 않고 치환할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 돌연변이를 유도하는 단계는 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 유도되는 것이 바람직하며, 보다 구체적으로, 하기 단계 i) 내지 iii)의 단계를 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0035] i) TGFBI 유전자를 인식하는 sgRNA(single guide RNA) 및 ssODN(single-stranded oligodeoxynucleotide)를 생성하는 단계;
- [0036] ii) 동물 모델 배아 내로 상기 sgRNA, ssODN, 및 Cas9 mRNA를 주입하는 단계; 및
- [0037] iii) 배아를 대리모에 이식하는 단계.
- [0038] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 ii) 단계에서 NHEJ를 억제하는 scr7 pyrazine(2,3-Dihydro-6,7-diphenyl-2-thioxo-4(1H)-pteridinone)을 동물 모델 배아 내로 함께 주입함으로써 상동재조합수선의 효율을 증가시킬 수 있으며, 동물 모델 배아 내로 상기 sgRNA, ssODN, 및 Cas9 mRNA를 주입하는 것은 마이크로인젝션(microinjection)에 의해 주입되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어 “CRISPR-Cas9” 또는 “CRISPR-Cas9 시스템”은, 크리스퍼(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 유전자 가위라 불리는 유전체 편집 방법으로, 특정한 유전체 좌위에서 간편하고 쉽게 돌연변이를 유도할 수 있으며, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA(gRNA

A)와 특정한 염기서열을 자르는 가위 역할인 Cas9 단백질로 구성된다. CRISPR-Cas9 시스템에 의해 double strand break (DSB)가 생성되면, 상동재조합수선(HDR) pathway를 통해 DNA 파손을 복구할 수 있으며, 외인성 donor DNA 템플릿을 gRNA 및 Cas9 단백질과 함께 도입할 경우, 타겟 게놈 DNA 서열을 donor 서열로 대체함으로써 타겟 부위에서 donor DNA 서열의 point mutation 또는 knock-in과 같은 정확한 서열 변경을 생성할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 용어 “가이드 RNA(guide RNA, gRNA)”는 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 서열을 포함하는 RNA로서, Cas9 단백질과 복합체를 형성할 수 있으며, 타겟 염기 서열에 특이적인 crRNA(CRISPR RNA) 및 Cas9 뉴클레아제와 상호 작용하는 tracrRNA(transactivating crRNA)로 이루어져 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분이 융합된 형태인 단일-사슬 가이드 RNA (single-chain guide RNA; sgRNA) 형태일 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 crRNA가 결합하는 타겟 염기 서열은 서열번호 2로 나타내는 염기 서열의 5' 말단에서 3' 말단 방향을 기준으로 하여 349번 내지 396번, 349번 내지 387번, 349번 내지 375번, 349번 내지 372번, 349번 내지 369번, 349번 내지 363번, 352번 내지 396번, 352번 내지 387번, 352번 내지 375번, 352번 내지 372번, 352번 내지 369번, 352번 내지 363번, 364번 내지 396번, 364번 내지 387번, 373번 내지 396번, 358번 내지 396번, 358번 내지 387번, 358번 내지 384번의 연속하는 염기 서열 부위일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 또한, 상기 crRNA가 결합하는 타겟 염기 서열은 15 내지 50 bp, 15 내지 48 bp, 15 내지 45 bp, 15 내지 40 bp, 15 내지 35 bp, 15 내지 30 bp, 15 내지 25 bp, 15 내지 21 bp, 17 내지 50 bp, 17 내지 48 bp, 17 내지 45 bp, 17 내지 40 bp, 17 내지 35 bp, 17 내지 30 bp, 17 내지 25 bp, 17 내지 21 bp, 19 내지 50 bp, 19 내지 48 bp, 19 내지 45 bp, 19 내지 40 bp, 19 내지 35 bp, 19 내지 30 bp, 19 내지 25 bp, 19 내지 21 bp, 21 내지 25 bp, 21 내지 30 bp, 21 내지 35 bp, 21 내지 40 bp, 21 내지 45 bp, 21 내지 48 bp의 크기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 crRNA가 결합하는 타겟 염기 서열은 protospacer와 PAM (protospacer adjacent motif)을 포함한 형태일 수 있으며, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 나타내는 염기 서열을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6로 나타내는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 또는 서열번호 6으로 나타내는 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 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%, 99%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어 “ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotide, 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드)”은 상동재조합수선(HDR)을 이용한 point mutation 또는 knock-in에 사용되는 HDR 템플릿으로 한가닥의 DNA로 구성되어 있는 donor 서열을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 15로 나타내는 ssODN을 이용하여 야생형 랫드 TGFBI 염기 서열에 있던 restriction enzyme site를 새로운 것으로 교체하여 TGFBI-R124H의 유전형 분석(Genotyping)에 다양한 genotyping protocol을 적용할 수 있도록 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 ssODN는 서열번호 15로 나타내는 염기 서열일 수 있으며, 서열번호 15의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 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%, 99%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, 아벨리노 각막이상증 동물 모델은 인간을 제외한 포유 동물일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 포유 동물은 랫드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 성체 랫드는 성체 마우스의 8 내지 10배의 크기로 마우스에 비해 안과적 시술의 시험이 용이하며, 마우스에 비해 지능이 높아 인지능력을 기반으로 하는 표현형의 분석이 필요한 안과 질병 모델로서 활용도가 높다.

[0047] 또한, 본 발명은 i) 본 발명에 따른 아벨리노 각막이상증 동물 모델에 피검 물질을 처리하는 단계; 및

[0048] ii) 상기 단계 i)에서 처리된 동물 모델을 무처리 대조군과 비교하여 아벨리노 각막이상증 증상의 개선 여부를

확인하는 단계를 포함하는 아벨리노 각막이상증의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 대조군은, 무처리 대조군으로 피검 물질을 처리하지 않은 아벨리노 각막이상증 동물 모델 또는 정상 대조군으로 TGFBI 유전자의 돌연변이가 유도되지 않은 정상 랫드를 대조군으로 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 단계 ii)의 아벨리노 각막이상증 증상의 개선은 각막 혼탁의 개선을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0055] 실시예 1. TGFBI-R124H 랫드 제작을 위한 준비

[0056] 도 1에 나타낸 바와 같이, 인간과 랫드의 TGFBI(transforming growth factor beta induced) 단백질 아미노산 서열을 비교하였을 때, 124번째에 있는 아르기닌(Arg, R)의 upstream에 위치한 112번째 아미노산이 다른 것 이외에 TGFBI 단백질 아미노산 서열은 매우 잘 보존되어 있는바, CRISPR-Cas9 시스템과 상동재조합수선(homology-directed repair, HDR)을 이용하여 아벨리노 각막이상증(Avellino corneal dystrophy, granular corneal dystrophy type II GCD2, 파립형 각막이상증 제2형) TGFBI-R124H 돌연변이 랫드 모델을 제작하고자 하였다.

[0058] 1-1. Single guide RNA(sgRNA) 제작

[0059] TGFBI-R124H 돌연변이를 랫드의 genome에 도입하기 위해 벤칭 소프트웨어(Benchling software, benchling.com)를 이용하여 랫드의 TGFBI 유전자의 genomic DNA sequence를 분석하여 표 1에 나타낸 바와 같이, CRISPR-Cas9을 이용한 유전체 편집(gene editing)이 가능한 4개의 타겟 DNA 서열(Tgfb1-RG1: 서열번호 3, Tgfb1-RG2: 서열번호 4, Tgfb1-RG3: 서열번호 5, Tgfb1-RG4: 서열번호 6)을 선정하여 Snapgene software를 통해 도 2에 나타내었다.

표 1

타겟 DNA	서열 (5'→3')
Tgfb1-RG1 (서열번호 3)	ATCTGTGTACAGCTGTGTGG TGG
Tgfb1-RG2 (서열번호 4)	GCGATCTGTGTACAGCTGTG TGG
Tgfb1-RG3 (서열번호 5)	CAGATCGCACAGAAAAGCTG AGG
Tgfb1-RG4 (서열번호 6)	AGAAAAGCTGAGGCCTGAGA TGG

[0061] 이를 바탕으로 in vitro transcription 반응을 이용하여 sgRNA를 생산하기 위해 표 2에 기재된 oligomer(서열번호 7 내지 서열번호 14)를 (주) 마크로젠을 통해 합성하였다. 합성한 oligomer는 pUC57-sgRNA (Addgene #51132)의 BsaI site에 cloning하였으며, 이를 이용하여 기존 논문에서 보고한 바와 같이 sgRNA를 생산하였다(비특허문헌 1).

표 2

sgRNA	올리고머(Oligomer)	올리고머 서열 (5'→3')
Tgfb1-RG1 sgRNA	Tgfb1-RG1F (서열번호 7)	tagg ATCTGTGTACAGCTGTGTGG
	Tgfb1-RG1R (서열번호 8)	aaac CCACACAGCTGTACACAGAT
Tgfb1-RG2 sgRNA	Tgfb1-RG2F (서열번호 9)	tagg GCGATCTGTGTACAGCTGTG
	Tgfb1-RG2R (서열번호 10)	aaac CACAGCTGTACACAGATCGC
Tgfb1-RG3 sgRNA	Tgfb1-RG3F (서열번호 11)	tagg CAGATCGCACAGAAAAGCTG
	Tgfb1-RG3R (서열번호 12)	aaac CAGCTTTTCTGTGCGATCTG
Tgfb1-RG4 sgRNA	Tgfb1-RG4F (서열번호 13)	tagg AGAAAAGCTGAGGCCTGAGA
	Tgfb1-RG4R (서열번호 14)	aaac TCTCAGGCCTCAGCTTTTCT

[0062]

[0063] 1-2. ssODN(single-stranded oligodeoxynucleotide) 제작

[0064] CRISPR-Cas9 시스템을 매개로 하는 상동재조합수선(HDR) 과정에서 사용될 ssODN을 제작하기 위해 도 2에 나타낸 바와 같이, 타겟 DNA 서열 주위의 좌우 70mer를 homology arm으로 선정하였으며, 이를 이용하여 IDTOligomer Inc.를 통해서 ssODN(서열번호 15)을 제작하였다. 이 때, 도 3에 나타낸 바와 같이, ssODN의 염기 서열을 변형시켜 도 4에 나타낸 바와 같이, 야생형 랫드의 TGFBI 염기 서열에 있던 restriction enzyme site를 새로운 것으로 교체하여 TGFBI-R124H의 유전형 분석(Genotyping)에 다양한 genotyping protocol을 적용할 수 있도록 하였다.

[0066] 1-3. 유전형 분석을 위한 프라이머 제작

[0067] TGFBI-R124H 돌연변이 랫드의 제작을 위해 Founder rat screen 및 유전형 분석(genotyping)에 사용할 프라이머 세트를 제작하여 표 3에 나타내었다.

표 3

	프라이머 특이성 (Primer specificity)	프라이머	서열 (5'→3')	크기 (bp)
Set 1	common primer	TGFBI F1 (서열번호 16)	5'-TCCGTGAGCTTTGAGCATGT-3'	284
	common primer	TGFBI R1 (서열번호 17)	5'-TGCTTTTGCTTCCCTGGTG-3'	
	mutant-specific forward	Mutant F (서열번호 18)	5'-TTGTATACCGACCACACCGAGAAATTG-3'	
Set 2	common primer	TGFBI F2 (서열번호 19)	5'-TCCGTGAGCTTTGAGCATGT-3'	243
	common primer	TGFBI R2 (서열번호 20)	5'-TGCTTTTGCTTCCCTGGTG-3'	
	mutant-specific reverse	Mutant R (서열번호 21)	5'-CAATTCCTCGGTGTGGTGGTATACAA-3'	

[0068]

[0069] 실시예 2. 아벨리노 각막이상증 랫드 모델의 제작

[0070] 2-1. 동물 실험 수행 환경

[0071] 본 발명에서 수행한 모든 동물 실험은 한국 식품의약품안전처(MFDS, Ministry of Food and Drug Safety) 가이드라인을 준수하면서 수행되었다. 서울아산병원 아산생명과학연구원(Asan Institute for Life Sciences, Asan Medical Center) IACUC(Institutional Animal Care and Use Committees)가 프로토콜을 검토하고 승인하였다 (Permit Number: 2017-14-167). 모든 랫드를 서울아산병원 동물 연구실의 SPF(specific pathogen-free facility) 시설에서 유지시켰다.

[0073] 2-2. TGFBI-R124H 돌연변이 랫드의 생산

[0074] TGFBI-R124H 돌연변이 랫드는 유전자가위와 ssODN을 랫드 배아에 마이크로주입하는 방법으로 제작하여, 대리모를 통해 변이체 랫드를 생산하였다.

[0075] 구체적으로, 돌연변이 랫드를 제조하기 위한 야생형 랫드로 Sprague Dawley (SD) 랫드를 배아 공여자 및 대리모 (foster mother)로서 오리엔트바이오 사로부터 구입하였다. 구입한 랫드를 사육 환경에서 적응시킨 후, 5 내지 6 주령의 암컷 랫드에 40 IU 임신말 혈청성 성선 자극 호르몬 (pregnantmare serum gonadotropin, PMSG, Sigma)을 복강 내로 주입하였다. 그런 다음, 50 시간 간격으로 40 IU 인간 융모성 고나도트로핀 (human chorionic gonadotropin, hCG, Sigma)을 주입하여 과배란을 유도하였다. 과배란이 유도된 암컷 랫드를 SD stud 수컷들과 교배시켜, 난관에서 수정된 수정란을 수득하였다. 수득한 수정란(배아)이 전핵(pronuclear) 단계일 때, 상기 실시예 1-1 에서 준비한 각각의 100 ng/ml sgRNA, 50 ng/ml Cas9 mRNA, 및 실시예 1-2의 200 ng/ml ssODN을 배아의 세포질 내로 마이크로주입하였다. 마이크로주입된 배아는 가임신된 대리모의 난관 내로 이동시켜 자궁에 착상되도록 유도하였다.

[0076] 착상된 배아로부터 태어난 새끼의 꼬리 조직을 얻어 (biopsy)하여 genomic DNA를 수득하고 상기 실시예 1-3에서 제조한 프라이머쌍을 이용해 genotyping PCR을 수행하여, TGFBI-R124H mutant founder의 여부를 확인하였다. 또한, 상기 과정을 통해 생산된 TGFBI-R124H F0 랫드를 야생형 랫드와 교배시켜 표 4에 나타낸 바와 같이, 생식 전달 테스트(Germline Transmission test)를 통해 F0 #26 랫드로부터 TGFBI-R124H 돌연변이를 갖고 있는 F1 랫

드를 생산하였다. 생산된 F1 랫드 생후 10일 차에 꼬리 조직을 채취하여 상기 실시예 1-3에서 제조한 프라이머 쌍을 이용해 genotyping PCR을 실시하여 돌연변이 유무를 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, F1 랫드 #1, 2, 9, 10, 13, 15에서 돌연변이 밴드가 확인되었다. 최종적으로, 도 6에 나타난 바와 같이, genotyping PCR 결과 TGFBI-R124H 돌연변이 밴드가 확인된 F1 랫드 #1, 2, 9, 10, 13, 15의 서열을 분석함으로써 TGFBI에 R124H 돌연변이가 유도된 F1 랫드를 확인하였다.

표 4

파운더(Founder)	No.	성별	출생일(DOB)	생식전달(GT)
TGFBI FO #26	1	♂	2019.07.26	
	2	♂	2019.07.26	KI(Knock in)
	3	♂	2019.07.26	
	4	♂	2019.07.26	
	5	♂	2019.07.26	
	6	♂	2019.07.26	
	7	♂	2019.07.26	
	8	♂	2019.07.26	
	9	♂	2019.07.26	KI(Knock in)
	10	♀	2019.07.26	KI(Knock in)
	11	♀	2019.07.26	
	12	♀	2019.07.26	
	13	♀	2019.07.26	KI(Knock in)
	14	♀	2019.07.26	
	15	♀	2019.07.26	KI(Knock in)

2-3. 랫드 모델의 유전형 분석

제작한 TGFBI-R124H 돌연변이 랫드를 이용하여 이형접합체(heterozygote)와 동형접합체(homozygote)를 확보하기 위하여, F1 랫드와 정상 랫드(Normal rat)를 교배하여 N2 개체를 얻고, N2 개체끼리 교배시켜 N2F1을 생산하고, 이형접합체와 동형접합체가 확보되었는지 확인하기 위하여, N2F1 개체에 대한 유전형 분석(Genotyping)을 실시하였다. 구체적으로, 생후 10일차의 N2F1 개체의 꼬리를 2 내지 3 mm 잘라 상기 실시예 1-3에서 제조한 TGFBI F2 (서열번호 19), TGFBI R2 (서열번호 20), Mutant R (서열번호 21) 프라이머 및 WT F의 프라이머를 이용하여 도 7에 기재된 조건으로 PCR MightyAmp Genotyping Kit로 유전자형 분석을 실시하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 야생형(WT)은 #157과 같이 284 bp에서만 발현되고, 이형접합체(heterozygote)는 #158과 같이 284 bp, 243 bp에서 동시에 발현되며, 돌연변이 동형접합체(homozygote)는 #170과 같이 243 bp에서만 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

나아가, F1개체 및 N2 개체의 유전자형을 확인하기 위해, 상기 실시예 1-3에서 제조한 TGFBI F2 (서열번호 19), TGFBI R2 (서열번호 20), Mutant R (서열번호 21) 프라이머 및 WT F 프라이머를 이용하여 도 7에 기재된 조건으로 PCR MightyAmp Genotyping Kit로 유전형 분석을 실시하였으며, 미세수술 현미경으로 F1 개체, N2 개체, 및 N2F1 개체의 양안을 관찰하여 표현형을 확인한 결과, 표 5에 기재된 바와 같이, 11마리의 동형접합체, 89마리 이형접합체, 67마리의 야생형이 생산되었으며, 각막 혼탁이 관찰된 개체 수는 이형접합체 89마리 중 6마리였다.

표 5

세대 (generation)	개월 (month)	전체 (Total)	WT (야생형)	%	이형접합 (Hetero)	%	동형접합 (Homo)	%	GCD2 발현
F1	11	5	0	0%	5	100%	0	0%	1
N2	6	58	39	67%	19	33%	0	0%	5
N2F1	2	104	28	27%	65	63%	11	11%	0
전체(Total)		167	67	40%	89	53%	11	7%	6

실시예 3. 아벨리노 각막이상증 발생 여부 확인

[0083] **3-1. F1 랫드 전수조사**

[0084] 표현형 확인을 위하여, 생산된 F1 랫드들의 양안을 미세수술현미경으로 관찰하여 전수조사를 실시하였다.

[0085] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 43주령(11개월)의 #10 F1 랫드에서 40주 이후 아벨리노 각막이상증이 발생한 것을 확인할 수 있었다.

[0087] **3-2. 아벨리노 각막이상증이 발생한 N2 이형접합체에서의 확인**

[0088] **3-2-1. 각막 관찰**

[0089] 아벨리노 각막이상증이 관찰된 N2 이형접합체 개체 중 #4, #30, 및 #40의 생후 9주차에 개체의 좌우 각막을 미세수술 현미경으로 관찰한 결과, 아벨리노 각막 이상증이 확인되었으며, 도 9에 나타난 바와 같이, 우안 각막에서 육안적인 혼탁 병변이 관찰되었고, 좌안 각막은 clear하였다. 관찰 당일 #4, #30, 및 #40 개체의 좌안에 치료레이저각막절제술(PTK, Phototherapeutic keratectomy)을 실시하였다. PTK 시술 후 #40 개체의 각막을 미세수술 현미경으로 관찰한 결과, 도 10과 같이 나타났으며, PTK 시술 후 3주차(생후 12주차)에 #40 개체의 좌우 각막을 미세수술 현미경으로 관찰한 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 좌안에서 추가적인 병변은 발현되지 않은 것을 확인할 수 있었다.

[0090] 또한, N2 이형접합체 개체 중 #56 및 #66의 생후 17주차에 좌우 각막에서 아벨리노 각막이상증이 발현된 것을 미세수술 현미경으로 확인할 수 있었다.

[0092] **3-2-2. 조직화학적 병리 소견 확인**

[0093] 본 발명에서 제작한 TGFBI-R124H 돌연변이 랫드를 아벨리노 각막이상증 동물 모델로서 사용할 수 있는지 확인하기 위해, 각막 조직을 고정하여 표본을 제작하고 조직화화학적 관찰을 수행하였다.

[0094] 구체적으로, 랫드의 복강 내에 Zoletil[®] 0.01 ml (Tiletamine 125 mg/ml 및 Zolazepam 125 mg/ml Virbac, France)을 주사하여 마취한 다음, 안구를 적출하여 Davidson's fixative solution 에서 8시간 고정하고 이후 4% 파라포름알데하이드 고정액으로 2일 간 고정하였다. 고정된 안구로부터 각막 조직을 적출하여 파라핀에 포매한 후, 4 μ m 두께로 잘라 H&E 염색(hematoxylin-eosin staining)을 수행하였으며, Trichrome Stain Kit로 Masson Trichrome 염색을 수행하였고, Congo Red Stain Kit로 Congo Red 염색을 수행하여, 조직화학적 표본을 제작하였다.

[0095] 조직학적 변화를 관찰하기 위해, 상기 실시예 3-2-1의 PTK 실시한 생후 9주차의 #30 개체의 각막 조직을 상기 방법에 따라 H&E 염색, Masson Trichrome 염색, 및 Congo Red 염색을 실시하였다.

[0096] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, PTK 시술한 좌안에서는 상피(epithelium)와 앞각막기질(ant. stroma)가 손상된 형태가 관찰되었으며, 우안의 경우, H&E 염색 결과에서는 보라색의 염증세포(inflammatory cell)가 확연히 나타나지는 않으나, Masson Trichrome 염색과 Congo Red 염색 결과에서는 상피밑(subepithelium)과 앞각막기질에 침착물(deposit)이 확연하게 관찰되었다.

[0097] 또한, 상기 실시예 3-2-1의 PTK 시술 후 3주차(생후 12주차)의 #40 개체의 각막을 상기 방법에 따라 H&E 염색, Masson Trichrome 염색, 및 Congo Red 염색을 실시한 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, H&E 염색, Masson Trichrome 염색, 및 Congo Red 염색 모두에서 상피와 앞각막기질에서 유의미한 변화가 나타난 것을 확인할 수 있었다.

[0099] **3-3. N2F1 개체에서의 확인**

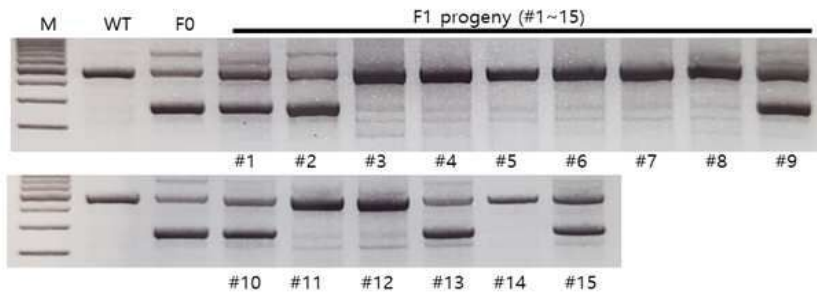
[0100] 이형접합체 랫드 모델과 동형접합체 랫드 모델로서 활용할 수 있는지 확인하기 위하여, 생후 8주차, 40주차의 N2F1개체의 각막을 미세 수술현미경으로 관찰하여 아벨리노 각막이상증이 발현되었는지 확인하였다.

[0101] 그 결과, 도 14 및 도 15에 나타난 바와 같이 아벨리노 각막이상증이 발현된 개체는 없는 것을 확인되었다.

도면4



도면5



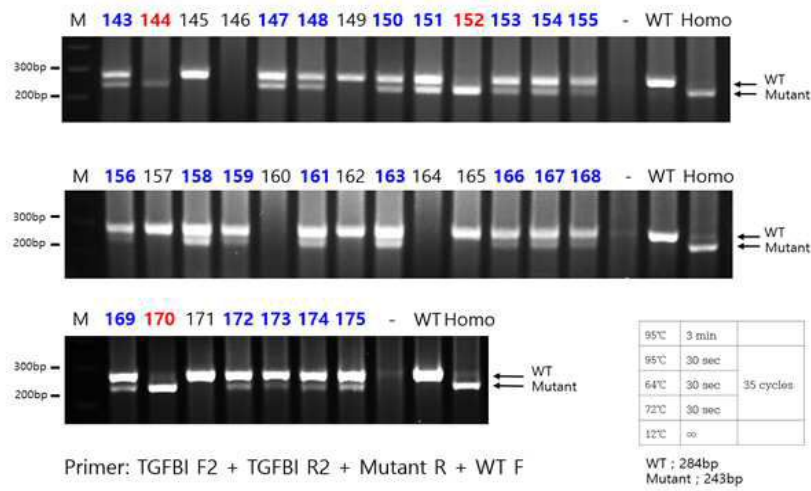
도면6

#26	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	WT (1/5)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	+2 (3/5)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (1/5)
#26-1	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (2/3)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	partial (1/3)
#26-2	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	WT (4/5)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (1/5)
#26-9	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	WT (1/4)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (3/4)
#26-10	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	WT (3/4)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (1/4)
#26-13	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	WT (3/5)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (2/5)
#26-15	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTACACAGATCGCACAGAAAAGCTGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	WT (1/5)
	ACCTTGGGAATTGTGGATGACCAACACACAGCTGTATACCGACCaCACCGAGAAATGAGGCCTGAGTGGAGGACCCGGCAGTTCCACCATCTT	KI (4/5)

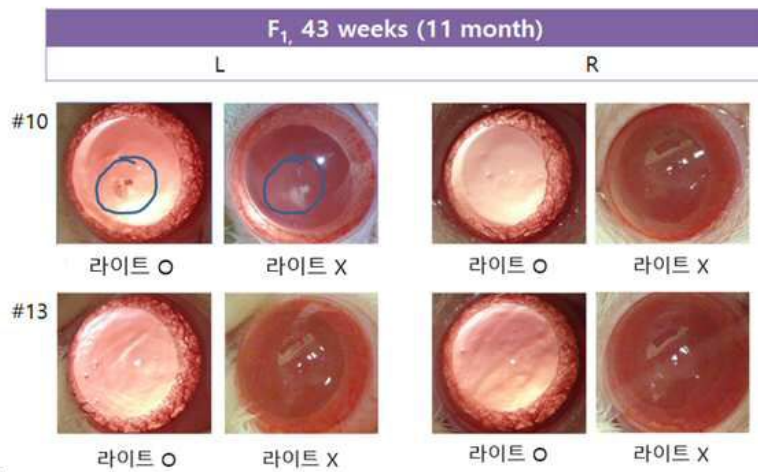
M2(#26-2, 26-9)
F3 (#26-10, 26-13, 26-15)

도면7

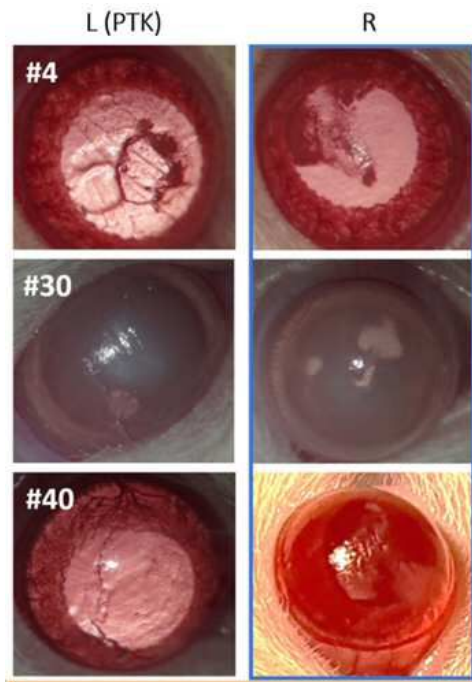
N₂F₁ Genotyping (#143 ~ #175)



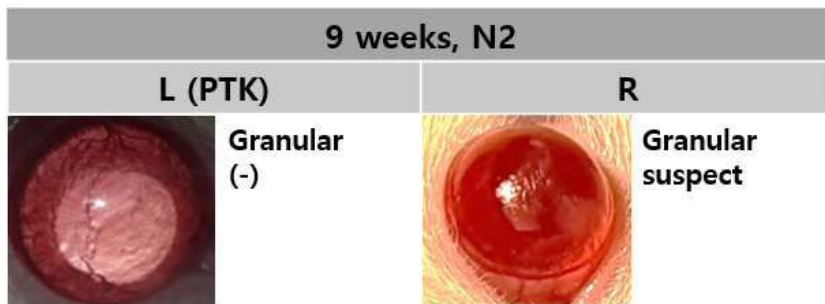
도면8



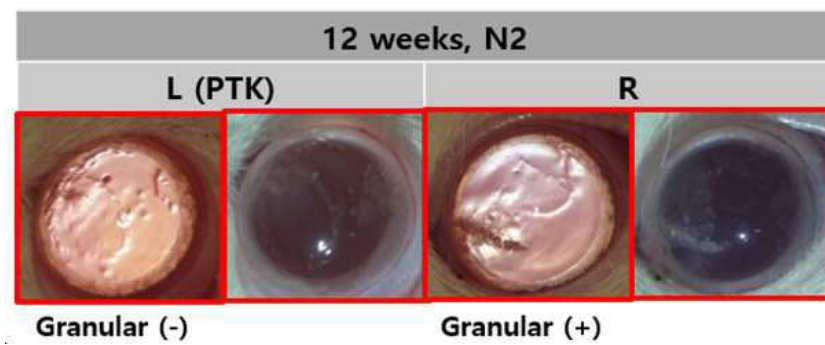
도면9



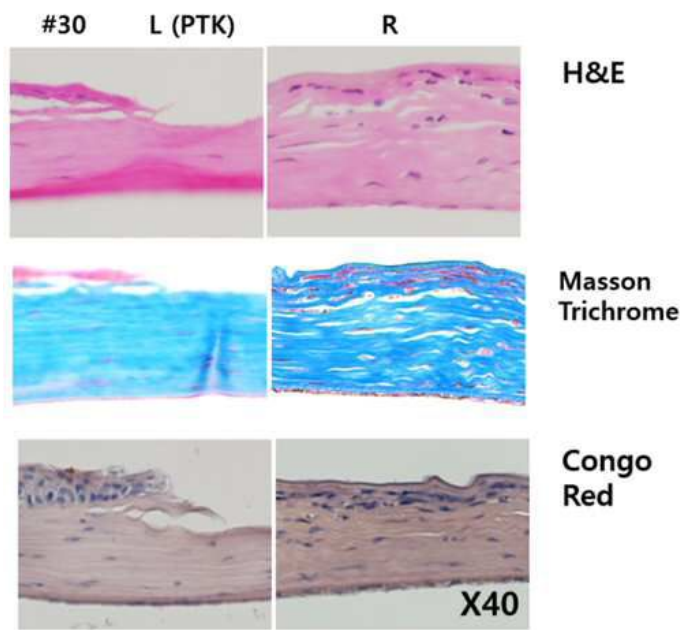
도면10



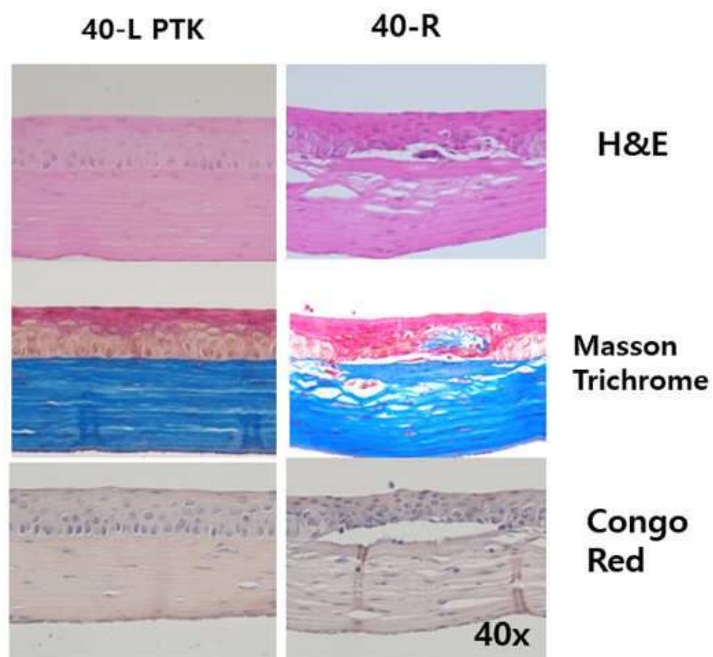
도면11



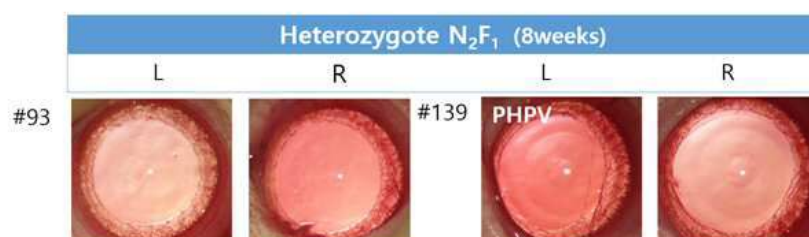
도면12



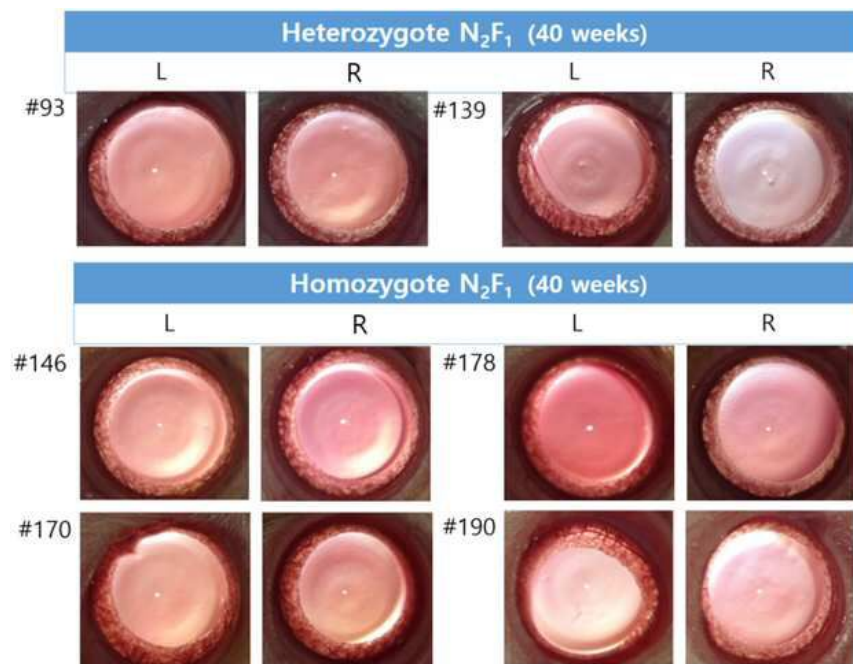
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> An avellino corneal dystrophy animal model and the preparation method thereof
- <130> MP21-174
- <160> 21
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 685
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus
- <400> 1

Met Ala Leu Leu Val Arg Leu Leu Pro Leu Ala Leu Ala Leu Ser Leu

1 5 10 15

Gly Phe Thr Gly Thr Leu Ala Gly Pro Ala Lys Ser Pro Tyr Gln Leu

20 25 30

Val Leu Gln His Ser Arg Leu Arg Gly Arg Gln His Gly Pro Asn Val

35 40 45

Cys Ala Val Gln Lys Val Ile Gly Thr Asn Lys Lys Tyr Phe Thr Asn

50 55 60
 Cys Lys Gln Trp Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile
 65 70 75 80
 Ser Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly
 85 90 95

 Cys Pro Ala Ala Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Ile
 100 105 110
 Val Gly Ser Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu
 115 120 125
 Arg Pro Glu Met Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser
 130 135 140
 Asn Glu Ala Trp Ser Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Val Asn Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val

 165 170 175
 Asp Arg Arg Val Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Met Tyr Gln Asn Ser Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly
 195 200 205
 Ile Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala
 210 215 220
 Thr Asn Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Val Thr
 225 230 235 240

 Asn Asn Ile Gln Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu
 245 250 255
 Arg Ala Ala Val Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Val Leu Glu Gly Asp
 260 265 270
 Gly Gln Phe Thr Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile
 275 280 285
 Pro Ala Glu Thr Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg
 290 295 300

Asp Leu Leu Asn Asn His Ile Leu Lys Thr Ala Met Cys Ala Glu Ala

305 310 315 320

Ile Val Ala Gly Met Ala Met Glu Thr Leu Gly Gly Thr Thr Leu Glu

325 330 335

Val Gly Cys Ser Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Val Ile

340 345 350

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

355 360 365

Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Leu Glu Leu Ala Ser

370 375 380

Glu Ser Asp Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Leu Arg Gln Ala Gly Leu

385 390 395 400

Ser Thr His Leu Ser Gly Lys Glu Gln Leu Thr Phe Leu Ala Pro Leu

405 410 415

Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Val Pro Arg Ile Asp Gly Gln Met Lys

420 425 430

Thr Leu Leu Leu Asn His Met Val Lys Gly Gln Leu Ala Ser Lys Tyr

435 440 445

Leu Tyr Ser Gly Gln Thr Leu Asp Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg

450 455 460

Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala

465 470 475 480

Ala His Asp Lys Lys Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg

485 490 495

Met Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp

500 505 510

Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Met

515 520 525

Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn

530 535 540

Glu Ala Phe Gln Ala Met Pro Pro Glu Glu Leu Asn Lys Leu Leu Ala

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

 595 600 605
 Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Thr Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val
 610 615 620
 Val Tyr Ala Ile Asn Thr Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln
 625 630 635 640
 Glu Arg Gly Glu Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Lys
 645 650 655
 Ala Ser Ala Tyr Ser Arg Ser Ala Gln Ser Ser Met Arg Leu Ala Pro
 660 665 670

Val Tyr Gln Arg Leu Leu Glu Arg Met Lys Arg Arg Gly

 675 680 685

<210> 2

<211> 2696

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

cgtgggtccg cgcgtgcttc agtcctatgg cgtcctcgt gcggctgctg cccctcgctc	60
tggtctgtgc tctgggcttc accgggaccc tggcgggccc ggccaagtca ccctatcagc	120
tggtgctgca gcacagccgg ctccggggcc gccagcacgg cccaatgta tgtgctgtgc	180
agaaggtcat tggcactaac aagaaatact tcaccaactg caagcagtgg taccagagga	240
agatctgcgg caagtcgaca gtcacagct atgagtgtg ccccgatat gaaaaggtcc	300
caggagagaa aggtgcacct gcagctcttc cgtctccaa tctgtacgag accttgggaa	360
ttgtgggata gaccaccaca cagctgtaca cagatcgac agaaaagctg aggcctgaga	420
tggagggacc cggcagcttc accatctttg cccctagcaa cgaggcctgg tcctccttgc	480
ctgcggaagt gctggactcc ctggtgagca atgtcaacat tgaactgctc aacgcctcc	540
gctaccacat ggtggacaga cgggtcctga cagacagct taagcacggc atggctctca	600

cctccatgta ccagaactcc aacatccaga tccatcacta tcccaatggg attgtaactg	660
ttaactgtgc cggctgctg aaagctgacc accatgcgac caacggcgtg gtgcatctca	720
ttgataaggt catttcacc gttaccaaca acatccagca gatcatcgag attgaggaca	780
cctttgagac acttcgggcc gccgtggctg catcaggact caataccgtg ctggagggtg	840
acggccagtt cacactcttg gcccacaaca acgaggcctt tgagaagatt cctgctgaga	900
ccttgaaccg gatcctgggt gaccccgagg cctgagaga cctgctaaac aatcatatcc	960
tgaagacagc catgtgtgct gaggccattg tggttgaat ggccatggag accctggggg	1020
gcaccacact ggaggtgggc tgcagtggag acatgctcac tattaacggg aaggctgtca	1080
tctccaaca agacatcctg gccaccaacg gtgtcatcca cttcattgat gagctgtca	1140
tcccagattc agccaagaca ttgctcgagc tcgcttcgga atctgacgtc tccacagcca	1200
ttgacctcct cagacaagct ggcctcagca cgcactcttc tggaaaagaa cagttgacct	1260
tcctggcccc tctgaattct gtgttcaaag atggtgtccc ccgcatcgac ggccaaatga	1320
agactttgct tctgaaccac atggtcaaag ggcagttggc ctccaaatat ttgtactccg	1380
gacagacact ggacacactg ggtggcaaaa agcttcgagt ttttgtttat cgaaatagcc	1440
tctgcattga aaacagctgc attgccgcc atgacaagaa gggacggtat gggaccctgt	1500
tcacatgga ccggatgctg acacccccta tggggactgt tatggatgtc ctgaaggggg	1560
acaaccgttt tagcatgctg gtggccgcca tccagtctgc aggcctgatg gagaccctca	1620
accggaagg ggtctacact gttttcgtc ccacgaacga agcgttccaa gccatgcctc	1680
cagaagagct gaacaaactc ttggcaaatg ccaaggaact taccaacatc ctgaagtacc	1740
acattgggga tgagatcctg gttagcggag gcattggggc tctggtgcgg ctgaagtctc	1800
tccaagggga caaactgaa gtcagctcga aaaacaatgt ggtgagtgtc aataaggaac	1860
ctgttgccga aaccgacatc atggccacaa acggtgtggt gtatgccatc aacactgttc	1920
tgaaccgcc agccaaccgg ccacaagaac ggggagaaga gttggcagac tctgcccttg	1980
aaatcttcaa gaaggcgtca gcctattcca ggagtgccca gatttctatg cgacttgccc	2040
ctgtctatca gcggttacta gagaggatga agcggagagg atgaagcatt agcaagaagg	2100
accacagagg agtgcctgc aagcagcttc ctgccagttt ctctcagttt gccaaagaga	2160
ccattgaatg tttcggaac caaatatcac acttcaacat acatgggctg caccacattg	2220
agatctgagc ctiggtggg ttgggatgtt aaggggagag aggtcagttt tagctttcga	2280
tccctccaaa cacggttgtt caaccactga acacacagat ctggcggctg tatcttggcg	2340

ctgactacca gaaaggacct ttccaaagca tggaattcaa caacggtgcc aaggccctgg 2400

gaaaaggag ctccagcctc ggagcttaca aatgtgaacc aagcagtcca tcgtccagga 2460

aagccctggc accatcctgt aaagctcttg taccgctgga gaaatggcat cactataagc 2520

tatgagttga acgttttctg tcaattatgt cttgtgacca cacgtggttt gaatgcttct 2580

acgtggccct gccaggtag aaaggaaagg gtgtggcgaa catgtagaat tcagattccc 2640

ctgagtgtga tggagccacg gcgcatttgt aataataaaa ccaaagaaac gaaaaa 2696

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG1

<400> 3

atctgtgtac agctgtgtgg tgg 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG2

<400> 4

gcgatctgtg tacagctgtg tgg 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG3

<400> 5

cagatcgcac agaaaagctg agg 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG4

<400> 6

agaaaagctg aggcctgaga tgg	23
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Tgfbi-RG1F	
<400> 7	
taggatctgt gtacagctgt gtgg	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Tgfbi-RG1R	
<400> 8	
aaaccacac agctgtacac agat	24
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Tgfbi-RG2F	
<400> 9	
tagggcgatc tgtgtacagc tgtg	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Tgfbi-RG2R	
<400> 10	
aaaccacagc tgtacacaga tcgc	24
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Tgfbi-RG3F

<400> 11

taggcagatc gcacagaaaa gctg 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG3R

<400> 12

aaaccagctt ttctgtgcga tctg 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG4F

<400> 13

taggagaaaa gctgaggcct gaga 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tgfbi-RG4R

<400> 14

aaactctcag gcctcagctt ttct 24

<210> 15

<211> 166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ssODN

<400> 15

caaggaggac caggcctcgt tgctaggggc aaagatggtg aagctgccgg gtccctccat 60

ctcaggcctc agcttttctg tgcgatctgt gtacagctgt gtggtggtcg atcccacaat 120

tcccaaggtc tcgtacagat tggagagcgg aagagctgca gagtca 166

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGFBI F1
 <400> 16
 tccgtgagct ttgagcatgt 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGFBI R1
 <400> 17
 tgcttttgct ttccctgggtg 20

 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutant F
 <400> 18
 ttgtataccg accacaccga gaaattg 27
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGFBI F2
 <400> 19
 tccgtgagct ttgagcatgt 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGFBI R2
 <400> 20

tgcttttgct ttccctgggtg

20

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant R

<400> 21

caatttctcg gtgtggtcgg tatacaa

27