(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-505062
(P2020-505062A)
(43)公表日　令和2年2月20日(2020.2.20)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/09 | 100 | 4B050 |
| C12N 15/63 | (2006.01) | C12N | 15/63 | ZNAZ | 4B065 |
| C12N 15/52 | (2006.01) | C12N | 15/52 | | |
| C12N 15/55 | (2006.01) | C12N | 15/55 | | |
| C12N 15/62 | (2006.01) | C12N | 15/62 | | |

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 46 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-559249 (P2019-559249)
(86)(22)出願日　平成30年1月16日 (2018.1.16)
(85)翻訳文提出日　令和1年7月17日 (2019.7.17)
(86)国際出願番号　PCT/KR2018/000747
(87)国際公開番号　WO2018/135838
(87)国際公開日　平成30年7月26日 (2018.7.26)
(31)優先権主張番号　62/446,951
(32)優先日　平成29年1月17日 (2017.1.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

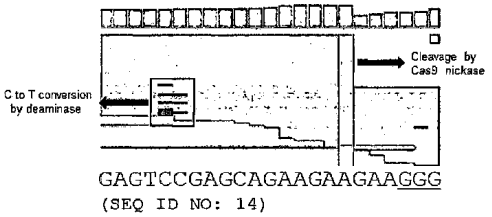
(71)出願人　516355542
インスティテュート　フォー　ベーシック　サイエンス
ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ　ＦＯＲ　ＢＡＳＩＣ　ＳＣＩＥＮＣＥ
大韓民国　３４１２６　テジョン，ユソン－ク，エクスポ－ロ，５５
(74)代理人　110002572
特許業務法人平木国際特許事務所
(72)発明者　キム，ジン－ス
大韓民国　０８８３１　ソウル，クワナク－グ，チョンニョン－ギル　７８，ナンバー１０３－７０２

Fターム(参考)　4B050 CC04 CC05 DD02 DD11 FF14E LL03

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡ一本鎖切断による塩基編集非標的位置確認方法

(57)【要約】
シチジンデアミナーゼ、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ、およびガイドＲＮＡを含む、ＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ　ｓｔｒａｎｄ　ｂｒｅａｋ）用組成物、これを用いたＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ　ｓｔｒａｎｄ　ｂｒｅａｋ）生成方法、塩基編集（ｂａｓｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ）が導入されたＤＮＡの核酸配列分析方法、および塩基編集位置、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）、および／または標的特異性を確認（または測定または検出）する方法が提供される。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）シチジンデアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子、およびガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；
（ｉｉ）前記一本鎖切断されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階；および
（ｉｉｉ）前記分析によって得られた核酸配列データから一本鎖切断位置を確認する段階
を含み、
前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは、ＤＮＡ二本鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を喪失したＣａｓ９タンパク質またはＣｐｆ１タンパク質である、
シチジンデアミナーゼの非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）確認方法。
【請求項２】
（ｉ）シチジンデアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子、およびガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；および
（ｉｉ）前記一本鎖切断が誘導されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階
を含み、
前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは、ＤＮＡ二本鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を喪失したＣａｓ９タンパク質またはＣｐｆ１タンパク質である、
シチジンデアミナーゼによって塩基編集（ｂａｓｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ）が導入されたＤＮＡの配列分析方法。
【請求項３】
（ｉ）シチジンデアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子、およびガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；
（ｉｉ）前記一本鎖切断が誘導されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階；および
（ｉｉｉ）前記分析によって得られた核酸配列データから一本鎖切断位置を確認する段階
を含み、
前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは、ＤＮＡ二本鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を喪失したＣａｓ９タンパク質またはＣｐｆ１タンパク質である、
シチジンデアミナーゼの塩基編集位置確認方法。
【請求項４】
前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９タンパク質の、
（１）Ｄ１０、Ｈ８４０、またはＤ１０およびＨ８４０；
（２）Ｄ１１３５、Ｒ１３３５、およびＴ１３３７からなる群より選択された一つ以上；
または
（３）前記（１）および（２）のアミノ酸残基の全て
が野生型タンパク質と異なるアミノ酸残基で置換されたものである、請求項１～３のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）およびトランス活性化型ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む二本鎖または一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項１～４のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記シチジンデアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ（アポリポタンパク質Ｂ　ｍＲＮＡ編集酵素、触媒性ポリペプチド様）、ＡＩＤ（活性化誘導シチジンデアミナーゼ）、ＣＤＡ（シ

チジンデアミナーゼ）、またはこれらの組み合わせである、請求項１～５のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記シチジンデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは、
融合タンパク質形態、
シチジンデアミナーゼまたはこれをコードするｍＲＮＡと、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはこれをコードするｍＲＮＡの混合物形態、または
シチジンデアミナーゼコード遺伝子と不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子をそれぞれまたは共に含むプラスミド形態
で使用される、請求項１～６のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｅｘｃｉｓｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を使用せず、
前記ウラシル－特異的除去試薬は、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（Ｕｒａｃｉｌ　ＤＮＡ　ｇｌｙｃｏｓｙｌａｓｅ；ＵＤＧ）、エンドヌクレアーゼＶＩＩＩ、またはこれらの組み合わせである、
請求項１～７のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で行われる、請求項１～８のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記細胞から分離されたＤＮＡは、ゲノムＤＮＡである、請求項１～９のうちのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
段階（ｉ）の細胞から分離されたＤＮＡは、ゲノムＤＮＡであり、
段階（ｉｉ）の核酸配列分析は、全体ゲノムシークエンシングによって行われる、請求項１～１０のうちのいずれか一項に記載の方法
【請求項１２】
前記段階（ｉｉｉ）以後に、
（ｉｖ）前記切断位置が標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）でない場合、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）と判断する段階を追加的に含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記段階（ｉｉｉ）は、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの数を確認する段階を含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記非標的位置は、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの数が２以上のものである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記非標的位置は、次のうちの一つ以上に該当するものである、請求項１４に記載の方法：
ＤＮＡ断片の中の切断が起こった鎖と相補的な鎖がＰＡＭ配列を含む；
ＤＮＡ断片の中の切断が起こった鎖と相補的な鎖が標的位置の配列と１５個以下の不一致ヌクレオチドを含む；および
ＤＮＡ断片の中の切断が起こった鎖と相補的な鎖が一つ以上のシトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換を含む。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
シチジンデアミナーゼ（ｄｅａｍｉｎａｓｅ）、不活性化された標的特異的エンドヌク

レアーゼ、およびガイドＲＮＡを含む、ＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋ）用組成物、これを用いたＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋ）生成方法、塩基編集（ｂａｓｅ ｅｄｉｔｉｎｇ）が導入されたＤＮＡの核酸配列分析方法、および塩基編集位置、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）、および／または標的特異性を確認（または測定または検出）する方法に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

ＤＮＡ結合モジュールとシチジンデアミナーゼ（ｃｙｔｉｄｉｎｅ ｄｅａｍｉｎａｓｅ）を含む塩基エディター（Ｂａｓｅ Ｅｄｉｔｏｒ；プログラム可能なデアミナーゼ（Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｄｅａｍｉｎａｓｅ））はＤＮＡ二本鎖切断（ＤＮＡ ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋｓ）を生成せず、ゲノムで標的化されたヌクレオチド置換または塩基編集を可能にする。標的部位に小さい挿入または欠失（ｉｎｄｅｌｓ）を誘導するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９およびＺＦＮ（ｚｉｎｃ－ｆｉｎｇｅｒ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ）のようなプログラム可能なヌクレアーゼ（ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ）とは異なり、プログラム可能な（ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ）デアミナーゼは、標的部位で数個のヌクレオチド内でＣをＴに（またはより少ない比率でＣをＧまたはＡに）変換させる。塩基エディターは人間の細胞、動物および植物に対する誘電疾患を誘発する点突然変異を修正するか、一塩基多型（ｓｉｎｇｌｅ－ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｓ；ＳＮＰ）を生成することができる。

【０００３】

塩基エディターは、以下の４種類が報告されている：

１）ストレプトコッカスピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に由来する触媒的に欠乏したＣａｓ９（ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ Ｃａｓ９；ｄＣａｓ９）またはＤ１０Ａ Ｃａｓ９ニッカーゼ（ｎＣａｓ９）と、ラットのシチジンデアミナーゼであるｒＡＰＯＢＥＣ１を含む塩基エディター（Ｂａｓｅ Ｅｄｉｔｏｒｓ；ＢＥｓ）；２）ｄＣａｓ９またはｎＣａｓ９と、ウミヤツメウナギ（ｓｅａ ｌａｍｐｒｅｙ）の活性化誘導シチジンデアミナーゼ（活性化誘導シチジンデアミナーゼ；ＡＩＤ）オーソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）であるＰｍＣＤＡ１またはヒトＡＩＤを含むＴａｒｇｅｔ－ＡＩＤ；３）ＭＳ２－結合タンパク質に融合された過活性化されたＡＩＤ変異体を募集するためにＭＳ２ ＲＮＡヘアピンに連結されたｓｇＲＮＡｓとｄＣａｓ９を含むＣＲＩＳＰＲ－Ｘ；および４）ジンク－フィンガータンパク質またはＴＡＬエフェクター（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ－ｌｉｋｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒｓ；ＴＡＬＥｓ）がシチジンデアミナーゼに融合されたもの。

【０００４】

塩基エディターによる塩基編集（ｂａｓｅ ｅｄｉｔｉｎｇ）に対する広範囲な関心にもかかわらず、プログラム可能な（ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ）デアミナーゼのゲノム全体に対する標的特異性を分析することができる手段が開発されたことがない。したがって、塩基エディターのゲノム全体に対する標的特異性を分析して、塩基エディターの塩基編集効率、非標的サイト（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）、非標的効果（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｅｆｆｅｃｔ）などを分析することができる手段の開発が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本明細書では、塩基エディターのゲノム全体に対する標的特異性を分析することができる手段、およびこれを通じて塩基エディターの非標的サイト、非標的効果などを分析することができる手段が提供される。

【０００６】

一例は、（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコー

ドする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を含む、ＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋｓ）用組成物を提供する。前記組成物は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を含まないものであってもよい。

【０００７】

他の例は、（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させる段階を含む、ＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋ）方法を提供する。前記方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を処理する段階を含まないものであってもよい。

【０００８】

他の例は、

（ｉ）（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；および

（ｉｉ）前記一本鎖切断されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階

を含む、前記デアミナーゼによって塩基編集（ｂａｓｅ ｅｄｉｔｉｎｇ）が導入されたＤＮＡの核酸配列分析方法を提供する。前記方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を処理する段階を含まないものであってもよい。

【０００９】

他の例は、

（ｉ）（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；

（ｉｉ）前記切断されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階；および

（ｉｉｉ）前記分析によって得られた核酸配列データから一本鎖切断位置を確認する段階

を含む、デアミナーゼの塩基編集または一本鎖切断位置、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）、および／または標的特異性を確認（または測定または検出）する方法を提供する。前記方法は、例えば、前記段階（ｉｉ）以後および段階（ｉｉｉ）以前、同時または以後に、（ｉｉｉ－１）前記分析によって得られた核酸配列データ（ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｒｅａｄ）から塩基編集（例えば、シトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換）の有無を確認する段階を追加的に含むことができる。前記方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を処理してＤＮＡに二本鎖切断を生成する段階を含まないものであってもよい。一例で、前記方法（例えば、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）確認方法）は、前記段階（ｉｉｉ）以後に、（ｉｖ）前記切断位置が標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）でない場合、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）と確認（判断）する段階を追加的に含むことができる。

【課題を解決するための手段】

【００１０】
本明細書では、Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑを修正してヒトゲノムでＣａｓ９ニッカーゼ（ｎｉｃｋａｓｅ）とデアミナーゼ（ｄｅａｍｉｎａｓｅ）から構成された塩基エディター（例えば、Ｂａｓｅ　Ｅｄｉｔｏｒ３；ＢＥ３）の特異性を評価した。ゲノムＤＮＡをＢＥ３およびガイドＲＮＡで試験管内で処理してＤＮＡ二本鎖の中の一本鎖に切断が生成されることを確認した。本明細書で提供されるデアミナーゼを用いたＤＮＡ一本鎖切断方法およびこれを用いた核酸配列分析方法によって、ＢＥ３非標的サイトを全体ゲノムシークエンシングデータを使用して計算的に確認することができる。
【００１１】
まず、ＤＮＡに二本鎖切断を誘発しないデアミナーゼを用いてＤＮＡに二本鎖切断を生成する技術が提供される。
【００１２】
一例は、（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を含む、ＤＮＡ一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ　ｓｔｒａｎｄ　ｂｒｅａｋｓ）用組成物を提供する。前記組成物は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｅｘｃｉｓｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を含まないものであってもよい。
【００１３】
本明細書に使用されたコード遺伝子は、ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡまたはこれを含む組換えベクター、またはｍＲＮＡ形態で使用できる。
【００１４】
前記デアミナーゼは、シチジンデアミナーゼであってもよい。シチジンデアミナーゼは、ヌクレオチドに存在する塩基であるシトシン（例えば、二本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡに存在するシトシン）をウラシルに変換（Ｃ－ｔｏ－Ｕ　ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ　ｏｒ　Ｃ－ｔｏ－Ｕ　ｅｄｉｔｉｎｇ）させる活性を有する全ての酵素を意味するものであって、標的部位の配列（標的配列）のＰＡＭ配列が存在する鎖に位置するシトシンをウラシルに変換させる。一例で、前記シチジンデアミナーゼは、人間、猿などの霊長類、ラット、マウスなどのげっ歯類などのような哺乳類に由来したものであってもよいが、これに制限されるわけではない。例えば、前記シチジンデアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ（“アポリポタンパク質Ｂ　ｍＲＮＡ編集酵素、触媒性ポリペプチド様”）ファミリーに属する酵素、ＡＩＤ（活性化誘導シチジンデアミナーゼ）、ＣＤＡ（シチジンデアミナーゼ；例えば、ＣＤＡ１）などからなる群より選択された１種以上であってもよく、例えば、次のものからなる群より１種以上選択されてもよいが、これに制限されるわけではない：
【００１５】
ＡＰＯＢＥＣ１：人間（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）ＡＰＯＢＥＣ１（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１２９１４９５．１、ＮＰ＿００１６３５．２、ＮＰ＿００５８８０．２など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏｓ．ＮＭ＿００１３０４５６６．１、ＮＭ＿００１６４４．４、ＮＭ＿００５８８９．３など）、マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）ＡＰＯＢＥＣ１（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１１２７８６３．１、ＮＰ＿１１２４３６．１など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏｓ．ＮＭ＿００１１３４３９１．１、ＮＭ＿０３１１５９．３など）；
【００１６】
ＡＰＯＢＥＣ２：人間ＡＰＯＢＥＣ２（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＰ＿００６７８０．１など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿００６７８９．３など）、マウスＡＰＯＢＥＣ２（タンパク質：Ｇｅｎ

Ｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ＿０３３８２４．１など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿００９６９４．３など）；

【００１７】

ＡＰＯＢＥＣ３Ｂ：人間ＡＰＯＢＥＣ３Ｂ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１２５７３４０．１、ＮＰ＿００４８９１．４など；遺伝子（ｍＲＮＡ ｏｒ ｃＤＮＡ、以下、同一）（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＭ＿００１２７０４１１．１、ＮＭ＿００４９００．４など）、マウス（Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ）ＡＰＯＢＥＣ３Ｂ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１１５３８８７．１、ＮＰ＿００１３３３９７０．１、ＮＰ＿０８４５３１．１など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＭ＿００１１６０４１５．１、ＮＭ＿００１３４７０４１．１、ＮＭ＿０３０２５５．３など）；

【００１８】

ＡＰＯＢＥＣ３Ｃ：人間ＡＰＯＢＥＣ３Ｃ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ＿０５５３２３．２など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿０１４５０８．２など）；

【００１９】

ＡＰＯＢＥＣ３Ｄ（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ ＡＰＯＢＥＣ３Ｅ）：人間ＡＰＯＢＥＣ３Ｄ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ＿６８９６３９．２など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿１５２４２６．３など）；

【００２０】

ＡＰＯＢＥＣ３Ｆ：人間ＡＰＯＢＥＣ３Ｆ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿６６０３４１．２、ＮＰ＿００１００６６６７．１など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＮＭ＿１４５２９８．５、ＮＭ＿００１００６６６６．１など）；

【００２１】

ＡＰＯＢＥＣ３Ｇ：人間ＡＰＯＢＥＣ３Ｇ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿０６８５９４．１、ＮＰ＿００１３３６３６５．１、ＮＰ＿００１３３６３６６．１、ＮＰ＿００１３３６３６７．１など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＮＭ＿０２１８２２．３、ＮＭ＿００１３４９４３６．１、ＮＭ＿００１３４９４３７．１、ＮＭ＿００１３４９４３８．１など）；

【００２２】

ＡＰＯＢＥＣ３Ｈ：人間ＡＰＯＢＥＣ３Ｈ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１１５９４７４．２、ＮＰ＿００１１５９４７５．２、ＮＰ＿００１１５９４７６．２、ＮＰ＿８６１４３８．３など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＮＭ＿００１１６６００２．２、ＮＭ＿００１１６６００３．２、ＮＭ＿００１１６６００４．２、ＮＭ＿１８１７７３．４など）；

【００２３】

ＡＰＯＢＥＣ４（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ ＡＰＯＢＥＣ３Ｅ）：人間ＡＰＯＢＥＣ４（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ＿９８２２７９．１など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿２０３４５４．２など）；マウスＡＰＯＢＥＣ４（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ＿００１０７４６６６．１など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿００１０８１１９７．１など）；

【００２４】

活性化誘導シチジンデアミナーゼ（活性化誘導シチジンデアミナーゼ；ＡＩＣＤＡまた

はＡＩＤ）：人間ＡＩＤ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１３１７２７２．１、ＮＰ＿０６５７１２．１など；遺伝子（前に記載されたタンパク質順にこれをコードする遺伝子を記載する）：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＭ＿００１３３０３４３．１、ＮＭ＿０２０６６１．３など）；マウスＡＩＤ（タンパク質：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ＿０３３７７５．１など；遺伝子：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿００９６４５．２など）；および

【００２５】

ＣＤＡ（シチジンデアミナーゼ；ＥＣ ｎｕｍｂｅｒ ３．５．４．５；例えば、ＣＤＡ１）：ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１７７６．１（遺伝子：ＮＭ＿００１７８５．２）、ＣＡＡ０６４６０．１（遺伝子：ＡＪ００５２６１．１）、ＮＰ＿４１６６４８．１（遺伝子：ＮＣ＿０００９１３．３）など。

【００２６】

本明細書に使用されたものとして、標的特異的ヌクレアーゼは、遺伝子ハサミ（ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｎｕｃｌｅａｓｅ）とも呼ばれ、目的とするゲノムＤＮＡ上の特定位置を認識して切断することができる全ての形態のエンドヌクレアーゼをひっくるめて称する。

【００２７】

例えば、前記標的特異的ヌクレアーゼは、標的遺伝子の特定配列を認識しヌクレオチド切断活性を有して標的遺伝子でインデル（ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ ａｎｄ／ｏｒ ｄｅｌｅｔｉｏｎ、Ｉｎｄｅｌ）を引き起こすことができる全てのヌクレアーゼから選択された１種以上であってもよい。

【００２８】

例えば、前記標的特異的ヌクレアーゼは、微生物免疫系であるＣＲＩＳＰＲに由来したＲＧＥＮ（ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｎｕｃｌｅａｓｅ；例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、など）などからなる群より選択された１種以上であってもよいが、これに制限されるわけではない。

【００２９】

一具体例で、前記標的特異的ヌクレアーゼは、Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９タンパク質（ＣＲＩＳＰＲ（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ） ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ９））、Ｃｐｆ１タンパク質（ＣＲＩＳＰＲ ｆｒｏｍ Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｎｄ Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ １）などのようなタイプＩＩおよび／またはタイプＶのＣＲＩＳＰＲシステムに伴うエンドヌクレアーゼからなる群より選択された１種以上であってもよい。この場合、前記標的特異的ヌクレアーゼは、ゲノムＤＮＡの標的部位に案内するための標的ＤＮＡ特異的ガイドＲＮＡを追加的に含んでもよい。前記ガイドＲＮＡは生体外（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）で転写された（ｔｒａｎｓｃｒｉｂｅｄ）ものであってもよく、例えばオリゴヌクレオチド二本鎖またはプラスミド鋳型から転写されたものであってもよいが、これに制限されない。前記標的特異的ヌクレアーゼおよびガイドＲＮＡはリボ核タンパク質（ＲＮＰ）形態で使用でき、前記リボ核タンパク質は標的特異的ヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子およびＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子が混合物または互いに結合された複合体形態で含まれたものであってもよい。

【００３０】

Ｃａｓ９タンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの主要タンパク質構成要素であって、活性化されたエンドヌクレアーゼまたはニッカーゼ（ｎｉｃｋａｓｅ）を形成することができるタンパク質である。

【００３１】

Ｃａｓ９タンパク質または遺伝子情報は、ＮＣＢＩ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）のＧｅｎＢａｎｋのような公知のデータベースから得ることができる。例えば、前記Ｃａｓ９タンパク質は、

ストレプトコッカスｓｐ．（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）、例えば、ストレプトコッカスピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ｎｕｍｂｅｒ　Ｑ９９ＺＷ２（ＮＰ＿２６９２１５．１）（コード遺伝子：配列番号４）；
カンピロバクター属、例えば、カンピロバクタージェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）由来のＣａｓ９タンパク質；
ストレプトコッカス属、例えば、ストレプトコッカスサーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｅｓ）またはストレプトコッカスアウレウス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｕｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）由来のＣａｓ９タンパク質；
ナイセリアメニンギチジス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）由来のＣａｓ９タンパク質；
パスツレラ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）属、例えば、パスツレラムルトシダ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ　ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）由来のＣａｓ９タンパク質；
フランシセラ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）属、例えば、フランシセラノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ）由来の例えばＣａｓ９タンパク質
などからなる群より選択された一つ以上であってもよいが、これに制限されるわけではない。

【００３２】

Ｃｐｆ１タンパク質は前記ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとは区別される新たなＣＲＩＳＰＲシステムのエンドヌクレアーゼであって、Ｃａｓ９に比べて相対的に大きさが小さくｔｒａｃｒＲＮＡが必要なく、単一ガイドＲＮＡによって作用できる。また、チミン（ｔｈｙｍｉｎｅ）が豊富なＰＡＭ（ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ－ａｄｊａｃｅｎｔ　ｍｏｔｉｆ）配列を認識しＤＮＡの二本鎖を切断して付着末端（ｃｏｈｅｓｉｖｅ　ｅｎｄ；ｃｏｈｅｓｉｖｅ　ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ　ｂｒｅａｋ）を生成する。

【００３３】

例えば、前記Ｃｐｆ１タンパク質はカンジダツス（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ）属、ラクノスピラ（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａ）属、ブチリビブリオ（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ）属、ペレグリニバクテリア（Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ）、アシドミノコッカス（Ａｃｉｄｏｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、ポルフィロモナス（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ）属、プレボテラ（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）属、フランシセラ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）属、カンジダツスメタノプラズマ（Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ）、またはユバクテリウム（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属由来のものであってもよく、例えば、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ（ＧＷＣ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ（ＭＣ２０１７）、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｉｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ（ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ＿３３＿１０）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．（ＢＶ３Ｌ６）、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｍａｃａｃａｅ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ（ＮＤ２００６）、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｄｉｓｉｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ　ｂｏｖｏｃｕｌｉ（２３７）、Ｓｍｉｉｈｅｌｌａ　ｓｐ．（ＳＣ＿ＫＯ８Ｄ１７）、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ　ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ（ＭＡ２０２０）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ（Ｕ１１２）、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ　ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｐａｃｅｉｂａｃｔｅｒ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｅｌｉｇｅｎｓなどの微生物由来のものであってもよいが、これに制限されるわけではない。

【００３４】

前記標的特異的エンドヌクレアーゼは、微生物から分離されたものまたは組換え的方法または合成的方法などのように人為的または非自然的生産されたもの（ｎｏｎ－ｎａｔｕｒａｌｌｙ　ｏｃｃｕｒｒｉｎｇ）であってもよい。一例で、前記標的特異的エンドヌク

レアーゼ（例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、など）は、組換えＤＮＡによって作られた組換えタンパク質であってもよい。組換えＤＮＡ（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ；ｒＤＮＡ）は多様な有機体から得られた異種または同種遺伝物質を含むために分子クローニングのような遺伝子組換え方法によって人工的に作られたＤＮＡ分子を意味する。例えば、組換えＤＮＡを適切な有機体で発現させて標的特異的エンドヌクレアーゼを生産（ｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏ）する場合、組換えＤＮＡは、製造しようとするタンパク質をコードするコドンのうちから前記有機体に発現するに最適化されたコドンを選択して再構成されたヌクレオチド配列を有するものであり得る。

【００３５】

前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼはＤＮＡ二本鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を喪失した標的特異的エンドヌクレアーゼを意味するものであって、例えば、エンドヌクレアーゼ活性を喪失しニッカーゼ活性を有する不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼ活性とニッカーゼ活性を全て喪失した不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼのうちから選択された１種以上であってもよい。一例で、前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼがニッカーゼ活性を有するものであってもよく、この場合、前記シトシンがウラシルに変換されると同時または順序と関係なく順次に、シトシンがウラシルに変換された鎖またはその反対鎖（例えば、反対鎖）で切断（ｎｉｃｋ）が導入される（例えば、ＰＡＭ配列が存在する鎖の反対鎖にＰＡＭ配列の５’末端方向に３番目のヌクレオチドと４番目のヌクレオチドの間に該当する位置に切断（ｎｉｃｋ）が導入される）。このような標的特異的エンドヌクレアーゼの変形（突然変異）は少なくとも触媒活性を有するアスパラギン酸残基（ｃａｔａｌｙｔｉｃ ａｓｐａｒｔａｔｅ ｒｅｓｉｄｕｅ；例えば、ストレプトコッカスピオゲネス由来Ｃａｓ９タンパク質の場合、１０番目位置のアスパラギン酸（Ｄ１０）、７６２番目位置のグルタミン酸（Ｅ７６２）、８４０番目位置のヒスチジン（Ｈ８４０）、８５４番目位置のアスパラギン（Ｎ８５４）、８６３番目位置のアスパラギン（Ｎ８６３）、９８６番目位置のアスパラギン酸（Ｄ９８６）などからなる群より選択された一つ以上）が任意の他のアミノ酸で置換されたＣａｓ９の突然変異を含むものであってもよく、前記他のアミノ酸はアラニン（ａｌａｎｉｎｅ）であってもよいが、これに制限されない。

【００３６】

本明細書に使用されたものとして、前記‘他のアミノ酸’は、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、バリン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、ライシン、前記アミノ酸の公知された全ての変形体のうち、野生型タンパク質が元来変異位置に有するアミノ酸を除いたアミノ酸のうちから選択されたアミノ酸を意味する。

【００３７】

一例で、前記不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼが変形Ｃａｓ９タンパク質である場合、変形Ｃａｓ９タンパク質は、ストレプトコッカスピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ Ｑ９９ＺＷ２（ＮＰ＿２６９２１５．１））にＤ１０またはＨ８４０位置での突然変異（例えば、他のアミノ酸での置換）が導入されてエンドヌクレアーゼ活性が喪失されニッカーゼ活性を有する変形Ｃａｓ９、ストレプトコッカスピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９タンパク質にＤ１０およびＨ８４０位置の両方共に突然変異（例えば、他のアミノ酸での置換）が導入されてエンドヌクレアーゼ活性およびニッカーゼ活性を全て喪失した変形Ｃａｓ９タンパク質などからなる群より選択された１種以上であってもよい。例えば、前記ＣＡｓ９タンパク質のＤ１０位置での突然変異は、Ｄ１０Ａ突然変異（Ｃａｓ９タンパク質のアミノ酸のうちの１０番目のアミノ酸であるＤがＡで置換された突然変異を意味する；以下、Ｃａｓ９に導入された突然変異は同様な方法で表記される）であってもよく、前記Ｈ８４０位置での突然変異はＨ８４０Ａ突然変異であってもよい。一具体例で、前記

不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは、ストレプトコッカスピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９タンパク質（配列番号４）のＤ１０がＡで置換されたＤ１０Ａ突然変異を有するニッカーゼ（例えば、配列番号１１によってコーディングされる）であってもよい。

【００３８】

前記シチジンデアミナーゼと不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは直接またはペプチドリンカーを通じて互いに融合された融合タンパク質（例えば、Ｎ－末端からＣ－末端方向にシチジンデアミナーゼ－不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼの順に位置するか（即ち、シチジンデアミナーゼのＣ－末端に不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼが融合される）、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ－シチジンデアミナーゼの順に配置（即ち、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼのＣ－末端にシチジンデアミナーゼが融合される）されてもよい）形態で使用される（または前記組成物に含まれる）か、精製されたシチジンデアミナーゼまたはこれをコードするｍＲＮＡと不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはこれをコードするｍＲＮＡの混合物形態で使用される（または前記組成物に含まれる）か、シチジンデアミナーゼコード遺伝子と不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子が全て含まれた（例えば、前記二つの遺伝子は前述の融合タンパク質をコードするように含まれる）一つのプラスミド形態で使用される（または前記組成物に含まれる）か、シチジンデアミナーゼコード遺伝子と不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子がそれぞれ別個のプラスミドに含まれたシチジンデアミナーゼ発現プラスミドと不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ発現プラスミドの混合物形態で使用され（または前記組成物に含まれ）てもよい。一具体例ではＮ－末端からＣ－末端方向に、シチジンデアミナーゼ－不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼの順に位置する融合タンパク質、または不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ－シチジンデアミナーゼの順に位置する融合タンパク質、または前記融合タンパク質をコードするようにシチジンデアミナーゼコード遺伝子と不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子が一つのプラスミドに含まれた形態で使用されてもよい。

【００３９】

前記プラスミドは、前記シチジンデアミナーゼコード遺伝子および／または不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子を挿入し、これを宿主細胞内で発現させることができる発現システムを含む全てのプラスミドであり得る。前記プラスミドは目的遺伝子発現のための要素（ｅｌｅｍｅｎｔｓ）を含むものであって、複製原点（ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ｏｒｉｇｉｎ）、プロモーター、作動遺伝子（ｏｐｅｒａｔｏｒ）、転写終結配列（ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ）などを含むことができ、宿主細胞のゲノム内への導入のための適切な酵素部位（例えば、制限酵素部位）および／または任意に宿主細胞内への成功的な導入を確認するための選別マーカおよび／またはタンパク質への翻訳のためのリボソーム結合部位（ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｓｉｔｅ；ＲＢＳ）および／または転写調節因子などを追加的に含むことができる。前記プラスミドは当業界で使用されるプラスミド、例えば、ｐｃＤＮＡシリーズ、ｐＳＣ１０１、ｐＧＶ１１０６、ｐＡＣＹＣ１７７、ＣｏｌＥ１、ｐＫＴ２３０、ｐＭＥ２９０、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ８／９、ｐＵＣ６、ｐＢＤ９、ｐＨＣ７９、ｐＩＪ６１、ｐＬＡＦＲ１、ｐＨＶ１４、ｐＧＥＸシリーズ、ｐＥＴシリーズ、ｐＵＣ１９などからなる群より選択された１種以上であってもよいが、これに制限されるわけではない。前記宿主細胞は、前記シチジンデアミナーゼによって塩基編集または二本鎖切断を導入しようとする細胞（例えば、ヒト細胞などのような哺乳類細胞を含む真核細胞）または前記シチジンデアミナーゼコード遺伝子および／または不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子を発現してシチジンデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼを発現することができる全ての細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉなど）のうちから選択され得る。

【００４０】

前記ガイドＲＮＡは、前記シチジンデアミナーゼと不活性化された標的特異的エンドヌ

クレアーゼの混合物または融合タンパク質を標的部位に案内する役割を果たすものであって、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、トランス活性化型ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、および単一ガイドＲＮＡ（ｓｉｎｇｌｅ　ｇｕｉｄｅ　ＲＮＡ；ｓｇＲＮＡ）からなる群より選択された１種以上であってもよく、具体的にｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡが互いに結合された二本鎖ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体、またはｃｒＲＮＡまたはその一部とｔｒａｃｒＲＮＡまたはその一部がオリゴヌクレオチドリンカーで連結された一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であってもよい。

【００４１】

前記ガイドＲＮＡの具体的配列は使用された標的特異的エンドヌクレアーゼの種類またはその由来微生物などによって適切に選択することができ、これはこの発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が容易に分かる事項である。

【００４２】

標的特異的エンドヌクレアーゼとしてストレプトコッカスピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９タンパク質を使用する場合、ｃｒＲＮＡは下記の一般式１で表され得る：

５’－（$N_{cas9}$）$_{l}$－（ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ）－（$X_{cas9}$）$_{m}$－３’（一般式１）

【００４３】

上記一般式１中、

$N_{cas9}$は標的化配列、即ち、標的遺伝子（ｔａｒｇｅｔ　ｇｅｎｅ）の標的部位（ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）の配列によって決定される部位（即ち、標的部位の配列と混成化可能な配列である）であり、ｌは前記標的化配列に含まれているヌクレオチド数を示すものであって、１７～２３または１８～２２の整数、例えば、２０であってもよく；

前記標的配列の３’方向に隣接して位置する連続する１２個のヌクレオチド（ＧＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ；配列番号１）を含む部位はｃｒＲＮＡの必須的部分であり、

$X_{cas9}$はｃｒＲＮＡの３’末端側に位置する（即ち、前記ｃｒＲＮＡの必須的部分の３’方向に隣接して位置する）ｍ個のヌクレオチドを含む部位であって、ｍは８～１２の整数、例えば、１１であってもよく、前記ｍ個のヌクレオチドは互いに同じであるか異なってもよく、それぞれ独立してＡ、Ｕ、ＣおよびＧからなる群より選択され得る。

【００４４】

一例で、前記$X_{cas9}$はＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号２）を含むことができるが、これに制限されない。

【００４５】

また、前記ｔｒａｃｒＲＮＡは下記の一般式２で表され得る：

５’－（$Y_{cas9}$）$_{p}$－（ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ）－３’（一般式２）

【００４６】

上記一般式２中、

６０個のヌクレオチド（ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ；配列番号３）で表された部位はｔｒａｃｒＲＮＡの必須的部分であり、

$Y_{cas9}$は前記ｔｒａｃｒＲＮＡの必須的部分の５’末端に隣接して位置するｐ個のヌクレオチドを含む部位であって、ｐは６～２０の整数、例えば８～１９の整数であってもよく、前記ｐ個のヌクレオチドは互いに同じであるかまたは異なってもよく、Ａ、Ｕ、ＣおよびＧからなる群よりそれぞれ独立して選択され得る。

【００４７】

また、ｓｇＲＮＡは前記ｃｒＲＮＡの標的化配列と必須的部位を含むｃｒＲＮＡ部分と前記ｔｒａｃｒＲＮＡの必須的部分（６０個ヌクレオチド）を含むｔｒａｃｒＲＮＡ部分がオリゴヌクレオチドリンカーを通じてヘアピン構造（ｓｔｅｍ－ｌｏｏｐ構造）を形成

するものであってもよい（この時、オリゴヌクレオチドリンカーがループ構造に該当する）。より具体的に、前記ｓｇＲＮＡはｃｒＲＮＡの標的化配列と必須的部分を含むｃｒＲＮＡ部分とｔｒａｃｒＲＮＡの必須的部分を含むｔｒａｃｒＲＮＡ部分が互いに結合された二本鎖ＲＮＡ分子で、ｃｒＲＮＡ部位の３’末端とｔｒａｃｒＲＮＡ部位の５’末端がオリゴヌクレオチドリンカーを通じて連結されたヘアピン構造を有するものであってもよい。

【００４８】

一例で、ｓｇＲＮＡは、下記の一般式３で表され得る：

５’－（Ｎ$_{cas9}$）$_{l}$－（ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ）－（オリゴヌクレオチドリンカー）－（ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ）－３’（一般式３）

【００４９】

上記一般式３中、（Ｎ$_{cas9}$）$_{l}$は標的化配列であって、前記一般式１で説明したとおりである。

【００５０】

前記ｓｇＲＮＡに含まれるオリゴヌクレオチドリンカーは３～５個、例えば４個のヌクレオチドを含むものであってもよく、前記ヌクレオチドは互いに同じであるかまたは異なってもよく、Ａ、Ｕ、ＣおよびＧからなる群よりそれぞれ独立して選択され得る。

【００５１】

前記ｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡは、５’末端（即ち、ｃｒＲＮＡのターゲティング配列部位の５’末端）に１～３個のグアニン（Ｇ）を追加的に含んでもよい。

【００５２】

前記ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡの必須的部分（６０ｎｔ）の３’末端に５個～７個のウラシル（Ｕ）を含む終結部位を追加的に含んでもよい。

【００５３】

前記ガイドＲＮＡの標的配列は、標的ＤＮＡ上のＰＡＭ（Ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ Ａｄｊａｃｅｎｔ Ｍｏｔｉｆ配列（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９の場合、５’－ＮＧＧ－３’（ＮはＡ、Ｔ、Ｇ、またはＣである））の５’に隣接して位置する約１７個～約２３個または約１８個～約２２個、例えば２０個の連続する核酸配列であってもよい。

【００５４】

前記ガイドＲＮＡの標的配列と混成化可能なガイドＲＮＡの標的化配列は前記標的配列が位置するＤＮＡ鎖（即ち、ＰＡＭ配列（５’－ＮＧＧ－３’（ＮはＡ、Ｔ、Ｇ、またはＣである）が位置するＤＮＡ鎖）の相補的な鎖のヌクレオチド配列と５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、９５％以上、９９％以上、または１００％の配列相補性を有するヌクレオチド配列を意味するものであって、前記相補的な鎖のヌクレオチド配列と相補的結合が可能である。

【００５５】

本明細書で、標的部位の核酸配列は、標的遺伝子の該当遺伝子部位の二つのＤＮＡ鎖のうちのＰＡＭ配列が位置する鎖の核酸配列で表示される。この時、実際にガイドＲＮＡが結合するＤＮＡ鎖はＰＡＭ配列が位置する鎖の相補鎖であるので、前記ガイドＲＮＡに含まれている標的化配列は、ＲＮＡ特性上ＴをＵに変更することを除いて、標的部位の配列と同一な核酸配列を有するようになる。したがって、本明細書で、ガイドＲＮＡの標的化配列と標的部位の配列（または切断部位の配列）は、ＴとＵが相互変更されることを除いて同一な核酸配列で表示される。

【００５６】

前記ガイドＲＮＡは、ＲＮＡ形態で使用される（または前記組成物に含まれる）か、これをコードするＤＮＡを含むプラスミド形態で使用され（または前記組成物に含まれ）てもよい。

【００５７】

本明細書に記載された組成物および方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ

－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を含む、または使用しないことを特徴とするものであってもよい。前記ウラシル－特異的除去試薬は、前記シチジンデアミナーゼによってシトシンから変換されたウラシルを除去し、および／または前記ウラシルが除去された位置にＤＮＡ切断を導入する役割を果たす全ての物質を含むことができる。

【００５８】

一例で、前記ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）は、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（Ｕｒａｃｉｌ ＤＮＡ ｇｌｙｃｏｓｙｌａｓｅ；ＵＤＧ）、エンドヌクレアーゼＶＩＩＩ、およびこれらの組み合わせを含む。一例で、前記ウラシル－特異的除去試薬は、エンドヌクレアーゼＶＩＩＩまたはウラシルＤＮＡグリコシラーゼとエンドヌクレアーゼＶＩＩＩの組み合わせを含むものであってもよい。

【００５９】

ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（Ｕｒａｃｉｌ ＤＮＡ ｇｌｙｃｏｓｙｌａｓｅ；ＵＤＧ）はＤＮＡに存在するウラシル（Ｕ）を除去してＤＮＡの突然変異誘発（ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）を防止する作用を果たす酵素であって、ウラシルのＮ－グリコシル結合（Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｙｌｉｃ ｂｏｎｄ）を切断することによって塩基除去修復経路（ｂａｓｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ ｒｅｐａｉｒ（ＢＥＲ） ｐａｔｈｗａｙ）を開始するようにする役割を果たす全ての酵素のうちから１種以上選択され得る。例えば、前記ウラシルＤＮＡグリコシラーゼは、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＡＤＸ４９７８８．１、ＡＣＴ２８１６６．１、ＥＦＮ３６８６５．１、ＢＡＡ１０９２３．１、ＡＣＡ７６７６４．１、ＡＣＸ３８７６２．１、ＥＦＵ５９７６８．１、ＥＦＵ５３８８５．１、ＥＦＪ５７２８１．１、ＥＦＵ４７３９８．１、ＥＦＫ７１４１２．１、ＥＦＪ９２３７６．１、ＥＦＪ７９９３６．１、ＥＦＯ５９０８４．１、ＥＦＫ４７５６２．１、ＫＸＨ０１７２８．１、ＥＳＥ２５９７９．１、ＥＳＤ９９４８９．１、ＥＳＤ７３８８２．１、ＥＳＤ６９３４１．１など）、ヒトウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００３３５３．１、ＮＰ＿５５０４３３．１など）、マウスウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＮＰ＿００１０３５７８１．１、ＮＰ＿０３５８０７．２など）などからなる群より選択された１種以上であってもよいが、これに制限されるわけではない。

【００６０】

前記エンドヌクレアーゼＶＩＩＩは前記ウラシルが除去されたヌクレオチドを除去する役割を果たすものであって、前記ウラシルＤＮＡグリコシラーゼによって損傷されたウラシルを二本鎖ＤＮＡから除去するＮ－グリコシラーゼ（Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｙｌａｓｅ）活性と前記損傷されたウラシル除去から発生した脱プリン部位（ａｐｕｒｉｎｉｃ ｓｉｔｅ；ＡＰ ｓｉｔｅ）の３’および５’末端を切断するＡＰ－リアーゼ（ＡＰ－ｌｙａｓｅ）活性を全て有する全ての酵素のうちから１種以上選択され得る。例えば、前記エンドヌクレアーゼＶＩＩＩは、ヒトエンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＢＡＣ０６４７６．１、ＮＰ＿００１３３９４４９．１、ＮＰ＿００１２４３４８１．１、ＮＰ＿０７８８８４．２、ＮＰ＿００１３３９４４８．１など）、マウスエンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＢＡＣ０６４７７．１、ＮＰ＿０８２６２３．１など）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）エンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏｓ．ＯＢＺ４９００８．１、ＯＢＺ４３２１４．１、ＯＢＺ４２０２５．１、ＡＮＪ４１６６１．１、ＫＹＬ４０９９５．１、ＫＭＶ５５０３４．１、ＫＭＶ５３３７９．１、ＫＭＶ５００３８．１、ＫＭＶ４０８４７．１、ＡＱＷ７２１５２．１など）などからなる群より選択された１種以上であってもよいが、これに制限されるわけではない。

【００６１】
他の例は、（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を、
細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させる段階
を含む、ＤＮＡに一本鎖切断（ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋ）を生成する方法を提供する。前記方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を処理する段階を含まないものであってもよい。
【００６２】
このようにＤＮＡに一本鎖切断を生成（または導入）することによって、ゲノムＤＮＡまたはＤＮＡの標的部位でシチジンデアミナーゼによって塩基編集（ｂａｓｅ ｅｄｉｔｉｎｇ、即ち、ＣからＵへの変換）が起こった位置または前記一本鎖切断が生成（導入）された位置、塩基編集効率などを分析することができ、これを通じて、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）配列に対する特異性、非標的（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ）配列などを確認（または測定）することができる。
【００６３】
他の例は、
（ｉ）（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；および
（ｉｉ）前記一本鎖切断されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階
を含む、デアミナーゼによって塩基編集（ｂａｓｅ ｅｄｉｔｉｎｇ）が導入されたＤＮＡの核酸配列分析方法を提供する。前記方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を処理してＤＮＡに二本鎖切断を生成する段階を含まないものであってもよい。
【００６４】
他の例は、
（ｉ）（ａ）デアミナーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）、および（ｂ）不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼまたはそれをコードする遺伝子（ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、またはｍＲＮＡ）および（ｃ）ガイドＲＮＡまたはそれをコードする遺伝子を細胞に導入するかまたは細胞から分離されたＤＮＡに接触させてＤＮＡ一本鎖切断を誘導する段階；
（ｉｉ）前記切断されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階；および
（ｉｉｉ）前記分析によって得られた核酸配列データから一本鎖切断位置を確認する段階
を含む、デアミナーゼの塩基編集位置、一本鎖切断位置、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）、および／または標的特異性を確認（または測定または検出）する方法を提供する。前記方法は、例えば、前記段階（ｉｉ）以後および段階（ｉｉｉ）以前、同時または以後に、（ｉｉｉ－１）前記分析によって得られた核酸配列データ（ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｒｅａｄ）から塩基編集（例えば、シトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換）の有無を確認する段階を追加的に含むことができる。前記方法は、ウラシル－特異的除去試薬（Ｕｒａｃｉｌ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｅｘｃｉｓｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ；ＵＳＥＲ）を処理してＤＮＡに二本鎖切断を生成する段階を含まないものであってもよい。
【００６５】
一例で、前記方法（例えば、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標

的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）確認方法）は、前記段階（ｉｉｉ）以後に、（ｉｖ）前記切断位置が標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）でない場合、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）と確認（判断）する段階を追加的に含むことができる。

【００６６】

前記デアミナーゼ、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ、ガイドＲＮＡおよびウラシル－特異的除去試薬は、前述のとおりである。

【００６７】

本明細書で提供された方法は細胞内または試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で行われるものであってもよく、例えば、試験管内で行われるものであってもよい。より具体的に、前記方法の全ての段階が試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で行われるか、前記段階（ｉ）は細胞内で行われ、前記段階（ｉｉ）以後段階は前記段階（ｉ）が行われた細胞から抽出されたＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ）を使用して試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で行われるものであってもよい。

【００６８】

前記段階（ｉ）は、デアミナーゼ（またはそれをコードする遺伝子）および不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ（またはそれをコードする遺伝子）とガイドＲＮＡを細胞に形質感染させるか、または前記細胞から抽出されたＤＮＡに接触（例えば、共に培養）させて、ガイドＲＮＡによって標的化される標的部位内で塩基編集（塩基変換、例えば、シトシンからウラシルへの変換）およびＤＮＡ一本鎖に切断（ｎｉｃｋ）発生を誘導する段階である。前記細胞は、デアミナーゼによる塩基編集および／または一本鎖切断を導入しようとする全ての真核細胞の中から選択されたものであってもよく、例えば、ヒト細胞を含む哺乳動物細胞の中から選択され得る。

【００６９】

前記形質感染は、

（１）デアミナーゼ、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ、およびガイドＲＮＡの混合物またはこれらが結合された複合体（リボ核タンパク質；ＲＮＰ）、

（２）デアミナーゼ暗号化ｍＲＮＡ、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ暗号化ｍＲＮＡ、およびガイドＲＮＡの混合物、または

（３）デアミナーゼコード遺伝子および標的特異的エンドヌクレアーゼコード遺伝子をそれぞれまたは共に含むプラスミド（組換えベクター）、およびガイドＲＮＡまたはガイドＲＮＡコード遺伝子を含むプラスミド

を通常の全ての手段によって細胞に導入させることによって行われてもよく、例えば、前記導入は電気穿孔（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ）、リポフェクション、微細注入などによって行われてもよいが、これに制限されるわけではない。

【００７０】

一具体例で、前記段階（ｉ）は、前記細胞（デアミナーゼおよび不活性化されたエンドヌクレアーゼによる塩基編集（塩基編集位置、塩基編集効率など）および／または一本鎖切断（切断位置、切断効率など）を確認しようとする細胞）から抽出されたＤＮＡをデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ（例えば、シチジンデアミナーゼおよび不活性化されたＣａｓ９タンパク質を含む融合タンパク質）およびガイドＲＮＡと共に培養することによって行われてもよい（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）。前記細胞から抽出されたＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ（ｇｅｎｏｍｅ　ＤＮＡ）または標的遺伝子または標的部位を含むＰＣＲ（ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）増幅産物であってもよい。

【００７１】

任意に、前記段階（ｉ）遂行（または完了）後段階（ｉｉ）遂行前に、段階（ｉ）で使用されたデアミナーゼ、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ、および／またはガイドＲＮＡを除去する段階を追加的に含むことができる。また、前記段階（ｉ）遂行（または完了）後段階（ｉｉ）遂行前に、一本鎖切断が起こった二本鎖ＤＮＡ断片の末端平

滑化（または末端修復；ｅｎｄ　ｒｅｐａｉｒ）段階を追加的に含むことができ、前記末端平滑化段階は（ｂ）一本鎖切断が起こった二本鎖ＤＮＡ断片で、切断が起こらない鎖の３’側（切断された鎖の切断地点の５’末端側と相補的位置）の延長されたヌクレオチドを除去（切断）する３’－ｔｏ－５’切断（３’－ｔｏ－５’　ｔｒｉｍｍｉｎｇ）段階、および／または（ｃ）一本鎖切断が起こった二本鎖ＤＮＡ断片で、切断が起こった鎖の切断地点での３’末端のヌクレオチドを延長させる５’－ｔｏ－３’ＤＮＡ合成段階を追加的に含むことができる（実施例１の図参照）。前記３’－ｔｏ－５’切断段階は、適切な通常のエキソヌクレアーゼを使用して行うことができる。前記５’－ｔｏ－３’ＤＮＡ合成段階は、適切な通常のＤＮＡポリメラーゼを使用して行うことができる。

【００７２】

また、任意に、前記段階（ｉ）遂行（または完了）後段階（ｉｉ）遂行前に、段階（ｉｉ）のＤＮＡ断片の核酸配列分析をより容易にするために、一本鎖切断されたＤＮＡ断片（ＤＮＡ二本鎖中、切断された鎖の切断位置（ｃｌｅａｖａｇｅ　ｓｉｔｅ）を含む連続する１０～３０ｎｔまたは１５～２５ｎｔのオリゴヌクレオチドおよび／または切断されていない鎖の切断位置と対応する（相補的な）位置を含む連続する１０～３０ｎｔまたは１５～２５ｎｔのオリゴヌクレオチド）を増幅させる過程を追加的に含むことができる。前記段階（ｉｉ）で核酸配列分析に使用される一本鎖切断されたＤＮＡ断片は、一本鎖切断が起こった鎖の切断位置を含む連続する１０～３０ｎｔまたは１５～２５ｎｔのオリゴヌクレオチドおよび／または切断されていない鎖の切断位置と対応する（相補的な）位置を含む連続する１０～３０ｎｔまたは１５～２５ｎｔのオリゴヌクレオチド；および／または前記オリゴヌクレオチドの増幅産物を含むことができる。

【００７３】

前記デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼはガイドＲＮＡと共に使用されて配列特異性（ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）を有するので大部分標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）に作用するが、標的配列以外の部位に標的配列と類似の配列がどの程度存在するかによって非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）に作用する副作用が発生することもある。本明細書で、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）とは、デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼの標的部位ではないが、デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼが活性を有する位置をいう。即ち、標的位置以外の、デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼによって塩基編集および／または切断される位置をいう。一例で、前記非標的位置は、デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼに対する実際非標的位置だけでなく、非標的位置になる可能性がある潜在的な非標的位置まで含む概念として使用できる。前記非標的位置はこれに制限されるわけではないが、試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）でデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼによって切断される標的位置以外の全ての位置を意味するものであり得る。

【００７４】

デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼが標的位置以外の位置でも活性を有することは、多様な原因によって引き起こされ得る。例えば、標的部位に対して設計された標的配列とヌクレオチド不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈ）水準が低いため、標的配列と配列相同性が高い標的配列以外の配列（非標的配列）の場合、デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼが作動する可能性がある。

【００７５】

前記非標的位置は、これに制限されるわけではないが、次の条件のうちの一つ以上を満足する配列部位（遺伝子部位）であり得る：

５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの数が２以上、例えば、３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上、または１０以上；

二本鎖ＤＮＡ断片の中の切断が起こった鎖と相補的な鎖がＰＡＭ配列を含み；

二本鎖ＤＮＡ断片の中の切断が起こった鎖と相補的な鎖が標的位置の配列（標的配列）と１５個以下または１０個以下、例えば、１個～１５個、１個～１４個、１個～１３個、

１個～１２個、１個～１１個、１個～１０個、１個～９個、１個～８個、１個～７個、１個～６個、１個～５個、１個～４個、１個～３個、１個～２個、または１個の不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈ）ヌクレオチドを含み；および
二本鎖ＤＮＡ断片の中の切断が起こった鎖と相補的な鎖が塩基編集（一つ以上のシトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換）を含む。

【００７６】
非標的位置でデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼが作動する場合、ゲノム内で望まない遺伝子の突然変異を引き起こすことがあるため深刻な問題が引き起こされることがある。よって、デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼの標的位置での活性に劣らず非標的配列を正確に検出して分析する過程も非常に重要であると言え、これは非標的効果なく標的位置にのみ特異的に作動するデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼを開発することに有用に使用できる。

【００７７】
本発明の目的上、前記シチジンデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼは生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）および試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で活性を有することができるので、試験管内でＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ）の非標的位置を検出することに使用でき、これを生体内で適用した時、前記検出された非標的位置（非標的配列を含む遺伝子上位置（部位））と同一な位置にも活性を有することを予想することができる。

【００７８】
前記段階（ｉｉ）は前記段階（ｉ）で切断（一本鎖切断）されたＤＮＡ断片の核酸配列を分析する段階であって、通常の全ての核酸配列分析方法によって行われてもよい。例えば、前記段階（ｉ）で使用された分離されたＤＮＡがゲノムＤＮＡである場合、前記核酸配列分析は、全体ゲノムシークエンシング（ｗｈｏｌｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）によって行われてもよい。全体ゲノムシークエンシングを行う場合、標的部位の配列と相同性を有する配列を探して非標的位置であると予測する間接的な方法と異なり、全体ゲノム水準で実質的に標的特異的ヌクレアーゼによって切断される非標的位置を検出することができるので、より正確に非標的位置を検出することができる。

【００７９】
本明細書に使用されたものとして、“全体ゲノムシークエンシング（ｗｈｏｌｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ；ＷＧＳ）”は、次世代シークエンシング（ｎｅｘｔ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）による全長ゲノムシークエンシングを１０Ｘ、２０Ｘ、４０Ｘの形式で様々な倍数でゲノムを読む方法を意味する。“次世代シークエンシング”はチップ（Ｃｈｉｐ）基盤およびＰＣＲ基盤ペアードエンド（ｐａｉｒｅｄ　ｅｎｄ）形式で全長ゲノムを断片化し、前記断片を化学的な反応（ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）に基づいて超高速でシークエンシングを行う技術を意味する。

【００８０】
前記段階（ｉｉｉ）は前記段階（ｉｉ）で得られた塩基配列データ（ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｒｅａｄ）からＤＮＡが切断された位置を確認（または決定）する段階であって、シークエンシングデータを分析して標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）と非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）を簡便に検出することができる。前記塩基配列データからＤＮＡが切断された特定位置を決定することは多様な接近方法で行うことができ、本明細書では前記位置を決定するための様々な合理的な方法を提供する。しかし、これは本発明の技術的思想に含まれる例示に過ぎず、本発明の範囲がこれら方法によって制限されるわけではない。

【００８１】
例えば、前記切断された位置を決定するための一例として、全体ゲノムシークエンシングを通じて得られた塩基配列データをゲノム上の位置によって整列した場合、５’末端が垂直整列された位置がＤＮＡが切断された位置を意味するものであり得る。前記塩基配列

データをゲノム上の位置によって整列する段階は、分析プログラム（例えば、ＢＷＡ／ＧＡＴＫまたはＩＳＡＡＣなど）を用いて行うことができる。本明細書に使用されたものとして、前記用語“垂直整列”とは、ＢＷＡ／ＧＡＴＫまたはＩＳＡＡＣなどのプログラムで全体ゲノムシークエンシング結果を分析する時、隣接したワトソン鎖（Ｗａｔｓｏｎ ｓｔｒａｎｄ）とクリック鎖（Ｃｒｉｃｋ ｓｔｒａｎｄ）のそれぞれに対して、２つ以上の塩基配列データの５’末端がゲノム上の同一な位置（ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｏｓｉｔｉｏｎ）で始まる配列をいう。これによって、前記段階（ｉ）で切断されて同一な５’末端を有するようになるＤＮＡ断片がそれぞれシークエンシングされて表されるようになる。

【００８２】

即ち、前記段階（ｉ）での切断が標的位置および非標的位置で起こる場合、塩基配列データを整列すれば、共通的に切断された部位はそれぞれその位置が５’末端で始まるので垂直整列されるが、切断されていない部位には５’末端が存在しないので、整列時、スタッガード（ｓｔａｇｇｅｒｅｄ）方式で配列され得る。したがって、垂直整列された位置を前記段階（ｉ）で切断された部位と見ることができ、これは即ち、不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼによって切断された標的位置または非標的位置を意味するものであり得る。

【００８３】

前記“整列”は、標準塩基配列（ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｇｅｎｏｍｅ）で塩基配列データをマッピングした後、ゲノムで同一位置を有する塩基を各位置に合うように配列することを意味する。したがって、塩基配列データを前記のような方式で整列することができればいかなるコンピュータプログラムも用いることができ、これは当業界に既に知られた公知のプログラムまたは目的に合うように製作されたプログラムのうちから選択され得る。一実施形態ではＩＳＡＡＣを用いて整列を行ったが、これに制限されるわけではない。

【００８４】

整列の結果、前述のように５’末端が垂直整列された位置を探すなどの方法を通じてデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼによってＤＮＡが切断された位置を決定することができ、前記切断された位置が標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）でなければ、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）と判断することができる。言い換えれば、シチジンデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼの標的位置として設計した塩基配列と同一な配列は標的位置であり、前記塩基配列と同一でない配列は非標的位置と見ることができる。これは前述の非標的位置の定義上自明なことである。

【００８５】

前記方法（例えば、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）確認方法）は、前記段階（ｉｉｉ）以後に、前記切断位置が標的位置（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）でない場合、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｓｉｔｅ）と確認（判断）する段階を追加的に含むことができる。

【００８６】

塩基エディター（デアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼ）によって切断されたＤＮＡ断片の中の切断された鎖は５’末端が垂直整列される。前記５’末端が垂直整列されるＤＮＡリード（ＤＮＡ ｒｅａｄ；本明細書で使用されるものとして、５’末端が垂直整列され同一な核酸配列を有するＤＮＡ断片または前記ＤＮＡ断片の集団を意味する）の個数によって、切断位置の個数を確認することができる。例えば、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの個数が１である場合、前記塩基エディターによって一つの位置、即ち、標的位置のみで切断が起こったのを確認することができる。５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの個数が２以上、例えば、３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上、または１０以上である場合、２以上の多数の位置で切断が起こったのを確認することができ、これは標的位置以外の位置（非標的位置）でＤＮＡ切断があるのを意味するものである。また、前記５’末端が垂直整列されるＤＮＡリー

ドの中の標的位置ではないもの（即ち、標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するもの）は非標的位置と確認（または決定）することができる。

【００８７】

したがって、前記段階（ｉｉｉ）の一本鎖切断位置を確認する段階は、（ａ）５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの数を確認（または測定）する段階を含むことができる。この場合、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの数が２以上、例えば、３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上、または１０以上である場合、標的位置でない位置（非標的位置）でＤＮＡ切断が起こったと確認（または決定）することができる。また、この場合、前記段階（ｉｖ）の非標的位置と確認する段階は、（ｉｖ－１）前記２つ以上の５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードを非標的位置と確認（または決定）する段階を含むことができる。

【００８８】

また、前記非標的位置がＰＡＭ配列を含むか否かを確認（より具体的に、切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）がＰＡＭ配列を含むか否かを確認）することによって、塩基エディターに含まれている標的特異的エンドヌクレアーゼによる標的特異的切断でない誤って切断された位置を排除して非標的位置の正確度をより増加させることができる。したがって、前記段階（ｉｉｉ）の一本鎖切断位置を確認する段階は、（ｂ）非標的位置がＰＡＭ配列を含むか否かを確認する段階、例えば、切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）が塩基エディターに含まれている標的特異的エンドヌクレアーゼに特異的なＰＡＭ配列を含むか否かを確認する段階を追加的に含むことができる。この場合、前記段階（ｉｖ）の非標的位置と確認する段階は、（ｉｖ－２）切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）が塩基エディターに含まれている標的特異的エンドヌクレアーゼに特異的なＰＡＭ配列を含む場合、非標的位置と確認（または決定）する段階を含むことができる。

【００８９】

また、前記非標的位置は、標的位置の配列と相同性を有する配列から構成されたものであってもよい。より具体的に、標的位置配列はＰＡＭ配列を含む鎖の核酸配列で表現されるので、前記非標的位置は、切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）の核酸配列が標的位置と１個以上のヌクレオチド不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈ）を有する配列、さらに具体的に、標的位置（標的配列）と１５個以下または１０個以下、例えば、１個～１５個、１個～１４個、１個～１３個、１個～１２個、１個～１１個、１個～１０個、１個～９個、１個～８個、１個～７個、１個～６個、１個～５個、１個～４個、１個～３個、または１個～２個のヌクレオチド不一致を有するものであってもよい。

【００９０】

したがって、前記段階（ｉｉｉ）の一本鎖切断位置を確認する段階は、（ｃ）切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）の標的位置配列に対する不一致ヌクレオチド数を確認（または測定）する段階を追加的に含むことができる。この場合、前記不一致ヌクレオチド数が１５個以下または１０個以下、例えば、１個～１５個、１個～１４個、１個～１３個、１個～１２個、１個～１１個、１個～１０個、１個～９個、１個～８個、１個～７個、１個～６個、１個～５個、１個～４個、１個～３個、または１個～２個である場合、前記ＤＮＡリードを標的位置でない位置（非標的位置）でＤＮＡ切断が起こったと確認（または決定）することができる。また、この場合、

前記段階（ｉｖ）の非標的位置と確認する段階は、（ｉｖ－３）切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）の標的位置配列に対する不一致ヌクレオチドが１５個以下または１０個以下、例えば、１個～１５個、１個～１４個、１個～１３個、１個～１２個、１個～１１個、１個～１０個、１個～９個、１個～８個、１個～７個、１個～６個、１個～５個、１個～４個、１個～３個、または１個～２個である場合、非標的位置と確認（または決定）する段階を含むことができる。

【００９１】

前記段階（ｉｉｉ）は、段階（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）のうちの一つ以上（例えば、段階（ａ）および、（ｂ）と（ｃ）のうちの一つ以上）を含むことができ、前記段階（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）のうちの２以上を含む場合、これらは同時にまたは順序に関係なく順次に行われるものであってもよい。また、段階（ｉｖ）は、段階（ｉｖ－１）、（ｉｖ－２）、および（ｉｖ－３）のうちの一つ以上（例えば、段階（ｉｖ－１）および、（ｉｖ－２）と（ｉｖ－３）のうちの一つ以上）を含むことができ、前記段階（ｉｖ－１）、（ｉｖ－２）、および（ｉｖ－３）のうちの２以上を含む場合、これらは同時にまたは順序に関係なく順次に行われるものであってもよい。

【００９２】

前記段階（ｉｉｉ－１）の塩基編集（例えば、シトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換）の有無を確認する段階は、切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）が塩基編集（一つ以上のシトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換）を含むか否かを確認（測定）する段階を含むものであってもよい。この場合、前記段階（ｉｖ）の非標的位置と確認する段階は、（ｉｖ－４）切断されたＤＮＡ断片中、５’末端が垂直整列されるＤＮＡリードの中の標的位置の核酸配列と異なる核酸配列を有するＤＮＡリードと相補的な鎖（相補的配列を有する鎖）が塩基編集（一つ以上のシトシン（Ｃ）のウラシル（Ｕ）またはチミン（Ｔ）への変換）を含む場合、非標的位置と確認（または決定）する段階を含むことができる。

【００９３】

一実施形態で、ゲノムＤＮＡに対して前記段階（ｉ）を行って一本鎖切断した後、全体ゲノム分析（段階（ｉｉ））遂行後、これをＩＳＡＡＣで整列して切断された位置では垂直整列、切断されていない位置ではスタガード方式で整列されるパターンを確認して、これを５’末端プロットで示した時、切断部位で独特なパターンが示され得る。

【００９４】

さらに、これに制限されるわけではないが、具体的な一例としてワトソン鎖（Ｗａｔｓｏｎ　ｓｔｒａｎｄ）とクリック鎖（Ｃｒｉｃｋ　ｓｔｒａｎｄ）に該当する塩基配列データ（ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｒｅａｄ）がそれぞれ二つ以上ずつ垂直に整列される位置を非標的位置であると判断することができ、また２０％以上の塩基配列データが垂直に整列され、それぞれのワトソン鎖およびクリック鎖で同一な５’末端を有する塩基配列データの数が１０以上である位置が非標的位置、即ち、切断される位置であると判断することができる。

【００９５】

前記方法は段階（ｉｉ）および（ｉｉｉ）の過程はＤｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑ（ｄｉｇｅｓｔｅｄ－ｇｅｎｏｍｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）であってもよく、より具体的な内容は韓国特許公開第１０－２０１６－００５８７０３号に記載されている（前記文献は本発明に参照として含まれる）。

【００９６】

前述の方法によって、デアミナーゼの塩基編集位置および／または一本鎖切断位置、標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集効率または標的特異性（即ち、［標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）部位での塩基編集または切断頻度］／［全体塩基編集または切断頻度］）、および／または非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ；デアミナーゼの塩基

編集位置として確認された位置のうちの標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）位置でない位置）を確認（または測定または検出）することができる。

【００９７】

前記非標的位置確認（検出）は、試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）でデアミナーゼおよび不活性化された標的特異的エンドヌクレアーゼをゲノムＤＮＡに処理して行われてもよい。よって、前記方法を通じて確認（検出）された非標的位置に対して実質的に生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）でも非標的効果が現れるか確認してみることができる。但し、これは追加的な検証過程に過ぎないので、本発明の範囲に必須的に伴う段階ではなく、必要によって追加的に行われる段階に過ぎない。

【００９８】

本明細書に使用されたものとして、用語“非標的効果（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｅｆｆｅｃｔ）”は、非標的位置（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）で塩基編集および／または二本鎖切断が起こる水準を意味するためのものであり得る。用語“インデル（Ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ　ａｎｄ／ｏｒ　ｄｅｌｅｔｉｏｎ；Ｉｎｄｅｌ）”は、ＤＮＡの塩基配列で一部塩基が中間に挿入されるか（ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ）および／または欠失された（ｄｅｌｅｔｉｏｎ）変異を総称する。

【発明の効果】

【００９９】

本明細書で提供されるシチジンデアミナーゼを用いたＤＮＡ一本鎖切断方法およびこれを用いた核酸配列分析技術によって、シチジンデアミナーゼの塩基編集位置、標的特異性、および／または非標的位置をより正確で効率的に確認することができる。

【図面の簡単な説明】

【０１００】

【図１】ＥＭＸ１の標的位置でのＣ→Ｕ変換および直線整列（ｓｔｒａｉｇｈｔ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）を示す代表的なＩＧＶイメージである。

【図２】Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑの結果として得られた一つの鎖のみでシークエンスリードの均一な整列を有する切断位置（ｎｉｃｋｅｄ　ｓｉｔｅｓ）の個数およびこれら位置のうちの１０個以下の不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈ）を有するＰＡＭ－含み位置の個数を示す。

【図３ａ】ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＮＬＳベクターの開裂地図である。

【図３ｂ】ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ－ＮＬＳベクターの開裂地図である。

【図３ｃ】ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－Ｃａｓ９ｎ－ＵＧＩ－ＮＬＳベクターの開裂地図である。

【図４】Ｃａｓ９発現プラスミド（ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｐｌａｓｍｉｄ）の開裂地図である。

【図５】ｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ１ベクターの開裂地図である。

【図６】ｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ３　ｄｅｌｔａ　ＵＧＩベクターの開裂地図である。

【発明を実施するための形態】

【０１０１】

以下、本発明を下記の実施例によってより具体的に説明する。しかし、これらは本発明を例示するためのものに過ぎず、本発明の範囲がこれら実施例によって制限されるわけではない。

［参考例］

【０１０２】

１．細胞培養および形質感染

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１１２６８）を１０％（ｗ／ｖ）ＦＢＳおよび１％（ｗ／ｖ）ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｗｅｌｇｅｎｅ）で補充されたＤＭＥＭ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ）培地で維持さ

せた。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（１．５×１０$^{5}$）を２４－ウェルプレートに接種し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してｓｇＲＮＡプラスミド（５００ｎｇ）と、塩基エディタープラスミド（Ｂａｓｅ Ｅｄｉｔｏｒ ｐｌａｓｍｉｄ）（Ａｄｄｇｅｎｅ ｐｌａｓｍｉｄ ＃７３０１９（Ｅｘｐｒｅｓｓｅｓ ＢＥ１ ｗｉｔｈ Ｃ－ｔｅｒｍｉｎａｌ ＮＬＳ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ；ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＮＬＳ；図３ａ）、＃７３０２０（Ｅｘｐｒｅｓｓｅｓ ＢＥ２ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ；ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ－ＮＬＳ；図３ｂ）、＃７３０２１（Ｅｘｐｒｅｓｓｅｓ ＢＥ３ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ；ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－Ｃａｓ９ｎ－ＵＧＩ－ＮＬＳ；図３ｃ））（１．５μｇ）またはＣａｓ９発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ ｐｌａｓｍｉｄ ＃４３９４５；図４）を形質感染させた（ａｔ～８０％ ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）。形質感染後７２時間後に、ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ ＆ Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してゲノムＤＮＡを分離した。前記細胞に対してマイコプラズマ汚染の有無をテストしなかった。

【０１０３】

下記の実施例に使用されたｓｇＲＮＡは標的部位配列（標的配列；ＥＭＸ１ ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ配列；ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡＧＧＧ（配列番号１４））の中の５’末端のＰＡＭ配列（５’－ＮＧＧ－３’（ＮはＡ、Ｔ、Ｇ、またはＣである））を除いた配列でＴをＵに変えた配列を下記の一般式３の標的化配列‘（Ｎ$_{ｃａｓ９}$）$_{１}$’にして製作されたものを使用した：

【０１０４】

５’－（Ｎ$_{ｃａｓ９}$）$_{１}$－（ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ；配列番号１）－（ＧＡＡＡ）－（ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ；配列番号３）－３’（一般式３；オリゴヌクレオチドリンカー：ＧＡＡＡ）。

【０１０５】

２．タンパク質精製

Ｈｉｓ６－ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９タンパク質をコーディングするプラスミド（ｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ１；Ｅｘｐｒｅｓｓｅｓ ＢＥ１ ｗｉｔｈ Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌ Ｈｉｓ６ ｔａｇ ｉｎ Ｅ．Ｃｏｌｉ；図５）はＤａｖｉｄ Ｌｉｕ（Ａｄｄｇｅｎｅ ｐｌａｓｍｉｄ ＃７３０１８）から提供を受け、前記Ｈｉｓ６－ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９タンパク質をコーディングするプラスミドｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ１で部位特異的変異導入法（ｓｉｔｅ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）を用いてｄＣａｓ９のＡ８４０をＨ８４０で置換して、Ｈｉｓ６－ｒＡＰＯＢＥＣ１－ｎＣａｓ９タンパク質（ＢＥ３ ｄｅｌｔａ ＵＧＩ；ＵＧＩドメインを欠如したＢＥ３変異型）をコーディングするプラスミド（ｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ３ ｄｅｌｔａ ＵＧＩ；図６）を製作した。

【０１０６】

Ｒｏｓｅｔｔａ発現細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ、ｃａｔａｌｏｇ ｎｕｍｂｅｒ：７０９５４－３ＣＮ）を前記準備されたｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ１またはｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ３ ｄｅｌｔａ ＵＧＩで形質転換させ、１００μｇ／ｍｌカナマイシン（ｋａｎａｍｙｃｉｎ）と５０ｍｇ／ｍｌカルベニシリン（ｃａｒｂｅｎｉｃｉｌｉｎ）を含むＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）ｂｒｏｔｈで３７℃条件で一晩培養した。ｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ１またはｐＥＴ２８ｂ－ＢＥ３ ｄｅｌｔａ ＵＧＩを含有するＲｏｓｅｔｔａ細胞を一晩培養した培養物１０ｍｌを１００μｇ／ｍｌカナマイシン（ｋａｎａｍｙｃｉｎ）および５０ｍｇ／ｍｌカルベニシリン（ｃａｒｂｅｎｉｃｉｌｉｎ）を含有する４００ｍｌのＬＢ ｂｒｏｔｈに接種し、ＯＤ６００が０．５－０．６に到達するまで３０℃条件で培養した。前記培養された細胞を１時間１６℃に冷却させ、０．５ｍＭ ＩＰＴＧ（Ｉｓｏｐｒｏｐｙｌ β－Ｄ－１－ｔｈｉｏｇａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ）を補充して、１４－１８時間培養した。

【０１０７】
タンパク質精製のために、細胞を４℃で１０分間５０００ｘｇで遠心分離して収穫し、リゾチーム（Ｓｉｇｍａ）およびプロテアーゼ抑制剤（Ｒｏｃｈｅ　ｃｏｍｐｌｅｔｅ、ＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ）補充された溶解緩衝液（５０ｍＭ　$NaH_2PO_4$、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴおよび１０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）５ｍｌで超音波処理して溶解させた。前記得られた細胞反応物を４℃で１３，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離して得られた溶解性細胞溶解物をＮｉ－ＮＴＡアガロースレジン（Ｑｉａｇｅｎ）と共に４℃で１時間培養した。細胞溶解物／Ｎｉ－ＮＴＡ混合物をカラムに適用して緩衝液（５０ｍＭ　$NaH_2PO_4$、３００ｍＭ　ＮａＣｌおよび２０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）で洗浄した。ＢＥ３タンパク質を溶出緩衝液（５０ｍＭ　$NaH_2PO_4$、３００ｍＭ　ＮａＣｌおよび２５０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）で溶出させた。溶出されたタンパク質を貯蔵緩衝液（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ　ＫＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴおよび２０％グリセロール）でバッファー交替して貯蔵し、遠心分離フィルターユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮させ、ｒＡＰＯＢＥＣ１－ｎＣａｓ９を精製した。

【０１０８】
３．ゲノムＤＮＡの脱アミノ化

ゲノムＤＮＡは製造者の指示によってＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　＆　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＨＥＫ２９３Ｔ細胞から精製（抽出）した。ゲノムＤＮＡ（１０μｇ）を前記参考例２で精製されたｒＡＰＯＢＥＣ１－ｎＣａｓ９タンパク質（３００ｎＭ）とｓｇＲＮＡ（９００ｎＭ）と共に５００μｌの反応容量で３７℃で８時間緩衝液（１００ｍＭ　ＮａＣｌ、４０ｍＭ）Ｈｒｉｓ－ＨＣｌ、１０ｍＭ　ＭｇＣｌ２、および１００μｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、ｐＨ７．９）で培養した。

【０１０９】
前記使用されたｓｇＲＮＡは、標的部位配列（標的配列；ＥＭＸ１　ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ配列；ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡＧＧＧ（配列番号１４））の中の５’末端のＰＡＭ配列（５’－ＮＧＧ－３’（ＮはＡ、Ｔ、Ｇ、またはＣである））を除いた配列でＴをＵに変えた配列を下記の一般式３の標的化配列‘（$N_{cas9}$）$_l$’にして製作されたものを使用した：

【０１１０】
５’－（$N_{cas9}$）$_l$－（ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡ）－（ＧＡＡＡ）－（ＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ）－３’（一般式３；オリゴヌクレオチドリンカー：ＧＡＡＡ）。

【０１１１】
ＲＮａｓｅ　Ａ（５０μｇ／ｍＬ）を使用してｓｇＲＮＡを除去した後、ウラシル含有ゲノムＤＮＡをＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　＆　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。標的部位をＳＵＮ－ＰＣＲブレンドを使用してＰＣＲ増幅させ、サンガー（Ｓａｎｇｅｒ）配列分析を行ってＢＥ３－媒介シトシン脱アミノ化およびＤＮＡ切断を確認した。

【０１１２】
４．全体ゲノムおよびＤｉｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ

Ｃｏｖａｒｉｓシステム（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して４００－５００ｂｐ範囲でゲノムＤＮＡ（１μｇ）を断片化し、Ｅｎｄ　Ｒｅｐａｉｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）を使用して平滑末端化（ｂｌｕｎｔ－ｅｎｄｅｄ）させた。断片化されたＤＮＡをアダプターで連結してライブラリーを生成した後、（株）マクロゼンに依頼してＨｉＳｅｑ　Ｘ　Ｔｅｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を使用してＷＧＳ（ｗｈｏｌｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）を行った（Ｋｉｍ、Ｄ．、Ｋｉｍ、Ｓ．、Ｋｉｍ、Ｓ．、Ｐａｒｋ、Ｊ．　＆　Ｋｉｍ、Ｊ．Ｓ．　Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ　ｔａｒｇｅｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｉｅｓ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ－

Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｒｅｖｅａｌｅｄ ｂｙ ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑ．Ｇｅｎｏｍｅ ｒｅｓｅａｒｃｈ ２６、４０６－４１５（２０１６））。

【０１１３】

５．標的深層シークエンシング（Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｅｅｐ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）

深層シークエンシング（ｄｅｅｐ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）ライブラリー生成のために、標的と潜在的な非標的部位をＫＡＰＡ ＨｉＦｉ ＨｏｔＳｔａｒｔ ＰＣＲキット（ＫＡＰＡ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ＃ ＫＫ２５０１）で増幅させた。プーリングされたＰＣＲ増幅物をＴｒｕＳｅｑ ＨＴ Ｄｕａｌ Ｉｎｄｅｘシステム（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）が装着されたＭｉｎｉＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）またはＩｌｌｕｍｉｎａ Ｍｉｓｅｑ（ＬＡＳ Ｉｎｃ．韓国）を使用してシークエンシングした。

【０１１４】

前記標的深層シークエンシングに使用されたプライマーは下記の通りである：

ＥＭＸ１

Ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ ｓｅｑｕｅｎｃｅ：ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡＧＧＧ（配列番号１４）

１ｓｔ ＰＣＲ

Ｆｏｒｗａｒｄ（５’→３’）：

ＡＧＴＧＴＴＧＡＧＧＣＣＣＣＡＧＴＧ（配列番号１５）；

Ｒｅｖｅｒｓｅ（５’→３’）：

ＧＴＧＡＣＴＧＧＡＧＴＴＣＡＧＡＣＧＴＧＴＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴＣＡＧＣＡＧＣＡＡＧＣＡＧＣＡＣＴＣＴ（配列番号１６）；

２ｎｄ ＰＣＲ

Ｆｏｒｗａｒｄ（５’→３’）：

ＡＣＡＣＴＣＴＴＴＣＣＣＴＡＣＡＣＧＡＣＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴＧＧＧＣＣＴＣＣＴＧＡＧＴＴＴＣＴＣＡＴ（配列番号１７）；

Ｒｅｖｅｒｓｅ（５’→３’）

ＧＴＧＡＣＴＧＧＡＧＴＴＣＡＧＡＣＧＴＧＴＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴＣＡＧＣＡＧＣＡＡＧＣＡＧＣＡＣＴＣＴ（配列番号１８）。

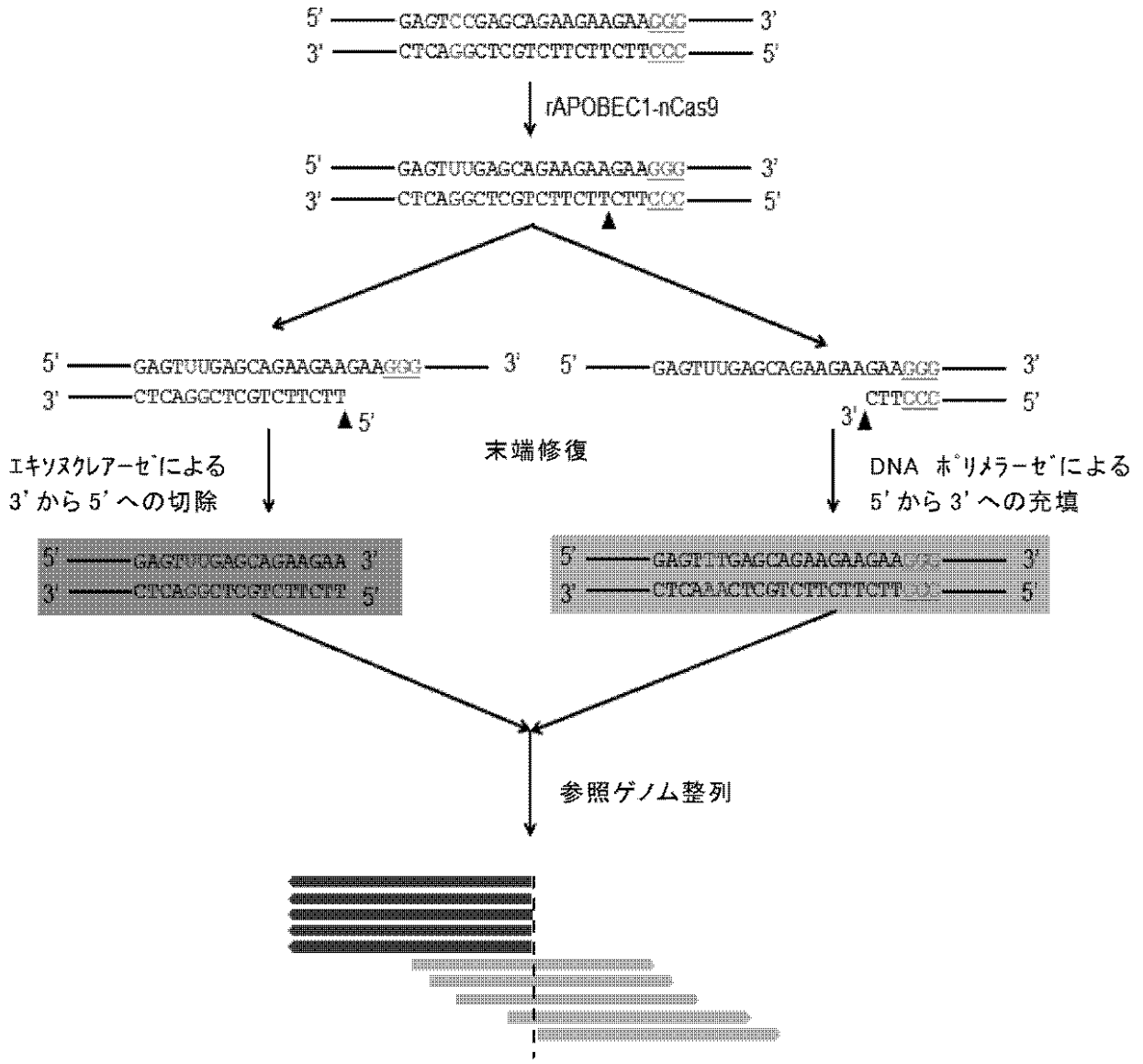
【０１１５】

実施例１．Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑを用いたＢＥ３非標的位置確認

生体外で（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）、ヒトゲノムＤＮＡにＥＭＸ１特異的ｓｇＲＮＡ（参考例３参照；標的（ｏｎ ｔａｒｇｅｔ）配列：配列番号１４）とｒＡＰＯＢＥＣ１－ｎＣａｓ９タンパク質（ＢＥ３：参考例２で精製される）が複合体を形成したリボ核タンパク質を処理して標的（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）位置および非標的（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ）位置で一つの鎖にはＣ→Ｕ変換を、他の鎖では切断（ｎｉｃｋ）を誘導した後、参考例４を参照してＤｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑを行った。本実施例で、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（Ｕｒａｃｉｌ ＤＮＡ ｇｌｙｃｏｓｙｌａｓｅ、ＵＤＧ）とＤＮＡグリコシラーゼ－リアゼエンドヌクレアーゼ（ＤＮＡ ｇｌｙｃｏｓｙｌａｓｅ－ｌｙａｓｅ Ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ）ＶＩＩＩは使用しなかった。末端修復（ｅｎｄ ｒｅｐａｉｒ）およびアダプターライゲーション（ａｄａｐｔｏｒ ｌｉｇａｔｉｏｎ）後、ＢＥ３処理されたゲノムＤＮＡに対して全体ゲノムシークエンシング（ＷＧＳ）を行った。

【０１１６】

その過程を模式的に示すと次の通りである：




【０１１７】
一鎖で配列リードの均一な整列および他の鎖でＣ→Ｕ変換が起こった標的位置および非標的位置を計算的に確認した。
【０１１８】
図１は、ＥＭＸ１の標的位置でのＣ→Ｕ変換および直線整列（ｓｔｒａｉｇｈｔ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）を示す代表的なＩＧＶイメージである。
【０１１９】
前記Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑの結果として得られた一つの鎖のみでシークエンスリードの均一な整列を有する切断位置（ｎｉｃｋｅｄ　ｓｉｔｅｓ；５’末端が垂直整列を有する位置（ｒｅａｄ））の個数およびこれら位置のうちの１０個以下の不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈ）を有するＰＡＭ－含み位置（ｒｅａｄ）の個数を図２に示した。グループＡとＢは同一な５’末端を有するシークエンスリードの絶対個数（ｎ≧５または１０）および相対個数（それぞれ１０％または２０％）を有すると確認され、標的配列と相同性を有する位置の個数を示す。
【０１２０】
ヒトゲノム全域で同一な５’末端を有する配列リードの絶対的個数（ｎ≧５または１０）および相対的個数（それぞれ１０％または２０％）を計数してゲノム内での均一な整列パターンに関連する全ての位置を列挙した。その結果、図２に示されているように、それ

ぞれ９０，４９６または１，８０７個の該当位置を確保した。一本鎖切断（ｎｉｃｋ）がある位置のうちの３４個（グループＡ）または１４２個（グループＢ；前記グループＡを含む）位置はそれぞれ一本鎖切断位置の下流方向のＰＡＭ（５’－ＮＧＮ－３’または５’－ＮＮＧ－３’）３塩基対を有し、１０個以下の不一致塩基を有するＥＭＸ１標的配列と１０個以下の不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈｅｓ）を有する程度の相同性を有する。

【０１２１】

Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑを通じて確認されたＥＭＸ１に対するＢＥ３非標的位置でのＣａｓ９誘導インデル（ｉｎｄｅｌ）頻度とＢＥ３誘導置換頻度をＨＥＫ２９３Ｔ細胞で標的深層シークエンシング（参考例５参照）を使用して測定した。損傷していないゲノムＤＮＡまたはｒＡＰＯＢＥＣ１－ｎＣａｓ９で処理されたゲノムＤＮＡを使用して得られたＷＧＳデータでのこれら位置それぞれでＣ→Ｔ変換が起こるか否かを確認した。

【０１２２】

ＥＭＸ１でＢＥ３によって切断されたＤＮＡ配列（標的位置１個＋非標的位置１４１個＝総１４２個）を下記の表１に整理した（下記の表１で、標的（ｏｎ　ｔａｒｇｅｔ）配列と不一致（ｍｉｓｍａｔｃｈ）の塩基は小文字で表わす）。

【０１２３】

【表１】

| | 染色体 | 位置 | 切断（ニック）サイトのDNA配列 |
|---|---|---|---|
| EMX1－001（on－target；配列番号14） | chr2 | 73160998 | GAGTCCGAGCAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－002 | chr4 | 131662222 | GAaTCCaAG－AGAAGAAGAATGG |
| EMX1－003 | chr2 | 219845072 | GAGgCCGAGCAGAAGAAagACGG |
| EMX1－004 | chr11 | 62365273 | GAaTCCaAGCAGAAGAAGAgAAG |
| EMX1－005 | chr8 | 128801258 | GAGTCCtAGCAGgAGAAGAAGAG |
| EMX1－006 | chr15 | 44109763 | GAGTCtaAGCAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1－007 | chr19 | 24250503 | GAGTCCaAGCAGtAGAgGAAGGG |
| EMX1－008 | chr6 | 9118799 | acGTCtGAGCAGAAGAAGAATGG |
| EMX1－009 | chr5 | 9227162 | aAGTCtGAGCAcAAGAAGAATGG |
| EMX1－010 | chr1 | 4515013 | GtGTCCtAG－AGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－011 | chr5 | 45359067 | GAGTtaGAGCAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1－012 | chr13 | 96928092 | GAGaCaGAG－AGAAGAAGAATGG |
| EMX1－013 | chr18 | 34906762 | GAGcCtGAGCgGAAGAgGAAAGG |
| EMX1－014 | chr1 | 184236243 | aAtaCaGAGCAGAAGAAGAATGG |
| EMX1－015 | chr18 | 1677040 | agtcCaGAGCAaAAtAAGAAGGG |
| EMX1－016 | chr1 | 33606480 | GAGcCtGAGCAGAAGgAGAAGGG |
| EMX1－017 | chr3 | 111296327 | GAagaaGAGCAaAAGAAGAAGGG |
| EMX1－018 | chr22 | 34716275 | GtGaCaGAGCAaAAGAAGAAAGG |
| EMX1－019 | chr3 | 37781974 | GAagagGAGCAaAAGAAGAAGGG |
| EMX1－020 | chr20 | 6653999 | aAGTCCagaCAGAAGAAGAAGGA |
| EMX1－021 | chr16 | 78848850 | aAaTCCaAcCAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1－022 | chr6 | 92449690 | GttcaaGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1－023 | chr4 | 87256692 | GAGTaaGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－024 | chr11 | 43747948 | aAGcCCGAGCAaAgGAAGAAAGG |
| EMX1－025 | chr5 | 160643032 | cctataGAGCAaAAGAAGAAAGG |
| EMX1－026 | chr11 | 120873098 | GAtcaaGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－027 | chr5 | 62692054 | cAaaaaGAGCAaAAGAAGAACGG |
| EMX1－028 | chrX | 3077291 | tAcagtGAGCAaAAGAAGAAGGG |
| EMX1－029 | chr14 | 98236084 | GttcaaGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1－030 | chr2 | 205473563 | ttcTCaGAGCAaAAGAAGAATGG |
| EMX1－031 | chr3 | 189633259 | cttTGCcAGGAGAAGgAcAtTGC |
| EMX1－032 | chr10 | 58498683 | agGTtaGAGCAaAAGAAGAAAGG |
| EMX1－033 | chr1 | 35818892 | tAtaCgGAGCAGAAGAAGAATGG |
| EMX1－034 | chr3 | 45605387 | GAGTCCacaCAGAAGAAGAAAGA |
| EMX1－035 | chr3 | 5031614 | GAaTCCaAGCAGgAGAAGAAGGA |
| EMX1－036 | chr12 | 106646090 | aAGTCCatGCAGAAGAgGAAGGG |
| EMX1－037 | chr1 | 23720618 | aAGTCCGAGgAGAgGAAGAAAGG |
| EMX1－038 | chr11 | 107812992 | aAGTCCaAGt－GAAGAAGAAAGG |
| EMX1－039 | chr4 | 169444372 | GAGaaCGAGaAGAAagAGgAGAG |
| EMX1－040 | chr6 | 18327737 | GAGagaGAGagagAGAgGgAGGG |
| EMX1－041 | chr2 | 230161576 | ctGgCaGAGCAaAAGAAGAgGGG |
| EMX1－042 | chr3 | 95690186 | tcaTCCaAGCAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1－043 | chr4 | 33321466 | GtacagGAGCAGgAGAAGAATGG |
| EMX1－044 | chr22 | 49900715 | aAGaagGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－045 | chr12 | 94591214 | GAGagaGAGagagAGAgaAAGGG |
| EMX1－046 | chr5 | 146833190 | GAGcCgGAGCAGAAGAAGgAGGG |
| EMX1－047 | chr6 | 111509461 | GAGggaGAGagGgAGAgagAAAG |
| EMX1－048 | chr1 | 26490139 | ttaTCtccGagaAgGAAGAAGGG |
| EMX1－049 | chr6 | 31265461 | GAtTCtGtcCcGAAtcAGAAGGG |
| EMX1－050 | chr14 | 30099303 | atGcaaGAGaAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1－051 | chr3 | 83057859 | agcaggGAGCAGAgGAAGAATGG |
| EMX1－052 | chr15 | 35575311 | GAGaagGAGaAGAAGAAGAAGGG |

| | | | |
|---|---|---|---|
| EMX1−053 | chr1 | 55846672 | actctaGAGCAGAAaAAGAATGG |
| EMX1−054 | chr6 | 104384459 | GAGgagGAGgAGgAGgAaggAGG |
| EMX1−055 | chr19 | 9975831 | aAagagGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1−056 | chr12 | 99525769 | GgGgagGAGCAGAAGAAGAgAGG |
| EMX1−057 | chr6 | 162280006 | agGcCgagGCAGgAGAAtAgGAG |
| EMX1−058 | chr7 | 85359110 | GAGaagGAGCAGAAaAAGAATGG |
| EMX1−059 | chr2 | 10462867 | acagtaGAGCAGAAGAAGAcTGG |
| EMX1−060 | chr3 | 18195303 | atccaaGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1−061 | chr2 | 57855994 | ataagaGAGCAaAACAAGAAAGG |
| EMX1−062 | chr6 | 33957284 | GAGagaGAGagagAGAgaAACGG |
| EMX1−063 | chr22 | 37474903 | GAGaagGAGaAGAAGgAGAAGAG |
| EMX1−064 | chr8 | 141193983 | aAGaagaAGaAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1−065 | chr1 | 110038435 | tttcggGAGCAGAAGAAGAACAG |
| EMX1−066 | chr4 | 117483357 | atcaCaGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1−067 | chr4 | 6150362 | aAacagGAGCAGAgGAAGAAGGG |
| EMX1−068 | chr2 | 116142148 | aAGaagagGaAGAgGAgGAAAAG |
| EMX1−069 | chr12 | 30794309 | GAaatgGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1−070 | chr22 | 44527016 | GAGagaGAaagaAAGAAaAAGGA |
| EMX1−071 | chr9 | 96189722 | GctgtgGAGCAaAAGAAGAAAGG |
| EMX1−072 | chr8 | 113493465 | GAGgagGAGCAGAAGAAGAAAAG |
| EMX1−073 | chr11 | 46171476 | tAaaagGAGCAGAAaAAGAAGGG |
| EMX1−074 | chrX | 3075272 | tAccttGAGCAaAAGAAGAAGGG |
| EMX1−075 | chr5 | 56038567 | aAGaagGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1−076 | chr2 | 71789100 | GcaggaGAGCAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1−077 | chr7 | 52389195 | aAGagCGAGattAAGAgGAATGG |
| EMX1−078 | chr5 | 31088930 | aAGaaaGgagAGgAGAgGAgAGG |
| EMX1−079 | chr11 | 111680806 | agtagtGAGCAGAAGAAGAtAGG |
| EMX1−080 | chr20 | 51306677 | aAGaagGAGaAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1−081 | chr19 | 38433655 | GAGagaGAGagagAGAgaAAGAG |
| EMX1−082 | chr8 | 60956107 | GgccagGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1−083 | chr16 | 26617803 | agaggaGAGCAGAAGAAGgATGG |
| EMX1−084 | chr12 | 52621931 | aAGaagGAGaAGAAGAAGgAGGA |
| EMX1−085 | chr3 | 156028864 | cAtTaaGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1−086 | chr6 | 40280504 | cgcTgatAcagaAAGAAGAATGG |
| EMX1−087 | chr1 | 35385601 | GAagtgGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1−088 | chr1 | 59299359 | tttgtgGAGCAGAAaAAGAAAGG |
| EMX1−089 | chr15 | 61646877 | aACTCaGAGgACAAGAAGAAGGG |
| EMX1−090 | chr2 | 159685754 | aAagCtGAGCAGAAaAAGAAGGG |
| EMX1−091 | chr12 | 41494108 | GcagtgGAGCAGAAGAAGAtGGG |
| EMX1−092 | chr7 | 119831026 | acaaaaGAGCAGAgGAAGAAAGG |
| EMX1−093 | chr1 | 234492864 | GAagtaGAGCAGAAGAAGAAGCG |
| EMX1−094 | chr14 | 104091588 | aAagagGgagAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1−095 | chr1 | 31954326 | aAGaagGAGaAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1−096 | chr8 | 120587501 | aAGgCCaAGCAGAAGAgtAATGG |
| EMX1−097 | chr2 | 46020469 | acacaaGAGCAGAAGAAGAAAGA |
| EMX1−098 | chr2 | 219294645 | GccaatGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1−099 | chr8 | 11924153 | cAtataGAGCAaAAGAAGAgAGG |
| EMX1−100 | chr6 | 54740531 | GAGgtgGAGggGAAGAgGgAAGG |
| EMX1−101 | chr1 | 156786840 | GAGagaGAGagagAGAgaAAGGG |
| EMX1−102 | chr6 | 30791217 | aAGgagGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1−103 | chr3 | 192777993 | GAGggaGAGagagAGAgagAAAG |
| EMX1−104 | chr2 | 36207879 | agtcggGAGCAGgAGAAGAAAGG |
| EMX1−105 | chr16 | 54831367 | GttcaaGAGCAGAAGAAGAATGG |
| EMX1−106 | chr6 | 160868147 | tctaaaGAGCAGAAaAAGAAAGG |
| EMX1−107 | chr2 | 24438043 | actgatGAGCAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1−108 | chr22 | 37102243 | aAGaagGAGaAGAAGAAGgAGGA |
| EMX1−109 | chr11 | 121786535 | agGaaaagagAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1−110 | chr7 | 3337380 | GAGgagGAGaAGAAGAAGAAGGG |

| | | | |
|---|---|---|---|
| EMX1－111 | chr8 | 112924257 | GAGagaGAGagagAGAgaAAGGG |
| EMX1－112 | chr16 | 69047289 | GAGgCCGAagctgAGgtGggAGG |
| EMX1－113 | chr8 | 105164125 | GAGcCCaAGaAGAAGAAGAAGGA |
| EMX1－114 | chr13 | 83353702 | atGTaCagagAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1－115 | chr2 | 102929260 | GccTtCagagAGAAGAAGAATGG |
| EMX1－116 | chr15 | 22366621 | GgagtaGAGCAGAgGAAGAAGGG |
| EMX1－117 | chr2 | 172374203 | GAagtaGAGCAGAAGAAGAAGCG |
| EMX1－118 | chr8 | 31096390 | GctcCtGAGCAGAAGAAGAACAG |
| EMX1－119 | chr2 | 66729772 | agtTCaGAGCAGgAGAAGAATGG |
| EMX1－120 | chr2 | 14472327 | atGaaCagagAGAAGAAGAATGG |
| EMX1－121 | chr8 | 140468447 | GAGagCGAGagagAGAgagAGGG |
| EMX1－122 | chr7 | 52204863 | aAaaagGAGCAGAAGAAGAAGGA |
| EMX1－123 | chr1 | 151027598 | ttcTCCaAGCAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1－124 | chr1 | 35590719 | GAGagaGAGagagAGAgaAAGGG |
| EMX1－125 | chr1 | 106744880 | ttGgaaagagAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－126 | chr10 | 115484209 | aAGaggaAGaAGAAGAAGAAGAG |
| EMX1－127 | chr3 | 119686684 | GAGagaGAGaAagAGAAagAGAG |
| EMX1－128 | chr8 | 53295601 | GAagaaGAGaAGAAGAAGAAGGG |
| EMX1－129 | chr18 | 12032247 | GAtTCtGAGaAaAttAAGAtGGG |
| EMX1－130 | chr15 | 61383748 | GgGctCcgGCAGAAGAtGccATG |
| EMX1－131 | chr1 | 209298672 | GAtTCCaAGCAatgGAgGAgGGG |
| EMX1－132 | chr7 | 17446438 | GtccaaGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1－133 | chr13 | 74473871 | atcTggGAGCAGgAGAAGAAGGG |
| EMX1－134 | chr5 | 5141237 | GAGgatccGagGAtGtAGAAGGG |
| EMX1－135 | chr12 | 5041728 | GAagaaGAagAaAgaAAGAAAGA |
| EMX1－136 | chr8 | 112756160 | cAGagaGAGaAtAAGtAGcATAG |
| EMX1－137 | chr8 | 17384135 | tgaggaagagAGAAGAAGAAAGG |
| EMX1－138 | chr12 | 4545932 | cAagCatgagAGAAGAAGAtGGG |
| EMX1－139 | chr10 | 58848728 | GAGcaCGAGCAagAGAAGAAGGG |
| EMX1－140 | chr14 | 48932119 | GAGTCCcAGCAaAAGAAGAAAAG |
| EMX1－141 | chr3 | 145057362 | GAGTCCct－CAGgAGAAGAAAGG |
| EMX1－142 | chr9 | 111348573 | GAGTCCttG－AGAAGAAGgAAGG |

【０１２４】

表１に列挙された切断サイトで測定されたｃｏｕｎｔ（同一な５’末端を有するシークエンスリード（ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｒｅａｄｓ）の個数）、ｄｅｐｔｈ（特定位置でのシークエンスリード（ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｒｅａｄｓ）個数）、％（ｃｏｕｎｔ／ｄｅｐｔｈ）およびＣ→Ｔ変換が起こったリード（ｒｅａｄｓ）個数を下記の表２に示した：

【０１２５】

【表２】

| | カウント (count) | 深さ (depth) | %(count ／depth) | C→T 変換 | | グループA | グループB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | (＋)塩基エディター | 未処理 | | |
| EMX1－001 (on－target) | 21 | 51 | 41.2 | 6 | 0 | v | v |
| EMX1－002 | 21 | 39 | 53.8 | 8 | 0 | v | v |
| EMX1－003 | 22 | 41 | 53.7 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－004 | 36 | 79 | 45.6 | 10 | 0 | v | v |
| EMX1－005 | 29 | 68 | 42.6 | 1 | 0 | v | v |
| EMX1－006 | 26 | 62 | 41.9 | 9 | 0 | v | v |
| EMX1－007 | 10 | 29 | 34.5 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－008 | 24 | 86 | 27.9 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－009 | 44 | 159 | 27.7 | 10 | 0 | v | v |
| EMX1－010 | 11 | 41 | 26.8 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－011 | 50 | 109 | 45.9 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－012 | 15 | 43 | 34.9 | 1 | 0 | v | v |
| EMX1－013 | 16 | 46 | 34.8 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－014 | 22 | 64 | 34.4 | 0 | 1 | v | v |
| EMX1－015 | 16 | 53 | 30.2 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－016 | 19 | 63 | 30.2 | 1 | 0 | v | v |
| EMX1－017 | 24 | 82 | 29.3 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－018 | 24 | 85 | 28.2 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－019 | 14 | 50 | 28.0 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－020 | 10 | 36 | 27.8 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－021 | 13 | 47 | 27.7 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－022 | 13 | 48 | 27.1 | 1 | 0 | v | v |
| EMX1－023 | 10 | 37 | 27.0 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－024 | 11 | 42 | 26.2 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－025 | 15 | 58 | 25.9 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－026 | 11 | 43 | 25.6 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－027 | 16 | 67 | 23.9 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－028 | 10 | 44 | 22.7 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－029 | 10 | 45 | 22.2 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－030 | 14 | 63 | 22.2 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－031 | 13 | 61 | 21.3 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－032 | 13 | 61 | 21.3 | N.A. | N.A. | v | v |
| EMX1－033 | 14 | 66 | 21.2 | 0 | 0 | v | v |
| EMX1－034 | 14 | 53 | 26.4 | 2 | 0 | v | v |
| EMX1－035 | 9 | 48 | 18.8 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－036 | 8 | 46 | 17.4 | 1 | 0 | — | v |
| EMX1－037 | 8 | 51 | 15.7 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－038 | 6 | 42 | 14.3 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－039 | 7 | 22 | 31.8 | 1 | 0 | — | v |
| EMX1－040 | 7 | 22 | 31.8 | N.A. | N.A. | — | v |
| EMX1－041 | 7 | 23 | 30.4 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－042 | 7 | 25 | 28.0 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－043 | 6 | 23 | 26.1 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－044 | 7 | 27 | 25.9 | N.A. | N.A. | — | v |
| EMX1－045 | 8 | 35 | 22.9 | N.A. | N.A. | — | v |
| EMX1－046 | 9 | 40 | 22.5 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－047 | 8 | 38 | 21.1 | N.A. | N.A. | — | v |
| EMX1－048 | 5 | 24 | 20.8 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－049 | 7 | 34 | 20.6 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－050 | 8 | 40 | 20.0 | 0 | 0 | — | v |
| EMX1－051 | 6 | 30 | 20.0 | N.A. | N.A. | — | v |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EMX1－052 | 10 | 51 | 19．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－053 | 12 | 63 | 19．0 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－054 | 7 | 37 | 18．9 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－055 | 12 | 64 | 18．8 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－056 | 8 | 43 | 18．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－057 | 5 | 27 | 18．5 | 1 | 0 | － | v |
| EMX1－058 | 9 | 49 | 18．4 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－059 | 13 | 71 | 18．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－060 | 10 | 55 | 18．2 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－061 | 10 | 55 | 18．2 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－062 | 5 | 28 | 17．9 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－063 | 5 | 28 | 17．9 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－064 | 7 | 40 | 17．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－065 | 13 | 76 | 17．1 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－066 | 5 | 30 | 16．7 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－067 | 5 | 30 | 16．7 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－068 | 6 | 36 | 16．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－069 | 19 | 115 | 16．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－070 | 6 | 37 | 16．2 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－071 | 9 | 56 | 16．1 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－072 | 15 | 94 | 16．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－073 | 11 | 70 | 15．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－074 | 7 | 45 | 15．6 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－075 | 9 | 59 | 15．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－076 | 9 | 59 | 15．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－077 | 5 | 33 | 15．2 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－078 | 14 | 93 | 15．1 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－079 | 6 | 40 | 15．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－080 | 11 | 75 | 14．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－081 | 6 | 42 | 14．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－082 | 6 | 43 | 14．0 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－083 | 6 | 43 | 14．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－084 | 7 | 50 | 14．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－085 | 7 | 50 | 14．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－086 | 5 | 36 | 13．9 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－087 | 7 | 51 | 13．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－088 | 7 | 51 | 13．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－089 | 6 | 44 | 13．6 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－090 | 10 | 74 | 13．5 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－091 | 12 | 89 | 13．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－092 | 5 | 37 | 13．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－093 | 7 | 52 | 13．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－094 | 6 | 45 | 13．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－095 | 6 | 46 | 13．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－096 | 11 | 85 | 12．9 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－097 | 6 | 47 | 12．8 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－098 | 5 | 39 | 12．8 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－099 | 6 | 48 | 12．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－100 | 6 | 48 | 12．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－101 | 8 | 64 | 12．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－102 | 7 | 57 | 12．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－103 | 6 | 50 | 12．0 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－104 | 7 | 59 | 11．9 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－105 | 6 | 51 | 11．8 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－106 | 9 | 77 | 11．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－107 | 8 | 69 | 11．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－108 | 5 | 43 | 11．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－109 | 5 | 43 | 11．6 | N．A． | N．A． | － | v |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EMX1－110 | 7 | 61 | 11．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－111 | 7 | 61 | 11．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－112 | 5 | 44 | 11．4 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－113 | 5 | 44 | 11．4 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－114 | 7 | 62 | 11．3 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－115 | 6 | 53 | 11．3 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－116 | 8 | 71 | 11．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－117 | 6 | 53 | 11．3 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－118 | 6 | 54 | 11．1 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－119 | 5 | 45 | 11．1 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－120 | 5 | 46 | 10．9 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－121 | 6 | 55 | 10．9 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－122 | 6 | 55 | 10．9 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－123 | 8 | 75 | 10．7 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－124 | 6 | 56 | 10．7 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－125 | 7 | 66 | 10．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－126 | 5 | 47 | 10．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－127 | 5 | 47 | 10．6 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－128 | 8 | 76 | 10．5 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－129 | 5 | 48 | 10．4 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－130 | 5 | 48 | 10．4 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－131 | 5 | 48 | 10．4 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－132 | 5 | 48 | 10．4 | 1 | 0 | － | v |
| EMX1－133 | 5 | 48 | 10．4 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－134 | 7 | 68 | 10．3 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－135 | 6 | 59 | 10．2 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－136 | 5 | 49 | 10．2 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－137 | 7 | 69 | 10．1 | N．A． | N．A． | － | v |
| EMX1－138 | 5 | 50 | 10．0 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－139 | 5 | 50 | 10．0 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－140 | 7 | 44 | 15．9 | 0 | 0 | － | v |
| EMX1－141 | 5 | 40 | 12．5 | 1 | 0 | － | v |
| EMX1－142 | 6 | 49 | 12．2 | 1 | 0 | － | v |

（N．A．：これらの部位では脱アミノ化されたシトシンはなかったため適用されない）

【０１２６】

上記表２に示されているように、ＢＥ－３処理されたゲノムＤＮＡまたは損傷していない（ＢＥ－３未処理）ゲノムＤＮＡを使用して得られたＷＧＳデータで、１４２個のグループＢ位置のうちの１６個位置（ＢＥ－３処理群）または１個位置（ＢＥ－３未処理群）でＣ→Ｔ変換がそれぞれ観察された。これら位置のうちの７０個位置はＢＥ３－媒介デアミネーションのウィンドウ（ｗｉｎｄｏｗ）である４～８番位置（５’から３’方向に１～２０番でナンバリングされる）にシトシンを有しない（表２でＮ．Ａ．と表示）。

【０１２７】

Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑによって確認されたグループＡとグループＢサイトの一部での非標的効果（ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｅｆｆｅｃｔ）を確認するために、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞で標的深層シークエンシング（ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｄｅｅｐ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）を行い、ＢＥ３－誘導塩基編集頻度とＣａｓ９－誘導インデル（ｉｎｄｅｌ）頻度を測定して、下記の表３に示した：

【０１２８】

【表３】

| | NGSによる有効性確認 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Indel頻度(%) | | | 塩基編集頻度(%) | | |
| | (－)Cas9 | (＋)Cas9 | 有効性 | (－)BE3 | (＋)BE3 | 有効性 |
| EMX1－001 (on－target) | 0.15 | 61.59 | 有効 | 0.10 | 49.33 | 有効 |
| EMX1－002 | 0.01 | 0.01 | 無効 | 0.16 | 1.05 | 有効 |
| EMX1－003 | 0.00 | 7.94 | 有効 | 0.24 | 4.04 | 有効 |
| EMX1－004 | 0.00 | 0.01 | 有効 | 0.16 | 0.93 | 有効 |
| EMX1－005 | 0.00 | 8.63 | 有効 | 0.05 | 2.47 | 有効 |
| EMX1－006 | 0.29 | 38.25 | 有効 | 0.04 | 15.59 | 有効 |
| EMX1－007 | 0.01 | 0.01 | 無効 | 0.08 | 0.13 | 有効 |
| EMX1－008 | 0.02 | 0.17 | 有効 | 0.03 | 0.62 | 有効 |
| EMX1－009 | 0.10 | 3.45 | 有効 | 0.02 | 0.15 | 有効 |
| EMX1－010 | 0.08 | 0.08 | 無効 | 0.07 | 0.70 | 有効 |
| EMX1－034 | 0.00 | 0.00 | 無効 | 0.33 | 0.40 | 無効 |
| EMX1－035 | 0.46 | 0.89 | 有効 | 0.23 | 0.48 | 有効 |
| EMX1－036 | 0.01 | 0.02 | 無効 | 0.09 | 0.31 | 有効 |
| EMX1－037 | 0.01 | 0.23 | 有効 | 0.20 | 0.23 | 有効 |
| EMX1－038 | 0.01 | 0.01 | 無効 | 0.14 | 0.16 | 有効 |
| EMX1－140 | 0.01 | 0.00 | 無効 | 0.38 | 0.36 | 無効 |
| EMX1－141 | 0.00 | 0.00 | 無効 | 0.30 | 0.37 | 無効 |
| EMX1－142 | 0.01 | 0.01 | 無効 | 0.19 | 0.17 | 無効 |

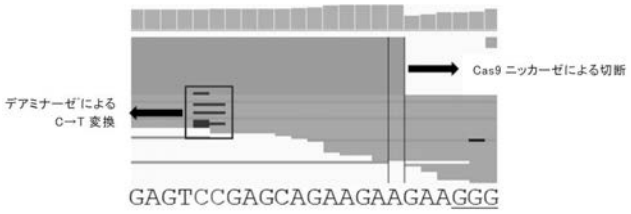
【０１２９】

表３に示されているように、総１８個のサイトを分析し、ＥＭＸ１標的サイト（ＥＭＸ１　ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅ）を含む１４個のサイトでシークエンシングエラーによるノイズ（ｎｏｉｓｅ）水準（０．００２～０．３８％）以上の頻度でＢＥ３による点突然変異が起こるのを観察した（有効性確認比率７８％）。ＢＥ３はバックグラウンドノイズ（ｂａｃｋｇｒｏｕｎｄ　ｎｏｉｓｅ）水準より低い頻度で他のＢＥ３－関連Ｄｉｇｅｎｏｍｅ－陽性サイトで変異を誘導することが可能である。重要なことは、前記方法によって０．１３％以下の頻度で塩基編集が検出されるＢＥ３非標的位置の確認が可能であるということであり、これはＤｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑが非常に敏感な方法であるのを示す。ＥＭＸ１に特異的なＣａｓ９ヌクレアーゼはノイズ水準以上の頻度で１８個位置のうちの９個位置でインデル（ｉｎｄｅｌｓ）を誘導し、これはＢＥ３およびＣａｓ９非標的位置が時々異なるということを示す。総合すれば、このような結果は、ＢＥ３非標的位置がＤｉｇｅｎｏｍｅ－ｓｅｑデータを使用して確認できるのを示す。

【０１３０】

以上の説明から、本発明の属する技術分野の当業者は本発明がその技術的な思想や必須的特徴を変更せずに他の具体的な形態で実施できるということを理解することができるはずである。これに関連して、以上で述べた実施例は全ての面で例示的なものであり、限定的なものではないと理解しなければならない。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは後述する特許請求範囲の意味および範囲、そしてその等価概念から導出される全ての変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれると解釈されなければならない。

【図１】



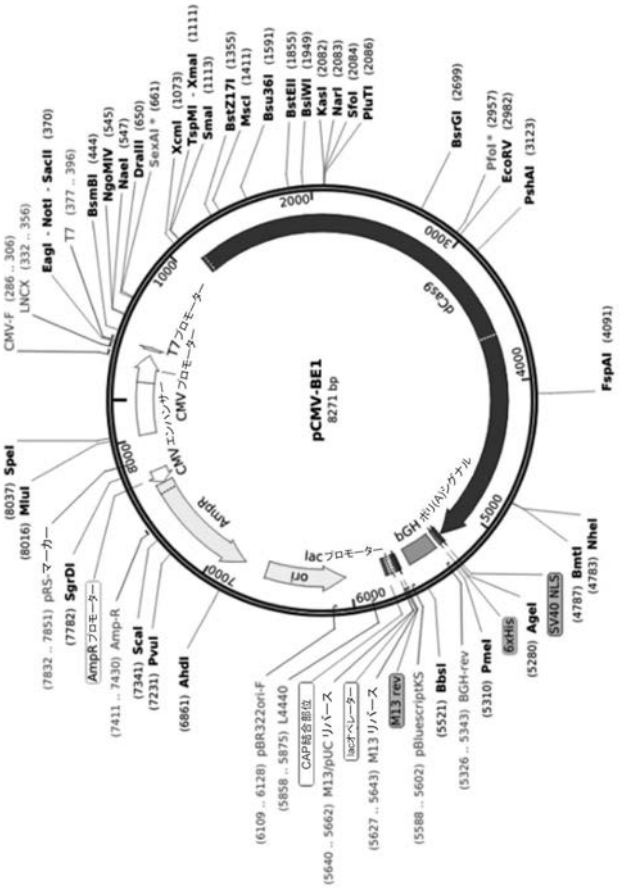

（配列番号 14）

【図２】

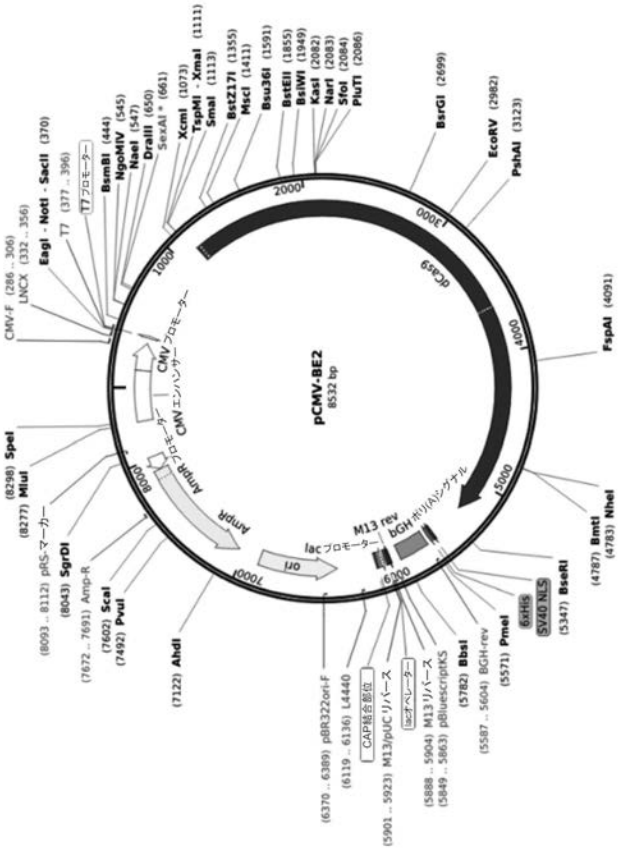
*EMX1*

| | 5'末端カウント ≥ 10 かつ 5'末端カウント/深さ ≥ 20% | 5'末端カウント ≥ 5 かつ 5'末端カウント/深さ ≥ 10% |
|---|---|---|
| 部位(サイト)の数 | 1807 | 90496 |
| 10 個以下の不一致を有する PAM 含有部位の数 | 34(グループ A) | 142(グループ B) |

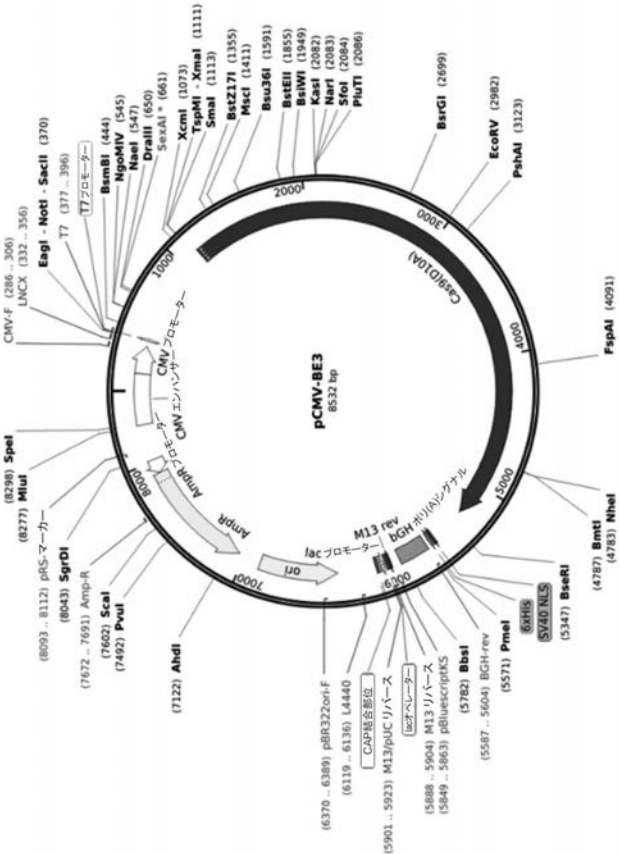
【図３ａ】



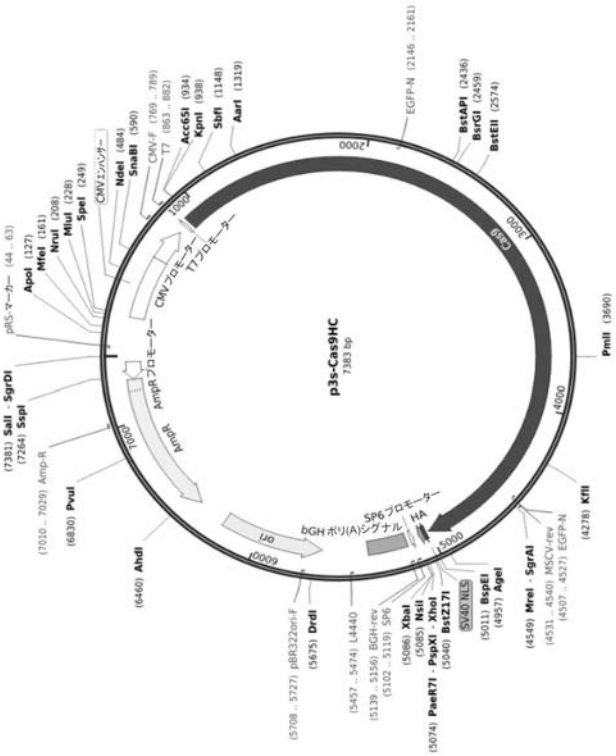

【図３ｂ】



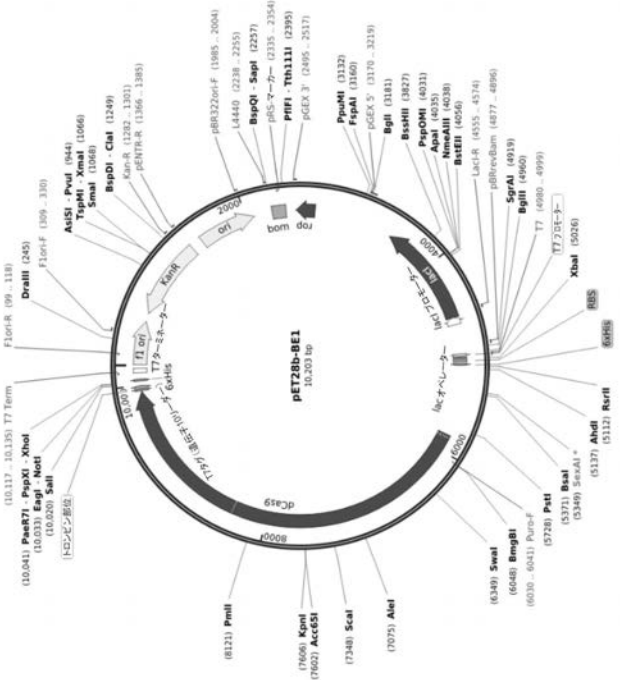

【図３ｃ】



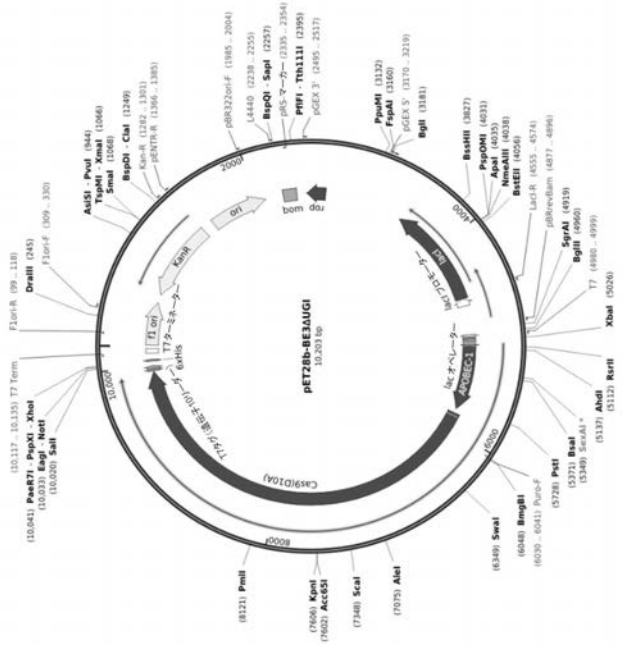
【図４】


p3s-Cas9HC
7383 bp
Cas9
CMVプロモーター
T7プロモーター
AmpR
AmpRプロモーター
ori
bGHポリ(A)シグナル
SP6プロモーター
HA
SV40 NLS
EGFP-N
MSCV-rev
pBR322ori-F
Amp-R
pBS-マーカー
CMVエンハンサー

【図５】


pET28b-BE1
10,203 bp
dCas9
lacオペレーター
T7プロモーター
T7ターミネーター
6xHis
KanR
ori
pBR322ori-F
pBS-マーカー
pGEX 3'
pGEX 5'
pBRrevBam
T7
Puro-F
LacI-R
T7 Term
Flori-F
Flori-R
Kan-R
pET-R

【図６】


pET28b-BE3ΔUGI
10,203 bp
Cas9(D10A)
lacオペレーター
T7プロモーター
T7ターミネーター
6xHis
KanR
ori
pBR322ori-F
pBS-マーカー
pGEX 3'
pGEX 5'
pBRrevBam
T7
Puro-F
LacI-R
T7 Term
Flori-F
Flori-R
Kan-R
pET-R

【配列表】
2020505062000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/KR2018/000747**

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12N 9/78(2006.01)i***

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)

C12Q 1/68; C12N 9/22; C12N 9/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cytidine deaminase, endonuclease inactivity Cas9, guide RNA, off-target site, base editing site, DNA read alignment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | KR 10-2016-0058703 A (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) 25 May 2016<br>See paragraphs [0003], [0041]-[0042]; and claims 1-3, 7, 17-18, 21. | 1-4,12-15 |
| Y | KOMOR, Alexis C. et al., "Programmable Editing of a Target Base in Genomic DNA without Double-stranded DNA Cleavage", Nature, 19 May 2016, vol. 533, pages 420-424 and METHODS<br>See page 420; figure 1; and METHODS. | 1-4,12-15 |
| A | KIM, Daesik et al., "Digenome-seq: Genome-wide Profiling of CRISPR-Cas9 Off-target Effects in Human Cells", Nature Methods, March 2015, vol. 12, no. 3, pages 237-243 and ONLINE METHODS<br>See pages 237, 239-241; and ONLINE METHODS. | 1-4,12-15 |
| A | YANG, Luhan et al., "Engineering and Optimising Deaminase Fusions for Genome Editing", Nature Communications, 02 November 2016, vol. 7, Article No. 13330, inner pages 1-11<br>See pages 1-2, 6-8. | 1-4,12-15 |
| A | CHO, Seung Woo et al., "Analysis of Off-target Effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided Endonucleases and Nickases", Genome Research, 2014, vol. 24, pages 132-141<br>See pages 132-135, 137-138; and figure 4. | 1-4,12-15 |

☒ 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
"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 |
|---|---|
| 19 OCTOBER 2018 (19.10.2018) | **22 OCTOBER 2018 (22.10.2018)** |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br>Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea<br>Facsimile No. +82-42-481-8578 | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/KR2018/000747**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| PX | KIM, Daesik et al., "Genome-wide Target Specificities of CRISPR RNA-guided Programmable Deaminases", Nature Biotechnology, 10 April 2017, vol. 35, pages 475-780 (inner pages 1-6) and ONLINE METHODS<br>See pages 3-5; and ONLINE METHODS. | 1-4,12-15 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/KR2018/000747**

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: **5-11**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
**PCT/KR2018/000747**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member | Publication date |
|---|---|---|---|
| KR 10-2016-0058703 A | 25/05/2016 | CN 107109486 A | 29/08/2017 |
| | | EP 3219810 A1 | 20/09/2017 |
| | | JP 2017-533724 A | 16/11/2017 |
| | | KR 10-1828933 B1 | 14/02/2018 |
| | | WO 2016-076672 A1 | 19/05/2016 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

# 국제조사보고서

국제출원번호
**PCT/KR2018/000747**

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

**C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12N 9/78(2006.01)i**

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68; C12N 9/22; C12N 9/78

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 시티딘 디아미나제, 엔도뉴클레아제 불활성 Cas9, 가이드 RNA, 비표적 위치, 염기 교정 위치, DNA 리드 정렬

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| Y | KR 10-2016-0058703 A (기초과학연구원) 2016.05.25<br>단락 [0003] [0041]-[0042]; 및 청구항 1-3, 7, 17-18, 21 참조. | 1-4,12-15 |
| Y | KOMOR, ALEXIS C. 등, 'Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage', Nature, 2016.05.19, 533권,<br>페이지 420-424 및 METHODS<br>페이지 420; 도면 1; 및 METHODS 참조. | 1-4,12-15 |
| A | KIM, DAESIK 등, 'Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells', Nature Methods, 2015.03, 12권, 3호,<br>페이지 237-243 및 ONLINE METHODS<br>페이지 237, 239-241; 및 ONLINE METHODS 참조. | 1-4,12-15 |
| A | YANG, LUHAN 등, 'Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing', Nature Communications, 2016.11.02, 7권, Article No. 13330,<br>내부 페이지 1-11<br>페이지 1-2, 6-8 참조. | 1-4,12-15 |
| A | CHO, SEUNG WOO 등, 'Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases', Genome Research, 2014, 24권,<br>페이지 132-141<br>페이지 132-135, 137-138; 및 도면 4 참조. | 1-4,12-15 |

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

| 국제조사의 실제 완료일 | 국제조사보고서 발송일 |
|---|---|
| 2018년 10월 19일 (19.10.2018) | 2018년 10월 22일 (22.10.2018) |

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
**PCT/KR2018/000747**

C(계속). 관련 문헌

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| PX | KIM, DAESIK 등, 'Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases', Nature Biotechnology, 2017.04.10, 35권, 페이지 475-780(내부 페이지 1-6) 및 ONLINE METHODS 페이지 3-5; 및 ONLINE METHODS 참조. | 1-4,12-15 |

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지의 계속) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
**PCT/KR2018/000747**

**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☒ 청구항: 5-11
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

**이의신청에 관한 기재**

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

**국제조사보고서**
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
**PCT/KR2018/000747**

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 |
|---|---|---|---|
| KR 10-2016-0058703 A | 2016/05/25 | CN 107109486 A | 2017/08/29 |
| | | EP 3219810 A1 | 2017/09/20 |
| | | JP 2017-533724 A | 2017/11/16 |
| | | KR 10-1828933 B1 | 2018/02/14 |
| | | WO 2016-076672 A1 | 2016/05/19 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| ***C12N*** | ***9/22*** | ***(2006.01)*** | C12N | 9/22 | |
| ***C12N*** | ***9/14*** | ***(2006.01)*** | C12N | 9/14 | |
| *C12N* | *1/21* | *(2006.01)* | C12N | 1/21 | |

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AB01 BA02 CA23 CA24