(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年5月30日(30.05.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/110249 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A01K 67/0275 (2024.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/041539

(22) 国際出願日： 2024年11月22日(22.11.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-199332 2023年11月24日(24.11.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 広島大学(**HIROSHIMA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山１－３－２ (JP). 第一三共株式会社 (**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED**) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 (JP).

(72) 発明者: 紙谷 浩之 (**KAMIYA, Hiroyuki**); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目３番２号 国立大学法人広島大学内 (JP). 河合 秀彦 (**KAWAI, Hidehiko**); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目３番２号 国立大学法人広島大学内 (JP). 小泉 誠(**KOIZUMI, Makoto**); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 第一三共株式会社内 (JP). 小路 貴生(**SHOJI, Takao**); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 第一三共株式会社内 (JP).

(74) 代理人: 山本 修，外 (**YAMAMOTO, Osamu** et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁

(54) **Title:** COMPOSITION FOR NUCLEOTIDE SEQUENCE EDITING, AND NUCLEOTIDE SEQUENCE EDITING METHOD USING SAME

(54) 発明の名称： 塩基配列編集用組成物およびそれを使用する塩基配列編集方法

(57) **Abstract:** Provided are a composition and others, the composition containing a first single-stranded polynucleotide and a third single-stranded polynucleotide, wherein: the first single-stranded polynucleotide has a length of 50-200 nucleotides; the nucleotide sequence for the first single-stranded polynucleotide has 80% or higher sequence identity with the nucleotide sequence for a portion of an editing target strand in a target region present in double-stranded DNA in a cell, and includes at least one mutation for editing purpose selected from the group consisting of deletion, substitution and insertion of one nucleotide or a plurality of nucleotides compared with the nucleotide sequence for the editing target strand; the third single-stranded polynucleotide has a length of 15-200 nucleotides; the nucleotide sequence for the third single-stranded polynucleotide has 90% or higher sequence identity with a nucleotide sequence that is included in the editing target strand and is located closer to the 5'-terminus or the 3'-terminus than a position corresponding to the position of the mutation for editing purpose in the first single-stranded polynucleotide; and, in the editing target strand, the nucleotide sequence having the sequence identity with the first single-stranded polynucleotide and the nucleotide sequence having the sequence identity with the third single-stranded polynucleotide overlap with each other, or are located adjacent to each other, or are separated from each other with 1 to 9 nucleotides interposed therebetween.

(57) 要約：第１の一本鎖ポリヌクレオチドおよび第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５'末端側または３'末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている、組成物など。

WO 2025/110249 A1

［続葉有］

目２番１号 新大手町ビル２０６区 ユアサハラ法律特許事務所 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

塩基配列編集用組成物およびそれを使用する塩基配列編集方法

技術分野

[0001]　本発明は、塩基配列編集用組成物、それを使用する塩基配列編集方法などに関する。

背景技術

[0002]　2013年にCRISPR-Cas9が報告されると、多くの研究者がゲノム編集を行うようになった（非特許文献１および２）。ゲノム編集技術自体はそれ以前から存在しており、ZFN（zinc-fingerヌクレアーゼ）や転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）による方法が知られていたが、ゲノム上の所望部位の編集のためのシステムの設計および構築が容易ではないため、一部の研究者が用いるだけであった。CRISPR-Cas9による編集は、guide RNAと呼ばれる核酸の配列が切断位置を規定する。そのため、標的部位に合わせてguide RNAを変えるだけで、CRISPR-Cas9による編集が可能であるため、実験技術として汎用されている。また、農作物および家畜の改良等に応用され始めている。

[0003]　ゲノム中の標的部位でCRISPR-Cas9や他の人工ヌクレアーゼがDNAを切断した場合、細胞内での修復時に高い頻度でエラーが生じることを利用して、目的遺伝子をノックアウトする（機能を喪失させる）ことができる。一方、切断時に、切断部位と相同性を有する配列を含むドナーDNAが存在すると、低頻度ながらそのDNAが取り込まれることがあり、それを利用して所望の配列を挿入したり、塩基置換変異等を導入したりすることができる。しかし、これら人工ヌクレアーゼによるゲノム編集は、DNA切断を伴うことから、off-target部位での変異やon-target部位での予期しない変異も生じるため（非特許文献３および４）、医療への応用は極めて慎重に進める必要がある。また、基本知的財産権が国外機関にあるため、日本国内企業にとっては使いにくい技術である。

[0004] 一方、人工ヌクレアーゼを用いない塩基配列編集法として、紙谷らが開発した一本鎖DNA（ss DNA）または5'-tailed duplex（TD）による塩基配列編集法（特許文献１および２）が知られている（図１）。また、TDによる塩基配列編集法に関し、河合らは、TDのeditor鎖（E鎖、標的配列に対して変異を含む長い鎖）の鎖長の編集効率に与える影響を検討し、E鎖の鎖長が数百塩基であるTDよりも、E鎖の鎖長が100塩基以下であるTDを用いた方が、編集効率が高いことを見出した（非特許文献５および６）。

[0005] 特許文献３には、一本鎖形態のポリヌクレオチドを用いたゲノム編集技術について記載されている。当該技術において使用されている編集用ポリヌクレオチドは、一次編集部位を有しており、また、編集用ポリヌクレオチドの５’末端部および３’末端部の相補的配列とオーバーラップする領域を有する編集促進用ポリヌクレオチドを使用することも記載されている。また、編集用ポリヌクレオチドが、ＤＮＡ高親和性ヌクレオチドアナログを構成単位として含むことも記載されており、編集用ポリヌクレオチドの５’末端部および３’末端部の特定の位置にＤＮＡ高親和性ヌクレオチドアナログを含む場合にのみ編集活性の向上がみられたことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2005/075657号

特許文献2：国際公開第2006/064813号

特許文献3：国際公開第2023/190848号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013)

非特許文献2：P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, G. M. Church. RNA-guided human genome engin

eering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013)

非特許文献3：Y. Fu, J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung, J. D. Sander. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat. Biotechnol. 31, 822-826 (2013)

非特許文献4：M. Kosicki, K. Tomberg, A. Bradley. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. Nat. Biotechnol. 36, 765-771 (2018)

非特許文献5：H. Kawai, K. Yazama, Y. Yanai, R. Kamitsubo, H. Kamiya. Gene correction by 5'-tailed duplexes with short editor oligodeoxyribonucleotides. J. Biosci. Bioengng. 132, 552-559 (2021)

非特許文献6：H. Kawai, R. Kamitsubo, H. Kamiya. Correction of monomeric enhanced green fluorescent protein (mEGFP) gene by short 5'-tailed duplexes. J. Biosci. Bioengng. 134, 175-181 (2022)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 特許文献１または２に開示されたss DNAまたはTDによる塩基配列編集法のような、ヌクレアーゼを用いない塩基配列編集技術において、更なる編集効率の向上が望まれていた。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、E鎖またはTD（E鎖 + A鎖）に、E鎖が配列同一性を有する編集標的鎖と配列同一性を有する別の核酸（A'鎖）を加えることによって、編集効率が大幅に向上することを見出した。また、E鎖またはA鎖の特定位置に特定の化学修飾を導入することにより、編集効率が大幅に向上することを見出した。本発明者らは、さらに鋭意研究し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

［１］第１の一本鎖ポリヌクレオチドおよび第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている、

組成物。好ましくは、当該組成物は外来性ヌクレアーゼまたはそれを発現可能なポリヌクレオチドを含まず、且つ、それらと組み合わせて使用されることはない。

［２］第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内にある、［１］に記載の組成物。

［３］第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から４９～５１％の範囲内にある、［２］に記載の組成物。

［４］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、７０～１００塩基長である、［１］～［３］のいずれかに記載の組成物。

［５］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、前記編集用変異の位置ならびに５’末端から１０塩基の領域および３’末端から１０塩基の領域を除いた配列において、編集標的鎖における対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、［１］～［４］のいずれかに記載の組成物。

［６］第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記編集標的鎖におい

て第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有する、［１］～［５］のいずれかに記載の組成物。

［７］前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とが、隣接している、［１］～［６］のいずれかに記載の組成物。

［８］第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、５５～７５塩基長である、［１］～［７］のいずれかに記載の組成物。

［９］第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、編集標的鎖の対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、［１］～［８］のいずれかに記載の組成物。

［１０］下記特徴

（ａ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置ならびに前記編集用変異の位置の５’末端側１０塩基及び３’末端側１０塩基からなる領域において、少なくとも１つのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、および

（ｂ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含み、前記修飾ヌクレオチド間結合は、前記編集用変異の位置の５’末端側３塩基から３’末端側３塩基の範囲に存在しない

の少なくとも一方を有する、［１］～［９］のいずれかに記載の組成物。

［１１］糖修飾ヌクレオチドが、リボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドである、［１０］に記載の組成物。

［１２］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、５’末端および／または３’末端から１３塩基以内に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含む、［１０］または［１１］に記載の組成物。ここで好ましくは、修飾ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合である。より好ましくは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドが

、３’末端から５塩基以内に１～４個（より好ましくは、３塩基以内に２個、もしくは２塩基以内に１個）の修飾ヌクレオチド間結合を含み、修飾ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である。

［１３］第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる、［１］～［１２］のいずれかに記載の組成物。

［１４］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含む、［１３］に記載の組成物。

［１５］第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度と同じか、またはそれよりも高い、［１３］または［１４］に記載の組成物。

［１６］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含む、［１３］～［１５］のいずれかに記載の組成物。

［１７］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、５’末端および／または３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含む、［１６］に記載の組成物。好ましくは、第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

［１８］修飾ヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合である、［１０］～［１７］のいずれかに記載の組成物。

［１９］前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように、前記編集用変異を含む、［１］～［１９］のいずれかに記載の組成物。

［２０］［１９］に記載の組成物を含む、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物。

［２１］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の［１９］に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

［２２］変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、［１］～［１９］のいずれかに記載の組成物を導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法。ここで、当該方法はインビトロで行われてもよい。

［２３］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬品の製造における、［１］～［１９］のいずれかに記載の組成物の使用。

[0011] 本発明は、以下の発明も包含する。

［ａ１］第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、かつ

下記特徴

（ａ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置ならびに前記編集用変異の位置の５’末端側１０塩基及び３’末端側１０塩基からなる領域において、少なくとも１つのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、および

（ｂ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも１つの修飾ヌク

レオチド間結合を含み、前記修飾ヌクレオチド間結合は、前記編集用変異の位置の５’末端側３塩基から３’末端側３塩基の範囲に存在しない
の少なくとも一方を有する、組成物。好ましくは、当該組成物は外来性ヌクレアーゼまたはそれを発現可能なポリヌクレオチドを含まず、且つ、それらと組み合わせて使用されることはない。

［ａ２］糖修飾ヌクレオチドが、リボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドである、［ａ１］に記載の組成物。

［ａ３］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、５’末端および／または３’末端から１３塩基以内に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含む、［ａ１］または［ａ２］に記載の組成物。ここで好ましくは、修飾ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合である。より好ましくは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、３’末端から５塩基以内に１～４個（より好ましくは、３塩基以内に２個、もしくは２塩基以内に１個）の修飾ヌクレオチド間結合を含み、修飾ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である。

［ａ４］第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内にある、［ａ１］～［ａ３］のいずれかに記載の組成物。

［ａ５］第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から４９～５１％の範囲内にある、［ａ４］に記載の組成物。

［ａ６］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、７０～１００塩基長である、［ａ１］～［ａ５］のいずれかに記載の組成物。

［ａ７］第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成

することができる、［ａ１］～［ａ６］のいずれかに記載の組成物。

［ａ８］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含む、［ａ７］に記載の組成物。

［ａ９］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、５’末端および／または３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含む、［ａ８］に記載の組成物。好ましくは、第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

［ａ１０］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含む、［ａ７］～［ａ９］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１１］修飾ヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合である、［ａ１］、［ａ３］、［ａ８］または［ａ９］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１２］第３の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている、［ａ１］～［ａ１１］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１３］第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有する、［ａ１２］に記載の組成物。

［ａ１４］前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列

同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とが、隣接している、［ａ１２］または［ａ１３］に記載の組成物。

［ａ１５］第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、５５～７５塩基長である、［ａ１２］～［ａ１４］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１６］第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、編集標的鎖の対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、［ａ１２］～［ａ１５］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１７］第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度と同じか、またはそれよりも高い、［ａ１２］～［ａ１６］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１８］前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように、前記編集用変異を含む、［ａ１］～［ａ１７］のいずれかに記載の組成物。

［ａ１９］［ａ１８］に記載の組成物を含む、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物。

［ａ２０］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の［ａ１８］に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

［ａ２１］変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、［ａ１］～［ａ１８］のいずれかに記載の組成物を導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、

方法。ここで、当該方法はインビトロで行われてもよい。

［ａ２２］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬品の製造における、［ａ１］～［ａ１８］のいずれかに記載の組成物の使用。

[0012] 本発明は、以下の発明も包含する。

［ｂ１］第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と併用するための第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む医薬組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れており、

前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように、前記編集用変異を含む、

医薬組成物。好ましくは、当該組成物は外来性ヌクレアーゼまたはそれを発現可能なポリヌクレオチドを含まず、且つ、それらと組み合わせて使用されることはない。

［ｂ２］第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有する、［ｂ１］に記載の医薬組成物。

［ｂ３］前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とが、隣接している、［ｂ１］または［ｂ２］に記載の医薬組成物。

［ｂ４］第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、５５～７５塩基長である、［ｂ１］～［ｂ３］のいずれかに記載の医薬組成物。

［ｂ５］第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、編集標的鎖の対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、［ｂ１］～［ｂ４］のいずれかに記載の組成物。

［ｂ６］第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内にある、［ｂ１］～［ｂ５］のいずれかに記載の医薬組成物。

［ｂ７］第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から４９～５１％の範囲内にある、［ｂ６］に記載の医薬組成物。

［ｂ８］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、７０～１００塩基長である、［ｂ１］～［ｂ７］のいずれかに記載の医薬組成物。

［ｂ９］第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、前記編集用変異の位置ならびに５’末端から１０塩基の領域および３’末端から１０塩基の領域を除いた配列において、編集標的鎖における対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、［ｂ１］～［ｂ８］のいずれかに記載の組成物。

［ｂ１０］第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる、［ｂ１］～［ｂ９」のいずれかに記載の医薬組成物。

［ｂ１１］第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含む、［ｂ１０］に記載の医薬組成物。

［ｂ１２］第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度と同じか、またはそれよりも高くなるように使用される、［ｂ１０］または［ｂ１１］に記載の医薬組成物。

［ｂ１３］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための、［ｂ１］～［ｂ１２］のいずれかに記載の医薬組成物。

［ｂ１４］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の［ｂ１３］に記載の医薬組成物を、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と、同時に、別々にまたは連続して対象に投与することを含む、方法。

［ｂ１５］変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、［ｂ１］～［ｂ１３］のいずれかに記載の医薬組成物を、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と同時に、別々にまたは連続して導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法。ここで、当該方法はインビトロで行われてもよい。

［ｂ１６］細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬品の製造における、［ｂ１］～［ｂ１２］のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、ss DNAまたはTDを利用した編集法において、細胞内のＤＮＡに対して所望の塩基編集を施すことができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]従来技術である一本鎖DNA（ss DNA）または5'-tailed duplex（TD）による塩基配列編集法において使用されるポリヌクレオチド、ならびに本発明の特定の実施形態における第１～第３の一本鎖ポリヌクレオチドの模式図である。

[図2]TDによる塩基配列編集法におけるA'鎖の追加による編集効率の変化を、copGFP遺伝子を標的遺伝子として用いて検討した実施例１の実験結果を示す。A'鎖を追加した場合の蛍光顕微鏡画像の拡大図を矢印の先に示す。

[図3]実施例１の実験結果を編集効率（％）として表したグラフである。Bars indicate SEM (n=3).

[図4]TDによる塩基配列編集法におけるA'鎖の追加による編集効率の変化を、mEGFP遺伝子を標的遺伝子として用いて検討した実施例２の実験結果を示す。A'鎖を追加した場合の蛍光顕微鏡画像の拡大図を矢印の先に示す。

[図5]実施例２の実験結果を編集効率（％）として表したグラフである。Bars indicate SEM (n=3).

[図6]実施例３（３－１）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、修飾が施された鎖、PS修飾の位置および数が示されている。Bars indicate SEM (n=3).

[図7]実施例３（３－２）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、修飾が施された鎖、PS修飾の位置および数が示されている。Bars indicate SEM (n=3).

[図8]実施例３（３－３）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるPS修飾の位置が示されている。Bars indicate SEM. **: P＜0.01; ***: P＜0.001 (n=3) ; n-TD' vs others.

[図9]実施例３（３－４）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、修飾が施された鎖、およびP-Me修飾またはP-OEt修飾の位置が示されている。n=3。

[図10]実施例３（３－５）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、A鎖におけるP-OEt修飾またはPS修飾の位置および数が示されてい

る。Bars indicate SEM. *: P＜0.05 (n=3) .

[図11]実施例３（３－６）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; *: *P＜0.01; ***: P＜0.001 (n=3) ; n-TD' vs others.

[図12]実施例３（３－７）の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。右側の6つの試料では、A鎖にP-OEt修飾が1つ施されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01 (n=3) .

[図13]実施例４の結果を示すグラフである。

[図14]実施例５の結果を示すグラフである。横軸には、各試料中のE鎖、A鎖、およびA'鎖のモル比（E鎖：A鎖：A'鎖）が示されている。

[図15]Aは、実施例６で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。Bは、実施例６の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、ギャップの数が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; ***: P＜0.001 (n=3) .

[図16]Aは、実施例７で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。Bは、実施例７の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖とA'鎖とで重複する塩基数が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01 (n=3) .

[図17]Aは、実施例８で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。Bは、実施例８の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、A鎖の鎖長が伸びた方向（5'側または3'側）、A鎖の鎖長、およびA鎖がE鎖中の変異を含む部分と相補的な塩基配列を含む場合の当該塩基配列が野生型（WT）か変異型（Y/H）かの区別が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01; ***: P＜0.001 (n=3) ; n-TD' (35A) vs others.

[図18]Aは、実施例９で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。Bは、実施例９の結果を示すグラフである。横軸の各

試料名の括弧内には、A鎖の3'末端の塩基に相補的なE鎖上の塩基を-1位とする変異の位置、およびA鎖がE鎖中の変異を含む部分と相補的な塩基配列を含む場合の当該塩基配列が野生型（WT）か変異型（Y/H）かの区別が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01 (n=3) ; n-TD' (A 40-WT) vs others.

[図19]Aは、実施例１０で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。Bは、実施例１０の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、各試料中のpDNA、E鎖、A鎖、およびA'鎖のモル比（pDNA：E鎖：A鎖：A'鎖）が示されている。Bars indicate SEM. *:P＜0.05; ***:P＜0.001.

[図20]実施例１１の結果を示す。A'鎖を追加したTDによりゲノム編集を行った結果を示す。

[図21]実施例１２の結果を示すグラフである。Bars indicate SEM. *P＜0.05 (n=3) .

[図22]実施例１３の結果を示すグラフである。Bars indicate SEM. *P＜0.05, **P＜0.01 (n=3) .

[図23]実施例１４の結果を示すグラフである。

[図24]実施例１５の結果を示すグラフである。

[図25]実施例１６で使用したプラスミドの図である。

[図26]実施例１６の結果を示すグラフである。蛍光消失型copGFPを組み込んだpcDNA4_mPlum_T2A_copGFP Y/HをAS n-TD' により編集した際の効率を1とする、相対編集効率を示す。Bars indicate SEM. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 (n=3).

[図27]Aは実施例１７－１で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。鎖長79塩基のE鎖および鎖長35塩基の各ODNの配置および名称が示されている。Bは、実施例１７－１の実験結果を、編集効率（%）として表したグラフである。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01 (n=3) ; n-E鎖のみ vs others.

[図28]実施例１７－２の実験結果を、編集効率（%）として表したグラフである。横軸の数値は、編集効率解析用のpDNAの導入量を1とした場合の、E鎖、A鎖および鎖長35塩基のA'鎖のモル比での用量を示している。

[図29]実施例１７－３の実験結果を、編集効率（%）として表したグラフである。横軸の数値は、編集効率解析用のpDNAの導入量を1とした場合の、E鎖、A鎖および鎖長35塩基のA'鎖のモル比での各用量を示している。

[図30]実施例１７－４の実験結果を、編集効率（%）として表したグラフである。横軸の数値は、編集効率解析用のpDNAの導入量を1とした場合の、E鎖、A鎖および鎖長35塩基のA'鎖のモル比での各用量を示している。

[図31]Aは、実施例１７－５で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。鎖長79塩基のE鎖、A鎖、および異なる鎖長のA'鎖の配置および名称が示されている。Bは、実施例１７－５の実験結果を編集効率（%）として表したグラフである。

[図32]実施例１７－６の実験結果を、編集効率（%）として表したグラフである。

[図33]実施例１７－７について、蛍光強度データからの解析値を縦軸、導入したプラスミド（mPlum-T2A-copGFP（正常型）発現ベクタープラスミドおよびmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド）中のmPlum-T2A-copGFP（正常型）発現ベクタープラスミドの割合（%）を横軸にプロットしたグラフである。直線は、copGFP（正常型）発現ベクターの割合が50%までの解析値から求めた回帰直線である。yは直線の傾き、R^2は直線関係の決定係数を示す。

[図34]実施例１７－８（実施例１７－６の編集効率を実施例１７－７の方法で求めた）の実験結果を、編集効率（%）として表したグラフである。

[図35]実施例１８－１の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図36]実施例１８－２の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図37]実施例１８－３の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図38]実施例１８－４の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01 (n=3) ; n-TD’ vs others.

[図39]実施例１８－５の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。Bars indicate SEM. *: P＜0.05; **: P＜0.01; ***: P＜0.05 (n=3) ; n-TD’ vs others.E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図40]実施例１８－６の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図41]実施例１８－７の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図42]Aは、実施例１８－８で使用された編集用核酸の構成要素の、標的領域に対する配置を示す図である。B～Eは、実施例１８－８の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、A鎖の鎖長および／またはE鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図43]実施例１８－９の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、E鎖におけるLNA修飾の位置が示されている。

[図44]実施例１８－１０の結果を示すグラフである。横軸の各試料名の括弧内には、A鎖の鎖長が示されている。

[図45]実施例１８－１１の結果を示すグラフである。Aは、copGFP遺伝子に対する編集効率を示すグラフである。Bは、DMD遺伝子に対する編集効率を示すグラフである。Cは、WRN遺伝子に対する編集効率を示す図である。

[図46]pNGS2-K3の構造を示す図である。

[図47]実施例１９の結果を示すグラフである。n.s: 有意差なし。

[図48]実施例２０の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0016] １．定義

本明細書中、「細胞内の二本鎖ＤＮＡ」とは、生体内に存在して生体を構成している細胞または単離された細胞（例えば培養細胞）中に存在する、任意の二本鎖ＤＮＡを意味する。二本鎖ＤＮＡは、タンパク質またはＲＮＡ産物をコードする領域およびその発現を調節するための領域を含み得る。細胞内の二本鎖ＤＮＡは、内因性の二本鎖ＤＮＡ（ゲノムＤＮＡおよびミトコンドリアＤＮＡ）または外因性の二本鎖ＤＮＡ（細胞内に導入された外来ＤＮＡ、ウイルスゲノムなど）であり得る。

[0017] 本明細書中、「標的領域」とは、細胞内の二本鎖ＤＮＡのうち、変異を導入したい塩基配列を含む領域を意味する。標的領域は、細胞内の二本鎖ＤＮＡのうち、いずれの領域であってもよく、例えば、構造遺伝子領域、調節遺伝子領域等の一部または全部を含む領域であり得る。構造遺伝子領域は、タンパク質のアミノ酸配列を規定している領域であり、真核細胞の構造遺伝子領域には、エクソンおよびイントロンの両者が含まれ得る。調節遺伝子領域としては、例えば、オペレーター領域、プロモーター領域、アテニュエーター領域等が挙げられる。なお、二本鎖ＤＮＡにコードされている遺伝子との関係から、標的領域を構成する一方の鎖をセンス鎖、他方の鎖をアンチセンス鎖と呼ぶことがある。

[0018] 本明細書中、「塩基配列編集」とは、塩基配列に対して意図された変異を導入することをいう。本明細書において、「変異」とは、基準となる塩基配列の、1つまたは複数の塩基が欠失、置換または挿入されること、或いはそれらの2種類以上の組み合わせを意味する。基準となる塩基配列とは、通常、天然のまたは正常な塩基配列を意味するが、これに限られない。

[0019] 本明細書中、「編集効率」とは、特に明記されない限り、細胞内の二本鎖ＤＮＡに対する塩基配列編集において、編集用核酸が導入された細胞のうち

、編集が成功した細胞の割合（百分率）をいう。実施例のようにインビトロの実験において編集効率を算出する場合には、細胞内の標的領域のコピー数を考慮した実施例１に記載された算出方法および細胞内の標的領域のコピー数を考慮しない実施例１７－１に記載された算出方法のいずれも利用され得る。

[0020] 本明細書中、「外来性ヌクレアーゼ」とは、本発明の塩基配列編集を施す対象の生物種が内因性に保有しないヌクレアーゼを意味する。外来性ヌクレアーゼは、本発明の塩基配列編集を施す対象の生物種によって変わり得るが、例えば、真核生物ではない生物種に由来するヌクレアーゼ、哺乳動物ではない生物種に由来するヌクレアーゼ、あるいはヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ又はウシではない生物種に由来するヌクレアーゼであり得る。外来性ヌクレアーゼには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬＥＮなどの完全に人工的なヌクレアーゼおよびＣａｓヌクレアーゼなどの細菌由来のヌクレアーゼも含まれる。

[0021] 本明細書中、「Tailed Duplex」または「TD」とは、５’末端または3’末端に一本鎖部分を有する二本鎖ポリヌクレオチドをいう。TDは、当業者に知られた方法によって適宜作製することができ、例えば、一本鎖ポリヌクレオチドとその一部の塩基配列に相補的な塩基配列を有する別の一本鎖ポリヌクレオチドとを混合すること、または両者を互いにハイブリダイズさせることによって作製することができる。

[0022] 本明細書中、「一本鎖ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドモノマーが鎖状に共有結合した分子をいい、ＤＮＡ、ＲＮＡ、およびＤＮＡ／ＲＮＡキメラのいずれであってもよい。一本鎖ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド（修飾塩基を有するヌクレオチド及び／若しくは糖修飾ヌクレオチド）または修飾ヌクレオチド間結合を含んでもよい。

[0023] 本明細書中、「修飾塩基」とは、ヌクレオチド塩基であって、１つ以上の原子または基の置換または付加によって修飾されたものをいう。修飾塩基は、天然または合成の非修飾塩基とは構造的に異なるが、機能的に交換可能で

ある。修飾塩基には、本発明の属する技術分野で知られている修飾の全ての様式が含まれる。そのような修飾としては、例えば、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化、もしくはアセチル化、またはそれらの様々な組み合わせが挙げられる。修飾塩基としては、例えば、５－メチルシトシンなどが挙げられる。

[0024] 本明細書中、「糖修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの糖部分が修飾されているヌクレオチドをいう。糖修飾ヌクレオチドには、本発明の属する技術分野で知られている糖修飾の全ての様式が含まれる。糖修飾ヌクレオチドには、例えばリボース環を有するヌクレオチドの場合であれば、２’－修飾ヌクレオチド、４’－チオ修飾ヌクレオチド、４’－チオ－２’－修飾ヌクレオチドおよび二環式糖修飾ヌクレオチドが含まれる。

[0025] ２’－修飾ヌクレオチドの例としては、ハロ、アリル、アミノ、アジド、Ｏ－アリル、Ｏ－Ｃ１－Ｃ１０アルキル、OCF_3、$O-(CH_2)_2-O-CH_3$、２’－$O(CH_2)_2SCH_3$、$O-(CH_2)_2-O-N(Rm)(Rn)$、または$O-CH_2-C(=O)-N(Rm)(Rn)$が挙げられ、各ＲｍとＲｎは個別にＨ、アミノ保護基、または置換あるいは非置換Ｃ１－Ｃ１０アルキルである。2’-0-メチルグアノシン、2’-0-メチルアデノシン、2’-0-メチルシチジン、および2’-0-メチルウリジンについては、市販のアミダイト試薬を用いることができる。2’-0-アミノエチルグアノシン、2’-0-アミノエチルアデノシン、2’-0-アミノエチルシチジン、および2’-0-アミノエチルウリジンは、文献（Blommers et al. Biochemistry (1998), 37, 17714-17725.）記載のアミダイト試薬を用いて合成できる。2’-0-プロピルグアノシン、2’-0-プロピルアデノシン、2’-0-プロピルシチジン、および2’-0-プロピルウリジンは、文献（Lesnik,E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.）に従って合成できる。2’-0-アリルグアノシン、2’-0-アリルアデノシン、2’-0-アリルシチジン、および2’-0-アリルウリジンについては、市販のアミダイト試薬を用いることができる。2’-0-メトキシエチルグアノシン、2’-0-メトキシエチルアデノシン、2’-0-メトキシエチルシチジン、および2’-0-メトキ

シエチルウリジンは、特許（US6261840）または、文献（Martin, P. Helv. Chim. Acta. (1995) 78, 486-504.に従って合成できる。2'-O-ブチルグアノシン、2'-O-ブチルアデノシン、2'-O-ブチルシチジン、および2'-O-ブチルウリジンは、文献（Lesnik,E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.）記載のアミダイト試薬を用いて合成できる。2'-O-ペンチルグアノシン、2'-O-ペンチルアデノシン、2'-O-ペンチルシチジン、および2'-O-ペンチルウリジンは、文献（Lesnik,E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.）に従って合成できる。2'-O-プロパルギルグアノシン、2'-O-プロパルギルアデノシン、2'-O-プロパルギルシチジン、および2'-O-プロパルギルウリジンについては、市販のアミダイト試薬を用いることができる。

[0026] 4'－チオ修飾ヌクレオチドの例としては、4'－酸素原子が硫黄原子で置換されたβ－D－リボヌクレオチドを挙げることができる（Ｈｏｓｈｉｋａ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５７９，ｐ．３１１５－３１１８，（２００５）；Ｄａｎｄｅ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４９，ｐ．１６２４－１６３４（２００６）；Ｈｏｓｈｉｋａ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ．８，ｐ．２１３３－２１３８，（２００７））。

[0027] 4'－チオ－2'－修飾ヌクレオチドの例としては、2'－H、または、2'－O－メチルを保持する4'－チオ－2'－修飾ヌクレオチドを挙げることができ（Ｍａｔｓｕｇａｍｉ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３６，１８０５（２００８））。

[0028] 二環式糖修飾ヌクレオチドの例としては、リボース環の２原子を架橋することによって形成された第二の環を保持するヌクレオチドを挙げることができる。二環式糖修飾の例としては、2'－O，4'－C－架橋化修飾、例えば、2'－酸素原子と4'－炭素原子をメチレン鎖で架橋した2'，4'－ＢＮＡ／ＬＮＡ（ｂｒｉｄｇｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ／ｌｏｃｋｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ）（Ｏｂｉｋａ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，３８，ｐ．８７３５－（１９

９７）．；Ｏｂｉｋａ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，３９，ｐ．５４０１－（１９９８）．；Ａ．Ａ．Ｋｏｓｈｋｉｎ，Ａ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，５４，ｐ．３６０７（１９９８）．；Ｏｂｉｋａ，Ｓ．Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，９，ｐ．１００１（２００１）．）、２’，４’－ＢＮＡ／ＬＮＡのメチレン鎖を一炭素延ばしたエチレン鎖で架橋したＥＮＡ（２’－Ｏ，４’－Ｃ－ｅｔｈｙｌｅｎｅ－ｂｒｉｄｇｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ）を挙げることができる（Ｍｏｒｉｔａ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１２，ｐ．７３（２００２）．；Ｍｏｒｉｔａ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１１，ｐ．２２１１（２００３）．）。また、ＷＯ２０１４／１０９３８４記載のＡｍＮＡ、又は、文献（Seth,P.P. et al. J.Org.Chem (2010), 75, 1569-1581.）記載のＳ－ｃＥｔ（２’，４’－ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ ｅｔｈｙｌ）も例として挙げることができる。なお、リボース環の修飾において、「２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋」と「４’－CH_2－Ｏ－２’架橋」とは同義である。

[0029] 本明細書中、「修飾ヌクレオチド間結合」とは、天然に存在する２つのヌクレオシド間のリン酸部の結合（すなわち、ホスホジエステル結合）に置換または変化が加えられた結合をいう。すなわち、修飾ヌクレオチド間結合を含むポリヌクレオチドは、少なくとも１つのヌクレオチドのリン酸基の修飾を含む。修飾ヌクレオチド間結合には、本発明の属する技術分野で知られている修飾の全ての様式が含まれる。修飾ヌクレオチド間結合としては、例えばホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、ホスホロアミデート結合、ホスホトリエステル結合などが挙げられる。アルキルホスホネート結合には、例えば、ホスホジエステル結合において非架橋酸素原子をメチル基に置換した修飾がなされた結合（P-CH_3；メチルホスホネート結合）が含まれる。ホスホトリエステル結合には、例えば、ホスホジエステル結合において非架橋酸素原子を

エトキシ基に置換した修飾がなされた結合（P-OC_2H_5；エチルホスホトリエステル結合）が含まれる。

[0030] ２．E鎖およびA’鎖またはE鎖＋A鎖（Tailed Duplex（TD））およびA’鎖による塩基配列編集

一態様において、本発明は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドおよび第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている、

組成物を提供する（以下、本発明の組成物Ｉともいう。）。

[0031] 本発明の組成物Ｉを細胞内に導入することにより、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に対して、第１の一本鎖ポリヌクレオチドに含まれる編集用変異に応じた塩基配列編集を行うことができる。すなわち、本発明の組成物Ｉは、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に対して変異を導入するために使用することができる。また、本発明の組成物Ｉによる塩基配列編集は、外来性ヌクレアーゼを必要としない。したがって、好ましい実施形態において、本発明の組成物Ｉは、外来性ヌクレアーゼまたはそれを発現可能なポリヌクレオチドを含まず、且つ、それらと組み合わせて使用されることはない。

[0032] 本発明において、編集標的鎖は、標的領域における二本鎖のいずれか一方の鎖、すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖を意味する。好ましい態様において、編集標的鎖は、アンチセンス鎖であり得る。

[0033] 第１の一本鎖ポリヌクレオチド（本明細書中、E鎖（Editor鎖）ともいう。）の塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの変異を含む。本明細書中、第１の一本鎖ポリヌクレオチドに含まれる上記変異を、編集用変異という。編集用変異は、例えば、１～１０個（１０個、９個、８個、７個、６個、５個、４個、３個、２個、または１個）のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択され得る。編集用変異は、複数の異なる編集用変異の組合せであってもよい。複数の編集用変異が含まれる場合、それらは、数塩基の範囲内（例えば１０塩基、９塩基、８塩基、７塩基、６塩基、５塩基、４塩基、３塩基、または２塩基以内）で近接して存在することが好ましい。より好ましい態様において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と比較して、１ヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される１つの編集用変異のみを含み得る。

[0034] 第１の一本鎖ヌクレオチドにおける前記編集用変異は、５’末端近傍または３’末端近傍に存在するよりも、中央付近に存在する方が、編集効率が高い傾向がある。したがって、好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドで前記編集用変異が導入された位置は、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内、例えば３０～７０％の範囲内、３５～６５％の範囲内、４０～６０％の範囲内、または４５～５５％の範囲内、より好ましくは４９～５１％の範囲内にあり得る。

[0035] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、５０～２００塩基長の範囲内であって塩基配列編集が可能である限り特に限定されず、例えば、５５～２００塩基長、６０～２００塩基長、６５～２００塩基長、７０～２００塩基長

、５０～１９５塩基長、５５～１９５塩基長、６０～１９５塩基長、６５～１９５塩基長、７０～１９５塩基長、５０～１９０塩基長、５５～１９０塩基長、６０～１９０塩基長、６５～１９０塩基長、７０～１９０塩基長、５０～１８５塩基長、５５～１８５塩基長、６０～１８５塩基長、６５～１８５塩基長、７０～１８５塩基長、５０～１８０塩基長、５５～１８０塩基長、６０～１８０塩基長、６５～１８０塩基長、７０～１８０塩基長、５０～１７５塩基長、５５～１７５塩基長、６０～１７５塩基長、６５～１７５塩基長、７０～１７５塩基長、５０～１７０塩基長、５５～１７０塩基長、６０～１７０塩基長、６５～１７０塩基長、７０～１７０塩基長、５０～１６５塩基長、５５～１６５塩基長、６０～１６５塩基長、６５～１６５塩基長、７０～１６５塩基長、５０～１６０塩基長、５５～１６０塩基長、６０～１６０塩基長、６５～１６０塩基長、７０～１６０塩基長、５０～１５５塩基長、５５～１５５塩基長、６０～１５５塩基長、６５～１５５塩基長、７０～１５５塩基長、５０～１５０塩基長、５５～１５０塩基長、６０～１５０塩基長、６５～１５０塩基長、７０～１５０塩基長、５０～１４５塩基長、５５～１４５塩基長、６０～１４５塩基長、６５～１４５塩基長、７０～１４５塩基長、５０～１４０塩基長、５５～１４０塩基長、６０～１４０塩基長、６５～１４０塩基長、７０～１４０塩基長、５０～１３５塩基長、５５～１３５塩基長、６０～１３５塩基長、６５～１３５塩基長、７０～１３５塩基長、５０～１３０塩基長、５５～１３０塩基長、６０～１３０塩基長、６５～１３０塩基長、７０～１３０塩基長、５０～１２５塩基長、５５～１２５塩基長、６０～１２５塩基長、６５～１２５塩基長、７０～１２５塩基長、５０～１２０塩基長、５５～１２０塩基長、６０～１２０塩基長、６５～１２０塩基長、７０～１２０塩基長、５０～１１５塩基長、５５～１１５塩基長、６０～１１５塩基長、６５～１１５塩基長、７０～１１５塩基長、５０～１１０塩基長、５５～１１０塩基長、６０～１１０塩基長、６５～１１０塩基長、７０～１１０塩基長、５０～１０５塩基長、５５～１０５塩基長、６０～１０５塩基長、６５～１０５塩基長、７０～１０５塩基長、５

０～１００塩基長、５５～１００塩基長、６０～１００塩基長、６５～１００塩基長、７０～１００塩基長、５０～９５塩基長、５５～９５塩基長、６０～９５塩基長、６５～９５塩基長、７０～９５塩基長、５０～９０塩基長、５５～９０塩基長、６０～９０塩基長、６５～９０塩基長、または７０～９０塩基長、好ましくは５０～１００塩基長、６０～１００塩基長、７０～１００塩基長、または６０～９０塩基長であり得る。第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、例えば、５０塩基長以上、５５塩基長以上、６０塩基長以上、６５塩基長以上、または７０塩基長以上、かつ、２００塩基長以下、１９５塩基長以下、１９０塩基長以下、１８５塩基長以下、１８０塩基長以下、１７５塩基長以下、１７０塩基長以下、１６５塩基長以下、１６０塩基長以下、１５５塩基長以下、１５０塩基長以下、１４５塩基長以下、１４０塩基長以下、１３５塩基長以下、１３０塩基長以下、１２５塩基長以下、１２０塩基長以下、１１５塩基長以下、１１０塩基長以下、１０５塩基長以下、１００塩基長以下、９５塩基長以下、または９０塩基長以下であり得る。

[0036] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有する。本明細書中、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を示す編集標的鎖上の配列を、「Ｅ鎖対応配列」とも言う。一実施形態において、編集用変異による編集効率を向上させ得る限り、また細胞内の二本鎖ＤＮＡに目的外の変異が導入されない限り、編集用変異以外の部位（例えば5’末端近傍（末端から10塩基、7塩基、5塩基、4塩基、3塩基、2塩基又は1塩基の領域）または３’末端近傍（末端から10塩基、7塩基、5塩基、4塩基、3塩基、2塩基又は1塩基の領域））において、数塩基（例えば１０塩基、９塩基、８塩基、７塩基、６塩基、５塩基、４塩基、３塩基、２塩基、または１塩基）のＥ鎖対応配列と相違する塩基または配列を含んでもよい。第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列とＥ鎖対応配列との配列同一性は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの鎖長および含まれる変異によって異なり得るが、例えば８１％以上、８２％以上、８３％以上、８４％以上、８５％以上、８６％

以上、８７％以上、８８％以上、８９％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、または９９％以上であり得る。特定の実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記編集用変異の位置ならびに５’末端から１０塩基の領域および３’末端から１０塩基の領域を除いた配列において、編集標的鎖における対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなり得る。特定の実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、塩基配列編集のために導入された編集用変異のみにおいてＥ鎖対応配列と相違し得る。すなわち、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記編集用変異を除いた配列において、編集標的鎖における対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなり得る。

[0037] Ｅ鎖対応配列として編集標的鎖上のいずれの配列を選定するかは、編集部位の位置を考慮して適宜なされ得る。本発明のＥ鎖対応配列の一態様として、ＧＣ含量がより高くなるようにＥ鎖対応配列を選定してもよい。この場合、第１の一本鎖ポリヌクレオチドのＧＣ含量は、例えば５０％、５５％以上、６０％以上、または６５％以上であり得る。

[0038] 一態様において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端から３’末端に向けて、0～10塩基の「５’末端配列」、25～100塩基の「５’同一配列」、0～10塩基の「変異配列」、25～100塩基からなる「３’同一配列」、0～10塩基の「３’末端配列」、の順に配置された塩基配列からなるポリヌクレオチドであり得る。ここで、５’末端配列及び３’末端配列は、Ｅ鎖対応配列における対応する塩基配列と10塩基以下のミスマッチを含んでいてもよい塩基配列である。５’同一配列及び３’同一配列は、Ｅ鎖対応配列における対応する塩基配列と同一の塩基配列である。５’末端配列において、５’同一配列と接する塩基は、Ｅ鎖対応配列とミスマッチの塩基である。３’末端配列において、３’同一配列と接する塩基は、Ｅ鎖対応配列とミスマッチの塩基である。変異配列は、編集用変異を含む塩基配列であり、一部がＥ鎖対応配列における対応する配列または塩基に対して同一の配列または塩基であ

ってもよい。変異配列は、編集用変異が置換または挿入である場合には、５’同一配列または３’同一配列と編集用変異の塩基において接し、編集用変異が欠失である場合には、５’同一配列または３’同一配列と当該欠失部位で接する。好ましくは、５’末端配列及び３’末端配列に含まれるミスマッチは、それぞれ1塩基以下であり（第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、５’末端10塩基以内にミスマッチが存在しない場合、５’末端配列は存在せず、３’末端10塩基以内にミスマッチが存在しない場合、３’末端配列は存在しない。）、更に好ましくは５’末端配列及び３’末端配列は存在しない。好ましい実施形態において、５’末端配列および５’同一配列の合計の長さと３’同一配列および３’末端配列の合計の長さとの比は、２５：７５～７５：２５の範囲内、例えば、３０：７０～７０：３０の範囲内、３５：６５～６５：３５の範囲内、４０：６０～６０：４０の範囲内、または４５：５５～５５：４５の範囲内であり得、より好ましくは、４９：５１～５１：４９の範囲内であり得、最も好ましくは、５０：５０であり得る。

[0039] 第３の一本鎖ポリヌクレオチド（本明細書中、A’鎖ともいう。）は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと組み合わせることにより、第１の一本鎖ポリヌクレオチドのみにより塩基配列編集を行った場合よりも、編集効率を向上させることができる。ここで、「第３の一本鎖ポリヌクレオチド」とは便宜的な呼称であって、必ずしも第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）が本発明の組成物Ｉの構成成分であることを意味するものではない。E鎖およびA鎖を含むTDは従来から知られていたため、E鎖およびA鎖をそれぞれ第１の一本鎖ポリヌクレオチドおよび第２の一本鎖ポリヌクレオチドとしてまず特定した。それらとA’鎖とを区別するために、「第３」との語を使用した。したがって、「第３の一本鎖ポリヌクレオチド」との用語自体は、本発明の組成物Ｉに第２の一本鎖ポリヌクレオチドが含まれることを意味するものではない。また、第１の一本鎖ポリヌクレオチド（E鎖）および第３の一本鎖ポリヌクレオチド（A’鎖）は、必ずしも第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）と組み合わせて用いられる必要はない。

[0040] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている。本明細書中、第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を示す編集標的鎖上の配列を、「Ａ’鎖対応配列」とも言う。

[0041] 本発明において、「隣接している」とは、編集標的鎖においてＥ鎖対応配列の５’末端側または３’末端側に、塩基を空けずに、連続してＡ’鎖対応配列が配置されることを意味する。図１には、編集標的鎖においてＥ鎖対応配列の５’末端側にＡ’鎖対応配列が配置され、Ｅ鎖対応配列とＡ’鎖対応配列とが、隣接しているか、または１～９塩基離れている場合の配置が示されている。

[0042] 編集標的鎖において、Ｅ鎖対応配列とＡ’鎖対応配列とが重複しているか、または１～９塩基離れている場合であっても、そのような第３の一本鎖ポリヌクレオチドを第１の一本鎖ポリヌクレオチドと組み合わせることにより、編集効率は向上するが、編集標的鎖において、Ｅ鎖対応配列とＡ’鎖対応配列とが隣接していることが好ましい。

[0043] 一実施形態において、第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し得る。

[0044] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、編集効率を向上させる効果が失われない限り、編集標的鎖の塩基配列と完全に一致していなくてもよく、配列同一性は、９０％以上、例えば９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、または９９％以上であり得るが、最も好ましくは１００％の配列同一性を有し得る。

[0045] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、１５～２００塩基長であって編

集効率を向上させる効果が失われない限り特に限定されず、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さにもよるが、例えば、２０～２００塩基長、２５～２００塩基長、３０～２００塩基長、３５～２００塩基長、４０～２００塩基長、４５～２００塩基長、５０～２００塩基長、５５～２００塩基長、１５～１９５塩基長、２０～１９５塩基長、２５～１９５塩基長、３０～１９５塩基長、３５～１９５塩基長、４０～１９５塩基長、４５～１９５塩基長、５０～１９５塩基長、５５～１９５塩基長、１５～１９０塩基長、２０～１９０塩基長、２５～１９０塩基長、３０～１９０塩基長、３５～１９０塩基長、４０～１９０塩基長、４５～１９０塩基長、５０～１９０塩基長、５５～１９０塩基長、１５～１８５塩基長、２０～１８５塩基長、２５～１８５塩基長、３０～１８５塩基長、３５～１８５塩基長、４０～１８５塩基長、４５～１８５塩基長、５０～１８５塩基長、５５～１８５塩基長、１５～１８０塩基長、２０～１８０塩基長、２５～１８０塩基長、３０～１８０塩基長、３５～１８０塩基長、４０～１８０塩基長、４５～１８０塩基長、５０～１８０塩基長、５５～１８０塩基長、１５～１７５塩基長、２０～１７５塩基長、２５～１７５塩基長、３０～１７５塩基長、３５～１７５塩基長、４０～１７５塩基長、４５～１７５塩基長、５０～１７５塩基長、５５～１７５塩基長、１５～１７０塩基長、２０～１７０塩基長、２５～１７０塩基長、３０～１７０塩基長、３５～１７０塩基長、４０～１７０塩基長、４５～１７０塩基長、５０～１７０塩基長、５５～１７０塩基長、１５～１６５塩基長、２０～１６５塩基長、２５～１６５塩基長、３０～１６５塩基長、３５～１６５塩基長、４０～１６５塩基長、４５～１６５塩基長、５０～１６５塩基長、５５～１６５塩基長、１５～１６０塩基長、２０～１６０塩基長、２５～１６０塩基長、３０～１６０塩基長、３５～１６０塩基長、４０～１６０塩基長、４５～１６０塩基長、５０～１６０塩基長、５５～１６０塩基長、１５～１５５塩基長、２０～１５５塩基長、２５～１５５塩基長、３０～１５５塩基長、３５～１５５塩基長、４０～１５５塩基長、４５～１５５塩基長、５０～１５５塩基長、５５～１５５塩基長、１５～１５０塩基

長、２０～１５０塩基長、２５～１５０塩基長、３０～１５０塩基長、３５～１５０塩基長、４０～１５０塩基長、４５～１５０塩基長、５０～１５０塩基長、５５～１５０塩基長、１５～１４５塩基長、２０～１４５塩基長、２５～１４５塩基長、３０～１４５塩基長、３５～１４５塩基長、４０～１４５塩基長、４５～１４５塩基長、５０～１４５塩基長、５５～１４５塩基長、１５～１４０塩基長、２０～１４０塩基長、２５～１４０塩基長、３０～１４０塩基長、３５～１４０塩基長、４０～１４０塩基長、４５～１４０塩基長、５０～１４０塩基長、５５～１４０塩基長、１５～１３５塩基長、２０～１３５塩基長、２５～１３５塩基長、３０～１３５塩基長、３５～１３５塩基長、４０～１３５塩基長、４５～１３５塩基長、５０～１３５塩基長、５５～１３５塩基長、１５～１３０塩基長、２０～１３０塩基長、２５～１３０塩基長、３０～１３０塩基長、３５～１３０塩基長、４０～１３０塩基長、４５～１３０塩基長、５０～１３０塩基長、５５～１３０塩基長、１５～１２５塩基長、２０～１２５塩基長、２５～１２５塩基長、３０～１２５塩基長、３５～１２５塩基長、４０～１２５塩基長、４５～１２５塩基長、５０～１２５塩基長、５５～１２５塩基長、１５～１２０塩基長、２０～１２０塩基長、２５～１２０塩基長、３０～１２０塩基長、３５～１２０塩基長、４０～１２０塩基長、４５～１２０塩基長、５０～１２０塩基長、５５～１２０塩基長、１５～１１５塩基長、２０～１１５塩基長、２５～１１５塩基長、３０～１１５塩基長、３５～１１５塩基長、４０～１１５塩基長、４５～１１５塩基長、５０～１１５塩基長、５５～１１５塩基長、１５～１１０塩基長、２０～１１０塩基長、２５～１１０塩基長、３０～１１０塩基長、３５～１１０塩基長、４０～１１０塩基長、４５～１１０塩基長、５０～１１０塩基長、５５～１１０塩基長、１５～１０５塩基長、２０～１０５塩基長、２５～１０５塩基長、３０～１０５塩基長、３５～１０５塩基長、４０～１０５塩基長、４５～１０５塩基長、５０～１０５塩基長、５５～１０５塩基長、１５～１００塩基長、２０～１００塩基長、２５～１００塩基長、３０～１００塩基長、３５～１００塩基長、４０～１００塩基長、

４５～１００塩基長、５０～１００塩基長、５５～１００塩基長、１５～９５塩基長、２０～９５塩基長、２５～９５塩基長、３０～９５塩基長、３５～９５塩基長、４０～９５塩基長、４５～９５塩基長、５０～９５塩基長、５５～９５塩基長、１５～９０塩基長、２０～９０塩基長、２５～９０塩基長、３０～９０塩基長、３５～９０塩基長、４０～９０塩基長、４５～９０塩基長、５０～９０塩基長、５５～９０塩基長、１５～８５塩基長、２０～８５塩基長、２５～８５塩基長、３０～８５塩基長、３５～８５塩基長、４０～８５塩基長、４５～８５塩基長、５０～８５塩基長、５５～８５塩基長、１５～８０塩基長、２０～８０塩基長、２５～８０塩基長、３０～８０塩基長、３５～８０塩基長、４０～８０塩基長、４５～８０塩基長、５０～８０塩基長、５５～８０塩基長、１５～７５塩基長、２０～７５塩基長、２５～７５塩基長、３０～７５塩基長、３５～７５塩基長、４０～７５塩基長、４５～７５塩基長、５０～７５塩基長、または５５～７５塩基長、好ましくは、１５～７５塩基長、または５５～７５塩基長であり得る。第３の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、例えば、１５塩基長以上、２０塩基長以上、２５塩基長以上、３０塩基長以上、３５塩基長以上、４０塩基長以上、４５塩基長以上、５０塩基長以上、または５５塩基長以上、かつ、２００塩基長以下、１９５塩基長以下、１９０塩基長以下、１８５塩基長以下、１８０塩基長以下、１７５塩基長以下、１７０塩基長以下、１６５塩基長以下、１６０塩基長以下、１５５塩基長以下、１５０塩基長以下、１４５塩基長以下、１４０塩基長以下、１３５塩基長以下、１３０塩基長以下、１２５塩基長以下、１２０塩基長以下、１１５塩基長以下、１１０塩基長以下、１０５塩基長以下、１００塩基長以下、９５塩基長以下、９０塩基長以下、８５塩基長以下、８０塩基長以下、または７５塩基長以下であり得る。

一実施形態において第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基長の１５％以上、２０％以上、２５％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、または７０％以上、かつ、２００％以下、１５

０％以下、１００％以下、または９５％以下であり得、好ましくは、７０～９５％の塩基長であり得る。

[0046] 好ましい実施形態において、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドで前記編集用変異の位置は、５’末端から３’末端までを１００％として、４９～５１％の範囲内にあり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列とＥ鎖対応配列との配列同一性は、９８％以上であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、７０～１００塩基長であり、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、Ｅ鎖対応配列とＡ’鎖対応配列とは隣接しており、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、５５～７５塩基長である。

[0047] 一態様において、本発明の組成物Ｉは、第２の一本鎖ポリヌクレオチド（本明細書中、A鎖（Assistant鎖）ともいう。）をさらに含み得る。第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる。第２の一本鎖ポリヌクレオチドが第１の一本鎖ポリヌクレオチドの編集用変異を含む領域（変異部または変異配列）と相補的な塩基配列を含むと、編集効率が低下し得る。したがって、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの編集用変異を含む領域と相補的な塩基配列を含まない。第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる限り、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の５’末端側または３’末端側のいずれの部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含んでいてもよい。好ましい実施形態において、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含み得る（図１参照）。

[0048] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと相補的な塩基配列の長さは、塩基配列編集が可能である限り特に限定されないが、例えば、２０～１００塩基長（例えば、２５～１００塩基長、３０～１００塩基長、２０～９５塩基長、２５～９５塩基長、３０～９５塩基長、２０～９０塩基長、２５～９０塩基長、３０～９０塩基長、２０～８５塩基長、２５～８５塩基長、３０～８５塩基長、２０～８０塩基長、２５～８０塩基長、３０～８０塩基長、２０～７５塩基長、２５～７５塩基長、３０～７５塩基長、２０～７０塩基長、２５～７０塩基長、３０～７０塩基長、２０～６５塩基長、２５～６５塩基長、３０～６５塩基長、２０～６０塩基長、２５～６０塩基長、３０～６０塩基長、２０～５５塩基長、２５～５５塩基長、３０～５５塩基長、２０～５０塩基長、２５～５０塩基長、３０～５０塩基長、２０～４５塩基長、２５～４５塩基長、３０～４５塩基長、２０～４０塩基長、２５～４０塩基長、３０～４０塩基長、２０～３５塩基長、２５～３５塩基長、または３０～３５塩基長）、好ましくは、２５～５０塩基長、３０～５０塩基長、３５～５０塩基長、または３０～４５塩基長、より好ましくは３０～３５塩基長であり得る。

[0049] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、２０～２００塩基長であって塩基配列編集が可能である限り特に限定されず、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さおよび変異の位置にもよるが、例えば、２５～２００塩基長、３０～２００塩基長、２０～１９５塩基長、２５～１９５塩基長、３０～１９５塩基長、２０～１９０塩基長、２５～１９０塩基長、３０～１９０塩基長、２０～１８５塩基長、２５～１８５塩基長、３０～１８５塩基長、２０～１８０塩基長、２５～１８０塩基長、３０～１８０塩基長、２０～１７５塩基長、２５～１７５塩基長、３０～１７５塩基長、２０～１７０塩基長、２５～１７０塩基長、３０～１７０塩基長、２０～１６５塩基長、２５～１６５塩基長、３０～１６５塩基長、２０～１６０塩基長、２５～１６０塩基長、３０～１６０塩基長、２０～１５５塩基長、２５～１５５塩基長、３０～１５５塩基長、２０～１５０塩基長、２５～１５０塩基長、３０～１５０塩基

長、２０～１４５塩基長、２５～１４５塩基長、３０～１４５塩基長、２０～１４０塩基長、２５～１４０塩基長、３０～１４０塩基長、２０～１３５塩基長、２５～１３５塩基長、３０～１３５塩基長、２０～１３０塩基長、２５～１３０塩基長、３０～１３０塩基長、２０～１２５塩基長、２５～１２５塩基長、３０～１２５塩基長、２０～１２０塩基長、２５～１２０塩基長、３０～１２０塩基長、２０～１１５塩基長、２５～１１５塩基長、３０～１１５塩基長、２０～１１０塩基長、２５～１１０塩基長、３０～１１０塩基長、２０～１０５塩基長、２５～１０５塩基長、３０～１０５塩基長、２０～１００塩基長、２５～１００塩基長、３０～１００塩基長、２０～９５塩基長、２５～９５塩基長、３０～９５塩基長、２０～９０塩基長、２５～９０塩基長、３０～９０塩基長、２０～８５塩基長、２５～８５塩基長、３０～８５塩基長、２０～８０塩基長、２５～８０塩基長、３０～８０塩基長、２０～７５塩基長、２５～７５塩基長、３０～７５塩基長、２０～７０塩基長、２５～７０塩基長、３０～７０塩基長、２０～６５塩基長、２５～６５塩基長、３０～６５塩基長、２０～６０塩基長、２５～６０塩基長、３０～６０塩基長、２０～５５塩基長、２５～５５塩基長、３０～５５塩基長、２０～５０塩基長、２５～５０塩基長、３０～５０塩基長、２０～４５塩基長、２５～４５塩基長、３０～４５塩基長、２０～４０塩基長、２５～４０塩基長、３０～４０塩基長、２０～３５塩基長、２５～３５塩基長、または３０～３５塩基長、好ましくは２５～１００塩基長、３０～１００塩基長、３５～１００塩基長、３０～９０塩基長、２５～５０塩基長、３０～５０塩基長、３５～５０塩基長、または３０～４５塩基長、より好ましくは３０～３５塩基長（例えば、３３塩基長、３４塩基長または３５塩基長）、さらにより好ましくは３４塩基長または３５塩基長であり得る。

[0050] 一実施形態において、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、編集標的鎖において、編集部位の5’側または3’側の塩基配列（「Ａ鎖対応配列」という）と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドであり得る。Ａ鎖対応配列は、Ｅ鎖対応配列の範囲内であってもよく、Ｅ鎖対応配列の末端を超えた配列

であってもよい。Ｅ鎖対応配列の範囲を超える場合、超過分の塩基長は、編集部位からＥ鎖対応配列の末端までと同程度の塩基長またはそれ以下の塩基長であり得、好ましくは、編集部位からＥ鎖対応配列の末端までの９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、３０％以下、２０％以下、または１０％以下の塩基長であり得る。

[0051] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、編集効率を低下させない限り、５’末端または３’末端に任意の塩基配列が挿入されてもよい。そのような塩基配列としては、例えば、国際公開第2006/064813号に開示されているTDにおける一本鎖ＤＮＡと同様のヘアピン構造を形成する塩基配列が挙げられる。

[0052] 本発明の組成物Ｉが第１～第３の３種類の一本鎖ポリヌクレオチドを含む場合、当該組成物中の第１、第２および第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル比は、塩基配列編集が可能である限り特に限定されないが、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル比が低いほど、あるいは、第１および第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量（モル）の合計に対する第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量の割合が低いほど、編集効率が高くなる場合がある。したがって、一実施形態において、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量は、第１および第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量の合計を１として、０．２～２、好ましくは、０．２～１、より好ましくは０．２～０．５であり得る。あるいは、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量は、第１および第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量の合計と同じか、またはそれよりも低いことが好ましい場合がある。なお、本明細書中、用量は、塩基配列編集を行う細胞または対象への投与時のモル濃度を意味する。

[0053] また、本発明の組成物Ｉが第１～第３の３種類の一本鎖ポリヌクレオチドを含む場合、又は、第１及び第３の２種類の一本鎖ポリヌクレオチドを含む場合、第１の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量（モル）に対する第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量の割合が高いほど、編集効率が高くなる場合がある。したがって、一実施形態において、第３の

一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量を１として、０．２５～４、好ましくは、１～４であり得る。あるいは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量と同じか、またはそれよりも高いことが好ましい場合がある。

[0054] また、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量（モル）に対して第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量の割合が高いほど、編集効率が高くなる場合がある。したがって、一実施形態において、本発明の組成物Ｉが第１～第３の３種類の一本鎖ポリヌクレオチドを含む場合、第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量は、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量を１として、０．２５～４、好ましくは、１～４であり得る。あるいは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量は、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度または用量と同じか、またはそれよりも高いことが好ましい場合がある。

[0055] 好ましい実施形態において、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドで前記編集用変異の位置は、５’末端から３’末端までを１００％として、４９～５１％の範囲内にあり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列とＥ鎖対応配列との配列同一性は、９８％以上であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、７０～１００塩基長であり、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含み、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、３０～１００塩基長であり、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、Ｅ鎖対応配列とＡ’鎖対応配列とは隣接しており、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、５５～７５塩基長である。

[0056] 第１～３の一本鎖ポリヌクレオチドは、塩基配列編集が可能である限り、それぞれＤＮＡ、ＲＮＡ、およびＤＮＡ／ＲＮＡキメラのいずれであってもよいが、好ましくはＤＮＡである。第１～３の一本鎖ポリヌクレオチドは、塩基配列編集が可能である限り、修飾ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド間結合を含んでもよい。

[0057] 一実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、下記特徴

（ａ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置ならびに前記編集用変異の位置の５’末端側１０塩基及び３’末端側１０塩基からなる領域において少なくとも１つのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、および

（ｂ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含み、前記修飾ヌクレオチド間結合は、前記編集用変異の位置の５’末端側３塩基から３’末端側３塩基の範囲に存在しない

の少なくとも一方を有し得る。

[0058] 特徴（ａ）において、糖修飾ヌクレオチドの位置を特定する場合、第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおける編集用変異の位置よりも５’末端側および３’末端側で編集標的鎖と同一のヌクレオチドのうち、編集用変異の位置に最も近い位置のヌクレオチドを１位として表す。例えば、「前記編集用変異の位置の５’末端側のＮ位」とは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおける編集用変異の位置よりも５’末端側で、編集標的鎖と同一のヌクレオチドのうち、編集用変異にＮ番目に近い位置のヌクレオチドを意味する。本明細書中、「前記編集用変異の位置の５’末端側のＮ位」を「－Ｎ位」という場合があり、「前記編集用変異の位置の３’末端側のＮ位」を「＋Ｎ位」という場合がある。「前記編集用変異の位置の３’末端側のＮ位」とは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおける編集用変異の位置よりも３’末端側で、編集標的鎖と同一のヌクレオチドのうち、編集用変異にＮ番目に近い位置のヌクレオチドを意味する。なお、第１の一本鎖ポリヌクレオチドが複数個の編集用変異を含む場合、５’末端側の糖修飾ヌクレオチドの位置は、当該編集用

変異のうち最も５’側に位置する編集用変異の位置を基準とし、３’末端側の糖修飾ヌクレオチドの位置は、当該編集用変異のうち最も３’側に位置する編集用変異の位置を基準として特定するものとする。「前記編集用変異の位置の５’末端側１０塩基」とは、前記編集用変異の位置の５’末端側の１位～１０位の塩基をいう。「前記編集用変異の位置の３’末端側１０塩基」とは、前記編集用変異の位置の３’末端側の１位～１０位の塩基をいう。

[0059] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドに導入する糖修飾ヌクレオチドの数および位置は、塩基配列編集が可能である限り、前記編集用変異の位置ならびに前記編集用変異の位置の５’末端側１０塩基及び３’末端側１０塩基からなる領域に含まれるヌクレオチドから適宜選択することができる。糖修飾ヌクレオチドの数にも特に制限はないが、例えば１５個以下であり得、好ましくは１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個である。

[0060] 一実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、前記編集用変異の位置、前記編集用変異の位置の５’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドから選択される少なくとも１つ、ならびに３’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドから選択される少なくとも１つが、糖修飾ヌクレオチドであり得、例えば、前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび３’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置の５’末端側の１位および３位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置の５’末端側の１位、３位、および５位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位、３位、および５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置の５’末端側の１位、３位、５位、および７位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位、３位、５位、および７位のヌクレオチド、または前記編集用変異の位置の５’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり得る。

特定の実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの、

前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および２位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位、２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、２位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の７位、５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位、５位および７位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の９位、７位、５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位、５

位、７位および９位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位～６位のヌクレオチドのいずれか１つ、
前記編集用変異の位置の３’末端側の１位～６位のヌクレオチドのいずれか１つ、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチドおよび３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチドおよび３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の６位のヌクレオチドおよび３’末端側の６位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位および２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の３’末端側の３位および５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の７位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の６位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチドおよび前記編集用

変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチド、前記編集用変異

の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の６位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の７位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および２位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位、２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、２位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、または
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド
が糖修飾ヌクレオチドであり得る。

好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの、
前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、または

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド

が糖修飾ヌクレオチドであり得る。

[0061] 好ましい実施形態において、糖修飾ヌクレオチドはリボース環において４’－低級直鎖アルキレン－Ｏ－２’架橋を含むヌクレオチドであり得、より好ましくはリボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドであり得、さらに好ましくはＬＮＡまたはＥＮＡであり得る。

[0062] 特徴（ｂ）において、修飾ヌクレオチド間結合の位置は、３’側のリン酸部に修飾を有する塩基の位置で表す。編集用変異の近傍における位置に関しては、第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおける編集用変異よりも５’末端側および３’末端側で編集標的鎖と同一の塩基のうち、編集用変異に最も近い

位置の塩基を基準（１位）として表す。なお、第１の一本鎖ポリヌクレオチドが複数個の編集用変異を含む場合、５’末端側の修飾ヌクレオチド間結合の位置は、当該編集用変異のうち最も５’側に位置する編集用変異の位置を基準とし、３’末端側の修飾ヌクレオチド間結合の位置は、当該編集用変異のうち最も３’側に位置する編集用変異を基準として特定するものとする。

[0063] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて修飾ヌクレオチド間結合が前記編集用変異の位置の５’末端側３塩基から３’末端側３塩基の範囲（すなわち、前記編集用変異の５’末端側の３位の塩基から３’末端側の３位の塩基までの範囲）内に存在する場合、編集効率が低下する場合がある。したがって、この範囲内に修飾ヌクレオチド間結合は配置されない。

[0064] 一実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端付近（例えば５’末端から２０塩基以内、１５塩基以内、１３塩基以内、１０塩基以内、８塩基以内、６塩基以内、５塩基以内、４塩基以内、３塩基以内、もしくは２塩基以内）および／または３’末端付近（例えば３’末端から２０塩基以内、１５塩基以内、１３塩基以内、１０塩基以内、８塩基以内、６塩基以内、５塩基以内、４塩基以内、３塩基以内、もしくは２塩基以内）に、１～４個（例えば１個、２個、３個、または４個）の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。この場合の修飾ヌクレオチド間結合は特に限定されないが、好ましくはホスホロチオエート結合（ＰＳ修飾とも記載される）、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合であり得、より好ましくはホスホロチオエート結合である。好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から１３塩基以内（より好ましくは５塩基以内）に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。より好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から３塩基以内に２個、または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。さらにより好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から１３塩基以内に１～４個（好ましくは３塩基以内に２個、または２塩基以内に１個）の修飾ヌクレオチド間結合を含み、修飾ヌクレオチド間

結合がホスホロチオエート結合であり得る。

[0065] 好ましい実施形態において、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドで前記編集用変異の位置は、５’末端から３’末端までを１００％として、４９～５１％の範囲内にあり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列とＥ鎖対応配列との配列同一性は、９８％以上であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、７０～１００塩基長であり、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドの、

前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用

変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドならびに前記編集

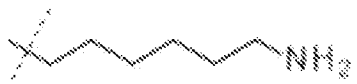
用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、または
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド
が糖修飾ヌクレオチドであり、
糖修飾ヌクレオチドはリボース環において４’－低級直鎖アルキレン－Ｏ－２’架橋を含むヌクレオチドであり、より好ましくはリボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドであり、さらに好ましくはＬＮＡまたはＥＮＡであり、
第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から５塩基以内に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含み、より好ましくは３’末端から３塩基以内に２個、もしくは２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み、
修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、
第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含み、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、３０～１００塩基長であり、かつ

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、Ｅ鎖対応配列とＡ’鎖対応配列とは隣接しており、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、５５～７５塩基長である。

[0066] 一実施形態において、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。修飾ヌクレオチド間結合の数および位置は、塩基配列編集が可能である限り、適宜選択することができる。好ましい実施形態において、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端および／または３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１の修飾ヌクレオチド間結合を含み、より好ましくは３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。好ましい実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合であり得、より好ましくはアルキルホスホネート結合またはホスホトリエステル結合であり得、さらにより好ましくはメチルホスホネート結合またはエチルホスホトリエステル結合であり得る。

[0067] 一実施形態において、第１～３の一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端または３’末端に化学修飾を有し得る。化学修飾としては、アミノリンカーなどのリンカーが挙げられる。アミノリンカーとは、下記式（ＡＬ）

[化1]



(AL)

（式中、破線は結合手を示し、メチレン基は、１つの一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端のヌクレオチドの５’－リン酸基または３’－リン酸基とリン酸ジエステル結合することを表す）で示されるリンカー（以下、ＡＬリンカーともいう。）をいう。ＡＬリンカーを一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端

に結合させる場合、5'-Amino-Modifier C6（製品番号0-1906-02、Glen Research製)などを用い、３’末端に結合させる場合は、Phthalamido Amino C6 lcaa CPG（製品番号N-8217-10、ChemGenes製）などを用いることができる。

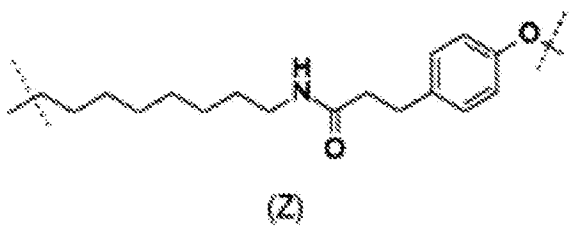
[0068] 末端にアミノ基を有するその他のリンカーとしては、前述の6個のメチレン基を有するＡＬリンカー以外に、３乃至１２個のメチレン基の末端にアミノ酸基を持つリンカーが挙げられる。一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端に本リンカーを結合させる場合、４、５、または、１２個のメチレン基の末端にアミノ酸基を持つリンカーは、例えば、それぞれTFA-Amino C-4 CED phosphoramidite（製品番号CLP-1453、ChemGenes製）、TFA amino C-5 CED phosphoramidite（製品番号CLP-1357、ChemGenes製）、または、MMT-Amino C-12 CED phosphoramidite（製品番号CLP-1453、ChemGenes製）を用いることで得ることができる。一本鎖ポリヌクレオチドの３’末端に本リンカーを結合させる場合、３、または、６個のメチレン基の末端にアミノ酸基を持つリンカーは、例えば、3'-Amino Modifier C-3 lcaa CPG（製品番号N-9750-10、ChemGenes製）、または、3'-Amino Modifier TFA Amino C-6 lcaa CPG（製品番号N-1004-10、ChemGenes製）を用いることで得ることができる。

[0069] その他の化学修飾としては、末端に水酸基を持つリンカーが挙げられる。一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端に本リンカーを結合させる場合、２、３、４、６、９、または１２個のメチレン基の末端に水酸基を持つリンカーは、例えば、それぞれDMT-ethane-Diol phosphoramidite（製品番号CLP-2250、ChemGenes製）、DMT-propane-Diol phosphoramidite（製品番号CLP-1368、ChemGenes製）、DMT-butane-Diol phosphoramidite（製品番号CLP-9775、ChemGenes製）、DMT-hexane-Diol phosphoramidite（製品番号CLP-9765、ChemGenes製）、DMT-nonane-Diol phosphoramidite（製品番号CLP-9009、ChemGenes製）、または、DMT-dodecane-Diol phosphoramidite（製品番号CLP-1114、ChemGenes製）を用いることで得ることができる。さらに、末端に水酸基を有したエチルオキシ基が連結したリンカーも例として挙げられる。３、４、または６個のエチルオキシ基が連結し末端に水酸基を持つリンカーは、例えば、そ

れぞれDMT-triethyloxy-Glycol phosphoramidite（製品番号CLP-1113、ChemGenes製）、DMT-tetraethyloxy-Glycol CED phosphoramidite（製品番号CLP-1368、ChemGenes製）、DMT Hexaethylene Glycol phosphoramidite（製品番号CLP-9765、ChemGenes製）を用いることで得ることができる。一本鎖ポリヌクレオチドの３’末端に本リンカーを結合させる場合、上記のphosphoramidite試薬をUniversal UnyLinker Support（製品番号N-4000-20、N-4000-10、N-4000-05、N-4000-03、ChemGenes製）などに結合させることで得ることができる。

[0070] 一実施形態において、第１～３の一本鎖ポリヌクレオチドのうちのいずれか２つまたは３つが、リンカーによって連結されていてもよい。リンカーにより、一方の一本鎖ポリヌクレオチドの末端と他方の一本鎖ポリヌクレオチドの末端とが連結され得る。例えば、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの３’末端と第２もしくは第３の一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの３’末端と第１もしくは第３の一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端、または第３の一本鎖ポリヌクレオチドの３’末端と第１もしくは第２の一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端が、リンカーにより連結され得る。本発明においては、当該技術分野において知られた医薬上許容されるリンカーを使用することができ、例えばＷＯ２０１２／０７４０３８に記載されたものが挙げられる。特定の実施形態において、リンカーは、下記式（Ｚ）

[化2]



(Z)

（式中、破線は結合手を示し、フェニル基に結合している酸素原子は、１つの一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端のヌクレオチドの５’－リン酸基とリン酸ジエステル結合することを表し、他方の末端のメチレン基は別の一本鎖

ポリヌクレオチドの３’末端のヌクレオチドの３’－リン酸基とリン酸ジエステル結合することを表す）で示されるリンカー（以下、Ｚリンカーともいう。）であり得る。Ｚリンカーは、ＷＯ２０１２／０７４０３８の記載にしたがって適宜調製することができる。

その他のリンカーとして、細胞内の還元的な条件で切断されるジスルフィド結合を有するリンカー（ＳＳリンカー）が挙げられる。ＳＳリンカーは、例えば、5’-Thiol C-6 Disulfide Modifier CED phosphoramidite（製品番号CLP-8506、ChemGenes製）を用いることで得ることができる。

[0071] 第１、第２および第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、公知の化学合成法を用いて作製することができる。短鎖（例えば１００塩基長程度）のものを複数合成し、それらを公知のライゲーション法により連結し、目的の塩基長の一本鎖ポリヌクレオチドを作製することもできる。また、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、標的領域を有する二本鎖ＤＮＡを鋳型とした変異導入型ＰＣＲ、市販の変異導入キット等により調製したファージ又はファージミドＤＮＡを制限酵素処理することにより作製することもできる。

[0072] 一実施形態において、前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるように、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含み得る。異常塩基配列は、正常塩基配列において１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの変異を有する塩基配列である。本明細書中、異常塩基配列の修復は、正常塩基配列（または野生型塩基配列）に戻すことに限られず、例えば、正常塩基配列におけるコドンと同じアミノ酸をコードする同義コドンとなるような変異の導入、正常塩基配列におけるコドンとは異なるアミノ酸をコードするコドンとなるような変異の導入も含まれ得る。疾患の原因となる変異としては、例えば、血友病の第９因子遺伝子、Ｉ型シトルリン血症のＡＳＳ１遺伝子、ＩＩ型シ

トルリン血症のＳＬＣ２５Ａ１３遺伝子、血友病のＦａｃｔｏｒ　Ｖ　Ｌｅｉｄｅｎ遺伝子、α１アンリトリプシン欠損症のＳＥＲＰＩＮＡ１遺伝子、ホモシスチン尿症のＣＢＳ遺伝子、フェニルケトン尿症のＰＡＨ遺伝子、ヘモクロマトーシスのＨＦＥ遺伝子、トランスサイレチンアミロイドシス（ＴＴＲ遺伝子、家族性高コレステロール血症のＰＣＳＫ９遺伝子のＬＤＬＲ遺伝子、ａｐｏ（ａ）遺伝子及びＡＮＧＰＴＬ３遺伝子、コレステロールエステル蓄積症のＬＩＰＡ遺伝子、ウィルソン病のＡＴＰ７Ｂ遺伝子、急性間欠性ポルフィリン症のＡＬＡＳ１遺伝子、先端巨人症のＧＨＲ遺伝子、ギルバート症候群のＵＧＴ１Ａ１遺伝子、原発性高シュウ酸尿症のＡＧＸＴ遺伝子、糖原病Ｉａ型のＧ６ＰＣ遺伝子、Ｈｕｒｌｅｒ症候群：ムコ多糖症（ＩＤＵＡ）のＳＬＣ２６Ａ１遺伝子、アレキサンダー病のＧＦＡＰ遺伝子、筋萎縮性側索硬化症のＧＲＩＡ２遺伝子、レット症候群のＭＥＣＰ２遺伝子、ドラベ症候群のＳＣＮ１Ａ遺伝子、パーキンソン病のＳＮＣＡ遺伝子及びＬＲＲＫ２遺伝子、アルツハイマー病のＡＰＰ遺伝子，ＭＡＰＴ遺伝子、アンジェルマン症候群のＵＢＥ３Ａ遺伝子、パントテン酸関連神経変性疾患のＰＡＮＫ２遺伝子、脊髄筋委縮症のＳＭＮ１遺伝子、網膜色素変性症のＥＹＳ遺伝子及びＲＰ１遺伝子、スタガルト病のＡＢＣＡ４遺伝子、アッシャー症候群のＵＳＨ２Ａ遺伝子、レーバー先天性黒内障のＣＥＰ２９０遺伝子、遠位型ミオパチーのＧＮＥ遺伝子、ポンペ病のＧＡＡ遺伝子、嚢胞性線維症のＣＦＴＲ遺伝子及びＥＮＡＣ遺伝子、単状分節性糸球体硬化症のＮＰＨＳ２遺伝子、アルポート症候群のＣＯＬ４Ａ５遺伝子、ならびに肥厚性皮膚骨膜症のＳＬＣＯ２Ａ１遺伝子における一塩基置換等が挙げられる。

[0073] 好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が正常塩基配列となるように、前記編集用変異を含み得る。

[0074] 一態様において、本発明は、本発明の組成物Ｉを含む、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物を提供する（以下、本発明の医薬組成物Ｉとも

いう。）。ここで、本発明の組成物Ｉにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるように、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含む。それにより、本発明の医薬組成物Ｉによる塩基配列編集が起こると、前記異常塩基配列が修復され（例えば、正常塩基配列となり）、前記異常塩基配列が原因となる疾患を治療または予防することができる。

[0075] 本発明の医薬組成物Ｉは、一本鎖ポリヌクレオチドを細胞内に導入可能な形態で含むことが好ましい。細胞内に導入可能な形態は、当該技術分野において知られた任意の形態であり得るが、例えば、適当な溶媒（例えば水）に分散させた形態、中空ナノ粒子、リポソーム、脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle：LNP）等の内部に封入した形態、カチオン性ポリマーとの複合体等が挙げられる。

[0076] 本発明の医薬組成物Ｉが投与される対象は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

[0077] 本発明の医薬組成物Ｉの投与径路としては、経口投与および非経口投与のいずれでもよく、対象となる症状等に応じて好適な投与経路を選択すればよい。また投与経路は、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、髄腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。

[0078] 本発明の医薬組成物Ｉは、治療または予防に有効な量で対象に投与される。「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与径路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。

[0079] 本発明の医薬組成物Ｉの投与量は、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定され得る。

[0080] 本発明の医薬組成物Ｉは、塩基配列の変異を原因とする任意の疾患を治療または予防するために使用され得る。そのような疾患としては、例えばＩ型シトルリン血症（ＡＳＳ１）、ＩＩ型シトルリン血症（ＳＬＣ２５Ａ１３）、血友病（Ｆａｃｔｏｒ　Ｖ　Ｌｅｉｄｅｎ）、α１アンリトリプシン欠損症（ＳＥＲＰＩＮＡ１）、ホモシスチン尿症（ＣＢＳ）、フェニルケトン尿症（ＰＡＨ）、ヘモクロマトーシス（ＨＦＥ）、トランスサイレチンアミロイドシス（ＴＴＲ）、家族性高コレステロール血症（ＰＣＳＫ９、ＬＤＬＲ、ａｐｏ（a）、ＡＮＧＰＴＬ３）、コレステロールエステル蓄積症（ＬＩＰＡ）、ウィルソン病（ＡＴＰ７Ｂ）、急性間欠性ポルフィリン症（ＡＬＡＳ１）、先端巨人症（ＧＨＲ）、ギルバート症候群（ＵＧＴ１Ａ１）、原発性高シュウ酸尿症（ＡＧＸＴ）、糖原病Ｉａ型（Ｇ６ＰＣ）、Ｈｕｒｌｅｒ症候群：ムコ多糖症（ＩＤＵＡ（ＳＬＣ２６Ａ１））、アレキサンダー病（ＧＦＡＰ）、筋萎縮性側索硬化症（ＧＲＩＡ２）、レット症候群（ＭＥＣＰ２）、ドラベ症候群（ＳＣＮ１Ａ）、パーキンソン病（ＳＮＣＡ、ＬＲＲＫ２）、アルツハイマー病（ＡＰＰ，ＭＡＰＴ）、アンジェルマン症候群（ＵＢＥ３Ａ）、パントテン酸関連神経変性疾患（ＰＡＮＫ２）、脊髄筋委縮症（ＳＭＮ１）、網膜色素変性症（ＥＹＳ、ＲＰ１）、スタガルト病（ＡＢＣＡ４）、アッシャー症候群（ＵＳＨ２Ａ）、レーバー先天性黒内障（ＣＥＰ２９０）、遠位型ミオパチー（ＧＮＥ）、ポンペ病（ＧＡＡ）、嚢胞性線維症（ＣＦＴＲ、ＥＮＡＣ）、単状分節性糸球体硬化症（ＮＰＨＳ２）、アルポート症候群（ＣＯＬ４Ａ５）、および肥厚性皮膚骨膜症（ＳＬＣＯ２Ａ１）などが挙げられる。なお、括弧内は標的遺伝子名である。

[0081] 一態様において、本発明は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の本発明の組成物Ｉを対象に投与することを含む、方法を提供する。ここで、本発明の組成物Ｉにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるように

、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含む。本発明の具体的な実施形態は、本発明の医薬組成物Ｉを投与する場合と同様である。

[0082] 一態様において、本発明は、変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、本発明の組成物Ｉを導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法を提供する（以下、本発明の製造方法Ｉともいう。）。

[0083] 本発明の製造方法Iにおける細胞は、生体を構成していない細胞（すなわち、単離された細胞）または生体内に存在して生体を構成している細胞のいずれであってもよい。一実施形態において、生体内に存在して生体を構成している細胞から、ヒトの細胞は除外され得る。別の実施形態において、ヒトの疾患を治療する目的で本発明の組成物Iをヒトに投与することにより、本発明の組成物Iを細胞内に導入することが、本発明の製造方法Ｉに含まれ得る。単離された細胞を対象とする場合、本発明の製造方法Iはインビトロで行われ得る。細胞は真核細胞または原核細胞のいずれであってもよく、細胞が由来する生物種は特に限定されるものではない。細胞が由来する生物種としては、例えば、哺乳類、鳥類、昆虫類等の動物、植物、微生物等のいずれであってもよいが、動物であることが好ましく、哺乳類であることがより好ましい。哺乳類としては、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット等が挙げられる。微生物は、原核微生物及び真核微生物のいずれであってもよく、原核微生物としては、例えば、グラム陽性菌、グラム陰性菌等の細菌類が挙げられ、真核微生物としては、例えば、糸状菌（カビ類）、酵母等の真菌類が挙げられる。

[0084] 細胞の種類は特に限定されるものではなく、例えば、体細胞、生殖細胞、幹細胞、またはこれらの培養細胞等が挙げられる。体細胞の具体例としては、脳、脊髄等の神経系組織；網膜細胞、嗅細胞等の感覚器； 食道、胃、小腸

、大腸等の消化器；肺、気管支等の呼吸器；精巣、卵巣、子宮、胎盤等の生殖器；腎臓、膀胱等の泌尿器；骨髄細胞、血球細胞等の造血器；骨格筋、平滑筋、心筋等の筋組織；骨芽細胞、破骨細胞等の骨組織；皮膚、毛根細胞等の皮膚組織等の各種組織・器官から分離された生細胞又はその培養細胞等が挙げられる。生殖細胞の具体例としては、卵、精子又はその培養細胞等が挙げられる。幹細胞の具体例としては、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、胚性生殖細胞（ＥＧ細胞）、栄養膜幹細胞（ＴＳ細胞）、骨髄幹細胞、神経幹細胞等が挙げられる。

[0085] 本発明の組成物Ｉの細胞内への導入方法としては、当該技術分野において知られた方法を使用することができ、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等を使用することができる。また、本発明の医薬組成物Ｉに関して記載したとおり、第１、第２および第３の一本鎖ポリヌクレオチドを細胞内に導入可能な形態とし、ヒトまたは非ヒト生物に投与してもよい。

[0086] 細胞内に本発明の組成物Ｉが導入されると、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖が本発明の組成物Ｉに含まれる第１の一本鎖ポリヌクレオチドで相同置換されたのと同様の変異が編集標的鎖に導入され、他方の鎖もそれと相補的となるように修正され、その結果、細胞内の二本鎖ＤＮＡを構成する両方の鎖に変異が導入される。

[0087] 標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれる場合、異常塩基配列に変異を導入して修復すること（例えば、正常塩基配列に変換すること、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列に変換すること）により、異常塩基配列が原因となる疾患を治療または予防することができる。

[0088] 標的領域に変異が導入された細胞および該細胞を保有する生物個体は、特定の化合物等に対する感受性が正常型とは異なるスクリーニング系、疾患モデル等として有用である。

[0089] ３．化学修飾を含む一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物による塩基配列編

集

一態様において、本発明は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、かつ

下記特徴

（ａ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置ならびに前記編集用変異の位置の５’末端側１０塩基及び３’末端側１０塩基からなる領域において、少なくとも１つのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、および

（ｂ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含み、前記修飾ヌクレオチド間結合は、前記編集用変異の位置の５’末端側３塩基から３’末端側３塩基の範囲に存在しない

の少なくとも一方を有する、組成物を提供する（以下、本発明の組成物ＩＩともいう。）。

[0090] 本発明の組成物ＩＩを細胞内に導入することにより、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に対して、第１の一本鎖ポリヌクレオチドに含まれる編集用変異に応じた塩基配列編集を行うことができる。すなわち、本発明の組成物ＩＩは、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に対して変異を導入するために使用することができる。また、本発明の組成物ＩＩによる塩基配列編集は、外来性ヌクレアーゼを必要としない。したがって、好ましい実施形態において、本発明の組成物IIは、外来性ヌクレアーゼまたはそれを発現可能なポリヌクレオチドを含まず、且つ、それらと組み合わせて使用されることはない。

ここで、「第１の一本鎖ポリヌクレオチド」とは便宜的な呼称であって、

必ずしも第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）または第３の一本鎖ポリヌクレオチド（A’鎖）が本発明の組成物ＩＩの構成成分であることを意味するものではない。「第１の一本鎖ポリヌクレオチド」との用語自体は、本発明の組成物ＩＩに第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）または第３の一本鎖ポリヌクレオチド（A’鎖）が含まれることを意味するものではない。本発明の組成物ＩＩを使用する場合、第１の一本鎖ポリヌクレオチド単独で塩基配列編集を行ってもよく、第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）及び第３の一本鎖ポリヌクレオチド（A’鎖）の少なくとも一方と組み合わせて塩基配列編集を行ってもよい。後述のとおり、本発明の組成物ＩＩは、第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）及び第３の一本鎖ポリヌクレオチド（A’鎖）の少なくとも一方を含んでもよい。

[0091] 本発明の組成物ＩＩにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、上記特徴（ａ）および（ｂ）の少なくとも一方を有することを必須の特徴とする以外は、本発明の組成物Ｉにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドと同じ特徴を有し得る。特徴（ａ）および（ｂ）は、本発明の組成物Iにおける特徴（ａ）および（ｂ）と同様である。

[0092] 特徴（ａ）を有する場合、一実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、前記編集用変異の位置、前記編集用変異の５’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドから選択される少なくとも１つ、ならびに３’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドから選択される少なくとも１つが、糖修飾ヌクレオチドであり得、例えば、前記編集用変異の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび３’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の５’末端側の１位および３位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、前記編集用変異の５’末端側の１位、３位、および５位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位、３位、および５位のヌクレオチド、前記編集用変異の５’末端側の１位、３位、５位、および７位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位、３位、５位、および７位のヌクレオチド、または前記編集用変異の

５’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドならびに３’末端側の１位、３位、５位、７位、および９位のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり得る。

特定の実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの、

前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および２位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位、２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、２位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の７位、５位、３位および１位のヌクレ

オチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位、５位および７位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の９位、７位、５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位、５位、７位および９位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位～６位のヌクレオチドのいずれか１つ、

前記編集用変異の位置の３’末端側の１位～６位のヌクレオチドのいずれか１つ、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび３’末端側の２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチドおよび３’末端側の４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチドおよび３’末端側の５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の６位のヌクレオチドおよび３’末端側の６位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の４位および２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の３’末端側の３位および５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の７位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の６位のヌクレオチドおよび前記編集用

変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の６位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の７位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および２位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位、２位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、２位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならび

に前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、または
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド
が糖修飾ヌクレオチドであり得る。

好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの、
前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位、３位および１位のヌクレオチド

ならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌ

クレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、または
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド
が糖修飾ヌクレオチドであり得る。

好ましい実施形態において、糖修飾ヌクレオチドはリボース環において４’－低級直鎖アルキレン－Ｏ－２’架橋を含むヌクレオチドであり得、より好ましくはリボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドであり得、さらに好ましくはＬＮＡまたはＥＮＡであり得る。

[0093] 特徴（ｂ）を有する場合、一実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端付近（例えば５’末端から２０塩基以内、１５塩基以内、１３塩基以内、１０塩基以内、８塩基以内、６塩基以内、５塩基以内、４塩基以内、３塩基以内、もしくは２塩基以内）および／または３’末端付近（例えば３’末端から２０塩基以内、１５塩基以内、１３塩基以内、１０塩基以内、８塩基以内、６塩基以内、５塩基以内、４塩基以内、３塩基以内、もしくは２塩基以内）に、１～４個（例えば１個、２個、３個、または４個）の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から１３塩基以内（より好ましくは５塩基以内）に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。より好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から３塩基以内に２個、または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。好ましい実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合であり得る。より好ましい実施形態において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から１３塩基以内に１～４個（好ましくは３塩基以内に２個、または２塩基以内に１個）の修飾ヌクレオチド間結合を含み、修飾ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合であり得る。

[0094] 好ましい実施形態において、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドで前記編集用変異の位置は、５’末端から３’末端までを１００％として、４９～５１％の範囲内にあり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列とＥ鎖対応配列との配列同一性は、９８％以上であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、７０～１００塩基長であり、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドの、

前記編集用変異の位置のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位の

ヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位、３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の１位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、

前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の６位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の７位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の２位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の３位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の４位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の５位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドおよび前記編集用変異の位置の３’末端側の５位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の３位および１位のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位、３位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の１位および４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置の５’末端側の１位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド、
前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の２位および４位のヌクレオチド、または

前記編集用変異の位置の５’末端側の２位のヌクレオチド、前記編集用変異の位置のヌクレオチドならびに前記編集用変異の位置の３’末端側の４位のヌクレオチド

が糖修飾ヌクレオチドであり、

糖修飾ヌクレオチドはリボース環において４’－低級直鎖アルキレン－Ｏ－２’架橋を含むヌクレオチドであり、より好ましくはリボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドであり、さらに好ましくはＬＮＡまたはＥＮＡであり、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、３’末端から５塩基以内に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含み、より好ましくは３’末端から３塩基以内に２個、もしくは２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み、かつ

修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合である。

[0095] 一実施形態において、本発明の組成物ＩＩは、第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み得る。本発明の組成物ＩＩにおける第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、本発明の組成物Ｉにおける第２の一本鎖ポリヌクレオチドと同じ特徴を有し得る。

[0096] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドが少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含む場合、好ましい実施形態において、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端および／または３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み、より好ましくは３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。好ましい実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合であり得、より好ましくはアルキルホスホネート結合またはホスホトリエステル結合であり得、さらにより好ましくはメチルホスホネート結合またはエチルホスホトリエステル結合であり得る。

[0097] 一実施形態において、本発明の組成物ＩＩは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み得る。本発明の組成物ＩＩにおける第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、本発明の組成物Ｉにおける第３の一本鎖ポリヌクレオチドと同じ特徴を有し得る。

[0098] 一実施形態において、前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるように、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含み得る。

[0099] 一態様において、本発明は、本発明の組成物ＩＩを含む、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物を提供する（以下、本発明の医薬組成物ＩＩともいう。）。ここで、本発明の組成物ＩＩにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるように、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含む。それにより、本発明の医薬組成物ＩＩによる塩基配列編集が起こると、前記異常塩基配列が修復され（例えば、正常塩基配列となり、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となり）、前記異常塩基配列が原因となる疾患を治療または予防することができる。本発明の医薬組成物ＩＩの具体的な実施形態は、本発明の医薬組成物Ｉと同様である。

[0100] 一態様において、本発明は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の本発明の組成物ＩＩを対象に投与することを含む、方法を提供する。ここで、本発明の組成物ＩＩにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるよ

うに、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含む。本発明の具体的な実施形態は、本発明の医薬組成物ＩＩを投与する場合と同様である。

[0101] 一態様において、本発明は、変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、本発明の組成物ＩＩを導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法を提供する（以下、本発明の製造方法ＩＩともいう。）。本発明の製造方法ＩＩの具体的な実施形態は、本発明の組成物Ｉの代わりに本発明の組成物ＩＩを用いること以外は、本発明の製造方法Ｉと同様である。

[0102] ４．E鎖またはTDを含む組成物と併用するためのA’鎖を含む医薬組成物

一態様において、本発明は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と併用するための第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む医薬組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れており、

前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一

本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように（例えば、正常塩基配列となるように、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列となるように）、前記編集用変異を含む、

医薬組成物を提供する（以下、本発明の医薬組成物ＩＩＩともいう。）。

[0103] 本発明の医薬組成物ＩＩＩを、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と併用して、細胞内に導入することにより、塩基配列編集が起こり、前記異常塩基配列を修復すること（例えば、正常塩基配列に変換すること、または正常塩基配列とは異なるが前記疾患の原因が除去された塩基配列に変換すること）ができる。したがって、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物であり得る。そのような疾患としては、本発明の医薬組成物Ｉに関して挙げたものが例示される。

[0104] 本発明の医薬組成物ＩＩＩと第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物との併用による塩基配列編集は、外来性ヌクレアーゼを必要としない。したがって、好ましい実施形態において、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、外来性ヌクレアーゼまたはそれを発現可能なポリヌクレオチドを含まず、且つ、それらと組み合わせて使用されることはない。

[0105] 本発明の医薬組成物ＩＩＩにおける第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、本発明の組成物Ｉにおける第３の一本鎖ポリヌクレオチドと同じ特徴を有し得る。

ここで、「第３の一本鎖ポリヌクレオチド」とは便宜的な呼称であって、第１の一本鎖ポリヌクレオチド（E鎖）または第２の一本鎖ポリヌクレオチド（A鎖）が本発明の医薬組成物ＩＩＩの構成成分であることを意味するものではない。

[0106] 本発明の医薬組成物ＩＩＩと併用される組成物中の第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、本発明の組成物Ｉにおける第１の一本鎖ポリヌクレオチドと同じ特徴を有し得る。また、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖ポリヌク

レオチドを含む組成物は、本発明の医薬組成物ＩＩにおいて第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含むが第２および第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含まない実施形態に該当し得る。

[0107] 一実施形態において、本発明の医薬組成物ＩＩＩと併用される第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物は、第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み得る。ここで、第２の一本鎖ポリヌクレオチドは、本発明の組成物Ｉにおける第２の一本鎖ポリヌクレオチドと同じ特徴を有し得る。また、第１および第２の一本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物は、本発明の医薬組成物ＩＩにおいて第１および第２の一本鎖ポリヌクレオチドを含むが第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含まない実施形態に該当し得る。

[0108] 本明細書中、「併用」および「併用する」とは、２種類以上の薬剤または医薬組成物を同じ個体に投与することを言う。これらの薬剤または医薬組成物は、同時にまたはほぼ同時に（例えば、１時間以内に）投与されてもよいし、間隔を空けて（例えば、数時間を空けて）別々にまたは連続して投与されてもよい。本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と同時またはほぼ同時に投与されてもよいし、間隔を空けて投与されてもよい。また、本発明の医薬組成物ＩＩＩと第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物とは、任意の順序で投与され得る。好ましい実施形態において、本発明の医薬組成物ＩＩＩと第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物とは同時に投与され得る。

[0109] 本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドを細胞内に導入可能な形態で含むことが好ましい。細胞内に導入可能な形態は、当該技術分野において知られた任意の形態であり得るが、例えば、適当な溶媒（例えば水）に分散させた形態、中空ナノ粒子、リポソーム、脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle：LNP）等の内部に封入した形態、カチオン性ポリマーとの複合体等が挙げられる。

[0110] 本発明の医薬組成物ＩＩＩが投与される対象は、例えば、哺乳動物であり

、好ましくはヒトである。

[0111] 本発明の医薬組成物ＩＩＩの投与径路としては、経口投与および非経口投与のいずれでもよく、対象となる症状等に応じて好適な投与経路を選択すればよい。また投与経路は、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、髄腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。

[0112] 本発明の医薬組成物ＩＩＩは、治療または予防に有効な量で対象に投与される。「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与径路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。

[0113] 本発明の医薬組成物ＩＩＩの投与量は、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定され得る。

[0114] 本発明の医薬組成物ＩＩＩと第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物との投与量の割合は、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物による編集効率を向上させ得る限り、特に限定されない。

[0115] 一実施形態において、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの用量（モル）が、第１および第３の一本鎖ポリヌクレオチドの用量の合計を１として、０．２～２、好ましくは、０．２～１、より好ましくは０．２～０．５となるように使用され得る。あるいは、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの用量が、第１および第３の一本鎖ポリヌクレオチドの用量の合計と同じか、またはそれよりも低くなるように使用されることが好ましい。

[0116] 一実施形態において、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの用量（モル）が、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの用量を１として、０．２５～４、好ましくは、１～４となるように使用され得る。あるいは、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの用量が、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの用量と同じか、またはそれよりも高く

なるように使用されることが好ましい。

[0117] 一実施形態において、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの用量（モル）が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの用量を１として、０．２５～４、好ましくは、１～４となるように使用され得る。あるいは、本発明の医薬組成物ＩＩＩは、第３の一本鎖ポリヌクレオチドの用量が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドの用量と同じか、またはそれよりも高くなるように使用されることが好ましい。

[0118] 一態様において、本発明は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の本発明の組成物ＩＩＩを、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と、同時に、別々にまたは連続して対象に投与することを含む、方法を提供する。本発明の具体的な実施形態は、本発明の医薬組成物ＩＩＩを投与する場合と同様である。

[0119] 一態様において、本発明は、変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、本発明の医薬組成物ＩＩＩを、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と同時に、別々にまたは連続して導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法を提供する（以下、本発明の製造方法ＩＩＩともいう。）。本発明の製造方法ＩＩＩの具体的な実施形態は、第３の一本鎖ポリヌクレオチドと第１のポリヌクレオチドとが異なる組成物中に含まれており、それらが同時に、別々にまたは連続して細胞に導入されることを除き、本発明の製造方法Ｉと同様である。

[0120] 本発明の医薬組成物ＩＩＩを、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と別々にまたは連続して細胞に導入してもよいが、同時に導入することが好ましい。

[0121] 以下、実施例および試験例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲は、これらに限定されるものではない。なお、実施例中、「n-

」は、編集用核酸の調製時に熱処理およびアニーリング処理を行っていないことを示すために使用される。また、実施例中、「n-E」は、E鎖を細胞に導入したことを表し、「n-TD」は、TD（E鎖およびA鎖）を細胞に導入したことを表し、「n-TD'」は、TD（E鎖およびA鎖）およびA'鎖を細胞に導入したことを表す。

実施例

[0122] 実施例１：A'鎖の追加による塩基配列編集効率の向上

緑色蛍光タンパク質を用いて、TDによる塩基配列編集法におけるA'鎖の追加による編集効率の変化を検討した。

標的遺伝子としてカイアシ由来の緑色蛍光蛋白質をコードするcopGFP遺伝子を用いた。蛍光団を構成するGly-Tyr-Gly中のTyrに相当する塩基配列TACをCAC（Hisをコードする）に変えた変異型copGFP遺伝子（配列番号１）を有するプラスミドDNAとTDとをヒトU2OS細胞に共導入した。TDは、標的遺伝子のアンチセンス鎖の一部と同じ配列を有し、蛍光団をコードする配列が野生型である、鎖長79塩基のE鎖（配列番号５）と、E鎖の3'-末端から35塩基の領域にハイブリダイズするA鎖（配列番号６）とからなる。TDにより塩基配列編集が起こると、プラスミドDNA上の変異型copGFP遺伝子が野生型copGFP遺伝子となり、緑色蛍光が観察されるようになる。標的プラスミドおよびTDとともに、様々な鎖長のA'鎖を導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を調べた。

E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

A鎖

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖 for AS_E鎖）：配列番号６

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

A'鎖

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

[0123] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖、A鎖、およびA’鎖の1μMの各水溶液を目的の比率で混合し、熱処理を行わず、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。384-well plateの各wellにU2OS細胞（8×10^{3}細胞；American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)から入手）を播種し、一晩培養した後、編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド（30.0 ng；H. Kawai, R. Kamitsubo, H. Kamiya. Correction of monomeric enhanced green fluorescent protein (mEGFP) gene by short 5’-tailed duplexes. J. Biosci. Bioengng. 134, 175-181 (2022)）、編集用核酸（E鎖のみ、E鎖＋A鎖、またはE鎖＋A鎖＋A’鎖）を、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換した。48時間培養後、Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒド（100 μL/well）で固定し、蛍光顕微鏡で観察した。

[0124] 編集効率は、以下の方法により算出した。

Opera Phenix(登録商標)ハイスループット・ハイコンテンツイメージングシステム(PerkinElmer社)により蛍光顕微鏡画像を取得した。画像解析ソフトHarmony（PerkinElmer）を用いて、各細胞のHoechst33342、mPlum、およびcopGFPについて蛍光強度データを取得した。各実験での384-well plate毎にHoechst33342の蛍光強度データから平均的な蛍光強度および形態を有する細胞核のみを抽出し、編集効率の解析対象とした。各細胞核におけるmPlumおよびcopGFPの蛍光波長の蛍光輝度の中央値/pixelの積算値をそれぞれ算出した。mPlum-T2A-copGFP(正常型)発現ベクタープラスミドとmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミドとを一定比率で混合して作製した試料中のベクターの存在比率とcopGFPの蛍光強度から検量線を作成し、これを用いて各wellに

ついて算出した蛍光強度の積算値から編集効率を算出した。

[0125] その結果、E鎖およびA鎖のみ導入した場合と比較して、E鎖、A鎖およびA'鎖を導入した場合では、copGFPの蛍光を有する細胞が多く観察され、編集効率が向上することが明らかとなった。特に、本実施例で用いたE鎖およびA鎖と組み合わせた場合、65塩基のA'鎖（配列番号７；標的遺伝子のアンチセンス鎖において、E鎖と配列同一性を有する塩基配列とA'鎖と配列同一性を有する塩基配列とは、隣接している（すなわち、両者の間隔は0塩基である））を共導入した際に、編集効率が大幅に向上した（図２および３）。

なお、TDの代わりにE鎖のみを使用した場合も、同様にA'鎖の追加による編集効率向上効果が確認された。

[0126] 実施例２：A'鎖の追加による塩基配列編集効率の向上

標的遺伝子をmEGFP遺伝子に変更し、実施例１と同様に、A'鎖の追加による編集効率向上効果を確認した。

mEGFPは、緑色蛍光タンパク質であるが、copGFPとアミノ酸レベルでは27%しか相同性がなく、それらをコードするDNA配列レベルではほぼ相同性がない。mEGFPの蛍光団Thr-Tyr-Gly中のTyrに相当する塩基配列TACをCACに変えた変異型遺伝子（配列番号３）を有するプラスミド（mPlum-T2A-mEGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド；H. Kawai, R. Kamitsubo, H. Kamiya. Correction of monomeric enhanced green fluorescent protein (mEGFP) gene by short 5'-tailed duplexes. J. Biosci. Bioengng. 134, 175-181 (2022)）とともに、TD（E鎖＋A鎖）またはTD＋A'鎖をU2OS細胞に共導入した。蛍光顕微鏡観察は、実施例１と同様にして行った。

使用した編集用核酸を以下に示す。

[0127] E鎖

mEGFP-79_AS_E：配列番号８

5'-TCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAG -3'

A鎖

mEGFP-35_S_A：配列番号９

5’-CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCT -3’

A’鎖

mEGFP-65_AS_Ap：配列番号１０

5’-GAAGAAGATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCT -3’

[0128] その結果、mEGFP遺伝子を用いた実験でも、E鎖＋A鎖のみの場合と比較して、A’鎖を加えた場合では、緑色蛍光を有する細胞が多く観察され、編集効率が著しく向上することが明らかとなった（図４および５）。

[0129] 実施例３：E鎖またはA鎖の化学修飾による塩基配列編集効率の向上

copGFP遺伝子を標的遺伝子とした解析法（実施例１）を用いて、E鎖およびA鎖に対する化学修飾の編集効率への影響を解析した。実施例中、特に明記しない場合、n-TD’におけるA’鎖は、実施例１と同じcopGFP_A_prime65である。

[0130] （３－１）ホスホロチオエート（PS）修飾の塩基配列編集効率への影響１

E鎖、A鎖、およびA’鎖のそれぞれについて、5’末端側または3’末端側からそれぞれ1ヶ所または2ヶ所にPS修飾を導入し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所の3’側のリン酸部にPS修飾を有する。）。

[0131] E鎖

copGFP-79_AS_E 5’3’S：配列番号１１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 5’S：配列番号１２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 3’S：配列番号１３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 5'3'SS：配列番号１４

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E 5'SS：配列番号１５

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP -79_AS_E 3'SS：配列番号１６

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

[0132] A鎖

copGFP-35_S_A 5'3'S：配列番号１７

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-35_S_A 5'S：配列番号１８

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-35_S_A 3'S：配列番号１９

5'- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-35_S_A 5'3'SS：配列番号２０

5'- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-35_S_A 5'SS：配列番号２１

5'- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-35_S_A 3'SS：配列番号２２

5'- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

[0133] A'鎖

copGFP-79_AS_Ap 5'3'S：配列番号２３

5'- CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP-79_AS_Ap 5'S：配列番号２４

5'- CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT

-3’

copGFP-79_AS_Ap 3’S：配列番号２５

5’- CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT

-3’

copGFP-79_AS_Ap 5’3’SS：配列番号２６

5’- CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT

-3’

copGFP-79_AS_Ap 5’SS：配列番号２７

5’- CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT

-3’

copGFP-79_AS_Ap 3’SS：配列番号２８

5’- CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT

-3’

[0134] 結果を図６に示す。E鎖およびA鎖のいずれについても、各鎖の3’末端側のPS修飾は編集効率を向上させた。5’末端側および3’末端側にPS修飾を導入したA’鎖については、本実験系では編集効率の向上は見られなかったが、A’鎖におけるヌクレオチド間修飾は、細胞導入時のヌクレアーゼ耐性の付与のために有用である可能性がある。

[0135] （３－２）PS修飾の塩基配列編集効率への影響２

E鎖およびA鎖のそれぞれについて、3’末端側からそれぞれ1～4ヶ所にPS修飾を導入し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所の3’側のリン酸部にPS修飾を有する。）。

[0136] E鎖

copGFP-79_AS_E 3’S：配列番号１３

copGFP -79_AS_E 3’SS：配列番号１６

copGFP-79_AS_E 3’SSS：配列番号２９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 3’SSSS：配列番号３０

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

[0137] A鎖

copGFP-35_S_A 3’S：配列番号１９

copGFP-35_S_A 3’SS：配列番号２２

copGFP-35_S_A 3’SSS：配列番号３１

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-35_S_A 3’SSSS：配列番号３２

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

[0138] 結果を図７に示す。E鎖では3’末端の2ヶ所まで、A鎖では3ヶ所までのPS修飾は、編集効率を向上させる傾向が見られた。

[0139] （３－３）PS修飾の塩基配列編集効率への影響３

2ヶ所のPS修飾の位置を変えたE鎖を用いて、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所の3’側のリン酸部にPS修飾を有する。）。

[0140] E鎖

copGFP-79_AS_E 3’SSp11：配列番号３３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 3’SSp21：配列番号３４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 3’SSp31：配列番号３５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E 3’SSp41：配列番号３６

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E 3'SSp51：配列番号３７

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E 3'SSp61：配列番号３８

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E 3'SSp71：配列番号３９

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3'

[0141] 結果を図８に示す。E鎖における2ヶ所のPS修飾は、E鎖の3'末端側に近い場合には編集効率を向上させた。その一方、塩基配列編集のために導入された変異の5'末端側3塩基から3'末端側1塩基の範囲内に2ヶ所のPS修飾を含む場合には編集効率を低下させた。

[0142] （３－４）A鎖のPCH_3（P-Me）修飾および$POCH_2CH_3$（P-OEt）修飾の塩基配列編集効率への影響

A鎖について、5'末端側または3'末端側から2ヶ所において、PCH_3（P-Me）修飾（リン酸ジエステル結合のメチルホスホネート結合への置換）または$POCH_2CH_3$（P-OEt）修飾（リン酸ジエステル結合のエチルホスホトリエステル結合への置換）を導入し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所の3'側のリン酸部にP-Me修飾またはP-OEt修飾を有する。）。

[0143] A鎖

copGFP_forAS_E79 A35 5' p-met ×2：配列番号４０

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP_forAS_E79 A35 3' p-met ×2：配列番号４１

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP_forAS_E79 A35 5’ p-etho ×2：配列番号４２

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP_forAS_E79 A35 3’ p-etho ×2：配列番号４３

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

[0144] 結果を図９に示す。A鎖の3’末端側から2ヶ所のP-Me修飾またはP-OEt修飾は、編集効率を向上させた。

[0145] （３－５）A鎖のP-OEt修飾の塩基配列編集効率への影響

A鎖について、3’末端側から1または2ヶ所において、P-OEt修飾を導入し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（P-OEt修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドの3’側のリン酸部にP-OEt修飾を有する。）。3’末端側から1または2ヶ所にPS修飾を含むA鎖（copGFP-35_S_A 3’SおよびcopGFP-35_S_A 3’SS）も使用した。

[0146] A鎖

copGFP-35_S_A 3’S：配列番号１９

copGFP-35_S_A 3’SS：配列番号２２

copGFP_forAS_E79 A35 3’ p-etho ×1：配列番号４４

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP_forAS_E79 A35 3’ p-etho ×2：配列番号４５

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

[0147] 結果を図１０に示す。A鎖の3’末端側へのP-OEt修飾は、編集効率を向上させた。

[0148] （３－６）E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響

E鎖について、塩基配列編集のために導入された変異の近傍にLNA修飾を導入し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。各配列の名称において、変異の位置を0とし、その5’側の塩基の位置をマイナス（-）で、3’側の塩基の位置をプラス（+）で表した。

[0149] E鎖

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+0+1：配列番号４７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-1+1+3：配列番号４９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-5-3-1+1+3+5：配列番号５０

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2+2：配列番号５１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2-1+1+2：配列番号５２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-2+2+3：配列番号５３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-2-1+1+2+3：配列番号５４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

[0150] 結果を図１１に示す。変異を挟む特定の位置におけるLNA修飾は、編集効率

を向上させた。特に、変異の位置を0として、-5、-3、-1、+1、+3、および+5の6ヶ所にLNA修飾を導入した場合に最も編集効率が向上した。一方、-2および+2の位置にLNA修飾を導入した場合には、編集効率は低下した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0151] （３－７）E鎖のLNA修飾とA鎖のP-OEt修飾との組合せによる塩基配列編集効率の向上

E鎖における変異の近傍へのLNA修飾の導入について、さらに修飾箇所を広げると共に、A鎖のP-OEt修飾と組み合わせて、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。各配列の名称において、変異の位置を0とし、その5’側の塩基の位置をマイナス（-）で、3’側の塩基の位置をプラス（+）で表した。

[0152] E鎖

copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

copGFP-79_AS_E LNA-3-1+1+3：配列番号４９

copGFP-79_AS_E LNA-5-3-1+1+3+5：配列番号５０

copGFP-79_AS_E LNA-7-5-3-1+1+3+5+7：配列番号５５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-9-7-5-3-1+1+3+5+7+9：配列番号５６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

[0153] A鎖

copGFP_forAS_E79 A35 3’ p-etho ×1：配列番号４４

[0154] 結果を図１２に示す。変異の位置を0として、-7、-5、-3、-1、+1、+3、+5、および+7の8ヶ所、または-9、-7、-5、-3、-1、+1、+3、+5、+7、および+9の10ヶ所にLNA修飾を導入した場合にも、編集効率が向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。また、A鎖のP-OEt修飾と組み合わせた場合

、相加的に編集効率が向上する傾向が見られ、特に2～6ヶ所のLNA修飾を導入したE鎖において高い編集効率が得られた。

[0155] 実施例４：E鎖のLNA修飾およびA鎖のP-OEt修飾による塩基配列編集効率の向上

標的遺伝子として変異型mEGFP遺伝子を使用して、実施例２と同様に、E鎖のLNA修飾およびA鎖のP-OEt修飾による塩基配列編集効率の向上を検討した。使用した編集用核酸（E鎖およびA鎖については修飾を含むもののみ）を以下に示す。修飾を含むE鎖については、下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。修飾を含むA鎖については、下線箇所のヌクレオチドの3'側のリン酸部にP-OEt修飾を有する。対照として、修飾を含まないE鎖（配列番号８）およびA鎖（配列番号９）を使用した。

[0156] E鎖

mEGFP-79_AS_E LNA-2,0：配列番号５７

5'-TCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAG -3'

A鎖

mEGFP-35_S_A 3' p-etho×1：配列番号５８

5'- CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCT -3'

A'鎖

mEGFP-65_AS_Ap：配列番号５９

5'- GAAGAAGATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCT -3'

[0157] 結果を図１３に示す。E鎖における-2位および0位の2ヶ所へのLNA修飾の導入およびA鎖のP-OEt修飾により、編集効率が向上した。特に、E鎖へのLNA修飾により編集効率は大幅に向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0158] 実施例５：E鎖、A鎖、およびA'鎖の比率の検討

標的遺伝子を含むプラスミドDNA（pDNA）に対する編集用核酸（E鎖、A鎖、

およびA’鎖の合計）のモル比（pDNA:編集用核酸）を1：60とし、E鎖：A鎖：A’鎖のモル比を変えて、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸を以下に示す。

[0159] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

A鎖

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖 for AS_E鎖）：配列番号６

A’鎖

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

[0160] 結果を図１４に示す。E鎖のモル濃度が一定の場合には、A’鎖のモル濃度が、A鎖のモル濃度と同じか、またはそれよりも高い場合に、編集効率がより高くなる傾向が見られた。A鎖のモル濃度が一定の場合には、A’鎖のモル濃度が、E鎖のモル濃度と同じか、またはそれよりも高い場合に、編集効率がより高くなる傾向が見られた。A’鎖のモル濃度が一定の場合には、E鎖のモル濃度が、A鎖のモル濃度と同じか、またはそれよりも高い場合に、編集効率がより高くなる傾向が見られた。A鎖のモル濃度が、E鎖およびA’鎖のモル濃度の合計よりも低い方が、編集効率がより高くなる傾向が見られた。

[0161] 実施例６：A’鎖とE鎖と間の位置関係の塩基配列編集効率への影響１

標的遺伝子のアンチセンス鎖においてE鎖と配列同一性を有する塩基配列とA’鎖と配列同一性を有する塩基配列との間隔（すなわちギャップ）が0～9塩基となるように、A’鎖を設計し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸を以下に示す。A’鎖の名称において、「Gap」の後の数字は、ギャップの塩基数を示す。copGFP_A_prime65（配列番号７）の場合、ギャップは0塩基である（この位置関係を「nick」ともいう。）。

[0162] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

A鎖

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖 for AS_E鎖）：配列番号６

A'鎖

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

65Ap_AS_Gap1：配列番号６０

5'- CCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTC -3'

65Ap_AS_Gap2：配列番号６１

5'- TCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTT -3'

65Ap_AS_Gap3：配列番号６２

5'- GTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGT -3'

65Ap_AS_Gap6：配列番号６３

5'- GCCGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGG -3'

65Ap_AS_Gap9：配列番号６４

5'- GCCGCCGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGA -3'

[0163] 結果を図１５に示す。ギャップが大きくなると編集効率は低下したが、ギャップが9塩基となっても、A'鎖の追加による編集効率の向上が確認された。

[0164] 実施例７：A'鎖とE鎖との間の位置関係の塩基配列編集効率への影響２

標的遺伝子のアンチセンス鎖においてE鎖と配列同一性を有する塩基配列とA'鎖と配列同一性を有する塩基配列との重なりが3～39塩基となるように、A'鎖を設計し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸を以下に示す。

[0165] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

A鎖

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖 for AS_E鎖）：配列番号６

A'鎖

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

copGFP-79_AS_Ap 3-overlap：配列番号６５

5'- GTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGT -3'

copGFP-79_AS_Ap 6-overlap：配列番号６６

5'- CTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGC -3'

copGFP-79_AS_Ap 9-overlap：配列番号６７

5'- CTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGC -3'

copGFP-79_AS_Ap 12-overlap：配列番号６８

5'- GATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGG -3'

copGFP-79_AS_Ap 15-overlap：配列番号６９

5'- GCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGT -3'

copGFP-79_AS_Ap 19-overlap：配列番号７０

5'- GTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGT -3'

copGFP-79_AS_Ap 29-overlap：配列番号７１

5'- AGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGG -3'

copGFP-79_AS_Ap 39-overlap：配列番号７２

5'- GTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGT

-3’

[0166] 結果を図１６に示す。重なりがある場合、重なりがない場合（n-TD’(nick)）よりも編集効率が低下する傾向が見られたものの、重なりが3～39塩基となっても、A’鎖の追加による編集効率の向上が確認された。

[0167] 実施例８：A鎖の鎖長の塩基配列編集効率への影響

鎖長およびE鎖と二本鎖を形成する位置を変更したA鎖を設計し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸を以下に示す。35塩基からなるA鎖（配列番号７）を基準とし、5’側または3’側に鎖長を伸ばした。A鎖の鎖長を3’側に伸ばした場合、E鎖中の変異を含む部分と相補的な塩基配列を含むことから、野生型（WT）copGFP遺伝子の配列を有するA鎖（すなわち、E鎖と完全に相補的である；配列番号７１～７５）および変異型（Y/H）copGFP遺伝子の配列を有するA鎖（すなわち、E鎖と変異箇所において相補的でない；配列番号７６～８０）の両方を設計した。

[0168] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

A鎖

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖 for AS_E鎖）：配列番号６

copGFP-153-79b-AS-45TD3’-ODN5’：配列番号７３

5’- CAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-55TD3’-ODN5’：配列番号７４

5’- TGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TD3’-ODN5’：配列番号７５

5’- ACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-75TD3’-ODN5’：配列番号７６

5’-GGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-45TD3’-ODN3’：配列番号７７

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGC -3’

copGFP-153-79b-AS-55TD3’-ODN3’：配列番号７８

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TD3’-ODN3’：配列番号７９

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTA -3’

copGFP-153-79b-AS-75TD3’-ODN3’：配列番号８０

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGC -3’

copGFP-153-79b-AS-79TD3’-ODN3’：配列番号８１

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGCTACG -3’

79E_AS_45TD3’-ODN3’：配列番号８２

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCCACGGC -3’

79E_AS_55TD3’-ODN3’：配列番号８３

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCCACGGCTTCTACCACT -3’

79E_AS_65TD3’-ODN3’：配列番号８４

5’- CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCCACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTA -3’

79E_AS_75TD3’-ODN3’：配列番号８５

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCCACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGC -3’

79E_AS_79TD3’-ODN3’：配列番号８６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCCACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGCTACG -3’

A’鎖

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

[0169] 結果を図１７に示す。A鎖の5’末端がＥ鎖の3’末端を超えて伸長すると、塩基長が長くなるほど編集効率が低下する傾向が見られたが、A’鎖の追加による高い編集効率は維持されると考えられた。一方、A鎖の3’末端側が伸長し、E鎖中の変異を含む部分と相補的な塩基配列を含むようになると、編集効率は低下した。

[0170] 実施例９：n-TD’の二本鎖部と変異との距離の塩基配列編集効率への影響

E鎖上の変異が、A鎖の3’末端の塩基に相補的なE鎖上の塩基を-1位として、+44位（E鎖の5’末端）、+34位、+24位、+14位、+5位、+4位、+1位、-6位、-16位、-26位または-34位（TDの二本鎖部が変異部と重ならない場合を+、TDの二本鎖部が変異部と重なる場合を-とする）の位置に配置されるように、E鎖およびA鎖を設計し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸を以下に示す。

[0171] 79GFP_AS_5’-1-mut(+44-WT)：配列番号８７

5’-AGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAGGGCGCCTTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGGTCATGCGGCC -3’

35mer_for_79GFP_AS_5’-1-mut(+44-WT)：配列番号８８

5’- GGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGG -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-1-mut(+44-WT)：配列番号８９

5’- GTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGT -3’

79GFP_AS_5’-11-mut(+34-WT)：配列番号９０

5’-TAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAGGGCGCCTTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGG -3’

35mer_for_79GFP_AS_5’-11-mut(+34-WT)：配列番号９１

5’-CCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACC -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-11-mut(+34-WT)：配列番号９２

5’-AGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGG -3’

79GFP_AS_5'-21-mut(+24-WT)：配列番号９３

5'-GCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAGGGCGCC TTTGGTGCTCTTC -3'

35mer_for_79GFP_AS_5'-21-mut(+24-WT)：配列番号９４

5'-GAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCT -3'

65Ap_for_79E_AS_5'-21-mut(+24-WT)：配列番号９５

5'-GTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGT -3'

79GFP_AS_5'-31-mut(+14-WT)：配列番号９６

5'-TGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGG TCAGGGCGCCTTT -3'

35mer_for_79GFP_AS_5'-31-mut(+14-WT)：配列番号９７

5'-AAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAG -3'

65Ap_for_79E_AS_5'-31-mut(+14-WT)：配列番号９８

5'-CTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGC -3'

79GFP_AS_5'-41-mut(+4-WT)：配列番号９９

5'-TCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAG GGGCTGAAGGTCA -3'

35mer_for_79GFP_AS_5'-41-mut(+4-WT)：配列番号１００

5'-TGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATG -3'

65Ap_for_79E_AS_5'-41-mut(+4-WT)：配列番号１０１

5'-CCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTC -3'

79GFP_AS_5'-44-mut(+1-WT)：配列番号１０２

5'-TTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGG TAGGGGCTGAAGG -3'

35mer_for_79GFP_AS_5'-44-mut(+1-WT)：配列番号１０３

5’-CCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGC -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-44-mut(+1-WT)：配列番号１０４

5’-CGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGG
-3’

79GFP_AS_5’-51-mut(-6)：配列番号１０５

5’-GAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCT
CAGCAGGTAGGGG -3’

35mer_for_79GFP_AS_5’-51-mut(-6-WT)：配列番号１０６

5’-CCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCT -3’

35A_AS_5’-51-mut(-6-YH)：配列番号１０７

5’-CCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCCACGGCT -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-51-mut(-6)：配列番号１０８

5’-ACGCCGCCGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAG
-3’

79GFP_AS_5’-61-mut(-16)：配列番号１０９

5’-TGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCA
TCACGTGGCTCAG -3’

35mer_for_79GFP_AS_5’-61-mut(-16-WT)：配列番号１１０

5’-CTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTT -3’

35A_AS_5’-61-mut(-16-YH)：配列番号１１１

5’-CTGAGCCACGTGATGGGCCACGGCTTCTACCACTT -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-61-mut(-16)：配列番号１１２

5’-CACGTGCAGCACGCCGCCGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGA
-3’

79GFP_AS_5’-71-mut(-26)：配列番号１１３

5’-CCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAG
CCGTAGCCCATCA -3’

35mer_for_79GFP_AS_5’-71-mut(-26-WT)：配列番号１１４

5’-TGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTAC -3’

35A_AS_5’-71-mut(-26-YH)：配列番号１１５

5’-TGATGGGCCACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTAC -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-71-mut(-26)：配列番号１１６

5’-AGCTGAAGCTCACGTGCAGCACGCCGCCGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCG -3’

79GFP_AS_5’-79-mut(-34)：配列番号１１７

5’-TGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTA -3’

35mer_for_79GFP_AS_5’-79-mut(-34-WT)：配列番号１１８

5’-TACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGG -3’

35A_AS_5’-79-mut(-34-YH)：配列番号１１９

5’-CACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGG -3’

65Ap_for_79E_AS_5’-79-mut(-34)：配列番号１２０

5’-GGTTGTGGGCGTAGCTCTTCATGCTCCTGCCGCCGCACGACGTGCACTCGAAGTCGATGGCGATG -3’

[0172] 結果を図１８に示す。79塩基長のE鎖の両末端から35塩基目の中央塩基に変異を導入した場合（「+5-WT」）に、最も高い編集効率が得られた。3つの鎖の鎖長および相対的な位置関係はそのままで、塩基配列を変えることにより変異の位置を移動させた場合、5’側および3’側のどちらに移動させても、編集効率は低下した。特に+14位よりも離れた場合、または+4位よりも近づいた場合、編集効率は大きく低下した。

[0173] 実施例１０：n-TD’におけるnickの位置の検討

編集標的鎖上においてE鎖と配列同一性を有する配列とA’鎖と配列同一性を有する配列とが隣接している場合、E鎖とA’鎖とは、一定の鎖長の一本鎖ポリヌクレオチドに非連結部分（nick）を一ヶ所導入して得られた２本の一本鎖ポリヌクレオチドであると考えることができる。そこで、nickの位置を移動させた形のE鎖およびA’鎖を設計し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検

討した。具体的には、109、79、65および35塩基長のアンチセンス鎖のE鎖、ならびに、E鎖の5'側に隣接したそれぞれ35、65、79および109塩基長のA'鎖を作成した。また、A'鎖と組み合わせない、144ヌクレオチドの鎖長のE鎖も作成した。A鎖には、各E鎖の3'末端の35ヌクレオチドに相補な塩基配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドを用いた。使用した編集用核酸を以下に示す。

[0174] 144E_AS_5'-105-mut：配列番号１２１

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

109E_AS_5'-70-mut_for_35Ap：配列番号１２２

5'-CGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

35Ap_for_109E_AS_5'-70-mut：配列番号１２３

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGC -3'

65E_AS_5'-26-mut_for_79Ap：配列番号１２４

5'-TAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

79Ap_for_65E_AS_5'-26-mut：配列番号１２５

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGG -3'

35E_AS_notmut_for_109Ap：配列番号１２６

5'-ATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

109Ap_5'-105-mut_for_35E_AS_notmut：配列番号１２７

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCC -3'

[0175] 結果を図１９に示す。79塩基長のE鎖と65塩基長のA'鎖との組合せ、または65塩基長のE鎖と79塩基長のA'鎖との組合せを用いた場合、高い編集効率が得られた。

[0176] 実施例１１：A'鎖を追加したTDによるゲノム編集

標的遺伝子である変異型copGFP遺伝子をゲノム内に挿入したU2OS細胞を用いて、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。

本実施例で使用した細胞は、mPlum-T2A-copGFP (Y/H) 発現ベクタープラスミド (H. Kawai, R. Kamitsubo, H. Kamiya. Correction of monomeric enhanced green fluorescent protein (mEGFP) gene by short 5'-tailed duplexes. J. Biosci. Bioengng. 134, 175-181 (2022)) を用いて、U2OS細胞にリポフェクション後、薬剤 (Zeocin) 耐性およびmPlumの蛍光を指標として、クローニングを行うことにより作製した。

[0177] LNAを-1位および+1位の2ヶ所に導入したE鎖、A鎖、およびA'鎖のそれぞれについて、5'末端側からそれぞれ1ヶ所にPS修飾を導入したものを使用した。使用した編集用核酸（修飾箇所を下線で示す。PS修飾については下線箇所の3'側のリン酸部に修飾を有する。）。

E鎖

copGFP-79_AS_E LNA-1+1_5'PS：配列番号１２８

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

A鎖

copGFP-35_S_A_5'PS (別名：copGFP-35_S_A 5'S) ：配列番号１８

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

A'鎖

copGFP_A_prime65_5'PS：配列番号１２９

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3'

[0178] 蛍光顕微鏡観察は、Opera Phenix(登録商標)ハイスループット・ハイコンテンツイメージングシステム(PerkinElmer社)により行った。

[0179] 結果を図２０に示す。TDおよびA'鎖を導入した結果、copGFPの蛍光を有する細胞が観察された。したがって、本発明の方法により、ゲノム編集が可能

であることが確認された。

[0180] 実施例１２：E鎖のLNA修飾およびA鎖のP-OEt修飾による塩基配列編集効率の向上

標的遺伝子として変異型mEGFP遺伝子を使用して、実施例２と同様に、E鎖のLNA修飾およびA鎖のP-OEt修飾による塩基配列編集効率の向上を検討した。使用した編集用核酸（E鎖およびA鎖については修飾を含むもののみ）を以下に示す。修飾を含むE鎖については、下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。修飾を含むA鎖については、下線箇所のヌクレオチドの3'側のリン酸部にP-OEt修飾を有する。対照として、修飾を含まないE鎖（配列番号８）およびA鎖（配列番号９）を使用した。

[0181] E鎖

mEGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号１３０

5'-TCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAG -3'

A鎖

mEGFP-35_S_A 3' p-etho×1：配列番号５８

5'- CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCT -3'

A'鎖

mEGFP-65_AS_Ap：配列番号５９

5'- GAAGAAGATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCT -3'

[0182] 結果を図２１に示す。copGFP遺伝子を標的遺伝子とした場合と同様に、E鎖における変異の近傍へのLNA修飾の導入およびA鎖のP-OEt修飾により、編集効率が向上した。特に、E鎖へのLNA修飾により編集効率は大幅に向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。なお、図２１中、「AS_TD'」は修飾を含まないTD'の結果を示し、「AS_E(LNAx2)」は修飾を含むE鎖の結果を示し、「AS_TD'(LNAx2)」は修飾を含むE鎖を含むTD'の結果を示し、「AS_TD'(LNAx2,3'-Etho)」は修飾を含むE鎖および修飾を含むA鎖を含むTD'の結果を

示す。

[0183] 実施例１３：E鎖のENA修飾の塩基配列編集効率への影響

E鎖について、塩基配列編集のために導入された変異の近傍にENA修飾を導入し（LNA修飾またはENA修飾の導入位置は、配列中、下線で示す。）、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（修飾を含むもののみ）を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾またはENA修飾を有する。）。各配列の名称において、変異の位置を0とし、その5’側の塩基の位置をマイナス（-）で、3’側の塩基の位置をプラス（+）で表した。

[0184] copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E ENA-1+1：配列番号１３１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

[0185] 結果を図２２に示す。n-E（E鎖のみ)およびn-TD’（E鎖＋A鎖＋A鎖’）による編集において、LNA修飾とENA修飾とは、ほぼ同等の効果を示した。

[0186] 実施例１４：各オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の5’末端または3’末端にアミノリンカーを導入した場合の塩基配列編集効率への影響

n-TD’（E鎖＋A鎖＋A鎖’）に含まれるODNのいずれかについて5’末端または3’末端にアミノリンカー（ALリンカー）を導入し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸（ALリンカーを含むもののみ）を以下に示す。5’末端および3’末端へのALリンカーの導入には、それぞれ5’-Amino-Modifier C6（製品番号0-1906-02、Glen Research製）およびPhthalamido Amino C6 lcaa CPG（製品番号N- 8217-10、ChemGenes製）を用いた。

[0187] E鎖

copGFP-153-79b-AS(E) _5’NH2：配列番号５の5’末端にALリンカーを導入

5’-AL-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG-3’

copGFP-153-79b-AS(E)_3'NH2：配列番号５の3' 末端にALリンカーを導入

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG-AL-3'

A鎖

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN(A)_5'NH2：配列番号６の5' 末端にALリンカーを導入

5'-AL-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT-3'

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN(A)_3'NH2：配列番号６の3' 末端にALリンカーを導入

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT-AL-3'

A'鎖

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN(Aprime)_5'NH2：配列番号７の5' 末端にALリンカーを導入

5'-AL-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3'

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN(Aprime)_3'NH2：配列番号７の3' 末端にALリンカーを導入

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-AL-3'

[0188] 結果を図２３に示す。E鎖、A鎖、およびA'鎖のいずれかの5'末端または3'末端にALリンカーを導入した場合（図中、5'-Linkerまたは3'-Linker）、ALリンカーを導入しない場合（図中、EAA'(n-TD')）と比較して、編集効率に影響はなかった。この結果は、各ODNの各末端に修飾が可能であること、また、ODN間を切断可能なリンカーで連結することが可能であることを示す。

[0189] 実施例１５：リンカーで接続したODNを用いた場合の塩基配列編集効率の比較

E鎖とA鎖、E鎖とA'鎖のそれぞれをＺリンカーで連結し、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。アンチセンス鎖の79-ntの鎖長のE鎖（配列番

号５）を編集用核酸とし、A鎖（配列番号６）またはA'鎖（配列番号７）とＺリンカーで連結した。Ｚリンカーによる連結は、ＷＯ２０１２／０７４０３８の記載に従って行った。Ｚリンカーによる連結の有無にかかわらず、各ODNのモル濃度が同じになるように混合した。すなわち、n-TDおよびLinker_(E+A)（E鎖の3'末端とA鎖の5'末端を連結したもの）ではE鎖：A鎖のモル比を１：１とし、Linker_(E+A')（E鎖の3'末端とA'鎖の5'末端を連結したもの）ではE鎖：A'鎖のモル比を１：１とし、n-TD'、Linker_(E+A)+A'（Linker_(E+A)にA'鎖を加えたもの）、およびLinker_(E+A')+A（Linker_(E+A')にA鎖を加えたもの）ではE鎖：A鎖：A'鎖のモル比を１：１：１とした。

使用した編集用核酸（Ｚリンカーで連結したもののみ）を以下に示す。

[0190] E鎖とA鎖とが連結された構築物

copGFP-79_AS_5'E3'_C8Ph_5'A3'：配列番号５の3'末端と配列番号６の5'末端とをＺリンカーで連結

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG-Z-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT-3'

E鎖とA'鎖とが連結された構築物

copGFP-79_AS_5'E3'_C8Ph_5'A'3'：配列番号５の3'末端と配列番号７の5'末端とをＺリンカーで連結

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG-Z-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3'

[0191] 結果を図２４に示す。Linker_(E+A)は、E鎖とA鎖のそれぞれを混合して調製した場合（n-TD）と同様の効果を示した。一方、Linker_(E+A')は、E鎖単独の編集効率とほぼ等しく、Ｚリンカーでつないだ A'鎖の影響はなかった。

[0192] 実施例１６：ヒト疾患において報告されている原因遺伝子のナンセンス変異に対する編集効率

遺伝子編集の標的配列として、8種類のヒト疾患において報告されているナンセンス変異配列を用いた（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/）。表１に

疾患名、原因遺伝子、およびナンセンス変異近傍の配列を示す。

[表1]

遺伝子名	疾患名	*target
DMD (C→T)	デュシェンヌ型筋ジストロフィ	AATATCATCCTCATTCCAACAAACCAACATCAAAAATTCTCCTCAGCTCCTC TGACAATCAACTCCTAATTATCCACACTTAATCGTAATCAACTTCACACCAC
WRN (C→T)	ウェルナー症候群	ACAATTCCCATCCATTATCCCAACCCTCAAACCTCCCCTCCCTTCATTTCCAG TGACACCTCATCAACTTCACAACATTATTCCTCATCTTATCTTATCCCAAAC
HBB (G→T)	鎌状赤血球貧血症	CACAACTCTCCCTTACTCCCTCTCCCCAACCTCAACCTCCATCAACTTCCTCT TACCCCTCCACACCTCTTCTTCTACCCTTCCACCACAACACTTCCTTTCAG
ADA (C→T)	ADA欠損症	CACCTACCCCACACACCTCTCCCCTACTCTCCCCACCCCTCCACACACCCAG TGACACTTCCCCCCTCAACCCCCCTCCATCCTCTCCTCATCCCCCACCACCC
LCA (C→T)	レーバー先天性黒内障	TTTCCTTCCCACCATCACATCCCATCTCCTCACCTTCCCATTCAACCTCCCCACTAT TGATCTAACACAAAACCCTCCTCATCCCCCACAAACAAACACAACACACAG
PRKN (T→G)	パーキンソン症候群	ACCTCCACCCCACCCAACCCTCACCTTCACCCCACCCTCCATCTTCCTCCCATCATCCTT TGATTCCAAACCCCATCACTCCTCAATCCCCAACTCCCCTCCCCCACCACT
BRAF (G→T)	悪性黒色腫	TCCCCACATTCCTCATCCCCCACATTACATCCCCAAACAACAATTCCCATCTCCATCATTT TGACACTCTACAACCCCAAACTCCCCATCCTCATCCCCACATCAAAATCTTCAAT
NRAS (C→T)	悪性黒色腫	AAACCAACTCCTTATACATCCTCAAACCTCTTTCTTCCCACATACTCCCATACACACTCCCA TGACCAACACTACATCCCATCCCCATCCCCAATACCATACACACCCCAACCCCTTC

表１において、下線はナンセンス変異により生じた終止コドンを示し、網掛け文字はナンセンス変異を示す。GCを袋文字で示す。なお、各遺伝子情報は、アメリカ国立生物工学情報センターのウェブサイト（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/）において以下の番号で登録されている。

DMD：rs128626235

WRN：rs121908446

HBB：rs33950507

ADA：rs780014431

LCA：rs780667159

PRKN：rs1562485799

BRAF：rs121913357

NRAS：rs1562485799

[0193] これらのナンセンス変異の前後の各55-ntを、発現ベクターの赤色蛍光タンパク質mPlum遺伝子とT2A配列との間に挿入し、ナンセンス変異がn-TDまたはn-TD’によって編集されることでcopGFP遺伝子が翻訳されるpcDNA4_mPlum_S_copGFP WT（図２５）を作製した。

鎖長が79-ntのアンチセンス（AS）E鎖とE鎖の3’末端側に相補的な配列を持つ35-ntのA鎖、E鎖の5’末端から続く65-ntのA’鎖を用いて、細胞に導入した際のモル比が上記プラスミドDNAを1としてE：A：A’＝10：20：30となるように、n-TD’を調製した。

また、A’鎖を用いずに、細胞に導入した際のモル比がプラスミドDNAを1としてE：A＝10：20となるように、n-TDを調製した。

対照として、実施例１と同様に、蛍光消失型copGFPを組み込んだpcDNA4_mPlum_T2A_copGFP Y/H、E鎖（配列番号５）、A鎖（配列番号６）およびA’鎖（配列番号７）を用いて編集効率を測定した。

[0194] 結果を図２６および表２に示す。すべての配列において、AS n-TDよりもAS n-TD’の方が遺伝子編集効率が高かった（図２６）。また、AS n-TD’による遺伝子編集効率が高い遺伝子配列では、E鎖部分のGC含量が高い傾向があり

、編集効率にE鎖のGC含量が影響していることが示唆された。

[表2]

gene	relative editing efficiency	GC% of E strand
copGFP Y/H	1.00	63.3%
WRN	35.3	55.7%
HBB	7.24	64.6%
ADA	3.16	69.6%
NRAS	2.47	45.6%
PRKN	2.09	49.4%
LCA	1.13	49.4%
DMD	0.76	40.5%
BRAF	0.30	45.6%

[0195] 実施例１７－１：標的領域に対してE鎖と異なる配置にある鎖長35塩基のオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の追加によるE鎖による塩基配列編集効率への影響

緑色蛍光タンパク質を用いたE鎖による塩基配列編集法における、標的領域に対してE鎖と異なる配置にある鎖長35塩基のODNの追加による編集効率の変化を検討した。

標的遺伝子としてカイアシ由来の緑色蛍光蛋白質をコードするcopGFP遺伝子を用いた。蛍光団を構成するGly-Tyr-Gly中のTyrに相当する塩基配列TACをCAC（Hisをコードする）に変えた変異型copGFP遺伝子（配列番号１）を有するプラスミドDNA、E鎖およびODNをヒトU2OS細胞に共導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を比較した。標的遺伝子のアンチセンス鎖の一部と同じ配列を有し、蛍光団をコードする配列が野生型である、鎖長79塩基の一本鎖ポリヌクレオチド（AS_E鎖、配列番号５）をE鎖として用いた。標的領域に対してE鎖と異なる配置にある、アンチセンス鎖またはセンス鎖と配列同一性を有する鎖長35塩基のODNを使用した。使用したODNの配列を以下に示す。

[0196] copGFP-153-79b-S-35TDup-ODN（AS_Up_0）：配列番号１４０

5’-GGCGCCTTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGGTCATGC -3’

copGFP-153-79b-S-35TD5'-ODN (AS_Up_T) ：配列番号１４１

5'-ATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-153-79b-S-35TDcn-ODN (AS_Cnt_Y) ：配列番号１４２

5'-GAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCA -3'

copGFP-153-79b-S-35TDcnYH-ODN (AS_Cnt_H) ：配列番号１４３

5'-GAAGTGGTAGAAGCCGTGGCCCATCACGTGGCTCA -3'

copGFP-153-79b-S-35TD3'-ODN (AS_Dwn_T) ：配列番号１４４

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAG -3'

copGFP-153-79b-S-35TDdown-ODN (AS_Dwn_O) ：配列番号１４５

5'-GCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP-153-79b-AS-35TDup-ODN (S_Up_O) ：配列番号１４６

5'-GCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCC -3'

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN (S_Up_T、A鎖 for AS_E鎖) ：配列番号６

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-153-79b-AS-35TDcn-ODN (S_Cnt_Y) ：配列番号１４７

5'-TGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTC -3'

copGFP-153-79b-AS-35TDcnYH-ODN (S_Cnt_H) ：配列番号１４８

5'-TGAGCCACGTGATGGGCCACGGCTTCTACCACTTC -3'

copGFP-153-79b-AS-35TD5'-ODN (S_Dwn_T) ：配列番号１４９

5'-CTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGCTACG -3'

copGFP-153-79b-AS-35TDdown-ODN (S_Dwn_O) ：配列番号１５０

5'-AGAACCCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGC -3'

[0197] 図２７Ａには、標的領域におけるE鎖および鎖長35塩基の各ODNの配置が示されている。鎖長35塩基の各ODNの名称は、copGFP遺伝子のアンチセンス鎖と配列同一性を有する場合にはAS、センス鎖と配列同一性を有する場合にはSを含む。編集塩基（E鎖上の編集用変異）からcpoGFP遺伝子の上流側に位置する場合にはUp（upstream）、下流側に位置する場合にはDwn（downstream）、編集塩基上に位置する場合にはCnt（center）を含む。E鎖の塩基配列と重複せ

ず、隣接する場合にはO（outside）、E鎖の末端と重複する塩基配列の場合にはT（terminal）を含む。編集塩基上に位置するODNについては、蛍光型copGFPの発色団中のTyrをコードする配列5’-TAC-3’（センス鎖）またはその相補鎖5’-GTA-3’（アンチセンス鎖）を含む場合にはY、変異型copGFPのHisをコードする配列5’-CAC-3’（センス鎖）またはその相補鎖5’-GTG-3’（アンチセンス鎖）を含む場合にはHを含む。なお、S_Up_Tは、TDのA鎖（配列番号６）と同一のODNである。

[0198] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖と、標的領域に対してE鎖と異なる配置にある鎖長35塩基のODNについて、それぞれの溶液を1：10の比率で混合し、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド（pDNA; 30.0 ng、7.33 fmol）とそれぞれ調製した編集用核酸とを、pDNAとE鎖とのモル比が1：10となるように混合し、384-well plateの各wellに播種（8×10^3細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0199] 編集効率は、以下の方法により算出した。

Opera Phenixで384-well plateの各wellの蛍光顕微鏡画像を撮影した。全てのwellのHoechst33342の蛍光強度のデータから、画像解析ソフトHarmonyを用いて各細胞核を識別し、各細胞核のHoechst33342、mPlum、およびcopGFPの蛍光波長の蛍光強度の中央値/pixelの積算値を算出した。全てのwellのHoechst33342の蛍光強度データから、平均的な蛍光強度および形態を有する細胞核を編集効率の解析対象として選択した。mPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミドのみを導入したwell内の細胞核のmPlumとcopGFPの蛍光強度データから、copGFPの蛍光が陰性の細胞（編集された蛍光型copGFP遺伝子のpDNAを含まない細胞）とcopGFPの蛍光が陽性の細胞（蛍光型copGFP遺伝子のpDNAを含む細胞）との閾値線を設定した。また、全てのwellの解析対象の細胞核

のmPlumの蛍光強度から、mPlumが陽性の細胞（pDNAを含む細胞）とmPlumが陰性の細胞（pDNAを含まない細胞）との閾値を設定した。各wellで、copGFP陽性細胞数をmPlum陽性細胞数で除した値を編集効率として算出した。

[0200] 結果を図２７Ｂに示す。E鎖のみ（－）の編集効率と比較して、E鎖の3'-末端側の相補鎖のODN、S_Up_T（A鎖）を追加した5'-tailed duplex（TD）において編集効率が最も向上した。また、E鎖の5'-末端側の相補鎖のODN（S_Dwn_T）を追加した場合でも編集効率は有意に向上した。さらに、E鎖の5'-末端に隣接しているODN（AS_Dwn_0）を追加した場合にも編集効率が有意に向上した。

[0201] 実施例１７－２：E鎖、A鎖、およびE鎖の5'-末端に隣接しているODN（AS_Dwn_0、鎖長35塩基のA'鎖）の導入量の違いによる塩基配列編集効率への影響

緑色蛍光タンパク質を用いたE鎖による塩基配列編集法における、標的プラスミドに対するE鎖、A鎖、および、E鎖の5'-末端に隣接しているODN（AS_Dwn_0、鎖長35塩基のA'鎖）の総導入量を変えた場合の編集効率への影響について検討した。

標的プラスミドDNAに対して、E鎖、A鎖、鎖長35塩基のA'鎖を異なる組み合わせと用量で、細胞に導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を比較した。

[0202] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖（配列番号５）、A鎖（配列番号６）、および鎖長35塩基のA'鎖（AS_Dwn_0、配列番号１４５）について、それぞれの溶液を、1：0：0、1：10：0、1：0：10、または1：5：5のモル比で混合し、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド（pDNA; 30.0 ng、7.33 fmol）とそれぞれ調製した編集用核酸とを、pDNAとE鎖とのモル比が1：10、1：1、または1：0.1となるように混合し、384-well plateの各wellに播種（8×10^3細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラ

ホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0203] 編集効率は、実施例１７－１と同様に算出した。

[0204] 結果を図２８に示す。E鎖の量に依存して、編集効率は上昇した。また、E鎖のみによる編集効率と比較して、A鎖または鎖長35塩基のA'鎖を追加した場合に、編集効率が向上した。また、A鎖またはA'鎖を単独で追加した場合の編集効率と比較して、両方を追加した場合には編集効率がより向上した。

[0205] 実施例１７－３：E鎖に対する、A鎖および鎖長35塩基のA'鎖の導入量による塩基配列編集効率への影響

緑色蛍光タンパク質を用いたE鎖による塩基配列編集法における、標的プラスミドに対するE鎖の用量を一定とし、A鎖および鎖長35塩基のA'鎖の導入量を変えた場合の編集効率への影響について検討した。

標的プラスミドDNAとE鎖のモル比を1：1として、A鎖および鎖長35塩基のA'鎖を異なる用量で、細胞に導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を比較した。

[0206] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖（配列番号５）、A鎖（配列番号６）、および鎖長35塩基のA'鎖（AS_Dwn_0、配列番号１４５）について、それぞれ1μMの溶液を、E鎖と、A鎖、鎖長35塩基のA'鎖、またはA鎖および鎖長35塩基のA'鎖の混合物（モル比1：1）とを、1：0.1、1：1、1：10、1：100、または1：1000で混合し、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド（pDNA; 30.0 ng、7.33 fmol）とそれぞれ調製した編集用核酸とを、pDNAとE鎖とのモル比が1：1となるように混合し、384-well plateの各wellに播種（8×10^3細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0207] 編集効率は、実施例１７－１と同様に算出した。

[0208] 結果を図２９に示す。pDNAとE鎖のモル比を1：1として、A鎖または鎖長35

塩基のA’鎖を追加した場合、それぞれの用量が増加するに従って、編集効率が向上した。また、A鎖と鎖長35塩基のA’鎖では、同じ用量を追加した場合、A鎖の追加の方が編集効率はより向上した。A鎖とA’鎖とを1：1で混合して追加した場合では、それぞれ単独で同じ用量を追加した場合よりも編集効率が向上した。

[0209] 実施例１７－４：E鎖に対する、A鎖および鎖長35塩基のA’鎖の導入量比による塩基配列編集効率への影響

緑色蛍光タンパク質を用いたE鎖による塩基配列編集法における、標的プラスミドに対するE鎖の用量を一定とし、A鎖および鎖長35塩基のA’鎖の用量比を変えた場合の編集効率への影響について検討した。

標的プラスミドDNA、E鎖、およびA鎖と鎖長35塩基のA’鎖との合計のモル比を、1：1：100として、A鎖と鎖長35塩基のA’鎖とを異なるモル比で細胞に導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を比較した。

[0210] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖（配列番号５）、A鎖（配列番号６）、および鎖長35塩基のA’鎖（AS_Dwn_0、配列番号１４５）について、それぞれ1μMの溶液を、E鎖を1として、A鎖および鎖長35塩基のA’鎖を、100：0、90：10、80：20、70：30、60：40、50：50、40：60、30：70、20：80、10：90、0：100のモル比で混合し、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP (Y/H) 発現ベクタープラスミド（pDNA; 30.0 ng、7.33 fmol）とそれぞれ調製した編集用核酸とを、pDNAとE鎖とのモル比が1：1となるように混合し、384-well plateの各wellに播種（8×10^3細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0211] 編集効率は、実施例１７－１と同様に算出した。

[0212] 結果を図３０に示す。A鎖と鎖長35塩基のA’鎖との用量比の変化による編集効率への影響が見られた。鎖長35塩基のA’鎖の用量をA鎖の用量よりも多くし

た場合に編集効率がより向上する傾向が見られた。

[0213] 実施例１７－５：E鎖の5'-末端に隣接しているODN（A'鎖）の鎖長の違いによる塩基配列編集効率への影響

緑色蛍光タンパク質を用いたE鎖による塩基配列編集法における、E鎖の5'-末端に隣接しているODN（A'鎖; 鎖長15～75塩基）の追加による編集効率を解析し、A'鎖の鎖長の編集効率への影響を検討した。

標的プラスミドDNAおよびE鎖（配列番号５）に、A鎖（配列番号６）、または、鎖長15塩基（A'鎖_15-nt）、25塩基（A'鎖_25-nt）、35塩基（A'鎖_35-nt、配列番号X１１）、45塩基（A'鎖_45-nt）、55塩基（A'鎖_55-nt）、65塩基（A'鎖_65-nt）、もしくは75塩基（A'鎖_75-nt）のA'鎖を追加して、これらを細胞に導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を比較した。使用したODNの配列を以下に示す。図３１Ａには、標的領域におけるE鎖および各ODNの配置が示されている。

[0214] copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖）：配列番号６

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP_A_prime15（A'鎖_15-nt）：配列番号１５１

5'-GCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP_A_prime25（A'鎖_25-nt）：配列番号１５２

5'-TTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP_A_prime35（copGFP-153-79b-S-35TDdown-ODN）（A'鎖_35-nt）：配列番号１４５

5'-GCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP_A_prime45（A'鎖_45-nt）：配列番号１５３

5'-TGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP_A_prime55（A'鎖_55-nt）：配列番号１５４

5'-TCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3'

copGFP_A_prime65（A'鎖_65-nt）（A'鎖）：配列番号７

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT

-3’

copGFP_A_prime75（A’鎖_75-nt）：配列番号１５５

5’-CGCCGCCGTCCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3’

[0215] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖およびA鎖または異なる鎖長のA’鎖について、それぞれ1μMの溶液を、1：10のモル比で混合し、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド（pDNA; 30.0 ng、7.33 fmol）とそれぞれ調製した編集用核酸とを、pDNAとE鎖とのモル比が1：10となるように混合し、384-well plateの各wellに播種（8×10³細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0216] 編集効率は、実施例１７－１と同様の方法で算出した。

[0217] 結果を図３１Ｂに示す。E鎖に対してA鎖を追加した5’-tailed duplex（TD）の編集効率よりも、鎖長45塩基以上のA’鎖を同じモル用量で追加した場合の編集効率の方が高く、鎖長65塩基のA’鎖を追加した場合に最も編集効率が高くなった。

[0218] 実施例１７－６：A’鎖の鎖長の違いによる塩基配列編集効率への影響

緑色蛍光タンパク質を用いたE鎖またはTD（E鎖およびA鎖）による塩基配列編集法における、鎖長15～75塩基のA’鎖の追加による編集効率を解析し、A’鎖の鎖長の編集効率への影響を検討した。

標的プラスミドDNAおよびE鎖またはTDに、鎖長15塩基（A’鎖_15-nt）、25塩基（A’鎖_25-nt）、35塩基（A’鎖_35-nt、配列番号X１１）、45塩基（A’鎖_45-nt）、55塩基（A’鎖_55-nt）、65塩基（A’鎖_65-nt）または75塩基（A’鎖_75-nt）のA’鎖を追加して、これらを細胞に導入し、蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察された細胞の割合を比較した。使用したODNは、実施例１７－５

で用いたもの（配列番号７、１４５および１５１～１５５）と同じである。

[0219] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

E鎖（配列番号５）、A鎖（配列番号６）および異なる鎖長のA'鎖（配列番号１４５および１５１～１５５）について、それぞれの溶液を、E鎖：A鎖またはE鎖：A'鎖の場合では1：10、E鎖：A鎖：A'鎖の場合には1：5：5のモル比となるように混合し、室温で１時間静置して、編集用核酸を調製した。編集効率解析用の変異型copGFP遺伝子を含むmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミド（pDNA; 30.0 ng、7.33 fmol）とそれぞれ調製した編集用核酸とを、pDNAとE鎖とのモル比が1：10となるように混合し、384-well plateの各wellに播種（8×10^3細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、Lipofectamine 3000を用いて共導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0220] 編集効率は、実施例１７－１と同様の方法で算出した。

[0221] 結果を図３２に示す。TDの編集効率と比較して、TDに鎖長35塩基以上のA'鎖を追加した場合の編集効率の方が高くなった。

[0222] 実施例１７－７：各細胞の蛍光強度の積算値を用いた定量的編集効率の算出法の確立

実施例１７－１～１７－２における編集効率は、copGFP陽性細胞数をmPlum陽性細胞数で除した値として算出された。この算出法では、各細胞に導入された標的プラスミドDNAのコピー数は反映されていない。また、編集効率の向上により解析対象の細胞核の大多数がcopGFP陽性細胞となった場合（例えば実施例１７－６）、編集効率の比較は困難となる。そこで、各wellの解析対象の細胞核のcopGFPとmPlumの蛍光強度の総積算値から、標的プラスミドDNAの導入コピー数が反映された編集効率を算出できるか検討した。

[0223] 具体的な実験方法は、以下のとおりである。

mPlum-T2A-copGFP（正常型）発現ベクタープラスミドおよびmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミドを、1：0（正常型copGFPの割合 100%）、

2：1（66.7%）、5：5（50.0%）、1：2（33.3%）、1：3（25.0%）、1：7（12.5%）、1：15（6.25%）、1：31（3.13%）、1：63（1.56%）、1：127（0.781%）、1：255（0.391%）、1：511（0.195%）、1：1023（0.0977%）、1：2047（0.0488%）、1：4095（0.244%）、および0：1（0%）のモル比で混合した。384-well plateの各wellに播種（8×10^3細胞）後、一晩培養したU2OS細胞に、混合したプラスミド30.0 ngをLipofectamine 3000を用いて導入した。4時間後に培地交換し、48時間培養した。Hoechst 33342によって核染色し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡画像を取得した。

[0224] 蛍光顕微鏡画像から、各wellの蛍光強度の解析値を以下の方法で求めた。

Opera Phenixで384-well plateの各wellの蛍光顕微鏡画像を撮影した。全てのwellのHoechst33342の蛍光強度のデータから、画像解析ソフトHarmonyを用いて各細胞核を識別し、各細胞核のHoechst33342、mPlum、およびcopGFPの蛍光波長の蛍光強度の中央値/pixelの積算値を算出した。全てのwellのHoechst33342の蛍光強度データから、平均的な蛍光強度および形態を有する細胞核を解析対象として選択した。mPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミドのみを導入したwell内の細胞核のmPlumとcopGFPの蛍光強度データから、copGFPの蛍光が陰性の細胞（蛍光型copGFP遺伝子のpDNAを含まない細胞）とcopGFPの蛍光が陽性の細胞（蛍光型copGFP遺伝子のpDNAを含む細胞）との閾値線を設定した。また、各wellの解析対象の細胞核のmPlumの蛍光強度から、mPlumが陽性の細胞（pDNAを含む細胞）とmPlumが陰性の細胞（pDNAを含まない細胞）との閾値を設定した。mPlum-T2A-copGFP（正常型）発現ベクタープラスミドとmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミドとが異なる割合で導入された各wellにおけるcopGFP陽性細胞のcopGFPの蛍光強度の積算値とmPlum陽性細胞のmPlumの蛍光強度の積算値を求めた。各wellのcopGFPの積算値をmPlum-T2A-copGFP（Y/H）発現ベクタープラスミドのみを導入したwellの蛍光強度データで補正した値を解析値とした。

[0225] 蛍光強度データからの解析値を縦軸に、導入したプラスミド中のmPlum-T2A-copGFP（正常型）発現ベクタープラスミドの割合（%）を横軸にプロットし

た結果を図３３に示す。copGFP（正常型）発現ベクターが50%までの解析値で回帰直線を求めたところ、直線関係の決定係数R^2が0.9961となった。この結果から、この方法を用いた蛍光強度データの解析値から、編集効率を比較することができ、特に50%までの編集効率を正確に比較できると考えられる。

[0226] 実施例１７－８：A'鎖の鎖長の違いによる塩基配列編集効率への影響

実施例１７－６の結果について、実施例１７－７の方法によって再解析し、A'鎖の鎖長の編集効率への影響を比較した。

[0227] 結果を図３４に示す。図３２に示された結果と同様に、TDの編集効率と比較して、TDに鎖長35塩基以上のA'鎖を追加した場合の編集効率の方が高くなることが確認された。また、TDに鎖長65塩基のA'鎖を追加した場合に、編集効率が最も高くなった。

[0228] 実施例１８－１：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（２）

E鎖上の編集塩基の周辺の1ヶ所にLNA修飾を導入した場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

実施例３（３－６）では、編集塩基を挟んで対称となる特定の位置にLNA修飾を導入した場合の編集効率を検討した。-5、-3、-1、+1、+3、および+5の6ヶ所にLNA修飾を導入した場合（E鎖上の編集塩基の位置を0、その5'側の塩基の位置をマイナス（-）、3'側の塩基の位置をプラス（+）とする。）で、編集効率が最も向上した（図１１および図１２）。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖）：配列番号６

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for

AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+1：配列番号１５６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+2：配列番号１５７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+3：配列番号１５８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+4：配列番号１５９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+5：配列番号１６０

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+6：配列番号１６１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1：配列番号１６２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2：配列番号１６３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3：配列番号１６４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-4：配列番号１６５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-5：配列番号１６６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-6：配列番号１６７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

[0229] 結果を図３５に示す。LNA修飾を１ヶ所導入した場合、編集塩基の位置（0）にLAN修飾を導入した場合にのみ編集効率が向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0230] 実施例１８－２：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（３）

E鎖の編集塩基の位置（0）を中心として対称的となる位置の2ヶ所にLNA修飾を導入した場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0231] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3'

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-2+2：配列番号１６８

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-3+3：配列番号１６９

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-4+4：配列番号１７０

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-5+5：配列番号１７１

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-6+6：配列番号１７２

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

[0232] 結果を図３６に示す。-１および+1にLNA修飾を導入した場合に、編集効率が特に向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0233] 実施例１８－３：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（４）

E鎖の編集塩基の周辺において、1塩基を空けた２ヶ所にLNA修飾を導入した場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0234] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

copGFP-79_AS_E LNA-5-3：配列番号１７３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-4-2：配列番号１７４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-1：配列番号１７５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+1+3：配列番号１７６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+2+4：配列番号１７７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA+3+5：配列番号１７８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

[0235] 結果を図３７に示す。+1および+3の2ヶ所にLNA修飾を導入した場合に編集効率が向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0236] 実施例１８－４：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（５）

E鎖の編集塩基の位置（0）および追加で1ヶ所にLNA修飾を導入した場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0237] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT -3’

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+1：配列番号１７９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+2：配列番号１８０

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+3：配列番号１８１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+5：配列番号１８３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+6：配列番号１８４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+7：配列番号１８５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+0：配列番号１８６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2+0：配列番号１８７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3+0：配列番号１８８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-4+0：配列番号１８９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG

GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-5+0：配列番号１９０

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-6+0：配列番号１９１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-7+0：配列番号１９２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

[0238] 結果を図３８に示す。編集塩基の位置（0）および追加で１ヶ所にLNA修飾を導入した場合、いくつかの組み合わせでは、LAN修飾を導入しない場合と比較して編集効率が向上した（特に、-2+0、-1+0、0+3、0+4および0+6）。0および+4の位置にLNA修飾を導入した場合（0+4）では特に編集効率が向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0239] 実施例１８－５：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（６）

E鎖の編集塩基の位置（0）および追加で2ヶ所にLNA修飾を導入した場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0240] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+0+1：配列番号４７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2+0+2：配列番号１９３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3+0+3：配列番号１９４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-4+0+4：配列番号１９５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-5+0+5：配列番号１９６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-6+0+6：配列番号１９７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-7+0+7：配列番号１９８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

[0241] 結果を図３９に示す。いくつかの組み合わせでは、LAN修飾を導入しない場合と比較して編集効率が向上した（特に、-2+0+2、-3+0+3、-4+0+4および-5+

0+5）。編集塩基の位置（0）、-4および+4にLNA修飾を導入した場合（-4+0+4）に、編集効率が特に向上した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0242] 実施例１８－６：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（７）

E鎖の編集塩基の位置（0）を中心として対称的となる位置の2ヶ所において2塩基または3塩基連続でLNA修飾を導入した場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0243] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

copGFP-79_AS_E LNA-2-1+1+2：配列番号１９９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-2+2+3：配列番号２００

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-2-1+1+2+3：配列番号２０１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

[0244] 結果を図４０に示す。いずれの組み合わせでも編集効率は低下した。同様の結果は、E鎖単独での編集でも得られた。

[0245] 実施例１８－７：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（８）

実施例３（３－６）および１８－１～１８－６において編集効率を向上させたLNA修飾（すなわち、編集塩基の位置（0）、-1+1、-3-1+1+3、-2+0、-1+0、0+1、および0+2）に、+4のLNA修飾を組み合わせた場合の塩基配列編集効率を、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0246] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+1+4：配列番号２０２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-1+1+3：配列番号４９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-3-1+1+3+4：配列番号２０３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+1：配列番号１７９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+1+4：配列番号２０４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+0：配列番号１８６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+0+4：配列番号２０５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+2：配列番号１８０

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+2+4：配列番号２０６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2+0：配列番号１８７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2+0+4：配列番号２０７

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

[0247] 結果を図４１に示す。-3-1+1+3を除き、+4へのLNA修飾を組み合わせることにより、編集効率は向上した。

[0248] 実施例１８－８：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（９）

未修飾のE鎖、または編集塩基の位置0にLNA修飾を有するE鎖において、+4、+5、+6または+7の位置にLNA修飾を追加で導入したE鎖と、3’末端側から1塩基ずつ短くした異なる鎖長のA鎖（31～35塩基）とを用いた場合の塩基配列編集効率について、実施例１と同様に検討した。

実施例１８－７までの実験結果では、E鎖の+4の位置のLNA修飾とその他の位置のLNA修飾とを組み合わせることにより、特に編集効率が向上した。E鎖の+4の位置は、A鎖としてE鎖の3’末端から35塩基までの配列の相補配列からなるODNを用いた場合、当該A鎖の3’末端の塩基と隣接する塩基、すなわち、E鎖においてA鎖と塩基対形成しない配列の3’末端に相当する。そこで、E鎖のLNA修飾の位置とA鎖の3’末端との関係性について検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0249] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖、35-nt A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT
-3’

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-34TD3’-ODN（34-nt A鎖）：配列番号２０８

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGA -3’

copGFP-153-79b-AS-33TD3’-ODN（33-nt A鎖）：配列番号２０９

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTG -3’

copGFP-153-79b-AS-32TD3’-ODN（32-nt A鎖）：配列番号２１０

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGT -3’

copGFP-153-79b-AS-31TD3’-ODN（31-nt A鎖）：配列番号２１１

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+5：配列番号１８３

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+6：配列番号１８４

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0+7：配列番号１８５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG
GGCTGAAGGTCAG -3’

[0250] 結果を図４２に示す。未修飾のE鎖、または、0と+4の位置の2ヶ所にLNA修飾を導入したE鎖を用いたn-TD’では、A鎖の鎖長が34塩基の場合に編集効率が最も高くなり、32塩基以下では編集効率が顕著に低下した。また、異なる鎖長のA鎖を用いた場合でも、未修飾のE鎖のn-TD’よりも、0と+4の位置の2ヶ所にLNA修飾を導入したE鎖のn-TD’において、より高い編集効率が得られた。E鎖のLNA修飾による編集効率の向上は、E鎖のLNA修飾の位置とA鎖の3’末端との位置関係には依存せず、E鎖のLNA修飾の位置およびA鎖の適切な鎖長のそれぞれに依存した。

[0251] 実施例１８－９：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（１０）

実施例１８－４において編集効率が向上した、2ヶ所にLNA修飾が導入されたE鎖と、33、34または35塩基長のA鎖とを用いたn-TD'による塩基配列編集効率について、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0252] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖、35-nt A鎖）：配列番号６

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3'

copGFP-153-79b-AS-34TD3'-ODN（34-nt A鎖）：配列番号２０８

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGA -3'

copGFP-153-79b-AS-33TD3'-ODN（33-nt A鎖）：配列番号２０９

5'-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTG -3'

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3'

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA0+5：配列番号１８３

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA0+6：配列番号１８４

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA0+7：配列番号１８５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

[0253] 結果を図４３に示す。35塩基長または34塩基長のA鎖を含むn-TD’による編集効率は、E鎖に0の位置および+4、+5または+6の位置の2ヶ所にLNA修飾を導入した場合に、LNA修飾を含まない場合と比較して向上した。0と+4の位置にLNA修飾を導入したE鎖を用いた場合の編集効率が最も高く、+5、+6と修飾位置が離れるほど、編集効率は低下した。35塩基長のA鎖と34塩基長のA鎖との間で、編集効率の向上の傾向に違いは無かった。また、0と+7のLNA修飾を導入したE鎖では、編集効率は向上しなかった。33塩基長のA鎖を用いた場合では、E鎖への2ヶ所のLNA修飾の導入により編集効率は向上したが、LNA修飾の位置による違いは無かった。

[0254] 実施例１８－１０：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（１１）

実施例１８－７の実験結果で編集効率が向上したE鎖と、33、34または35塩基長のA鎖とを用いたn-TD’による塩基配列編集効率について、実施例１と同様に検討した。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0255] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGG GGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖、35-nt A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-34TD3’-ODN（34-nt A鎖）：配列番号２０８

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGA -3’

copGFP-153-79b-AS-33TD3’-ODN（33-nt A鎖）：配列番号２０９

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTG -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

5'-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3'

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-1+1+4：配列番号２０２

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-1+0+4：配列番号２０５

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

copGFP-79_AS_E LNA-2+0+4：配列番号２０７

5'-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3'

[0256] 結果を図４４に示す。LNA修飾を導入したE鎖を含むn-TD'では、A鎖が35塩基長である場合と34塩基である場合とで同程度に編集効率が向上した。

[0257] 実施例１８－１１：E鎖のLNA修飾の塩基配列編集効率への影響（１２）

copGFP遺伝子の塩基配列編集効率に影響するE鎖のLNA修飾の位置について、実施例１６の実験で用いたDMD遺伝子およびWRN遺伝子のナンセンス変異に対する編集効率への影響を検討した。それぞれの遺伝子に対して、n-TD'による塩基配列編集効率について、実施例１と同様に検討した。copGFP遺伝子およびDMD遺伝子については、pDNAを1として、E鎖10、A鎖20およびA'鎖30のモル比で、WRN遺伝子については、pDNAを1として、E鎖0.1、A鎖0.2およびA'鎖0

.3のモル比で細胞に導入し、編集効率の解析を行った。

使用した編集用核酸を以下に示す（下線箇所のヌクレオチドにLNA修飾を有する。）。

[0258] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-153-79b-AS-35TD3’-ODN（A鎖、35-nt A鎖）：配列番号６

5’-CTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGAT -3’

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A’鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

5’-CTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATGGCGTGCAGGAAGGGGTTCT-3’

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-4+0：配列番号１８９

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

copGFP-79_AS_E LNA-2+2：配列番号５１

5’-CGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAAGTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCTGAAGGTCAG -3’

DMD-79_AS_E：配列番号２１２

5’-TGATTACATTAACCTGTGGATAATTACGAGTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGGAGAATCTTTTCAC TGTTGGTTTGTTG -3’

DMD-35_forAS-E_A：配列番号２１３

5’-CAACAAACCAACAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTG -3’

DMD-65_forAS-E_Aprime：配列番号２１４

5’-GCCGGGATTCTCCTCCACGTCACCGCATGTTAGAAGACTTCCTCTGCCCTCGCTGGTGGTGAAGT -3’

DMD-79_AS_E LNA0+4：配列番号２１５

5’-TGATTACATTAACCTGTGGATAATTACGAGTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGGAGAATCTTTTCAC TGTTGGTTTGTTG -3’

DMD-79_AS_E LNA-4+0：配列番号２１６

5’-TGATTACATTAACCTGTGGATAATTACGAGTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGGAGAATCTTTTCAC TGTTGGTTTGTTG -3’

DMD-79_AS_E LNA-1+1：配列番号２１７

5’-TGATTACATTAACCTGTGGATAATTACGAGTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGGAGAATCTTTTCAC TGTTGGTTTGTTG -3’

DMD-79_AS_E LNA0：配列番号２１８

5’-TGATTACATTAACCTGTGGATAATTACGAGTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGGAGAATCTTTTCAC TGTTGGTTTGTTG -3’

DMD-79_AS_E LNA-2+2：配列番号２１９

5’-TGATTACATTAACCTGTGGATAATTACGAGTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGGAGAATCTTTTCAC TGTTGGTTTGTTG -3’

WRN-79_AS_E：配列番号２２０

5’-CAGCAATAATCTTCTGAACCTCTGGAGTCAGGCCTGCTCGCTCCAAATCAAGGGGGCAGCCAGCTT TCACCGCTTGGGA -3’

WRN-35_forAS-E_A：配列番号２２１

5’-TCCCAAGCGGTGAAAGCTGGCTGCCCCCTTGATTT -3’

WRN-65_forAS-E_Aprime：配列番号２２２

GCCGGGATTCTCCTCCACGTCACCGCATGTTAGAAGACTTCCTCTGCCCTCGTTTCGGATAACAT

WRN-79_AS_E LNA0+4：配列番号２２３

5’-CAGCAATAATCTTCTGAACCTCTGGAGTCAGGCCTGCTCGCTCCAAATCAAGGGGGCAGCCAGCTT TCACCGCTTGGGA -3’

WRN-79_AS_E LNA-4+0：配列番号２２４

5’-CAGCAATAATCTTCTGAACCTCTGGAGTCAGGCCTGCTCGCTCCAAATCAAGGGGGCAGCCAGCTT TCACCGCTTGGGA -3’

WRN-79_AS_E LNA-1+1：配列番号２２５

5’-CAGCAATAATCTTCTGAACCTCTGGAGTCAGGCCTGCTCGCTCCAAATCAAGGGGGCAGCCAGCTT TCACCGCTTGGGA -3’

WRN-79_AS_E LNA0：配列番号２２６

5’-CAGCAATAATCTTCTGAACCTCTGGAGTCAGGCCTGCTCGCTCCAAATCAAGGGGGCAGCCAGCTT TCACCGCTTGGGA -3’

WRN-79_AS_E LNA-2+2：配列番号２２７

5’-CAGCAATAATCTTCTGAACCTCTGGAGTCAGGCCTGCTCGCTCCAAATCAAGGGGGCAGCCAGCTT TCACCGCTTGGGA -3’

[0259] 結果を図４５に示す。いずれの遺伝子に対しても、未修飾のE鎖を含むn-TD’と比較して、0と+4の位置または-1と+1の位置の2ヵ所にLNA修飾を導入したE鎖を含むn-TD’で編集効率が特に向上した。WRN遺伝子に対しては、未修飾のE鎖を含むn-TD’と比較して、LNA修飾を導入したE鎖を含むn-TD’で編集効率が向上した。n-TD（E+A）については、DMD遺伝子およびWRN遺伝子に対しては、未修飾のE鎖を含むn-TDと比較して、LNA修飾を導入したE鎖を含むn-TDで編集効率が向上した。

[0260] 実施例１９：エチルホスホトリエステル結合、ホスホロチオエート結合またはLNA修飾による変異誘発の検討

上記実施例において、ODNの修飾がn-TD’の編集効率を向上させることが示された。同様の修飾を受けたポリヌクレオチドがヒト細胞内でDNA複製の鋳型

となった場合に変異誘発する可能性の有無を検討した。

具体的な実験方法は、以下のとおりである。

各修飾を受けたポリヌクレオチドによって誘発される変異の解析には、supF-NGS法（H. Kawai, R. Iwata, S. Ebi, R. Sugihara, S. Masuda, C. Fujiwara, S. Kimura, H. Kamiya. Development of a versatile high-throughput mutagenesis assay with multiplexed short-read NGS using DNA-barcoded supF shuttle vector library amplified in E. coli. Elife. 11, e83780 (2022)）を用いた。supF-NGS法は、変異検出用マーカーであるsupF（amber suppressor tRNA）遺伝子と分子バーコード（変異データの解析に用いる12塩基のランダム塩基配列）を含むシャトルベクタープラスミド（哺乳類細胞と大腸菌の両方で複製される）pNGS2-K3（図４６）、および、supF遺伝子の変異検出用の指示大腸菌RF01（R. Fukushima, T. Suzuki, H. Kamiya. New indicator Escherichia coli strain for rapid and accurate detection of supF mutations. Genes Environ. 42, 28 (2020))を用いて、次世代シーケンサー（NGS）解析によってsupF遺伝子配列内の変異とその頻度を解析する手法である。

まず、一本鎖の環状DNAとしたpNGS2-K3から、5’末端がリン酸化修飾（Phos-）された5種類のODN（配列番号２２８～２３２。修飾箇所を下線で示した。）を用いて、試験管内酵素反応（R. Fukushima, T. Suzuki, Y. Komatsu, H. Kamiya. Biased distribution of action-at-a-distance mutations by 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Mutation Res. (Fundam. Mol. Mech. Mutagen.), 825, 111794 (2022)）により、二本鎖の環状DNAを構築した。

SupF top_strand：配列番号２２８

5’-Phos-GAGCAGACTCTAAATCTGCCG -3’

SupF top_strand p-etho（エチルホスホトリエステル結合）：配列番号２２９

5’-Phos-GAGCAGAC<u>TC</u>TAAATCTGCCG -3’

SupF top_strand S（ホスホロチオエート結合）：配列番号２３０

5’-Phos-GAGCAGACTCTAAATCTGCCG -3’

SupF top_strand LNA-1+1：配列番号２３１

5’-Phos-GAGCAGACTCTAAATCTGCCG -3’

SupF top_strand LNA-1+1 T>C：配列番号２３２

5’- Phos-GAGCAGACTCCAAATCTGCCG -3’

配列番号２２８の未修飾ODNで対照実験用のpNGS2-K3(Ctrl)を構築し、配列番号２２９のODNでエチルホスホトリエステル結合、配列番号２３０のODNでホスホロチオエート結合、および配列番号２３１のODNでLNA修飾（2ヵ所）の各修飾をsupF遺伝子配列内に導入したプラスミド（それぞれpNGS2-K3(P-OEt)、pNGS2-K3(PS)およびpNGS2-K3(LNA-1+1)）を構築した。また、配列番号２３２のODNで、2ヵ所のLNA修飾の間の塩基対をC:Aミスマッチとしたp NGS2-K3(LNA-1+1 T>C)を構築した。

構築した各二本鎖の環状DNA（400 ng）を、6-well plateのU2OS細胞（5×10^5細胞/wellで前日に播種）に、Lipofectamine 2000によって導入した。48時間培養し、細胞内で二本鎖の環状DNAから複製された各プラスミドを回収してRF01に導入した。RF01をKanamycin含有のLB plateに播種して形成したコロニーからプラスミドを抽出し、supF-NGS法によってsupF遺伝子の配列情報を取得し、変異体頻度を算出した。

[0261] 結果を図４７に示す。pNGS2-K3(Ctrl)、pNGS2-K3(P-OEt)、pNGS2-K3(PS)およびpNGS2-K3(LNA-1+1)では、supF遺伝子の変異体頻度の3回の実験データの平均が、それぞれ6.73×10^{-3}、6.67×10^{-3}、7.04×10^{-3}および5.41×10^{-3}となり、それらの修飾は変異を有意に誘発しないことが明らかとなった。また、pNGS2-K3(LNA-1+1 T>C)では、変異体頻度の平均が5.52×10^{-1}であり、そのうち、5.49×10^{-1}がLNA修飾の間のC：Aミスマッチに由来するTからCへの変異であった。この結果は、pNGS2-K3の２ヵ所のLNA修飾を含むDNA鎖と未修飾のDNA鎖がほぼ同じ効率で複製されたことを示唆し、LNA修飾によるDNA複製阻害はない可能性が示唆された。また、そのTからCへの変異を除いた変異体頻度（LNA-1+1 T>C w/o-C)の平均が8.12×10^{-3}であったことから、編集用のミスマッチ塩

基対がある場合でも、その両側のLNA修飾は変異を有意には誘発しないことが明らかとなった。

[0262] 実施例２０：E鎖のLNA修飾とA鎖のP-OEt修飾との組み合わせによる塩基配列編集効率の向上（２）

編集効率の向上が見られたE鎖のLNA修飾について、A鎖のP-OEt修飾と組み合わせて、実施例１と同様に塩基配列編集効率を検討した。使用した編集用核酸を以下に示す。

[0263] E鎖

copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）：配列番号５

copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖、35-nt A鎖）：配列番号６

copGFP_forAS_E79 A35 3' p-etho ×1 ：配列番号４４

copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）：配列番号７

copGFP-79_AS_E LNA-1+1：配列番号４８

copGFP-79_AS_E LNA-1+1+4：配列番号２０２

copGFP-79_AS_E LNA-1+0：配列番号１８６

copGFP-79_AS_E LNA-1+0+4：配列番号２０５

copGFP-79_AS_E LNA-2+0：配列番号１８７

copGFP-79_AS_E LNA-2+0+4：配列番号２０７

copGFP-79_AS_E LNA0：配列番号４６

copGFP-79_AS_E LNA0+4：配列番号１８２

[0264] 結果を図４８に示す。E鎖にLNA修飾を導入した全ての場合で、A鎖のP-OEt修飾と組み合わせることにより、相加的に編集効率が向上する傾向が見られた。

産業上の利用可能性

[0265] 本発明によれば、人工ヌクレアーゼを用いることなくゲノムDNA中の目的の塩基配列を効率よく編集することができる。したがって、本発明は、細胞工学、生物工学、医療等の分野においてゲノム編集のために利用され得る。特

に本発明は、遺伝子の変異を原因とする疾患の治療または予防に用いられ得る。

配列表フリーテキスト

[0266] 配列番号１：mPlum-T2A-copGFP(Y/H)のヌクレオチド配列（変異型copGFP遺伝子を含む配列）

配列番号２：mPlum-T2A-copGFP(Y/H)のアミノ酸配列

配列番号３：mPlum-T2A-mEGFP(Y/H)のヌクレオチド配列（変異型mEGFP遺伝子を含む配列）

配列番号４：mPlum-T2A-mEGFP(Y/H)のアミノ酸配列

配列番号５：copGFP-153-79b-AS（AS_E鎖）

配列番号６：copGFP-153-79b-AS-35TD3'-ODN（A鎖 for AS_E鎖）

配列番号７：copGFP-153-79b-AS-65TDdown-ODN（別名：copGFP_A_prime65）（A'鎖 for AS_E鎖）

配列番号８：mEGFP-79_AS_E

配列番号９：mEGFP-35_S_A

配列番号１０：mEGFP-65_AS_Ap

配列番号１１：copGFP-79_AS_E 5'3'S

配列番号１２：copGFP-79_AS_E 5'S

配列番号１３：copGFP-79_AS_E 3'S

配列番号１４：copGFP-79_AS_E 5'3'SS

配列番号１５：copGFP-79_AS_E 5'SS

配列番号１６：copGFP -79_AS_E 3'SS

配列番号１７：copGFP-35_S_A 5'3'S

配列番号１８：copGFP-35_S_A 5'S

配列番号１９：copGFP-35_S_A 3'S

配列番号２０：copGFP-35_S_A 5'3'SS

配列番号２１：copGFP-35_S_A 5'SS

配列番号２２：copGFP-35_S_A 3'SS

配列番号２３：copGFP-79_AS_Ap 5'3'S

配列番号２４：copGFP-79_AS_Ap 5'S

配列番号２５：copGFP-79_AS_Ap 3'S

配列番号２６：copGFP-79_AS_Ap 5'3'SS

配列番号２７：copGFP-79_AS_Ap 5'SS

配列番号２８：copGFP-79_AS_Ap 3'SS

配列番号２９：copGFP-79_AS_E 3'SSS

配列番号３０：copGFP-79_AS_E 3'SSSS

配列番号３１：copGFP-35_S_A 3'SSS

配列番号３２：copGFP-35_S_A 3'SSSS

配列番号３３：copGFP-79_AS_E 3'SSp11

配列番号３４：copGFP-79_AS_E 3'SSp21

配列番号３５：copGFP-79_AS_E 3'SSp31

配列番号３６：copGFP-79_AS_E 3'SSp41

配列番号３７：copGFP-79_AS_E 3'SSp51

配列番号３８：copGFP-79_AS_E 3'SSp61

配列番号３９：copGFP-79_AS_E 3'SSp71

配列番号４０：copGFP_forAS_E79 A35 5' p-met ×2

配列番号４１：copGFP_forAS_E79 A35 3' p-met ×2

配列番号４２：copGFP_forAS_E79 A35 5' p-etho ×2

配列番号４３：copGFP_forAS_E79 A35 3' p-etho ×2

配列番号４４：copGFP_forAS_E79 A35 3' p-etho ×1

配列番号４５：copGFP_forAS_E79 A35 3' p-etho ×2

配列番号４６：copGFP-79_AS_E LNA0

配列番号４７：copGFP-79_AS_E LNA-1+0+1

配列番号４８：copGFP-79_AS_E LNA-1+1

配列番号４９：copGFP-79_AS_E LNA-3-1+1+3

配列番号５０：copGFP-79_AS_E LNA-5-3-1+1+3+5

配列番号５１：copGFP-79_AS_E LNA-2+2

配列番号５２：copGFP-79_AS_E LNA-2-1+1+2

配列番号５３：copGFP-79_AS_E LNA-3-2+2+3

配列番号５４：copGFP-79_AS_E LNA-3-2-1+1+2+3

配列番号５５：copGFP-79_AS_E LNA-7-5-3-1+1+3+5+7

配列番号５６：copGFP-79_AS_E LNA-9-7-5-3-1+1+3+5+7+9

配列番号５７：mEGFP-79_AS_E LNA-2,0

配列番号５８：mEGFP-35_S_A 3’ p-etho×1

配列番号５９：mEGFP-65_AS_Ap

配列番号６０：65Ap_AS_Gap1

配列番号６１：65Ap_AS_Gap2

配列番号６２：65Ap_AS_Gap3

配列番号６３：65Ap_AS_Gap6

配列番号６４：65Ap_AS_Gap9

配列番号６５：copGFP-79_AS_Ap 3-overlap

配列番号６６：copGFP-79_AS_Ap 6-overlap

配列番号６７：copGFP-79_AS_Ap 9-overlap

配列番号６８：copGFP-79_AS_Ap 12-overlap

配列番号６９：copGFP-79_AS_Ap 15-overlap

配列番号７０：copGFP-79_AS_Ap 19-overlap

配列番号７１：copGFP-79_AS_Ap 29-overlap

配列番号７２：copGFP-79_AS_Ap 39-overlap

配列番号７３：copGFP-153-79b-AS-45TD3’-ODN5’

配列番号７４：copGFP-153-79b-AS-55TD3’-ODN5’

配列番号７５：copGFP-153-79b-AS-65TD3’-ODN5’

配列番号７６：copGFP-153-79b-AS-75TD3’-ODN5’

配列番号７７：copGFP-153-79b-AS-45TD3’-ODN3’

配列番号７８：copGFP-153-79b-AS-55TD3’-ODN3’

配列番号７９：copGFP-153-79b-AS-65TD3'-ODN3'

配列番号８０：copGFP-153-79b-AS-75TD3'-ODN3'

配列番号８１：copGFP-153-79b-AS-79TD3'-ODN3'

配列番号８２：79E_AS_45TD3'-ODN3'

配列番号８３：79E_AS_55TD3'-ODN3'

配列番号８４：79E_AS_65TD3'-ODN3'

配列番号８５：79E_AS_75TD3'-ODN3'

配列番号８６：79E_AS_79TD3'-ODN3'

配列番号８７：79GFP_AS_5'-1-mut(+44-WT)

配列番号８８：35mer_for_79GFP_AS_5'-1-mut(+44-WT)

配列番号８９：65Ap_for_79E_AS_5'-1-mut(+44-WT)

配列番号９０：79GFP_AS_5'-11-mut(+34-WT)

配列番号９１：35mer_for_79GFP_AS_5'-11-mut(+34-WT)

配列番号９２：65Ap_for_79E_AS_5'-11-mut(+34-WT)

配列番号９３：79GFP_AS_5'-21-mut(+24-WT)

配列番号９４：35mer_for_79GFP_AS_5'-21-mut(+24-WT)

配列番号９５：65Ap_for_79E_AS_5'-21-mut(+24-WT)

配列番号９６：79GFP_AS_5'-31-mut(+14-WT)

配列番号９７：35mer_for_79GFP_AS_5'-31-mut(+14-WT)

配列番号９８：65Ap_for_79E_AS_5'-31-mut(+14-WT)

配列番号９９：79GFP_AS_5'-41-mut(+4-WT)

配列番号１００：35mer_for_79GFP_AS_5'-41-mut(+4-WT)

配列番号１０１：65Ap_for_79E_AS_5'-41-mut(+4-WT)

配列番号１０２：79GFP_AS_5'-44-mut(+1-WT)

配列番号１０３：35mer_for_79GFP_AS_5'-44-mut(+1-WT)

配列番号１０４：65Ap_for_79E_AS_5'-44-mut(+1-WT)

配列番号１０５：79GFP_AS_5'-51-mut(-6)

配列番号１０６：35mer_for_79GFP_AS_5'-51-mut(-6-WT)

配列番号１０７：35A_AS_5'-51-mut(-6-YH)

配列番号１０８：65Ap_for_79E_AS_5'-51-mut(-6)

配列番号１０９：79GFP_AS_5'-61-mut(-16)

配列番号１１０：35mer_for_79GFP_AS_5'-61-mut(-16-WT)

配列番号１１１：35A_AS_5'-61-mut(-16-YH)

配列番号１１２：65Ap_for_79E_AS_5'-61-mut(-16)

配列番号１１３：79GFP_AS_5'-71-mut(-26)

配列番号１１４：35mer_for_79GFP_AS_5'-71-mut(-26-WT)

配列番号１１５：35A_AS_5'-71-mut(-26-YH)

配列番号１１６：65Ap_for_79E_AS_5'-71-mut(-26)

配列番号１１７：79GFP_AS_5'-79-mut(-34)

配列番号１１８：35mer_for_79GFP_AS_5'-79-mut(-34-WT)

配列番号１１９：35A_AS_5'-79-mut(-34-YH)

配列番号１２０：65Ap_for_79E_AS_5'-79-mut(-34)

配列番号１２１：144E_AS_5'-105-mut

配列番号１２２：109E_AS_5'-70-mut_for_35Ap

配列番号１２３：35Ap_for_109E_AS_5'-70-mut

配列番号１２４：65E_AS_5'-26-mut_for_79Ap

配列番号１２５：79Ap_for_65E_AS_5'-26-mut

配列番号１２６：35E_AS_notmut_for_109Ap

配列番号１２７：109Ap_5'-105-mut_for_35E_AS_notmut

配列番号１２８：copGFP-79_AS_E LNA-1+1_5'PS

配列番号１２９：copGFP_A_prime65_5'PS

配列番号１３０：mEGFP-79_AS_E LNA-1+1

配列番号１３１：copGFP-79_AS_E ENA-1+1

配列番号１３２：DMD遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３３：WRN遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３４：HBB遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３５：ADA遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３６：LCA遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３７：PRKN遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３８：BRAF遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１３９：NRAS遺伝子のナンセンス変異配列

配列番号１４０：copGFP-153-79b-S-35TDup-ODN (AS_Up_O)

配列番号１４１：copGFP-153-79b-S-35TD5'-ODN (AS_Up_T)

配列番号１４２：copGFP-153-79b-S-35TDcn-ODN (AS_Cnt_Y)

配列番号１４３：copGFP-153-79b-S-35TDcnYH-ODN (AS_Cnt_H)

配列番号１４４：copGFP-153-79b-S-35TD3'-ODN (AS_Dwn_T)

配列番号１４５：copGFP-153-79b-S-35TDdown-ODN (AS_Dwn_O)

配列番号１４６：copGFP-153-79b-AS-35TDup-ODN (S_Up_O)

配列番号１４７：copGFP-153-79b-AS-35TDcn-ODN (S_Cnt_Y)

配列番号１４８：copGFP-153-79b-AS-35TDcnYH-ODN (S_Cnt_H)

配列番号１４９：copGFP-153-79b-AS-35TD5'-ODN (S_Dwn_T)

配列番号１５０：copGFP-153-79b-AS-35TDdown-ODN (S_Dwn_O)

配列番号１５１：copGFP_A_prime15

配列番号１５２：copGFP_A_prime25

配列番号１５３：copGFP_A_prime45

配列番号１５４：copGFP_A_prime55

配列番号１５５：copGFP_A_prime75

配列番号１５６：copGFP-79_AS_E LNA+1

配列番号１５７：copGFP-79_AS_E LNA+2

配列番号１５８：copGFP-79_AS_E LNA+3

配列番号１５９：copGFP-79_AS_E LNA+4

配列番号１６０：copGFP-79_AS_E LNA+5

配列番号１６１：copGFP-79_AS_E LNA+6

配列番号１６２：copGFP-79_AS_E LNA-1

配列番号１６３：copGFP-79_AS_E LNA-2

配列番号１６４：copGFP-79_AS_E LNA-3

配列番号１６５：copGFP-79_AS_E LNA-4

配列番号１６６：copGFP-79_AS_E LNA-5

配列番号１６７：copGFP-79_AS_E LNA-6

配列番号１６８：copGFP-79_AS_E LNA-2+2

配列番号１６９：copGFP-79_AS_E LNA-3+3

配列番号１７０：copGFP-79_AS_E LNA-4+4

配列番号１７１：copGFP-79_AS_E LNA-5+5

配列番号１７２：copGFP-79_AS_E LNA-6+6

配列番号１７３：copGFP-79_AS_E LNA-5-3

配列番号１７４：copGFP-79_AS_E LNA-4-2

配列番号１７５：copGFP-79_AS_E LNA-3-1

配列番号１７６：copGFP-79_AS_E LNA+1+3

配列番号１７７：copGFP-79_AS_E LNA+2+4

配列番号１７８：copGFP-79_AS_E LNA+3+5

配列番号１７９：copGFP-79_AS_E LNA0+1

配列番号１８０：copGFP-79_AS_E LNA0+2

配列番号１８１：copGFP-79_AS_E LNA0+3

配列番号１８２：copGFP-79_AS_E LNA0+4

配列番号１８３：copGFP-79_AS_E LNA0+5

配列番号１８４：copGFP-79_AS_E LNA0+6

配列番号１８５：copGFP-79_AS_E LNA0+7

配列番号１８６：copGFP-79_AS_E LNA-1+0

配列番号１８７：copGFP-79_AS_E LNA-2+0

配列番号１８８：copGFP-79_AS_E LNA-3+0

配列番号１８９：copGFP-79_AS_E LNA-4+0

配列番号１９０：copGFP-79_AS_E LNA-5+0

配列番号１９１：copGFP-79_AS_E LNA-6+0

配列番号１９２：copGFP-79_AS_E LNA-7+0

配列番号１９３：copGFP-79_AS_E LNA-2+0+2

配列番号１９４：copGFP-79_AS_E LNA-3+0+3

配列番号１９５：copGFP-79_AS_E LNA-4+0+4

配列番号１９６：copGFP-79_AS_E LNA-5+0+5

配列番号１９７：copGFP-79_AS_E LNA-6+0+6

配列番号１９８：copGFP-79_AS_E LNA-7+0+7

配列番号１９９：copGFP-79_AS_E LNA-2-1+1+2

配列番号２００：copGFP-79_AS_E LNA-3-2+2+3

配列番号２０１：copGFP-79_AS_E LNA-3-2-1+1+2+3

配列番号２０２：copGFP-79_AS_E LNA-1+1+4

配列番号２０３：copGFP-79_AS_E LNA-3-1+1+3+4

配列番号２０４：copGFP-79_AS_E LNA0+1+4

配列番号２０５：copGFP-79_AS_E LNA-1+0+4

配列番号２０６：copGFP-79_AS_E LNA0+2+4

配列番号２０７：copGFP-79_AS_E LNA-2+0+4

配列番号２０８：copGFP-153-79b-AS-34TD3’-ODN

配列番号２０９：copGFP-153-79b-AS-33TD3’-ODN

配列番号２１０：copGFP-153-79b-AS-32TD3’-ODN

配列番号２１１：copGFP-153-79b-AS-31TD3’-ODN

配列番号２１２：DMD-79_AS_E

配列番号２１３：DMD-35_forAS-E_A

配列番号２１４：DMD-65_forAS-E_Aprime

配列番号２１５：DMD-79_AS_E LNA0+4

配列番号２１６：DMD-79_AS_E LNA-4+0

配列番号２１７：DMD-79_AS_E LNA-1+1

配列番号２１８：DMD-79_AS_E LNA0

配列番号２１９：DMD-79_AS_E LNA-2+2

配列番号２２０：WRN-79_AS_E

配列番号２２１：WRN-35_forAS-E_A

配列番号２２２：WRN-65_forAS-E_Aprime

配列番号２２３：WRN-79_AS_E LNA0+4

配列番号２２４：WRN-79_AS_E LNA-4+0

配列番号２２５：WRN-79_AS_E LNA-1+1

配列番号２２６：WRN-79_AS_E LNA0

配列番号２２７：WRN-79_AS_E LNA-2+2

配列番号２２８：SupF top_strand

配列番号２２９：SupF top_strand p-etho

配列番号２３０：SupF top_strand S

配列番号２３１：SupF top_strand LNA-1+1

配列番号２３２：SupF top_strand LNA-1+1 T>C

[0267] ホスホロチオエート結合（修飾ヌクレオチド間結合として）

ＰＣＨ$_3$修飾（修飾ヌクレオチド間結合として）

ＰＯＣＨ$_2$ＣＨ$_3$修飾（修飾ヌクレオチド間結合として）

２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋化核酸（糖修飾ヌクレオチドとして）

２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋化核酸（糖修飾ヌクレオチドとして）

請求の範囲

[請求項1] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドおよび第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている、

組成物。

[請求項2] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内にある、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から４９～５１％の範囲内にある、請求項２に記載の組成物。

[請求項4] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、７０～１００塩基長である、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項5] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、前記編集用変異の位置ならびに５’末端から１０塩基の領域および３’末端から１０塩基の領域を除

いた配列において、編集標的鎖における対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項6] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有する、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とが、隣接している、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、５５～７５塩基長である、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、編集標的鎖の対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項11] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含む、請求項１０に記載の組成物。

[請求項12] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度と同じか、またはそれよりも高い、請求項１０または１１に記載の組成物。

[請求項13] 前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように、前記編集用変異を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項14] 請求項１３に記載の組成物を含む、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物。

[請求項15] 細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の請求項１３に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

[請求項16] 変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、請求項１～１３のいずれか一項に記載の組成物を導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法。

[請求項17] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、その塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、かつ

下記特徴

（ａ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置ならびに前記編集用変異の位置の５’側１０塩基及び３’側１０塩基からなる領域において、少なくとも１つのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチ

ドである、および

（ｂ）第１の一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含み、前記修飾ヌクレオチド間結合は、前記編集用変異の位置の５’末端側３塩基から３’末端側３塩基の範囲に存在しない

の少なくとも一方を有する、組成物。

[請求項18] 糖修飾ヌクレオチドが、リボース環において２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン架橋または２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋を含むヌクレオチドである、請求項１７に記載の組成物。

[請求項19] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、５’末端および／または３’末端から１３塩基以内に１～４個の修飾ヌクレオチド間結合を含む、請求項１７または１８に記載の組成物。

[請求項20] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内にある、請求項１７～１９のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項21] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から４９～５１％の範囲内にある、請求項２０に記載の組成物。

[請求項22] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、７０～１００塩基長である、請求項１７～２１のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項23] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる、請求項１７～２２のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項24] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を含む、請求項２３に記載の組成物。

[請求項25] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、５’末端および／または３’末端から３塩基以内に１もしくは２個または２塩基以内に１個の修飾ヌクレオチド間結合を含む、請求項２４に記載の組成物。

[請求項26] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含む、請求項２３～２５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項27] 修飾ヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホネート結合、またはホスホトリエステル結合である、請求項１７、１９、２４または２５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項28] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～７５塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れている、請求項１７～２７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項29] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有する、請求項２８に記載の組成物。

[請求項30] 前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とが、隣接している、請求項２８または２９に記載の組成物。

[請求項31] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、５５～７５塩基長である、請求

項２８～３０のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項32] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、編集標的鎖の対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、請求項２８～３１のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項33] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度と同じか、またはそれよりも高い、請求項２８～３２のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項34] 前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように、前記編集用変異を含む、請求項１７～３３のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項35] 請求項３４に記載の組成物を含む、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための医薬組成物。

[請求項36] 細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の請求項３４に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

[請求項37] 変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、請求項１７～３４のいずれか一項に記載の組成物を導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、

方法。

[請求項38] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と併用するための第３の一本鎖ポリヌクレオチドを含む医薬組成物であって、

第１の一本鎖ポリヌクレオチドは、５０～２００塩基長であり、そ

の塩基配列は、細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の編集標的鎖の一部分の塩基配列と８０％以上の配列同一性を有し、前記編集標的鎖の塩基配列と比較して、１または複数個のヌクレオチドの欠失、置換および挿入からなる群から選択される少なくとも１つの編集用変異を含み、

第３の一本鎖ポリヌクレオチドは、１５～２００塩基長であり、その塩基配列は、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側または３’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有し、ここで、前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とは、重複しているか、隣接しているか、または１～９塩基離れており、

前記標的領域に疾患の原因となる異常塩基配列が含まれており、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列は、前記異常塩基配列が修復され、それにより前記疾患が治療または予防され得るように、前記編集用変異を含む、

医薬組成物。

[請求項39] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列が、前記編集標的鎖において第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異に対応する位置よりも５’末端側の塩基配列と９０％以上の配列同一性を有する、請求項３８に記載の医薬組成物。

[請求項40] 前記編集標的鎖において、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列と第３の一本鎖ポリヌクレオチドと配列同一性を有する塩基配列とが、隣接している、請求項３８または３９に記載の医薬組成物。

[請求項41] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、５５～７５塩基長である、請求項３８～４０のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項42] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドが、編集標的鎖の対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、請求項３８～４１のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項43] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から２５～７５％の範囲内にある、請求項３８～４２のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項44] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異の位置が、５’末端から３’末端までを１００％として、５’末端から４９～５１％の範囲内にある、請求項４３に記載の医薬組成物。

[請求項45] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、７０～１００塩基長である、請求項３８～４４のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項46] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドが、前記編集用変異の位置ならびに５’末端から１０塩基の領域および３’末端から１０塩基の領域を除いた配列において、編集標的鎖における対応する塩基配列と１００％同一の塩基配列からなることを特徴とする、請求項３８～４５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項47] 第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物が、第２の一本鎖ポリヌクレオチドをさらに含み、

第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、２０～２００塩基長であり、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの前記編集用変異を含まない領域の一部分の塩基配列と相補的な塩基配列を含み、第１の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖を形成することができる、請求項３８～４６のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項48] 第２の一本鎖ポリヌクレオチドが、第１の一本鎖ポリヌクレオチドの塩基配列の前記編集用変異の位置よりも３’末端側の部分と相補的な塩基配列を含む、請求項４７に記載の医薬組成物。

[請求項49] 第３の一本鎖ポリヌクレオチドのモル濃度が、第２の一本鎖ポリヌ

クレオチドのモル濃度と同じか、またはそれよりも高くなるように使用される、請求項４７または４８に記載の医薬組成物。

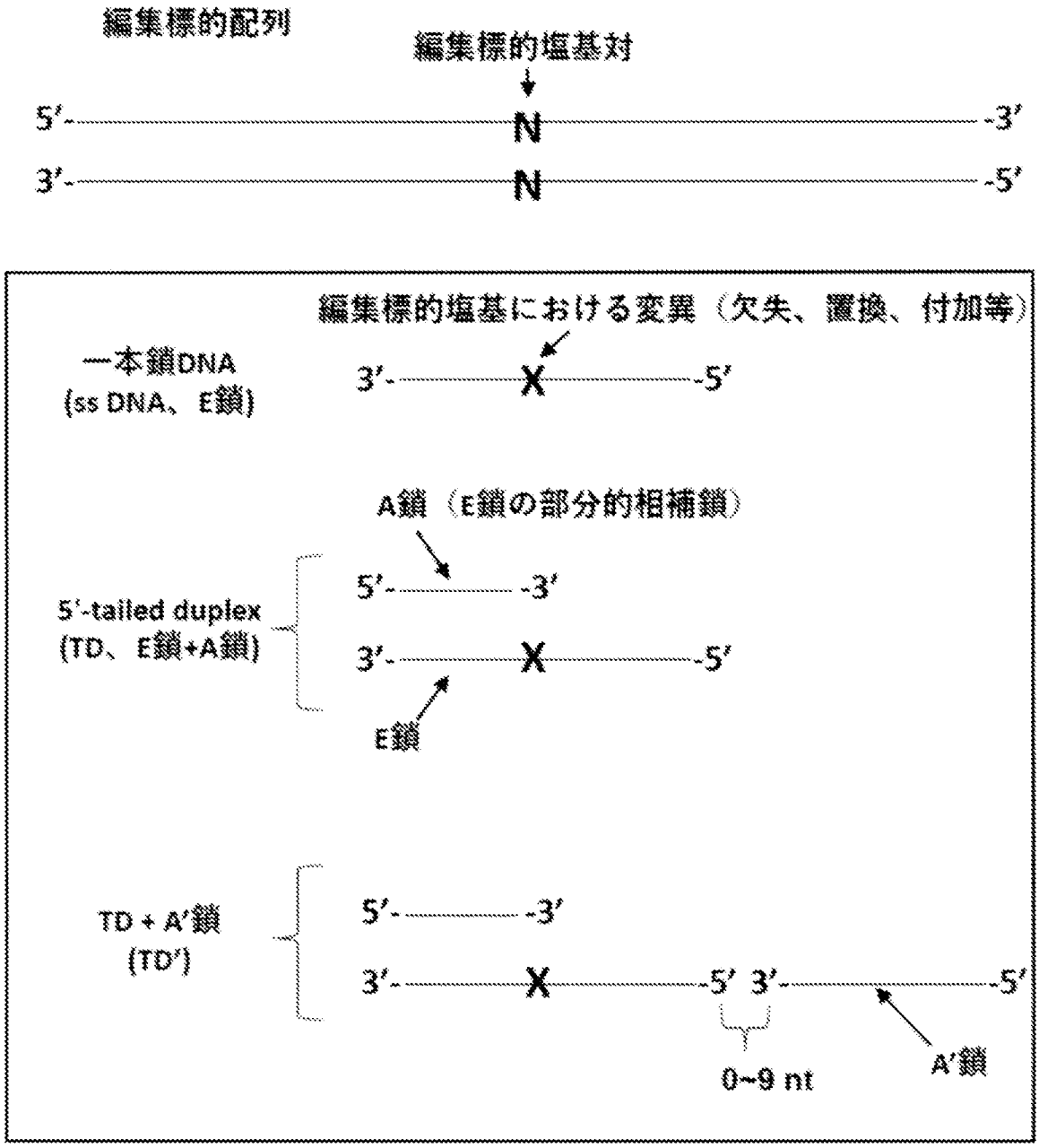
[請求項50] 細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための、請求項３８～４９のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項51] 細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域に含まれる異常塩基配列が原因となる疾患の治療または予防のための方法であって、治療または予防有効量の請求項５０に記載の医薬組成物を、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と、同時に、別々にまたは連続して対象に投与することを含む、方法。

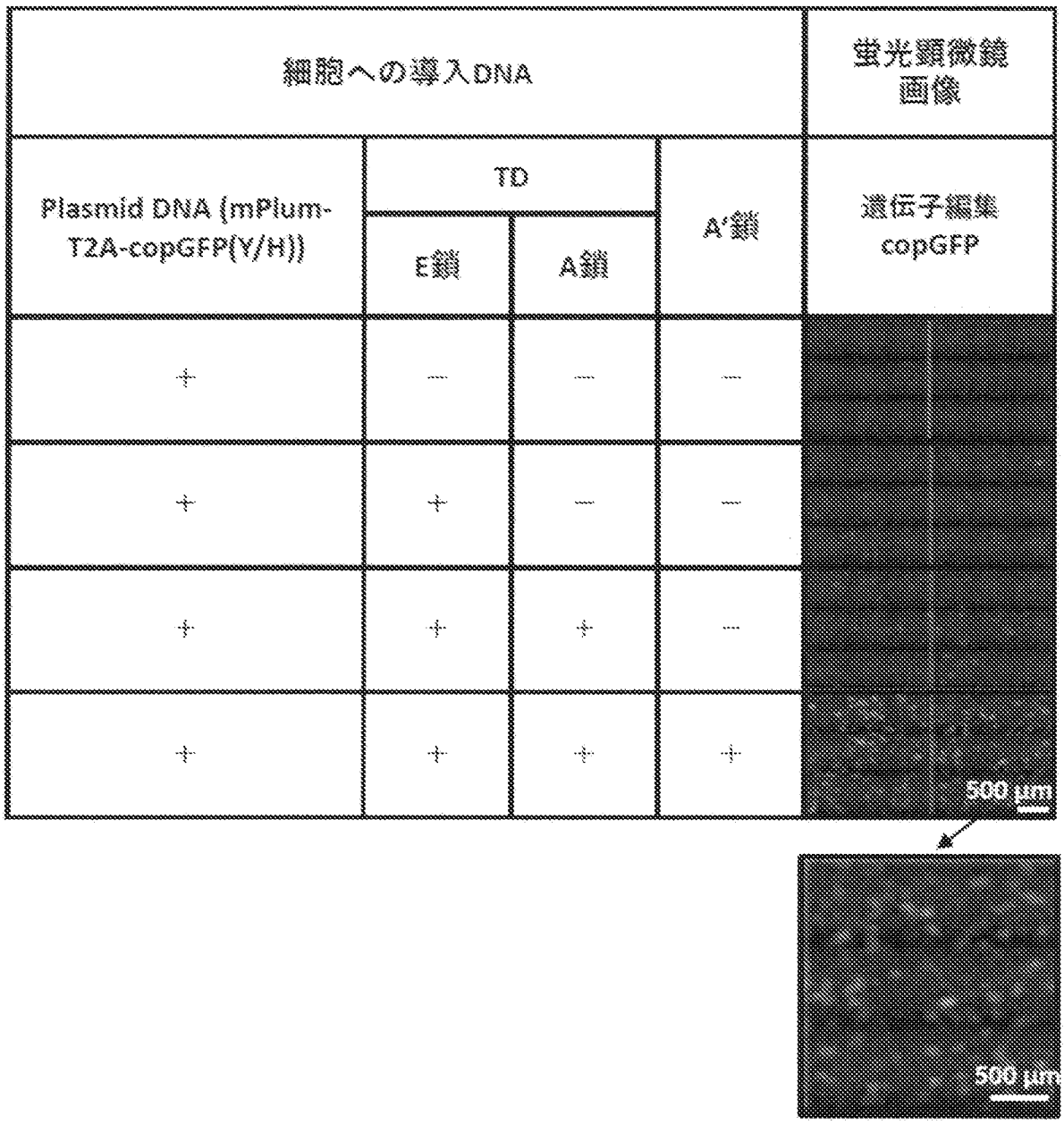
[請求項52] 変異が導入された単離された細胞または変異が導入された細胞を有する生物の製造方法であって、

前記単離された細胞内または前記生物の生体を構成している細胞内に、請求項３８～５０のいずれか一項に記載の医薬組成物を、第１の一本鎖ポリヌクレオチドを含む組成物と同時に、別々にまたは連続して導入し、それにより細胞内の二本鎖ＤＮＡに存在する標的領域の塩基配列に変異を導入する工程を含む、方法。

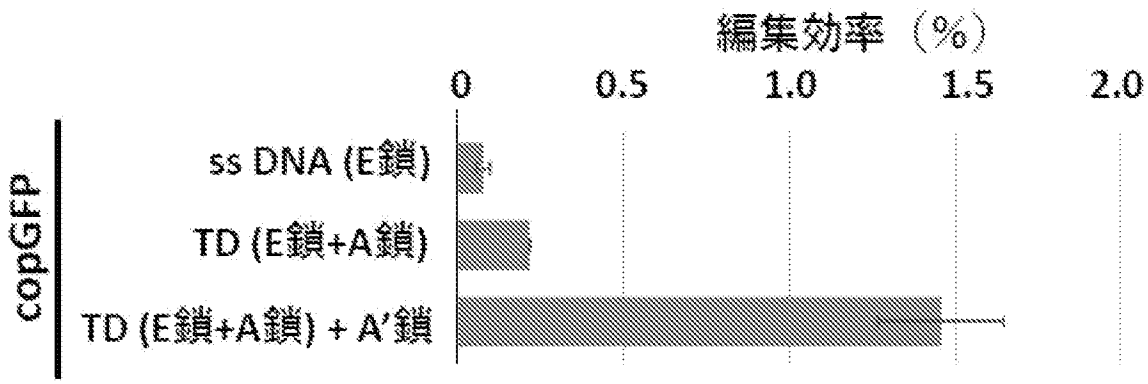
[図1]


編集標的配列
編集標的塩基対
5′-
N
-3′
3′-
N
-5′
編集標的塩基における変異（欠失、置換、付加等）
一本鎖DNA
(ss DNA、E鎖)
3′-
X
-5′
A鎖（E鎖の部分的相補鎖）
5′-tailed duplex
(TD、E鎖+A鎖)
5′-
-3′
3′-
X
-5′
E鎖
TD + A′鎖
(TD′)
5′-
-3′
3′-
X
-5′ 3′-
-5′
0~9 nt
A′鎖

[図2]

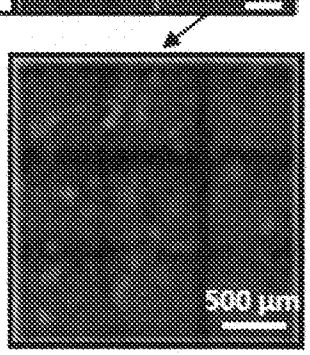

細胞への導入DNA
蛍光顕微鏡画像
Plasmid DNA (mPlum-T2A-copGFP(V/H))
TD
E鎖
A鎖
A'鎖
遺伝子編集 copGFP
500 μm
500 μm

[図3]

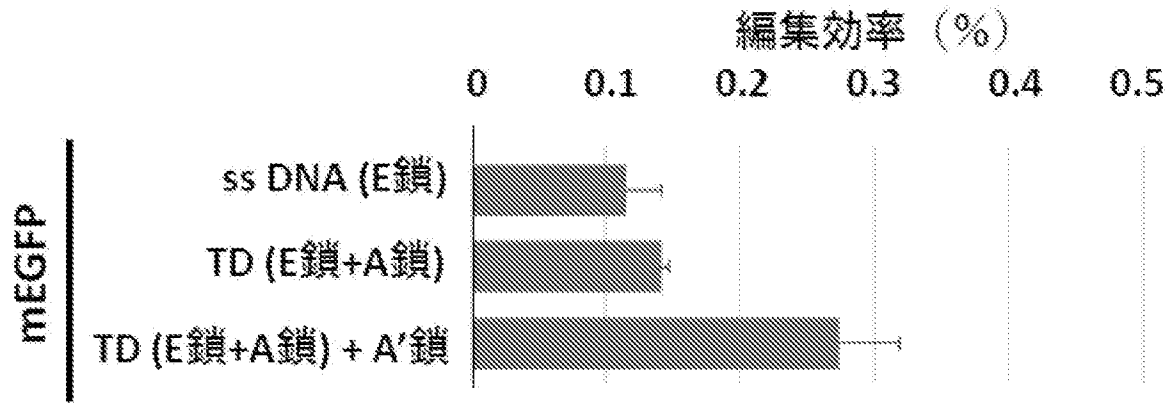

編集効率（%）
0
0.5
1.0
1.5
2.0
copGFP
ss DNA (E鎖)
TD (E鎖+A鎖)
TD (E鎖+A鎖) + A'鎖

[図4]

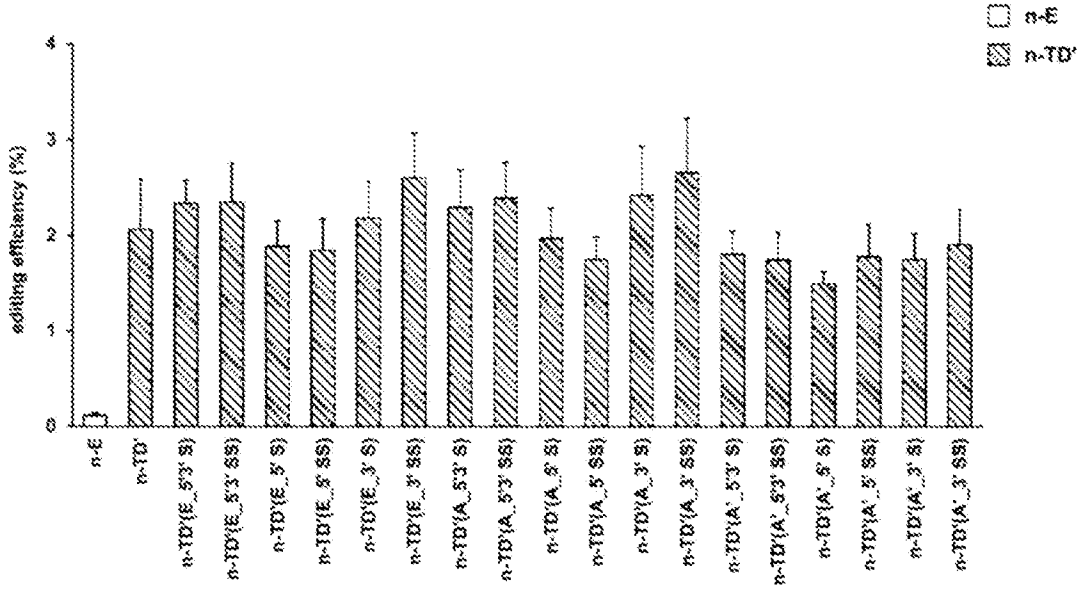
細胞への導入DNA				蛍光顕微鏡画像
Plasmid DNA (mPlum-T2A-mEGFP(Y/H))	TD		A'鎖	遺伝子編集 mEGFP
	E鎖	A鎖		
+	−	−	−	
+	+	−	−	
+	+	+	−	
+	+	+	+	



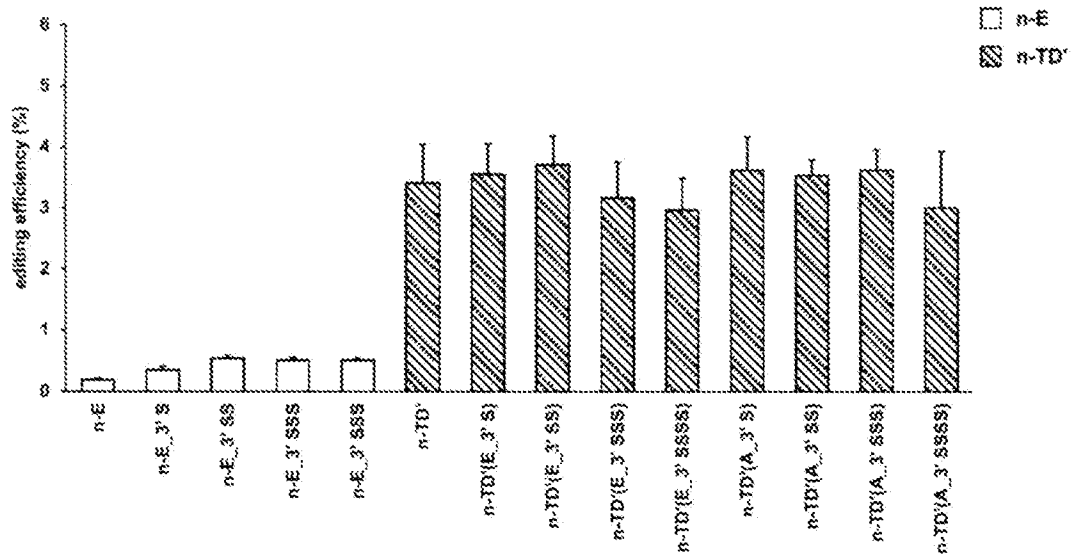
[図5]



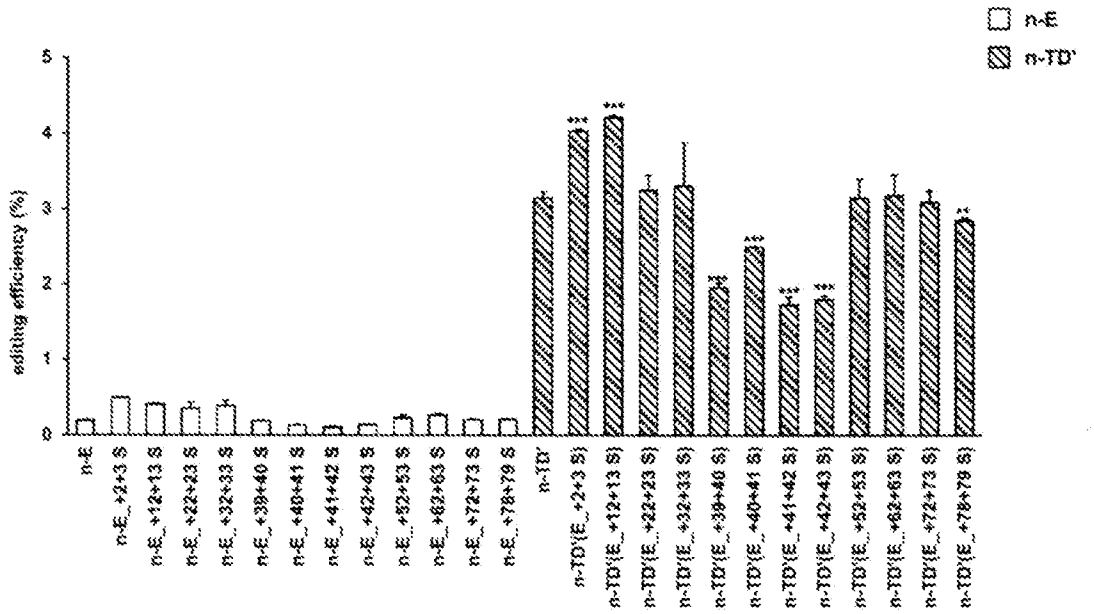
[図6]


n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
n-E
n-TD'
n-TD'
n-TD'(E_5'3' S)
n-TD'(E_5'3' SS)
n-TD'(E_5' S)
n-TD'(E_5' SS)
n-TD'(E_3' S)
n-TD'(E_3' SS)
n-TD'(A_5'3' S)
n-TD'(A_5'3' SS)
n-TD'(A_5' S)
n-TD'(A_5' SS)
n-TD'(A_3' S)
n-TD'(A_3' SS)
n-TD'(A'_5'3' S)
n-TD'(A'_5'3' SS)
n-TD'(A'_5' S)
n-TD'(A'_5' SS)
n-TD'(A'_3' S)
n-TD'(A'_3' SS)

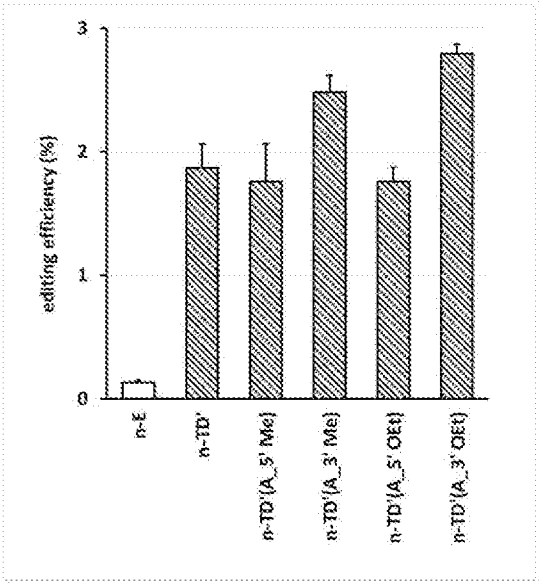
[図7]


n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
n-E
n-E_3' S
n-E_3' SS
n-E_3' SSS
n-E_3' SSSS
n-TD'
n-TD'(E_3' S)
n-TD'(E_3' SS)
n-TD'(E_3' SSS)
n-TD'(E_3' SSSS)
n-TD'(A_3' S)
n-TD'(A_3' SS)
n-TD'(A_3' SSS)
n-TD'(A_3' SSSS)

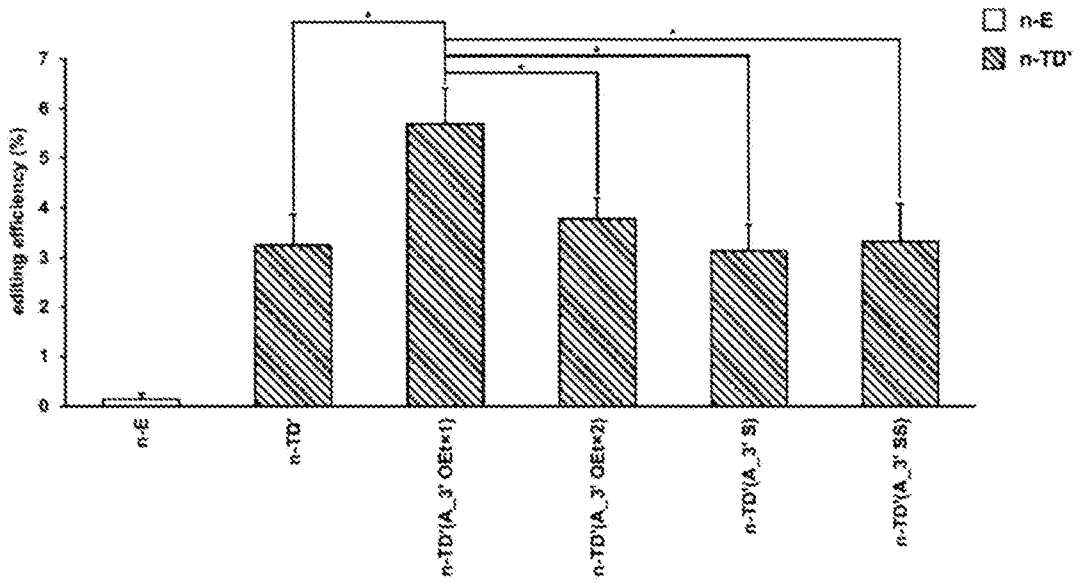
[図8]


n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
n-E
n-E_+2+3 S
n-E_+12+13 S
n-E_+22+23 S
n-E_+32+33 S
n-E_+39+40 S
n-E_+40+41 S
n-E_+41+42 S
n-E_+42+43 S
n-E_+52+53 S
n-E_+62+63 S
n-E_+72+73 S
n-E_+78+79 S
n-TD'
n-TD'(E_+2+3 S)
n-TD'(E_+12+13 S)
n-TD'(E_+22+23 S)
n-TD'(E_+32+33 S)
n-TD'(E_+39+40 S)
n-TD'(E_+40+41 S)
n-TD'(E_+41+42 S)
n-TD'(E_+42+43 S)
n-TD'(E_+52+53 S)
n-TD'(E_+62+63 S)
n-TD'(E_+72+73 S)
n-TD'(E_+78+79 S)

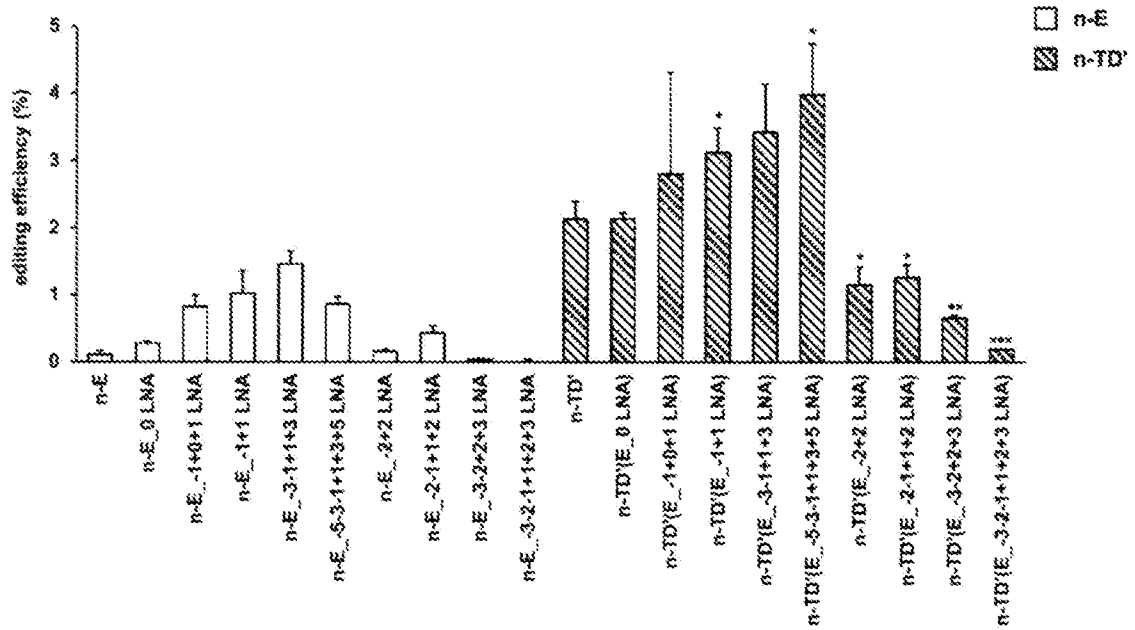
[図9]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
n-E
n-TD'
n-TD'(A_5' Me)
n-TD'(A_3' Me)
n-TD'(A_5' OEt)
n-TD'(A_3' OEt)

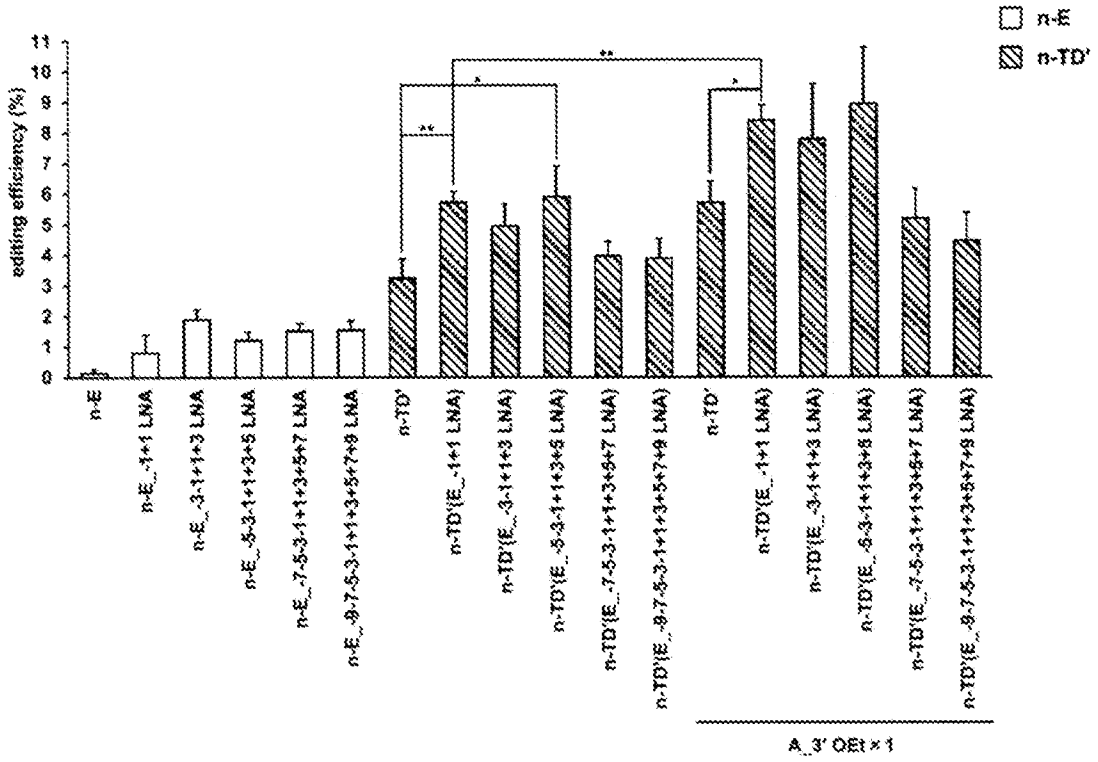
[図10]


n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
n-E
n-TD'
n-TD'(A_3' OEt×1)
n-TD'(A_3' OEt×2)
n-TD'(A_3' S)
n-TD'(A_3' S6)

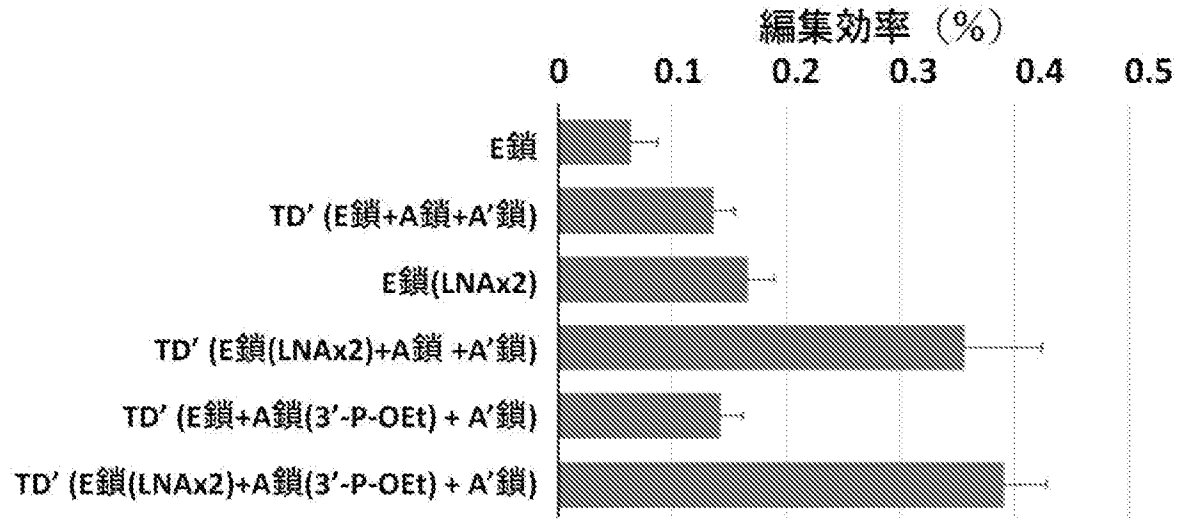
[図11]


n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
n-E
n-E_0 LNA
n-E_-1+0+1 LNA
n-E_-1+1 LNA
n-E_-3-1+1+3 LNA
n-E_-5-3-1+1+3+5 LNA
n-E_-2+2 LNA
n-E_-2-1+1+2 LNA
n-E_-3-2+2+3 LNA
n-E_-3-2-1+1+2+3 LNA
n-TD'
n-TD'(E_0 LNA)
n-TD'(E_-1+0+1 LNA)
n-TD'(E_-1+1 LNA)
n-TD'(E_-3-1+1+3 LNA)
n-TD'(E_-5-3-1+1+3+5 LNA)
n-TD'(E_-2+2 LNA)
n-TD'(E_-2-1+1+2 LNA)
n-TD'(E_-3-2+2+3 LNA)
n-TD'(E_-3-2-1+1+2+3 LNA)

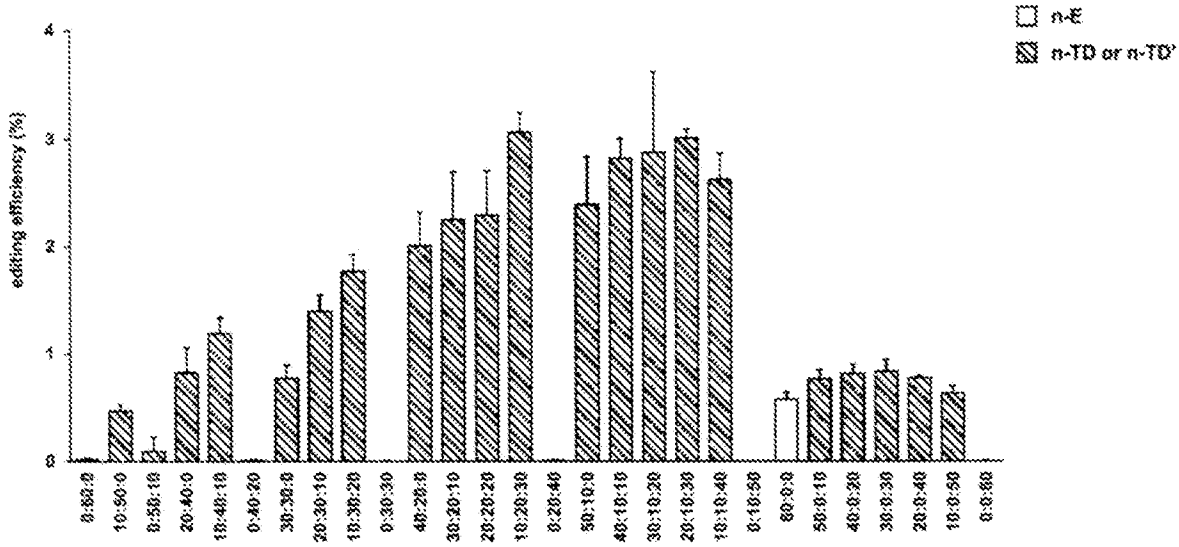
[図12]


n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
n-E
n-E_-1+1 LNA
n-E_-3-1+1+3 LNA
n-E_-5-3-1+1+3+5 LNA
n-E_-7-5-3-1+1+3+5+7 LNA
n-E_-9-7-5-3-1+1+3+5+7+9 LNA
n-TD'
n-TD'(E_-1+1 LNA)
n-TD'(E_-3-1+1+3 LNA)
n-TD'(E_-5-3-1+1+3+5 LNA)
n-TD'(E_-7-5-3-1+1+3+5+7 LNA)
n-TD'(E_-9-7-5-3-1+1+3+5+7+9 LNA)
n-TD'
n-TD'(E_-1+1 LNA)
n-TD'(E_-3-1+1+3 LNA)
n-TD'(E_-5-3-1+1+3+5 LNA)
n-TD'(E_-7-5-3-1+1+3+5+7 LNA)
n-TD'(E_-9-7-5-3-1+1+3+5+7+9 LNA)
A_3' OEt × 1

[図13]

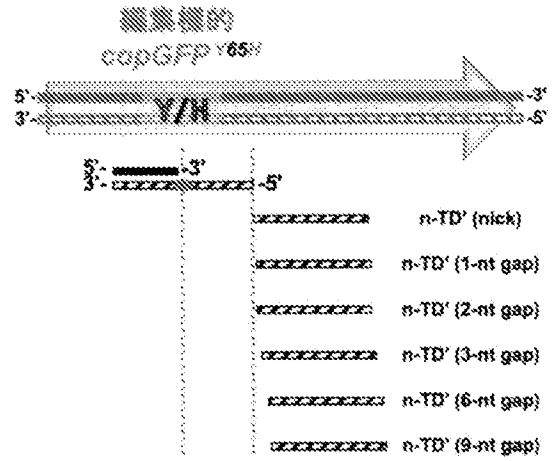

編集効率（%）
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
E鎖
TD' (E鎖+A鎖+A'鎖)
E鎖(LNAx2)
TD' (E鎖(LNAx2)+A鎖 +A'鎖)
TD' (E鎖+A鎖(3'-P-OEt) + A'鎖)
TD' (E鎖(LNAx2)+A鎖(3'-P-OEt) + A'鎖)

[図14]

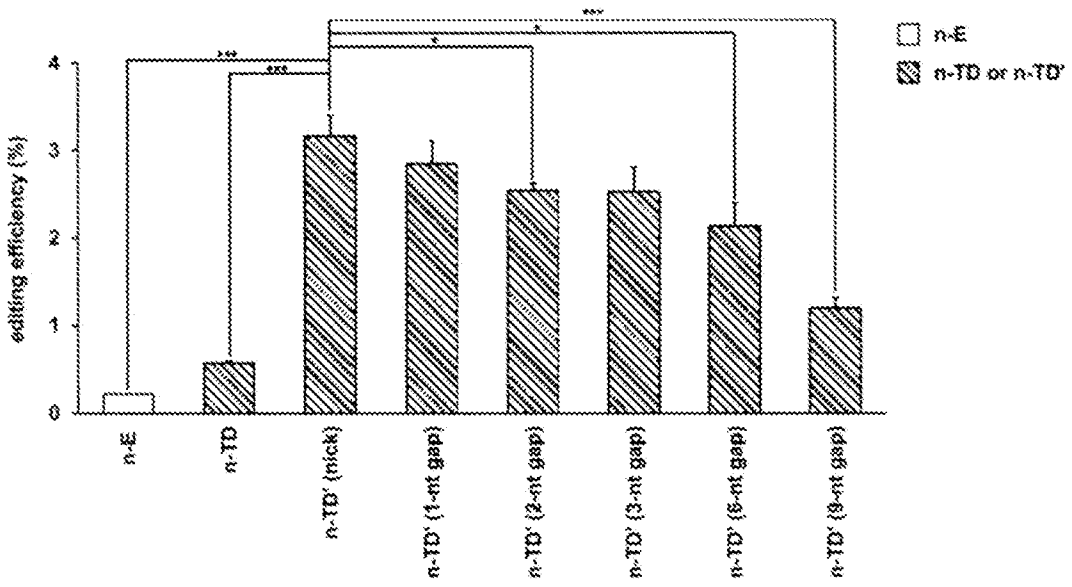

n-E
n-TD or n-TD'
editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
0:50:0
10:50:0
0:50:10
20:40:0
10:40:10
0:40:20
30:30:0
20:30:10
10:30:20
0:30:30
40:20:0
30:20:10
20:20:20
10:20:30
0:20:40
50:10:0
40:10:10
30:10:20
20:10:30
10:10:40
0:10:50
60:0:0
50:0:10
40:0:20
30:0:30
20:0:40
10:0:50
0:0:60

[図15]

A

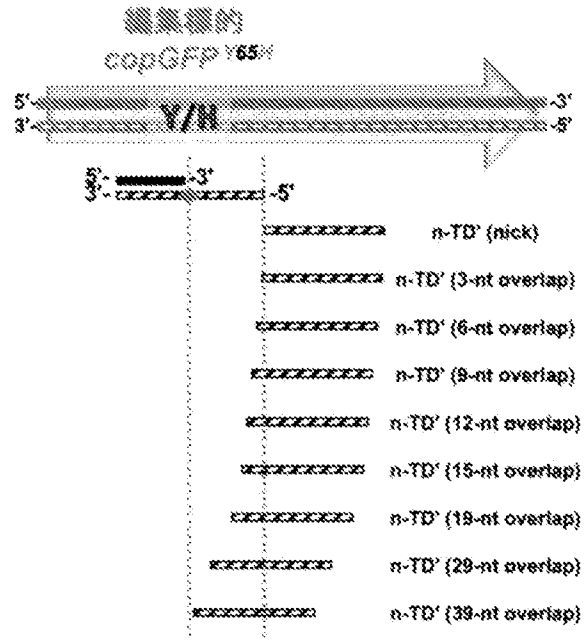

copGFP Y65
5'
3'
Y/N
-3'
-5'
n-TD' (nick)
n-TD' (1-nt gap)
n-TD' (2-nt gap)
n-TD' (3-nt gap)
n-TD' (6-nt gap)
n-TD' (9-nt gap)

B

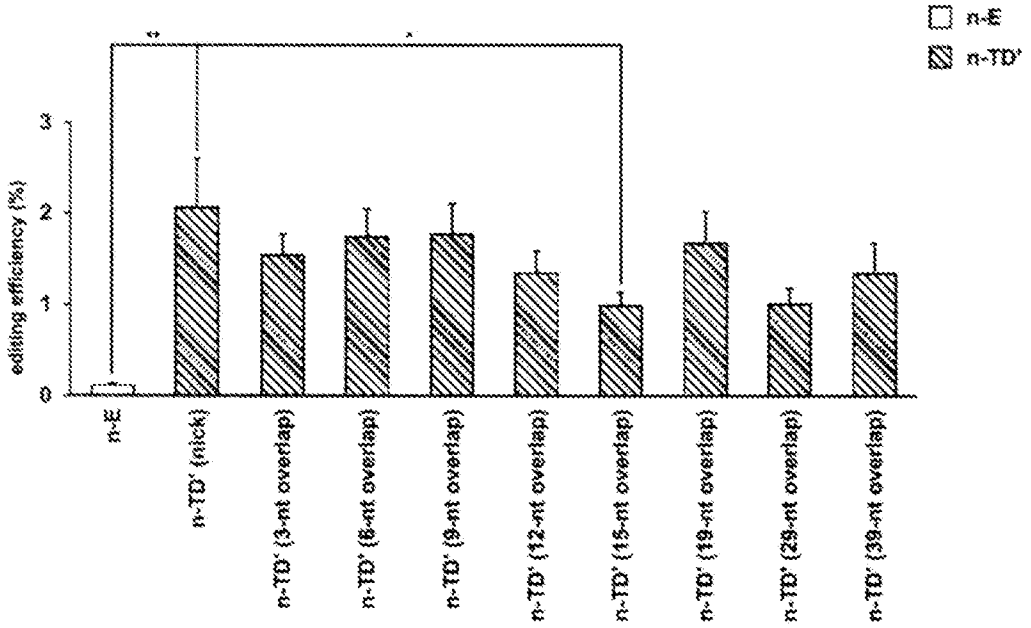

n-E
n-TD or n-TD'
editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
***
*
n-E
n-TD
n-TD' (nick)
n-TD' (1-nt gap)
n-TD' (2-nt gap)
n-TD' (3-nt gap)
n-TD' (6-nt gap)
n-TD' (9-nt gap)

[図16]

A

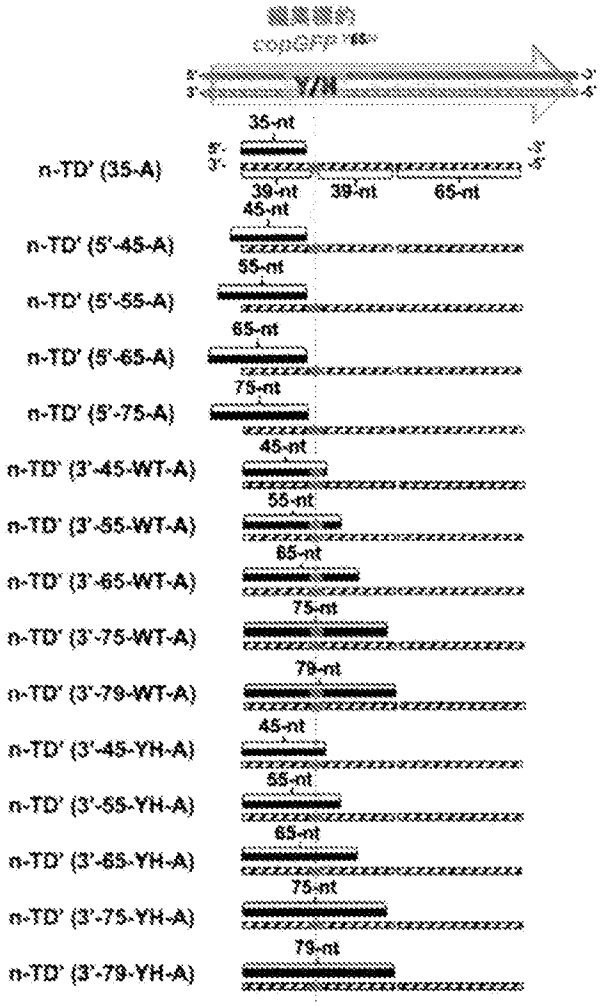

copGFP Y65X
5'
3'
Y/H
-3'
-5'
n-TD' (nick)
n-TD' (3-nt overlap)
n-TD' (6-nt overlap)
n-TD' (9-nt overlap)
n-TD' (12-nt overlap)
n-TD' (15-nt overlap)
n-TD' (19-nt overlap)
n-TD' (29-nt overlap)
n-TD' (39-nt overlap)

B

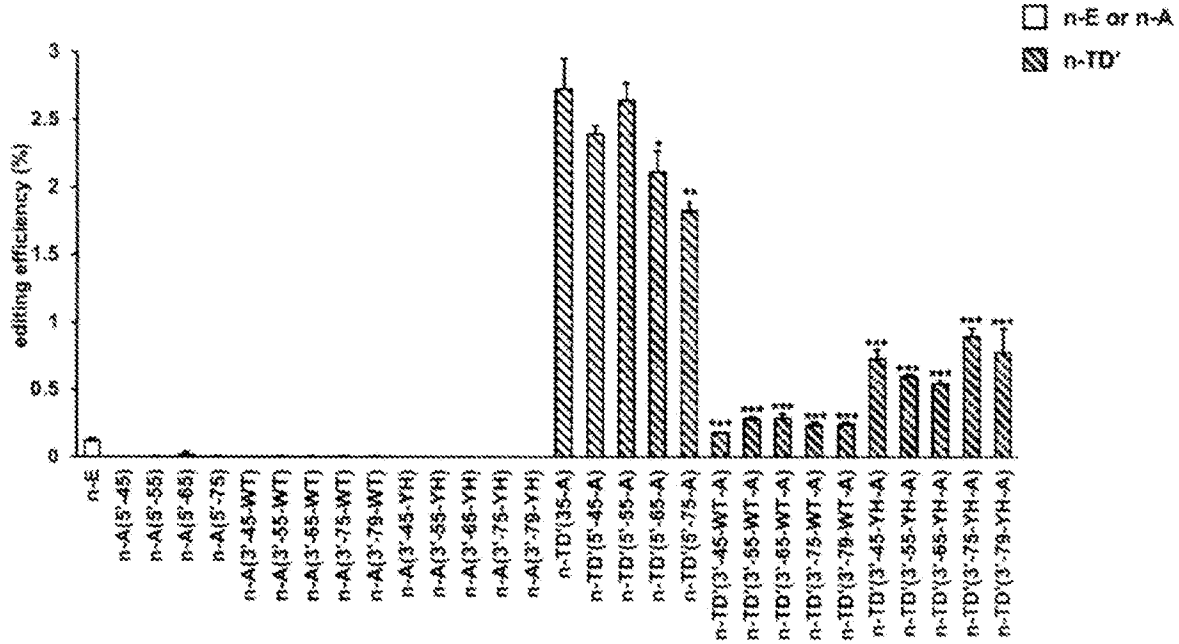

n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
0
1
2
3
n-E
n-TD' (nick)
n-TD' (3-nt overlap)
n-TD' (6-nt overlap)
n-TD' (9-nt overlap)
n-TD' (12-nt overlap)
n-TD' (15-nt overlap)
n-TD' (19-nt overlap)
n-TD' (29-nt overlap)
n-TD' (39-nt overlap)

[図17]

A

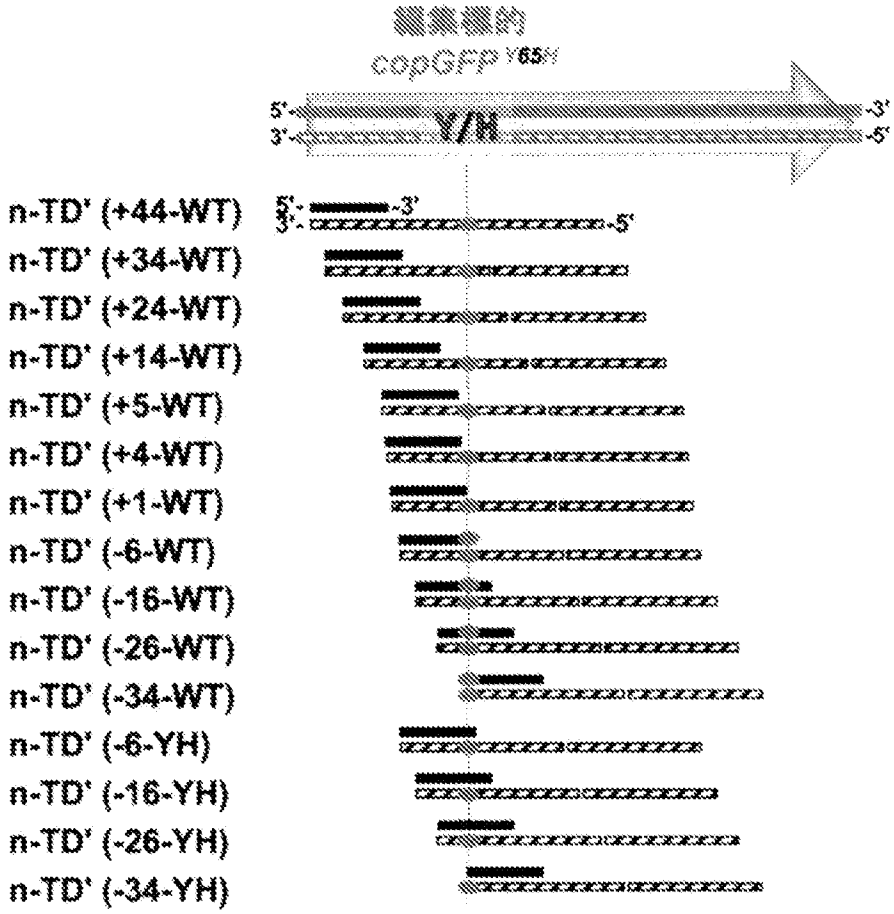

Y/H
35-nt
n-TD' (35-A)
39-nt
39-nt
65-nt
45-nt
n-TD' (5'-45-A)
55-nt
n-TD' (5'-55-A)
65-nt
n-TD' (5'-65-A)
75-nt
n-TD' (5'-75-A)
45-nt
n-TD' (3'-45-WT-A)
55-nt
n-TD' (3'-55-WT-A)
65-nt
n-TD' (3'-65-WT-A)
75-nt
n-TD' (3'-75-WT-A)
79-nt
n-TD' (3'-79-WT-A)
45-nt
n-TD' (3'-45-YH-A)
55-nt
n-TD' (3'-55-YH-A)
65-nt
n-TD' (3'-65-YH-A)
75-nt
n-TD' (3'-75-YH-A)
79-nt
n-TD' (3'-79-YH-A)

B

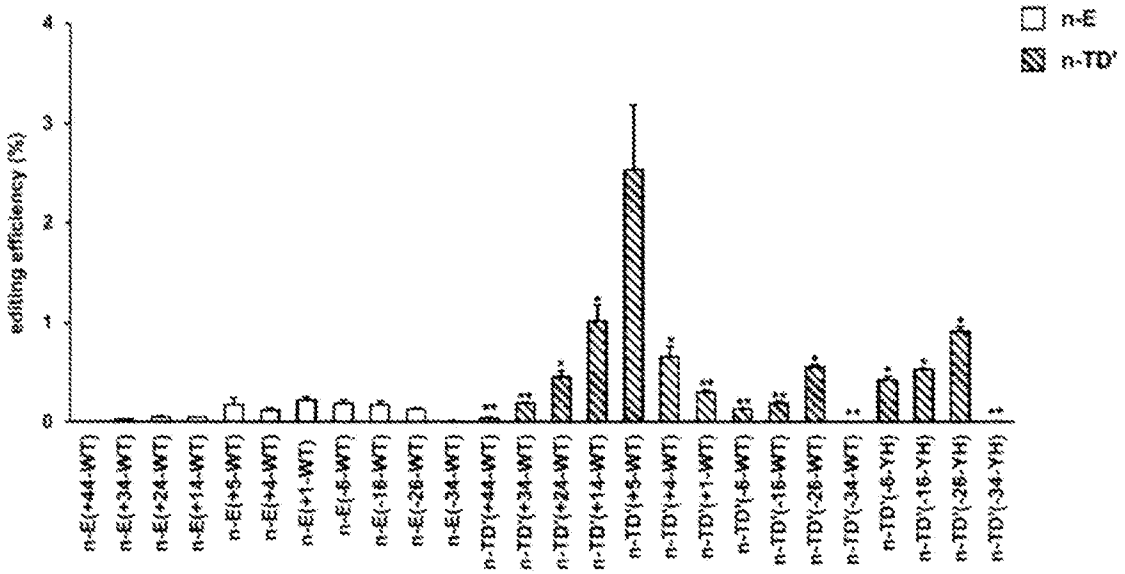

n-E or n-A
n-TD'
editing efficiency (%)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
n-E
n-A(5'-45)
n-A(5'-55)
n-A(5'-65)
n-A(5'-75)
n-A(3'-45-WT)
n-A(3'-55-WT)
n-A(3'-65-WT)
n-A(3'-75-WT)
n-A(3'-79-WT)
n-A(3'-45-YH)
n-A(3'-55-YH)
n-A(3'-65-YH)
n-A(3'-75-YH)
n-A(3'-79-YH)
n-TD'(35-A)
n-TD'(5'-45-A)
n-TD'(5'-55-A)
n-TD'(5'-65-A)
n-TD'(5'-75-A)
n-TD'(3'-45-WT-A)
n-TD'(3'-55-WT-A)
n-TD'(3'-65-WT-A)
n-TD'(3'-75-WT-A)
n-TD'(3'-79-WT-A)
n-TD'(3'-45-YH-A)
n-TD'(3'-55-YH-A)
n-TD'(3'-65-YH-A)
n-TD'(3'-75-YH-A)
n-TD'(3'-79-YH-A)

[図18]

A

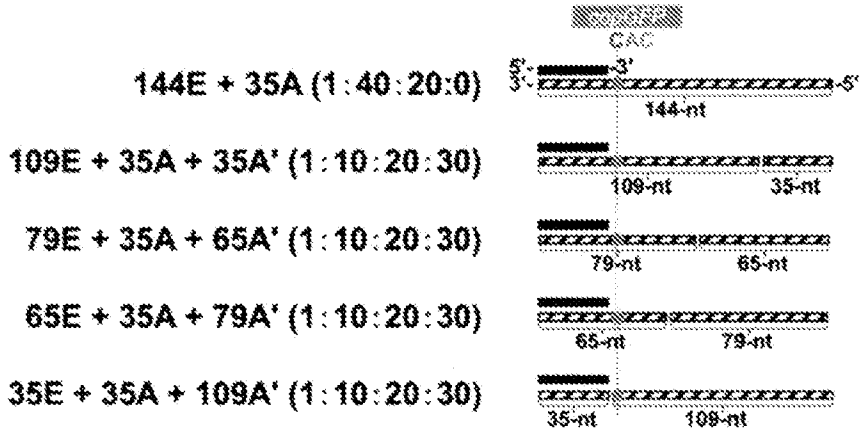

copGFP Y65Y
5'
3'
Y/H
-3'
-5'
n-TD' (+44-WT)
n-TD' (+34-WT)
n-TD' (+24-WT)
n-TD' (+14-WT)
n-TD' (+5-WT)
n-TD' (+4-WT)
n-TD' (+1-WT)
n-TD' (-6-WT)
n-TD' (-16-WT)
n-TD' (-26-WT)
n-TD' (-34-WT)
n-TD' (-6-YH)
n-TD' (-16-YH)
n-TD' (-26-YH)
n-TD' (-34-YH)

B

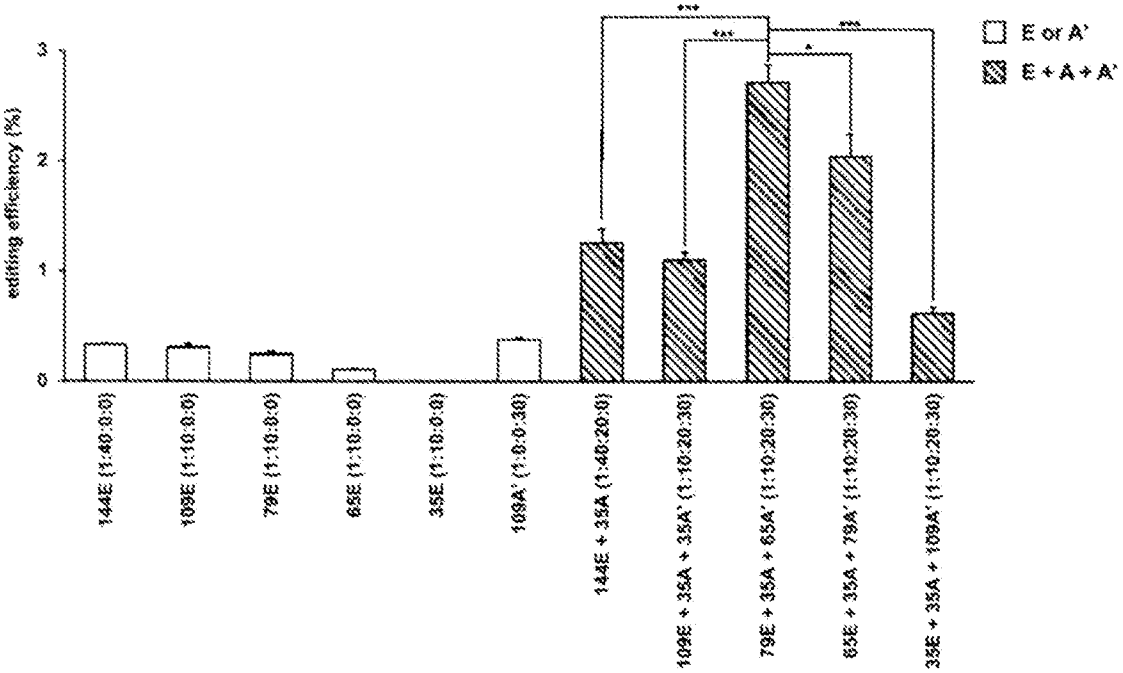

n-E
n-TD'
editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
n-E(+44-WT)
n-E(+34-WT)
n-E(+24-WT)
n-E(+14-WT)
n-E(+5-WT)
n-E(+4-WT)
n-E(+1-WT)
n-E(-6-WT)
n-E(-16-WT)
n-E(-26-WT)
n-E(-34-WT)
n-TD'(+44-WT)
n-TD'(+34-WT)
n-TD'(+24-WT)
n-TD'(+14-WT)
n-TD'(+5-WT)
n-TD'(+4-WT)
n-TD'(+1-WT)
n-TD'(-6-WT)
n-TD'(-16-WT)
n-TD'(-26-WT)
n-TD'(-34-WT)
n-TD'(-6-YH)
n-TD'(-16-YH)
n-TD'(-26-YH)
n-TD'(-34-YH)

[図19]

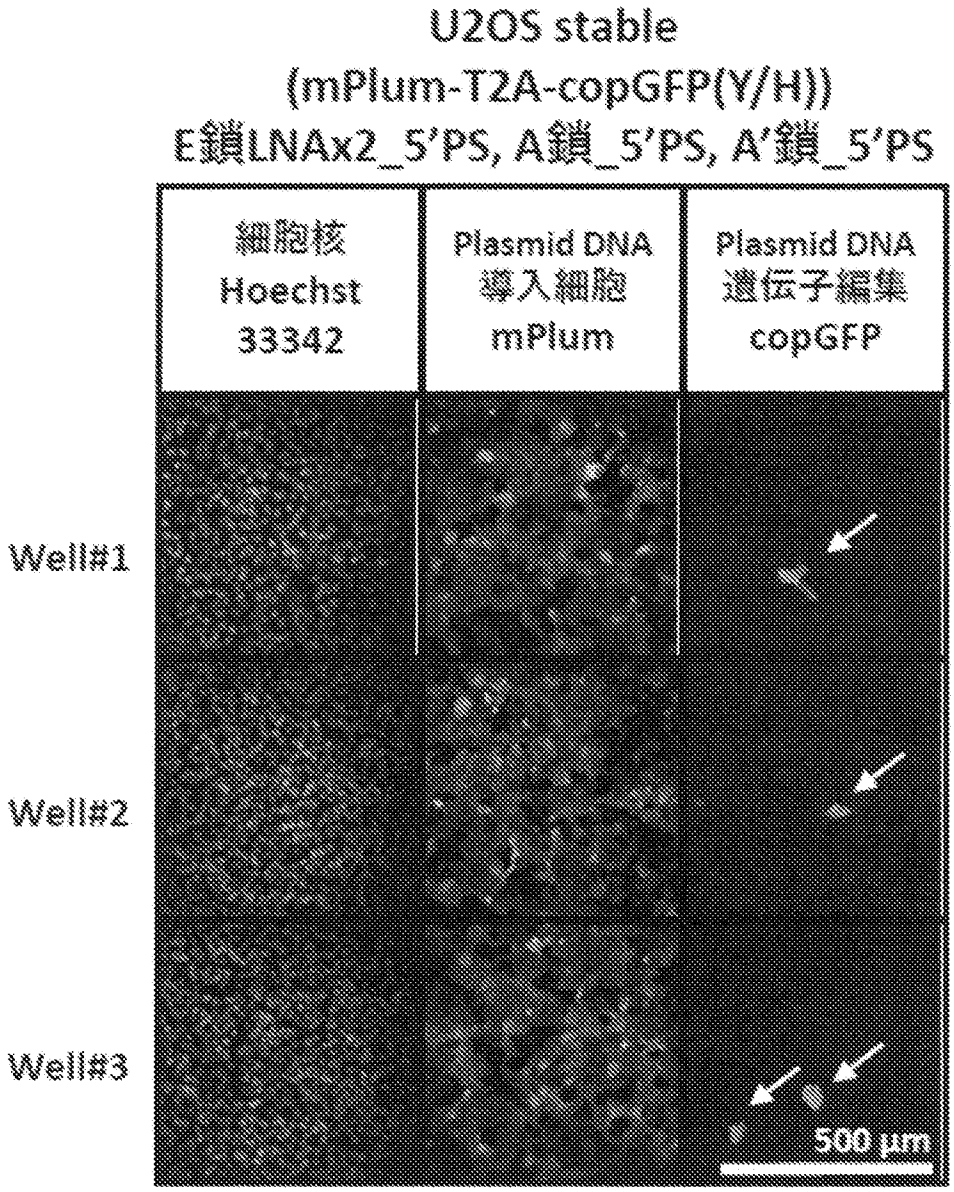
A


CAC
144E + 35A (1:40:20:0)
5'
3'
5'
144-nt
109E + 35A + 35A' (1:10:20:30)
109-nt
35-nt
79E + 35A + 65A' (1:10:20:30)
79-nt
65-nt
65E + 35A + 79A' (1:10:20:30)
65-nt
79-nt
35E + 35A + 109A' (1:10:20:30)
35-nt
109-nt

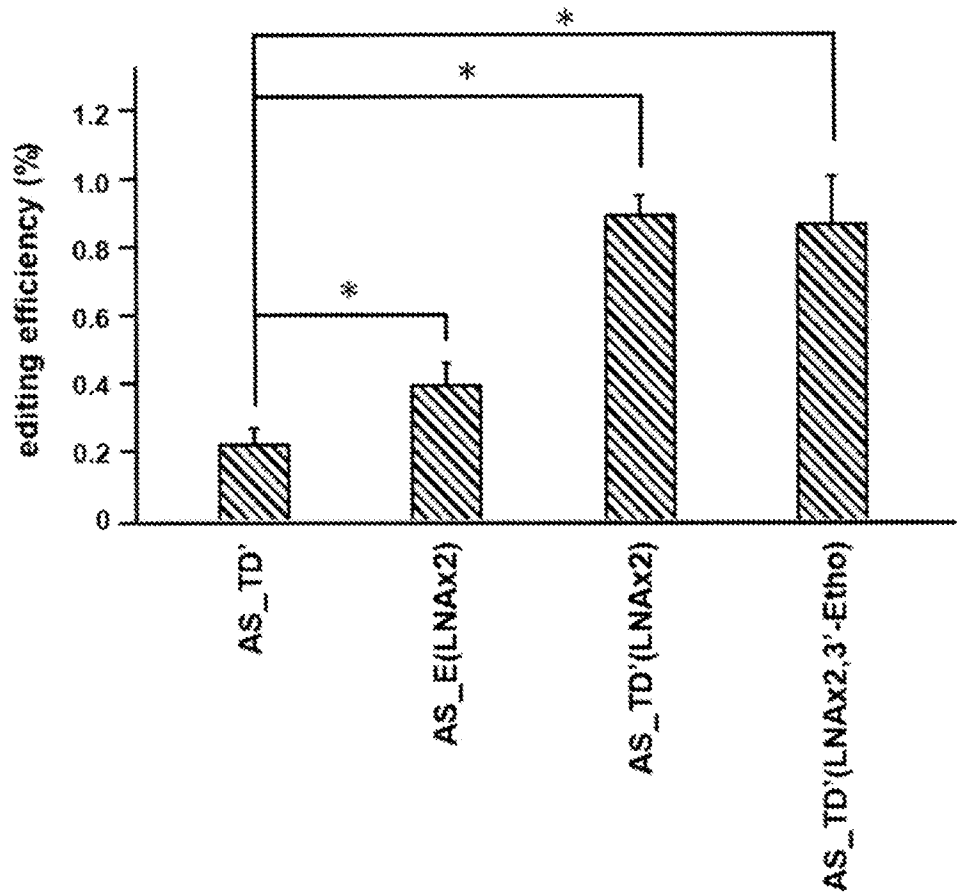
B


editing efficiency (%)
0
1
2
3
E or A'
E + A + A'
144E (1:40:0:0)
109E (1:10:0:0)
79E (1:10:0:0)
65E (1:10:0:0)
35E (1:10:0:0)
109A' (1:0:0:30)
144E + 35A (1:40:20:0)
109E + 35A + 35A' (1:10:20:30)
79E + 35A + 65A' (1:10:20:30)
65E + 35A + 79A' (1:10:20:30)
35E + 35A + 109A' (1:10:20:30)

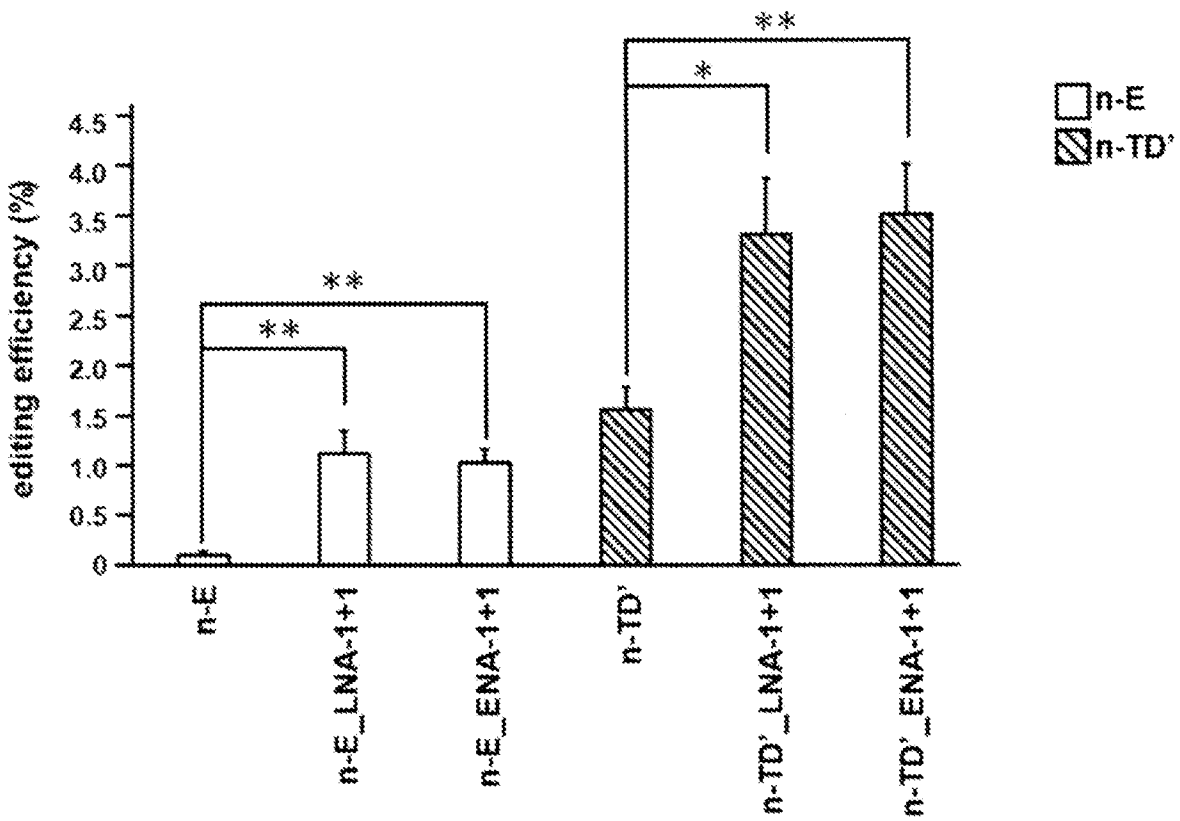
[図20]


U2OS stable
(mPlum-T2A-copGFP(Y/H))
E鎖LNAx2_5'PS, A鎖_5'PS, A'鎖_5'PS
細胞核
Hoechst
33342
Plasmid DNA
導入細胞
mPlum
Plasmid DNA
遺伝子編集
copGFP
Well#1
Well#2
Well#3
500 µm

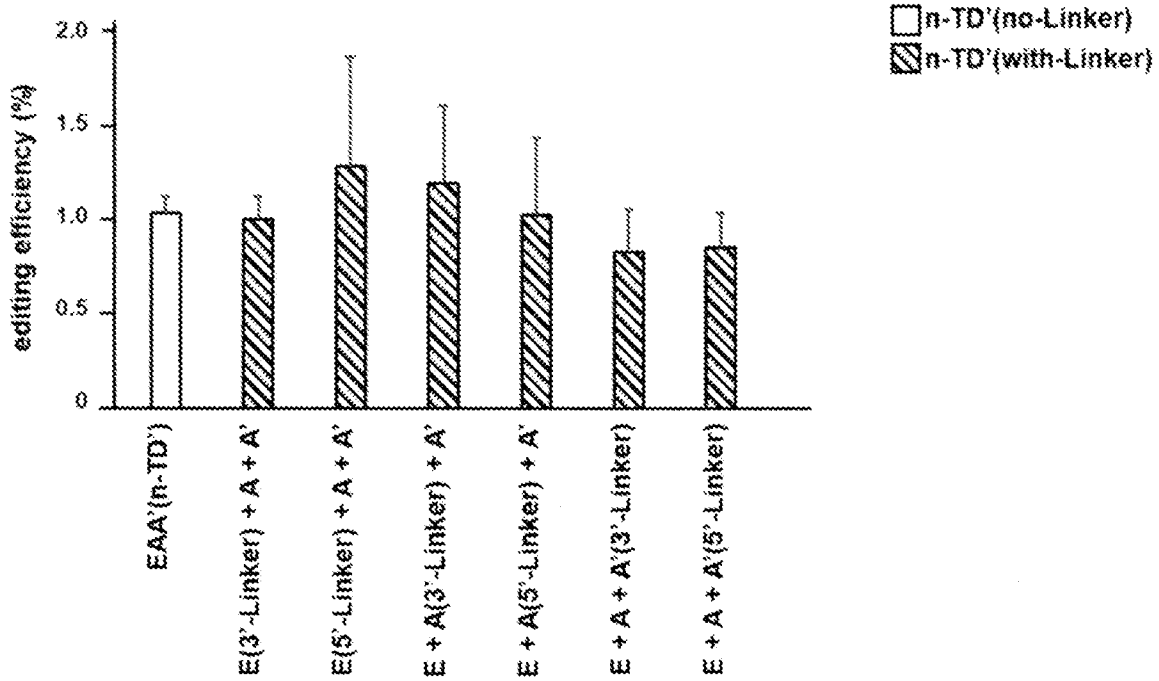
[図21]


editing efficiency (%)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
*
*
*
AS_TD'
AS_E(LNAx2)
AS_TD'(LNAx2)
AS_TD'(LNAx2,3'-Etho)

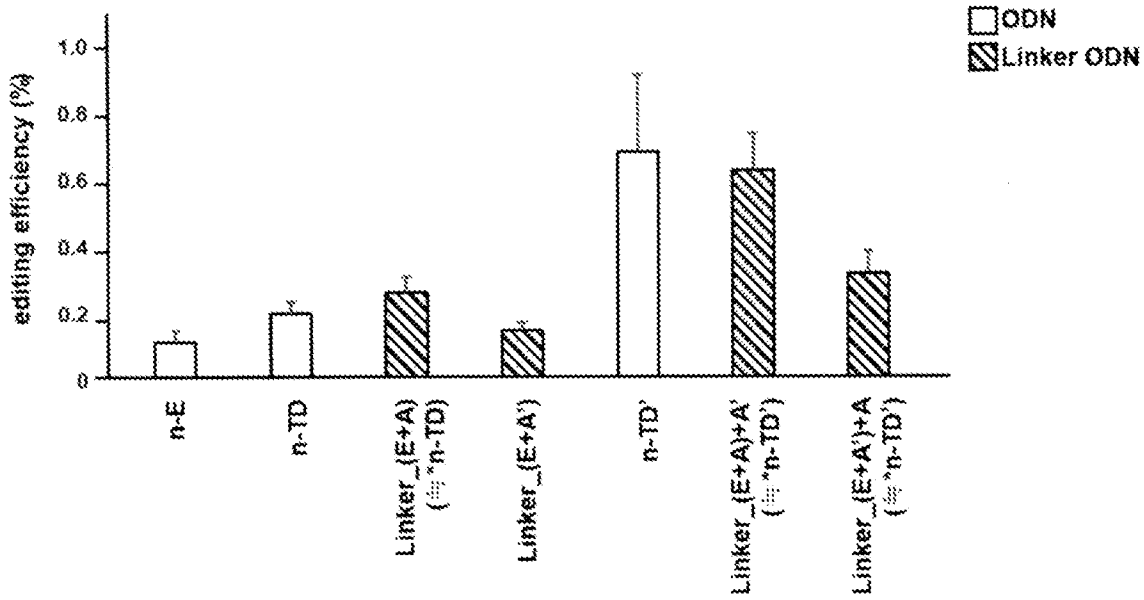
[図22]


editing efficiency (%)
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
**
**
**
*
n-E
n-TD'
n-E
n-E_LNA-1+1
n-E_ENA-1+1
n-TD'
n-TD'_LNA-1+1
n-TD'_ENA-1+1

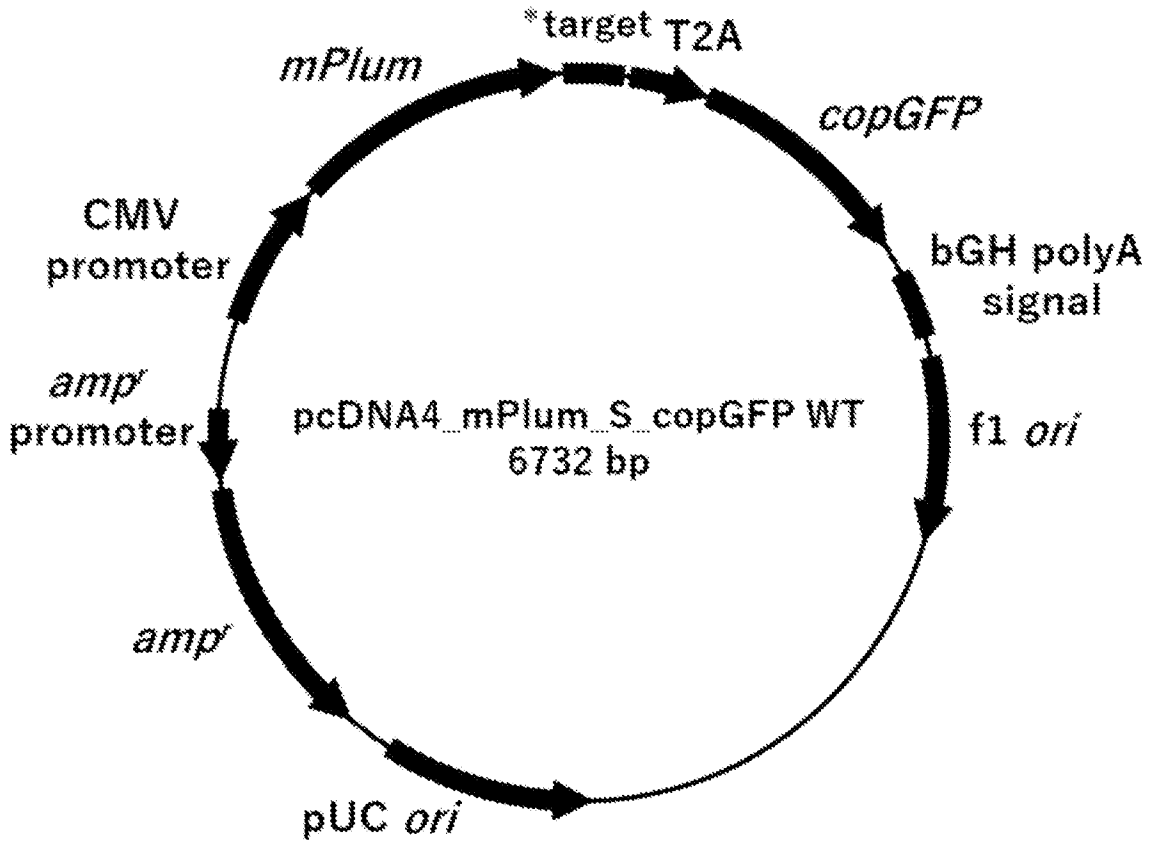
[図23]


n-TD'(no-Linker)
n-TD'(with-Linker)
editing efficiency (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
EAA'(n-TD')
E(3'-Linker) + A + A'
E(5'-Linker) + A + A'
E + A(3'-Linker) + A'
E + A(5'-Linker) + A'
E + A + A'(3'-Linker)
E + A + A'(5'-Linker)

[図24]

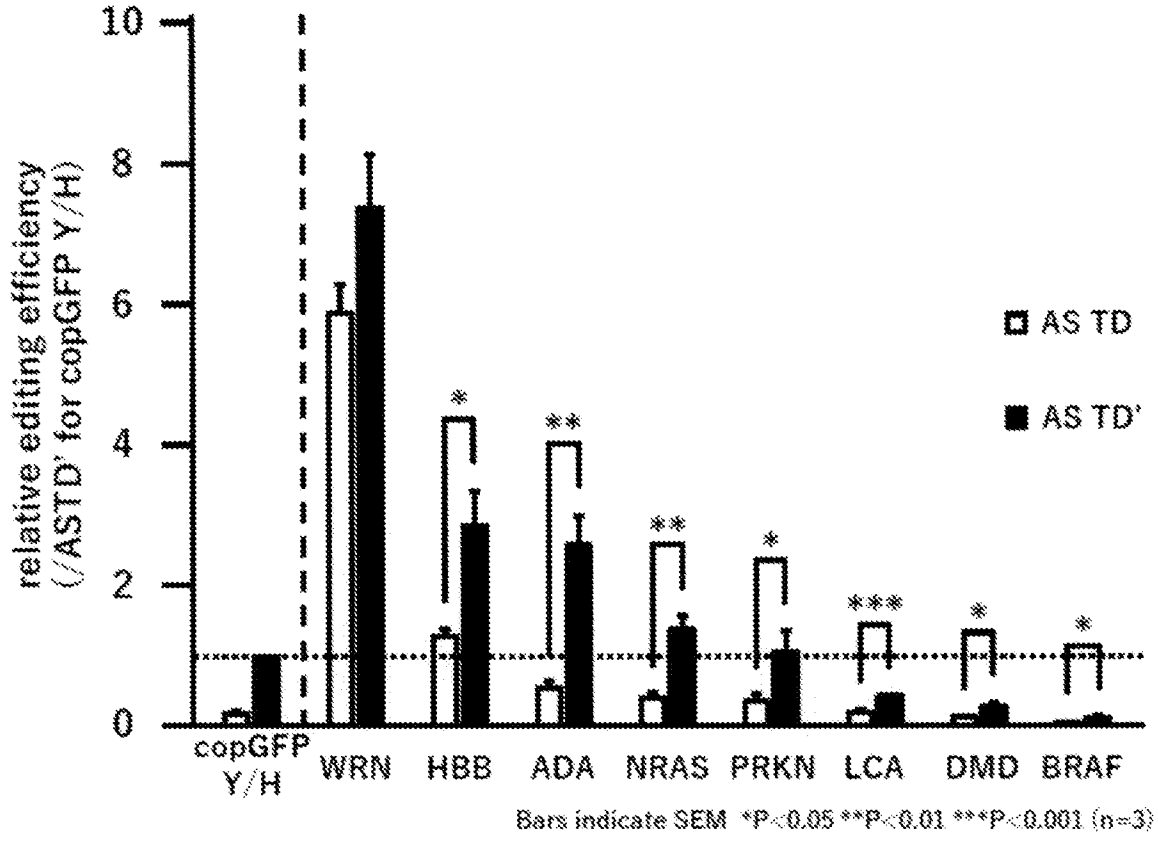

ODN
Linker ODN
editing efficiency (%)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
n-E
n-TD
Linker_(E+A)
(≒*n-TD)
Linker_(E+A')
n-TD'
Linker_(E+A)+A'
(≒*n-TD')
Linker_(E+A')+A
(≒*n-TD')

[図25]



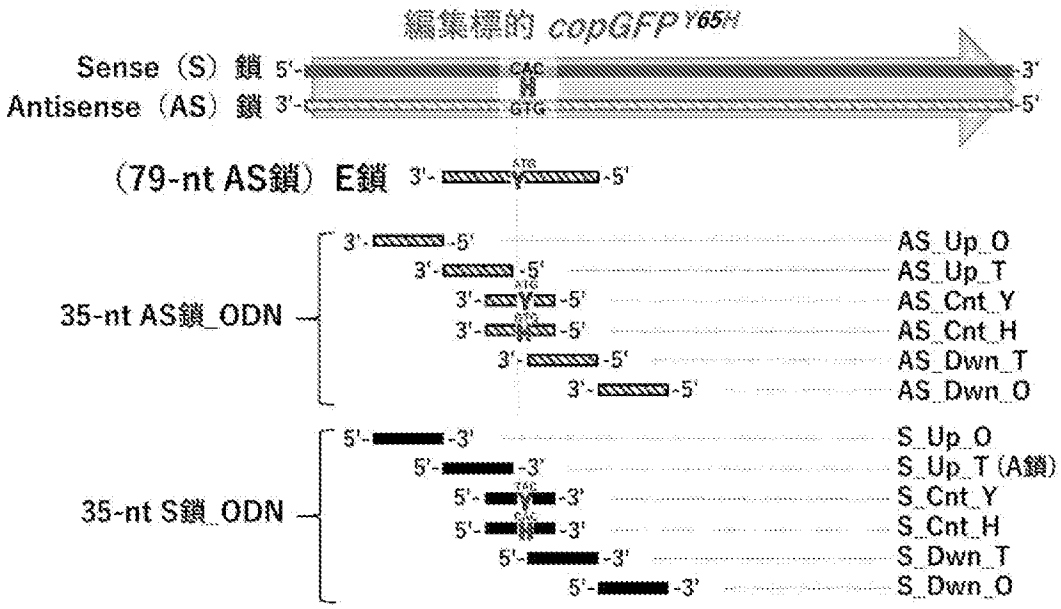
*target：ナンセンス変異配列

[図26]

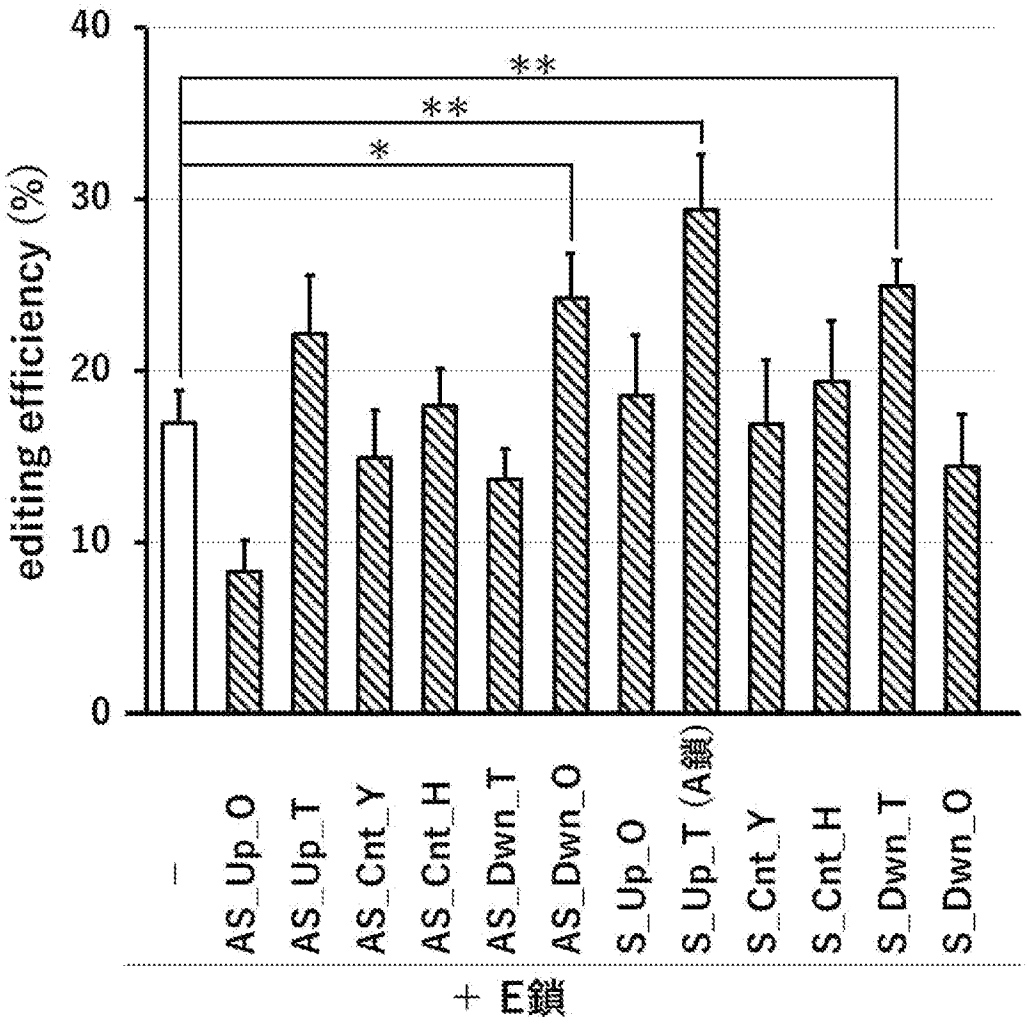


[図27]

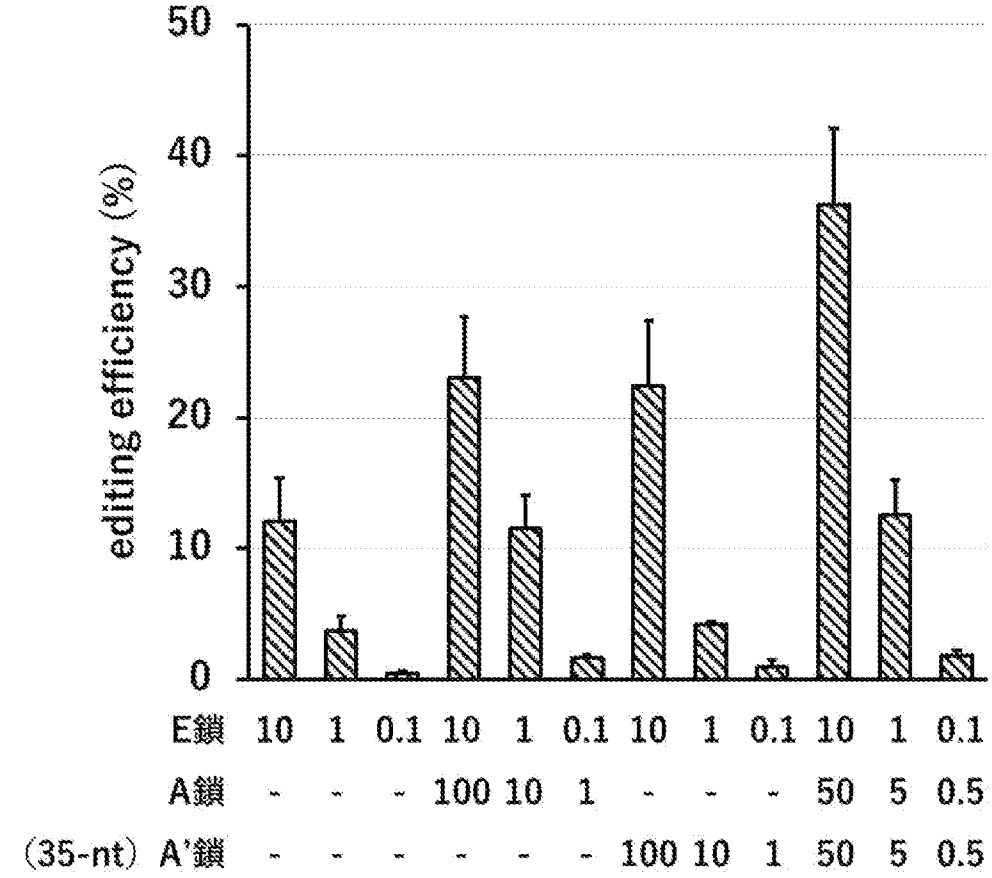
A


編集標的 copGFP Y65N
Sense（S）鎖 5'-CAC-3'
Antisense（AS）鎖 3'-GTG-5'
（79-nt AS鎖）E鎖 3'-CTG-5'
35-nt AS鎖_ODN
AS_Up_O
AS_Up_T
AS_Cnt_Y
AS_Cnt_H
AS_Dwn_T
AS_Dwn_O
35-nt S鎖_ODN
S_Up_O
S_Up_T (A鎖)
S_Cnt_Y
S_Cnt_H
S_Dwn_T
S_Dwn_O

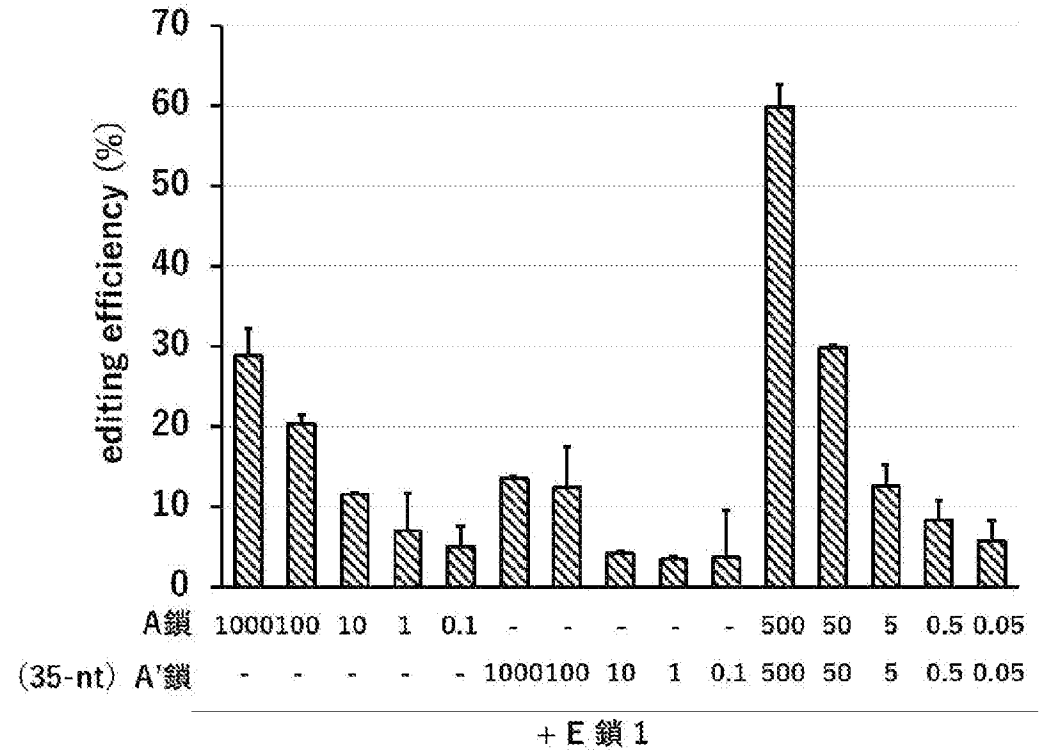
B


editing efficiency (%)
40
30
20
10
0
**
**
*
−
AS_Up_O
AS_Up_T
AS_Cnt_Y
AS_Cnt_H
AS_Dwn_T
AS_Dwn_O
S_Up_O
S_Up_T (A鎖)
S_Cnt_Y
S_Cnt_H
S_Dwn_T
S_Dwn_O
＋ E鎖

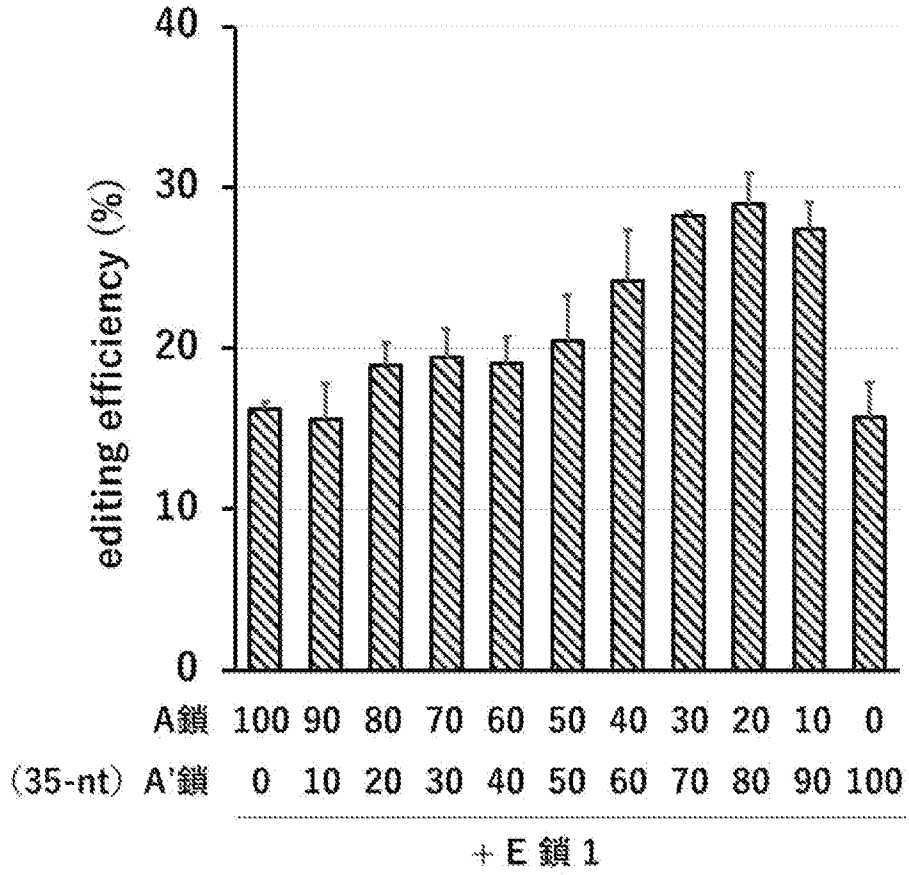
[図28]


editing efficiency (%)
50
40
30
20
10
0
E鎖 10 1 0.1 10 1 0.1 10 1 0.1 10 1 0.1
A鎖 - - - 100 10 1 - - - 50 5 0.5
(35-nt) A'鎖 - - - - - - 100 10 1 50 5 0.5

[図29]

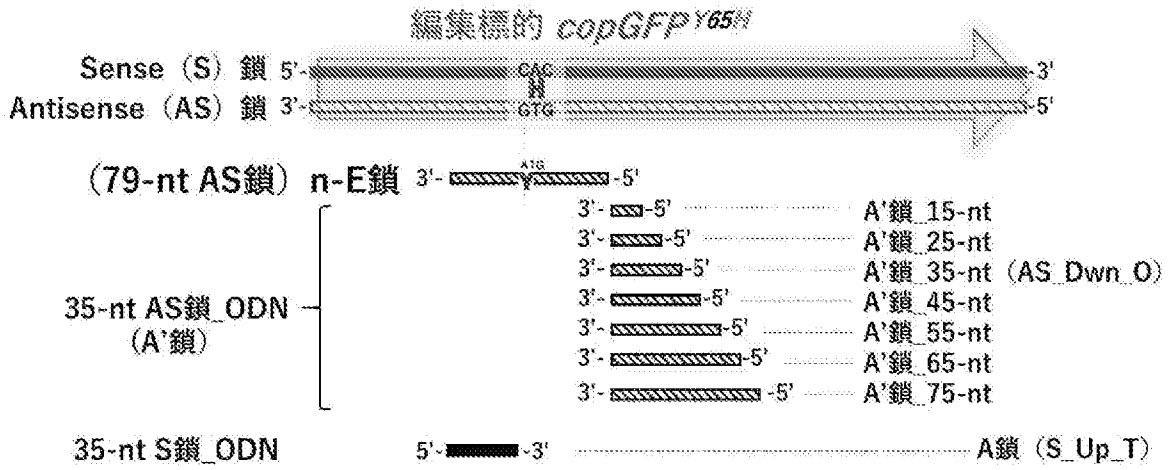

editing efficiency (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
A鎖 1000100 10 1 0.1 - - - - - 500 50 5 0.5 0.05
(35-nt) A'鎖 - - - - - 1000100 10 1 0.1 500 50 5 0.5 0.05
+E鎖1

[図30]

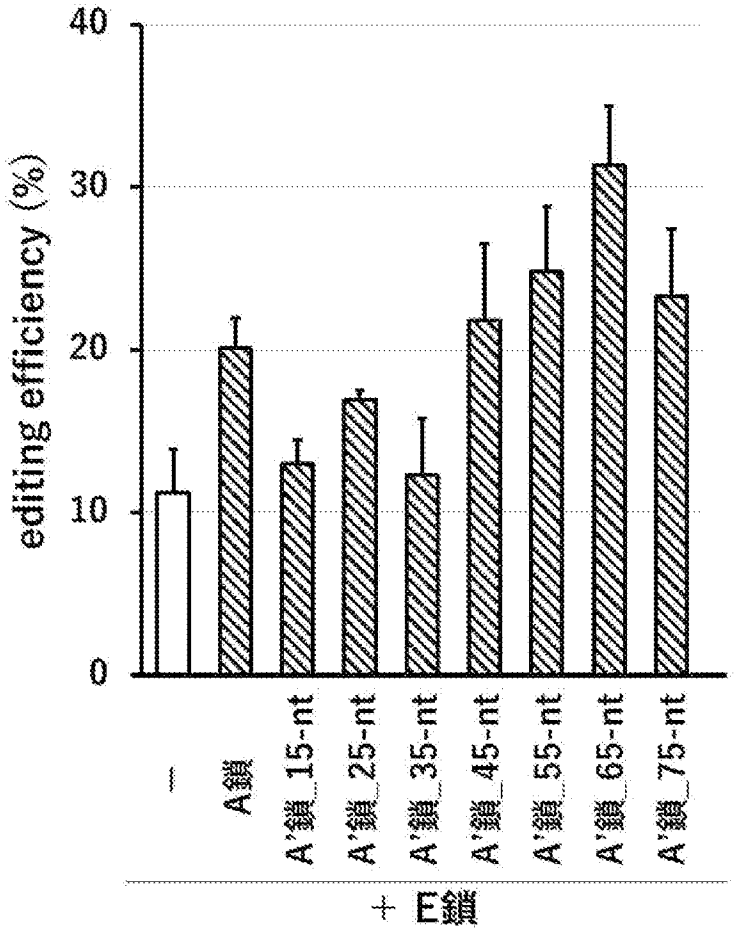

40
30
20
10
0
editing efficiency (%)
A鎖 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(35-nt) A'鎖 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
+ E 鎖 1

[図31]

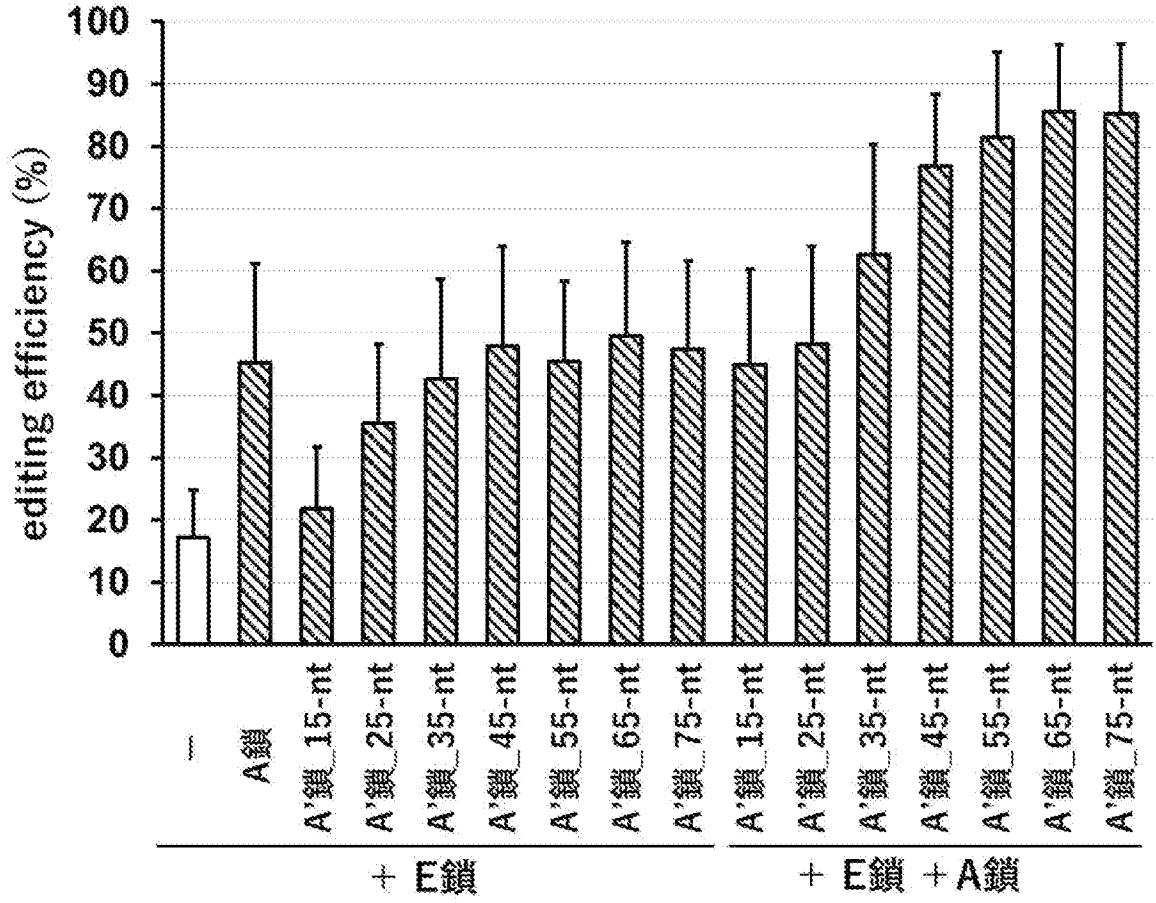
A


編集標的 copGFP Y65H
Sense（S）鎖 5'-CAC-3'
Antisense（AS）鎖 3'-GTG-5'
（79-nt AS鎖）n-E鎖 3'-ATG-5'
35-nt AS鎖_ODN（A'鎖）
3'-5' A'鎖_15-nt
3'-5' A'鎖_25-nt
3'-5' A'鎖_35-nt（AS_Dwn_O）
3'-5' A'鎖_45-nt
3'-5' A'鎖_55-nt
3'-5' A'鎖_65-nt
3'-5' A'鎖_75-nt
35-nt S鎖_ODN 5'-3' A鎖（S_Up_T）

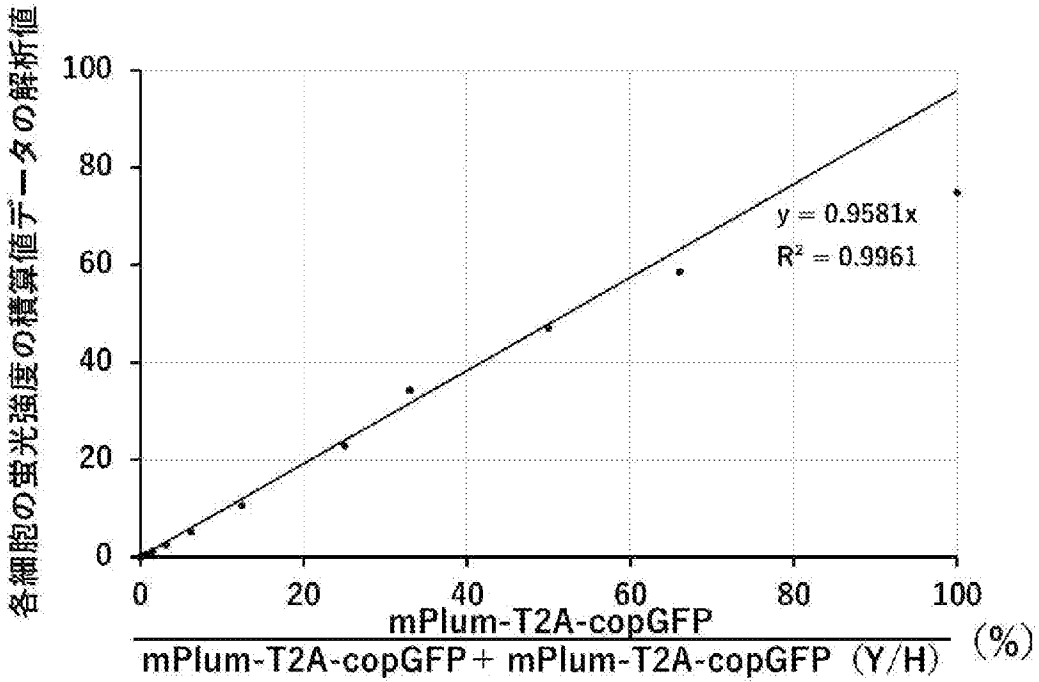
B


editing efficiency (%)
40
30
20
10
0
−
A鎖
A'鎖_15-nt
A'鎖_25-nt
A'鎖_35-nt
A'鎖_45-nt
A'鎖_55-nt
A'鎖_65-nt
A'鎖_75-nt
＋ E鎖

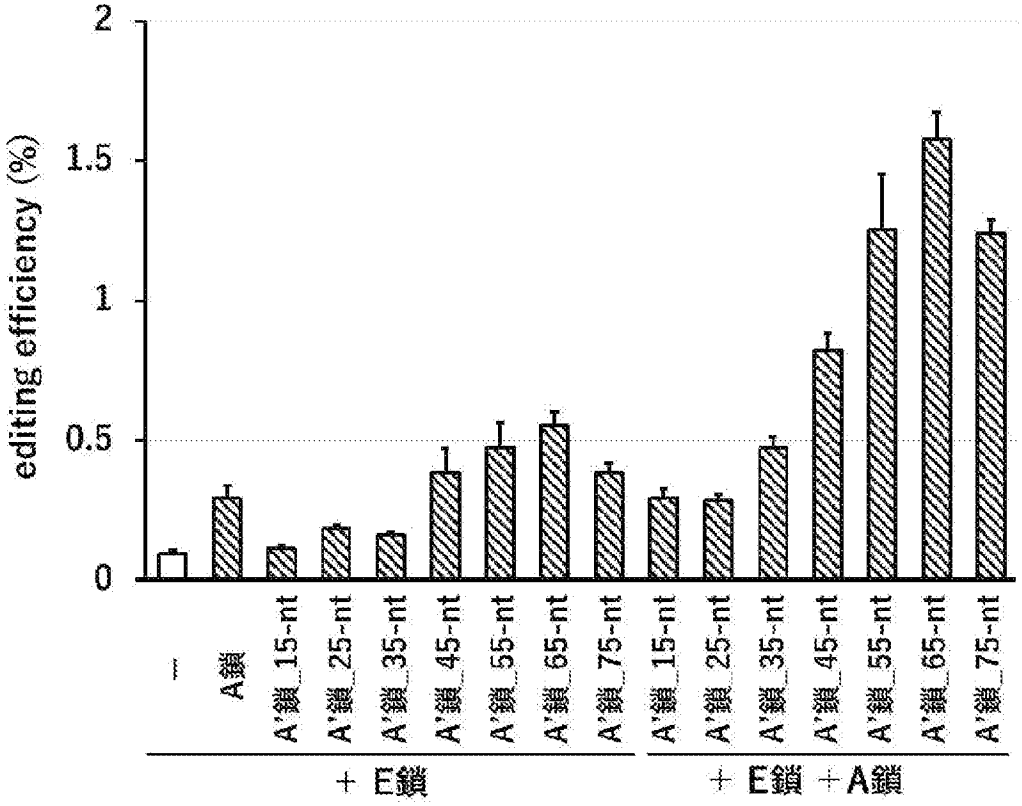
[図32]


editing efficiency (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
−
A鎖
A'鎖_15-nt
A'鎖_25-nt
A'鎖_35-nt
A'鎖_45-nt
A'鎖_55-nt
A'鎖_65-nt
A'鎖_75-nt
A'鎖_15-nt
A'鎖_25-nt
A'鎖_35-nt
A'鎖_45-nt
A'鎖_55-nt
A'鎖_65-nt
A'鎖_75-nt
＋ E鎖
＋ E鎖 ＋A鎖

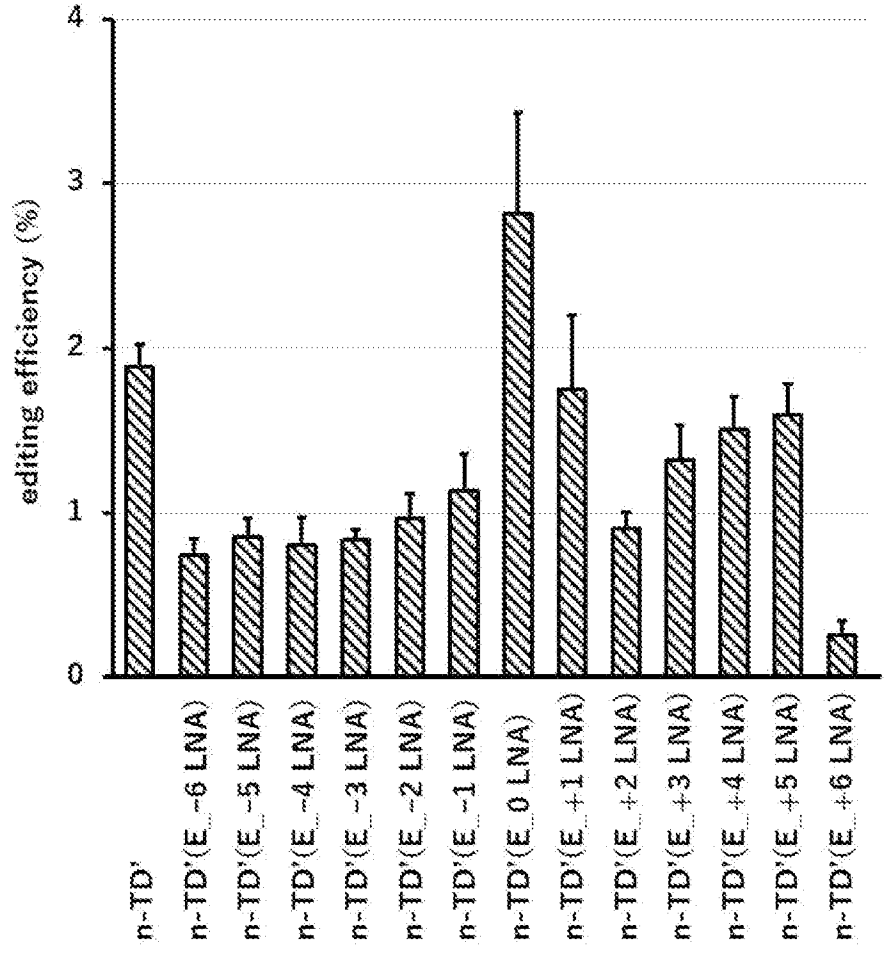
[図33]


各細胞の蛍光強度の積算値データの解析値
100
80
60
40
20
0
y = 0.9581x
R² = 0.9961
0
20
40
60
80
100
mPlum-T2A-copGFP
mPlum-T2A-copGFP＋ mPlum-T2A-copGFP (Y/H)
(%)

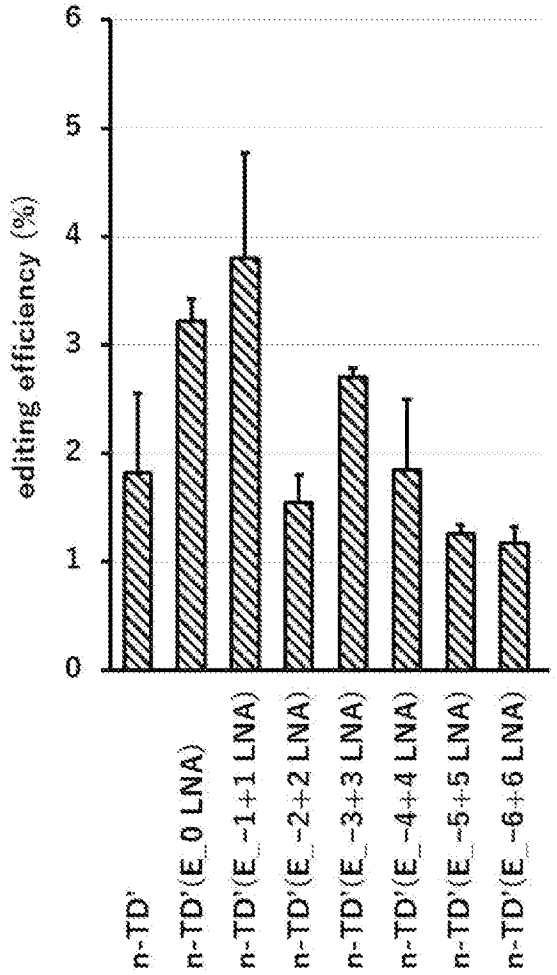
[図34]


editing efficiency (%)
2
1.5
1
0.5
0
−
A鎖
A'鎖_15-nt
A'鎖_25-nt
A'鎖_35-nt
A'鎖_45-nt
A'鎖_55-nt
A'鎖_65-nt
A'鎖_75-nt
+ E鎖
+ E鎖 +A鎖

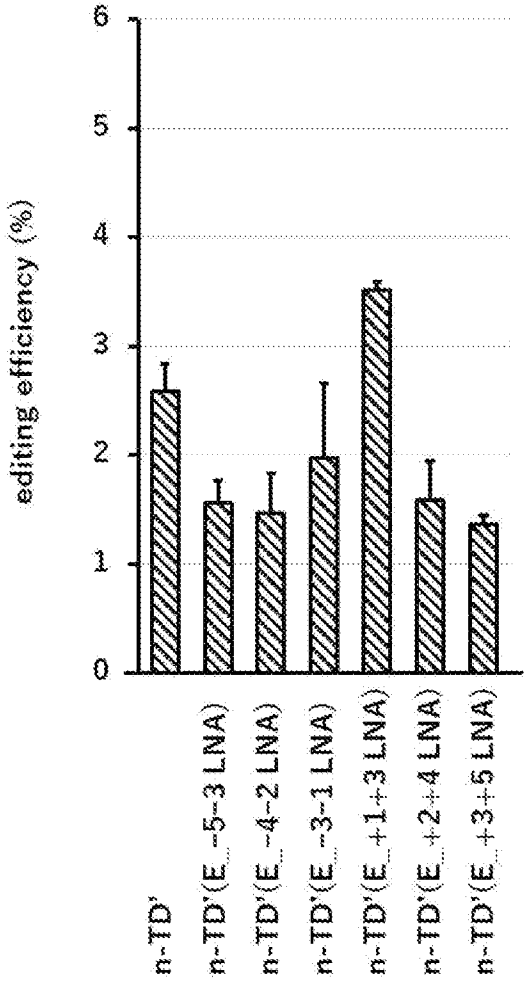
[図35]


editing efficiency (%)
4
3
2
1
0
n-TD'
n-TD'(E_−6 LNA)
n-TD'(E_−5 LNA)
n-TD'(E_−4 LNA)
n-TD'(E_−3 LNA)
n-TD'(E_−2 LNA)
n-TD'(E_−1 LNA)
n-TD'(E_0 LNA)
n-TD'(E_+1 LNA)
n-TD'(E_+2 LNA)
n-TD'(E_+3 LNA)
n-TD'(E_+4 LNA)
n-TD'(E_+5 LNA)
n-TD'(E_+6 LNA)

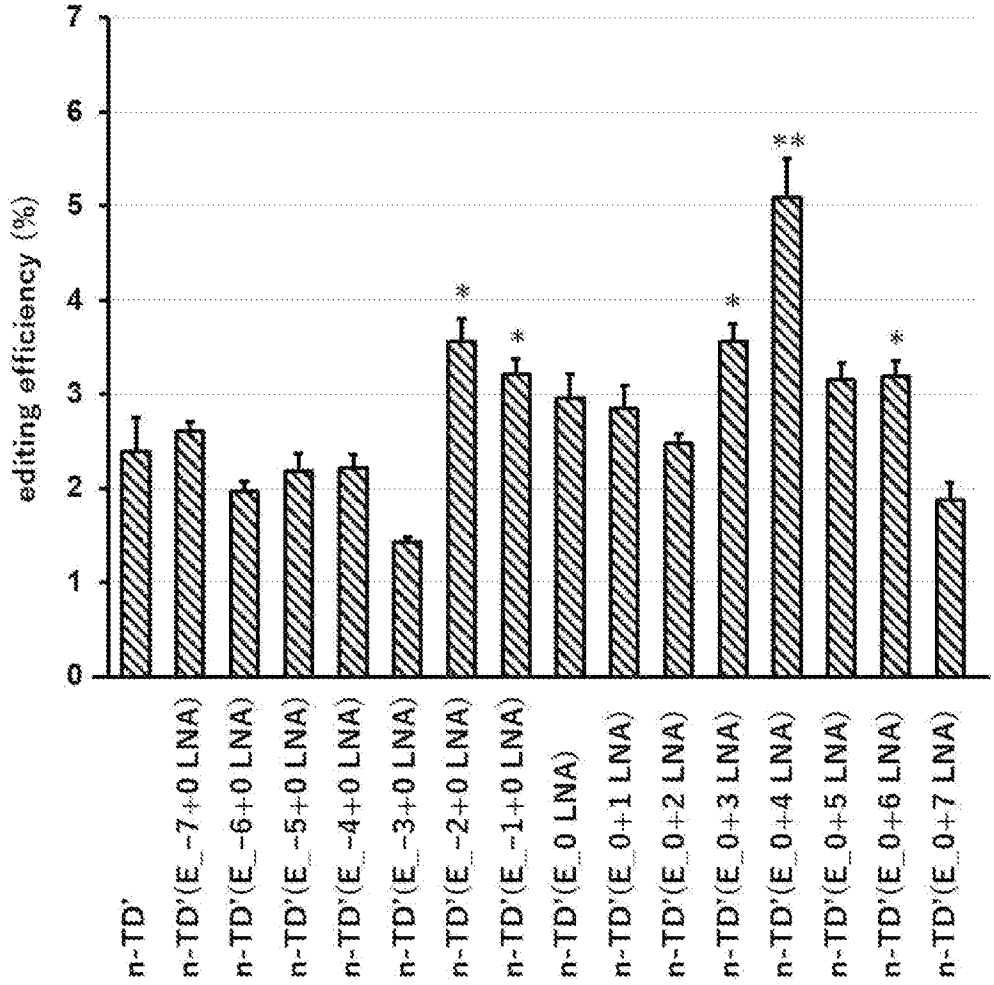
[図36]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
n-TD'
n-TD'(E_0 LNA)
n-TD'(E_-1+1 LNA)
n-TD'(E_-2+2 LNA)
n-TD'(E_-3+3 LNA)
n-TD'(E_-4+4 LNA)
n-TD'(E_-5+5 LNA)
n-TD'(E_-6+6 LNA)

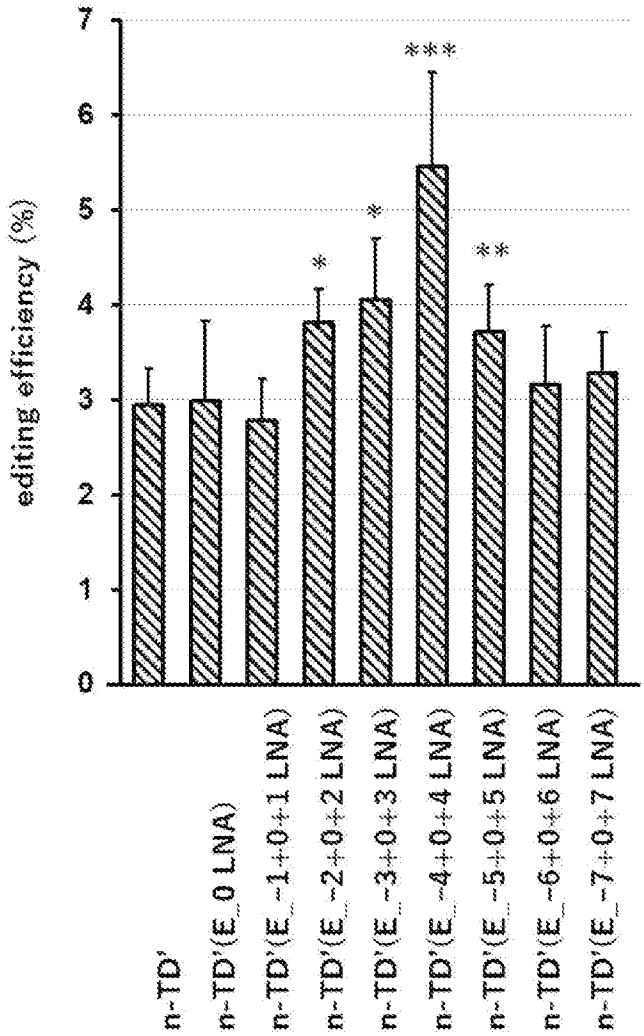
[図37]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
n-TD'
n-TD'(E_-5-3 LNA)
n-TD'(E_-4-2 LNA)
n-TD'(E_-3-1 LNA)
n-TD'(E_+1+3 LNA)
n-TD'(E_+2+4 LNA)
n-TD'(E_+3+5 LNA)

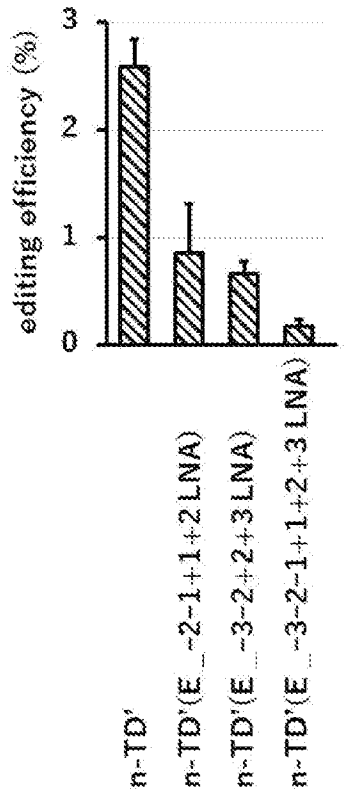
[図38]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
*
*
*
**
*
n-TD'
n-TD'(E_-7+0 LNA)
n-TD'(E_-6+0 LNA)
n-TD'(E_-5+0 LNA)
n-TD'(E_-4+0 LNA)
n-TD'(E_-3+0 LNA)
n-TD'(E_-2+0 LNA)
n-TD'(E_-1+0 LNA)
n-TD'(E_0 LNA)
n-TD'(E_0+1 LNA)
n-TD'(E_0+2 LNA)
n-TD'(E_0+3 LNA)
n-TD'(E_0+4 LNA)
n-TD'(E_0+5 LNA)
n-TD'(E_0+6 LNA)
n-TD'(E_0+7 LNA)

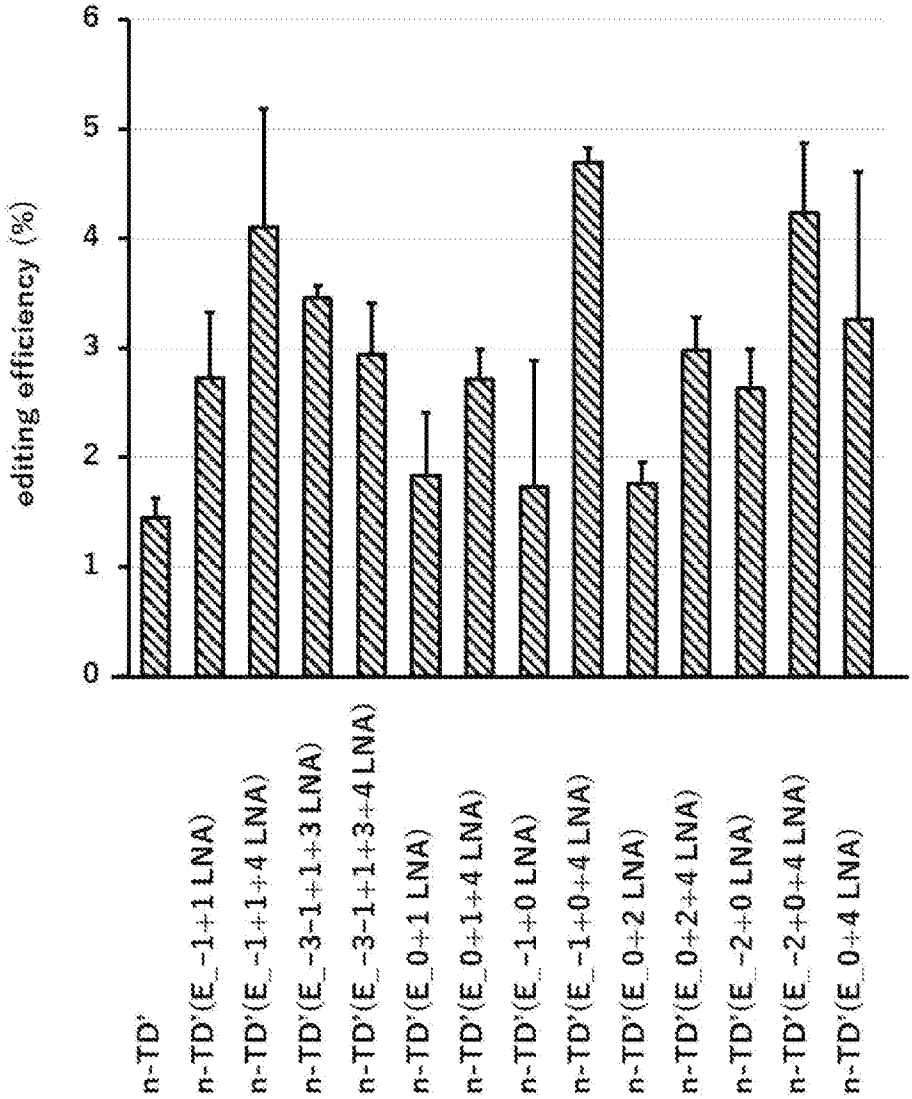
[図39]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
*
*
***
**
n-TD'
n-TD'(E_0 LNA)
n-TD'(E_-1+0+1 LNA)
n-TD'(E_-2+0+2 LNA)
n-TD'(E_-3+0+3 LNA)
n-TD'(E_-4+0+4 LNA)
n-TD'(E_-5+0+5 LNA)
n-TD'(E_-6+0+6 LNA)
n-TD'(E_-7+0+7 LNA)

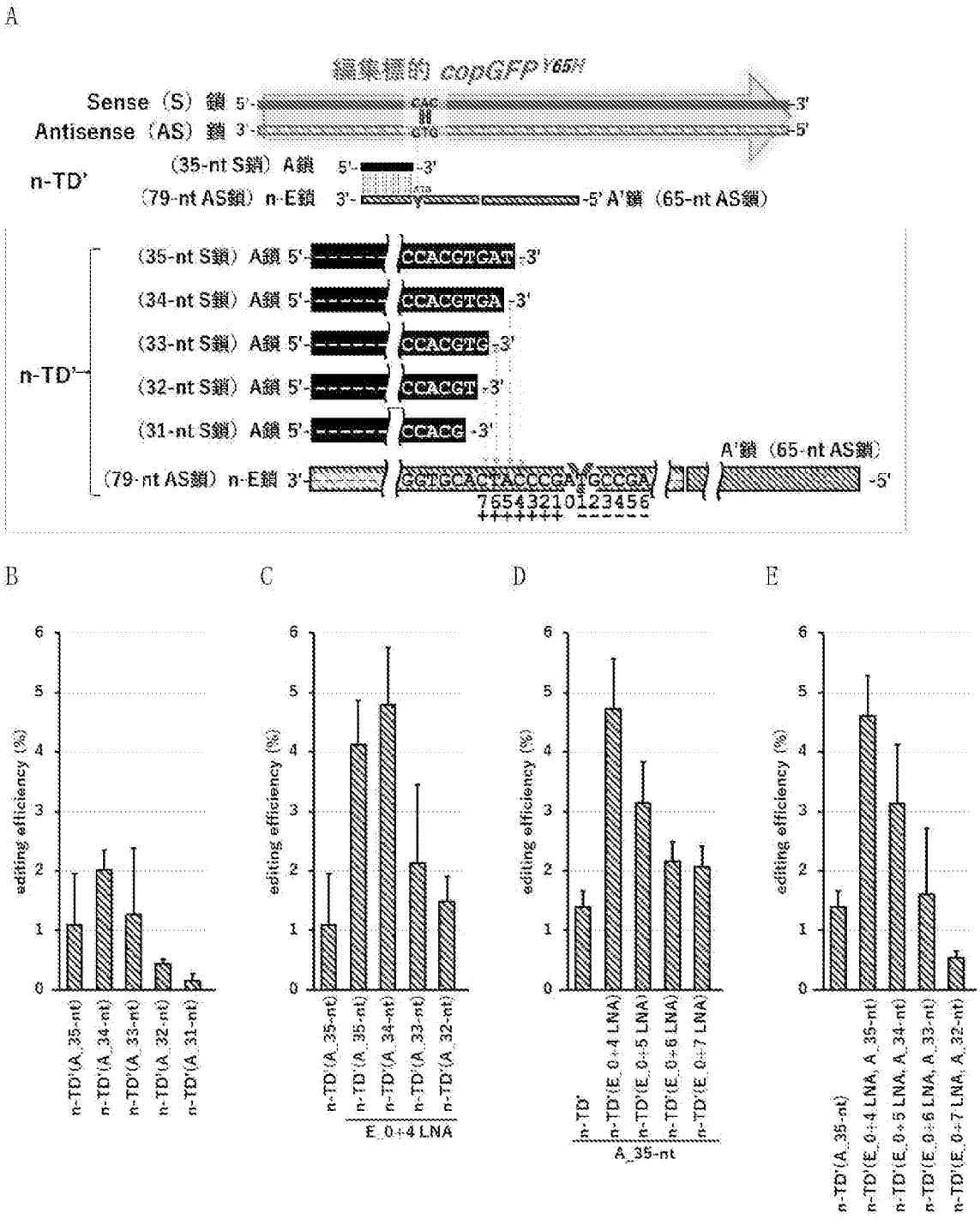
[図40]


editing efficiency (%)
3
2
1
0
n-TD'
n-TD'(E_-2~1+1+2 LNA)
n-TD'(E_-3~2+2+3 LNA)
n-TD'(E_-3~2~1+1+2+3 LNA)

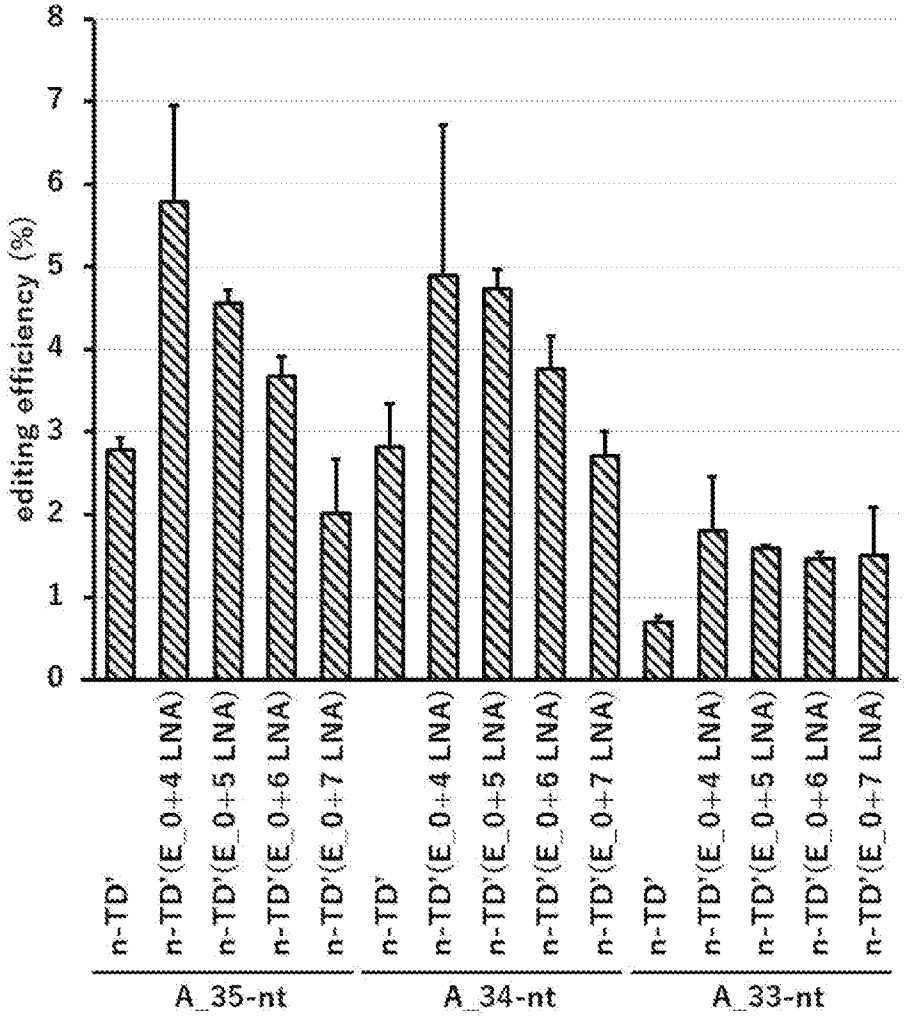
[図41]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
n-TD'
n-TD'(E_-1+1 LNA)
n-TD'(E_-1+1+4 LNA)
n-TD'(E_-3-1+1+3 LNA)
n-TD'(E_-3-1+1+3+4 LNA)
n-TD'(E_0+1 LNA)
n-TD'(E_0+1+4 LNA)
n-TD'(E_-1+0 LNA)
n-TD'(E_-1+0+4 LNA)
n-TD'(E_0+2 LNA)
n-TD'(E_0+2+4 LNA)
n-TD'(E_-2+0 LNA)
n-TD'(E_-2+0+4 LNA)
n-TD'(E_0+4 LNA)

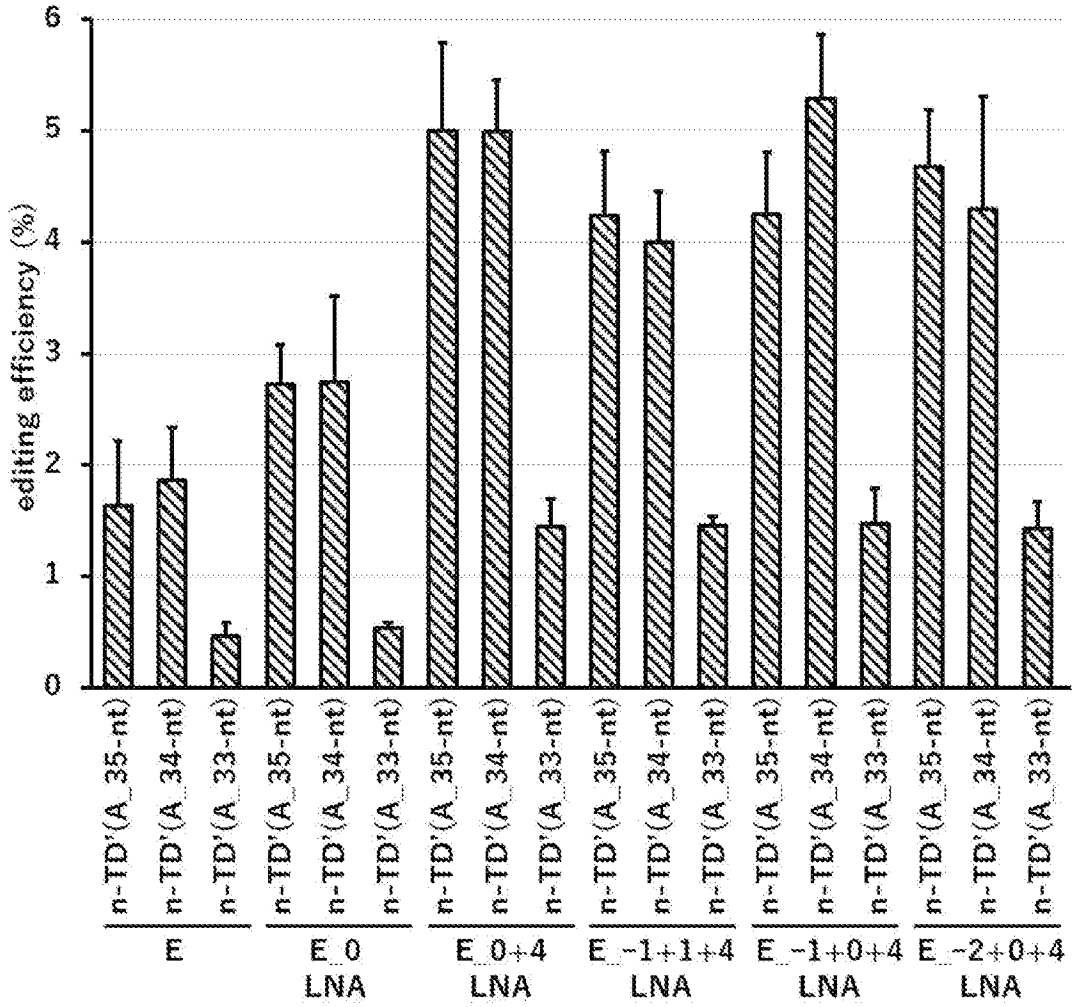
[図42]


A
編集標的 copGFP Y65N
Sense (S) 鎖 5'- -3'
Antisense (AS) 鎖 3'- -5'
n-TD'
(35-nt S鎖) A鎖 5'- -3'
(79-nt AS鎖) n-E鎖 3'- -5' A'鎖 (65-nt AS鎖)
(35-nt S鎖) A鎖 5'- CCACGTGAT -3'
(34-nt S鎖) A鎖 5'- CCACGTGA -3'
(33-nt S鎖) A鎖 5'- CCACGTG -3'
(32-nt S鎖) A鎖 5'- CCACGT -3'
(31-nt S鎖) A鎖 5'- CCACG -3'
A'鎖 (65-nt AS鎖)
(79-nt AS鎖) n-E鎖 3'- GGTGCACTACCCGATGCCGA -5'
765432101234567
B
C
D
E
editing efficiency (%)
n-TD'(A_35-nt)
n-TD'(A_34-nt)
n-TD'(A_33-nt)
n-TD'(A_32-nt)
n-TD'(A_31-nt)
E_0+4 LNA
n-TD'
n-TD'(E_0+4 LNA)
n-TD'(E_0+5 LNA)
n-TD'(E_0+6 LNA)
n-TD'(E_0+7 LNA)
A_35-nt
n-TD'(A_35-nt)
n-TD'(E_0+4 LNA, A_35-nt)
n-TD'(E_0+5 LNA, A_34-nt)
n-TD'(E_0+6 LNA, A_33-nt)
n-TD'(E_0+7 LNA, A_32-nt)

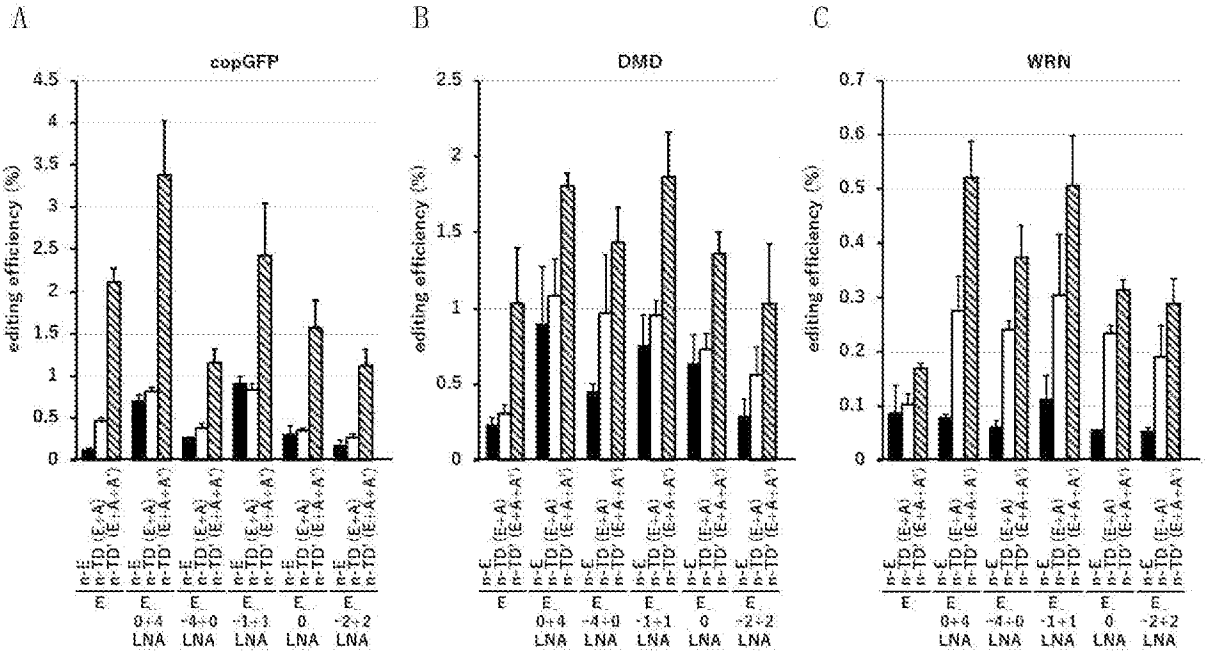
[図43]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
n-TD'
n-TD'(E_0+4 LNA)
n-TD'(E_0+5 LNA)
n-TD'(E_0+6 LNA)
n-TD'(E_0+7 LNA)
n-TD'
n-TD'(E_0+4 LNA)
n-TD'(E_0+5 LNA)
n-TD'(E_0+6 LNA)
n-TD'(E_0+7 LNA)
n-TD'
n-TD'(E_0+4 LNA)
n-TD'(E_0+5 LNA)
n-TD'(E_0+6 LNA)
n-TD'(E_0+7 LNA)
A_35-nt
A_34-nt
A_33-nt

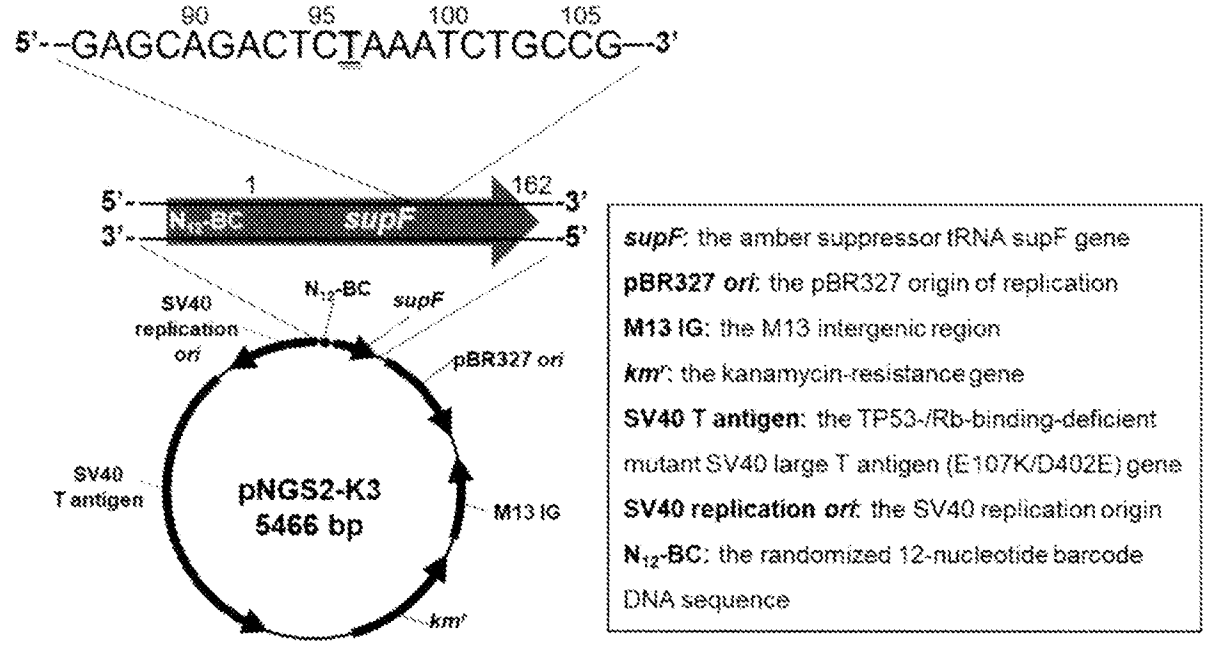
[図44]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
n-TD'(A_35-nt)
n-TD'(A_34-nt)
n-TD'(A_33-nt)
E
E_0 LNA
E_0+4 LNA
E_-1+1+4 LNA
E_-1+0+4 LNA
E_-2+0+4 LNA

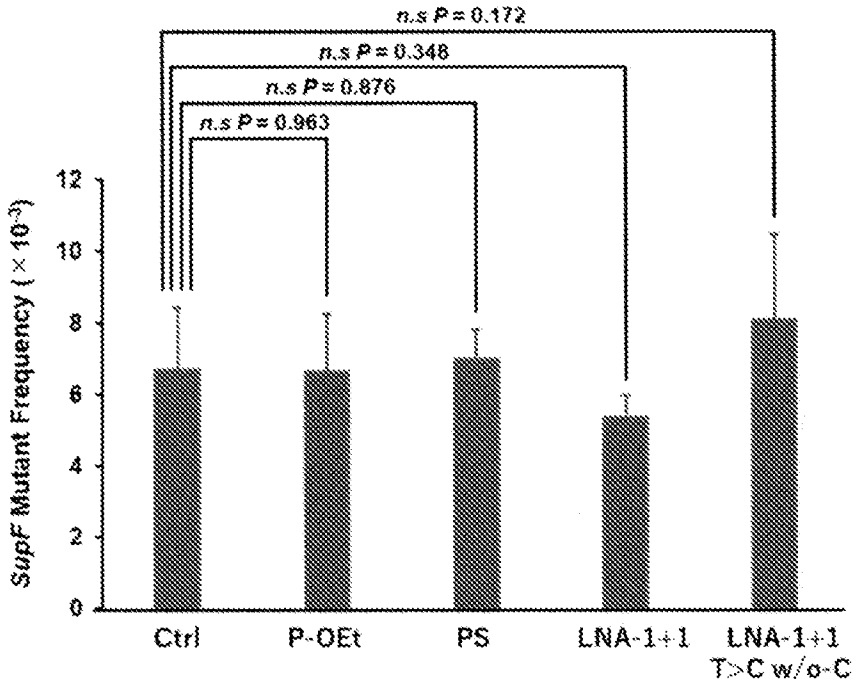
[図45]


A
copGFP
B
DMD
C
WRN
editing efficiency (%)
n-E
n-TD'(E+A)
n-TD'(E+A+A')
E
E_0+4 LNA
E_-4+0 LNA
E_-1+1 LNA
E_0 LNA
E_-2+2 LNA

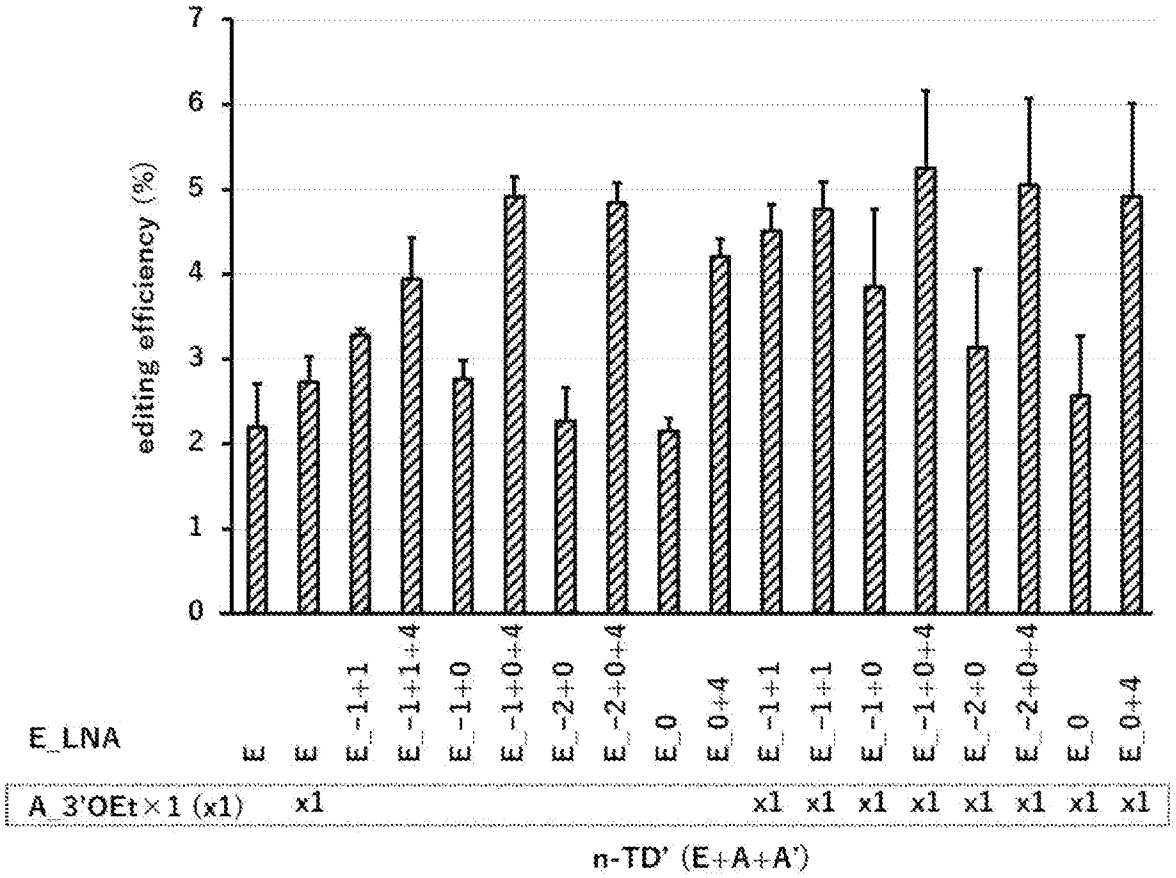
[図46]


90
95
100
105
5'-GAGCAGACTCTAAATCTGCCG-3'
1
162
5'
3'
3'
5'
N12-BC
supF
SV40 replication ori
N12-BC
supF
pBR327 ori
SV40 T antigen
pNGS2-K3
5466 bp
M13 IG
km'
supF: the amber suppressor tRNA supF gene
pBR327 ori: the pBR327 origin of replication
M13 IG: the M13 intergenic region
km': the kanamycin-resistance gene
SV40 T antigen: the TP53-/Rb-binding-deficient mutant SV40 large T antigen (E107K/D402E) gene
SV40 replication ori: the SV40 replication origin
N12-BC: the randomized 12-nucleotide barcode DNA sequence

[図47]


n.s P = 0.172
n.s P = 0.348
n.s P = 0.876
n.s P = 0.963
SupF Mutant Frequency (×10-3)
12
10
8
6
4
2
0
Ctrl
P-OEt
PS
LNA-1+1
LNA-1+1 T>C w/o-C

[図48]


editing efficiency (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
E_LNA
E
E
E_-1+1
E_-1+1+4
E_-1+0
E_-1+0+4
E_-2+0
E_-2+0+4
E_0
E_0+4
E_-1+1
E_-1+1
E_-1+0
E_-1+0+4
E_-2+0
E_-2+0+4
E_0
E_0+4
A_3'OEt×1 (x1)
x1
x1 x1 x1 x1 x1 x1 x1 x1
n-TD' (E+A+A')

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/041539

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/09(2006.01)i; ***A01K 67/0275***(2024.01)i; ***A61K 31/7125***(2006.01)i; ***A61K 48/00***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C12N 15/11***(2006.01)i
FI: C12N15/09 100; A01K67/0275; A61K48/00; A61K31/7125; A61P43/00 111; C12N15/11 Z ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09; A01K67/0275; A61K31/7125; A61K48/00; A61P43/00; C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2025
Registered utility model specifications of Japan 1996-2025
Published registered utility model applications of Japan 1994-2025

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Harris H. et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. NATURE. 13 August 2009, vol. 460, pp. 894-898, doi:10.1038/nature08187 particularly, summary, fig. 2, 4-5	17-22, 27, 37
Y	particularly, summary, fig. 2, 4-5	17-27, 34-37
A	particularly, summary, fig. 2, 4-5	1-16, 28-33, 38-52
X	LIVINGSTON, Paula et al. Oligonucleotide Delivery by Nucleofection Does Not Rescue the Reduced Proliferation Phenotype of Gene-Edited Cells. NUCLEIC ACID THERAPEUTICS. 2012, vol. 22, no. 6, pp. 405-413, DOI: 10.1089/nat.2012.0374 particularly, summary, fig. 1, reviews	17-22, 27, 34-37
Y	particularly, summary, fig. 1, reviews	17-27, 34-37
A	particularly, summary, fig. 1, reviews	1-16, 28-33, 38-52

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 January 2025	**10 February 2025**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-520495 A (KEYGENE N.V.) 28 May 2009 (2009-05-28) claims, drawings, examples	17-22, 27, 34-37
Y	claims, drawings, examples	17-27, 34-37
A	claims, drawings, examples	1-16, 28-33, 38-52
Y	KAWAI, Hidehiko et al. Gene correction by 5'-tailed duplexes with short editor oligodeoxyribonucleotides. Journal of Bioscience and Bioengineering. vol. 132, no. 6, pp. 552-559, https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.08.012 particularly, summary, drawings	17-27, 34-37
A	particularly, summary, drawings	1-16, 28-33, 38-52
Y	VAN RAVESTEYN, Thomas W. et al. LNA modification of single-stranded DNA oligonucleotides allows subtle gene modification in mismatch-repair-proficient cells. PNAS. 12 April 2016, vol. 113, no. 15, pp. 4122-4127, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1513315113 particularly, summary, drawings, reviews	17-27, 34-37
A	particularly, summary, drawings, reviews	1-16, 28-33, 38-52
A	WO 2023/190848 A1 (THE NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 05 October 2023 (2023-10-05) claims, examples, drawings	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/041539

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/041539

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2009-520495 A	28 May 2009	WO 2007/073149 A1 claims, drawings, examples	
WO 2023/190848 A1	05 October 2023	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/041539

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/09(2006.01)i; A01K 67/0275(2024.01)i; A61K 31/7125(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i
FI: C12N15/09 100; A01K67/0275; A61K48/00; A61K31/7125; A61P43/00 111; C12N15/11 Z ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/09; A01K67/0275; A61K31/7125; A61K48/00; A61P43/00; C12N15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WANG, Harris H. et al., Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution, NATURE, 2009.08.13, Vol.460, pp.894-898, doi:10.1038/nature08187 特に要旨，図2，4-5	17-22, 27, 37
Y	特に要旨，図2，4-5	17-27, 34-37
A	特に要旨，図2，4-5	1-16, 28-33, 38-52
X	LIVINGSTON, Paula et al., Oligonucleotide Delivery by Nucleofection Does Not Rescue the Reduced Proliferation Phenotype of Gene-Edited Cells, NUCLEIC ACID THERAPEUTICS, 2012, Vol.22, No.6, pp.405-413, DOI: 10.1089/nat.2012.0374 特に要旨，図1，考察	17-22, 27, 34-37
Y	特に要旨，図1，考察	17-27, 34-37
A	特に要旨，図1，考察	1-16, 28-33, 38-52

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
31.01.2025	10.02.2025

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

田ノ上　拓自 4B 6115

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2009-520495 A (キージーン ナムローゼ フェンノートシャップ) 28.05.2009 (2009-05-28) 特許請求の範囲, 図, 実施例	17-22, 27, 34-37
Y	特許請求の範囲, 図, 実施例	17-27, 34-37
A	特許請求の範囲, 図, 実施例	1-16, 28-33, 38-52
Y	KAWAI, Hidehiko et al., Gene correction by 5'-tailed duplexes with short editor oligodeoxyribonucleotides, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.132, No.6, pp.552-559, https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.08.012 特に要旨, 図	17-27, 34-37
A	特に要旨, 図	1-16, 28-33, 38-52
Y	VAN RAVESTEYN, Thomas W. et al., LNA modification of single-stranded DNA oligonucleotides allows subtle gene modification in mismatch-repair-proficient cells, PNAS, 2016.04.12, Vol.113, No.15, pp.4122-4127, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1513315113 特に要旨, 図, 考察	17-27, 34-37
A	特に要旨, 図, 考察	1-16, 28-33, 38-52
A	WO 2023/190848 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 05.10.2023 (2023-10-05) 特許請求の範囲, 実施例, 図	1-52

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/041539

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/041539

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2009-520495 A	28.05.2009	WO 2007/073149 A1 特許請求の範囲，図，実施例	
WO 2023/190848 A1	05.10.2023	（ファミリーなし）	