(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0033452
(43) 공개일자 2025년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2024.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0114102
(22) 출원일자 2023년08월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
장구
서울특별시 관악구 관악로 1, 85-1동 (서울대학교)
전범진
서울특별시 관악구 관악로 1, 85-1동 (서울대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아이플레이

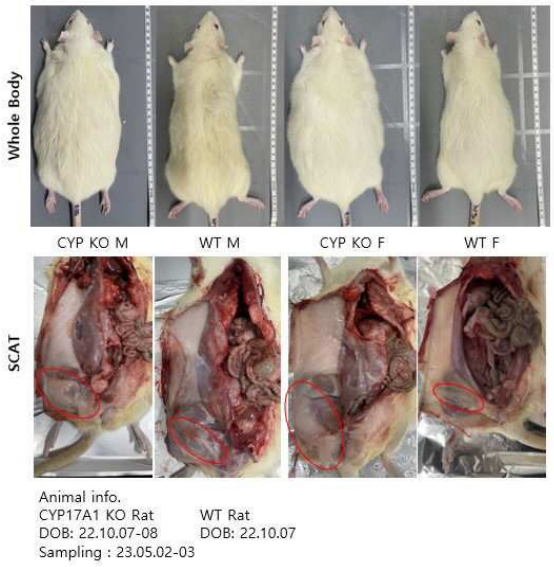
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **CYP17A1 형질전환 비만 및 불임치료제 개발 모델 제조방법 및 용도**

(57) 요 약

본 발명은 형질전환 동물에 관한 것이다. 상기 형질전환 동물은 비만 모델 또는 불임 모델로 사용되기에 적합하다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
A01K 2217/077 (2013.01)
A01K 2217/206 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0362 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자
권동혁
서울특별시 관악구 관악로 1, 85-1동 (서울대학교)
김희경
서울특별시 관악구 관악로 1, 85-1동 (서울대학교)
강세찬
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 생명과학대학 414호
이종권
충북 청주시 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원
강명희
충북 청주시 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원
박지수
충북 청주시 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475013432
과제번호	DY0002259587-20182실험동501-3
부처명	식품의약안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	6) 실험동물자원 활용기술 및 관리 선진화 연구
연구과제명	동맥경화 치료제 평가를 위한 비임상 평가기반 마련 연구(3)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2022.07.15 ~ 2023.07.14

명 세 서

청구범위

청구항 1

비만 모델인 형질전환 설치 동물 (rodent)로,

상기 형질전환 설치 동물은 게놈 내에 야생형 CYP17A1 (Cytochrome P450 17A1)유전자를 포함하지 않고,

상기 형질전환 설치 동물은 게놈 내에 야생형 CYP17A1유전자에서 인델 돌연변이를 포함하는 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자를 포함하며,

이때, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열과 다르며,

상기 형질전환 설치 동물은 야생형과 비교하여 체내 CYP17A1 단백질 및 CYP17A1 mRNA 발현양이 적으며,

상기 형질전환 설치 동물에서의 몸무게에 대한 피하지방의 무게의 비율이 야생형 설치 동물에 비하여 높으며,

상기 형질전환 설치 동물에서의 내장지방의 무게에 대한 피하지방의 무게의 비율이 야생형 설치 동물에 비하여 높은 것을 특징으로 함.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 설치 동물은 마우스 (mouse), 래트 (rat), 다람쥐, 기니피그, 및 햄스터 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 설치 동물는 마우스 (mouse) 또는 래트 (rat)인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 인델 돌연변이는 야생형 CYP17A1유전자의 엑손 2(exon 2)에 위치한 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 인델 돌연변이의 크기가 1 내지 300bps인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 서열번호 3의 핵산서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 서열번호 1의 핵산서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 형질전환 설치 동물의 전체 몸무게에서 피하지방의 무게가 차지하는 비율 ((피하지방의 무게/전체 몸무게) × 100%)은 3.5% 이상인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 형질전환 설치류의 전체 몸무게에서 피하지방의 무게가 차지하는 비율((피하지방의 무게/전체 몸무게) × 100%)이 야생형 설치류에 비하여 2배 이상인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치류.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 형질전환 설치 동물의 내장지방의 무게 대한 피하지방의 무게의 비율 ((피하지방의 무게/내장지방 무게) × 100%)은 50% 이상인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 형질전환 설치 동물의 내장지방의 무게 대한 피하지방의 무게의 비율 ((피하지방의 무게/내장지방 무게) × 100%)이 야생형 설치류에 비하여 2배 이상인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 형질전환 설치 동물은 불임인 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 형질전환 설치 동물이 수컷이며,

이때, 상기 수컷의 정소에 2차 정자세포 (secondary spermatocyte)가 없는 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 형질전환 설치 동물이 암컷이며,

이때, 상기 암컷은 난포를 배란할 수 없는 것을 특징으로 하는, 형질전환 설치 동물.

청구항 15

다음을 포함하는 CYP17A1 (Cytochrome P450 17A1) 유전자 조작용 조성물:

스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질(SpCas9 단백질) 또는 이를 암호화하는 핵산; 및

가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 가이드 RNA,

이 때, 상기 가이드 RNA는 CYP17A1 유전자를 표적으로 하는 가이드 도메인을 포함하며,

상기 가이드 도메인이 표적으로 하는 서열은 설치 동물의 CYP17A1 유전자의 엑손 1 영역에 위치한 것을 특징으로 하는, CYP17A1 유전자 조작용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 질환 모델용, 구체적으로 비만질환 또는 불임질환 모델용 형질전환 동물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 실험에 사용되는 동물의 종류로는 면역결핍 동물, 누드 동물, 이종이식 모델 동물 등으로 다양하다. 비만인 동물 또는 불임인 동물 또한 실험의 설계 및 목적 등에 따라 필요한 동물이다. 이러한 동물 모델을 제작하기 위해서는 자연 돌연변이 동물을 교배하여 제작하거나, CRISPR/Cas 시스템을 유전자 편집 도구로 사용하여 원하는 유전자를 조작한 동물 모델을 제작할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2022-0060403호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개 제10-2016-0013219호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 목적은 질환 모델용 형질전환 동물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 동물의 용도를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 CYP17A1 유전자 조작용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 동물의 제작방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 게놈 내에 인위적으로 조작된 CYP17A1 (Cytochrome P450 17A1) 유전자를 포함하는 형질 전환 동물을 제공한다.

[0009] 상기 형질 전환 동물은 게놈 내에 야생형 CYP17A1 유전자를 포함하지 않는다.

[0010] 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1 유전자는 야생형 CYP17A1 유전자에서 인델 돌연변이를 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1 유전자의 서열은 야생형 CYP17A1 유전자의 서열과 다르다.

[0012] 상기 인델 돌연변이의 크기는 1bp, 2bp, 3bp, 4nt, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 110bp, 120bp, 130bp, 140bp, 150bp, 160bp, 170bp, 180bp, 190bp, 200bp, 또는 210bp 크기일 수 있다.

[0013] 상기 인델 돌연변이는 CYP17A1 유전자의 엑손(exon)1, 엑손2, 엑손3, 엑손4, 엑손5, 엑손6, 엑손7, 엑손8, 인트론(intron)1, 인트론2, 인트론3, 인트론4, 인트론5, 인트론6, 및 인트론7 중 어느 하나 이상에 위치할 수 있다.

[0014] 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1 유전자는 서열번호 1의 핵산서열을 포함할 수 있다.

[0015] 상기 형질전환 동물은 내장지방에 대한 피하지방의 비율((피하지방의 무게/내장지방의 무게) × 100%)이 야생형 동물에 비하여 높을 수 있다.

[0016] 상기 형질전환 동물은 전체 몸무게에서 피하지방이 차지하는 비율((피하지방의 무게/전체 몸무게) × 100%)이

야생형 동물에 비하여 높을 수 있다.

[0017] 상기 형질전환 동물은 전체 몸무게에서 내장지방이 차지하는 비율((내장지방의 무게/전체 몸무게) × 100%)이 야생형 동물에 비하여 높을 수 있다.

[0018] 상기 형질전환 동물은 불임일 수 있다.

[0019] 상기 동물은 인간 또는 비-인간 동물일 수 있다.

[0020] 상기 동물은 포유류 (또는 포유 동물)일 수 있다.

[0021] 상기 동물은 설치류 (또는 설치 동물, rodent), 토끼류, 영장류, 우제류 및 기제류 중 어느 하나일 수 있다.

[0022] 상기 동물은 마우스 (mouse), 래트 (rat), 다람쥐, 기니피그, 및 햄스터 중 어느 하나일 수 있다.

[0023] 본 출원의 상기 형질전환 동물은 비만질환 또는 불임질환 동물 모델로서 제공될 수 있다.

[0024] 본 발명은 CYP17A1 (Cytochrome P450 17A1) 유전자 조작용 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 조성물은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질(SpCas9 단백질) 또는 이를 암호화하는 핵산; 및 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 가이드 RNA를 포함할 수 있다.

[0026] 이 때, 상기 가이드 RNA는 CYP17A1 유전자를 표적으로 하는 가이드 도메인을 포함할 수 있다.

[0027] 이 때, 상기 가이드 도메인이 표적으로 하는 서열은 설치 동물의 CYP17A1 유전자의 엑손 1 영역에 위치할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 형질전환 동물 및 이의 제작방법에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 기술을 통해, 비만 모델인 형질전환 동물을 제공할 수 있다. 또한 불임 모델인 형질전환 동물을 제공할 수 있다. 또한 CYP17A1 유전자 조작용 조성물 및 이를 이용한 형질전환 동물 제작방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 래트의 CYP17A1 유전자의 모식도이다.

도 2는 배아에 전기천공을 수행하는 과정을 보여준다.

도 3은 CYP17A1 유전자가 낙아웃 (knock-out)된 래트 및 야생형 래트의 외형 및 피하지방의 크기를 비교한 모습을 보여준다.

도 4는 CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 및 야생형 래트에서 측정된 몸무게, 내장지방 무게, 피하지방 무게 및 이들의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 5는 CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 및 야생형 래트에서의 지방 관련 인자의 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 및 야생형 래트의 외부 생식기의 외형을 비교한 것이다.

도 7은 CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 및 야생형 래트의 생식기관의 형태를 비교한 것이다.

도 8은 CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 수컷 및 야생형 래트 수컷의 정소 조직을 H&E 염색하여 관찰한 것이다.

도 9는 CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 암컷 및 야생형 래트 암컷의 난소 조직을 H&E 염색하여 관찰한 것이다.

도 10은 CYP17A1 유전자가 낙아웃된 래트 암컷 및 야생형 래트 암컷의 자궁 조직을 H&E 염색하여 관찰한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하여, 발명의 내용을 특정한 구현예와 예시들을 통해 더욱 상세하게 설명한다. 상기 첨부된 도면은 발명의 일부 구현예를 포함하지만, 모든 구현예를 포함하고 있지는 않다는 점에 유의해야 한다. 본 명세서에 의해 개시되는 발명의 내용은 다양하게 구현될 수 있으며, 여기에 설명되는 특정 구현예로 제한되지 않는다. 이러한 구현예들은 본 명세서에 적용되는 법적 요건을 만족시키기 위해 제공되는 것으로 보아야 한

다. 본 명세서에 개시된 발명이 속한 기술분야에 있어 통상의 기술자라면, 본 명세서에 개시된 발명의 내용에 대한 많은 변형 및 다른 구현예들을 떠올릴 수 있을 것이다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 발명의 내용은 여기에 기재된 특정 구현예로 제한되지 않으며, 이에 대한 변형 및 다른 구현예들도 청구범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0031] **용어의 정의**

[0032] 본 명세서에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0033] 약

[0034] 본 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0035] 조작된

[0036] 본 명세서에서 사용되는 "조작된" 이란 용어는 자연계에서 이미 존재하는 구성을 가진 물질, 분자 등과 구분하기 위해 사용하는 용어로, 상기 물질, 분자 등에 인위적인 변형이 가해진 것을 의미한다. 예를 들어, "조작된 유전자"의 경우, 자연계에 존재하는 유전자의 구성에 인위적인 변경이 가해진 유전자를 의미한다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0037] 야생형

[0038] 본 명세서에서 사용되는 "야생형"이란 용어는 자연적으로 발생하는 염기서열을 포함하는 유전자 및 그 유전자로부터 발현되는 단백질이 정상적인 기능적 특성을 지니는 것을 의미한다. 야생형 유전자는 집단에서 가장 빈번하게 관찰된다. 본 명세서에서 "야생형"이라는 용어가 조작된(또는 인위적으로 조작된) 유전자, 및/또는 세포와 대비해 사용된다면, 이는 인위적으로 조작된 유전자, 및/또는 세포와 상응하는 동종의 "인위적으로 조작되지 않은" 자연적으로 발생하는 염기서열을 포함하는 유전자 및 이를 가지는 세포를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0039] 핵산 서열 표기

[0040] 본 명세서에서 사용되는 A, T, C, G 및 U 기호는 당업계 통상의 기술자가 이해하는 의미로 해석된다. 문맥 및 기술에 따라 DNA 또는 RNA 상에서 염기, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로 적절히 해석될 수 있다. 예를 들어, 염기를 의미하는 경우는 각각 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C), 구아닌(G) 또는 우라실(U) 자체로 해석될 수 있고, 뉴클레오사이드를 의미하는 경우는 각각 아데노신(A), 티미딘(T), 시티딘(C), 구아노신(G) 또는 유리딘(U)으로 해석될 수 있으며, 서열에서 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 상기 각각의 뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0041] 본 명세서에서 N 기호는 문맥 및 기술에 따라 DNA 또는 RNA 상에서 염기, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로 적절히 해석될 수 있다. 예를 들어, 염기를 의미하는 경우는 각각 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C), 구아닌(G), 및 우라실(U) 중 어느 하나로 해석될 수 있고, 뉴클레오사이드를 의미하는 경우는 각각 아데노신(A), 티미딘(T), 시티딘(C), 구아노신(G), 및 유리딘(U) 중 어느 하나로 해석될 수 있으며, 서열에서 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 상기 각각의 뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0042] 표적 유전자 또는 표적 핵산

[0043] 본 명세서에서 사용되는 "표적 유전자" 또는 "표적 핵산"은 기본적으로, 유전자 편집의 대상이 되는 세포 내 유전자, 또는 핵산을 의미한다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 혼용될 수 있으며, 서로 동일한 대상을 지칭할 수 있다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 달리 기재되지 않은 한, 대상 세포가 가진 고유한 유전자 또는 핵산, 혹은 외부 유래의 유전자 또는 핵산 모두를 의미할 수 있으며, 유전자 편집의 대상이 될 수 있다면 특별히 제한되지 않는다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 단일가닥 DNA, 이중가닥 DNA, 및/또는 RNA일 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0044] 표적 가닥(target strand), 비표적 가닥(non-target strand)

[0045] 본 명세서에서 “표적 가닥”, 및 “비-표적 가닥”이라는 용어는, CRISPR/Cas9 복합체가 이중가닥 핵산을 표적 핵산으로 하여 작용하는 것을 서술할 때 각 가닥을 특정하기 위한 의미로 사용된다. 기본적으로, 표적 가닥과 비표적 가닥은 이중가닥 핵산의 각 가닥을 의미하며, 서로 상보적인 서열을 가진다. 여기서, 상기 비-표적 가닥은 Cas9 단백질이 인식하는 PAM(Protospacer Adjacent Motif)이 위치하는 가닥을 의미하고, 표적 가닥은 가이드 RNA 가 상보적으로 결합하게 되는 가닥을 의미한다. 달리 서술하면, CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단할 때, 1) Cas9 단백질이 비-표적 가닥에 존재하는 PAM 서열을 인식하고, 2) 가이드 RNA 중 표적 서열을 표적화 하도록 설계된 부분(이른바, 가이드 도메인)이 표적 가닥과 상보적으로 결합하여 복합체(duplex)를 형성하여 CRISPR/Cas9 복합체의 핵산 절단 기능이 활성화되게 된다.

[0046] 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0047] 표적 서열(target sequence), 비표적 서열(non-target sequence)

[0048] 본 명세서에서 사용되는 "표적 서열"은 CRISPR/Cas 복합체가 표적 유전자 또는 표적 핵산을 절단하기 위해 인식하는 특정 서열을 의미한다. 상기 표적 서열은 그 목적에 따라 적절히 선택될 수 있다. 구체적으로, "표적 서열"은 표적 유전자 또는 표적 핵산 서열 내에 포함된 서열이며, 본 명세서에서 제공하는 가이드 RNA, 또는 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 가이드 도메인 서열과 상보성을 가지는 서열을 의미한다. 일반적으로, 상기 가이드 도메인 서열은 표적 유전자 또는 표적 핵산의 서열 및 CRISPR/Cas 시스템의 이펙터 단백질이 인식하는 PAM 서열을 고려하여 결정된다. 상기 표적 서열은 CRISPR/Cas 복합체의 가이드 RNA와 상보적으로 결합하는 표적 가닥에 포한 된 서열을 의미한다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 "비표적 서열"은 상기 표적 서열과 상보성을 가지는 서열을 의미한다. 상기 비표적 서열은 비표적 가닥에 포함되는 서열로, 이중가닥으로 존재하는 경우, 표적 서열과 결합된 상태에 있는 것이 일반적이다. 또한, 상기 비표적 서열은 PAM 서열의 근처(adjacent)에 있다.

[0050] 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0051] 벡터

[0052] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 달리 특정되지 않는 한, 유전 물질을 세포 내로 운반할 수 있는 모든 물질을 통틀어 일컫는다. 예를 들어, 벡터는 대상이 되는 유전 물질, 예를 들어 CRISPR/Cas 시스템의 Cas 단백질을 암호화하는 핵산, 및/또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 DNA 분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0053] 비-상동성 말단-결합(Non-homologous end joining, NHEJ)

[0054] 본 명세서에서 사용되는 "비- 상동성 말단-결합(Non-homologous end joining, NHEJ)"은 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 양 말단이 함께 결합함으로써 DNA 내 이중가닥 파손을 수복 또는 수선하는 방법으로, 일반적으로, 이중가닥의 파손 (예를 들어, 절단)에 의해 형성된 2 개의 적합성 말단이 빈번한 접촉을 반복하여 2 개의 말단이 완전히 결합되는 경우 파손된 이중가닥이 복구된다. NHEJ는 모든 세포 주기에서 가능한 수복 방식으로, 주로 G1 시기와 같이 세포 내에 주형으로 쓸 상동 유전체가 없을 때 발생한다. NHEJ를 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에서 NHEJ 수선 부위에 핵산 서열의 일부 삽입 및/또는 결실(인델, indel)을 초래할 수 있다. 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0055] 상동 재조합 수리(homology directed repairing, HDR)

[0056] 본 명세서에서 사용되는 "상동 재조합 수리(homology directed repairing, HDR)"는 손상된 유전자 또는 핵산을 수선 또는 수복하기 위해 상동성을 가진 서열을 주형으로 이용하여 오류 없이 교정할 수 있는 방법으로, 일반적으로, 파손된 DNA을 수선 또는 수복하기 위해, 즉 세포가 가지고 있는 원래의 정보를 복원하기 위해, 변형이 이루어지지 않은 상보적인 염기서열의 정보를 이용하거나 자매 염색분체의 정보를 이용하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복한다. HDR의 가장 일반적인 형태는 상동성 재조합(homologous recombination, HR)이다. HDR은 통상적으로 활발하게 분열하는 세포의 S나 G2/M 시기에 주로 발생하는 수선 또는 수복 방식이다.

[0057] HDR을 이용하여 손상된 DNA를 수선 또는 수복을 하기 위해, 세포가 본래 가지는 상보적인 염기서열 또는 자매 염색분체를 이용하는 대신에, 상보적인 염기서열 또는 상동성 염기서열 정보를 이용하여 인공적으로 합성한 DNA

주형을 이용할 수 있다. 즉, 상보적인 염기서열 또는 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복할 수 있다. 이때, 상기 핵산 주형에 추가로 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함시켜 파손된 DNA를 수선 또는 수복할 때, 파손된 DNA에 추가로 포함시킨 핵산 서열 또는 핵산 조작을 삽입(Knock-In)할 수 있다. 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[0058] PAM (Protospacer Adjacent Motif)

[0059] CRISPR/Cas9 시스템은 표적-특이적인 핵산 절단 활성을 가지는데, 이러한

[0060] 표적-특이적인 핵산 절단 활성을 나타내기 위해서는 두 가지 조건이 필요하다. 첫째로, 핵산 내에 Cas9 단백질이 인식할 수 있는 일정 길이의 염기 서열이

[0061] 있어야 한다. 둘째로, 상기 일정 길이의 염기 서열 주변에 가이드 RNA에 포함된 가이드 도메인과 상보적으로 결합할 수 있는 서열이 있어야 한다. 위 두 가지 조건이 만족되어 1) Cas9 단백질이 상기 일정 길이의 염기 서열을 인식하고, 2) 상기 가이드 도메인이 상기 일정 길이의 염기 서열 주변 서열 부분과 상보적으로 결합하는 경우, 핵산 절단 활성이 나타난다. 이때, 상기 Cas9 단백질에 의해 인식되는 일정 길이의 염기 서열을 Protospacer Adjacent Motif(PAM) 서열이라 한다.

[0062] 상기 PAM 서열은 상기 Cas9 단백질에 따라 정해지는 고유한 서열이다. 상기Cas9 단백질의 PAM 서열을 알고 있다면, 이를 사용하여 PAM 서열 주변의 미리 결정된 표적 서열의 핵산을 표적화하는 CRISPR/Cas9 시스템을 설계할 수 있다.

[0064] 이하, 본 출원의 발명의 일 양태인 형질전환 동물, 형질전환 동물의 용도 및 형질전환 동물을 제작하는 방법에 대하여 상세하게 설명한다.

[0066] **형질전환 동물 (transgenic animal)**

[0067] 개괄

[0068] 본 발명의 일 양태로 질환 모델용 형질전환 동물 (transgenic animal for disease model)이 있다. 상기 형질전환 동물은 인위적으로 조작된 CYP17A1 (Cytochrome P450 17A1) 유전자를 포함하는 마우스이다. 이때, 상기 형질전환 동물은 인위적으로 조작된 CYP17A1 유전자를 포함함으로 인하여, 비만인 동물이다. 이때, 상기 형질전환 동물은 야생형 동물에 비하여 많은 양의 피하지방을 가지는 것을 특징으로 한다. 또한 상기 형질전환 동물은 불임의 특성을 가질 수 있다.

[0069] 상기 형질전환 동물은 피하지방 비만 모델 또는 불임질환 모델로 사용되기에 적합할 수 있다.

[0070] 동물의 예시

[0071] 상기 형질전환 동물은 인간 또는 비-인간 동물일 수 있다.

[0072] 상기 비-인간 동물은 포유류 (또는 포유 동물)일 수 있다.

[0073] 상기 포유류는 설치류 (또는 설치 동물, rodent), 토끼류, 영장류, 우제류 및 기제류 중 어느 하나일 수 있다.

[0074] 상기 설치류는 마우스 (mouse), 래트 (rat), 다람쥐, 기니피그, 및 햄스터 중 어느 하나일 수 있다.

[0075] 바람직하게는, 상기 형질전환 동물은 설치류(또는 설치류 동물)일 수 있으며, 구체적으로는 래트일 수 있다.

[0076] 형질전환 동물의 유전형

[0077] 본 발명의 형질전환 동물은 게놈 내 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자를 포함한다. 또는 상기 형질전환 동물의 유전체(또는 게놈 DNA)는 조작된 CYP17A1유전자를 포함한다. 상기 형질전환 동물은 게놈 내 야생형 CYP17A1유전자를 포함하지 않을 수 있다. 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열과 다르다. 이때, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 인위적으로 조작된 것 또는 자연적으로 발생한 돌연변이일 수 있다.

[0078] 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 인델(indel) 돌연변이를 포함한다. 이때, 상기 인델은 삽입(insertion) 및/또는 결실(deletion)을 의미한다. 상기 형질전환 동물은 게놈 내에 야생형 CYP17A1유전자가 아닌 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자를 가짐으로 인하여, CYP17A1단백질을 발현하지 않을 수 있다. 즉, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 인델 돌연변이로 인하여, 야생형 CYP17A1유전자가 암호화하는 CYP17A1단백질

의 발현이 억제되거나 발현되지 않을 수 있다.

[0079] 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 야생형 CYP17A1유전자에서 인델 돌연변이를 포함한 것일 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 야생형 CYP17A1유전자에서 인델 돌연변이가 발생한 것일 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열에서 일부 서열 (예를 들어, 300bp 이하의 크기를 가지는 연속되는 서열)이 결실된 것일 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열에서 1bp, 2bp, 3bp, 4nt, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 110bp, 120bp, 130bp, 140bp, 150bp, 160bp, 170bp, 180bp, 190bp, 200bp, 210bp, 220bp, 230bp, 240bp, 250bp, 260bp, 270bp, 280bp, 290bp, 또는 300bp 크기의 연속되는 서열이 결실된 것일 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열에서 일부 서열 (예를 들어, 300bp 이하의 크기를 가지는 연속되는 서열)이 삽입된 것일 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열에서 1bp, 2bp, 3bp, 4nt, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 110bp, 120bp, 130bp, 140bp, 150bp, 160bp, 170bp, 180bp, 190bp, 200bp, 210bp, 220bp, 230bp, 240bp, 250bp, 260bp, 270bp, 280bp, 290bp, 또는 300bp 크기의 연속되는 서열이 삽입된 것일 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열에서 일부 서열 (예를 들어, 300bp 이하의 크기를 가지는 연속되는 서열)이 결실되고, 일부 서열 (예를 들어, 300bp 이하의 크기를 가지는 연속되는 서열)이 삽입된 것일 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 서열은 야생형 CYP17A1유전자의 서열에서 1bp, 2bp, 3bp, 4nt, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 110bp, 120bp, 130bp, 140bp, 150bp, 160bp, 170bp, 180bp, 190bp, 200bp, 210bp, 220bp, 230bp, 240bp, 250bp, 260bp, 270bp, 280bp, 290bp, 또는 300bp 크기의 연속되는 서열이 결실되고, 1bp, 2bp, 3bp, 4nt, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 110bp, 120bp, 130bp, 140bp, 150bp, 160bp, 170bp, 180bp, 190bp, 200bp, 210bp, 220bp, 230bp, 240bp, 250bp, 260bp, 270bp, 280bp, 290bp, 또는 300bp 크기의 연속되는 서열이 삽입된 것일 수 있다.

[0080] 일 구체예로 상기 인델 돌연변이는 1bp, 2bp, 3bp, 4nt, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 110bp, 120bp, 130bp, 140bp, 150bp, 160bp, 170bp, 180bp, 190bp, 200bp, 210bp, 220bp, 230bp, 240bp, 250bp, 260bp, 270bp, 280bp, 290bp, 또는 300bp 크기일 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 인델 돌연변이는 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 사이의 크기 또는 이전 문장에서 선택된 수치 이하의 크기일 수 있다. 예를 들어, 상기 인델은 10 내지 100bp의 크기일 수 있다. 예를 들어, 상기 인델 돌연변이는 300bp 이하의 크기일 수 있다. 구체적으로, 상기 인델은 295bp의 크기일 수 있다.

[0081] 일 구체예로, 상기 인델 돌연변이는 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 엑손(exon)1, 엑손2, 엑손3, 엑손4, 엑손5, 엑손6, 엑손7, 엑손8, 인트론(intron)1, 인트론2, 인트론3, 인트론4, 인트론5, 인트론6, 및 인트론7 중 어느 하나 이상에 위치할 수 있다. 바람직하게는, 상기 인델 돌연변이는 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자의 엑손2에 위치할 수 있다.

[0082] 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는, 야생형의 CYP17A1유전자 서열(서열번호 2)과 비교하여, 5'-CGCTCCACAGCTGGCCATCTGCCTACACCTGGCTGCCATGTGGGAACTTGTGGGTCTCTTGCTGCTCATCCTAGCCTATTTCTTTTGGGTCAAGTCAAAGACGCCCGGTGCCAAGCTCCCCAGGAGCCTTCCATCCCTGCCCCTGGTGGGCAGTCTGCCGTTTCTCCCCAGACGTGGTCATATGCATGTCAACTTCTTCAAGCTACAGGAAAAGTATGGTCCCATCTATTCTCTTCGCCTGGGTACCACAACTACAGTGATCATCGGCCACTATCAGCTGGCCAGGGAGGTGCTC-3'(서열번호 3) 서열이 결실된 서열을 가질 수 있다. 구체적으로는, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 서열번호 3의 핵산서열을 포함하지 않을 수 있다. 또는, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 야생형 CYP17A1유전자의 엑손 2의 영역에서 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[0083] 일 구체예로, 상기 인위적으로 조작된 CYP17A1유전자는 서열번호 1의 핵산 서열을 가질 수 있다.

[0084] 형질전환 동물의 표현형1 - 피하지방 증가에 의한 비만

[0085] 본 출원의 형질전환 동물은 비만의 표현형을 가진다. 이때, 상기 형질전환 동물은 야생형 동물에 비하여 지방이 많은 표현형을 가진다. 일 구체예로, 상기 형질전환 동물은 야생형 동물에 비하여 피하지방 및/또는 내장지방이 많을 수 있다. 바람직하게는, 상기 형질전환 동물은 야생형 동물에 비하여 피하지방이 많을 수 있다.

[0086] 상기 형질전환 동물은 내장지방에 대한 피하지방의 비율((피하지방의 무게/내장지방의 무게) × 100%)이 야생형 동물에 비하여 높을 수 있다. 일 구체예로, 상기 형질전환 동물에서의 내장지방에 대한 피하지방의 비율이 야생형 동물에서의 내장지방에 대한 피하지방의 비율의 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배 또는 2.0배 이상일 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 형질전환 동물에서 내장지방에 대한 피하지방의 비율이 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% 또는 50% 이상일 수 있다.

[0087] 상기 형질전환 동물은 전체 몸무게에서 피하지방이 차지하는 비율((피하지방의 무게/전체 몸무게) × 100%)이 야생형 동물에 비하여 높을 수 있다. 일 구체예로, 상기 형질전환 동물에서의 전체 몸무게에서 피하지방이 차지하는 비율이 야생형 동물에서의 전체 몸무게에서 피하지방이 차지하는 비율의 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 또는 2.0배 이상일 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 형질전환 동물에서 전체 몸무게에서 피하지방이 차지하는 비율이2%, 2.1%, 2.2%, 2.3%, 2.4%, 2.5%, 2.6%, 2.7 %, 2.8%, 2.9%, 3.0%, 3.1%, 3.2%, 3.4%, 또는 3.5% 이상일 수 있다.

[0088] 상기 형질전환 동물은 전체 몸무게에서 내장지방이 차지하는 비율((내장지방의 무게/전체 몸무게) × 100%)이 야생형 동물에 비하여 높을 수 있다. 일 구체예로, 상기 형질전환 동물에서의 전체 몸무게에서 내장지방이 차지하는 비율이 야생형 동물에서의 전체 몸무게에서 내장지방이 차지하는 비율의 1.01배, 1.02배, 1.03배, 1.04배, 1.05배, 1.03배, 1.04배, 1.05배, 1.06배, 1.07배, 1.08배, 1.09배 또는 1.1배 이상일 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 형질전환 동물에서 전체 몸무게에서 내장지방이 차지하는 비율이4%, 4.1%, 4.2%, 4.3%, 4.4%, 4.5%, 4.6%, 4.7 %, 4.8%, 4.9%, 5.0%, 5.1%, 5.2%, 5.4%, 5.5%, 5.6%, 5.7%, 5.8%, 5.9% 또는 6.0% 이상일 수 있다.

[0089] 피하지방, 내장지방, 및/또는 몸무게에 관련된 상기 형질전환 동물의 표현형은 상기 형질전환 동물의 게놈이 가지는 상기 조작된 CYP17A1유전자에 의한 것일 수 있다. 이러한 표현형의 특징으로 인하여, 본 출원의 형질전환 동물은 비만질환, 특히 피하지방에 의한 비만질환 모델용 동물로서 유용하다.

[0090] 형질전환 동물의 표현형2 - CYP17A1 단백질 결핍

[0091] 본 출원의 형질전환 동물은 게놈 내 상기 조작된 CYP17A1 유전자를 가짐으로 인하여, 야생형 동물에 비해 CYP17A1 단백질 발현량이 적을 수 있다. . 또는 상기 형질전환 동물은 게놈 내 상기 조작된 CYP17A1 유전자를 가짐으로 인하여, 야생형 동물에 비해 CYP17A1 단백질이 결핍된 동물일 수 있다. 이때, 상기 조작된 CYP17A1 유전자는 야생형 CYP17A1 유전자에서 인델이 발생한 것이므로, 상기 조작된 CYP17A1 유전자는 CYP17A1 단백질을 암호화하는 mRNA를 발현하지 못하거나, 상기 조작된 CYP17A1 유전자로부터 발현되는 단백질이 야생형 CYP17A1 단백질과 아미노산 서열이 다른 것일 수 있다.

[0092] 일 구체예로, 상기 CYP17A1 단백질의 결핍은 CYP17A1 단백질이 없는 것을 의미할 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 CYP17A1 단백질의 결핍은, CYP17A1 단백질을 암호화하는 mRNA의 수준이 야생형 동물에 비하여 낮음을 의미할 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 CYP17A1 단백질의 결핍은, CYP17A1 단백질이 정상적으로 작동/기능하지 않음을 의미할 수 있다. 이때, CYP17A1 단백질이 정상적으로 작동/기능하지 않는 것은, 형질전환 동물에서 발현되는 CYP17A1 단백질이 야생형 동물에서 발현되는 CYP17A1 단백질과 아미노산 서열이 다름으로 인한 것일 수 있다. 또는 상기 형질전환 동물은 야생형 CYP17A1 단백질을 발현하지 않을 수 있다. 이때, CYP17A1 단백질의 아미노산 서열이 다른 것은 조작된 CYP17A1 유전자에 포함된 인델로 인한 것일 수 있다.

[0093] 형질전환 동물의 표현형3 - 지방 분화 인자 발현

[0094] 본 출원의 형질전환 동물은 야생형 동물에 비해 지방 분화 인자의 발현수준이 높을 수 있다. 이때, 상기 형질전환 동물은 CYP17A1 단백질을 발현하지 않음으로 인하여, 야생형 동물에 비해 지방 분화 인자의 발현수준이 높을 수 있다. 상기 지방 분화 인자는 PPARg2 및/또는 C/EBPa일 수 있다.

[0095] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물은 야생형 동물에 비해 지방 분화 인자의 mRNA 발현수준이 높을 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 형질전환 동물은 태어난 지 1일, 2일, 3일 또는 4일차에 야생형 동물에 비해 지방 분화 인자의 mRNA 발현수준이 높을 수 있다. 또 다른 일 구체예로, 상기 형질전환 동물은 태어난 지 1일 내지 4일차에 야생형 동물에 비해 지방 분화 인자의 mRNA 발현수준이 높을 수 있다.

[0096] 형질전환 동물의 표현형4 - 불임

[0097] 본 출원의 형질전환 동물은 불임의 표현형을 가질 수 있다.

[0098] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물이 수컷인 경우, 야생형 동물의 수컷에 비하여 항문과 외부 생식기 간의 거리가 짧을 수 있다.

[0099] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물이 수컷인 경우, 정상적인 형태로 발달이 되지 않은 형태의 외부 생식기를 가진다.

[0100] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물이 수컷인 경우, 정소에서 정상적인 정자 형성 (spermatogenesis)이 이루어지지 않을 수 있다. 구체적으로는, 정소에 1차 정자 세포 (primary spermatocyte)가 있는 반면, 2차 정자세포 (secondary spermatocyte)는 없을 수 있다.

[0101] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물이 암컷인 경우, 발달이 덜 된 자궁을 가질 수 있다. 이때, 자궁의 발달이 덜 되었다고 함은 자궁의 강 (lumen)이 정상 자궁에 비하여 제대로 형성되지 않은 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 형질 전환 동물이 암컷인 경우, 상기 형질전환 동물의 자궁 내에 빈 공간이 형성되어 있지 않다. 또는, 자궁의 발달이 덜 되었다고 함은 자궁 벽의 두께가 정상 자궁에 비하여 얇은 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 형질 전환 동물이 암컷인 경우, 상기 형질전환 동물의 자궁 벽의 두께는 정상 자궁 벽의 두께의 50%, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26% 또는 25% 이하일 수 있다. 바람직하게는, 상기 상기 형질 전환 동물이 암컷인 경우, 상기 형질전환 동물의 자궁 벽의 두께는 정상 자궁 벽의 두께의 약 25%일 수 있다.

[0102] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물이 암컷인 경우, 배란이 정상적으로 일어난 후의 난포가 없을 수 있다.

[0103] 이러한 표현형의 특징으로 인하여, 본 출원의 형질전환 동물은 불임질환 모델용 동물로서도 유용할 수 있다.

[0105] 형질전환 동물의 유전형 예시 - 래트

[0106] 일 예로, 상기 형질전환 동물이 형질전환 래트 (transgenic rat)일 경우의 유전형에 대하여 아래에서 설명한다.

[0107] 상기 형질전환 래트의 8번 상동염색체는 상기 조작된 CYP17A1유전자를 포함한다. 구체적으로, 상기 형질전환 래트는 야생형 CYP17A1 유전자를 포함하지 않는다.

[0108] 일 구체예로, 상기 형질전환 동물은 조작된 CYP17A1유전자에 대하여 동형접합의 유전형을 가질 수 있다.

[0109] 설명의 편의상, 상기 형질전환 래트의 유전체에 포함되는 2개의 8번 상동염색체를 제1상동염색체(8) 및 제2상동염색체(8)로 구분하여 설명한다. 또한, 설명의 편의상, 상기 조작된 CYP17A1 유전자를 제1조작된 CYP17A1 유전자 및 제2조작된 CYP17A1 유전자로 구분하여 설명한다.

[0110] 상기 형질전환 동물의 제1상동염색체(8)는 제1조작된 CYP17A1 유전자를 포함한다. 동시에 상기 형질전환 동물의 제2상동염색체(8)는 제2조작된 CYP17A1 유전자를 포함한다. 일 구체예로, 제1조작된 CYP17A1 유전자와 제2조작된 CYP17A1 유전자는 동일 할 수 있다. 예를 들어, 제1조작된 CYP17A1 유전자의 인델과 제2조작된 CYP17A1 유전자의 인델은 크기 및/또는 위치가 동일할 수 있다. 다른 구체예로, 제1조작된 CYP17A1 유전자와 제2조작된 CYP17A1 유전자는 서로 다를 수 있다. 예를 들어, 제1조작된 CYP17A1 유전자의 인델과 제2조작된 CYP17A1 유전자의 인델은 크기 및/또는 위치가 다를 수 있다.

[0111] **형질전환 동물의 용도**

[0112] 비만 모델

[0113] 본 출원에서 설명되는 형질전환 동물은 비만 모델로 사용될 수 있다. 구체적으로는, 상기 형질전환 동물은 피하지방이 많은 비만 모델로 적합하다. 이때, 내장지방이 일반 동물 (야생형 동물)과 근사하지만 피하지방이 일반 동물 (야생형 동물)보다 유의미하게 많은 동물이 필요한 실험에서, 상기 형질전환 동물이 유용하게 사용될 수 있다. 즉, 상기 형질전환 동물은 피하지방에 대한 실험용 모델로 사용될 수 있다.

[0114] 불임 모델

[0115] 본 출원에서 설명되는 형질전환 동물은 불임 모델로 사용될 수 있다. 구체적으로는, 상기 형질전환 동물은 생식기가 발달되지 않은 불임 실험 모델로 적합하다. 즉, 상기 형질전환 동물은 불임에 대한 실험용 모델로 사용될 수 있다.

[0116] **형질전환 동물 제작 방법**

[0117] 개괄

[0118] 본 발명의 일 양태로 형질전환 동물을 제작하는 방법이 있다. 상기 방법은 동물의 배아에 CYP17A1유전자 조작용 조성물을 전달(deliver), 주입(inject), 및/또는 도입(administer)하는 단계를 포함한다.

[0119] 일 구체예로 상기 방법은 동물로부터 수정된 배아를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 방법은 수정된 배아를 대리모의 난관에 이식하는 단계를 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 방법은 조작된 CYP17A1 유전자를 게놈 상에 가지는 동물을 교배하는 방법을 포함할 수 있다.

[0120] CYP17A1 유전자 조작용 조성물의 주입

[0121] 일 구체예로, 상기 방법은 동물의 배아에 CYP17A1유전자 조작용 조성물을 전달(deliver), 주입(inject), 및/또는 도입(administer)하는 단계를 포함한다. 이때, 일 구체예로, 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물은 Cas 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0122] 상기 전달, 주입, 및/또는 도입 방법은, 세포 내로 CYP17A1 유전자 조작용 조성물을 세포 내로 전달할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[0123] 일 구체예로, 상기 전달, 주입, 및/또는 도입 방법은 주사(injection), 수혈(transfusion), 삽입(implantation) 또는 이식(transplantation)으로 수행될 수 있다.

[0124] 일 구체예로, 상기 전달, 주입, 및/또는 도입 방법은 망막하(subretinal), 피하(subcutaneously), 피내(intradermaliy), 안구내(intraocularly), 유리체내(intravitreally) 종양내(intratumorally), 절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous), 림프액내(intralymphatic) 또는 복막내(intraperitoneally)에서 선택된 경로로 수행될 수 있다.

[0125] 일 구체예로, 상기 전달, 주입, 및/또는 도입 방법은 미세주입법, 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 및/또는 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징일 수 있다. 바람직하게는, 상기 전달, 주입 및/또는 도입 방법은 전기천공법일 수 있다.

[0126] 일 구현예로, 상기 전달, 주입, 및/또는 도입 방법은 Cas 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 및/또는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 나노파티클을 이용하여 전달하는 것일 수 있다. 이때, 상기 전달 방법은 양이온성 리포좀법, 초산 리튬-DMSO, 지질-매개 형질감염(transfection), 인산칼슘 침전법(precipitation), lipofection, PEI(Polyethyleneimine)-매개 형질감염, DEAE-dextran 매개 형질감염, 및/또는 나노파티클-매개 핵산 전달(Panyam et. , al Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13.pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023 참조)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0127] 일 구체예로, 상기 지질-매개 형질감염은 지질 나노입자(lipid nanoparticle, LNP) 및/또는 PEG를 이용한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 LNP는 양성자화된 이온화 지질 및/또는 중성을 나타내는 이온화 지질을 포함할 수 있다.

[0128] 다른 구체예로, 상기 미세주입법은 일정한 흐름 시스템(constant flow system 또는 continuous flow injection mode), 펄스 흐름 시스템(pulsed flow system), 및/또는 pronuclear injection을 이용한 것일 수 있다.

[0129] CYP17A1 유전자 조작 결과 - 인델(indel) 발생

[0130] 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물의 주입으로 인하여 CYP17A1 유전자에서 이중 가닥 절단(Double-strand break, DSB)이 발생할 수 있다. 이때, DSB가 발생한 부분은 비-상동성 말단-결합(non-homologous end joining, NHEJ)의 메커니즘(mechanism)을 통하여 수선될 수 있다. 이때, NHEJ에 의하여 수선된 경우, 짧은 유전자 단편의 치환, 삽입 또는 결실을 야기하고, CYP17A1 유전자의 넉아웃(knock-out)이 일어날 수 있다.

[0131] 일 구체예로, CYP17A1 유전자에 인델이 발생할 수 있다. 이때, 상기 인델은 표적 서열 부분의 내부 및/또는 외부에서 일어날 수 있다. 상기 인델은, 유전자 편집 전 핵산의 뉴클레오타이드 배열에서 일부 뉴클레오타이드가 중간에 결실되거나, 임의의 뉴클레오타이드가 삽입되거나, 및/또는 상기 삽입과 결실이 혼입된 변이를 일컫는다.

[0132] 상기 CYP17A1 유전자 내에 인델이 일어나면, CYP17A1 유전자는 불활성화된다. 이러한 경우, 상기 CYP17A1 유전자가 코딩하는 CYP17A1 단백질은 발현이 되지 않거나 손상된 단백질로 발현되어 기능적으로 결핍될 수 있다. 이러한 효과를 "CYP17A1 유전자의 넉아웃(knock-out)"으로 지칭할 수 있다.

[0133] 제작된 형질전환 동물의 유전형 및 표현형

[0134] 일 구체예로, 상기 방법을 통하여 제작된 형질전환 동물의 유전형은 본 명세서의 <<형질전환 동물의 유전형>>단락에서 개시하는 형질전환 동물의 유전형과 동일할 수 있다. 일 구체예로, 상기 방법을 통하여 제작된 형질전환 동물의 표현형은 본 명세서의 <<형질전환 동물의 표현형1 - 비만 세포>> 내지 <<형질전환 동물의 표현형4 - 불임>> 단락에서 개시하는 형질전환 동물의 표현형과 동일할 수 있다

[0136] 다음으로 본 발명의 일 태양으로, 상기 형질전환 동물 제작에 사용될 수 있는 CYP17A1유전자 조작용 조성물이 있다. 상기 CYP17A1유전자 조작용 조성물은 인위적으로 게놈 상 CYP17A1 유전자 서열에 돌연변이를 도입할 수 있는 기술을 이용한 것일 수 있다.

[0137] 예를 들어, 유전자 가위(engineered nuclease) 기술을 이용하여 인위적인 돌연변이를 생성시킬 수 있다.

[0138] 상기 유전자 가위 기술에서, CYP17A1유전자 조작용 조성물에 사용되는 단백질은 Cas 단백질, 징크핑거 뉴클레이즈(Zinc Finger Nuleases; ZFN) 또는 탈렌(TALEN; Tranion Activator-Like Effector Nucleases)일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[0139] 상기 본 출원의 유전자 조작용 조성물의 구체적인 예로써, CRISPR/Cas시스템을 들 수 있고, 이하, 이를 중심으로 기술한다.

[0141] **CRISPR/Cas 시스템**

[0142] CRISPR/Cas 시스템 개괄

[0143] CRISPR/Cas 시스템은 원핵생물 유기체에서 발견되는 면역 시스템의 일종이며, Cas 단백질, 및 가이드 RNA를 포함한다. Cas 단백질, 또는 가이드 RNA의 자세한 구성에 대해서는 공개문헌인 WO2018/231018(국제공개번호)에 자세히 설명되어 있다. 본 명세서에서 사용되는 "Cas 단백질" 이라는 용어는 CRISPR/Cas 시스템에서 이용되는 것으로 해석될 수 있는 뉴클레이즈(nuclease)를 총칭하는 용어이다. 이하에서는 가장 일반적으로 쓰이는 CRISPR/Cas9 시스템의 DNA 절단 과정을 간략히 설명한다.

[0144] Cas9 단백질

[0145] CRISPR/Cas9 복합체에서, 핵산을 절단하는 뉴클레이즈(nuclase) 활성을 가지는 단백질을 Cas9 단백질이라 한다. 상기 Cas9 단백질은 CRISPR/Cas 시스템 분류 상 Class 2, Type II에 해당하며, 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속 (Streptococcus sp.), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum) 유래 Cas9 단백질 등이 있다. 본 출원은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질의 변이체에 관한 것이다.

[0146] 가이드 RNA

[0147] CRISPR/Cas9 복합체에서, 표적 핵산에 포함된 특정 서열을 인식하도록 CRISPR/Cas9 복합체를 유도하는 기능을 가지는 RNA를 가이드 RNA라 한다. 상기 가이드 RNA는 당 분야에서 일반적으로 crRNA 및 tracrRNA로 이루어지는 구성으로 설명될 수 있다.

[0148] 또한, 상기 가이드 RNA의 구성을 기능적으로 나누어 크게, 1) 스캐폴드 부분, 및 2) 가이드 도메인 부분으로 나눌 수도 있다. 일반적으로, 상기 스캐폴드 부분은 tracrRNA, 반복 서열 부분(direct repeat)을 포함하며, 상기 가이드 도메인 부분 및 일부 반복 서열 부분은 crRNA에 포함된다. 상기 스캐폴드 부분은 Cas9 단백질과 상호작용하는 부분으로, Cas9 단백질과 상호작용하여 복합체를 이룰 수 있도록 하는 부분이다. 상기 스캐폴드 부분은 Cas9 단백질의 유래 미생물의 종류에 의해 서열이 결정된다. 상기 가이드 도메인 부분은, 표적 핵산 내 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열 부분과 상보적으로 결합할 수 있는 부분으로, 약 15 내지 30 nt의 길이를 가질 수 있다. 상기 가이드 도메인 부분은 인위적으로 변형할 수 있는 서열로서, 관심 있는 표적 뉴클레오타이드 서열에 의해 결정된다.

[0149] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단하는 과정

[0150] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산에 접촉하여 Cas9 단백질이 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열(PAM 서열)을 인식하고, 가이드 RNA의 일부(상기 가이드 도메인 부분)가 표적 서열(표적 핵산의 이중 가닥에서, PAM 서열과 인접한 부분인 비표적 서열과 상보적으로 결합하는 부분)과 상보적으로 결합하며, CRISPR/Cas9 복합체에 의해 상기

표적 핵산이 절단된다. 이때, Cas9 단백질이 인식하는 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열은 프로토스페이서 인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM) 서열이라 하며, 이는 Cas9 단백질의 종류나 기원에 따라 결정되는 서열이다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질은 표적 핵산 내 5'-NGG-3' 서열을 인식할 수 있다. 이때, 상기 N은 아데노신(A), 티미딘(T), 사이티딘(C), 구아노신(G)중 하나이다. CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단하기 위해서는 가이드 RNA의 가이드 도메인 부분이 표적 서열(표적 핵산의 이중 가닥에서, PAM 서열과 인접한 부분인 비표적 서열과 상보적으로 결합하는 부분)과 상보적으로 결합해야 한다. 따라서, 상기 가이드 도메인 부분은 표적 핵산의 서열, 구체적으로는 PAM 서열과 인접한 서열에 따라 설계되어 사용된다. CRISPR/Cas9 복합체가 상기 표적 핵산을 절단할 때, 표적 핵산의 PAM 서열부분 및/또는 상기 가이드 도메인과 상보적으로 결합하는 서열을 포함하는 이중 가닥 영역 내 임의의 위치가 절단되게 된다.

[0151] **CYP17A1 유전자 조작용 조성물의 예시 - CRISPR/Cas9**

[0152] 개괄

[0153] 본 명세서에서 개시되는 CYP17A1 유전자 조작용 조성물은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 CYP17A1 유전자를 편집할 수 있는 구성을 가진다. 상기 유전자 조작용 조성물은 전술한 형질전환 동물의 유전자형, 및/또는 표현형을 나타낼 수 있도록, 적합한 세포 내 표적 서열을 인지하고 이를 편집할 수 있도록 설계된 것이다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물은 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0154] CYP17A1 유전자 조작용 조성물 구성요소1 - Cas9 단백질

[0155] 본 명세서에서 개시되는 CYP17A1유전자 조작용 조성물은 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함한다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 자연계에 존재하는 Cas9 단백질이거나, 자연계에 존재하는 Cas9 단백질에서 하나 이상의 도메인이 인위적으로 변형된 Cas9 단백질일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas9 단백질은 상기 Cas9 단백질에 포함된 일부 또는 전부 도메인의 기능이 불활성화된 것일 수 있다.

[0156] 일 구체예로, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속 (Streptococcus sp.), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 또는 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum) 유래 Cas9 단백질일 수 있다. 일 구체예로, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질(SpCas9 단백질)일 수 있다.

[0157] CYP17A1 유전자 조작용 조성물 구성요소2 - 가이드 RNA

[0158] 본 명세서에서 개시되는 CYP17A1 유전자 조작용 조성물은 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함한다. 이때, 상기 가이드 RNA의 표적 유전자는 동물의 CYP17A1 유전자이다.

[0159] 상기 가이드 RNA는 스캐폴드 부분, 및 가이드 도메인 부분을 포함한다. 일반적으로, 상기 스캐폴드 부분은 tracrRNA, 및 반복 서열 부분(direct repeat)을 포함하며, 상기 가이드 도메인 부분 및 일부 반복 서열 부분은 crRNA에 포함된다. 상기 가이드 도메인은, 표적 핵산 내 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열 부분과 상보적으로 결합할 수 있는 부분이다. 상기 가이드 도메인 부분은, 표적 핵산 내 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열 부분과 상보적으로 결합할 수 있는 부분으로, 약 15 내지 30 nt의 길이를 가질 수 있다. 상기 가이드 도메인은 인위적으로 변형할 수 있는 서열로서, 관심 있는 표적 뉴클레오타이드 서열에 의해 결정된다. 상기 스캐폴드 부분은 Cas9 단백질과 상호작용하는 부분으로, Cas9 단백질과 상호작용하여 CRISPR/Cas9 복합체를 형성할 수 있다.

[0160] 일 구체예로, 상기 가이드 RNA는 CYP17A1 유전자의 엑손(exon)1, 엑손2, 엑손3, 엑손4, 엑손5, 엑손6, 엑손7, 엑손8, 인트론(intron)1, 인트론2, 인트론3, 인트론4, 인트론5, 인트론6, 및 인트론7 중 어느 하나를 표적으로 할 수 있다. 구체적으로는 상기 가이드 RNA는 CYP17A1 유전자의 엑손 1을 표적으로 할 수 있다.

[0161] 일 구체예로, 상기 가이드 도메인의 서열은 다음 서열을 포함할 수 있다: 5'- UGACCCAAAAGAAAUAGGCU -3'(서열번호 4). 다른 일 구체예로, 상기 가이드 도메인의 서열은 서열번호 4의 서열과 적어도 80%이상, 예를 들어, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0162] 일 구체예로, 상기 가이드 RNA의 스캐폴드 부분은 다음 서열을 포함할 수 있다: 5'-UAAUACGACUCACUAUAGUGACCCAAAAGAAAUAGGCUGUUUUAGAGCUAGAA -3'(서열번호 5). 다른 일 구체예로, 상기 스캐폴드 부분의 서열은 서열번호 5의 서열과 적어도 80%이상, 예를 들어, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0163] CRISPR/Cas9 시스템 구성요소의 포함 형태

[0164] 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물 내에 포함된 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성요소의 형태는 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물이 세포 내에 도입되는 경우, CRISPR/Cas 복합체가 형성되어 CYP17A1 유전자를 인위적으로 조작할 수 있도록 하는 형태라면 특별히 제한되지 않는다.

[0166] 일 구체예로, 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물은 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및/또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산이 포함된 벡터를 가지고 있을 수 있다.

[0167] 일 구체예로, 상기 벡터는 발현 조절 요소, 선별 요소 등을 포함할 수 있다. 상기 발현 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, ITR(inverted terminal repeat), LTR(long terminal repeat), 종결자(terminator), 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 2A 자가 절단 펩타이드(2A self-cleaving peptides) 또는 복제원점(replication origin) 등일 수 있다. 상기 선별 요소는 형광 단백질 유전자, 태그(tag), 리포터 유전자, 항생제 내성 유전자 등일 수 있다.

[0168] 일 구체예로, 상기 벡터는 플라스미드 및/또는 바이러스 벡터일 수 있다. 일 구현예로, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 비바이러스 벡터일 수 있다. 일 구체예로, 상기 비바이러스 벡터는 플라스미드, 파지, 네이키드 DNA, DNA 복합체, 및 mRNA로 구성된 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다. 일 구현예로, 상기 플라스미드는 pcDNA 시리즈, pS456, p326, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, 및 pUC19으로 이뤄진 군에서 선택된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 파지는 λgt4λB, λ-Charon, λ△z1, 및 M13으로 이뤄진 군에서 선택된 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 암호화 핵산은 PCR 앰플리콘(amplicon)일 수 있다.

[0170] 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물은 상기 Cas9 단백질 및 상기 가이드 RNA를 포함하고, 상기 Cas9 단백질과 상기 가이드 RNA는 리보뉴클레오프로테인(ribonucleoprotein, RNP) 형태로 존재할 수 있다. 일 구체예로, 상기 HR 유전자 조작용 조성물은 상기 Cas9 단백질 및 상기 가이드 RNA가 결합된 리보뉴클레오프로테인(RNP, ribonucleoprotein)을 포함할 수 있다.

[0172] 일 구체예로, 상기 CYP17A1 유전자 조작용 조성물은 다음의 1) 내지 4)의 구성 중 어느 하나 이상의 구성을 포함할 수 있다: 1) Cas9 단백질 및 가이드 RNA; 2) Cas9 단백질를 암호화하는 핵산 및 가이드 RNA; 3) Cas9 단백질를 암호화하는 핵산 및 가이드 RNA를 암호화하는 핵산; 및 4) Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 암호화하는 핵산.

[0173] 구체적으로는 상기 CRISPR/Cas9 조성물은 SpCas9 단백질 및 가이드 RNA를 포함할 수 있다.

[0176] 이하, 실험예 및 실시예를 통해 본 명세서가 제공하는 발명에 대해 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 예시하기 위한 것으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0178] **실험예**

[0179] 실험예1. CRISPR/Cas9을 활용한 CYP17A1 낙아웃 Rat 생산

[0180] *실험예 1.1 래트 준비*

[0181] 모든 래트 관리 및 절차는 기관 동물 관리 및 사용 위원회(No. SNU-201222-4-2)의 승인을 받았으며 서울대학교 지침에 따라 수행되었다. 본 연구에 사용된 SD 래트를 Orient-bio(대한민국 성남)에서 구입하였으며, 24 ± 2℃, 50% 습도, 12:12시간 명암주기(07:00 ~ 19:00 점등)의 환경에서 관리하였다.

[0182] *실험예 1.2 배아 채취*

[0183] 암컷 래트에 150 IU/kg의 PMSG(대성미생물연구소, 의왕, 대한민국)와 150 IU/kg의 hCG(대성미생물연구소)를 48시간 동안 복강내 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. 교배 다음날 암컷의 난관에서 1세포기 배아(1 cell-stage embryos)를 채취하여 M16 배지(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 0.5~2시간 동안 보관하였다.

[0184] *실험예 1.3 배아 전기 천공 및 대리모 임신*

[0185] 1 세포기 배아를 0.5~2시간 동안 보관한 후, M2 배지(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 Opti-MEM 배지(Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 각각 2회씩 세척하였다. 세척한 후, 배아를 25ng/μL의 sgRNA 및 100ng/μL의 Cas9 단백질(Invitrogen, Waltham, MA, USA) RNP를 포함하는 Opti-MEM 배지 10ul로 채워진 BTX 마이크로슬라이드(Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA)의 라인에 두고, 전기천공(Electroporation) 전 5분 동안 배양하였다.

[0186] 전기천공은 Genome Editor(GEB15; BEX, Tokyo, Japan)를 이용하여 30 V, 7회, 3 msec, 97 msec 간격으로 수행되었다. 전기천공을 수행하는 과정을 도 2에 도시하였다. 도2의 우측 사진에서, 배아가 가운데에 일렬로 나열되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0187] 전기천공 후 배아를 m16 배지에서 1시간 동안 배양한 후 mR1ECM 배지(Cosmobio, Tokyo, Japan)로 옮겼다. 2 세포기 배아를 가임기인 대리모 (래트 암컷)의 난관으로 옮겼다. 배아를 이식받은 대리모로부터 CYP17A1 KO Rat를 얻었다.

[0188] *실험예 1.4 sgRNA 디자인 및 형질감염*

[0189] 온라인 툴(CRISPR RGEN 도구; http://www.rgenome.net/)을 사용하여 각 유전자 별로 3개의 sgRNA를 선택하고, 정밀 gRNA 합성 키트(Invitrogen)를 사용하여 sgRNA를 합성하였다.

[0190] 100ng/μL의 sgRNA 및 Cas9 RNP를 5분 동안 배양하고 Neon Transfection 시스템(Invitrogen)을 사용하여 래트 섬유아세포(Rat2 세포)에 형질감염시켰다. 대략적인 sgRNA 효율은 T7E1 assay로 분석했으며, 가장 효율이 높은 sgRNA를 선택하여 낙아웃 배아를 생산하는 데 사용하였다. 모든 sgRNA 후보가 타겟으로 하는 서열, PAM 서열, 타겟 서열의 strand 종류를 표 1에 나열하였다. 이때, sg CYP17A1 #1 내지 3은 CYP17A1 유전자를 타겟으로 하는 sgRNA를 의미한다.

[0191] 이때, 표 1에서 sgCYP17A1 #3이 배아의 형질감염에 사용된 것이다. sgCYP17A1 #3이 타겟으로 하는 CYP17A1 유전자에 대하여, 도1에 도시하였다.

표 1

[0192]

sgRNA명칭	**핵산 서열 (5' - 3')**	**PAM 서열(5' - 3')**	**Strand 종류**
sgCYP17A1 #1	AGCAACTTCAACCAAGAAGG (서열번호 6)	AGG	antisense
sgCYP17A1 #2	AAGTTGCTCCGCTCCACAGC (서열번호 7)	TGG	sense
sgCYP17A1 #3	TGACCCAAAAGAAATAGGCT (서열번호 8)	AGG	antisense

[0194] *실험예 1.5 낙아웃 확인*

[0195] 실험예 1.3에서 대리모로부터 얻은 CYP17A1 KO Rat 꼬리의 게놈 DNA 및 실험예 1.4에서 형질감염시킨 래트 섬유아세포 (Rat2 세포)의 게놈 DNA는 DNeasy Blood & Tissue 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. 추출한 게놈 DNA에 대한 PCR은 표 2에 기재된 프라이머와 Maxime PCR PreMix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Republic of Korea)를 이용하여 수행하였다. PCR 결과물에 대하여 T7E1 분석 및 Sanger Sequencing을 수행하여 래트 섬유아세포 및 CYP17A1 KO Rat의 돌연변이를 확인하였다.

표 2

[0196]

프라이머 명칭	**Sequence (5' - 3')**
CYP17A1 F	CTCTGTAACCCGATGGCAGT (서열번호 9)
CYP17A1 R	CTCACCATCTTGCTGGACAA (서열번호 10)

[0198] CYP17A1 F 및 CYP17A1 R은 각각 CYP17A1 유전자에 대한 포워드 프라이머 (forward primer) 및 리버스 프라이머 (reverse primer)를 의미한다.

[0199] 실험예2. 비만의 표현형 확인1 - 지방의 정량 및 표준화

[0200] CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트 (CYP17A1 KO Rat)와 야생형 래트(WT Rat)에게 29주간 일반적인 식단(Normal diet)를 급여하여 29주령에 부검을 진행하였다.

[0201] 부검하여 확인한 래트의 피하지방을 도 3에 도시하였다. 이때, CYP KO M은 CYP17A1 유전자를 낙아웃한 수컷, CYP KO W은 CYP17A1 유전자를 낙아웃한 암컷, WT M은 야생형 수컷, WT F은 야생형 암컷을 의미한다.

[0202] 부검한 래트의 전체 몸무게, 내장지방의 무게, 피하지방의 무게를 측정하여, 각각 도 4의 Body Wight (BW), Visceral Adipose Tissue (VAT), Subcutaneous Adipose Tissue (SCAT)에 도시하였다.

[0203] 상기 무게들을 이용하여, 전체 몸무게에서 내장지방이 차지하는 비율((내장지방의 무게/전체 몸무게) × 100%), 전체 몸무게에서 피하지방이 차지하는 비율((피하지방의 무게/전체 몸무게) × 100%), 내장지방에 대한 피하지방의 비율((피하지방의 무게/내장지방의 무게) × 100%)를 계산하여, 각각 도 4의 VAT/BM, SCAT/BM, SCAT/VAT에 도시하였다.

[0204] 이러한 결과를 통해, CYP17A1 유전자를 낙아웃한 래트에서, 체중 대비 많은 피하지방 (Subcutaneous fat)의 증가를 확인할 수 있으며 (SCAT/BW 참조), 내장지방 (Visceral Fat)의 증가보다 피하지방 (Subcutaneous fat)의 유의미한 증가를 확인할 수 있었다 (SCAT//VAT 참조). 즉, CYP17A1 유전자를 낙아웃하였을 때, 피하지방이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0205] 실험예3. 비만의 표현형 확인2 - 지방 분화 인자 발현 비교

[0206] CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트 (CYP17A1 KO Rat)와 야생형 래트(WT Rat)가 태어난 날 (Day 0), 4일차 (Day 4), 8일차 (Day 8) 및 15일차 (Day 15)에 지방 줄기 세포에서의 지방 관련 인자의 발현양 (relative mRNA expression level)을 측정하였다. 이때, 지방 관련 인자 중 지방 분화 인자 (Adipogenesis marker)로 PPARg2 및 C/EBPa를 측정하였으며, 지방 성숙 인자 (Mature Adipocyte marker)로 APN 및 LPL을 측정하였다.

[0207] 측정 결과를 도 5에 도시하였다. 이때, CYP PGASC는 CYP17A1 KO Rat의 내장지방 유래 지방 줄기 세포를 의미하며, CYP SCASC는 CYP17A1 KO Rat의 피하지방 유래 지방 줄기 세포를 의미하며, WT PGASC는 WT Rat의 내장지방 유래 지방 줄기 세포를 의미하며, WT SCASC는 WT Rat의 피하지방 유래 지방 줄기 세포를 의미한다.

[0208] 이러한 결과를 통해, 비교적 이른 시기(Day0~Day4)에 CYP17A1 낙아웃 Rat의 피하지방 유래 지방 줄기 세포에서 지방 분화 인자들의 발현수준 야생형 Rat에 비하여 유의미하게 높다는 결과를 확인하였다.

[0209] 실험예4. 불임의 표현형 확인

[0210] *실험예 4.1 수컷의 경우*

[0211] CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트 (CYP17A1 KO Rat)와 야생형 래트(WT Rat)의 항문과 생식기 사이의 거리를 육안으로 확인한 결과를 도 6에 도시하였다. 이때, 도6의 좌측부터 우측 순서대로의 래트는 각각 1) 6주차 CYP17A1 KO Rat 암컷, 2) 5주차 CYP17A1 KO Rat 수컷, 3) 6주차 WT Rat 암컷, 4) 4주차 WT Rat 수컷이다.

[0212] 이러한 결과를 통해, WT Rat 수컷의 외부 생식기가 암컷과 다른 형태 (항문과 생식기 간의 거리가 긺)를 띄는 것과 달리, CYP17A1 KO Rat 수컷의 외부 생식기가 암컷과 같은 형태 (항문과 생식기 간의 거리가 짧은 것)를 띄는 것을 확인할 수 있었다.

[0213] CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트 (CYP17A1 KO Rat)와 야생형 래트(WT Rat)의 생식기관를 부검하여 형태 및 크기를 확인한 결과를 도 7에 도시하였다. 이때, CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트의 생식기관이 야생형 래트의 생식기관에 비하여, 제대로 형성되지 않음을 확인하였다.

[0214] CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트 (CYP17A1 KO Rat) 수컷과 야생형 래트(WT Rat) 수컷의 정소의 조직을 H&E staining을 통해 관찰한 결과를 도 8에 도시하였다. 이때, 야생형 래트에서는 정상적인 정자 생성 및 성숙 (Spermatogenesis, WT male의 빨간색 박스 부분)이 관찰된 반면, CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트에서는 야생형 래트와 같은 정상적인 정자 생성 및 성숙이 관찰되지 않았다.

[0215] 이러한 결과들 (도 6 내지 8)을 통하여, CYP17A1 KO Rat 수컷이 불임의 표현형을 가진다는 것을 확인하였다.

[0216] *실험예 4.2 암컷의 경우*

[0217] CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트 (CYP17A1 KO Rat) 암컷과 야생형 래트(WT Rat) 암컷의 난소 및 자궁의 조직을 H&E staining을 통하여 관찰한 결과를 도 9 및 10에 도시하였다.

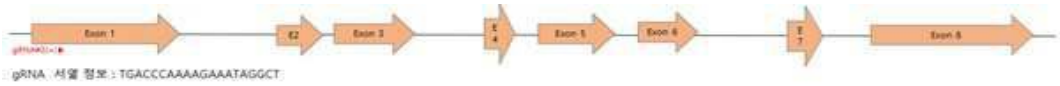
[0218] 도9를 통하여, 야생형 래트의 난소에서는 배란이 정상적으로 일어난 후의 난포가 관찰이 되지만, CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트의 난소에서는 이러한 정상적인 난포가 관찰되지 않았다.

[0219] 도 10을 통하여, 야생형 래트의 자궁과 CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트의 자궁의 벽의 두께를 비교했을 때, CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트의 두께가 현저히 얇으며, 자궁의 강(Lumen)이 제대로 형성되어 있지 않음을 통해서 생식 기관이 제대로 발달하지 않음을 확인할 수 있었다. 이때, CYP17A1 유전자를 넉아웃한 래트의 자궁 벽의 두께는 야생형 래트의 자궁의 약 ¼ 수준 (224.4um vs 903.5um)으로 측정된다.

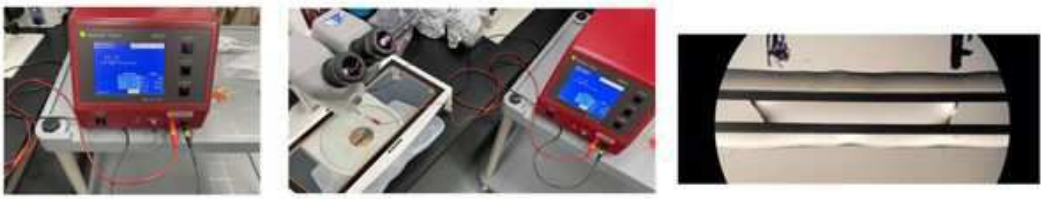
[0220] 이러한 결과들 (도 9 및 10)을 통하여, CYP17A1 KO Rat 암컷이 불임의 표현형을 가진다는 것을 확인하였다.

도면

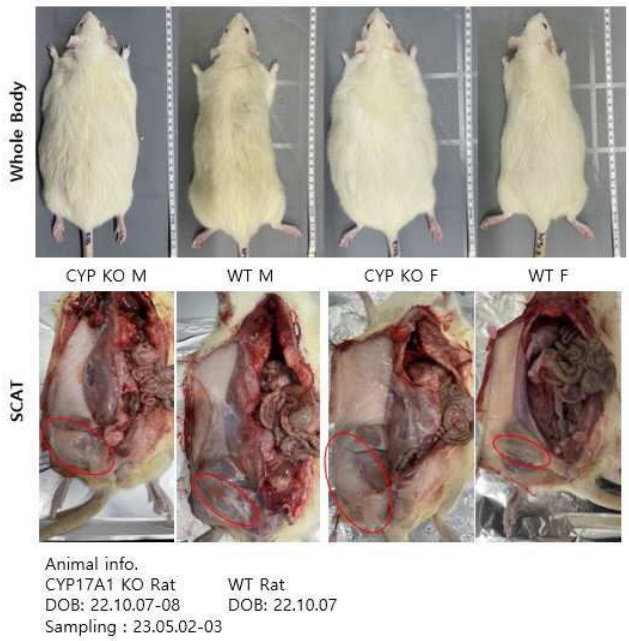
도면1



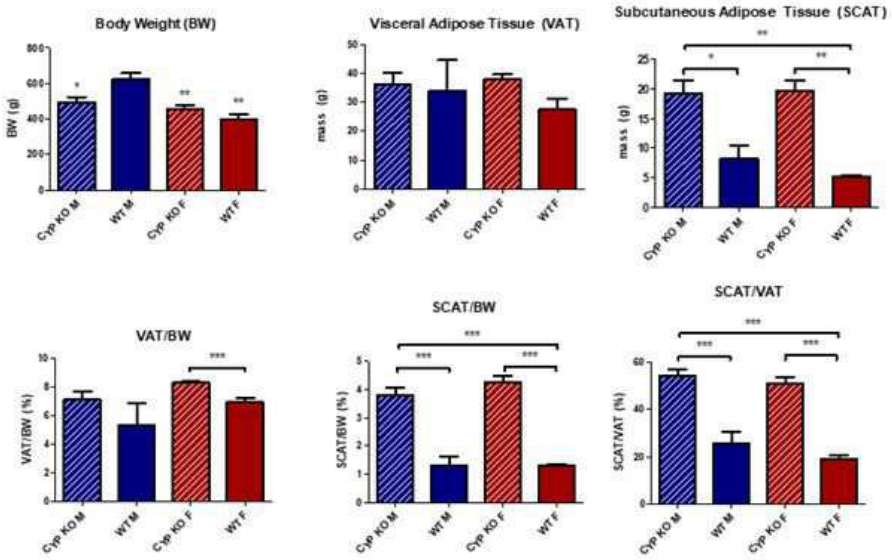
도면2



도면3

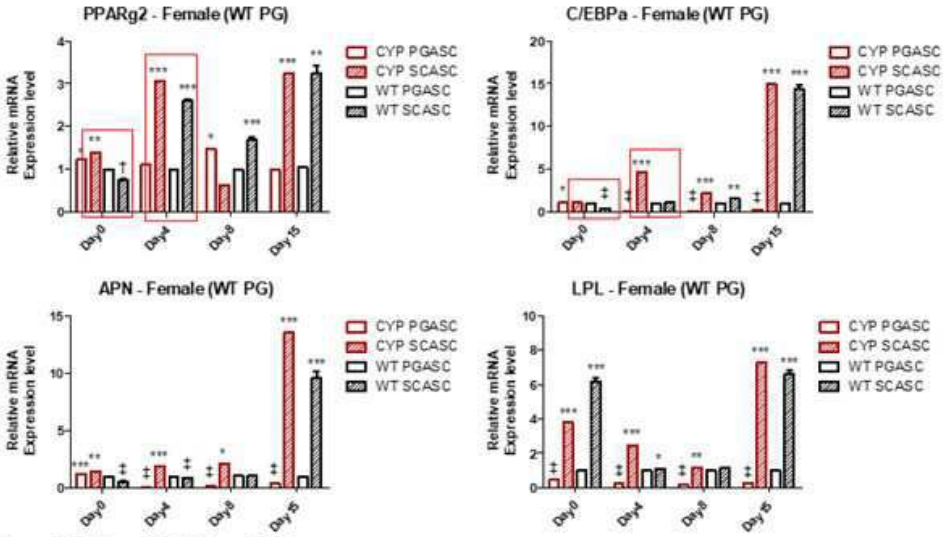


도면4



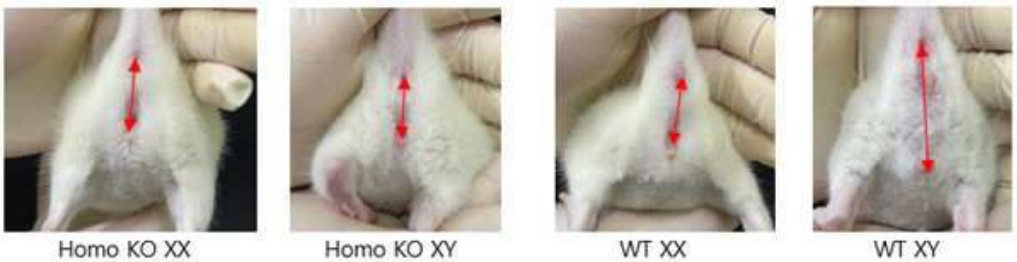
BW: Body Weight
VAT: Visceral Adipose Tissue; Perigonadal adipose tissue+perirenal adipose tissue
SCAT: Subcutaneous Adipose Tissue; Inguinal adipose tissue

도면5



*: p<0.05 **: p<0.01 ***: p<0.001
†: p<0.05, lower than control ‡: p<0.01, lower than control

도면6



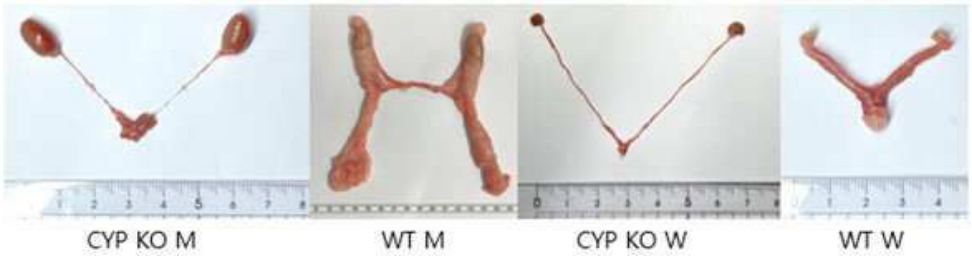
Homo KO XX
Age : 6w

Homo KO XY
Age : 5w

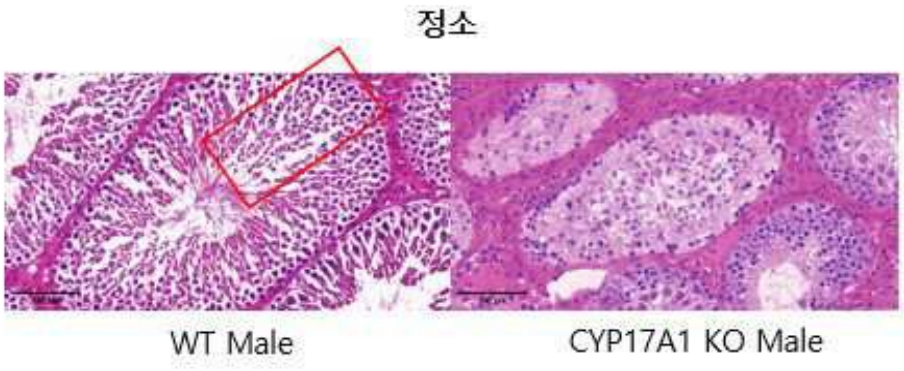
WT XX
Age : 6w

WT XY
Age : 4w

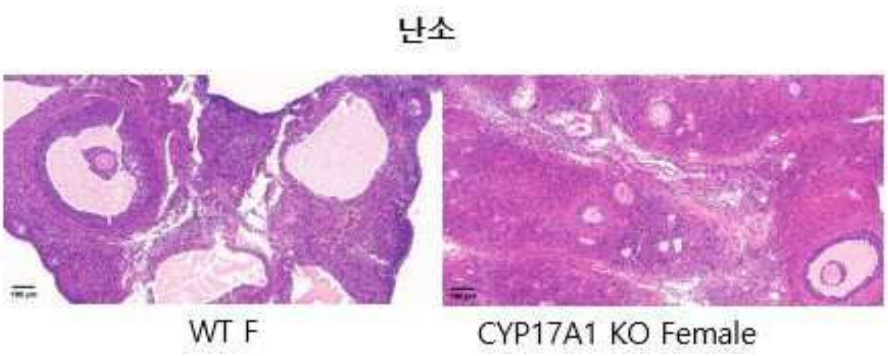
도면7



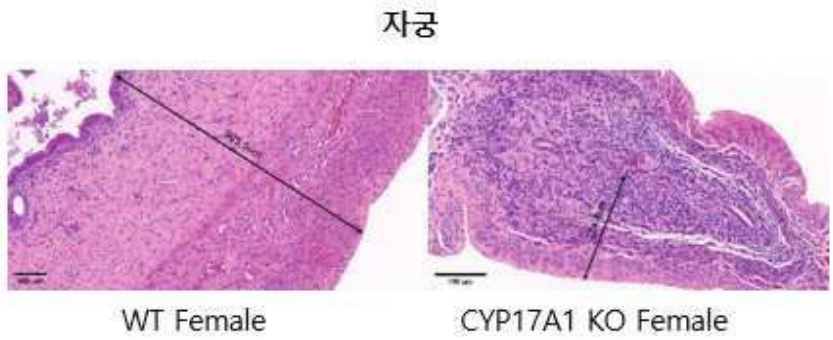
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.