



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월24일
(11) 등록번호 10-2799255
(24) 등록일자 2025년04월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) A01K 67/027 (2024.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/24 (2017.01)
A61K 47/28 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 21/02 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
A01K 67/027 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7018909
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월27일
심사청구일자 2021년12월22일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월30일
- (65) 공개번호 10-2020-0104318
- (43) 공개일자 2020년09월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2018/048034
- (87) 국제공개번호 WO 2019/131829
국제공개일자 2019년07월04일
- (30) 우선권주장
JP-P-2017-254798 2017년12월28일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170045345 A
WO2016153012 A1
WO2003102150 A1

- (73) 특허권자
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 요시다혼마치 36번치 1
다케다 야쿠헝 교고 가부시키키가이사
일본 오사카 추오쿠 도쇼마치 4쵸메 1반 1고
- (72) 발명자
호타 아키츠
일본, 6068501, 교토, 교토시, 사쿄쿠, 요시다혼마치, 36-1, 씨/오 고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠
이후쿠 마사타카
일본, 6068501, 교토, 교토시, 사쿄쿠, 요시다혼마치, 36-1, 씨/오 고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 이형곤

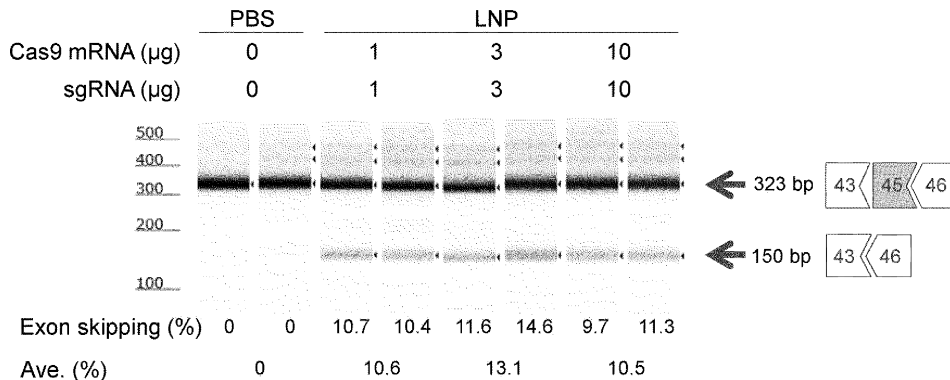
(54) 발명의 명칭 표적 유전자 개변용 조성물

(57) 요약

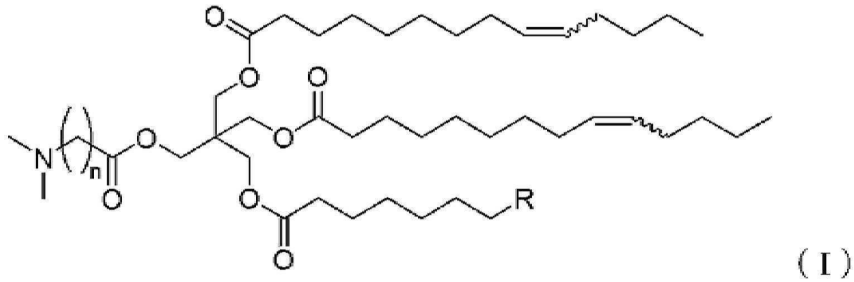
본 발명은 세포에서의 높은 유전자 개변 효율의 실현이 가능한 유전자 개변 툴을 송달하기 위한 딜리버리 수법을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물은 1) 식 (I)로 표시되는 화합물 또는 그 염, 2) 구조 지질 및 3) 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



는 핵산을 포함하는, 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하기 위한 조성물이다. 식 (I) 중, n은 2 내지 5의 정수를, R은 직쇄상 C₁₋₅ 알킬기, 직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기 또는 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기를, 파선은 각각 독립적으로 시스형 또는 트랜스형 결합을 나타낸다.



(52) CPC특허분류

- A61K 31/7088 (2013.01)
- A61K 38/46 (2013.01)
- A61K 47/18 (2013.01)
- A61K 47/24 (2013.01)
- A61K 47/28 (2013.01)
- A61K 48/00 (2024.01)
- A61P 21/02 (2018.01)
- C07K 14/435 (2013.01)
- C12N 15/102 (2013.01)

(72) 발명자

후지모토 나오코

일본, 6068501, 교토, 교토시, 사쿄쿠, 요시다혼마치, 36-1, 씨/오 고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠

이와부치 쿠미코

일본, 6068501, 교토, 교토시, 사쿄쿠, 요시다혼마치, 36-1, 씨/오 고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠

겐조 에리야

일본, 2510012, 카나가와, 후지사와시, 무라오카-히가시 2초메, 26, 씨/오 다케다 야쿠형 고교 가부시키키가이샤

마키타 유키마사

일본, 2510012, 카나가와, 후지사와시, 무라오카-히가시 2초메, 26, 씨/오 다케다 야쿠형 고교 가부시키키가이샤

오치아이 루미코

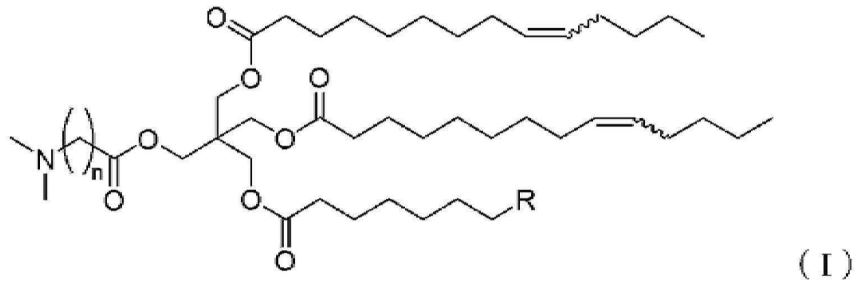
일본, 2510012, 카나가와, 후지사와시, 무라오카-히가시 2초메, 26, 씨/오 다케다 야쿠형 고교 가부시키키가이샤

명세서

청구범위

청구항 1

1) 식 (I):



[식 (I) 중,

n은 2 내지 5의 정수를,

R은 직쇄상 C₁₋₅ 알킬기, 직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기 또는 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기를,

파선은 각각 독립적으로 시스형 또는 트랜스형의 결합을 나타낸다.]

로 표시되는 화합물 또는 그 염,

2) 구조 지질 및

3) 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 포함하는, 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, RNA 유도형 뉴클레아제가 Cas9이며;

가이드 RNA가

(a) 키메라 RNA 또는

(b) crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 2 이상의 RNA

인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, Cas9가 화농성 렌서 구균 유래 Cas9인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 2종류 이상의 가이드 RNA인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 세포가 근세포인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 표적 유전자좌가 디스트로핀 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 가이드 RNA가

- (1) 서열 번호 1 혹은 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA, 또는
- (2) (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및
- (ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 화합물이 3-((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)-2,2-비스(((9Z,9'Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트인 조성물.

청구항 9

생체 외에서 제1항에 기재된 조성물과 세포를 접촉시키는 공정을 포함하는, 세포 중의 표적 유전자좌를 개변하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, RNA 유도형 뉴클레아제가 Cas9이며;

가이드 RNA가

- (a) 키메라 RNA 또는
- (b) crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 2 이상의 RNA

인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, Cas9가 화학성 렌서 구균 유래 Cas9인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 세포가 근세포인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 표적 유전자좌가 디스트로핀 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 가이드 RNA가

- (1) 서열 번호 1 혹은 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA, 또는
- (2) (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및
- (ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA인 방법.

청구항 15

제9항에 기재된 방법에 의해 얻어지는, 표적 유전자좌가 개변된 단리된 세포.

청구항 16

제6항에 기재된 조성물을 포함하는 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, RNA 유도형 뉴클레아제가 Cas9이며;

가이드 RNA가

(a) 키메라 RNA 또는

(b) crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 2 이상의 RNA

인 의약 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, Cas9가 화농성 렌서 구균 유래 Cas9인 의약 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서, 가이드 RNA가

(1) 서열 번호 1 혹은 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA, 또는

(2) (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및

(ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA인 의약 조성물.

청구항 20

제16항에 있어서, 근디스트로피의 예방용 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 조성물이 또한 수복형 디스트로핀 단백질의 생산을 위한 것인 의약 조성물.

청구항 22

인간을 제외한 포유 동물에 대하여 제6항에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 특징으로 하는, 해당 포유 동물에서의 근디스트로피의 예방 방법 또는 치료 방법.

청구항 23

인간을 제외한 포유 동물에 대하여 제6항에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 특징으로 하는, 해당 포유 동물에서의 수복형 디스트로핀 단백질 생산 방법.

청구항 24

제6항에 있어서, 근디스트로피의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 25

생체 외에서 제1항에 기재된 조성물과 세포를 접촉시키는 공정을 포함하는, 표적 유전자좌가 개변된 세포의 제조 방법.

청구항 26

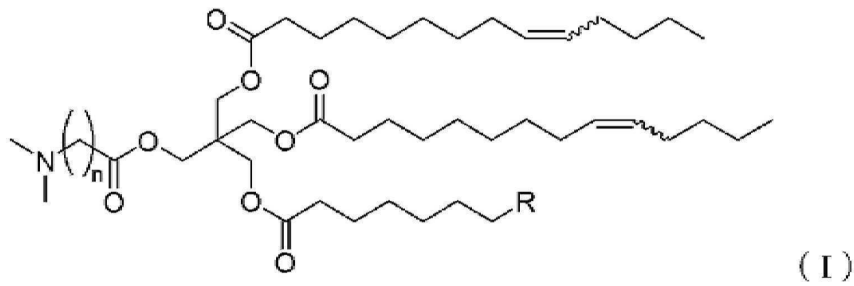
(1) 제1항에 기재된 조성물과 비인간 포유 동물의 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 접촉시키는 공정,

(2) 표적 유전자좌가 개변된 상기 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 선택하는 공정, 및

(3) 상기 선택된 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 비인간 포유 동물의 암컷 동물에게 이식하는 공정을 포함하는, 표적 유전자좌가 개변된 비인간 포유 동물의 제작 방법.

청구항 27

1) 식 (I):



[식 (I) 중,

n은 2 내지 5의 정수를,

R은 직쇄상 C₁₋₅ 알킬기, 직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기 또는 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기를,

과선은 각각 독립적으로 시스형 또는 트랜스형의 결합을 나타낸다.]

로 표시되는 화합물 또는 그 염, 및

2) 구조 지질

을 포함하는 지질 입자 분산액과,

3) 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산

을 포함하는 수용액을 혼합하는 공정을 포함하는,

세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하기 위한 조성물의 제조 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 2종류 이상의 가이드 RNA인 제조 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 화합물이 3-((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)-2,2-비스(((9Z,9'Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트인 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 활성 성분으로서 CRISPR 시스템에 사용되는 물질을 세포 내에 도입하는 것을 가능하게 하는 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이와 같은 조성물을 이용하여 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하는 방법, 예를 들어 근세포의 디스트로핀 유전자를 개변함으로써 근디스트로피를 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 게놈 편집 수단, 예를 들어 CRISPR(Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats) 시스템을 이용해 다양한 세포 중에서 유전자 개변을 하기 위한 연구 개발이 진행되고 있다. 그러나 주사 등에 의한 생체로의 투여에 의해 목적으로 하는 세포 중에 CRISPR 시스템에서 필요로 하는 gRNA(가이드 RNA)나 RNA 유도형 뉴클레아제(Cas9 등)를 코딩하는 유전자 등의 유전자 개변 틀을 송달하여 유전자 개변을 하는 것에 대해서는 보

고가 적으며 예를 들어 근세포에서의 높은 유전자 개변 효율의 실현이 가능한 유전자 개변 툴을 송달하기 위한 딜리버리 수법의 개발이 요망되고 있다. CRISPR 시스템으로서는 클래스 1과 클래스 2가 알려져 있으며, 클래스 1 중에서는 타입 I, 타입 III, 타입 IV가, 클래스 2 중에서는 타입 II, 타입 V 및 타입 VI가 알려져 있다. 유전자 개변을 행함에 있어서 DNA에 결합하여 절단하는 클래스 2 타입 II의 Cas9가 널리 이용되고 있는데, 마찬가지로 DNA를 결합·절단하는 클래스 2 타입 V의 Cpf1(Cas12a)이나 C2c1(Cas12b) 등도 이용되고 있다. 또, RNA에 결합하여 절단하는 클래스 2 타입 VI의 Cas13a(C2c2)나 Cas13b 등도 보고되어 있다.

[0003] 세포로의 딜리버리 수단인 하나로서, gRNA, mRNA 등의 핵산을 내포할 수 있는 지질 나노 입자(LNP: lipid nanoparticle)가 알려져 있다. 예를 들어 줄기 세포에 대하여 LNP에 의해 CRISPR/Cas9 시스템의 유전자 개변 툴을 송달하는 것을 기재한 선행 기술 문헌으로서는 다음과 같은 것을 들 수 있다.

[0004] 비특허 문헌 1에는 C12-200(지질형 분자), 콜레스테롤, C14PEG2000(폴리에틸렌글리콜 지질), DOPE(1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민) 및 아라키돈산을 이용하여 제작된 LNP로 SpCas9(*S. treptococcus pyogenes* 유래의 Cas 9)의 mRNA를, AAV 벡터에서 gRNA 및 상동 제조합 수복(HDR: Homology-directed repair) 템플릿을 각각 $Fah^{mut/mut}$ 마우스에게 정맥 주사함으로써 간에서의 Fah^+ 세포의 비율이 증가하였다고 기재되어 있다.

[0005] 특허 문헌 1에는, gRNA, 양이온성 지질 및 비양이온성 지질을 포함하는 지질 입자가 기재되어 있다. 양이온성 지질로서는 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA) 등이 예시되어 있다. 실시예에서는 Cas9의 mRNA 및 gRNA를 포함하는 LNP를 마우스에게 정맥 주사함으로써 간세포의 Pcsk9 유전자 및 HBV RT 유전자에서 indel이 인정되었다고 기재되어 있다.

[0006] 비특허 문헌 2에는 cKK-E12(리신 베이스의 디펩티드로부터의 유도체인 지질형 분자), 콜레스테롤, C14PEG2000 및 DOPE를 이용하여 제작된 LNP를 이용하여 SpCas9의 mRNA 및 수식 sgRNA를 마우스에게 정맥 주사함으로써 줄기 세포의 Pcsk9 유전자, Fah 유전자 및 Rosa26 유전자에서 indel이 인정되었다고 기재되어 있다.

[0007] 한편 LNP 이외의 수단에 의해 근세포 등에 대해 CRISPR/Cas9 시스템의 유전자 개변 툴을 송달하는 것을 기재한 선행 기술 문헌으로서는 다음과 같은 것을 들 수 있다.

[0008] 특허 문헌 2에는, 듀시엔형 근디스트로피를 치료하기 위해서 마우스 디스트로핀 유전자(Dmd)의 결손을 수정하는 것을 목적으로 하여, gRNA 및 Cas9를 코딩하는 유전자의 바이러스 벡터(예를 들어 아데노 수반 바이러스(AAV))를 이용해, 근세포 등으로 송달하는 것이 기재되어 있다. 실시예에서는 Dmd의 엑손 23에 넌센스 변이(스톱 코돈)가 발생하고 있는 mdx 마우스에 대하여 당해 엑손을 스킵하기 위한 sgRNA 및 spCas9 유전자를 적재한 벡터를 포함하는 변형 AAV를 주사에 의해 투여하여 근섬유 및 심근 세포 일부에서 디스트로핀 양성이 되었다고 기재되어 있다.

[0009] 특허 문헌 3에도 gRNA 및 Cas9를 코딩하는 유전자 등을 근세포 등에 송달함으로써 Dmd 등의 유전자를 수정할 수 있다고 기재되어 있다. 실시예(실시예 9, 11 등)에서는 환자에게서 채취한 근육 시원 세포 집단에 대해(생체 밖에서) Dmd의 엑손 51을 스킵하기 위한 sgRNA 및 SpCas9 유전자를 적재한 발현 플라스미드를 일렉트로포레이션에 의해 도입한 후, 그 세포 집단을 면역 부전 마우스에게 이식하여 당해 마우스의 체내에서 디스트로핀 단백을 발현할 수 있었다고 기재되어 있다.

[0010] 비특허 문헌 3에는 gRNA 및 SaCas9의 mRNA 혹은 SpCas9의 mRNA를 AAV에 의해 mdx 마우스(근디스트로피 모델)에게 정맥 주사 또는 근육 내 투여하여 심근 및 골격근에서 엑손 23의 deletion이 인정되었다고 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) WO 2016/197133호 팸플릿
- (특허문헌 0002) WO 2016/025469호 팸플릿
- (특허문헌 0003) WO 2014/197748호 팸플릿

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Yin et al., Nat. Biotech., 34 (2016) p329-333
- (비특허문헌 0002) Yin et al., Nat. Biotech., 35 (2017) p1179-1187
- (비특허문헌 0003) Tabebordbar et al., Science, 351 (2016) p407-411

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 여러 세포에서의 높은 유전자 개변 효율의 실현이 가능한 유전자 개변 툴을 송달하기 위한 딜리버리 수법을 제공하는 것이다.

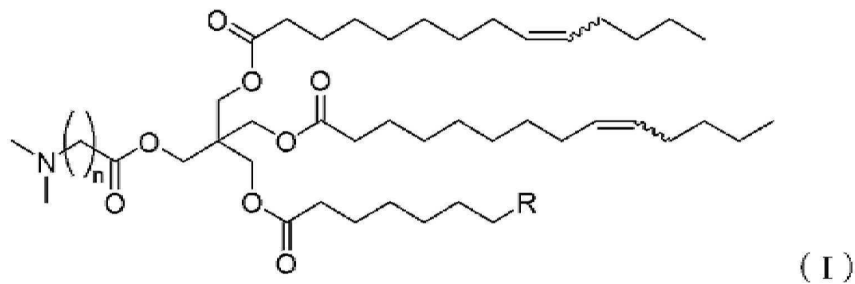
과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들이 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토한 결과, 하기 식으로 표시되는 화합물(양이온성 지질의 일종) 또는 그 염과 다른 구조 지질에 의해 형성되는 지질 입자를 이용함으로써 가이드 RNA(gRNA)나 Cas9로 대표되는 RNA 유도형 뉴클레아제 단백질 또는 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 등을 다양한 세포 중에 효율적으로 송달할 수 있어 상기 과제를 해결 가능하다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0015] 즉, 본 발명은 적어도 이하의 발명에 관한 것이다.

[0016] [1]

[0017] 1) 식 (I):

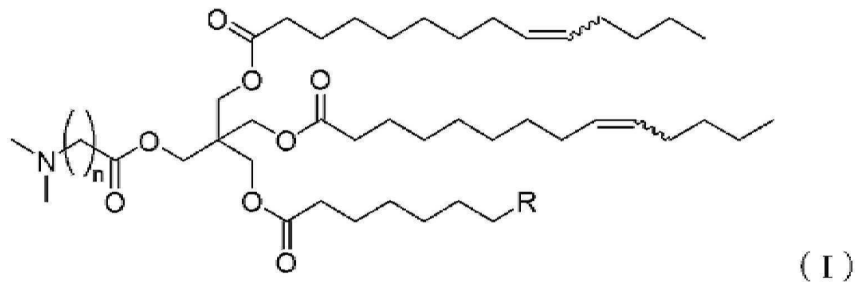


- [0018]
- [0019] [식 (I) 중,
- [0020] n은 2 내지 5의 정수를,
- [0021] R은 직쇄상 C₁₋₅ 알킬기, 직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기 또는 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기를,
- [0022] 과선은 각각 독립적으로 시스형 또는 트랜스형의 결합을 나타낸다.]
- [0023] 로 표시되는 화합물 또는 그 염,
- [0024] 2) 구조 지질 및
- [0025] 3) 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 포함하는, 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하기 위한 조성물.
- [0026] [2]
- [0027] RNA 유도형 뉴클레아제가 Cas9이며;
- [0028] 가이드 RNA가
- [0029] (a) 키메라 RNA 또는
- [0030] (b) crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 2 이상의 RNA

- [0031] 인, 항 1에 기재된 조성물.
- [0032] [2a]
- [0033] RNA 유도형 뉴클레아제가 Cpf1인 항 1에 기재된 조성물.
- [0034] [3]
- [0035] Cas9가 화농성 렌서 구균 유래 Cas9인 항 1 또는 항 2에 기재된 조성물.
- [0036] [4]
- [0037] 상기 가이드 RNA가 2종류 이상의 가이드 RNA인 항 1 내지 항 3 중 어느 것에 기재된 조성물.
- [0038] [5]
- [0039] 세포가 근세포인 항 1 내지 항 4 중 어느 것에 기재된 조성물.
- [0040] [6]
- [0041] 표적 유전자좌가 디스트로핀 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 항 1 내지 항 5 중 어느 것에 기재된 조성물.
- [0042] [7]
- [0043] 가이드 RNA가
- [0044] (1) 서열 번호 1 혹은 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA, 또는
- [0045] (2) (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및
- [0046] (ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA
- [0047] 인, 항 1 내지 항 6 중 어느 것에 기재된 조성물.
- [0048] [8]
- [0049] 항 1에 기재된 조성물과 세포를 접촉시키는 공정을 포함하는, 세포 중의 표적 유전자좌를 개변하는 방법.
- [0050] [9]
- [0051] RNA 유도형 뉴클레아제가 Cas9이며;
- [0052] 가이드 RNA가
- [0053] (a) 키메라 RNA 또는
- [0054] (b) crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 2 이상의 RNA
- [0055] 인, 항 8에 기재된 방법.
- [0056] [9a]
- [0057] RNA 유도형 뉴클레아제가 Cpf1인 항 8에 기재된 방법.
- [0058] [10]
- [0059] Cas9가 화농성 렌서 구균 유래 Cas9인, 항 8 또는 항 9에 기재된 방법.
- [0060] [11]
- [0061] 세포가 근세포인, 항 8 내지 항 10 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0062] [12]
- [0063] 표적 유전자좌가 디스트로핀 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 항 8 내지 항 11 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0064] [13]

- [0065] 가이드 RNA가
- [0066] (1) 서열 번호 1 혹은 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA, 또는
- [0067] (2) (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및
- [0068] (ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA
- [0069] 인, 항 8 내지 항 12 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0070] [14]
- [0071] 항 8 내지 항 13 중 어느 것에 기재된 방법에 의해 얻어지는 표적 유전자좌가 개변된 세포.
- [0072] [15]
- [0073] 항 6에 기재된 조성물을 포함하는 의약.
- [0074] [16]
- [0075] RNA 유도형 뉴클레아제가 Cas9이며;
- [0076] 가이드 RNA가
- [0077] (a) 키메라 RNA 또는
- [0078] (b) crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 2 이상의 RNA
- [0079] 인, 항 15에 기재된 의약.
- [0080] [16a]
- [0081] RNA 유도형 뉴클레아제가 Cpf1인 항 15에 기재된 의약.
- [0082] [17]
- [0083] Cas9가 화농성 렌서 구균 유래 Cas9인 항 15 또는 항 16에 기재된 의약.
- [0084] [18]
- [0085] 가이드 RNA가
- [0086] (1) 서열 번호 1 혹은 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA, 또는
- [0087] (2) (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및
- [0088] (ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA
- [0089] 인, 항 15 내지 항 17 중 어느 것에 기재된 의약.
- [0090] [19]
- [0091] 근디스트로피의 예방·치료약인 항 15 내지 항 18 중 어느 것에 기재된 의약.
- [0092] [20]
- [0093] 수복형 디스트로핀 단백 생산약인 항 15 내지 항 19 중 어느 것에 기재된 의약.
- [0094] [21]
- [0095] 포유 동물에 대하여 항 6 또는 항 7에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 특징으로 하는 해당 포유 동물에서의 근디스트로피의 예방·치료 방법.
- [0096] [21a]
- [0097] 상기 투여가 정맥 내 투여인 항 21에 기재된 예방·치료 방법.
- [0098] [21b]
- [0099] 상기 투여가 근육 내 투여인 항 21에 기재된 예방·치료 방법.

- [0100] [22]
- [0101] 포유 동물에 대하여 항 6 또는 항 7에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 특징으로 하는 해당 포유 동물에서의 수복형 디스트로핀 단백 생산 방법.
- [0102] [23]
- [0103] 근디스트로피의 예방·치료제를 제조하기 위한 항 6 또는 항 7에 기재된 조성물의 사용.
- [0104] [24]
- [0105] 근디스트로피의 예방·치료를 사용하기 위한 항 6 또는 항 7에 기재된 조성물.
- [0106] [25]
- [0107] 항 1 내지 항 7 중 어느 것에 기재된 조성물과 세포를 접촉시키는 공정을 포함하는, 표적 유전자좌가 개변된 세포의 제조 방법.
- [0108] [26]
- [0109] (1) 항 1 내지 항 7 중 어느 것에 기재된 조성물과 비인간 포유 동물의 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 접촉시키는 공정,
- [0110] (2) 표적 유전자좌가 개변된 상기 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 선택하는 공정, 및
- [0111] (3) 상기 선택된 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 비인간 포유 동물의 암컷 동물에게 이식하는 공정을 포함하는, 표적 유전자좌가 개변된 비인간 포유 동물의 제작 방법.
- [0112]
- [0113] [27]
- [0114] 1) 식 (I):



- [0115]
- [0116] [식 (I) 중,
- [0117] n은 2 내지 5의 정수를,
- [0118] R은 직쇄상 C₁₋₅ 알킬기, 직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기 또는 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기를,
- [0119] [과선은 각각 독립적으로 시스형 또는 트랜스형의 결합을 나타낸다.]
- [0120] 로 표시되는 화합물 또는 그 염, 및
- [0121] 2) 구조 지질
- [0122] 을 포함하는 지질 입자 분산액과,
- [0123] 3) 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산
- [0124] 을 포함하는 수용액을 혼합하는 공정을 포함하는,
- [0125] 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하기 위한 조성물의 제조 방법.
- [0126] [28]

[0127] 상기 가이드 RNA가 2종류 이상의 가이드 RNA인 항 27에 기재된 제조 방법.

[0128] 또한, 본 명세서에서 "식 (I)로 표시되는 화합물"을 "화합물 (I)"이라고 기재하는 수가 있다. "식 (I)로 표시되는 화합물 또는 그 염"을 "본 발명의 화합물"이라고 하기도 한다. "식 (I)로 표시되는 화합물 또는 그 염(본 발명의 화합물)을 함유하는 지질 입자"를 "본 발명의 지질 입자"라고 하는 수가 있다. 또한 "가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 또는 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산"을 "본 발명의 활성 성분"이라고 하기도 한다. "가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA"를 "gRNA 등"이라고 하는 수가 있고, "RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산"을 "RNA 유도형 뉴클레아제 등"이라고 하기도 한다. 본 발명의 화합물, 구조 지질, gRNA 등 및 RNA 유도형 뉴클레아제 등을 함유하는 조성물을 "본 발명의 조성물"이라 하는 수가 있다.

[0129] 본 발명의 지질 입자의 형상은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 본 발명의 화합물 등이 구형을 구성하도록 집합한 복합체, 특정 형상을 구성하지 않고 집합한 복합체, 용매에 용해된 복합체, 분산매 중에 균일하거나 불균일하게 분산된 복합체 등을 포함한다.

발명의 효과

[0130] 본 발명에 따라 활성 성분으로서 CRISPR 시스템에 이용되는 gRNA 등, RNA 유도형 뉴클레아제 등을 각종 세포, 조직 또는 장기에 대해 도입하는 것이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도 1은 실시예 1의 [1-3] "C57BL/6J 마우스에서의 MmRosa26 sgRNA를 이용한 DNA 변이 도입 효율 평가"의 결과를 나타낸다. [A] sgRNA 및 Cas9 mRNA의 농도별 전기 영동도 및 그 농도에서 산출된 변이(indel) 도입 효율. [B] sgRNA 및 Cas9 mRNA의 농도와 변이 도입 효율의 관계를 나타내는 그래프. 세로 축은 변이(indel) 도입 효율(%)을 나타내고, 가로 축은 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 농도를 나타낸다.

도 2는 실시예 2의 [2-4] "골격근에서의 DNA 변이 도입 효율 평가"에 대한 전기 영동도 및 그 농도에서 산출된 변이(indel) 도입 효율의 결과를 나타낸다.

도 3은 실시예 2의 [2-5] "골격근에서의 엑손 스킵핑 효율 평가"에 대한 전기 영동도 및 그 농도에서 산출된 엑손 스킵핑 효율의 결과를 나타낸다.

도 4는 실시예 2의 [2-6] "골격근에서의 디스트로핀 단백 회복의 평가"에 대한 웨스턴 블로팅 및 그 농도에서 산출된 디스트로핀 단백질의 발현량(디스트로핀/Gapdh의 상대값)의 결과를 나타낸다.

도 5는 실시예 3의 [3-4] "인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 DNA 변이 도입 효율 평가"에 대한 전기 영동도 및 그 농도에서 산출된 변이(indel) 도입 효율의 결과를 나타낸다.

도 6은 실시예 3의 [3-5] "인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 엑손 스킵핑 효율 평가"에 대한 전기 영동도 및 그 농도에서 산출된 엑손 스킵핑 효율의 결과를 나타낸다.

도 7은 실시예 4의 [4-5] "인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 엑손 스킵핑 효율 평가"에 대한 전기 영동도 및 그 농도에서 산출된 엑손 스킵핑 효율의 결과를 나타낸다.

도 8은 실시예 4의 [4-6] "인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 디스트로핀 단백 회복의 평가"에 대한 웨스턴 블로팅 및 그 농도에서 산출된 디스트로핀 단백질의 발현량(디스트로핀/GAPDH의 상대값)의 결과를 나타낸다.

도 9는 실시예 5 "LNP 정맥 내 투여 시의 각종 조직에서의 DNA cleavage activity 평가"에서의 변이 도입 효율의 결과를 나타낸다.

도 10은 실시예 6 "Dual sgRNAs를 이용한 골격근에서의 exon skipping efficiency 평가"에서의 엑손 스킵핑 효율의 결과를 나타낸다.

도 4 및 8 중에서 나타내는 디스트로핀 단백질은 모두 수복형 디스트로핀 단백질(엑손 43과 엑손 46이 연결한 mRNA에서 번역되는 인간 디스트로핀 단백질)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] 이하, 본 명세서 중에서 이용되는 각 치환기의 정의에 대해 상술한다. 특기하지 않는 한 각 치환기는 이하의 정

의를 갖는다.

- [0133] 본 명세서 중 "직쇄상 C₁₋₅ 알킬기"로서는, 예를 들어 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸을 들 수 있다.
- [0134] 본 명세서 중 "직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기"로서는, 예를 들어 1-헵테닐, 2-헵테닐, 3-헵테닐, 4-헵테닐, 5-헵테닐, 6-헵테닐, 1-옥테닐, 2-옥테닐, 3-옥테닐, 4-옥테닐, 5-옥테닐, 6-옥테닐, 7-옥테닐, 1-노네닐, 2-노네닐, 3-노네닐, 4-노네닐, 5-노네닐, 6-노네닐, 7-노네닐, 8-노네닐, 1-데세닐, 2-데세닐, 3-데세닐, 4-데세닐, 5-데세닐, 6-데세닐, 7-데세닐, 8-데세닐, 9-데세닐, 1-운데세닐, 2-운데세닐, 3-운데세닐, 4-운데세닐, 5-운데세닐, 6-운데세닐, 7-운데세닐, 8-운데세닐, 9-운데세닐, 10-운데세닐을 들 수 있다. 이러한 직쇄상 C₇₋₁₁ 알케닐기는 탄소-탄소 이중 결합을 1개 포함하기 때문에 시스형 및 트랜스형의 구조를 취할 수 있지만, 어느 쪽 구조이어도 좋다.
- [0135] 본 명세서 중 "직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기"로서는, 예를 들어 1,3-운데카디에닐, 1,4-운데카디에닐, 1,5-운데카디에닐, 1,6-운데카디에닐, 1,7-운데카디에닐, 1,8-운데카디에닐, 1,9-운데카디에닐, 1,10-운데카디에닐, 2,4-운데카디에닐, 2, 5-운데카디에닐, 2,6-운데카디에닐, 2,7-운데카디에닐, 2,8-운데카디에닐, 2,9-운데카디에닐, 2,10-운데카디에닐, 3,5-운데카디에닐, 3,6-운데카디에닐, 3,7-운데카디에닐, 3,8-운데카디에닐, 3,9-운데카디에닐, 3,10-운데카디에닐, 4,6-운데카디에닐, 4,7-운데카디에닐, 4,8-운데카디에닐, 4,9-운데카디에닐, 4,10-운데카디에닐, 5,7-운데카디에닐, 5,8-운데카디에닐, 5,9-운데카디에닐, 5,10-운데카디에닐, 6,8-운데카디에닐, 6,9-운데카디에닐, 6,10-운데카디에닐, 7,9-운데카디에닐, 7,10-운데카디에닐, 8,10-운데카디에닐을 들 수 있다. 이러한 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기는 탄소-탄소 이중 결합을 2개 포함하기 때문에 각각에서 서로 독립적으로 시스형 및 트랜스형의 구조를 취할 수 있지만, 각각 어느 쪽 구조이어도 좋다.
- [0136] 식 (I)에서의 n 및 파선의 바람직한 예는 다음과 같다.
- [0137] n은 바람직하게는 3 내지 5의 정수이며, 보다 바람직하게는 3이다.
- [0138] 파선은, 바람직하게는 양쪽 모두 시스형의 결합이다.
- [0139] 화합물 (I)의 적합한 구체예는 다음과 같다.
- [0140] 화합물 (A): n은 3-5의 정수이고, R이 시스형의 선형 C₇₋₁₁ 알케닐기며, 파선이 양쪽 모두 시스형이 되는 결합인 화합물.
- [0141] 화합물 (B): n이 4이고, R은 2개의 탄소-탄소 이중 결합 모두에서 시스형인, 직쇄상 C₁₁ 알카디에닐기이고, 파선이 양쪽 모두 시스형의 결합인 화합물.
- [0142] 화합물 (C): n은 2 또는 3이고, R은 직쇄상 C₁₋₅ 알킬기이고, 파선이 양쪽 모두 시스형의 결합인 화합물.
- [0143] 화합물 (I)의 보다 적합한 구체예는 다음과 같다.
- [0144] 화합물 (A1): n은 3-5의 정수이고, R이 시스형의 5-헵테닐, 7-노네닐 또는 9-운데세닐이며, 파선이 양쪽 모두 시스형이 되는 결합인 화합물.
- [0145] 화합물 (B1): n이 4이고, R은 2개의 탄소-탄소 이중 결합 모두에서 시스형인, 2,5-운데카디에닐이며, 파선이 양쪽 모두 시스형의 결합인 화합물.
- [0146] 화합물 (C1): n은 2 또는 3이고, R은 메틸, 프로필 또는 펜틸이며, 파선이 양쪽 모두 시스형의 결합인 화합물.
- [0147] 화합물 (I)의 더욱 적합한 구체예는, 3-(((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)-2,2-비스(((9Z,9'Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트이다.
- [0148] 화합물 (I)의 염으로는 약학적으로 허용되는 염이 바람직하며, 예를 들어 무기 염기와의 염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염을 들 수 있다.
- [0149] 무기 염기와의 염의 적합한 예로서는 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토류 금속염; 알루미늄염, 암모늄염을 들 수 있다. 바람직하게는 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염이며, 보다 바람직하게는 나트륨염, 칼륨염이다.
- [0150] 유기 염기와의 염의 적합한 예로서는 트리메틸아민, 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민,

트리에탄올아민, 트로메타민[트리스(히드록시메틸)메틸아민], tert-부틸아민, 시클로헥실아민, 벤질아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민과의 염을 들 수 있다.

- [0151] 무기산과의 염의 적합한 예로서는 불화 수소산, 염산, 브롬화 수소산, 요오드화 수소산, 질산, 황산, 인산과의 염을 들 수 있다. 바람직하게는 염산과의 염, 인산과의 염이다.
- [0152] 유기산과의 염의 적합한 예로서는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸말산, 옥살산, 타르타르산, 말레산, 시트르산, 숙신산, 말산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산과의 염을 들 수 있다.
- [0153] 염기성 아미노산과의 염의 적합한 예로서는 아르기닌, 리신, 오르니틴과의 염을 들 수 있다.
- [0154] 산성 아미노산과의 염의 적합한 예로서는 아스파르트산, 글루탐산과의 염을 들 수 있다.
- [0155] 본 발명의 전형적인 실시 형태에서, 본 발명의 화합물은 구조 지질과 함께 지질 입자를 형성하고 있다. 이 지질 입자는 본 발명의 조성물에서 가이드 RNA 또는 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 또는 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 내포하고 있다.
- [0156] 구조 지질은 본 발명의 화합물과 혼합하여 혼합 지질 성분을 조제한 후, 지질 입자를 형성할 수 있는 것이라면 특별히 한정되지 않는다. 이러한 구조 지질로서는 예를 들어
- [0157] 스테롤류(예를 들어 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 콜레스테롤 헤미숙신산 등);
- [0158] 인지질(예를 들어 포스파티딜콜린(예를 들어 디팔미토일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 팔미토일올레오일포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린, MC-1010(NOF CORPORATION), MC-2020(NOF CORPORATION), MC-4040(NOF CORPORATION) 등), 포스파티딜세린(예를 들어 디팔미토일포스파티딜세린, 디스테아로일포스파티딜세린, 디올레오일포스파티딜세린, 팔미토일올레오일포스파티딜세린 등), 포스파티딜에탄올아민(예를 들어 디팔미토일포스파티딜에탄올아민, 디스테아로일포스파티딜에탄올아민, 디올레오일포스파티딜에탄올아민, 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민 등), 포스파티딜이노시톨, 포스파티딘산 등); 및
- [0159] 폴리에틸렌 글리콜 지질(PEG 지질)(예를 들어 PEG-DAA, PEG-DAG, PEG-phospholipid conjugate, PEG-Cer, PEG-cholesterol, PEG-C-DOMG, 2KPEG-CMG, GM-020(NOF CORPORATION), GS-020(NOF CORPORATION), GS-050(NOF CORPORATION) 등)
- [0160] 로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1 종을 이용할 수 있다. 본 발명에서는 구조 지질로서 스테롤류(특히 콜레스테롤), 인지질(특히 포스파티딜콜린) 및 폴리에틸렌글리콜 지질의 3 종 모두를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0161] 본 발명의 조성물에서의 본 발명의 화합물과 구조 지질과의 비율은, 목적에 따라 적절히 조절할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 조성물에서 본 발명의 화합물 및 구조 지질을 함유하는 혼합 지질 성분에 의하여 지질 입자가 형성되어 있는 경우, 본 발명의 화합물 1몰에 대하여, 구조 지질은 통상 0.008 내지 4몰의 비율이며, 바람직하게는 0.4 내지 1.5몰의 비율이다. 또 다른 규정을 사용하면 혼합 지질 성분 중, 본 발명의 화합물은 통상 1 내지 4몰, 스테롤류는 통상 0 내지 3몰, 인지질은 통상 0 내지 2몰, 폴리에틸렌글리콜 지질은 통상 0 내지 1몰의 비율이다. 본 발명의 화합물과 다른 지질 성분을 혼합하여 사용하는 경우의 보다 바람직한 양태는 본 발명의 화합물 1 내지 1.5몰, 스테롤류 0 내지 1.25몰, 인지질 0 내지 0.5몰 및 폴리에틸렌글리콜 지질 0 내지 0.125몰의 비율이다.
- [0162] 이하, 본 발명의 활성 성분에 대해 설명한다.
- [0163] 본 발명에서는 활성 성분으로서 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자 개변을 유도하기 위한 물질, 구체적으로는 CRISPR 시스템에 대응한 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 이용한다. 또한 유전자 개변을 위해 CRISPR 시스템에 대응한 물질에 대한 기본적인 사항은 주지이며, 다양한 응용적인 사항도 공지되어 있어 본 발명에 대해서도 이들 주지 또는 공지 사항을 적용할 수 있다(예를 들어 앞에서 서술한 선행 기술 문헌 참조). 당업자라면 목적에 따라 표적 유전자좌나 CRISPR 시스템의 각 요소에 대해 적절한 것을 설계, 선택, 제조하는 것이 가능하다.
- [0164] 세포 및 표적 유전자좌는 유전자 개변의 목적에 따라 적절히 선택할 수 있으며 특별히 한정되는 것은 아니지만, 전형적으로는 유전자 질환에 관여하고 있어 유전자 치료의 대상이 될 수 있는 세포 및 유전자좌이다.
- [0165] 본 발명의 조성물은 다수 종류의 세포, 조직 또는 장기에 활성 성분을 도입하기 위하여 사용할 수 있다. 본 발

명의 구성물을 적용할 수 있는 세포로서는 예를 들어 간엽계 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 피부 줄기 세포, 비장 세포, 신경 세포, 글리아 세포, 췌장 B 세포, 골수 세포, 혈관간 세포, 랑게르한스 세포, 표피 세포, 상피 세포, 내피 세포, 섬유아 세포, 섬유 세포, 근 세포(예, 골격근 세포, 심근 세포, 근아 세포, 근위성 세포, 평활근 세포), 지방 세포, 혈구 세포(예, 마크로파지, T 세포, B 세포, 내추럴 킬러 세포, 비만 세포, 백혈구, 호중구, 호염기구, 호산구, 단구, 거핵구, 조혈 줄기 세포), 활막 세포, 연골 세포, 골 세포, 골아 세포, 파골 세포, 유선 세포, 간 세포, 혹은 간질 세포, 난세포, 정세포, 또는 이들 세포로 분화 유도 가능한 전구 세포, 줄기 세포(예를 들어 인공 다능성 줄기 세포(iPS 세포), 배아 줄기 세포(ES 세포) 포함), 시원 생식 세포, 난모 세포, 수정란을 들 수 있다. 또한 본 발명을 적용할 수 있는 조직 또는 장기로서는 상기 세포가 존재하는 모든 조직 혹은 장기, 예를 들어 뇌, 뇌의 각 부위(예, 후구, 편두핵, 대뇌 기저구, 해마, 시상, 시상하부, 시상하핵, 대뇌피질, 연수, 소뇌, 후두엽, 전두엽, 측두엽, 피각, 미상핵, 뇌염, 흑질), 척수, 뇌하수체, 위, 췌장, 신장, 간, 생식선, 갑상선, 담낭, 골수, 부신, 피부, 폐, 위장관(예, 대장, 소장), 혈관, 심장, 흉선, 비장, 악하선, 말초혈, 말초혈구, 전립선, 태반, 자궁, 뼈, 관절 및 근육 등을 들 수 있다. 이들 세포, 조직 또는 장기는 암화된 암 세포나 암조직 등이어도 좋다.

[0166] 본 발명에서의 바람직한 실시 형태에서 세포는 근세포(예, 심근 세포, 골격근 세포, 근위성 세포), 섬유아세포, 간엽계 줄기 세포, 혈구 세포 또는 iPS 세포이고, 보다 바람직하게는 근세포(특히 골격근 세포 또는 근위성 세포)가 바람직하다. 근세포로서는 예를 들어 인간(환자 혹은 정상인) 또는 그 밖의 포유 동물(예를 들어 비인간 영장류(게잡이 원숭이, 붉은털 원숭이, 침팬지 등), 소, 돼지, 마우스, 랫트 등의 질환 모델 동물)에서 채취된 근세포, 생체(예: 인간 생체 내)의 근세포, 근세포주 및 줄기 세포(예: iPS 세포, ES 세포)로부터 분화 유도된 근세포를 들 수 있다.

[0167] 본 발명의 바람직한 실시 형태에서 표적 유전자좌는 디스트로핀 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것이다.

[0168] 디스트로핀 유전자는 X 염색체 상에 존재하는 220만 염기를 초과하는 거대한 유전자이다. 전사 개시점의 차이때문에 따라 다양한 아이소폼이 존재하며 전신에서 발현하는 Dp71, 말단 신경 세포에서 발현하는 Dp116, 뇌나 신장에서 발현하는 Dp140, 망막에서 발현하는 Dp260, 푸르키네 신경 세포에서 발현하는 Dp417p, 뇌에서 발현하는 Dp427b, 그리고 골격근에서 발현하는 Dp427m 등이 알려져 있다. 이 중에서도 Dp427m 아이소폼에서 생산되는 디스트로핀 단백질은 주로 근세포 내에 발현하는 단백질이고, N 말단측에 존재하는 액틴 결합 도메인에서 세포 골격 액틴과 결합하고 C 말단측에 존재하는 높은 시스테인 도메인에 의해 디스트로글리칸 복합체와도 결합하여 액틴과 함께 세포 골격을 구성하고 있다. Dp427m 아이소폼의 디스트로핀 유전자는 79개의 엑손으로 구성되어 있다.

[0169] 듀시엔형 근디스트로피 환자의 경우, 디스트로핀 유전자 중 어느 엑손의 결손 또는 중복 변이를 가짐으로써, 혹은 엑손 중의 염기의 점 변이(년센스 변이) 또는 삽입 결손 변이(프레임 시프트 변이)에 의해 기능성의 디스트로핀 단백질은 거의 발현되지 않는다(웨스턴블롯법에 의한 검출률 정상인의 3% 이하 단백질량). 반면, 듀센느형 근디스트로피보다도 비교적 경증인 베커형 근디스트로피 환자의 경우, 엑손의 결실이나 염기의 점 변이가 존재해도 스톱 코돈이 중간에 생기지 않은 경우에는 정상적인 디스트로핀 단백질보다 아미노산 서열이 짧거나 또는 일부 아미노산이 치환된 디스트로핀 단백을 발현하고 있다.

[0170] 디스트로핀 유전자의 변이로서는, 듀시엔형 근디스트로피 및 베커형 근디스트로피에서, 단일 또는 복수의 엑손의 결실이 절반 이상을 차지한다. 특히 결실을 많이 볼 수 있는 부위로서 엑손 44와 엑손 55 사이가 알려져 있다. 디스트로핀 유전자의 결손 엑손 부위에 따라 예를 들어 이미 보고된 논문 등(예를 들어 van Deutekom JC, van Ommen GJ., Nat Rev Genet 2003)을 참조함으로써 어느 엑손을 대상으로 하여 엑손 스킵핑을 하면 적절한 수복형 디스트로핀을 발현시킬 수 있는지 확인할 수 있다. 또한 게놈 편집을 이용한 수복형 디스트로핀의 발현 방법으로서 엑손 스킵핑 이외에도 디스트로핀 유전자 중에 미소 결손 또는 삽입을 도입하여 리딩 프레임을 조절하는 방법, 또는 결손되어 있는 엑손을 상동 재조합 등에 의해 삽입함으로써도 실시 가능하다.

[0171] 상기와 같은 디스트로핀 유전자에 이상이 생긴 경우, (i) 1개 또는 2개 이상의 엑손을 mRNA에 포함하지 않음(스킵핑)으로써, 프레임 시프트가 일어나지 않도록 그 전후 엑손끼리를 연결시키거나, (ii) 1개 또는 2개 이상의 염기를 삽입 또는 결실시킴으로써, 프레임 시프트를 수정하거나, (iii) 결손된 엑손을 녹인하는 등의 어떤 조작에 의해 그 이상을 수정할 수 있다. 상기 (i) 또는 (ii)의 경우, 정상적인 디스트로핀 단백질보다 아미노산 서열이 짧거나 길거나 또는 일부 아미노산이 치환된 디스트로핀 단백질이 생산된다. 또, 상기 (ii) 또는 (iii)에 의해, 정상적인 디스트로핀 단백을 생산할 수도 있다. 이러한 디스트로핀 유전자의 수정에 의해 근디스트로피 등의 질환을 예방하거나 치료하는 것이 가능해진다.

- [0172] 인간의 디스트로핀 유전자의 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 National Center for Biotechnology Information 으로부터 입수 가능하다. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1756>)
- [0173] 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA가 연결된 1개의 RNA 형태, 즉 키메라 RNA(싱글 가이드 RNA, sgRNA 등이라고도 한다)이어도 좋고, 연결되어 있지 않은 각각 1개씩의 RNA(2개의 RNA 조합 또는 그 이상 갯수의 RNA 조합) 형태 이어도 좋다. 본 발명의 조성물은 이러한 가이드 RNA를 RNA 자체의 형태로 포함해도 좋고, 가이드 RNA를 코드하는 서열을 포함하는 DNA(발현 플라스미드 등)의 형태로 포함해도 좋다.
- [0174] 가이드 RNA는 하나의 염기 서열을 표적으로 하는 형태(1개의 sgRNA 또는 1조의 crRNA 및 tracrRNA)이어도 좋고, 2개 이상의 염기 서열을 표적으로 하는 형태(2개 이상의 sgRNA 또는 2조 이상의 crRNA 및 tracrRNA)이어도 좋다. 본 명세서에서 표적으로 하는 염기 서열별로, 가이드 RNA의 "종류"라고 기재하는 수가 있다. 따라서 본 명세서에서 2개 이상의 염기 서열을 표적으로 하는 형태에서의 가이드 RNA를 "2종류 이상의 가이드 RNA"라고 기재하는 수가 있다. 가이드 RNA는 2종류 또는 2종류 이상인 것이 바람직하다.
- [0175] 2종류 이상의 가이드 RNA를 이용하는 경우, 이들 가이드 RNA가 표적으로 하는 염기 서열 간의 거리는 특별히 한정되지 않지만 2개의 가이드 RNA의 표적 서열은 겹치지 않는 것이 바람직하다. 또 2개의 가이드 RNA의 표적 서열은 1염기 이상 떨어져 있는 것이 바람직하다.
- [0176] 2종류의 가이드 RNA를 이용하는 경우, 이들 2종류의 가이드 RNA를 이용한 CRISPR 시스템에 의해 발생하는 DNA 절단 부분이 유전자 개변을 유도하는 세포 중의 표적 유전자와 또는 표적 유전자와 상의 특정 염기 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 이 때, 염기 서열을 포함한다는 것은 당해 염기 서열의 상류와 하류에 DNA 절단 부위가 존재하는 것을 의미한다.
- [0177] 2종류의 가이드 RNA를 이용하는 경우, 2종류의 가이드 RNA의 표적 서열로서는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 서열 번호 3 및 서열 번호 4의 표적 인식 서열이 하이브리다이징하는 염기 서열로 할 수 있다.
- [0178] 본 발명의 crRNA는 세포 중의 표적 유전자와 중의 특정 염기 서열(본 명세서 중 "표적 서열"이라고 하는 수가 있다)에 하이브리다이징하는 18 내지 20 염기 정도의 핵산 서열(본 명세서 중 "표적 인식 서열"이라고 하는 수가 있다)을 포함한다. 표적 인식 서열로서는 서열 번호 3 또는 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서, crRNA는 서열 번호 3 또는 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함한다. 또한, 본 발명의 바람직한 실시 형태에서, crRNA는 서열 번호 5 또는 서열 번호 6으로 표시되는 핵산 서열을 포함한다. 표적 서열은 CRISPR 시스템에 의해 인식되는 짧은 서열(PAM(프로토스페이서 인접 모티프))과 인접한다. PAM의 서열 및 길이의 조건은, 사용되는 뉴클레아제 종류에 따라 다르지만, PAM은 전형적으로는 표적 서열에 인접하는 2 내지 5염기쌍 서열이다.
- [0179] 본 발명의 바람직한 실시 형태에서 가이드 RNA는 서열 번호 1 또는 서열 번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 키메라 RNA(sgRNA)이다.
- [0180] 본 발명의 바람직한 실시 형태에서 가이드 RNA는 (i) 서열 번호 3 혹은 서열 번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 crRNA 및 (ii) 서열 번호 7 혹은 서열 번호 8로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 tracrRNA의 조합이다.
- [0181] 서열 번호 1: 실시예 "HsDMDEx45#1" 대응 sgRNA 전체 서열
- [0182] 5'- U(M)^G(M)^G(M)^UAUCUUACAGGAACUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C -3'
- [0183] 서열 번호 2: 실시예 "HsDMDEx45#23" 대응 sgRNA 전체 서열
- [0184] 5'- A(M)^G(M)^C(M)^UGUCAGACAGAAAAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGG(M)^U(M)^G(M)^C -3'
- [0185] 서열 번호 3: 서열 번호 1의 표적 인식 서열
- [0186] 5'- U(M)^G(M)^G(M)^UAUCUUACAGGAACUCC -3'
- [0187] 서열 번호 4: 서열 번호 2의 표적 인식 서열
- [0188] 5'- A(M)^G(M)^C(M)^UGUCAGACAGAAAAAG -3'

- [0189] 서열 번호 5: 서열 번호 1의 crRNA 서열
- [0190] 5'- U(M)^G(M)^G(M)^UAUCUUACAGGAACUCCGUUUUAGAGCUA -3'
- [0191] 서열 번호 6: 서열 번호 2의 crRNA 서열
- [0192] 5'- A(M)^G(M)^C(M)^UGUCAGACAGAAAAAGGUUUUAGAGCUA -3'
- [0193] 서열 번호 7: 서열 번호 1의 tracrRNA 서열
- [0194] 5'- UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C -3'
- [0195] 서열 번호 8: 서열 번호 2의 tracrRNA 서열
- [0196] 5'- UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C -3'
- [0197] 서열 번호 1 내지 8에서 "(M)"이 오른쪽 옆에 표시되어 있는 리보오스는 천연의(수식되지 않은) 리보오스이어도 좋고, 2'-0-메틸리보오스 또는 그 밖의 수식 리보오스이어도 좋지만, 바람직하게는 2'-0-메틸리보오스이다.
- [0198] 또 서열 번호 1 내지 8에서 "^"로 표시되어 있는 2'-0-메틸리보오스끼리의 결합 또는 2'-0-메틸리보오스와 리보오스와의 결합은 인산 디에스테르 결합이어도 좋고, 포스포로티오에이트 결합이라도 좋으나, 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이다.
- [0199] 본 발명의 표적 인식 서열은, 상기 서열 번호 3 및 4 중 어느 것으로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는다. 또한 본 발명의 crRNA 및 키메라 RNA(sgRNA)는 표적 인식 서열 이외의 서열에서 상기 서열 번호 1, 2, 5 및 6 중 어느 것으로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는다. 또한 본 발명의 tracrRNA는 상기 서열 번호 7 및 8 중 어느 것으로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는다. 여기서 "실질적으로 동일한 서열"은, 적어도 약 75%의 서열 동일성을 갖는 서열을 의미한다. 따라서 본 발명의 표적 인식 서열, crRNA, tracrRNA, 키메라 RNA(sgRNA)는 상기와 같이 각각 대응하는 서열 번호로 표시되는 서열과 적어도 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% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 서열 동일성은 바람직하게는 적어도 85% 또는 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 또는 97%, 특히 바람직하게는 적어도 99%이다.
- [0200] "서열 동일성"이라는 용어는 2개의 유전자 서열을 당해 염기쌍의 일치가 최대가 되도록 정렬시켰을 때 2개의 서열 간에 일치하는 염기쌍의 비율(%)을 의미한다.
- [0201] 서열 동일성은 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 결정할 수 있다. 예를 들어 Higgins들에 의한 다중 정렬 프로그램인 Clustal(Gene 73, 1, 237-244, 1988)에 의해 결정할 수 있다. Clustal 프로그램은, 예를 들어 유럽 바이오 인포매틱스 연구소(European Bioinformatics Institute(EBI))의 인터넷상의 웹 사이트에서 이용 가능하다.
- [0202] 본 발명에 사용되는 RNA 유도형 뉴클레아제로서는 예를 들어 RNA 유도형 엔도뉴클레아제를 들 수 있다.
- [0203] RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 적어도 1개의 뉴클레아제 도메인 및 gRNA와 상호 작용하는 적어도 1개의 도메인을 포함한다. RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 gRNA에 의해 게놈의 표적 부위로 유도된다.
- [0204] RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 클러스터화 조절적 산재형 짧은 팔린드롬 반복 서열(clustered regularly interspersed short palindromic repeats: CRISPR)/CRISPR-관련(Cas) 시스템에서 유래될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은 클래스 1 중의 타입 I, 타입 III, 타입 IV, 혹은 클래스 2 중의 타입 II, 타입 V 및 타입 VI 시스템으로 할 수 있다. 적당한 CRISPR/Cas 단백질의 비한정적인 예로는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e(또는 CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8C, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a(또는 Cpf1), Cas12b(또는 C2c1), Cas12c, Cas13a1(또는 C2c2), Cas13a2, Cas13b, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1(또는 CasA), Cse2(또는 CasB), Cse3(또는 CasE), Cse4(또는 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 및 Cu1966이 포함된다.
- [0205] 일 양태에서, RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 클래스 2 타입 II의 CRISPR/Cas 시스템 유래이다. 특정 양태에서 RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 Cas9 단백질에서 유래한다. Cas9 단백질은 화농성 렌서 구균(스트렙토코커스 피오게네스), 스트렙토코커스 서모필러스, 스트렙토코커스속, 황색포도상 구균, 스태필로코커스속, 노카르디움시스 다손빌레이, 스트렙토마이세스 프리스티나에스피라리스, 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces

viridochromogenes), 스트렙토스포란기움·로세움, 알리사이클로바실루스 아시도칼다리우스, 바실루스 슈도마이코이데스, 바실루스 세레니티레두센스, 이그조박테리움 시비리쿰(*Exiguobacterium sibiricum*), 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*), 락토바실루스 델브루에키, 락토바실루스 살리바리우스, 게오바실루스 스테아로서모필러스, 마이크로실라 마리나, 버르크홀데리아 세균, 폴라로모나스 나프티날레니보란스, 폴라로모나스종, 크로코스파에라 왓슨이(*Crocospaera watsonii*), 시아노테세속, 마이크로시스티스 아에르기노사(*Microcystis aeruginosa*), 시네코코카스속, 아세토할로비움 아라바티쿰, 암모니펙스 데젠시이(*Ammonifex degensii*), 칼디셀루로시럽터 벡시(*Caldicellulosiruptor beccii*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 캄필로박터 콜리(*Campylobacter coli*), 네이세리아 메닝기티데스 (*Neisseria meningitides*) 칸디다 데술포루디스(*Candidatus Desulforudis*), 클로스트리듐 보톨리누스, 클로스트리디움 디피실, 피네고르디아 마그나, 나트라나에로비우스 테르모필루스(*Natranaerobius thermophilus*), 페로토마쿨럼 서포프로피오쿰, 아시디티오바실루스 카르다스, 아시디티오바실루스 페로옥시단스, 알로크로마티움 비노숨, 마리노박터속, 니트로소코커스 할로필루스(*Nitrosococcus halophilus*), 니트로소코커스 왓슨이(*Nitrosococcus watsoni*), 슈도알테로모나스 할로프란크티스, 크테도노박터 라세미페르(*Ktedonobacter racemifer*), 메타노할비움 에베스티가툼(*Methanohalbiium evestigatum*), 아나베나 바리아빌리스, 노둘라리아 스푸미게나, 노스톡속, 아르스로피라 막시마, 아르스로피라 플라텐시스, 아르스로피라속, 링그비아속, 마이크로콜레스 크소노플라스테스(*Microcoleus chthonoplastes*), 오시라토리야속, 페트로토가 모빌리스, 서모시호 아프리카누스, 또는 아카리오칼로리스 마리나에서 유래하고 있어도 좋다.

[0206] 일 양태에 있어서, RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 클래스 2 타입 V의 CRISPR-Cas12a/Cpf1 시스템 유래이다. 특정 양태에서 RNA 유도형 엔도뉴클레아제는 Cpf1 단백질에서 유래한다. Cpf1 단백질은 *Acidaminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Francisella novicida*에서 유래하고 있어도 좋다

[0207] CRISPR/Cas 단백질은 야생형 CRISPR/Cas 단백질, 수식형 CRISPR/Cas 단백질 또는 야생형 또는 수식형 CRISPR/Cas 단백질의 프래그먼트일 수 있다. CRISPR/Cas 단백질은 핵산 결합 친화성 및/또는 특이성을 증대하여 효소 활성을 변경하거나 또는 단백질의 다른 특성을 변경하기 위해 수식되어 있어도 좋다.

[0208] RNA 유도형 뉴클레아제는 Cas 뉴클레아제 또는 Cas 니카제이어도 좋다. 여기에서 Cas 뉴클레아제 또는 Cas 니카제란 CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 성분을 말하며 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스 활성화 crRNA(tracrRNA)라고 하는 2개의 RNA와 복합체를 형성했을 경우에, 활성을 갖는 엔도뉴클레아제 또는 니카제를 의미한다. 니카제는 한 쪽 DNA쇄에만 Nick(nick)을 넣는 DNA 절단 효소를 말한다. 일반적으로 Cas9 단백질은 적어도 2개의 뉴클레아제(즉 DNase) 도메인을 포함한다. 예를 들어 Cas9 단백질은 RuvC형 뉴클레아제 도메인 및 HNH형 뉴클레아제 도메인을 포함할 수 있다. RuvC 및 HNH 도메인은 DNA 중에 이중쇄의 절단을 행하기 위해 단일쇄를 절단하는 데 협동한다(Jinek et al., Science, 337: 816-821). 어떤 태양에서 Cas9 유래 단백질은 1개의 기능적 뉴클레아제 도메인(RuvC형 또는 HNH형 뉴클레아제 도메인 중 어느 것)만을 포함하도록 수식되어 있어도 좋다. 예를 들어 Cas9 유래의 단백질은 뉴클레아제 도메인의 하나가 그것이 더 이상 기능하지 않도록(즉, 뉴클레아제 활성이 존재하지 않도록) 결실 또는 변이되도록 수식되어 있어도 좋다. 뉴클레아제 도메인의 하나가 불활성인 태양에서, Cas9 유래의 단백질은 이중쇄 핵산에 Nick 도입할 수 있지만, 이중쇄 DNA를 절단할 수는 없다. 예를 들어 RuvC형 도메인에서의 아스파라긴산에서 알라닌으로의 변환(D10A)은 Cas9 유래의 단백질을 니카제로 변환한다. 마찬가지로 HNH 도메인에서의 히스티딘에서 알라닌으로의 변환(H840A 또는 H839A)은 Cas9 유래의 단백질을 니카제로 변환한다. 각 뉴클레아제 도메인은 부위 특이적 돌연변이 유발법, PCR 증개성 돌연변이 유발법 및 전 유전자 합성 및 당해 기술 분야에서 공지된 기타 방법과 같은 주지의 방법을 이용하여 수식될 수 있다.

[0209] RNA 유도형 뉴클레아제에는 특히 스트렙토코카스속균(*Streptococcus* sp.) 또는 스태필로코카스속균(*Staphylococcus* sp.) 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas 뉴클레아제 또는 Cas 니카제를 사용할 수 있다. 이 중 유래원으로서 스트렙토코카스속균에서는 화농성 렌서 구균(*S. pyogenes*)이 바람직하며, 스태필로코카스속균에서는 황색포도상 구균(*S. aureus*)이 바람직하다. 화농성 렌서 구균 유래의 Cas9 뉴클레아제 또는 Cas9 니카제는 PAM 서열로서 NGG 또는 NAG 트리뉴클레오티드를 인식한다.

[0210] 본 발명의 조성물은, 이러한 RNA 유도형 뉴클레아제를 단백질 형태로 포함하고 있어도 좋고, 그 단백질의 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 핵산(mRNA 또는 발현 플라스미드와 같은 DNA 등)의 형태로 포함하고 있어도 좋다.

[0211] RNA 유도형 뉴클레아제로서는 Cas9가 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서 Cas9는, 화농성 렌서 구균

(화농성 렌서 구균)(*S. pyogenes*) 유래 Cas9(SpCas9)이다. Cas9로서는 다양한 세균 또는 고세균에서 유래되는 것으로 알려져 있으며, 본 발명에서는 SpCas9 외에도 예를 들어 황색포도상 구균(*S. aureus*) 유래 Cas9(SaCas9) 등, 목적으로 하는 뉴클레아제 활성을 갖는 Cas9를 사용할 수 있다.

[0212] 본 발명의 조성물에서의 본 발명의 화합물 및 구조 지질(또는 그것들에 의하여 형성되는 지질 입자)에 대한 본 발명의 활성 성분의 비율은, 목적 및 활성 성분의 종류에 따라 적절히 조절할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 조성물에서, 본 발명의 화합물 및 구조 지질을 함유하는 혼합 지질 성분에 의하여 지질 입자가 형성되어 있고, 본 발명의 활성 성분으로서 RNA가 그 지질 입자에 내장되어 있는 경우, 지질 입자의 질량(즉 본 발명의 화합물 및 구조 지질의 합계 질량)에 대하여 본 발명의 활성 성분은 통상 1 내지 20질량%, 바람직하게는 2 내지 10질량%의 비율이다.

[0213] "RNA"(리보 핵산), "DNA"(데옥시리보 핵산) 및 "핵산"은 천연의 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 만을 포함하는 것이어도 좋고, 필요에 따라 그것들에 더하여 뉴클레아제 내성의 향상, 안정화, 상보성 핵산과의 어피니티 향상, 세포 투과성의 향상 등을 위해, 이들 분자 구조의 일부를 수식하여 뉴클레오티드 유사체를 포함 하는 것이어도 좋다. 뉴클레오티드 유사체로는, 예를 들어 당부 수식 뉴클레오티드(2'-O-메틸리보오스, 2'-O-프로필리보오스, 2'-O-메톡시에톡시리보오스, 2'-O-메톡시에틸리보오스, 2'-O-[2-(구아니디움)에틸]리보오스, 2'-O-플루오로리보오스 등); 가교 구조형 인공 핵산(BNA)(잠금 인공 핵산(LNA), 에틸렌 가교 구조형 인공 핵산(ENA) 등); 인산 디에스테르 결합 수식 뉴클레오티드(인산 디에스테르 결합의 포스포로티오에이트 결합으로의 치환체, N3'-P5' 포스포아미데이트 결합으로의 치환체 등)를 들 수 있다. 또한 핵산은 5'-폴리아민 부가 유도체, 콜레스테롤 부가 유도체, 스테로이드 부가 유도체, 담즙산 부가 유도체, 비타민 부가 유도체, 형광 색소 부가 유도체, 비오틴 부가 유도체 등이어도 좋다. "RNA", "DNA" 및 "핵산"은 단일체이어도 좋고, 이중체이어도 좋다.

[0214] 본 발명의 한 실시 형태에서 가이드 RNA의 적어도 일부는 상기 뉴클레오티드 유사체로 하는 것이 바람직하다. 뉴클레오티드 유사체로서는 당부 수식 뉴클레오티드 및 인산 디에스테르 결합 수식 뉴클레오티드가 바람직하고, 보다 구체적으로는 2'-O-메틸리보오스 및 인산 디에스테르 결합의 포스포로티오에이트 결합으로의 치환체가 바람직하다. 가이드 RNA에서 적어도 서열의 3' 및 5'의 양 말단의 1염기씩이 뉴클레오티드 유사체인 것이 바람직하고, 적어도 서열의 3' 및 5'의 양 말단의 2염기씩 또는 3염기씩이 뉴클레오티드 유사체인 것이 보다 바람직하다.

[0215] 가이드 RNA가 키메라 RNA인 경우에는 적어도 그 서열의 3' 및 5'의 양 말단 1염기씩을 뉴클레오티드 유사체로 하는 것이 바람직하고, 연결되어 있지 않은 각각 1개씩의 RNA(2개의 RNA 조합) 또는 그 이상의 갯수의 RNA 형태인 경우에는 적어도 각각의 RNA 서열의 3' 및 5'의 양 말단의 1염기씩을 뉴클레오티드 유사체로 하는 것이 바람직하다(예를 들어 crRNA의 3' 및 5'의 양 말단 및 tracrRNA의 3' 및 5'의 양 말단을 뉴클레오티드 유사체로 하는 것이 바람직하다).

[0216] 가이드 RNA 등 및 RNA 유도형 뉴클레아제 등을 모두 발현 플라스미드 등의 유전자 구축물의 형태로 할 경우, 가이드 RNA를 코딩하는 서열 및 RNA 유도형 뉴클레아제 단백질을 코딩하는 서열의 양쪽이 하나의 유전자 구축물에 포함되어 있어도 좋고, 이들 서열이 각각의 유전자 구축물에 포함되어 있어도 좋다. 또한 유전자 구축물은 필요에 따라 프로모터, 인핸서, 개시 코돈, 종지 코돈, 폴리아데닐화 시그널, 핵국재화 시그널(NLS), 약제 선택 유전자, 리포터 유전자 등의 서열을 포함해도 좋다.

[0217] 본 발명의 조성물은 (i) 가이드 RNA 등(가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA)만을 포함하고, RNA 유도형 뉴클레아제 등(RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산)은 포함하지 않는 실시 형태, (ii) 가이드 RNA 등은 포함하지 않고, RNA 유도형 뉴클레아제 등만을 포함하는 실시 형태, (iii) 가이드 RNA 등과 RNA 유도형 뉴클레아제 등을 모두 포함하는 실시 형태 중 어느 것이어도 좋다. 가이드 RNA 등을 포함하는 경우, 그 가이드 RNA는 1 종류이어도 좋고, 2 종류 또는 2 종류 이상이어도 좋다. 본 발명의 조성물의 한 양태에서는 2종류 또는 2종류 이상의 가이드 RNA인 것이 바람직하다.

[0218] 본 발명에서, 조성물 중의 지질 입자는 CRISPR 시스템에 필요한 복수의 요소 중 1종류만을 내장하고 있어도 좋고, 복수의 종류(예를 들어 gRNA와 Cas9의 mRNA)를 내장하고 있어도 좋다. 지질 입자가 복수의 요소를 내장하는 경우는, 예를 들어 그 제조 시에 각 요소를 적절한 농도(비율)로 함유하는 수용액을 이용하도록 하면 좋다.

[0219] 본 발명의 조성물은 1종류의 요소를 내장하는 지질 입자를 여러 종류 포함하고 있어도 좋다. 예를 들어 gRNA만을 내장하는 지질 입자와 Cas9의 mRNA를 내장하는 지질 입자가 조성물 중에서 혼합되어 있어도 좋다. 1종류의

요소를 내봉하는 지질 입자를 복수종 혼합하는 경우는 유전자의 개변 효율 등을 고려하면서 각 요소가 적절한 농도(비율)가 되도록 하면 좋다.

- [0220] 본 발명의 실시 형태에서 gRNA 등을 내봉하는 지질 입자와 RNA 유도형 뉴클레아제 등을 내봉하는 지질 입자는 동일한 조성물(혼합 용액)에 따라 또는 각각의 조성물에 따라 세포에 첨가된다.
- [0221] 본 발명의 일 실시 형태에서 gRNA 등과 RNA 유도형 뉴클레아제 등을 모두 내봉하는 지질 입자를 포함하는 본 발명의 조성물이 세포에 첨가된다.
- [0222] 본 발명의 화합물, 지질 입자 및 조성물은 안정적이고 저독성으로 안전하게 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물을 생체 내에서 사용하는 경우, 내지 의약으로서 사용하는 경우, 투여 대상(인간 또는 비인간 포유 동물. 바람직하게 인간.)에 대하여 본 발명물의 조성물 중의 활성 성분의 유효량이 표적으로 하는 세포에 송달되도록 해당 조성물을 투여하면 좋다.
- [0223] 본 발명의 조성물을 생체 외에서 사용하는 경우, 내지 시약으로서 이용하는 경우, 배지에 첨가하는 등의 방법으로 배양되고 있는 세포에 본 발명의 조성물(특히 거기에 포함되는, 활성 성분을 내봉하는 지질 입자)을 접촉시킴으로써 활성 성분의 유효량이 세포 내로 이행되도록 하면 좋다.
- [0224] 본 발명의 조성물 중의 활성 성분(가이드 RNA 등 및 RNA 유도형 뉴클레아제 등)의 농도는 조성물의 용도에 따라 적절히 조절할 수 있으며, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어 본 발명의 조성물을 생체 외에서 사용하는 경우는, 고농도로 활성 성분을 함유하는 조성물로서 보관해 두었다가 적절한 농도가 되도록 적절한 용매로 희석한 조성물을 조제하여, 또는 배지 등에 첨가하여 사용할 수 있도록 해도 좋다. 예를 들어 본 발명의 활성 성분을 내봉한 지질 입자가 첨가된 배지(배양액)도 본 발명의 조성물의 한 실시 형태이며, 그 배지 중의 지질 입자에 내봉된 활성 성분의 농도도 적절히 조절할 수 있다.
- [0225] 이하, 본 발명의 화합물의 제조 방법에 대하여 설명한다.
- [0226] 이하의 제조 방법에서의 각 공정에서 사용된 원료나 시약 및 얻어진 화합물은 각각 염을 형성해도 좋다. 이러한 염으로서, 예를 들어 앞에서 기술한 본 발명의 화합물에서의 염과 동일한 것을 들 수 있다.
- [0227] 각 공정에서 얻어진 화합물이 유리 화합물인 경우에는 공지된 방법에 의해 목적으로 하는 염으로 변환할 수 있다. 반대로 각 공정에서 얻어진 화합물이 염인 경우에는, 공지된 방법에 의해 유리체 또는 목적으로 하는 다른 종류의 염으로 변환할 수 있다.
- [0228] 각 공정에서 얻어진 화합물은 반응액 그대로, 또는 조생성물로서 얻은 후에 다음 반응에 이용할 수 있거나, 혹은 각 공정에서 얻어진 화합물을 통상법에 따라 반응 혼합물로부터 농축, 정출, 재결정, 증류, 용매 추출, 분류, 크로마토그래피 등의 분리 수단으로 단리 및/또는 정제할 수 있다.
- [0229] 각 공정의 원료나 시약의 화합물이 시판되고 있는 경우에는 시판품을 그대로 이용할 수 있다.
- [0230] 각 공정의 반응에서, 반응 시간은 이용하는 시약이나 용매에 따라 다를 수 있지만, 특별히 기재가 없는 경우, 통상 1분 내지 48시간, 바람직하게는 10분 내지 8시간이다.
- [0231] 각 공정의 반응에서, 반응 온도는 이용하는 시약이나 용매에 따라 다를 수 있지만, 특별히 기재가 없는 경우, 통상 -78℃ 내지 300℃, 바람직하게는 -78℃ 내지 150℃이다.
- [0232] 각 공정의 반응에서, 압력은 사용하는 시약이나 용매에 따라 다를 수 있지만, 특별히 기재가 없는 경우, 통상 1기압 내지 20기압, 바람직하게는 1기압 내지 3기압이다.
- [0233] 각 공정의 반응에서, 예를 들어 Biotage사제 Initiator 등의 Microwave 합성 장치를 이용하는 경우가 있다. 반응 온도는 이용하는 시약이나 용매에 따라 다를 수 있지만 특별히 기재가 없는 경우, 통상 실온 내지 300℃, 바람직하게는 실온 내지 250℃, 보다 바람직하게는 50℃ 내지 250℃이다. 반응 시간은 이용하는 시약이나 용매에 따라 다를 수 있지만 특별한 기재가 없는 경우, 통상 1분 내지 48시간, 바람직하게 1분 내지 8시간이다.
- [0234] 각 공정의 반응에서, 시약은 특별히 기재가 없는 경우, 기질에 대해 0.5당량 내지 20당량, 바람직하게는 0.8당량 내지 5당량이 이용된다. 시약을 촉매로서 사용하는 경우, 시약은 기질에 대해 0.001당량 내지 1당량, 바람직하게는 0.01당량 내지 0.2당량이 이용된다. 시약이 반응 용매를 겸하는 경우 시약은 용매량이 이용된다.
- [0235] 각 공정의 반응에서, 특별히 기재가 없는 경우, 이들 반응은 무용매 또는 적당한 용매에 용해 또는 현탁하여 이루어진다. 용매의 구체예로서는 실시예에 기재되어 있는 용매 혹은 다음을 들 수 있다.

- [0236] 알코올류: 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 이소부탄올, tert-부틸알코올, 2-메톡시에탄올 등;
- [0237] 에테르류: 디에틸에테르, 디이소프로필에테르, 디페닐에테르, 테트라히드로푸란, 1,2-디메톡시에탄 등;
- [0238] 방향족 탄화 수소류: 벤젠, 톨루엔, 크실렌 등;
- [0239] 포화 탄화 수소류: 시클로hex산, hex산, heptan 등;
- [0240] 아미드류: N,N-디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈 등;
- [0241] 할로겐화 탄화 수소류: 디클로로메탄, 사염화 탄소 등;
- [0242] 니트릴류: 아세토니트릴 등;
- [0243] 술폰시드류: 디메틸술폰시드 등;
- [0244] 방향족 유기 염기: 피리딘 등;
- [0245] 산 무수물류: 무수 아세트산 등;
- [0246] 유기산류: 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산 등;
- [0247] 무기산류: 염산, 황산 등;
- [0248] 에스테르류: 아세트산 에틸, 아세트산 이소프로필에스테르 등;
- [0249] 케톤류: 아세톤, 메틸에틸케톤 등;
- [0250] 물.
- [0251] 상기 용매는 2종 이상을 적당한 비율로 혼합하여 사용해도 좋다.
- [0252] 각 공정의 반응에서 염기를 사용하는 경우, 예를 들어 아래에 나타내는 염기 혹은 실시예에 기재되어 있는 염기가 이용된다.
- [0253] 무기 염기류: 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 마그네슘 등;
- [0254] 염기성 염류: 탄산 나트륨, 탄산 칼슘, 탄산 수소 나트륨 등;
- [0255] 유기 염기류: 트리에틸아민, 디에틸아민, 피리딘, 4-디메틸아미노피리딘, N,N-디메틸아닐린, 1,4-디아자비시클로[2.2.2]옥탄, 1,8-디아자비시클로[5.4.0]-7-운데센, 이미다졸, 피페리딘 등;
- [0256] 금속 알콕시드류: 나트륨에톡시드, 칼륨tert-부톡시드, 나트륨tert-부톡시드 등;
- [0257] 알칼리 금속 수소화물류: 수소화 나트륨 등;
- [0258] 금속 아미드류: 나트륨아미드, 리튬디이소프로필아미드, 리튬헥사메틸디실라지드 등;
- [0259] 유기 리튬류: n-부틸리튬, sec-부틸리튬 등.
- [0260] 각 공정의 반응에서 산 또는 산성 촉매를 이용하는 경우, 예를 들어 다음에 나타내는 산이나 산성 촉매 또는 실시예에 기재되어 있는 산이나 산성 촉매가 이용된다.
- [0261] 무기산류: 염산, 황산, 질산, 브롬화 수소산, 인산 등;
- [0262] 유기산류: 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, p-톨루엔술폰산, 10-캄페솔폰산 등;
- [0263] 루이스산: 삼불화 붕소 디에틸에테르 착체, 요오드화 아연, 무수 염화 알루미늄, 무수 염화 아연, 무수 염화철 등.
- [0264] 각 공정의 반응은 특별한 기재가 없는 한, 공지된 방법, 예를 들어 제5판 실험 화학 강좌, 13권 내지 19권(일본 화학회편); 신실험 화학 강좌, 14권 내지 15권(일본 화학회편); 정밀 유기 화학 개정 제2판(L. F. Tietze, Th. Eicher, 난코도); 개정 유기 인명 반응 그 구조와 포인트 (도고 히데오 지음, 코단샤); ORGANIC SYNTHESSES Collective Volume I-VII (John Wiley & SonsInc); Modern Organic Synthesis in the Laboratory A Collection of Standard Experimental Procedures (Jie Jack Li 지음, OXFORD UNIVERSITY 출판); Comprehensive Heterocyclic Chemistry III, Vol. 1~Vol. 14 (엘세비어·재팬 주식회사); 인명 반응으로 배우는 유기 합성 전략(도미오카 기요시 역, 화학 동인 발행); 컴프리헨시브 오가닉 트랜스포메이션스(VCH

Publishers Inc.) 1989년 간행 등에 기재된 방법, 또는 실시예에 기재된 방법에 준하여 이루어진다.

- [0265] 각 공정에서 관능기의 보호 또는 탈보호 반응은 공지된 방법, 예를 들어 Wiley-Interscience사 2007년 간행 "Protective Groups in Organic Synthesis, 4thEd."(Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts 지음); Thieme사의 2004년 간행 "Protecting Groups 3rdEd."(P.J.Kocienski 지음) 등에 기재된 방법 또는 실시예에 기재된 방법에 준하여 이루어진다.
- [0266] 알코올 등의 수산기나 페놀성 수산기의 보호기로서는, 예를 들어 메톡시메틸에테르, 벤질에테르, p-메톡시벤질에테르, t-부틸디메틸실릴에테르, t-부틸디페닐실릴에테르, 테트라히드로피라닐에테르 등의 에스테르형 보호기; 아세트산 에스테르 등의 카르복실산 에스테르형 보호기; 메탄술폰산 에스테르 등의 술폰산 에스테르형 보호기; t-부틸카보네이트 등의 탄산 에스테르형 보호기 등을 들 수 있다.
- [0267] 알데히드의 카르보닐기의 보호기로서는, 예를 들어 디메틸아세탈 등의 아세탈형 보호기; 환상 1,3-디옥산 등의 환상 아세탈형 보호기 등을 들 수 있다.
- [0268] 케톤의 카르보닐기의 보호기로서는, 예를 들어 디메틸케탈 등의 케탈형 보호기; 환상 1,3-디옥산 등의 환상 케탈형 보호기; O-메틸옥심 등의 옥심형 보호기; N,N-디메틸히드라존 등의 히드라존형 보호기 등을 들 수 있다.
- [0269] 카르복실기의 보호기로서는, 예를 들어 메틸에스테르 등의 에스테르형 보호기; N,N-디메틸아미드 등의 아미드형 보호기 등을 들 수 있다.
- [0270] 티올의 보호기로서는, 예를 들어 벤질티오에테르 등의 에테르형 보호기; 티오아세트산 에스테르, 티오카르보네이트, 티오카르바메이트 등의 에스테르형 보호기 등을 들 수 있다.
- [0271] 아미노기나 이미다졸, 피롤, 인돌 등의 방향족 헤테로환의 보호기로서는, 예를 들어 벤질카르바메이트 등의 카르바메이트형 보호기; 아세트아미드 등의 아미드형 보호기; N-트리페닐메틸아민 등의 알킬아민형 보호기, 메탄술폰아미드 등의 술폰아미드형 보호기 등을 들 수 있다.
- [0272] 보호기의 제거는 공지된 방법, 예를 들어 산, 염기, 자외광, 히드라진, 페닐히드라진, N-메틸디티오카르바민산 나트륨, 테트라부틸암모늄플루오리드, 아세트산 팔라듐, 트리알킬실릴할라이드(예를 들어 트리메틸실릴요오드화물, 트리메틸실릴브로미드)를 사용하는 방법이나 환원법 등을 이용해 실시할 수 있다.
- [0273] 각 공정에서 환원 반응을 행하는 경우, 사용되는 환원제로서는 수소화 알루미늄리튬, 수소화 트리아세톡시 붕소 나트륨, 수소화 시아노 붕소 나트륨, 수소화 디이소부틸알루미늄(DIBAL-H), 수소화 붕소 나트륨, 수소화 트리아세톡시 붕소 테트라메틸암모늄 등의 금속 수소화물류; 보란테트라히드로푸란 착체 등의 보란류; 레이니 니켈; 레이니 코발트; 수소; 포름산 등을 들 수 있다. 예를 들어 수소 또는 포름산 존재 하에서 레이니 니켈 또는 레이니 코발트를 사용할 수 있다. 탄소-탄소 이중 결합 또는 삼중 결합을 환원하는 경우에는, 팔라듐-카본이나 Lindlar 촉매 등의 촉매를 사용하는 방법이 있다.
- [0274] 각 공정에서 산화 반응을 행하는 경우, 사용되는 산화제로서는 m-클로로과벤조산 (MCPBA), 과산화 수소, t-부틸히드로퍼옥시 등의 과산화물; 과염소산 테트라부틸암모늄 등의 과염소산염류; 염소산 나트륨 등의 염소산염류; 아염소산 나트륨 등의 아염소산염류; 과요오드산 나트륨 등의 과요오드산류; 요오드실벤젠 등의 고원자가 요오드 시약; 이산화 망간, 과망간산 칼륨 등의 망간을 갖는 시약; 4아세트산납 등 납류; 클로로크롬산 피리디늄(PCC), 2크롬산 피리디늄(PDC), 존스 시약 등의 크롬을 갖는 시약; N-브로모숙신이미드(NBS) 등의 할로겐 화합물류; 산소; 오존; 삼산화황·피리딘 착체; 사산화 오스mium; 이산화 셀레늄; 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논(DDQ) 등을 들 수 있다.
- [0275] 각 공정에서 라디칼 환화 반응을 행하는 경우, 사용되는 라디칼 개시제로서는 아조비스이소부티로니트릴(AIBN) 등의 아조 화합물; 4-4'-아조비스-4-시아노펜탄산(ACPA) 등의 수용성 라디칼 개시제; 공기 혹은 산소 존재 하에서의 트리에틸 붕소; 과산화 벤조일 등을 들 수 있다. 또한 사용되는 라디칼 반응 시제로서는 트리부틸스타난, 트리스(트리메틸실릴)실란, 1,1,2,2-테트라페닐디실란, 디페닐실란, 요오드화 사마륨 등을 들 수 있다.
- [0276] 각 공정에서 Wittig 반응을 행하는 경우, 사용되는 Wittig 시약으로서는 알킬리텐포스포란류 등을 들 수 있다. 알킬리텐포스포란류는 공지된 방법, 예를 들어 포스포늄염과 강염기를 반응시킴으로써 조제할 수 있다.
- [0277] 각 공정에서 Horner-Emmons 반응을 행하는 경우, 사용되는 시약으로서는 디메틸포스포노아세트산 메틸, 디에틸포스포노아세트산 에틸 등의 포스포노아세트산 에스테르류; 알칼리 금속 수소화물류, 유기 리튬류 등의 염기를 들 수 있다.

- [0278] 각 공정에서 Friedel-Crafts 반응을 행하는 경우, 사용되는 시약으로서는 루이스산과 산클로리드 혹은 알킬화제 (예, 할로젠화 알킬류, 알코올, 올레핀류 등)를 들 수 있다. 또는 루이스산 대신 유기산이나 무기산을 사용할 수도 있고, 산클로리드 대신 무수 아세트산 등 산무수물을 사용할 수도 있다.
- [0279] 각 공정에서 방향족 구핵 치환 반응을 행하는 경우, 시약으로서는 구핵제(예, 아민류, 이미다졸 등)와 염기(예, 염기성 염류, 유기 염기류 등)를 사용할 수 있다.
- [0280] 각 공정에서 카르보 음이온에 의한 구핵 부가 반응, 카르보 음이온에 의한 구핵 1,4-부가 반응(Michael 부가 반응), 또는 카르보 음이온에 의한 구핵 치환 반응을 행하는 경우, 카르보 음이온을 발생하기 위해 이용하는 염기로서는 유기 리튬류, 금속 알콕시드류, 무기 염기류, 유기 염기류 등을 들 수 있다.
- [0281] 각 공정에서 Grignard 반응을 행하는 경우, Grignard 시약으로서는 페닐마그네슘브로미드 등의 아릴마그네슘할라이드류; 메틸마그네슘브로미드, 이소프로필마그네슘브로미드 등의 알킬마그네슘할라이드류를 들 수 있다. Grignard 시약은 공지된 방법, 예를 들어 에테르 또는 테트라히드로푸란을 용매로 하여 할로젠화 알킬 또는 할로젠화 아릴과 금속 마그네슘을 반응시킴으로써 조제할 수 있다.
- [0282] 각 공정에서 Knoevenagel 축합 반응을 행하는 경우, 시약으로서는 두 개의 전자 구인기에 협지된 활성 메틸렌 화합물(예, 말론산, 말론산 디에틸, 말로노니트릴 등) 및 염기(예, 유기 염기류, 금속 알콕시드류, 무기 염기류)를 사용할 수 있다.
- [0283] 각 공정에서 Vilsmeier-Haack 반응을 행하는 경우, 시약으로서는 염화 포스포릴과 아미드 유도체(예, N,N-디메틸포름아미드 등)를 사용할 수 있다.
- [0284] 각 공정에서 알코올류, 알킬할라이드류, 술폰산 에스테르류의 아지드화 반응을 행하는 경우, 사용되는 아지드화제로서는 디페닐포스포릴아지드(DPPA), 트리메틸실릴아지드, 아지드화 나트륨 등을 들 수 있다. 예를 들어 알코올류를 아지드화하는 경우, 디페닐포스포릴아지드와 1,8-디아자비스클로[5,4,0]운데카-7-엔(DBU)을 이용하는 방법이나 트리메틸실릴아지드와 루이스산을 이용하는 방법 등이 있다.
- [0285] 각 공정에서 환원적 아미노화 반응을 행하는 경우, 사용되는 환원제로서는 수소화 트리아세톡시 붕소 나트륨, 수소화 시아노 붕소 나트륨, 수소, 포름산 등을 들 수 있다. 기질이 아민 화합물인 경우는, 사용되는 카르보닐 화합물로서는 파라포름알데히드 외에 아세트알데히드 등의 알데히드류, 시클로헥사논 등의 케톤류를 들 수 있다. 기질이 카르보닐 화합물인 경우는 사용되는 아민류로서는 암모니아, 메틸아민 등의 1급 아민; 디메틸아민 등의 2급 아민 등을 들 수 있다.
- [0286] 각 공정에서 광연 반응을 행하는 경우, 시약으로서는 아조디카르복실산 에스테르류(예, 아조디카르복실산 디에틸(DEAD), 아조디카르복실산 디이소프로필(DIAD) 등) 및 트리페닐포스핀을 사용할 수 있다.
- [0287] 각 공정에서 에스테르화 반응, 아미드화 반응, 혹은 우레아화 반응을 행하는 경우, 사용되는 시약으로서는 산클로리드, 산브로미드 등의 할로젠화 아실체; 산무수물, 활성 에스테르체, 황산 에스테르체 등 활성화된 카르복실산류를 들 수 있다. 카르복실산의 활성화제로서는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(WSCD) 등의 카르보디이미드계 축합제; 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄클로라이드-n-하이드레이트(DMT-MM) 등의 트리아진계 축합제; 1,1-카르보닐디이미다졸(CDI) 등의 탄산 에스테르계 축합제; 디페닐인산 아지드(DPPA); 벤조트리아졸-1-일옥시-트리스디메틸아미노포스포늄염(BOP 시약); 요오드화2-클로로-1-메틸-피리디늄(무카야마 시약); 염화 티오닐; 클로로포름산 에틸 등의 할로포름산 저급 알킬; 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄헥사플루오로 인산염(HATU); 황산; 혹은 이들의 조합 등을 들 수 있다. 카르보디이미드계 축합제를 사용하는 경우, 1-히드록시벤조트리아졸(HOBt), N-히드록시숙신산 이미드(HOSu), 디메틸아미노피리딘(DMAP) 등의 첨가제를 추가로 반응에 첨가하여도 좋다.
- [0288] 각 공정에서 커플링 반응을 행하는 경우, 사용되는 금속 촉매로서는 아세트산 팔라듐(II), 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0), 디클로로비스(트리페닐포스핀) 팔라듐(II), 디클로로비스(트리에틸포스핀)팔라듐(II), 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0), 염화1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센팔라듐(II), 아세트산 팔라듐(II) 등의 팔라듐 화합물; 테트라키스(트리페닐포스핀)니켈(0) 등의 니켈 화합물; 염화 트리스(트리페닐포스핀)로듐(III) 등의 로듐 화합물; 코발트 화합물; 산화 동, 요오드화 동(I) 등의 동 화합물; 백금 화합물 등을 들 수 있다. 추가로 반응에 염기를 첨가하여도 좋고, 이러한 염기로서는 무기 염기류, 염기성 염류 등을 들 수 있다.
- [0289] 각 공정에서 티오카르보닐화 반응을 행하는 경우, 티오카르보닐화제로서는 대표적으로는 오황화 2인을 이용할 수 있는데, 오황화 2인 외에 2,4-비스(4-메톡시페닐)-1,3,2,4-디티아디포스페탄-2,4-디술폰(Lowesson 시약)

등의 1,3,2,4-디티아디포스페탄-2,4-디설피드 구조를 갖는 시약을 이용해도 좋다.

- [0290] 각 공정에서 Wohl-Ziegler 반응을 행하는 경우, 사용되는 할로겐화제로서는 N-요오드 숙신산 이미드, N-브로모 숙신산 이미드(NBS), N-클로로 숙신산 이미드(NCS), 브롬, 염화 술프릴 등을 들 수 있다. 추가로 열, 빛, 과산화 벤조일, 아조비스이소부티로니트릴 등의 라디칼 개시제를 반응에 첨가함으로써 반응을 가속시킬 수 있다.
- [0291] 각 공정에서 히드록시기의 할로겐화 반응을 행하는 경우, 사용되는 할로겐화제로서는 할로겐화 수소산과 무기산의 산할로겐화물, 구체적으로는 염소화에서는 염산, 염화 티오닐, 옥시 염화인 등, 브롬화에서는 48% 브롬화 수소산 등을 들 수 있다. 또한 트리페닐포스핀과 사염화 탄소 또는 사브롬화 탄소 등과의 작용에 의해 알코올로부터 할로겐화 알킬체를 얻는 방법을 이용해도 좋다. 혹은 알코올을 술폰산 에스테르로 변환한 후, 브롬화 리튬, 염화 리튬 또는 요오드화 나트륨과 반응시키는 2단계 반응을 거쳐 할로겐화 알킬체를 합성하는 방법을 이용해도 좋다.
- [0292] 각 공정에서 Arbuzov 반응을 행하는 경우, 사용되는 시약으로서는 브로모아세트산 에틸 등의 할로겐화 알킬류; 트리에틸포스파이트나 트리(이소프로필)포스파이트 등의 포스파이트류를 들 수 있다.
- [0293] 각 공정에서 술폰에스테르화 반응을 행하는 경우, 사용되는 술폰화제로는 메탄술폰닐클로리드, p-톨루엔술폰닐 클로리드, 메탄술폰산 무수물, p-톨루엔술폰산 무수물, 트리플루오로메탄술폰산 무수물 등을 들 수 있다.
- [0294] 각 공정에서 가수 분해 반응을 행하는 경우, 시약으로서는 산 또는 염기가 이용된다. 또한 t-부틸에스테르산의 가수 분해 반응을 행하는 경우, 부생하는 t-부틸 양이온을 환원적으로 트랩하기 위해 포름산이나 트리에틸실란 등을 첨가하는 수가 있다.
- [0295] 각 공정에서 탈수 반응을 행하는 경우, 사용되는 탈수제로서는 황산, 오산화 2인, 옥시 염화인, N,N'-디시클로헥실카르보다이미드, 알루미늄, 폴리인산 등을 들 수 있다.
- [0296] 화합물 (I)은, 예를 들어 이하의 제법에 따라 제조할 수 있다. 화합물 (I) 중, 과선의 양쪽이 시스형이 되는 결합인 화합물 및 과선의 한쪽 또는 양쪽이 트랜스형이 되는 결합인 화합물 중 어느 것도 이하에 나타내는 제법과 동일한 제법으로 제조할 수 있다. 본 발명에서는, 특히 에스테르화 시에, 목적으로 하는 화합물 (I)의 구조에 따른 적절한 원료를 이용함으로써, 목적으로 하는 구조의 화합물 (I)을 합성하는 것이 가능하다. 또한 화합물 (I)의 염은 무기 염기, 유기 염기, 유기산, 염기성 또는 산성 아미노산과의 적절한 혼합에 의해 얻을 수 있다.



[0297]

[0298]

[0299]

이하 본 발명의 화합물을 함유하는 지질 입자 및 당해 지질 입자와 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 함유하는 조성물의 제조 방법에 대해 기재한다.

본 발명의 지질 입자는 본 발명의 화합물 (양이온성 지질)을 그 밖의 지질 성분과 혼합한 후, 지질 성분으로부터 지질 입자를 조제하기 위한 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어 상기 (혼합)지질 성분을 유기 용매에 용해하고, 얻어진 유기 용매 용액을 물 혹은 완충액과 혼합(예를 들어 유화법)으로써 지질 입자 분산액으로서 제조할 수 있다. 상기 혼합은, 미소 유체 혼합 시스템(예를 들어 NanoAssemblr 장치(Precision Nano

Systems사))를 이용하여 행할 수 있다. 얻어진 지질 입자는 탈염 혹은 투석 및 멸균 여과에 부쳐도 좋다. 또한 필요에 따라 pH 조정, 삼투압 조정을 해도 좋다.

- [0300] 화합물 (I)은 식 (I)의 n, R 및 파선의 정의된 조합에 의해 복수의 구조를 취할 수 있다. 지질 입자의 제조에는 화합물 (I)로서 특정 구조를 갖는 1종류의 화합물을 단독으로 사용해도 좋고, 구조가 다른 여러 종류의 화합물의 혼합물로서 사용해도 좋다.
- [0301] "다른 지질 성분"으로서는 앞서 설명한 것과 같은 구조 지질, 예를 들어 스테롤류, 인지질, 폴리에틸렌글리콜 지질을 들 수 있다. "다른 지질 성분"은 예를 들어 본 발명의 화합물 1몰에 대해 0.008 내지 4몰이 이용된다. 본 발명의 화합물은 다른 지질 성분(특히 콜레스테롤, 포스포티딜콜린 및 폴리에틸렌글리콜 지질)과 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 화합물과 다른 지질 성분을 혼합하여 사용하는 경우의 바람직한 양태는 본 발명의 화합물 1 내지 4몰, 스테롤류 0 내지 3몰, 인지질 0 내지 2몰 및 폴리에틸렌글리콜 지질 0 내지 1몰의 혼합물이다. 본 발명의 화합물과 다른 지질 성분을 혼합하여 사용하는 경우의 보다 바람직한 양태는 본 발명의 화합물 1 내지 1.5몰, 스테롤류 0 내지 1.25몰, 인지질 0 내지 0.5몰 및 폴리에틸렌글리콜 지질 0 내지 0.125몰의 혼합물이다.
- [0302] 전술한 유기 용매 용액 중의 본 발명 화합물 혹은 본 발명의 화합물과 다른 지질 성분과의 혼합물의 농도는 바람직하게는 0.5 내지 100mg/mL이다.
- [0303] 유기 용매로서는 예를 들어 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올, tert-부탄올, 아세톤, 아세토 니트릴, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폭시드, 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다. 유기 용매는 0 내지 20%의 물 혹은 완충액을 함유해도 좋다.
- [0304] 완충액으로서는 산성 완충액(예를 들어 아세트산 완충액, 시트르산 완충액, 2-모르폴리노에탄술폰산(MES) 완충액, 인산 완충액)이나 중성 완충액(예를 들어 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(HEPES) 완충액, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충액, 인산 완충액, 인산 완충 생리 식염수(PBS))를 들 수 있다.
- [0305] 미소 유체 혼합 시스템을 이용하여 혼합을 행하는 경우, 유기 용매 용액 1용적부에 대하여 물 혹은 완충액 1 내지 5용적부를 혼합하는 것이 바람직하다. 또한 해당 시스템에서 혼합액(유기 용매 용액과 물 혹은 완충액과의 혼합액) 유속은 바람직하게는 0.1 내지 10mL/min이며, 온도는 바람직하게는 15 내지 45°C이다.
- [0306] 본 발명의 조성물은 지질 입자 또는 지질 입자 분산액을 제조할 때, 물 혹은 완충액에 활성 성분으로서의 핵산(예를 들어 가이드 RNA 혹은 이것을 코드하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코드하는 서열을 포함하는 핵산)을 첨가하여 포함시켜 덩으로써 활성 성분을 포함하는 지질 입자 분산액으로서 제조할 수 있다. 활성 성분은 물 혹은 완충액에서의 활성 성분의 농도가 0.05 내지 2.0mg/mL가 되도록 첨가하는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 활성 성분을 포함하는 물 혹은 완충액을 "활성 성분(가이드 RNA 혹은 이것을 코드하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코드하는 서열을 포함하는 핵산)을 포함하는 수용액"이라고 기재하는 수가 있다.
- [0307] 활성 성분으로 2종류 또는 2종류 이상의 가이드 RNA를 포함하는 본 발명의 조성물을 제조하는 경우, 당해 조성물의 제조에서 2종류 또는 2종류 이상의 가이드 RNA를 포함하는 수용액을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0308] 또한 본 발명의 조성물은 지질 입자 또는 지질 입자 분산액과 활성 성분 또는 그 수용액을 공지된 방법으로 혼합함으로써 활성 성분을 포함하는 지질 입자 분산액으로서 제조할 수 있다. 지질 입자 분산액은 지질 입자를 적당한 분산매로 분산시킴으로써 조제할 수 있다. 또, 활성 성분의 수용액은 활성 성분을 적당한 용매에 용해시킴으로써 조제할 수 있다.
- [0309] 분산매 및 용매를 제외한 본 발명의 조성물에서의 본 발명 화합물의 함량은 바람직하게는 40 내지 70 중량%이다.
- [0310] 분산매 및 용매를 제외한 본 발명물 조성물에서의 활성 성분의 함량은 바람직하게는 1 내지 20 중량%이다.
- [0311] 지질 입자 분산액 또는 조성물을 포함하는 분산액의 분산매는, 투석함으로써 물 또는 완충액으로 치환할 수 있다. 투석에는 분획 분자량 10 내지 20K의 한외 여과막을 이용해 4°C 내지 실온에서 실시한다. 반복 투석을 해도 좋다. 분산매의 치환에는, 탄젠셜 플로우·필트레이션(TFF)을 사용해도 좋다. 또, 분산매의 치환 후 필요에 따라 pH 조정, 삼투압 조정을 해도 좋다.
- [0312] 이하 본 발명의 화합물을 함유하는 지질 입자 및 당해 지질 입자와 가이드 RNA 혹은 이것을 코드하는 서열을 포

합하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 함유하는 조성물의 분석 방법에 대해 기재한다.

- [0313] (조성물 중의) 지질 입자의 입자 직경은 공지된 수단에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어 NIBS(비접촉 후방 산란) 기술에 기초한 입자 직경 측정 장치, Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)를 이용하고, 자기 상관 함수의 큐물런트 해석에 의해 Z평균 입자 직경으로서 산출할 수 있다. (조성물 중의) 지질 입자의 입자 직경(평균 입자 직경)은, 바람직하게는 10 내지 200 nm이다.
- [0314] 본 발명 조성물에서의 활성 성분으로서의 핵산(구체적으로는 가이드 RNA 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 및/또는 RNA 유도형 뉴클레아제 혹은 이것을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산)의 농도 및 내분물은 공지된 수단에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어 Quant-iT™ RiboGreen(등록상표)(Invitrogen)을 이용해 핵산을 형광 표지하고, 그 형광 강도를 측정함으로써 농도 및 내분물을 구할 수 있다. 조성물 중의 핵산 농도는 농도가 기지의 핵산 수용액으로부터 작성되는 표준 곡선을 이용하여 산출할 수 있으며 내분물은 Triton-X100(지질 입자를 붕괴시키기 위한 계면 활성제)의 첨가 여부에 따른 형광 강도의 차이를 기초로 산출할 수 있다. 또한, 조성물 중의 농도는 지질 입자에 내분되어 있는 핵산 및 내분되지 않은 핵산의 합계 농도를 가리키며, 내분물은 조성물 중의 핵산 전체 중, 지질 입자에 내분되어 있는 것의 비율을 가리킨다.
- [0315] 이하, 본 발명물의 조성물의 용도에 대해 설명한다.
- [0316] 본 발명의 조성물은 하나의 실시 형태에서 본 발명의 조성물과 세포를 접촉시키는 공정을 포함하는 세포 중의 표적 유전자좌를 개변하는 방법에서 사용할 수 있다. 이러한 방법에 의해 표적 유전자좌가 개변된 세포가 얻어진다.
- [0317] 본 발명의 조성물은 하나의 실시 형태에서, 본 발명의 조성물을 포함하는 의약을 제조하기 위하여 사용할 수 있다. 바꾸어 말하면 본 발명의 조성물은 의약으로서 조제 내지 제제화할 수 있다.
- [0318] 본 발명의 바람직한 일 실시 형태에서, 의약은 디스트로핀 이상증(예, 근디스트로피(Duchenne형 근디스트로피), 디스트로핀 유전자 관련 확장형 심근증)의 예방·치료제 또는 수복형 디스트로핀 단백 생산약이다. 바꾸어 말하면, 본 발명의 바람직한 일 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 그 유효량을 투여함으로써 포유 동물에서의 디스트로핀 이상증(예, 근디스트로피(예, Duchenne형 근디스트로피, Becker형 근디스트로피), 디스트로핀 유전자 관련 확장형 심근증)을 예방·치료하는 방법을 위해(특히 Duchenne형 근디스트로피를 예방·치료하는 방법을 위해) 또는 수복형 디스트로핀 단백을 생산하는 방법을 위해 사용된다.
- [0319] 근디스트로피란, "골격근의 변성, 괴사를 주병변으로 하며 임상적으로는 진행성의 근력 저하를 보이는 유전성 질환"으로 정의되어 있다. 근디스트로피 중에는 Duchenne형 근디스트로피, Becker형 근디스트로피, 에머리 드레이푸스형 근디스트로피, 지대형 근디스트로피, 선천성 근디스트로피, 미요시형 근디스트로피, 원위형 근디스트로피, 안면 건갑상완형 근디스트로피, 그리고 근강직성 디스트로피 등이 알려져 있다.
- [0320] 디스트로핀 이상증이란, 디스트로핀 유전자 변이가 원인으로, 기능 결손형 또는 기능 이상형 디스트로핀 단백질에 의해 야기되는 여러 가지 질환을 말한다. Duchenne형 근디스트로피, Becker형 근디스트로피 및 디스트로핀 유전자 관련 확장형 심근증 등이 포함된다. 골격근 장애가 주된 증상인 경우가 많지만 골격근 증상이 나타나지 않는 경우도 존재한다. 고CK혈증, 미오글로빈 뇨증, 확장형 심근증, 인지 기능 장애 등을 동반하는 경우도 있다.
- [0321] Duchenne형 근디스트로피는 소아의 근디스트로피 중에서 가장 환자 수가 많은 질환이고, 유병률은 인구 10만명당 4 내지 5명으로 알려져 있다. 진행성 근위축을 주증상으로 하며 X 염색체 상의 디스트로핀 유전자가 변이에 의해 기능 부전이 되는 것이 원인이다. Duchenne형 근디스트로피에서는, 절반 이상의 환자가 단일, 또는 복수의 엑손 결손을 가지고 있다. 디스트로핀 유전자 변이에 의해 단백질 해독 틀의 어긋남이 생기고, 도중에 시종 코돈이 나타나 디스트로핀 단백질이 합성되지 않음으로써 일련의 증상이 야기된다.
- [0322] 본 명세서에서 수복형 디스트로핀 단백질이란, 게놈 편집 결과, 발현이 회복된 디스트로핀 단백을 가리킨다. 특히 프레임 시프트 변이 또는 넌센스 변이를 갖는 디스트로핀 유전자에 대해 게놈 편집을 이용함으로써 발현이 회복된, N 말단의 액틴 결합 도메인과 C 말단의 고시스테인 도메인을 보유한 디스트로핀 단백을 가리킨다. 엑손 중복에 의해 프레임 시프트 변이가 생긴 경우, 게놈 편집에 의해 당해 중복 엑손의 한쪽을 스킵했을 경우, 정상형과 100% 상동성을 갖는 수복형 디스트로핀 단백질의 발현을 회복시키는 경우도 있을 수 있다. 수복형 디스트로핀 단백질로서는 특히 엑손 44를 결실한 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 45가 스킵되고, 엑손 43과 엑손 46이 연결된 mRNA로부터 번역되는 인간 디스트로핀 단백을 가리킨다. 이 밖에도 예를 들어 엑손 12-44, 18-44, 46-47,

46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 또는 46-55를 결실한 인간 디스트로핀 유전자에서 각각 소정의 엑손을 스킵함으로써 생산되는 인간 디스트로핀 단백질 수복형 디스트로핀 단백질에 포함되지만 이것으로 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물을 사용함으로써 수복형 디스트로핀 단백질이 생산되게 되었는지 여부는 예를 들어 세포 내에서의 수복형 디스트로핀 단백을 코딩하는 mRNA를 PCR에 의해 검출함으로써 확인할 수 있다. 또는 디스트로핀 단백질을 인식하는 항체를 이용하여 웨스턴블롯법을 행하고, 디스트로핀 단백질의 분자량으로부터 확인할 수도 있다.

- [0323] 본 발명의 조성물은, 하나의 실시 형태에서 본 발명의 조성물과 세포를 접촉시키는 공정을 포함하는 표적 유전자좌가 개변된 세포의 제조 방법에서 사용할 수 있다.
- [0324] 본 발명의 조성물은 하나의 실시 형태에서 (1) 본 발명의 조성물과 비인간 포유 동물의 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 접촉시키는 공정, (2) 표적 유전자좌가 개변된 상기 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 선택하는 공정 및 (3) 상기 선택된 수정란, 배아 줄기 세포 혹은 난모 세포를 비인간 포유 동물의 암컷 동물에게 이식하는 공정을 포함하는, 표적 유전자좌가 개변된 비인간 포유 동물의 제작 방법에서 사용할 수 있다.
- [0325] 공정 (1)에서 본 발명의 조성물과 접촉시키는 세포는 상기 세포 외에 예를 들어 iPS 세포 등의 다능성 줄기 세포, 정자 줄기 세포 및 시원 생식 세포 등의 생식 세포로 할 수 있다.
- [0326] 공정 (2)에서의 선택은 약제 내성 유전자를 이용한 CRISPR 시스템에서의 일반적인 스크리닝 방법에 의해 행해도 좋고, PCR 및 시퀀스 확인에 의해 행해도 좋다. 예를 들어 녹인용 또는 녹아웃용 벡터에 약제 내성 유전자 발현 유닛을 포함시켜 두고 CRISPR 시스템에 의해 표적 유전자좌에 대해 녹인 또는 녹아웃이 일어난 수정란 등에서 약제 내성 유전자를 발현시킨 후, 세포 집단을 약제 처리함으로써 표적 유전자좌가 개변된 수정란 등을 선택할 수 있다.
- [0327] 상기와 같은 본 발명의 각종 방법, 의약, 사용에 따른 실시 형태에서 사용되는 "조성물"의 상세한 내용은 앞에서 서술한 바와 같으며, 예를 들어 조성물이 함유하는 가이드 RNA 등, RNA 유도형 뉴클레아제 등, 세포, 표적 유전자좌의 상세한 내용이나 바람직한 실시 형태는 그 조성물을 이용하는 방법, 의약, 사용 등에 따른 발명에 있어서도 마찬가지이다.
- [0328] 본 발명의 의약은 정맥 내 주사, 동맥 내 주사, 근육 내 주사, 피하 주사, 복강 내 주사 등의 주사제로 하는 것이 바람직하지만, 다른 경로에 의해서도 활성 성분의 유효량을 목적으로 하는 세포에 송달할 수 있다면, 그에 적용한 제형으로 하는 것도 가능하다. 주사제로서는 정맥 내 주사 또는 근육 내 주사가 바람직하다.
- [0329] 본 발명의 의약은 본 발명의 조성물에 더하여 제약학적으로 허용되는 물질, 예를 들어 주사제로서 조제하는 경우는 주사용수, 용매, 첨가제 등을 필요에 따라 포함할 수 있다. 본 발명의 의약에서의 활성 성분의 양 내지 농도는 목적으로 하는 예방 또는 치료 효과에 있어서 유효한 양의 활성 성분이 목적으로 하는 세포에 송달할 수 있도록 제형, 투여 경로, 1회당 투여량, 일정 기간 중의 투여 횟수 등을 감안하면서 적절히 조정할 수 있다. 투여 경로로서는 정맥 내(전신) 투여 또는 근육 내 투여가 바람직하다.
- [0330] 본 발명에서 "치료"한다는 것은, 이미 질환이 발증되어 있는 대상의 생체 내(조직 중 또는 장기 중)의 일정 비율의 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자를 개변하고, 질환의 원인이 되고 있는 유전자의 염기 서열 이상을 수복하는 것을 말한다. 또한 "예방"한다는 것은, 아직 질환 또는 증상이 발증되지 않은 대상의 생체 내(조직 중 또는 장기 중)의 일정 비율의 세포 중의 표적 유전자좌에서의 유전자를 개변하여 질환의 원인이 될 수 있는 유전자의 염기 서열을 수복하는 것을 말한다.
- [0331] 상기 질환의 원인이 되고 있는 유전자의 염기 서열 이상으로서는 예를 들어 질환에 관여하는 유전자 변이(예, Duchenne형 근디스트로피 환자의 일부에게서 보여지는 엑손 44의 결손)를 들 수 있다. 디스트로핀 단백질의 생산이 이루어지지 않는 엑손 44 결손형 Duchenne형 근디스트로피 환자에 대하여, 본 발명의 조성물을 투여함으로써 수복형 디스트로핀 단백질의 생산이 유도되고(디스트로핀 단백질의 회복이라고도 함), 그 결과, 당해 질환을 치료·예방할 수 있다.
- [0332] 조직 중 또는 장기 중의 유전자가 개변된 세포의 비율(유전자의 개변 효율)이나 질환 증상의 회복, 완화, 발생의 지연 또는 방지, 진행 억제 등의 정도는 일률적으로 규정되지 않는다.
- [0333] 근디스트로피의 증상으로서의 제한되는 것은 아니지만 근력 저하, 근위축, 운동 능력 저하, 보행 장애, 심근 질환 등이 포함된다. 근디스트로피의 치료는 이러한 증상의 개선, 발증 혹은 진행의 지연 등이 포함된다.
- [0334] 근디스트로피의 발증, 진행 또는 증상에 영향을 미치는지 여부를 판정함으로써 근디스트로피의 치료 효과를 평가할 수 있다. 보다 구체적으로는, 예를 들어 대상의 근중량, 근단면적, 단리 골격근의 장력, 근력(예를 들어

약력), 운동 능력(예를 들어 트레드밀 능력) 등을 측정함으로써 근디스트로피의 치료 효과를 확인할 수 있다.

[0335] 실시예

[0336] 본 발명은 추가로 이하의 실시예, 시험예 및 제제예에 따라 자세하게 설명되지만, 이것들은 본 발명을 한정하는 것이 아니며, 또한 본 발명의 범위를 일탈하지 않는 범위에서 변화시켜도 좋다.

[0337] 이하의 실시예 중의 "실온"은 통상 약 10°C 내지 약 35°C를 나타낸다. 혼합 용매에서 나타낸 비는 특별히 언급이 없는 한 용량비를 나타낸다. %는 특별히 언급이 없는 한 중량%를 나타낸다.

[0338] 실시예의 컬럼 크로마토그래피에서의 용출은 특별히 언급하지 않는 한 TLC(Thin Layer Chromatography, 박층 크로마토그래피)에 의한 관찰 하에 실시하였다. TLC 관찰에서는 TLC 플레이트로서 메르크(Merck)사제의 60 F₂₅₄를 이용하고, 전개 용매로서 컬럼 크로마토그래피에서 용출 용매로서 이용한 용매를 이용하였다. 또, 검출에는 UV 검출기를 채용하고, 필요에 따라 TLC 발색 시약을 이용해 관찰하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 NH라고 기재한 경우는 아미노프로필실란 결합 실리카겔을, Diol이라고 기재한 경우는 3-(2,3-디히드록시프로폭시)프로필실란 결합 실리카겔을 이용하였다. 분취 HPLC(고속 액체 크로마토그래피)에서 C18이라고 기재한 경우는 옥타데실 결합 실리카겔을 이용하였다. 용출 용매에서 나타낸 비는 특별히 언급이 없는 한 용량비를 나타낸다.

[0339] ¹H NMR은 푸리에 변환형 NMR로 측정하였다. ¹H NMR의 해석에는 ACD/SpecManager(상품명) 소프트웨어 등을 이용하였다. 수산기나 아미노기 등의 프로톤 피크가 매우 완만한 피크에 대해서는 기재하지 않는 수가 있다.

[0340] MS는, LC/MS 및 MALDI/TOFMS에 의해 측정하였다. 이온화법으로서는 ESI법, APCI법 또는 MALDI법을 이용하였다. 매트릭스로서는 CHCA를 사용하였다. 데이터는 질량값(found)을 기재하였다. 통상, 분자 이온 피크가 관측되지만 프라그먼트 이온으로서 관측되는 경우가 있다. 염의 경우에는, 통상, 프리체의 분자 이온 피크, 양이온종, 음이온종 혹은 프라그먼트 이온 피크가 관측된다.

[0341] 이하의 실시예에서는 아래의 약호를 사용한다.

[0342] MS: 매스 스펙트럼

[0343] M: 몰 농도

[0344] N: 규정도

[0345] CDCl₃: 중클로로포름

[0346] DMSO-d₆: 중디메틸설폭시드

[0347] ¹H NMR: 프로톤 핵자기 공명

[0348] LC/MS: 액체 크로마토그래프 질량 분석계

[0349] ESI: electrospray ionization, 일렉트로스프레이 이온화

[0350] APCI: atmospheric pressure chemical ionization, 대기압 화학 이온화

[0351] MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization, 매트릭스 지원 레이저 탈리 이온화

[0352] TOFMS: Time-of-flight mass spectrometry, 비행 시간형 질량 분석

[0353] CHCA: α-시아노-4-히드록시 신남산

[0354] DMF: N,N-디메틸포름아미드

[0355] THF: 테트라히드로푸란

[0356] DMAP: 4-디메틸아미노피리딘

[0357] TBAF: 테트라부틸암모늄플루오리드

[0358] [합성예 1] 3-((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)-2,2-비스(((9Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트

- [0359] A) 2-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)-2-(히드록시메틸)프로판-1,3-디올
- [0360] 2,2-비스(히드록시메틸)프로판-1,3-디올(5.45 g), 1H-이미다졸(2.72 g) 및 DMF(190 mL)의 혼합물에 tert-부틸 클로로디메틸실란(3.01 g)의 DMF(10 mL) 용액을 실온에서 첨가하였다. 24 시간 교반 후, 반응 혼합물을 감압 하 농축하였다. 잔사를 아세트산 에틸로 희석하고, 물로 3회, 포화 식염수로 1회 세정한 후, 무수 황산 나트륨으로 건조하고 용매를 감압 하 증류 제거하였다. 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(아세트산 에틸/헥산)로 정제 하여 표제 화합물(2.25 g)을 얻었다.
- [0361] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.08 (6H, s), 0.90 (9H, s), 2.53 (3H, t, J = 5.5 Hz), 3.66 (2H, s), 3.73 (6H, d, J = 5.5 Hz)
- [0362] B) 3-(((tert-부틸(디메틸)실릴)옥시)-2,2-비스(((9Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트
- [0363] 2-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)-2-(히드록시메틸)프로판-1,3-디올(258 mg), (9Z)-테트라데카-9-엔산(769 mg) 및 DMAP(126 mg)의 DMF(3 mL) 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염(790 mg)을 실온에서 첨가하였다. 18 시간 교반 후, 반응 혼합물을 아세트산 에틸로 희석하고, 물로 2회, 포화 식염수로 1회 세정한 후, 무수 황산 나트륨으로 건조하고 용매를 감압 하 증류 제거하였다. 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마 토그래피(NH, 아세트산 에틸/헥산)로 정제하여 표제 화합물(860 mg)을 얻었다.
- [0364] ^1H NMR (300 MHz, 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 Hz), 3.58 (2H, s), 4.08 (6H, s), 5.27-5.43 (6H, m)
- [0365] C) 3-히드록시-2,2-비스(((9Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트
- [0366] 3-(((tert-부틸(디메틸)실릴)옥시)-2,2-비스(((9Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에 노에이트(5.91 g)의 THF(120 mL) 용액에 TBAF의 THF 용액(1 M, 14.85 mL)과 아세트산(4.91 mL)의 혼합물을 실 온에서 첨가하였다. 3 일간 교반 후, 반응 혼합물을 감압 하 농축하였다. 잔사를 아세트산 에틸로 희석하고, 포 화 탄산 수소 나트륨 수용액으로 1회, 포화 식염수로 1회 세정한 후, 무수 황산 나트륨으로 건조하고 용매를 감 압 하 증류 제거하였다. 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(아세트산 에틸/헥산)로 정제하여 표제 화합물 (4.96 g)을 얻었다.
- [0367] ^1H NMR (300 MHz, 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 Hz), 2.52 (1H, t, J = 7.0 Hz), 3.49 (2H, d, J = 7.0 Hz), 4.11 (6H, s), 5.26- 5.42 (6H, m)
- [0368] D) 3-(((4-(디메틸아미노)부타노일)옥시)-2,2-비스(((9Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트
- [0369] 3-히드록시-2,2-비스(((9Z)-테트라데카-9-에노일옥시)메틸)프로필(9Z)-테트라데카-9-에노에이트(4.96 g), DMAP(796 mg) 및 4-(디메틸아미노)부탄산 염산염(2.19 g)의 DMF(20 mL) 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로 필)카르보디이미드 염산염(2.50 g)을 실온에서 첨가하였다. 18 시간 교반 후, 반응 혼합물을 아세트산 에틸로 희석하고 포화 탄산 수소 나트륨 수용액으로 1회, 포화 식염수로 1회 세정한 후, 무수 황산 나트륨으로 건조하 고 용매를 감압 하 증류 제거하였다. 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(NH, 아세트산 에틸/헥산)로 정제하 여 표제 화합물(5.31 g)을 얻었다.
- [0370] ^1H NMR (300 MHz, 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)
- [0371] 이하의 실시예에서 이용한 MmRosa26 sgRNA(서열 번호 9) 및 2종류의 HsDMDEX45 sgRNA(HsDMDEX45#1 sgRNA 및 HsDMDEX45#23 sgRNA, 각각 상기 서열 번호 1 및 2에 대응)의 염기 서열은 다음과 같다.

표 1

ID	sequence	
1 MmRosa26 sgRNA (mod)	G(M)^A(M)^U(M)^GGGCGGGAGUCUUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU(M)^U(M)^U(M)^U(M)^U	98 mer RNA
2 HsDMD Ex45#1 sgRNA (mod)	U(M)^G(M)^G(M)^UAUCUUACAGGAACUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C	96 mer RNA
3 HsDMD Ex45#23 sgRNA (mod)	A(M)^G(M)^C(M)^UGUCAGACAGAAAAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG(M)^U(M)^G(M)^C	96 mer RNA

N: RNA
N(M): 2'-OMe RNA
^: phosphorothioate

[0372]

[0373] [실시예 1] C57BL/6J 마우스에서의 MmRosa26 sgRNA를 이용한 DNA 변이 도입 효율 평가

[0374] [1-1] Cas9 mRNA-LNP의 조제

[0375] 지질 혼합물(합성예 1에서 얻어진 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7, 몰비)을 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 6.9mg/mL의 지질 용액을 얻었다. Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies)를 10mM 2-MES 용액 pH 5.5에 용해하여 0.15mg/mL의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 2.7mL/min: 5.3mL/min로 혼합하여 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)를 이용하여, 물에 대하여 4°C에서 1시간, PBS에 대하여 4°C에서 18시간 투석을 행하였다. 다시 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심(3,000×g, 4°C, 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회) 및 한외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서 0.2µm의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4°C에 보존하였다. 이와 같이 하여 제조된 분산액을 "Cas9 mRNA-LNP"로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iTTM RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 측정 결과를 표 2에 나타낸다.

[0376] [1-2] MmRosa26 sgRNA-LNP의 조제

[0377] 지질 혼합물(합성예 1에서 얻어진 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7, 몰비)을 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 6.9mg/mL의 지질 용액을 얻었다. MmRosa26 sgRNA(GeneDesign, 상기 표 1 참조)를 10mM 2-MES 용액 pH 5.5에 용해하여 0.15mg/mL의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 2.7mL/min: 5.3mL/min로 혼합하여 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)를 이용하여, 물에 대하여 4°C에서 1시간, PBS에 대하여 4°C에서 18시간 투석을 행하였다. 추가로 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심(3,000×g, 4°C, 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회) 및 한외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서, 0.2µm의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4°C에 보존하였다. 이와 같이 하여 조제한 분산액을 "MmRosa26 sgRNA-LNP"로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iTTM RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 측정 결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

	핵산 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	내봉률 (%)	입자 직경 (nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	950	96	82	0.028
MmRosa sgRNA-LNP	904	94	84.8	0.077

[0378]

[0379]

[1-3] C57BL/6J 마우스에서의 MmRosa26 sgRNA를 이용한 DNA 변이 도입 효율 평가

[0380]

9주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(일본 클레아)의 우측 하지 비복근에, MmRosa26 sgRNA-LNP 및 Cas9 mRNA-LNP의 혼합 용액(sgRNA 및 mRNA로서의 투여량이 모두 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 또는 $1\mu\text{g}/\text{마우스}$ 가 되도록 각각의 LNP 분산액을 혼합하여 제조한 것), 또는 PBS를 투여하였다. 투여 4일 후 3.5% 이소플루란 마취하에서 단두 방혈로 안락사시킨 후, 골격근을 적출하여 액체 질소로 신속하게 동결시켰다. 동결된 조직으로부터 QIAamp Fast DNA Tissue Kit(Qiagen)를 이용하여 게놈 DNA를 추출 정제하고 PrimeSTAR GXL DNA polymerase(TAKARA)를 사용하여 PCR(Forward primer; 서열 번호 10, Reverse primer; 서열 번호 11)을 행하였다. PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)로 정제하고, T7 Endonuclease I(NEB)로 처리 후, Agilent 4200 TapeStation(Agilent)를 이용하여 해석하였다. 결과를 도 1에 나타낸다.

[0381]

서열 번호 10

[0382]

5'- CTCCGAGGCGGATCACAAGCAATAATAACCTGTAG -3'

[0383]

서열 번호 11

[0384]

5'- TGCAAGCACGTTTCCGACTTGAGTTGCCTCAAGAG -3'

[0385]

[실시에 2] 인간 DMD 엑손 45 녹인-마우스 Dmd 엑손 44 녹아웃 마우스에서의 HsDMDEX45#1 sgRNA를 이용한 DNA 변이 도입 활성, 엑손 스킵핑 효과 및 수복형 디스트로핀 단백 발현 효과

[0386]

[2-1] Cas9 mRNA-LNP의 조제

[0387]

실시에 1의 [1-1]에 기재한 순서로 다시 Cas9 mRNA-LNP를 조제하고, 핵산 농도, 내봉률, 입자 직경 및 PDI를 측정하였다. 측정 결과를 표 3에 나타낸다.

[0388]

[2-2] HsDMDEX45#1 sgRNA-LNP의 조제

[0389]

지질 혼합물(합성에 1에서 제조한 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7 몰비)를 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 $6.9\text{mg}/\text{mL}$ 의 지질 용액을 얻었다. HsDMDEX45#1 sgRNA(GeneDesign, 상기 표 1 참조)를 10mM 2-모르폴리노에탄 술폰산(MES) 용액 pH 5.5에 용해하여 $0.15\text{mg}/\text{mL}$ 의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 $2.7\text{mL}/\text{min}$: $5.3\text{mL}/\text{min}$ 로 혼합하여 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)을 이용하여, 물에 대하여 4°C 에서 1시간, PBS에 대하여 4°C 에서 18시간 투석을 행하였다. 또한 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심($3,000\times\text{g}$, 4°C , 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회)하고, 환외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서, $0.2\mu\text{m}$ 의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4°C 에 보존하였다. 이와 같이 하여 조제한 분산액을 "HsDMDEX45#1 sgRNA-LNP" 로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iTTM RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 측정 결과를 표 3에 나타낸다.

표 3

	핵산 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	내봉률 (%)	입자 직경 (nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	1102	94	83.1	0.091
HsDMDEX45#1sgRNA-LNP	1555	98	84.8	0.115

[0390]

[0391]

[2-3] 인간 DMD 엑손 45 녹인-마우스 Dmd 엑손 44 녹아웃 마우스의 제작 방법

[0392]

10 μg 의 인간 DMD 엑손 45 및 이의 5'측 0.7 kb 3'측 0.6 kb를 포함하는 서열 1.5kb, FRT 서열로 헛지된 네오마이신 내성 유전자 발현 유닛 및 마우스 Dmd 인트론 44와 인트론 45 유래 서열 각 1.5 kb로 이루어지는 녹인 벡터를 2.5 μg 의 pCAG-Cas9 발현 벡터 및 2종류의 2.5 μg 의 pU6-sgRNA 발현 벡터(타겟 서열 ; 서열 번호 12 및 서열 번호 13)와 함께 5×10^5 개의 C57BL/6J 마우스 유래의 ES 세포에 일렉트로포레이션하여 PCR 및 시퀀스 확인에 의해 상동 재조합 세포주를 선발하였다. Flpe(플립파아제) 처리에 의해 네오마이신 내성 유닛을 제거한 후 당해 ES 세포주를 ICR 마우스의 4배체 배반포에 현미 주입하고, 키메라 마우스를 취득하였다. 키메라 마우스와 암컷 C57BL/6J 마우스와의 체외 수정에 의해 암컷 인간 DMD 엑손 45 헤테로 녹인 마우스를 취득하였다. 이어서, 수컷 C57BL/6J 마우스와 암컷 인간 DMD 엑손 45 헤테로 녹인 마우스의 수정란에 100 ng/ μL 의 Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies), 2종류의 마우스 Dmd 엑손 44 녹아웃용 sgRNA(타겟 서열 ; 서열 번호 14 및 서열 번호 15, 주식회사 FASMAC 및 ssODN 50ng/ μL (서열 번호 16, 유로핀체노믹스 주식회사)을 현미 주입하고, 얻어진 수컷 새끼에 대하여 PCR 및 시퀀스 확인에 의한 유전자 판정을 하여 인간 DMD 엑손 45 녹인-마우스 Dmd 엑손 44 녹아웃 마우스를 선발하였다.

[0393]

서열 번호 12

[0394]

5'- atgaatgtgcctacatatgg -3'

[0395]

서열 번호 13

[0396]

5'- catagcatgcatttggcttc -3'

[0397]

서열 번호 14

[0398]

5'- gaatgaggtagtgtttagg -3'

[0399]

서열 번호 15

[0400]

5'- gcaggaatcatcttatagc -3'

[0401]

서열 번호 16

[0402]

5'-
gagcaagctgggttagaacaaggctctgtcagagtcagcatgggaatgaggtagtgtgtagcaggaaatagtgtggttttaggtctctccccgcctctgtgtatgtgtgtgtgtgtgt -3'

[0403]

[2-4] 골격근에서의 DNA 변이 도입 효율 평가

[0404]

12주령의 수컷 인간 DMD 엑손 45 녹인-마우스 Dmd 엑손 44 녹아웃 마우스의 우측 하지 비복근에 3 μg 의 HsDMDEX45#1 sgRNA를 내봉한 LNP와 3 μg 의 SpCas9 mRNA를 내봉한 LNP([2-1]의 Cas9 mRNA-LNP와 [2-2]의 HsDMDEX45#1 sgRNA-LNP의 혼합 용액)을, 좌측 하지 비복근에는 PBS를, 각각 6 회/2주간 투여하였다. 초기 투여로부터 56일 후에 3.5% 이소플루란 마취하에 안락사시킨 후 골격근을 적출하여 액체 질소로 신속하게 동결시켰다. 동결 근육 조직을 3% protenase inhibitor cocktail(Sigma)과 5 mM EDTA(WAKO)를 함유한 RIPA buffer(WAKO)로 호모지나이즈 후, QIAamp Fast DNA Tissue Kit(Qiagen)를 이용하여 게놈 DNA를 추출 정제하고 PrimeSTAR GXL DNA polymerase(TAKARA)와 서열 번호 17(Forward primer) 및 서열 번호 18(Reverse primer)의

primer set를 이용하여 증폭하였다. PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)로 정제하고, 재어닐링 한 후에 T7 Endonuclease I(NEB)로 처리하고, Agilent 4200 TapeStation(Agilent)을 이용하여 전기 영동하고, 부착된 소프트웨어로 해석하였다. 얻어진 수치를 이용하여 변이 도입 효율을 아래의 계산식(수학식 1)으로 구하였다.

[0405] 서열 번호 17

[0406] 5'- CAAGTTTAAAATAGCAGAAAACCACTAACTAGCCA -3'

[0407] 서열 번호 18

[0408] 5'- CTGACACATAAAAAGGTGTCTTTCTGTCTTGTATCC -3'

수학식 1

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

$$\text{indel}(\%) = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{cut}})$$

a: 모든 밴드의 피크 면적

b, c: 예상되는 분자량으로 커트된 밴드 유래의 피크 면적

[0409]

[0410] 그 결과, 도 2에 나타내는 바와 같이 PBS 투여에 대하여 LNP를 투여한 골격근에서는 특이적인 DNA의 절단이 검출되고, 변이 도입 효율은 $5.84 \pm 2.15\%$ (Mean \pm SD)였다.

[0411] [2-5] 골격근에서의 엑손 스킵핑 효율 평가

[0412] 호모지네이트의 일부에 QIAzol Lysis Reagent(QIAGEN)와 클로로포름(WAKO)을 첨가하여 혼합·원심 후에 RNA를 포함하는 수조를 분리 회수하고 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)을 이용하여 total RNA를 추출 정제하였다. Total RNA를 High Capacity RNA-to-cDNA kit(Thermo)를 이용하여 역전사하고, 이어서, PrimeSTAR GXL DNA polymerase(TAKARA)와 서열 번호 19(Forward primer) 및 서열 번호 20(Reverse primer)의 primer set를 사용하여 증폭시켰다. PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)로 정제 후 Agilent 4200 TapeStation(Agilent)을 이용하여 전기 영동하고, 부착된 소프트웨어로 해석하였다. 얻어진 수치를 이용하여 엑손 스킵핑 효율(exon skipping efficiency)을 아래의 계산식(수학식 2)으로 구하였다.

[0413] 서열 번호 19

[0414] 5'- GGTGAAAGTACAGGAAGCCGT -3'

[0415] 서열 번호 20

[0416] 5'- TTAGCTGCTGCTCATCTCCAA -3'

수학식 2

$$\text{exon skipping efficiency} = 100 \times b/(a+b)$$

a: Unskipped product band의 피크 면적

b: Skipped product band의 피크 면적

[0417]

- [0418] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, PBS 투여에 대하여 LNP를 투여한 골격근에서는 human Exon 45가 skip된 짧은 PCR 산물이 검출되고 그 효율은 $5.07 \pm 2.59\%$ (Mean \pm SD)였다.
- [0419] [2-6] 골격근의 디스트로핀 단백 회복의 평가
- [0420] 호모지네이트의 일부를 원심 분리하여 상청을 회수하였다. 상청 중의 총단백질량을 Protein assay kit(Thermo)로 측정하고, 0.02 μ g/ μ L 및 3 μ g/ μ L로 조정하였다.
- [0421] Gapdh 검출: 0.02 μ g/ μ L로 조정된 상청에 환원제(Thermo)를 함유한 Sample buffer(Bio-Rad)를 첨가하여 98 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하였다. 0.2 μ g/10 μ L의 환원·열처리한 샘플액을 TGX ANY KD겔(Bio-Rad)에 첨가하여 200V로 30분간 영동하였다. 영동 종료 후 Trasblot turbo system(Bio-Rad)을 이용하여 PVDF막에 전사하였다. 전사한 PVDF막을 iBind Solution(Thermo)으로 5분간 블로킹하고, 계속해서 iBind system(Thermo)을 이용하여 희석액(TOYOBO)으로 희석한 항GAPDH 항체(1: 2000, Cell Signaling)와 HRP 표지된 항-토끼 IgG 항체(1: 5000, GE)로 블롯팅을 행하였다. 블롯팅 종료 후의 PVDF막을 증류수로 세정하고, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(GE)에 약 5분간 담그고 ChemiDoc(Bio-Rad)로 검출하였다.
- [0422] 디스트로핀 검출: 3 μ g/ μ L로 조정된 상청에 환원제(Thermo)를 함유한 Sample buffer(Thermo)를 첨가하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하였다. 30 μ g/10 μ L의 환원·열처리한 샘플액을 3-8% Tris-Acetate겔(Thermo)에 첨가하고, 150V로 약 90분간 전기 영동하였다. 영동 종료 후 Trasblot turbo system(Bio-Rad)을 이용하여 PVDF막에 전사하였다. 전사한 PVDF막을 iBind Solution(Thermo)으로 5분간 블로킹하고, 계속해서 iBind system(Thermo)을 이용하여 희석액(TOYOBO)으로 희석한 항디스트로핀 항체(1: 2000, abcam)와 HRP 표지된 항토끼 IgG 항체(1: 5000, GE)로 블롯팅을 행하였다. 블롯팅 종료 후의 PVDF막을 증류수로 세정하고, ECL Select Western Blotting Detection Reagent(GE)에 약 5분간 담가 Imager(Bio-Rad)로 검출하였다.
- [0423] ChemiDoc에서 검출된 Gapdh 및 디스트로핀을 Image Lab 소프트웨어(Bio-Rad)로 해석하고, 수복형 디스트로핀/Gapdh로서 상대적인 발현량을 산출하였다. 이상의 결과를 도 4에 나타낸다. PBS 투여군에 비해 LNP 투여군에서는 현저한 디스트로핀의 발현이 확인되었다.
- [0424] [실시예 3] 인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 HsDMDEX45 sgRNA를 이용한 DNA 변이 도입 효율 및 엑손 스킵핑 효율(1)
- [0425] [3-1] Cas9 mRNA-LNP의 조제
- [0426] 실시예 1의 [1-1]에 기재한 순서로 다시 Cas9 mRNA-LNP를 조제하고, 핵산 농도, 내봉률, 입자 직경 및 PDI를 측정하였다. 측정 결과를 표 4에 나타낸다.
- [0427] [3-2] HsDMDEX45#1 sgRNA-LNP의 조제
- [0428] 실시예 2의 [2-2]에서 제작한 HsDMDEX45#1 sgRNA-LNP를 다시 사용하였다. 실시예 2에서의 측정 결과를 표 4에 다시 게재한다.

표 4

	핵산 농도 (μ g/mL)	내봉률 (%)	입자 직경 (nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	967	93	78.6	0.082
HsDMDEX45#1 gRNA-LNP	1555	98	84.8	0.115

- [0429]
- [0430] [3-3] 인간 iPS 세포의 근육 분화와 LNP의 도입
- [0431] Doxycycline 유도형 MyoD 발현 카세트를 포함하는 디스트로핀 Ex 45 결손 DMD 환자 유래의 인간 iPS 세포를 10 μ M Y-27632를 포함하는 AK02N 배지(Ajinomoto)에 현탁하고, 매트릭셀이 코팅된 6 well plate에 3×10^5 cells/well의 밀도로 파종하였다. 다음날 배지를 Primate ES Cell Medium(Reprocell)로 교체하고, 다시 그 다

음날에 1 µg/mL doxycycline을 포함하는 Primate ES Cell 배지로 교환함으로써 MyoD 유전자 발현 유도를 개시하였다. doxycycline 첨가부터 24시간 후, 5% KSR과 1 µg/mL doxycycline을 포함하는 alpha Minimal Essential Medium(SIGMA) 배지로 교환하고 3 일간 배양하였다. 배지를 700 µL로 줄이고 Cas9 mRNA-LNP(mRNA로서 1, 3 또는 10 µg/well) 및 HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP(sgRNA로서 1, 3, 10 µg/well)의 혼합물을 첨가하였다. 첨가 6시간 후에, 1.3mL의 배지(alpha Minimal Essential Medium 5% KSR, 1 µg/mL doxycycline)를 첨가하였다.

- [0432] [3-4] 인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 DNA 변이 도입 효율 평가
- [0433] LNP의 첨가로부터 72시간 후, 세포를 회수하고 QIAamp DNA mini kit(Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출 정제하였다. PrimeSTAR GXL DNA polymerase(TAKARA)를 이용한 PCR(Forward primer: 상기 서열 번호 17, Reverse primer: 상기 서열 번호 18)에 의해 표적 서열을 포함하는 게놈 영역을 증폭하고, 얻어진 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)에 의해 정제하였다. 정제한 DNA 단편을 재어닐링한 후에 T7 Endonuclease I(NEB)로 처리하고, Agilent 4200 Tap eStation(Agilent)을 이용하여 전기 영동하고, 부착된 소프트웨어로 해석하였다. 변이 도입 효율의 계산식은 [2-4]와 같다(상기 번호 1 참조). 결과를 도 5에 나타낸다.
- [0434] [3-5] 인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 엑손 스킵핑 효율 평가
- [0435] 회수한 세포로부터 RNA easy mini kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출 정제하였다. Total RNA를 High Capacity RNA-to-cDNA kit(Thermo)를 이용하여 역전사하고, PrimeSTAR GXL DNA polymerase(TAKARA)를 사용하여 PCR(Forward primer: 서열 번호 21, Reverse primer: 서열 번호 22)을 행하였다. 얻어진 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)에 의해 정제하고, Agilent 4200 TapeStation을 이용하여 전기 영동하고, 부착된 소프트웨어로 해석하였다. 엑손 스킵핑 효율(exon skipping efficiency)의 계산식은 [2-5]와 같다(상기 수학적 2 참조). 결과를 도 6에 나타낸다.
- [0436] 서열 번호 21
- [0437] 5'- CTACAGGAAGCTCTCTCCCA -3'
- [0438] 서열 번호 22
- [0439] 5'- TGCTTCCTCCAACCATAAAACA -3'
- [0440] [실시예 4] 인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 HsDMDEx45 sgRNA를 이용한 게놈 편집 효과 및 엑손 스킵핑 효율 평가(2)
- [0441] [4-1] Cas9 mRNA-LNP의 조제
- [0442] 실시예 1의 [1-1]에 기재한 순서로 다시 Cas9 mRNA-LNP를 조제하고, 핵산 농도, 내봉률, 입자 직경 및 PDI를 측정하였다. 측정 결과를 표 5에 나타낸다.
- [0443] [4-2] HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP의 조제
- [0444] 실시예 2의 [2-2]에서 제작한 HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP를 다시 사용하였다. 실시예 2에서의 측정 결과를 표 5에 다시 게재한다.
- [0445] [4-3] HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP의 조제
- [0446] 실시예 2의 [2-2]에 기재한 순서에서 "HsDMDEx45#1 sgRNA"(실시예 4에서의 HsDMDEx45#1 sgRNA, 상기 표 1 참조) 대신 "HsDmdEx45#23 sgRNA"(상기 표 1의 "HsDMDEx45#23 sgRNA"참조)를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 하여 HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP를 조제하여 핵산 농도, 내봉률, 입자 직경 및 PDI를 측정하였다. 측정 결과를 표 5에 나타낸다.

표 5

	핵산 농도 (µg/mL)	내용률 (%)	입자 직경(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

[0447]

[0448]

[4-4] 인간 iPS 세포의 근육 분화와 LNP의 도입

[0449]

Doxycycline 유도형 MyoD 발현 카세트를 포함하는 디스트로핀 Ex 45 결손 DMD 환자 유래의 인간 iPS 세포와 정상인 유래 인간 iPS 세포를, 10 µM Y-27632을 포함하는 AK02N 배지(Ajinomoto)에 현탁하고 매트릭셀이 코팅된 6 well plate에 1×10⁵ cells/well의 밀도로 파종하였다. 다음날 배지를 Primate ES Cell Medium(Reprocell)로 교체하고, 다시 그 다음날에 1 µg/mL doxycycline을 포함하는 배지(Primate ES Cell Medium으로 교환함으로써 MyoD 유전자 발현 유도를 개시하였다. doxycycline 첨가로부터 24시간 후 5% KSR과 1 µg/mL doxycycline을 포함하는 alpha Minimal Essential Medium(SIGMA) 배지로 교환, 3일간 배양하였다. 환자 유래 인간 iPS 세포의 배지를 700 µL로 줄이고, LNP의 혼합물을 첨가하였다(아래 표 6 참조). 첨가 6시간 후에 1.3 mL의 배지(alpha Minimal Essential Medium 5% KSR, 1 µg/mL doxycycline)를 첨가하였다.

표 6

sample	Cas9 mRNA-LNP (µg/well, RNA 로서)	HsDMDEx45#1 sgRNA-LNP (µg/well, RNA 로서)	HsDMDEx45#23 sgRNA-LNP (µg/well, RNA 로서)
PBS	0	0	0
Ex45#1	1	1	0
Ex45#23	1	0	1
Ex45#1+Ex45#23	1	0.5	0.5

[0450]

[0451]

[4-5] 인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 엑손 스킵핑 효율 평가

[0452]

LNP 첨가로부터 72시간 후에, 냉각된 PBS로 각 well을 2회 세정 후 셀 스크레이퍼로 세포를 회수하고, 4°C 15,000rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 그 후, 상청을 제거하고 RIPA buffer로 세포를 용해하였다. 세포 용해액의 일부로부터 RNA easy mini kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출 정제하였다. Total RNA를 High Capacity RNA-to-cDNA kit(Thermo)를 이용하여 역전사하고, PrimeSTAR GXL DNA polymerase(TAKARA)를 사용하여 PCR(Forward primer: 상기 서열 번호 21, Reverse primer: 상기 서열 번호 22)을 행하였다. 얻어진 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)에 의해 정제하고, Agilent 4200 TapeStation을 이용하여 전기 영동하고, 부속된 소프트웨어로 해석하였다. 엑손 스킵핑 효율(exon skipping efficiency)의 계산식은 [2-5]과 같다(상기 수학식 2 참조). 결과를 도 7에 나타낸다.

[0453]

[4-6] 인간 iPS 세포 유래 근아세포에서의 디스트로핀 단백질의 회복 평가

[0454]

세포 용해액 일부의 총단백질량을 Protein assay kit(Thermo)로 측정하고, 0.083 µg/µL 및 0.58 µg/µL로 조정하였다.

[0455]

Gapdh 검출: 0.083 µg/µL로 조정된 세포 용해액에 환원제(Thermo)를 함유한 Sample buffer(Bio-Rad)를 첨가하

고 98℃에서 10분간 처리하였다. 1 μg/12 μL의 환원·열처리한 샘플액을 10% 미니프로틴인 TGX 프리캐스트 젤(Bio-Rad)에 첨가하고 150V로 40분간 전기 영동하였다. 영동 종료 후, Trasblot turbo system(Bio-Rad)를 이용하여 PVDF막에 전사하였다. 전사한 PVDF막을 iBind Solution(Thermo)으로 5분간 블로킹하고, 계속해서 iBind system(Thermo)을 이용하여 희석액(TOYOBO)으로 희석한 항GAPDH 항체(1: 1000, Cell Signaling)와 HRP 표지된 항-토끼 IgG 항체(1: 1000, GE)로 블롯팅을 행하였다. 블롯팅 종료 후의 PVDF막을 증류수로 세정하고, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(GE)에 약 5분간 담그고 ChemiDoc(Bio-Rad)로 검출하였다.

[0456] 디스트로핀 검출: 0.58 μg/μL로 조제한 상청에 환원제(Thermo)를 함유한 Sample buffer(Thermo)를 첨가하여 70℃에서 10분간 처리하였다. 7 μg/12 μL의 환원·열처리한 샘플액을 3-8% Tris-Acetate 젤(Thermo)에 첨가하고, 150V로 약 90분간 영동하였다. 영동 종료 후, Trasblot turbo system(Bio-Rad)를 이용하여 PVDF막에 전사하였다. 전사한 PVDF막을 iBind Solution(Thermo)으로 5분간 블로킹하고, 계속해서 iBind system(Thermo)을 이용하여 희석액(TOYOBO)으로 희석한 항디스트로핀 항체(1: 1000, abcam)와 HRP 표지된 항토끼 IgG 항체(1: 1000, GE)로 블롯팅을 행하였다. 블롯팅 종료 후의 PVDF막을 증류수로 세정하고, ECL Select Western Blotting Detection Reagent(GE)에 약 5분간 담그고 ChemiDoc(Bio-Rad)로 검출하였다.

[0457] ChemiDoc에서 검출된 GAPDH 및 디스트로핀을 Image Lab(Bio-Rad)으로 해석하여 수복형 디스트로핀의 발현량을 GAPDH로 보정하고, 정상인 유래 인간 iPS 세포에서의 디스트로핀 발현량을 100%로 하여 상대적 발현량을 산출하였다. 이상의 결과를 도 8에 나타낸다.

[0458] [실시에 5] LNP 정맥 내 투여 시의 각종 조직에서의 DNA 변이 도입 효율 평가

[0459] [5-1] Cas9 mRNA-LNP의 조제

[0460] 지질 혼합물(합성에 1에서 얻어진 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7, 몰비)을, 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 6.9mg/mL의 지질 용액을 얻었다. Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies)를 10mM 2-MES 용액 pH 5.5에 용해하여 0.15mg/mL의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 2.7 mL/min: 5.3 mL/min로 혼합하여 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)를 사용하여 물에 대하여 4℃에서 1시간, PBS에 대하여 4℃에서 18시간 투석을 행하였다. 또한 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심(3,000×g, 4℃, 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회)하여 한외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서, 0.2 μm의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4℃에 보존하였다. 이와 같이 하여 조제한 분산액을 "Cas9 mRNA-LNP"로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iT™ RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 결과를 표 7에 나타낸다.

[0461] [5-2] MmRosa26 sgRNA-LNP의 조제

[0462] 지질 혼합물(합성에 1에서 얻어진 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7, 몰비)을, 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 6.9mg/mL의 지질 용액을 얻었다. MmRosa26 sgRNA(GeneDesign, 상기 표 1 참조)를 10mM 2-MES 용액 pH 5.5에 용해하여 0.15mg/mL의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 2.7 mL/min: 5.3 mL/min로 혼합하고, 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)를 사용하여 물에 대하여 4℃에서 1시간, PBS에 대하여 4℃에서 18시간 투석을 행하였다. 또한 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심(3,000×g, 4℃, 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회)하고, 한외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서, 0.2 μm의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4℃에 보존하였다. 이와 같이 하여 조제한 분산액을 "MmRosa26 sgRNA-LNP"로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iT™ RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 결과를 표 7에 나타낸다.

표 7

	핵산 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	내봉률 (%)	입자 직경 (nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	1304	94	88.1	0.076
MmRosa sgRNA-LNP	1263	98	85.3	0.041

[0463]

[0464]

5 주령의 수컷 C57BL/6J 마우스의 꼬리 정맥에서 50 μg 의 mRosa26 sgRNA와 50 μg 의 SpCas9 mRNA를 내봉한 LNP를 투여하였다. 7일 후 3.5% 이소플루란 마취하에서 단두 방혈로 안락사시킨 후, 비복근, 전경골근, 대퇴사두근, 횡격막, 심장을 채취하여 액체 질소로 신속하게 동결시켰다. 동결 조직의 게놈 DNA를 QIAamp Fast DNA Tissue Kit(Qiagen)를 이용하여 추출 정제하고, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase(New England Biolabs Japan)와 이하에 나타내는 primer set(Forward primer: 상기 서열 번호 17, Reverse primer: 상기 서열 번호 18)을 이용하여 증폭하였다. PCR 산물을 QIAquick 96 PCR BioRobot kit(QIAGEN)로 정제하고 T7 Endonuclease I(NEB)로 처리 후 Agilent 4200 TapeStation(Agilent)을 이용하여 전기 영동하고, 부속된 소프트웨어로 해석하였다. 얻어진 수치를 이용하여 변이 도입 효율을 상기 계산식(수학식 1 참조)으로 구하였다.

[0465]

그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, PBS 투여에 대하여 LNP를 투여한 골격근에서는 특이적으로 표적 DNA로의 변이 도입이 검출되고, 변위 도입 효율은 비복근에서 2.50%, 전경골근에서 1.32%, 대퇴사두근 2.27%, 횡격막 1.54%, 심장 0.22%, 간에서 1.83이었다. 그 밖의 채취한 조직에서는 변이 도입은 보이지 않았다.

[0466]

[실시에 6] Dual sgRNAs을 이용한 골격근에서의 엑손 스킵핑 효율 평가

[0467]

[6-1] Cas9 mRNA-LNP의 조제

[0468]

지질 혼합물(합성예 1에서 얻어진 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7, 몰비)을, 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 6.9mg/mL의 지질 용액을 얻었다. Cas9 mRNA(TriLink BioTechnologies)를 10mM 2-MES 용액 pH 5.5에 용해하여 0.15mg/mL의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 2.7 mL/min: 5.3 mL/min으로 혼합하고, 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)를 사용하여 물에 대하여 4°C에서 1시간, PBS에 대하여 4°C에서 18시간 투석을 행하였다. 또한 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심(3,000 \times g, 4°C, 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회)하고, 한외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서, 0.2 μm 의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4°C에 보존하였다. 이와 같이 하여 조제한 분산액을 "Cas9 mRNA-LNP"로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iTTM RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 결과를 표 8에 나타낸다.

[0469]

[6-2] HsDMDEX45#1+#23 sgRNA-LNP의 조제

[0470]

지질 혼합물(합성예 1에서 제조한 양이온성 지질: DPPC: 콜레스테롤: GM-020 = 60: 10.6: 28.7: 0.7, 몰비)를, 90% EtOH, 10% RNase 프리 워터에 용해하여 6.9mg/mL의 지질 용액을 얻었다. HsDMDEX45#1 sgRNA 및 HsDMDEX45#23 sgRNA를 10mM 2-모르폴리노에탄술폰산(MES) 용액 pH 5.5에 동량씩 용해하여 0.15mg/mL의 핵산 용액을 얻었다. 얻어진 지질 용액 및 핵산 용액을 실온에서 NanoAssemblr(Precision NanoSystems)에 의해 유속비 2.7 mL/min: 5.3 mL/min로 혼합하고 핵산을 내봉하는 지질 입자를 포함하는 분산액을 얻었다. 얻어진 분산액은 Slyde-A-Lyzer(20k의 분획 분자량, Thermo scientific)를 사용하여 물에 대하여 4°C에서 1시간, PBS에 대하여 4°C에서 18시간 투석을 행하였다. 또한 Amicon(30k의 분획 분자량)을 이용하여 원심(3,000 \times g, 4°C, 일정 체적으로 떨어질 때까지 20분을 수회)하고, 한외 여과에 의한 농축을 행하였다. 이어서, 0.2 μm 의 syringe filter(Iwaki)를 사용하여 필터 여과를 행하고, 4°C에 보존하였다. 이와 같이 하여 조제한 분산액을 "HsDMDEX45#1+#23 sgRNA-LNP"로 하여 후술하는 시험에서 사용하였다. 지질 입자의 입자 직경 및 다분산 지수(PDI)는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에 의해 측정하였다. 또한 지질 입자에서의 핵산의 농도 및 내봉률은 Quant-iTTM RiboGreen(등록 상표)(Thermo scientific)을 이용하여 측정하였다. 결과를 표 8에 나타낸다.

다.

표 8

	핵산 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	내봉률 (%)	입자 직경 (nm)	PDI
Cas9 mRNA-LNP	1196	95	85.3	0.074
HsDmdEx45 (#1+23) sgRNA-LNP	785	94	85.9	0.091

[0471]

[0472]

6주령의 수컷 인간 DMD exon 45 녹인-마우스 Dmd exon 44 녹아웃 마우스의 우측 하지 비복근에 3 μg 의 HsDMDEx45#1+#23 및 3 μg 의 Cas9 mRNA를 내봉한 LNP를 1일 간격으로 4 회 투여하였다. 초기 투여 14 일 후에 3.5% 이소플루란 마취 하에 단두 방혈로 안락사시킨 후, 골격근을 적출하여 액체 질소로 신속하게 동결시켰다. 동결시킨 골격근에 Qiazol(QIAGEN)을 첨가하여 호모지네이트하였다. 클로로포름(WAKO)을 첨가하여 혼합·원심 후에 RNA를 포함하는 수조를 분리 회수하고 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)을 이용하여 total RNA를 추출 정제하였다. Total RNA를 High Capacity RNA-to-cDNA kit(Thermo)를 이용하여 역전사하고, 이어서, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase(New England Biolabs Japan)와 이하에 나타내는 primer set(Forward primer: 상기 서열 번호 19, Reverse primer: 상기 서열 번호 20)를 사용하여 증폭시켰다. RT-PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)로 정제 후 Agilent 4200 TapeStation(Agilent)를 이용하여 전기 영동하고, 부착된 소프트웨어로 해석하였다. 얻어진 수치를 이용하여 exon skipping efficiency를 상기 계산식(수학식 2 참조)으로 구하였다.

[0473]

그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, PBS 투여에 대하여 LNP를 투여한 골격근에서는 human Exon 45가 skip된 짧은 디스트로핀 유전자의 전사 산물이 RT-PCR에 의해 검출되고, 그 엑손 스킵핑 효율은 $47.91 \pm 9.32\%$ (Mean \pm SD)였다(PBS 대상: $2.63 \pm 0.62\%$).

산업상 이용가능성

[0474]

본 발명의 화합물, 지질 입자 및 조성물은 각종 세포, 조직 및 장기에 대하여 효율적으로, CRISPR 시스템에 사용되는 gRNA 등 및 RNA 유도형 뉴클레아제 등을 도입하는 것을 가능하게 한다. 따라서, 본 발명의 화합물, 지질 입자 및 조성물은 CRISPR 시스템에서의 DDS 기술로서 이용 가능하다. 또한, 본 발명의 화합물, 지질 입자 및 조성물은 다양한 질환, 예를 들어 근디스트로피의 예방·치료제로서, 또한 연구용 시약으로서 이용 가능하다.

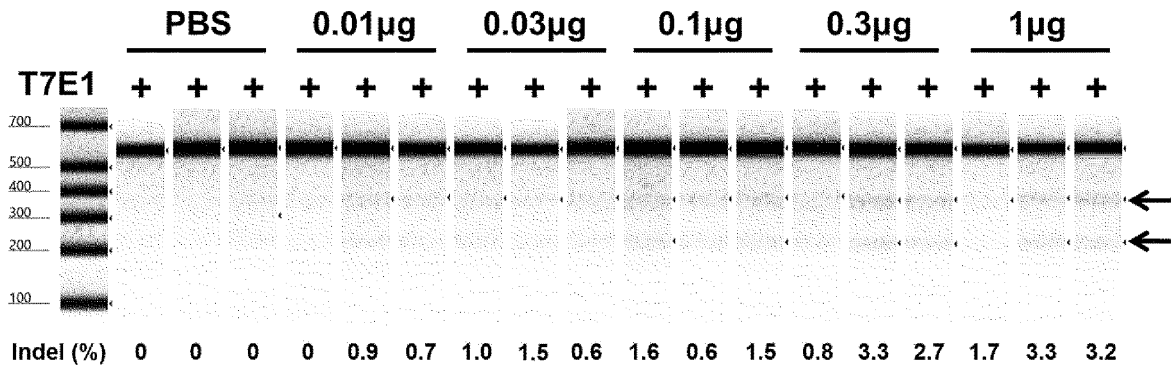
도면

도면1

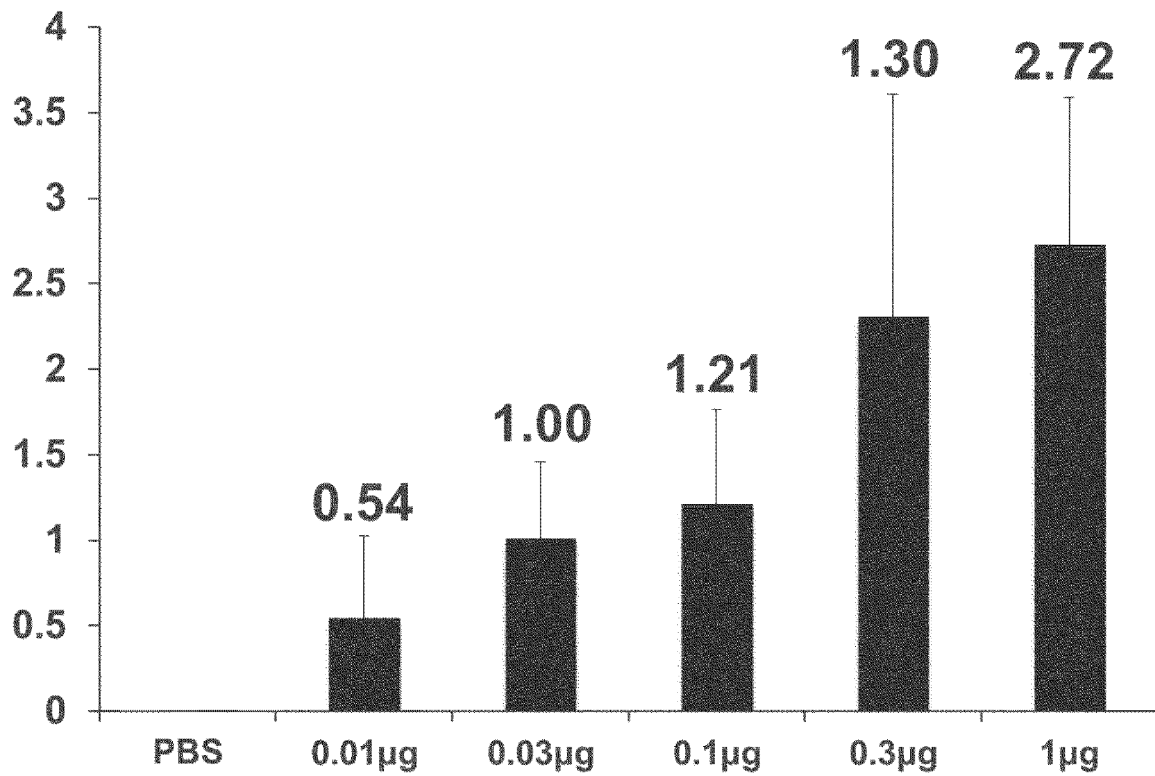
[A]

MmRosa26 sgRNA + Cas9 mRNA

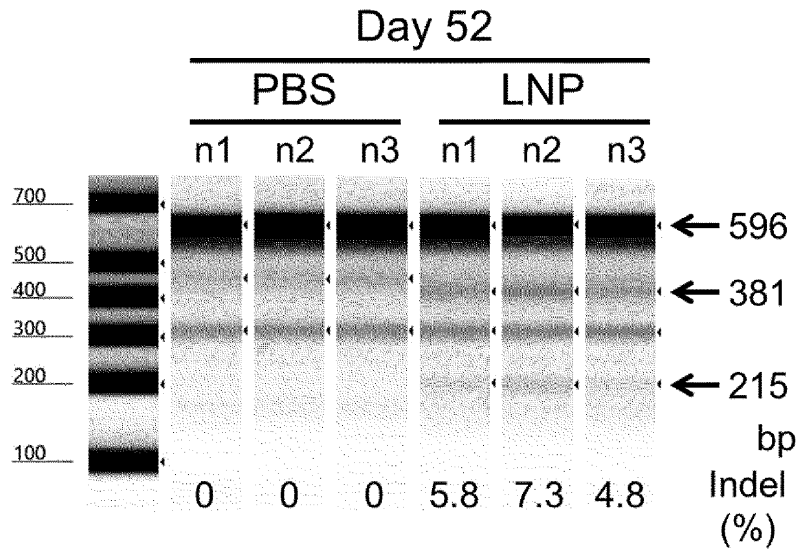
50 μ l injection



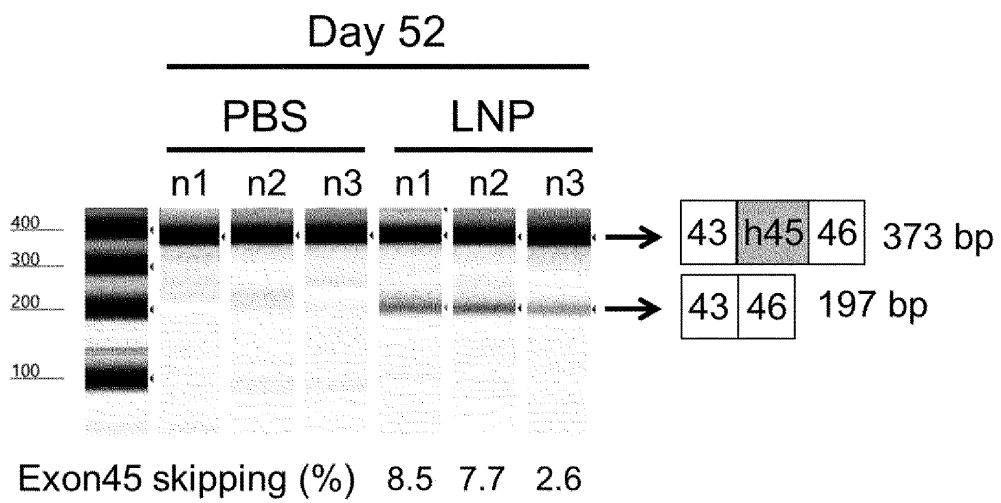
[B]



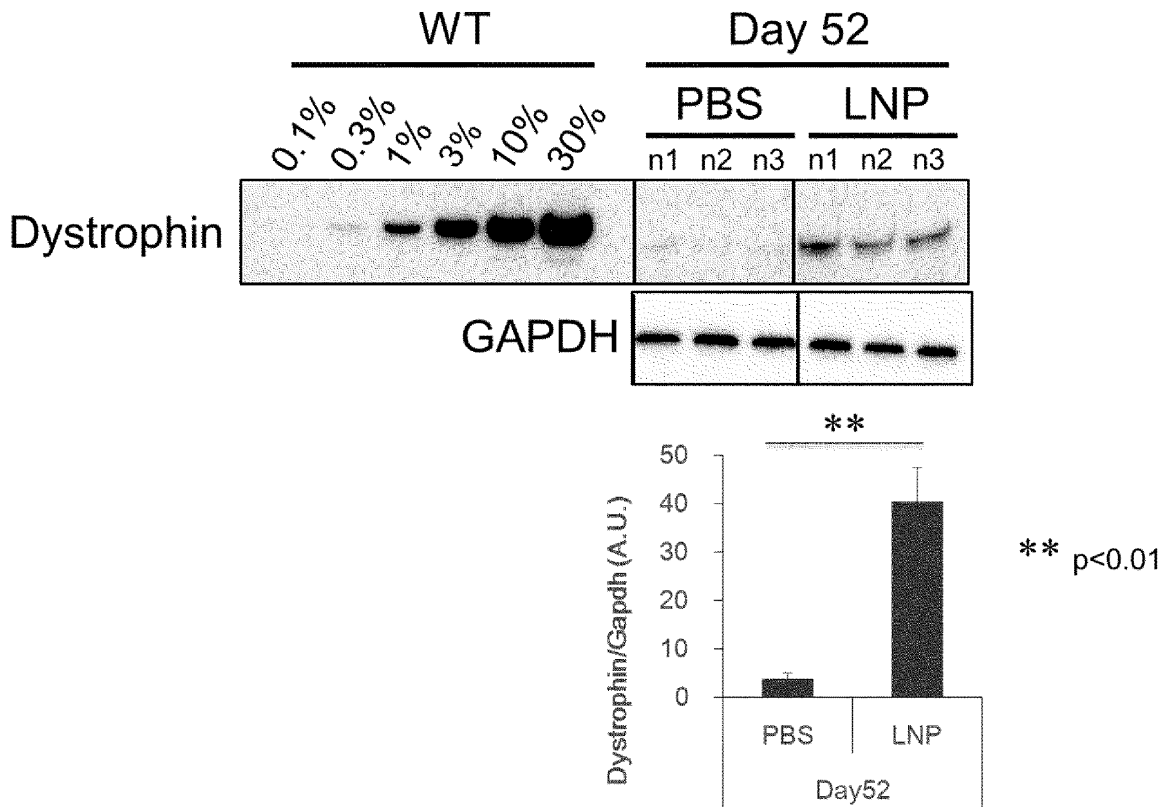
도면2



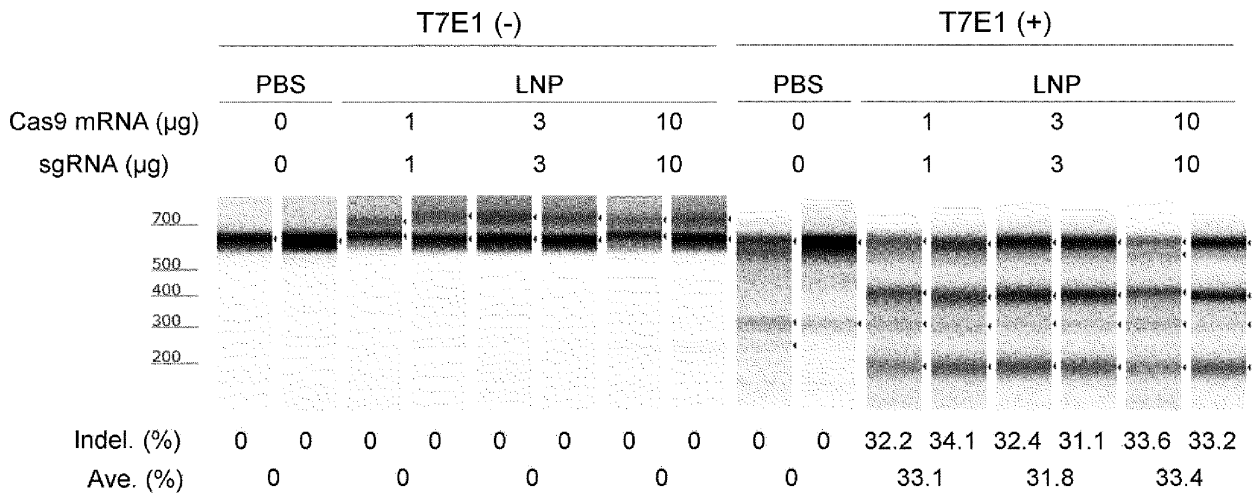
도면3



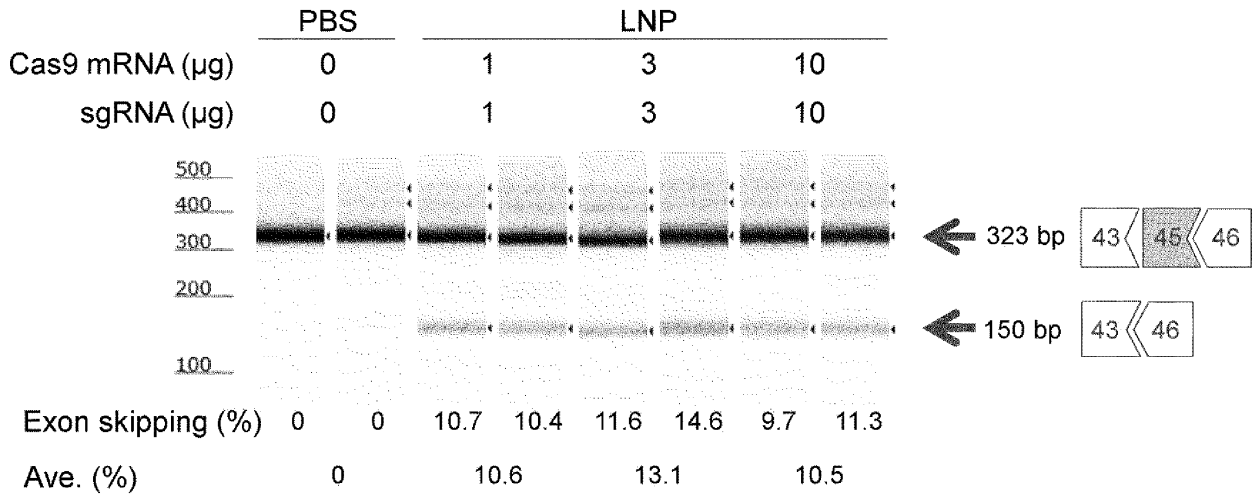
도면4



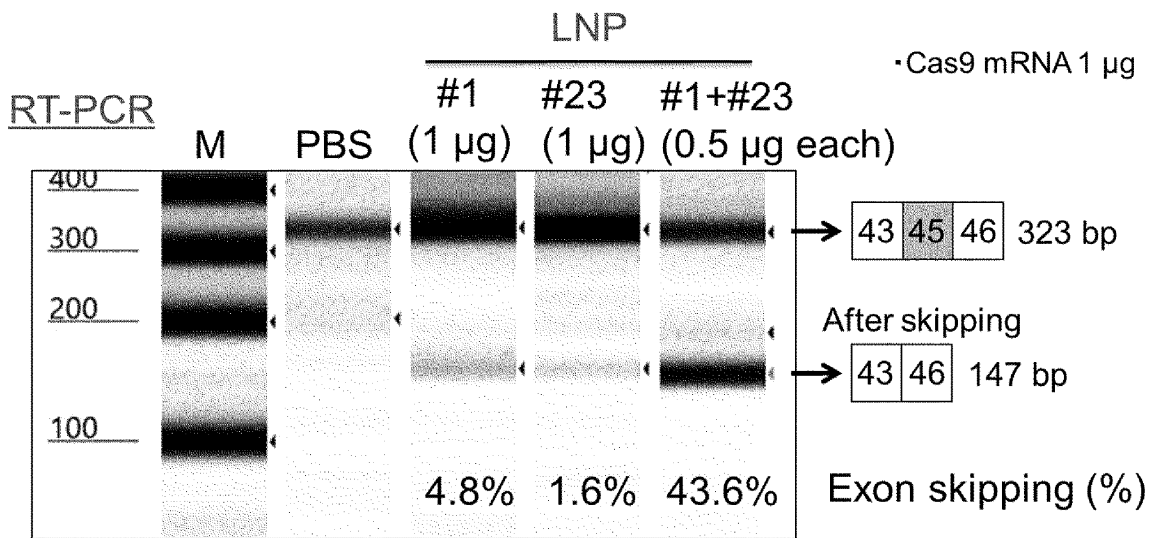
도면5



도면6

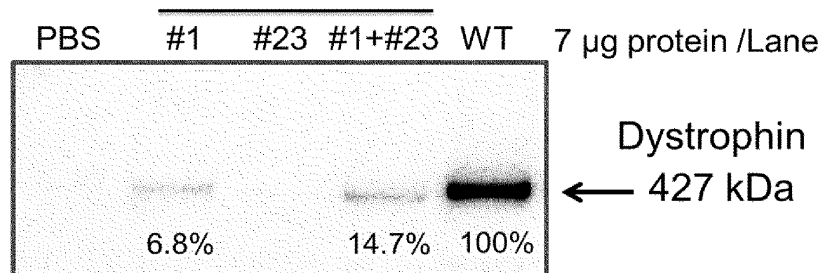


도면7

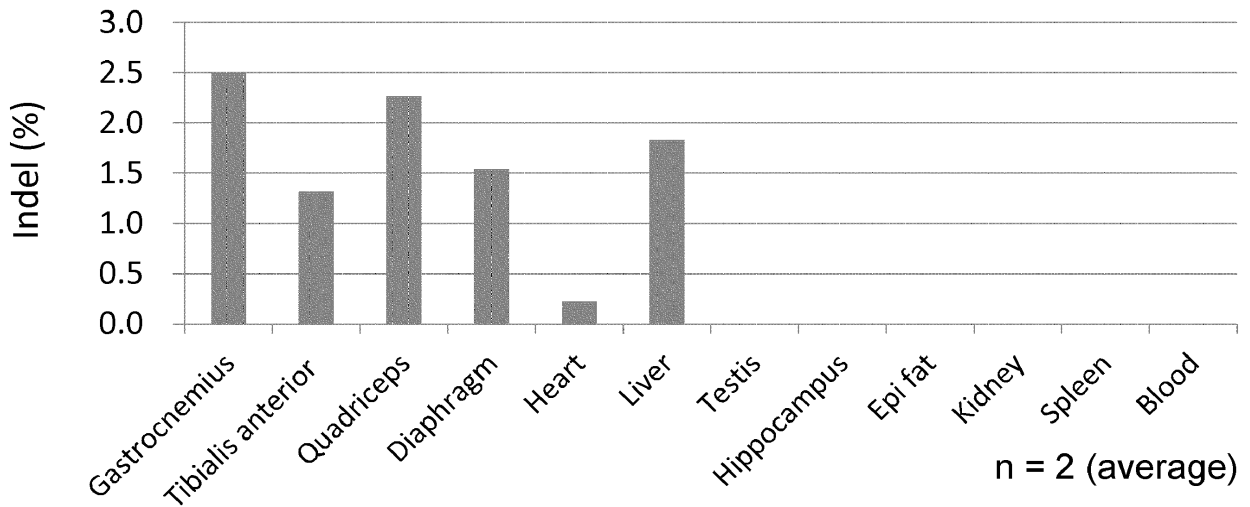


도면8

Western blot

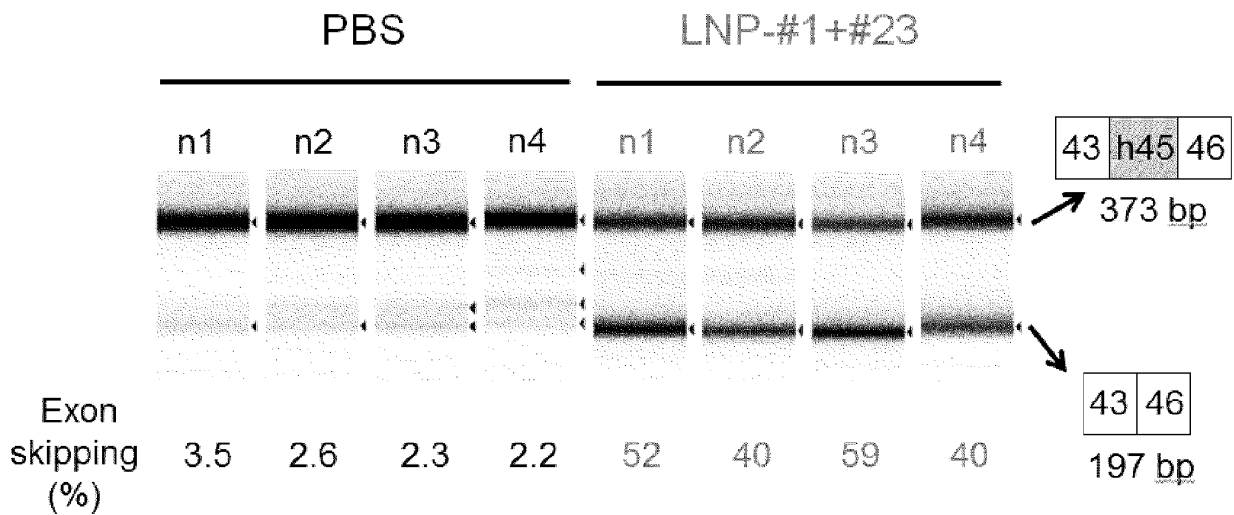


도면9



도면10

RT-PCR



서열목록

<110> KYOTO UNIVERSITY

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

<120> Composition for Altering Target Gene

<130> PT38-9026WO

<150> JP 2017-254798

<151> 2017-12-28

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HsDMDEx45#1 sgRNA

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<220><221> modified_base

<222> (93)..(93)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<220><221> misc_feature

<222> (93)..(95)

<223> n is a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (94)..(94)

<223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)

<220><221> modified_base

<222> (95)..(95)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<400> 1

nnnuaucuua caggaacucc guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cgnnnc 96

<210> 2

<211> 96
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HsDmdEx45#23 sgRNA
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> n stands for adenine (a) which may be 2'-O-methyladenosine
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(3)
 <223> n is a, c, g, or u
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> n stands for cytosine (c) which may be 2'-O-methylcytidine (cm)
 <220><221> modified_base
 <222> (93)..(93)
 <223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
 <220><221> misc_feature
 <222> (93)..(95)
 <223> n is a, c, g, or u
 <220><221> modified_base
 <222>
 (94)..(94)
 <223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)
 <220><221> modified_base
 <222> (95)..(95)
 <223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
 <400> 2
 nnnugucaga cagaaaaaag guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgnnnc 96
 <210> 3
 <211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target-recognizing sequence of HsDmdEX#1 sgRNA

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<400> 3

nnnuaucuua caggaacucc

<210> 4

<211> 20

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target-recognizing sequence of HsDmdEX#23 sgRNA

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> n stands for adenine (a) which may be 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

20

<223> n stands for cytosine (c) which may be 2'-O-methylcytidine (cm)

<400> 4

nnnugucaga cagaaaaaag

20

<210> 5

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA sequence of HsDmdEX#1 sgRNA

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<220

><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)

<400> 5

nnnuaucuua caggaacucc guuuuagagc ua

32

<210> 6

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA sequence of HsDmdEX#23 sgRNA

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> n stands for adenine (a) which may be 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or u

<220><221
> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
<220><221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> n stands for cytosine (c) which may be 2'-O-methylcytidine (cm)
<400> 6
nnnugucaga cagaaaaaag guuuuagagc ua 32
<210> 7
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> tracrRNA sequence of HsDmdEX#1 sgRNA
<220><221> modified_base
<222> (57)..(57)
<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
<220><221> misc_feature
<222> (57)..(59)
<223> n is a, c, g, or u
<220><221> modified_base
<222> (58)..(58)
<223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)
<220><221> modified_base
<222> (59)..(59)
<223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
<400> 7
uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau caacuugaaa aaguggcacc gagucgnnc 60
<210> 8
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> tracrRNA sequence of HsDmdEX#23 sgRNA

<220><221> modified_base
 <222> (57)..(57)
 <223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
 <220><221> misc_feature
 <222> (57)..(59)
 <223> n is a, c, g, or u
 <220><221> modified_base
 <222> (58)..(58)
 <223> n stands for uracil (u) which may be 2'-O-methyluridine (um)
 <220><221> modified_base
 <222> (59)..(59)
 <223> n stands for guanine (g) which may be 2'-O-methylguanosine (gm)
 <400> 8

uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau caacuugaaa aaguggcacc gagucgnnc 60

<210> 9
 <211> 98
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MmRosa26 sgRNA
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> gm
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> n is a, c, g, or u
 <220><221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (95)..(95)
 <223> um
 <220><221> misc_feature
 <222> (95)..(97)
 <223> n is a, c, g, or u

<220><221> modified_base
 <222> (96)..(96)
 <223> um
 <220><221> modified_base
 <222> (97)..(97)

 <223> um
 <400> 9
 nnnnggcggg agucuucugu uuuagagcua gaaauagcaa guaaaaauaa ggcuaaguccg 60
 uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg gugcnnu 98
 <210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer used in Example 1[1-3]
 <400> 10
 ctccgaggcg gatcacaagc aataataacc tntag 35
 <210> 11
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer used in Example 1[1-3]
 <400> 11

 tgcaagcacg tttccgactt gagttgcctc aagag 35
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 12
 atgaatgtgc ctacatatgg 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13	
catagcatgc atttgcttc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 14	
gaatgaggta gtgtttagg	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 15	
gcaggaatc atcttatagc	20
<210> 16	
<211> 120	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ssODN used in Example 2[2-3]	
<400> 16	
gagcaagctg ggttagaaca aaggtctgtc agagtcagca tgggaatgag gtagtgtgt	60
agcaggaaat agtgtggttt aggtctctcc cggccctctg tgtatgtgtg tgtgtgtgtt	120
<210> 17	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer used in Example 2[2-4] and [2-5], and Example 5	
<400> 17	
caagtttaaa atagcagaaa accactaact agcca	35
<210> 18	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Reverse primer used in Example 2[2-4] and [2-5], and Example 5
 <400> 18
 ctgacacata aaaggtgtct ttctgtcttg tatcc 35
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer used in Example 2[2-5] and Example 6
 <400> 19
 ggtgaaagta caggaagccg t 21

 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer used in Example 2[2-5] and Example 6
 <400> 20
 ttagctgctg ctcactcca a 21
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer used in Example 3[3-5] and Example 4[4-5]
 <400> 21
 ctacaggaag ctctctcca 20
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Reverse primer used in Example 3[3-5] and Example 4[4-5]
 <400> 22
 tgcttctcc aaccataaaa ca 22