



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111527204 B

(45) 授权公告日 2023.09.01

(21) 申请号 201880084068.9
 (22) 申请日 2018.12.27
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111527204 A
 (43) 申请公布日 2020.08.11
 (30) 优先权数据
 2017-254798 2017.12.28 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.06.24
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2018/048034 2018.12.27
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/131829 JA 2019.07.04
 (73) 专利权人 国立大学法人京都大学
 地址 日本京都府京都市
 专利权人 武田药品工业株式会社
 (72) 发明人 堀田秋津 井福正隆 藤本直子
 岩渊久美子 见城江利也
 蒔田幸正 落合留美子
 (74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
 责任公司 11219
 专利代理师 鲁雯雯 金龙河

(51) Int.Cl.
 C12N 15/09 (2006.01)
 A01K 67/027 (2006.01)
 A61K 31/7088 (2006.01)
 A61K 38/46 (2006.01)
 A61K 47/18 (2006.01)
 A61K 47/24 (2006.01)
 A61K 47/28 (2006.01)
 A61K 48/00 (2006.01)
 A61P 21/02 (2006.01)
 A61P 43/00 (2006.01)
 C07K 14/435 (2006.01)
 C12N 1/15 (2006.01)
 C12N 1/19 (2006.01)
 C12N 1/21 (2006.01)
 C12N 5/10 (2006.01)
 C12N 15/12 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 106536729 A, 2017.03.22
 US 2017015994 A1, 2017.01.19
 CN 104116643 A, 2014.10.29
 WO 2016197133 A1, 2016.12.08 (续)

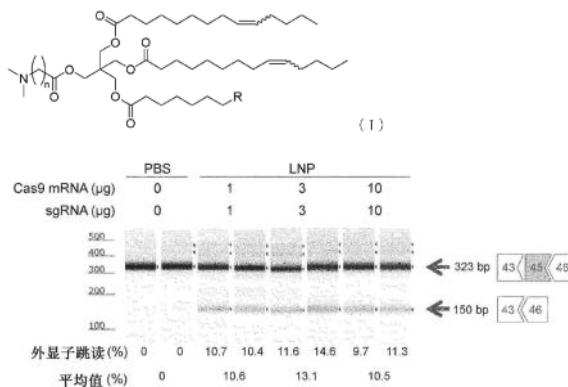
审查员 刘宁伟

权利要求书3页 说明书36页
序列表10页 附图5页

(54) 发明名称
 靶基因改造用组合物

(57) 摘要

本发明提供用于递送能够实现细胞中的高基因改造效率的基因改造工具的递送方法。本发明的组合物为用于诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的组合物,其包含:1)式(I)所表示的化合物或其盐、2)结构脂质、以及3)指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸。式(I)中,n表示2~5的整数,R表示直链状C₁₋₅烷基、直链状C₇₋₁₁烯基或直链状C₁₁链二烯基,波浪线各自独立地表示顺式或反式的键。



CN 111527204 B

[接上页]

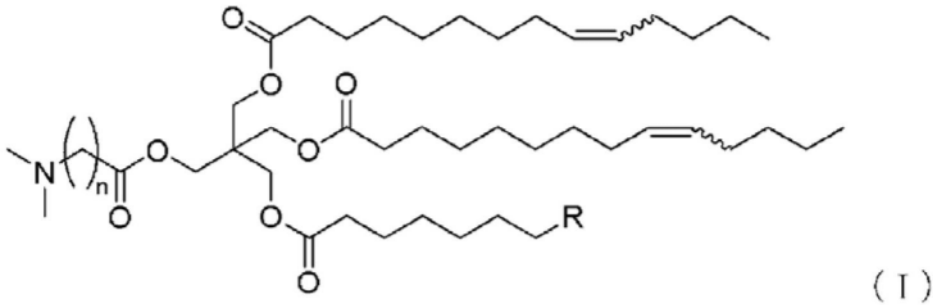
(56) 对比文件

WO 2017072590 A1, 2017.05.04

Hao Yin et al..Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral

delivery of CRISPR system components in vivo.Nat Biotechnol.2016,第34卷(第34期),摘要,图1-3.

1. 一种用于诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的组合物,其包含:1) 式(I)所表示的化合物或其盐、2) 结构脂质、以及3) 指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸,



式(I)中,

n表示2~5的整数,

R表示直链状 C_{1-5} 烷基、直链状 C_{7-11} 烯基或直链状 C_{11} 链二烯基,波状线各自独立地表示顺式或反式的键。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中,

RNA引导性核酸酶为Cas9;

指导RNA为(a) 嵌合RNA、或者(b) 包含crRNA和tracrRNA的两种以上的RNA。

3. 如权利要求2所述的组合物,其中,Cas9为来源于化脓性链球菌的Cas9。

4. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述指导RNA为两种以上的指导RNA。

5. 如权利要求1所述的组合物,其中,细胞为肌细胞。

6. 如权利要求5所述的组合物,其中,靶基因座包含肌养蛋白基因的核苷酸序列。

7. 如权利要求6所述的组合物,其用于肌营养不良症的预防/治疗。

8. 如权利要求5所述的组合物,其中,指导RNA为:

(1) 包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA;或者

(2) (i) 包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii) 包含序列号7或序列号8所示的核酸序列的tracrRNA。

9. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述化合物为(9Z)-十四碳-9-烯酸3-((4-(二甲氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双(((9Z,9'Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯。

10. 一种对细胞中的靶基因座进行改造的方法,其包括在生物体外使权利要求1所述的组合物与细胞接触的步骤。

11. 如权利要求10所述的方法,其中,

RNA引导性核酸酶为Cas9;

指导RNA为(a) 嵌合RNA、或者(b) 包含crRNA和tracrRNA的两种以上的RNA。

12. 如权利要求11所述的方法,其中,Cas9为来源于化脓性链球菌的Cas9。

13. 如权利要求10所述的方法,其中,细胞为肌细胞。

14. 如权利要求13所述的方法,其中,靶基因座包含肌养蛋白基因的核苷酸序列。

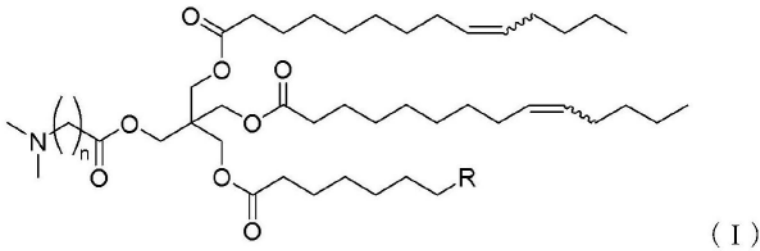
15. 如权利要求13所述的方法,其中,指导RNA为:

(1) 包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA;或者

(2) (i) 包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii) 包含序列号7或序列号

8所示的核酸序列的tracrRNA。

16. 一种靶基因座被改造的细胞,其通过权利要求10所述的方法得到,并且包含式(I)所表示的化合物或其盐,



式(I)中,

n表示2~5的整数,

R表示直链状 C_{1-5} 烷基、直链状 C_{7-11} 烯基或直链状 C_{11} 链二烯基,
波浪线各自独立地表示顺式或反式的键。

17. 如权利要求16所述的细胞,其中,所述化合物为(9Z)-十四碳-9-烯酸3-((4-(二甲氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双(((9Z,9'Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯。

18. 一种药物,其包含权利要求6所述的组合物。

19. 如权利要求18所述的药物,其中,

RNA引导性核酸酶为Cas9;

指导RNA为(a)嵌合RNA、或者(b)包含crRNA和tracrRNA的两种以上的RNA。

20. 如权利要求19所述的药物,其中,Cas9为来源于化脓性链球菌的Cas9。

21. 如权利要求18所述的药物,其中,指导RNA为:

(1) 包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA;或者

(2) (i) 包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii) 包含序列号7或序列号

8所示的核酸序列的tracrRNA。

22. 如权利要求18所述的药物,其为肌营养不良症的预防/治疗药。

23. 如权利要求18所述的药物,其为修复型肌养蛋白产生药。

24. 权利要求6所述的组合物在制造肌营养不良症的预防/治疗剂中的应用。

25. 一种靶基因座被改造的细胞的制造方法,其包括在生物体外使权利要求1所述的组合物与细胞接触的步骤。

26. 一种用于诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的组合物制造方法的制造方法,其包括将脂质粒子分散液与水溶液混合的步骤,所述脂质粒子分散液包含1) 式(I)所表示的化合物或其盐和2) 结构脂质,所述水溶液包含3) 指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸,

靶基因改造用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及能够将作为活性成分的CRISPR系统中使用的物质导入到细胞内的组合物。此外,本发明还涉及使用这样的组合物来诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的方法、例如通过对肌细胞的肌养蛋白基因进行改造而预防或治疗肌营养不良症的方法。

背景技术

[0002] 近年来,利用基因组编辑手段、例如CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats,成簇的规律间隔的短回文重复序列)系统,进行了用于在各种细胞中进行基因改造的研究开发。但是,少有关于通过经注射等给药于生物体而将CRISPR系统中所需的gRNA(指导RNA)或编码RNA引导性核酸酶(Cas9等)的基因等的基因改造工具递送到目标细胞中来进行基因改造的报道,期望开发出用于递送例如能够实现肌细胞中的高基因改造效率的基因改造工具的递送方法。作为CRISPR系统,已知I类和2类,1类中已知I型、III型、IV型,2类中已知II型、V型和VI型。进行基因改造时,广泛使用与DNA结合并切断的2类II型的Cas9,但也使用同样地结合DNA并切断的2类V型的Cpf1(Cas12a)、C2c1(Cas12b)等。另外,也报道了与RNA结合并切断的2类VI型的Cas13a(C2c2)、Cas13b等。

[0003] 作为向细胞递送的递送手段之一,已知能够包封gRNA、mRNA等核酸的脂质纳米粒子(LNP:lipid nanoparticle)。例如,作为记载了利用LNP对肝细胞递送CRISPR/Cas9系统的基因改造工具的现有技术文献,可以列举下述文献。

[0004] 非专利文献1中记载了:分别利用使用C12-200(脂质样分子)、胆固醇、C14PEG2000(聚乙二醇脂质)、DOPE(1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)和花生四烯酸制作的LNP将SpCas9(来源于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9)的mRNA静注于Fah^{mut/mut}小鼠,利用AAV载体将gRNA和同源重组修复(HDR:Homology-directed repair)模板静注于Fah^{mut/mut}小鼠,由此肝脏中的Fah+细胞的比例增加。

[0005] 专利文献1中记载了包含gRNA、阳离子性脂质和非阳离子性脂质的脂质粒子。作为阳离子性脂质,可以例示1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)等。在实施例中记载了:通过将包含Cas9的mRNA和gRNA的LNP静注于小鼠,在肝细胞的Pcsk9基因和HBV RT基因中确认到插入/缺失(indel)。

[0006] 非专利文献2中记载了:利用使用cKK-E12(作为由基于赖氨酸的二肽得到的衍生物的脂质样分子)、胆固醇、C14PEG2000和DOPE制作的LNP,将SpCas9的mRNA和修饰sgRNA静注于小鼠,由此,在肝细胞的Pcsk9基因、Fah基因和Rosa26基因中确认到插入/缺失。

[0007] 另一方面,作为记载了利用LNP以外的手段对肌细胞等递送CRISPR/Cas9系统的基因改造工具的现有技术文献,可以列举下述文献。

[0008] 专利文献2中记载了:出于为了治疗杜氏肌营养不良症而对小鼠肌养蛋白基因(Dmd)的缺陷进行修正的目的,使用gRNA和编码Cas9的基因的病毒载体(例如腺相关病毒(AAV)),向肌细胞等进行递送。在实施例中记载了:对于在Dmd的外显子23产生了无义突变(终止密码子)的mdx小鼠,通过注射给药包含载有用于跳过该外显子的sgRNA和spCas9基因

的载体的重组AAV,在肌纤维和心肌细胞的一部分中变为肌养蛋白阳性。

[0009] 专利文献3中也记载了通过将gRNA和编码Cas9的基因等递送到肌细胞等中,能够对Dmd等基因进行修正。在实施例(实施例9、11等)中记载了:对于从患者采集的肌肉原始细胞群(在生物体外),通过电穿孔导入载有用于跳过Dmd的外显子51的sgRNA和SpCas9基因的表达质粒后,将该细胞群移植于免疫缺陷小鼠中,在该小鼠的体内能够表达肌养蛋白。

[0010] 非专利文献3中记载了:利用AAV将gRNA和SaCas9的mRNA或SpCas9的mRNA静注或肌肉内给药于mdx小鼠(肌营养不良症模型),在心肌和骨骼肌中确认到外显子23的缺失。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:W02016/197133号小册子

[0014] 专利文献2:W02016/025469号小册子

[0015] 专利文献3:W02014/197748号小册子

[0016] 非专利文献

[0017] 非专利文献1:Yin et al.,Nat.Biotech.,34(2016)p329-333

[0018] 非专利文献2:Yin et al.,Nat.Biotech.,35(2017)p1179-1187

[0019] 非专利文献3:Tabebordbar et al.,Science,351(2016)p407-411

发明内容

[0020] 发明所要解决的问题

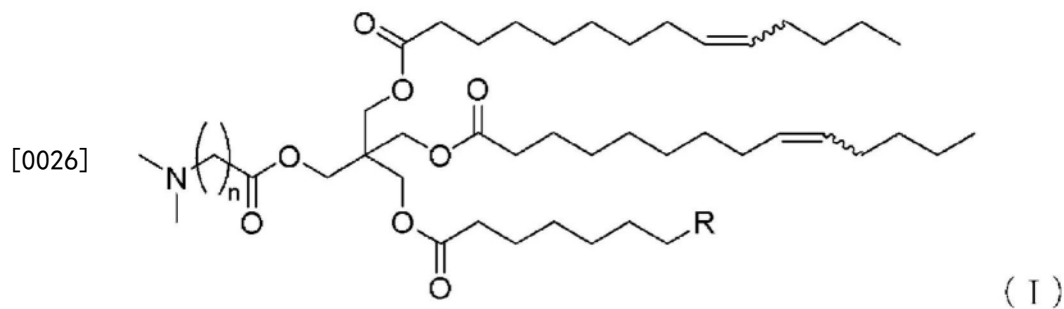
[0021] 本发明的目的在于提供用于递送能够实现各种细胞中的高基因改造效率的基因改造工具的递送方法。

[0022] 用于解决问题的方法

[0023] 本发明人为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现,通过使用由下式所示的化合物(阳离子性脂质的一种)或其盐和其他结构脂质形成的脂质粒子,能够高效地将指导RNA(gRNA)、以Cas9为代表的RNA引导性核酸酶蛋白或包含编码该蛋白的序列的核酸等递送到各种细胞中,能够解决上述课题,从而完成了本发明。

[0024] 即,本发明至少涉及以下的发明。

[0025] [1]一种用于诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的组合物,其包含1)式(I)所表示的化合物或其盐、2)结构脂质、以及3)指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸。



[0027] [式(I)中,

[0028] n表示2~5的整数,

[0029] R表示直链状C₁₋₅烷基、直链状C₇₋₁₁烯基或直链状C₁₁链二烯基,波状线各自独立地表示顺式或反式的键。]

[0030] [2]如项1所述的组合物,其中,

[0031] RNA引导性核酸酶为Cas9;

[0032] 指导RNA为(a)嵌合RNA、或者(b)包含crRNA和tracrRNA的两种以上的RNA。

[0033] [2a]如项1所述的组合物,其中,RNA引导性核酸酶为Cpf1。

[0034] [3]如项1或项2所述的组合物,其中,Cas9为来源于化脓性链球菌的Cas9。

[0035] [4]如项1至项3中任一项所述的组合物,其中,所述指导RNA为两种以上的指导RNA。

[0036] [5]如项1至项4中任一项所述的组合物,其中,细胞为肌细胞。

[0037] [6]如项1至项5中任一项所述的组合物,其中,靶基因座包含肌养蛋白基因的核苷酸序列。

[0038] [7]如项1至项6中任一项所述的组合物,其中,指导RNA为:

[0039] (1)包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA;或者

[0040] (2) (i)包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii)包含序列号7或序列号8所示的核酸序列的tracrRNA。

[0041] [8]一种对细胞中的靶基因座进行改造的方法,其包括使项1所述的组合物与细胞接触的步骤。

[0042] [9]如项8所述的方法,其中,

[0043] RNA引导性核酸酶为Cas9;

[0044] 指导RNA为(a)嵌合RNA、或者(b)包含crRNA和tracrRNA的两种以上的RNA。

[0045] [9a]如项8所述的方法,其中,RNA引导性核酸酶为Cpf1。

[0046] [10]如项8或项9所述的方法,其中,Cas9为来源于化脓性链球菌的Cas9。

[0047] [11]如项8至项10中任一项所述的方法,其中,细胞为肌细胞。

[0048] [12]如项8至项11中任一项所述的方法,其中,靶基因座包含肌养蛋白基因的核苷酸序列。

[0049] [13]如项8至项12中任一项所述的方法,其中,指导RNA为:

[0050] (1)包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA;或者

[0051] (2) (i)包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii)包含序列号7或序列号8所示的核酸序列的tracrRNA。

[0052] [14]一种靶基因座被改造的细胞,其通过项8至项13中任一项所述的方法得到。

[0053] [15]一种药物,其包含项6所述的组合物。

[0054] [16]如项15所述的药物,其中,

[0055] RNA引导性核酸酶为Cas9;

[0056] 指导RNA为(a)嵌合RNA、或者(b)包含crRNA和tracrRNA的两种以上的RNA。

[0057] [16a]如项15所述的药物,其中,RNA引导性核酸酶为Cpf1。

[0058] [17]如项15或项16所述的药物,其中,Cas9为来源于化脓性链球菌的Cas9。

[0059] [18]如项15至项17中任一项所述的药物,其中,指导RNA为:

[0060] (1)包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA;或者

[0061] (2) (i) 包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii) 包含序列号7或序列号8所示的核酸序列的tracrRNA。

[0062] [19]如项15至项18中任一项所述的药物,其为肌营养不良症的预防/治疗药。

[0063] [20]如项15至项19中任一项所述的药物,其为修复型肌养蛋白产生药。

[0064] [21]一种哺乳动物中的肌营养不良症的预防/治疗方法,其特征在于,对该哺乳动物给药有效量的项6或项7所述的组合物。

[0065] [21a]如项21所述的预防/治疗方法,其中,上述给药为静脉内给药。

[0066] [21b]如项21所述的预防/治疗方法,其中,上述给药为肌肉内给药。

[0067] [22]一种哺乳动物中的修复型肌养蛋白产生方法,其特征在于,对该哺乳动物给药有效量的项6或项7所述的组合物。

[0068] [23]项6或项7所述的组合物在制造肌营养不良症的预防/治疗剂中的应用。

[0069] [24]如项6或项7所述的组合物,其用于肌营养不良症的预防/治疗。

[0070] [25]一种靶基因座被改造的细胞的制造方法,其包括使项1至项7中任一项所述的组合物与细胞接触的步骤。

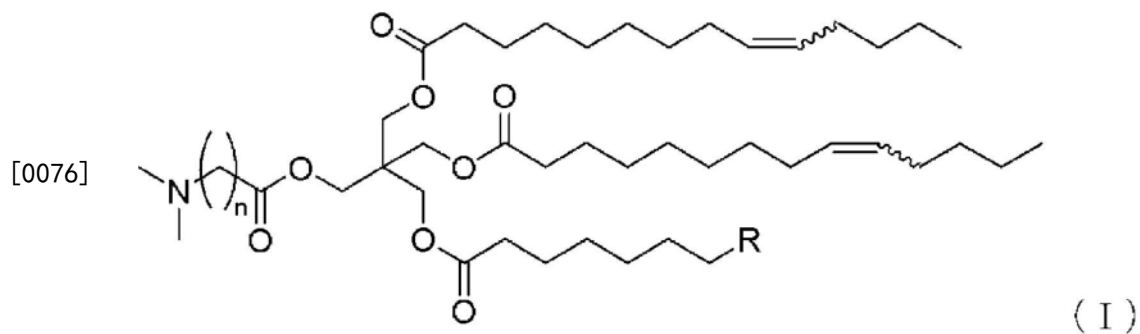
[0071] [26]一种靶基因座被改造的非人哺乳动物的制作方法,其包括:

[0072] (1)使项1至项7中任一项所述的组合物与非人哺乳动物的受精卵、胚胎干细胞或卵母细胞接触的步骤;

[0073] (2)对靶基因座被改造的上述受精卵、胚胎干细胞或卵母细胞进行选择的步骤;和

[0074] (3)将上述选择出的受精卵、胚胎干细胞或卵母细胞移植到非人哺乳动物的雌性动物中的步骤。

[0075] [27]一种用于诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的组合物的制造方法,其包括将脂质粒子分散液与水溶液混合的步骤,上述脂质粒子分散液包含1)式(I)所表示的化合物或其盐和2)结构脂质,上述水溶液包含3)指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸。



[0077] [式(I)中,

[0078] n表示2~5的整数,

[0079] R表示直链状C₁₋₅烷基、直链状C₇₋₁₁烯基或直链状C₁₁链二烯基,波状线各自独立地表示顺式或反式的键。]

[0080] [28]如项27所述的制造方法,其中,上述指导RNA为两种以上的指导RNA。

[0081] 需要说明的是,在本说明书中,有时将“式(I)所表示的化合物”记为“化合物(I)”。有时将“式(I)所表示的化合物或其盐”称为“本发明的化合物”。有时将“含有式(I)所表示的化合物或其盐(本发明的化合物)的脂质粒子”称为“本发明的脂质粒子”。另外,有时将

“指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸”称为“本发明的活性成分”。有时将“指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA”称为“gRNA等”，有时将“RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸”称为“RNA引导性核酸酶等”。有时将含有本发明的化合物、结构脂质、gRNA等和RNA引导性核酸酶等的组合物称为“本发明的组合物”。

[0082] 本发明的脂质粒子的形状没有特别限定，例如包括本发明的化合物等以构成球形的方式集合而成的复合物、以不构成特定形状的方式集合而成的复合物、溶解于溶剂中而成的复合物、均匀或不均匀地分散于分散介质中而成的复合物等。

[0083] 发明效果

[0084] 根据本发明，能够将作为活性成分的CRISPR系统中使用的gRNA等、RNA引导性核酸酶等导入到各种细胞、组织或器官中。

附图说明

[0085] 图1示出实施例1的[1-3]“C57BL/6J小鼠中的使用MmRosa26sgRNA的DNA突变导入效率评价”的结果。[A]示出sgRNA和Cas9 mRNA的各浓度的、电泳图及由其浓度算出的突变(插入/缺失)导入效率。[B]是示出sgRNA和Cas9mRNA的浓度与突变导入效率的关系的图。纵轴表示突变(插入/缺失)导入效率(%),横轴表示sgRNA和Cas9 mRNA的浓度。

[0086] 图2示出关于实施例2的[2-4]“骨骼肌中的DNA突变导入效率评价”的、电泳图及由其浓度算出的突变(插入/缺失)导入效率的结果。

[0087] 图3示出关于实施例2的[2-5]“骨骼肌中的外显子跳读效率评价”的、电泳图及由其浓度算出的外显子跳读效率的结果。

[0088] 图4示出关于实施例2的[2-6]“骨骼肌中的肌养蛋白恢复的评价”的、蛋白免疫印迹及由其浓度算出的肌养蛋白的表达量(肌养蛋白/Gapdh的相对值)的结果。

[0089] 图5示出关于实施例3的[3-4]“人iPS细胞来源成肌细胞中的DNA突变导入效率评价”的、电泳图及由其浓度算出的突变(插入/缺失)导入效率的结果。

[0090] 图6示出关于实施例3的[3-5]“人iPS细胞来源成肌细胞中的外显子跳读效率评价”的、电泳图及由其浓度算出的外显子跳读效率的结果。

[0091] 图7示出关于实施例4的[4-5]“人iPS细胞来源成肌细胞中的外显子跳读效率评价”的、电泳图及由其浓度算出的外显子跳读效率的结果。

[0092] 图8示出关于实施例4的[4-6]“人iPS细胞来源成肌细胞中的肌养蛋白恢复的评价”的、蛋白免疫印迹及由其浓度算出的肌养蛋白的表达量(肌养蛋白/GAPDH的相对值)的结果。

[0093] 图9示出实施例5“LNP静脉内给药时的各种组织中的DNA切割活性评价”中的突变导入效率的结果。

[0094] 图10示出实施例6“使用双sgRNAs的骨骼肌中的外显子跳读效率评价”中的外显子跳读效率的结果。

[0095] 需要说明的是，图4和8中所示的肌养蛋白均表示修复型肌养蛋白(由外显子43与外显子46连接而成的mRNA翻译得到的人肌养蛋白)。

具体实施方式

[0096] 以下,对本说明书中使用的各取代基的定义进行详述。若无特别记载,各取代基具有下述的定义。

[0097] 本说明书中,作为“直链状 C_{1-5} 烷基”,可以列举例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基。

[0098] 本说明书中,作为“直链状 C_{7-11} 烯基”,可以列举例如1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、4-庚烯基、5-庚烯基、6-庚烯基、1-辛烯基、2-辛烯基、3-辛烯基、4-辛烯基、5-辛烯基、6-辛烯基、7-辛烯基、1-壬烯基、2-壬烯基、3-壬烯基、4-壬烯基、5-壬烯基、6-壬烯基、7-壬烯基、8-壬烯基、1-癸烯基、2-癸烯基、3-癸烯基、4-癸烯基、5-癸烯基、6-癸烯基、7-癸烯基、8-癸烯基、9-癸烯基、1-十一碳烯基、2-十一碳烯基、3-十一碳烯基、4-十一碳烯基、5-十一碳烯基、6-十一碳烯基、7-十一碳烯基、8-十一碳烯基、9-十一碳烯基、10-十一碳烯基。这些直链状 C_{7-11} 烯基包含一个碳-碳双键,因此可以形成顺式和反式的结构,可以为任意一种结构。

[0099] 本说明书中,作为“直链状 C_{11} 链二烯基”,可以列举例如1,3-十一碳二烯基、1,4-十一碳二烯基、1,5-十一碳二烯基、1,6-十一碳二烯基、1,7-十一碳二烯基、1,8-十一碳二烯基、1,9-十一碳二烯基、1,10-十一碳二烯基、2,4-十一碳二烯基、2,5-十一碳二烯基、2,6-十一碳二烯基、2,7-十一碳二烯基、2,8-十一碳二烯基、2,9-十一碳二烯基、2,10-十一碳二烯基、3,5-十一碳二烯基、3,6-十一碳二烯基、3,7-十一碳二烯基、3,8-十一碳二烯基、3,9-十一碳二烯基、3,10-十一碳二烯基、4,6-十一碳二烯基、4,7-十一碳二烯基、4,8-十一碳二烯基、4,9-十一碳二烯基、4,10-十一碳二烯基、5,7-十一碳二烯基、5,8-十一碳二烯基、5,9-十一碳二烯基、5,10-十一碳二烯基、6,8-十一碳二烯基、6,9-十一碳二烯基、6,10-十一碳二烯基、7,9-十一碳二烯基、7,10-十一碳二烯基、8,10-十一碳二烯基。这些直链状 C_{11} 链二烯基包含两个碳-碳双键,因此可以分别相互独立地形成顺式和反式的结构,分别可以为任意一种结构。

[0100] 式(I)中的n和波状线的优选例如下所述。

[0101] n优选为3~5的整数,更优选为3。

[0102] 波状线优选为两者均为顺式的键。

[0103] 化合物(I)的优选的具体例如下所述。

[0104] 化合物(A):n为3~5的整数、R为顺式的直链状 C_{7-11} 烯基、波状线两者均为顺式的键的化合物。

[0105] 化合物(B):n为4、R为在2个碳-碳双键两者中均为顺式的直链状 C_{11} 链二烯基、波状线两者均为顺式的键的化合物。

[0106] 化合物(C):n为2或3、R为直链状 C_{1-5} 烷基、波状线两者均为顺式的键的化合物。

[0107] 化合物(I)的更优选的具体例如下所述。

[0108] 化合物(A1):n为3~5的整数、R为顺式的5-庚烯基、7-壬烯基或9-十一碳烯基、波状线两者均为顺式的键的化合物。

[0109] 化合物(B1):n为4、R为在2个碳-碳双键两者中均为顺式的2,5-十一碳二烯基、波状线两者均为顺式的键的化合物。

[0110] 化合物(C1):n为2或3、R为甲基、丙基或戊基、波状线两者均为顺式的键的化合物。

[0111] 化合物(I)的进一步优选的具体例为(9Z)-十四碳-9-烯酸3-((4-(二甲氨基)丁酰

基)氧基)-2,2-双(((9Z,9'Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯。

[0112] 作为化合物(I)的盐,优选为药理学上可接受的盐,可以列举例如与无机碱的盐、与有机碱的盐、与无机酸的盐、与有机酸的盐、与碱性或酸性氨基酸的盐。

[0113] 作为与无机碱的盐的优选例,可以列举:钠盐、钾盐等碱金属盐;钙盐、镁盐等碱土金属盐;铝盐、铵盐。优选为钠盐、钾盐、钙盐、镁盐,更优选为钠盐、钾盐。

[0114] 作为与有机碱的盐的优选例,可以列举与三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇[三(羟甲基)甲胺]、叔丁胺、环己胺、苄胺、二环己胺、N,N-二苄基乙二胺的盐。

[0115] 作为与无机酸的盐的优选例,可以列举与氢氟酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、硫酸、磷酸的盐。优选为与盐酸的盐、与磷酸的盐。

[0116] 作为与有机酸的盐的优选例,可以列举与甲酸、乙酸、三氟乙酸、邻苯二甲酸、富马酸、草酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸的盐。

[0117] 作为与碱性氨基酸的盐的优选例,可以列举与精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸的盐。

[0118] 作为与酸性氨基酸的盐的优选例,可以列举与天冬氨酸、谷氨酸的盐。

[0119] 在本发明的典型实施方式中,本发明的化合物与结构脂质一起形成脂质粒子。该脂质粒子在本发明的组合物中包封有指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸。

[0120] 结构脂质只要是在与本发明的化合物混合而制备混合脂质成分后能够形成脂质粒子的结构脂质,则没有特别限定。作为这样的结构脂质,可以使用例如选自固醇类(例如胆固醇、胆固醇酯、胆固醇半琥珀酸酯等)、磷脂质(例如磷脂酰胆碱(例如二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱、MC-1010(NOF CORPORATION)、MC-2020(NOF CORPORATION)、MC-4040(NOF CORPORATION)等)、磷脂酰丝氨酸(例如二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰丝氨酸、棕榈酰油酰磷脂酰丝氨酸等)、磷脂酰乙醇胺(例如二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰乙醇胺等)、磷脂酰肌醇、磷脂酸等)和聚乙二醇脂质(PEG脂质)(例如PEG-DAA、PEG-DAG、PEG-磷脂结合物、PEG-Cer、PEG-胆固醇、PEG-C-DOMG、2KPEG-CMG、GM-020(NOF CORPORATION)、GS-020(NOF CORPORATION)、GS-050(NOF CORPORATION)等)组成的组中的至少一种。在本发明中,作为结构脂质,优选固醇类(特别是胆固醇)、磷脂质(特别是磷脂酰胆碱)和聚乙二醇脂质这三种全都使用。

[0121] 本发明的组合物中的本发明的化合物与结构脂质的比例可以根据目的适当调节。例如,本发明的组合物中,在由含有本发明的化合物和结构脂质的混合脂质成分形成脂质粒子的情况下,相对于本发明的化合物1摩尔,结构脂质通常为0.008~4摩尔的比例,优选为0.4~1.5摩尔的比例。另外,若采用其他规定的方式,则混合脂质成分中为下述比率:本发明的化合物通常为1~4摩尔,固醇类通常为0~3摩尔,磷脂质通常为0~2摩尔,聚乙二醇脂质通常为0~1摩尔。将本发明的化合物与其他脂质成分混合使用的方式下的更优选的方式为本发明的化合物1~1.5摩尔、固醇类0~1.25摩尔、磷脂质0~0.5摩尔和聚乙二醇脂质0~0.125摩尔的比率。

[0122] 以下,对本发明的活性成分进行说明。

[0123] 本发明中,作为活性成分,使用用于诱导细胞中的靶基因座上的基因改造的物质,具体而言为与CRISPR系统对应的、指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸。另外,关于用于基因改造的与CRISPR系统对应的物质的基本事项是周知的,各种应用事项也是公知的,对于本发明也可以应用这些周知或公知的事项(例如参考上述的现有技术文献)。本领域技术人员可以根据目的对靶基因座、CRISPR系统的各要素进行适当的设计、选择、制造。

[0124] 细胞和靶基因座可以根据基因改造的目的适当选择,没有特别限定,典型地为与基因疾病相关、可作为基因治疗的对象细胞和基因座。

[0125] 本发明的组合物可以用于将活性成分导入到多种细胞、组织或器官中。作为能够应用本发明的细胞,可以列举例如间充质干细胞、神经干细胞、皮肤干细胞、脾细胞、神经细胞、神经胶质细胞、胰岛B细胞、骨髓细胞、系膜细胞、朗格汉斯细胞、表皮细胞、上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞、肌细胞(例如骨骼肌细胞、心肌细胞、成肌细胞、肌卫星细胞、平滑肌细胞)、脂肪细胞、血细胞(例如巨噬细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、白细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨核细胞、造血干细胞)、滑膜细胞、软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、乳腺细胞、肝细胞或间质细胞、卵细胞、精细胞、或者可分化诱导为这些细胞的前体细胞、干细胞(例如包括诱导性多能干细胞(iPS细胞)、胚胎干细胞(ES细胞)、原始生殖细胞、卵母细胞、受精卵。另外,作为能够应用本发明的组织或器官,可以列举存在上述细胞的所有组织或器官,例如脑、脑的各部位(例如嗅球、扁桃核、大脑基底核、海马、丘脑、下丘脑、丘脑底核、大脑皮质、延髓、小脑、枕叶、额叶、颞叶、壳核、尾状核、胼胝体、黑质)、脊髓、下垂体、胃、胰腺、肾脏、肝脏、生殖腺、甲状腺、胆囊、骨髓、肾上腺、皮肤、肺、消化道(例如大肠、小肠)、血管、心脏、胸腺、脾脏、颌下腺、外周血、外周血细胞、前列腺、胎盘、子宫、骨、关节和肌肉等。这些细胞、组织或器官可以为发生了癌化的癌细胞、癌组织等。

[0126] 在本发明的一个优选实施方式中,细胞优选为肌细胞(例如心肌细胞、骨骼肌细胞、肌卫星细胞)、成纤维细胞、间充质干细胞、血细胞或iPS细胞,更优选为肌细胞(尤其是骨骼肌细胞或肌卫星细胞)。作为肌细胞,可以列举例如从人(患者或健康人)或其他哺乳动物(例如非人灵长类(食蟹猴、恒河猴、黑猩猩等)、牛、猪、小鼠、大鼠等疾病模型动物)采集的肌细胞、从活体(例如:人活体内)的肌细胞、肌细胞株和干细胞(例如iPS细胞、ES细胞)分化诱导的肌细胞。

[0127] 在本发明的一个优选实施方式中,靶基因座包含肌养蛋白基因的核苷酸序列。

[0128] 肌养蛋白基因是存在于X染色体上的超过220万个碱基的巨大基因。根据转录起始点的不同,存在各种同种型,已知在全身表达的Dp71、在末梢神经细胞中表达的Dp116、在脑和肾脏中表达的Dp140、在视网膜中表达的Dp260、在浦肯野神经细胞中表达的Dp417p、在脑中表达的Dp427b、以及在骨骼肌中表达的Dp427m等。其中,由Dp427m同种型产生的肌养蛋白是主要在肌细胞内表达的蛋白质,其利用存在于N末端侧的肌动蛋白结合结构域与细胞骨架肌动蛋白结合并利用存在于C末端侧的富含半胱氨酸结构域与肌营养不良蛋白聚糖复合物也结合,与肌动蛋白一起构成细胞骨架。Dp427m同种型的肌养蛋白基因由79个外显子构成。

[0129] 在杜氏肌营养不良症患者(患者)的情况下,由于具有肌养蛋白基因的任意一个外显子的

缺失或重复突变、或者由于外显子中的碱基的点突变(无义突变)或插入缺失突变(移码突变),几乎不表达功能性的肌养蛋白(在基于蛋白免疫印迹法的检测中蛋白质量为健康人的3%以下)。另一方面,在与杜氏肌营养不良症相比为轻症的贝氏肌营养不良症的患者情况下,即使存在外显子的缺失或碱基的点突变,在中途不产生终止密码子的情况下,也可表达氨基酸序列比正常的肌养蛋白短、或者一部分氨基酸被置换的肌养蛋白。

[0130] 作为肌养蛋白基因的突变,在杜氏肌营养不良症和贝氏肌营养不良症中,单个或多个外显子的缺失占一半以上。特别是作为常见缺失的部位,已知外显子44与外显子55之间。根据肌养蛋白基因的缺失外显子的部位,通过参考例如已经报道的论文等(例如van Deutekom JC, van Ommen GJ., Nat Rev Genet. 2003),可以确认以哪个外显子作为对象来进行外显子跳读时能够表达适当的修复型肌养蛋白。另外,作为使用基因组编辑的修复型肌养蛋白的表达方法,除了外显子跳读以外,也可以通过在肌养蛋白基因中导入微小缺失或插入而调节读码框的方法、或者利用同源重组等插入缺失的外显子的方法来实施。

[0131] 在上述的肌养蛋白基因产生异常的情况下,可以通过下述中的任意一种操作对该异常进行修正:(i)不使1个或2个以上的外显子整合到mRNA中(跳读),由此按照不产生移码的方式使其前后的外显子彼此连接;(ii)通过插入或缺失1个或2个以上的碱基而对移码进行修正;(iii)敲入缺失的外显子;等等。在上述(i)或(ii)的情况下,产生氨基酸序列比正常的肌养蛋白短或长、或者一部分氨基酸被置换的肌养蛋白。另外,通过上述(ii)或(iii),也能够产生正常的肌养蛋白。通过这样的肌养蛋白基因的修正,能够预防或治疗肌营养不良症等疾病。

[0132] 人的肌养蛋白基因的核苷酸序列例如可以从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)获得(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1756>)。

[0133] 指导RNA可以是crRNA与tracrRNA连接而成的一条RNA的形态、即嵌合RNA(有时也称为单指导RNA、sgRNA等),也可以是未连接的分别各一条的RNA(两条RNA的组合、或条数为两条以上的RNA的组合)的形态。本发明的组合物可以以RNA本身的形态包含这样的指导RNA,也可以以包含编码指导RNA的序列的DNA(表达质粒等)的形态包含这样的指导RNA。

[0134] 指导RNA可以是以一个碱基序列为靶标的形态(一条sgRNA、或者一组的crRNA和tracrRNA),也可以是以两个以上的碱基序列为靶标的形态(两条以上的sgRNA、或者两组以上的crRNA和tracrRNA)。在本说明书中,有时按照作为靶标的各碱基序列记载为指导RNA的“种类”。因此,在本说明书中,有时将以两个以上的碱基序列作为靶标的形态中的指导RNA记为“两种以上的指导RNA”。指导RNA优选为两种或两种以上。

[0135] 在使用两种以上的指导RNA的情况下,这些指导RNA的靶碱基序列间的距离没有特别限定,但优选两个指导RNA的靶序列不重叠。另外,两个指导RNA的靶序列优选相距一个碱基以上。

[0136] 在使用两种指导RNA的情况下,利用使用这两种指导RNA的CRISPR系统而产生的DNA切割部位优选包含要诱导基因改造的细胞中的靶基因座或靶基因座上的特定碱基序列。此时,包含碱基序列是指,在该碱基序列的上游和下游存在DNA切割部位。

[0137] 在使用两种指导RNA的情况下,作为两种指导RNA的靶序列,没有特别限定,例如可以设定为序列号3和序列号4的靶识别序列所杂交的碱基序列。

[0138] 本发明的crRNA包含与细胞中的靶基因座上的特定碱基序列(本说明书中有时称为“靶序列”)杂交的、约18个碱基~约20个碱基的核酸序列(本说明书中有时称为“靶识别序列”)。作为靶识别序列,优选序列号3或序列号4所示的核酸序列。在本发明的一个优选实施方式中,crRNA包含序列号3或序列号4所示的核酸序列。另外,在本发明的一个优选实施方式中,crRNA包含序列号5或序列号6所示的核酸序列。靶序列与由CRISPR系统识别的短序列(PAM(前间隔序列邻近基序))相邻。PAM的序列和长度的条件根据所使用的核酸酶的种类而不同,典型地,PAM为与靶序列相邻的2~5个碱基对序列。

[0139] 在本发明的一个优选实施方式中,指导RNA为包含序列号1或序列号2所示的核酸序列的嵌合RNA(sgRNA)。

[0140] 在本发明的一个优选实施方式中,指导RNA为(i)包含序列号3或序列号4所示的核酸序列的crRNA、和(ii)包含序列号7或序列号8所示的核酸序列的tracrRNA的组合。

[0141] 序列号1:实施例“HsDMDEx45#1”对应sgRNA全序列

[0142] 5' -U(M)^ˆG(M)^ˆG(M)^ˆUAUCUUACAGGAACUCCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^ˆU(M)^ˆG(M)^ˆC-3'

[0143] 序列号2:实施例“HsDMDEx45#23”对应sgRNA全序列

[0144] 5' -A(M)^ˆG(M)^ˆC(M)^ˆUGUCAGACAGAAAAAGGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^ˆU(M)^ˆG(M)^ˆC-3'

[0145] 序列号3:序列号1的靶识别序列

[0146] 5' -U(M)^ˆG(M)^ˆG(M)^ˆUAUCUUACAGGAACUCC-3'

[0147] 序列号4:序列号2的靶识别序列

[0148] 5' -A(M)^ˆG(M)^ˆC(M)^ˆUGUCAGACAGAAAAAG-3'

[0149] 序列号5:序列号1的crRNA序列

[0150] 5' -U(M)^ˆG(M)^ˆG(M)^ˆUAUCUUACAGGAACUCCGUUUUAGAG CUA-3'

[0151] 序列号6:序列号2的crRNA序列

[0152] 5' -A(M)^ˆG(M)^ˆC(M)^ˆUGUCAGACAGAAAAAGGUUUUAGAG CUA-3'

[0153] 序列号7:序列号1的tracrRNA序列

[0154] 5' -UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^ˆU(M)^ˆG(M)^ˆC-3'

[0155] 序列号8:序列号2的tracrRNA序列

[0156] 5' -UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^ˆU(M)^ˆG(M)^ˆC-3'

[0157] 序列号1~8中,“(M)”右边相邻所示的核糖可以为天然的(未被修饰的)核糖,也可以为2'-O-甲基核糖或其他修饰核糖,优选为2'-O-甲基核糖。

[0158] 另外,序列号1~8中,“~”所表示的2'-O-甲基核糖彼此的键或2'-O-甲基核糖与核糖的键可以为磷酸二酯键,也可以为硫代磷酸酯键,优选为硫代磷酸酯键。

[0159] 本发明的靶识别序列具有与上述的序列号3和4中任一者所表示的核酸序列实质上相同的序列。另外,本发明的crRNA和嵌合RNA(sgRNA)在靶识别序列以外的序列中具有与上述的序列号1、2、5和6中任一者所表示的核酸序列实质上相同的序列。另外,本发明的tracrRNA具有与上述的序列号7和8中任一者所表示的核酸序列实质上相同的序列。在此,

“实质上相同的序列”是指具有至少约75%的序列一致性的序列。因此,本发明的靶识别序列、crRNA、tracrRNA、嵌合RNA (sgRNA) 与如上所述分别对应的序列号所示的序列可以具有至少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%或100%的序列一致性。序列一致性优选为至少85%或90%,更优选为至少95%或97%,特别优选为至少99%。

[0160] 术语“序列一致性”是指,将两个基因序列以该碱基对的一致达到最大的方式对齐时在两个序列间一致的碱基对的比例(%)。

[0161] 序列一致性可以通过本领域技术人员公知的任意方法来确定。例如,可以通过由Higgins等人提出的多序列比对程序Clustal (Gene 73,1,237-244,1988) 来确定。Clustal程序例如可在欧洲生物信息研究所 (European Bioinformatics Institute (EBI)) 的互联网的网站利用。

[0162] 作为本发明中使用的RNA引导性核酸酶,可以列举例如RNA引导性内切核酸酶。

[0163] RNA引导性内切核酸酶包含至少一个核酸酶结构域和至少一个与gRNA相互作用的结构域。RNA引导性内切核酸酶由gRNA引导至基因组的靶部位。

[0164] RNA引导性内切核酸酶可以来源于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats:CRISPR) /CRISPR-相关 (Cas) 系统。CRISPR/Cas系统可以为1类中的I型、III型、IV型或者2类中的II型、V型和VI型系统。适当的CRISPR/Cas蛋白的非限定性示例包括:Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (或CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a (或Cpf1)、Cas12b (或C2c1)、Cas12c、Cas13a1 (或C2c2)、Cas13a2、Cas13b、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (或CasA)、Cse2 (或CasB)、Cse3 (或CasE)、Cse4 (或CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cu1966。

[0165] 在一个方式中, RNA引导性内切核酸酶来源于2类II型的CRISPR/Cas系统。在特定的方式中, RNA引导性内切核酸酶来源于Cas9蛋白。Cas9蛋白可以来源于化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、达松维尔拟诺卡氏菌 (*Nocardiosis dassonvillei*)、始旋链霉菌 (*Streptomyces pristinaespiralis*)、产绿色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*)、玫瑰链孢囊菌 (*Streptosporangium roseum*)、酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、假蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus pseudomycoides*)、还原硒酸盐芽孢杆菌 (*Bacillus selenitireducens*)、西伯利亚微小杆菌 (*Exiguobacterium sibiricum*)、新凶手弗朗西斯菌 (*Francisella novicida*)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、海洋微颤菌 (*Microscilla marina*)、伯克氏细菌、萘降解极地单胞菌 (*Polaromonas naphthalenivorans*)、极地单胞菌属 (*Polaromonas* sp.)、瓦氏鳄球藻 (*Crocospaera watsonii*)、蓝杆藻属 (*Cyanothece* sp.)、铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、聚球藻属 (*Synechococcus* sp.)、阿拉伯糖醋盐杆菌 (*Acetohalobium arabaticum*)、丹氏制氨菌 (*Ammonifex degensii*)、热解纤维素菌

(*Caldicellulosiruptor becsii*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitides*)、金矿菌(*Candidatus Desulforudis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、大芬戈尔德菌(*Fingoldia magna*)、嗜热盐碱厌氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)、热丙酸盐暗色厌氧香肠状菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)、喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)、氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、酒色别样着色菌(*Allochromatium vinosum*)、海杆菌属(*Marinobacter* sp.)、嗜盐亚硝化球菌(*Nitrosococcus halophilus*)、瓦氏亚硝化球菌(*Nitrosococcus watsoni*)、游海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、消旋纤线杆菌(*Ktedonobacter racemifer*)、调查甲烷盐菌(*Methanohalobium evestigatum*)、多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)、泡沫节球藻(*Nodularia spumigena*)、念珠藻属(*Nostoc* sp.)、极大节旋藻(*Arthrospira maxima*)、钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)、节旋藻属(*Arthrospira* sp.)、鞘丝藻属(*Lyngbya* sp.)、原型微鞘藻(*Microcoleus chthonoplastes*)、颤藻属(*Oscillatoria* sp.)、运动石袍菌(*Petrotoga mobilis*)、非洲栖热腔菌(*Thermosiphon africanus*)或深海单细胞蓝藻(*Acaryochloris marina*)。

[0166] 在一个方式中, RNA引导性内切核酸酶来源于2类V型的CRISPR-Cas12a/Cpf1系统。在特定的方式中, RNA引导性内切核酸酶来源于Cpf1蛋白。Cpf1蛋白可以来源于氨基酸球菌属(*Acidaminococcus*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、新凶手弗朗西斯菌(*Francisella novicida*)。

[0167] CRISPR/Cas蛋白可以为野生型CRISPR/Cas蛋白、修饰型CRISPR/Cas蛋白、或者野生型或修饰型CRISPR/Cas蛋白的片段。CRISPR/Cas蛋白可以为了增加核酸结合亲和性和/或特异性、改变酶活性、或者改变蛋白质的其他特性而进行了修饰。

[0168] RNA引导性核酸酶可以为Cas核酸酶或Cas切口酶。在此, Cas核酸酶或Cas切口酶是指CRISPR/Cas系统中必需的蛋白质成分, 是指在与被称为CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活crRNA (tracrRNA) 的两种RNA形成复合物的情况下具有活性的内切核酸酶或切口酶。切口酶是指仅在一个DNA链中切出切口(nick)的DNA切割酶。通常, Cas9蛋白包含至少两个核酸酶(即, DNase)结构域。例如, Cas9蛋白可以包含RuvC样核酸酶结构域和HNH样核酸酶结构域。RuvC和HNH结构域为了在DNA中进行双链的切割而协作地对单链进行切割(Jinek et al., *Science*, 337:816-821)。在某一方式中, 来源于Cas9的蛋白质可以以仅包含一个功能性核酸酶结构域(RuvC样或HNH样核酸酶结构域中的任意一者)的方式进行修饰。例如, 来源于Cas9的蛋白质可以以发生缺失或突变以使核酸酶结构域中的一个已不发挥功能(即, 不具有核酸酶活性)的方式进行修饰。在核酸酶结构域中的一个为非活性的方式中, 来源于Cas9的蛋白质可以在双链核酸中导入切口, 但无法将双链DNA切断。例如, RuvC样结构域中的天冬氨酸向丙氨酸的转换(D10A)是将来源于Cas9的蛋白质转换为切口酶。同样地, HNH结构域中的组氨酸向丙氨酸的转换(H840A或H839A)是将来源于Cas9的蛋白质转换为切口酶。各核酸酶结构域可以使用定点诱变法、PCR介导的诱变法和全基因合成、以及该技术领域中公知的其他方法等周知的方法进行修饰。

[0169] RNA引导性核酸酶可以使用特别是来源于链球菌属菌(*Streptococcus* sp.)或葡萄球菌属菌(*Staphylococcus* sp.)、新凶手弗朗西斯菌(*Francisella novicida*)、空肠弯

曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 的Cas核酸酶或Cas切口酶。其中,作为来源物,在链球菌属菌中优选化脓性链球菌 (*S. pyogenes*),在葡萄球菌属菌中优选金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)。来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶或Cas9切口酶识别NGG或NAG三核苷酸作为PAM序列。

[0170] 本发明的组合物可以以蛋白质的形态包含这样的RNA引导性核酸酶,也可以以包含编码该蛋白质的氨基酸序列的碱基序列的核酸(mRNA或表达质粒等DNA等)的形态包含这样的RNA引导性核酸酶。

[0171] 作为RNA引导性核酸酶,优选Cas9。在本发明的一个优选实施方式中,Cas9为来源于化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) 的Cas9 (SpCas9)。作为Cas9,已知来源于各种细菌或古细菌的Cas9,在本发明中,除了SpCas9以外,还可以使用例如来源于金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的Cas9 (SaCas9) 等具有所期望的核酸酶活性的Cas9。

[0172] 本发明的组合物中的、本发明的活性成分相对于本发明的化合物和结构脂质(或由它们形成的脂质粒子)的比例可以根据目的和活性成分的种类适当调节。例如,本发明的组合物中,在由含有本发明的化合物和结构脂质的混合脂质成分形成脂质粒子、作为本发明的活性成分的RNA被包封于该脂质粒子中的情况下,相对于脂质粒子的质量(即,本发明的化合物和结构脂质的合计质量),本发明的活性成分通常为1~20质量%、优选为2~10质量%的比例。

[0173] “RNA”(核糖核酸)、“DNA”(脱氧核糖核酸)和“核酸”可以仅包含天然的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸,也可以根据需要除它们以外还包含为了提高核酸酶耐性、使其稳定化、提高与互补性核酸的亲水性、提高细胞穿透性等而对这些分子的部分结构进行了修饰的核苷酸类似物。作为核苷酸类似物,可以列举例如糖部修饰核苷酸(2'-O-甲基核糖、2'-O-丙基核糖、2'-O-甲氧基乙氧基核糖、2'-O-甲氧基乙基核糖、2'-O-[2-(胍)乙基]核糖、2'-O-氟核糖等);桥接结构型人造核酸(BNA)(锁型人造核酸(LNA)、乙烯桥接结构型人造核酸(ENA)等);磷酸二酯键修饰核苷酸(磷酸二酯键被取代为硫代磷酸酯键的取代体、磷酸二酯键被取代为N3'-P5' 磷酰胺酯键的取代体等)。另外,核酸可以为5'-多胺附加衍生物、胆固醇附加衍生物、类固醇附加衍生物、胆汁酸附加衍生物、维生素附加衍生物、荧光色素附加衍生物、生物素附加衍生物等。“RNA”、“DNA”和“核酸”可以为单链,也可以为双链。

[0174] 在本发明的一个实施方式中,优选指导RNA的至少一部分为上述核苷酸类似物。作为核苷酸类似物,优选糖部修饰核苷酸和磷酸二酯键修饰核苷酸,更具体而言,优选2'-O-甲基核糖和磷酸二酯键被取代为硫代磷酸酯键的取代体。指导RNA中,优选至少序列的3'和5'的两末端的各一个碱基为核苷酸类似物,更优选至少序列的3'和5'的两末端的各两个碱基或各三个碱基为核苷酸类似物。

[0175] 在指导RNA为嵌合RNA的情况下,优选至少其序列的3'和5'的两末端的各一个碱基为核苷酸类似物,在未连接的分别各一条的RNA(两条RNA的组合)或条数为两条以上的RNA的形态的情况下,优选至少各RNA的序列的3'和5'的两末端的各一个碱基为核苷酸类似物(例如优选使crRNA的3'和5'的两末端和tracrRNA的3'和5'的两末端为核苷酸类似物)。

[0176] 在指导RNA等和RNA引导性核酸酶等均为表达质粒等基因构建物的形态的情况下,编码指导RNA的序列和编码RNA引导性核酸酶蛋白的序列这两者可以包含在一个基因构建物中,这些序列也可以包含在分开的基因构建物中。另外,基因构建物可以根据需要包含启动子、增强子、起始密码子、终止密码子、多聚腺苷化信号、核定位信号(NLS)、药剂选择基

因、报告基因等的序列。

[0177] 本发明的组合物可以为下述中的任意一种实施方式：(i) 仅包含指导RNA等(指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA)而不包含RNA引导性核酸酶等(RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸)的实施方式；(ii) 不包含指导RNA等而仅包含RNA引导性核酸酶等的实施方式；(iii) 包含指导RNA等和RNA引导性核酸酶等这两者的实施方式。在包含指导RNA等的情况下，该指导RNA可以为一种，也可以为两种或两种以上。在本发明的组合物的一个方式中，优选为两种或两种以上的指导RNA。

[0178] 本发明中，组合物中的脂质粒子可以仅包封有CRISPR系统所需的多个要素中的一种，也可以包封有多种(例如gRNA和Cas9的mRNA)。在脂质粒子包封多个要素的情况下，例如在其制造时使用以适当的浓度(比率)含有各要素的水溶液即可。

[0179] 本发明的组合物可以包含两种以上的包封一种要素的脂质粒子。例如，可以将仅包封gRNA的脂质粒子和包封Cas9的mRNA的脂质粒子在组合物中混合。在将包封一种要素的脂质粒子混合两种以上的情况下，考虑基因的改造效率等将各要素设定为适当的浓度(比率)即可。

[0180] 在本发明的一个实施方式中，包封gRNA等的脂质粒子和包封RNA引导性核酸酶等的脂质粒子可以通过同一组合物(混合溶液)添加到细胞中，或者通过分开的组合物添加到细胞中。

[0181] 在本发明的一个实施方式中，将包含包封gRNA等和RNA引导性核酸酶等这两者的脂质粒子的本发明的组合物添加到细胞中。

[0182] 本发明的化合物、脂质粒子和组合物稳定且毒性低，可以安全地使用。在将本发明的组合物在生物体内使用的情况下或作为药物使用的情况下，对于给药对象(人或非人哺乳动物、优选人)，按照有效量的本发明的组合物中的活性成分被递送至靶细胞的方式给药该组合物即可。

[0183] 在将本发明的组合物在生物体外使用的情况下或作为试剂使用的情况下，将其添加到培养基中等，使本发明的组合物(特别是其中包含的包封活性成分的脂质粒子)与被培养中的细胞接触，由此使有效量的活性成分转移到细胞内即可。

[0184] 本发明的组合物中的活性成分(指导RNA等和RNA引导性核酸酶等)的浓度可以根据组合物的用途适当调节，没有特别限定。例如，在生物体外使用本发明的组合物的情况下，可以预先以高浓度含有活性成分的组合物(例如脂质体)的形式来保存，用适当的溶剂稀释至适当的浓度来制备组合物，或者添加到培养基等中，以使其能够使用。例如，添加了包封有本发明的活性成分的脂质粒子的培养基(培养液)也是本发明的组合物的一个实施方式，该培养基中的包封在脂质粒子中的活性成分的浓度也可以适当调节。

[0185] 以下，对本发明的化合物的制造方法进行说明。

[0186] 以下的制造方法中的各步骤中使用的原料、试剂以及所得到的化合物可以分别形成盐。作为这样的盐，可以列举例如与上述的本发明的化合物中的盐同样的盐。

[0187] 在各步骤中得到的化合物为游离化合物的情况下，可以利用公知的方法转换为目标盐。相反地，在各步骤中得到的化合物为盐的情况下，可以利用公知的方法转换为游离体或作为目标的其他种类的盐。

[0188] 各步骤中得到的化合物可以直接以反应液的形式用于下一反应、或者以粗产物的

形式得到后用于下一反应,或者也可以按照常规方法通过浓缩、结晶、重结晶、蒸馏、溶剂萃取、分馏、色谱等分离手段将各步骤中得到的化合物从反应混合物中进行分离和/或纯化。

[0189] 在各步骤的原料、试剂的化合物有市售的情况下,可以直接使用市售品。

[0190] 在各步骤的反应中,反应时间可以根据所使用的试剂、溶剂而不同,在没有特别记载的情况下,通常为1分钟~48小时、优选为10分钟~8小时。

[0191] 在各步骤的反应中,反应温度可以根据所使用的试剂、溶剂而不同,在没有特别记载的情况下,通常为-78℃~300℃、优选为-78℃~150℃。

[0192] 在各步骤的反应中,压力可以根据所使用的试剂、溶剂而不同,在没有特别记载的情况下,通常为1个大气压~20个大气压、优选为1个大气压~3个大气压。

[0193] 在各步骤的反应中,例如有时使用Biotage公司制造的Initiator等微波合成装置。反应温度可以根据所使用的试剂、溶剂而不同,在没有特别记载的情况下,通常为室温~300℃、优选为室温~250℃、更优选为50℃~250℃。反应时间可以根据所使用的试剂、溶剂而不同,在没有特别记载的情况下,通常为1分钟~48小时、优选为1分钟~8小时。

[0194] 在各步骤的反应中,在没有特别记载的情况下,试剂相对于基质使用0.5当量~20当量、优选使用0.8当量~5当量。在将试剂作为催化剂使用的情况下,试剂相对于基质使用0.001当量~1当量、优选使用0.01当量~0.2当量。在试剂兼作反应溶剂的情况下,试剂使用溶剂量。

[0195] 在各步骤的反应中,在没有特别记载的情况下,这些反应在无溶剂下进行或者溶解或悬浮于适当的溶剂中进行。作为溶剂的具体例,可以列举实施例记载的溶剂或下述的溶剂。

[0196] 醇类:甲醇、乙醇、异丙醇、异丁醇、叔丁醇、2-甲氧基乙醇等;

[0197] 醚类:乙醚、二异丙醚、二苯醚、四氢呋喃、1,2-二甲氧基乙烷等;

[0198] 芳香族烃类:氯苯、甲苯、二甲苯等;

[0199] 饱和烃类:环己烷、己烷、庚烷等;

[0200] 酰胺类:N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮等;

[0201] 卤代烃类:二氯甲烷、四氯化碳等;

[0202] 腈类:乙腈等;

[0203] 亚砷类:二甲基亚砷等;

[0204] 芳香族有机碱类:吡啶等;

[0205] 酸酐类:乙酸酐等;

[0206] 有机酸类:甲酸、乙酸、三氟乙酸等;

[0207] 无机酸类:盐酸、硫酸等;

[0208] 酯类:乙酸乙酯、乙酸异丙酯等;

[0209] 酮类:丙酮、甲乙酮等;

[0210] 水。

[0211] 上述溶剂可以以适当的比例混合使用两种以上。

[0212] 在各步骤的反应中使用碱的情况下,例如使用以下所示的碱或者实施例记载的碱。

[0213] 无机碱类:氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化镁等;

- [0214] 碱性盐类:碳酸钠、碳酸钙、碳酸氢钠等;
- [0215] 有机碱类:三乙胺、二乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶、N,N-二甲基苯胺、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷、1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯、咪唑、哌啶等;
- [0216] 金属醇盐类:乙醇钠、叔丁醇钾、叔丁醇钠等;
- [0217] 碱金属氢化物类:氢化钠等;
- [0218] 金属酰胺类:酰胺钠、二异丙基酰胺锂、六甲基二硅基氨基锂等;
- [0219] 有机锂类:正丁基锂、仲丁基锂等。
- [0220] 在各步骤的反应中使用酸或酸性催化剂的情况下,例如使用以下所示的酸或酸性催化剂、或者实施例记载的酸或酸性催化剂。
- [0221] 无机酸类:盐酸、硫酸、硝酸、氢溴酸、磷酸等;
- [0222] 有机酸类:乙酸、三氟乙酸、柠檬酸、对甲苯磺酸、10-樟脑磺酸等;
- [0223] 路易斯酸:三氟化硼乙醚络合物、碘化锌、无水氯化铝、无水氯化锌、无水氯化铁等。
- [0224] 若无特别记载,各步骤的反应依照公知的方法、例如第5版实验化学讲座、13卷~19卷(日本化学会编);新实验化学讲座、14卷~15卷(日本化学会编);精密有机化学修订第2版(L.F.Tietze, Th.Eicher、南江堂);修订有机人名反应其机理和要点(东乡秀雄著、讲谈社);有机合成汇编(ORGANICSYNTHESSES Collective)I~VII卷(John Wiley&SonsInc);实验室现代有机合成标准实验步骤汇编(Modern Organic Synthesis in the Laboratory A Collection of Standard Experimental Procedures)(Jie Jack Li著、牛津大学出版);综合杂环化学(Comprehensive Heterocyclic Chemistry)III, Vol.1~Vol.14(爱思唯尔日本株式会社);从人名反应学到的有机合成策略(人名反応に学ぶ有機合成戦略)(富冈清监译、化学同人发行);综合有机转化(VCH出版社)1989年刊等中记载的方法、或者实施例记载的方法进行。
- [0225] 在各步骤中,官能团的保护或脱保护反应依照公知的方法、例如Wiley-Interscience公司2007年刊“有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis),第四版”(Theodora W.Greene, Peter G.M.Wuts著);Thieme公司2004年刊“保护基(Protecting Groups)第三版”(P.J.Kocienski著)等中记载的方法、或者实施例记载的方法进行。
- [0226] 作为醇等的羟基或酚性羟基的保护基,可以列举例如:甲氧基甲基醚、苄基醚、对甲氧基苄基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、叔丁基二苯基甲硅烷基醚、四氢吡喃醚等醚型保护基;乙酸酯等羧酸酯型保护基;甲磺酸酯等磺酸酯型保护基;碳酸叔丁酯等碳酸酯型保护基等。
- [0227] 作为醛的羰基的保护基,可以列举例如:二甲基缩醛等缩醛型保护基;环状1,3-二氧杂环己烷等环状缩醛型保护基等。
- [0228] 作为酮的羰基的保护基,可以列举例如:二甲基缩酮等缩酮型保护基;环状1,3-二氧杂环己烷等环状缩酮型保护基;0-甲基脞等脞型保护基;N,N-二甲基脞等脞型保护基等。
- [0229] 作为羧基的保护基,可以列举例如:甲基酯等酯型保护基;N,N-二甲基酰胺等酰胺型保护基等。
- [0230] 作为硫醇的保护基,可以列举例如:苄基硫醚等醚型保护基;硫代乙酸酯、硫代碳

酸酯、硫代氨基甲酸酯等酯型保护基等。

[0231] 作为氨基或咪唑、吡咯、吡啶等芳香族杂环的保护基,可以列举例如:苄基氨基甲酸酯等氨基甲酸酯型保护基;乙酰胺等酰胺型保护基;N-三苯基甲胺等烷基胺型保护基、甲砒酰胺等砒酰胺型保护基等。

[0232] 保护基的除去可以使用公知的方法、例如使用酸、碱、紫外光、肼、苯肼、N-甲基二硫代氨基甲酸钠、四丁基氟化铵、乙酸钡、三烷基卤代硅烷(例如三甲基碘代硅烷、三甲基溴代硅烷)的方法或还原法等来进行。

[0233] 在各步骤中进行还原反应的情况下,作为所使用的还原剂,可以列举:氢化锂铝、三乙酰氧基硼氢化钠、氰基硼氢化钠、二异丁基氢化铝(DIBAL-H)、硼氢化钠、四甲基三乙酰氧基硼氢化铵等金属氢化物类;硼烷四氢呋喃络合物等硼烷类;雷尼镍;雷尼钴;氢气;甲酸等。例如,在氢气或甲酸存在下,可以使用雷尼镍或雷尼钴。在对碳-碳双键或三键进行还原的情况下,有使用钯碳或林德拉(Lindlar)催化剂等催化剂的方法。

[0234] 在各步骤中进行氧化反应的情况下,作为所使用的氧化剂,可以列举:间氯过氧苯甲酸(MCPBA)、过氧化氢、叔丁基过氧化氢等过氧酸类;高氯酸四丁基铵等高氯酸盐类;氯酸钠等氯酸盐类;亚氯酸钠等亚氯酸盐类;高碘酸钠等高碘酸盐类;亚碘酰苯等高原子价碘试剂;二氧化锰、高锰酸钾等含有锰的试剂;四乙酸铅等铅类;氯铬酸吡啶盐(PCC)、二铬酸吡啶盐(PDC)、琼斯试剂等含有铬的试剂;N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)等卤素化合物类;氧气;臭氧;三氧化硫-吡啶络合物;四氧化锇;二氧化硒;2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌(DDQ)等。

[0235] 在各步骤中进行自由基环化反应的情况下,作为所使用的自由基引发剂,可以列举:偶氮二异丁腈(AIBN)等偶氮化合物;4-4'-偶氮二(4-氰基戊酸)(ACPA)等水溶性自由基引发剂;空气或氧气存在下的三乙基硼;过氧化苯甲酰等。另外,作为所使用的自由基反应试剂,可以列举三丁基锡烷、三(三甲基甲硅烷基)硅烷、1,1,2,2-四苯基二硅烷、二苯基硅烷、碘化钆等。

[0236] 在各步骤中进行维蒂希(Wittig)反应的情况下,作为所使用的维蒂希试剂,可以列举亚烷基磷烷类等。亚烷基磷烷类可以利用公知的方法、例如使磷盐与强碱反应来制备。

[0237] 在各步骤中进行霍纳尔-埃蒙斯(Horner-Emmons)反应的情况下,作为所使用的试剂,可以列举:二甲基膦酰基乙酸甲酯、二乙基膦酰基乙酸乙酯等膦酰基乙酸酯类;碱金属氢化物类、有机锂类等碱。

[0238] 在各步骤中进行傅列德尔-克拉夫茨(Friedel-Crafts)反应的情况下,作为所使用的试剂,可以列举路易斯酸与酰氯或烷基化剂(例如卤代烷烃类、醇、烯烃类等)。或者,也可以使用有机酸、无机酸代替路易斯酸,使用乙酸酐等酸酐代替酰氯。

[0239] 在各步骤中进行芳香族亲核取代反应的情况下,作为试剂,使用亲核剂(例如胺类、咪唑等)和碱(例如碱性盐类、有机碱类等)。

[0240] 在各步骤中进行基于碳阴离子的亲核加成反应、基于碳阴离子的亲核1,4-加成反应(迈克尔(Michael)加成反应)、或者基于碳阴离子的亲核取代反应的情况下,作为用于产生碳阴离子的碱,可以列举有机锂类、金属醇盐类、无机碱类、有机碱类等。

[0241] 在各步骤中进行格利雅(Grignard)反应的情况下,作为格利雅试剂,可以列举苯基溴化镁等芳基卤化镁类;甲基溴化镁、异丙基溴化镁等烷基卤化镁类。格利雅试剂可以利用公知的方法、例如以醚或四氢呋喃为溶剂使卤代烷烃或卤代芳烃与金属镁反应来制备。

[0242] 在各步骤中进行克脑文盖尔(Knoevenagel)缩合反应的情况下,作为试剂,使用被两个吸电子基团夹持的活性亚甲基化合物(例如丙二酸、丙二酸二乙酯、丙二腈等)和碱(例如有机碱类、金属醇盐类、无机碱类)。

[0243] 在各步骤中进行维尔斯迈尔-哈克(Vilsmeier-Haack)反应的情况下,作为试剂,使用磷酰氯和酰胺衍生物(例如N,N-二甲基甲酰胺等)。

[0244] 在各步骤中进行醇类、卤代烷烃类、磺酸酯类的叠氮化反应的情况下,作为所使用的叠氮化剂,可以列举叠氮磷酸二苯酯(DPPA)、三甲基硅叠氮、叠氮化钠等。例如,在对醇类进行叠氮化的情况下,有使用叠氮磷酸二苯酯和1,8-二氮杂双环[5,4,0]十一碳-7-烯(DBU)的方法、使用三甲基硅叠氮和路易斯酸的方法等。

[0245] 在各步骤中进行还原性氨基化反应的情况下,作为所使用的还原剂,可以列举三乙酰氧基硼氢化钠、氰基硼氢化钠、氢气、甲酸等。在基质为胺化合物的情况下,作为所使用的羰基化合物,除了多聚甲醛以外,还可以列举乙醛等醛类、环己酮等酮类。在基质为羰基化合物的情况下,作为所使用的胺类,可以列举氨、甲胺等伯胺;二甲胺等仲胺等。

[0246] 在各步骤中进行光延反应的情况下,作为试剂,使用偶氮二羧酸酯类(例如偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)、偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)等)和三苯基膦。

[0247] 在各步骤中进行酯化反应、酰胺化反应或尿素化反应的情况下,作为所使用的试剂,可以列举:酰氯、酰溴等酰卤体;酸酐、活性酯体、硫酸酯体等活化的羧酸类。作为羧酸的活化剂,可以列举:1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCD)等碳二亚胺系缩合剂;4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐-n-水合物(DMT-MM)等三嗪系缩合剂;1,1-羰基二咪唑(CDI)等碳酸酯系缩合剂;叠氮磷酸二苯酯(DPPA);苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷盐(BOP试剂);碘化2-氯-1-甲基-吡啶盐(向山试剂);亚硫酰氯;氯甲酸乙酯等卤代甲酸低级烷基酯;0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU);硫酸;或者它们的组合等。在使用碳二亚胺系缩合剂的情况下,可以进一步在反应中加入1-羟基苯并三唑(HOBT)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)、二甲氨基吡啶(DMAP)等添加剂。

[0248] 在各步骤中进行偶联反应的情况下,作为所使用的金属催化剂,可以列举:乙酸钯(II)、四(三苯基膦)钯(0)、二氯双(三苯基膦)二氯化钯(II)、双(三乙基膦)二氯化钯(II)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁氯化钯(II)、乙酸钯(II)等钯化合物;四(三苯基膦基)镍(0)等镍化合物;三(三苯基膦)氯化铑(III)等铑化合物;钴化合物;氧化铜、碘化铜(I)等铜化合物;铂化合物等。可以进一步在反应中加入碱,作为这样的碱,可以列举无机碱类、碱性盐类等。

[0249] 在各步骤中进行硫代羰基化反应的情况下,作为硫代羰基化剂,代表性地使用五硫化二磷,除了五硫化二磷以外,也可以使用2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3,2,4-二硫杂二磷杂环丁烷-2,4-二硫化物(劳森(Lowesson)试剂)等具有1,3,2,4-二硫杂二磷杂环丁烷-2,4-二硫化物结构的试剂。

[0250] 在各步骤中进行沃尔-齐格勒(Wohl-Ziegler)反应的情况下,作为所使用的卤化剂,可以列举N-碘代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)、溴、硫酰氯等。通过进一步在反应中加入热、光、过氧化苯甲酰、偶氮二异丁腈等自由基引发剂,能够使反应加速。

[0251] 在各步骤中进行羟基的卤化反应的情况下,作为所使用的卤化剂,可以列举氢卤酸和无机酸的酰卤,具体而言,在氯化的情况下,可以列举盐酸、亚硫酸氯、氧氯化磷等,在溴化的情况下,可以列举48%氢溴酸等。另外,也可以使用通过三苯基磷与四氯化碳或四溴化碳等的作用而由醇得到卤代烷烃体的方法。或者,也可以使用经过将醇转换为磺酸酯后、与溴化锂、氯化锂或碘化钠反应这样的两阶段反应来合成卤代烷烃体的方法。

[0252] 在各步骤中进行艾伯佐夫(Arbuzov)反应的情况下,作为所使用的试剂,可以列举溴乙酸乙酯等卤代烷烃类;亚磷酸三乙酯、亚磷酸三(异丙基)酯等亚磷酸酯类。

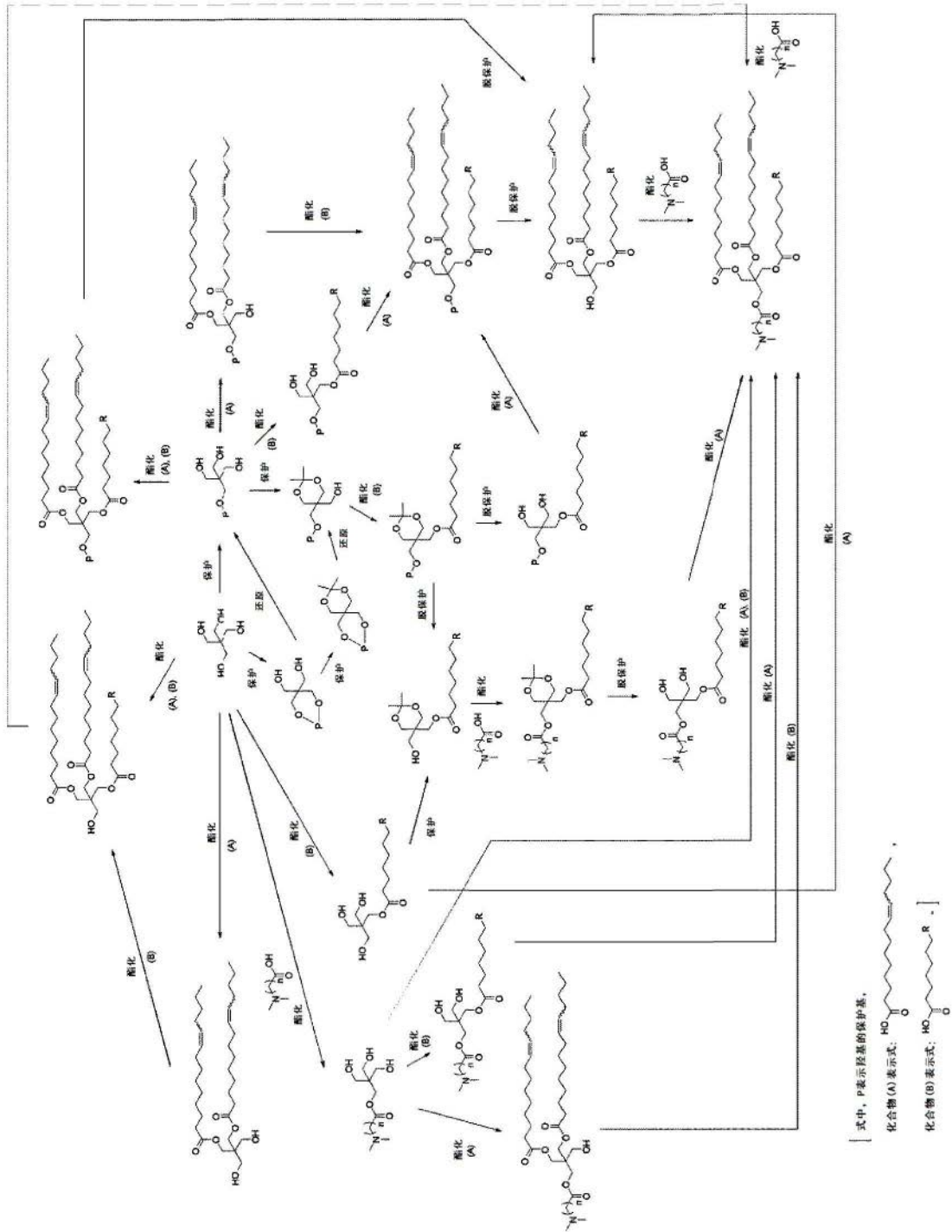
[0253] 在各步骤中进行磺酯化反应的情况下,作为所使用的磺化剂,可以列举甲磺酰氯、对甲苯磺酰氯、甲磺酸酐、对甲苯磺酸酐、三氟甲磺酸酐等。

[0254] 在各步骤中进行水解反应的情况下,作为试剂,使用酸或碱。另外,在进行叔丁基酯的酸水解反应的情况下,为了将副生的叔丁基阳离子还原地捕获,可以添加甲酸、三乙基硅烷等。

[0255] 在各步骤中进行脱水反应的情况下,作为所使用的脱水剂,可以列举硫酸、五氧化二磷、氧氯化磷、N,N'-二环己基碳二亚胺、氧化铝、聚磷酸等。

[0256] 化合物(I)例如可以通过下述的制法来制造。化合物(I)中,波状线的两者为顺式的键的化合物和波状线中的一者或两者为反式的键的化合物均可以通过与以下所示的制法同样的制法来制造。在本发明中,特别是在酯化时,通过使用与目标化合物(I)的结构对应的适当的原料,能够合成所期望结构的化合物(I)。另外,化合物(I)的盐可以通过与无机碱、有机碱、有机酸、碱性或酸性氨基酸适当混合而得到。

[0257]



[0258] 以下,对含有本发明的化合物的脂质粒子、以及含有该脂质粒子和指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸的组合物的制造方法进行记载。

[0259] 本发明的脂质粒子可以通过用于将本发明的化合物(阳离子性脂质)与其他脂质成分混合、然后由脂质成分制备脂质粒子的公知的方法来制造。例如,可以通过将上述的(混合)脂质成分溶解于有机溶剂中并将所得到的有机溶剂溶液与水或缓冲液混合(例如乳化法)而以脂质粒子分散液的形式进行制造。上述混合可以使用微型流体混合系统(例如NanoAssemblr装置(Precision NanoSystems公司))来进行。所得到的脂质粒子可以进行脱盐或透析和灭菌过滤。另外,可以根据需要进行pH调节、渗透压调节。

[0260] 化合物(I)可以根据式(I)的n、R和波状线的定义的组合而形成多种结构。脂质粒子的制造中,作为化合物(I),可以单独使用具有特定结构的一种化合物,也可以以结构不同的多种化合物的混合物的形式来使用。

[0261] 作为“其他脂质成分”,可以列举如上所述的结构脂质、例如固醇类、磷脂质、聚乙二醇脂质。相对于本发明的化合物1摩尔,“其他脂质成分”例如使用0.008~4摩尔。本发明的化合物优选与其他脂质成分(特别是胆固醇、磷脂酰胆碱和聚乙二醇脂质)混合使用。将本发明的化合物与其他脂质成分混合使用情况下的优选方式为本发明的化合物1~4摩尔、固醇类0~3摩尔、磷脂质0~2摩尔和聚乙二醇脂质0~1摩尔的混合物。将本发明的化合物与其他脂质成分混合使用情况下的更优选的方式为本发明的化合物1~1.5摩尔、固醇类0~1.25摩尔、磷脂质0~0.5摩尔和聚乙二醇脂质0~0.125摩尔的混合物。

[0262] 上述的有机溶剂溶液中的本发明的化合物、或者本发明的化合物与其他脂质成分的混合物的浓度优选为0.5~100mg/mL。

[0263] 作为有机溶剂,可以列举例如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、叔丁醇、丙酮、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷或它们的混合物。有机溶剂可以含有0~20%的水或缓冲液。

[0264] 作为缓冲液,可以列举酸性缓冲液(例如乙酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲液、磷酸缓冲液)、中性缓冲液(例如4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)缓冲液、磷酸缓冲液、磷酸缓冲生理盐水(PBS))。

[0265] 在使用微型流体混合系统进行混合的情况下,相对于有机溶剂溶液1容积份,优选混合水或缓冲液1~5容积份。另外,在该系统中,混合液(有机溶剂溶液与水或缓冲液的混合液)流速优选为0.1~10mL/分钟,温度优选为15~45℃。

[0266] 通过在制造脂质粒子或脂质粒子分散液时,预先在水或缓冲液中添加而含有作为活性成分的核酸(例如,指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸),能够以包含活性成分的脂质粒子分散液的形式制造本发明的组合物。活性成分优选以水或缓冲液中的活性成分的浓度为0.05~2.0mg/mL的方式添加。在本说明书中,有时将包含活性成分的水或缓冲液记载为“包含活性成分(指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸)的水溶液”。

[0267] 在制造包含两种或两种以上的指导RNA作为活性成分的本发明的组合物的情况下,在该组合物的制造中,优选使用包含两种或两种以上的指导RNA的水溶液。

[0268] 另外,本发明的组合物也可以通过利用公知的方法将脂质粒子或脂质粒子分散液与活性成分或其水溶液混合而以包含活性成分的脂质粒子分散液的形式进行制造。脂质粒子分散液可以通过使脂质粒子分散于适当的分散介质中来制备。另外,活性成分的水溶液可以通过使活性成分溶解于适当的溶剂中来制备。

[0269] 除分散介质和溶剂以外的本发明的组合物中的本发明的化合物的含量优选为40~70重量%。

[0270] 除分散介质和溶剂以外的本发明的组合物中的活性成分的含量优选为1~20重量%。

[0271] 脂质粒子分散液或包含组合物的分散液的分散介质可以通过进行透析而置换为

水或缓冲液。透析使用分级分子量为10~20K的超滤膜,在4℃~室温下实施。可以反复进行透析。分散介质的置换也可以使用切向流过滤(TFF)。另外,在分散介质的置换后,可以根据需要进行pH调节、渗透压调节。

[0272] 以下,对含有本发明的化合物的脂质粒子、以及含有该脂质粒子和指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸的组合物的分析方法进行记载。

[0273] (组合物中的)脂质粒子的粒径可以利用公知的手段进行测定。例如,可以使用基于NIBS(非侵入式背散射)技术的粒径测定装置、Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments),通过自相关函数的累积量分析以Z平均粒径算出粒径。(组合物中的)脂质粒子的粒径(平均粒径)优选为10~200nm。

[0274] 本发明的组合物中的作为活性成分的核酸(具体而言为指导RNA或包含编码该指导RNA的序列的DNA、和/或RNA引导性核酸酶或包含编码该RNA引导性核酸酶的序列的核酸)的浓度和包封率可以利用公知的手段进行测定。例如,可以使用Quant-iT™ RiboGreen(注册商标)(Invitrogen)对核酸进行荧光标记,测定其荧光强度,由此求出浓度和包封率。组合物中的核酸的浓度可以使用由浓度已知的核酸水溶液制成的标准曲线来算出,包封率可以基于Triton-X100(用于使脂质粒子崩解的表面活性剂)的添加的有无所带来的荧光强度的差异来算出。需要说明的是,组合物中的浓度是指被脂质粒子包封的核酸和未被包封的核酸的合计浓度,包封率是指组合物中的核酸整体中被脂质粒子包封的核酸的比例。

[0275] 以下,对本发明的组合物的用途进行说明。

[0276] 在一个实施方式中,本发明的组合物可以在对细胞中的靶基因座进行改造的方法中使用,该方法包括使本发明的组合物与细胞接触的步骤。通过这样的方法,能够得到靶基因座被改造的细胞。

[0277] 在一个实施方式中,本发明的组合物可以用于制造包含本发明的组合物的药物。换言之,本发明的组合物可以制备或制剂化为药物。

[0278] 在本发明的一个优选实施方式中,药物为肌养蛋白异常症(例如肌营养不良症(杜氏肌营养不良症)、肌养蛋白基因相关扩张型心肌病)的预防/治疗药或修复型肌养蛋白产生药。换言之,在本发明的一个优选实施方式中,本发明的组合物用于通过有效量的给药而预防/治疗哺乳动物中的肌养蛋白异常症(例如肌营养不良症(例如杜氏肌营养不良症、贝氏肌营养不良症)、肌养蛋白基因相关扩张型心肌病)的方法(特别是预防/治疗杜氏肌营养不良症的方法)、或产生修复型肌养蛋白的方法。

[0279] 肌营养不良症定义为“以骨骼肌的变性、坏死为主要病变,临床上可见进行性的肌力降低的遗传性疾病”。肌营养不良症中已知杜氏肌营养不良症、贝氏肌营养不良症、埃-德二氏肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、先天性肌营养不良症、三好氏肌营养不良症、远端型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、以及强直性肌营养不良等。

[0280] 肌养蛋白异常症是指以肌养蛋白基因突变为原因,由功能缺失型或功能异常型肌养蛋白引起的各种疾病。包括杜氏肌营养不良症、贝氏肌营养不良症和肌养蛋白基因相关扩张型心肌病等。骨骼肌障碍为主要症状的情况较多,但也存在未观察到骨骼肌症状的病例。有时会伴有高CK血症、肌红蛋白尿症、扩张型心肌病、认知功能障碍等。

[0281] 杜氏肌营养不良症是小儿肌营养不良症中患者数最多的疾病,患病率为每10万人

口中4~5人。以进行性的肌萎缩为主要症状,其病因是X染色体上的肌养蛋白基因由于突变而导致功能缺陷。在杜氏肌营养不良症中,一半以上的患者具有单个或多个外显子的缺失。由于肌养蛋白基因突变而产生蛋白质读码框的移位,在中途出现终止密码子,无法再合成肌养蛋白,由此引起一系列症状。

[0282] 本说明书中,修复型肌养蛋白是指基因组编辑的结果恢复了表达的肌养蛋白。特别是指通过对具有移码突变或无义突变的肌养蛋白基因使用基因组编辑而恢复了表达、保持有N末端的肌动蛋白结合结构域和C末端的富含半胱氨酸结构域的肌养蛋白。可能存在下述情况:由于外显子重复而产生移码突变的情况;通过基因组编辑而跳过该重复外显子中的一者的情况;恢复了与健全型具有100%一致性的修复型肌养蛋白的表达的情况。作为修复型肌养蛋白,特别是指在缺失了外显子44的人肌养蛋白基因中跳过外显子45、由外显子43与外显子46连接而成的mRNA翻译得到的人肌养蛋白。此外,例如,在缺失了外显子12-44、18-44、46-47、46-48、46-49、46-51、46-53或46-55的人肌养蛋白基因中分别跳过规定的外显子而产生的人肌养蛋白也包括在修复型肌养蛋白中,但并不限于这些。通过使用本发明的组合物是否产生了修复型肌养蛋白可以通过例如下述方法进行确认:利用PCR对细胞内的编码修复型肌养蛋白的mRNA进行检测。或者,也可以使用识别肌养蛋白的抗体进行蛋白免疫印迹法,根据肌养蛋白的分子量来进行确认。

[0283] 在一个实施方式中,本发明的组合物可以在靶基因座被改造的细胞的制造方法中使用,该方法包括使本发明的组合物与细胞接触的步骤。

[0284] 在一个实施方式中,本发明的组合物可以在靶基因座被改造的非人哺乳动物的制备方法中使用,该方法包括:(1)使本发明的组合物与非人哺乳动物的受精卵、胚胎干细胞或卵母细胞接触的步骤;(2)对靶基因座被改造的上述受精卵、胚胎干细胞或卵母细胞进行选择步骤;和(3)将上述选择出的受精卵、胚胎干细胞或卵母细胞移植到非人哺乳动物的雌性动物中的步骤。

[0285] 在步骤(1)中,与本发明的组合物接触的细胞除了上述细胞以外,还可以为例如iPS细胞等多能干细胞、精子干细胞和原始生殖细胞等生殖细胞。

[0286] 步骤(2)中的选择可以通过利用药剂抗性基因的CRISPR系统中的一般筛选方法进行,也可以通过PCR和序列确认来进行。例如,可以使敲入用或敲除用的载体中预先包含药剂抗性基因表达单元,在利用CRISPR系统使靶基因座发生了敲入或敲除的受精卵等中表达药剂抗性基因后,对细胞群进行药剂处理,由此选择出靶基因座被改造的受精卵等。

[0287] 如上所述的关于本发明的各种方法、药物、应用的实施方式中使用的“组合物”的详细情况如前所述,例如组合物所含有的指导RNA等、RNA引导性核酸酶等、细胞、靶基因座的详细情况或优选的实施方式在关于使用该组合物的方法、药物、应用等的发明中也是同样的。

[0288] 本发明的药物优选制成静脉内注射、动脉内注射、肌肉内注射、皮下注射、腹腔内注射等的注射剂,但若通过其他途径也能够将有效量的活性成分递送至目标细胞,则也可以制成与之相适应的剂型。作为注射剂,优选静脉内注射或肌肉内注射。

[0289] 本发明的药物中,除了包含本发明的组合物以外,还可以根据需要包含制药学上可接受的物质,例如在以注射剂形式进行制备的情况下,可以包含注射用水、溶剂、添加剂等。本发明的药物中的活性成分的量或浓度可以按照能够将对于期望的预防或治疗的效果

而言有效的量的活性成分递送至目标细胞的方式,考虑剂型、给药途径、每一次的给药量、一定期间内的给药次数等而适当调节。作为给药途径,优选静脉内(全身)给药或肌肉内给药。

[0290] 本发明中的“治疗”是指,对已经发生了疾病的对象的活体内(组织中或器官中)的一定比例的细胞中的靶基因座上的基因进行改造,对成为疾病病因的基因的碱基序列的异常进行修复。另外,“预防”是指,对尚未发生疾病或症状的对象的活体内(组织中或器官中)的一定比例的细胞中的靶基因座上的基因进行改造,对可能成为疾病病因的基因的碱基序列进行修复。

[0291] 作为上述成为疾病病因的基因的碱基序列的异常,可以列举例如与疾病相关的基因突变(例如仅在一部分杜氏肌营养不良症患者中可见的外显子44的缺失)。通过对不产生肌养蛋白的外显子44缺失型杜氏肌营养不良症患者给药本发明的组合物而诱导修复型肌养蛋白的产生(有时称为肌养蛋白的恢复),结果能够治疗、预防该疾病。

[0292] 组织中或器官中的基因被改造的细胞的比例(基因的改造效率)、疾病的症状的恢复、缓解、产生的延迟或防止、加重的抑制等的程度不能一概地规定。

[0293] 作为肌营养不良症的症状,没有限定,包括肌力降低、肌萎缩、运动能力的降低、步行障碍、心肌疾病等。肌营养不良症的治疗包括这些症状的改善、发病或加重的延迟等。

[0294] 通过判定是否对肌营养不良症的发病、加重或症状产生影响,可以对肌营养不良症的治疗效果进行评价。更具体而言,例如,可以通过测定对象的肌重量、肌截面积、分离骨骼肌的张力、肌力(例如握力)、运动能力(例如平板运动能力)等来确认肌营养不良症的治疗效果。

[0295] 实施例

[0296] 通过以下的实施例、试验例和制剂例进一步详细地对本发明进行说明,但这些示例并非限定本发明,另外可以在不脱离本发明范围的范围内加以变化。

[0297] 以下的实施例中的“室温”通常表示约10℃至约35℃。若无特别声明,混合溶剂中所示的比值表示容量比。若无特别声明,%表示重量%。

[0298] 若无特别说明,实施例的色谱中的洗脱在基于TLC(Thin Layer Chromatography, 薄层色谱)的观察下进行。在TLC观察中,作为TLC板,使用默克(Merck)公司制造的60F₂₅₄,作为展开溶剂,使用在色谱中用作洗脱溶剂的溶剂。另外,检测采用UV检测器,根据需要需要使用TLC显色试剂进行观察。在硅胶柱色谱中,在记为NH的情况下使用氨基丙基硅烷键合硅胶,在记为Diol的情况下使用3-(2,3-二羟基丙氧基)丙基硅烷键合硅胶。在制备HPLC(高效液相色谱)中,在记为C18的情况下使用十八烷基键合硅胶。若无特别声明,洗脱溶剂中所示的比值表示容量比。

[0299] ¹H NMR通过傅立叶变换型NMR进行测定。¹H NMR的分析使用ACD/SpecManager(商品名)软件等。对于羟基或氨基等的质子峰非常平缓的峰,有时未进行记载。

[0300] MS通过LC/MS和MALDI/TOFMS进行测定。作为电离法,使用ESI法、APCI法或MALDI法。作为基质,使用CHCA。数据记载实测值(found)。通常,观测到分子离子峰,但有时以碎片离子的形式被观测到。在盐的情况下,通常观测到游离体的分子离子峰、阳离子种、阴离子种或碎片离子峰。

[0301] 在以下的实施例中使用时下述的缩写。

- [0302] MS: 质谱
- [0303] M: 摩尔浓度
- [0304] N: 当量浓度
- [0305] CDCl_3 : 氘代氯仿
- [0306] DMSO-d_6 : 氘代二甲基亚砜
- [0307] $^1\text{H NMR}$: 质子核磁共振
- [0308] LC/MS: 液相色谱质谱分析仪
- [0309] ESI: electrospray ionization、电喷雾电离
- [0310] APCI: atmospheric pressure chemical ionization、大气压化学电离
- [0311] MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization、基质辅助激光解吸电离
- [0312] TOFMS: Time-of-flight mass spectrometry、飞行时间质谱分析
- [0313] CHCA: α -氰基-4-羟基肉桂酸
- [0314] DMF: N,N-二甲基甲酰胺
- [0315] THF: 四氢呋喃
- [0316] DMAP: 4-二甲氨基吡啶
- [0317] TBAF: 四丁基氟化铵
- [0318] [合成例1] (9Z)-十四碳-9-烯酸3-((4-(二甲氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双(((9Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯
- [0319] A) 2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇
- [0320] 在室温下在2,2-双(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(5.45g)、1H-咪唑(2.72g)和DMF(190mL)的混合物中加入叔丁基二甲基氯硅烷(3.01g)的DMF(10mL)溶液。搅拌24小时后,将反应混合物在减压下浓缩。将残渣用乙酸乙酯稀释,用水清洗3次、用饱和盐水清洗1次后,用无水硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂。利用硅胶柱色谱(乙酸乙酯/己烷)对残渣进行纯化,得到标题化合物(2.25g)。
- [0321] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ_{ppm} 0.08(6H, s), 0.90(9H, s), 2.53(3H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 3.66(2H, s), 3.73(6H, d, $J=5.5\text{Hz}$)
- [0322] B) (9Z)-十四碳-9-烯酸3-((叔丁基(二甲基)甲硅烷基)氧基)-2,2-双(((9Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯
- [0323] 在室温下在2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(258mg)、(9Z)-十四碳-9-烯酸(769mg)和DMAP(126mg)的DMF(3mL)溶液中加入1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(790mg)。搅拌18小时后,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用水清洗2次、用饱和盐水清洗1次后,用无水硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂。利用硅胶柱色谱(NH₂/乙酸乙酯/己烷)对残渣进行纯化,得到标题化合物(860mg)。
- [0324] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ_{ppm} 0.03(6H, s), 0.81-0.96(18H, m), 1.18-1.41(36H, m), 1.53-1.67(6H, m), 1.91-2.10(12H, m), 2.29(6H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 3.58(2H, s), 4.08(6H, s), 5.27-5.43(6H, m)
- [0325] C) (9Z)-十四碳-9-烯酸3-羟基-2,2-双(((9Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯
- [0326] 在室温下在(9Z)-十四碳-9-烯酸3-((叔丁基(二甲基)甲硅烷基)氧基)-2,2-双

((9Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯(5.91g)的THF(120mL)溶液中加入TBAF的THF溶液(1M,14.85mL)与乙酸(4.91mL)的混合物。搅拌3天后,将反应混合物在减压下浓缩。将残渣用乙酸乙酯稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液清洗1次、用饱和盐水清洗1次后,用无水硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂。利用硅胶柱色谱(乙酸乙酯/己烷)对残渣进行纯化,得到标题化合物(4.96g)。

[0327] ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ_{ppm} 0.82-0.97(9H,m), 1.16-1.42(36H,m), 1.52-1.68(6H,m), 1.90-2.12(12H,m), 2.32(6H,t, $J=7.6\text{Hz}$), 2.52(1H,t, $J=7.0\text{Hz}$), 3.49(2H,d, $J=7.0\text{Hz}$), 4.11(6H,s), 5.26-5.42(6H,m)

[0328] D) (9Z)-十四碳-9-烯酸3-((4-(二甲氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双((9Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯

[0329] 在室温下在(9Z)-十四碳-9-烯酸3-羟基-2,2-双((9Z)-十四碳-9-烯酰氧基)甲基)丙酯(4.96g)、DMAP(796mg)和4-(二甲氨基)丁酸盐(2.19g)的DMF(20mL)溶液中加入1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(2.50g)。搅拌18小时后,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液清洗1次、用饱和盐水清洗1次后,用无水硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂。利用硅胶柱色谱(NH、乙酸乙酯/己烷)对残渣进行纯化,得到标题化合物(5.31g)。

[0330] ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ_{ppm} 0.82-0.94(9H,m), 1.20-1.42(36H,m), 1.50-1.66(6H,m), 1.69-1.83(2H,m), 1.90-2.10(12H,m), 2.20(6H,s), 2.23-2.41(10H,m), 4.11(8H,s), 5.23-5.44(6H,m)

[0331] 以下的实施例中使用的MmRosa26sgRNA(序列号9)和两种HsDMDEx45 sgRNA(HsDMDEx45#1 sgRNA和HsDMDEx45#23 sgRNA,分别与上述序列号1和2对应)的碱基序列如下所示。

[0332] [表1]

ID	序列	
1 MmRosa26 sgRNA (mod)	G(M)^A(M)^U(M)^GGGCGGAGUCUUCUGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AAUAAGGCUAGUCGGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U	98 mer RNA

ID	序列	
2 HsDMDEx45#1 sgRNA (mod)	U(M)^G(M)^G(M)^UAUCUUAACAGGAACUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C	96 mer RNA

[0333]

ID	序列	
3 HsDMDEx45#23 sgRNA (mod)	A(M)^G(M)^C(M)^UGUCAGACAGAAAAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAUAAGGCUAGUCGGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C	96 mer RNA

N: RNA
N(M): 2'-OMe RNA
^: 硫代磷酸酯

[0334] [实施例1]C57BL/6J小鼠中的使用MmRosa26sgRNA的DNA突变导入效率评价

[0335] [1-1]Cas9 mRNA-LNP的制备

[0336] 将脂质混合物(合成例1中得到的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:28.7:0.7,摩尔比)溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9mg/mL的脂质溶液。将

Cas9 mRNA (TriLink BioTechnologies) 溶解于10mM 2-MES溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr (Precision NanoSystems) 将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slyde-A-Lyzer (20k的分级分子量、Thermo scientific) 在4℃下向水中进行1小时透析、在4℃下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon (30k的分级分子量) 进行离心(3000×g、4℃、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超滤进行浓缩。接着,使用0.2μm的针筒过滤器(Iwaki) 进行过滤器过滤,在4℃下保存。将如此制备的分散液作为“Cas9 mRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和多分散指数(PDI) 利用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) 进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iT™ RiboGreen (注册商标) (Thermo scientific) 进行测定。将测定结果示于表2。

[0337] [1-2]MmRosa26

[0338] sgRNA-LNP的制备

[0339] 将脂质混合物(合成例1中得到的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:28.7:0.7,摩尔比) 溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9 mg/mL的脂质溶液。将MmRosa26 sgRNA (GeneDesign、参考上述表1) 溶解于10mM 2-MES溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr (Precision NanoSystems) 将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slyde-A-Lyzer (20k的分级分子量、Thermo scientific) 在4℃下向水中进行1小时透析、在4℃下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon (30k的分级分子量) 进行离心(3000×g、4℃、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超滤进行浓缩。接着,使用0.2μm的针筒过滤器(Iwaki) 进行过滤器过滤,在4℃下保存。将如此制备的分散液作为“MmRosa26 sgRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和多分散指数(PDI) 利用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) 进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iT™ RiboGreen (注册商标) (Thermo scientific) 进行测定。将测定结果示于表2。

[0340] [表2]

[0341]

	核酸浓度 (μg/mL)	包封率 (%)	粒径 (nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	950	96	82	0.028
MmRosa sgRNA-LNP	904	94	84.8	0.077

[0342] [1-3]C57BL/6J小鼠中的使用MmRosa26 sgRNA的DNA突变导入效率评价

[0343] 在9周龄的雄性C57BL/6J小鼠(日本CLEA)的右下肢腓肠肌给药MmRosa26 sgRNA-LNP和Cas9 mRNA-LNP的混合溶液(按照以sgRNA和mRNA计的给药量均为0.01、0.03、0.1、0.3或1μg/小鼠的方式将各自的LNP分散液混合而制备)或PBS。给药4天后,在3.5%异氟烷麻醉下通过断头放血使其安乐死后,摘取骨骼肌,迅速在液氮中冷冻。使用QIAamp Fast DNA组织试剂盒(Qiagen) 从冷冻肌组织中提取纯化基因组DNA,使用PrimeSTAR GXL DNA聚合酶(TAKARA) 进行PCR(正向引物:序列号10、反向引物:序列号11)。利用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN) 对PCR产物进行纯化,用T7内切核酸酶I (NEB) 处理后,使用Agilent 4200 TapeStation(Agilent) 进行分析。将结果示于图1。

[0344] 序列号10

[0345] 5'-CTCCGAGGCGGATCACAAGCAATAATAACCTGTAG-3'

[0346] 序列号11

[0347] 5'-TGCAAGCACGTTTCCGACTTGAGTTGCCTCAAGAG-3'

[0348] [实施例2]人DMD外显子45敲入-小鼠Dmd外显子44敲除小鼠中的使用HsDMDEx45#1 sgRNA的DNA突变导入活性、外显子跳读效果和修复型肌养蛋白表达效果

[0349] [2-1]Cas9 mRNA-LNP的制备

[0350] 按照实施例1的[1-1]中记载的步骤再次制备Cas9 mRNA-LNP,测定核酸浓度、包封率、粒径和PDI。将测定结果示于表3。

[0351] [2-2]HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP的制备

[0352] 将脂质混合物(合成例1中制造的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:28.7:0.7,摩尔比)溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9 mg/mL的脂质溶液。将HsDMDEx45#1 sgRNA(GeneDesign、参考上述表1)溶解于10mM 2-吗啉代乙磺酸(MES)溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr(Precision NanoSystems)将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slide-A-Lyzer(20k的分级分子量、Thermo scientific)在4°C下向水中进行1小时透析、在4°C下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon(30k的分级分子量)进行离心(3000×g、4°C、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超滤进行浓缩。接着,使用0.2μm的针筒过滤器(Iwaki)进行过滤器过滤,在4°C下保存。将如此制备的分散液作为“HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和分散指数(PDI)利用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iT™ RiboGreen(注册商标)(Thermo scientific)进行测定。将测定结果示于表3。

[0353] [表3]

[0354]

	核酸浓度(μg/mL)	包封率(%)	粒径(mm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	1102	94	83.1	0.091
HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP	1555	98	84.8	0.115

[0355] [2-3]人DMD外显子45敲入-小鼠Dmd外显子44敲除小鼠的制作方法

[0356] 将10μg的由包含人DMD外显子45及其5'侧0.7kb、3'侧0.6kb的序列1.5kb、被FRT序列夹持的新霉素抗性基因表达单元以及来源于小鼠Dmd内含子44和内含子45的序列各1.5kb构成的敲入载体与2.5μg的pCAG-Cas9表达载体和两种2.5μg的pU6-sgRNA表达载体(靶序列:序列号12和序列号13)一起对 5×10^5 个来源于C57BL/6J小鼠的ES细胞进行电穿孔,通过PCR和序列确认筛选出同源重组细胞株。通过Flpe(翻转酶)处理除去新霉素抗性单元后,将该ES细胞株显微注入到ICR小鼠的4倍体囊胚中,获得嵌合小鼠。通过嵌合小鼠与雌性C57BL/6J小鼠的体外受精获得雌性人DMD外显子45杂合敲入小鼠。接着,在雄性C57BL/6J小鼠与雌性人DMD外显子45杂合敲入小鼠的受精卵中显微注入100ng/μL的Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies)、两种小鼠Dmd外显子44敲除用sgRNA(靶序列:序列号14和序列号15、株式会社FASMAC)和ssODN 50ng/μL(序列号16、Eurofins Genomics株式会社),对所得到的雄性产仔通过PCR和序列确认进行基因判定,筛选出人DMD外显子45敲入-小鼠Dmd

外显子44敲除小鼠。

[0357] 序列号12

[0358] 5' -atgaatgtgcctacatatgg-3'

[0359] 序列号13

[0360] 5' -catagcatgcatttgcttc-3'

[0361] 序列号14

[0362] 5' -gaatgaggtagtgtttagg-3'

[0363] 序列号15

[0364] 5' -gcaggaaatcatcttatagc-3'

[0365] 序列号16

[0366] 5' -gagcaagctgggttagaacaaggctctgtcagagtcagcatgggaatgaggtagtgtttag ca
ggaaatagtgtggttttaggtctctccccgccctctgtgtatgtgtgtgtgtgtt-3'

[0367] [2-4]骨骼肌中的DNA突变导入效率评价

[0368] 在12周龄的雄性人DMD外显子45敲入-小鼠Dmd外显子44敲除小鼠的右下肢腓肠肌以6次/2周给药3 μ g的包封有HsDMD Ex45#1 sgRNA的LNP和3 μ g的包封有SpCas9 mRNA的LNP ([2-1]的Cas9 mRNA-LNP与[2-2]的HsDMDEX45#1 sgRNA-LNP的混合溶液),在左下肢腓肠肌以6次/2周给药PBS。在初次给药起56天后,在3.5%异氟烷麻醉下使其安乐死,然后摘取骨骼肌,迅速在液氮中冷冻。将冷冻肌组织用含有3%蛋白酶抑制剂混合物(Sigma)和5mM EDTA(WAKO)的RIPA缓冲液(WAKO)制成匀浆后,使用QIAamp Fast DNA组织试剂盒(Qiagen)提取纯化基因组DNA,使用PrimeSTAR GXL DNA聚合酶(TAKARA)与序列号17(正向引物)和序列号18(反向引物)的引物组进行扩增。利用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)对PCR产物进行纯化,再退火后使用T7内切核酸酶I(NEB)进行处理,使用Agilent 4200 TapeStation(Agilent)进行电泳,利用附带的软件进行分析。使用所得到的数值,利用下述的计算式(数学式1)求出突变导入效率。

[0369] 序列号17

[0370] 5' -CAAGTTTAAAATAGCAGAAAACCACTAAGTCC-3'

[0371] 序列号18

[0372] 5' -CTGACACATAAAAGGTGTCTTTCTGTCTTGTATCC-3'

[0373] [数学式1]

[0374] $f_{cut} = (b+c)/(a+b+c)$

[0375] 插入/缺失(%) = $100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{cut}})$

[0376] a:全部条带的峰面积

[0377] b、c:来源于切割至预想分子量的条带的峰面积

[0378] 其结果,如图2所示,相对于PBS给药,在给药了LNP的骨骼肌中检测出特异性的DNA切割,突变导入效率为 $5.84 \pm 2.15\%$ (平均值 \pm SD)。

[0379] [2-5]骨骼肌中的外显子跳读效率评价

[0380] 在一部分匀浆中添加QIAzol裂解试剂(QIAGEN)和氯仿(WAKO),混合并离心后,分离回收含有RNA的水槽,使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN)提取纯化总RNA。使用大容量RNA-to-cDNA试剂盒(Thermo)对总RNA进行逆转录,接着使用PrimeSTAR GXL DNA聚合酶

(TAKARA)与序列号19(正向引物)和序列号20(反向引物)的引物组进行扩增。利用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)对PCR产物进行纯化后,使用Agilent 4200 TapeStation (Agilent)进行电泳,利用附带的软件进行分析。使用所得到的数值利用下述的计算式(数学式2)求出外显子跳读效率(exon skipping efficiency)。

[0381] 序列号19

[0382] 5'-GGTCAAAGTACAGGAAGCCGT-3'

[0383] 序列号20

[0384] 5'-TTAGCTGCTGCTCATCTCCAA-3'

[0385] [数学式2]

[0386] 外显子跳读效率 = $100 \times b / (a+b)$

[0387] a: 未跳读产物条带的峰面积

[0388] b: 跳读产物条带的峰面积

[0389] 其结果,如图3所示,相对于PBS给药,在给药了LNP的骨骼肌中,检测到人外显子45被跳过而得到的短的PCR产物,其效率为 $5.07 \pm 2.59\%$ (平均值 \pm SD)。

[0390] [2-6]骨骼肌中的肌养蛋白恢复的评价

[0391] 将一部分匀浆离心,回收上清。利用蛋白质检测试剂盒(Thermo)测定上清中的总蛋白质量,调节至 $0.02\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0392] Gapdh检测:在调节至 $0.02\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的上清中添加含有还原剂(Thermo)的样品缓冲液(Bio-Rad),在 98°C 下处理10分钟。将 $0.2\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 的还原、热处理后的样品液添加到TGX ANY KD凝胶(Bio-Rad)中,以200V泳动30分钟。泳动结束后,使用Trasblot turbo系统(Bio-Rad)转印至PVDF膜上。将转印后的PVDF膜用iBind溶液(Thermo)封闭5分钟,接着使用iBind系统(Thermo),以利用稀释液(TOYOBO)稀释后的抗GAPDH抗体(1:2000,Cell Signaling)和HRP标记的抗兔IgG抗体(1:5000,GE)进行封闭。将封闭结束后的PVDF膜用蒸馏水进行清洗,在ECL Prime蛋白免疫印迹检测试剂(GE)中浸泡约5分钟,利用ChemiDoc (Bio-Rad)进行检测。

[0393] 肌养蛋白检测:在调节至 $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的上清中添加含有还原剂(Thermo)的样品缓冲液(Thermo),在 70°C 下处理10分钟。将 $30\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 的还原、热处理后的样品液添加到3-8% Tris-乙酸酯凝胶(Thermo)中,以150V电泳约90分钟。泳动结束后,使用Trasblot turbo系统(Bio-Rad)转印至PVDF膜上。将转印后的PVDF膜用iBind溶液(Thermo)封闭5分钟,接着使用iBind系统(Thermo),以利用稀释液(TOYOBO)稀释后的抗肌养蛋白抗体(1:2000,abcam)和HRP标记的抗兔IgG抗体(1:5000,GE)进行封闭。将封闭结束后的PVDF膜用蒸馏水进行清洗,在ECL Select蛋白免疫印迹检测试剂(GE)中浸泡约5分钟,利用Imager (Bio-Rad)进行检测。

[0394] 利用Image Lab软件(Bio-Rad)对由ChemiDoc检测出的Gapdh和肌养蛋白进行分析,以修复型肌养蛋白/Gapdh算出相对表达量。将以上的结果示于图4。与PBS给药组相比,在LNP给药组中确认到显著的肌养蛋白的表达。

[0395] [实施例3]人iPS细胞来源的成肌细胞中的使用HsDMDEx45 sgRNA的DNA突变导入效率和外显子跳读效率(之一)

[0396] [3-1]Cas9 mRNA-LNP的制备

[0397] 按照实施例1的[1-1]中记载的步骤再次制备Cas9 mRNA-LNP,测定核酸浓度、包封

率、粒径和PDI。将测定结果示于表4。

[0398] [3-2]HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP的制备

[0399] 再次使用实施例2的[2-2]中制作的HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP。将实施例2时的测定结果再次示于表4。

[0400] [表4]

	核酸浓度(μg/mL)	包封率(%)	粒径(mm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	967	93	78.6	0.082
HsDMDEx45#1 gRNA-LNP	1555	98	84.8	0.115

[0402] [3-3]人iPS细胞的肌分化和LNP的导入

[0403] 将包含强力霉素诱导型MyoD表达盒的来源于肌养蛋白Ex 45缺失DMD患者的人iPS细胞悬浮于包含10μM Y-27632的AK02N培养基(Ajinomoto)中,以 3×10^5 个细胞/孔的密度接种到包被有基质胶的6孔板中。次日,将培养基更换为灵长类ES细胞培养基(Reprocell),进而在其次日更换为含有1μg/mL强力霉素的灵长类ES Cell培养基,由此开始MyoD基因表达诱导。强力霉素添加起24小时后,更换为包含5%KSR和1μg/mL强力霉素的α-最低基础培养基(SIGMA),培养3天。将培养基减至700μL,添加Cas9 mRNA-LNP(以mRNA计为1、3或10μg/孔)和HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP(以sgRNA计为1、3、10μg/孔)的混合物。添加6小时后,加入1.3mL的培养基(α-最低基础培养基,5%KSR,1μg/mL强力霉素)。

[0404] [3-4]人iPS细胞来源的成肌细胞中的DNA突变导入效率评价

[0405] LNP添加起72小时后,回收细胞,使用QIAamp DNA mini试剂盒(Qiagen)提取纯化DNA。通过使用PrimeSTAR GXL DNA聚合酶(TAKARA)的PCR(正向引物:上述序列号17,反向引物:上述序列号18)对包含靶序列的基因组区域进行扩增,利用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)对所得到的PCR产物进行纯化。将纯化后的DNA片段再退火后,用T7内切核酸酶I(NEB)进行处理,使用Agilent 4200 TapeStation(Agilent)进行电泳,利用附带的软件进行分析。突变导入效率的计算式与[2-4]相同(参考上述数学式1)。将结果示于图5。

[0406] [3-5]人iPS细胞来源的成肌细胞中的外显子跳读效率评价

[0407] 使用RNA easy mini试剂盒(Qiagen)从回收的细胞中提取纯化总RNA。使用大容量RNA-to-cDNA试剂盒(Thermo)对总RNA进行逆转录,使用PrimeSTAR GXL DNA聚合酶(TAKARA)进行PCR(正向引物:序列号21,反向引物:序列号22)。利用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)对所得到的PCR产物进行纯化,使用Agilent 4200 TapeStation进行电泳,利用附带的软件进行分析。外显子跳读效率(exon skipping efficiency)的计算式与[2-5]相同(参考上述数学式2)。将结果示于图6。

[0408] 序列号21

[0409] 5'-CTACAGGAAGCTCTCTCCCA-3'

[0410] 序列号22

[0411] 5'-TGCTTCCTCCAACCATAAAACA-3'

[0412] [实施例4]人iPS细胞来源的成肌细胞中的使用HsDMDEx45 sgRNA的基因组编辑效果和外显子跳读效率评价(之二)

[0413] [4-1]Cas9 mRNA-LNP的制备

[0414] 按照实施例1的[1-1]中记载的步骤再次制备Cas9 mRNA-LNP,测定核酸浓度、包封

率、粒径和PDI。将测定结果示于表5。

[0415] [4-2]HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP的制备

[0416] 再次使用实施例2的[2-2]中制作的HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP。将实施例2时的测定结果再次示于表5。

[0417] [4-3]HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP的制备

[0418] 在实施例2的[2-2]记载的步骤中,代替“HsDMDEx45#1 sgRNA”(实施例4中的HsDMDEx45#1 sgRNA、参考上述表1),使用“HsDMDEx45#23 sgRNA”(参考上述表1的“HsDMDEx45#23 sgRNA”),除此以外同样地制备HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP,测定核酸浓度、包封率、粒径和PDI。将测定结果示于表5。

[0419] [表5]

[0420]

	核酸浓度(μg/mL)	包封率(%)	粒径(nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	1040	96	78.2	0.085
HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP	1587	98	83.8	0.081
HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP	947	91	86.5	0.105

[0421] [4-4]人iPS细胞的肌分化和LNP的导入

[0422] 将包含强力霉素诱导型MyoD表达盒的来源于肌养蛋白Ex 45缺失DMD患者的人iPS细胞和来源于健康人的人iPS细胞悬浮于包含10μM Y-27632的AK02N培养基(Ajinomoto)中,以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到包被有基质胶的6孔板中。次日,将培养基更换为灵长类ES细胞培养基(Reprocell),进而在其次日更换为含有1μg/mL强力霉素的培养基(灵长类ES细胞培养基),由此开始MyoD基因表达诱导。强力霉素添加起24小时后,更换为包含5%KSR和1μg/mL强力霉素的α-最低基础培养基(SIGMA),培养3天。将来源于患者的人iPS细胞的培养基减少至700μL,添加LNP的混合物(参考下述表6)。添加6小时后,加入1.3mL的培养基(α-最低基础培养基,5%KSR,1μg/mL强力霉素)。

[0423] [表6]

[0424]

样品	Cas9 mRNA-LNP (μg/孔,以RNA计)	HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP (μg/孔,以RNA计)	HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP (μg/孔,以RNA计)
PBS	0	0	0
Ex45#1	1	1	0
Ex45#23	1	0	1
Ex45#1+Ex45#23	1	0.5	0.5

[0425] [4-5]人iPS细胞来源的成肌细胞中的外显子跳读效率评价

[0426] LNP添加起72小时后,用冷却的PBS将各孔清洗2次后,使用细胞刮回收细胞,在4℃下以15000rpm离心分离5分钟。然后,去除上清,用RIPA缓冲液将细胞溶解。使用RNA easy mini试剂盒(Qiagen)从一部分细胞溶解液中提取纯化总RNA。使用大容量RNA-to-cDNA试剂盒(Thermo)对总RNA进行逆转录,使用PrimeSTAR GXL DNA聚合酶(TAKARA)进行PCR(正向引物:上述序列号21,反向引物:上述序列号22)。利用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)对所得到的PCR产物进行纯化,使用Agilent 4200 TapeStation进行电泳,利用附带的软件进行分析。外显子跳读效率(exon skipping efficiency)的计算式与[2-5]相同(参考上述数学式2)。将结果示于图7。

[0427] [4-6]人iPS细胞来源的成肌细胞中的肌养蛋白的恢复评价

[0428] 利用蛋白检测试剂盒(Thermo)测定一部分细胞溶解液的总蛋白质量,制备成0.083 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和0.58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0429] Gapdh检测:在制备为0.083 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的细胞溶解液中添加含有还原剂(Thermo)的样品缓冲液(Bio-Rad),在98 $^{\circ}\text{C}$ 下处理10分钟。将1 $\mu\text{g}/12\mu\text{L}$ 的还原、热处理后的样品液添加到10%Mini-PROTEAN TGX预制凝胶(Bio-Rad)中,以150V电泳40分钟。泳动结束后,使用Trasblot turbo系统(Bio-Rad)转印至PVDF膜上。将转印后的PVDF膜用iBind溶液(Thermo)封闭5分钟,接着使用iBind系统(Thermo),以利用稀释液(TOYOBO)稀释后的抗GAPDH抗体(1:1000,Cell Signaling)和HRP标记的抗兔IgG抗体(1:1000,GE)进行封闭。将封闭结束后的PVDF膜用蒸馏水进行清洗,在ECL Prime蛋白免疫印迹检测试剂(GE)中浸泡约5分钟,利用ChemiDoc(Bio-Rad)进行检测。

[0430] 肌养蛋白检测:将制备为0.58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的上清中添加含有还原剂(Thermo)的样品缓冲液(Thermo),在70 $^{\circ}\text{C}$ 下处理10分钟。将7 $\mu\text{g}/12\mu\text{L}$ 的还原、热处理后的样品液添加到3-8%Tris-乙酸酯凝胶(Thermo)中,以150V泳动约90分钟。泳动结束后,使用Trasblot turbo系统(Bio-Rad)转印至PVDF膜上。将转印后的PVDF膜用iBind溶液(Thermo)封闭5分钟,接着使用iBind系统(Thermo),以利用稀释液(TOYOBO)稀释后的抗肌养蛋白抗体(1:1000,abcam)和HRP标记的抗兔IgG抗体(1:1000,GE)进行封闭。将封闭结束后的PVDF膜用蒸馏水进行清洗,在ECL Select蛋白免疫印迹检测试剂(GE)中浸泡约5分钟,利用ChemiDoc(Bio-Rad)进行检测。

[0431] 利用Image Lab软件(Bio-Rad)对由ChemiDoc检测出的GAPDH和肌养蛋白进行分析,利用GAPDH对修复型肌养蛋白的表达量进行校正,将来源于健康人的人iPS细胞中的肌养蛋白表达量设为100%,算出相对表达量。将以上的结果示于图8。

[0432] [实施例5]LNP静脉内给药时的各种组织中的DNA突变导入效率评价

[0433] [5-1]Cas9 mRNA-LNP的制备

[0434] 将脂质混合物(合成例1中得到的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:28.7:0.7,摩尔比)溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9 mg/mL的脂质溶液。将Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies)溶解于10mM 2-MES溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr(Precision NanoSystems)将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slyde-A-Lyzer(20k的分级分子量、Thermo scientific)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下向水中进行1小时透析、在4 $^{\circ}\text{C}$ 下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon(30k的分级分子量)进行离心(3000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超滤进行浓缩。接着,使用0.2 μm 的针筒过滤器(Iwaki)进行过滤器过滤,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。将如此制备的分散液作为“Cas9 mRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和分散指数(PDI)利用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iTTM RiboGreen(注册商标)(Thermo scientific)进行测定。将结果示于表7。

[0435] [5-2]MmRosa26 sgRNA-LNP的制备

[0436] 将脂质混合物(合成例1中得到的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:

28.7:0.7,摩尔比)溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9 mg/mL的脂质溶液。将MmRosa26 sgRNA(GeneDesign、参考上述表1)溶解于10mM 2-MES溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr(Precision NanoSystems)将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slyde-A-Lyzer(20k的分级分子量、Thermo scientific)在4℃下向水中进行1小时透析、在4℃下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon(30k的分级分子量)进行离心(3000×g、4℃、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超滤进行浓缩。接着,使用0.2μm的针筒过滤器(Iwaki)进行过滤器过滤,在4℃下保存。将如此制备的分散液作为“MmRosa26 sgRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和分散指数(PDI)利用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iT™ RiboGreen(注册商标)(Thermo scientific)进行测定。将结果示于表7。

[0437] [表7]

	核酸浓度 (μg/mL)	包封率(%)	粒径 (nm)	PDI
[0438] Cas9 mRNA-LNP	1304	94	88.1	0.076
MmRosa sgRNA-LNP	1263	98	85.3	0.041

[0439] 从5周龄的雄性C57BL/6J小鼠的尾静脉给药包封有50μg的mRosa26 sgRNA和50μg的SpCas9 mRNA的LNP。7天后,在3.5%异氟烷麻醉下通过断头放血使其安乐死后,采集腓肠肌、胫前肌、股四头肌、横膈膜、心脏并迅速在液氮中冷冻。使用QIAamp Fast DNA组织试剂盒(Qiagen)提取纯化冷冻组织的基因组DNA,使用Q5高保真DNA聚合酶(New England Biolabs Japan)和以下所示的引物组(正向引物:上述序列号17,反向引物:上述序列号18)进行扩增。利用QIAquick 96 PCR BioRobot试剂盒(QIAGEN)对PCR产物进行纯化,用T7内切核酸酶I(NEB)处理后,使用Agilent 4200 TapeStation(Agilent)进行电泳,利用附带的软件进行分析。使用所得到的数值,利用上述计算式(参考数学式1)求出突变导入效率。

[0440] 其结果,如图9所示,相对于PBS给药,在给药了LNP的骨骼肌中,特异性地检测到向靶DNA中的突变导入,突变导入效率在腓肠肌中为2.50%、在胫前肌中为1.32%、在股四头肌中为2.27%、在横膈膜中为1.54%、在心脏中为0.22%、在肝脏中为1.83。在其他采集的组织中未观察到突变导入。

[0441] [实施例6]使用双sgRNAs的骨骼肌中的外显子跳读效率评价

[0442] [6-1]Cas9 mRNA-LNP的制备

[0443] 将脂质混合物(合成例1中得到的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:28.7:0.7,摩尔比)溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9mg/mL的脂质溶液。将Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies)溶解于10mM 2-MES溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr(Precision NanoSystems)将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slyde-A-Lyzer(20k的分级分子量、Thermo scientific)在4℃下向水中进行1小时透析、在4℃下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon(30k的分级分子量)进行离心(3000×g、4℃、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超

滤进行浓缩。接着,使用0.2 μ m的针筒过滤器(Iwaki)进行过滤器过滤,在4 $^{\circ}$ C下保存。将如此制备的分散液作为“Cas9 mRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和多分散指数(PDI)利用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iTTM RiboGreen(注册商标)(Thermo scientific)进行测定。将结果示于表8。

[0444] [6-2]HsDMDEx45#1+#23 sgRNA-LNP的制备

[0445] 将脂质混合物(合成例1中制造的阳离子性脂质:DPPC:胆固醇:GM-020=60:10.6:28.7:0.7,摩尔比)溶解于90%EtOH、10%无RNase的水中,得到6.9 mg/mL的脂质溶液。将HsDMDEx45#1 sgRNA和HsDMDEx45#23 sgRNA各自等量地溶解于10mM 2-吗啉代乙磺酸(MES)溶液pH5.5中,得到0.15mg/mL的核酸溶液。在室温下利用NanoAssemblr(Precision NanoSystems)将所得到的脂质溶液和核酸溶液以2.7mL/分钟:5.3mL/分钟的流速比进行混合,得到包含包封核酸的脂质粒子的分散液。所得到的分散液使用Slide-A-Lyzer(20k的分级分子量、Thermo scientific)在4 $^{\circ}$ C下向水中进行1小时透析、在4 $^{\circ}$ C下向PBS中进行18小时透析。进一步,使用Amicon(30k的分级分子量)进行离心(3000 \times g、4 $^{\circ}$ C、20分钟,进行数次直至减少至一定体积为止),通过超滤进行浓缩。接着,使用0.2 μ m的针筒过滤器(Iwaki)进行过滤器过滤,在4 $^{\circ}$ C下保存。将如此制备的分散液作为“HsDMDEx45#1+#23 sgRNA-LNP”在后述试验中使用。脂质粒子的粒径和多分散指数(PDI)利用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)进行测定。另外,脂质粒子中的核酸的浓度和包封率使用Quant-iTTM RiboGreen(注册商标)(Thermo scientific)进行测定。将结果示于表8。

[0446] [表8]

	核酸浓度 (μ g/mL)	包封率(%)	粒径 (nm)	PDI
[0447] Cas9 mRNA-LNP	1196	95	85.3	0.074
HsDmdEx45 (#1+23) sgRNA-LNP	785	94	85.9	0.091

[0448] 在6周龄的雄性人DMD外显子45敲入-小鼠Dmd外显子44敲除小鼠的右下肢腓肠肌每隔1天给药4次包封有3 μ g的HsDMDEx45#1+#23和3 μ g的Cas9 mRNA的LNP。初次给药起14天后,在3.5%异氟烷麻醉下通过断头放血使其安乐死后,摘取骨骼肌,迅速在液氮中冷冻。在冷冻的骨骼肌中添加Qiazol(QIAGEN)制成匀浆。添加氯仿(WAKO),混合、离心后,分离回收含有RNA的水槽,使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN)提取纯化总RNA。使用大容量RNA-to-cDNA试剂盒(Thermo)对总RNA进行逆转录,接着使用Q5高保真DNA聚合酶(New England Biolabs Japan)和以下所示的引物组(正向引物:上述序列号19,反向引物:上述序列号20)进行扩增。利用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)对RT-PCR产物进行纯化后,使用Agilent 4200 TapeStation(Agilent)进行电泳,利用附带的软件进行分析。使用所得到的数值,利用上述计算式(参考数学式2)求出外显子跳读效率。

[0449] 其结果,如图10所示,相对于PBS给药,在给药了LNP的骨骼肌中,通过RT-PCR检测到人外显子45被跳过而得到的短的肌养蛋白基因的转录产物,其外显子跳读效率为47.91 \pm 9.32%(平均值 \pm SD)(PBS对照:2.63 \pm 0.62%)。

[0450] 产业上的可利用性

[0451] 本发明的化合物、脂质粒子和组合物能够高效地将CRISPR系统中使用的gRNA等和RNA引导性核酸酶等导入至各种细胞、组织和器官中。因此,本发明的化合物、脂质粒子和组合物能够作为CRISPR系统中的DDS技术来利用。另外,本发明的化合物、脂质粒子和组合物能够用作各种疾病、例如肌营养不良症的预防/治疗药,并且用作研究用试剂。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY)
- [0003] 武田药品工业株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED)
- [0004] <120> 靶基因改造用组合物 (Composition for Altering Target Gene)
- [0005] <130> PT38-9026W0
- [0006] <150> JP 2017-254798
- [0007] <151> 2017-12-28
- [0008] <160> 22
- [0009] <170> PatentIn version 3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 96
- [0012] <212> RNA
- [0013] <213> 人工序列
- [0014] <220>
- [0015] <223> HsDMDEx45#1 sgRNA
- [0016] <220>
- [0017] <221> modified_base
- [0018] <222> (1) .. (1)
- [0019] <223> n代表尿嘧啶 (u), 其可以是2'-O-甲基尿苷 (um)
- [0020] <220>
- [0021] <221> misc_feature
- [0022] <222> (1) .. (3)
- [0023] <223> n为a、c、g或 u
- [0024] <220>
- [0025] <221> modified_base
- [0026] <222> (2) .. (2)
- [0027] <223> n代表鸟嘌呤 (g), 其可以是2'-O-甲基鸟苷 (gm)
- [0028] <220>
- [0029] <221> modified_base
- [0030] <222> (3) .. (3)
- [0031] <223> n代表鸟嘌呤 (g), 其可以是2'-O-甲基鸟苷 (gm)
- [0032] <220>
- [0033] <221> modified_base
- [0034] <222> (93) .. (93)
- [0035] <223> n代表鸟嘌呤 (g), 其可以是2'-O-甲基鸟苷 (gm)
- [0036] <220>
- [0037] <221> misc_feature
- [0038] <222> (93) .. (95)

- [0039] <223> n为a、c、g或 u
- [0040] <220>
- [0041] <221> modified_base
- [0042] <222> (94) .. (94)
- [0043] <223> n代表尿嘧啶(u),其可以是2'-0-甲基尿苷(um)
- [0044] <220>
- [0045] <221> modified_base
- [0046] <222> (95) .. (95)
- [0047] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
- [0048] <400> 1
- [0049] nnnuaucuua caggaacucc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
- [0050] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgnnnc 96
- [0051] <210> 2
- [0052] <211> 96
- [0053] <212> RNA
- [0054] <213> 人工序列
- [0055] <220>
- [0056] <223> HsDmdEx45#23 sgRNA
- [0057] <220>
- [0058] <221> modified_base
- [0059] <222> (1) .. (1)
- [0060] <223> n代表腺嘌呤(a),其可以是2'-0-甲基腺苷
- [0061] <220>
- [0062] <221> misc_feature
- [0063] <222> (1) .. (3)
- [0064] <223> n 为a、c、g或 u
- [0065] <220>
- [0066] <221> modified_base
- [0067] <222> (2) .. (2)
- [0068] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
- [0069] <220>
- [0070] <221> modified_base
- [0071] <222> (3) .. (3)
- [0072] <223> n代表胞嘧啶(c),其可以是2'-0-甲基胞苷(cm)
- [0073] <220>
- [0074] <221> modified_base
- [0075] <222> (93) .. (93)
- [0076] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
- [0077] <220>

- [0078] <221> misc_feature
 [0079] <222> (93) .. (95)
 [0080] <223> n为 a、c、g或 u
 [0081] <220>
 [0082] <221> modified_base
 [0083] <222> (94) .. (94)
 [0084] <223> n代表尿嘧啶(u),其可以是2'-0-甲基尿苷(um)
 [0085] <220>
 [0086] <221> modified_base
 [0087] <222> (95) .. (95)
 [0088] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
 [0089] <400> 2
 [0090] nnnugucaga cagaaaaaag guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
 [0091] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgnnnc 96
 [0092] <210> 3
 [0093] <211> 20
 [0094] <212> RNA
 [0095] <213> 人工序列
 [0096] <220>
 [0097] <223> HsDmdEX#1 sgRNA的靶识别序列
 [0098] <220>
 [0099] <221> modified_base
 [0100] <222> (1) .. (1)
 [0101] <223> n代表尿嘧啶(u),其可以是2'-0-甲基尿苷(um)
 [0102] <220>
 [0103] <221> misc_feature
 [0104] <222> (1) .. (3)
 [0105] <223> n为a、c、g或u
 [0106] <220>
 [0107] <221> modified_base
 [0108] <222> (2) .. (2)
 [0109] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
 [0110] <220>
 [0111] <221> modified_base
 [0112] <222> (3) .. (3)
 [0113] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
 [0114] <400> 3
 [0115] nnnuaucuua caggaacucc 20
 [0116] <210> 4

- [0117] <211> 20
[0118] <212> RNA
[0119] <213> 人工序列
[0120] <220>
[0121] <223> HsDmdEX#23 sgRNA的靶识别序列
[0122] <220>
[0123] <221> modified_base
[0124] <222> (1) .. (1)
[0125] <223> n代表腺嘌呤(a),其可以是2'-0-甲基腺苷
[0126] <220>
[0127] <221> misc_feature
[0128] <222> (1) .. (3)
[0129] <223> n为a、c、g或u
[0130] <220>
[0131] <221> modified_base
[0132] <222> (2) .. (2)
[0133] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
[0134] <220>
[0135] <221> modified_base
[0136] <222> (3) .. (3)
[0137] <223> n代表胞嘧啶(c),其可以是2'-0-甲基胞苷(cm)
[0138] <400> 4
[0139] nnnugucaga cagaaaaaag 20
[0140] <210> 5
[0141] <211> 32
[0142] <212> RNA
[0143] <213> 人工序列
[0144] <220>
[0145] <223> HsDmdEX#1 sgRNA的crRNA序列
[0146] <220>
[0147] <221> modified_base
[0148] <222> (1) .. (1)
[0149] <223> n代表尿嘧啶(u),其可以是2'-0-甲基尿苷(um)
[0150] <220>
[0151] <221> misc_feature
[0152] <222> (1) .. (3)
[0153] <223> n为a、c、g或u
[0154] <220>
[0155] <221> modified_base

- [0156] <222> (2) .. (2)
- [0157] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-O-甲基鸟苷(gm)
- [0158] <220>
- [0159] <221> modified_base
- [0160] <222> (3) .. (3)
- [0161] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-O-甲基鸟苷(gm)
- [0162] <400> 5
- [0163] nnnuauuuu caggaacucc guuuuagagc ua 32
- [0164] <210> 6
- [0165] <211> 32
- [0166] <212> RNA
- [0167] <213> 人工序列
- [0168] <220>
- [0169] <223> HsDmdEX#23 sgRNA的crRNA序列
- [0170] <220>
- [0171] <221> modified_base
- [0172] <222> (1) .. (1)
- [0173] <223> n代表腺嘌呤(a),其可以是2'-O-甲基腺苷
- [0174] <220>
- [0175] <221> misc_feature
- [0176] <222> (1) .. (3)
- [0177] <223> n为a、c、g或u
- [0178] <220>
- [0179] <221> modified_base
- [0180] <222> (2) .. (2)
- [0181] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-O-甲基鸟苷(gm)
- [0182] <220>
- [0183] <221> modified_base
- [0184] <222> (3) .. (3)
- [0185] <223> n代表胞嘧啶(c),其可以是2'-O-甲基胞苷(cm)
- [0186] <400> 6
- [0187] nnnugucaga cagaaaaaag guuuuagagc ua 32
- [0188] <210> 7
- [0189] <211> 60
- [0190] <212> RNA
- [0191] <213> 人工序列
- [0192] <220>
- [0193] <223> HsDmdEX#1 sgRNA的tracrRNA序列
- [0194] <220>

- [0195] <221> modified_base
 [0196] <222> (57) .. (57)
 [0197] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
 [0198] <220>
 [0199] <221> misc_feature
 [0200] <222> (57) .. (59)
 [0201] <223> n为a、c、g或u
 [0202] <220>
 [0203] <221> modified_base
 [0204] <222> (58) .. (58)
 [0205] <223> n代表尿嘧啶(u),其可以是2'-0-甲基尿苷(um)
 [0206] <220>
 [0207] <221> modified_base
 [0208] <222> (59) .. (59)
 [0209] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
 [0210] <400> 7
 [0211] uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau caacuugaaa aaguggcacc gagucgnnnc 60
 [0212] <210> 8
 [0213] <211> 60
 [0214] <212> RNA
 [0215] <213> 人工序列
 [0216] <220>
 [0217] <223> HsDmdEX#23 sgRNA的tracrRNA序列
 [0218] <220>
 [0219] <221> modified_base
 [0220] <222> (57) .. (57)
 [0221] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)
 [0222] <220>
 [0223] <221> misc_feature
 [0224] <222> (57) .. (59)
 [0225] <223> n为a、c、g或u
 [0226] <220>
 [0227] <221> modified_base
 [0228] <222> (58) .. (58)
 [0229] <223> n代表尿嘧啶(u),其可以是2'-0-甲基尿苷(um)
 [0230] <220>
 [0231] <221> modified_base
 [0232] <222> (59) .. (59)
 [0233] <223> n代表鸟嘌呤(g),其可以是2'-0-甲基鸟苷(gm)

- [0234] <400> 8
- [0235] uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau caacuugaaa aaguggcacc gagucgnnc 60
- [0236] <210> 9
- [0237] <211> 98
- [0238] <212> RNA
- [0239] <213> 人工序列
- [0240] <220>
- [0241] <223> MmRosa26 sgRNA
- [0242] <220>
- [0243] <221> modified_base
- [0244] <222> (1) .. (1)
- [0245] <223> gm
- [0246] <220>
- [0247] <221> misc_feature
- [0248] <222> (1) .. (3)
- [0249] <223> n为a、c、g或u
- [0250] <220>
- [0251] <221> modified_base
- [0252] <222> (3) .. (3)
- [0253] <223> um
- [0254] <220>
- [0255] <221> modified_base
- [0256] <222> (95) .. (95)
- [0257] <223> um
- [0258] <220>
- [0259] <221> misc_feature
- [0260] <222> (95) .. (97)
- [0261] <223> n为a、c、g或u
- [0262] <220>
- [0263] <221> modified_base
- [0264] <222> (96) .. (96)
- [0265] <223> um
- [0266] <220>
- [0267] <221> modified_base
- [0268] <222> (97) .. (97)
- [0269] <223> um
- [0270] <400> 9
- [0271] nnnnggcggg agucuucugu uuuagagcua gaaauagcaa guaaaaauaa ggcuaaguccg 60
- [0272] uuaucaacu gaaaaagugg caccgagucg gucnnu 98

- [0273] <210> 10
[0274] <211> 35
[0275] <212> DNA
[0276] <213> 人工序列
[0277] <220>
[0278] <223> 实施例 1[1-3]中使用的正向引物
[0279] <400> 10
[0280] ctccgaggcg gatcacaagc aataataacc tgtag 35
[0281] <210> 11
[0282] <211> 35
[0283] <212> DNA
[0284] <213> 人工序列
[0285] <220>
[0286] <223> 实施例 1[1-3]中使用的反向引物
[0287] <400> 11
[0288] tgcaagcacg tttccgactt gagttgcctc aagag 35
[0289] <210> 12
[0290] <211> 20
[0291] <212> DNA
[0292] <213> 小白鼠 (Mus musculus)
[0293] <400> 12
[0294] atgaatgtgc ctacatatgg 20
[0295] <210> 13
[0296] <211> 20
[0297] <212> DNA
[0298] <213> 小白鼠 (Mus musculus)
[0299] <400> 13
[0300] catagcatgc atttgcttc 20
[0301] <210> 14
[0302] <211> 20
[0303] <212> DNA
[0304] <213> 小白鼠 (Mus musculus)
[0305] <400> 14
[0306] gaatgaggta gtgtttagg 20
[0307] <210> 15
[0308] <211> 20
[0309] <212> DNA
[0310] <213> 小白鼠 (Mus musculus)
[0311] <400> 15

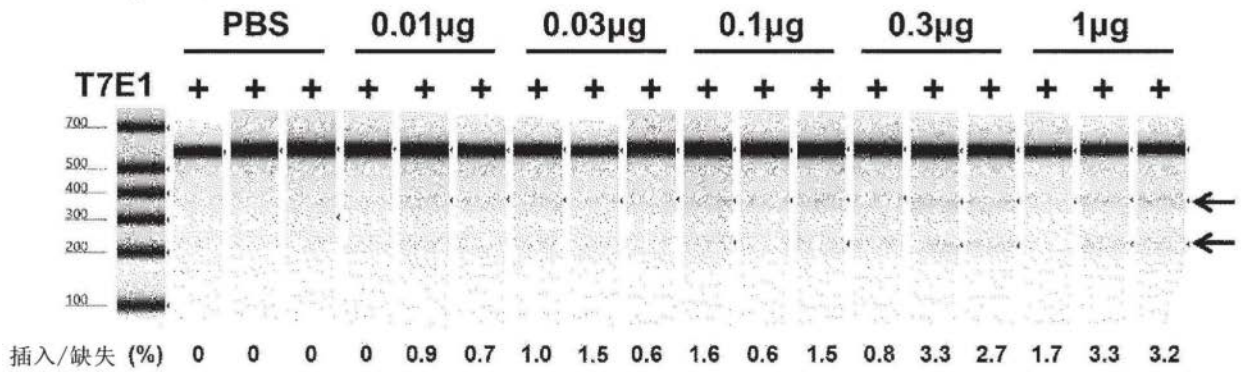
- [0312] gcaggaaatc atcttatagc 20
- [0313] <210> 16
- [0314] <211> 120
- [0315] <212> DNA
- [0316] <213> 人工序列
- [0317] <220>
- [0318] <223> 实施例 2[2-3]中使用的ssODN
- [0319] <400> 16
- [0320] gagcaagctg ggtagaaca aaggtctgtc agagtcagca tgggaatgag gtagtggtgt 60
- [0321] agcaggaaat agtgtggttt aggtctctcc ccgccctctg tgtatgtgtg tgtgtgtgtt 120
- [0322] <210> 17
- [0323] <211> 35
- [0324] <212> DNA
- [0325] <213> 人工序列
- [0326] <220>
- [0327] <223> 实施例2[2-4]和[2-5]以及实施例5中使用的正向引物
- [0328] <400> 17
- [0329] caagtttaaa atagcagaaa accactaact agcca 35
- [0330] <210> 18
- [0331] <211> 35
- [0332] <212> DNA
- [0333] <213> 人工序列
- [0334] <220>
- [0335] <223> 实施例2[2-4]和[2-5]以及实施例5中使用的反向引物
- [0336] <400> 18
- [0337] ctgacacata aaaggtgtct ttctgtcttg tatec 35
- [0338] <210> 19
- [0339] <211> 21
- [0340] <212> DNA
- [0341] <213> 人工序列
- [0342] <220>
- [0343] <223> 实施例2[2-5]和实施例6中使用的正向引物
- [0344] <400> 19
- [0345] ggtgaaagta caggaagccg t 21
- [0346] <210> 20
- [0347] <211> 21
- [0348] <212> DNA
- [0349] <213> 人工序列
- [0350] <220>

- [0351] <223> 实施例2[2-5]和实施例6中使用的反向引物
[0352] <400> 20
[0353] ttagctgctg ctcactcca a 21
[0354] <210> 21
[0355] <211> 20
[0356] <212> DNA
[0357] <213> 人工序列
[0358] <220>
[0359] <223> 实施例3[3-5]和实施例4[4-5]中使用的正向引物
[0360] <400> 21
[0361] ctacaggaag ctctctcca 20
[0362] <210> 22
[0363] <211> 22
[0364] <212> DNA
[0365] <213> 人工序列
[0366] <220>
[0367] <223> 实施例3[3-5]和实施例4[4-5]中使用的反向引物
[0368] <400> 22
[0369] tgcttcctcc aaccataaaa ca 22

[A]

MmRosa26 sgRNA + Cas9 mRNA

50 μ l 注射



[B]

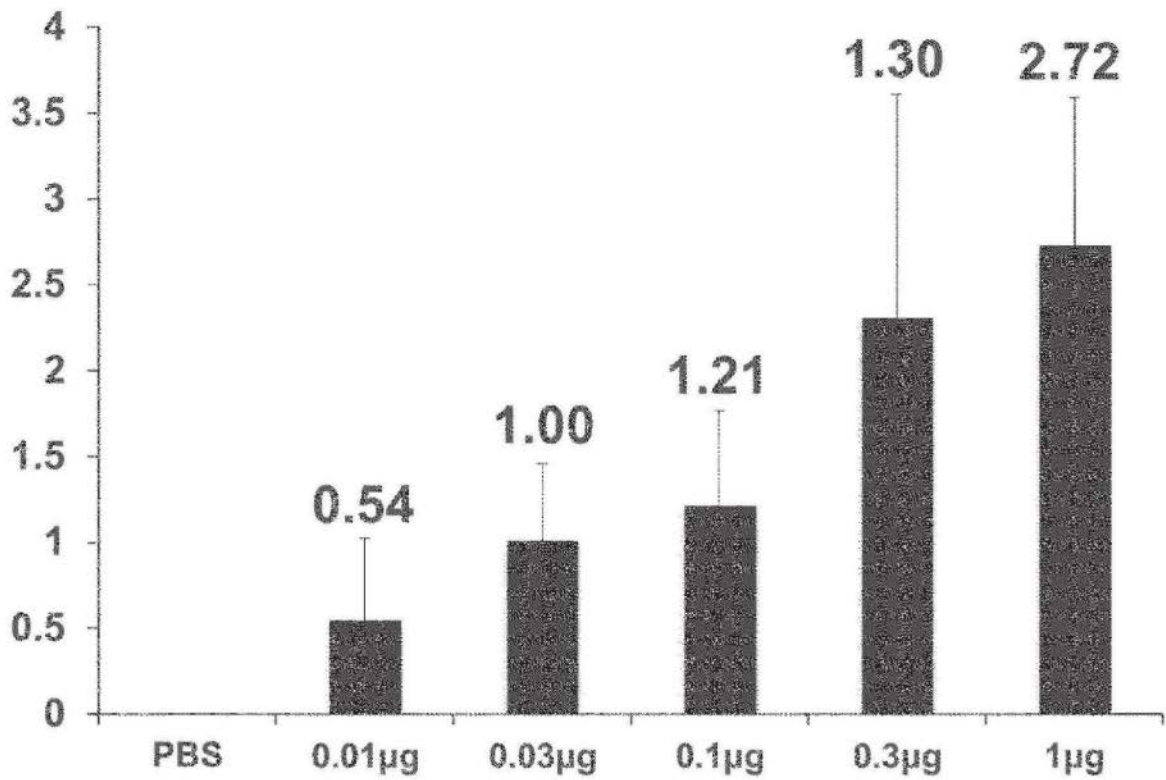


图1

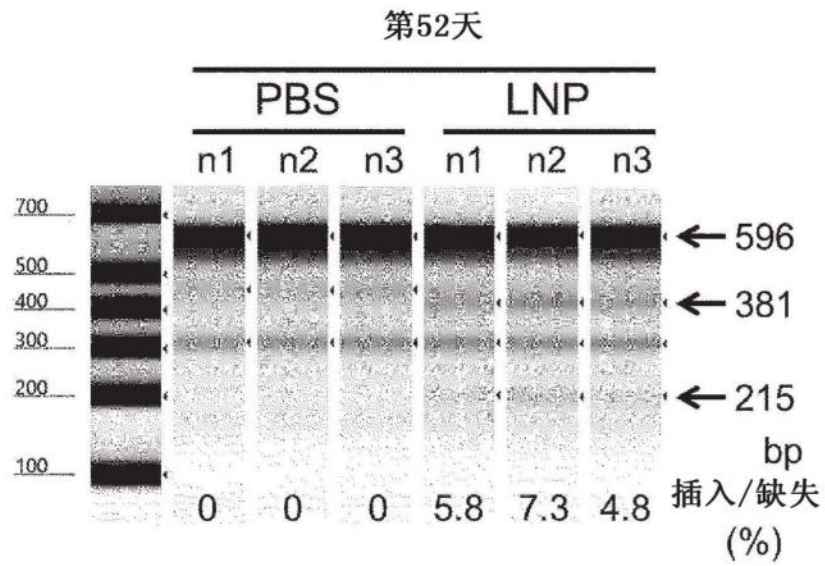


图2

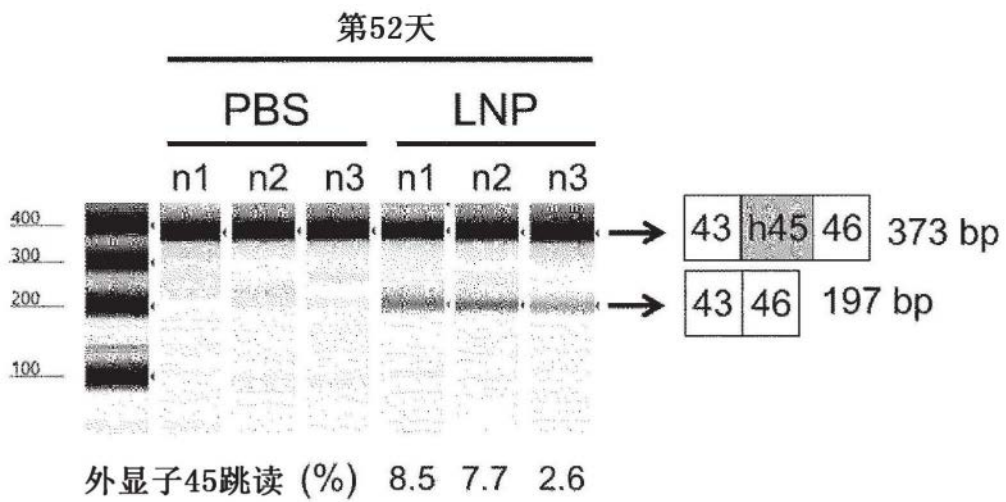


图3

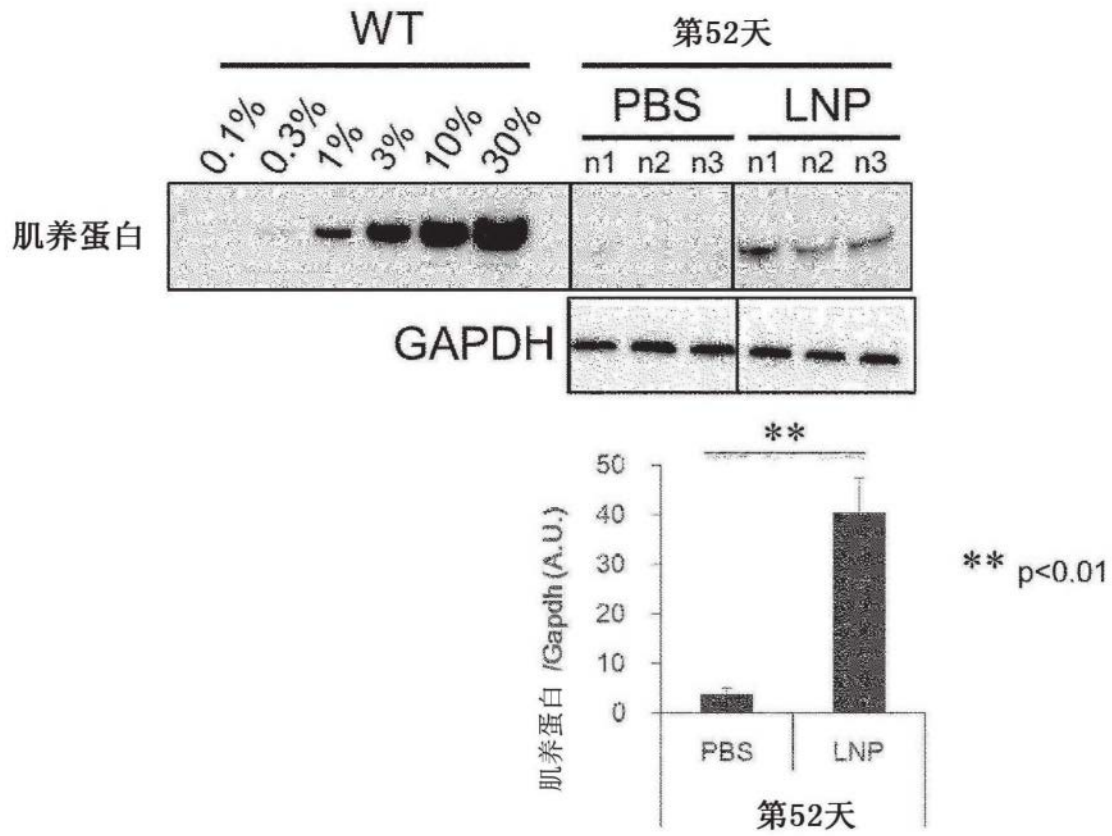


图4

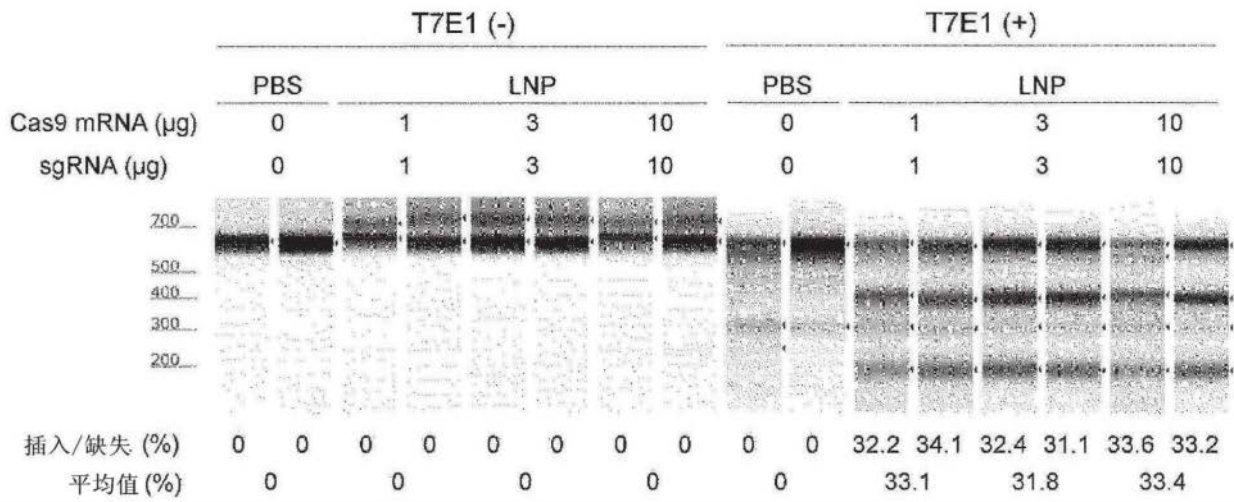


图5

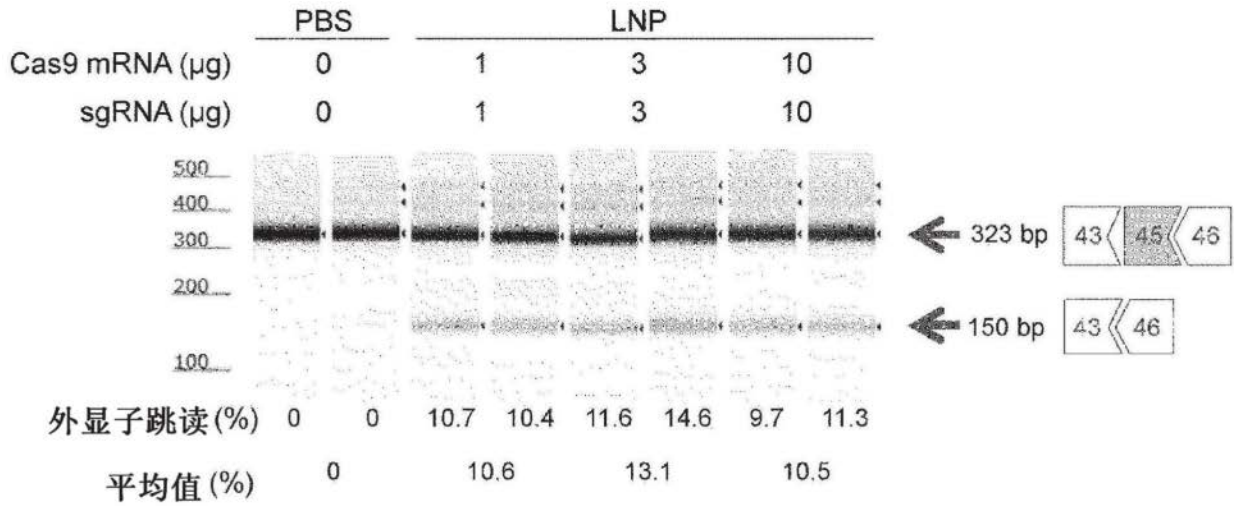


图6

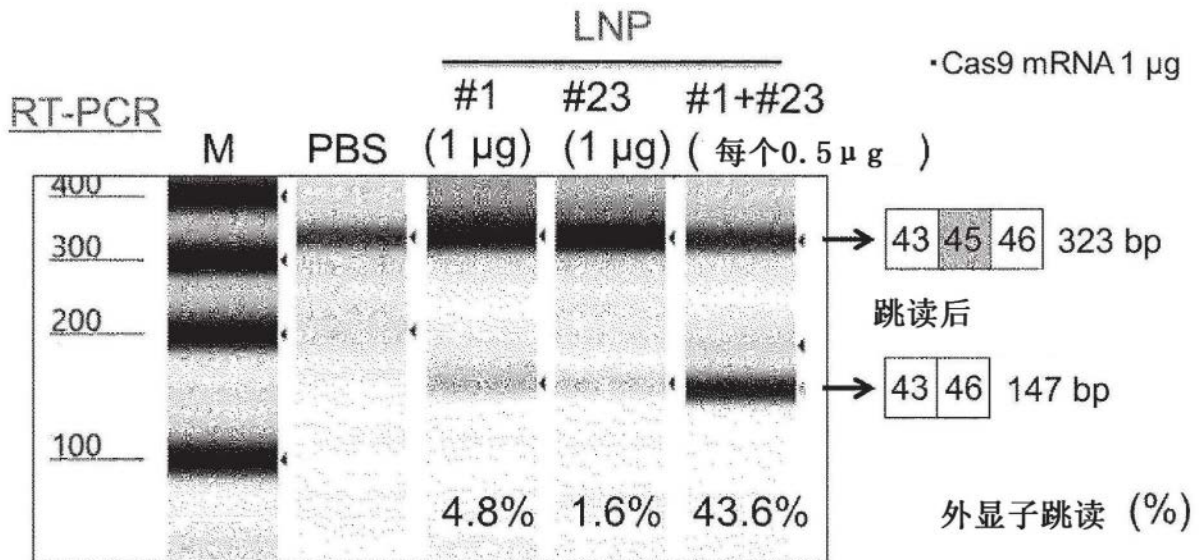


图7

蛋白免疫印迹

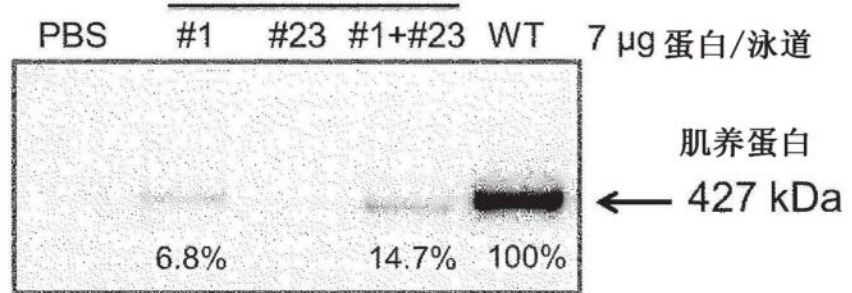


图8

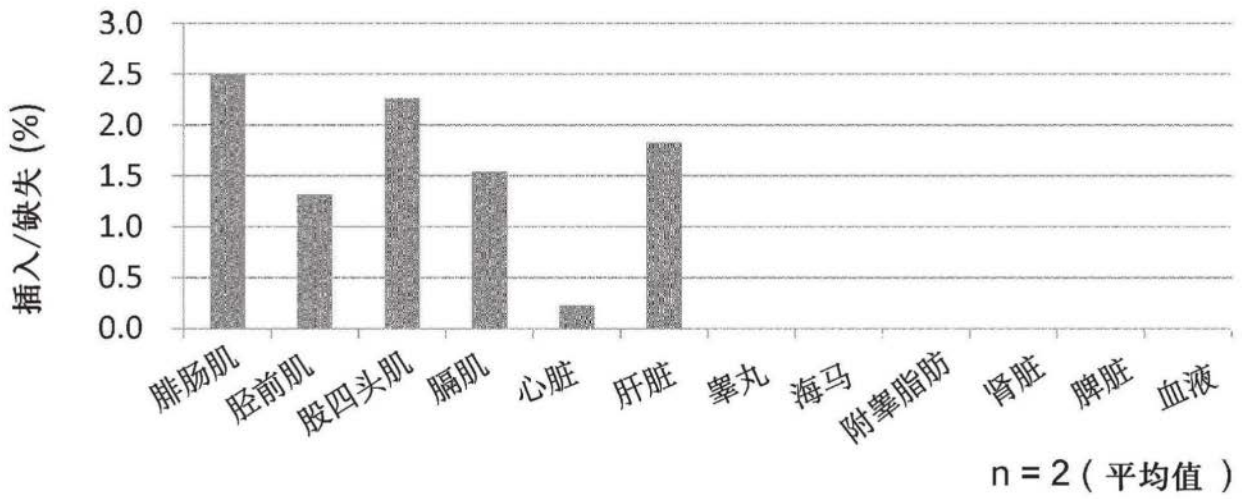


图9

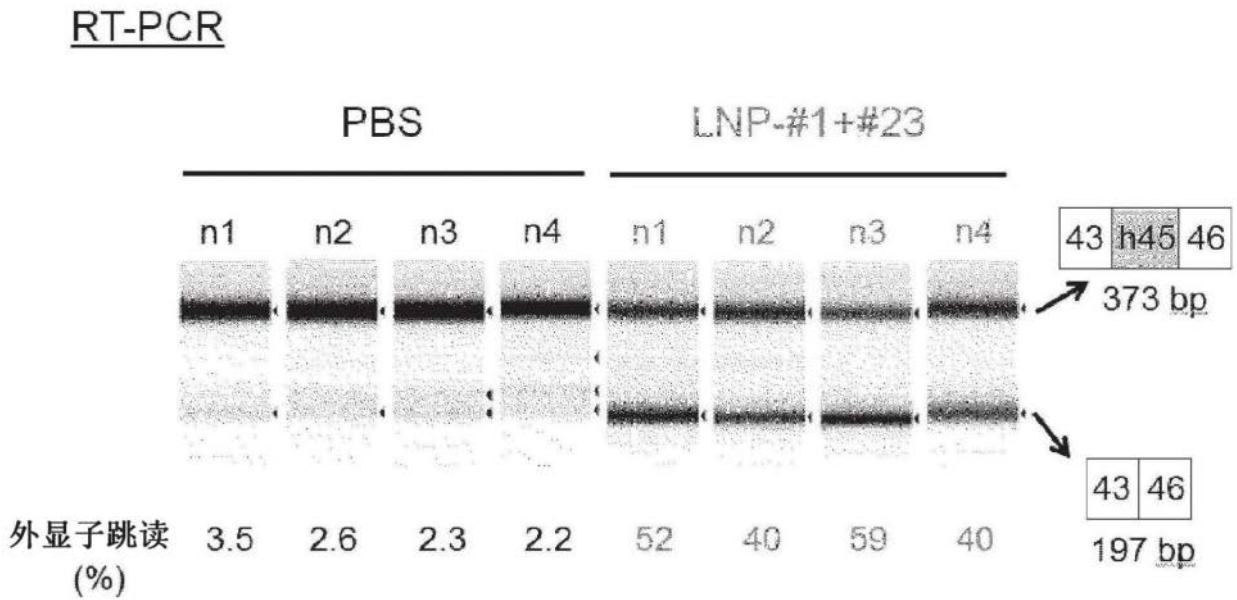


图10